

# Bi6725 Moderní metody buněčné biologie

Analýza genové exprese a nástroje systémové biologie

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)



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

# Analýza genové exprese

## ▪ Zdrojová literatura

- Wilt, F.H., and Hake, S. (2004). **Principles of Developmental Biology**. (New York ; London: W. W. Norton).
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S.J., Barry, C., Barbarese, E., and Carson, J.H. (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* 123, 431-441.
- Alberts, B. (1998). The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 92, 291-294.
- Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., and Yakhini, Z. (2009). GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10, 48.
- Benitez, M. and Hejatko, J. (2013) Dynamics of cell-fate determination and patterning in the vascular bundles of *Arabidopsis thaliana*. *Plos ONE*, 8, e63108.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Osnova

- Struktura genů
- Regulace transkripce
- 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
    - Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
  - Kvantitativní analýza genové 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

# Osnova

- Struktura genů



EVROPSKA UNIE

esf

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

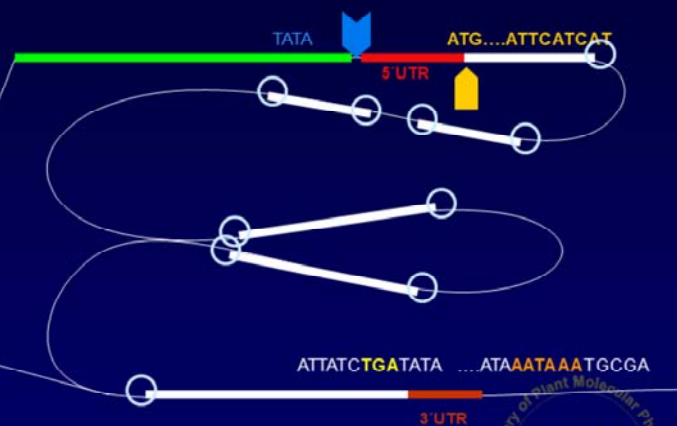
MUNI  
MASARYKOVA UNIVERZITA

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Struktura genů

- promotor
- počátek transkripce
- 5'UTR
- počátek translace
- místa sestřihu
- stop kodon
- 3'UTR
- polyadenylační signál



# Osnova

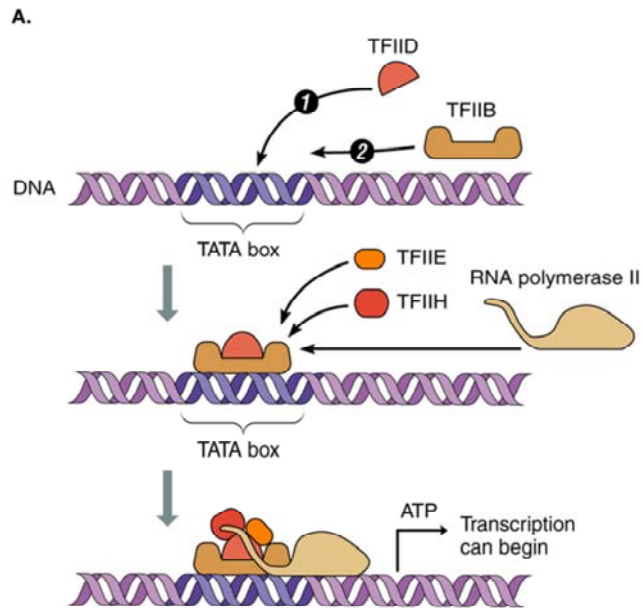
- Struktura genů
- Regulace transkripce



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

## Formation of transcription initiation complex

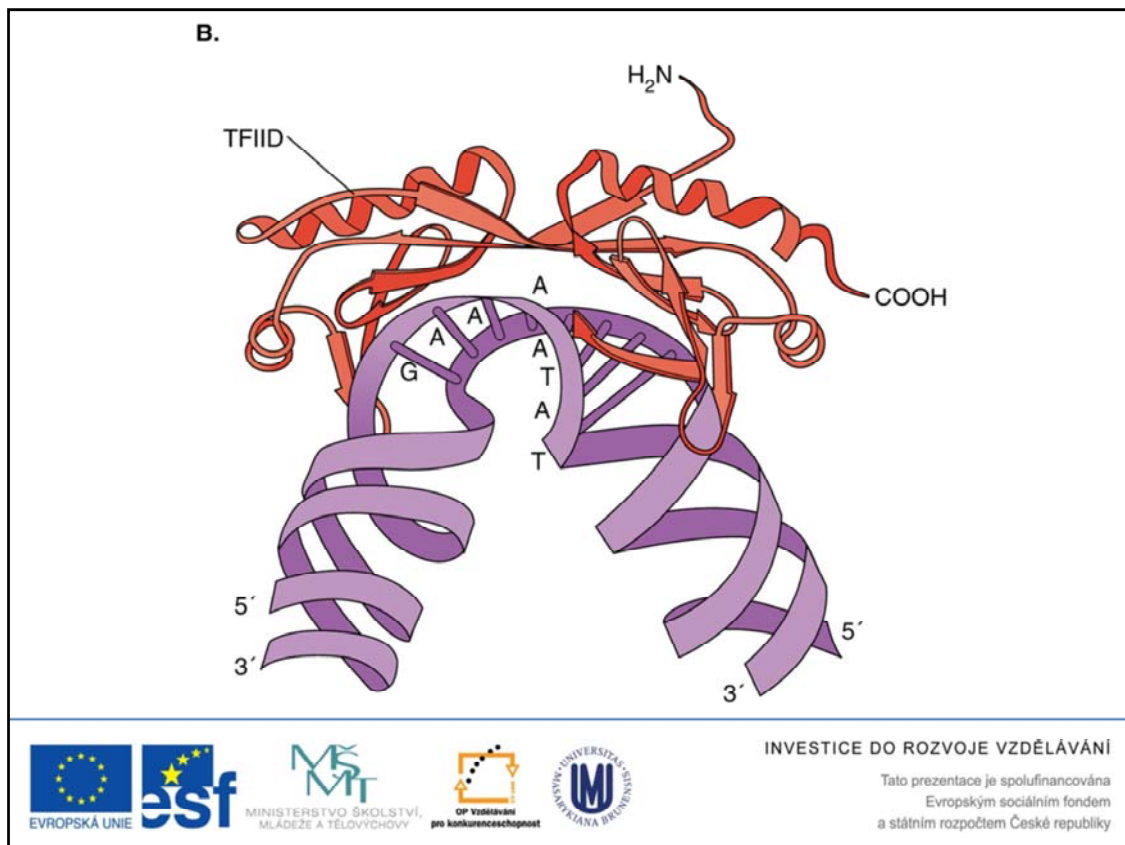


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Regulation of transcription occurs via specific interaction of both general and tissue specific transcription factors (TFs) with promoter and/or enhancer sequences.

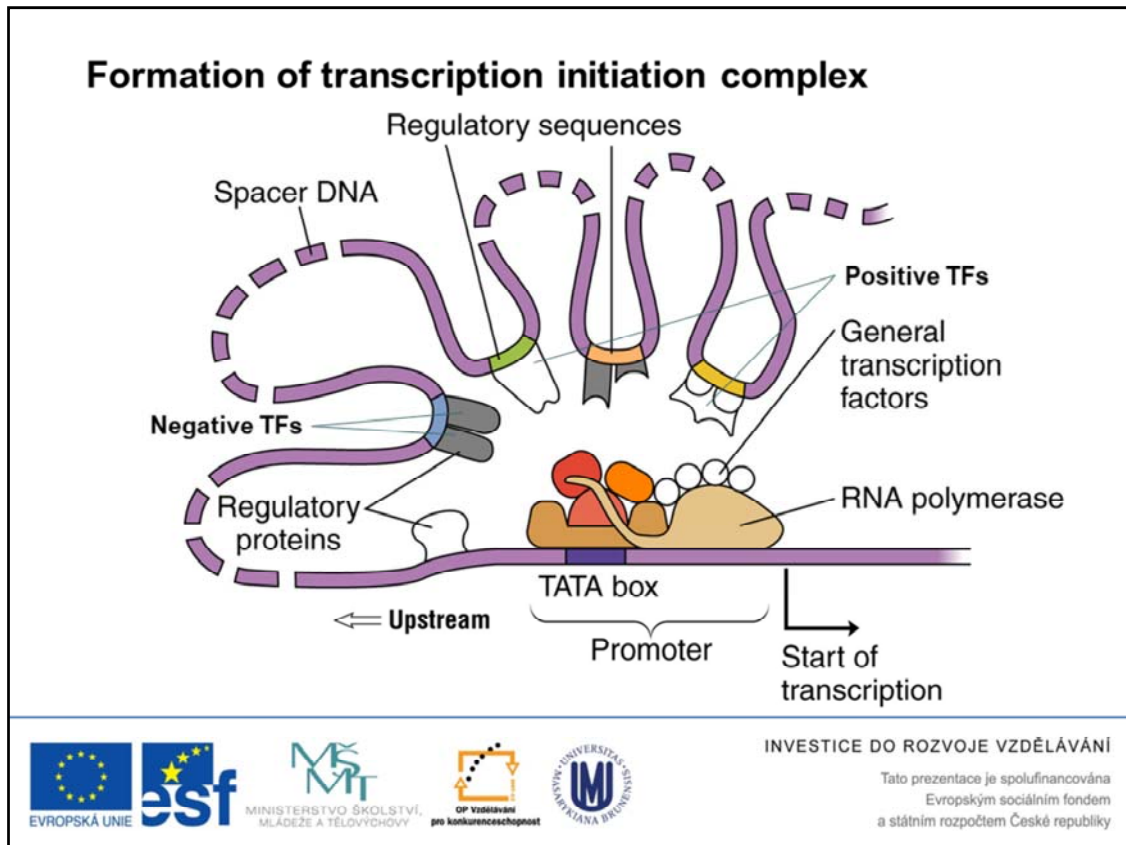
The scheme above shows simplified subsequent formation of the complex of TFs involved in the regulation of transcription. Interaction of general TFIIID with the TATA box induces distortion of the DNA structure (see the next slide).



Induction of structural changes upon interaction of TFIID with DNA. This may be important for the assembly of other TFs involved in the formation of transcription initiation complex.

This change of confirmation provides a kind of “signature” that is recognized by other proteins and NA polymerase to recognize the proper binding site. However, there are also TATA box-less promoter, where probably other types of “signatures” occur.

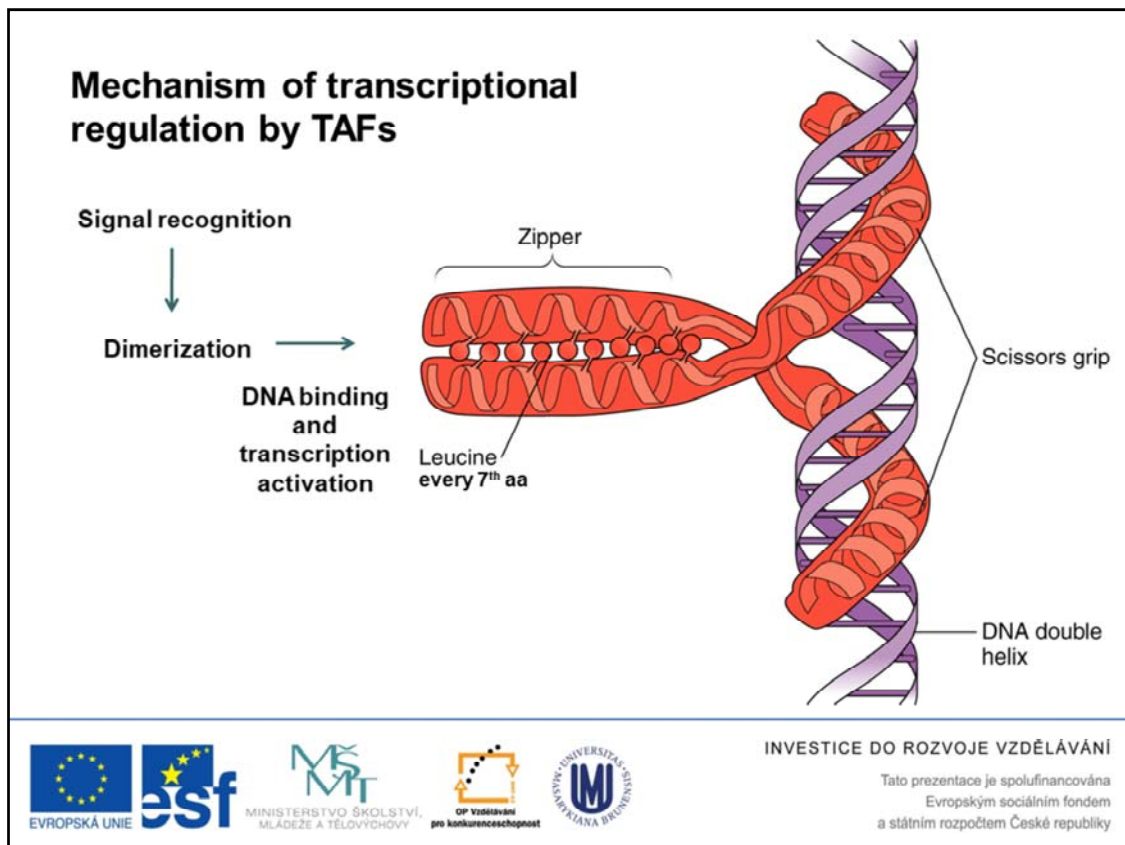




The scheme showing the formation of the transcription initiation complex and the interaction of both positive (open symbols) and negative (solid symbols) factors.

These proteins bind to the regulatory sequences that might be hundreds or even thousands of base pairs away from the promoter. These protein interact with each other and with the RNA polymerase, integrating thus many signals into a “yes” or “no” response of the basal promoter, i.e. the region adjacent to the TATA box and recognized by the RNA polymerase.

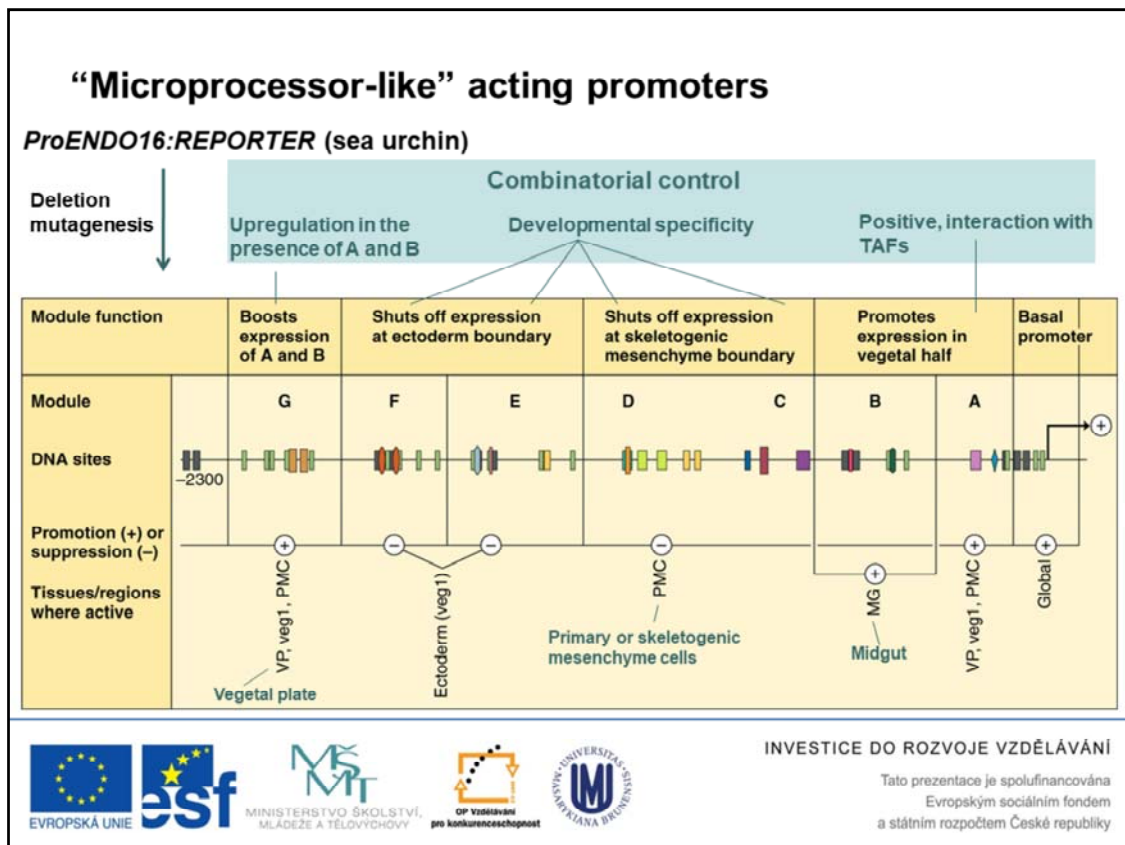
The individual positive or negative factors are complex and their activity might be regulated by their phosphorylation status or via their interaction with other proteins (i.e. monomeric or dimeric) etc..



There is a whole family of transcription activating factors (TAFs) that interact with signalling molecules, e.g. steroid hormones, thyroid hormones or retinoic acid and in a response to the signal transfer to the nucleus where they regulate transcription.

One of the type of TAF are leucine zipper or bZIP type TAFs. These TAFs are dimeric, with leucine-rich hydrophobic face formed by the Leu that occurs every 7<sup>th</sup> aa.

That allows the factor to take the proper configuration, which provides the dimer with the ability to bind DNA via charged aa.



An example of the “microprocessor”-like acting promoter is a promoter of the *endo16* gene from the sea urchin.

There have been identified several gene regulatory modules in the *endo16* gene that have positive or negative regulatory role. These modules were identified via formation of deletion mutants of the transcriptional fusions with reporter gene.

The analysis has revealed that the module A has a positive function and must interact with its cognate TAFs for transcription to occur.

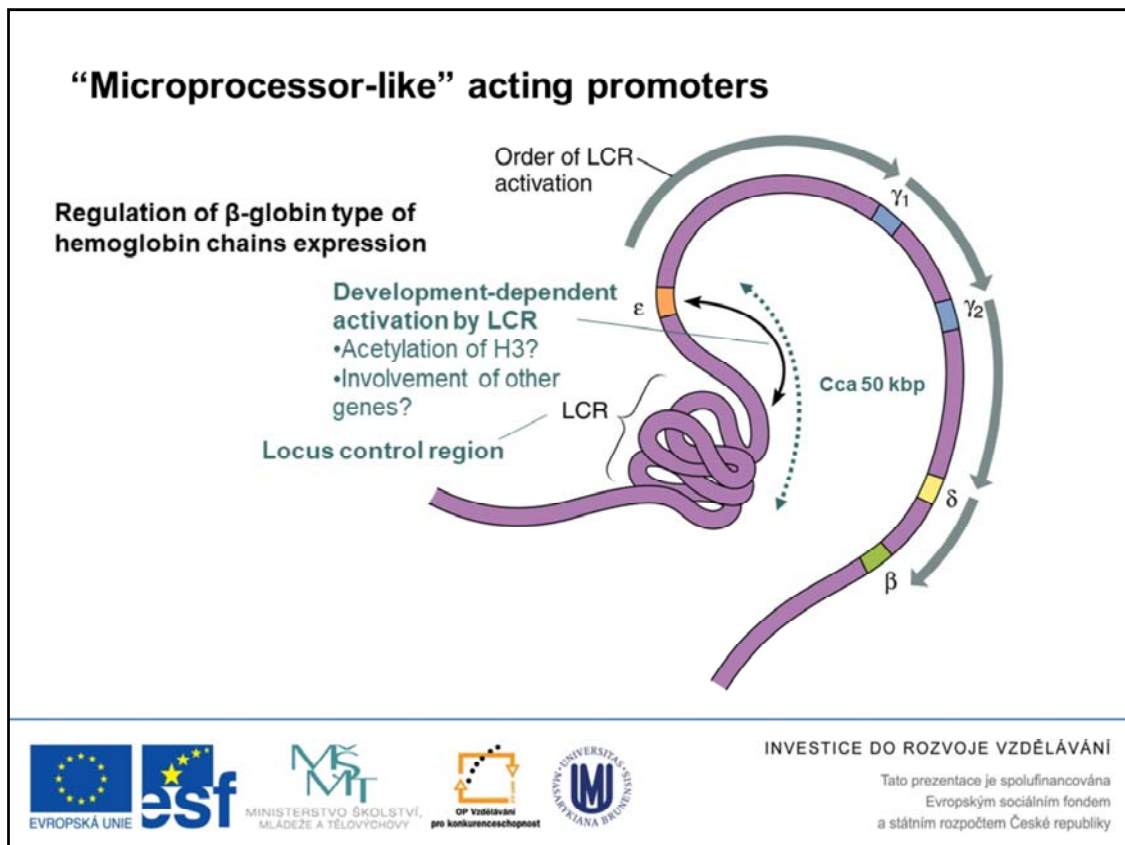
Module G enhances the expression when the A and B are active.

C, D, E and F are responsible for the specificity of the expression of *endo16* during sea urchin development.

Each of the modules has several protein interaction sites, some of them general, other unique. Site for the protein SpGCF1 is present in many modules and is probably responsible for looping of chromatin, allowing thus bringing of distal regulatory modules close to the basal promoter.

This type of regulation, i.e. based on the different activities of diverse regulatory sequences is sometimes called *combinatorial* and is common for development of many living creatures.

In the combinatorial type of regulations, some modules may act synergistically, some of them antagonistically, some may have both positive and negative roles (e.g. the module B, see the figure). This variability allows very precise and responsive regulations towards changing environmental conditions.



An example of the combinatorial gene regulation is the regulation of  $\beta$ -globin type of hemoglobin chains of humans.

As discussed in the Lesson 5 (course Bi8940 Developmental biology), the type of hemoglobin produced by the fetus changes during development. The hemoglobin present in the liver-produced hemoglobin is composed of two  $\alpha$ - and two  $\beta$ -type chains. The  $\beta$ -type hemoglobin chains are of several developmental types, produced by  $\epsilon$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  and  $\beta$  (in this order). In addition, there is minor adult type of  $\beta$ -type hemoglobin, called  $\delta$  globin.

The genes for the  $\beta$ -type chains are aligned on the chromosome in the order, in which they are expressed during development (see the figure).

For the expression of individual cell types is distinctive an upstream regulatory sequence called locus control region (LCR). LCR is located about 50 kbp away from the most proximal  $\epsilon$  gene.

The LCR structure is different in erythrocyte precursor cells in comparison to other cells that could be demonstrated by the changes in the sensitivity to low concentrations of DNase, suggesting low amount of nucleosomes bound.

For the expression of the particular genes, the interaction of their regulatory sequences with LCRs is necessary. Because of LCR can interact only with one regulatory sequence at a time, only one type of genes for the particular  $\beta$ -type chain is activated (the first interaction of LCR with  $\epsilon$  gene, which is later in development replaced by the other one, is shown by the double-headed arrow).

The underlying molecular mechanisms of the specific pattern of the LCR movement from the most proximal towards the most distal gene cannot be satisfactory explained.

Probably, acetylation of H3 histones might play a role and possibly, other genes outside of the  $\beta$ -type chain family are involved in the regulation of LCR activity. That seems to be confirmed by the identification of other human genes with similar structure, suggesting common regulatory mechanisms via LCRs.

For

# Osnova

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

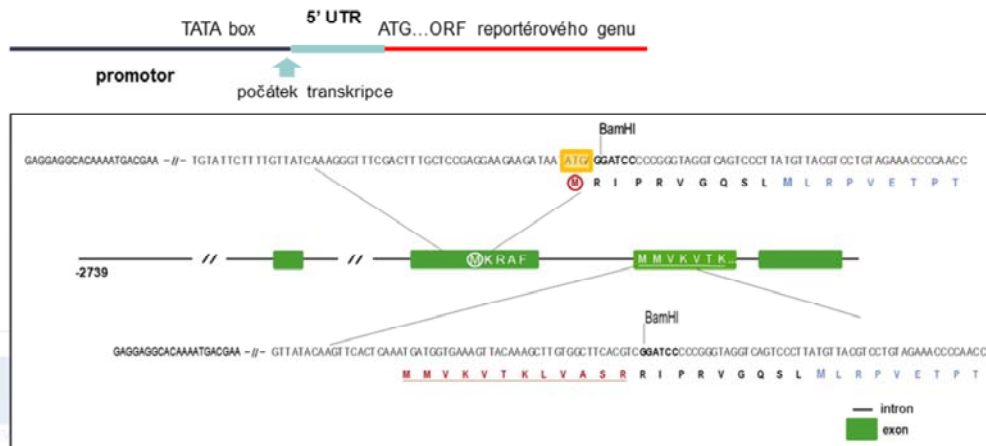


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

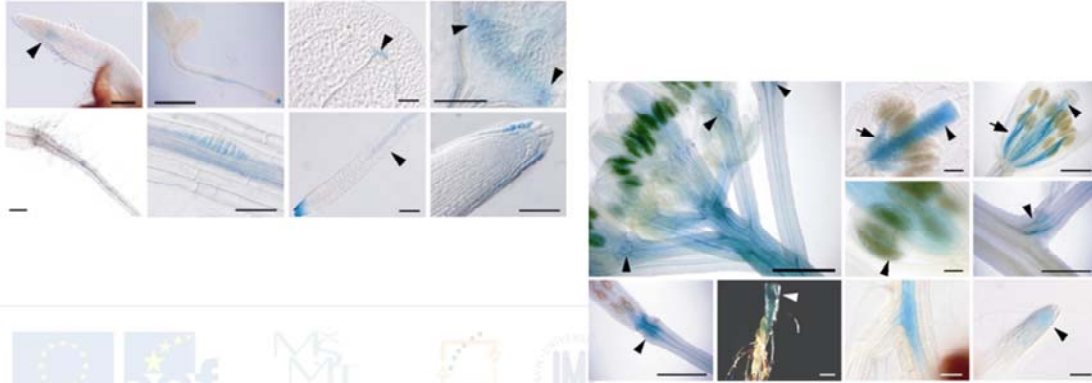
# Genová exprese

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



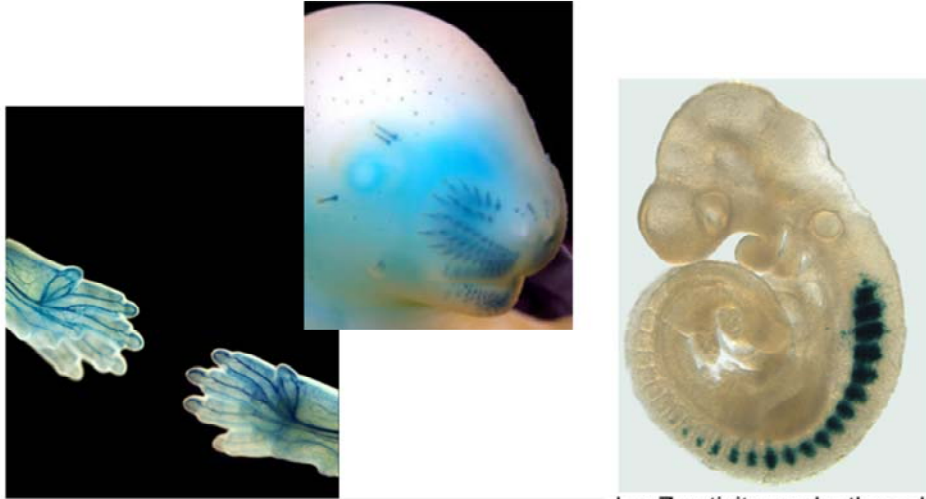
# Genová exprese

- **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



Evropský sociální fond  
a státním rozpočtem České republiky

# GUS reporter in mouse embryos



LacZ activity marks the cells of the developing myotome.



ZDĚLÁVÁNÍ

Číslo ústavu: 143/2016/SF  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky



# Osnova

- Struktura genů
- Regulace transkripce
- 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

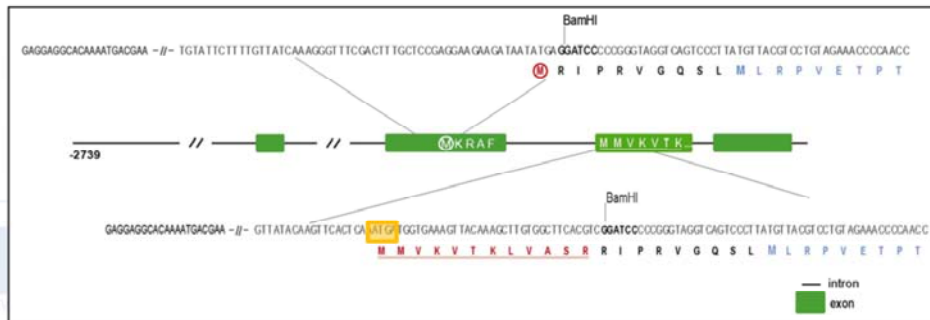
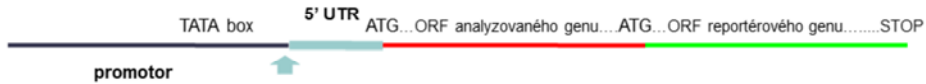


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Genová exprese

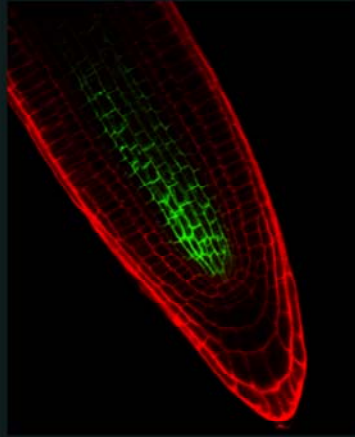
- **Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reportérovým genem**
  - Identifikace a klonování promotorové a kódující oblasti analyzovaného genu
  - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a kódující sekvenci studovaného genu ve fúzi s reportérovým genem (uidA, GFP)



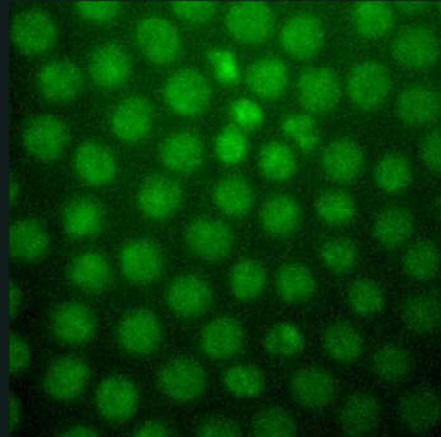
EVZDĚLÁVÁNÍ  
pro rozvoje vzdělávání  
z sociálním fondem  
Evropské unie  
a státního rozpočtu  
České republiky

# 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



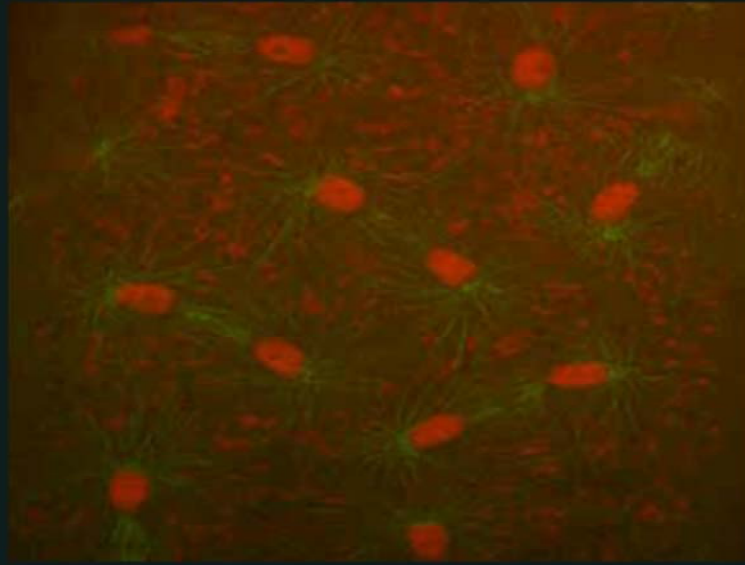
PIN1-GFP in *Arabidopsis*



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

# Genová exprese

- Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s repotérovým genem



# Osnova

- Struktura genů
- Regulace transkripce
- 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

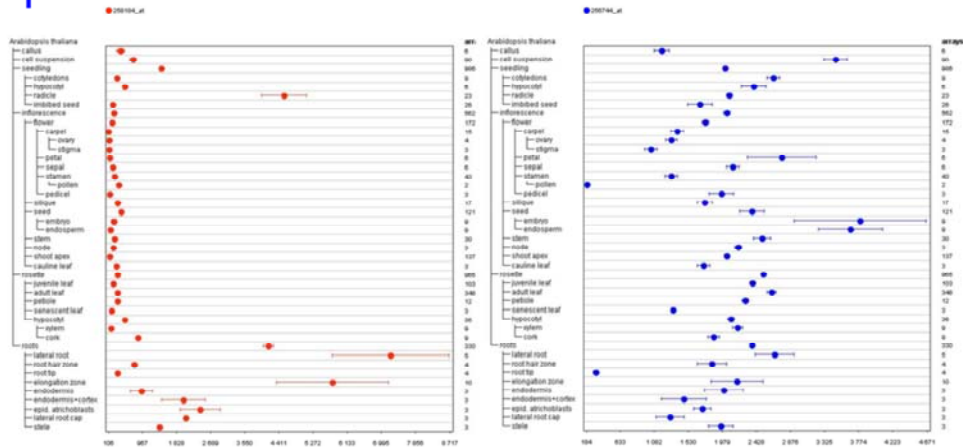


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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)**

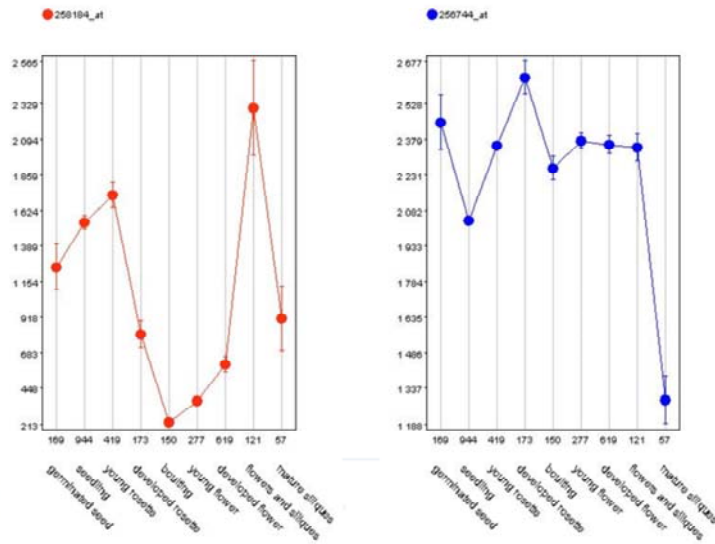


INVESTICE DO KVALIFIKACE A VZDELÁVÁNÍ

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)

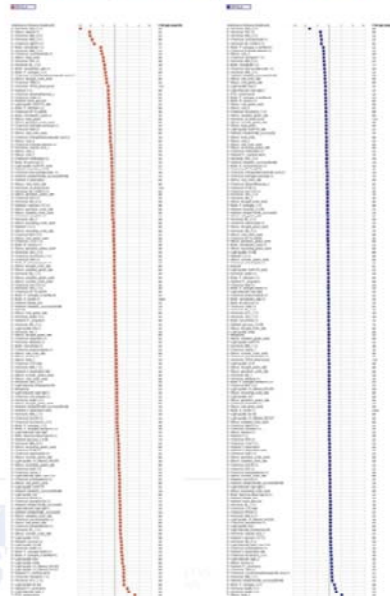


ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

pro prezentaci je realizováno  
Evropským sociálním fondem  
a vlastními prostředky 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

- Struktura genů
- Regulace transkripce
- 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**

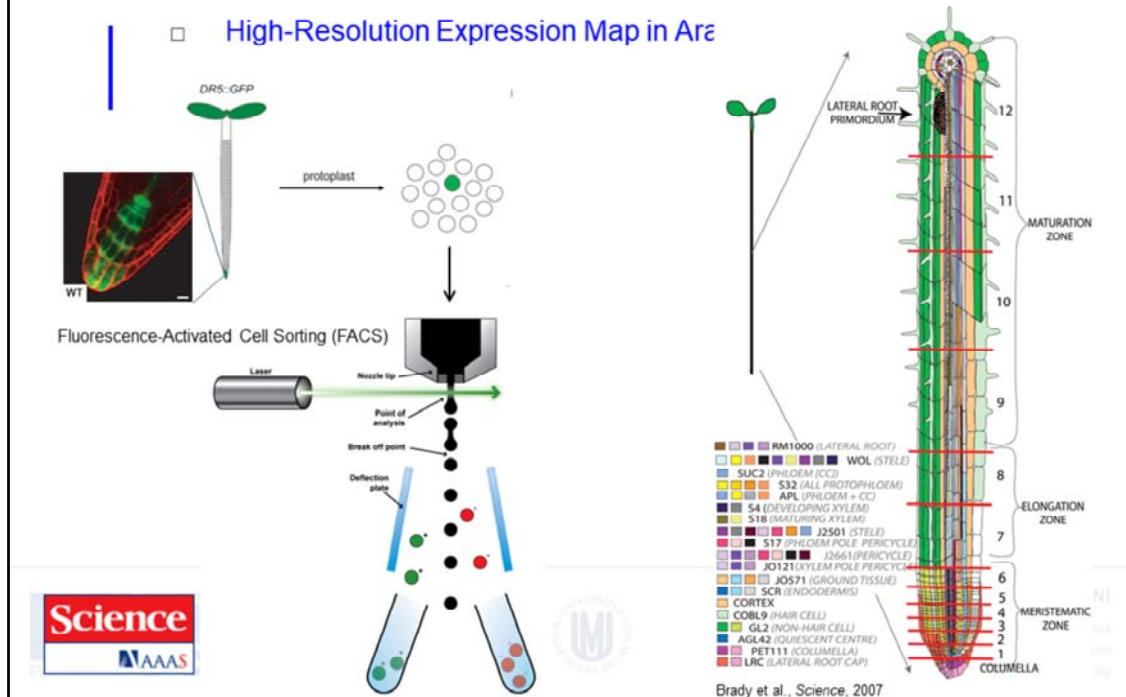


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Expression Maps - RNA

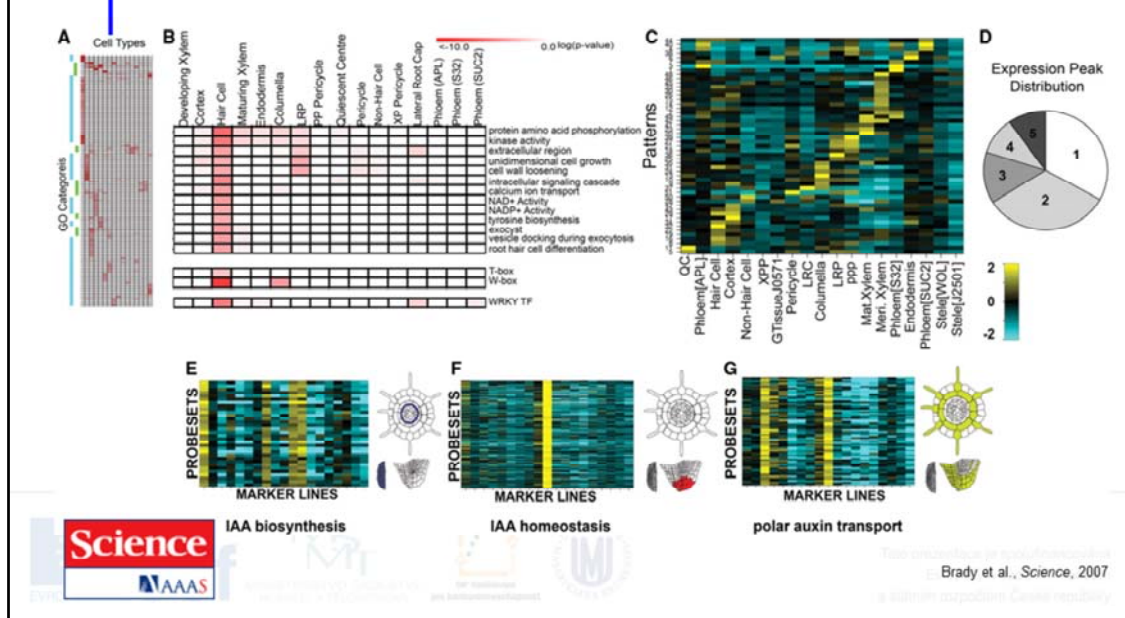
## High-Resolution Expression Map in *Ara*



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.

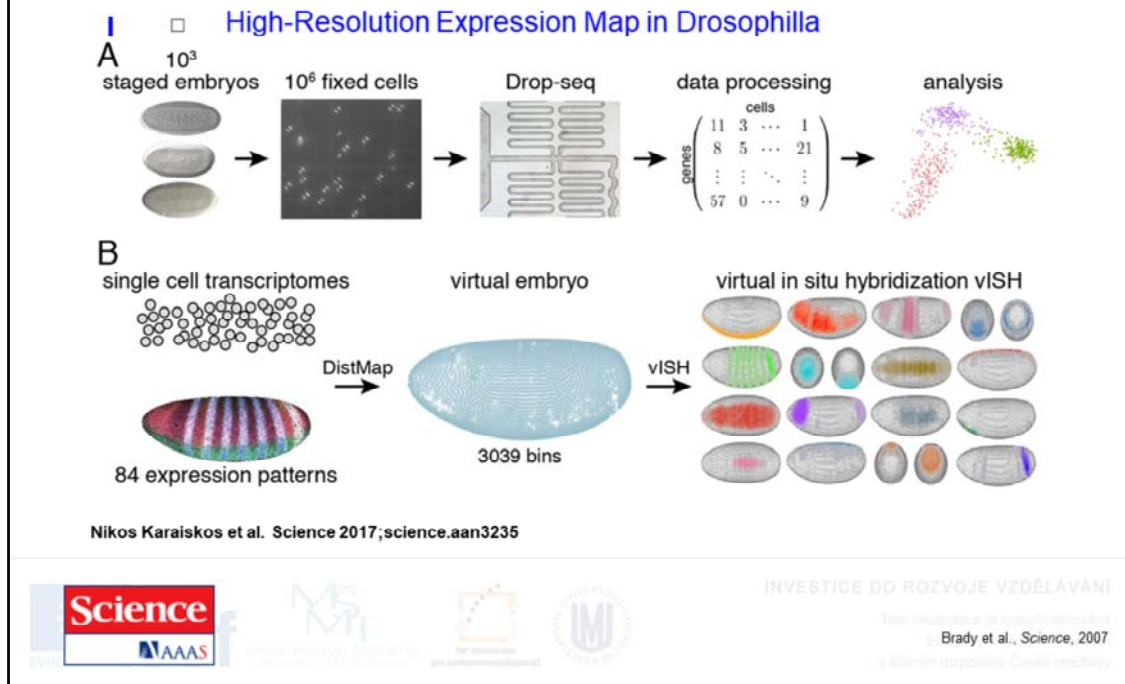
# Expression Maps - RNA

## 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).

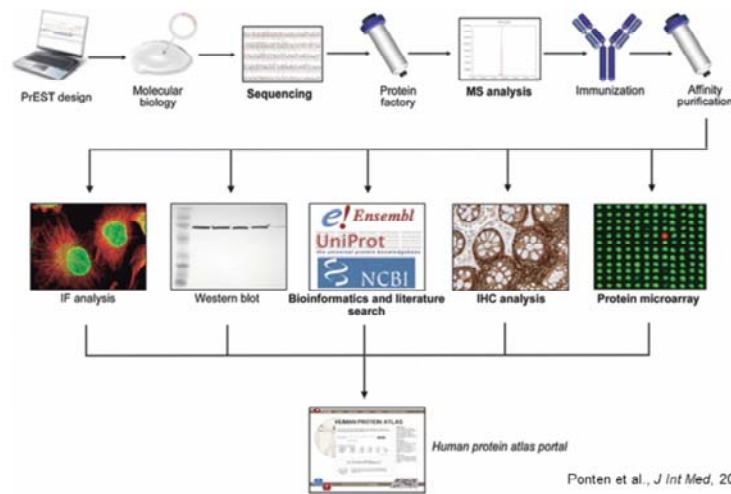
# Expression Maps - RNA



(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



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

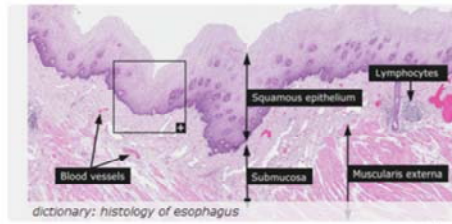
- Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>)

## THE HUMAN PROTEIN ATLAS

ABOUT & HELP

SEARCH ? »

e.g. CD44, ELF3, KLK3, 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](#)

13156 genes with protein expression profiles based on 18707 antibodies.



Knut & Alice Wallenberg Stiftelse

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

MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



VOJTE VZDĚLÁVÁNÍ

Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy  
a státním rozpočtem České republiky

# Expression Maps - Proteins

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

The screenshot displays the Human Protein Atlas interface for a specific protein. It features two main summary panels: 'SUBCELLULAR LOCATION SUMMARY' and 'NORMAL TISSUE & ORGAN SUMMARY'. The subcellular summary includes details on main and additional locations, staining summary, reliability (High), and antibodies used in assays (CAB039238, CAB039239). The normal tissue & organ summary provides an expression overview, tissue specificity (expressed in 11 out of 82 cell types), reliability (High), and antibodies used. A table below lists various organs and the number of cell types where the protein is expressed, accompanied by a bar chart showing the distribution of expression across these organs.

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

# Osnova

- Struktura genů
- Regulace transkripce
- 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
    - Identifikace mutantů se změnou expresního profilu



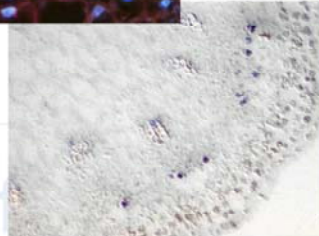
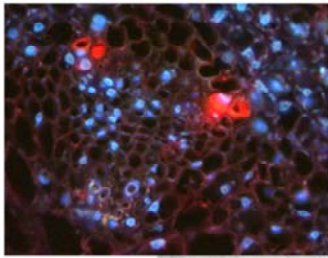
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



# Expresní profil

- Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
  - analýza expresního profilu (vzorce) daného genu a identifikace mutantů se změnou exprese



EVROPSKÁ UNIE

ESF

© Ministerstvo zemědělství České republiky

# Expresní profil

- Identifikace mutantů se změnou expresního profilu

- analýza expresního profilu (vzorce) daného genu a identifikace mutantů se změnou exprese
- možnost částečné automatizace (virtuální digitální mikroskopie)

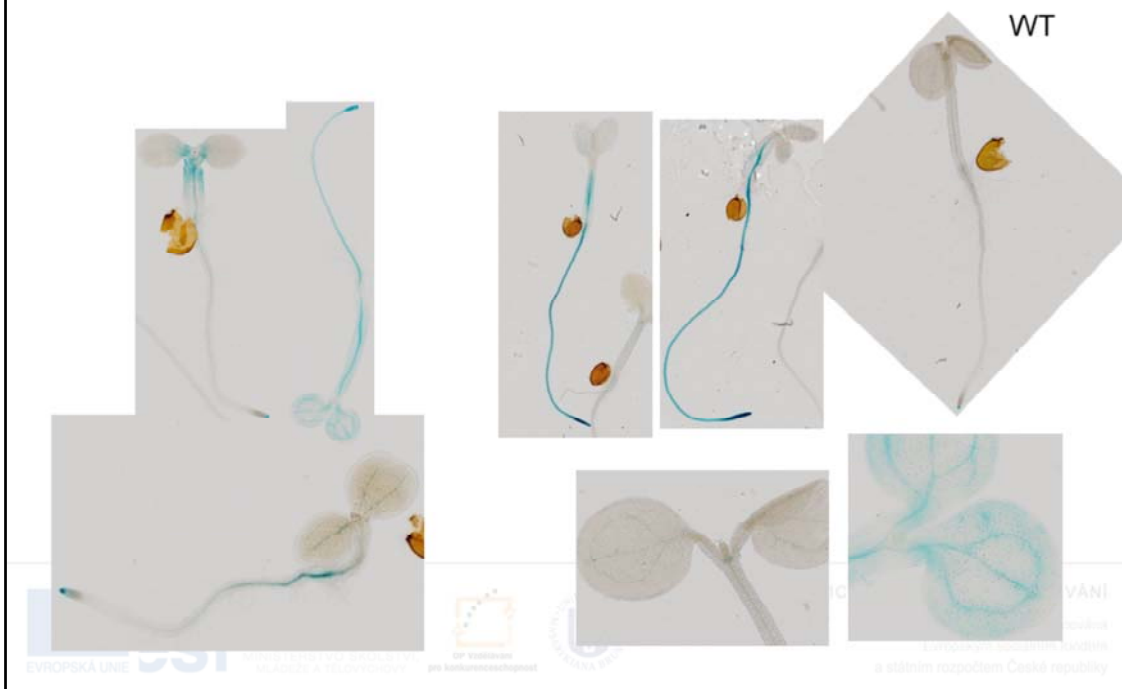


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



Tato prezentace je financována z  
Evropského sociálního fondu  
a státního rozpočtu České republiky

# Expresní profil



# Osnova

- Struktura genů
- Regulace transkripce
- 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
    - Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
  - Kvantitativní analýza genové 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 fotonografické techniky-usnadnění syntézy oligonukleotidů např. pro celý genom člověka (cca 3,1 x 10<sup>9</sup> bp) je touto technikou možno připravit 25-mery v pouhé 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>B. 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, 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

stair

Home | About STAIR | Blogmap | Contact | Help | Order | Login

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

Search

Experiment: Aluminum Stress

Experiment Summary Samples Slides & Datasets Array Design View All

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)	7304	63: Aluminum Stress	technical		7304_Cy3.7305_Cy3	no treatment pool of 3, 8, and 24 hours	Cy3	Download
Aluminum Stress 1 (strong spatial bias)	7304	63: Aluminum Stress	technical		7304_Cy5.7305_Cy5	Aluminum (50 μM AC23) pool of 3, 8, and 24 hours	Cy5	Download
Aluminum Stress 1 (strong spatial bias)	7304	63: Aluminum Stress	technical		7304_Cy5.7305_Cy3	Aluminum (50 μM AC23) pool of 3, 8, and 24 hours	Cy3	Download
Aluminum Stress 2 (strong spatial bias)	7305	64: Aluminum Stress	technical	63	7304_Cy3.7305_Cy3	no treatment pool of 3, 8, and 24 hours	Cy3	Download
Aluminum Stress 2 (strong spatial bias)	7305	64: Aluminum Stress	technical	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 hostitelskou institucí  
Evropské unie financována  
z státních prostředků 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



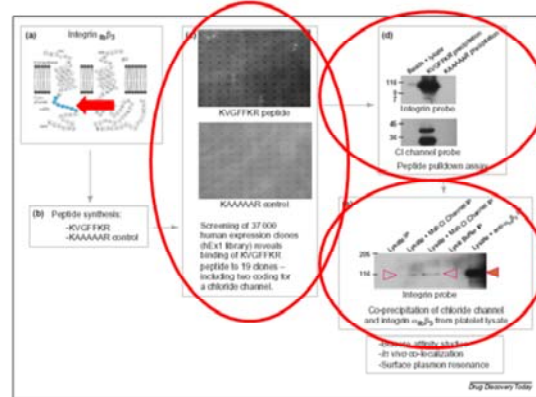
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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 jako fúzního peptidu biotin-KVGF FKR
- 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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



# Osnova

- Struktura genů
- Regulace transkripce
- 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
    - Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
  - Kvantitativní analýza genové exprese
    - DNA a proteinové čipy
    - **Next gen transkripční profilování**

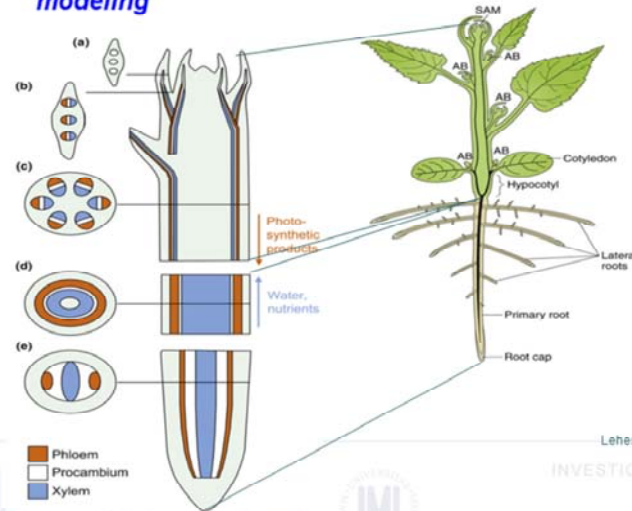


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Molecular Regulatory Networks Modeling

- **Vascular tissue** as a developmental model for **GO analysis** and **MRN modeling**



Lehesranta et al., *Trends in Plant Sci* (2010)



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY  
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost

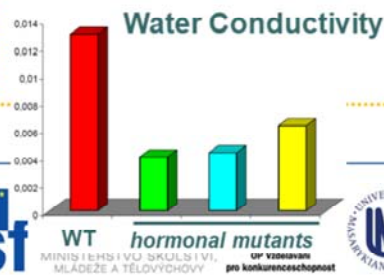
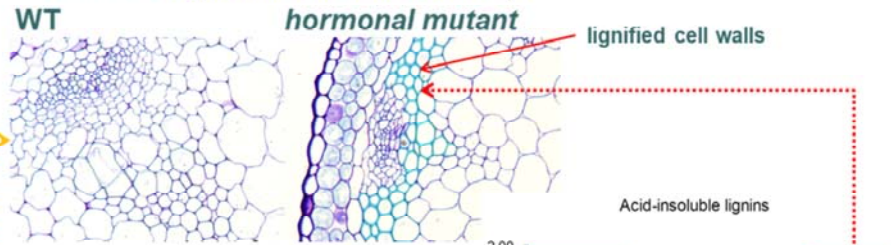


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

# Hormonal Control Over Vascular Tissue Development

- Plant **Hormones Regulate Lignin Deposition** in Plant Cell Walls and **Xylem Water Conductivity**



WT      *hormonal mutants*

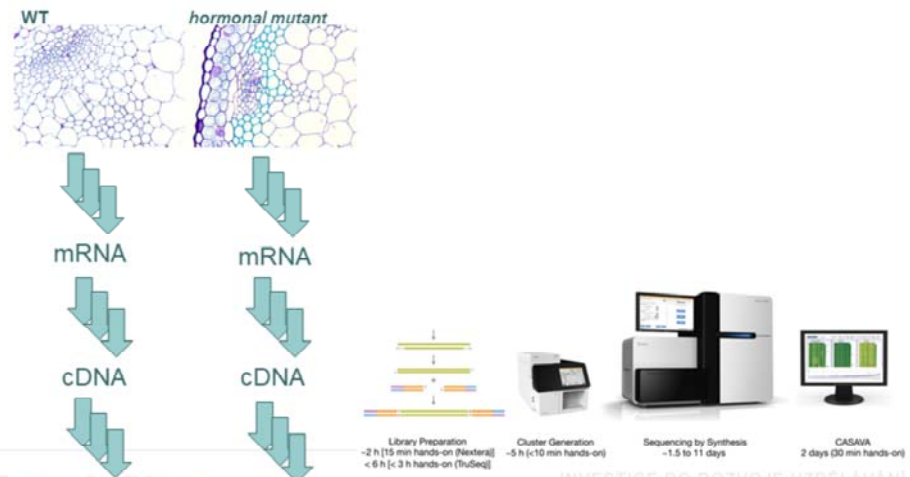
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY  
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



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

# Hormonal Control Over Vascular Tissue Development

## □ *Transcriptional profiling* via *RNA sequencing*



Sequencing by Illumina and  
**number of transcripts** determination



EVROPSKA UNIE  
MLÁDEŽ A TĚLOVÝCHOVA  
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



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**...

Ddil 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	1.79709e+308	1.79709e+308	6.8885e-05	0.00039180	1yes
HRS1	1:4566891-4568708	WT	MT	OK	0	0.696831	1.79709e+308	1.79709e+308	6.61994e-06	0.0005306	yes
ATMLO14	1:9227472-9232296	WT	MT	OK	0	0.5148091	1.79709e+308	1.79709e+308	9.74219e-05	0.0005306	5yes
NRT1.8	1:9400883-9403789	WT	MT	OK	0	0.8778881	1.79709e+308	1.79709e+308	3.2892e-08	0.0005306	yes
AT1G27570	1:9075425-9082370	WT	MT	OK	0	2.08291	1.79709e+308	1.79709e+308	9.70039e-00	0.047e-05	yes
AT1G00085	1:22109735-22102419	WT	MT	OK	0	0.6850851	1.79709e+308	1.79709e+308	9.95901e-08	0.0005306	yes
AT1G03020	1:096205-096515	WT	MT	OK	0	1.788591	1.79709e+308	1.79709e+308	0.00913915	0.0277958	yes
AT1G13009	1:4062720-4063471	WT	MT	OK	0	3.558141	1.79709e+308	1.79709e+308	0.00021683	0.00108079	yes
AT1G21550	1:7553100-7553875	WT	MT	OK	0	0.5820881	1.79709e+308	1.79709e+308	0.00115582	0.00471497	yes
AT1G22120	1:7808308-7809632	WT	MT	OK	0	0.6173541	1.79709e+308	1.79709e+308	2.48392e-06	0.00028514	yes
AT1G31370	1:11238297-11239303	WT	MT	OK	0	1.462541	1.79709e+308	1.79709e+308	4.6323e-05	0.00028514	3yes
APUM10	1:13253387-13255570	WT	MT	OK	0	0.5810311	1.79709e+308	1.79709e+308	7.87855e-06	0.00037473	yes
AT1G48700	1:18010728-18012871	WT	MT	OK	0	0.5565251	1.79709e+308	1.79709e+308	6.53917e-05	0.00037473	6yes
AT1G09077	1:21746208-21833195	WT	MT	OK	0	138.8881	1.79709e+308	1.79709e+308	0.00122789	0.00490810	yes
AT1G00050	1:22121549-22123702	WT	MT	OK	0	0.3700871	1.79709e+308	1.79709e+308	0.00117953	0.0046001	yes
AT4G15242	4:8705786-8706987	WT	MT	OK	0.00930712	17.9056	10.9098	-4.405231	1.00073e-05	7.13963e-05	yes
AT5G33251	5:12496071-12500433	WT	MT	OK	0.0486379	52.2837	10.0349	-9.5119	0	0	yes
AT4G12820	4:7421056-7421738	WT	MT	OK	0.0195111	16.6516	9.88612	-3.500439	9.80217e-05	0.00028904	yes
AT1G00020	1:22100051-22100270	WT	MT	OK	0.0119377	7.18623	9.24011	-7.503020	1.9504e-14	1.4066e-12	yes
AT5G15380	5:4987235-4989182	WT	MT	OK	0.098273	56.4834	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.

# Shrnutí

- Struktura genů
- Regulace transkripce
- 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
    - Identifikace mutantů se změnou expresního profilu
  - Kvantitativní analýza genové 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

# Diskuse



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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