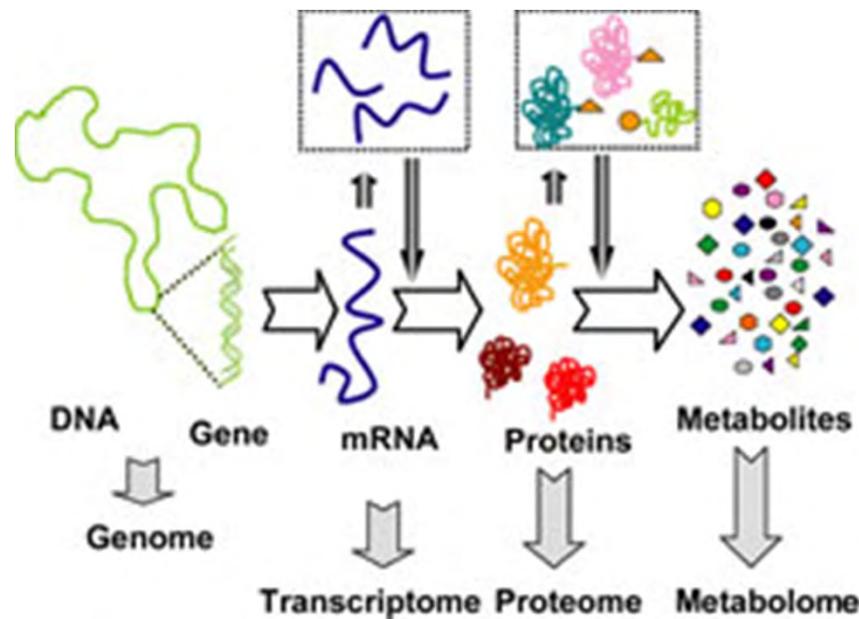


TRANSKRIPTOM IN TRANSKRIPTOMIKA



Transkriptom je zbirka RNA molekul (mRNA, rRNA, tRNA, in druge nekodirajoče RNA); ki jih proizvede ena celica, populacija celic, ali celotni organizem, v katerem koli času.

Transkriptomika preiskuje transkriptom.



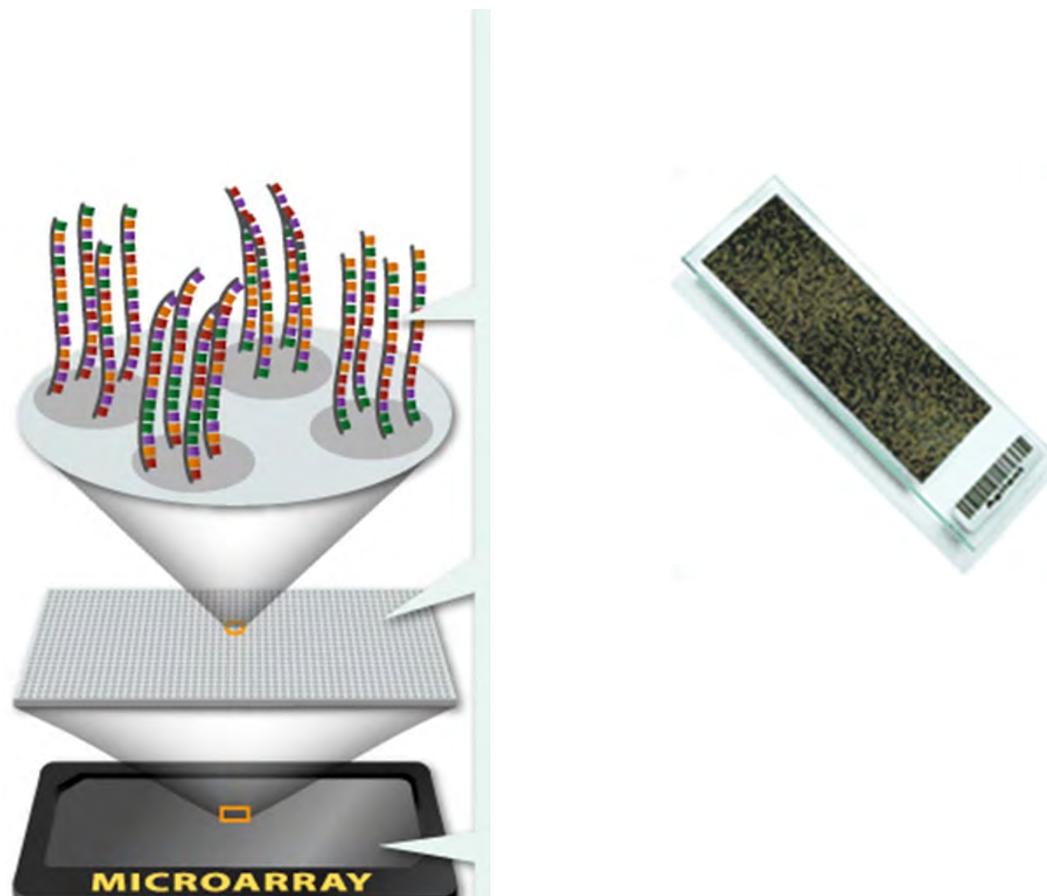
OSNOVE TEHNOLOGIJE DNA ČIPOV



1. Definicije osnovnih pojmov.
2. Različni pristopi tehnologije DNA čipov.
 - **Analiza genomske DNA** (genotpizacija enojnih nukleotidnih polimorfizmov SNP, analiza variance števila kopij CNV oz. CGH, resekvenciranje).
 - **Analiza izražanja genov** (ekspresijsko profiliranje: 3' ekspresijski, eksonski ali genski čipi, čipi za sledenje izražanja miRNA).
 - **Študije uravnavanja izražanja genov** (kromatinska imunoprecipitacija na čipu ChIP-on-Chip, mapiranje prepisov).

DNA MIKROMREŽA-DNA ČIP

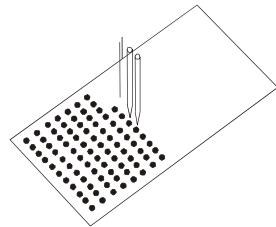
DNA mikromreža je zbirka mikroskopskih DNA točk, ki so nanešene na trdo podlago. Tvorijo mrežo DNA molekul, s katero preverjamo izražane (ekspresijo) tisočih genov hkrati.



VRSTE DNA MIKROMREŽ

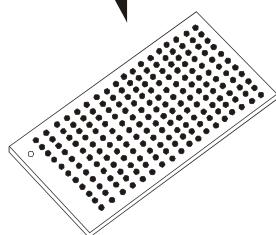
glede na vrsto DNA molekul, ki predstavljajo določen gen

1.



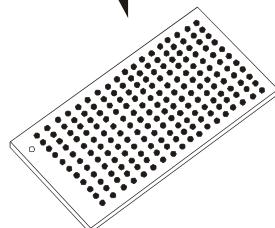
DNA čipi: Kemična sinteza kratkih, do 20 bp dolgih oligonukelotidov na matrici *in situ* (npr. tehnologija Affimetrix)
Vsak gen je predstavljen z večimi različnimi oligonukleotidi

2.



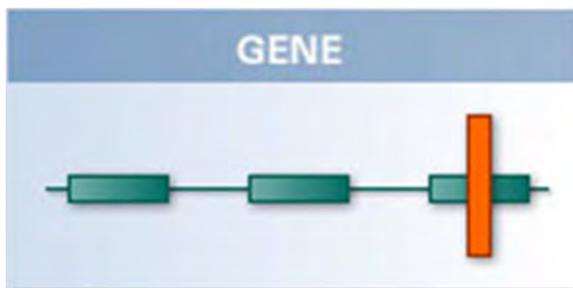
DNA mikromreže z dolgimi oligonukleotidi: na podlago nanešeni 50 – 80 bp dolgi oligonukleotidi
Vsak gen je predstavljen z enim do tremi različnimi oligonukleotidi

3.

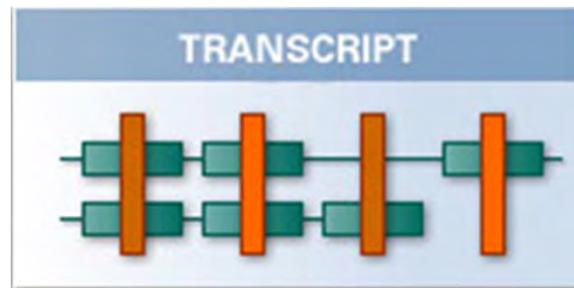


cDNA mikromreže : na podlago nanešene delne ali popolne cDNA dolžin 300 – 5000 bp (tehnologija Patt Brown)
Vsak gen je predstavljen z eno cDNA

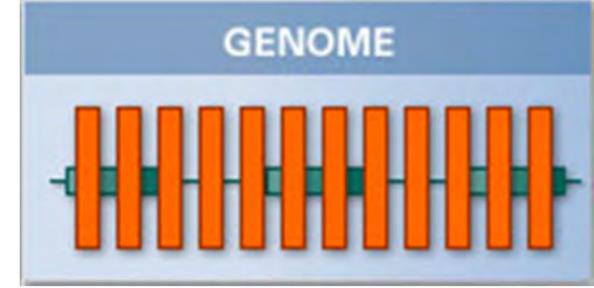
NA MIKROMREŽI SO LAHKO KOT PROBE PRISOTNI RAZLIČNI DELI GENA



Robust, simple representation focusing on the 3' ends.

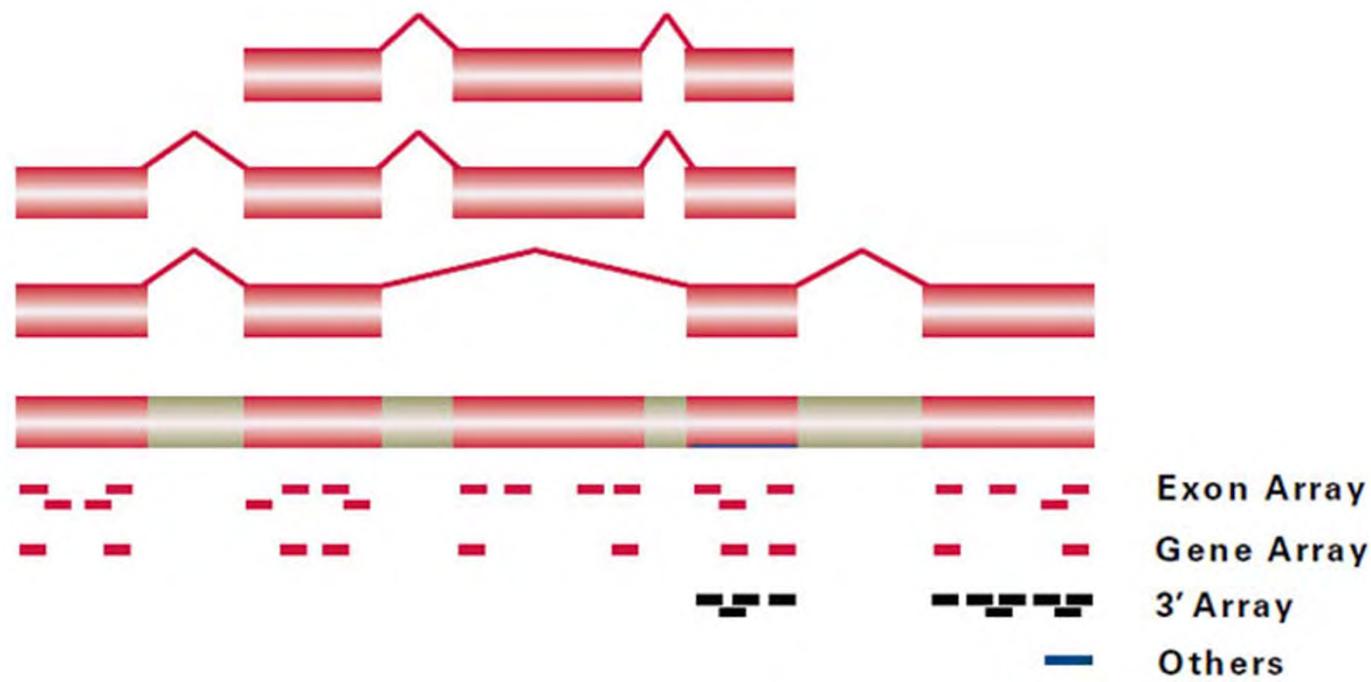


Genome-wide, exon-level analysis on a single array — a survey of alternative splicing and gene expression.



High-density tiled microarrays for transcript mapping.

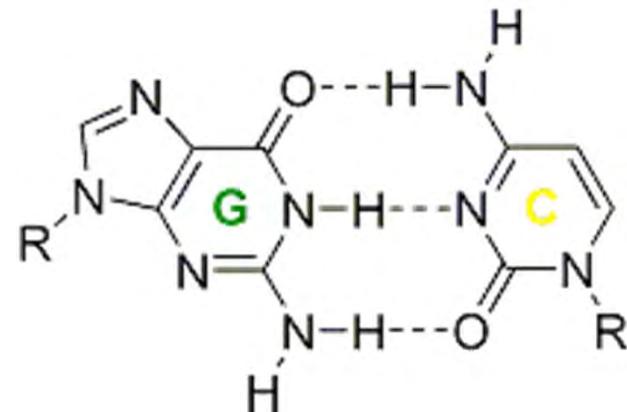
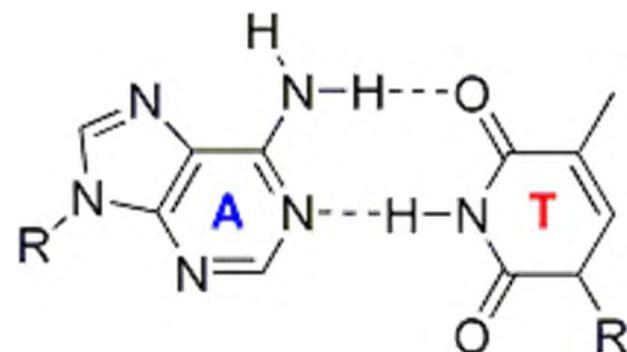
VRSTE MIKROMREŽ GLEDE NA PROBE



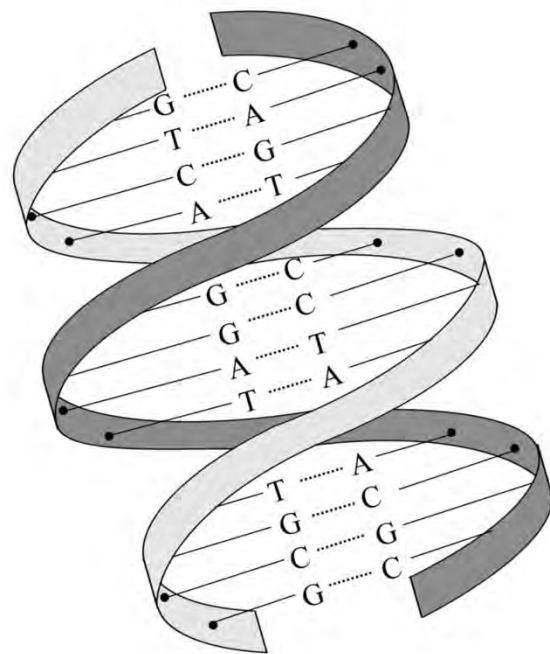
Mikromreže s 5' regulatornimi zaporedji

miRNA mikromreže

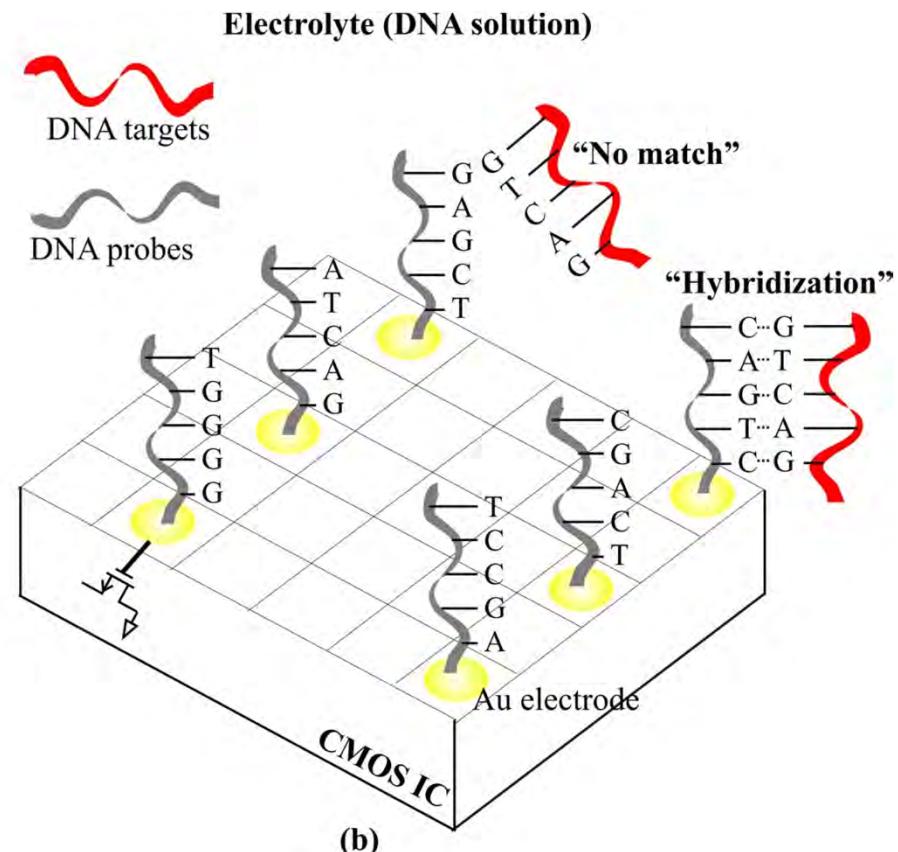
HIBRIDIZACIJA MIKROMREŽ



HIBRIDIZACIJA NA MIKROMREŽI

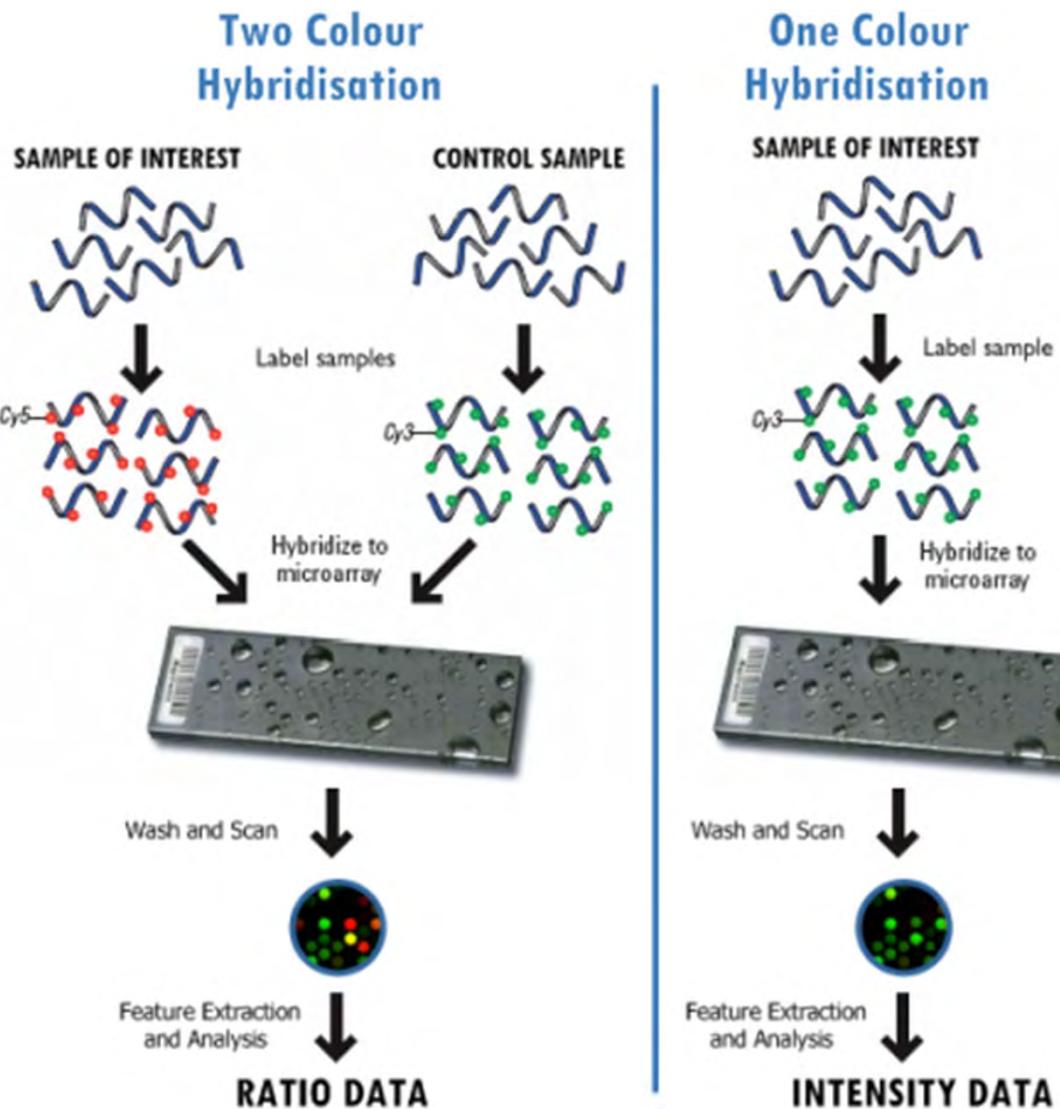


(a)



(b)

DVOJNO ALI ENOJNO OZNAČEVANJE



ANALIZA GENOMSKE DNA Z MIKROMREŽAMI

SNP mikromreže - razpoznavanje genetskih različic posameznikov znotraj populacije. Mikromreže vsebujejo krakte ologonukleotide z vsemi možnimi različicami zaporedij.

CGH ali CNV mikromreže – za ugotavljanje večjih nepravilnosti v genomu (amplifikacije, delecije, druge prerazporeditve)-

Mikromreže za re-sekvenciranje – so imele življenjsko dobo le nekaj let.....

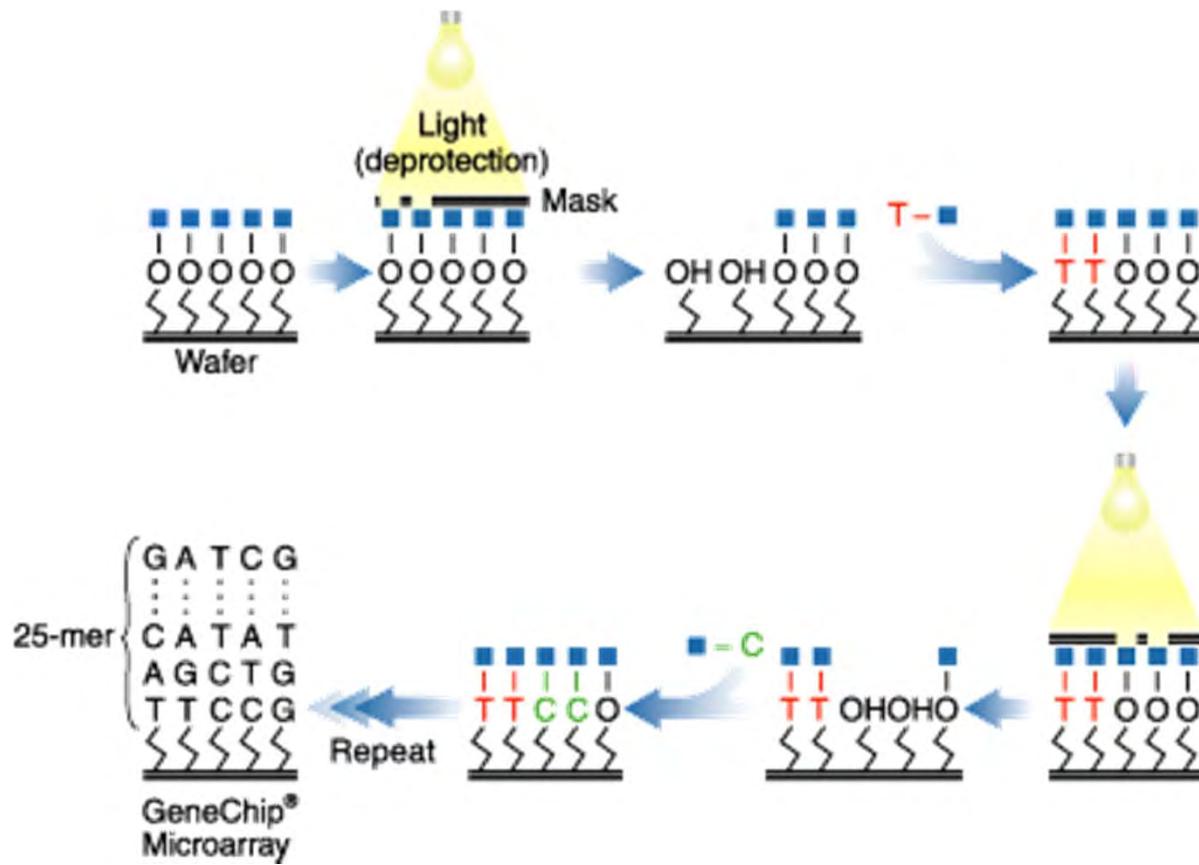


METODE ZA UGOTAVLJANJE RAZLIK NA RAVNI DNA

- Mendlova genetika,
- Direktno sekvenciranje DNA,
- RFLP analiza
(polimorfizmi dožin restrikcijskih fragmentov),
- Alelno specifični oligonukleotidi,
- DNA mikromreže,
- Nove generacije sekvenciranja



MIKROMREŽE AFFYMETRIX



Affymetrix uses a unique combination of photolithography and combinatorial chemistry to manufacture GeneChip® Arrays.



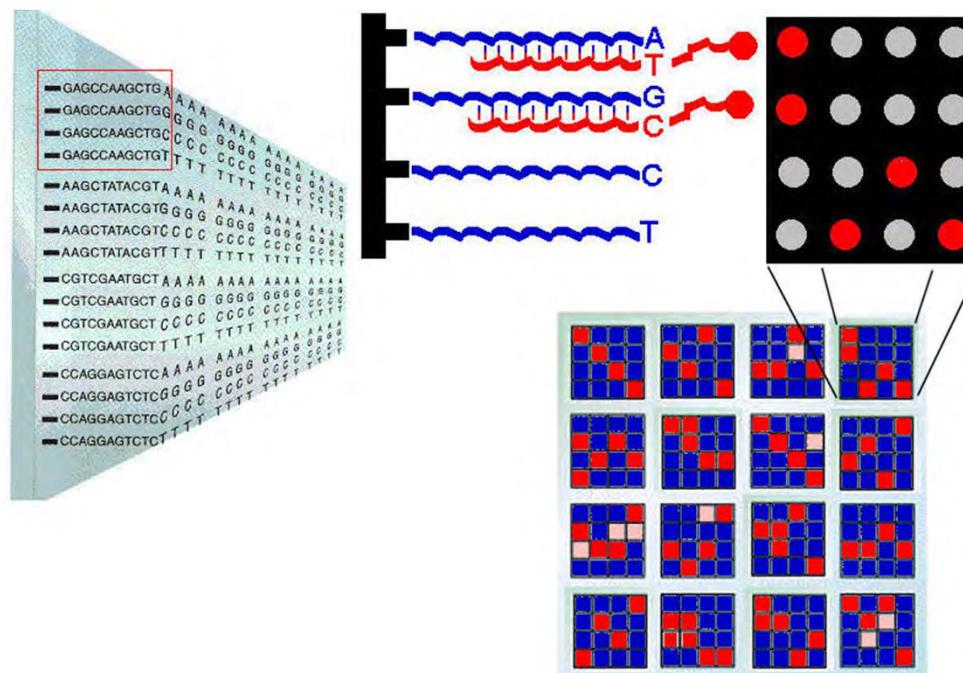
SNP ČIPI

To determine which alleles are present, **genomic DNA** from an individual is isolated, fragmented, tagged with a fluorescent dye, and applied to the chip.

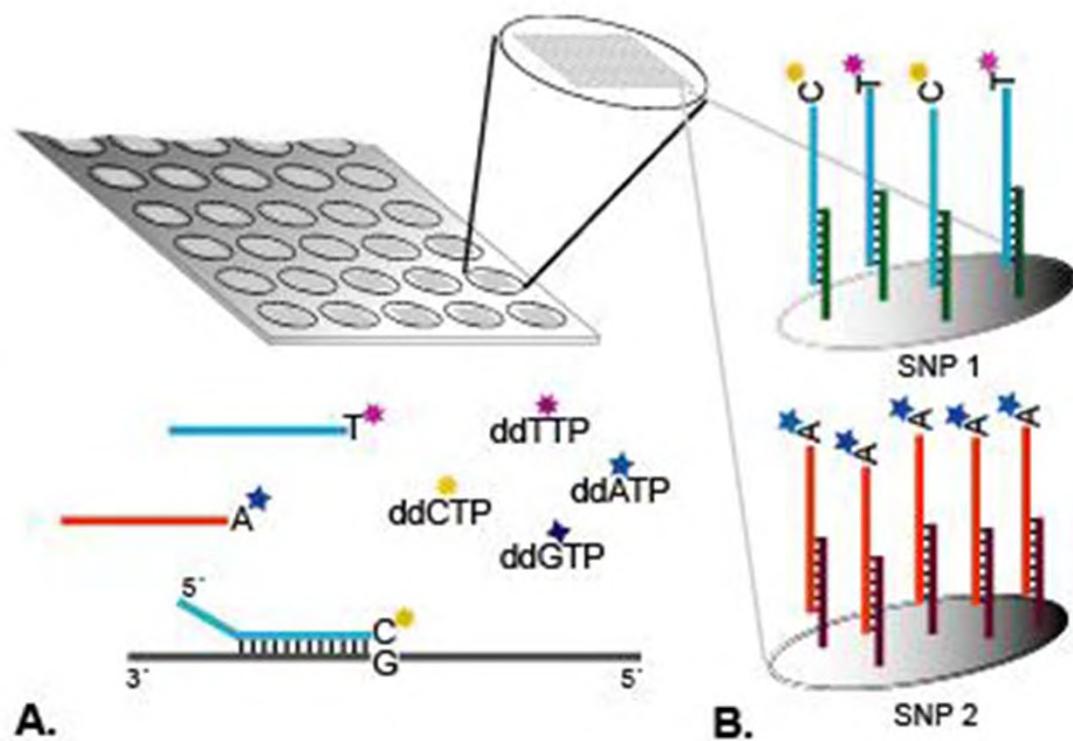
The **genomic DNA** fragments anneal only to these **oligos** to which they are perfectly complementary.

A computer reads the position of the two fluorescent tags and identifies the individual as a **C / T heterozygote**.

The *single* spots in the other three columns indicate that the individual is **homozygous** at the three corresponding **SNP** positions.



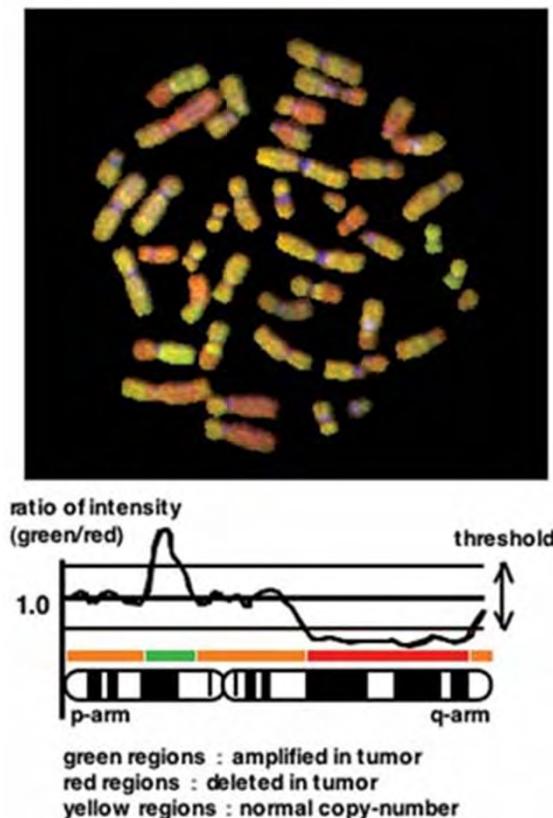
DETEKCIJA POLIMORFIZMOV Z DNA ČIPI



KOMPARATIVNA GENOMSKA HIBRIDIZACIJA

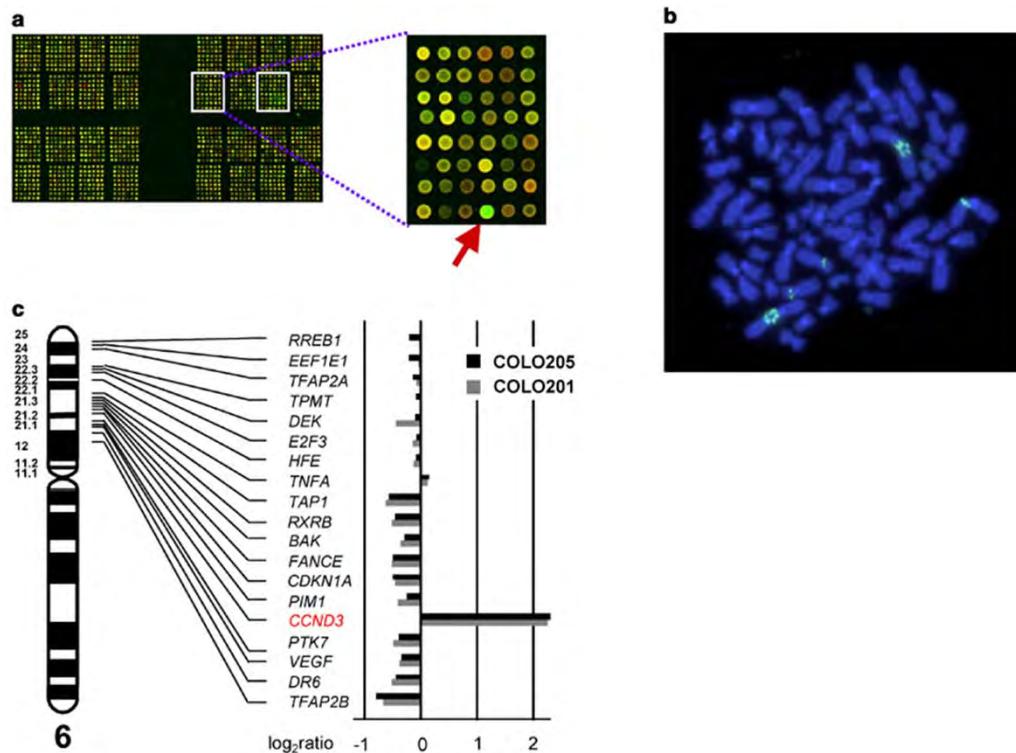
Komparativna genomska hibridizacija na čipih (CGH) je orodje za ugotavljanje števila kopij DNA ali odsekov DNA (CNV) v vzorcu.

Tehnika se je razvila iz konvencionalne CGH, kjer so diferenčno označili vzorec pacientove in referenčne DNA (od zdravega moškega/ženske) in pregledali razmaz metafaznih kromosomov.

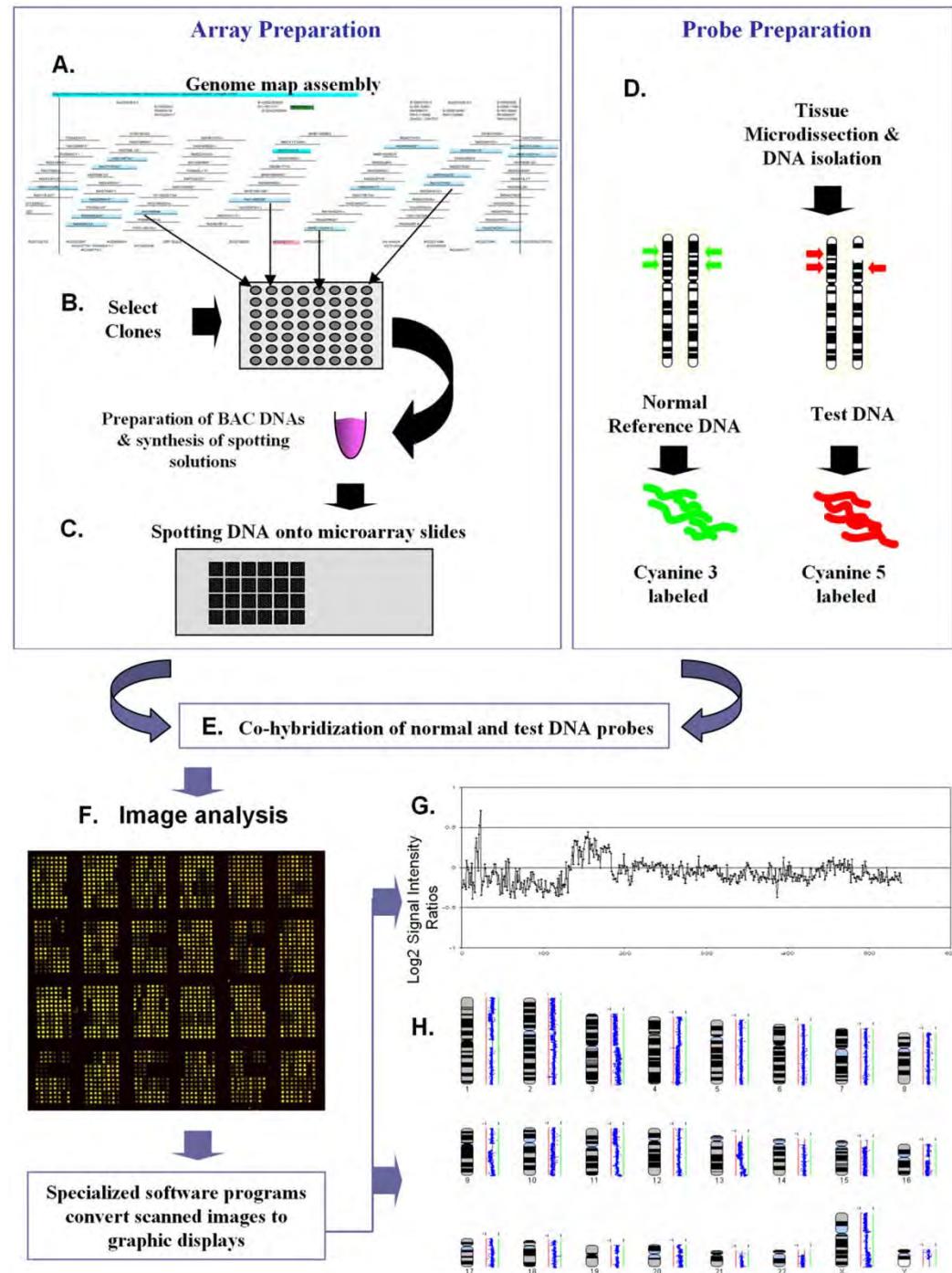


NEKATERE BOLEZNI SO POVEZANE Z VELIKIMI DELECIJAMI ALI REPLIKACIJAMI DNA PODROČIJ ZNOTRAJ KROMOSOMOV

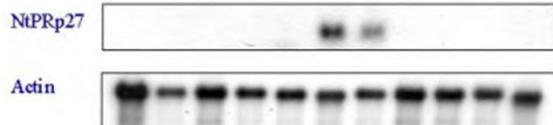
CGH oz. CNV omogoča visokozmogljivostno določevanje in mapiranje teh genomskeh nepravilnosti, z resolucijo le nekaj bp.



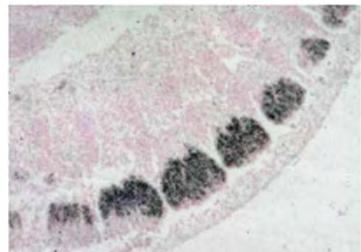
PRIMER HIBRIDIZACIJE CGH ČIPA IN REZULTAT ANALIZE



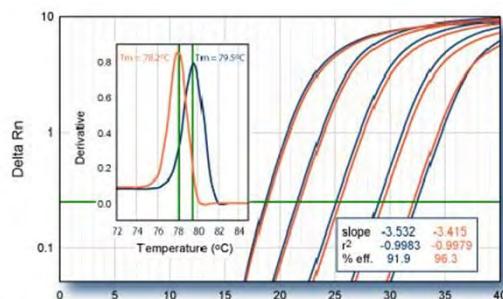
METODE ZA MERJENJE IZRAŽANJA GENOV



Northern blot



***In situ* hibridizacija**

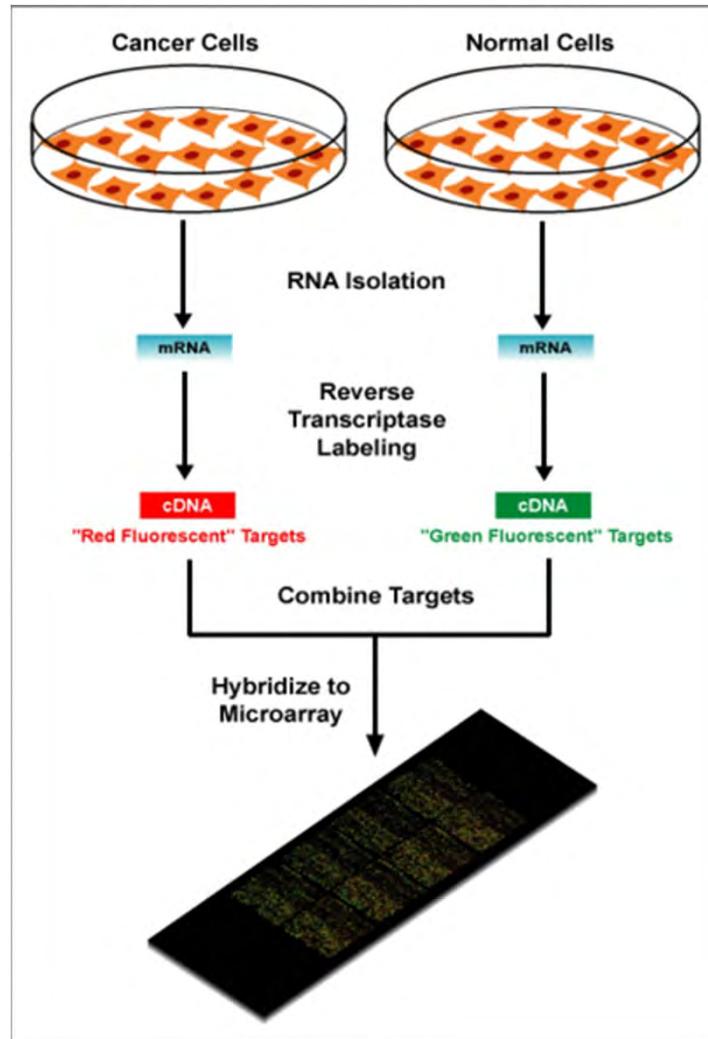


qPCR



DNA mikromreže

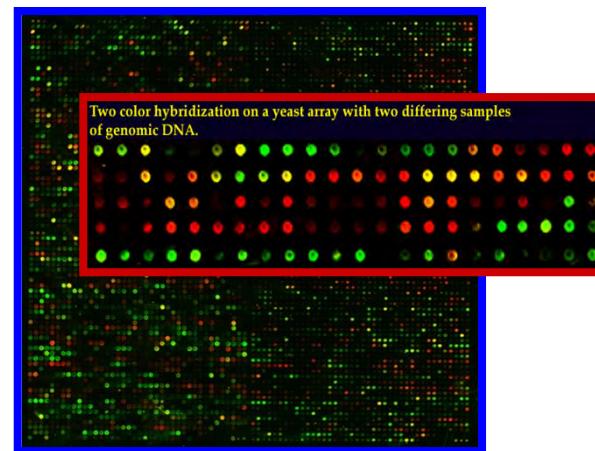
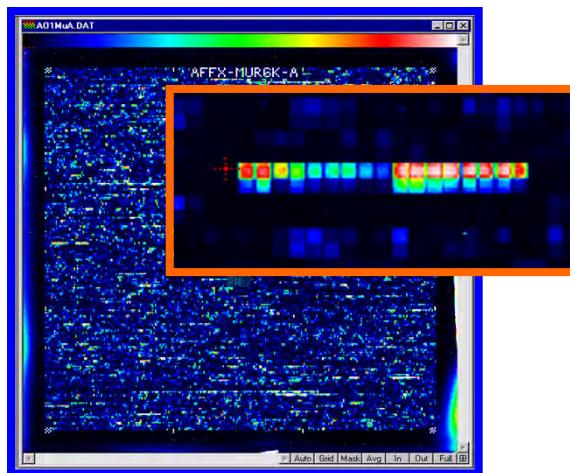
EKSPRESIJSKO PROFILIRANJE Z DNA MIKROMREŽAMI



EKSPRESIJSKO PROFILIRANJE – določanje količine izraženih genov

Postopek:

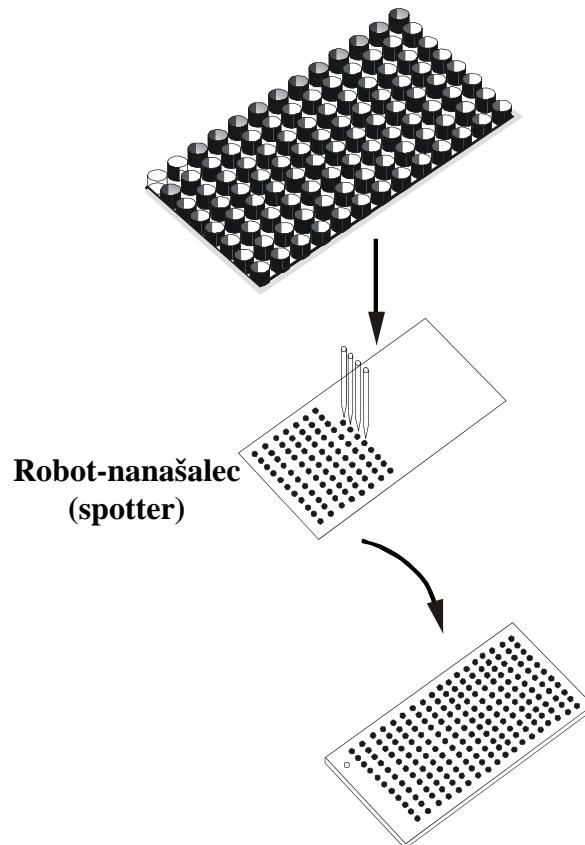
- 1) Ekstrakcija mRNA
- 2) Priprava označene cDNA,
- 3) Hibridizacija na mikromrežo,
- 4) Skeniranje in analiza slike
- 5) Iskanje differenčno izraženih genov (normalizacija, bioinformatična obdelava, gručanje, GO, itd.)



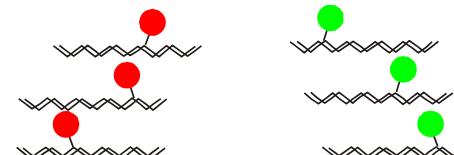
Ekspresijsko profiliranje z DNA mikromrežami – dvojno označevanje

mikromreže s cDNA in dolgimi oligonukleotidi s 3'-konca

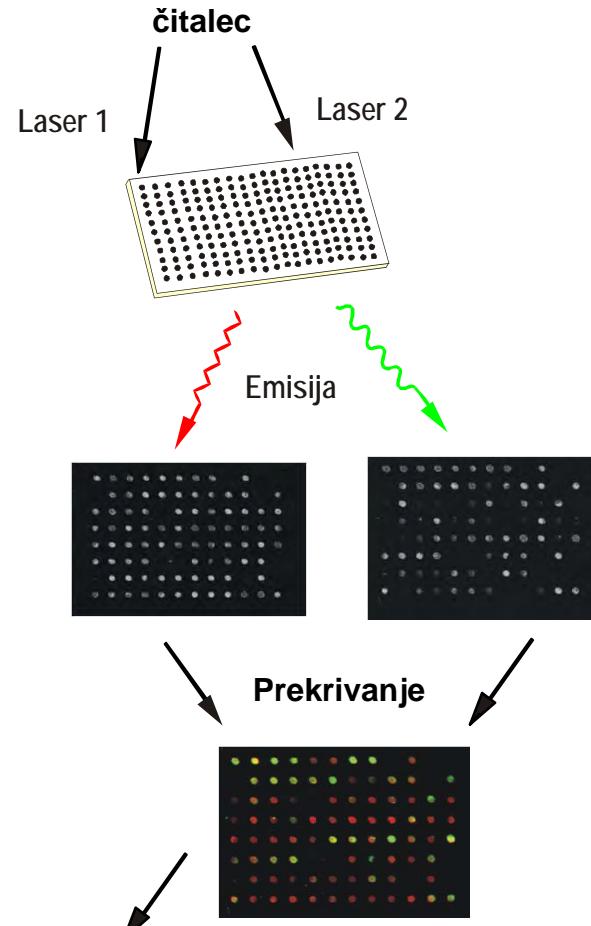
Geni zastopani s
cDNA ali z oligonukleotidi



Obratno prepisovanje
označevanje

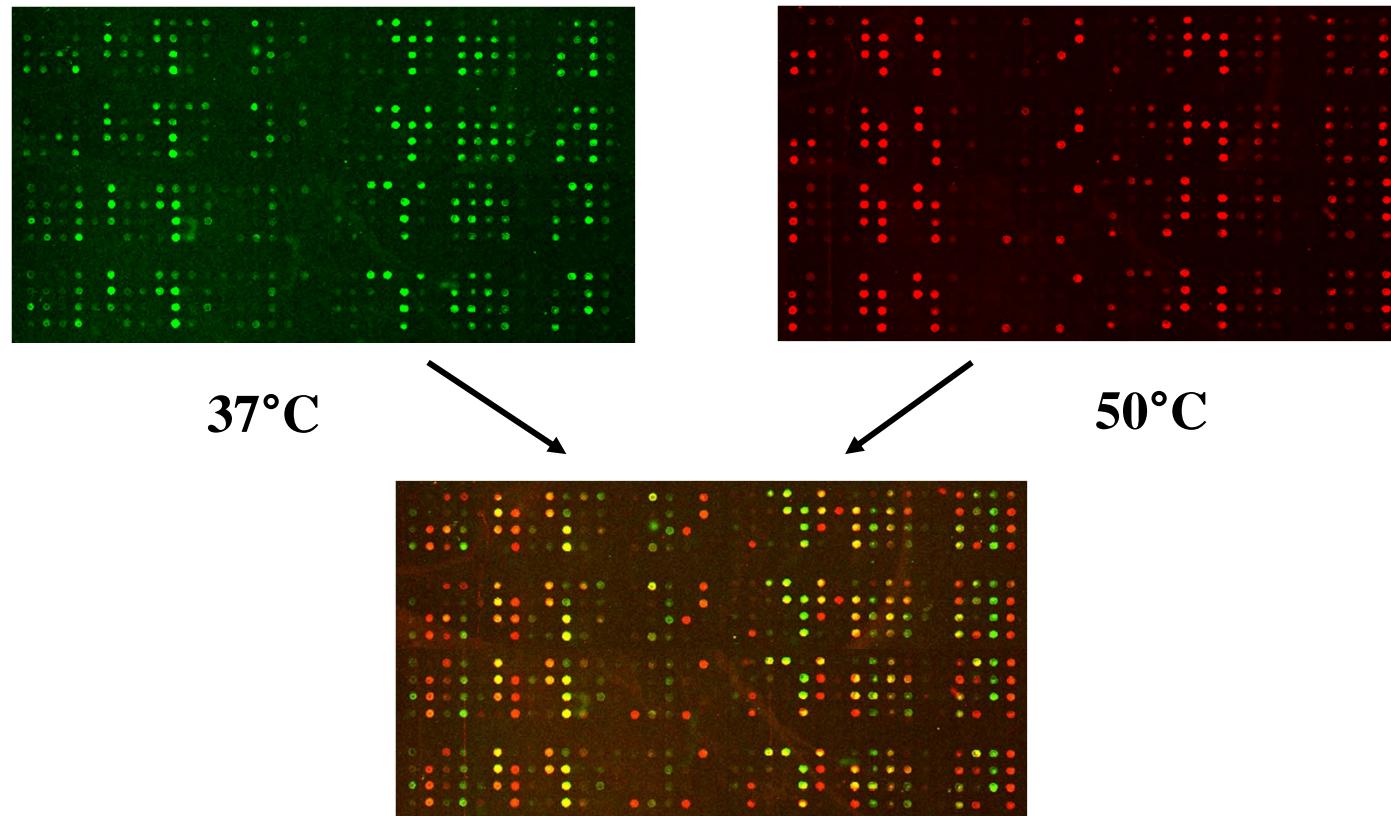


ko-hibridizacija



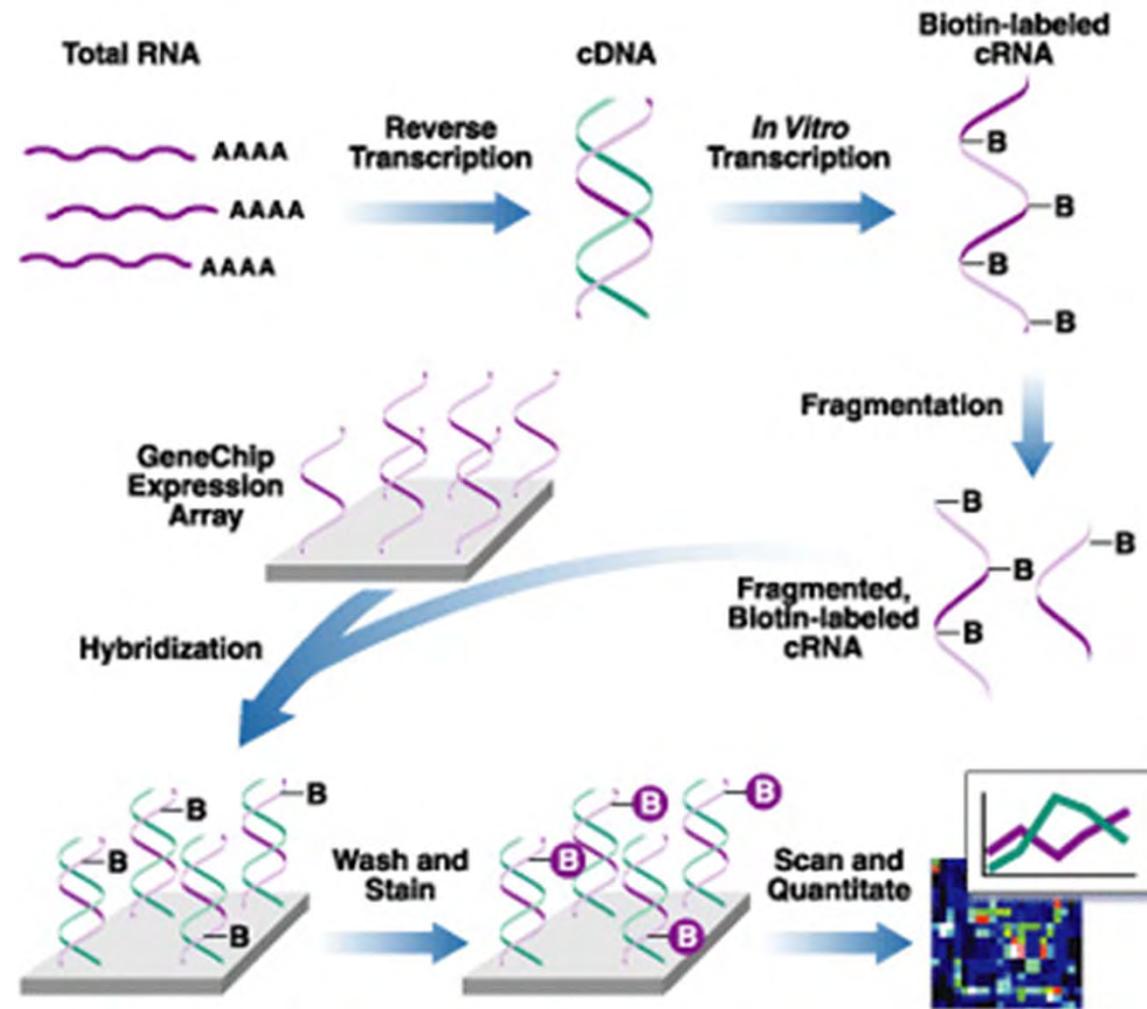
Računalniška analiza

PRIMER – TEMPERATURNI ŠOK *E. COLI*



Ekspresijski profil 50 genov *E. coli* pod vplivom temperaturnega šoka (barvili cy3/cy5)

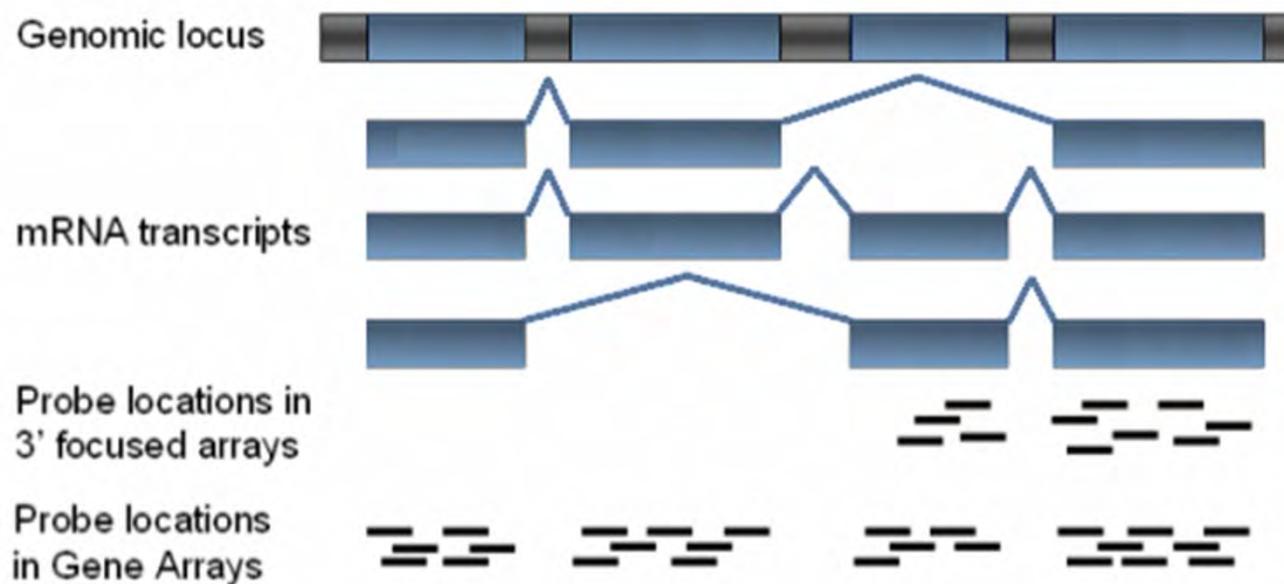
ENOJNO OZNAČEVANJE PROB S 3'-KONCA GENOV



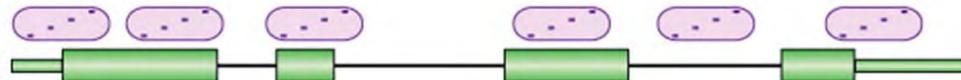
AFFYMETRIX®

**ZA EKSPRESIJSKO PROFILIRANJE SE NAJVEČ UPORABLJAJO
ČIPI S PROBAMI NA 3' KONCU ALI t.i. GENSKI ČIPI**

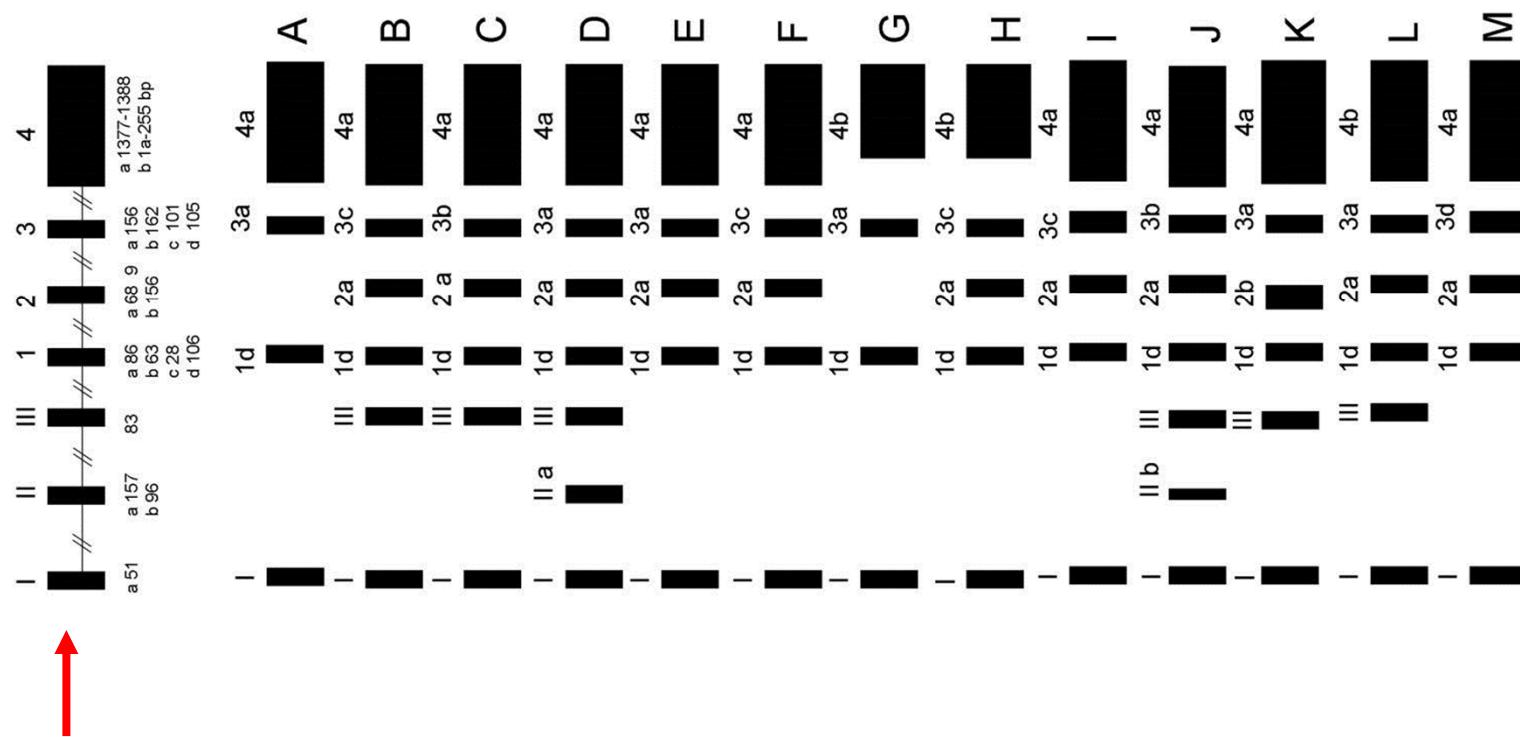
Primer: tehnologija Affymetrix



EKSONSKI ČIPI – ZA DOLOČEVANJE ALTERNATIVNEGA POVEZOVANJA EKSONOV

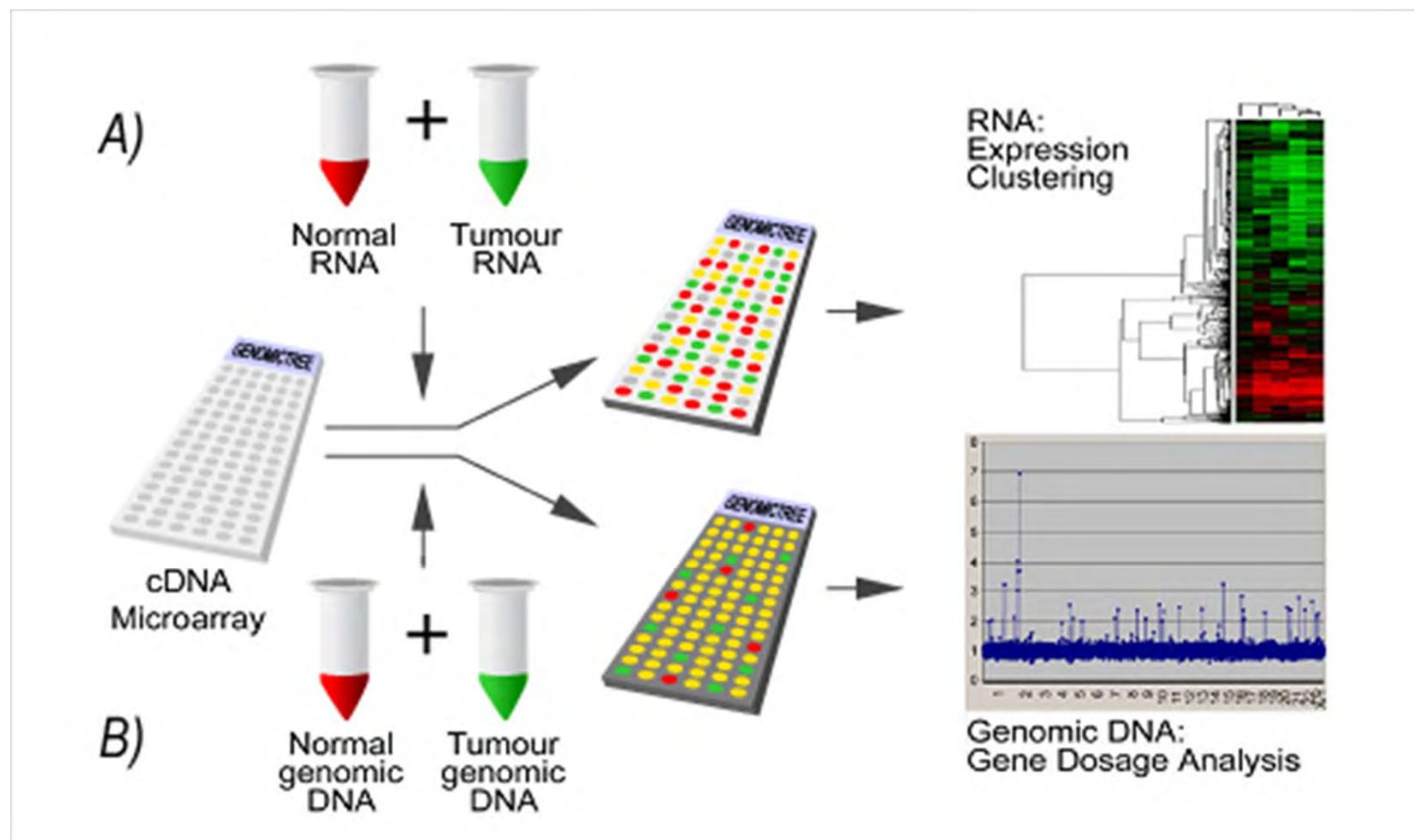


Omogočajo analizo ekspresijskega profila kot tudi alternativnega spajanja (angl. *splicing*).



Complex organisation and structure of the ghrelin antisense strand gene GHRLOS, a candidate non-coding RNA gene
Seim I et al., BMC Molecular Biology 2008, 9:95

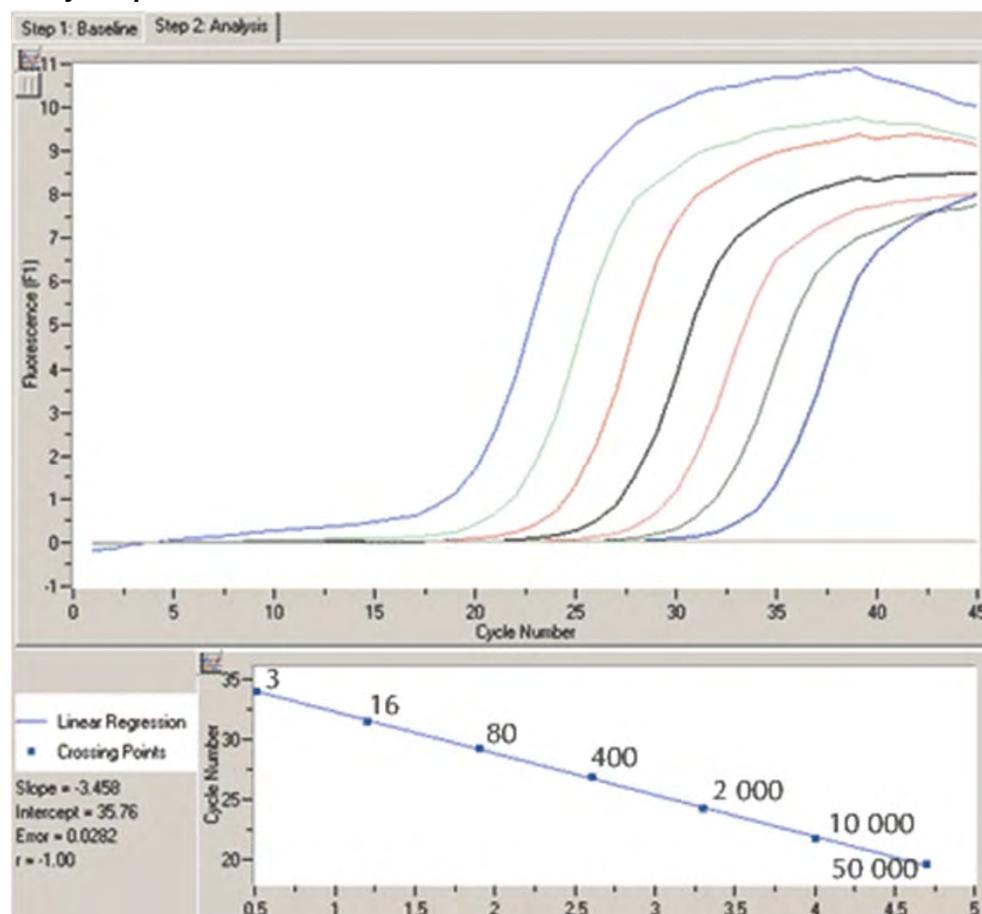
KOMBINACIJA EKSPRESIJSKEGA PROFILIRANJA IN CGH PRI ŠTUDIJAH RAKA



KVANTITATIVNI PCR – METODA VALIDACIJE REZULTATA EKSPRESIJSKEGA PROFILIRANJA IN DOLOČEVANJA SNP

Omogoča določanje specifičnih PCR produktov v realnem času med pomnoževanjem.

Omogoča kvantifikacijo specifičnih DNA molekul v začetni PCR mešanici.



Z MIKROMREŽAMI LAHKO TUDI MERIMO IZRAŽANJE miRNA (drugačne mikromreže kot za ekspresijsko profiliranje)

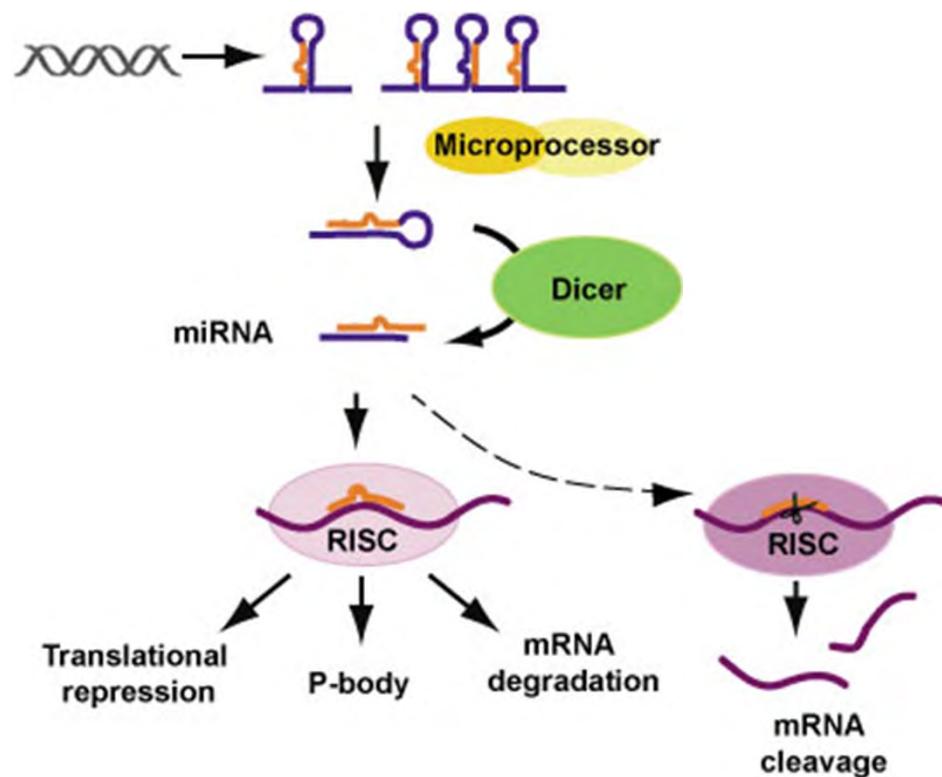
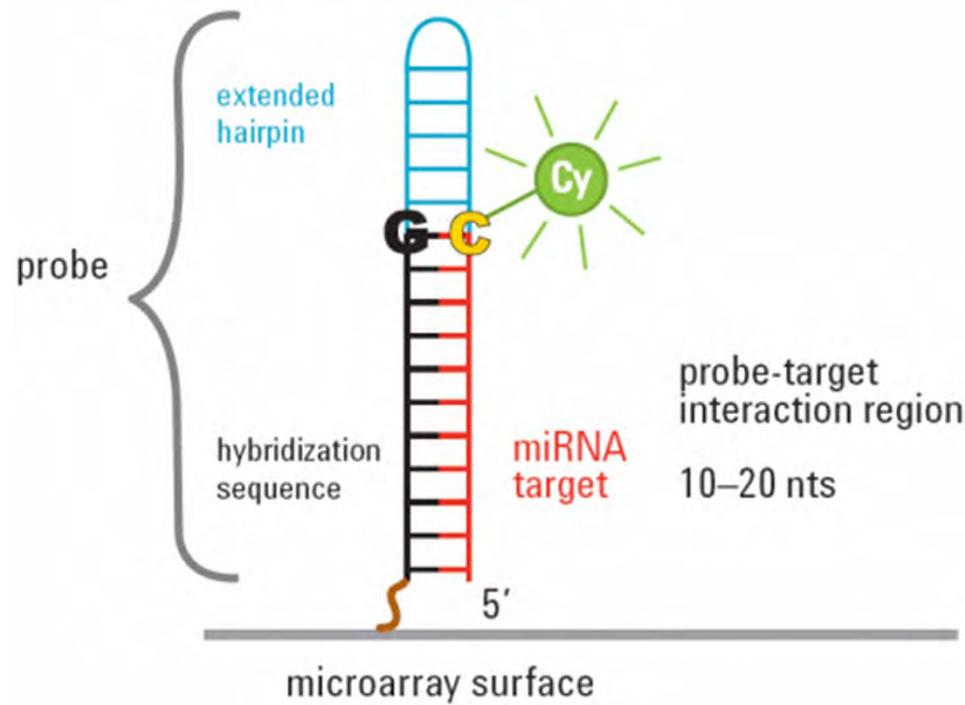


Fig1. The current model on miRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing.

PRIMER HIBRIDIZACIJE miRNA MIKROMREŽ

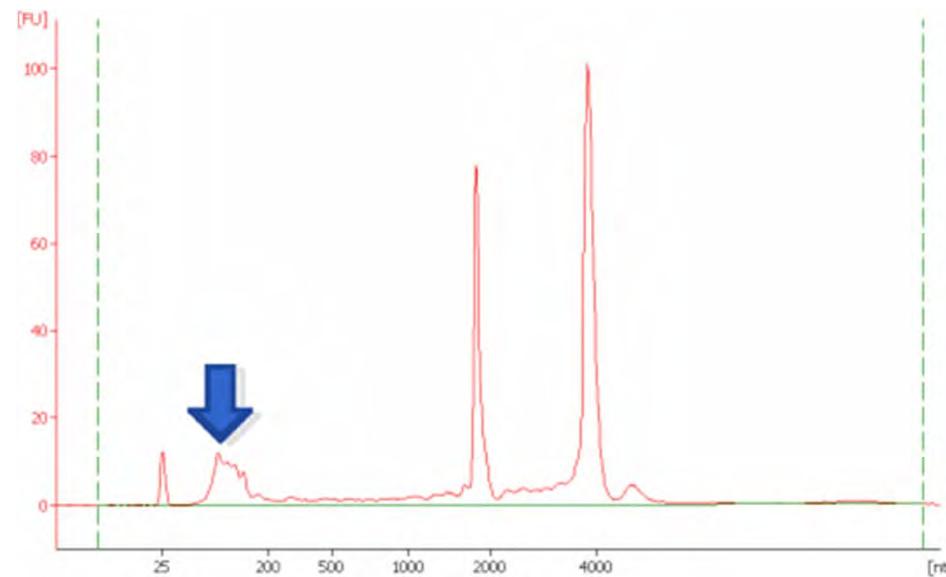


Zanka na 5' koncu probe za specifično prepoznavanje.

Source: Agilent

IZOLACIJA miRNA

- Iz celokupne RNA s Trizolom, brez čiščenja na kolonah.
- Kvantifikacija z Nanodrop spektrofotometrom.
- Analiza kvalitete z Agilent bioanalizatorjem.



Analiza z Agilent 2100 Bioanalyzatorjem – elektroferogram s TRIZOLom izolirane celokupne RNA.

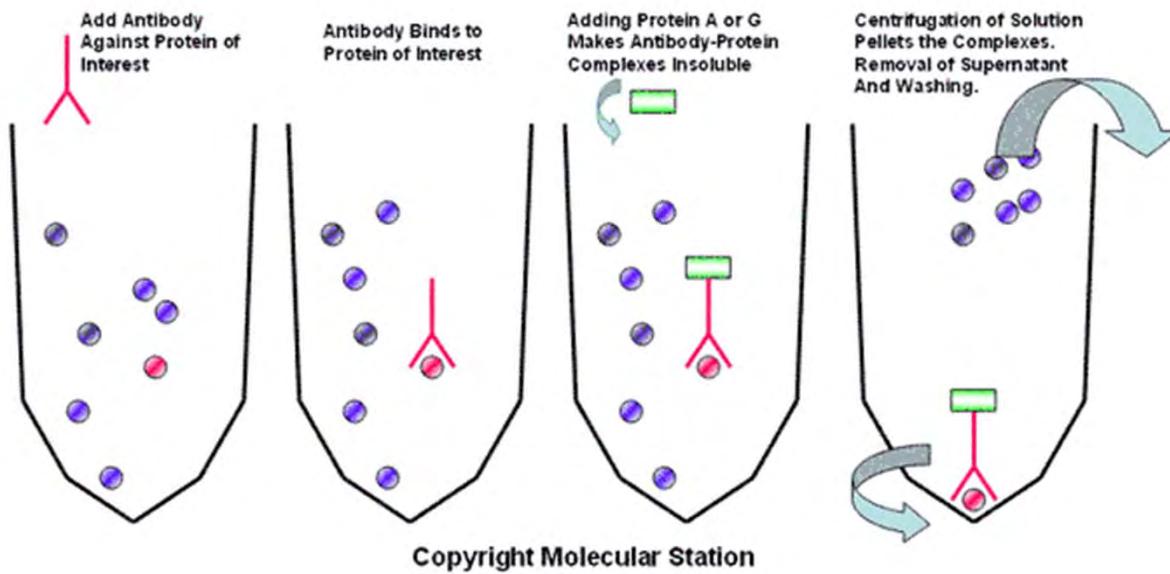
RNA <200nt vsebujejo miRNA.

DOLOČANJE INTERAKCIJ MED DNA IN PROTEINI NA ČIPU: KROMATINSKA IMUNOPRECIPITACIJA NA ČIPU (CHIP-Chip)



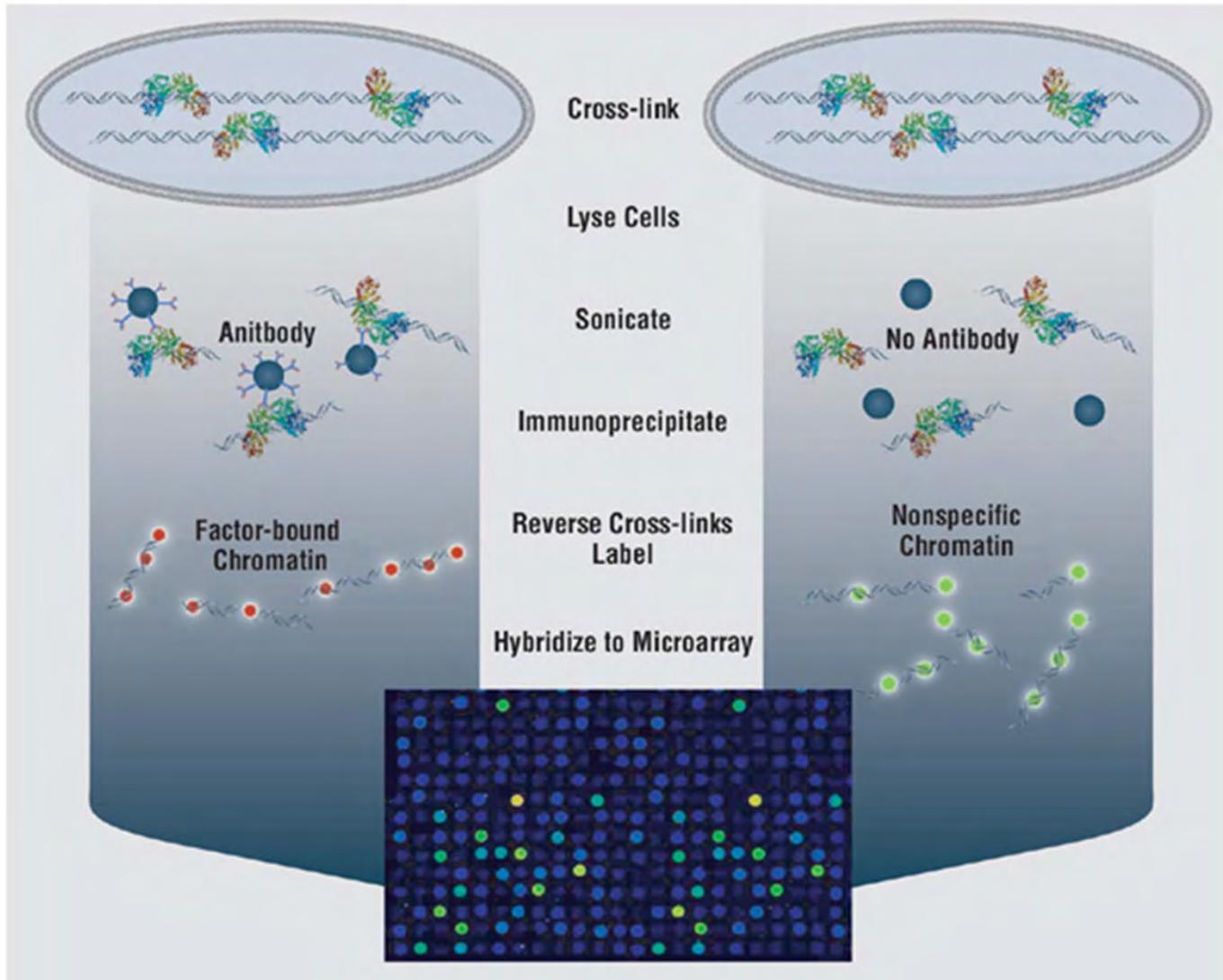
1. Imunoprecipitacija proteinov, ki so vezani na DNA
2. Ločitev proteinov od DNA
3. Hibridzacija DNA na čip, ki vsebuje regulatorna zaporeja genoma

Princip imunoprecipitacije proteinov

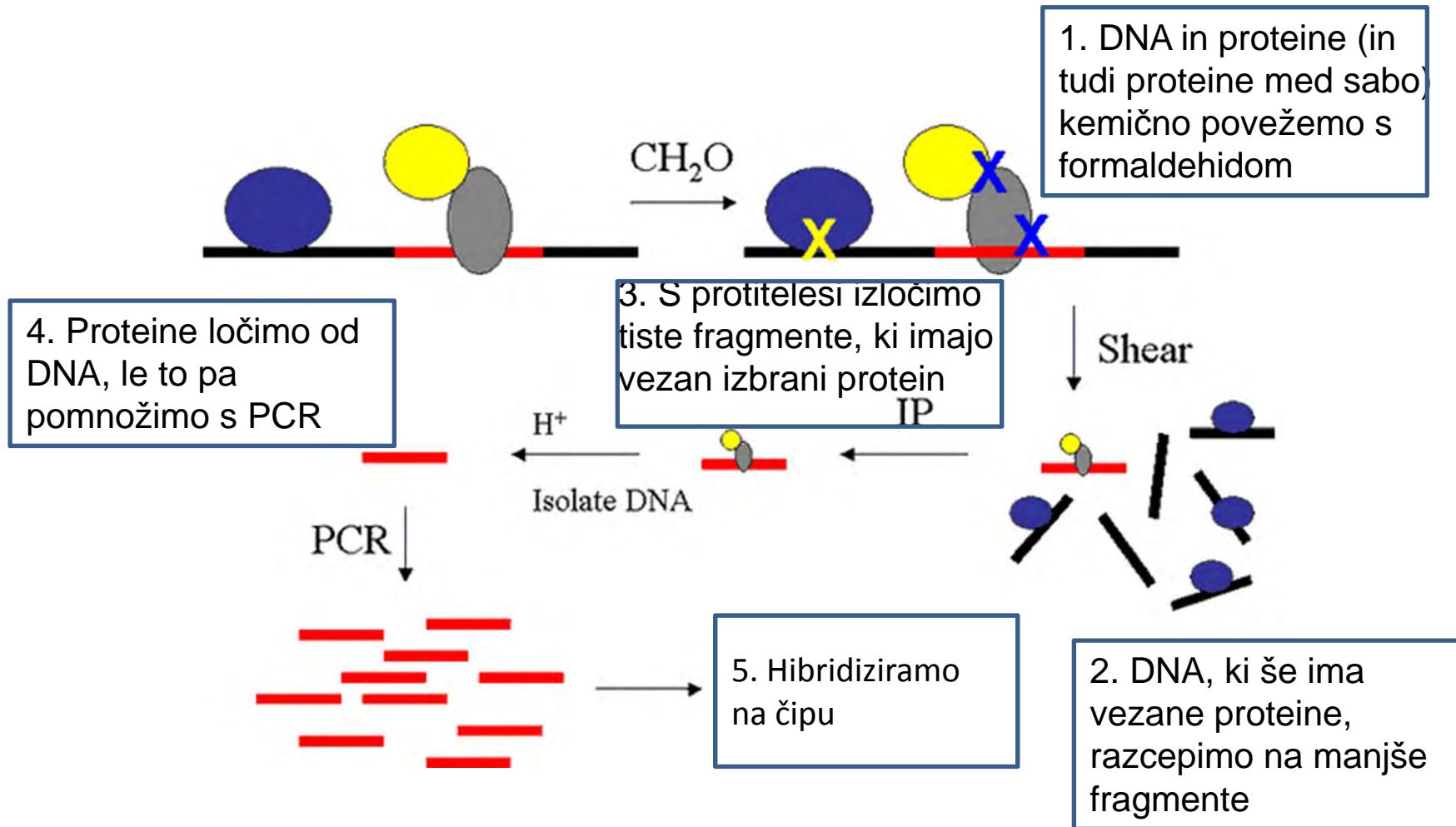


Če s protitelesi izločimo proteine, ki so vezani na DNA, postopek imenujemo kromatinska imunoprecipitacija.

SHEMA KROMATINSKE IMUNOPRECIPITACIJE NA ČIPU

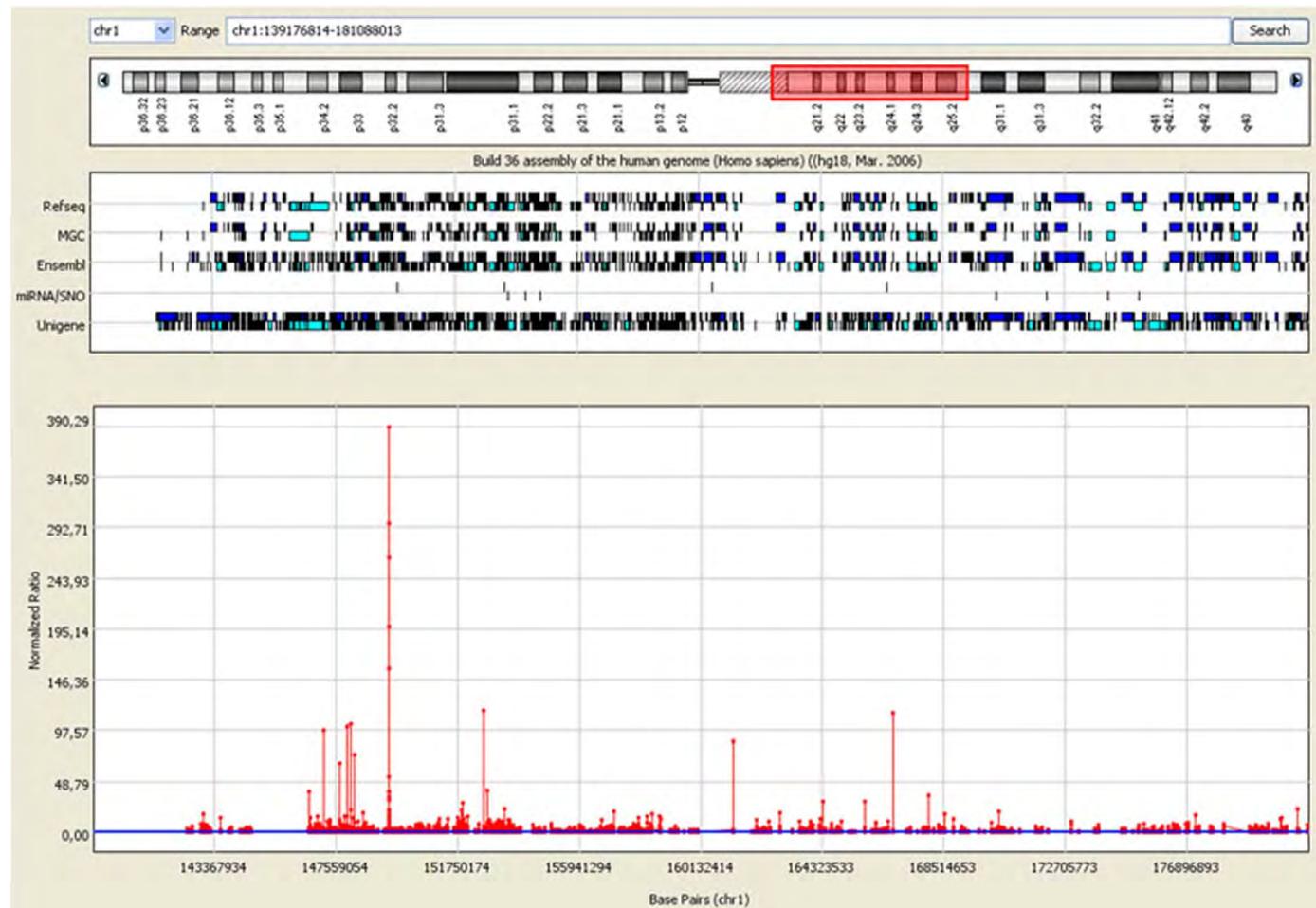


POSTOPEK KROMATINSKE IMUNOPRECIPITACIJE



Vsaka DNA, ki je po imunoprecipitaciji na čipu obogatena, predstavlja potencialno mesto vezave proteina, s katerim smo izvedli imunoprecipitacijo.

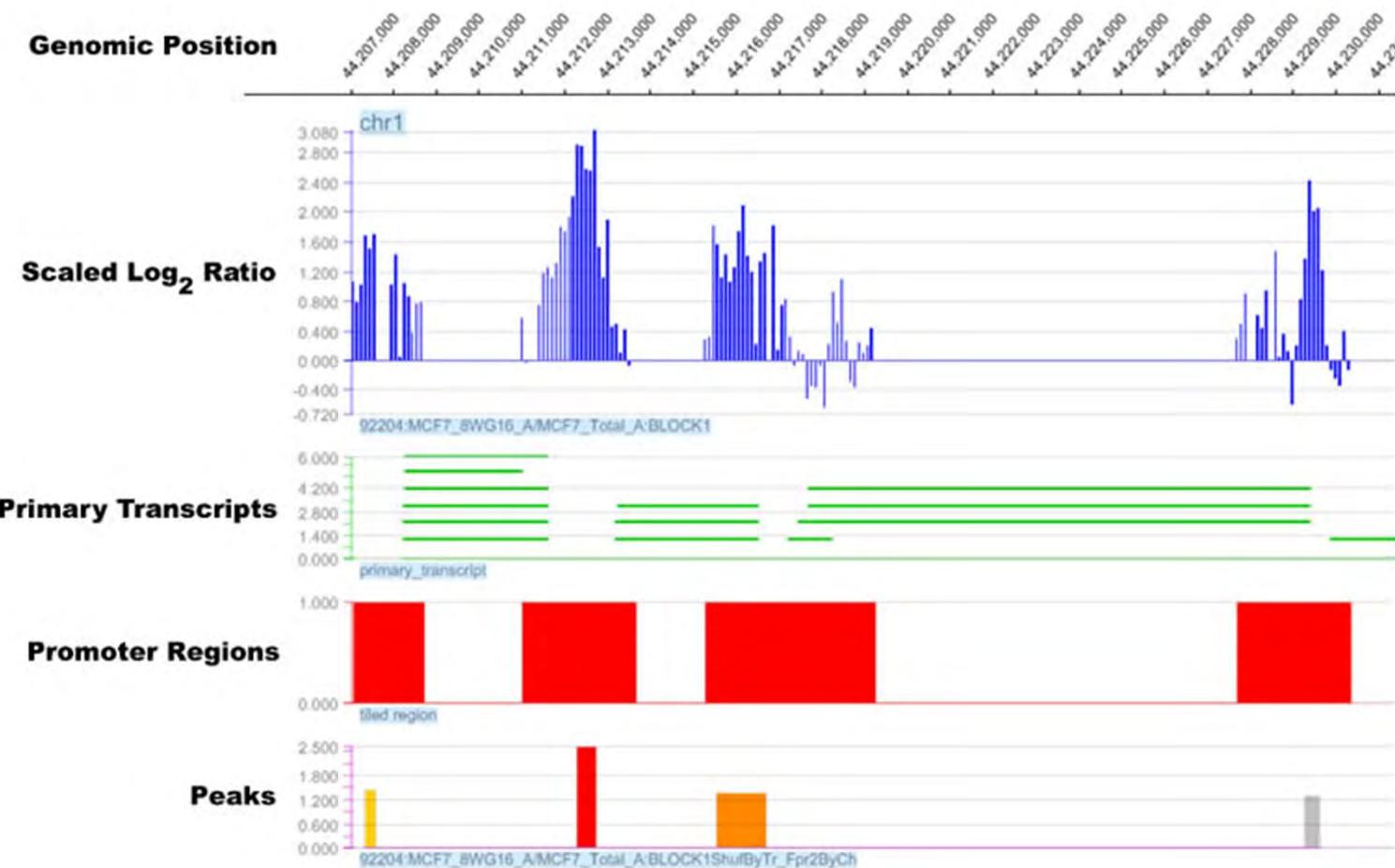
PRIMER IZPISA ANALIZE ČIP-ČIP



Mesto za vezavo transkripcijskega faktorja prepoznamo po povečani vezavi probe na določenem predelu DNA

(Agilent)

PRIMER IZPISA ANALIZE ČIP-ČIP





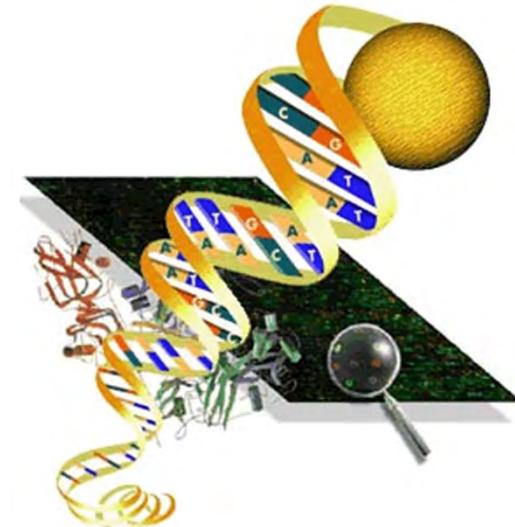
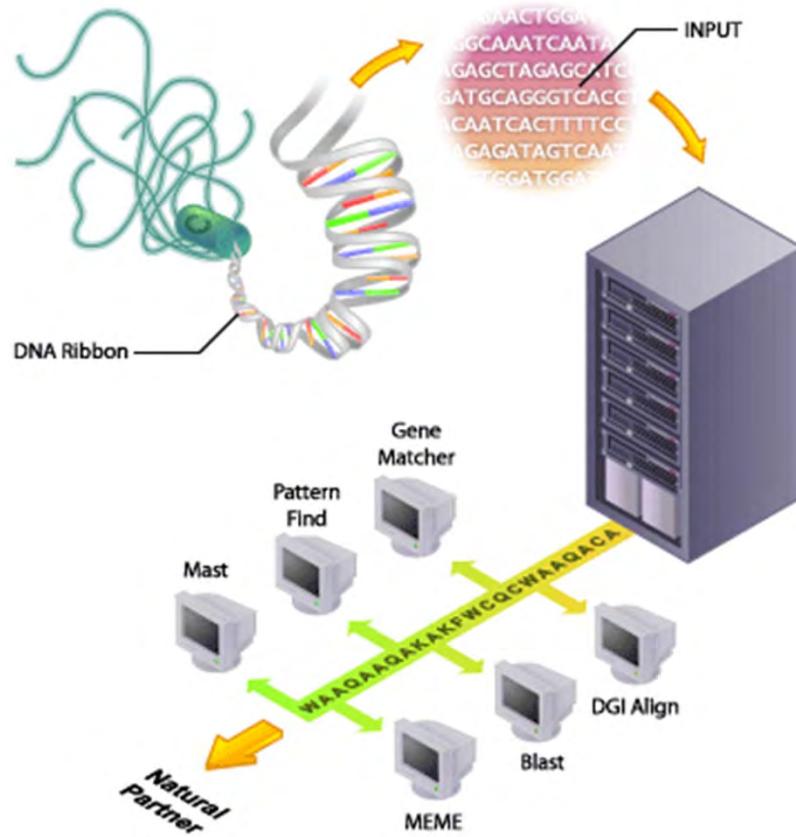
Povzetek

DNA čipi so zbirka mikroskopskih “DNA točk”, cDNA ali oligonukleotidov, pritrjenih na trdo podlago.

Uporabljajo se za:

- **Analizo genomske DNA** (genotipizacija, SNP analiza, CHG, sekvenciranje).
- **Analizo izražanja genov** (ekspresijsko profiliranje), kjer probe lahko predstavljajo 3'-konci genov, eksone ali različne dele genov. Posebni čipi pa so za sledenje izražanja miRNA.
- **Študije uravnavanja izražanja genov** (določanje vezavnih mest transkripcijskih faktorjev, metilacija kromatina), kjer probe predstavljajo 5'-neprevedene dele in nerepetitivne dele genov.

Bionformatika predstavlja ključni del vseh visokozmogljivih tehnologij pogenomske dobe



www.gwumc.edu

Bioinformatics

Wikipedia

Making sense of the huge amounts of DNA data produced by gene sequencing projects.

Bioinformatics and **computational biology** involve the use of techniques from applied mathematics, informatics, statistics, and computer science to solve biological problems.

Research in computational biology often overlaps with systems biology.

Major research efforts in the field include sequence alignment, gene finding, genome assembly, protein structure alignment, protein structure prediction, prediction of gene expression and protein-protein interactions, and the modeling.

The terms *bioinformatics* and *computational biology* are often used interchangeably, although the former typically focuses on algorithm development and specific computational methods, while the latter focuses more on hypothesis testing and discovery in the biological domain.

Bioinformatics

More hypothesis-driven research in computational biology.

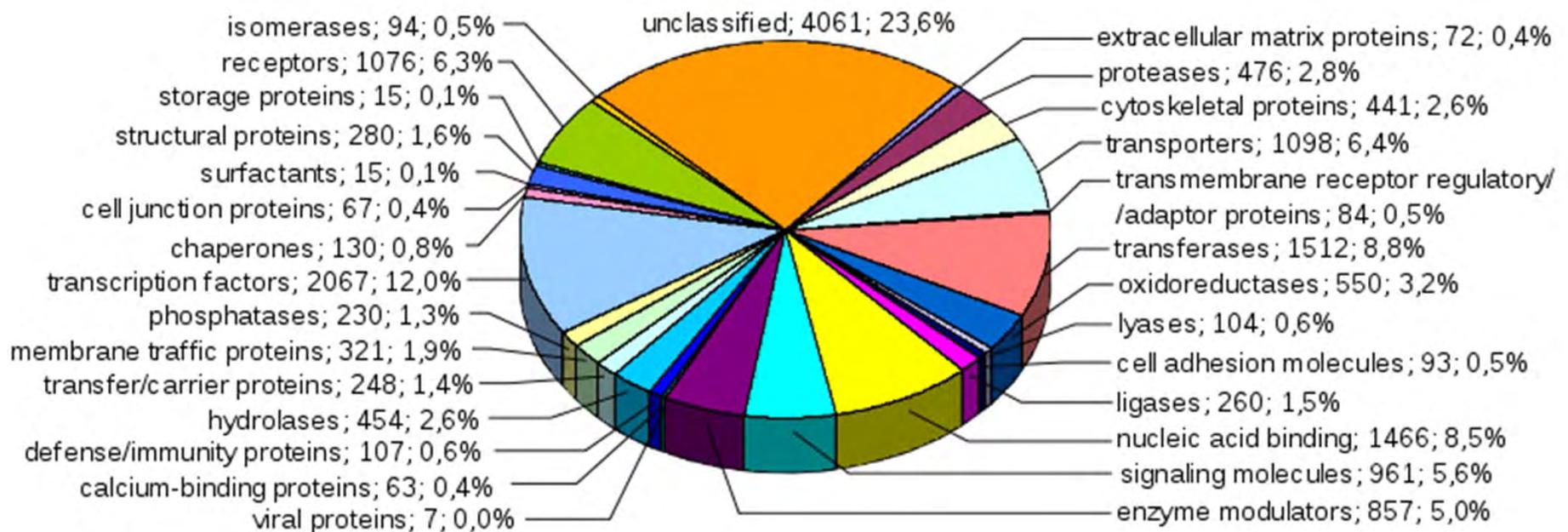
More technique-driven research in bioinformatics.

A common thread in projects in bioinformatics and computational biology is the use of mathematical tools to extract useful information from [noisy](#) data produced by high-throughput biological techniques.

A representative problem in bioinformatics is the assembly of high-quality [DNA](#) sequences from fragmentary "shotgun" DNA [sequencing](#).

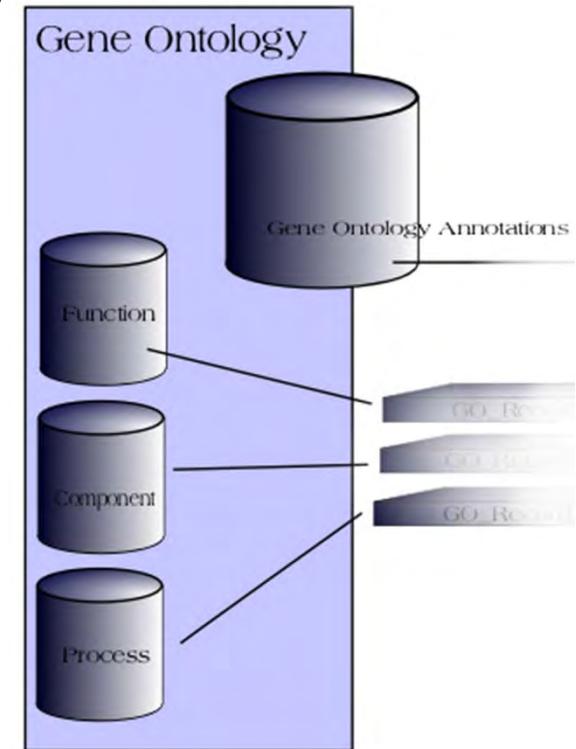
In computational biology, a representative problem might be statistical testing of a hypothesis of common [gene regulation](#) using data from [mRNA microarrays](#) or [mass spectrometry](#).

PRIBLIŽNO 23.000 GENOV ČLOVEŠKEGA GENOMA LAHKO RAZPOREDIMO V SMISELNE SKUPINE – PRI TEM SI POMAGAMO Z GENSKIMI ONTOLOGIJAMI



GENSKA(E) ONTOLOGIJA(E) SO V POMOČ PRI OPREDELITVI FUNKCIJE GENOV

- Genske ontologije so bioinformatična orodja, ki omogočajo predstavitev genov in genskih produktov v vseh organizmih.
- Predstavljajo neke vrste slovarje genov in genskih produktov, ki omogočajo **anotacijo genov** (opis gena na podlagi zbranih podatkov o genskem produktu).
- Vsak gen opišemo s **celično komponento** (kje v celici se genski produkt nahaja), **molekularno funkcijo** (i. e. strukturni protein, encim, etc.) in **biološko vlogo**.
- **Ontologije so dinamične**, saj nova spoznanja spreminja opise funkcije genov.
- **Tudi anotacije so še vedno dinamične (2013)!!**

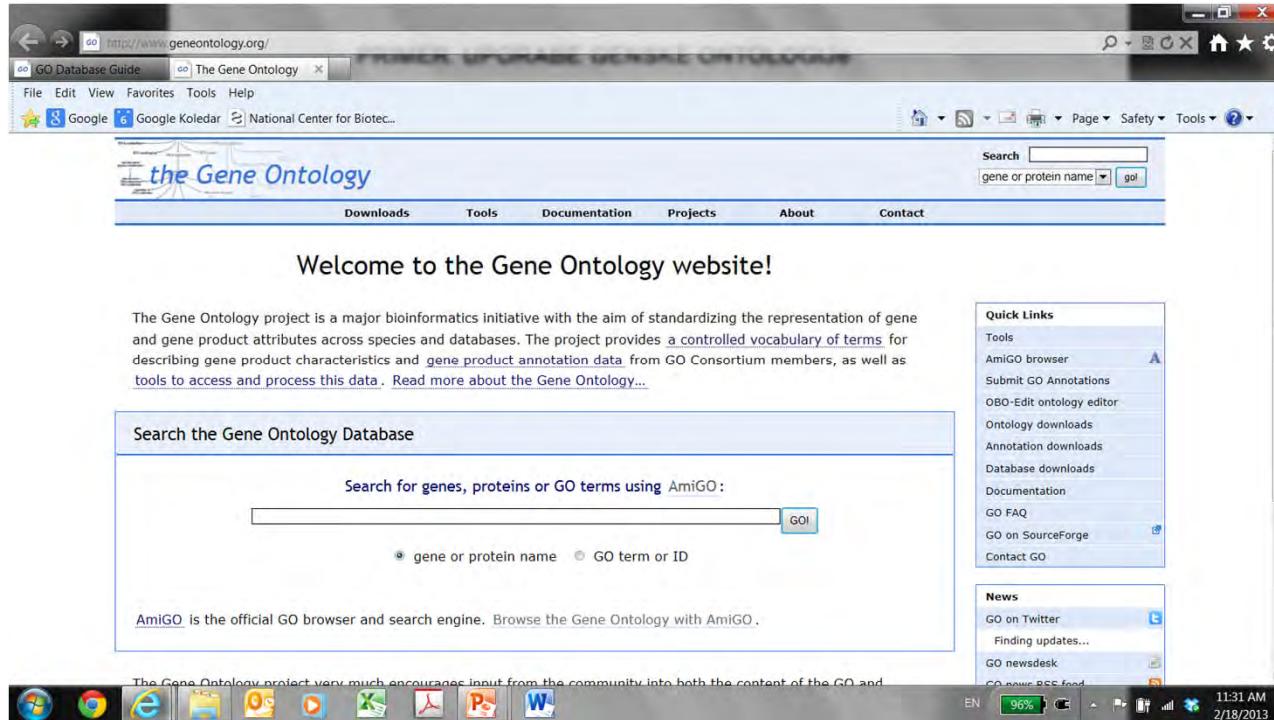


[3http://www.geneontology.org/](http://www.geneontology.org/)

<http://www.geneontology.org/GO.doc.shtml>

<http://www.geneontology.org/GO.database.shtml#dbtypes>

PRIMER UPORABE GENSKE ONTOLOGIJE



<http://www.geneontology.org/>

<http://www.geneontology.org/GO.database.shtml>

OBSTAJA VEČ RAZLIČNIH ONTOLOGIJ, KI PRIVEDEJO DO RAZLIČNIH UVRSTITEV GENOV V SKUPINE

Primer GO klasifikacije

id: GO:0000016
name: lactase activity
namespace: molecular_function
def: "Catalysis of the reaction: lactose + H₂O = D-glucose + D-galactose." [EC:3.2.1.108]
synonym: "lactase-phlorizin hydrolase activity" BROAD [EC:3.2.1.108]
synonym: "lactose galactohydrolase activity" EXACT [EC:3.2.1.108]
xref: EC:3.2.1.108
xref: MetaCyc:LACTASE-RXN
xref: Reactome:20536
is_a: GO:0004553 ! hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds

KEGG Klasifikacija

Mreže interakcij med molekulami, reakcij in njihovih medsebjnih relacij.



http://kt.ijs.si/software/SEGS/index.php?show=download_ONT