

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, 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.



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)
 - Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Využití dostupných dat ve veřejných databázích
 - Tkáňově a buněčně specifická analýza genové exprese



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)

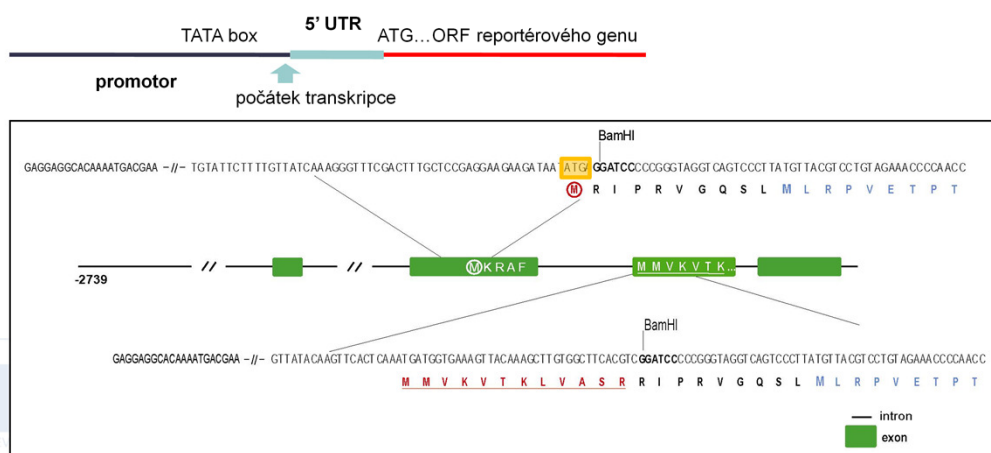


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genová exprese

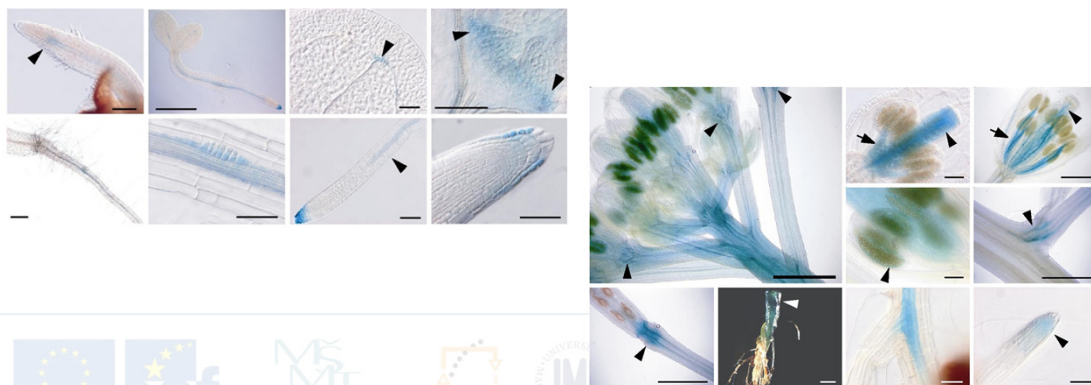
- **Transkripční fúze s promotorovou oblastí**
 - Identifikace a klonování promotorové oblasti genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP)



ELÁVÁNÍ
řancována
im fondem
s republiky

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



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)
 - Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem

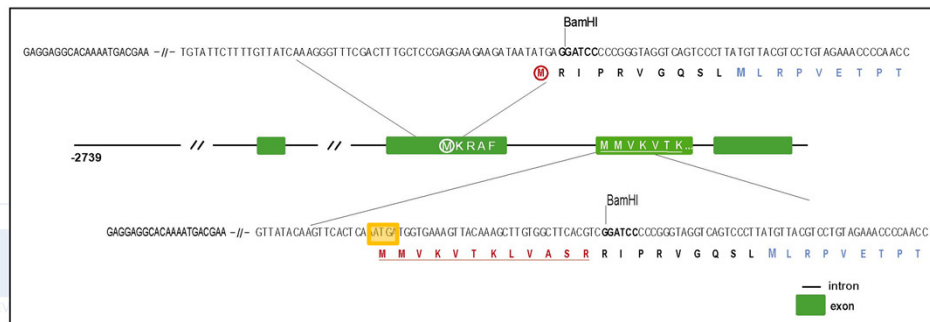
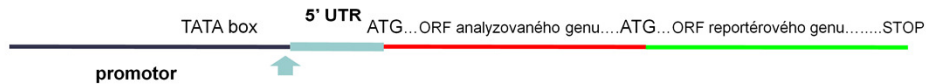


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genová exprese

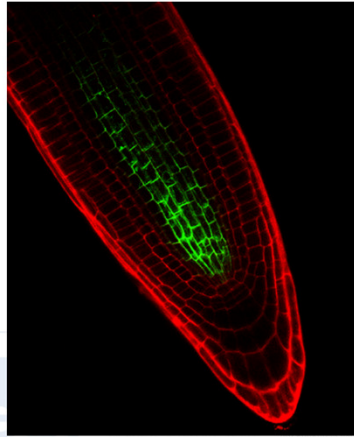
- **Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reportérovým genem**
 - Identifikace a klonování promotorové a kódující oblasti analyzovaného genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a kódující sekvenci studovaného genu ve fúzi s reportérovým genem (uidA, GFP)



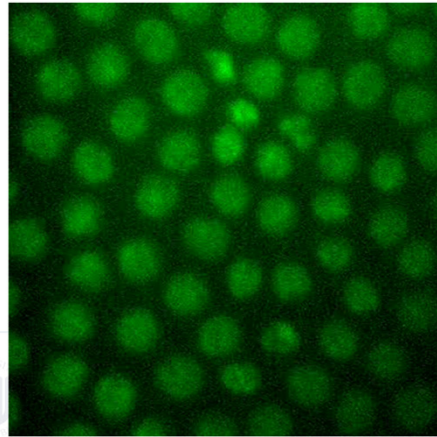
EVZDĚLÁVÁNÍ
je spolufinancováno
státním sociálním fondem
České republiky

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



PLÁVÁNÍ
nancována
m fondem
republiky

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

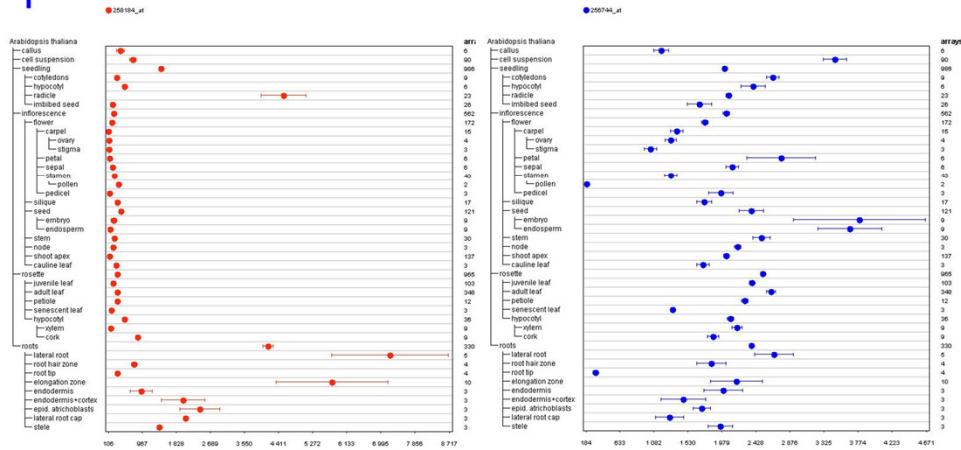


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genová exprese

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

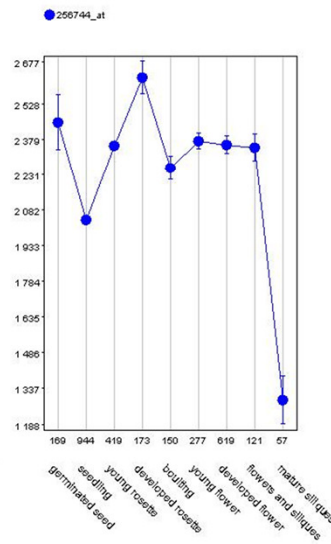
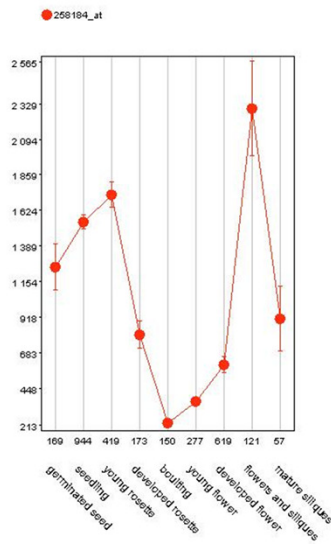


INVESTICE DO ROZVOJE VZDELAVÁNÍ

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

Genová exprese

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



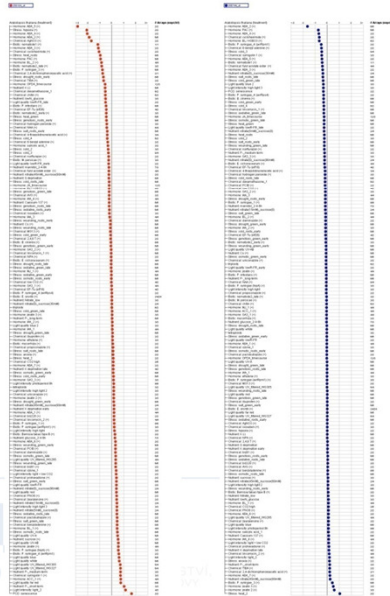
EVROPSKÁ UNIE

ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genová exprese

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



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 mutagenese
 - ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese

- Fenotypové profilování
 - DNA a proteinové čipy
 - metabolické profilování
 - metody mikrodisekce



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 mutagenese
 - 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.

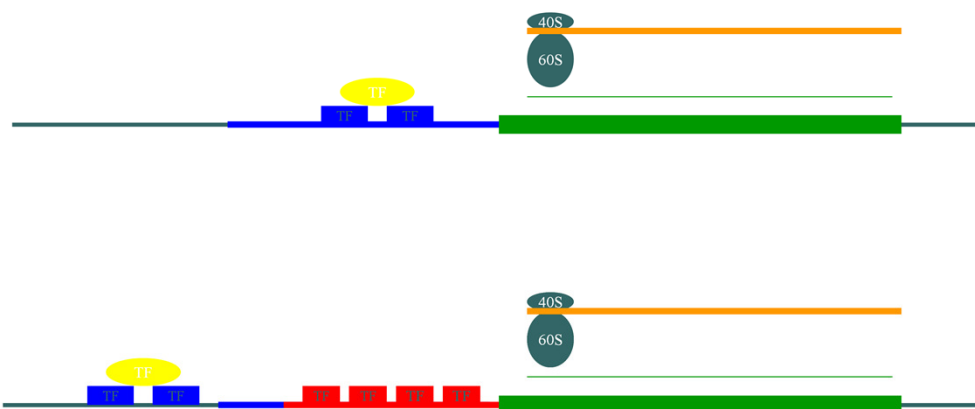
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese
 - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inzerce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
 - prvním krokem je příprava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

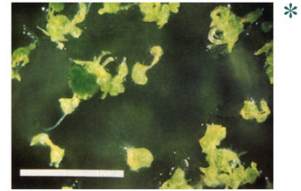


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

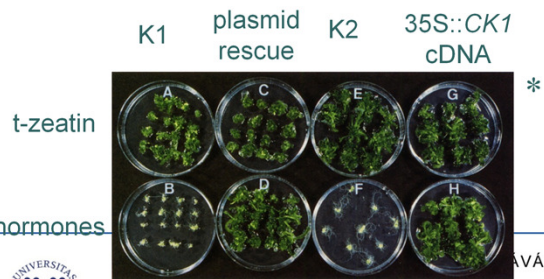
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace genu *CK1*

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



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



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

Genomika IV.

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

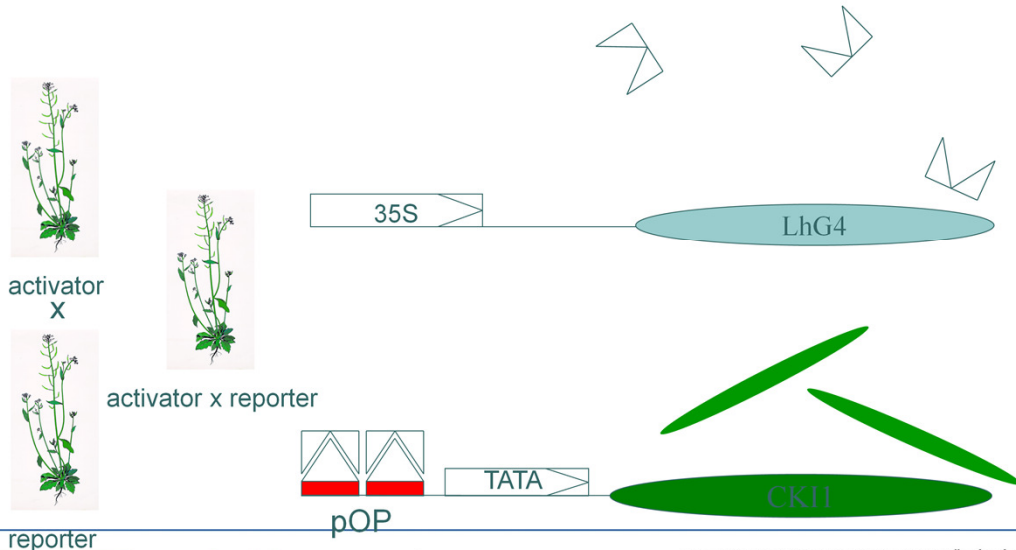


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika IV.

systemy regulovatelné exprese, pOP

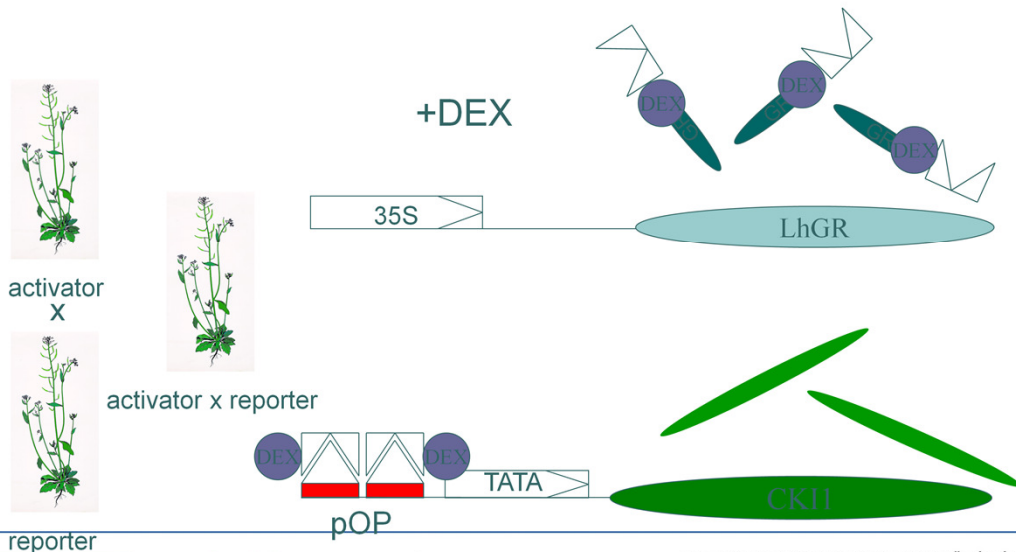


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika IV.

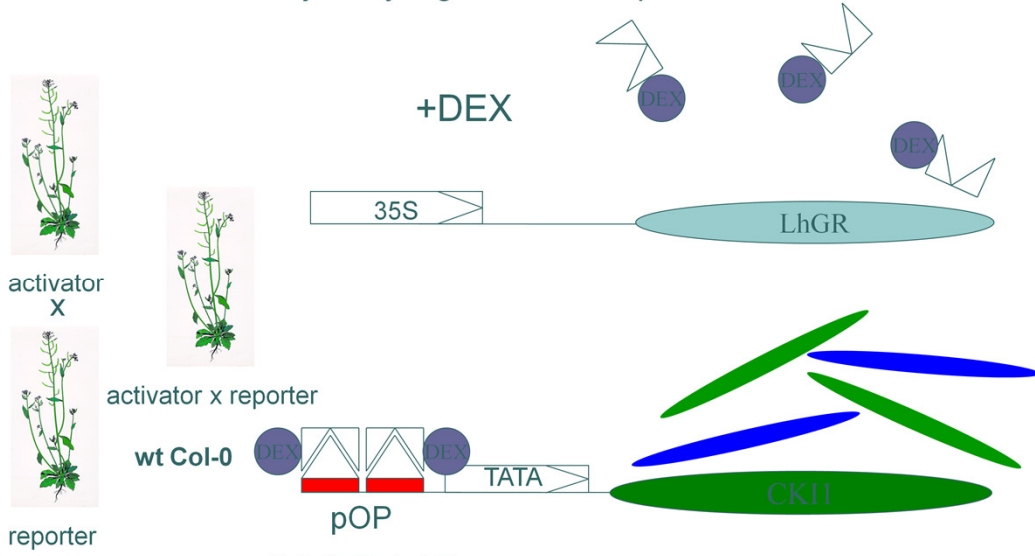
systemy regulovatelné exprese, pOP



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

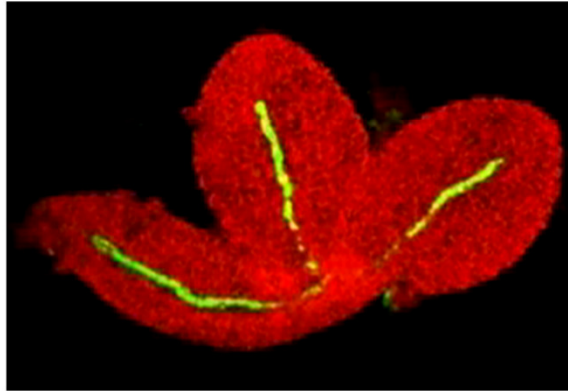
Genomika IV. systémy regulovatelné exprese



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



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

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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



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

Affymetrix ATH1 *Arabidopsis* genome array

k dispozici komerčně dostupné sady pro celý genom

Operační geny kódující proteiny v *S. pombe* a *D. melanogaster*

možnost použití oligonukleotidů, lze je také snadno připravit

čipy nejen pro analýzu exprese, ale například i genotypování (SNP polymorfismy, sekvenování pomocí čipů, ...)

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>S. subtilis</i> gene <i>lysA</i> , Phage P1 <i>cre</i> gene, <i>Arabidopsis</i> maintenance genes <i>GAPDH</i> , <i>Ubiquitin</i> , and <i>Actin</i>
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.	



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Genomika IV.

DNA čipy

- DNA čipy, analýza výsledků
 - pro správnou interpretaci výsledků je nutná dobrá znalost pokročilých statistických metod
 - je nutné zahrnout dostatečný počet kontrol i opakování

- kontrola na přesnost měření (opakované měření na několika čípech se stejným vzorkem, vynesení stejných vzorků analyzovaných na různých čípech proti sobě)
- kontrola reproducibility měření (opakované měření s různými vzorky, izolovanými za stejných podmínek na stejném čipu-stejně podmínky proti sobě)
- identifikace hranice spolehlivého měření
- konečně vynesení experimentu proti kontrole nebo různých podmínek proti sobě – vlastní výsledek

Expression of 195M6T7 in response to chemical treatment

Home | About TAIR | Sitemap | Contact | Help | Order | Login

Search | Tools | Arabidopsis Info | News | Links | FTP | Stocks

Gene

Experiment: Aluminum Stress

Experiment Summary | Samples | Slides & Datasets | Array Design | View All

Slide (name & description)	External ID	Replicate (id & p.name)	Replicate type	Reverse replicate	Sample	Experimental variables	Label	Get Data
HoekengaS7 [1] 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
HoekengaS7 [1] Aluminum Stress 2 (strong spatial bias)	AFGC 7305	64: Aluminum Stress	technical	63	7304_Cy5.7305_Cy3	Aluminum (50 μM AlCl ₃) (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy5	Download
					7304_Cy3.7305_Cy5	no treatment (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy3	Download



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

DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
One et al., 2002

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



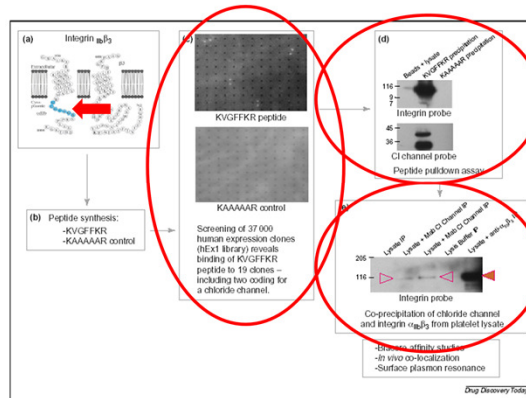
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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)



Lueking et al., 2005



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 search results page for the query 'chemical genetics'. The page header includes the NCBI logo and the text 'Aviation of the U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health'. The search bar contains the text 'chemical genetics' and the results are displayed in a list format. The first result is 'Single Molecule Studies of Multiple-Fluorophore Labeled Antibodies: Effect of Homo-FRET on the Number of Photons Available Before Photobleaching' by Cui et al. (2008). The second result is 'Five cases of beta-oxidation deficiency detected by GC/MS analysis of urine metabolome' by J. M. S. et al. (2008). The third result is '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' by J. M. S. et al. (2008). The page also includes a 'Recent Activity' sidebar and a 'Page 1 of 2521' indicator.



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

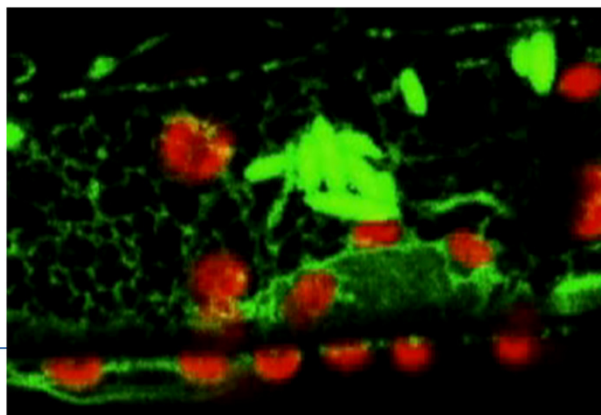


ZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Centra je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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)



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



OP ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

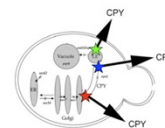
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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

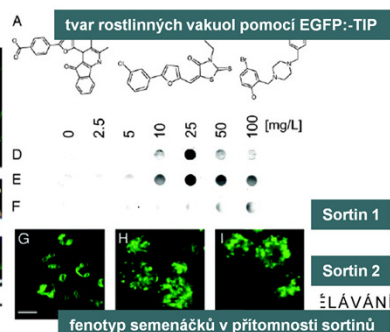
- identifikované látky („sortiny“) byly schopny vyvolat obdobné změny i u *Arabidopsis* (konzervované mechanismy transportu u kvasinek i u rostlin)

imunodetekce karboxipeptidázy

- pro bližší identifikaci molekulárního procesu sortinůs 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 změnou citlivostí k sortinu 1 (hyper- nebo hypersenzitivní mutantů)



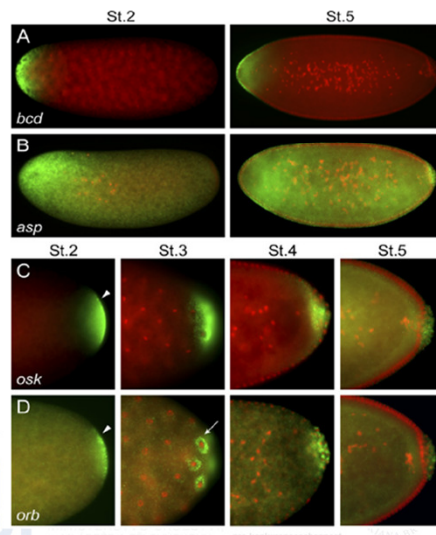
fenotyp semenáčků v přítomnosti sortinů

Zobrazeno v rámci projektu financovaného zvláštním fondem a státním rozpočtem České republiky



RNA localization

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



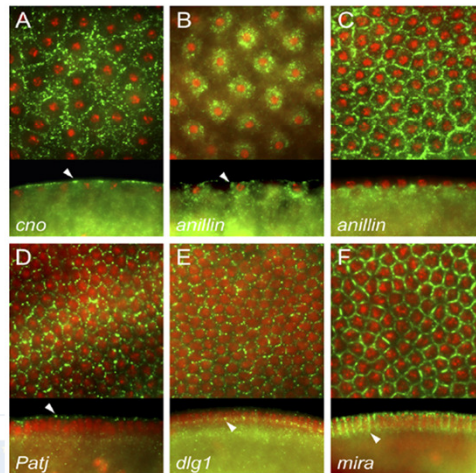
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky
Le'cuyer et al., *Cell*, 2007

Polar localization of mRNA can be achieved by three different mechanisms: (i) local stabilization and regulated degradation of mRNA; (ii) local trapping of an RNA that is diffusing through the cytoplasm; and (iii) active and directed transport of mRNA. Although there are examples for all three mechanisms, the latter is the most common mechanism employed. The transported mRNP complexes form larger structures, which are referred to as RNA transport granules. These granules are transported by motor proteins along microtubules and/or the actin cytoskeleton to their final destination. In addition to the association with the cytoskeleton there is also evidence that mRNA transport and ER trafficking may be coupled (Schmid et al., 2006; Aronov et al., 2007). Before mRNPs reach their final subcellular destination, translation is usually delayed by the recruitment of translational repressors (Schoenberger et al., Plant J., 2012).

Figure 2. Anterior/Posterior Patterns and Functional Enrichments (A–E) Sagittal views of entire embryos (A and B) or of the posterior region (C–E) between stages 2–5, following FISH with probes to *bcd* (A), *asp* (B), *osk* (C), *orb* (D), or *grp* (E) transcripts (mRNA green/nuclei red). (A and B) Varieties of anterior patterns, with *bcd* mRNA (A) showing tight anterior localization and *asp* transcripts (B), a more diffuse anterior enrichment. (C–E) Early and late posterior localization patterns. While both *osk* and *orb* transcripts localize to the posterior pole plasm in stage 1–2 embryos ([C and D] arrowheads), *orb* mRNA forms distinctive rings around pole cell nuclei at stage 3 ([D] arrow).

RNA localization

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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Le'cuyer et al., *Cell*, 2007

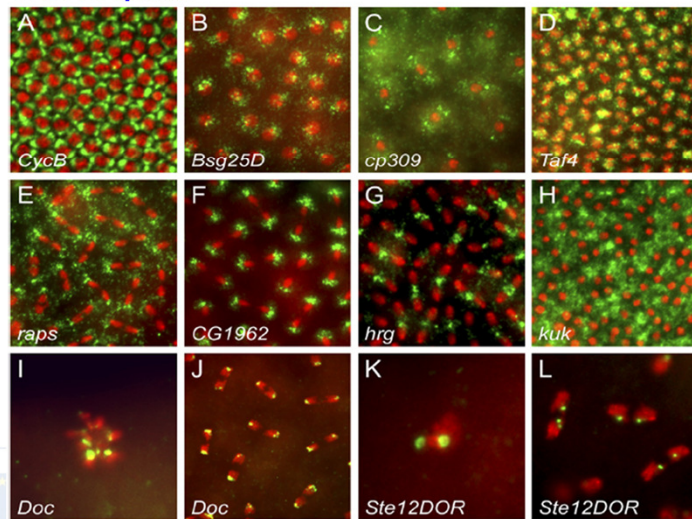
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Figure 4. Membrane-Associated Patterns (A–F) Surface plane (upper panels) and sagittal (lower panels) views of stage 3 (A and B), 4 (C), 5 (E and F), and 6 (D) embryos hybridized with probes for the transcripts indicated in lower panels (mRNA green/nuclei red). *cno* transcripts localize within cortical polygonal networks ([A] arrowhead), while *anillin* mRNA is first perinuclear ([B] arrowhead) and then evolves into a cell junction type pattern (C). (D–F) *Patj*, *dlg1*, and *mira* transcripts localize at different positions along the lateral membrane (arrowheads).

RNA localization

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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY
 OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



Le'cuyer et al., Cell, 2007

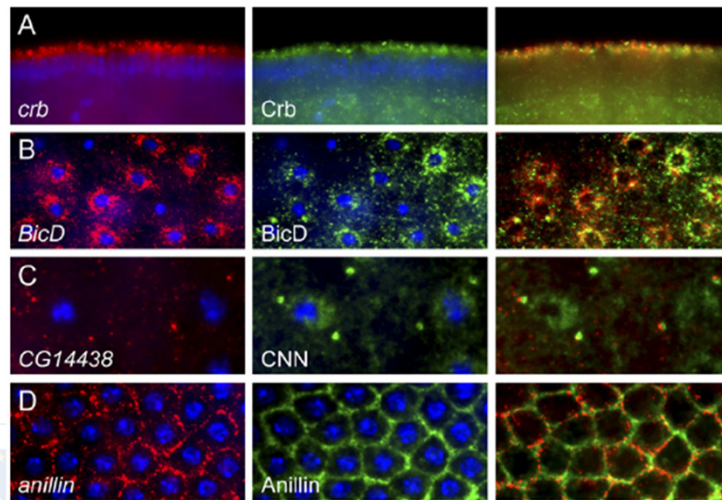
ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

prezentace je spolufinancována
 Evropským sociálním fondem
 a státním rozpočtem České republiky

Figure 5. Cell Division and Nuclei-Associated Transcripts (A–P) Surface plane (A–L and O) or sagittal (M, N, and P) views of stage 1–5 embryos hybridized with the indicated probes (mRNA green/nuclei red). (A–H) Examples of mRNAs that localize to different sections of the cell division apparatus, including spindle poles (A), microtubule networks and centrosomes (B, C, E, and F), the spindle midzone (G and H), or in proximity to metaphase chromosomes (D). (I and J) Doc-element transcripts localize to centromeric chromatin regions on polar body chromosomes (I) and during mitosis in diploid nuclei (J). (K and L) Ste12DOR transcripts localize in chromatin-associated foci during metaphase (K), which then become telomeric during anaphase (L).

RNA localization

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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



Le'cuyer et al., *Cell*, 2007

ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

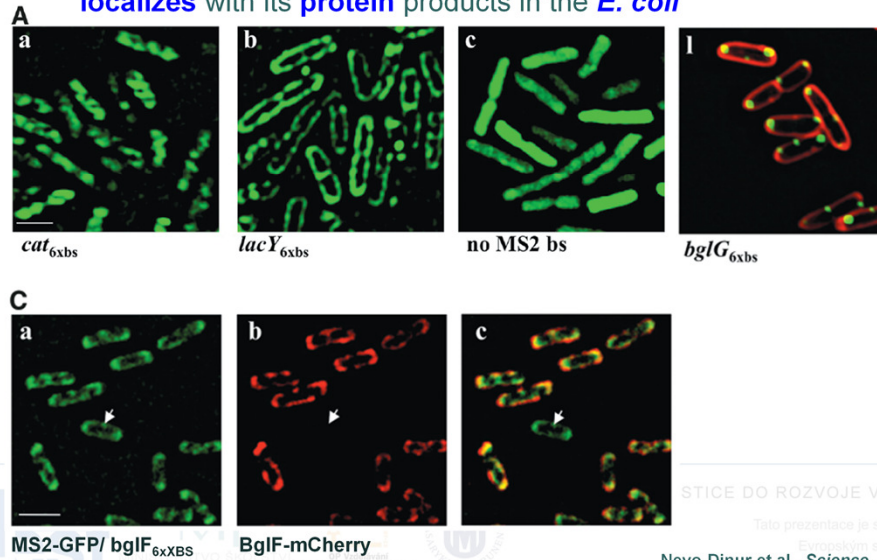
Centra je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a rozpočtem České republiky

(A–F) Stage 4 (B–E), 5 (A) and 9 (F) embryos hybridized with probes for the indicated apical (A), cell division-associated (B and C), membrane-associated (D), and nuclear retained (E and F) mRNAs (red signal, left panels) and colabeled with antibodies against the indicated

protein products (green signal, middle panels). Overlaid mRNA and protein signals are shown in the right panels. Nuclei are shown in blue in the left and middle panels in (A)–(E). Arrowheads in (E) and (F) indicate nuclei showing an accumulation of kuk and cas mRNAs, respectively.

RNA localization

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

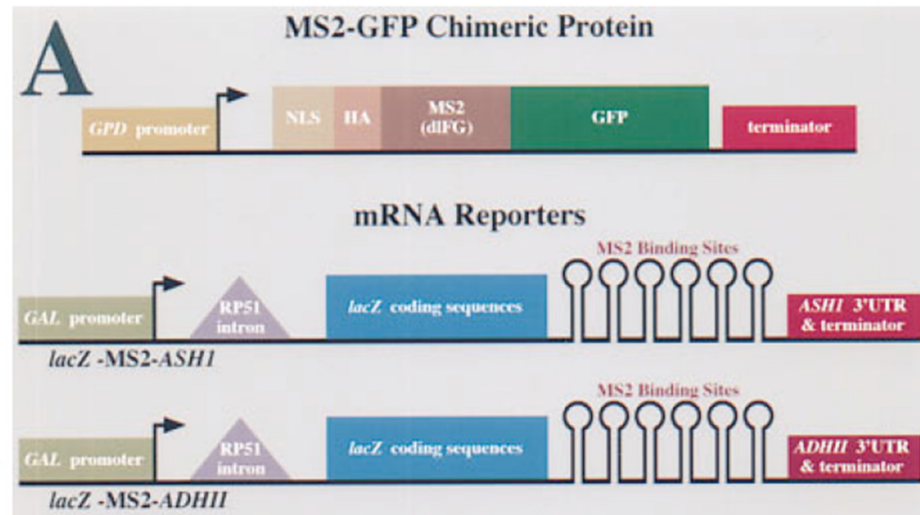


Subcellular localization of mRNA transcripts correlates with subsequent localization of their protein products. (A) Fluorescence microscopy images of cells expressing MS2-GFP (green) and transcripts containing or lacking binding sites for MS2-GFP. “6xbs” after a gene’s name denotes that the MS2 binding sites were introduced immediately next to this gene. Cells shown in (l) were supplemented with the fluorescent membrane stain FM4-64. Transcripts were plasmid-encoded, unless otherwise stated. Scale bar, 1 mm.

(C) (a and b) Fluorescence microscopy images of cells expressing MS2-GFP (green) and a BglF-mCherry fusion protein (red), whose transcript contains the 6xbs. (c) An overlay of the signals. Scale bar, 1 mm. The possibility of false detection due to fluorescence leakage between the filters was ruled out. The white arrows point to a cell in which the 6xbs-tagged *bglF*-mCherry transcripts are detected (a) and the BglF mCherry protein is not (b) (see also the results in fig. S18).

RNA localization - methods

□ MS2 system



EST

MINISTERSTVO ŠKOLSTVA, VYSOKÉHO ŠKOLSTVA A VEDY SR

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



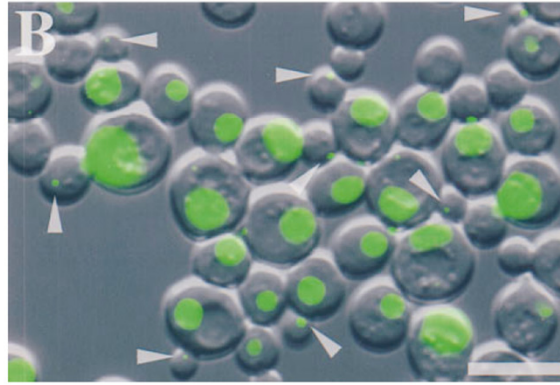
Nevo-Dinur et al., *Science*, 2011

ANI
dna
republicy

Figure 1. Visualization of Reporter mRNAs in Live Cells (A) Schematic describing the constructs used in this approach. The system is comprised of two components, a reporter mRNA and a GFP-MS2 fusion protein. The GFP-MS2 was expressed under the control of the constitutive GPD promoter, while the reporter mRNA was under the control of the GAL promoter. The reporter mRNA contains six binding sites for the coat protein of the bacterial phage MS2. To avoid possible interference with translation and the function of the 3'UTR, the MS2-binding sites were introduced immediately after a translation termination codon. The 3'UTRs were either from the ASH1 gene, to induce mRNA localization at the bud tip, or from the ADHII gene, as control. In addition, a nuclear localization signal (NLS) followed by an HA tag was introduced at the N terminus of the fusion protein, so that that only the GFP protein that is bound to its target mRNA would be present in the cytoplasm. (B) Live cells expressing the GFP-MS2 fusion protein and the lacZMS2-ASH1 reporter mRNA. Arrows indicate some of the particles, usually in the bud. Bar, 5 mm.

RNA localization - methods

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

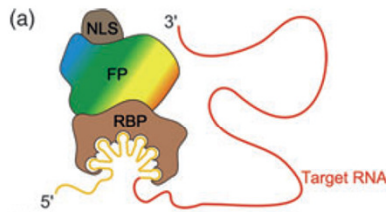
Tato prezentace je spolufinancována

Evropským strukturálním fondem

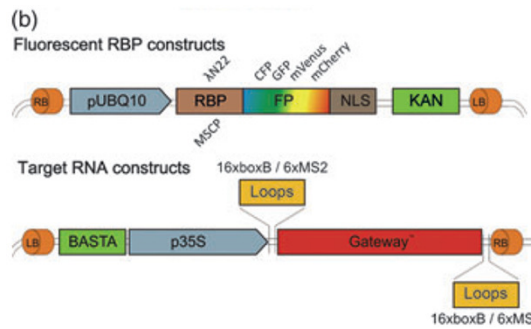
Nevo-Dinur et al., *Science*, 2011

RNA localization - methods

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



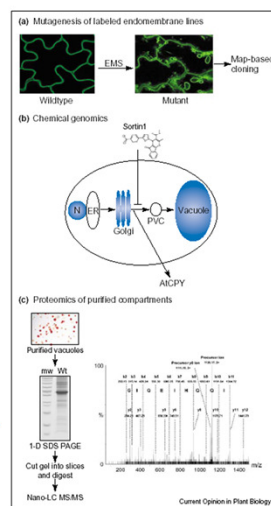
Schenberger et al., *Plant J*, 2012



NI
NS
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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



IZDĚLÁVÁNÍ

spolufinancována
sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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