

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
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

- 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
OPERAČNÍ PROGRAM VÝZKUM, VÝVOJ A INOVACE
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND
financováno z rozpočtu Evropské unie
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
 - 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)

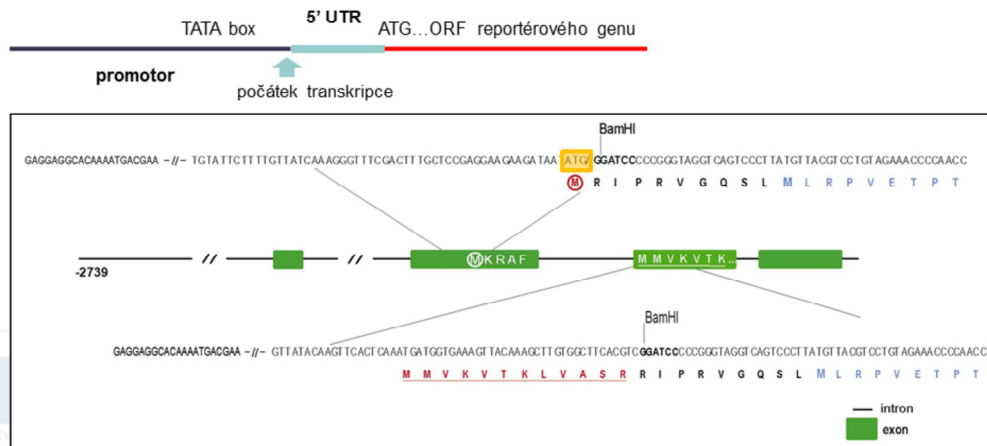


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Transkripční fúze

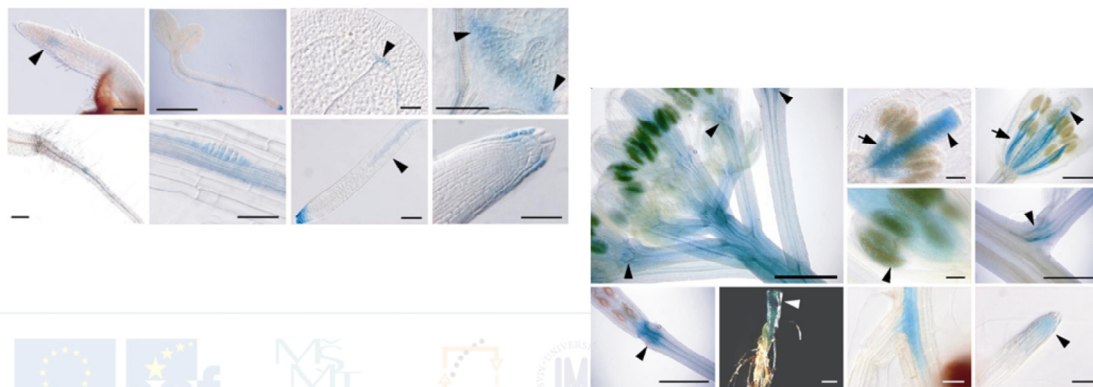
- **Transkripční fúze s promotorovou oblastí**
 - Identifikace a klonování promotorové oblasti genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP)



ELAVÁNÍ
řancována
im fondem
ř republiky

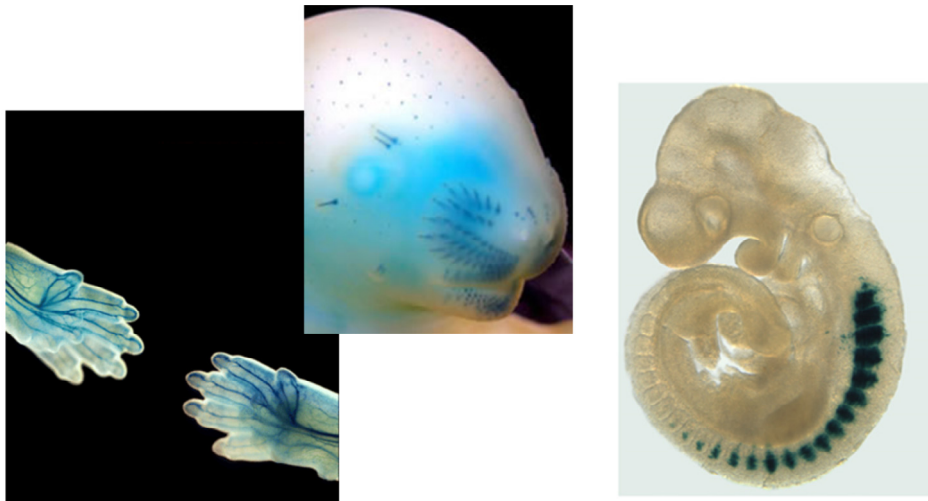
Transkripční fúze

- **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



ZDĚLÁVÁNÍ

polufinancována

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

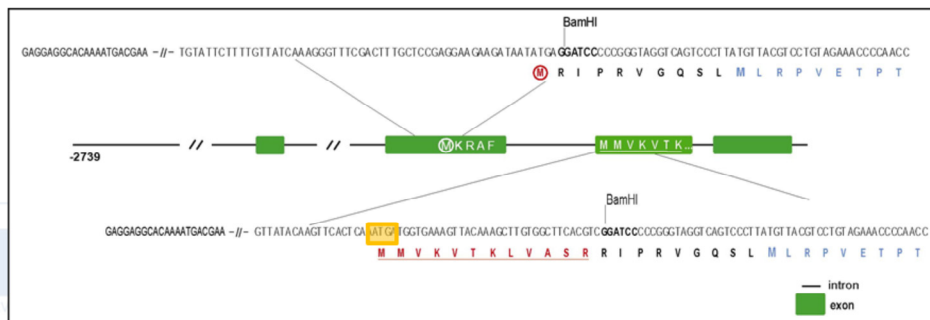
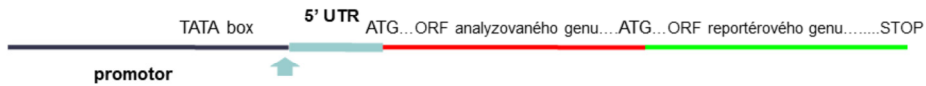


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Translační fúze

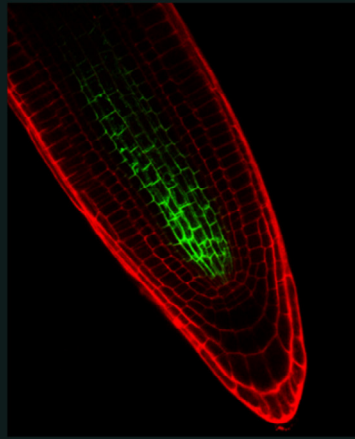
- **Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reportérovým genem**
 - Identifikace a klonování promotorové a kódující oblasti analyzovaného genu
 - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a kódující sekvenci studovaného genu ve fúzi s reportérovým genem (uidA, GFP)



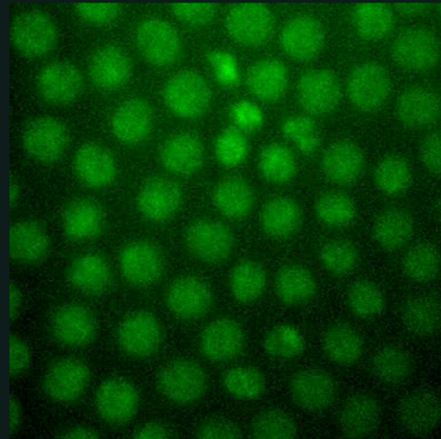
EVZDĚLÁVÁNÍ
je spolufinancováno
státním sociálním fondem
České republiky

Translační fúze

- **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



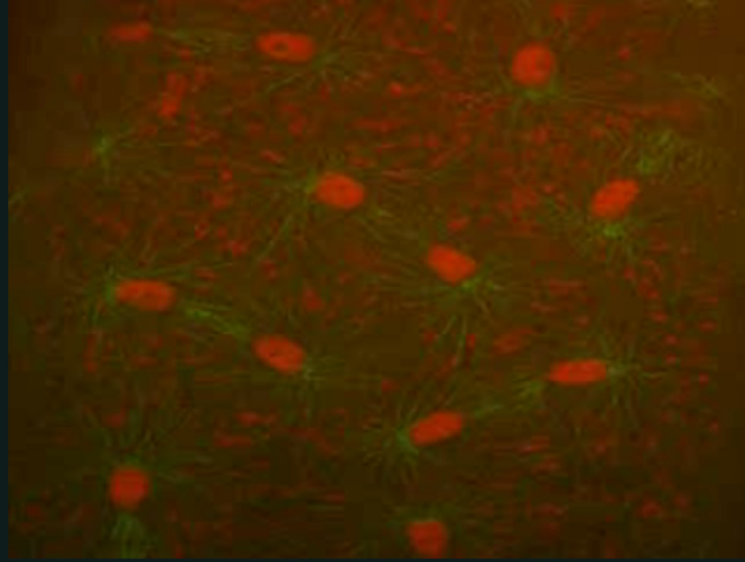
PIN1-GFP in *Arabidopsis*



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

Translační fúze

- 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

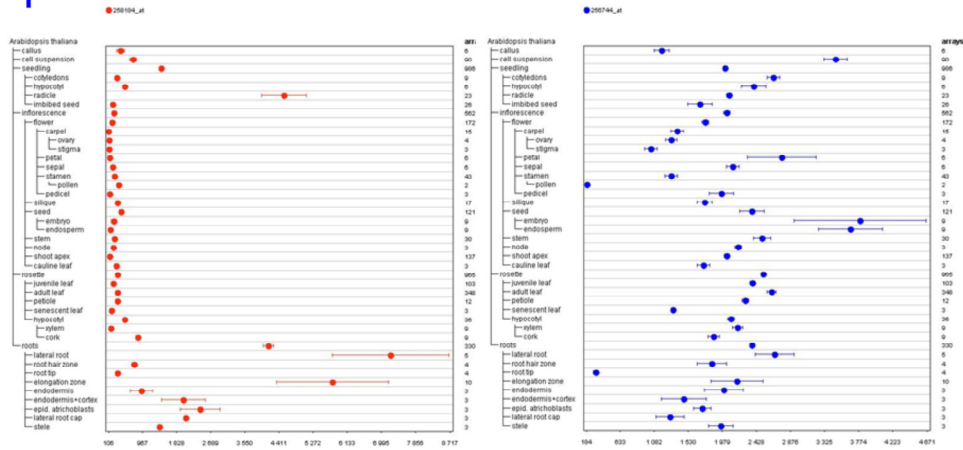


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Databáze

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

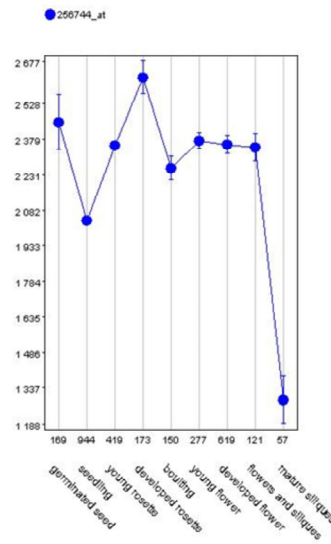
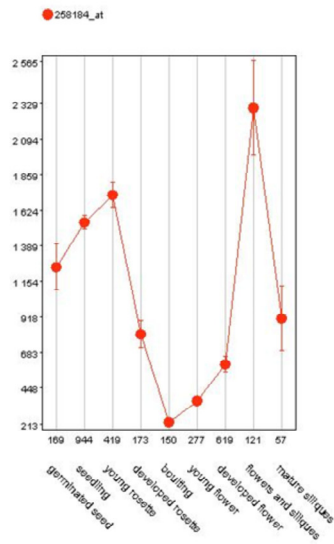


INVESTICE DO ROZVOJE VZDELAVÁNÍ

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

Databáze

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



EVROPSKA UNIE

EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND
EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND

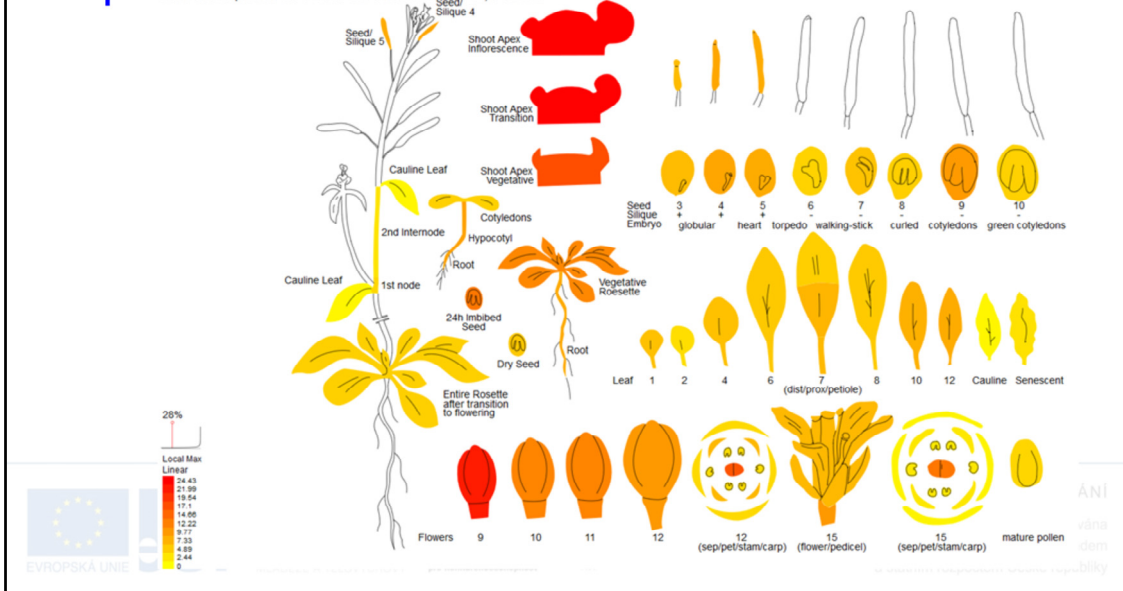
ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

o prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a národním rozpočtem České republiky

Databáze

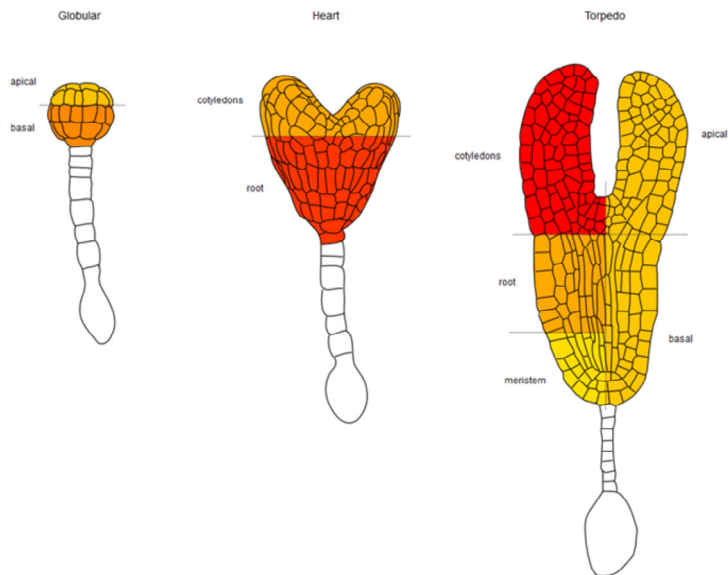
Analýza exprese pomocí ePlant

AtGenExpress eFP: AT1G13330 / AHP2, HOP2



Databáze

□ Analýza exprese pomocí ePlant



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ, MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost



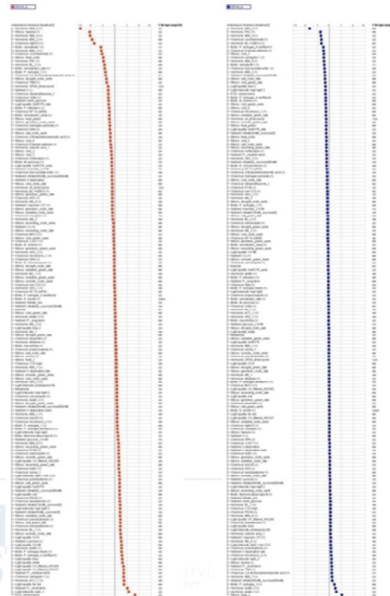
ZDĚLÁVÁNÍ

polufinancováno
ociálním fondem

a státním rozpočtem České republiky

Databáze

- **Analýza exprese pomocí Genevestigator (AHP1 a AHP2, Arabidopsis, AffymetrixATH 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**

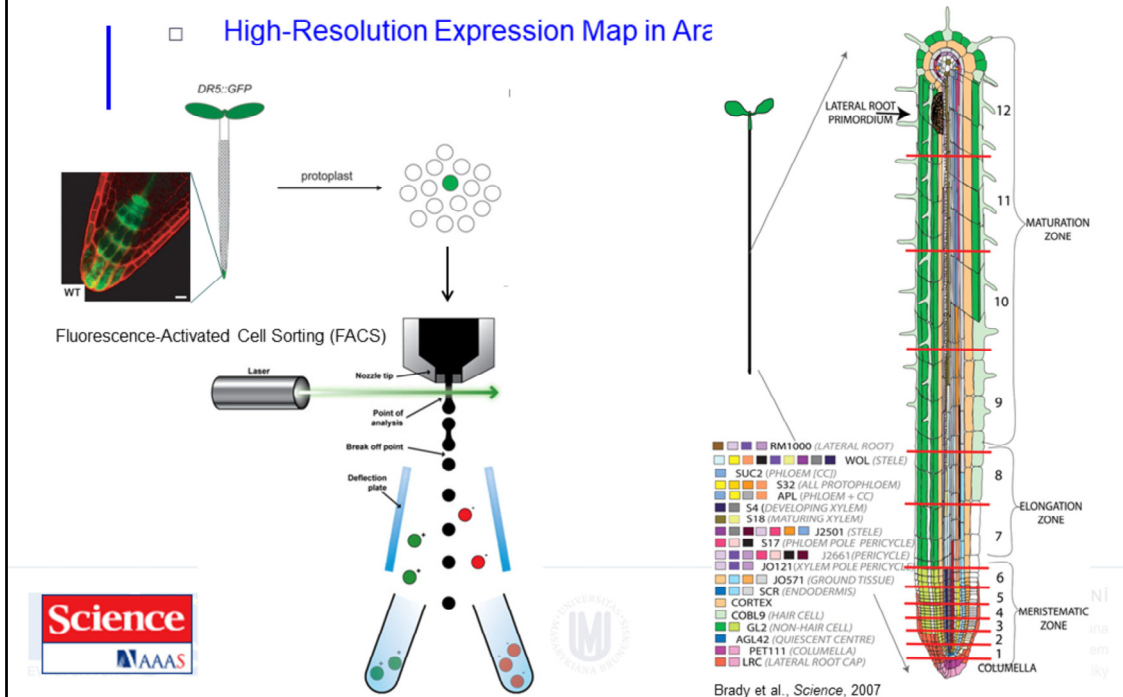


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Expression Maps - RNA

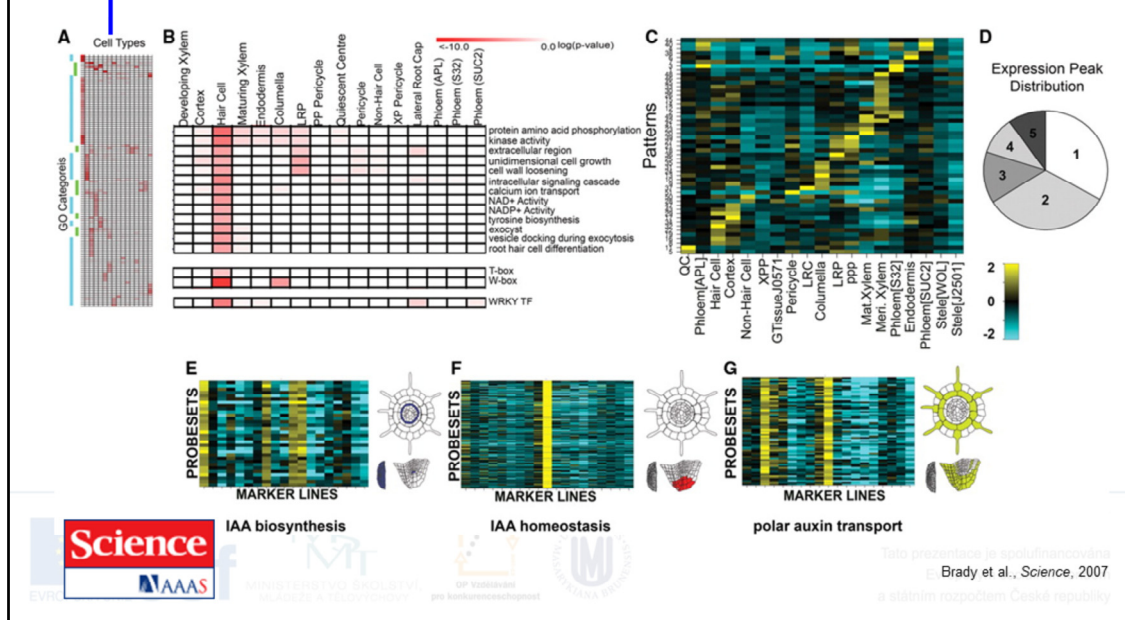
High-Resolution Expression Map in *Arabidopsis*



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.

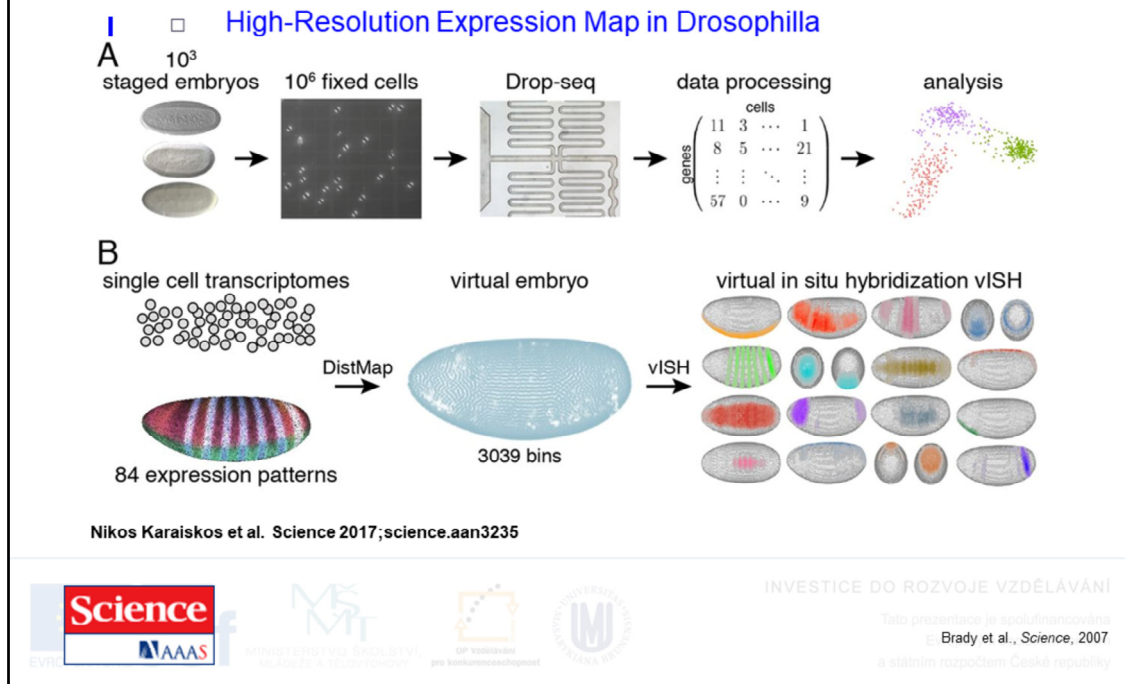
Expression Maps - RNA

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



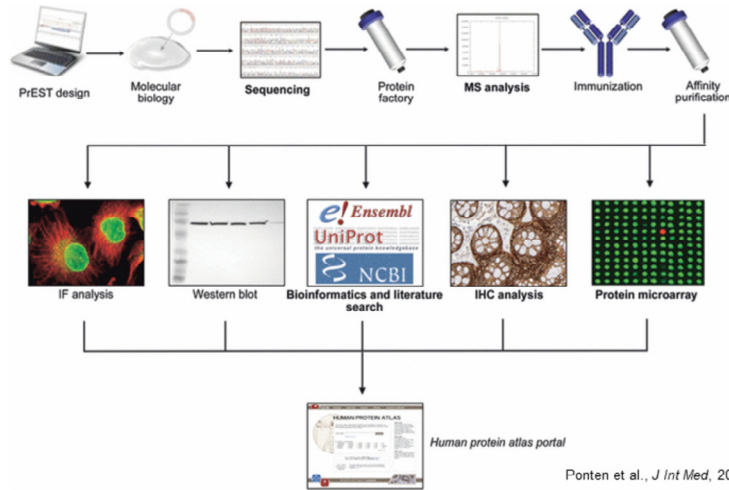
Deconstructing and reconstructing the embryo by single-cell transcriptomics combined with spatial mapping.

(A) Single-cell sequencing of the *Drosophila* embryo: ~1000 handpicked stage 6 fly embryos are dissociated per Drop-seq replicate, cells are fixed and counted, single cells are combined with barcoded capture beads, and libraries are prepared and sequenced. Finally, single-cell transcriptomes are deconvolved, resulting in a digital gene expression matrix for further analysis.

(B) Mapping cells back to the embryo: Single-cell transcriptomes are correlated with high-resolution gene expression patterns across 84 marker genes, cells are mapped to positions within a virtual embryo, and expression patterns are computed by combining the mapping probabilities with the expression levels (virtual in situ hybridization).

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

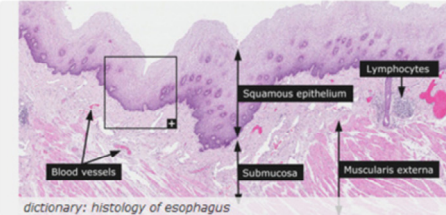
- Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>)

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](#)

15156 genes with protein expression profiles based on **18707** antibodies.

dictionary: histology of esophagus



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



VOJJE VZDĚLÁVÁNÍ

stace je spolufinancována
... stápným sociálním fondem
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 and several images.

SUBCELLULAR LOCATION SUMMARY

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

NORMAL TISSUE & ORGAN SUMMARY

Expression 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	██████████

The interface also includes a fluorescence microscopy image (top left) showing green nuclear staining in red-stained cells, and a histology image (middle) showing brown immunohistochemical staining in tissue sections. A logo for the European Union (EVROPSKA UNIE) is visible in the bottom left corner.

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 $3,1 \times 10^9$ 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 μ m
Oligonucleotide probe length	25-mer
Probe pairs/sequence	11
Control sequences	<i>E. coli</i> genes <i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>B. subtilis</i> gene <i>lysA</i> , Phage P1 <i>cm</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 čípech se stejným vzorkem, vnesení 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 vnesení experimentu proti kontrole nebo různých podmínek proti sobě – vlastní výsledek

Expression of 195M677 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 & name)	Replicate type	Reverse replicate	Sample	Experimental variables	Label	Get Data
Hoekengas7 Aluminum Stress 1 (strong spatial bias)	AFGC 7304	63: Aluminum Stress	technical		7304_Cy3.7305_Cy3	no treatment pool of 3, 8, and 24 hours	Cy3	Download
					7304_Cy5.7305_Cy5	Aluminum (50 μM AlCl ₃) pool of 3, 8, and 24 hours	Cy5	Download
Hoekengas5 Aluminum Stress 2 (strong spatial bias)	AFGC 7305	64: Aluminum Stress	technical	63	7304_Cy3.7305_Cy3	Aluminum (50 μM AlCl ₃) pool of 3, 8, and 24 hours	Cy3	Download
					7304_Cy5.7305_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

Če 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



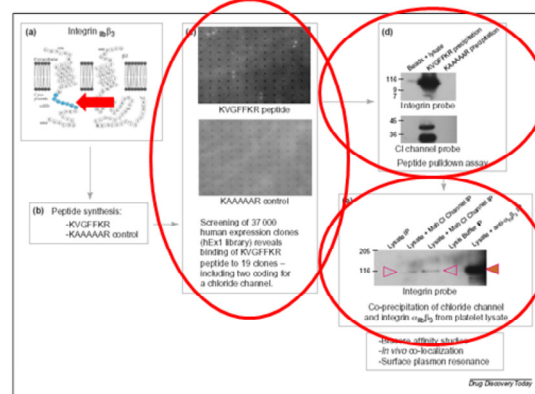
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

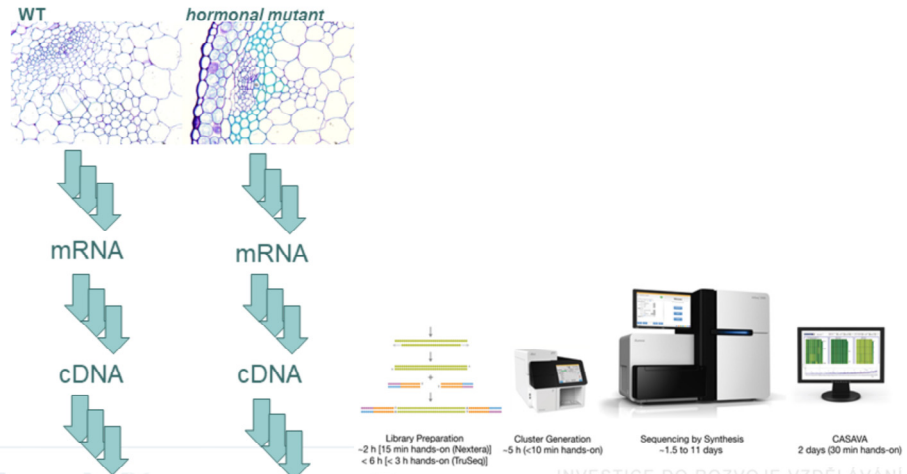


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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



EVROPSKA UNIE
Mládež a tělovýchova
OP Vzdělávání pro konkurenceschopnost
UNIVERSITY OF PRAHA



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**...

Ddili 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	1.18041.79769e+308		1.73769e+308	6.88885e-05	0.00039180	1 yes
HRS1	1:4566891-4568708	WT	MT	OK	0	0.6966831.79769e+308		1.73769e+308	6.61994e-06	4.67708e-05	yes
ATMLO14	1:9227472-9232296	WT	MT	OK	0	0.5148091.79769e+308		1.73769e+308	9.74219e-05	0.00053505	6 yes
NRT1.6	1:9400883-9403789	WT	MT	OK	0	0.8778861.79769e+308		1.73769e+308	3.2892e-08	3.50131e-07	yes
AT1G27070	1:9075425-9082370	WT	MT	OK	0	2.06291.79769e+308		1.73769e+308	9.70039e-00	0.047e-05	yes
AT1G60095	1:22159735-22102419	WT	MT	OK	0	0.6885881.79769e+308		1.73769e+308	9.95901e-08	9.84982e-07	yes
AT1G93020	1:696200-998515	WT	MT	OK	0	1.788591.79769e+308		1.73769e+308	0.00913915	0.0277958	yes
AT1G13009	1:4062720-4063471	WT	MT	OK	0	3.556141.79769e+308		1.73769e+308	0.00021683	0.00108079	yes
AT1G21550	1:7553100-7553876	WT	MT	OK	0	0.5829881.79769e+308		1.73769e+308	0.00115582	0.00471497	yes
AT1G22120	1:7808308-7809632	WT	MT	OK	0	0.6173541.79769e+308		1.73769e+308	2.48392e-06	1.91089e-05	yes
AT1G31370	1:11238297-11239393	WT	MT	OK	0	1.462541.79769e+308		1.73769e+308	4.83523e-05	0.00028514	3 yes
APUM10	1:13253387-13255570	WT	MT	OK	0	0.5810311.79769e+308		1.73769e+308	7.87855e-06	5.46803e-05	yes
AT1G48700	1:18010728-18012871	WT	MT	OK	0	0.5565251.79769e+308		1.73769e+308	6.53917e-05	0.00037473	6 yes
AT1G59077	1:21748208-21833195	WT	MT	OK	0	138.8881.79769e+308		1.73769e+308	0.00122789	0.00498810	yes
AT1G60050	1:22121549-22123702	WT	MT	OK	0	0.3700871.79769e+308		1.73769e+308	0.00117953	0.00480001	yes
AT4G15242	4:8705786-8708997	WT	MT	OK	0.00930712	17.9056	10.9098	-4.405231.05673e-05	7.13983e-05	yes	
AT5G33251	5:12496071-12500433	WT	MT	OK	0.0496375	52.2837	10.0349	-9.8119	0	0 yes	
AT4G12820	4:7421055-7421738	WT	MT	OK	0.0195111	16.6516	8.88812	-3.900439.80217e-05	0.000528904	yes	
AT1G60020	1:22100851-22105276	WT	MT	OK	0.0116377	7.16623	9.24811	-7.503628.19504e-14	1.4088e-12	yes	
AT5G15380	5:4987235-4989182	WT	MT	OK	0.0986273	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.

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
 - T-DNA aktivační mutagenese



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Gain-of-Function Approaches

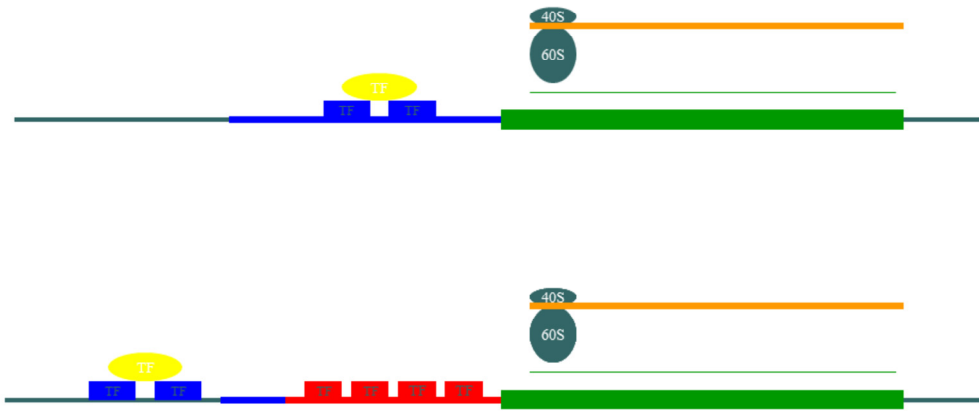
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese
 - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inserce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
 - prvním krokem je příprava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

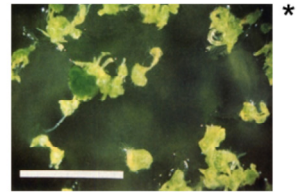


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

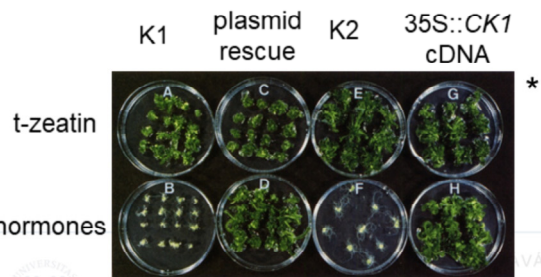
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Izolace genu *CKI1*

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



- mutantní fenotyp je fenokopíí exogenní aplikace cytokininů (*CK1*, C*Y*TOKININ *INDEPENDENT 1*)



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
 - 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



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

Regulated Expression Systems

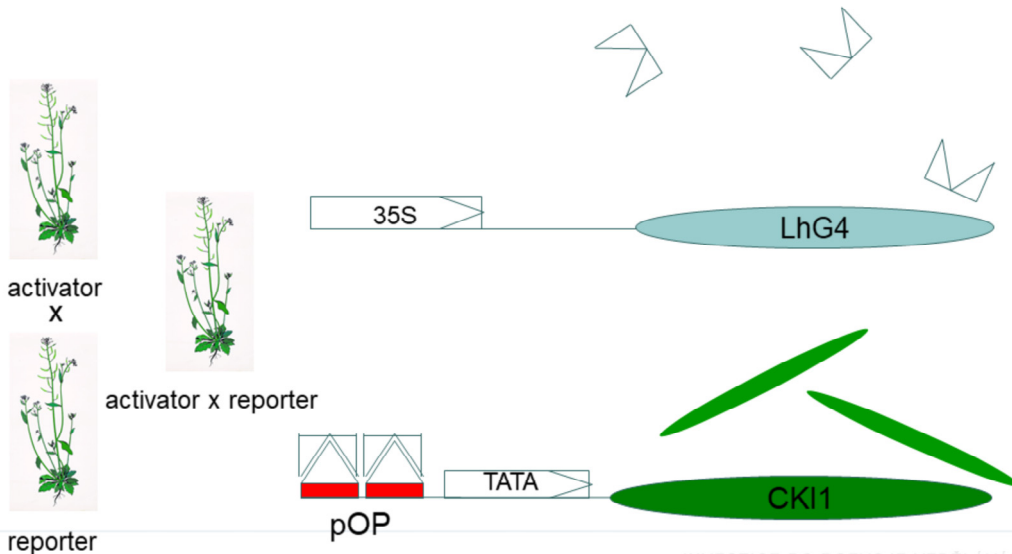
- Systémy regulovatelné genové exprese
 - umožňují časovou nebo místně specifickou regulaci genové exprese, vedoucí ke změně fenotypu a tím identifikaci přirozené funkce genu
 - pOP systém



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

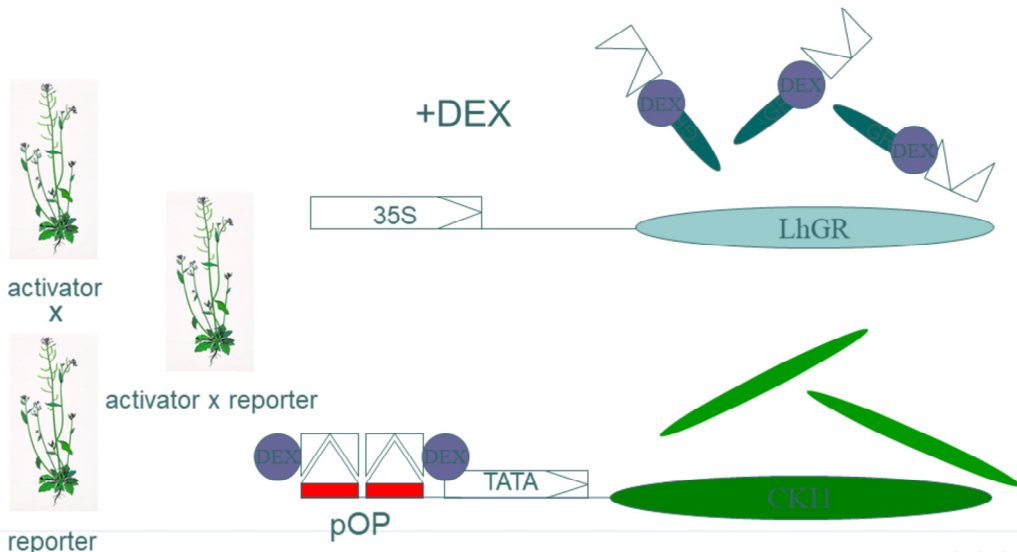
Regulated Expression Systems



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

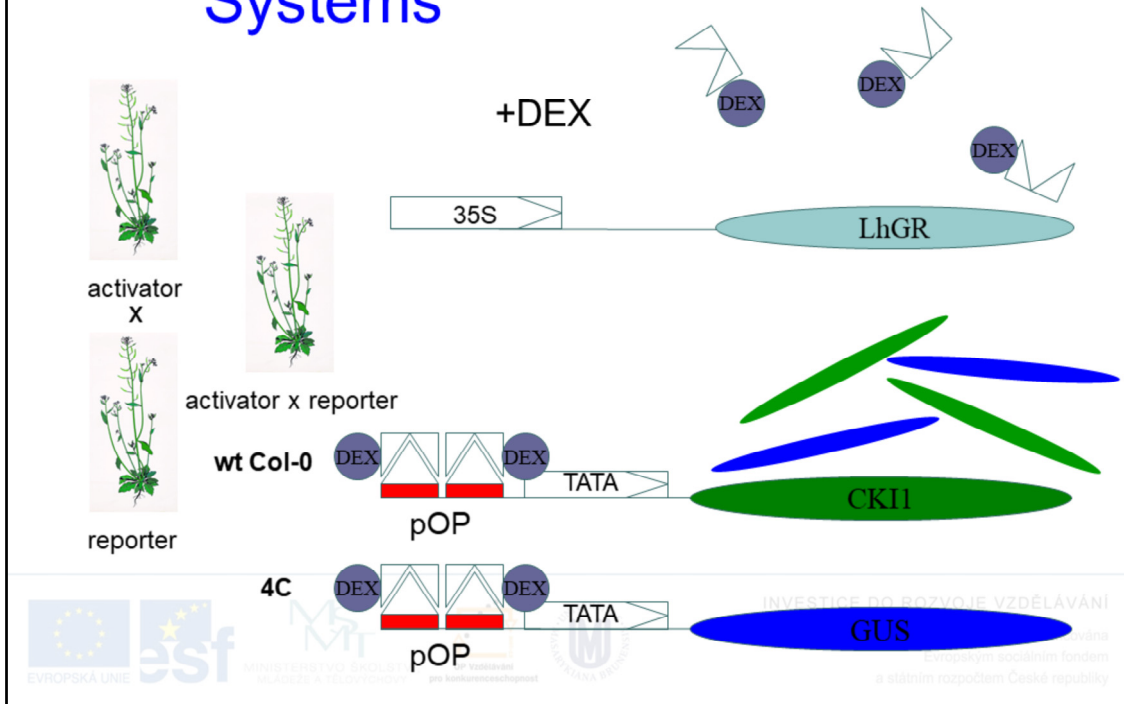
Regulated Expression Systems



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

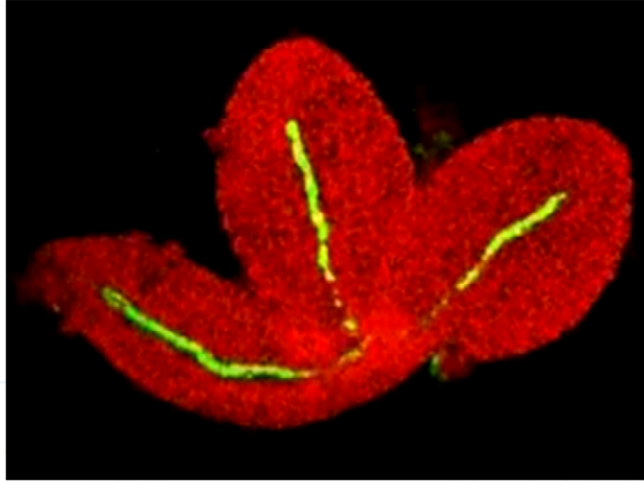
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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

pro konkurenceschopnost

a lidským rozvojem 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
 - 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 **50.000/120.417** záznamů v databázi PubMed (16.10. 2008/15.11. 2018, nárůst >240%)

The screenshot shows a PubMed search interface for the term 'chemical genetics'. The search results are sorted by 'Most Recent' and show a list of articles. The first article is 'Analysis of butterfly reproductive proteins using capillary electrophoresis and mass spectrometry' by Ruckwold MK, Rosen JL, Wilson C, Bremer A, and Andrich B, published in 2018. Other articles include 'K562 Suppression-Induced Degradation of MYC is Antagonized by a MEX5-ERK5 Compensatory Mechanism' and 'Whole genome screen reveals a novel relationship between Tobaccos levels and Drosophila host response'. The interface includes filters for article types, publication dates, and species. The bottom of the image features logos for 'EVROPSKA UNIE' and 'EVROPSKÝ SOCIÁLNÍ FOND'.

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 **cilový 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

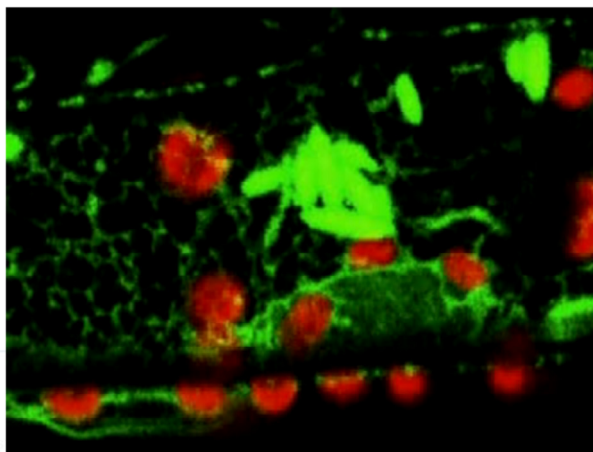


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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)

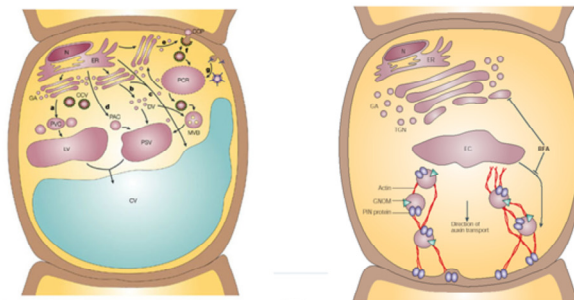


ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
státním rozpočtem České republiky

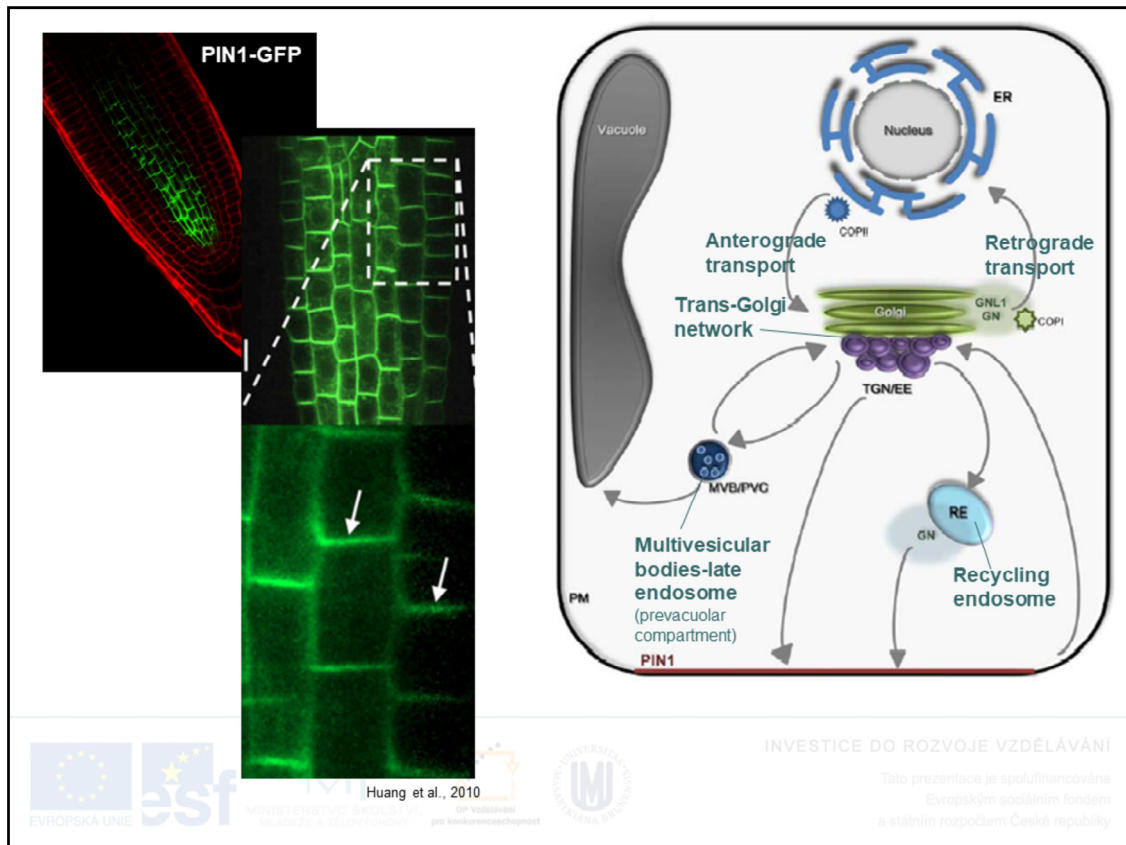
Chemical Genetics

- 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)
 - 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).

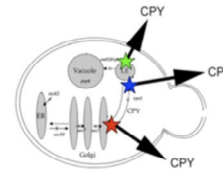
Plasma membrane proteins like the auxin efflux carrier PIN1 (red), which accumulates at the basal PM at steady state, are continually internalised and trafficked to the TGN, which resembles the early endosome (EE) in plants.

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.

Chemical Genetics

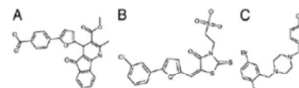
Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupů chemické genetiky

- 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

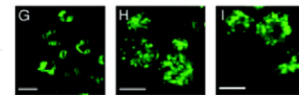
chemická struktura sortinů



Imunodetekce karboxipeptidázy



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



ELÁVANI

Tato prezentace je spolufinancována Zouhar et al., 2004 ním fondem a státním rozpočtem České republiky



Chemical Genetics

Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupů chemické genetiky

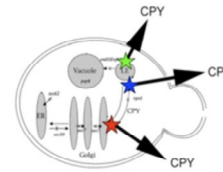
- pomocí vyhledávání v „knihovně“ chemických látek byly identifikovány takové, které vedou u kvasinek (*S. cerevisiae*) k sekreci enzymu (karboxipeptidázy Y), která je normálně transportována pomocí endomembránového transportu do vakuoly

- analýza změny sekrece pomocí dot-blotu a imunodetekce karboxipeptidázy Y v kulturačním médiu pomocí monoklonálních protilátek

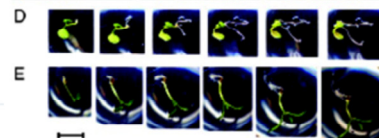
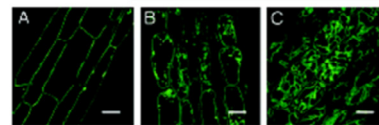
- identifikované látky („sortiny“) byly schopny vyvolat obdobné změny i u *Arabidopsis* - konzervované mechanismy transportu u kvasinek i u rostlin

- 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

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

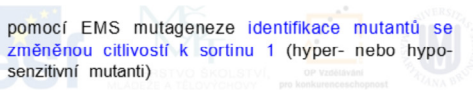


tvár rostlinných vakuol pomocí EGFP:-TIP



fenotyp semenáčků v přítomnosti sortinů

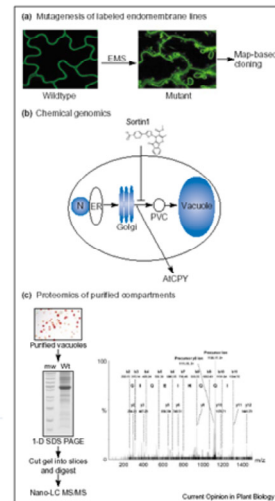
Zouhar et al., 2004
 financováno z Evropského fondu pro regionální rozvoj a státním rozpočtem České republiky



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**



OP ZDĚLÁVÁNÍ
spolufinancována
sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Shrnutí

- 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
 - 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

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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