

# CG020 Genomika

## Bi7201 Základy genomiky

### Přednáška 5

Genová exprese a fenotypové profilování

Jan Hejátko

**Funkční genomika a proteomika rostlin,**  
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,  
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno  
[hejatko@sci.muni.cz](mailto:hejatko@sci.muni.cz), [www.ceitec.muni.cz](http://www.ceitec.muni.cz)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Genomika 05

## ■ Zdrojová literatura

- 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
- Nevo-Dinur, K., Nussbaum-Shochat, A., Ben-Yehuda, S., and Amster-Choder, O. (2011). Translation-independent localization of mRNA in *E. coli*. *Science* 331, 1081-1084.
- Lecuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T.R., Tomancak, P., and Krause, H.M. (2007). Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* 131, 174-187.
- Schonberger, J., Hammes, U.Z., and Dresselhaus, T. (2012). In vivo visualization of RNA in plants cells using the lambdaN(22) system and a GATEWAY-compatible vector series for candidate RNAs. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 71, 173-181.

# Osnova

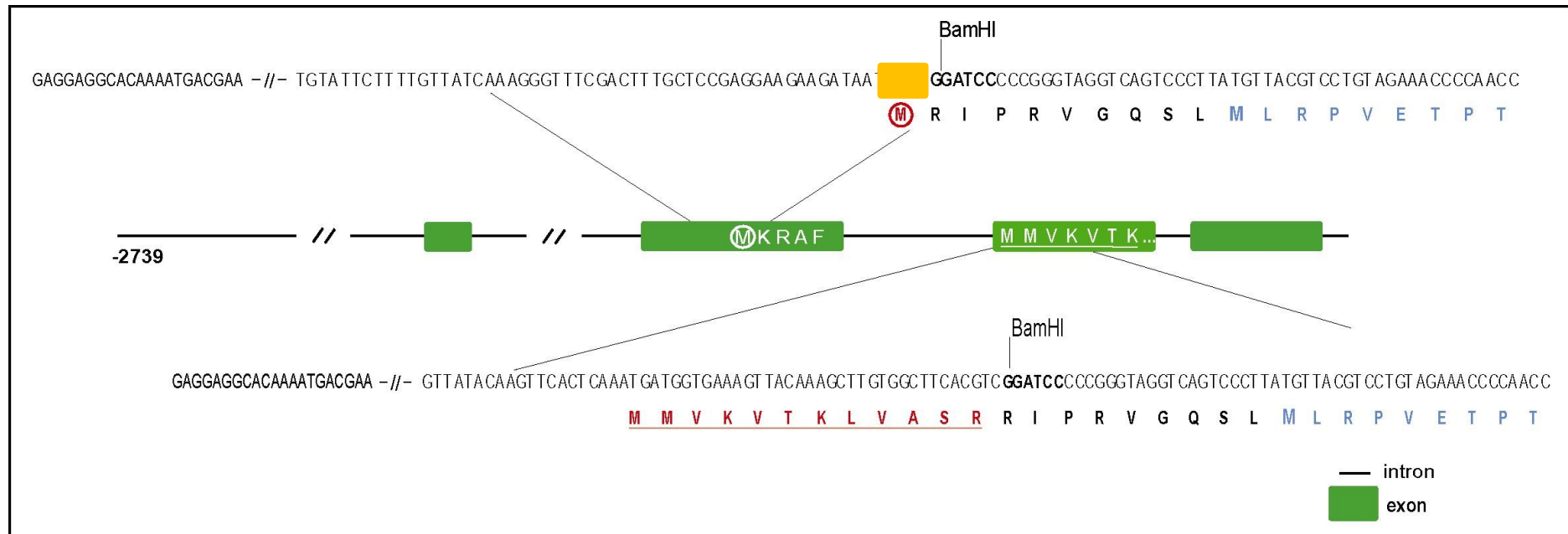
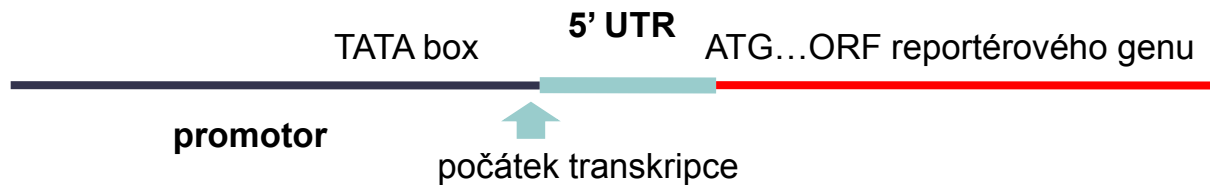
- Metody analýzy genové exprese
  - Kvalitativní analýza exprese genů
    - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
    - Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
    - Využití dostupných dat ve veřejných databázích
    - Tkáňově a buněčně specifická analýza genové exprese

# Osnova

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

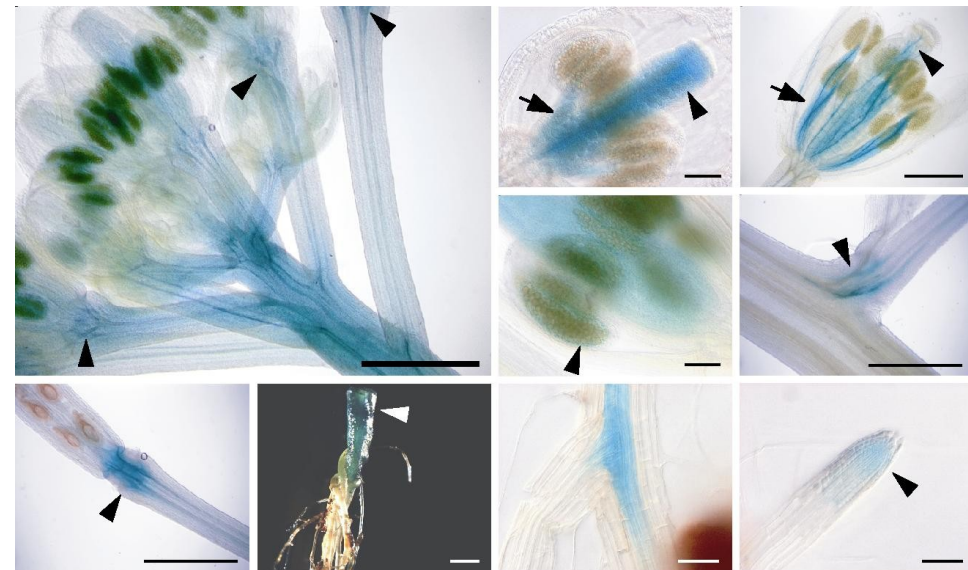
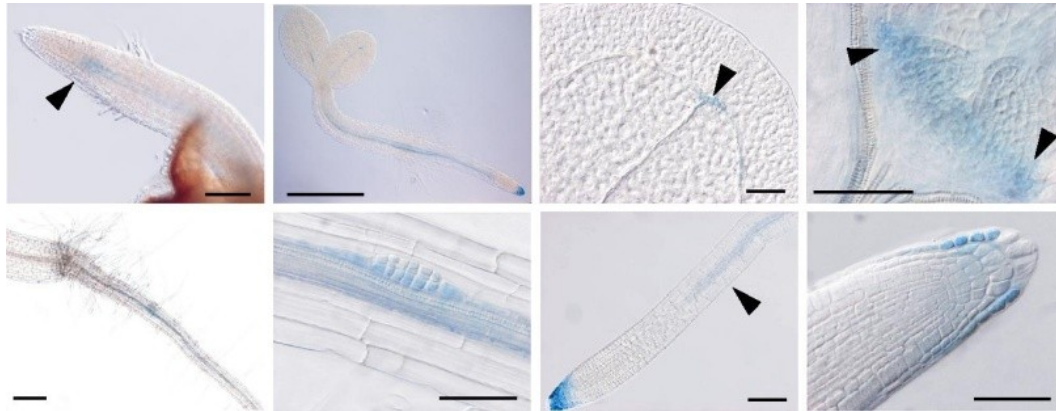
# Genová exprese

- **Transkripční fúze s promotorovou oblastí**
  - Identifikace a klonování promotorové oblasti genu
  - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP)



# Genová 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

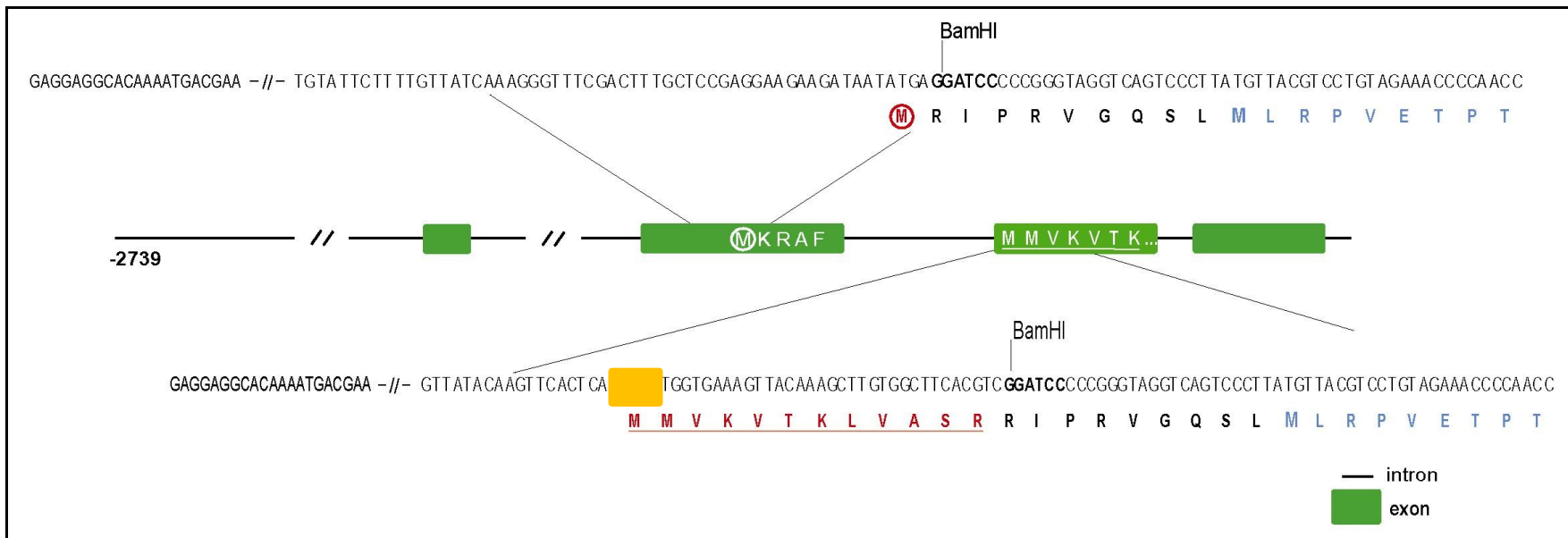
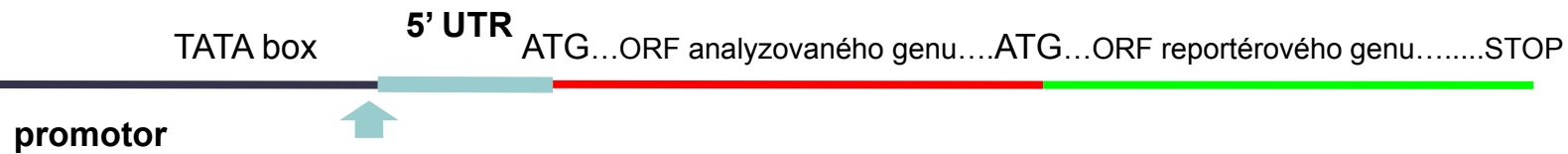


# Osnova

- 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

# Genová exprese

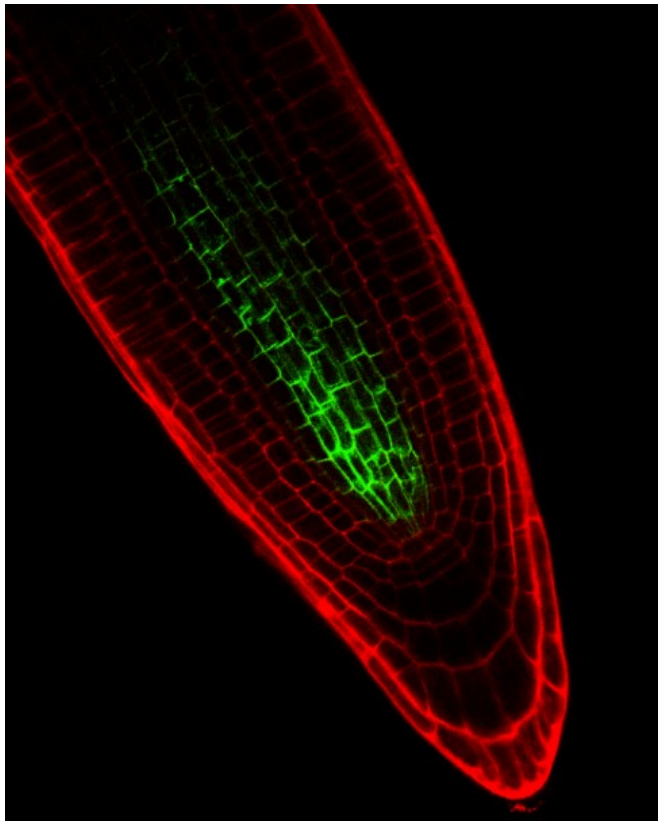
- **Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reportérovým genem**
  - Identifikace a klonování promotorové a kódující oblasti analyzovaného genu
  - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a kódující sekvenci studovaného genu ve fúzi s reportérovým genem (uidA, GFP)



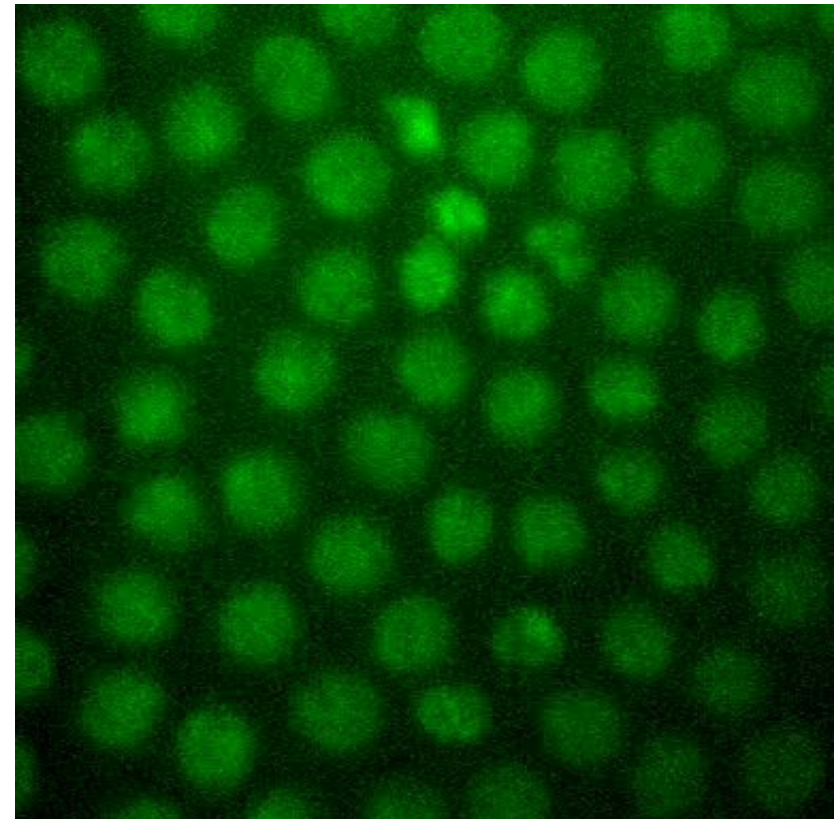


# Genová exprese

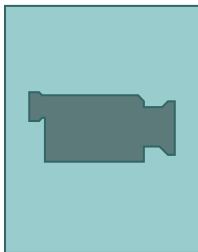
- **Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s repotérovým genem**
  - příprava transgenních organismů nesoucích tuto rekombinantní DNA a jejich histologická analýza
  - oproti transkripční fúzi umožňuje analyzovat např. intracelulární lokalizaci genového produktu (proteinu) nebo jeho dynamiku



PIN1-GFP in *Arabidopsis*



Histone 2A-GFP in *Drosophila* embryo by PAM

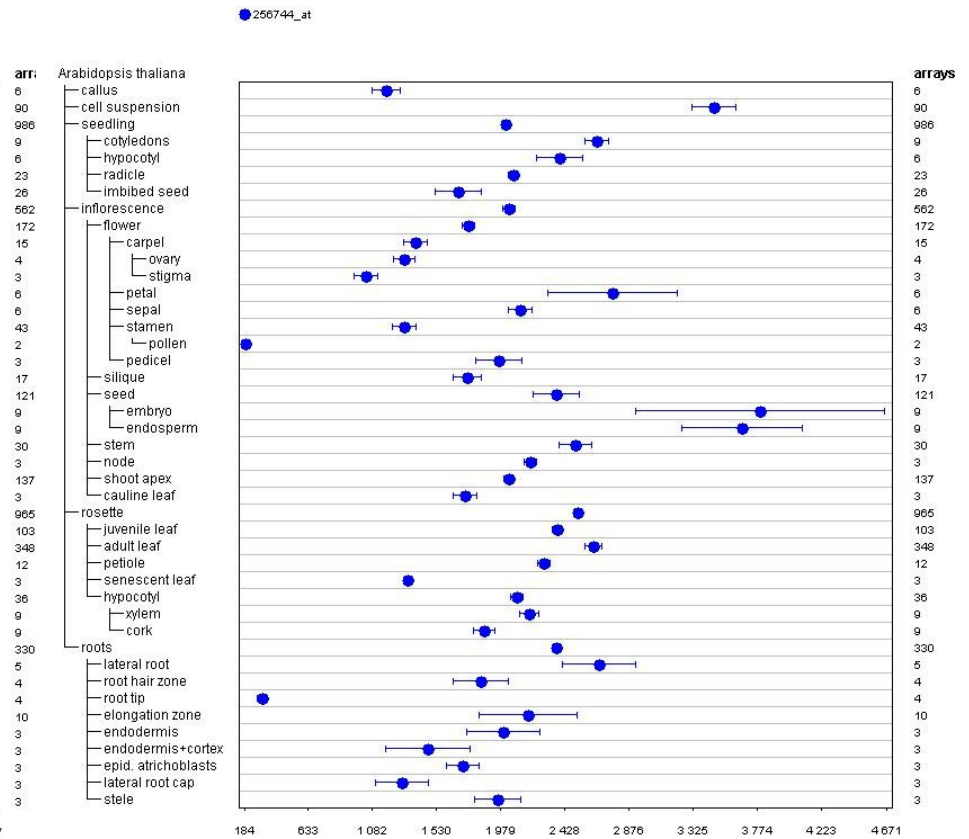
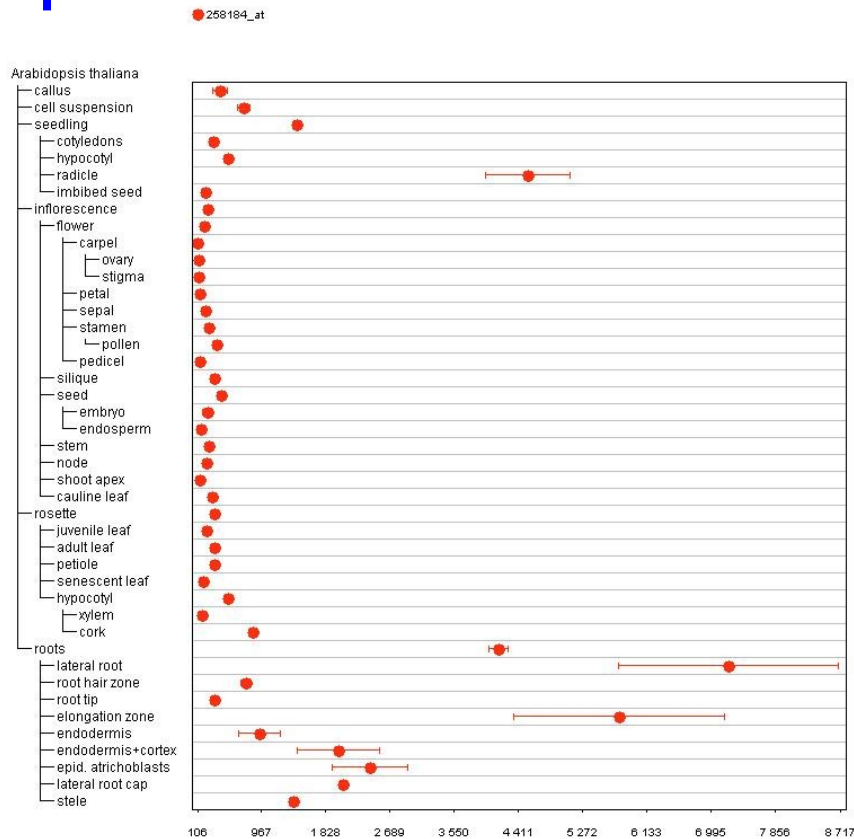


# Osnova

- 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 dat ve veřejných databázích

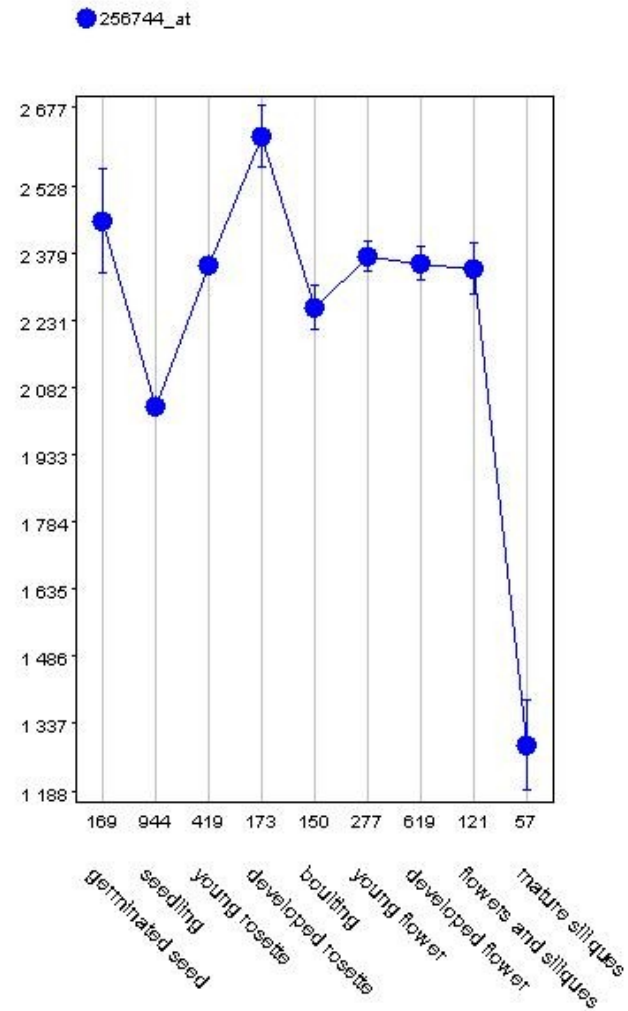
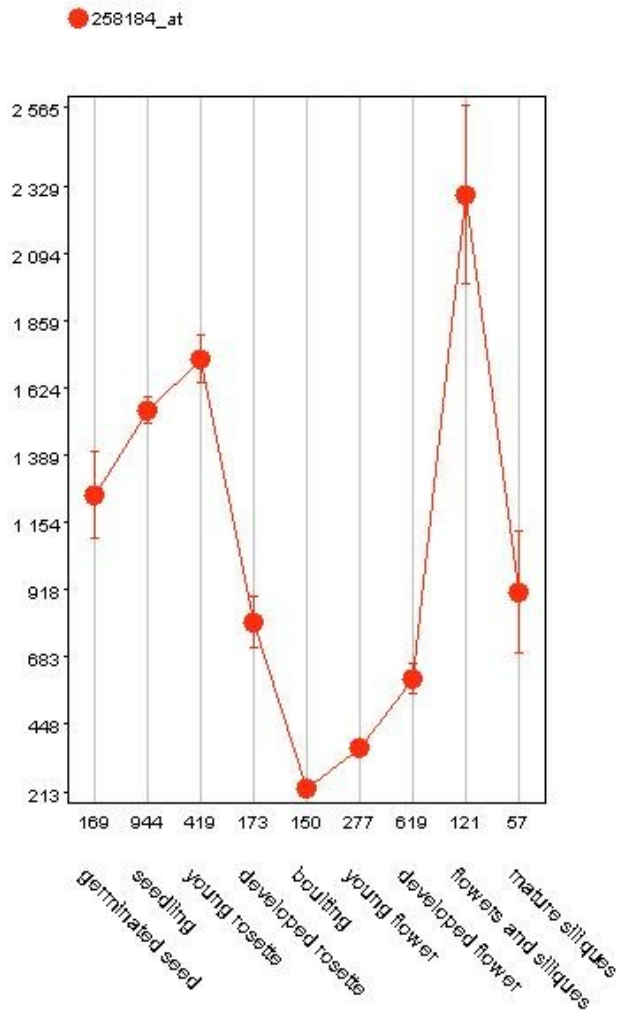
# Genová exprese

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



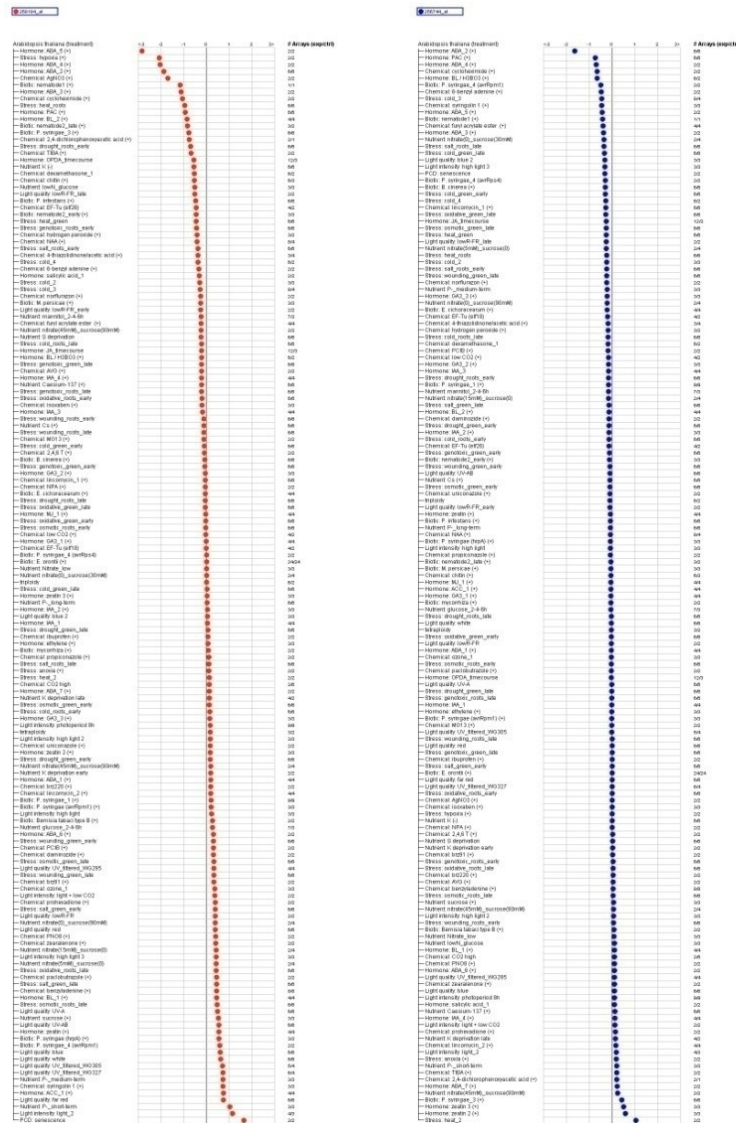
# Genová exprese

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



# Genová exprese

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



# 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

# Genomika IV.

- Nové trendy
  - chemická genetika



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Genomika IV.

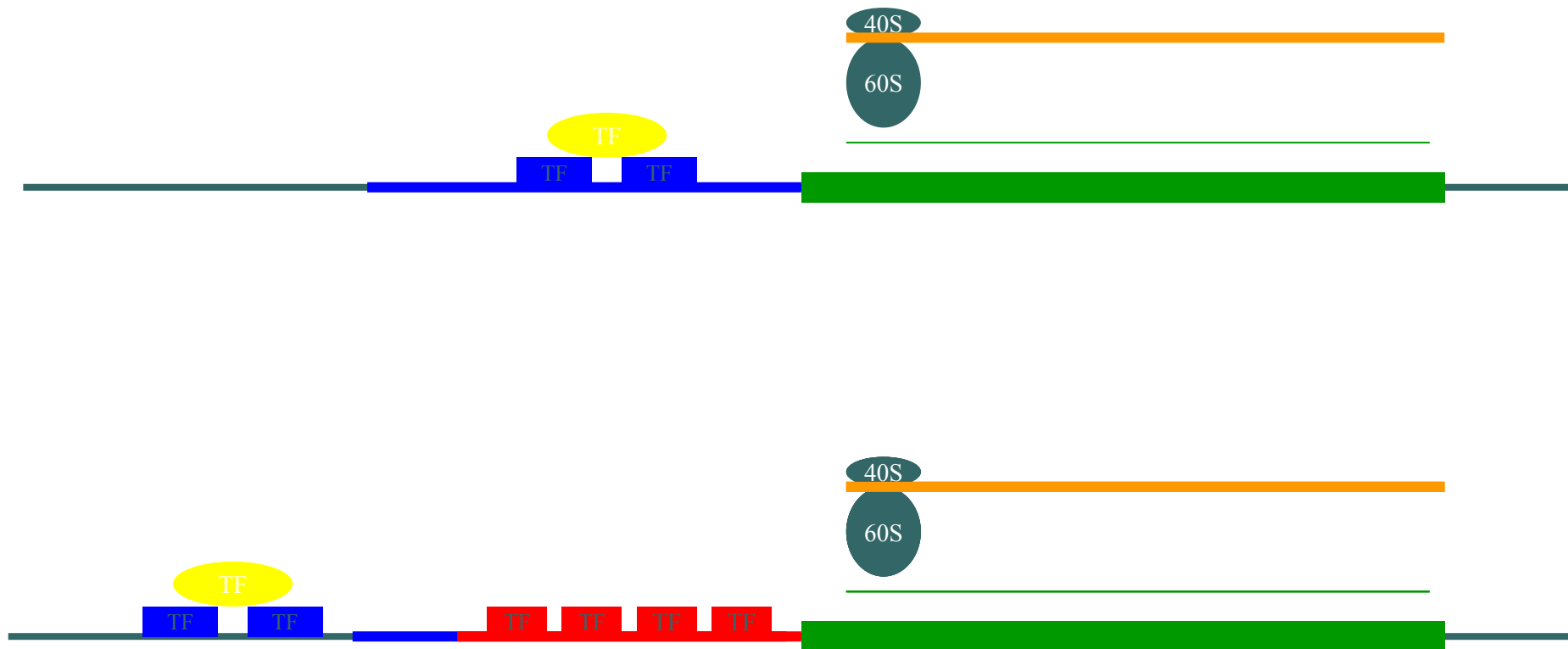
- Analýza genové exprese
  - Metody kvalitativní a kvantitativní analýzy genové exprese
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutageneze
  - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese



# Genomika IV.

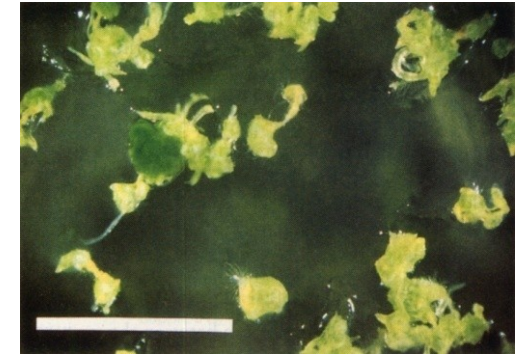
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutageneze
    - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inserce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
    - prvním krokem je 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 mutageneze



# Izolace genu *CKI1*

- Tatsuo Kakimoto, *Science* 274 (1996), 982-985 \*
- izolace genu pomocí aktivační mutagenese
- mutantní fenotyp je fenokopii exogenní aplikace cytokininů (*CKI1*, C*YTO*K*ININ* I*NDEPENDENT* 1)

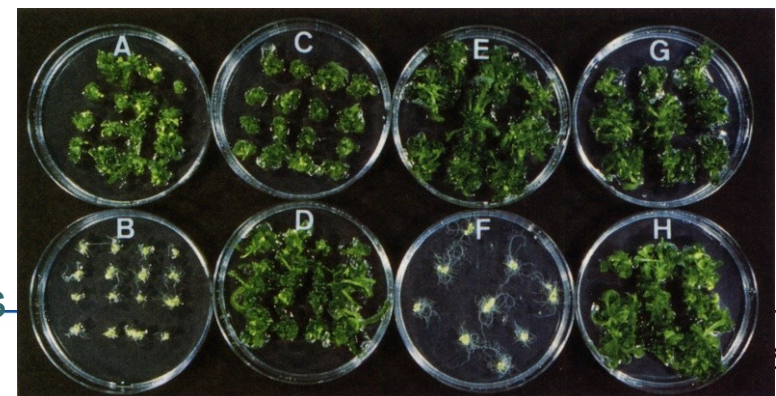


\*

K1      plasmid rescue      K2      35S::*CK1* cDNA

t-zeatin

no hormones



\*

# Genomika IV.

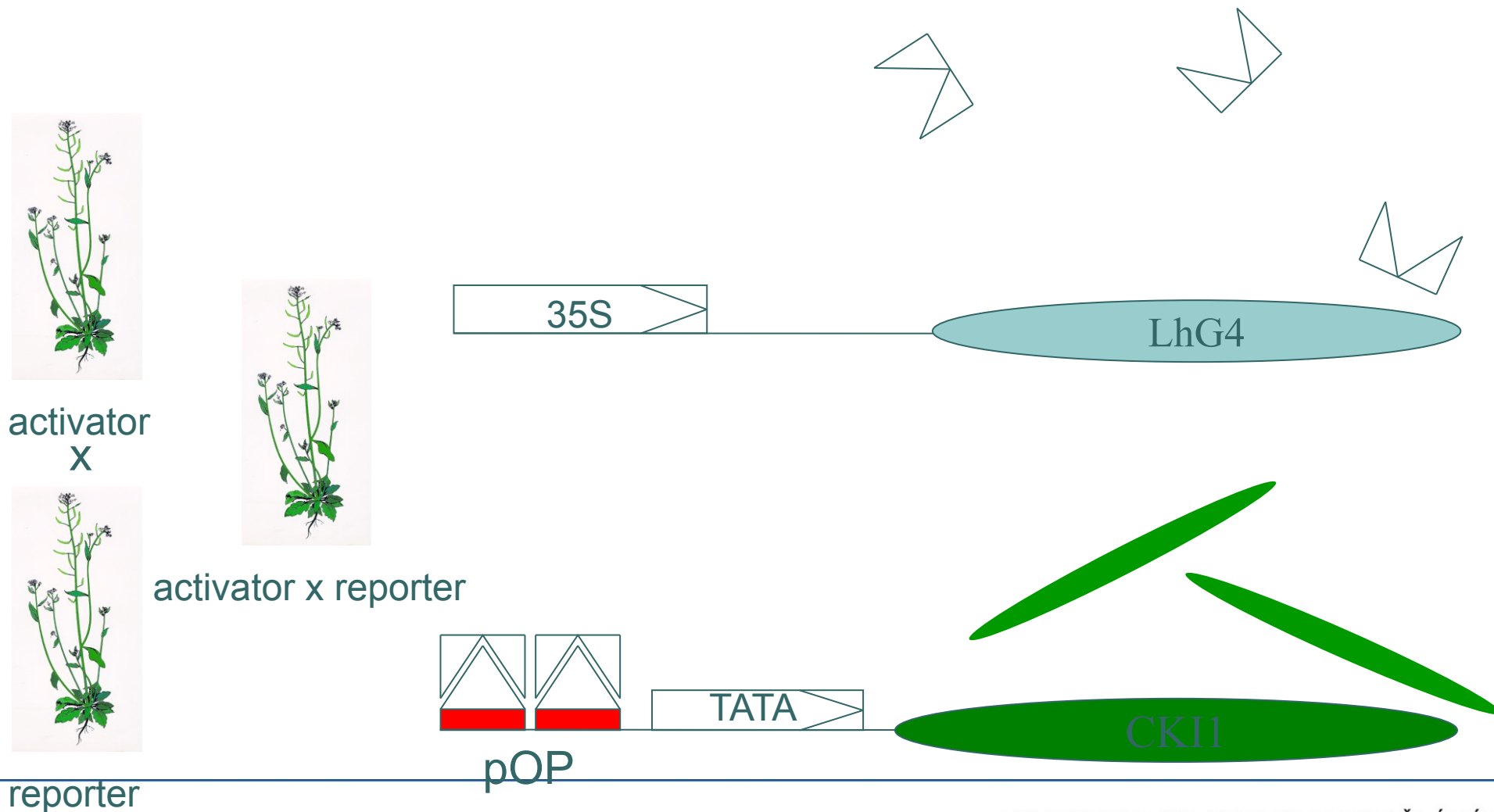
- Metody identifikace genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutageneze
  - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese

# 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



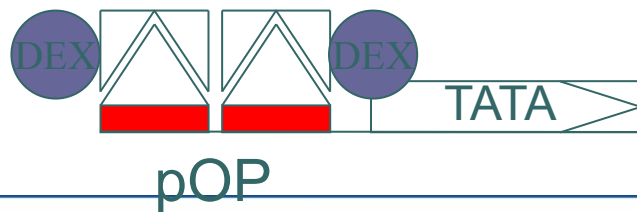
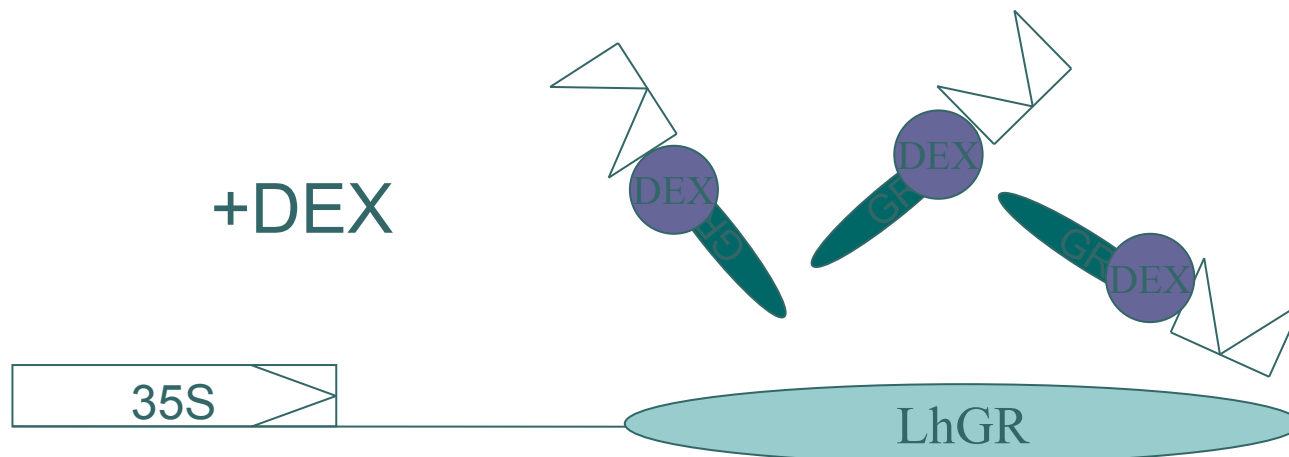
activator  
X



activator x reporter



reporter



# Genomika IV.

## systemy regulovateľné exprese



activator  
X

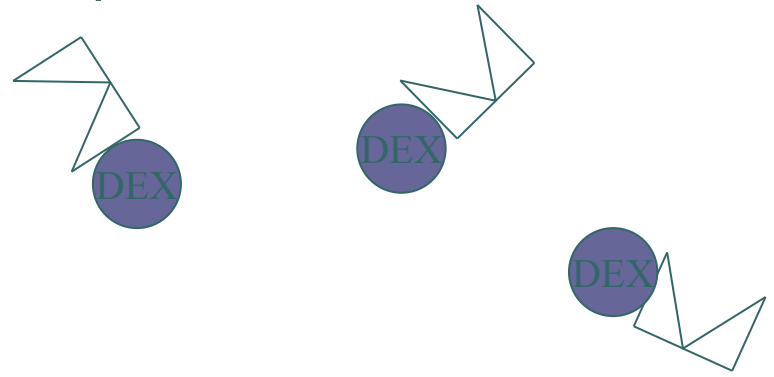


activator x reporter



reporter

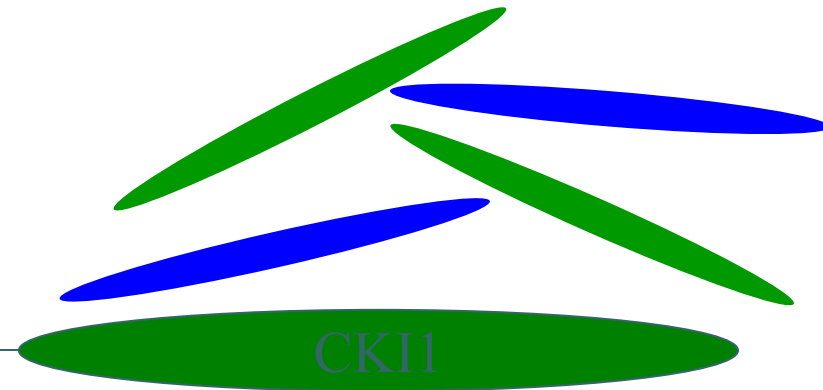
+DEX



wt Col-0

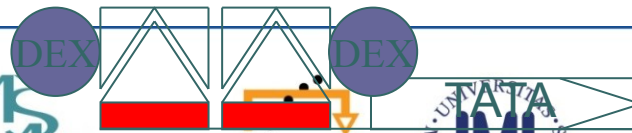


pOP



CKI1

4C



pOP

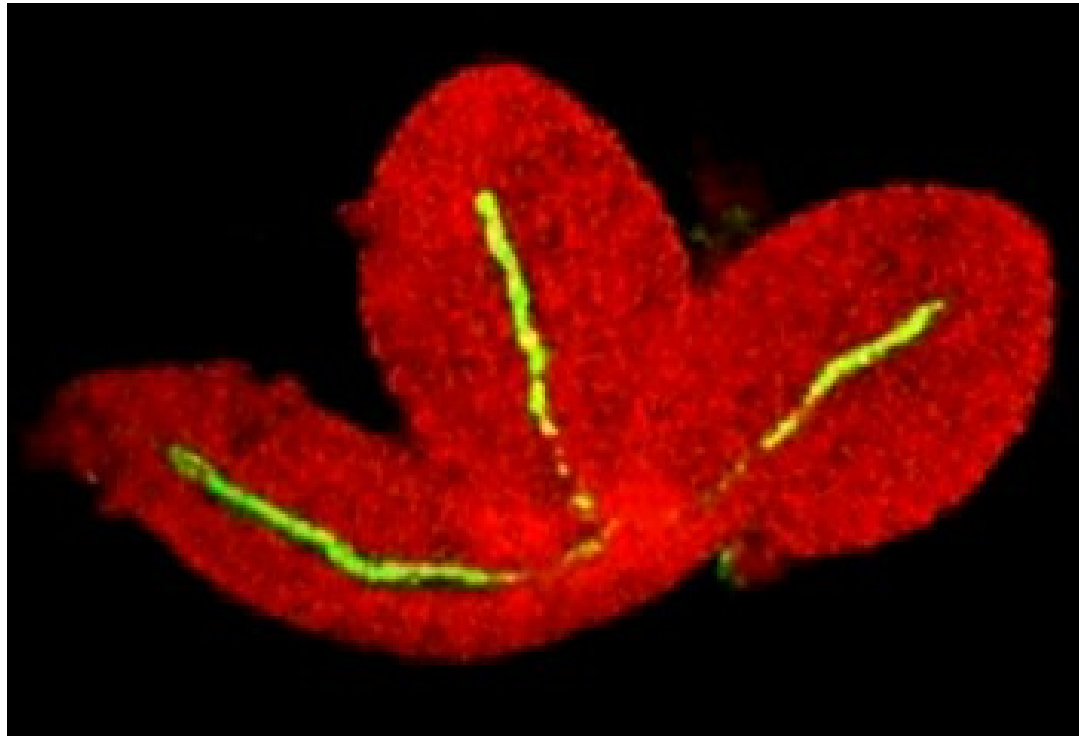


GUS



# 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.

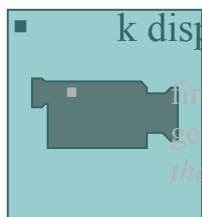
- Metody identifikace genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutageneze
  - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Fenotypové profilování
  - DNA a proteinové čipy

# 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  
genů kódujících  
*thaliana*

■ možnost použití  
oligonukleotidů  
možno připravit



- čipy nejen pro analýzu exprese, ale např. i genotypování (SNP polymorfismy, 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 $\mu$ m
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, vnesení 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 vnesení 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

DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ  
Che et al., 2002

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



EVROPSKÁ UNIE

# Genomika IV.

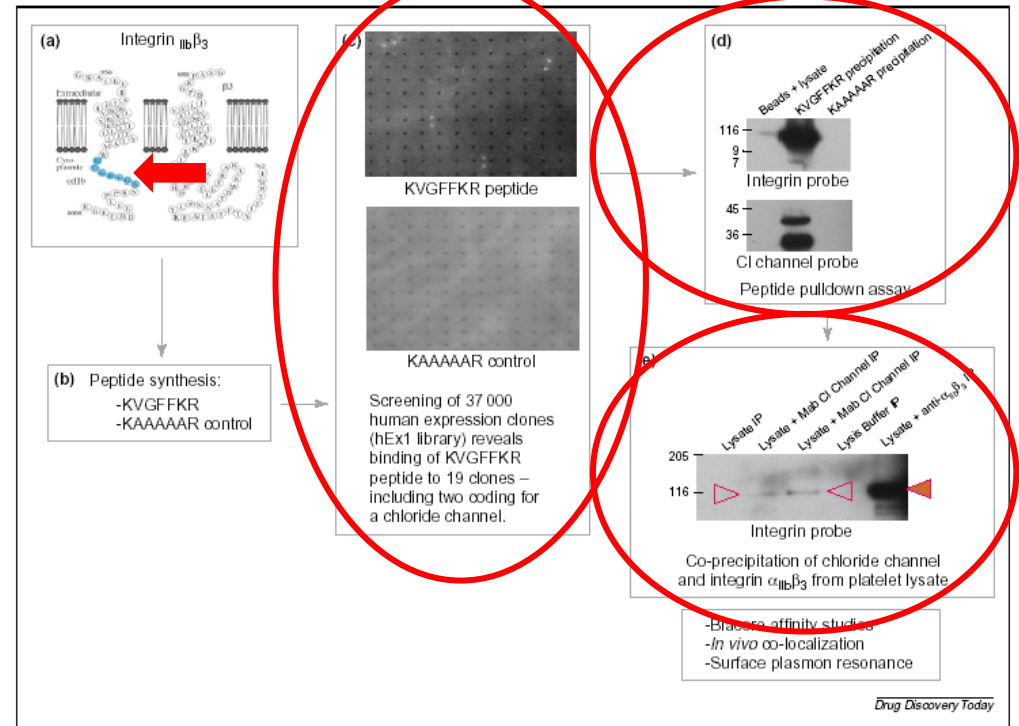
## proteinové čipy

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

# Genomika IV. proteinové čipy

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

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



Lueking et al., 2005

# Genomika IV.

## ■ 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%)

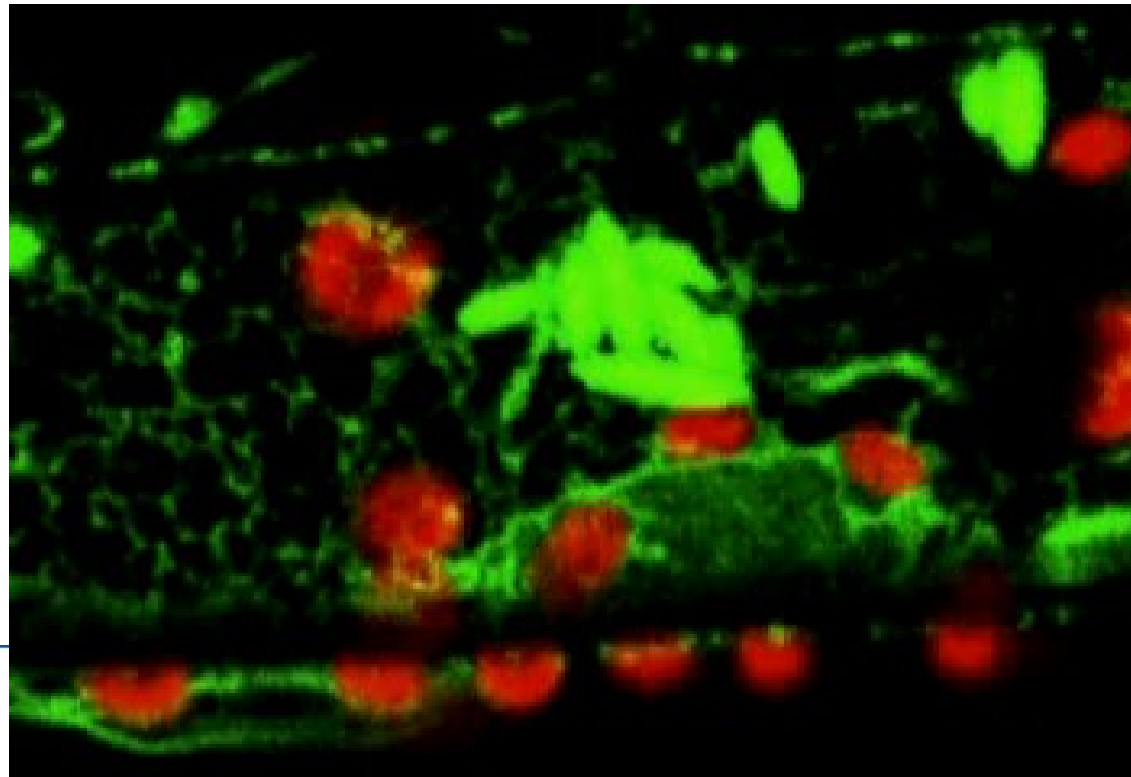
The screenshot shows the PubMed search interface. At the top, there are logos for NCBI and PubMed, along with the text 'A service of the U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health'. Below this, there are navigation tabs for 'All Databases', 'PubMed', 'Nucleotide', 'Protein', 'Genome', 'Structure', 'OMIM', 'PMC', and 'Journals'. The search bar contains the text 'for chemical genetics' and has buttons for 'Go' and 'Clear'. 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 below:

- 1: [Ludowski E, Matuseva EG, Gryczynski J, Targoszchik EA, Patankar L, Lachle G, Bomble 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: [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, Finer-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]

# 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)



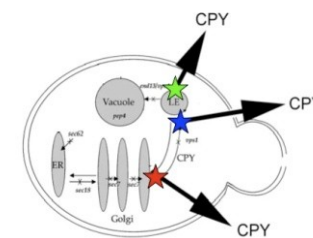


# Genomika IV.

## chemická genetika

### Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupů chemické genetiky

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



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

chemická struktura sortinů

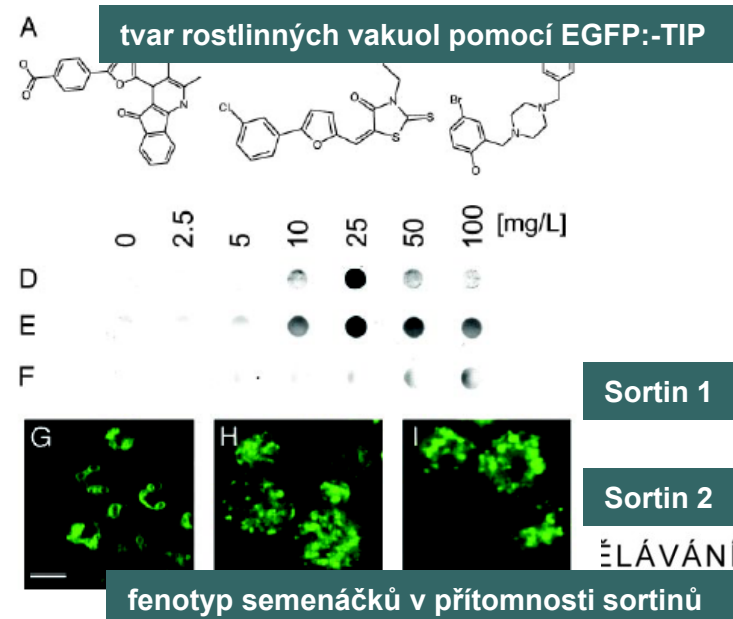
- identifikované látky („sortiny“) byly schopny vyvolat obdobné změny i u *Arabidopsis* (konzervované mechanismy transportu u kvasinek i u rostlin)

Imunodetekce karboxypeptidázy

- pro bližší identifikaci molekulárního procesu vlivem jedním z identifikovaných „sortinů“ byla provedena analýza jeho vlivu na sekreci markerového proteinu (AtCPY) – sortin 1 inhibuje

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 hypo-senzitivní mutantů)

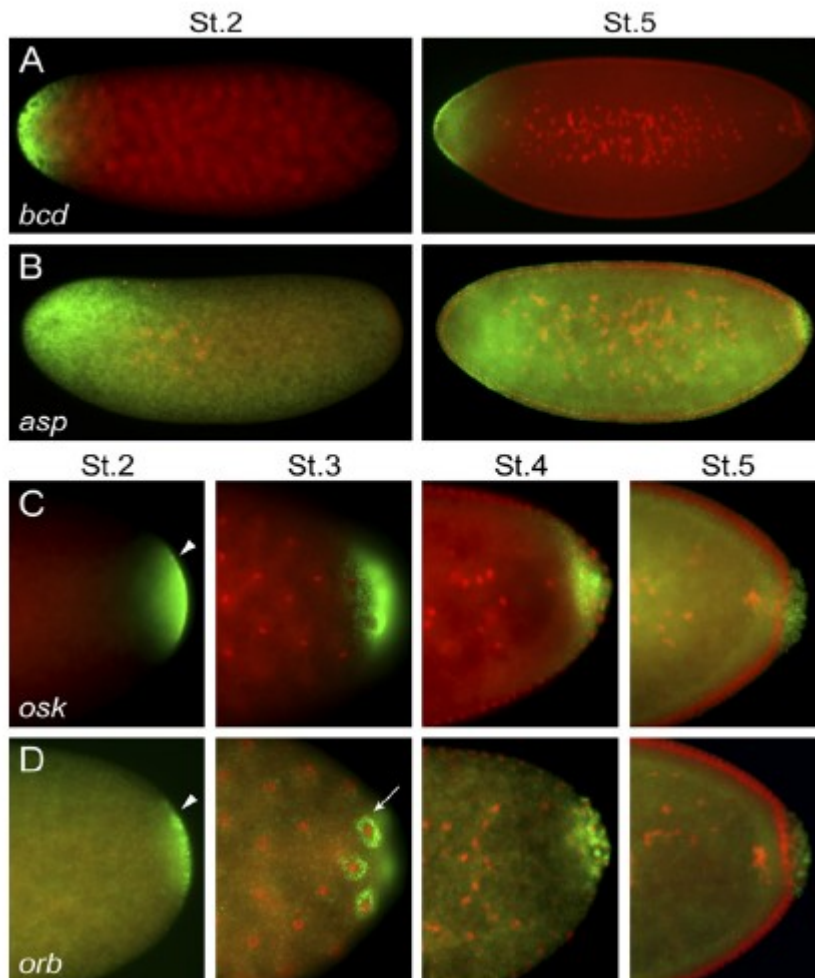


Zouhar et al. 2004

a státním rozpočtem České republiky

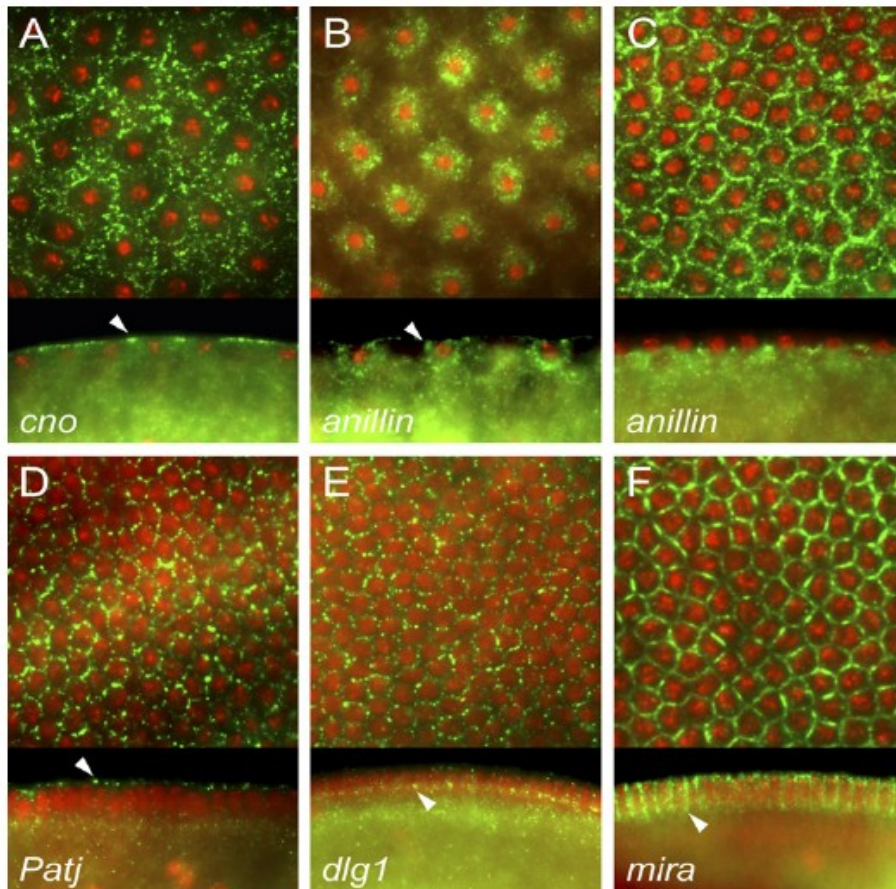
# RNA localization

- mRNA is targeted into **specific cell compartments** in the embryo
- of *Drosophila*



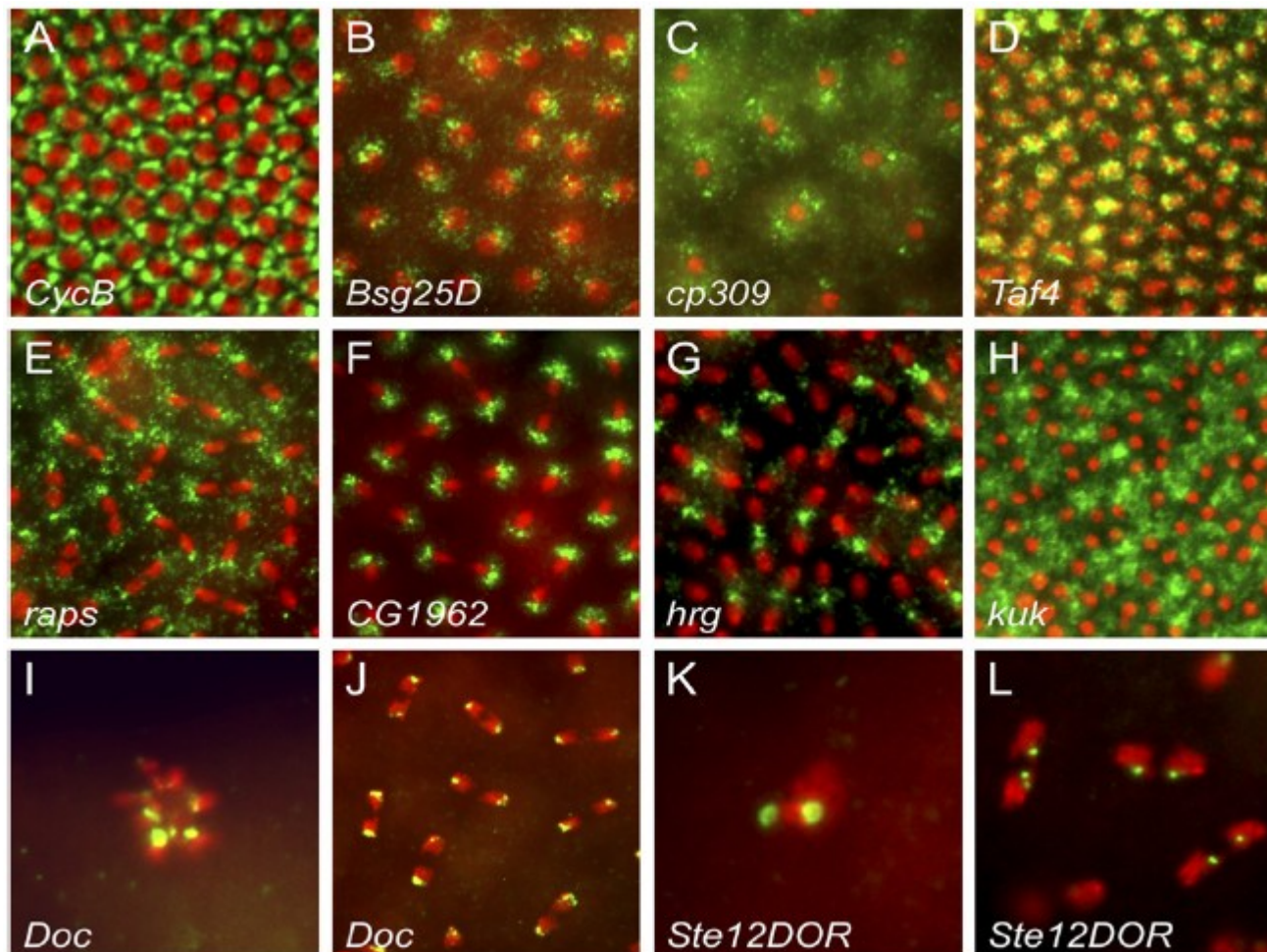
# RNA localization

- mRNA is targeted into **specific cell compartments** in the embryo of *Drosophila*



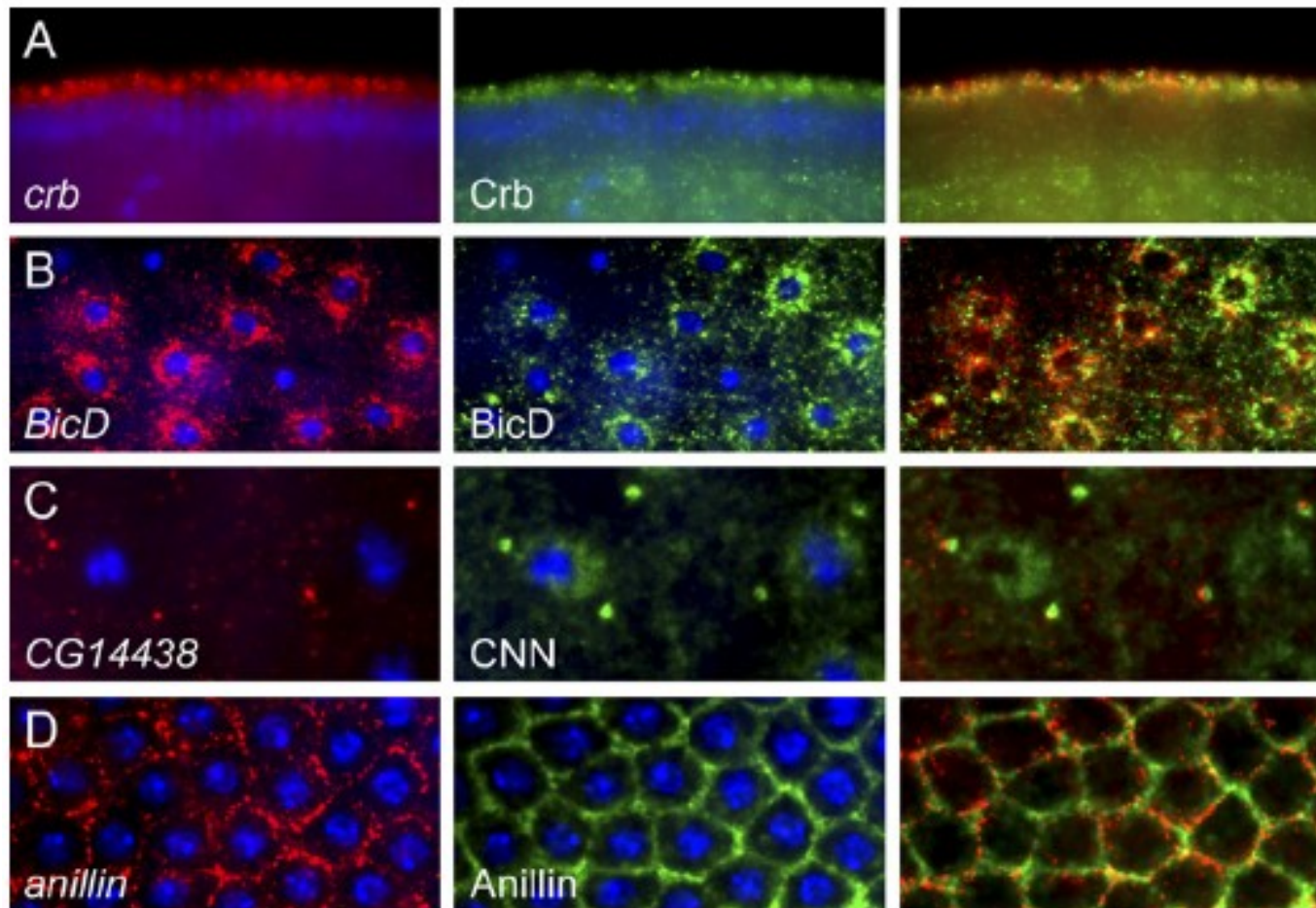
# RNA localization

- mRNA is targeted into **specific cell compartments** in the embryo of *Drosophila*



# RNA localization

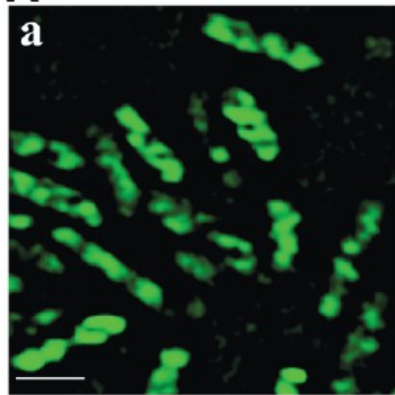
- mRNA is targeted into **specific cell compartments** in the embryo of *Drosophila*



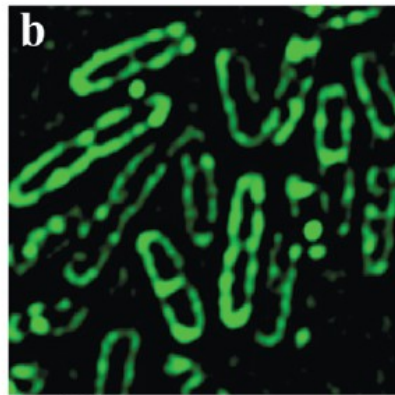
# RNA localization

- mRNA is targeted into **specific cell compartments** and **co-localizes** with its **protein** products in the *E. coli*

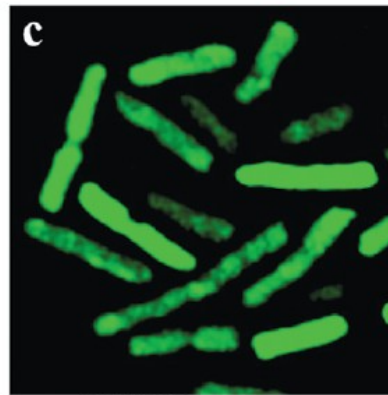
A



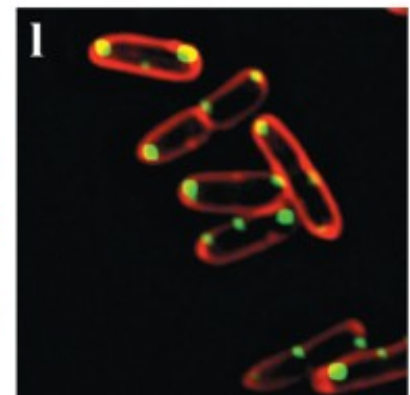
*cat*<sub>6xbs</sub>



*lacY*<sub>6xbs</sub>

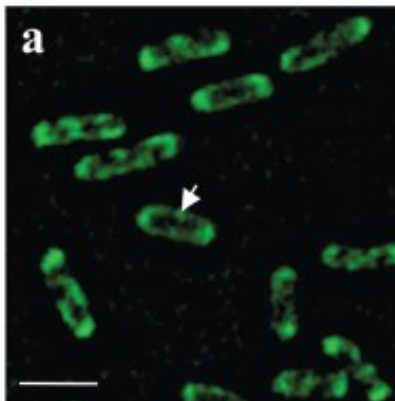


no MS2 bs

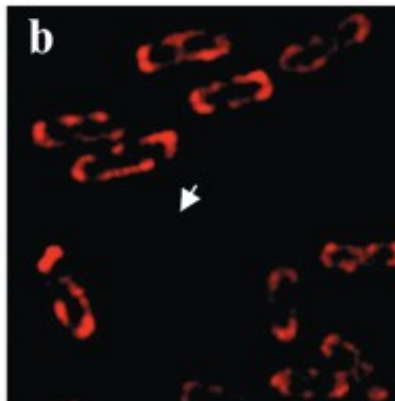


*bglG*<sub>6xbs</sub>

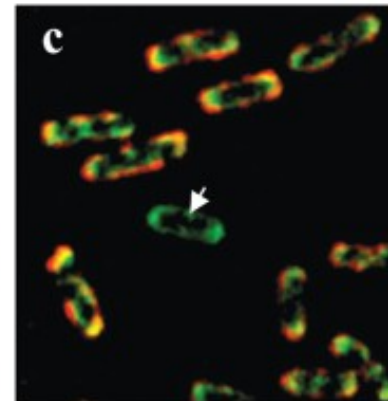
C



MS2-GFP/ *bglF*<sub>6xXBS</sub>

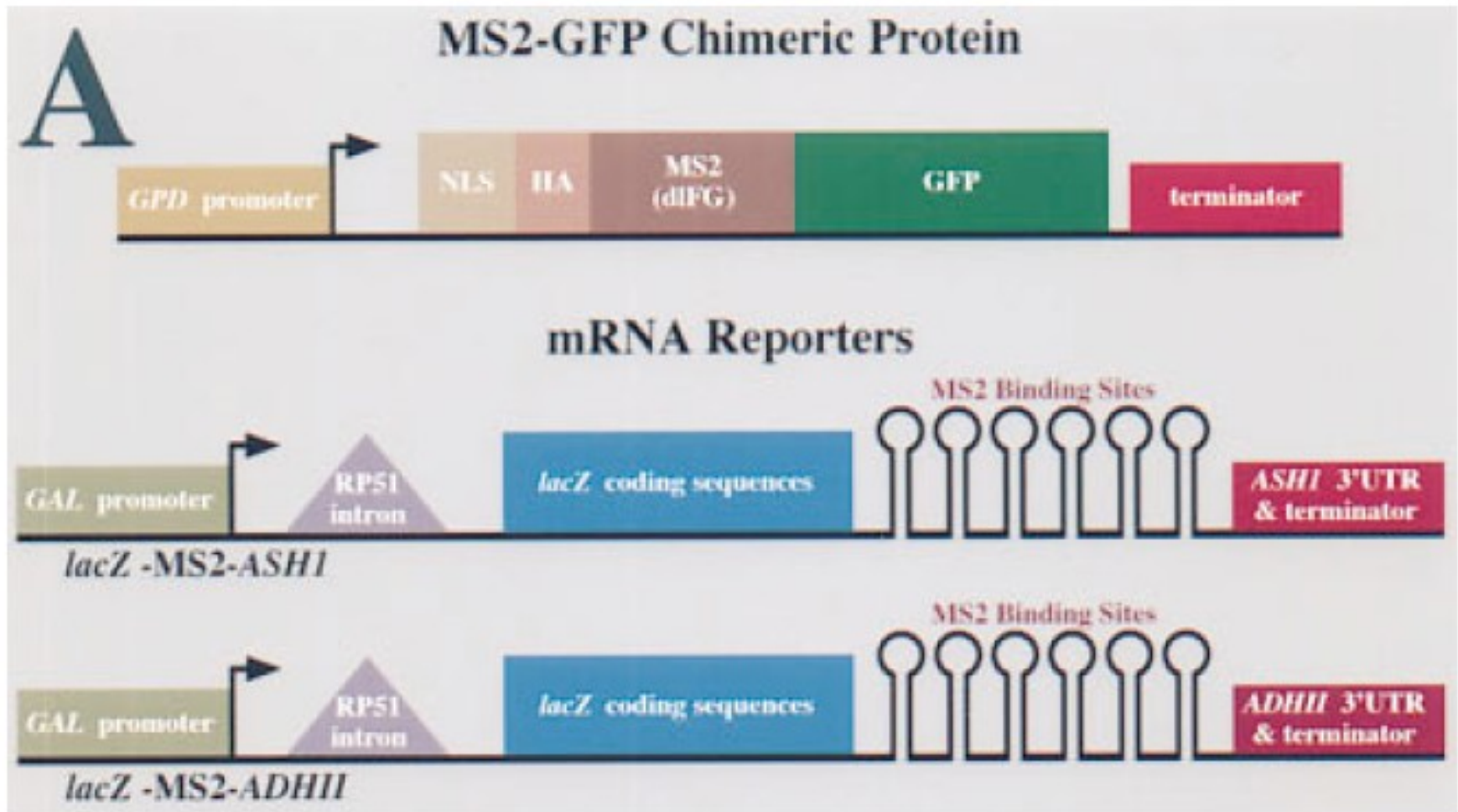


BglF-mCherry



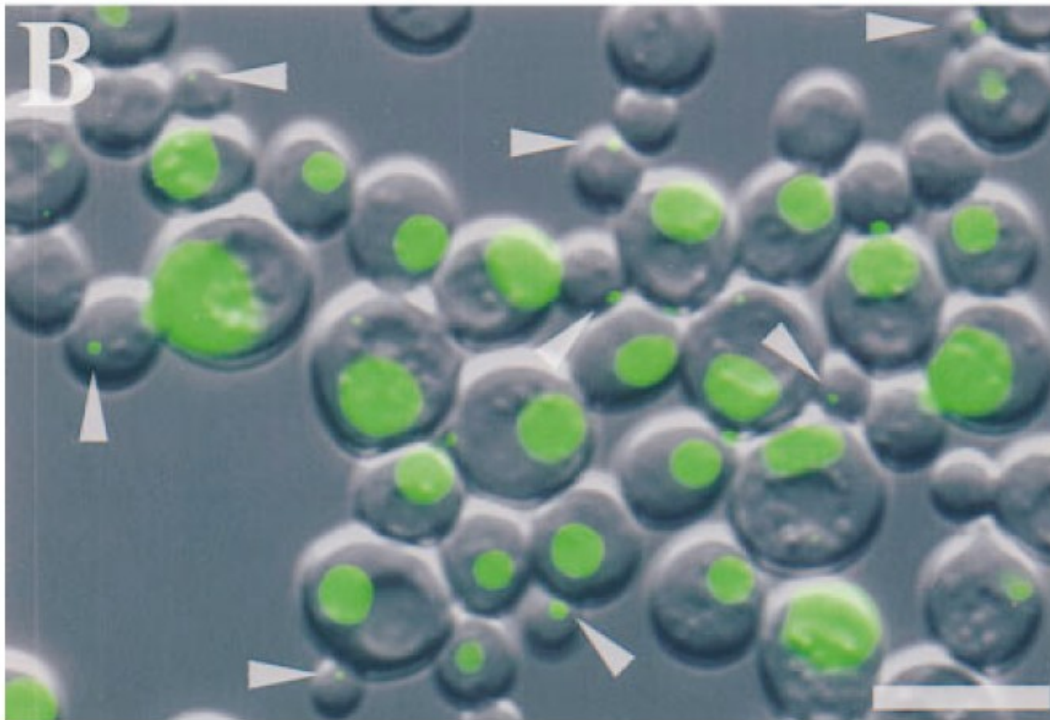
# RNA localization - methods

- **MS2 system**



# RNA localization - methods

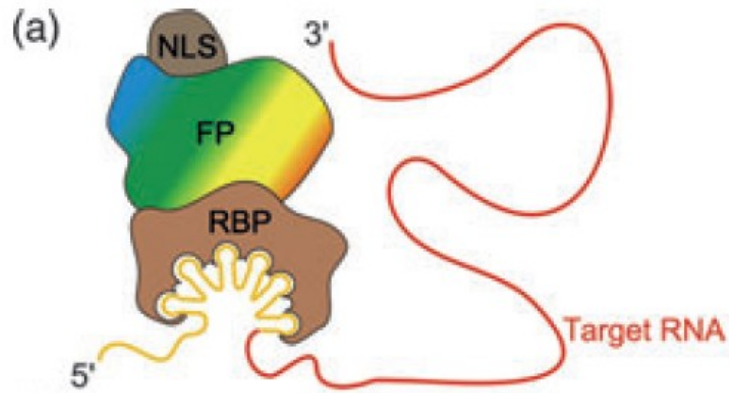
- mRNA is targeted into **specific cell compartments** and **co-localizes** with its **protein** products in the *E. coli*



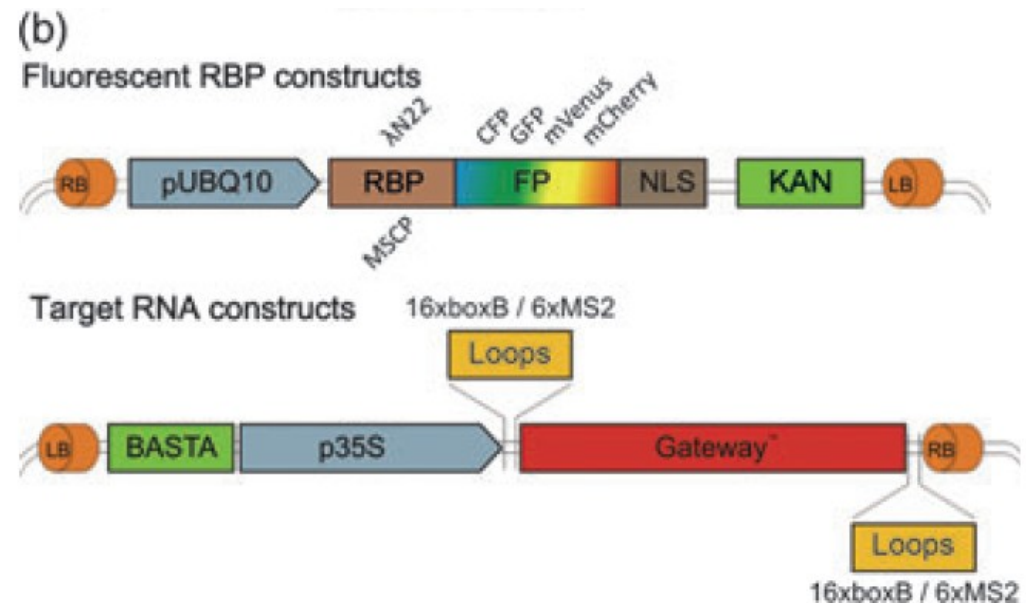


# RNA localization - methods

- mRNA is targeted into **specific cell compartments** and **co-localizes** with its **protein** products in the *E. coli*



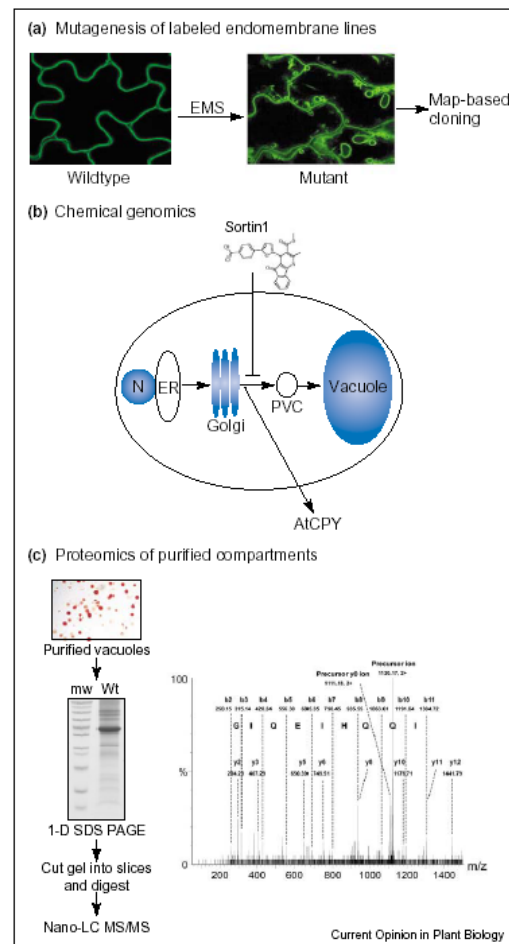
Schenberger et al., *Plant J*, 2012



# 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

# Osnova

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

# Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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