



MiniSimpozij 2015

**PROTEINSKE PORE,
SEKVENCIranJE IN BIOINFORMATIKA**

5.11.2015

Ljubljana

**Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo L-11
Kemijski inštitut**





MiniSimpozij 2015

**PROTEINSKE PORE,
SEKVENCIRANJE IN BIOINFORMATIKA**

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

577.2(082)

PROTEINSKE pore, sekvenciranje in bioinformatika : mini simpozij 2015, 5. 11. 2015 Ljubljana / [organizira] Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo, Kemijski inštitut Ljubljana ; [urednika Gregor Anderluh in Nada Kraševac]. - Ljubljana : Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo, Kemijski inštitut, 2015

ISBN 978-961-6104-29-6

1. Anderluh, Gregor, 1969- 2. Kemijski inštitut (Ljubljana). Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo
281867776

4. MiniSimpozij 2015 PROTEINSKE PORE, SEKVENCIRANJE IN BIOINFORMATIKA

Organizira

Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo,
Kemijski inštitut Ljubljana

Urednika

Gregor Anderluh in Nada Kraševac

Tehnična urednika

Matic Kisovec in Nada Kraševac

Izdal

Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo,
Kemijski inštitut Ljubljana

Tisk

Infokart

Ljubljana, 2015



Vsebina

| | |
|---|----------|
| Program | 4 |
| Predgovor | 5 |
| Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo | 6 |
| Povzetki kratkih predavanj | 7 |



Program

| | | |
|-------------|-----------------|--|
| 12.00-12.10 | Gregor Anderluh | Uvodne besede |
| 12.10-12.30 | Denis Kutnjak | Uporaba sekvenciranja naslednje generacije v virologiji |
| 12.30-12.50 | Nace Kranjc | Ugotavljanje specifičnosti vezave perfringolizina O na lipidne membrane s pomočjo sekvenciranja z nanoporo |
| 12.50-13.10 | Nataša Toplak | Naslednja generacija sekveniranja - Ion Torrent tehnologija in 16S rRNA metagenomika |
| 13.10-13.30 | Jernej Jakše | Določanje nukleotidnih zaporedij majhnih nekodirajočih RNA in njihova uporaba v genomiki |
| 13.30-13.50 | Nataša Štajner | Odkrivanje velikega števila molekularnih markerjev pri rastlinah na osnovi genotipizacije s sekvenciranjem |
| 13.50-14.10 | Uroš Petrovič | Pasti identifikacije vzročnih genov poligenских lastnosti |
| 14.10-14.30 | Janja Zajc | Kvasovke rodu <i>Aureobasidium</i> : prednosti določanja genomskih zaporedij sorodnih vrst |
| 14.30-14.50 | Cene Gostinčar | Določitev nukleotidnega zaporedja glive s podvojenim genomom – primer črne kvasovke <i>Hortaea werneckii</i> |
| 14.50-15.10 | | Odmor |
| 15.10-15.30 | Sabina Berne | Problem shranjevanja, upravljanja in analize podatkov iz visokozmogljivostnih tehnologij |
| 15.30-15.50 | Klemen Hrovat | komExpress: Interaktivna spletna aplikacija za raziskovanje transkriptomskih podatkov |
| 15.50-16.10 | Kristina Gruden | RNA-Seq za študij interakcij med rastlino in škodljivci na molekularnem nivoju |
| 16.10-16.30 | Simon Koren | Primer uporabe AmpliSeq tehnike za določanje sprememb v tarčnih delih genoma in analiza njihovega vpliva na proteinskem nivoju |
| 16.30-16.50 | Ida Djurdjevič | Sekvenciranje transkriptoma pigmentnih celic kot orodje za odkrivanje molekularnih mehanizmov marmoriranega vzorca na koži soške postrvi |
| 16.50-17.10 | Jernej Ogorevc | Transkriptom celic epitelija mlečne žleze kože po okužbi z <i>Mycoplasma agalactiae</i> |
| 17.10-17.30 | Jernej Kovač | Genetski presejalni testi s tehnologijo NGS in skrb za javno zdravje: Slovenske izkušnje s hiperholesterolemijo |
| 17.30-17.50 | Tomaž Curk | Detekcija interakcij protein-RNA z metodo iCLIP |
| 17.50-18.00 | Nada Kraševc | Zaključne besede |

Predgovor

Spoštovani,

Dobrodošli, sedaj že lahko rečemo, na tradicionalnem 4. MiniSimpoziju, ki ga organizira naš laboratorij. Teme, o katerih želimo govoriti na teh dogodkih, so teme vezane na usmeritve našega laboratorija in za katere hkrati upamo, da obrodijo morebitno sodelovanje z vami. Za letos smo si izbrali naslov: Proteinske pore, sekvenciranje in bioinformatika. K izbiri letošnje tematike nas je nenazadnje navedlo tudi naše uspešno sodelovanje s podjetjem Oxford Nanopores, v katerem uspešno združujemo delo na proteinih, ki tvorijo pore in sekvenciranje.

Namen simpozija je izmenjati izkušnje, ki jih imamo z različnimi modernimi pristopi določanja nukleotidnih zaporedij in njihovo analizo v slovenskem prostoru. Zanimajo nas izzivi, s katerimi ste se ubadali in metode uspešno rešenih primerov. Poslušali bom šestnajst krajših (15 - 20 min) predavanj v slovenskem jeziku.

Želimo vam prijetno poslušanje v upanju, da se vam porodi čim več rešitev za vsakdanje izzive, ki vam jih ponuja delo z množicami nukleotidnih zaporedij.

dr. Nada Kraševc

prof. dr. Gregor Anderluh

Pretekli dogodki:

1. MiniSimpozij 2012

PLANT-PATHOGEN INTERACTIONS

Velika predavalnica, Kemijski inštitut, Ljubljana, 16. 2. 2012

<http://www.ki.si/vede-o-zivljenju/l11-laboratorij-za-molekularno-biologijo-in-nanobiotehnologijo/dogodki/mini-simpozij-ljubljana-2012/>

2. MiniSimpozij 2013

INTERAKCIJE MED PROTEINI IN MEMBRANAMI

Morska biološka postaja, Piran, 6. 9. 2013

[\(http://www.ki.si/vede-o-zivljenju/l11-laboratorij-za-molekularno-biologijo-in-nanobiotehnologijo/mini-simpozij-piran-2013/\)](http://www.ki.si/vede-o-zivljenju/l11-laboratorij-za-molekularno-biologijo-in-nanobiotehnologijo/mini-simpozij-piran-2013/)

3. MiniSimpozij 2014

MOLEKULSKE INTERAKCIJE in

Deset let Infrastrukturnega centra za raziskave molekulskih interakcij

Predavalnica A4, Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

3. 12. 2014

[\(http://www.ki.si/vede-o-zivljenju/l11-laboratorij-za-molekularno-biologijo-in-nanobiotehnologijo/mini-simpozij-ljubljana-2014/\)](http://www.ki.si/vede-o-zivljenju/l11-laboratorij-za-molekularno-biologijo-in-nanobiotehnologijo/mini-simpozij-ljubljana-2014/)

Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo L-11

Izvajamo vrhunske raziskave bioloških procesov s poudarkom na razumevanju delovanja proteinov in molekulskih interakcij. Ustvarjamo nova temeljna znanja in uvajamo moderne metodologije na področju ved o življenju. Razvijamo aplikacije za reševanje aktualnih problemov na področju farmacije in biotehnologije, s poudarkom na razvoju bioloških zdravil. Oddelek vodi prof. dr. Gregor Anderluh.





Povzetki kratkih predavanj

Uporaba sekvenciranja naslednje generacije v virologiji

Denis Kutnjak^{1,2}, Ion Gutierrez-Aguirre¹, Maja Ravnikar¹

denis.kutnjak@nib.si

¹ Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

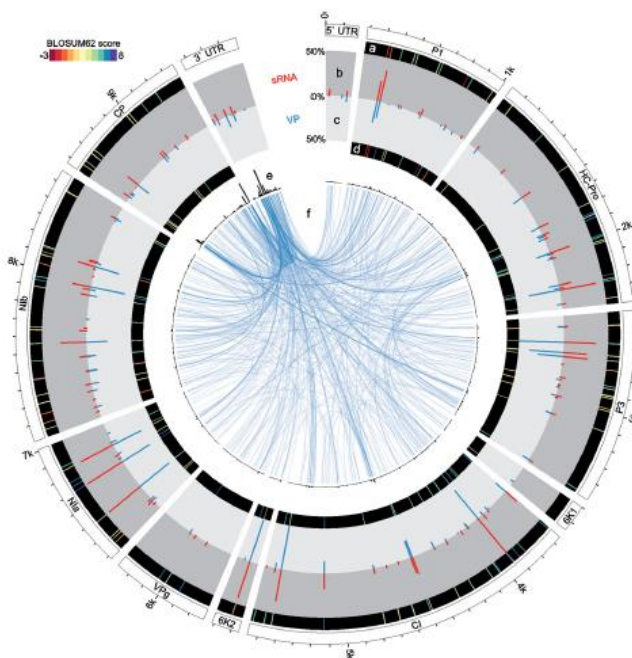
² Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana, Ljubljana

Sekvenciranje naslednje generacije (NGS) je v zadnjih letih omogočilo velik preboj na področju virologije. Predstavlja netarčno visoko zmogljivo metodo za študije nukleotidnih zaporedij virusov in s tem odpira še pred kratkim nepredstavljive možnosti za odkrivanje novih virusov in študije njihove raznolikosti. Pri tem eno izmed največjih preprek predstavlja nizka koncentracija virusnih nukleinskih kislin v ozadju gostiteljevih, zato je priprava vzorcev z namenom obogatitve virusnih nukleinskih kislin bistvenega pomena. To težavo smo uspešno rešili z novimi metodološkimi pristopi, ki se razlikujejo glede na vzorec: od uporabe koncentriranja virusov do sekvenciranja malih RNA. V predavanju bo na primerih iz našega raziskovalnega dela predstavljena uporaba NGS za odkrivanje novih genotipov virusov [1,2], primerjava metod za podroben študij raznolikosti virusnih populacij znotraj gostitelja [3] in uporaba NGS za virusno okoljsko metagenomiko. V zadnjem delu predavanja bodo na kratko predstavljeni tudi naši prvi koraki s tehnologijo sekvenciranja z nanoporami na napravi Minlon.

[1] Steyer A *et al.* (2013) *Journal of clinical microbiology* 51(11): 3818-3825.

[2] Kutnjak D *et al.* (2014) *Virus Research* 191: 45-50.

[3] Kutnjak D *et al.* (2015) *Journal of virology* 89(9):4760-4769.



Slika je povzeta iz [3].

Ugotavljanje specifičnosti vezave perfringolizina O na lipidne membrane s pomočjo sekvenciranja z nano poro.

Nace Kranjc¹, Neža Omerza¹, Aleksandra Šakanović¹, Gregor Anderluh¹

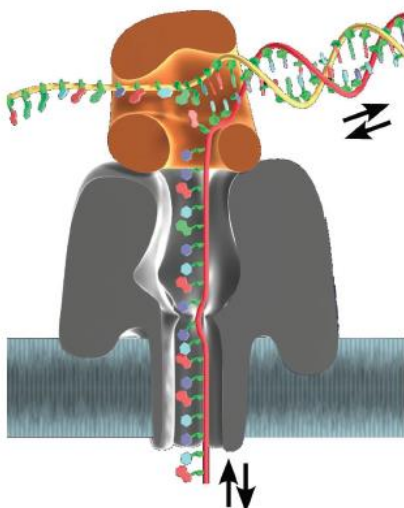
nace.kranjc@gmail.com

¹ Kemijski inštitut, Ljubljana

Perfringolizin O spada v družino od holesterola odvisnih citolizinov (CDC) in tvori pore v membrani celice. CDC so proteini, sestavljeni iz štirih domen. Na membrano se specifično vežejo z najbolj ohranjeno 4. domeno. Specifičnost vezave lahko preučujemo s predstavitvijo knjižnice različnih variant 4. domene na ribosomih. Različna zaporedja, ki omogočijo specifično vezavo na membrano, smo analizirali z določanjem nukleotidnega zaporedja z napravo MinION. Metoda temelji na principu prehajanja enoverižne DNA molekule skozi nano poro v membrani. Pri tem prehajanju lahko določimo nukleotidno zaporedje DNA molekule [1].

V predavanju bodo izpostavljene prednosti in slabosti metode ter predstavitev analize pridobljenih sekvenčnih podatkov na primeru 4. domene perfringolizina O, ki so bili uporabljeni tudi za magistrsko nalogo v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu.

[1] Schneider G. F., Dekker C. (2012) DNA sequencing with nanopores. *Nature biotechnology*, 30(4):326-328.



Slika je povzeta iz [1].

Naslednja generacija sekveniranja - Ion Torrent tehnologija in 16S rRNA metagenomika

Nataša Toplak¹, Simon Koren¹, Minka Kovač¹

natasa.toplak@omega.si

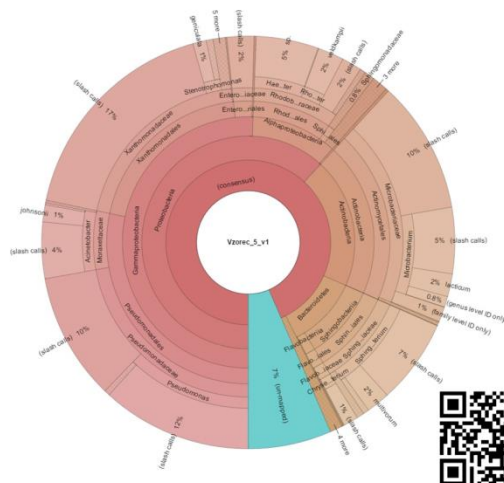
¹ Omega d.o.o., Dolinškova 8, 1000 Ljubljana

Metagenomika raziskuje genski material vseh organizmov, prisotnih v nekem ekosistemu, s pomočjo sodobnih genetskih tehnik. Gre za proučevanje mikroorganizmov neposredno v njihovih naravnih okoljih, brez potrebe po izolaciji in laboratorijskemu gojenju posameznih vrst. Moderna molekularna tehnika imenovana naslednja generacija sekveniranja (next generation sequencing), je še posebej prispevala k razmahu metagenomike.

V naši študiji smo se lotili preliminarne analize mikroorganizmov v štirih naključno izbranih gospodinjstvih pomivalnih strojih, pri čemer smo izhajali iz že objavljene študije [1]. Izolirali smo DNA iz oblog na tesnilih pomivalnih strojev in z multipleks reakcijo PCR pomnožili sedem hipervariabilnih regij 16S rRNA gena. Po pripravi knjižnic smo s pomočjo instrumenta Ion Torrent PGM izvedli masivno sekveniranje in natančno obdelavo dobljenih nukleotidnih zaporedij v programu Ion Reporter.

V predavanju bodo izpostavljene prednosti uporabljene metode pred klasičnim metagenomskim pristopom, prikazali bomo potek dela in priprave vzorcev, analizo podatkov naslednje generacije sekveniranja in razlike med testiranimi gospodinjstvi pralnimi stroji.

[1] Zalar, P., Novak, M., de Hoog, G.S., and Gunde-Cimerman, N. (2011). Dishwashers--a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biol.* 115, 997–1007



Primer končne analize bakterijske združbe v enem izmed testiranih pomivalnih strojih.

Določanje nukleotidnih zaporedij majhnih nekodirajočih RNA in njihova uporaba v genomiki

Jernej Jakše¹, Tine Pokorn¹, Sebastjan Radišek², Taja Jeseničnik¹, Branka Javornik¹

jernej.jakse@bf.uni-lj.si

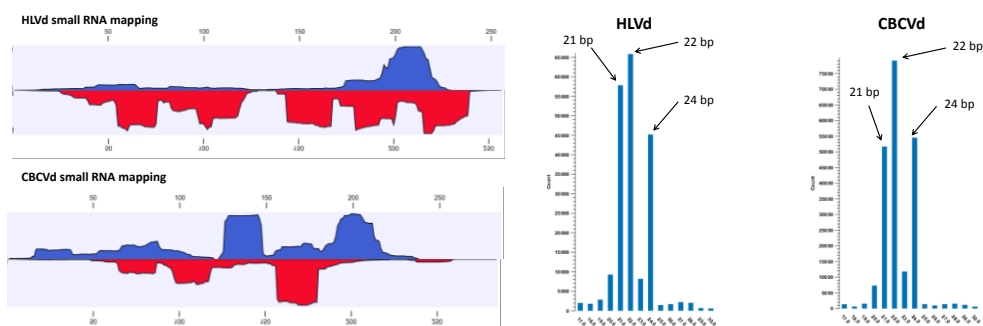
¹Katedra za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

²Oddelek za varstvo rastlin, Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije

Z razvojem tehnik naslednjih generacij določevanja nukleotidnih zaporedij (NGS) smo raziskovalci dobili neprecenljivo orodje, ki omogoča preučevanje malih nekodirajočih RNA molekul na ravni genoma z visoko globino določevanja. Zaradi dejstva, da so te molekule kratke, so že prve platforme NGS omogočile njihove študije.

V prispevku bomo predstavili tri aplikacije uporabe zaporedij malih nekodirajočih RNA iz našega laboratorija, njihove posebnosti in bioinformatične pristope, ki smo jih uporabili pri analizi.

Prva aplikacija je s področja rastlinske patologije. Znano je, da rastlinski obrambni odziv na virusne in viroidne parazite vključuje uporabo nekaterih elementov biogeneze malih RNA. Kot produkt te obrambe nastanejo v celicah od patogena pridobljene specifične male RNA. Določevanje nukleotidnih zaporedij le-teh s postopki NGS nam omogoča rekonstrukcijo genoma patogen z mapiranjem ali *de-novo* postopkom. S tega postopkom smo s pomočjo uporabe Illumina tehnologije potrdili prisotnost novega nevarnega viroida razpokanosti skorje agrumov (CBCVd) v slovenskih hmeljiščih. Drug primer uporabe kratkih sekvenčnih odčitkov je identifikacija endogenih rastlinskih mikro RNA genov (miRNA) na nivoju genoma, kar nam je omogočila nedavna objava hmeljnega genoma. Zadnji primer poizkusa, ki smo ga nedavno pričeli izvajati na katedri, pa je identifikacija endogenih glivnih miRNA genov (miRNA) in malih interferenčnih RNA. Sekvenčne odčitke smo pridobili s pomočjo platforme Ion Proton, ki je trenutno najhitrejši NGS sekvenator na tržišču.



Pasti identifikacije vzročnih genov poligenских lastnosti

Uroš Petrovič¹

uros.petrovic@ijs.si

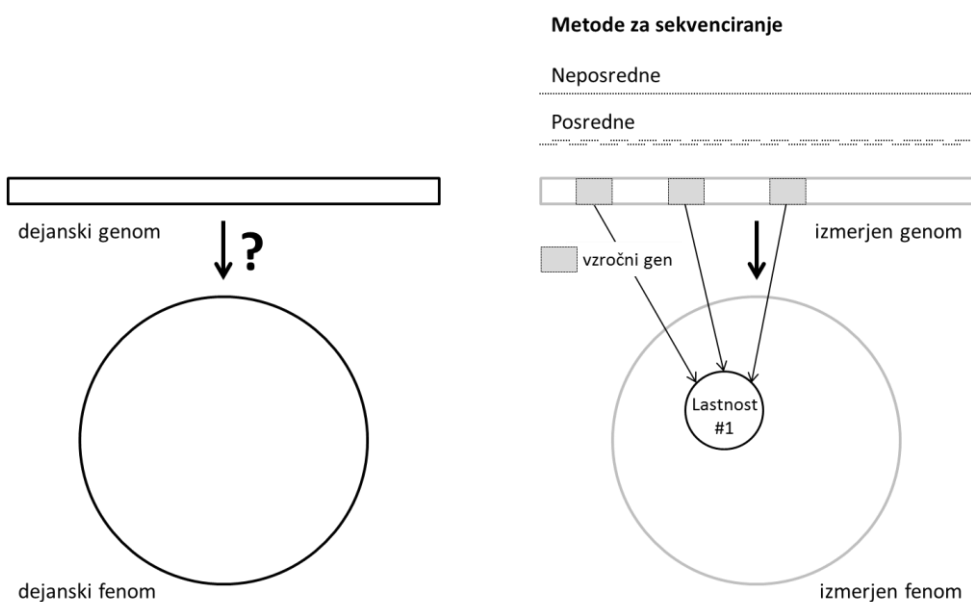
¹ Odsek za molekularne in biomedicinske znanosti, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

Velika večina lastnosti živih bitij je poligenских. Nedavni razvoj na področju sekvenciranja DNA je omogočil, da lahko vsaj za nekatere modelne organizme določimo celoten nabor vzročnih genov za posamezno lastnost [1]. Identifikacija le-teh za celoten fenom bi omogočila še nikoli viden natančen vpogled v načine, kako je fenotip določen z genotipom. Ključno vlogo bo pri tem igrala tudi natančnost določanja zaporedja genoma mnogih celic z zelo podobnim genotipom.

V predavanju bodo predstavljene ovire, ki stojijo na poti tehnikam za identifikacijo vzročnih genov poligenских lastnosti, vključno z vprašanjem, kako natančno je sploh mogoče določiti genotip kot osnovo določenega fenotipa [2]. Predstavljene bodo tudi možne rešitve nekaterih predstavljenih problemov.

[1] Bloom JS *et al.* (2013) Finding the sources of missing heritability in a yeast cross. *Nature*. 494(7436):234.

[2] Strippoli P *et al.* (2005) Uncertainty principle of genetic information in a living cell. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 2(1):40



Kvasovke rodu *Aureobasidium*: prednosti določanja genomskih zaporedij sorodnih vrst

Janja Zajc¹, Cene Gostinčar¹, Martina Turk¹, Polona Zalar¹, Nina Gunde-Cimerman²

janja.zajc@bf.uni-lj.si

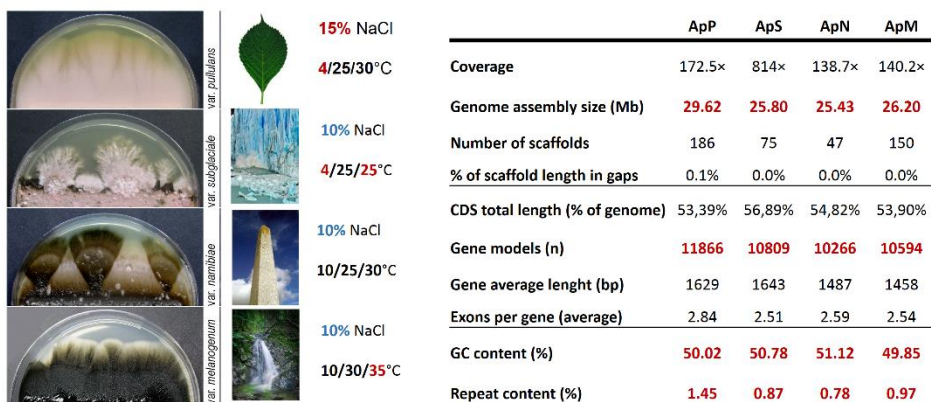
¹ Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

² Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov (CIPKeBiP)

Črne kvasovke rodu *Aureobasidium* (Dothideales) so zanimive za študij zaradi njihove uporabe v biotehnologiji (produkcija pululana, encimov in antimikrobnih snovi) in v biokontroli rastlinskih patogenov pred in po žetvi. Predstavniki tega rodu so tolerantni na različne strese, kot je pomanjkanje hranil, visoka slanost, kisel in bazičen pH ter visoke in nizke temperature, kar še povečuje možnosti njihove uporabe. Poleg široke uporabnosti pa se je potrebno zavedati tudi potencialne nevarnosti nekaterih oportunistično patogenih predstavnikov.

Določitev celotnega genomskega zaporedja z napravo Illumina HiSeq je razkrilo celoten repertoar biotehnološko zanimivih genov in ponudilo številne nadaljnje možnosti izrabe, poleg tega pa dalo vpogled v njihov mehanizem tolerance na stres, raznolik življenjski slog in patogeni potencial. V predavanju bomo predstavili nekatera spoznanja, do katerih je privedla primerjava genomov sorodnih kvasovk in izpostavili prednosti, ki jih prinašajo takšni podatki [1].

[1] Gostinčar, C., Ohm, R., Kogej, T., Sonjak, S., Turk, M., Zajc, J., Zalar, P., Grube, M., Sun, H., Han, J., Sharma, A., Chiniqy, J., Ngan, C., Lipzen, A., Barry, K., Grigoriev, I., and Gunde-Cimerman, N. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics* 15, 549. doi: 10.1186/1471-2164-15-549.



Slika 1. Slike kultur izbranih varietet *Aureobasidium pullulans*, slanostne in temperaturne meje rasti in tabela genomskih podatkov. Povzeto iz [1].

Določitev nukleotidnega zaporedja glive s podvojenim genomom – primer črne kvasovke *Hortaea werneckii*

Cene Gostinčar¹, Metka Lenassi², Martina Turk¹, Janja Zajc¹, Corey Nislow³, Ivan Sadowski⁴, Ana Plemenitaš², Nina Gunde-Cimerman^{1,5}

cene.gostincar@bf.uni-lj.si

¹ Katedra za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

² Inštitut za biokemijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

³ Department of Pharmaceutical Sciences, University of British Columbia

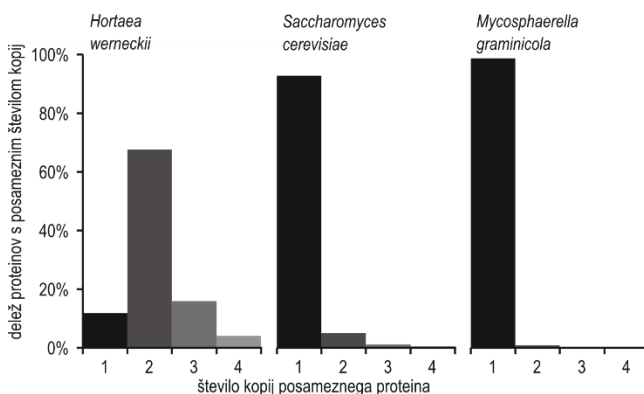
⁴ Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia

⁵ Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov (CIPKeBiP)

Ekstremno halotolerantna črna kvasovka *Hortaea werneckii* za rast ne potrebuje dodatne soli v gojišču, obenem pa lahko preživi in se razmnožuje tudi pri koncentracijah NaCl, ki so blizu nasičenja. Izjemno visoka je tudi njena toleranca na druge soli v okolju, npr. različne soli magnezija. Vendar je odkrivanje halotolerančnih mehanizmov *H. werneckii* počasno in težavno. Genomsko zaporedje je bilo dolgo neznano, molekularnobioloških metod, razvitih za druge organizme, pa največkrat pri tej glivi ni mogoče neposredno uporabiti.

Določitev celotnega genomskega zaporedja z napravo Illumina GAIIx bo nadaljnje delo bistveno olajšala. A pri določanju zaporedja smo naleteli na novo težavo: podvojitev celotnega genoma [1]. V predavanju se bomo posvetili posledicam, ki jih je ta podvojitev imela na uspešnost določitve genomskega zaporedja in nadaljnje bioinformatično delo z genomom, spregovorili pa bomo tudi o možnih rešitvah posledičnih težav v obliki alternativnih metod določevanja nukleotidnih zaporedij.

[1] Lenassi M, Gostinčar C et al. Whole genome duplication and enrichment of metal cation transporters revealed by de novo genome sequencing of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii*. PLoS ONE. 2013;8(8):e71328.



Slika 1. Delež proteinov, ki so v genomih vrst *H. werneckii*, *S. cerevisiae* in *M. graminicola* prisotne v eni, dveh, treh ali štirih kopijah. Slika je povzeta iz [1].

Problem shranjevanja, upravljanja in analize podatkov iz visokozmogljivostnih tehnologij

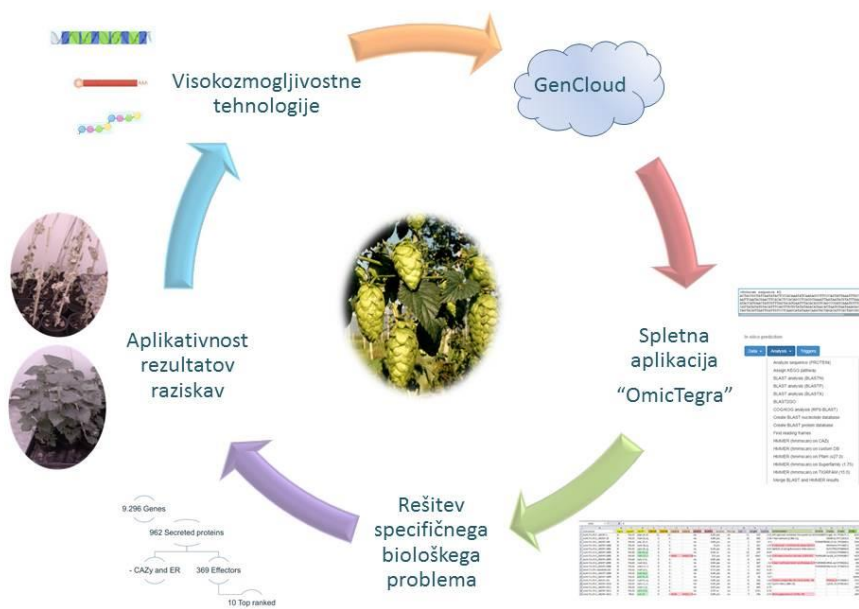
Kristina Marton¹, Vasja Progar¹, Branka Javornik¹ in Sabina Berne¹

sabina.berne@bf.uni-lj.si

¹ Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, Slovenija

Pri raziskavah molekularnih mehanizmov patogeneze glive *Verticillium nonalfalfae*, ki povzroča veliko gospodarsko škodo v nasadih hmelja, smo z uporabo sodobnih visokozmogljivostnih tehnologij pridobili veliko količino eksperimentalnih podatkov. Velik problem predstavlja njihovo shranjevanje, upravljanje in distribucija med različnimi uporabniki. Predvsem pa je težavna interpretacija tako obsežnih podatkov pri reševanju specifičnega biološkega problema.

V predavanju bomo predstavili rešitev v obliki spletne platforme GenCloud, ki nam je poleg shranjevanja podatkov v oblaku in preprostega dostopanja do njih, omogočila tudi postavitve spletne aplikacije za verižno obdelavo podatkov z različnimi bioinformatičnimi pristopi. Tako smo najprej okarakterizirali in funkcijsko anotirali genska zaporedja fitopatogene glive. V nadaljevanju smo *in silico* določili glivni sekretom, ki verjetno zajema virulentne dejavnike (toksine, efektorje in encime), s katerimi gliva nadzoruje imunski odziv rastline in se uspešno širi. Na koncu smo biološko vlogo izbranih glivnih efektorjev preverili z analizo izražanja v rastlinah hmelja ter s testom patogenosti mutant glive z izbitimi efektorji.



Slika. Uporabnost bioinformatičnih pristopov pri reševanju specifičnih bioloških vprašanj.

kompExpress: Interaktivna spletna aplikacija za raziskovanje transkriptomskih podatkov

Klemen Hrovat¹, Miha Štajdohar^{1,2}, Janez Kokošar^{1,2}, Luka Jeran¹, Rui Chen²

klemen@genialis.com

¹ Genialis, d.o.o., Ljubljana, Slovenija

² Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA

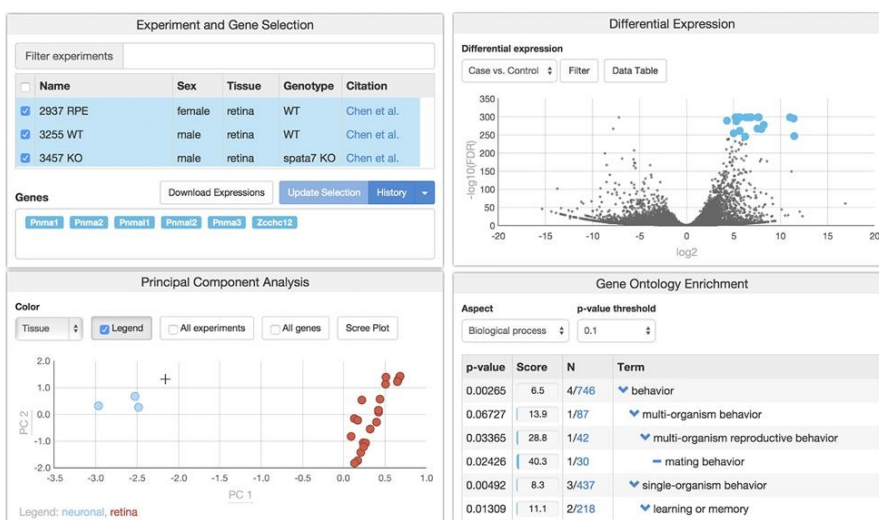
Sodobne interaktivne spletne aplikacije omogočajo enostaven dostop in brskanje po zbirkah bioloških podatkov. Uporabniku lahko bistveno olajšajo prepoznavo in iskanje zanimivih vzorcev v podatkih [1,2].

V predavanju bomo predstavili primer tovrstne aplikacije imenovane kompExpress [3]. Aplikacija kompExpress je bila razvita za potrebe podatkovne analitike transkriptomskih podatkov pridobljenih v okviru aktivnosti projektov KOMP (Knockout Mouse Project) in IMPC (International Mouse Phenotyping Consortium). kompExpress omogoča vizualno primerjavo izraženosti genov v različnih linijah miši ter interaktivno iskanje skupin sorodnih vzorcev. Analiza obogatenosti pojmov genske ontologije in iskanje diferencialno izraženih genov se prožita dinamično in v realnem času neposredno iz uporabniškega vmesnika. Omogočena je povezava na zunanje podatkovne baze ter prikaz podatkov iz zunanjih virov (Allen Brain Atlas). Analitični del aplikacije je podprt s sodobnim podatkovnim sistemom, ki uporabnika na enostaven način pripelje od surovih podatkov do podatkov, pripravljenih za nadaljnjo analizo.

[1] Rot, Gregor, et al. (2009) dictyExpress: a Dictyostelium discoideum gene expression database with an explorative data analysis web-based interface. *BMC bioinformatics*, 10.1: 265.

[2] www.dictyexpress.org

[3] www.kompexpress.org



RNA-Seq za študij interakcij med rastlino in škodljivci na molekularnem nivoju

Kristina Gruden¹

kristina.gruden@nib.si

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana

Netarčna analiza sprememb v transkriptomu je močno orodje v razumevanju interakcij med organizmi, nastanku bolezni ali simbiotskih interakcij. V študijah na našem oddelku se specifično posvečamo študiju bolezni rastlin, osredotočeni smo na krompir in njegove ekonomsko najbolj pomembne patogene in škodljivce. Do razvoja tehnologij naslednje generacije sekvenciranja smo za netarčno analizo transkripcijskega odziva uporabljali DNA-mikromreže, sedaj je primarna metoda za ta namen RNA-Seq. Predstavljene bodo prednosti/slabosti različnih pristopov, možnost primerjanja rezultatov pridobljenih z različnimi tehnologijami ter načini za potrjevanje rezultatov z neodvisnimi metodami. Rezultati bodo predstavljeni na primeru tristrane interakcije med krompirjem, krompirjevim virusom Y in koloradskim hroščem [1].

[1] Petek *et al.* (2014) Potato Virus Y infection hinders potato defence response and renders plants more vulnerable to Colorado potato beetle attack. *Mol. Ecol.* 23,5378-5391

| MapMan bin description | Elements in bin | cv. 'Igor' plants | | cv. 'Désirée' plants | |
|--------------------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------------|----------------------|-------------|
| | | Healthy | PVY ^{NTN} infected | Nontransgenic | <i>coi1</i> |
| Cell wall | 364 | | + | | |
| Photosynthesis | 247 | - | + | - | - |
| Phenylpropanoids/lignin biosynthesis | 73 | + | + | | |
| Proteinase inhibitors | 57 | + | + | + | |
| Amino acid synthesis/aromatic | 47 | | + | | |
| Auxin response transcription factors | 21 | | - | | |
| Gibberellin-regulated genes | 14 | | + | | |

Tabela je povzeta iz [1].

Primer uporabe AmpliSeq tehnike za določanje sprememb v tarčnih delih genoma in analiza njihovega vpliva na proteinskem nivoju

Simon Koren¹, Nataša Toplak¹, Minka Kovač¹

simon.koren@omega.si

¹ Omega d.o.o., Dolinškova 8, 1000 Ljubljana

Tehnologije naslednje generacije sekveniranja (NGS) so omogočile izvedbo obsežnih genetskih študij in pridobivanje velikih količin podatkov v zelo kratkem času. Pri tem pa se mnogi raziskovalci soočamo s težavami obdelovanja množice informacij in iskanja tistih ključnih podatkov, ki so biološko relevantni za problem, ki ga preučujemo.

V predavanju bomo predstavili AmpliSeq tehniko za Ion Torrent tehnologijo NGS, ki jo uporabljamo za zelo enostavno in hitro analizo izbranih delov genoma z uporabo visoko multipleksiranega PCR. Na praktičnem primeru bomo prikazali postopek analize s programsko opremo Ion Reporter, ki omogoča zelo hitro in napredno filtriranje rezultatov, ugotavljanje učinkov variant na proteinskem nivoju ter povezavo s številnimi anotiranimi bazami podatkov, kar izrazito poenostavi iskanje biološko relevantnih variant v vzorcu.

| Coding | Amino Acid Change | Variant Effect | PhyloP | SIFT | Grantham | PolyPhen | PFAM |
|------------|-------------------|----------------|--------|------|----------|----------|-----------------------------------|
| c.1365T>G | p.His455Gln | missense | 0.22 | 0.29 | 24.0 | 0.022 | Ion channel...(3) |
| c.4603T>C | p.Ser1535Pro | missense | 1.42 | | 74.0 | 0.0 | Collagen triple helix repeat(2) |
| c.138T>G | p.Asp46Glu | missense | 2.17 | | 45.0 | | Collagen triple helix repeat(2) |
| c.11602A>G | p.Met3868Val | missense | -1.69 | 0.31 | 21.0 | 0.0 | Fibronectin type III domain...(4) |
| c.11504C>T | p.Thr3835Ile | missense | 2.71 | | 89.0 | | Fibronectin type III domain...(4) |
| c.10232A>C | p.Glu3411Ala | missense | 1.04 | | 107.0 | | Fibronectin type III domain...(4) |
| c.6317T>C | p.Ile2106Thr | missense | 1.44 | | 89.0 | | Fibronectin type III domain...(4) |
| c.4457G>A | p.Arg1486Lys | missense | -0.48 | | 26.0 | | Fibronectin type III domain...(4) |
| c.373G>A | p.Ala125Thr | missense | -0.95 | 1.0 | 58.0 | 0.0 | Fibronectin type III domain...(4) |

Screenshot from the Ion Reporter software showing one of the views used for functional analysis

Sekvenciranje transkriptoma pigmentnih celic kot orodje za odkrivanje molekularnih mehanizmov marmoriranega vzorca na koži soške postrvi

Ida Djurdjevič¹, Tomasz Furmanek², Simona Sušnik Bajec¹

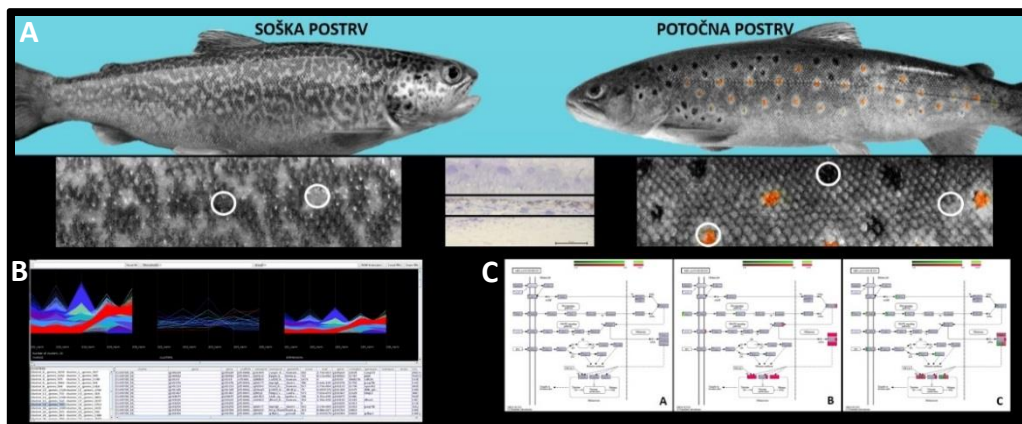
ida.djurdjevic@bf.uni-lj.si

¹ Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

² Institute of Marine Research, Bergen, Norway

Obarvanost je pri živalih pomembna lastnost, ki igra vlogo pri izbiri partnerja, obrambi pred predatorji, itd. V primerjavi s sesalci imajo ribe v koži več tipov pigmentnih celic in tudi zato izražajo izjemno raznolikost barv in vzorcev. Na koži soške postrvi je tako prisoten zanimiv marmoriran vzorec, ki je med postrvmi zelo redek, pogosto pa se pojavlja pri drugih vrstah rib in tudi pri sesalcih. Z namenom odkritja molekularnega ozadja nastanka takega vzorca smo iz različno obarvanih delov kože izolirali RNK, ki smo jo nato sekvencirali z metodo naslednje generacije (RNA-seq). Za primerjavo smo uporabili soški sorodno potočno postrv, ki ima na koži pikčast vzorec.

V predavanju bo predstavljena uporabnost metode za namene ekspresijskih študij in pa nekaj preliminarnih rezultatov, ki namigujejo na pomembno vlogo genov, ki kodirajo proteine, udeležene v medcelični komunikaciji, pri vzpostavitvi pigmentnega vzorca.



Slika1: A: Pigmentni vzorci na koži dveh primerjanih vrst - soške in potočne postrvi ter shematski prikaz vzorčenja iz kože. B: Gene z istim vzorcem ekspresije smo združevali s k-mean programom. C: Primerjalna analiza ekspresije genov vključenih v melanogenezo med različnimi vzorci kože (KEGG analiza).

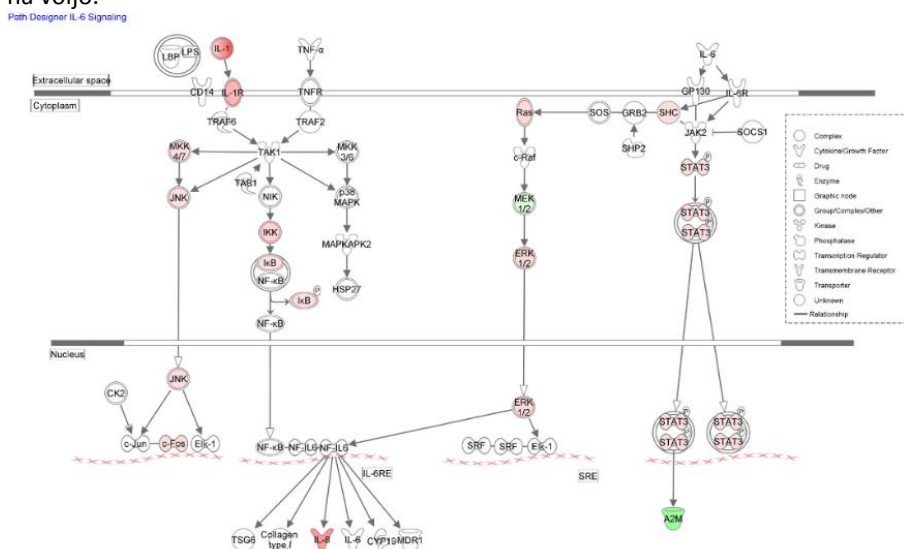
Transkriptom celic epitelija mlečne žleze kože po okužbi z *Mycoplasma agalactiae*

Jernej Ogorevc¹, Peter Dovč¹

jernej.ogorevc@bf.uni-lj.si; peter.dovc@bf.uni-lj.si

¹Genetski laboratorij, Oddelek za zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

Mycoplasma agalactiae (MA), je eden izmed glavnih vzrokov za okužbe mlečne žleze drobnice, ki povzročajo kužne presušitve. Za boljše razumevanje poteka odziva gostitelja na celični ravni smo vzpostavili primarno celično kulturo epitelija mlečne žleze (pgMEC). Sekvenciranje mRNA smo izvedli na izolatih mRNA v treh različnih časovnih točkah (3 h, 12 h in 24 h) po okužbi (PI). Bioinformacijska analiza transkriptov je pokazala, da je okužba vplivala na izražanje genov, ki so povezani z imunskim odzivom, metabolizmom steroidov, presnovo maščobnih kislin, apoptozo, celično signalizacijo, uravnavanjem transkripcije in uravnavanjem celičnega cikla (Ogorevc in sod., 2015). Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da epitelno tkivo mlečne žleze sodeluje pri oblikovanju imunskega odgovora predvsem preko izražanja citokinov, aktivacijo sistema komplemента, uravnavanjem apoptoze in z izražanjem genov, ki sodelujejo pri sintezi antimikrobnih substanc. V raziskavi smo skušali interpretirati transkriptomske spremembe, ki so posledica okužbe in skušali identificirati potencialne kandidate za boljšo odpornost epitelija mlečne žleze na okužbe z bakterijo *M. agalactiae*. Poleg tega demonstrirajo rezultati te študije tudi uporabnost komparativnega genomskega pristopa, saj smo transkripte kozje mlečne žleze identificirali na osnovi genomskih podatkov goveda (*Bos taurus*), saj genom kože v času raziskave še ni bil na voljo.



OGOREVC, Jernej, PRPAR MIHEVC, Sonja, HEDEGAARD, Jakob, BENČINA, Dušan, DOVČ, Peter. Transcriptomic response of goat mammary epithelial cells to *Mycoplasma agalactiae* challenge - a preliminary study. *Animal Science Papers and Reports*, ISSN 0860-4037, 2015, vol. 33, no. 2, str. 155-163.

Genetski presejalni testi s tehnologijo NGS in skrb za javno zdravje: Slovenske izkušnje s hiperholesterolemijo

Jernej Kovac¹, Gašper Klančar², Katarina Trebušak Podkrajšek^{1,3}, Tadej Battelino^{3,4}

jernej.kovac@kclj.si

¹ Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana

² Oddelek za molekularno diagnostiko, Onkološki inštitut Ljubljana

³ Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

⁴ Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrična klinika, UKC Ljubljana

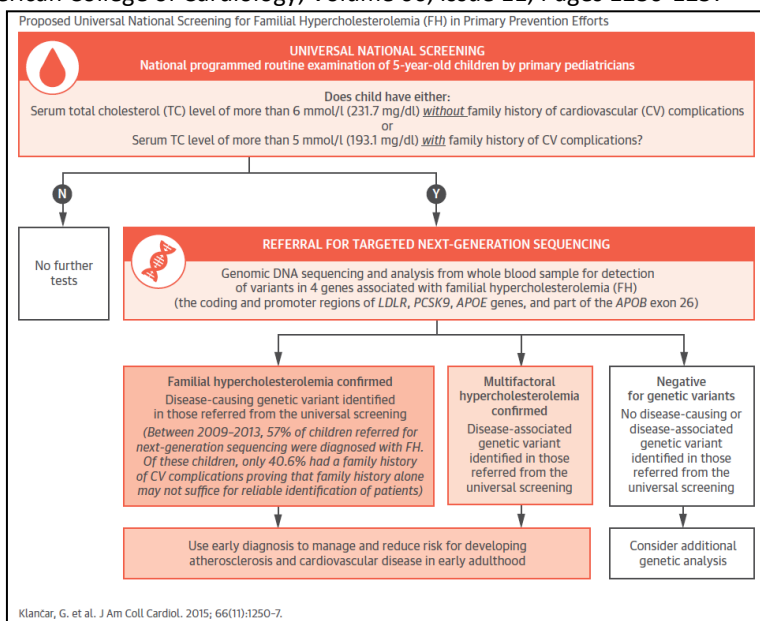
Kronično povišan holesterol za 100x poviša verjetnost zgodnjih srčno-žilnih zapletov. Ugotovitve slovenske raziskave kažejo, da pri 57% otrok s povišanim holesterolom leži vzrok v mutacijah znotraj genov *LDLR*, *PCSK9*, *APOB* ali *APOE* [1].

Slovenija je trenutno edina država na svetu, ki izvaja splošni presejalni test 5-letnikov za holesterol. Biokemični presejalni test je bil pred kratkim dopolnjen z usmerjenim genetskim presejalnim testom, kar omogoča učinkovito ločevanje med mono-genetskimi oblikami hiperholesterolemije in multi-faktorskimi oblikami bolezni. Usmerjen presejalni test se izvaja s tehnologijo sekvenciranja naslednje generacije (NGS), kar omogoča hitrejšo in cenejšo genetsko diagnostiko.

Uvedba NGS v klinično diagnostiko zahteva zaradi specifičnih lastnosti metode vzpostavitev strogih parametrov nadzora kvalitete sekvenciranja: kvaliteta gDNA, nadzor nad postopkom priprave NGS knjižnic, ustrezne prazne vrednosti parametrov, ki določajo uspešnost NGS reakcije in postopek potrjevanja morebitnih patoloških sprememb.

V predavanju so poleg rezultatov predstavljene naše izkušnje z uvajanjem NGS v rutinsko klinično genetsko diagnostiko.

[1] Klančar et al. Universal Screening for Familial Hypercholesterolemia in Children. Journal of the American College of Cardiology, Volume 66, Issue 11, Pages 1250-1257



Detekcija interakcij protein-RNA z metodo iCLIP

Tomaž Curk¹, Martin Stražar¹, Blaž Zupan¹, Jernej Ule²

tomaz.curk@fri.uni-lj.si

¹ Fakulteta za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani

² Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, London

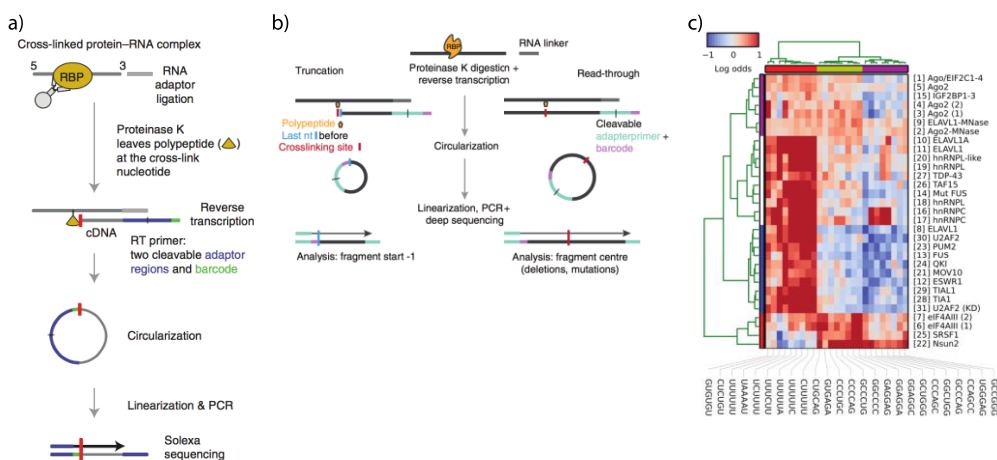
Metoda iCLIP omogoča do nukleotida natančno detekcijo mest vezave proteinov na RNA *in vivo* [1, 2]. Metoda temelji na uporabi svetlobe UV, protiteles za izbrani RNA-vezavni protein in na sekvenciranju. S tipičnim poskusom iCLIP detektiramo od nekaj stotisoč do več milijonov mest v transkriptomu, kjer izbrani protein vstopa v interakcijo z RNA. Tovrstne podatke je potrebno povezati s podatki o genomskem zaporedju, strukturnih lastnostih transkriptov, funkcijah tarčnih genov, itd. V ta namen smo razvili metodo, imenovano iONMF, za hkratno analizo več virov podatkov [3].

V predavanju bodo opisane prednosti in omejitve metode iCLIP [1], nekaj trenutnih izboljšav pri interpretaciji podatkov iCLIP [2]. Opisan bo bioinformatični pristop iONMF za integrativno analizo podatkov o interakcijah protein-RNA [3] ter izpostavljeni prihajajoči izzivi na tem področju.

[1] König J *et al.* (2010). iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*. 17:909–915.

[2] Hauer C, Curk T *et al.* (2015). Improved binding site assignment by high-resolution mapping of RNA–protein interactions using iCLIP. *Nature Communications*. 6:7921.

[3] Stražar M *et al.* (2015). Orthogonal matrix factorization enables integrative analysis of multiple RNA binding proteins. *Bioinformatics*. Under review.



Slika a) je povzeta iz [1], b) iz [2] in c) iz [3].

Kemijski inštitut

Kemijski inštitut je vodilna raziskovalna ustanova na področju molekularne biokemije, strukturne ter računalniške kemije in biotehnologije.

Raziskovalci Kemijskega inštituta dosegajo vrhunske rezultate na področju ved o materialih, kemijskega inženirstva in kemijske analitike.

Poslanstvo Kemijskega inštituta

ustvarjanje novih znanj s področja kemije in sorodnih ved;
prenos pridobljenega znanja na mlajše generacije;
prenos pridobljenega znanja v industrijo.

<http://www.ki.si/vede-o-zivljenju/l11-laboratorij-za-molekularno-biologijo-in-nanobiotehnologijo/>

