

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

Osnova

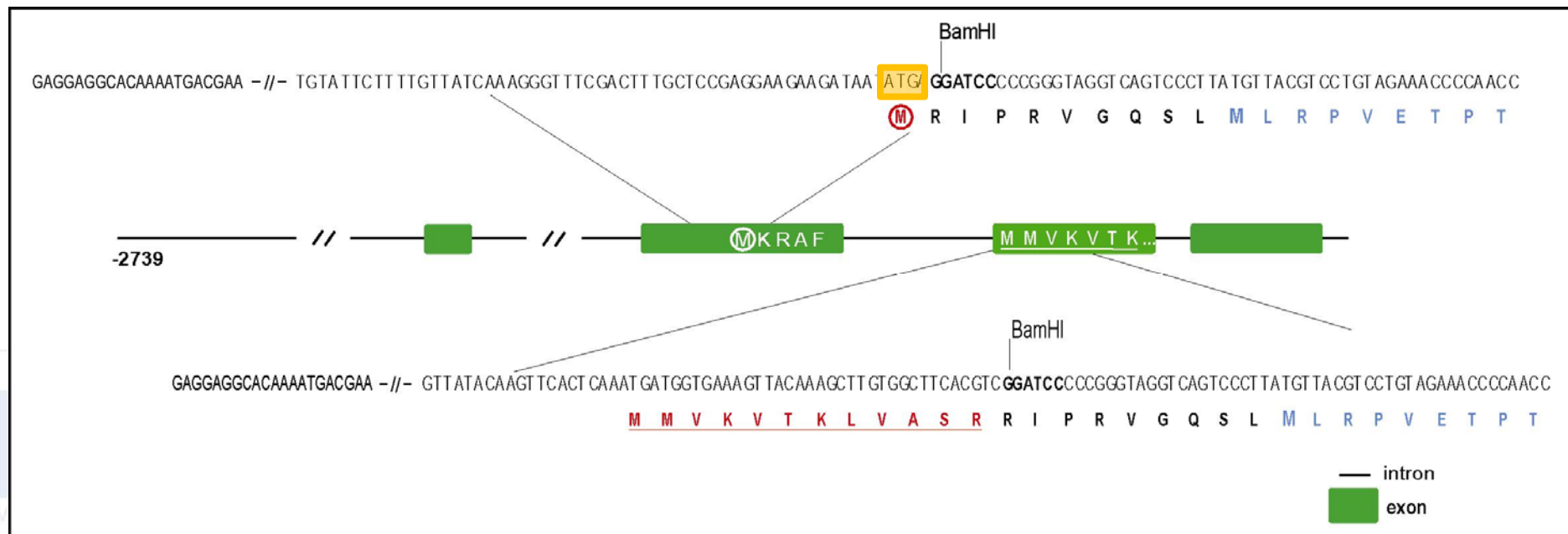
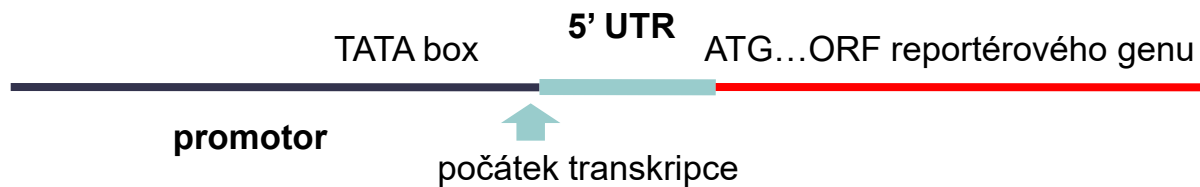
- Metody analýzy genové exprese
 - Kvalitativní analýza exprese genů
 - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Využití dostupných dat ve veřejných databázích
 - 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
 - přístup ziskane funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - Ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Chemická genetika

Osnova

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

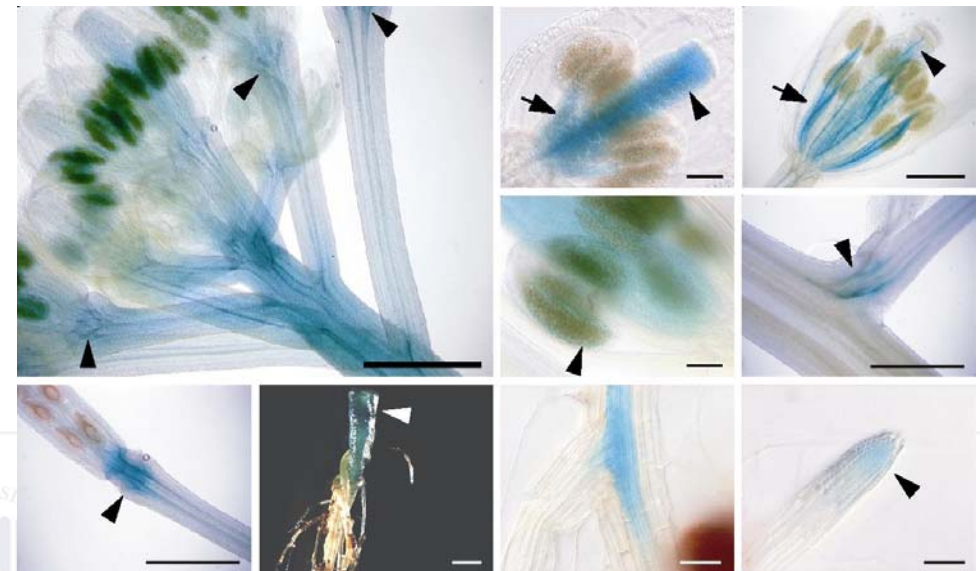
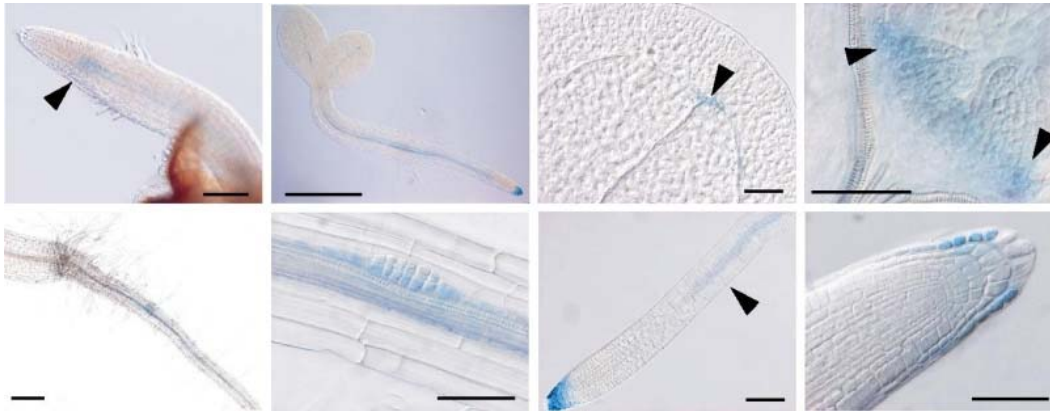
Transkripční fúze

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

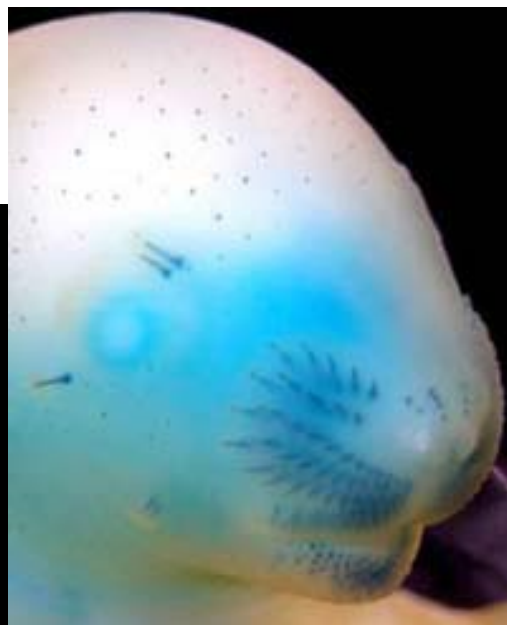


Transkripční fúze

- **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



GUS reporter in mouse embryos

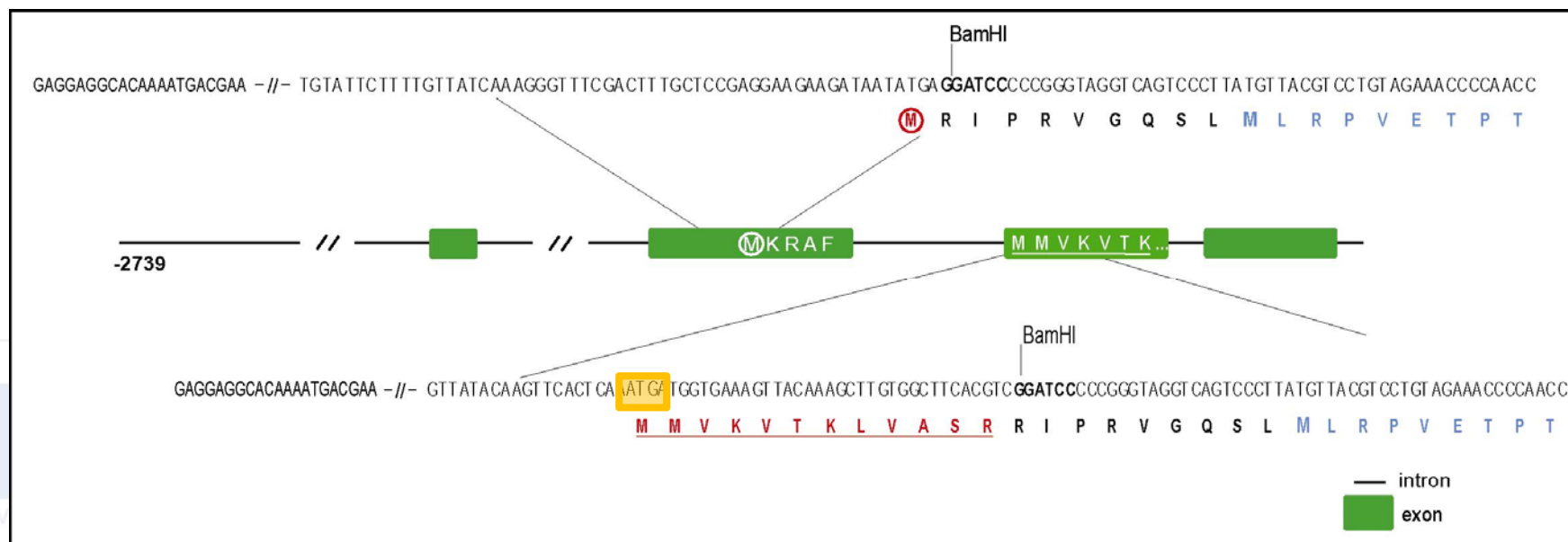
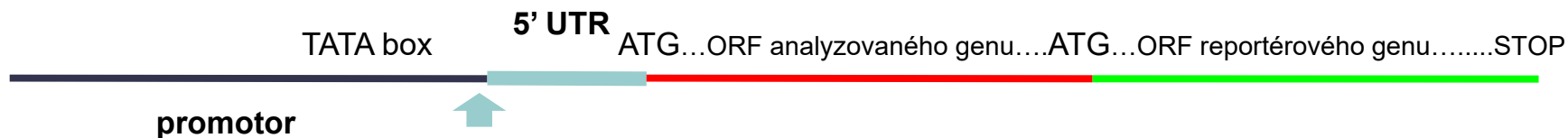


Osnova

- 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

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)

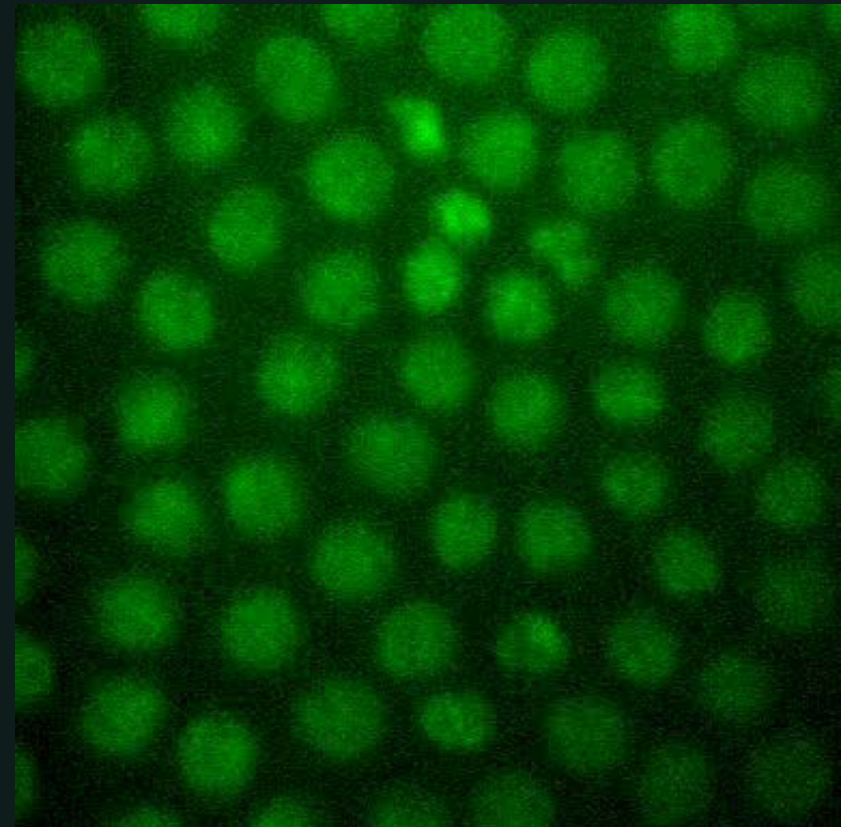


Translační fúze

- **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



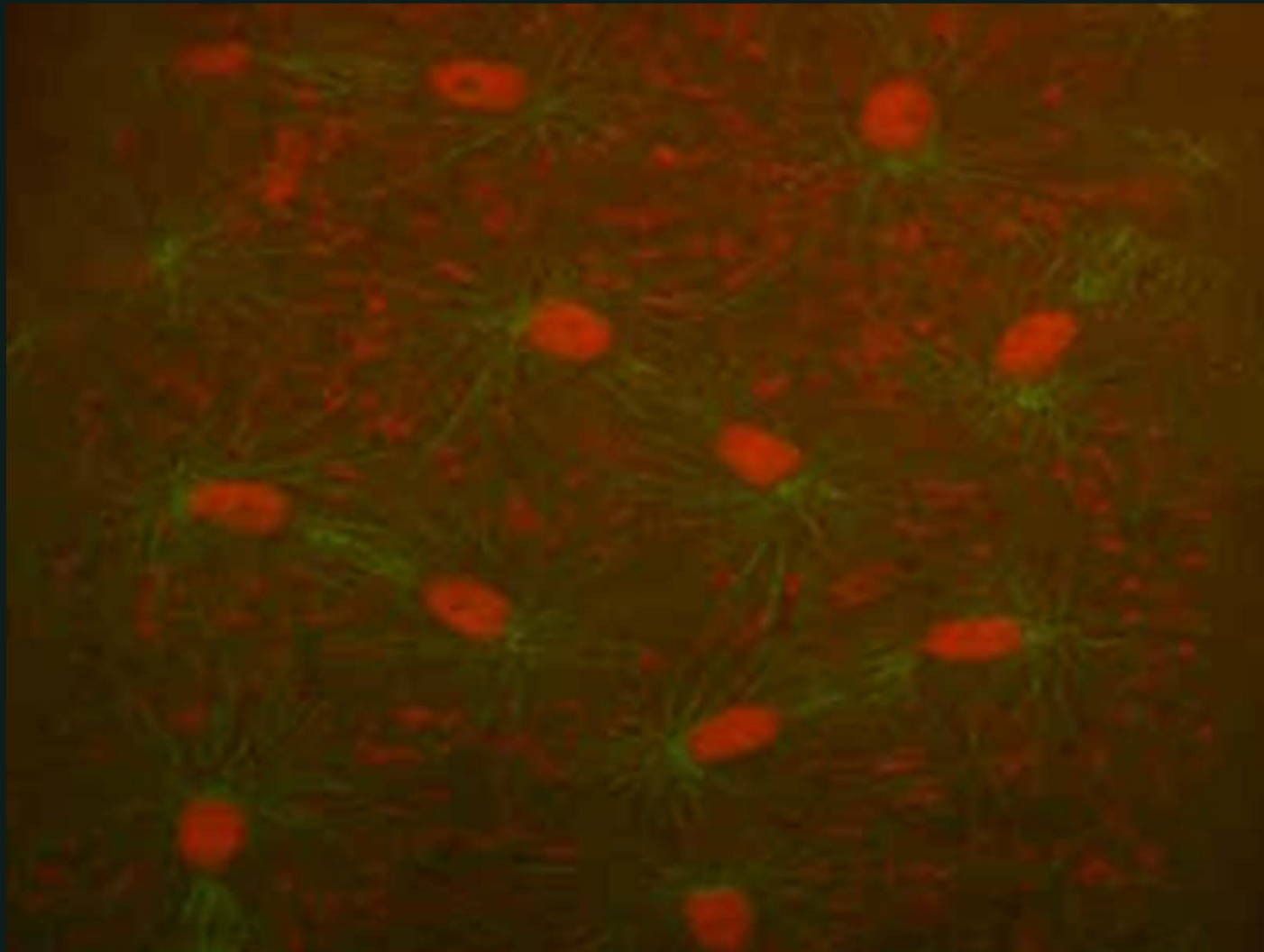
PIN1-GFP in *Arabidopsis*



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

Translační fúze

- Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s repotérovým genem

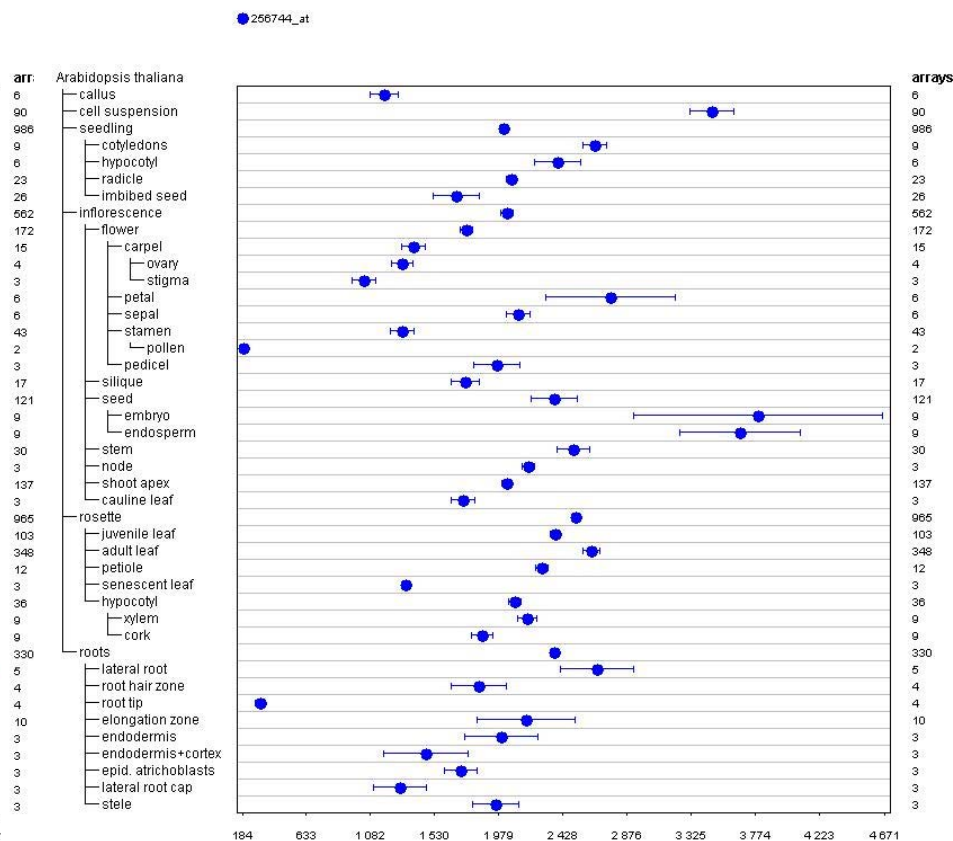
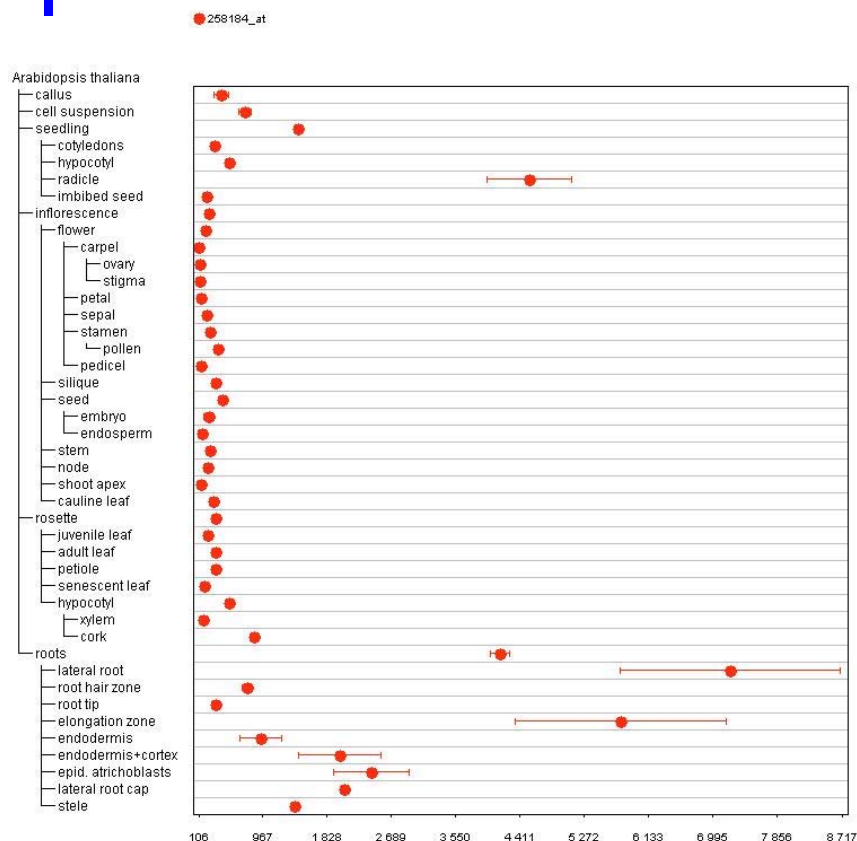


Osnova

- 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

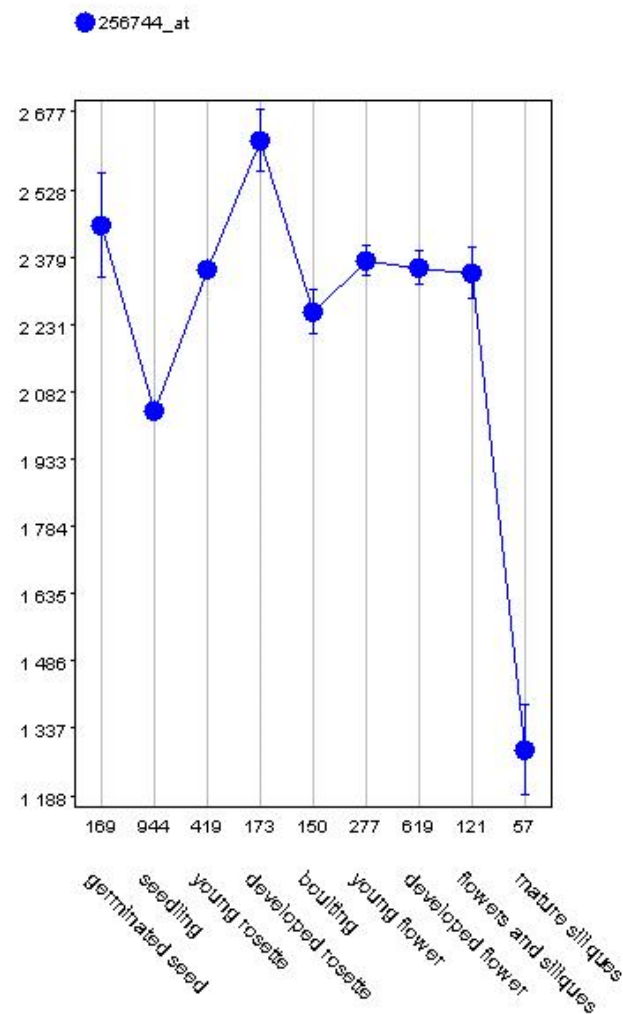
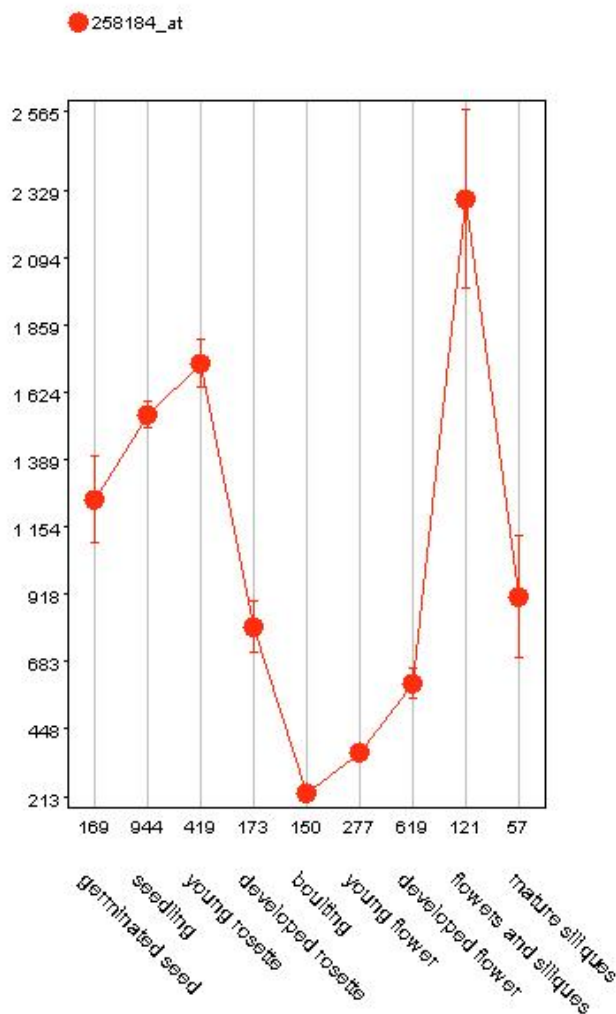
Databáze

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



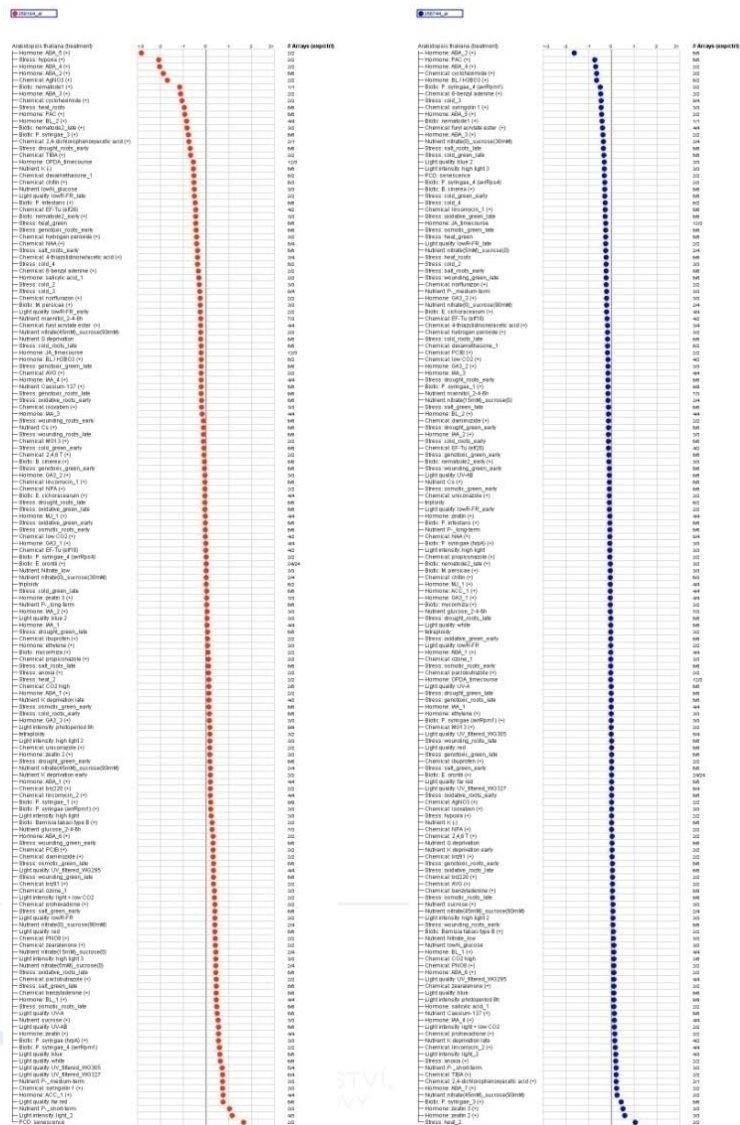
Databáze

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



Databáze

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

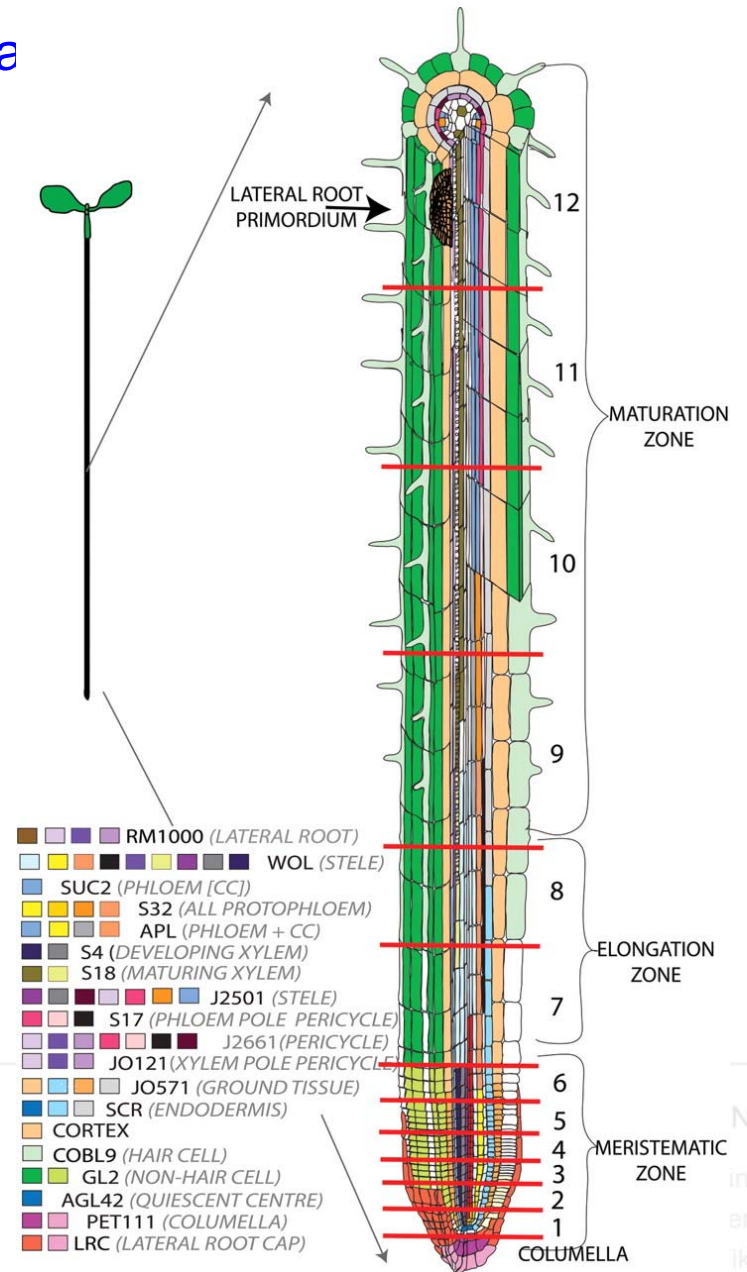
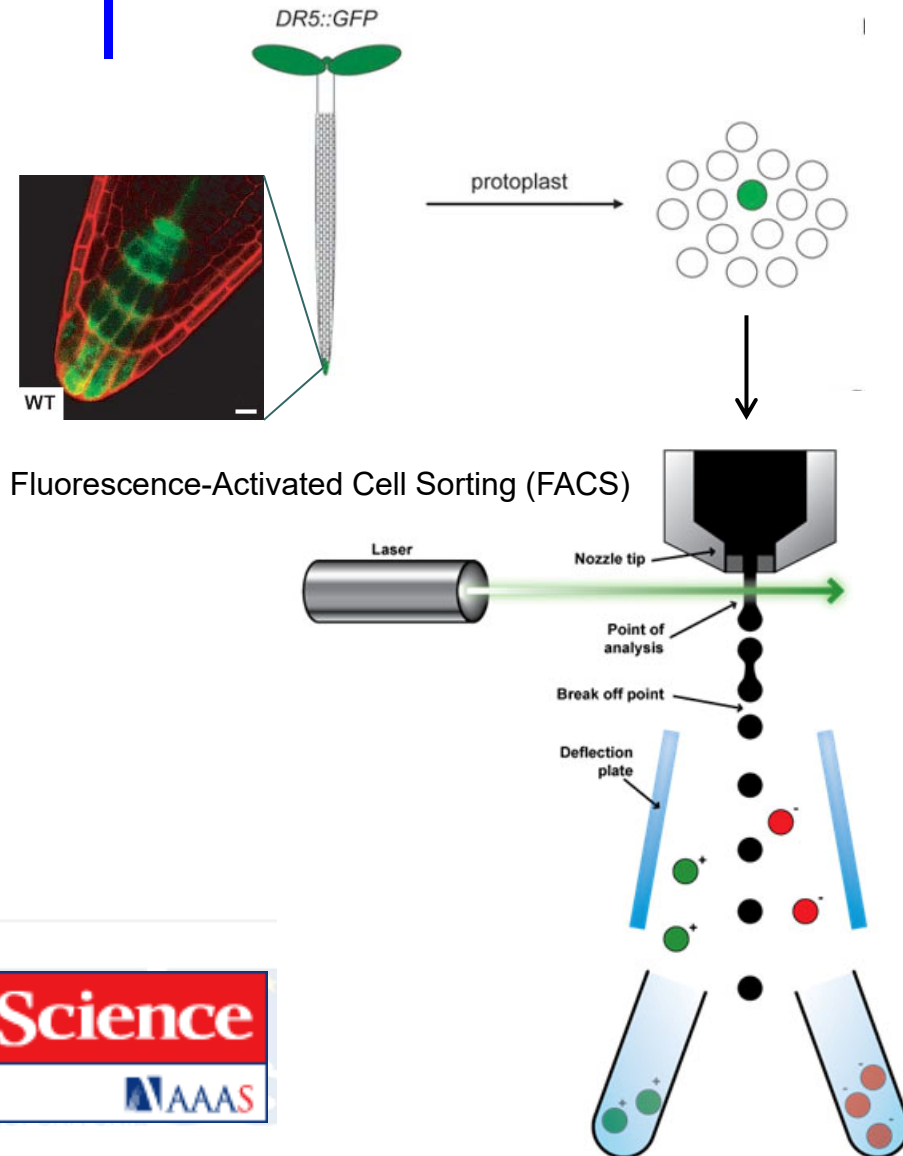


Osnova

- 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

Expression Maps - RNA

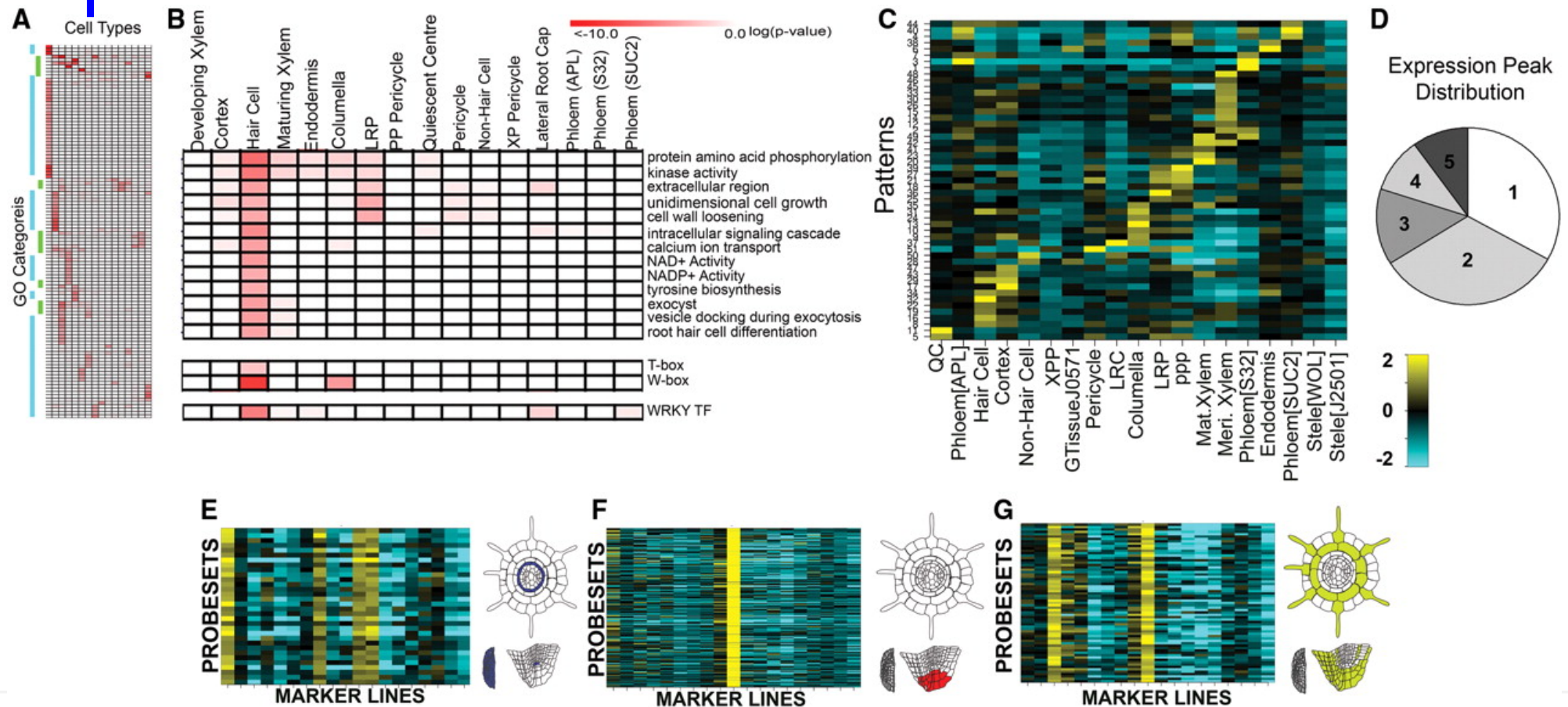
High-Resolution Expression Map in Ara



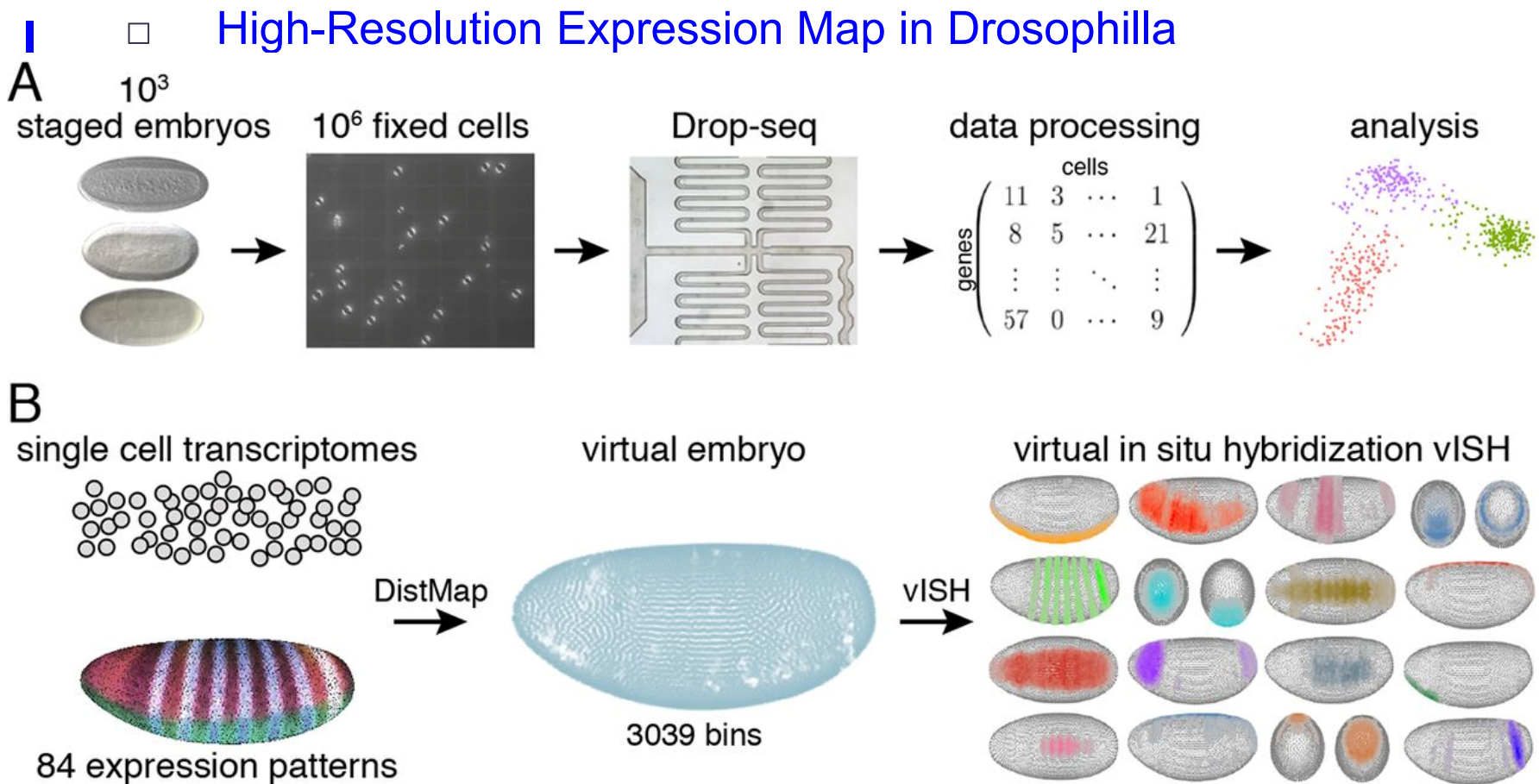
Brady et al., Science, 2007

Expression Maps - RNA

High-Resolution Expression Map in Arabidopsis Root



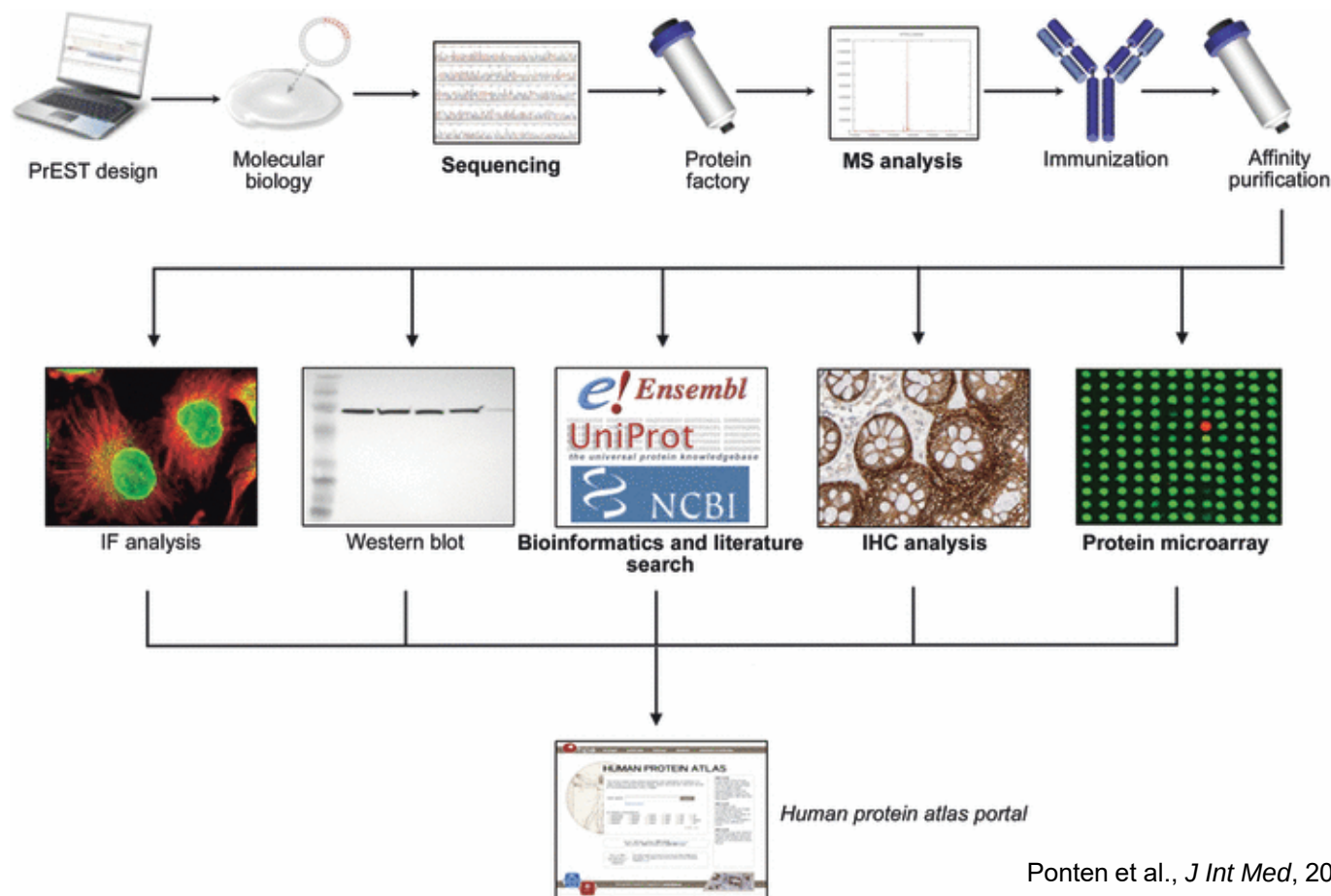
Expression Maps - RNA



Nikos Karaikos et al. Science 2017;science.aan3235

Expression Maps - Proteins

□ Human Protein Atlas



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

Expression Maps - Proteins

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

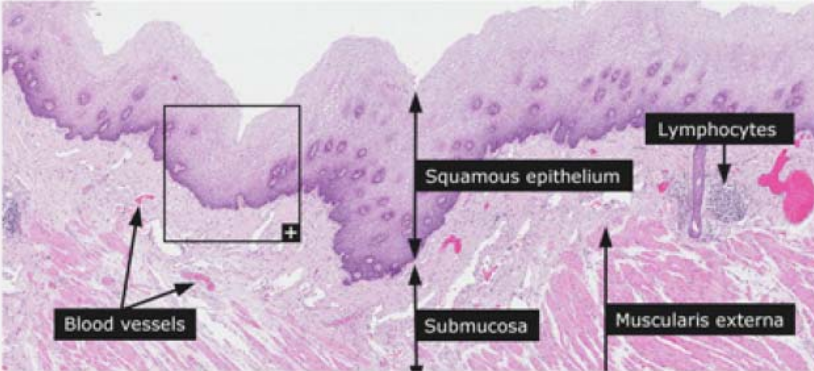
THE HUMAN PROTEIN ATLAS

ABOUT & HELP

SEARCH ? »

Search Clear Fields »

e.g. CD44, ELF3, KLK3, or use Fields to search specific fields such as protein_class:Transcription factors or chromosome:X



dictionary: histology of esophagus

News

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

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

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



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



UPPSALA
UNIVERSITET

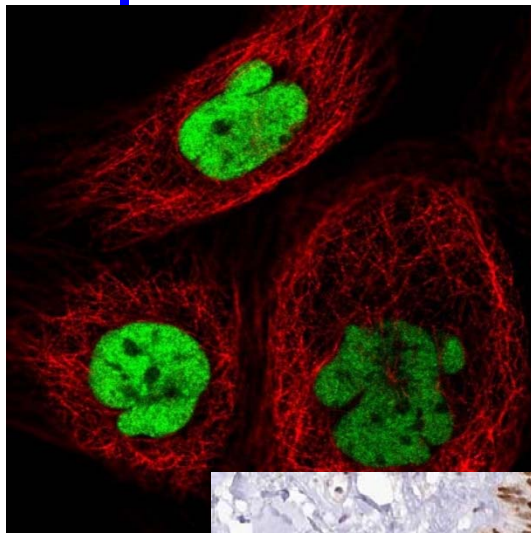


ROJE VZDĚLÁVÁNÍ

ntace je spolufinancována
...pským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Expression Maps - Proteins

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



SUBCELLULAR LOCATION SUMMARY ? »

Main location(s) Nucleus but not nucleoli

Additional location(s)

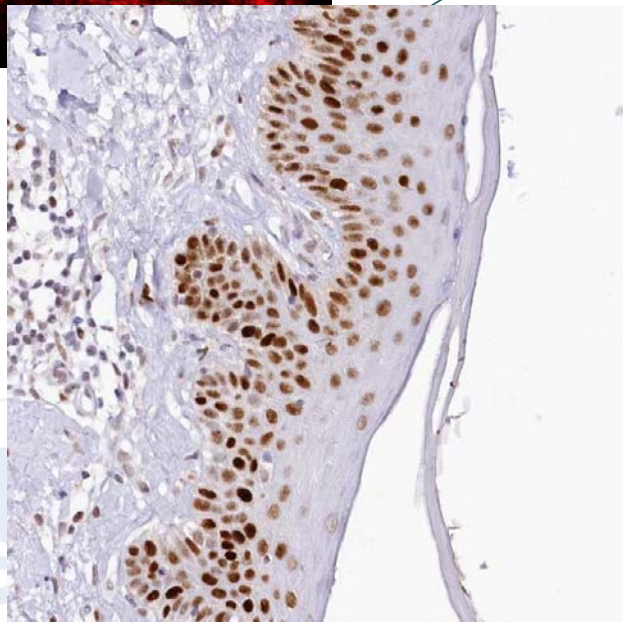
Staining summary Localized to the nucleus but excluded from the nucleoli.

Reliability (APE)  High

Antibodies in assay CAB039238, CAB039239

[Show image »](#)

[MORE SUBCELL DATA](#)



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	

[Show image »](#)

[MORE TISSUE DATA](#)

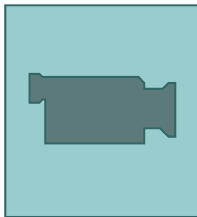
Osnova

- Metody analýzy genové exprese
 - Kvalitativní analýza exprese genů
 - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Využití dostupných dat ve veřejných databázích
 - Tkáňově a buněčně specifická analýza genové exprese
 - **Kvantitativní analýza exprese**
 - **DNA a proteinové čipy**

DNA Chips

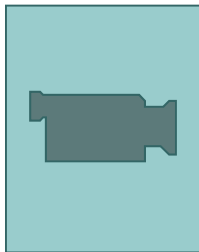
■ DNA čipy

- 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 pouhé 100 krocích)



- čipy nejen pro analýzu exprese, ale např. i genotypování (SNP polymorfizmy, sekvenování pomocí čipu, ...)

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>cre</i> gene. <i>Arabidopsis</i> maintenance genes GAPDH, Ubiquitin, and Actin
Detection sensitivity	1:100,000*

*As measured by detection in comparative analysis between a complex target containing spiked control transcriptions and a complex target with no spikes.

DNA Chips

■ DNA čipy, analýza výsledků

- pro správnou interpretaci výsledků je nutná dobrá znalost pokročilých statistických metod
- je nutné zahrnout dostatečný počet kontrol i opakování
- kontrola na přesnost měření (opakované měření na několika čipech se stejným vzorkem, vynesení stejných vzorků analyzovaných na různých čipech proti sobě)
- kontrola reproducibility měření (opakované měření s různými vzorky, izolovanými za stejných podmínek na stejném čipu-stejně podmínky proti sobě)
- identifikace hranice spolehlivého měření
- konečně vynesení experimentu proti kontrole nebo různých podmínek proti sobě – vlastní výsledek

Expression of 195M6T7 in response to chemical treatment

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

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

Gene

Experiment: Aluminum Stress

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

Slide Details

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_Cy5	no treatment (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy3	Download
					7304_Cy5.7305_Cy3	Aluminum (50 5M AlCl ₃ , pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy5	
HoekengaSc Aluminum Stress 2 [strong spatial bias]	AFGC: 7305	64: Aluminum Stress	technical	63	7304_Cy5.7305_Cy3	Aluminum (50 5M AlCl ₃ , pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy3	Download
					7304_Cy3.7305_Cy5	no treatment (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy5	

Protein Chips

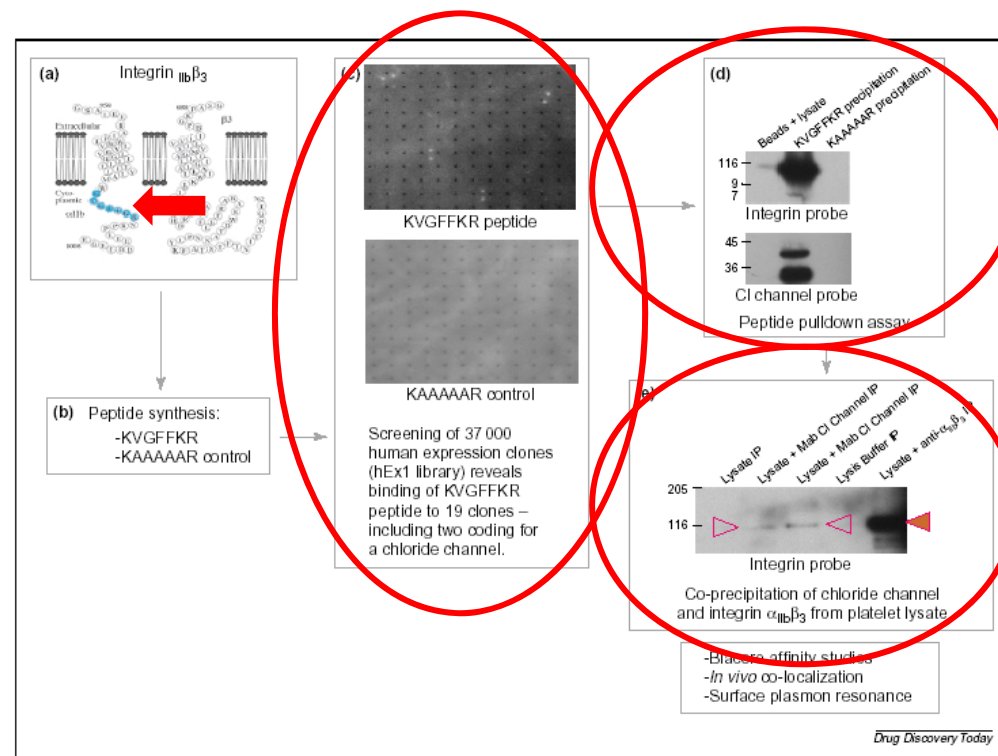
- Proteinové čipy

- 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

Protein Chips

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

- exprese cytoplasmatické části jako fúzního peptidu biotin-KVGFFKR
- analýza vazby s proteinovým čipem obsahujícím 37.000 klonů *E.coli* exprimujících lidské rekombinantní proteiny
- potvrzení interakce pull-down analýzou peptidů i koprecipitací celých proteinů (chloridový kanál ICln)
- další využití např. při identifikaci substrátů kináz, kdy substráty jsou navázány na čip a vystaveny působení kináz za přítomnosti radiokativně značeného ATP (768 purif. proteinů ječmene, z nich 21 identifikováno jako substráty kinázy CK2 α , Kramer et al., 2004)



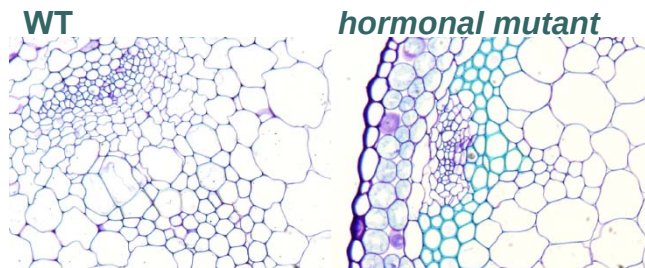
Lueking et al., 2005

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

Next Gen Transcriptional Profiling

- *Transcriptional profiling* via *RNA sequencing*



mRNA



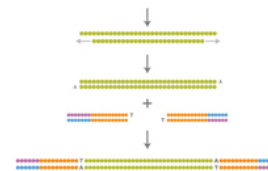
cDNA



mRNA



cDNA



Library Preparation
~2 h [15 min hands-on (Nextera)]
< 6 h [< 3 h hands-on (TruSeq)]



Cluster Generation
~5 h (<10 min hands-on)



Sequencing by Synthesis
~1.5 to 11 days



CASAVA
2 days (30 min hands-on)

Sequencing by Illumina and
number of transcripts determination

Results of -omics Studies vs Biologically Relevant Conclusions

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

Ddii 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	1,1804	1.79769e+308	1.79769e+308	6.88885e-05	0,00039180	1 yes
HRS1	1:4556891-4558708	WT	MT	OK	0	0,696583	1.79769e+308	1.79769e+308	6.61994e-06	4.67708e-05	yes
ATMLO14	1:9227472-9232296	WT	MT	OK	0	0,514609	1.79769e+308	1.79769e+308	9.74219e-05	0,00053505	5 yes
NRT1.6	1:9400663-9403789	WT	MT	OK	0	0,877865	1.79769e+308	1.79769e+308	3.2692e-08	3.50131e-07	yes
AT1G27570	1:9575425-9582376	WT	MT	OK	0	2,0829	1.79769e+308	1.79769e+308	9.76039e-06	6.647e-05	yes
AT1G60095	1:22159735-22162419	WT	MT	OK	0	0,688588	1.79769e+308	1.79769e+308	9.95901e-08	9.84992e-07	yes
AT1G03020	1:698206-698515	WT	MT	OK	0	1,78859	1.79769e+308	1.79769e+308	0,00913915	0,0277958	yes
AT1G13609	1:4662720-4663471	WT	MT	OK	0	3,55814	1.79769e+308	1.79769e+308	0,00021683	0,00108079	yes
AT1G21550	1:7553100-7553876	WT	MT	OK	0	0,562868	1.79769e+308	1.79769e+308	0,00115582	0,00471497	yes
AT1G22120	1:7806308-7809632	WT	MT	OK	0	0,617354	1.79769e+308	1.79769e+308	2.48392e-06	1.91089e-05	yes
AT1G31370	1:11238297-11239363	WT	MT	OK	0	1,46254	1.79769e+308	1.79769e+308	4.83523e-05	0,00028514	3 yes
APUM10	1:13253397-13255570	WT	MT	OK	0	0,581031	1.79769e+308	1.79769e+308	7.87855e-06	5.46603e-05	yes
AT1G48700	1:18010728-18012871	WT	MT	OK	0	0,556525	1.79769e+308	1.79769e+308	6.53917e-05	0,00037473	6 yes
AT1G59077	1:21746209-21833195	WT	MT	OK	0	138,886	1.79769e+308	1.79769e+308	0,00122789	0,00496816	yes
AT1G60050	1:22121549-22123702	WT	MT	OK	0	0,370087	1.79769e+308	1.79769e+308	0,00117953	0,0048001	yes
AT4G15242	4:8705786-8706997	WT	MT	OK	0,00930712	17,9056	10,9098	-4,40523	1.05673e-05	7.13983e-05	yes
AT5G33251	5:12499071-12500433	WT	MT	OK	0,0498375	52,2837	10,0349	-9,8119	0	0	yes
AT4G12520	4:7421055-7421738	WT	MT	OK	0,0195111	15,8516	9,66612	-3,90043	9.60217e-05	0,000528904	yes
AT1G60020	1:22100651-22105276	WT	MT	OK	0,0118377	7,18823	9,24611	-7,50382	6.19504e-14	1.4988e-12	yes
AT5G15360	5:4987235-4989182	WT	MT	OK	0,0988273	56,4834	9,1587	-10,4392	0	0	yes

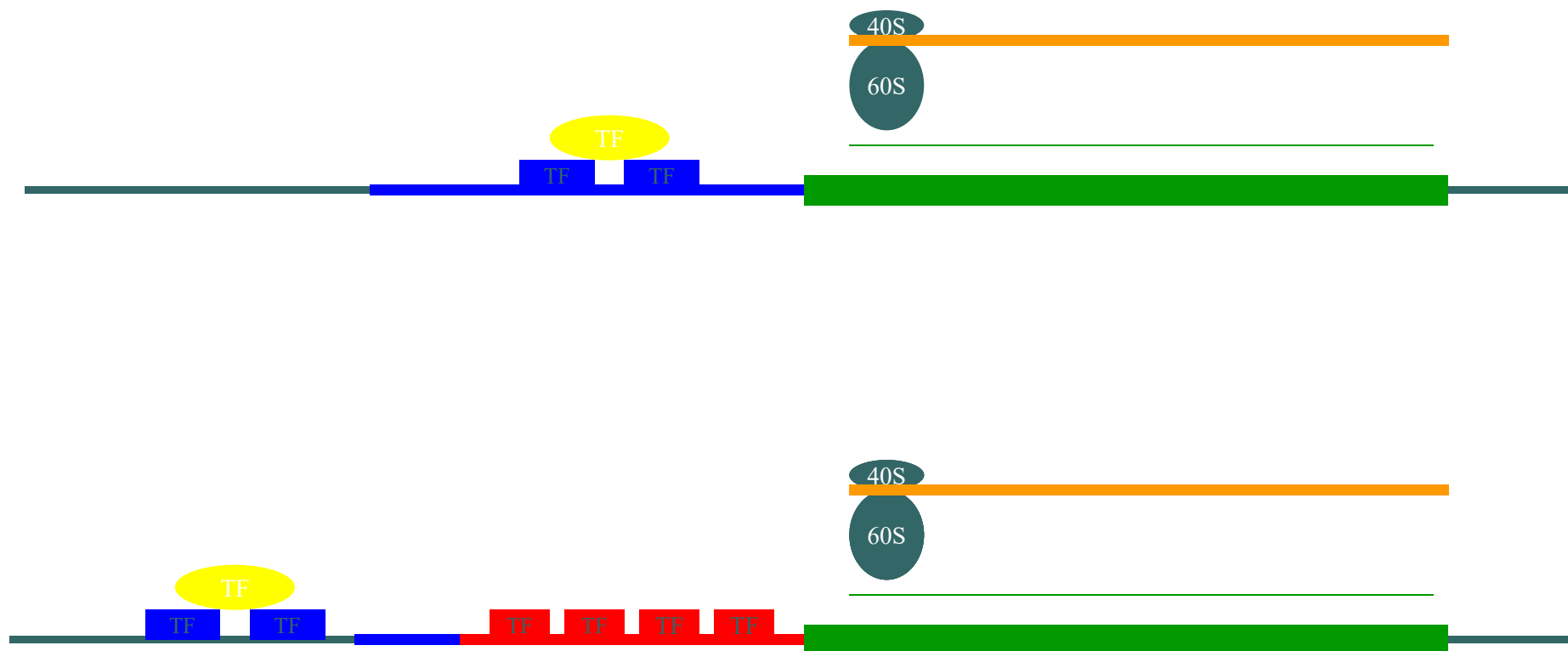
Osnova

- Metody analýzy genové exprese
 - Kvalitativní analýza exprese genů
 - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Využití dostupných dat ve veřejných databázích
 - Tkáňově a buněčně specifická analýza genové exprese
 - Kvantitativní analýza exprese
 - DNA a proteinové čipy
 - Next gen transkripční profilování
- Regulace genové exprese v identifikaci funkce genů
přístupy získané funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze

Gain-of-Function Approaches

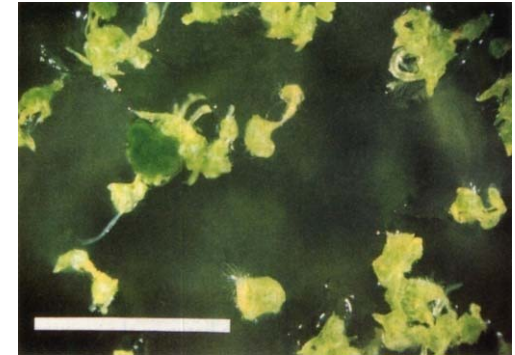
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů **získané funkce**
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inserce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
 - prvním krokem je příprava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

Activation Mutagenesis



Izolace genu *CKI1*

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



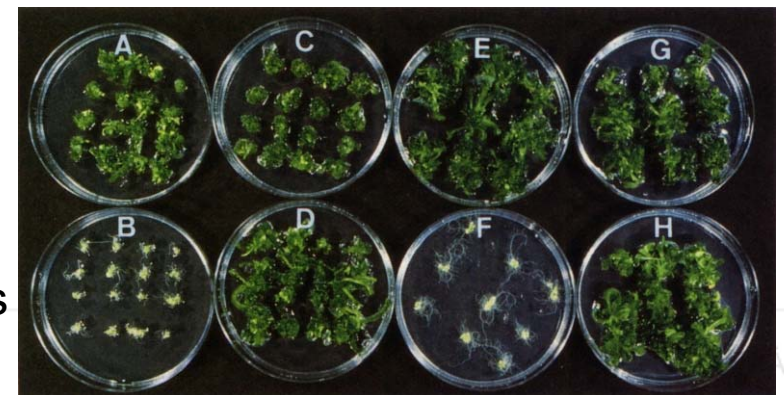
*

- mutantní fenotyp je fenokopii exogenní aplikace cytokininů (*CKI1*, C*YTO*K*ININ* I*NDEPENDENT* 1)

K1 plasmid rescue K2 35S::CK1 cDNA

t-zeatin

no hormones



*

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
 - přístup ziskane funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - Ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese

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

Regulated Expression Systems



activator
X



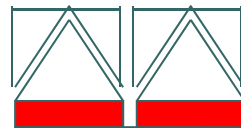
activator x reporter



reporter

35S

LhG4

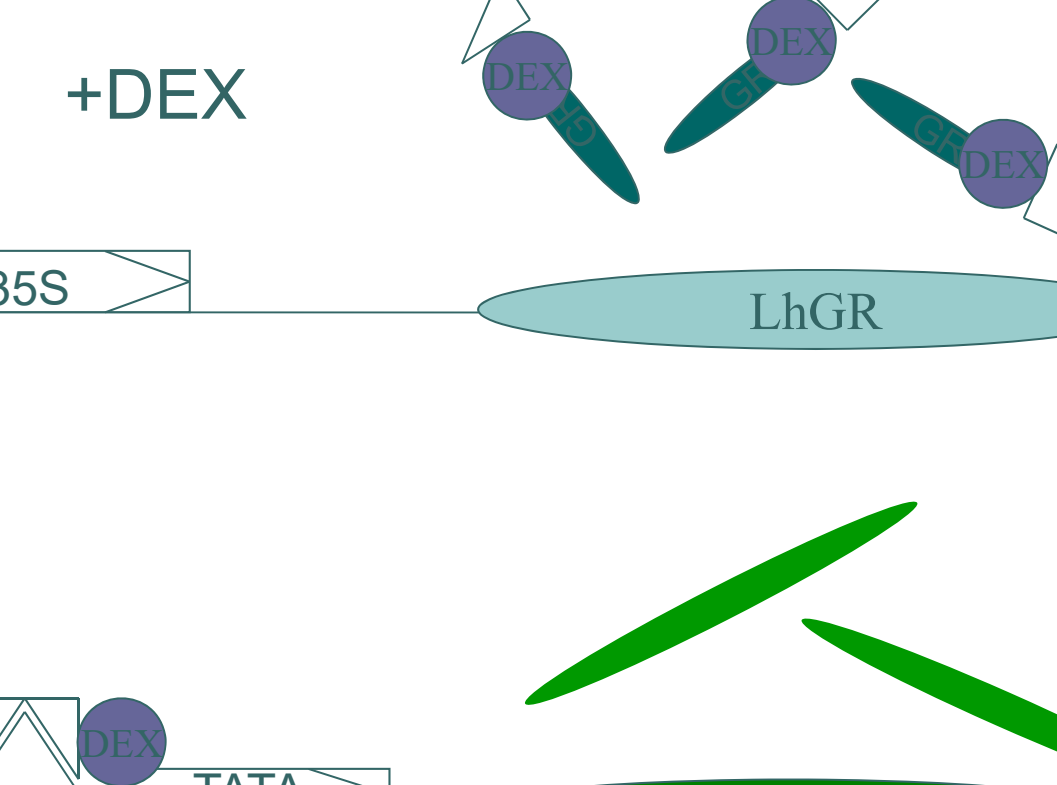


pOP

TATA

CKI1

A detailed botanical illustration of a plant, likely a species of Brassicaceae. The plant features a basal rosette of leaves with deeply lobed, pinnatifid leaves. Several upright, branched stems arise from the center, bearing small, light-colored flowers. The illustration is rendered in a classic scientific style with fine lines and shading to indicate texture and form.

A detailed botanical illustration of a plant, likely a species of *Thlaspi*. The plant features a central, upright stem with several smaller, branching stems. The leaves are green, serrated, and arranged in a basal rosette. Small, white, four-petaled flowers are visible at the ends of the stems. The root system is shown as a single, thick, taproot. The illustration is rendered in a classic scientific style with fine lines and shading.

The diagram illustrates the LhGR signaling pathway. The top part shows the LhGR protein (teal oval) with three DEX-bound GR proteins (purple circles) bound to it. The bottom part shows the CKI1 protein (green oval) with two DEX-bound GR proteins bound to it. The LhGR protein is shown with a 35S label. The CKI1 protein is shown with a TATA box and a pOP label.

Regulated Expression Systems



activator
X



activator x reporter



reporter

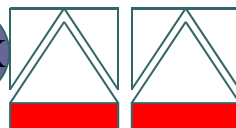
+DEX

35S

LhGR

wt Col-0

DEX



DEX

TATA

pOP

CKI1

4C

DEX



DEX

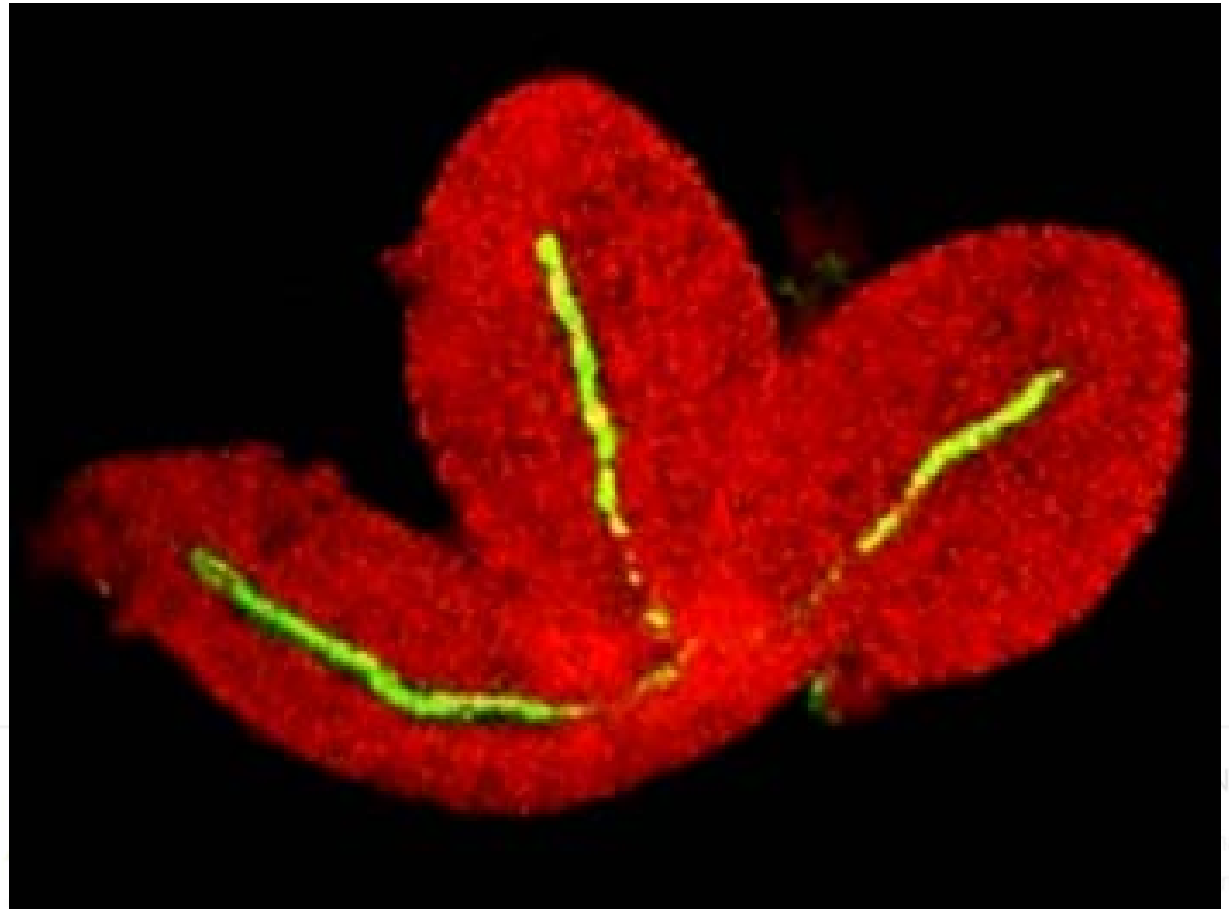
TATA

pOP

GUS

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



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
 - přístup ziskane funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - Ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Chemická genetika

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%**)

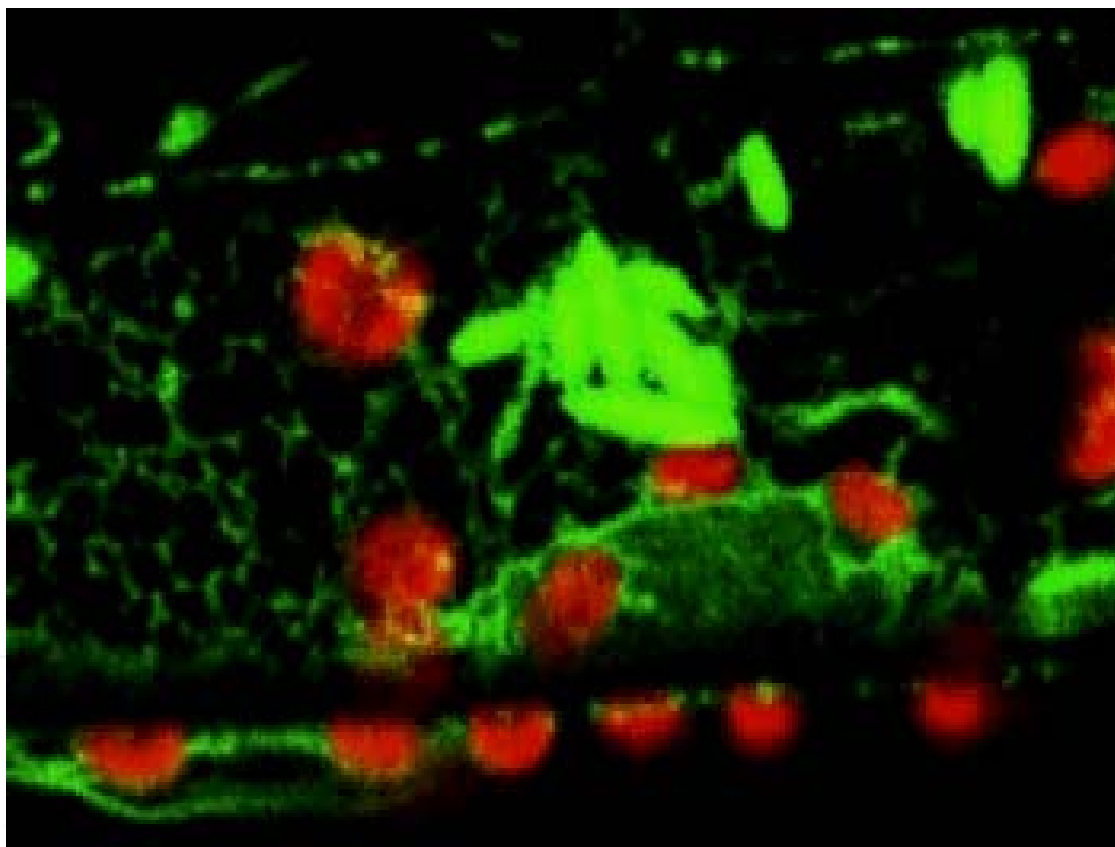
The screenshot displays the PubMed web interface with the search term 'chemical genetics'. The top navigation bar includes the NCBI logo, search filters, and a 'Sign in to NCBI' link. The search results page shows a list of articles, with the first result being 'Analysis of butterfly reproductive proteins using capillary electrophoresis and mass spectrometry' by Rokhas MK, Rönn JL, Wiklund C, and Emmer A. The page also features a 'Best matches for chemical genetics' section with links to related articles and a 'Search results' section with a list of items. The bottom of the page shows a Windows taskbar with various application icons and a system clock indicating 0:34 on 15.11.2018.

Chemical Genetics

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

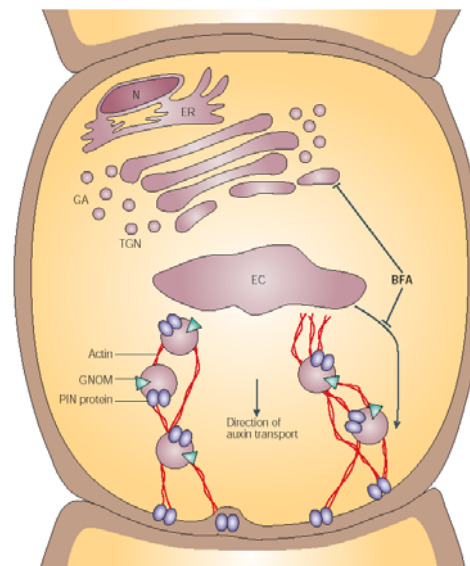
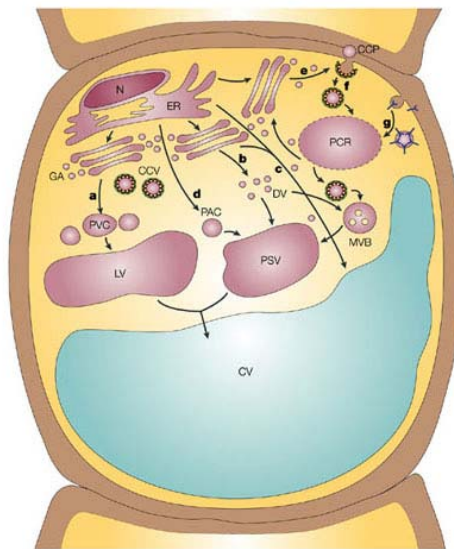
Chemical Genetics

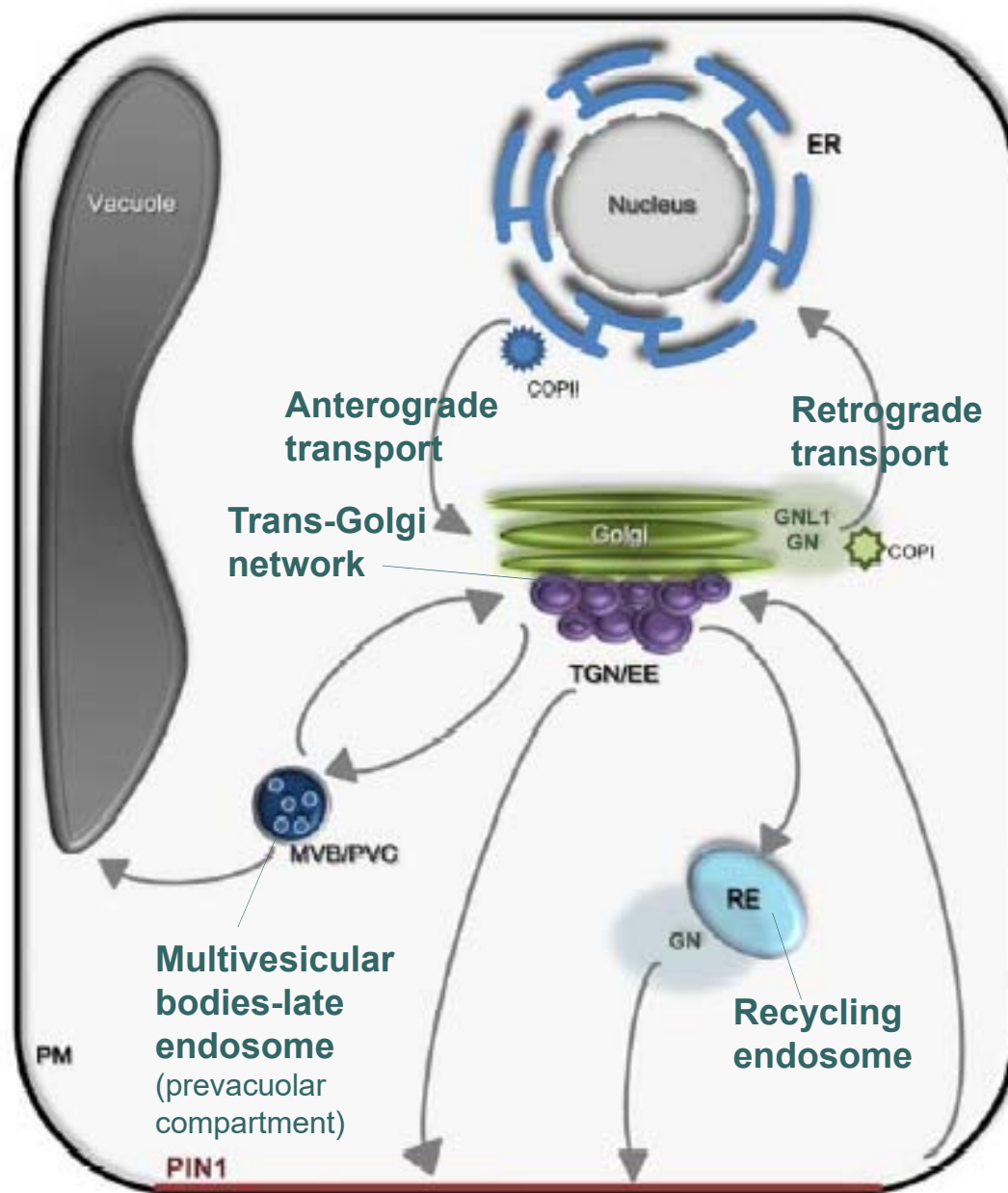
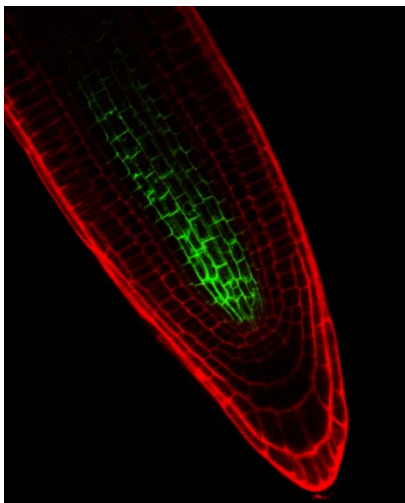
- Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupy chemické genetiky
 - v rostlinných buňkách dochází k velice dynamickým procesům, zprostředkovaným zejména tzv. endomembránovým transportem (viz film, GFP směřované do ER)



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





Richter et al., *E J Cell Biol* (2010)

Chemical Genetics

- Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupem chemické genetiky

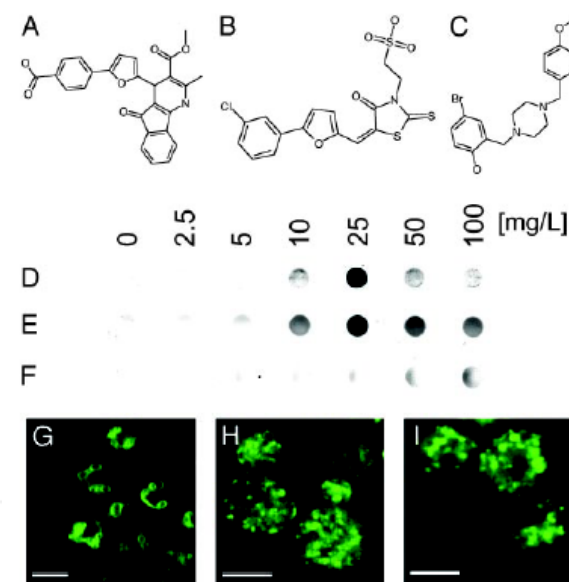
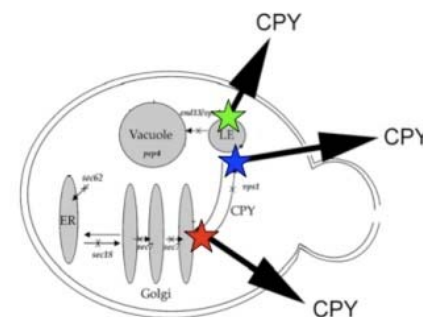
- pomocí vyhledávání v „knihovně“ chemických látek byly identifikovány takové, které vedou u kvasinek (*S. cerevisiae*) k sekreci enzymu (karboxipeptidázy Y), která je normálně transportována pomocí endomembránového transportu do vakuoly

- analýza změny sekrece pomocí dot-blotu a imunodetekce karboxipeptidázy Y v kultačním médiu pomocí monoclonálních protilátek

chemická struktura sortinů

Imunodetekce karboxypeptidázy

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



Chemical Genetics

- Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupů chemické genetiky

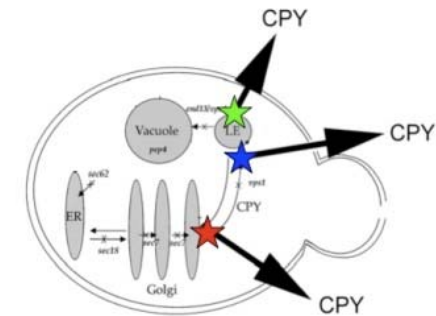
- pomocí vyhledávání v „knihovně“ chemických látek byly identifikovány takové, které vedou u kvasinek (*S. cerevisiae*) k sekreci enzymu (karboxipeptidázy Y), která je normálně transportována pomocí endomembránového transportu do vakuoly

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

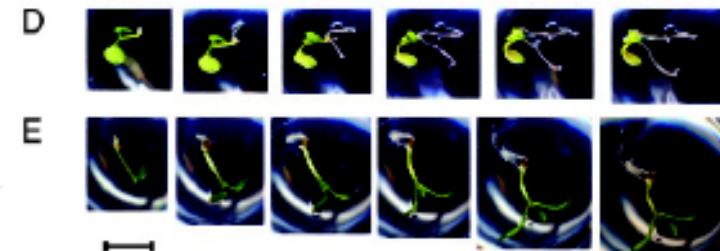
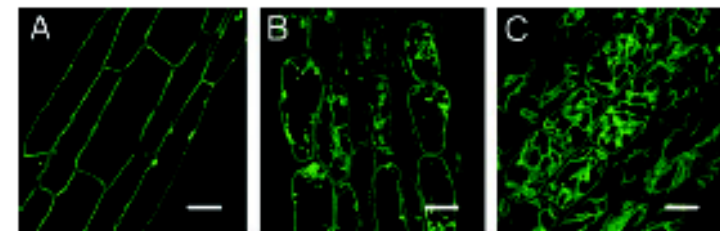
- identifikované látky („sortiny“) byly schopny vyvolat obdobné změny i u *Arabidopsis* - konzervované mechanismy transportu u kvasinek i u rostlin

- 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 hypo-senzitivní mutanti)



tvár rostlinných vakuol pomocí EGFP::TIP



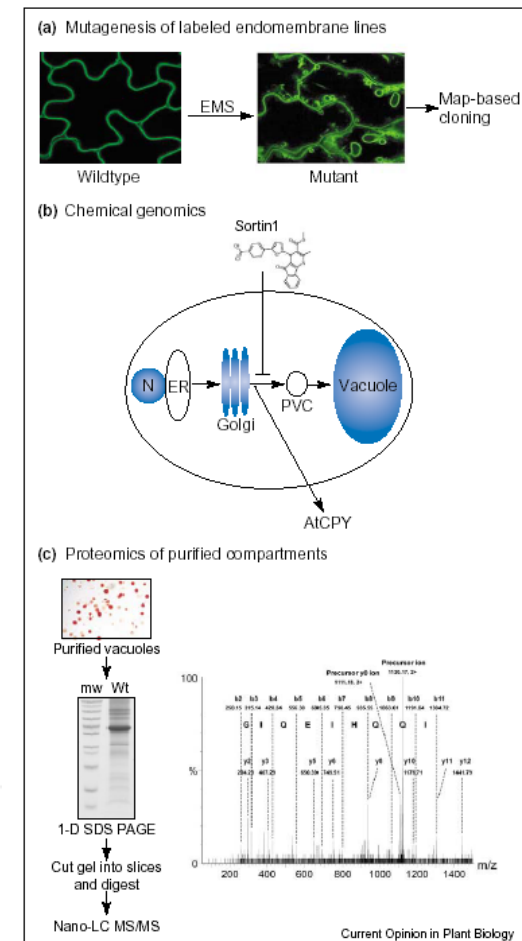
fenotyp semenáčků v přítomnosti sortinů

Zouhar et al., 2004

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 genetika v kombinaci s klasickou genetikou - identifikace proteinů zúčastňujících se regulace endomembránového transportu
- proteomické přístupy – identifikace a analýza proteomu vakuol



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
 - přístup ziskane funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - Ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Chemická genetika

Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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