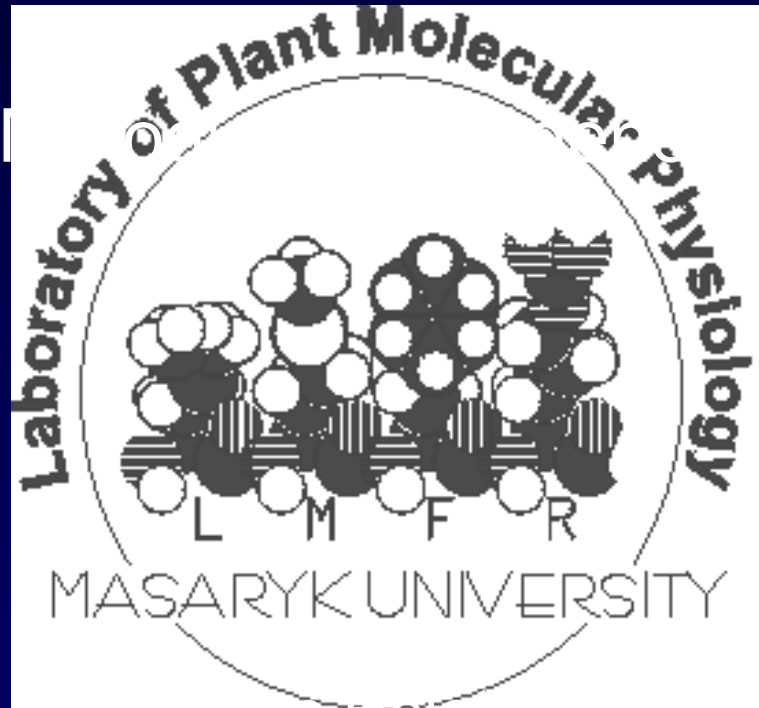


Základy genomiky

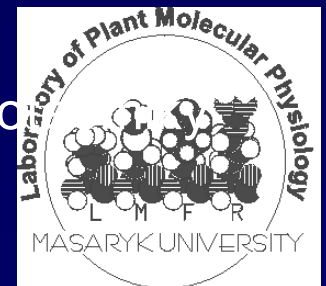
IV. |

ky



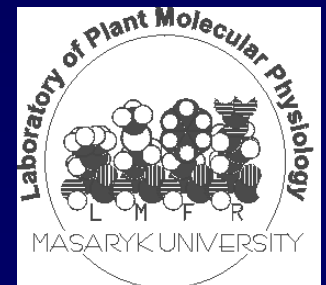
Jan Hejato

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



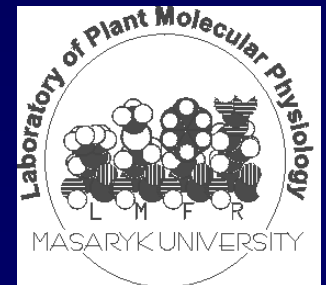
Základy genomiky IV.

- 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



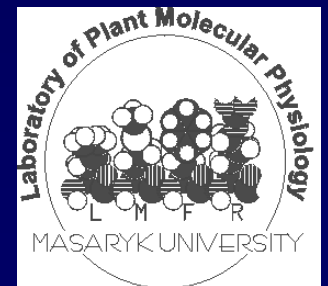
Genomika IV.

- 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.

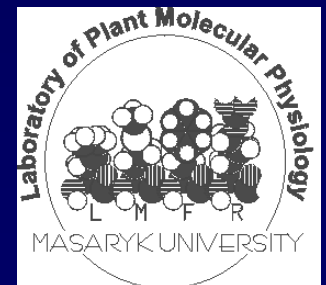
- Nové trendy
 - chemická genetika



Genomika IV.

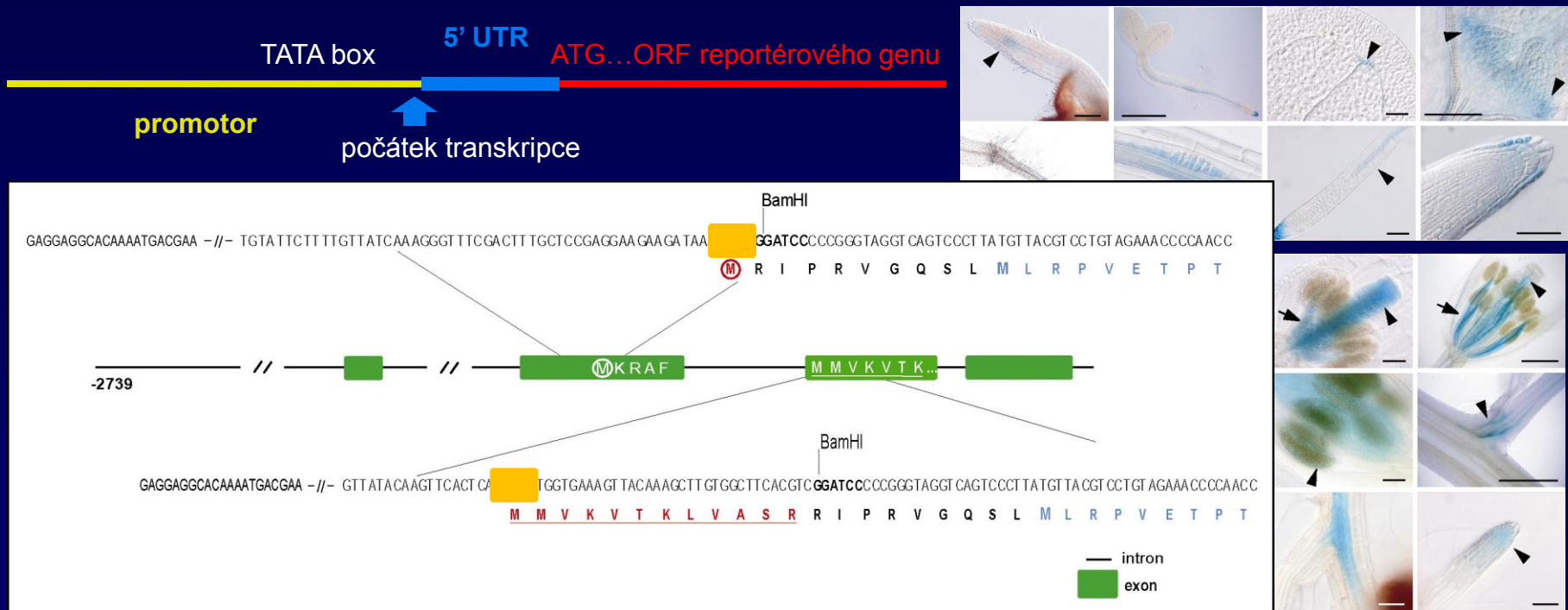
analýza genové exprese

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



Genomika IV. analýza genové exprese

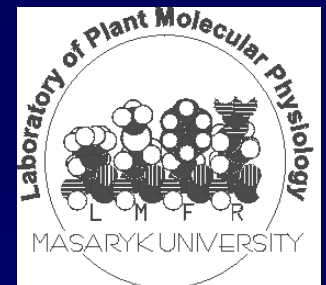
- Transkripční fúze s promotorovou oblastí
 - Identifikace a klonování promotorové oblasti genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP)
 - příprava transgenních organismů nesoucích tuto rekombinantní DNA a jejich histologická analýza



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 I

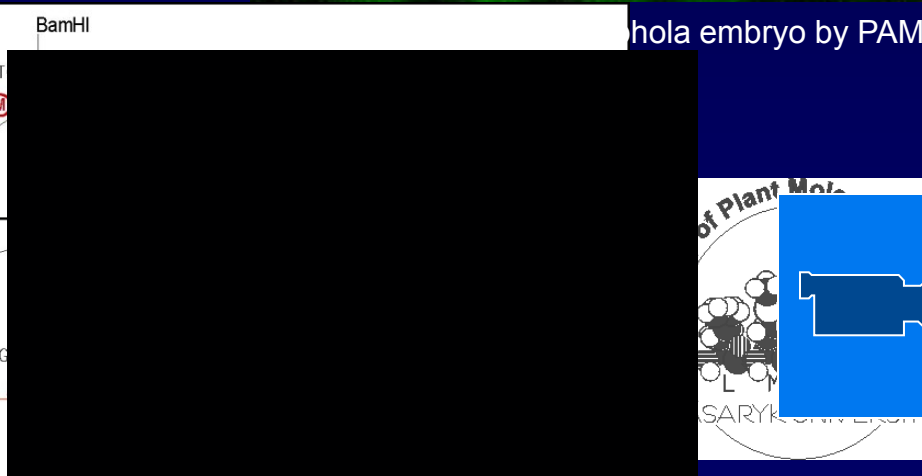
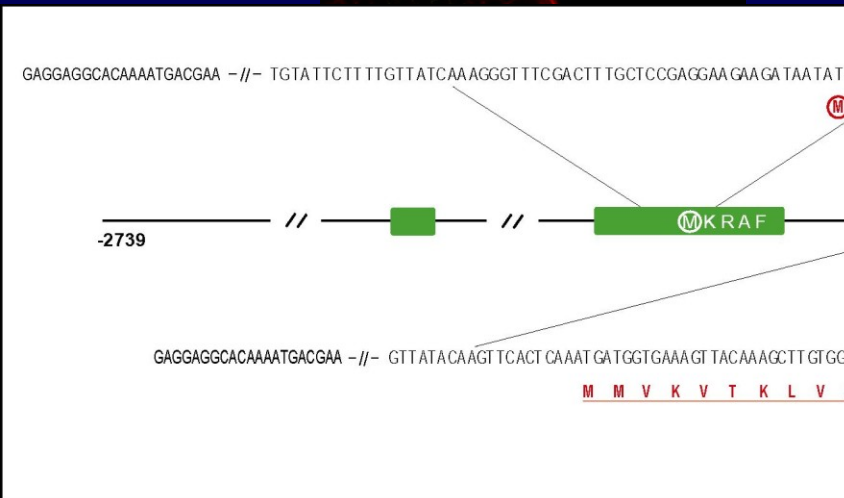
analýza genové exp

- Translační fúze kódující oblasti analyzované reportérovým genem
 - Identifikace a klonování promotorové a genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí p (GFP) ve fúzi s reportérovým genem
 - příprava transgenních organismů nesoucí jejich histologická analýza

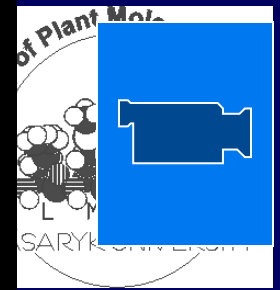
TATA box oproti transkripční fúzi umožňuje analýzu
genového produktu (proteinu) nebo jeho

promotor

počátek transkripce



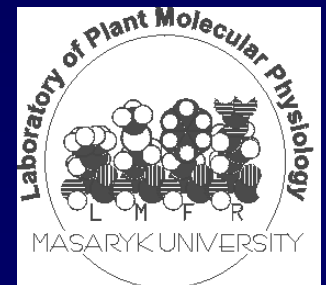
ATP, GFP, Elmer's glue, tonoplast movement



Genomika IV.

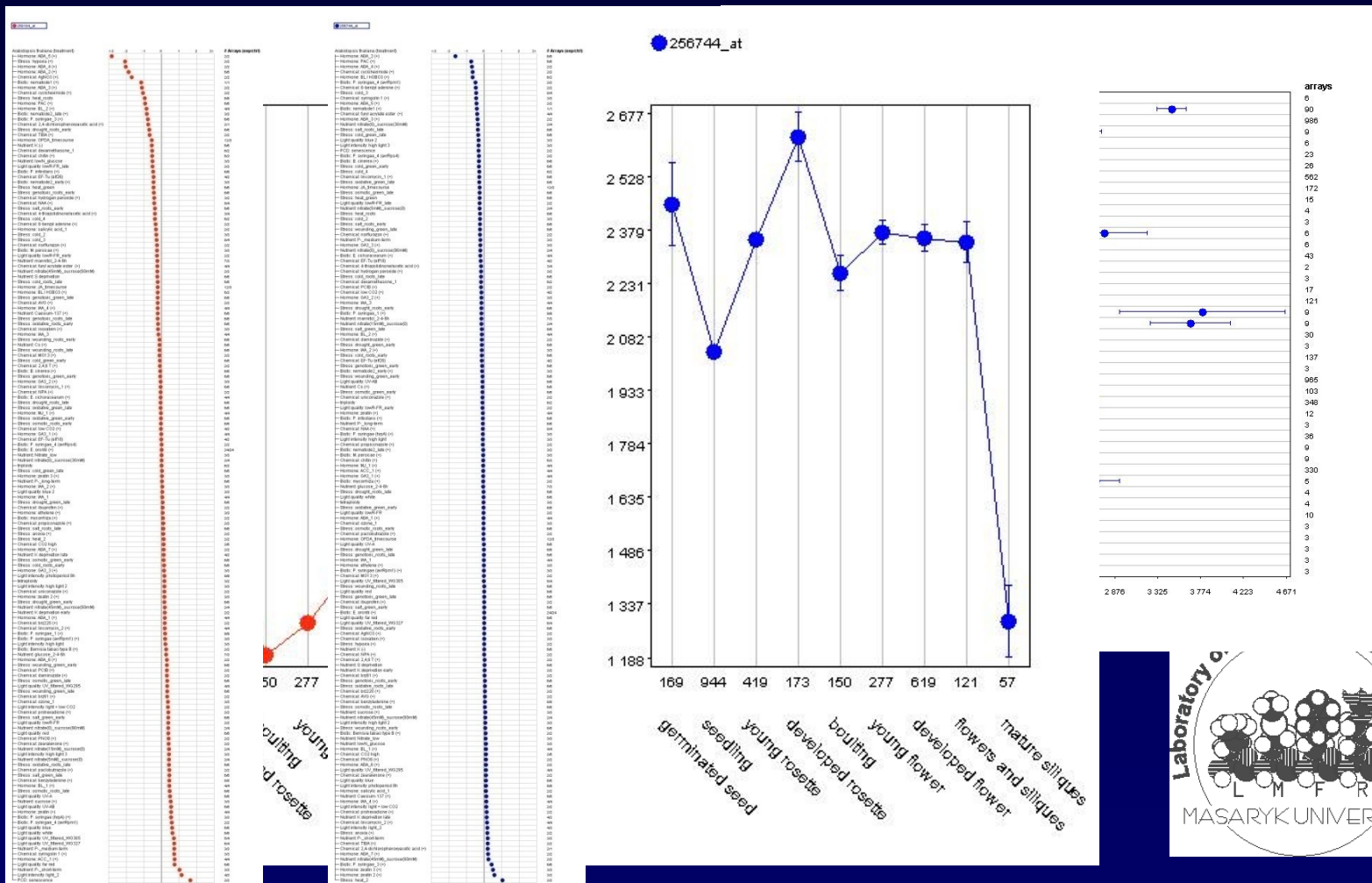
analýza genové exprese

- 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



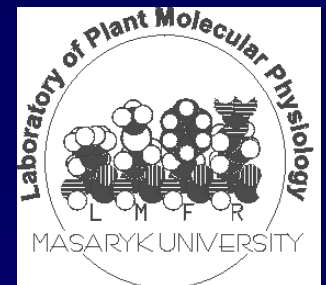
Genomika IV. analýza genové exprese

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



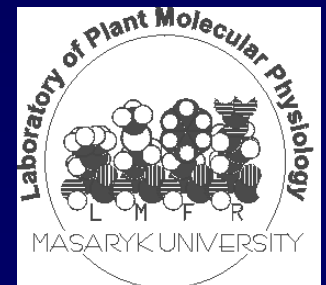
Genomika IV.

- 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



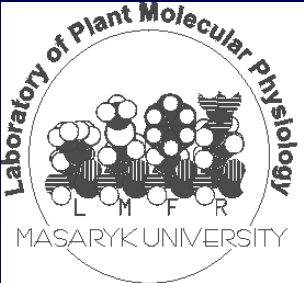
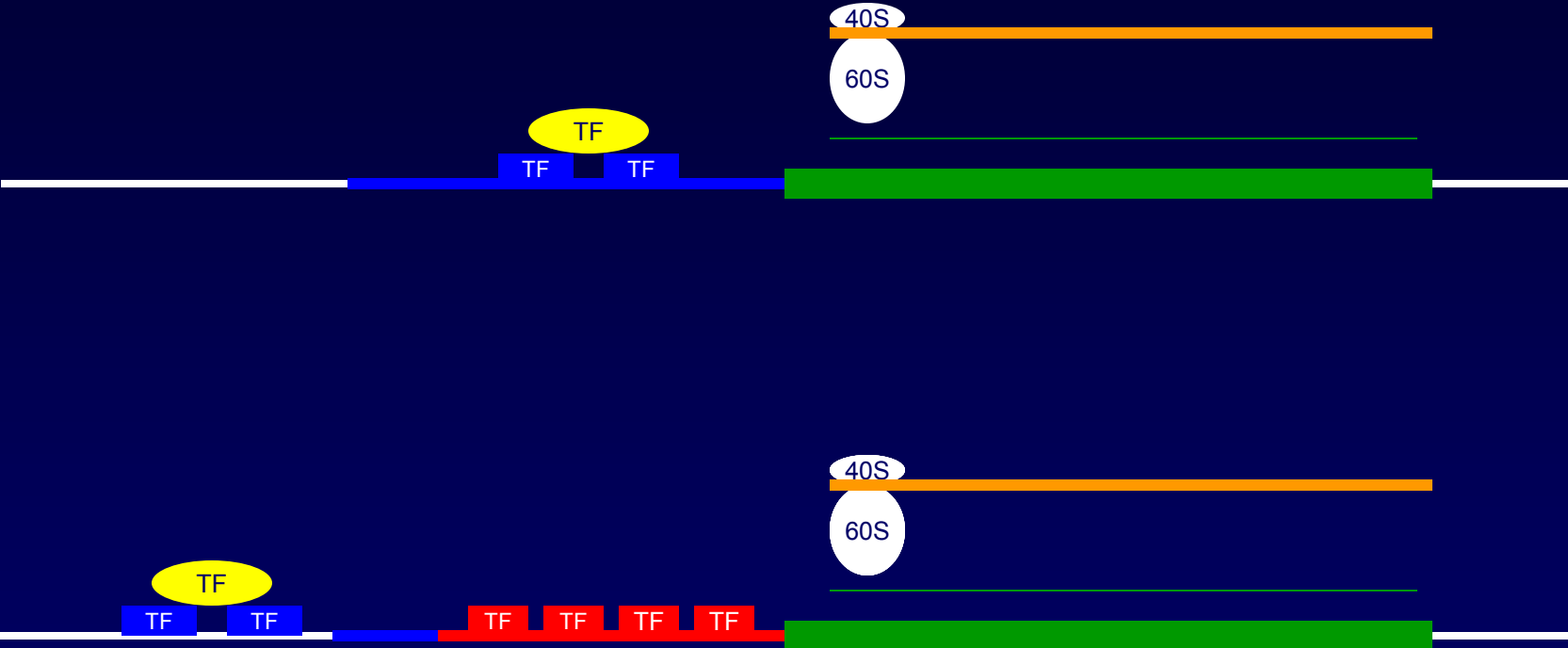
Genomika IV.

- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese
 - 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



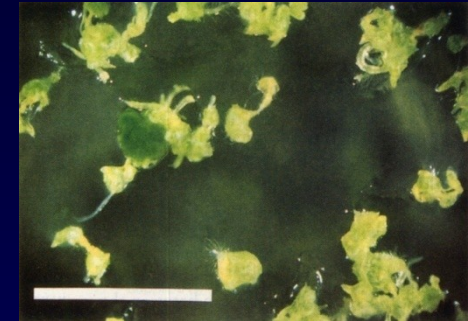
Genomika IV.

aktivační mutagenese

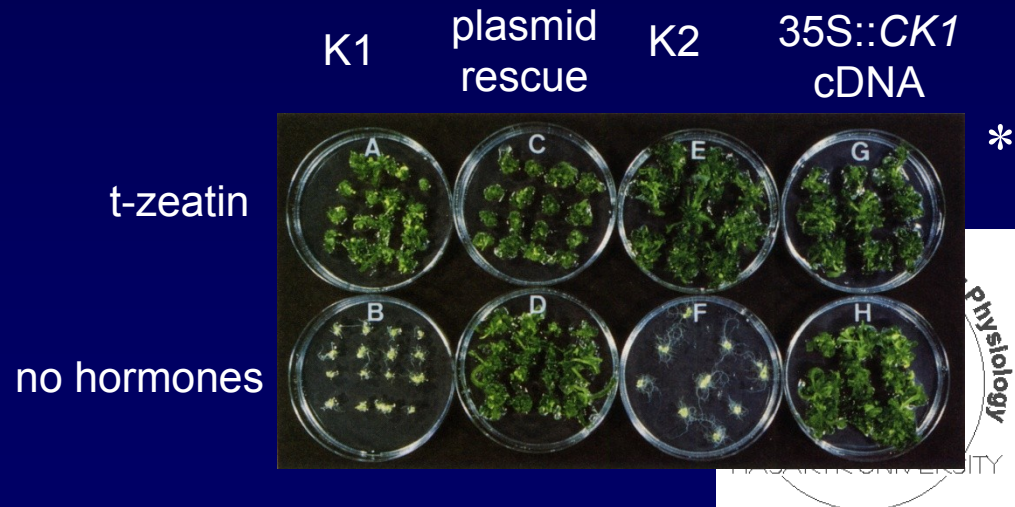


Izolace genu *CK11*

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

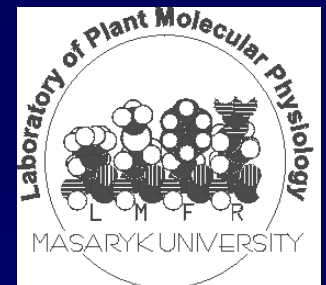


- mutantní fenotyp je fenokopii exogenní aplikace cytokininů (*CK11*, C*YTO*K*I*N*I*N *I*N*D**E**P**E**N**D**E**N**T**1*)



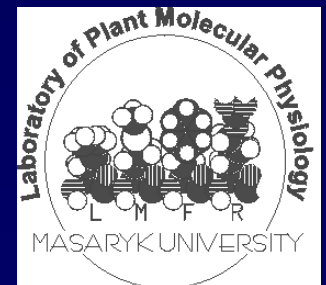
Genomika IV.

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



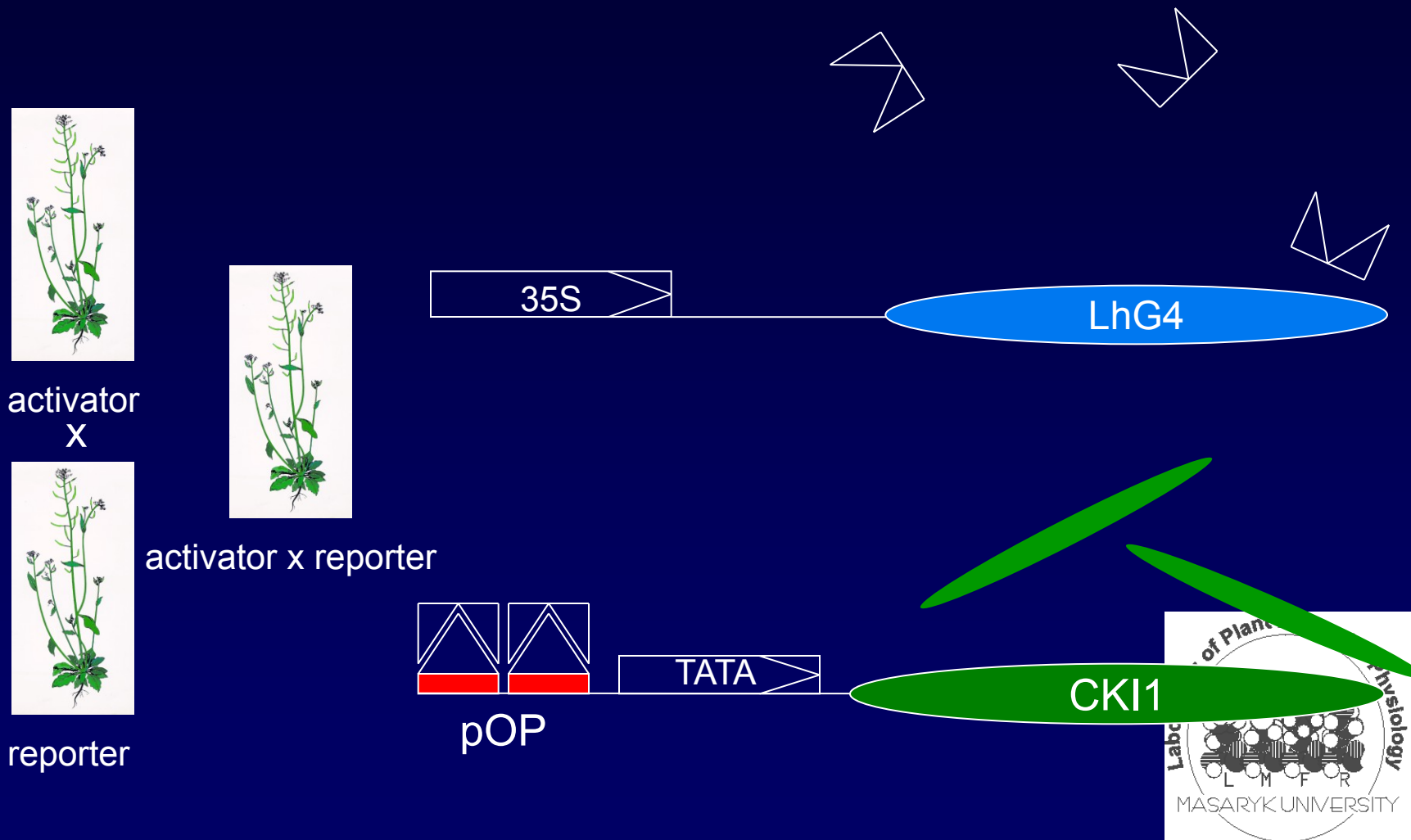
Genomika IV.

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



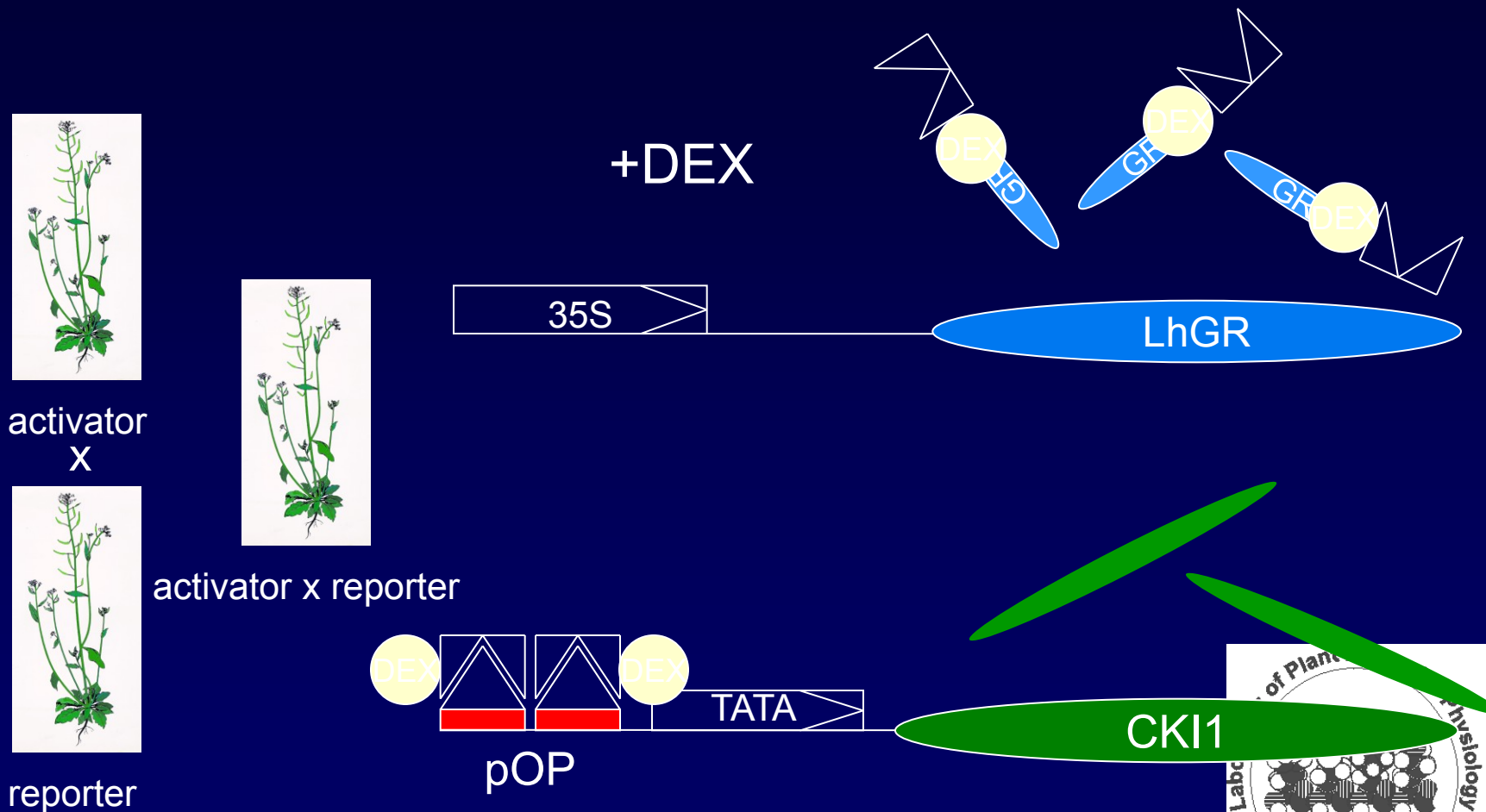
Genomika IV.

systemy regulované exprese, pOP



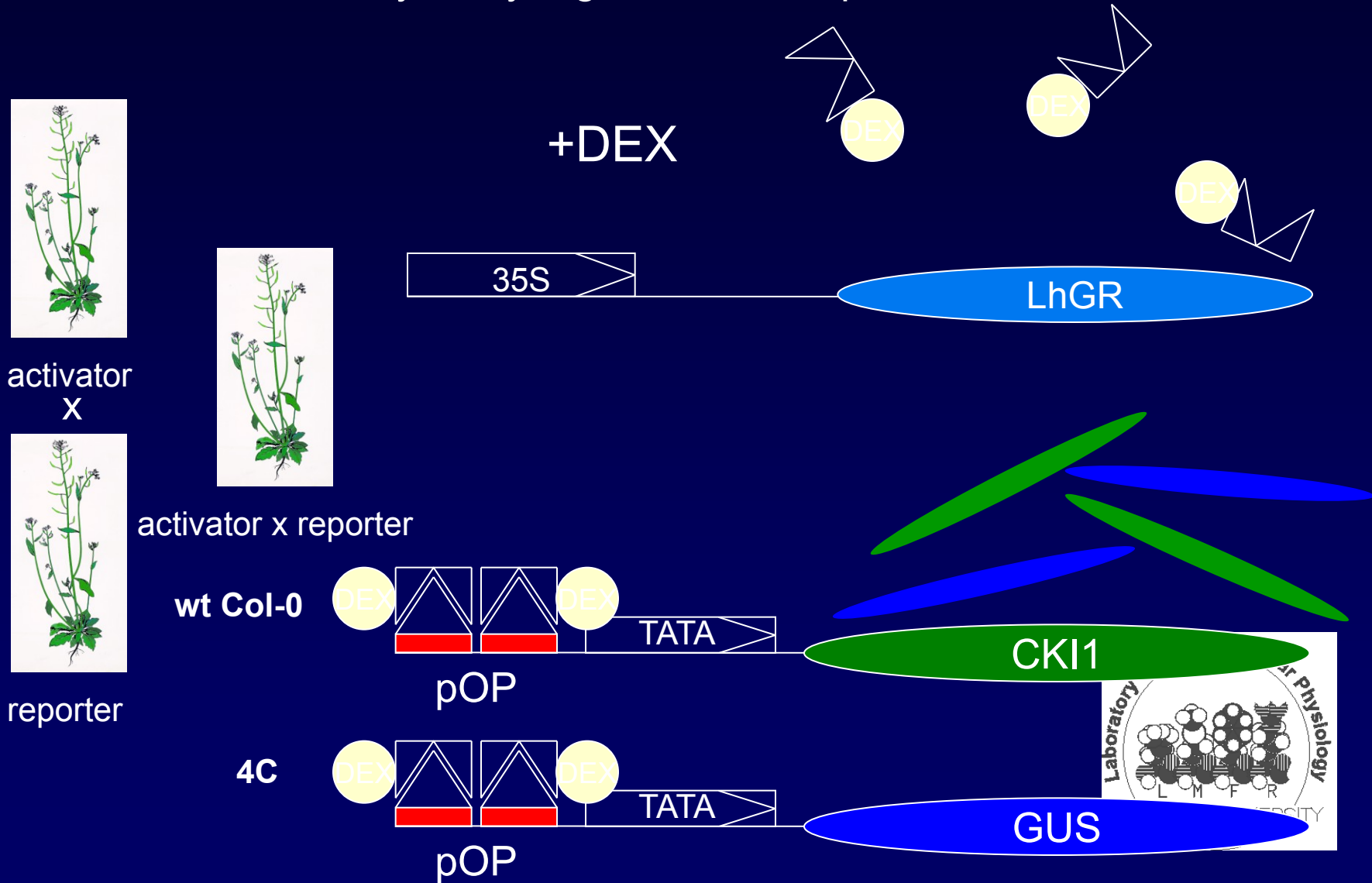
Genomika IV.

systemy regulované exprese, pOP



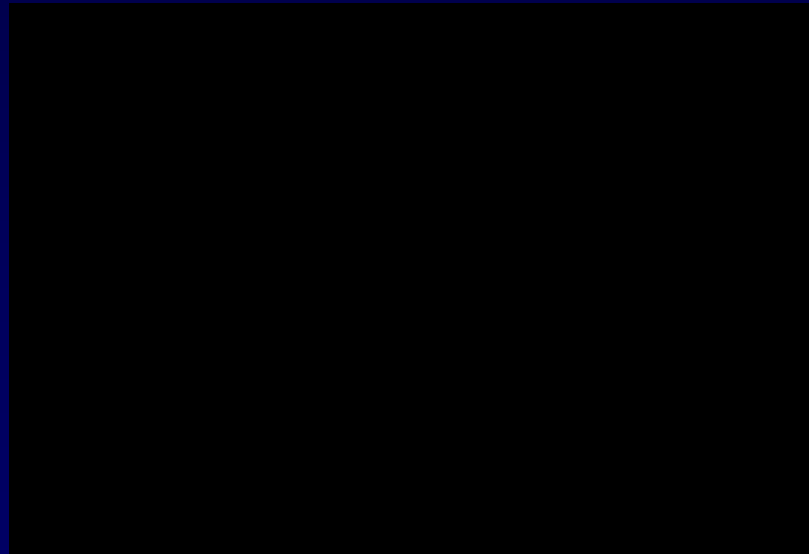
Genomika IV.

systemy regulovateľné exprese

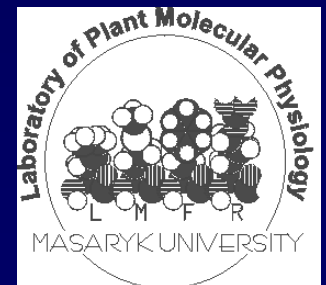


Genomika IV.

- 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

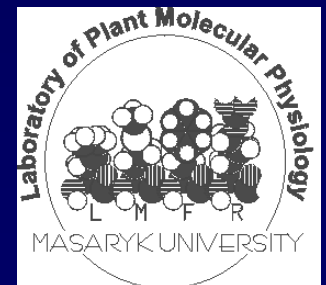


<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/>



Genomika IV.

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



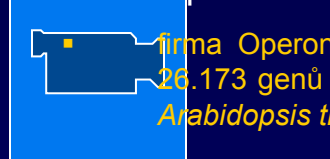
Genomika IV.

- 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**

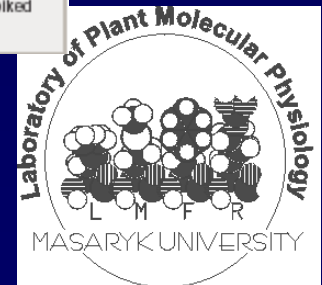


- možnost použití syntézy oligonukleotidů touto technikou

| 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. Arabidopsis 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

Search 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 | |
| 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 | |

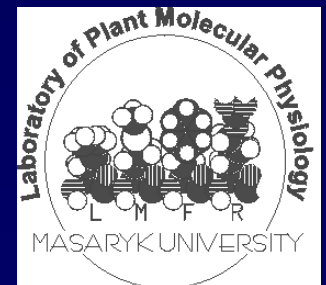
- v současnosti je již velké množství výsledků různých experimentů lokalizovaných ve veřejně přístupných databázích



Genomika IV.

proteinové čipy

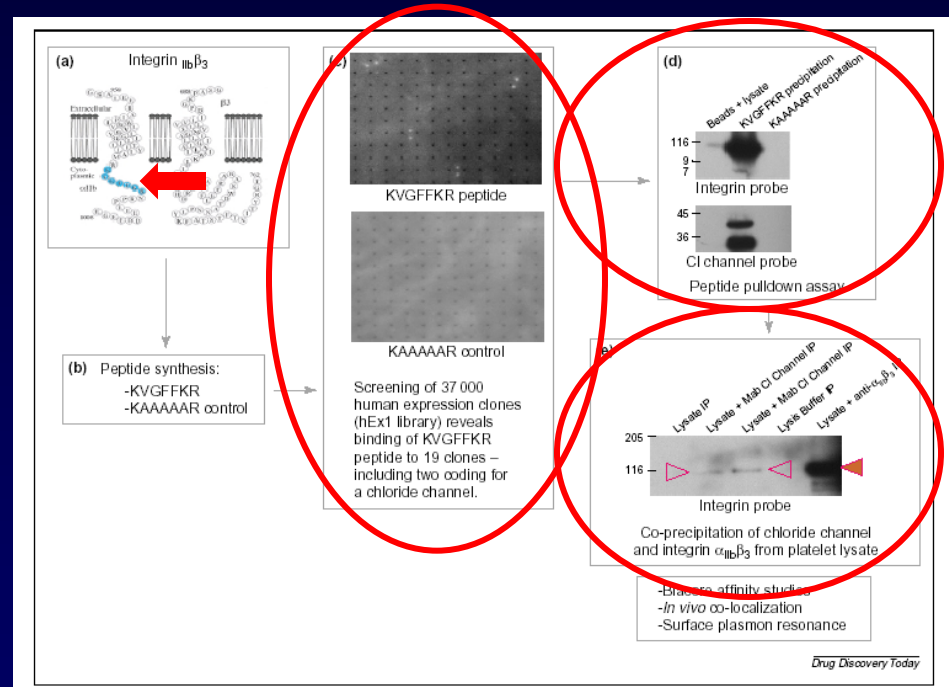
- Proteinové čipy
 - čipy s vysokou denzitou obsahující řádově 10^4 proteinů
 - analýza protein-proteinových interakcí, substrátů kináz a interakcí s malými molekulami
 - možnost použít protilátky – stabilnější než samotné proteiny



Genomika IV. proteinové čipy

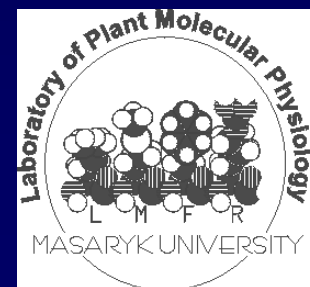
- Identifikace proteinů interagujících s cytoplasmatickou částí integrinu $\alpha_{IIb}\beta_3$ krevních destiček

- 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)



Genomika IV.

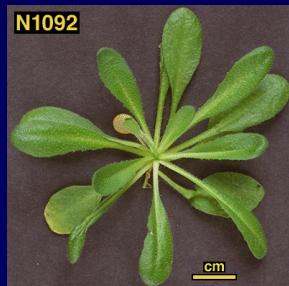
- Metody identifikace genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese
 - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Fenotypové profilování
 - DNA a proteinové čipy
 - metabolické profilování
 - metody mikrodisekce
 - proteomické přístupy
- Metody využívané ve funkční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



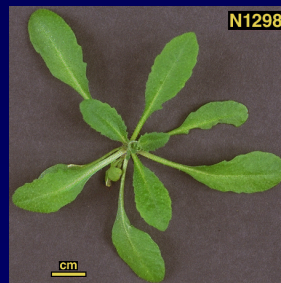
Arabidopsis thaliana

huseníček polní, mouse-ear cress

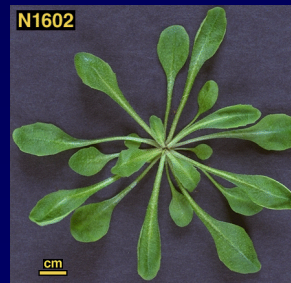
- malé nároky na kultivační plochu
- velké množství semen (20.000/roslinu a více)
- malý a kompaktní genom, (125 MBp, cca 25.000 genů, prům. velikost 3 kb)
- 5 chromozomů
- vhodná pro široké spektrum fyziologických experimentů
- velká přirozená variabilita (cca 750 ekotypů (Nottingham Arabidopsis Seed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



Columbia 0



Landsberg 0



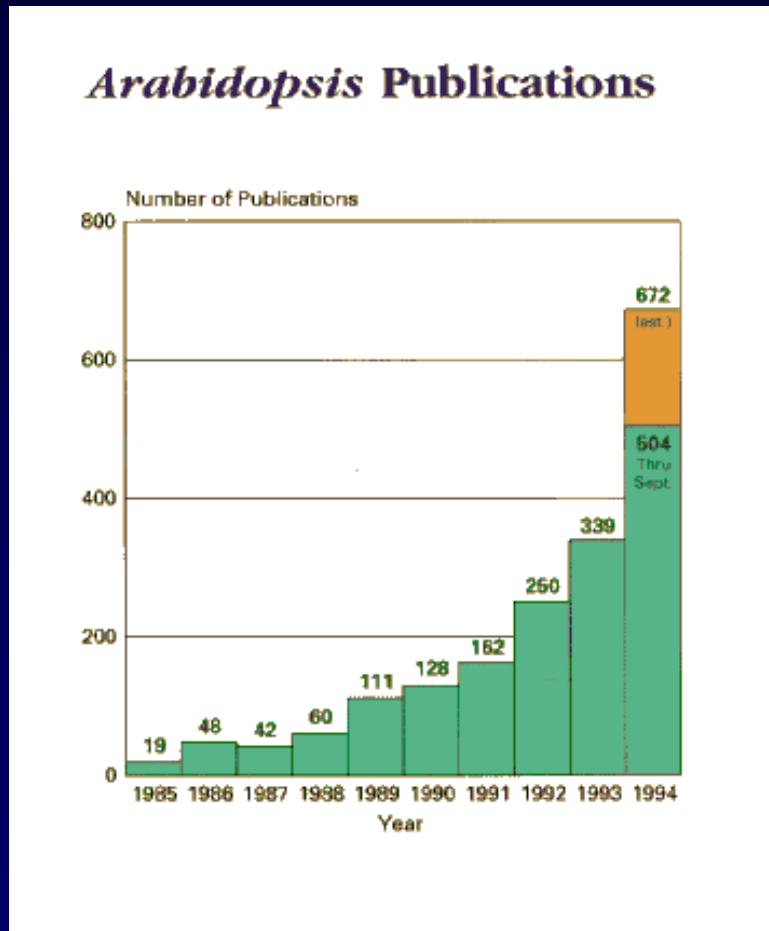
Wassilewskija 0



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

Arabidopsis, významný rostlinný model

Počet záznamů v databázi „PubMed“ (MEDLINE) vyhledaných pod heslem „*Arabidopsis*“ **25.690/29.146** (16.10. 2008/22.10. 2009, meziroční nárůst 13%). (Pro srovnání, pod heslem „*human*“ nalezeno 10 620.405/ 11 151.170 záznamů), nárůst 5%.



National Science Foundation, USA, , <http://www.nsf.gov/bio/pubs/arabid/chap1.htm>

| 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 | 3,864 |
| PubMed Central | 50,203 |
| Gene | 1 |
| Taxonomy | 1 |

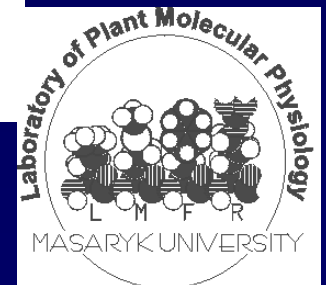


TAIR, <http://www.arabidopsis.org/info/aboutarabidopsis.jsp>

Transformace *Arabidopsis* prostřednictvím *Agrobacteria tumefaciens*

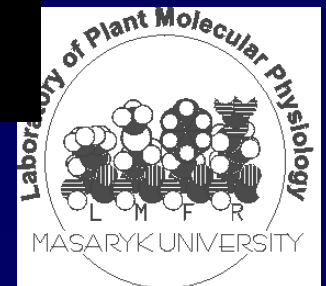
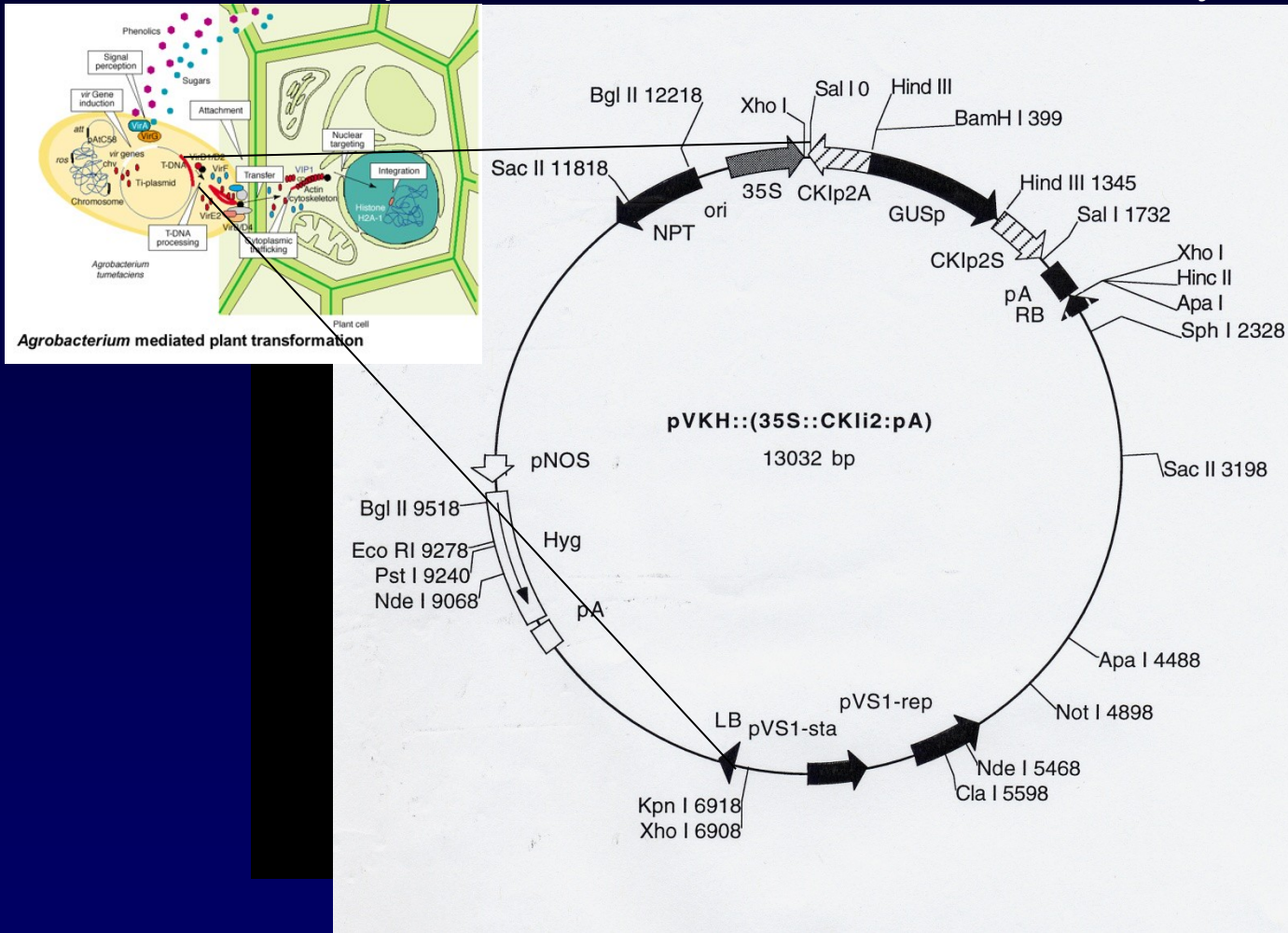


Crown gall of raspberry caused by *Agrobacterium tumefaciens*.



Transformace *Arabidopsis* prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*

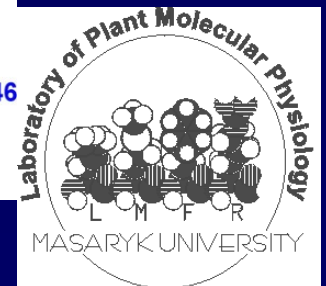
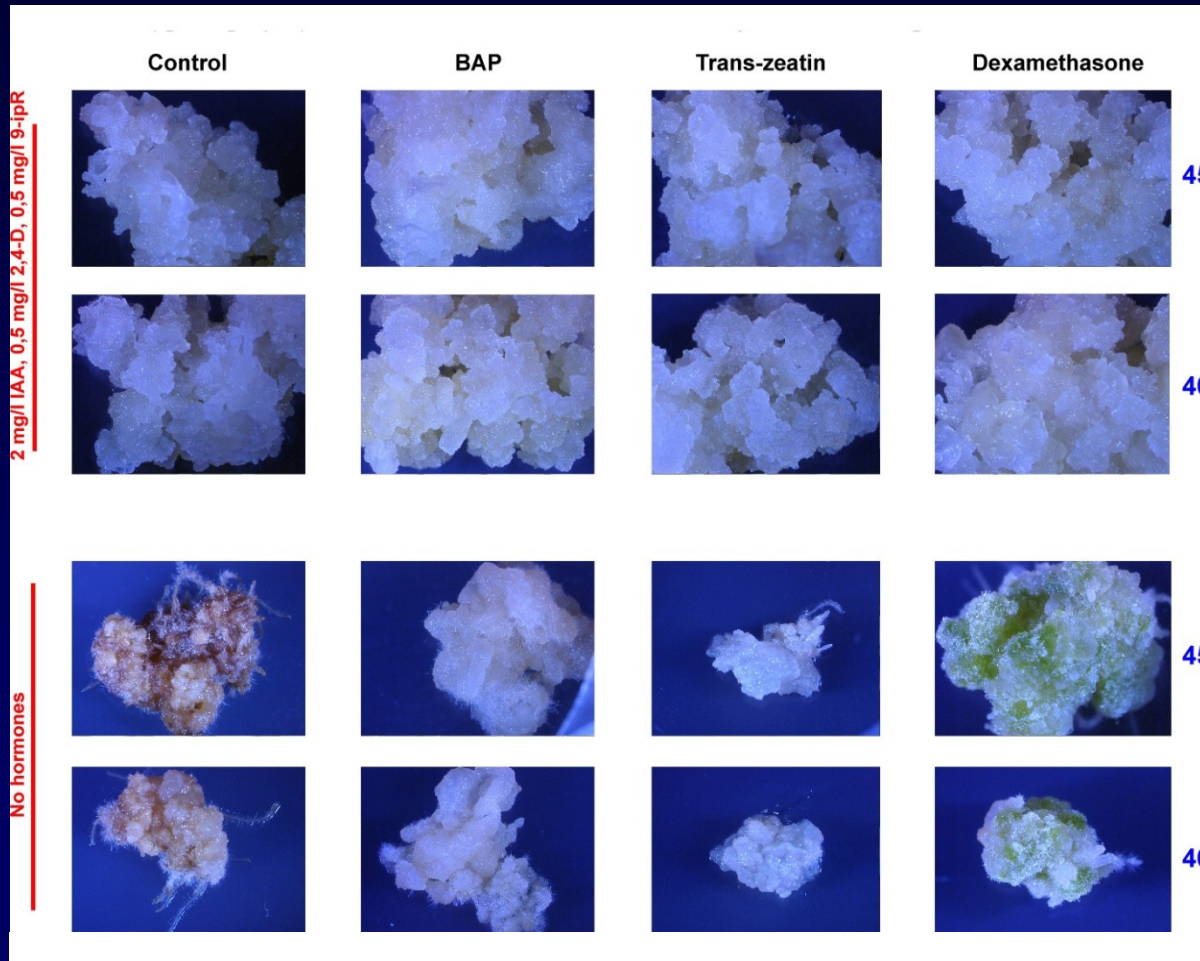
přenos bakteriální DNA do rostlinné buňky



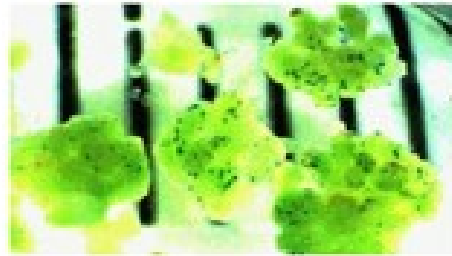
Transformace kokultivací listových disků



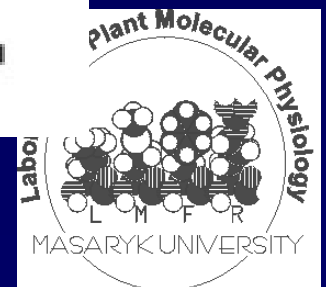
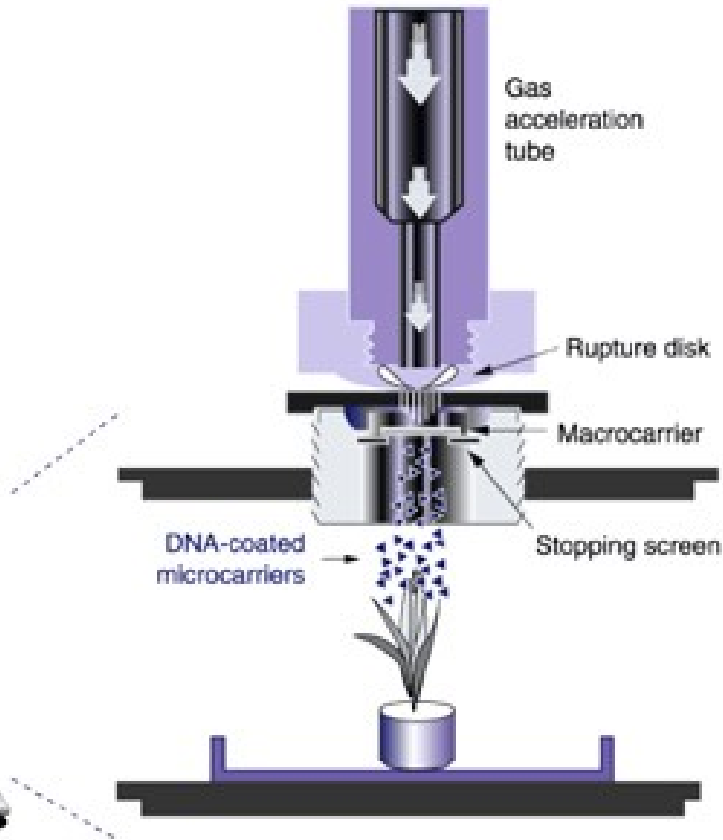
Transformace kokultivací kalusů



Transformace „nastřelováním“ DNA



Biolistic delivery of DNA

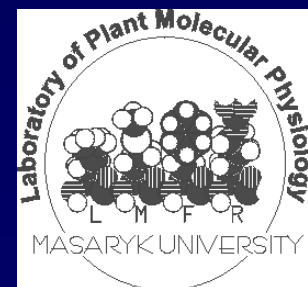


Transformace květenství

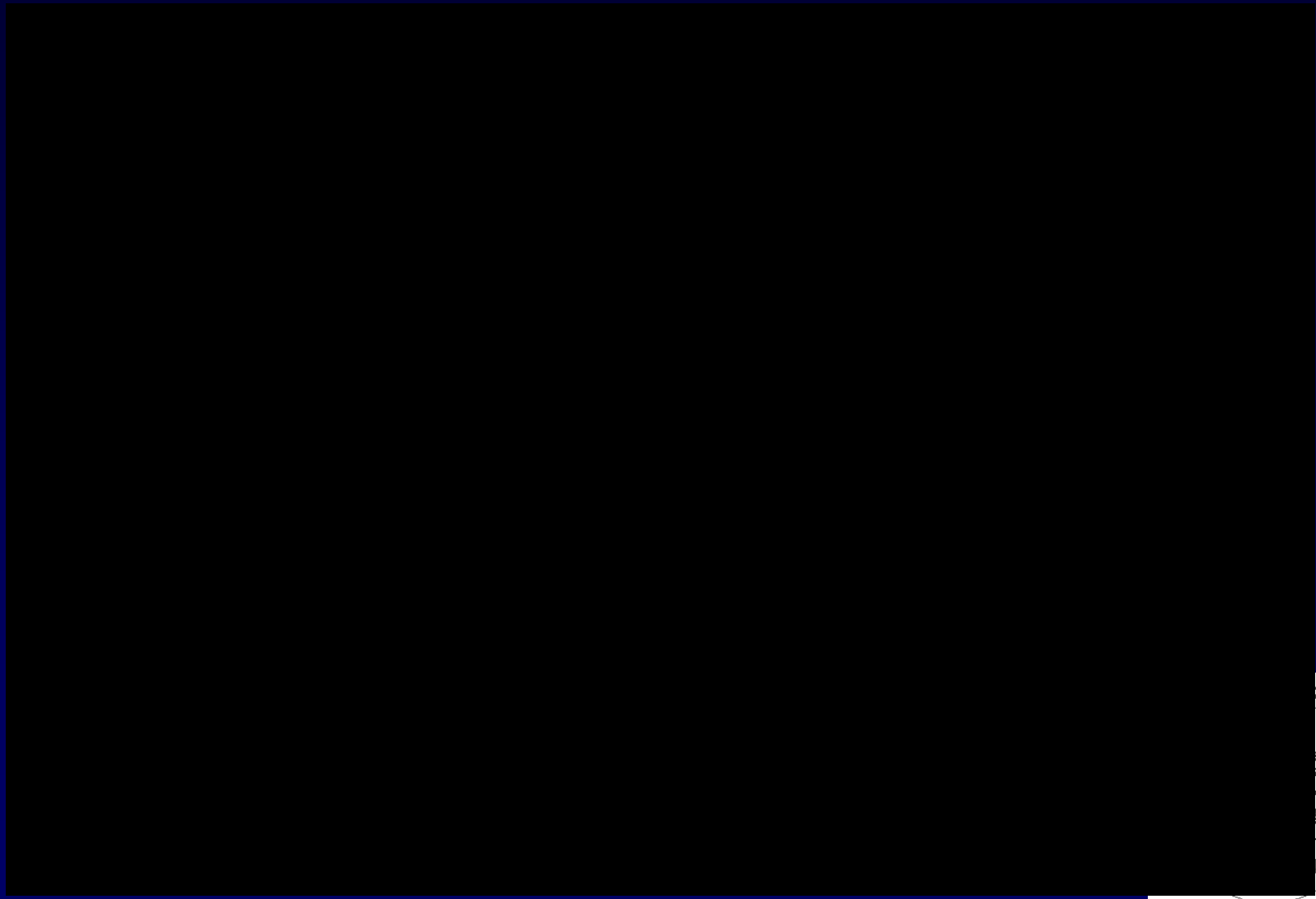


Plant transformed seedlings in soil.

Transformed seedlings are green and have true leaves on selective medium (a 40mg/l kanamycin plate is shown).



PCR



Genomika IV.

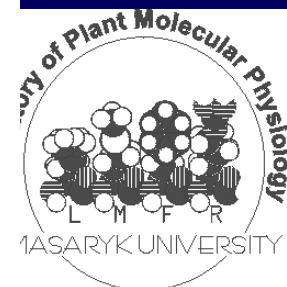
- Nové trendy

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

The screenshot shows the PubMed search interface. At the top, there is the NCBI logo and the text 'PubMed A service of the U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health www.pubmed.gov'. Below this is a navigation bar with tabs for 'All Databases', 'PubMed', 'Nucleotide', 'Protein', 'Genome', 'Structure', 'OMIM', 'PMC', and 'Journals'. The search bar contains the text 'PubMed for chemical genetics' with 'Go' and 'Clear' buttons. Below the search bar are buttons for 'Limits', 'Preview/Index', 'History', 'Clipboard', and 'Details'. The 'Display' section shows 'Summary' selected, 'Show 20' items, and 'Sort By' options. The results section shows 'All: 50407' and 'Review: 5562'. The first three results are listed:

- 1:** [Luchowicki K, Matyska EG, Grysinski J, Ierpecki EA, Patankar L, Laslo G, Borho J, Grysinski 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(3):411-20. PMID: 18833493 [PubMed - in process]
- 2:** [Kobayashi T, Okita M, Inoue Y, Shimizu 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, Peng Z, Huan-Liyao 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]

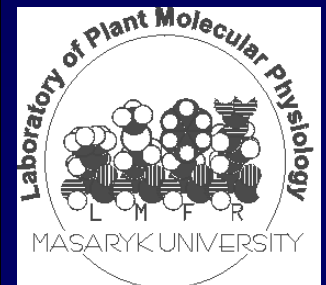
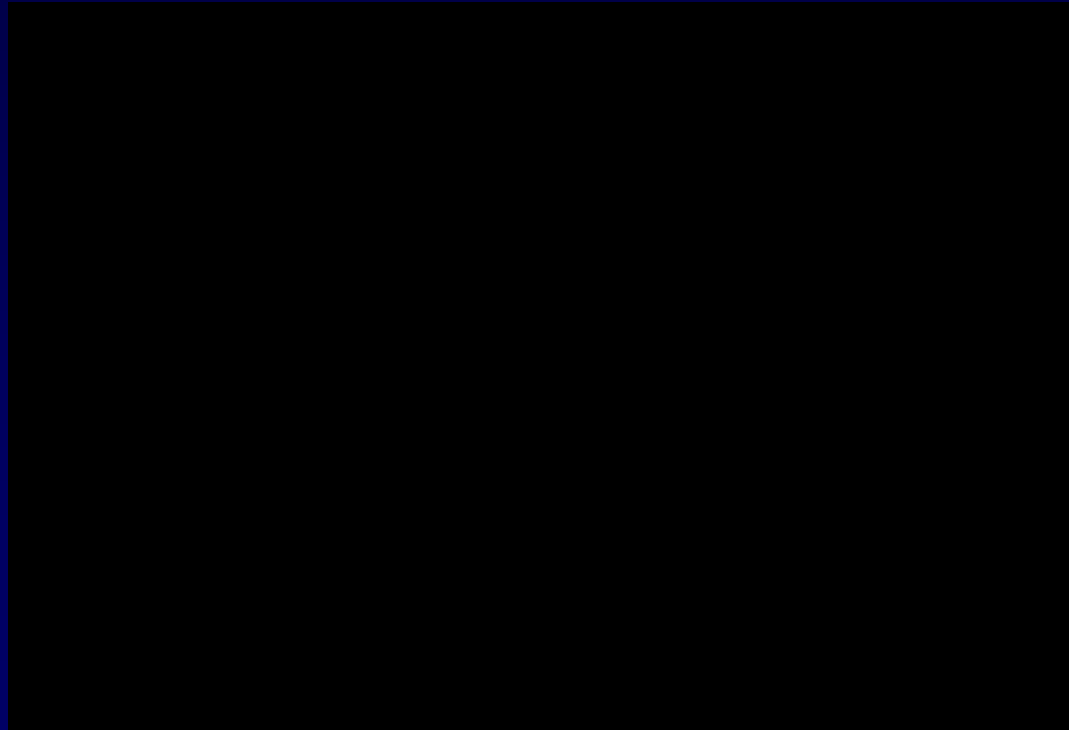
On the right side of the screenshot, there is a 'Recent Activity' box showing a search for 'chemikalogenetika (50407)' with a 'PubMed' link.



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)

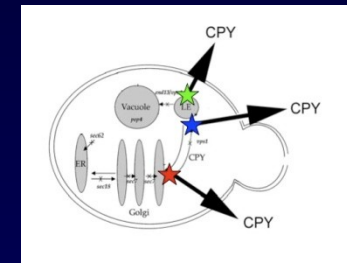


Genomika IV.

chemická genetika

Analýza mechanismů endomembránového transportu 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 kulturačním médiu pomocí monoklonálních protilátek

chemická struktura sortinů

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

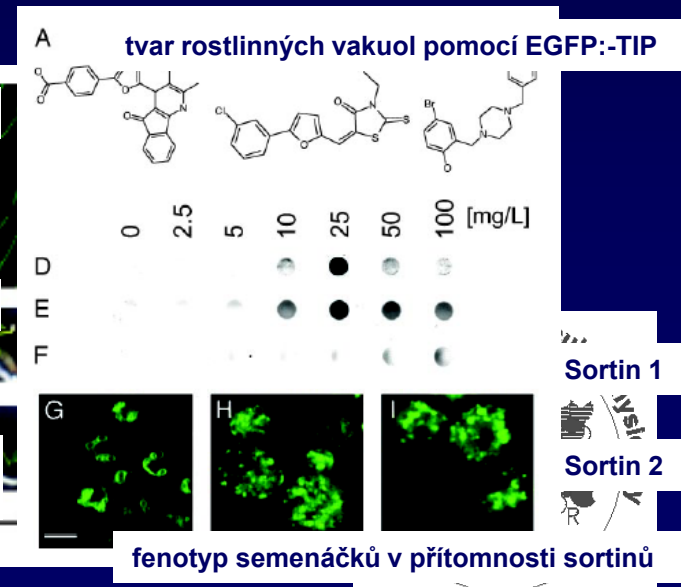


Imunodetekce karboxypeptidázy

- pro bližší identifikaci molekulárního procesu ovlivněného jedním z identifikovaných „sortinů“ byla provedena analýza jeho vlivu na sekreci markerového proteinu (AtCPY)

detekce vakuolárního fenotypu (tvaru tonoplastu) kvasinek pomocí barvení specifickou barvou (MDY-64)

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

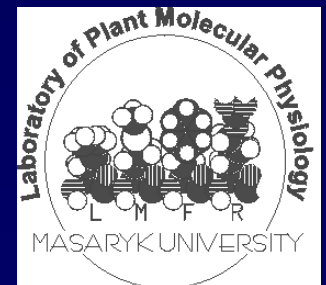


Zouhar et al., 2004

Genomika IV.

Shrnutí

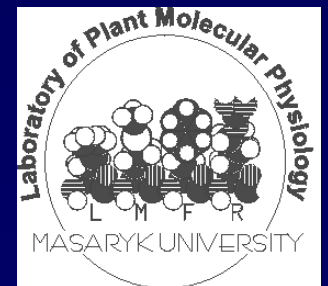
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese
 - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Fenotypové profilování
 - DNA a proteinové čipy
 - metabolické profilování
 - metody mikrodisekce
- Metody využívané ve funkční genomice rostlin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



Genomika IV.

Shrnutí

- Nové trendy
 - chemická genetika



Genomika IV.

Diskuse

