

CG020 Genomika

Přednáška 5

Genová exprese a chemická genetika

Jan Hejátko

Funkční genomika a proteomika rostlin,
Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC), Masarykova univerzita, Brno
hejatk@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

- Karaiskos N, Wahle P, Alles J, Boltengagen A, Ayoub S, Kipar C, Kocks C, Rajewsky N, Zinzen RP (2017) The *Drosophila* embryo at single-cell transcriptome resolution. *Science* 358: 194-199
- 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.
- 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
- 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.
- Surpin, M. and Raikhel, N. (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* 5,100-10
- 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



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND
ROZVOJ ČLOVĚKA
ROZVOJ BOŽHO VYDĚLÁVÁNÍ
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND
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
 - Kvantitativní analýza exprese
 - DNA a proteinové čipy
 - Next gen transkripční profilování
- Regulace genové exprese v identifikaci funkce genů
 - přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese
 - Ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Chemická genetika



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)



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

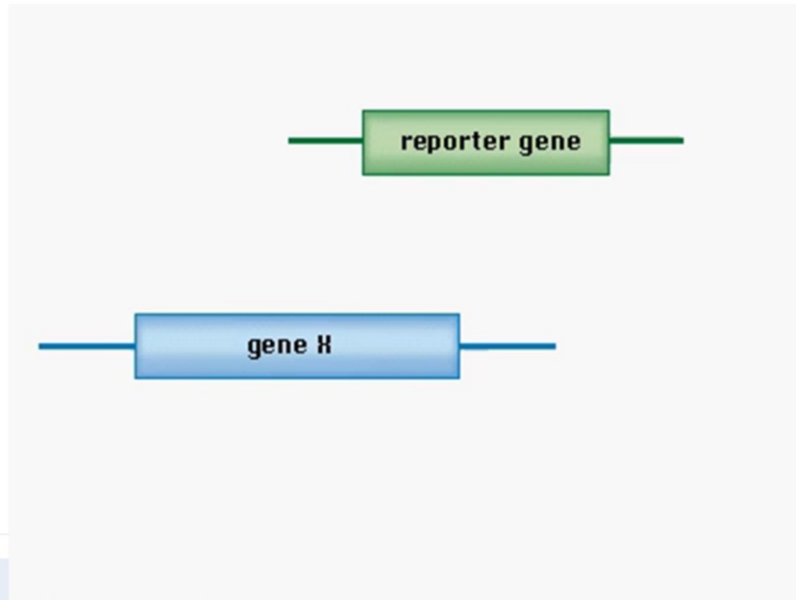


MUNI
MASARYKOVA UNIVERZITA BRNO

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Příprava rekombinantní DNA



est

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



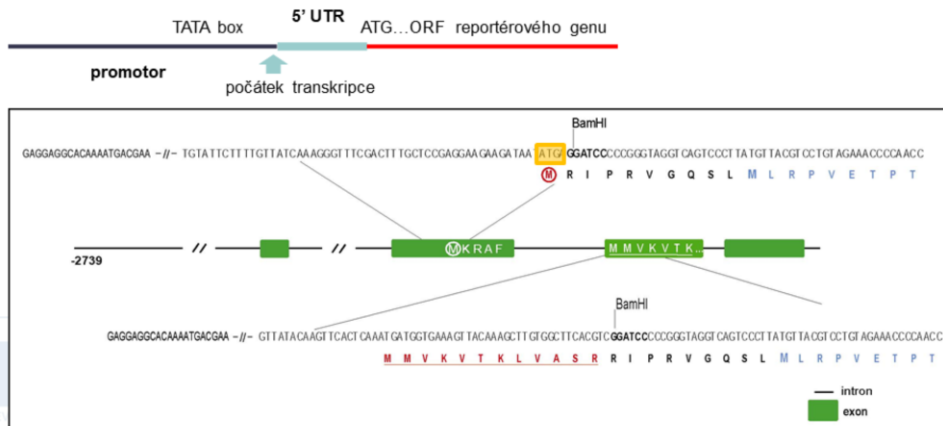
VZDĚLÁVÁNÍ

je spolufinancováno

Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Genová exprese

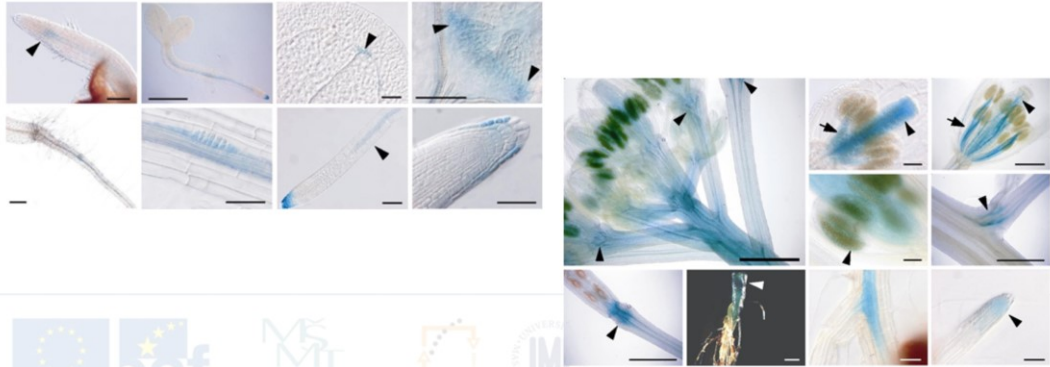
- **Transkripční fúze s promotorovou oblastí**
 - Identifikace a klonování promotorové oblasti genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP)



ELÁVÁNÍ
financována
šim fondem
čr republiky

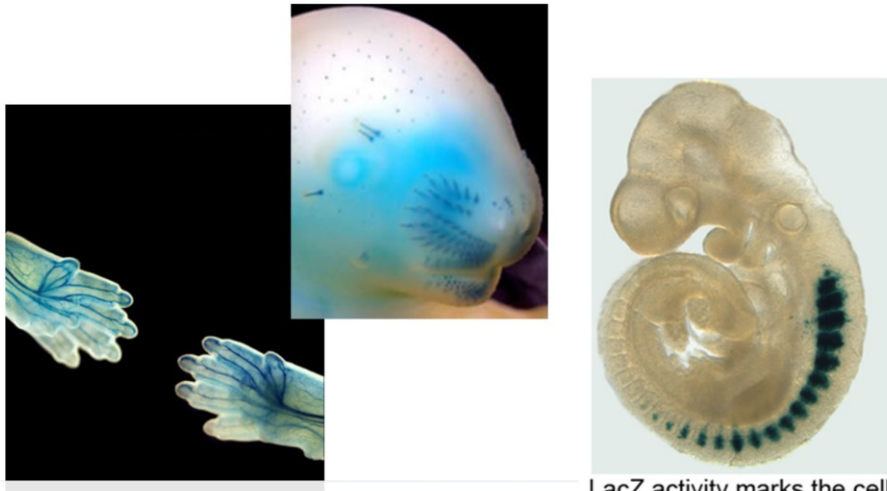
Genová exprese

- **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

GUS reporter in mouse embryos



LacZ activity marks the cells of the developing myotome.



ZDĚLÁVÁNÍ

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



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



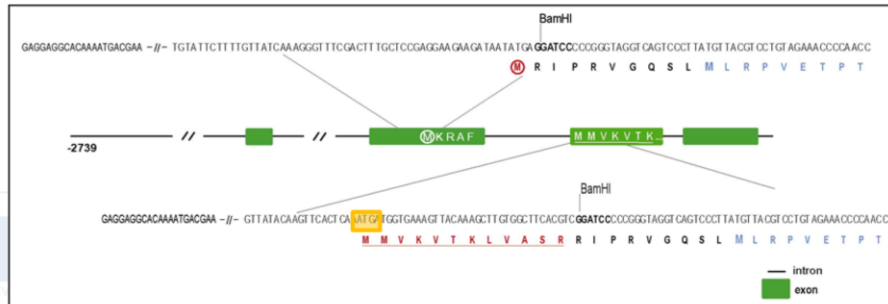
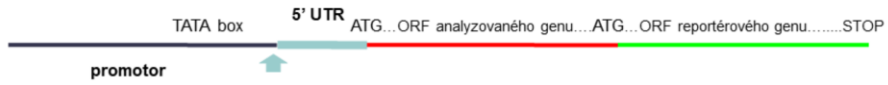
MUNI
MASARYKIANA BRUNENSIS

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)



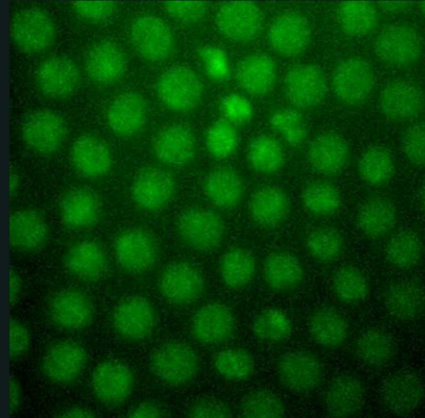
VZDĚLÁVÁNÍ
je spolufinancováno
státním sociálním fondem
České republiky

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



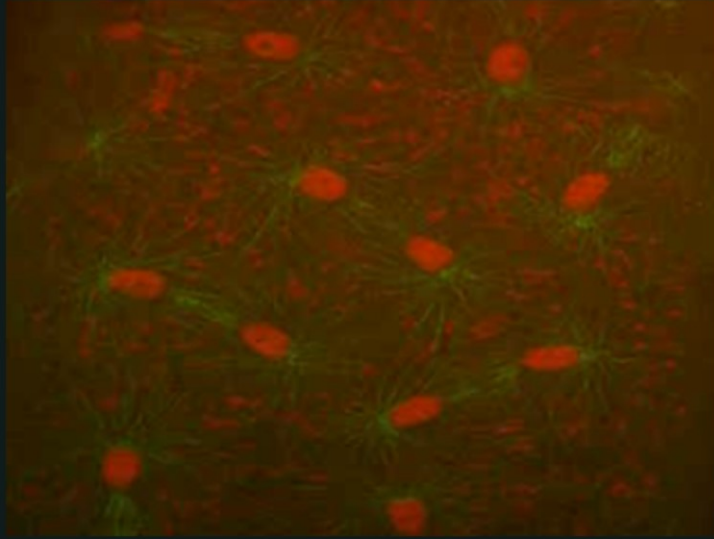
PIN1-GFP in *Arabidopsis*



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

Genová exprese

- Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s repotérovým genem



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



EVROPSKÁ UNIE

esf



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



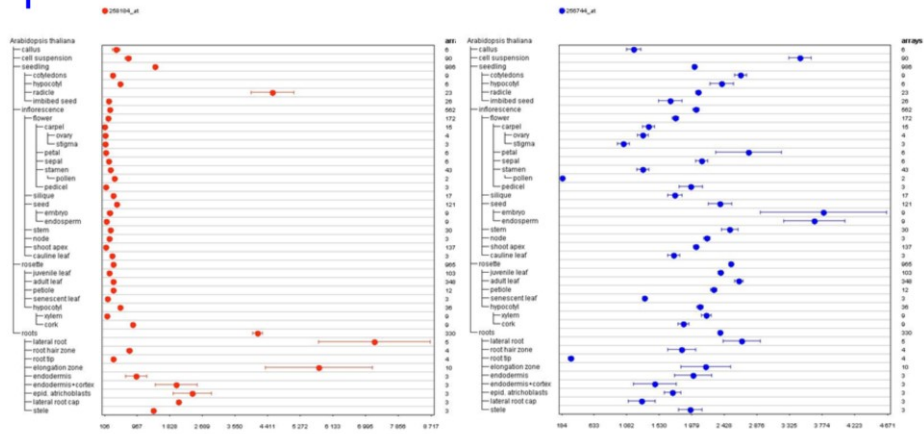
MUNI
MASARYKOVY UNIVERZITA BRNO

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)**

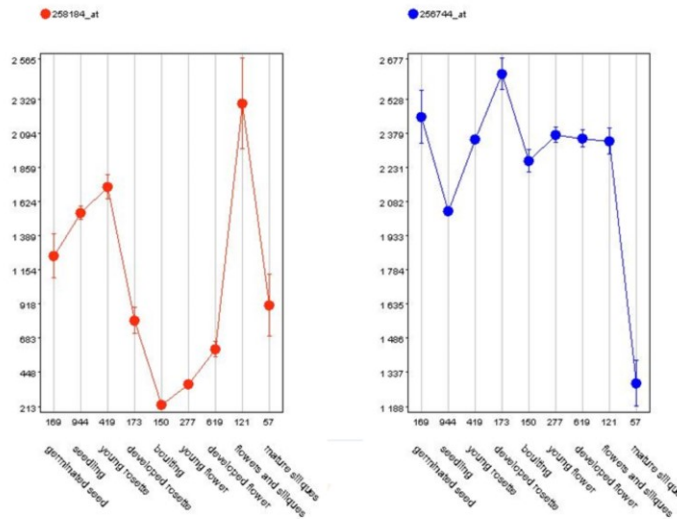


INVESTICE DO ROZVOJE VZDELAVÁNÍ

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

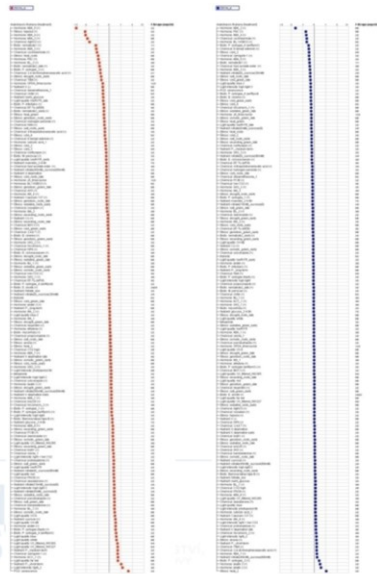
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND

ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

o prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a vnitřním 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

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**



EVROPSKÁ UNIE

esf



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



ÚIV
ÚSTAV PRO VÝZKUM
V OBLASTI VĚDEČNÉHO
KVALIFIKAČNÍHO
VÝVOJE



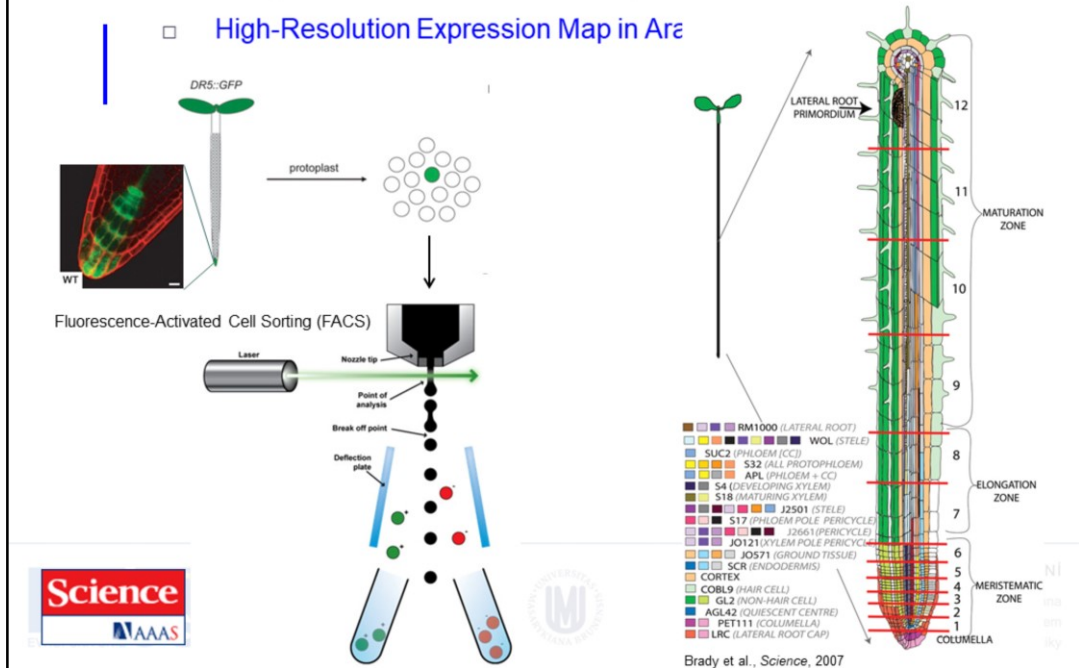
UNIVERSITA
MASARYK
UNIVERSITY
BRNO

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Expression Maps - RNA

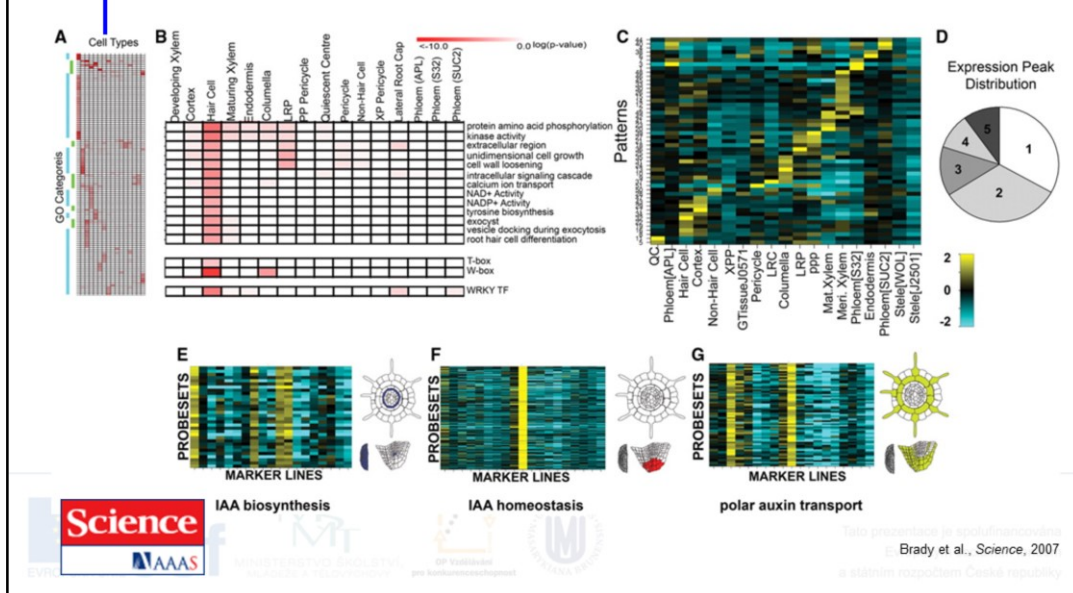
□ High-Resolution Expression Map in Arc



Microarray expression profiles of 19 fluorescently sorted GFP-marked lines were analyzed (3–9, 23, 24). The colors associated with each marker line reflect the developmental stage and cell types sampled. Thirteen transverse sections were sampled along the root's longitudinal axis (red lines) (10). CC, companion cells.

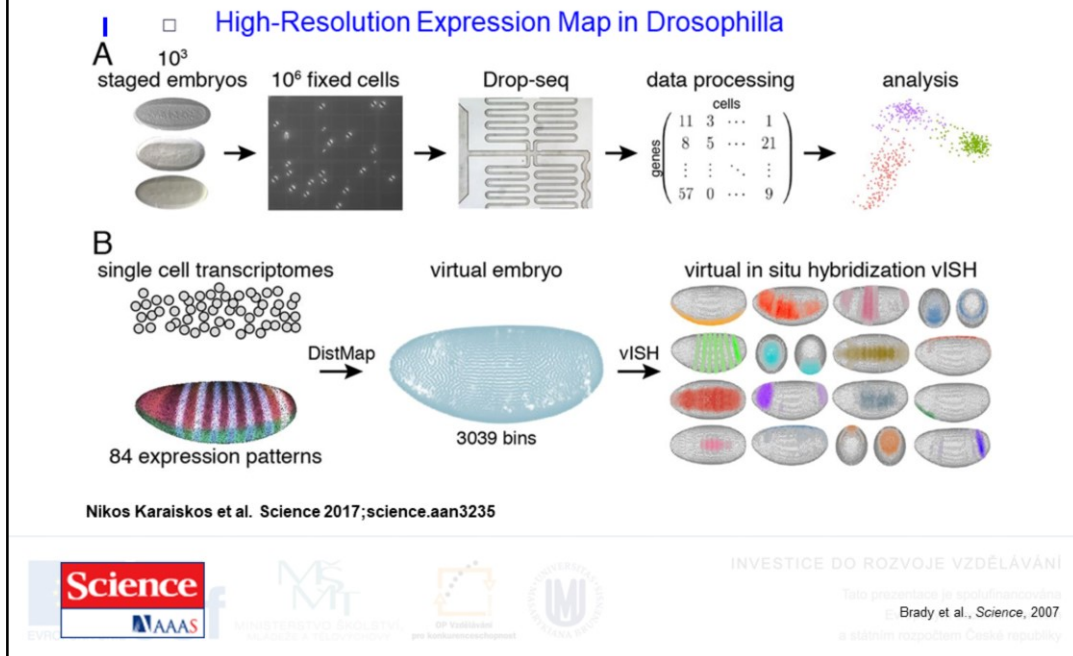
Expression Maps - RNA

High-Resolution Expression Map in Arabidopsis Root



(A) The majority of enriched GO terms (hierarchically clustered) are associated with individual cell types (blue bar). A smaller number are present across multiple cell types (green bar). (fig. S2) (B) GO category enrichment for hair cells confirms a previous report (15). Enriched cis-elements and an enriched TF family were also identified. (C) From the top 50% of varying probe sets, 51 dominant radial patterns were identified. Pattern expression values were mean-normalized (rows) and \log_2 transformed to yield relative expression indices for each marker line (columns). Marker line order is the same for all figures; see table S1 for marker line abbreviations. (D) Pattern expression peaks were found across one to five cell types. (E to G) Patterns where expression is enriched in single and multiple cell types support transcriptional regulation of auxin flux and synthesis. In all heat maps with probe sets, expression values were mean-normalized and \log_2 transformed. Expression is false-colored in representations of a root transverse section, a cut-away of a root tip, and in a lateral root primordium. (E) Auxin biosynthetic genes (*CYP79B2*, *CYP79B3*, *SUPERROOT1*, and *SUPERROOT2*) are transcriptionally enriched in the QC, lateral root primordia, pericycle, and phloem-pole pericycle ($P = 1.99E^{-11}$, pattern 5). All AGI identifiers and TAIR descriptions are found in table S14. (F) Auxin amido-synthases *GH3.6* and *GH3.17* that play a role in auxin homeostasis show enriched expression in the columella, just below the predicted auxin biosynthetic center of the QC ($P = 8.82E^{-4}$, pattern 13). (G) The expression of the auxin transporter, *PIN-FORMED2*, and auxin transport regulators (*PINOID*, *WAG1*) are enriched in the columella, hair cells, and cortex ($P = 1.03E^{-4}$, pattern 31).

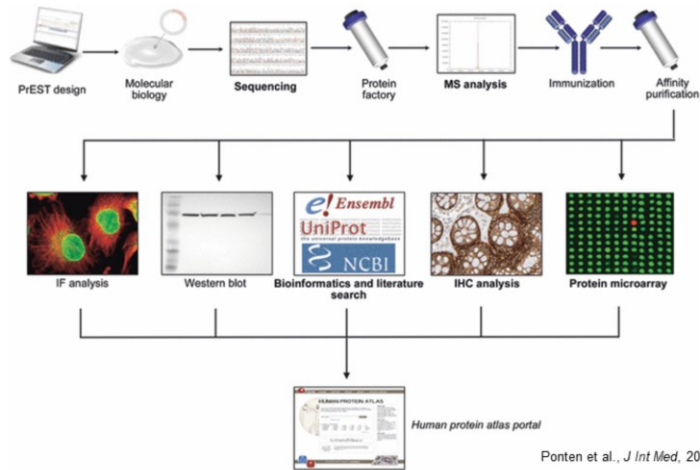
Expression Maps - RNA



(A) The majority of enriched GO terms (hierarchically clustered) are associated with individual cell types (blue bar). A smaller number are present across multiple cell types (green bar). (fig. S2) (B) GO category enrichment for hair cells confirms a previous report (15). Enriched cis-elements and an enriched TF family were also identified. (C) From the top 50% of varying probe sets, 51 dominant radial patterns were identified. Pattern expression values were mean-normalized (rows) and \log_2 transformed to yield relative expression indices for each marker line (columns). Marker line order is the same for all figures; see table S1 for marker line abbreviations. (D) Pattern expression peaks were found across one to five cell types. (E to G) Patterns where expression is enriched in single and multiple cell types support transcriptional regulation of auxin flux and synthesis. In all heat maps with probe sets, expression values were mean-normalized and \log_2 transformed. Expression is false-colored in representations of a root transverse section, a cut-away of a root tip, and in a lateral root primordium. (E) Auxin biosynthetic genes (*CYP79B2*, *CYP79B3*, *SUPERROOT1*, and *SUPERROOT2*) are transcriptionally enriched in the QC, lateral root primordia, pericycle, and phloem-pole pericycle ($P = 1.99E^{-11}$, pattern 5). All AGI identifiers and TAIR descriptions are found in table S14. (F) Auxin amido-synthases *GH3.6* and *GH3.17* that play a role in auxin homeostasis show enriched expression in the columella, just below the predicted auxin biosynthetic center of the QC ($P = 8.82E^{-4}$, pattern 13). (G) The expression of the auxin transporter, *PIN-FORMED2*, and auxin transport regulators (*PINOID*, *WAG1*) are enriched in the columella, hair cells, and cortex ($P = 1.03E^{-4}$, pattern 31).

Expression Maps - Proteins

□ Human Protein Atlas



Ponten et al., *J Int Med*, 2011



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Schematic flowchart of the Human Protein Atlas. For each gene, a signature sequence (PrEST) is defined from the human genome sequence, and following RT-PCR, cloning and production of recombinant protein fragments, subsequent immunization and affinity purification of antisera results immunospecific antibodies. The produced antibodies are tested and validated in various immunoassays. Approved antibodies are used for protein profiling in cells (immunofluorescence) and tissues (immunohistochemistry) to generate the images and protein expression data that are presented in the Human Protein Atlas (Ponten et al., *J Int Med*, 2011).

Expression Maps - Proteins

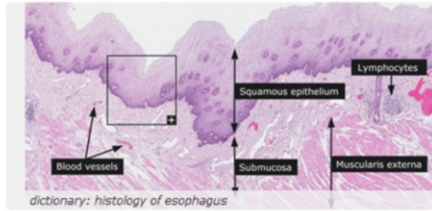
- Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>)

THE HUMAN PROTEIN ATLAS

ABOUT & HELP

SEARCH 7 »

e.g. CD44, ELF3, KLU3, or use Fields to search specific fields such as protein_class:Transcription factors or chromosome:X



News

Protein evidence according to Fagerberg et al is summarized in the chromosome progress diagram.

Version: 11.0
Atlas updated: 2013-03-11
[release history](#)

15156 genes with protein expression profiles based on 18707 antibodies.



EVROPSKÁ UNIE



Fund of the Wallenberg Alfvén

The Human Protein Atlas project is funded by the Knut & Alice Wallenberg foundation.

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

ČESKÁ REPUBLIKA



UPPSALA UNIVERSITET



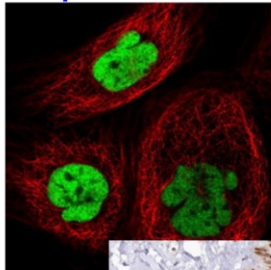
STU

VOJTE VZDĚLÁVÁNÍ

státní je spolufinancována
...zpřesným sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Expression Maps - Proteins

- Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>)

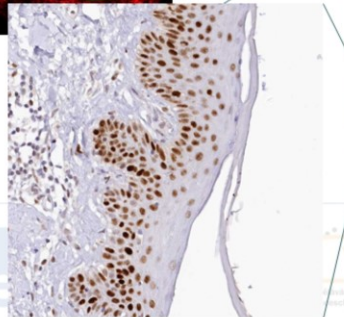


SUBCELLULAR LOCATION SUMMARY

Main location(s) Nucleus but not nucleolus
 Additional location(s)
 Staining summary Localized to the nucleus but excluded from the nucleolus.
 Reliability (APE) High
 Antibodies in assay CAB039238, CAB039239

Show image »

MORE SUBCELL DATA



NORMAL TISSUE & ORGAN SUMMARY

Expressive summary Fractions of cells showed weak nuclear and/or cytoplasmic expression.
 Tissue specificity Expressed in 11 out of 82 cell types
 Reliability (APE) High
 Antibodies in assay CAB002973, CAB039238, CAB039239

Organ	No of cell types	Protein expression
CNS (brain)	11	
Hematopoietic (blood)	8	
Liver and pancreas	5	
Digestive (GI-tract)	13	
Respiratory (lung)	4	
Cardiovascular	1	
Female tissues	13	
Placenta	2	
Male tissues	5	
Urinary tract (kidney)	3	
Skin and soft tissues	14	
Endocrine tissues	3	

Show image »

MORE TISSUE DATA



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
 - Tkářově a buněčně specifická analýza genové exprese
 - Kvantitativní analýza exprese
 - DNA a proteinové čipy



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

DNA Chips

- DNA 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 (Qiagen), 29.110 70-mer oligonukleotidů reprezentujících 26.173 genů kódujících proteiny, 28.964 transkriptů a 87 microRNA genů *Arabidopsis thaliana*
- možnost používat pro přípravu čipů fotolitografické techniky-usnadnění syntézy oligonukleotidů např. pro celý genom člověka (cca 3,1 x 10⁹ bp) je touto technikou možno připravit 25-mery v pouze 100 krocích)



- čipy nejen pro analýzu exprese, ale např. i genotypování (SNP polymorfizmy, 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>cro</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.



DNA Chips

- 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
- konečné vynesení experimentu proti kontrole nebo různých podmínek proti sobě – vlastní výsledek

Expression of 195M677 in response to chemical treatment

Experiment: Aluminum Stress

Slide (name & descriptions)	External ID	Replicate (id & name)	Replicate type	Reverse replicate	Sample	Experimental variables	Label	Get Data
Hoekenga57 Aluminum Stress 1 (strong spatial bias)	7304	63	Aluminum Stress	technical	7304_Cy3.7305_Cy5	no treatment (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy3	Download
Hoekenga58 Aluminum Stress 2 (strong spatial bias)	7306	64	Aluminum Stress	technical	7304_Cy3.7305_Cy5	Aluminum (50 μM ACS) (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy3	Download
				63	7304_Cy3.7305_Cy5	no treatment (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy5	Download



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

Che et al., 2002
Tato prezentace je spolufinancována Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky

Protein Chips

- 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



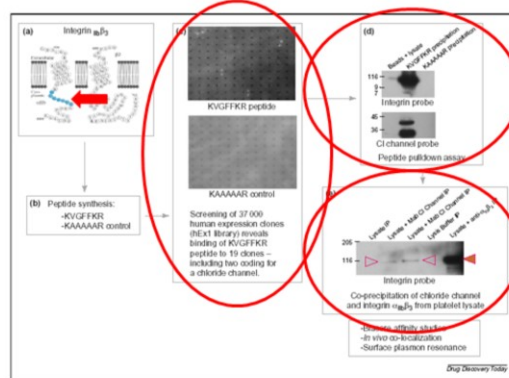
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Protein Chips

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

- exprese cytoplasmatické části fúzního peptidu biotin-KVGFVKR
- 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

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
 - Tkářově a buněčně specifická analýza genové exprese
 - Kvantitativní analýza exprese
 - DNA a proteinové čipy
 - Next gen transkripční profilování

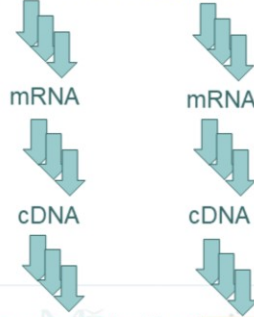
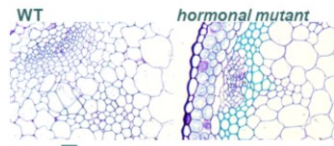


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Next Gen Transcriptional Profiling

- **Transcriptional profiling** via **RNA sequencing**



Sequencing by Illumina and
number of transcripts determination



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Results of -omics Studies vs Biologically Relevant Conclusions

- Transcriptional profiling yielded more than **7K differentially regulated genes**...

Dali et al., unpublished

gene	locus	sample_1	sample_2	status	value_1	value_2	log2(fold_change)	test_stat	p_value	q_value	significant	
AT1G07795	1:2414285-2414967	WT	MT	OK	0	1.18041.79709e+308		308	1.79709e+308	0.88885e-05	0.00039180	1yes
HRS1	1:4558891-4558708	WT	MT	OK	0	0.898583.79709e+308		308	1.79709e+308	0.61994e-08	0.00053505	yes
ATML014	1:9227472-9232296	WT	MT	OK	0	0.5148091.79709e+308		308	1.79709e+308	9.74219e-05	3.50131e-07	5yes
NRT1.6	1:9400663-9403789	WT	MT	OK	0	0.8778851.79709e+308		308	1.79709e+308	3.2892e-08	0.00011562	yes
AT1G27570	1:9575425-9582376	WT	MT	OK	0	2.08291.79709e+308		308	1.79709e+308	9.76039e-06	6.647e-05	yes
AT1G80096	1:22159735-22162419	WT	MT	OK	0	0.8885881.79709e+308		308	1.79709e+308	9.95901e-08	0.00011562	yes
AT1G03020	1:898206-898515	WT	MT	OK	0	1.788591.79709e+308		308	1.79709e+308	0.00913915	0.0277958	yes
AT1G13609	1:4682720-4683471	WT	MT	OK	0	3.558141.79709e+308		308	1.79709e+308	0.00021883	0.00108079	yes
AT1G21550	1:7553100-7553876	WT	MT	OK	0	0.5828881.79709e+308		308	1.79709e+308	0.00115562	0.00414971	yes
AT1G22120	1:7808308-7809632	WT	MT	OK	0	0.8173541.79709e+308		308	1.79709e+308	2.48392e-08	0.00028514	yes
AT1G31370	1:11238297-11238593	WT	MT	OK	0	1.482541.79709e+308		308	1.79709e+308	4.83823e-05	1.91058e-05	3yes
APUM10	1:13253397-13255570	WT	MT	OK	0	0.5810311.79709e+308		308	1.79709e+308	7.87855e-08	0.00037473	yes
AT1G48700	1:18010728-18012871	WT	MT	OK	0	0.5585251.79709e+308		308	1.79709e+308	8.53917e-05	0.00011562	yes
AT1G89077	1:21748209-21833195	WT	MT	OK	0	138.8861.79709e+308		308	1.79709e+308	0.00122789	0.00496816	yes
AT1G80050	1:22121548-22123702	WT	MT	OK	0	0.3700871.79709e+308		308	1.79709e+308	0.00117953	0.0048001	yes
AT4G15242	4:8705788-8706997	WT	MT	OK	0.00930712	17.9058	10.9098	-4.40523	1.05873e-05	7.13983e-05	yes	
AT5G33251	5:12489071-12500433	WT	MT	OK	0.0498375	52.2837	10.0349	-8.8119	0	0	yes	
AT4G12520	4:7421055-7421738	WT	MT	OK	0.0195111	15.8518	9.88612	-3.90043	9.80217e-05	0.000528904	yes	
AT1G80020	1:22100551-22105378	WT	MT	OK	0.0118377	7.18823	9.24511	-7.50382	8.19504e-14	1.4888e-12	yes	
AT5G15380	5:4987235-4988182	WT	MT	OK	0.0988273	58.4834	9.1587	-10.4392	0	0	yes	

Example of an output of transcriptional profiling study using Illumina sequencing performed in our lab. Shown is just a tiny fragment of the complete list, comprising about 7K genes revealing differential expression in the studied mutant.

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
 - Kvantitativní analýza exprese
 - DNA a proteinové čipy
 - Next gen transkripční profilování
- Regulace genové exprese v identifikaci funkce genů přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Gain-of-Function Approaches

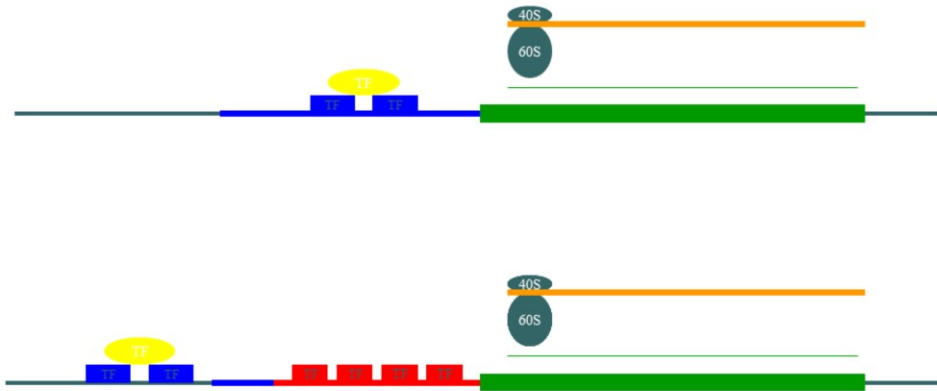
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese
 - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inserce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
 - prvním krokem je příprava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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Activation Mutagenesis

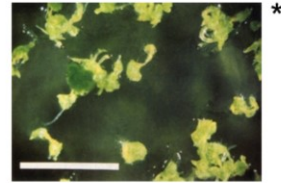


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

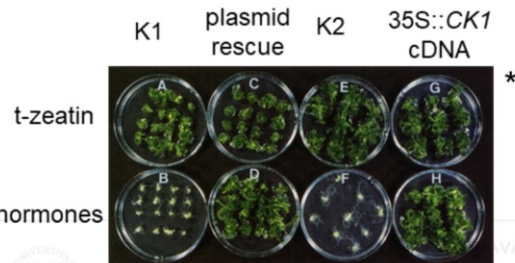
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace genu *CK11*

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



- mutantní fenotyp je fenokopii exogenní aplikace cytokininů (*CK11*, C*YTOKININ* I*NDEPENDENT* 1)



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND
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
 - Kvantitativní analýza exprese
 - DNA a proteinové čipy
 - Next gen transkripční profilování
- Regulace genové exprese v identifikaci funkce genů
přístupy získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese
 - Ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese



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

Regulated Expression Systems

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



EVROPSKÁ UNIE

esf



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

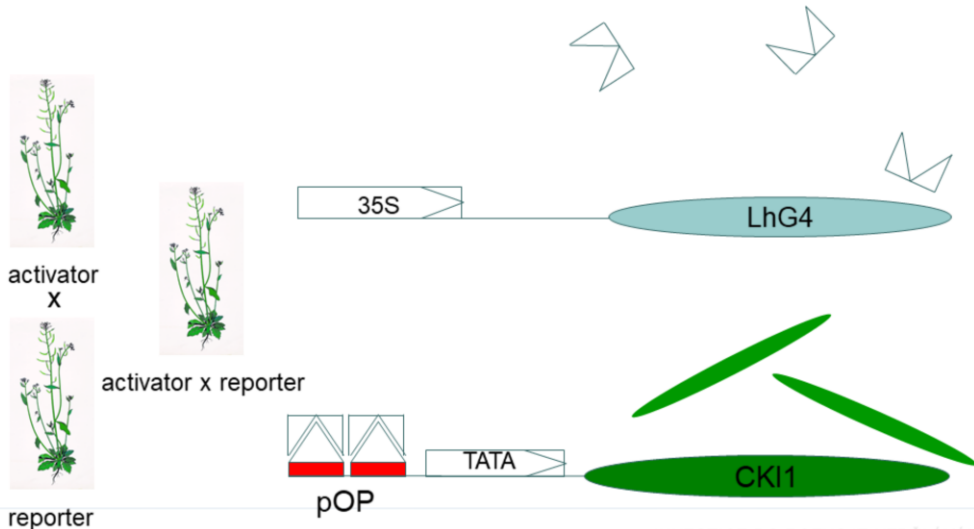


MUNI
MASARYKOVA UNIVERZITA BRNO

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

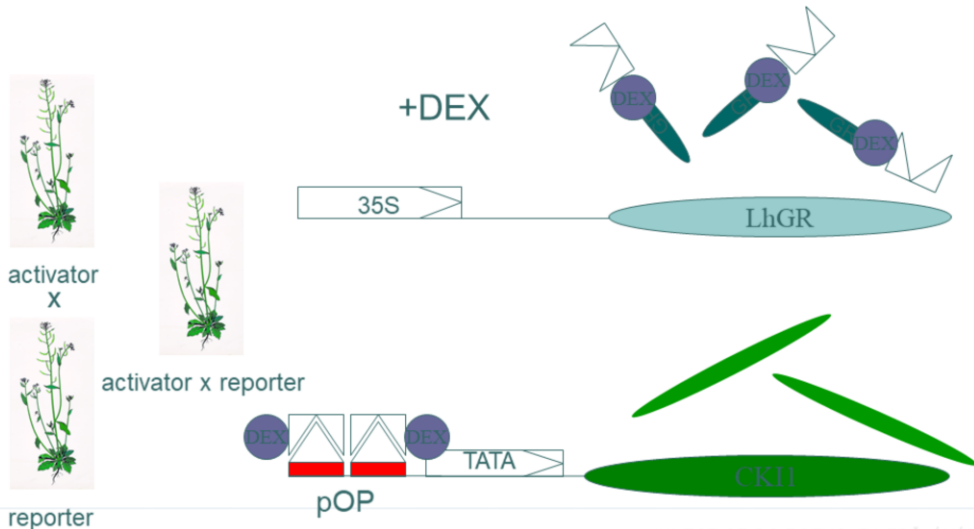
Regulated Expression Systems



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

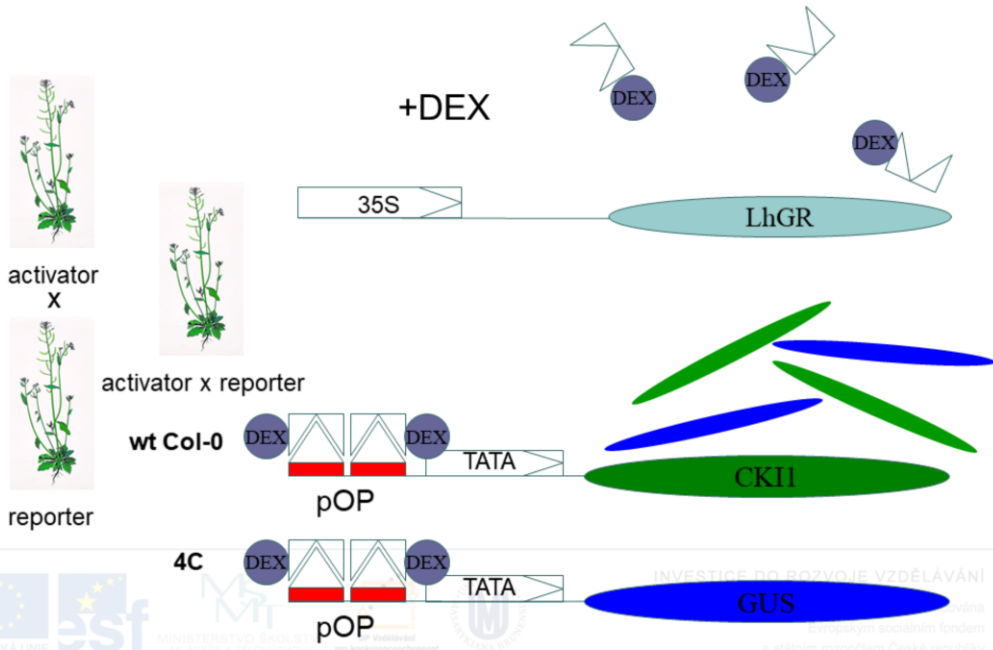
Regulated Expression Systems



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

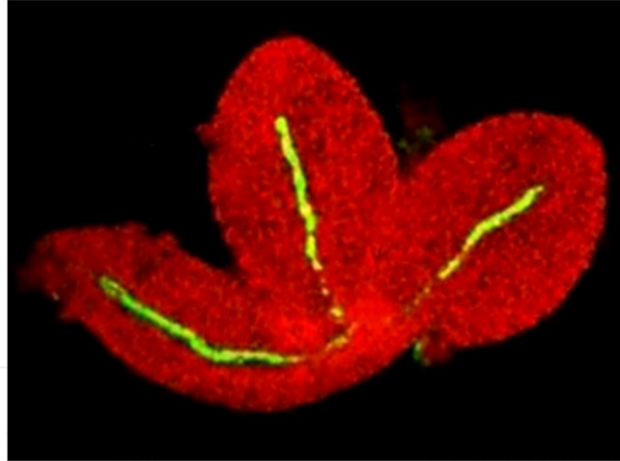
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Regulated Expression Systems



Regulated Expression Systems

- 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



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

2008

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
 - Tkářově a buněčně specifická analýza genové exprese
 - Kvantitativní analýza exprese
 - DNA a proteinové čipy
 - Next gen transkripční profilování
- Regulace genové exprese v identifikaci funkce genů přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese
 - Ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Chemická genetika



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

Chemical Genetics

- Nové trendy

- chemická genetika
- pojem **chemická genetika** – více než **50.000/89.631** záznamů v databázi PubMed (16.10.2008/29.10.2015, **nárůst 65%**)

The screenshot shows a PubMed search results page. 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 is a search bar with the query 'for chemical genetics'. The results are displayed in a list format, showing the first three items. Each item includes a checkbox, a citation link, the authors' names, the title of the article, and the journal information. The first item 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. The second item is 'Five cases of beta-ureidopropionase deficiency detected by GC/MS analysis of urine metabolome' by Zhou et al. The third item 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 Jindram et al.



MINISTERSTVO ZDRAVÍ
MUDr. JUD. MGR. A. ŠTĚPÁNEK, Ph.D.
OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



E DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Chemical Genetics

▪ Nové trendy

- chemická genetika
- pojem **chemická genetika** – více než **50.000/82.357** záznamů v databázi PubMed (16.10. **2008**/23.10. **2014**, **nárůst 65%**)
 - podobně jako v případě genetiky, existují i zde přístupy „**přímé**“ a „**reverzní**“
 - oproti přístupům „klasické“ genetiky není **předmětem zájmu** gen ale **protein**
 - chemická genetika se snaží identifikovat buď **cílový protein** po chemickém působení a následných fenotypových změnách („**přímá**“ **chemická genetika**) nebo naopak **chemikálie schopné interakce s proteinem zájmu** („**reverzní**“ **chemická genetika**)
 - za tímto účelem jsou prováděna **vyhledávání v knihovnách** nejrůznějších **chemických látek** (tisíce položek, komerčně přístupné)
 - příklad: **analýza endomembránového transportu** u rostlin

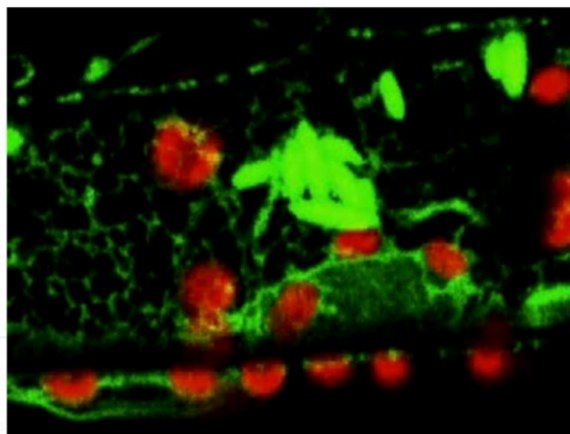


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Chemical Genetics

- 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)



EVROPSKÁ UNIE

esf

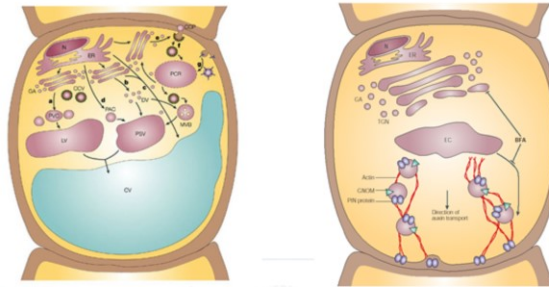
MINIS
2007

ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

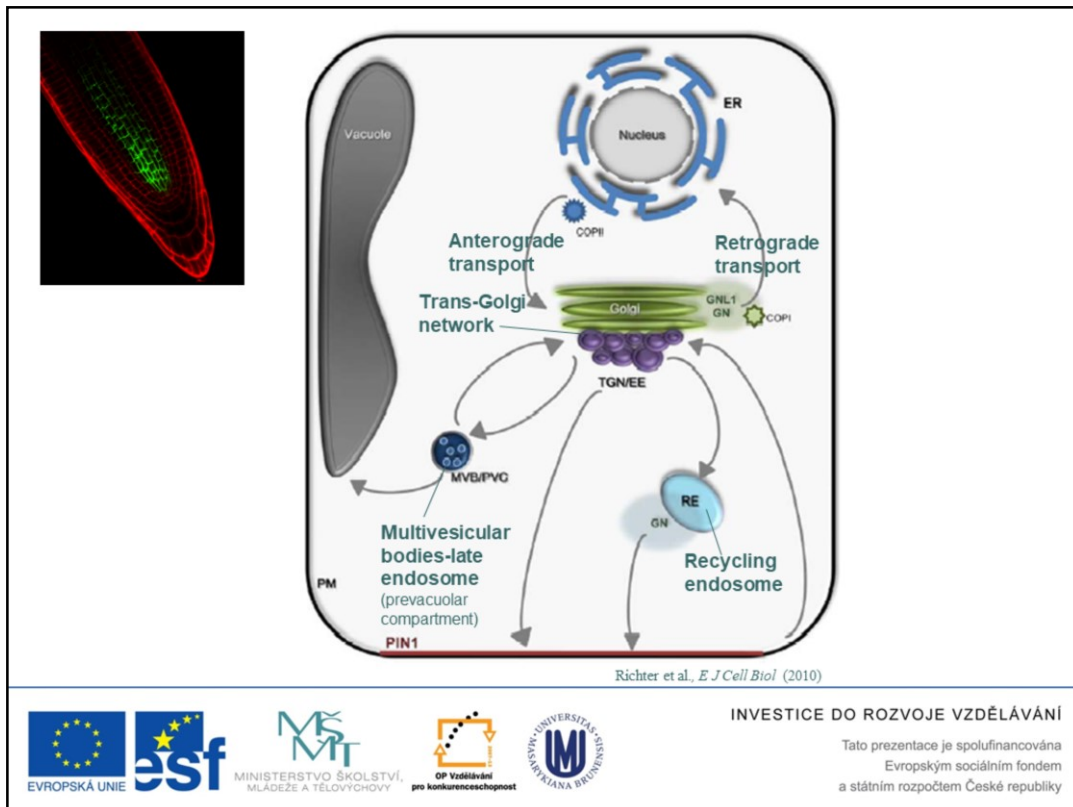
Chemical Genetics

- Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupy chemické genetiky
 - v rostlinných buňkách dochází k velké dynamickým procesům, zprostředkovaným zejména tzv. endomembránovým transportem (viz film, GFP směřované do ER)
 - endomembránový transport je důležitým regulačním mechanismem při přenosu signálu a regulaci buněčných procesů



ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



In the figure, there is simplified scheme of vesicle trafficking pathways, regulated by GNOM and its closest relative, GNOM-LIKE1 (GNL1).

Secretory and membrane proteins are synthesised at the ER (blue) and passed onto the Golgi apparatus (green) by anterograde trafficking in COPII-coated vesicles.

The retrograde route from the Golgi apparatus to the ER is regulated by the ARF-GEFs GNOM (GN) and GNL1, which regulate the recruitment of COPI coats to the Golgi membrane. On the secretory route, proteins are transported to the sorting station, the trans-Golgi network (TGN; lilac).

From there, proteins are either transported to the vacuole (grey) via multivesicular bodies (MVB, also called prevacuolar compartment, PVC, which corresponds to the late endosome; deep blue) or trafficked to the plasma membrane (PM).

Plasma membrane proteins like the auxin efflux carrier PIN1 (red), which accumulates at the basal PM at steady state, are continually internalised and trafficked to the TGN, which resembles the early endosome (EE) in plants.

From the TGN, PIN1 is recycled to the plasma membrane via the recycling endosome (RE; light blue). This pathway is regulated by the ARF-GEF GNOM.



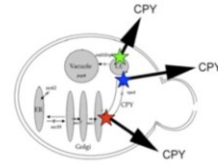
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

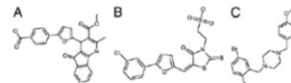
Chemical Genetics

Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupy 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 kulturačním médiu pomocí monoklonálních protilátek



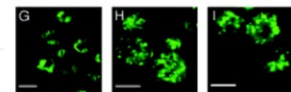
chemická struktura sortinů



Imunodetekce karboxipeptidázy



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



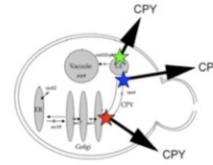
ELÁVÁNÍ

Projekt financován z prostředků Evropské unie
 Zouhar et al., 2004
 a státním rozpočtem České republiky

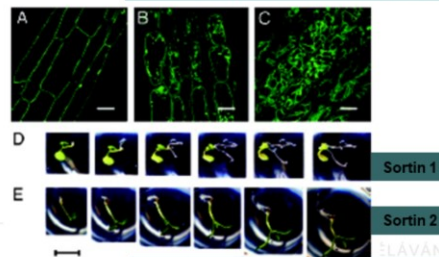
Chemical Genetics

Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupů 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 kulturačním médiu pomocí monoklonálních protilátek
- identifikované látky („sortiny“) byly schopny vyvolat obdobné změny i u *Arabidopsis* - konzervované mechanismy transportu u kvasinek i u rostlin
- pro bližší identifikaci molekulárního procesu ovlivněného jedním z identifikovaných „sortinů“ byla provedena analýza jeho vlivu na sekreci markerového proteinu (AtCPY) – sortin 1 inhibuje specificky pouze tuto sekreční cestu



tvary rostlinných vakuol pomocí EGFP::TIP



fenotyp semenáčků v přítomnosti sortinů

Zouhar et al., 2004

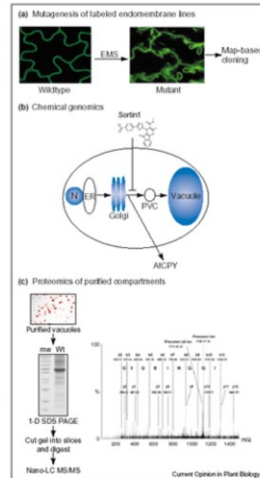
podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky



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

Chemical Genetics

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



ŘZDĚLÁVÁNÍ
spolufinancováno
sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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