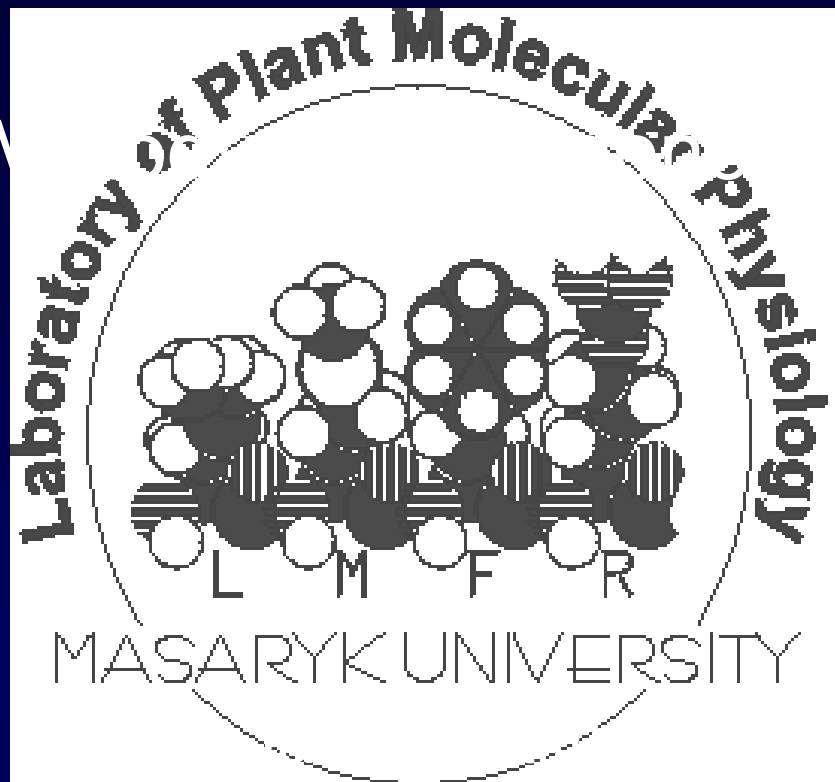
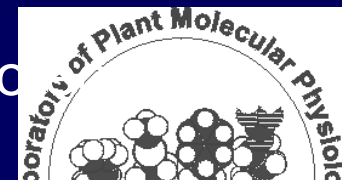


Základy genomiky

V. M. ... ky



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



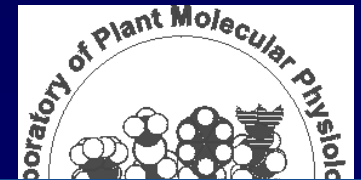
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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

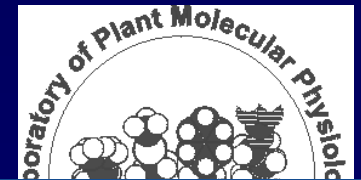


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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
 - PCR

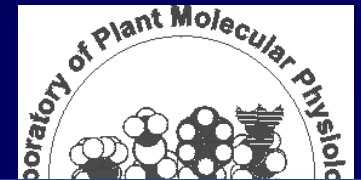


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika IV.

- Nové trendy
 - chemická genetika



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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

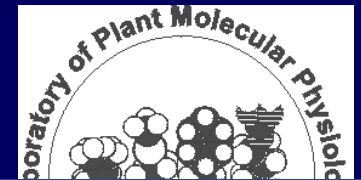


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika IV.

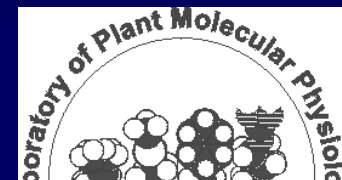
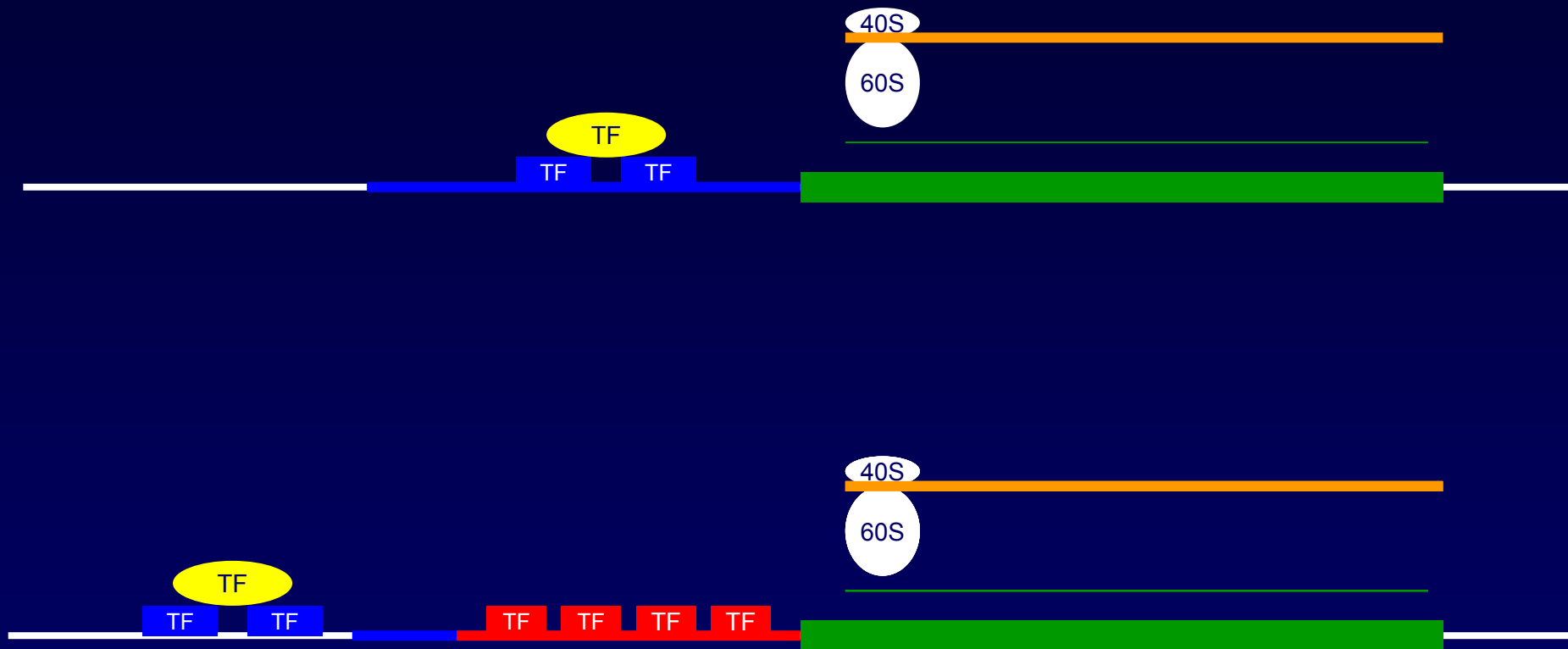
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inserce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
 - prvním krokem je příprava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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

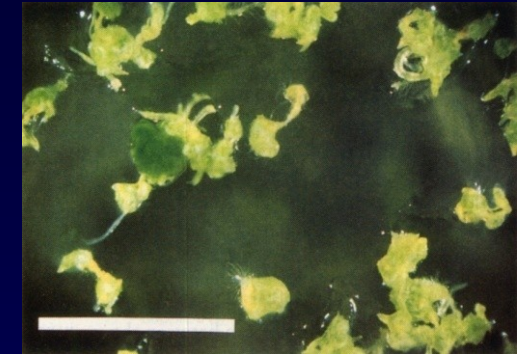
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika IV. aktivační mutagenese



Izolace genu *CK11*

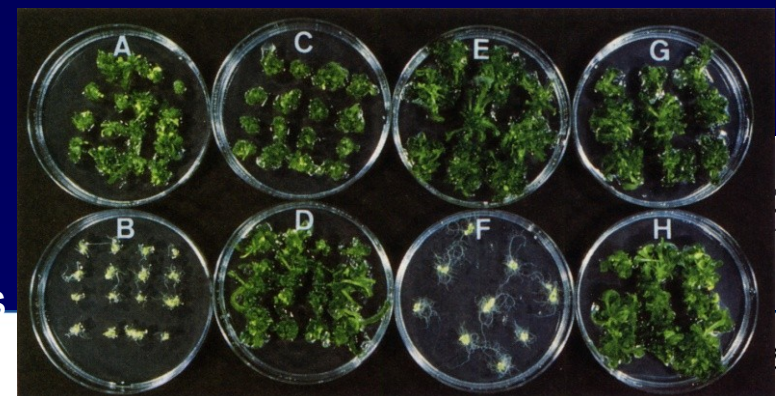
- Tatsuo Kakimoto, *Science* 274 (1996), 982-985 *
- izolace genu pomocí aktivační mutagenese



- mutantní fenotyp je fenokopii exogenní aplikace cytokininů (*CK11*, CYTOKININ INDEPENDENT 1)

K1 plasmid rescue K2 35S::CK1 cDNA

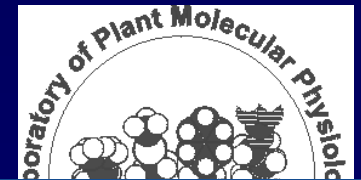
t-zeatin



no hormones

Genomika IV.

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

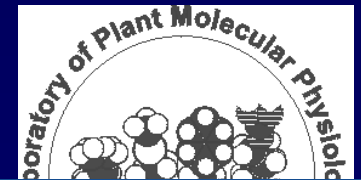


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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

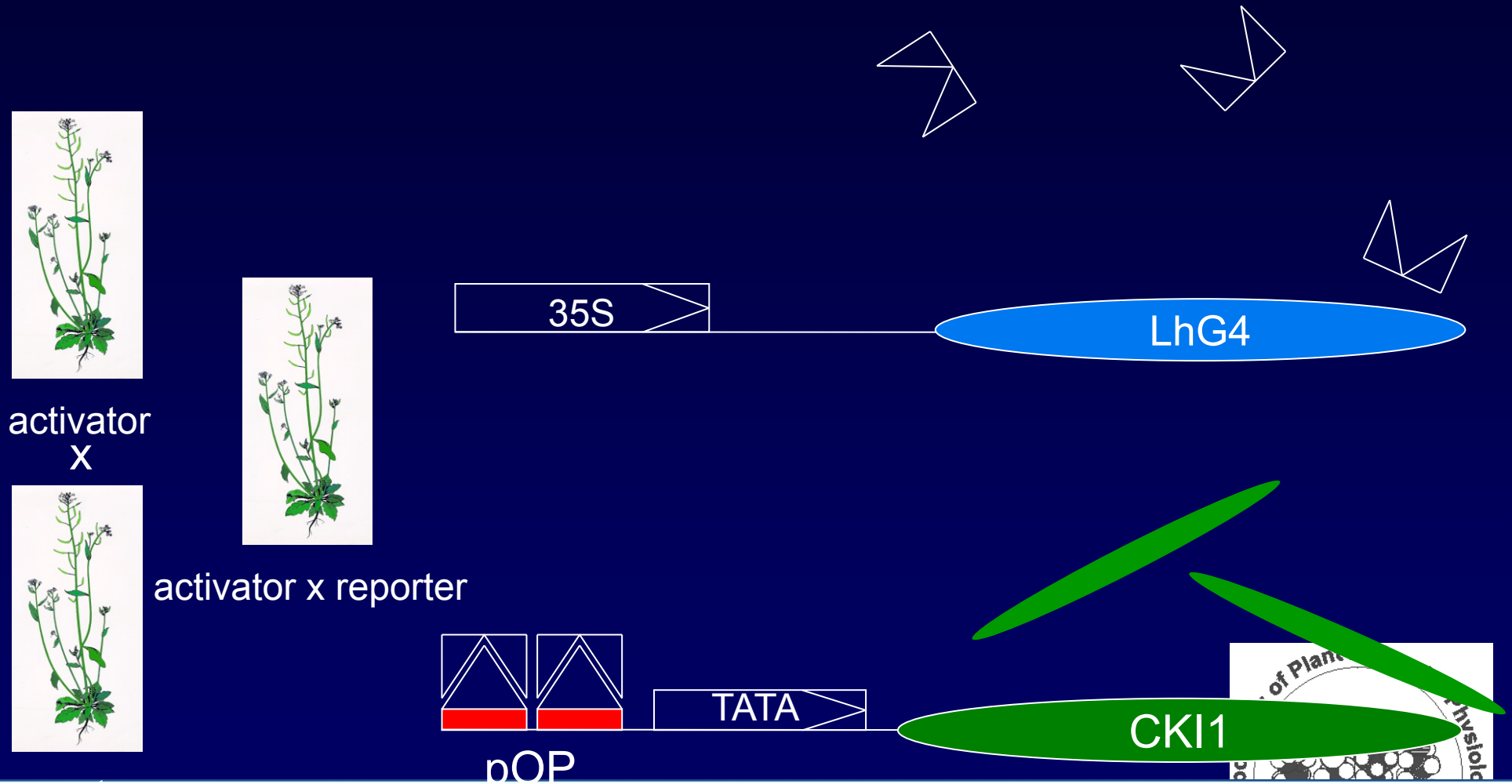


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

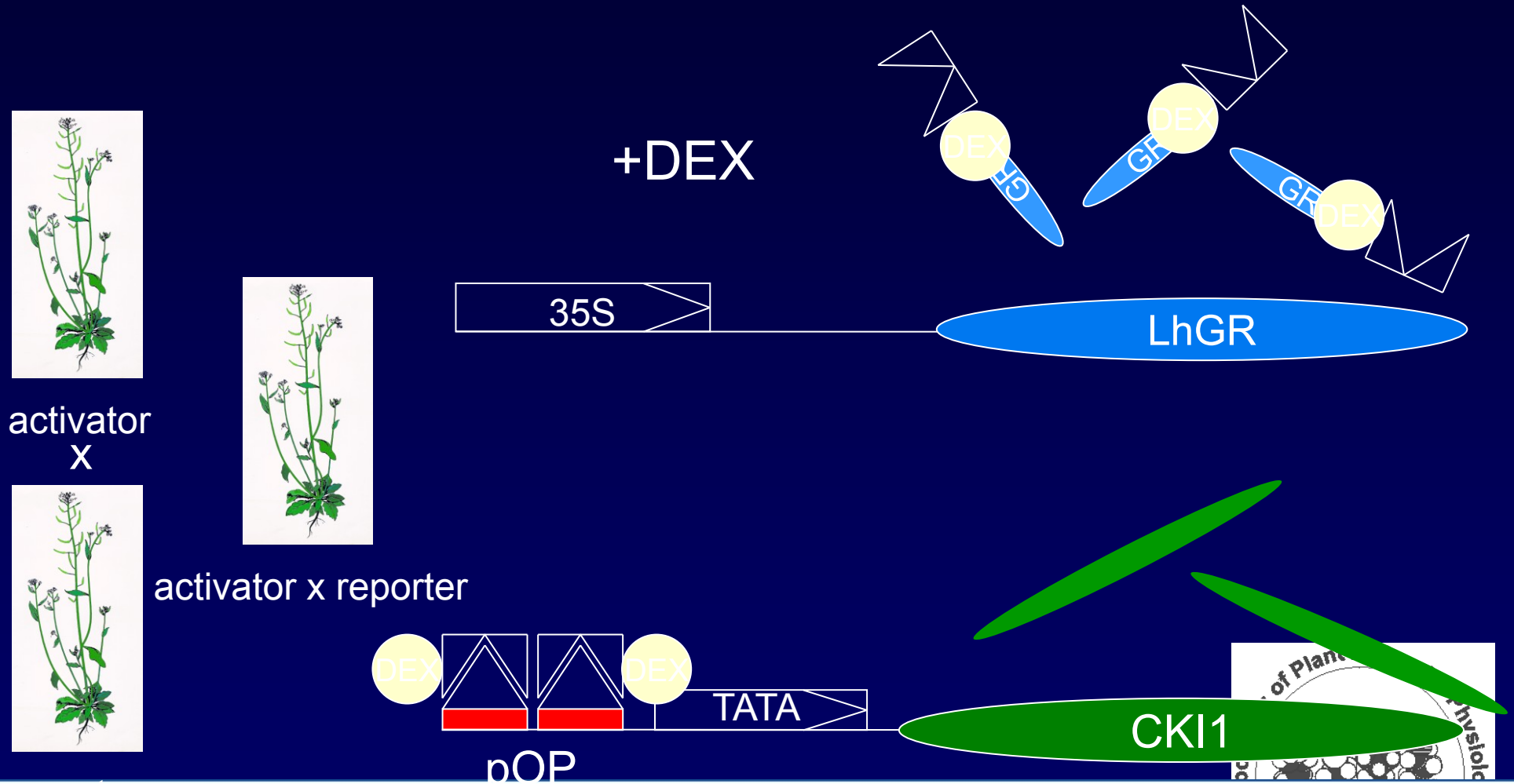
Genomika IV.

systemy regulovatelné exprese, pOP



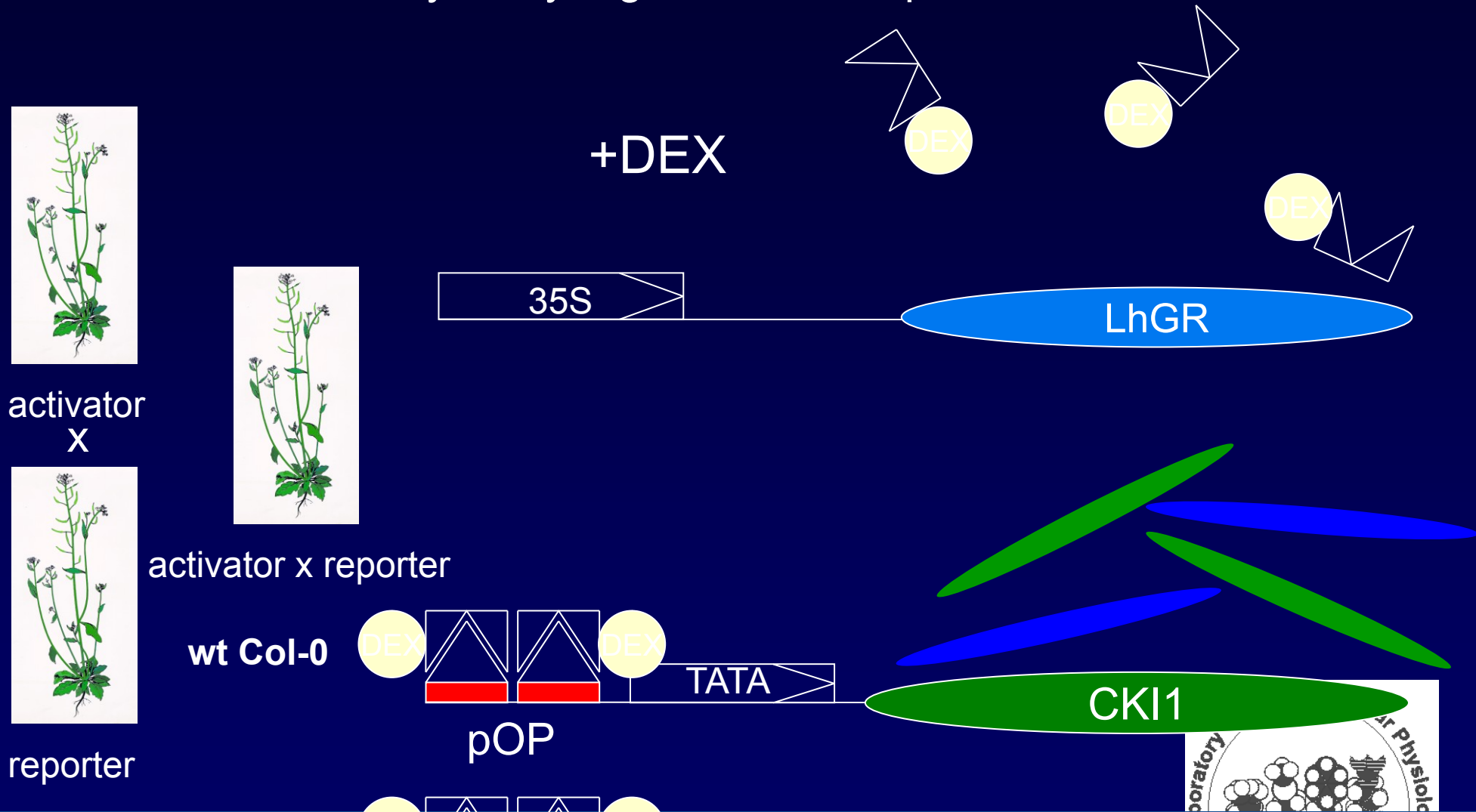
Genomika IV.

systemy regulovatelné exprese, pOP



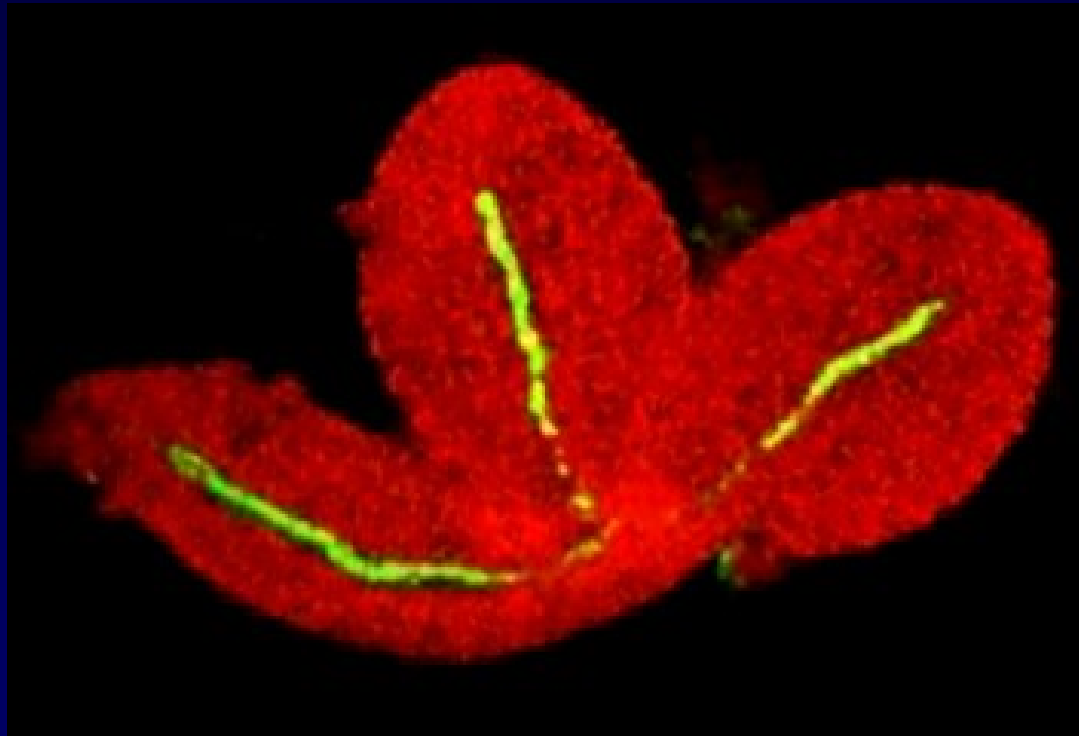
Genomika IV.

systemy regulovatelné exprese



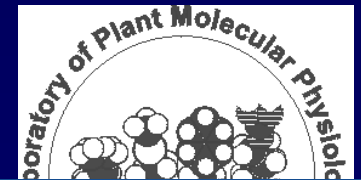
Genomika IV.

- 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.

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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

■ firma Operon
26.173 genů
Arabidopsis thaliana

■ možnost použít
syntézu oligonukleotidů
touto technikou

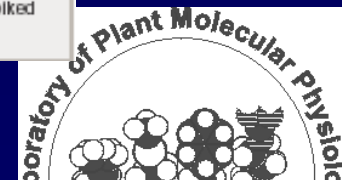
- čipy nejen pro analýzu exprese, ale např. i genotypování (SNP polymorfizmy, sekvenování pomocí čipů, ...)

Affymetrix ATH1 *Arabidopsis* genome array

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.



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 čipech se stejným vzorkem, vynesení **stejných vzorků** analyzovaných na **různých čipech** 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 | |
| HoekengaSc 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



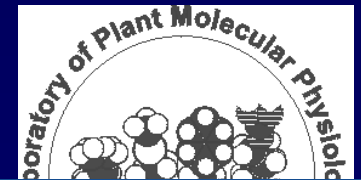
EVROPSKÁ UNIE

DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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



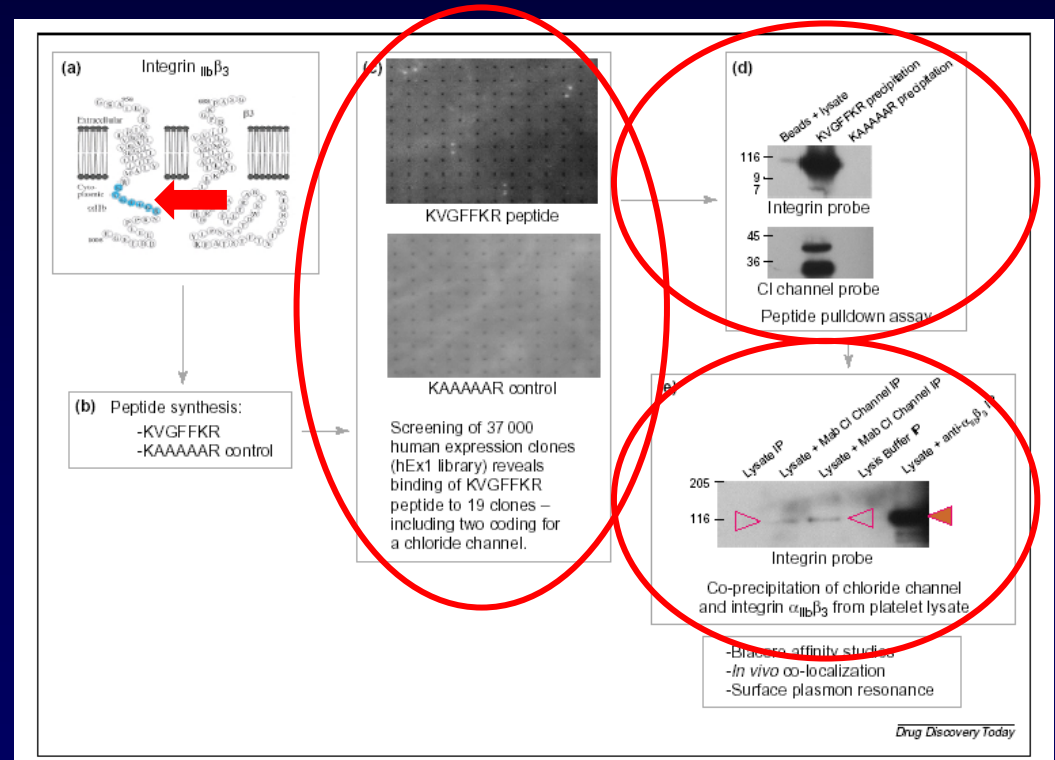
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika IV. proteinové čipy

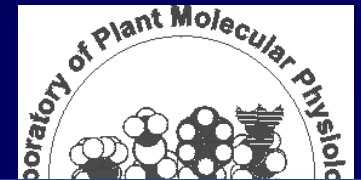
Identifikace proteinů interagujících s cytoplasmatickou částí integrinu $\alpha_{IIb}\beta_3$ krevních destiček

- 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 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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



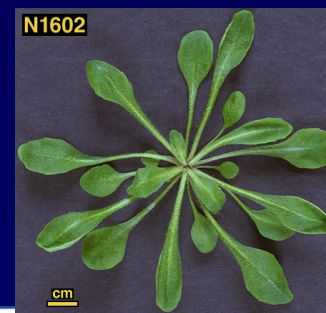
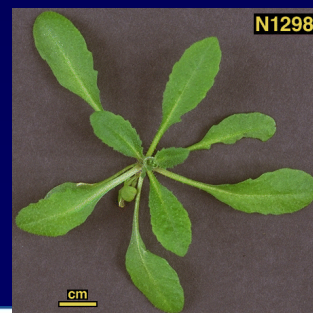
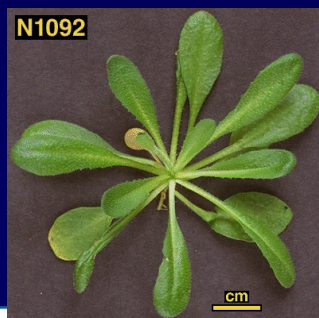
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

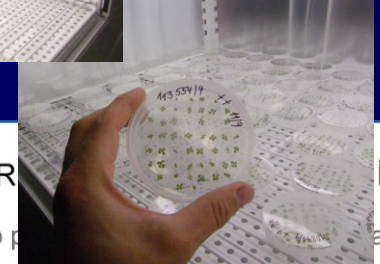
Arabidopsis thaliana

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))



Plant Molecular



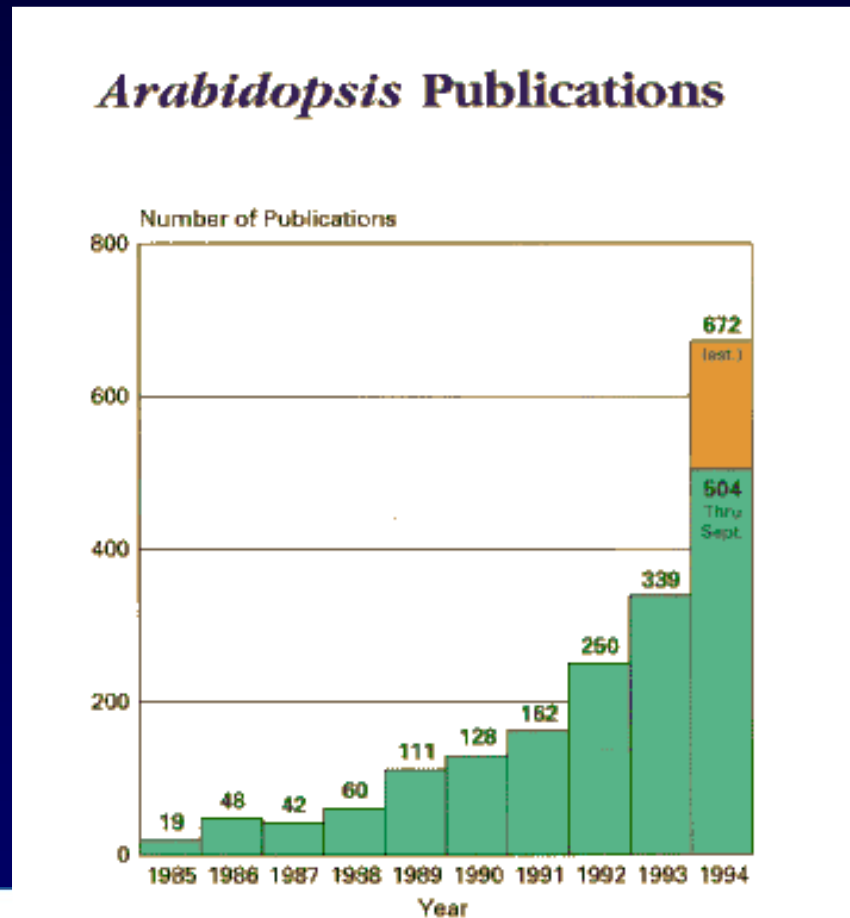
INVESTICE DO R

Tato p

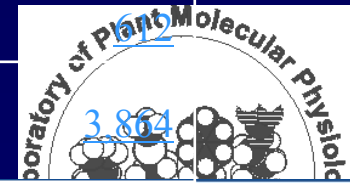
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Arabidopsis, významný rostlinný model

Počet záznamů v databázi „PubMed“ (MEDLINE) vyhledaných pod heslem „*Arabidopsis*“ **25.690/36.588** (16.10. 2008/3.11. 2011, nárůst 42%).
(Pro srovnání, pod heslem „*human*“ nalezeno 10 620.405/ 12 236.383 záznamů), nárůst 15%.



| 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 | 6 |
| PubMed Central | 3,864 |



Gene INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ 30,273

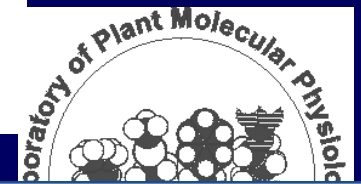
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky



Transformace *Arabidopsis* prostřednictvím *Agrobacteria tumefaciens*

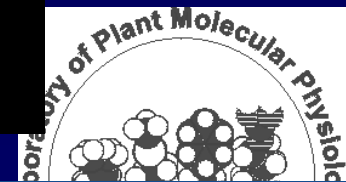
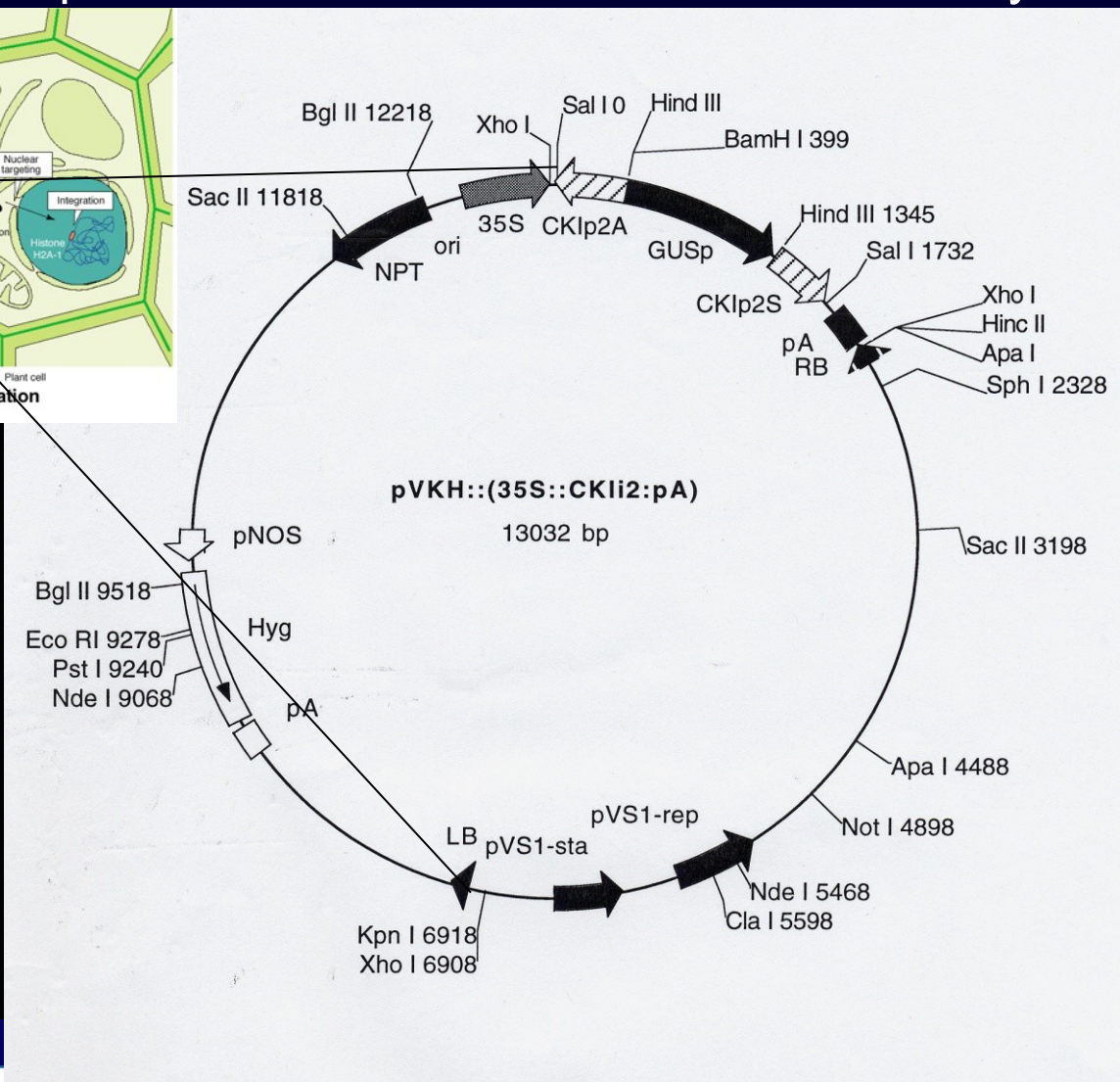
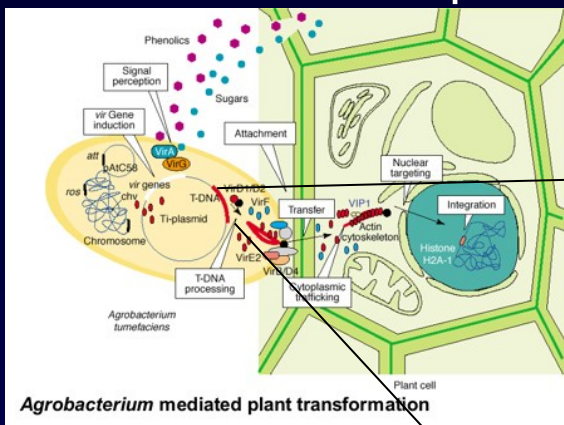


Crown gall of raspberry caused by *Agrobacterium tumefaciens*.



Transformace *Arabidopsis* prostřednictvím *Agrobacterium tumefaciens*

přenos bakteriální DNA do rostlinné buňky



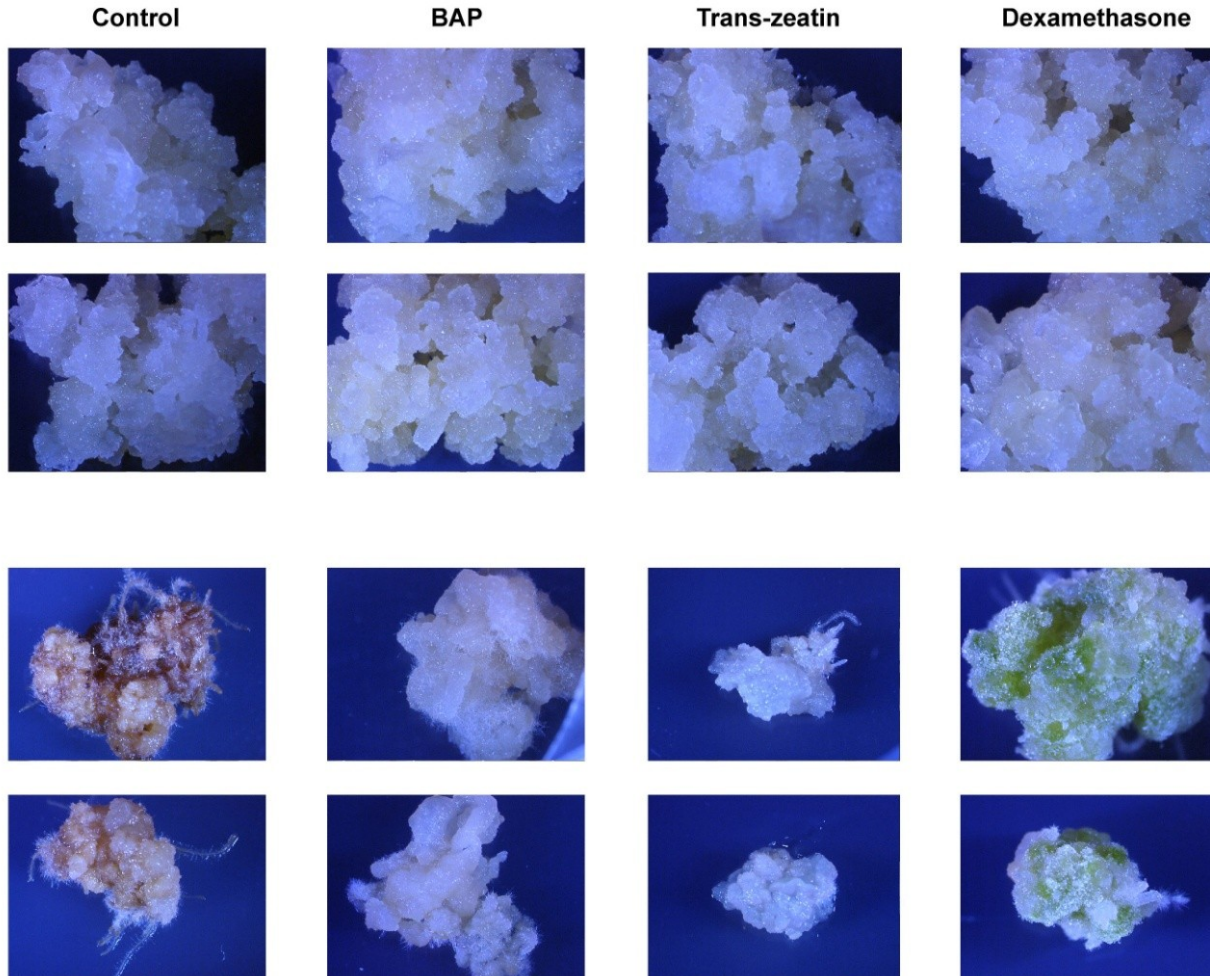
Transformace kokultivací listových disků



Transformace kokultivací kalusů

2 mg/l IAA, 0,5 mg/l 2,4-D, 0,5 mg/l 9-*ipR*

No hormones

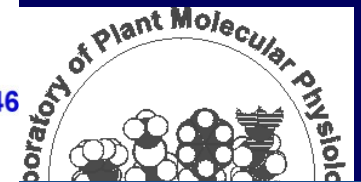


45

46

45

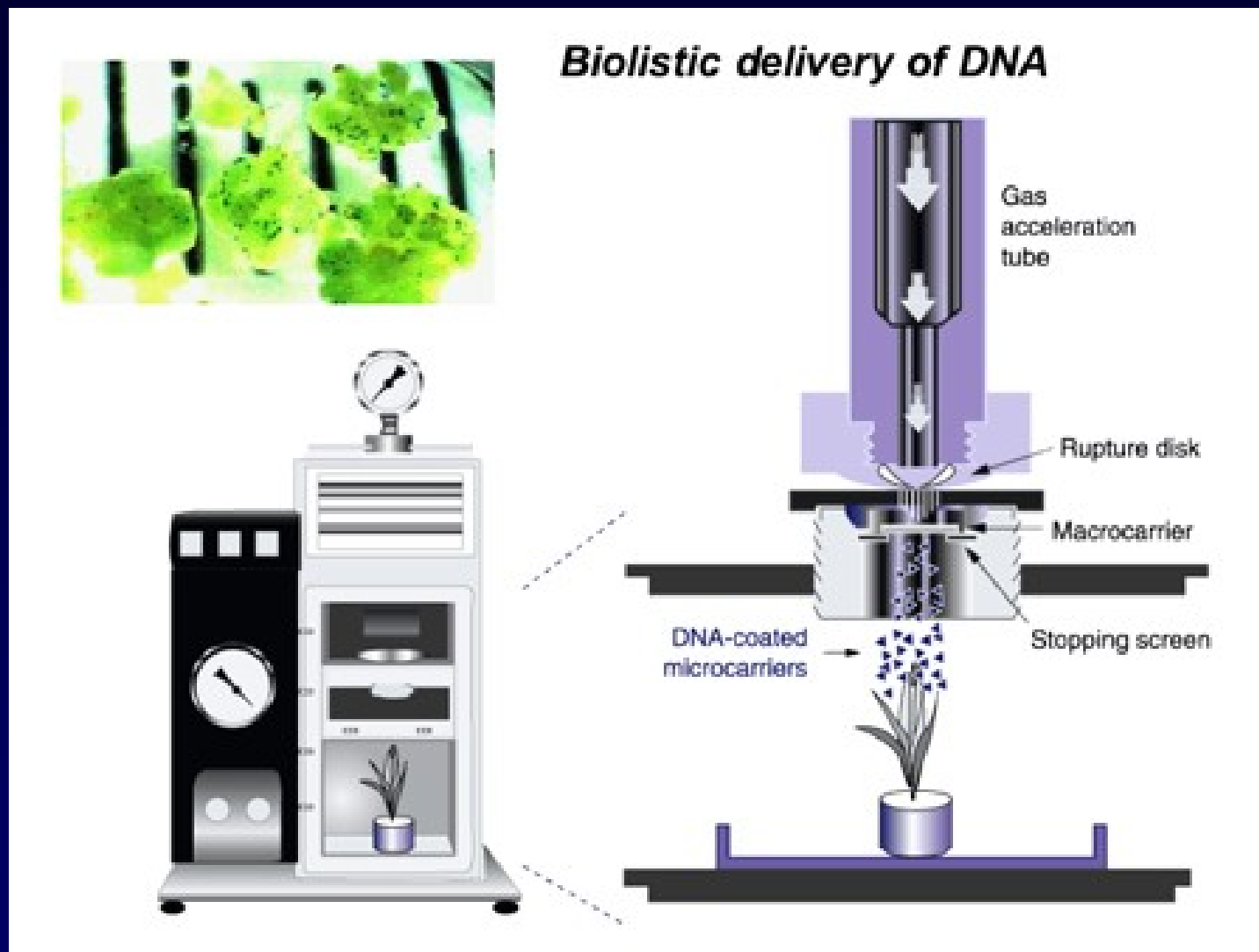
46



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

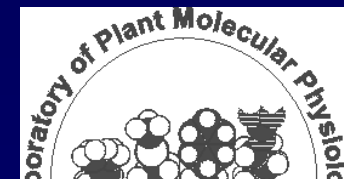
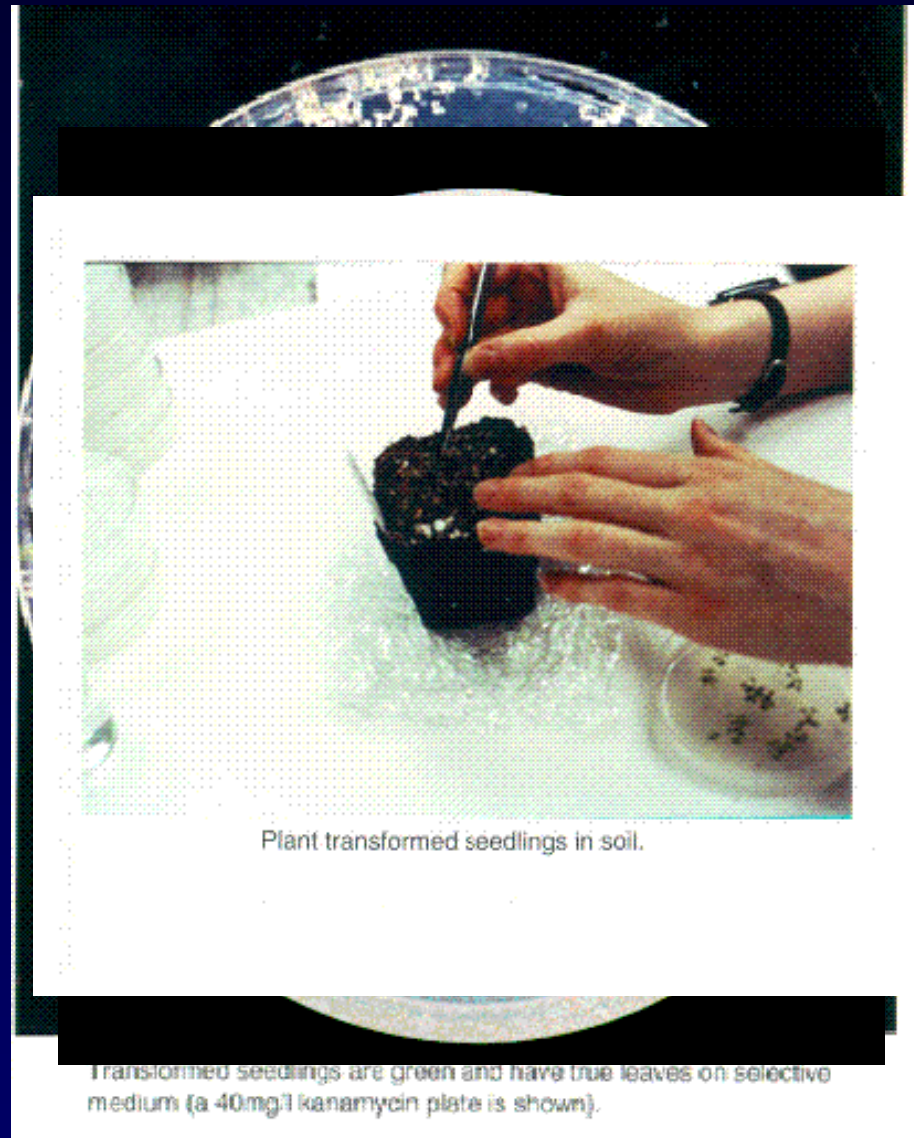
Transformace „nastřelováním“ DNA



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Transformace květenství



PCR

Polymerase Chain Reaction



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



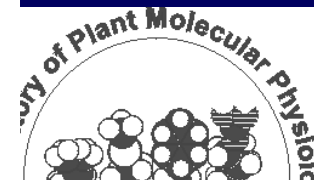
Genomika IV.

Nové trendy

- chemická genetika
- pojem chemická genetika – více než 50.000/66.038 záznamů v databázi PubMed (16.10. 2008/3.11.2011, nárůst 32%)

The screenshot shows the PubMed website 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'. Below this, there are navigation tabs for 'All Databases', 'PubMed', 'Nucleotide', 'Protein', 'Genome', 'Structure', 'OMIM', 'PMC', and 'Journals'. A search bar contains the text 'for chemical genetics' with 'Go' and 'Clear' buttons. There are also links for 'Advanced Search (beta)' and 'Save Search'. Below the search bar, there 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:** [Ludowski E, Matuseva EG, Gryszyk JL, Targoszko EA, Patankar L, Lach G, Bomilo J, Gryszyk JZ.](#) [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:** [Kubota J, Ohta M, Inoue Y, Shimizu I.](#) [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, Fitzer-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]



ZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Centrum je spolufinancováno
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

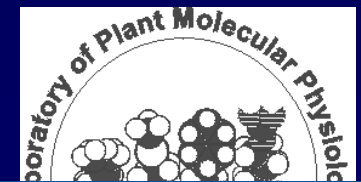
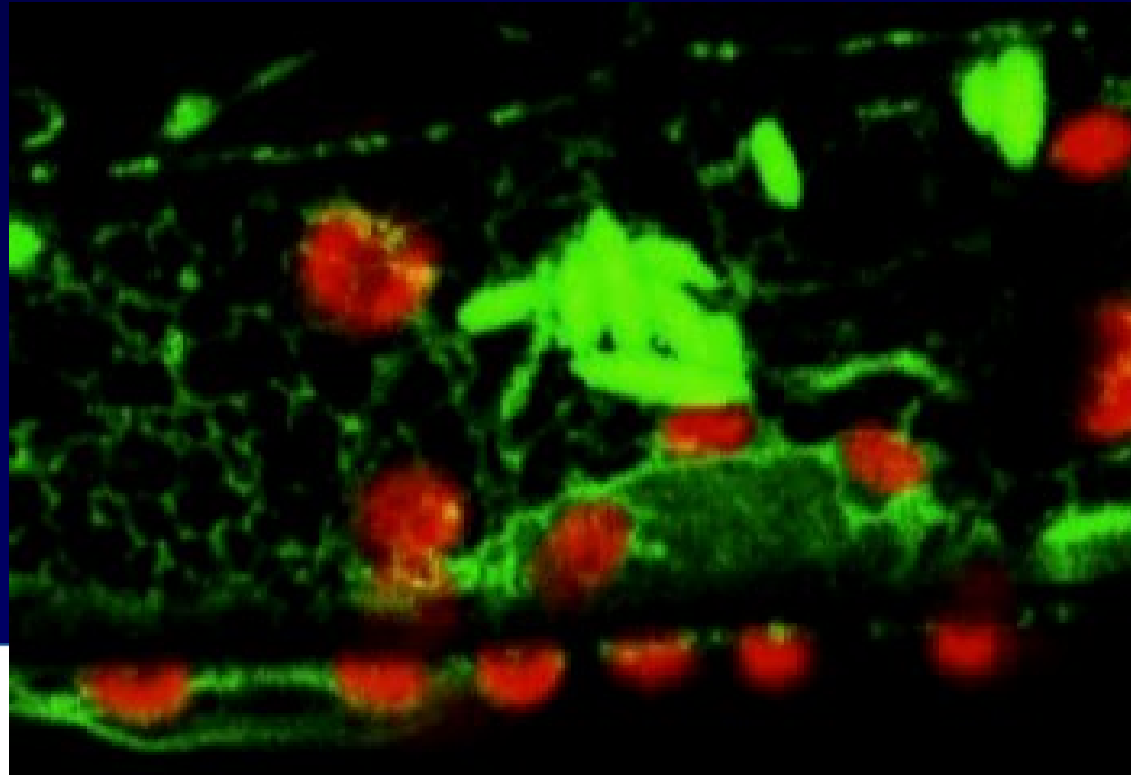
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



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)



OP ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

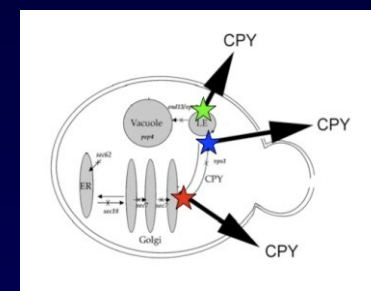
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika IV.

chemická genetika

Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupem chemické genetiky

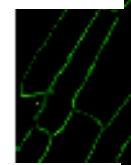
- pomocí vyhledávání v „knižovně“ chemických látek byly identifikovány takové, které vedou u kvasinek (*S. cerevisiae*) k sekreci enzymu (karboxipeptidázy Y), která je normálně transportována pomocí endomembránového transportu do vakuoly



- analýza změny sekrece pomocí dot-blotu a imunodetekce karboxipeptidázy Y v kulti-vačním médiu pomocí monoklonálních protilátek

chemická struktura sortinů

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

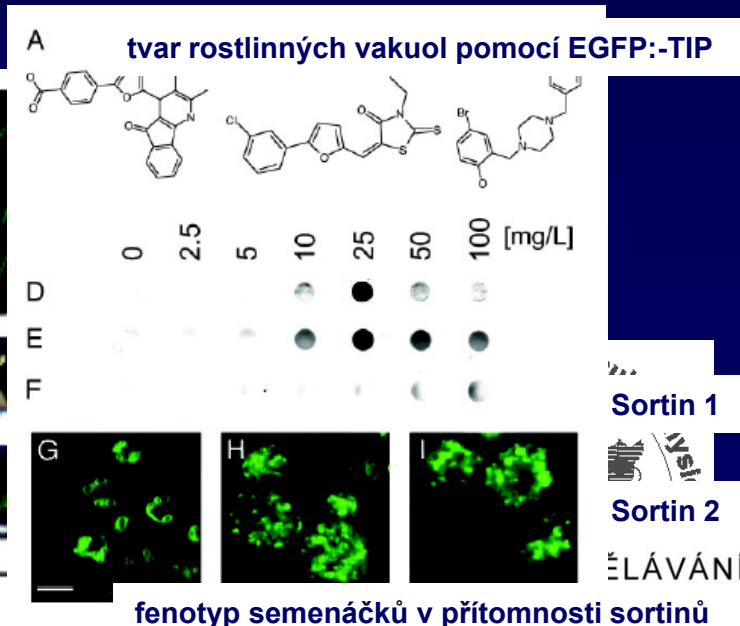


Imunodetekce karboxypeptidázy

- pro bližší identifikaci molekulárně přesně ovlivněného jedním z identifikovaných „sortinů“ byla provedena analýza jeho vlivu na sekreci markerového proteinu (AtCPY) – sortin 1 inhibuje specificky pouze tuto sekreční cestu

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

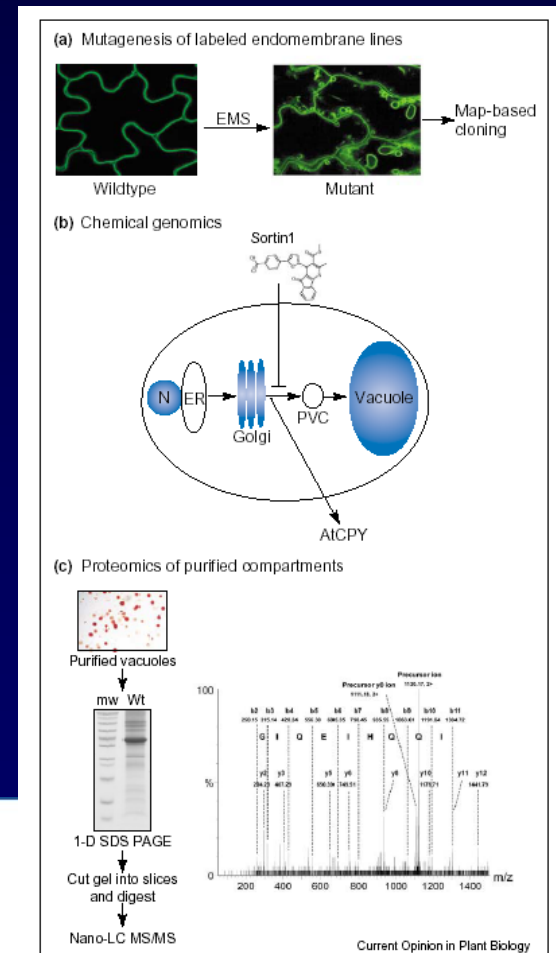
- pomocí EMS mutagenese identifikace mutantů se změněnou citlivostí k sortinu 1 (hyper- nebo hypersenzitivní mutanti)



Genomika IV.

chemická genetika

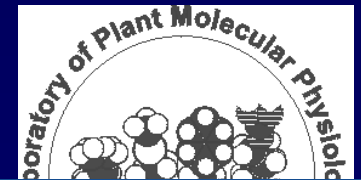
- Analýza mechanismů endomembránového transportu pomocí chemické genetiky - shrnutí
- GFP::d-TIP značení membrány vakuoly (tonoplastu) a identifikace mutací vedoucí ke změně morfologie tonoplastu
- chemická genetika v kombinaci s klasickou genetikou - identifikace proteinů zúčastňujících se regulace endomembránového transportu
- proteomické přístupy – identifikace a analýza proteomu vakuol



Genomika IV.

Shrnutí

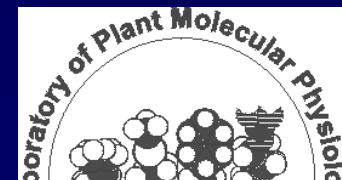
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Fenotypové profilování
 - DNA a proteinové čipy
 - metabolické profilování
 - metody mikrodisekce
- Metody využívané ve funkční genomice rostlin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



Genomika IV.

Shrnutí

- Nové trendy
 - chemická genetika

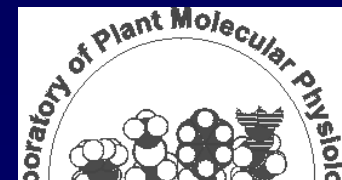


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genomika IV.

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky