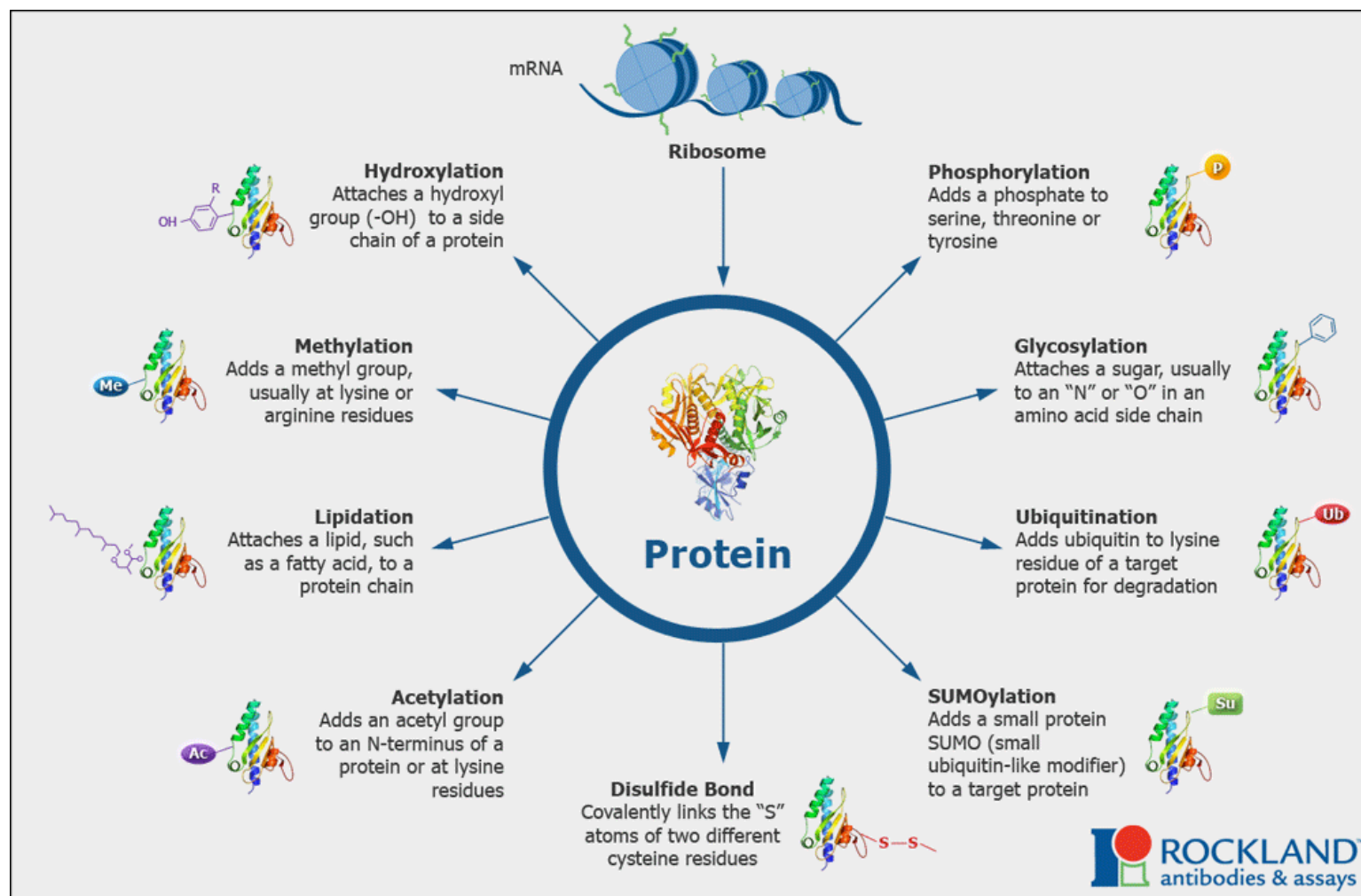


Analýza proteinových modifikací,
proteinových komplexů, manipulace
exprese proteinů a proteomika

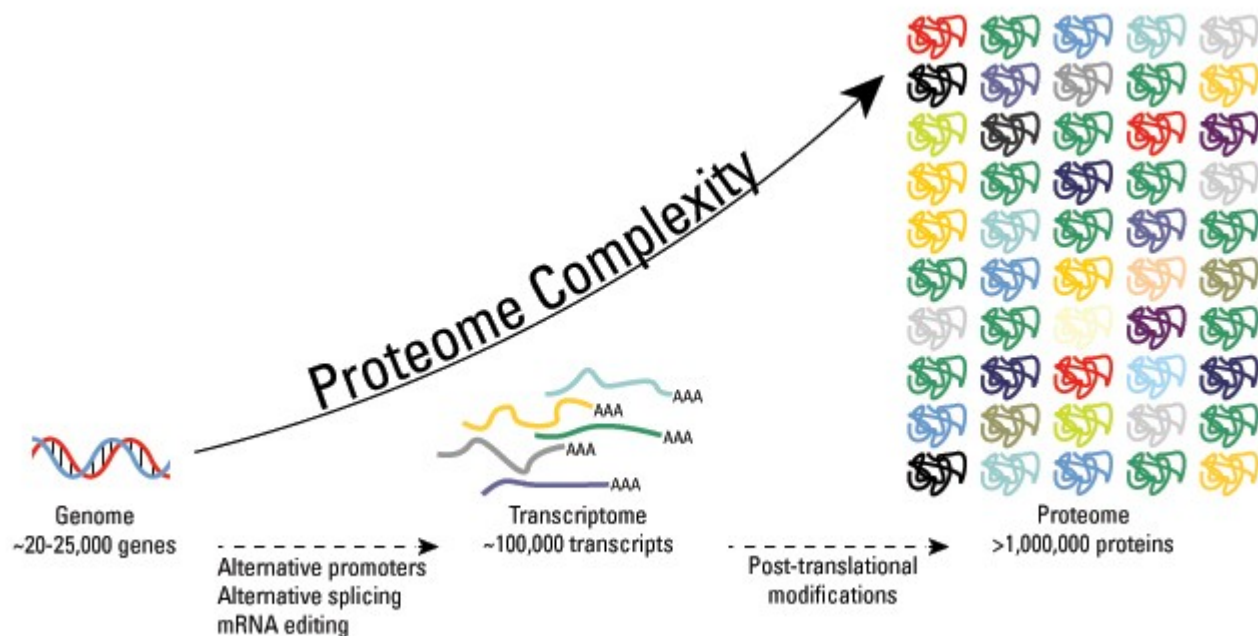
Post-translační modifikace (PTM) proteinů

- Úpravy proteinů po nebo během jejich syntézy ribozómy (translaci)
- Katalyzované enzymy
- Většinou kovalentní připojení funkční skupiny na postranní řetězec aminokyselin, případně na N- nebo C- konec proteinu
- Proteiny získávají nové vlastnosti (náboj, konformační změna...)



Post-translační modifikace (PTM) proteinů

- Výrazně zvyšují komplexnost proteomu
- Velký význam v signálních kaskádách (aktivace enzymů, změna interakčních partnerů...)



Typy PTM

Připojení chemické skupiny:

- Fosforylace
- Acetylace
- Hydroxylace
- Metylace

Připojení komplexní skupiny:

- Glykozylace
- Lipidace
- GPI kotva

Připojení polypeptidu:

- Ubiquitinace
- SUMOylácia

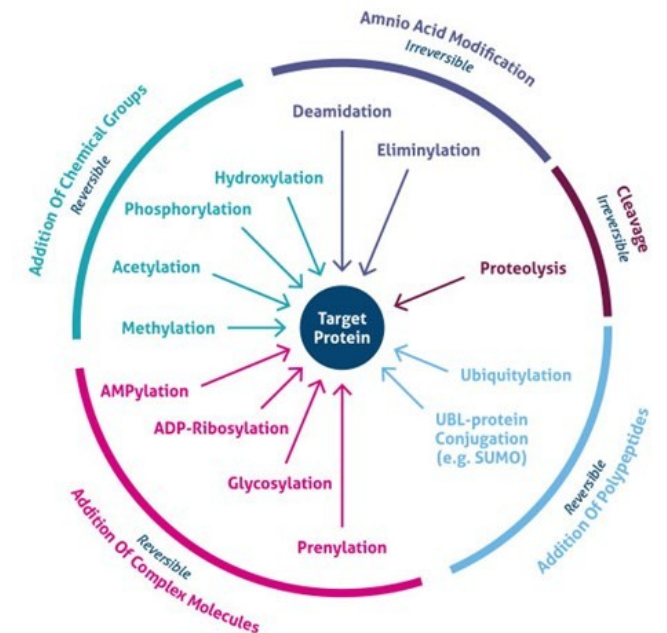
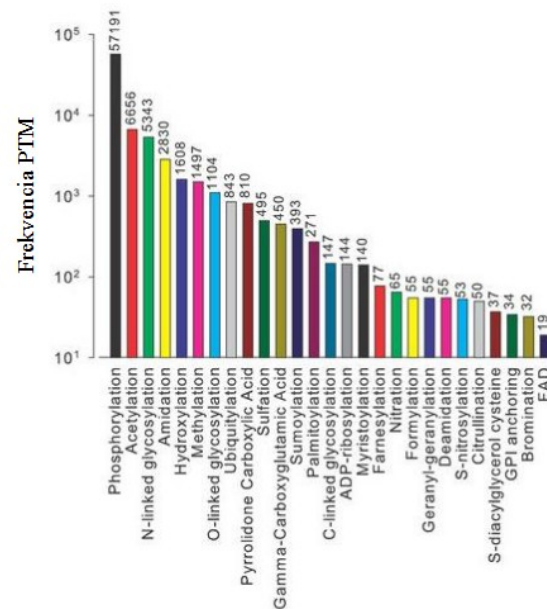
Změna aminokyseliny:

- Deamidace

Vytvoření disulfidické vazby

Štěpení proteinů:

- Proteolýza



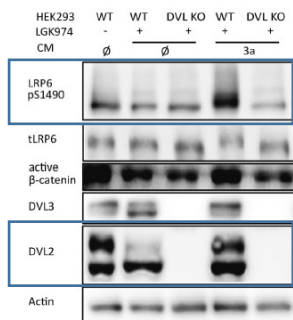
Osnova:

- Detekce modifikací na endogenních proteinech
- Biochemické principy experimentálních systémů určených pro globální detekci post-translačních modifikací
- Aplikace těchto postupů na biologické otázky
- Analýza komplexních proteinových směsí (hmotnostní spektrometrie)

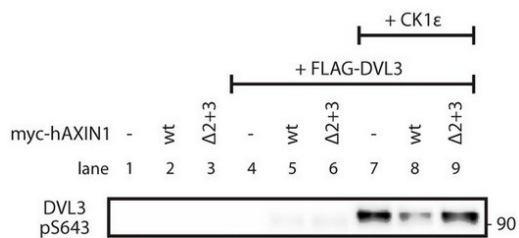
- „Vím, co hledám“ vs. „Nevím, co hledám (ale chci to najít)“

Fosfo-specifické protilátky

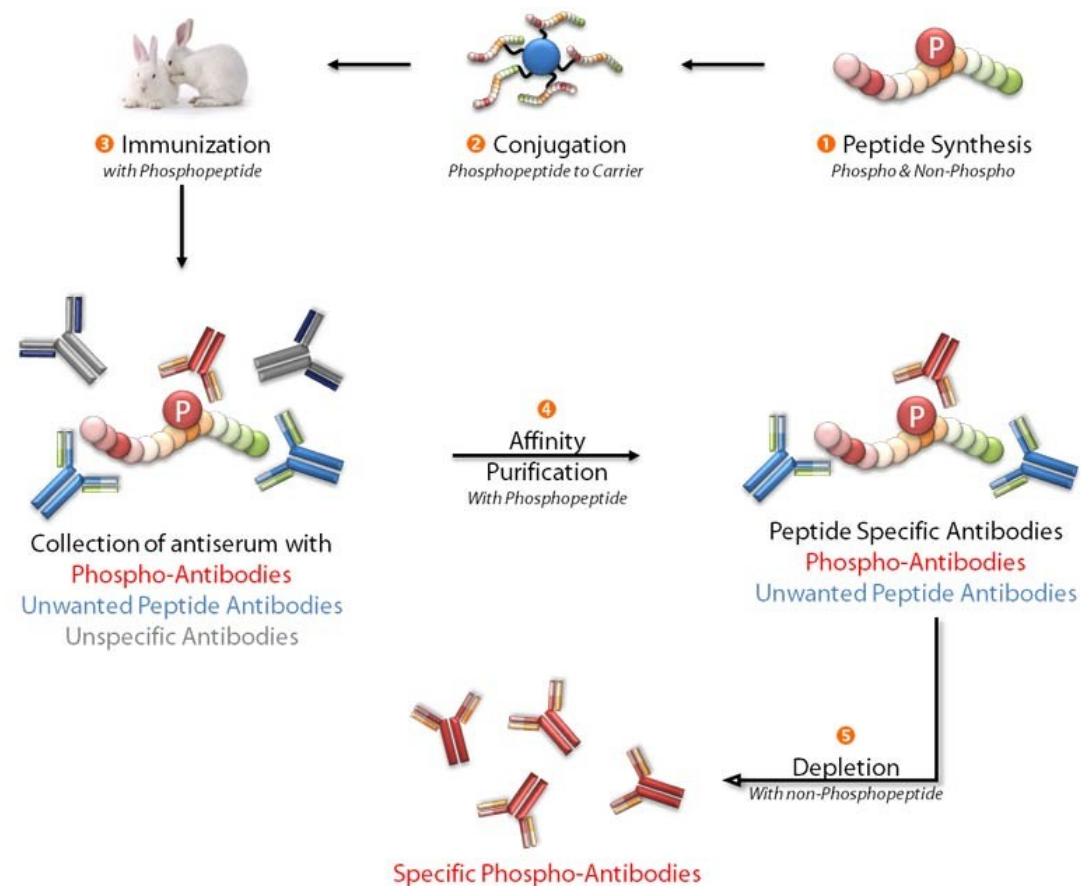
- Protilátky detekující proteiny fosforylované na specifickém místě
 - Studium aktivace signálních drah (pLRP6- aktivace Wnt/ β -kateninové dráhy)
 - Aktivace/inaktivace enzymů (fosforylovaná Glycogen syntáz kináza 3 β je neaktivní)
 - Umožnění vazby na jiné interakční partnery (proteiny obsahující 14-3-3 doménu se váží na specifické fosfoserinové a fosfothreoninové motivy)



Fosforylace koreceptoru LRP6 a proteinu Dishevelled po aktivaci Wnt3a detekováno WB



Fosforylace Dishevelled 3 (DVL3) S643 po přidání Casein kinázy 1 ϵ (CK ϵ) detekováno Western Blottingem

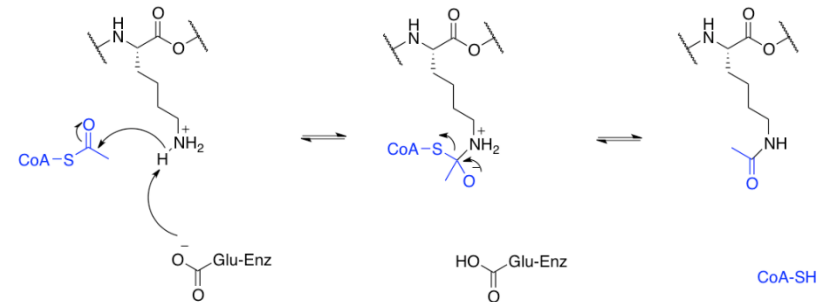
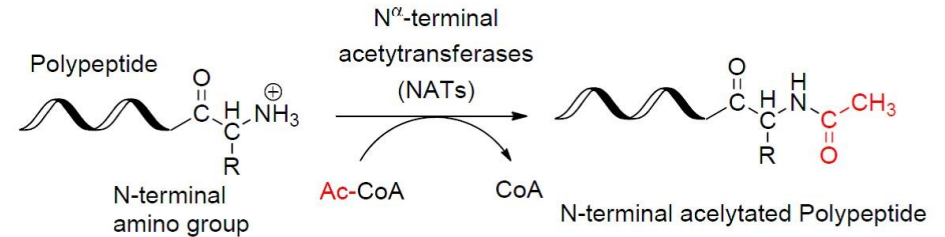


Acetylace

- N- koncová acetylace
 - Ko-translační modifikace
 - Až 85% lidských proteinů
- Vevnitř řetězce typicky na lyzinu
- Katalyzovaná enzymy:
 - **Acetyltransferázy** připojení acetylové skupiny (potřebný acetyl-koenzým A)
 - **Deacetylázy** odstranění acetylové skupiny

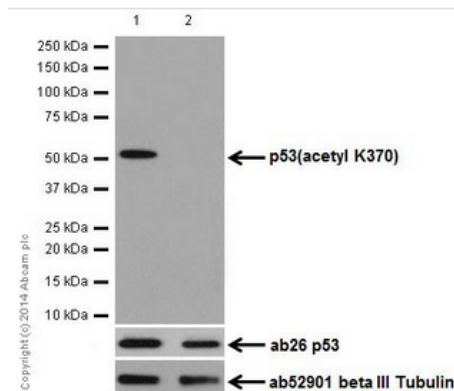
Význam:

- Regulace funkce, stability a lokalizácie proteinů
- Remodelace chromatinu (H4K16Ac – HAC vs. HDAC)-histonový kód
- Regulace cytoskeletu (acetylace tubulinu)



Protilátky proti acetylovaným formám proteinů

- Specifické pro acetylované proteinů
 - Acetylace transkripční faktorů mění jejich schopnost vázat se na DNA (př. acetylovaný p53- v reakci na stres zvýšená vazba na DNA)
 - Acetylace může umožnit vazbu jiných interakčních partnerů (př. c-Jun)
 - Acetylace může regulovat lokalizaci proteinů (HNF-4 v jádře)

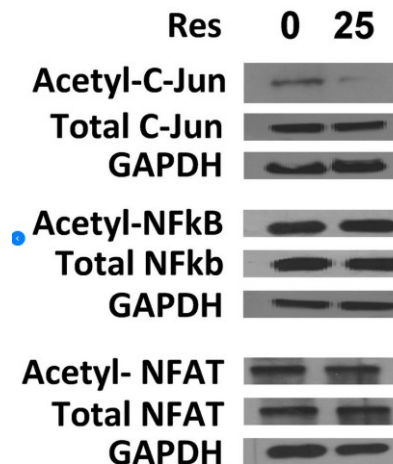


All lanes : Anti-p53 (acetyl K370) antibody [EPR17496] (ab183544) at 1/1000 dilution

Lane 1 : HepG2 (human hepatocellular carcinoma) treated with Etoposide 20uM and Trichostatin A 500 nM for 6 hours whole cell lysates

Lane 2 : HepG2 (human hepatocellular carcinoma) untreated whole cell lysates

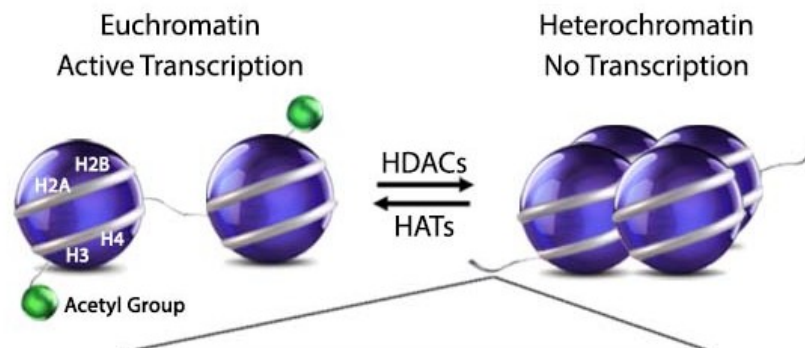
Lysates/proteins at 10 µg per lane.



Resveratrol enhanced the acetylase activity of Sirt1 on c-Jun. The cell lysate of activated T cells was precipitated with antibodies against c-Jun, NF- κ B, or NFAT, blotted with anti-acetylase antibody, and then blotted with antibodies against c-Jun, NF- κ B, NFAT, and GAPDH as references. The pictures are representative of three more repetitions. doi: 10.1371/journal.pone.0079199.g004

Modifikace histonů-histonový kód

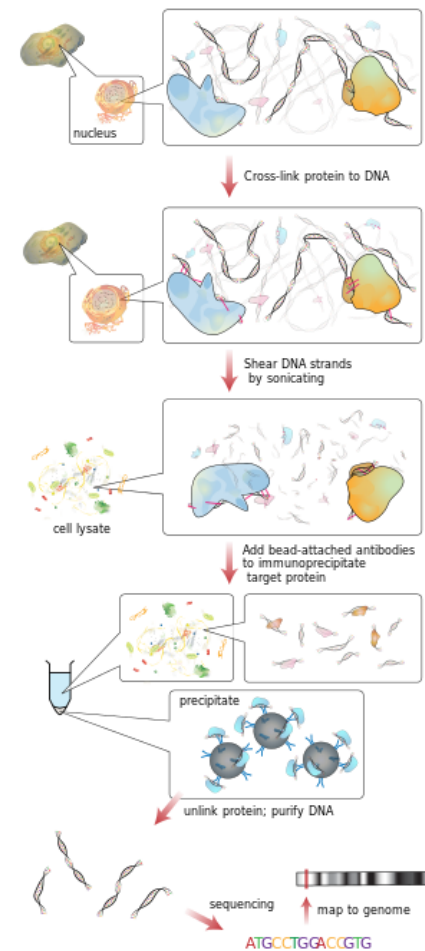
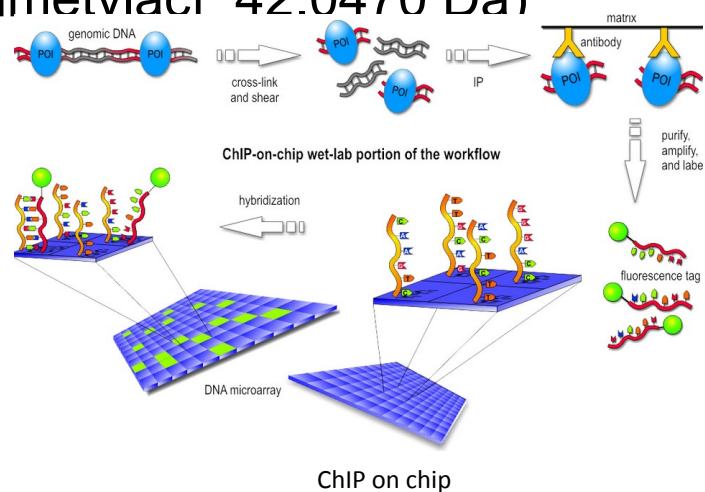
- PTM histonů (metylace, fosforylace, acetylace, ubiquitinace a sumoylace)
- Ovlivňují náboj a tím mění sílu vazby mezi histony a DNA a interakce mezi histony a regulačními proteiny → epigenetické regulace přepisu genů



Type of modification	Histone							
	H3K4	H3K9	H3K14	H3K27	H3K79	H3K122	H4K20	H2BK5
mono-methylation	activation ^[6]	activation ^[7]		activation ^[7]	activation ^{[7][8]}		activation ^[7]	activation ^[7]
di-methylation	activation	repression ^[3]		repression ^[3]	activation ^[8]			
tri-methylation	activation ^[9]	repression ^[7]		repression ^[7]	activation, ^[8] repression ^[7]			repression ^[3]
acetylation		activation ^[9]	activation ^[9]	activation ^[10]		activation ^[11]		

Detekce modifikace histonů

- Protilátky detekující modifikované formy histonů a následná analýza pomocí WB nebo fluorescenčních metod
- Chromatinová Immunoprecitace (ChIP)- izolace proteinu společně s navázanou DNA pomocí specifických protilátek a možnost lokalizace v rámci genomu (modifikace Chip on chip assay)
- Detekce nových modifikací pomocí hmotností spektrometrie-umožňuje detekci, ale i charakterizaci modifikace (př. rozdíl mezi acetylací 42.0106 Da a trimetylací 42.0470 Da)

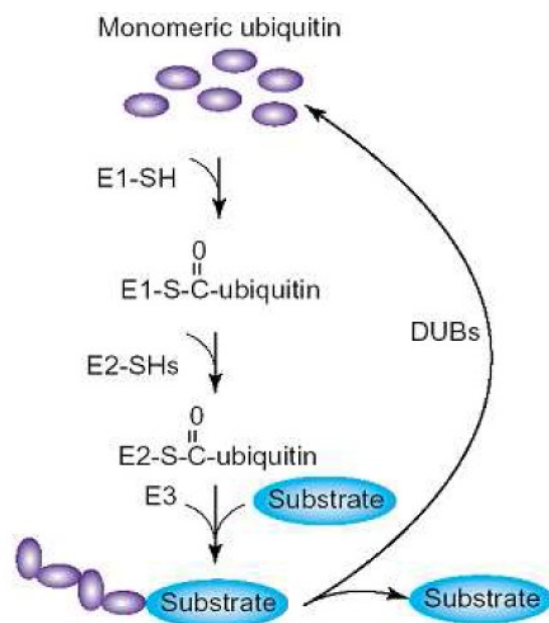


Chromatinová immunoprecitace

Ubikvitinace

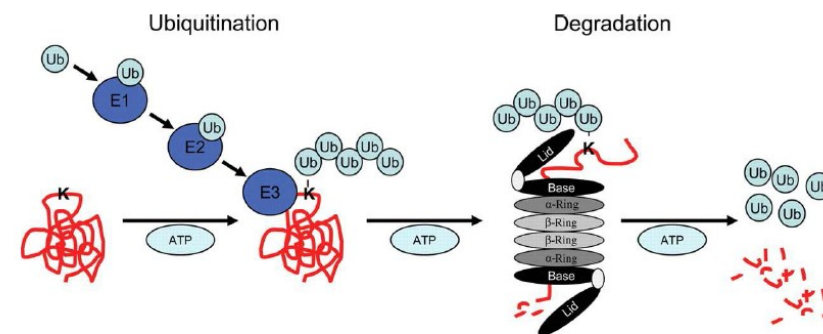
- Připojení ubikvitinu na lyzin daného proteinu

1. Tvorba thioesterové vazby mezi C-koncovým glycinem Ub a cysteinem v aktivním místě enzymu E1
2. Přímý přenos Ub na E2
3. Přenos Ub na epsilon-aminoskupinu lysinu substrátu
4. DUBs (deubikvitinační enzymy) jsou cysteinové proteázy, které specificky štěpí konjugáty Ub – antagonizují E3



- Význam

- stabilita proteinů
- buněčná lokalizace
- biologická aktivita



Detekce ubikvitinovaných proteinů

- Využití anti-ubikvitin protilátek
 - His-ubikvitin pull down
 - Immunoprecipitace ubikvitinu

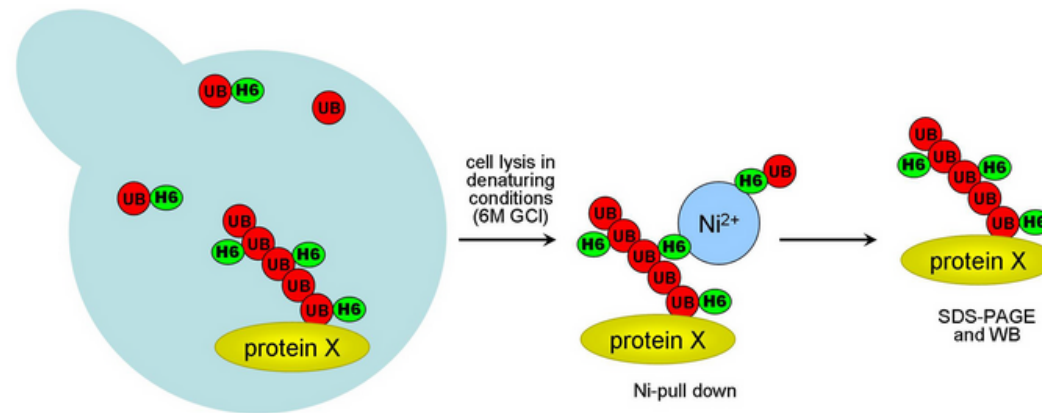


Figure 3. Principles of His-ubiquitin pulldown of ubiquitinated proteins from crude cellular extracts. Exogenous His6-tagged (green H6) ubiquitin (red UB) is expressed in cells. The cells are lysed and His6-ubiquitinated proteins are purified with Ni-resin. Ni-eluates are analyzed by western blot with an antibody against a protein of interest.

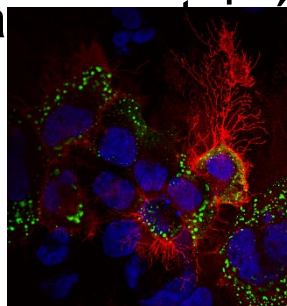
Proteiny fungují v komplexech

- Proteinové komplexy jsou skupiny proteinů, které spolu interagují v určitém čase a místě a hrají důležitou roli při regulaci buněčných procesů a signálních kaskád

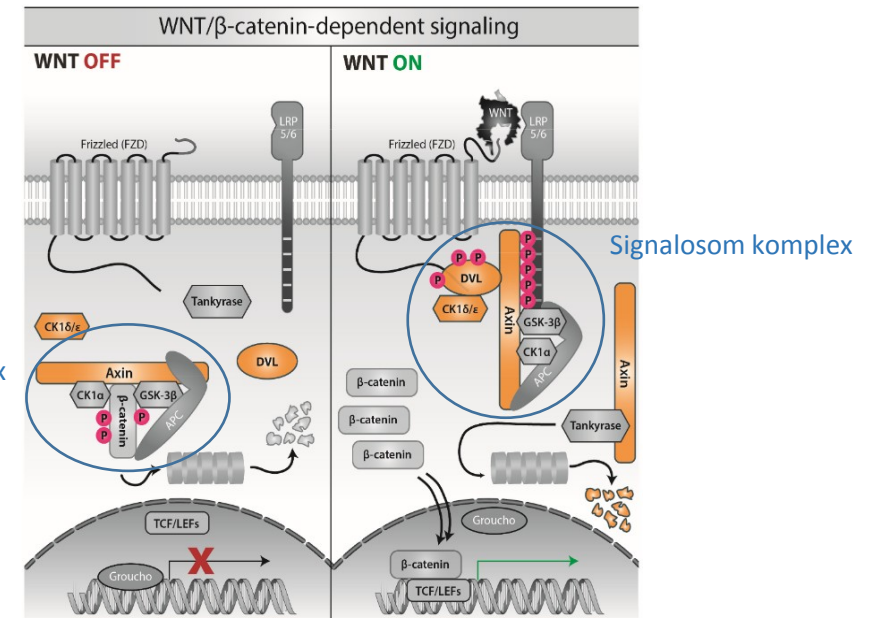
- Jsou dané proteiny ve vazbě?
 - Immunoprecipitace
 - Hmotností spektrometrie
 - BioID metody
 - Afinitní chromatografie
 - Tandemová afinitní chromatografie

- Jsou proteiny lokalizováni v určitém místě?

- Immunocytochemie
- Immunohistochemie



Imunocytochemie-proteiny spolu nekolokalizují
červeně Neuropilin, zeleně Dishevelled,
modře jádro.



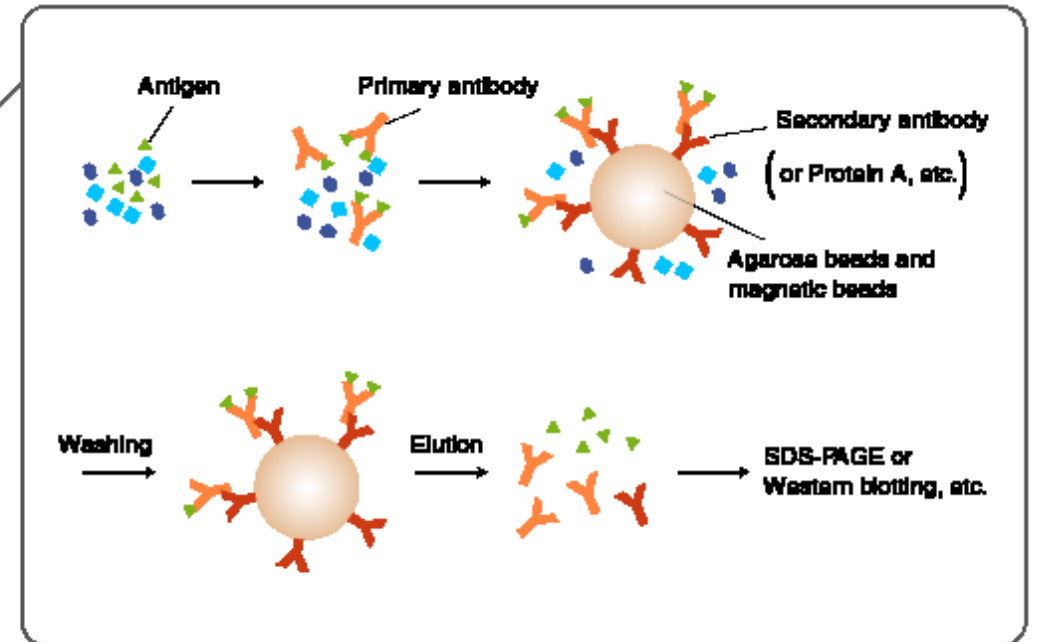
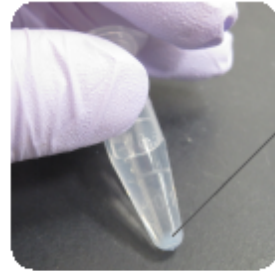
Destrukční komplex

Signalosom komplex

Destrukční komplex fosforyluje β -katenin, který je následně rozložen v proteozomu. Po aktivaci Wnt ligandem se destruktivní komplex rozpadá a vzniká nový signalosom komplex na vnitřní straně membrány. β -katenin může být translokován do jádra spustit transkripci cílových genů.

Immunoprecipitace (IP)

- Purifikace proteinu pomocí protilátky
1. Lyze buněk (v lyzačním pufru)
 2. Odstranění nerozpustných částic centrifugací
 3. Inkubace s primárními protilátkami
 4. Inkubace s kuličkami (agarózové, sefarózové, magnetické...), které na sebe naváží primární protilátku (typicky pomocí A/G proteinu)
 5. Promývání (lyzačním pufrem)
 6. Eluce (glycin, SDS nebo močovina)



Immunoprecipitace složení pufrů

Lyzační pufr:

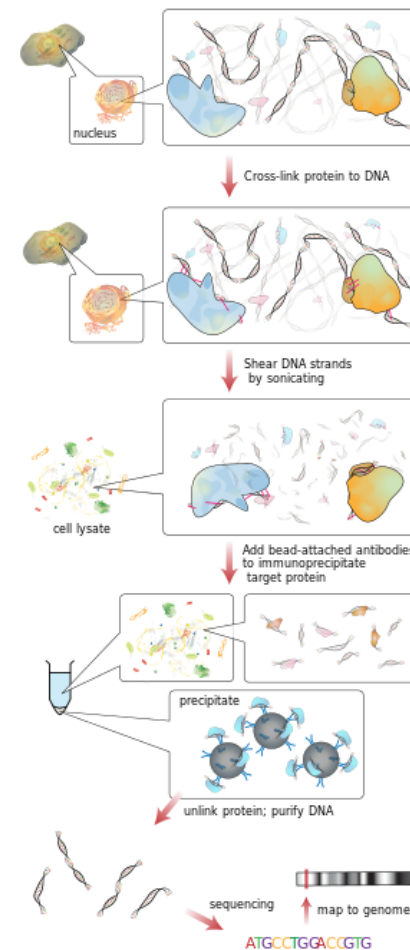
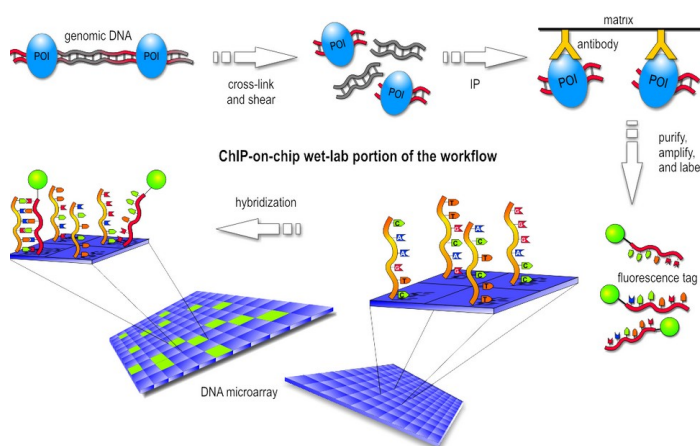
- Pufrovací systém – pro udržení požadovaného pH (např. 50mM Tris pH=8)
- Soli – úprava iontové síly (např. 150mM NaCl)
- Detergent – rozbití membránových struktur, při zachování proteinových komplexů (napr. 0,2% NP-40)
- Chelatační činidlo – odstranění iontů (Mg^{2+} , Ca^{2+} ...), které jsou často kofaktorem proteáz (např. 1mM EDTA)
- Redukční činidlo – prevence oxidačního poškození proteinů, redukce disulfidických vazeb (např. 1mM DTT)

Eluční pufr:

- Pufrovací systém (50mM Tris pH=8)
- Detergent (2% SDS)
- Redukční činidlo (5% β -Mercaptoethanol)

ChIP – chromatinová imunoprecipitace

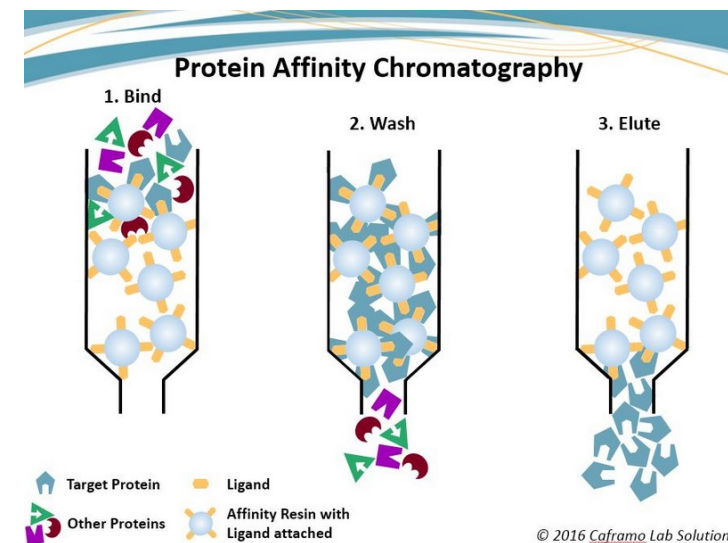
- Chromatinová Immunoprecipitace (ChIP)- izolace proteinu společně s navázanou DNA pomocí specifických protilátek a možnost lokalizace v rámci genomu (modifikace Chip on chip assay)
- U proteinů vážících DNA
- Možno zkombinovat s PTM-specifickými protilátkama – např. histonový kód



Chromatinová imunoprecipitace

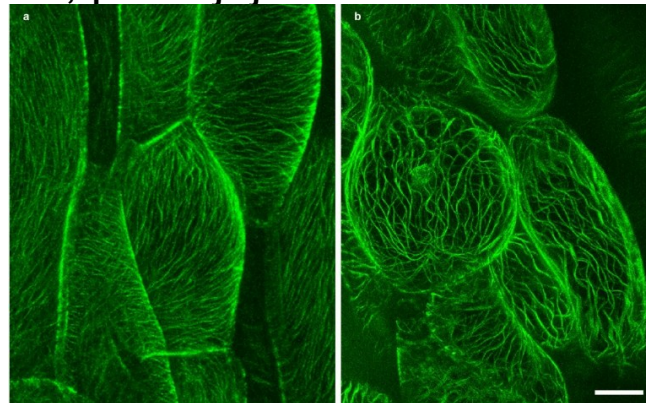
Afinitní purifikace

- umožňuje oddělit z komplexní směsi skupinu příbuzných proteinů nebo jeden určitý protein
- imobilizovaný ligand reagující specificky s proteinem našeho zájmu a tvoří silnou vazbu, zbytek směsi protéká kolonou beze změny, navázaný protein se následně eluuje z imobilizovaného ligandu pomocí vysoce koncentrovaného roztoku solí nebo i roztokem s rozpustnou formou ligandu
- Časté využití proteinových tagů
 - Peptidové sekvence přidané k rekombinantním proteinům
 - Často mohou být z proteinů odstraněny chemicky nebo enzymaticky



Hlavní typy tagů

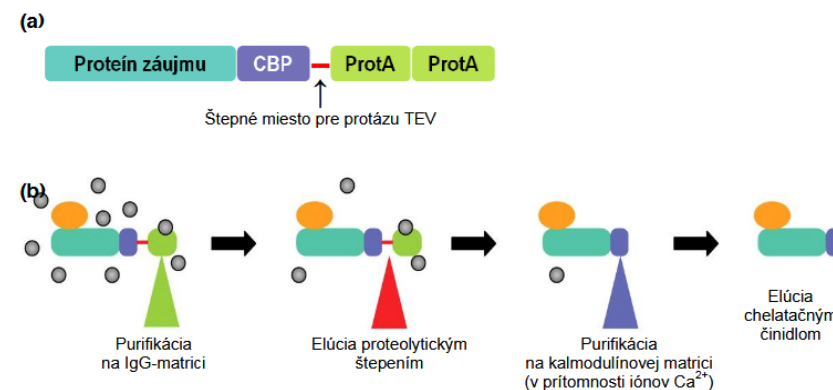
- Afinity tagy- využívány při AC, proteiny s tímto typem tagů mohou být jednoduše purifikovány pomocí AC
 - Strep-tag- (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys)- vazba na Biotin
 - glutathione-S-transferase (GST)- vazba na glutathion
 - poly(His) tag – alespoň 6 His zbytků, afinita ke kovové matici (př. Nikl)
- Tagy upravující rozpustnost proteinů- důležité při produkci rekombinantních proteinů
 - thioredoxin (TRX)
- Chromatografické tagy- využívány při chromatografických metodách
 - FLAG-tag
- Epitope tagy- jsou krátké peptidové sekvence, které jsou velmi dobře detekovatelné komerčními protilátkami- často odvozené z virových genů, proto jejich silná imunoreaktivita, často využívány při WB a IF metodách
 - V5-tag-GKPIPNPLLGLDST
 - Myc-tag-EQKLISEEDL
 - HA-tag-YPYDVPDYA
 - FLAG-tag - DYKDDDDK
- Fluorescenční tagy
 - GFP
 - RFP, BFP a další



(GFP)-tagged microtubules (GFP-MAP4)

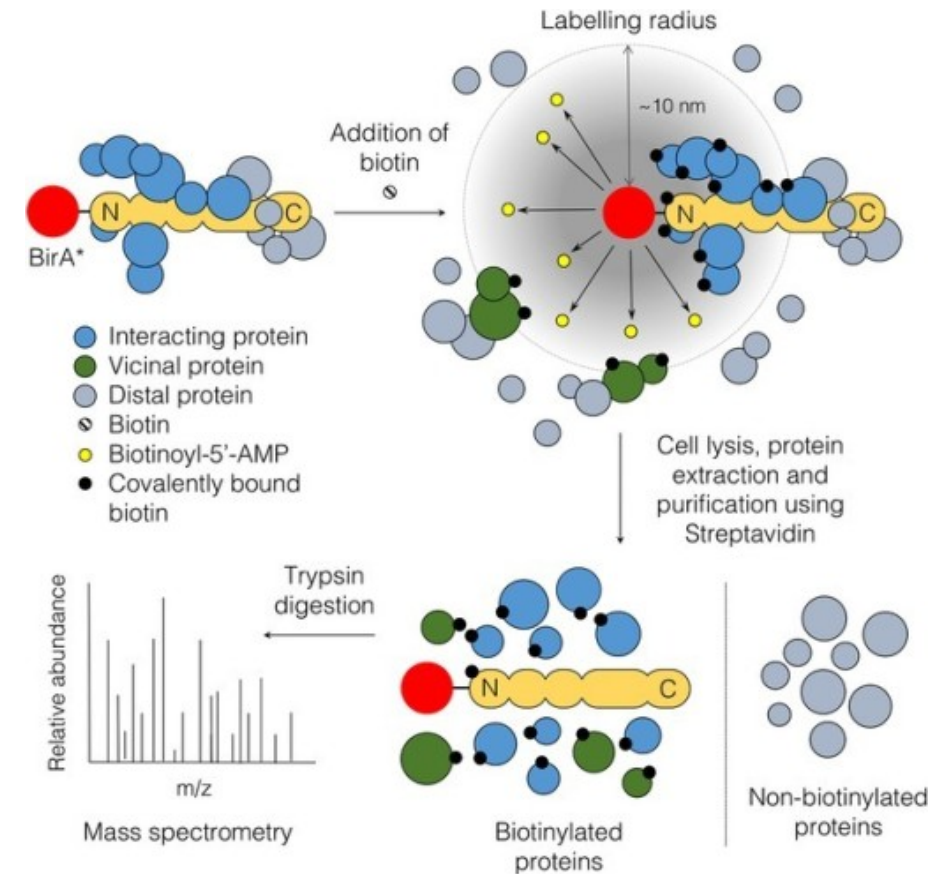
Tandemová afinitní purifikace

- Studium protein-proteinových interakcí
- Fúzní protein, který má na svém konci dva tagy
- V prvním kroku purifikace se náš protein vypurifikuje díky prvnímu tagu, který je po eluci enzymaticky odštěpen a následuje druhá purifikace využívající následující tag



BioID

- Unikátní metoda pro studium fyziologicky relevantních protein-proteinových interakcí v živých buňkách
- Tvorba fúzního proteinu s promiskuitní bakteriální biotin ligázou (BirA)- biotinyluje všechny proteiny v její bezprostřední blízkosti. Po expresi BirA-fúzního proteinu v buňkách se biotinylují všechny proteiny, které s BirA-fúzním proteinem interagovaly. Biotinylované proteiny mají vysokou afinitu, ke streptavidinu → detekce pomocí WB nebo hmotností spektrometrie
- Detekují se i dynamické vazby mezi proteiny

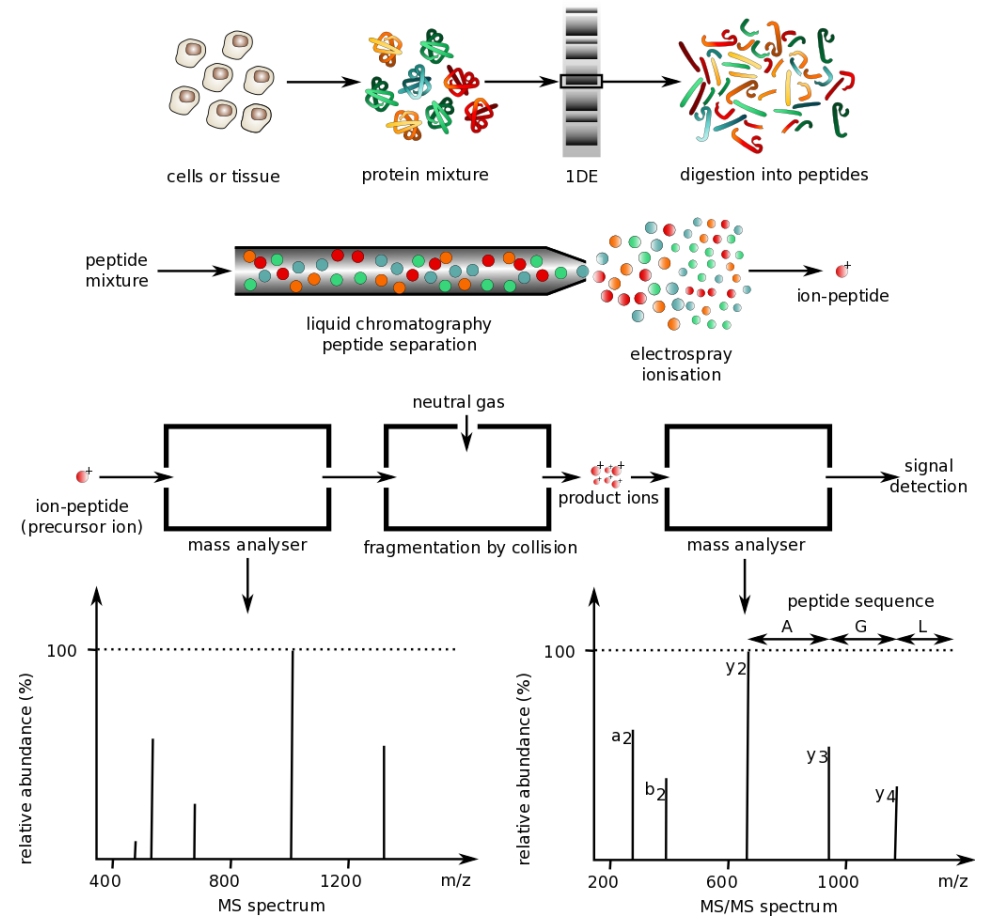


Po purifikaci následuje detekce

- Western blotting (pokud vím, co chci detekovat a mám na to protilátku)
- Hmotnostní spektrometrie (MS/MS) – analytický přístup pro určení složení komplexních proteinových směsí

Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry MS)

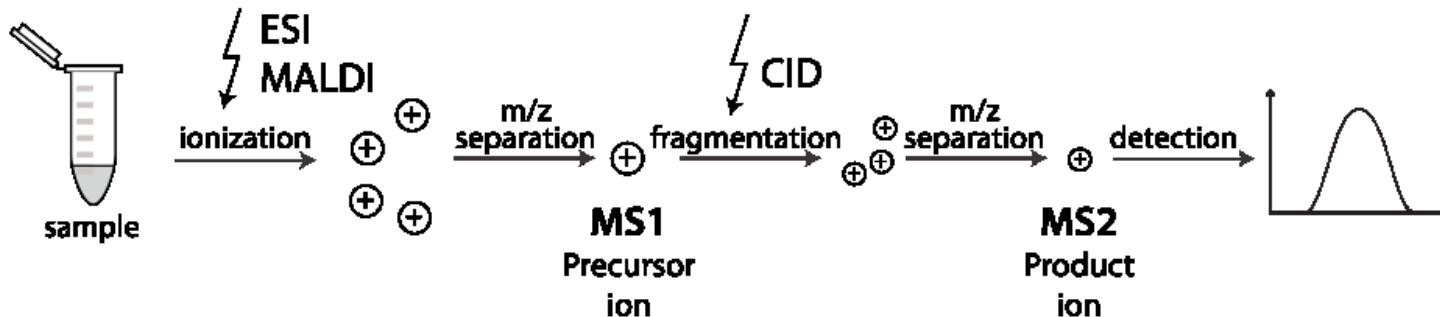
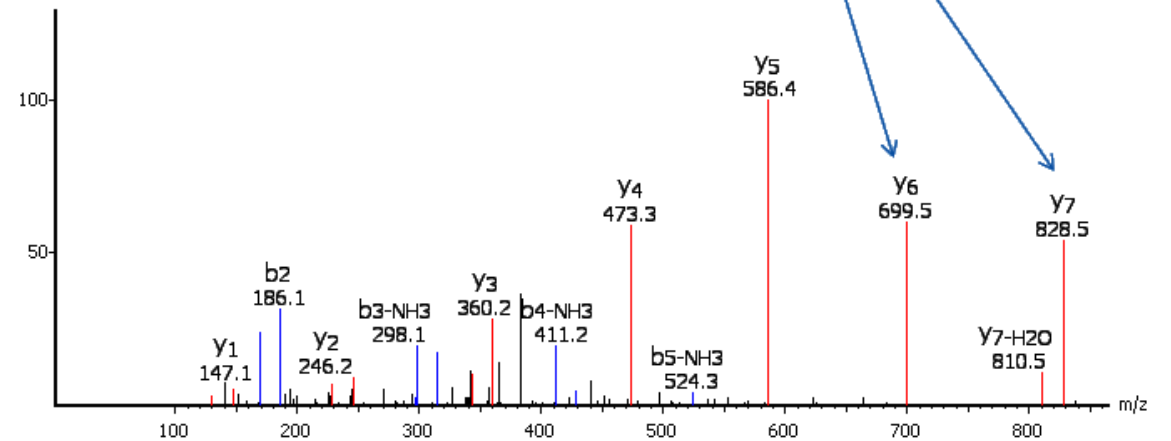
- Umožňuje zanalyzovat všechny proteiny a jejich PTM v určitém čase a místě
 - Rozdělení částic podle jejich hmotnosti a náboje (m/z)
1. Příprava vstupního materiálu (proteiny po IP, SDS PAGE...)
 2. Štěpení na oligopeptidy (např. pomocí trypsinu)
 3. Ionizace peptidů (paprsek elektronů, elektrosprej, laser...)
 4. Rozdělení podle m/z (sektorový magnetický analyzátor, orbitrap, TOF...)
 5. Detektor částic
- Při MS/MS:
5. Fragmentace peptidů
 6. Rozdělení podle m/z (orbitrap, TOF...)
 7. Detektor částic



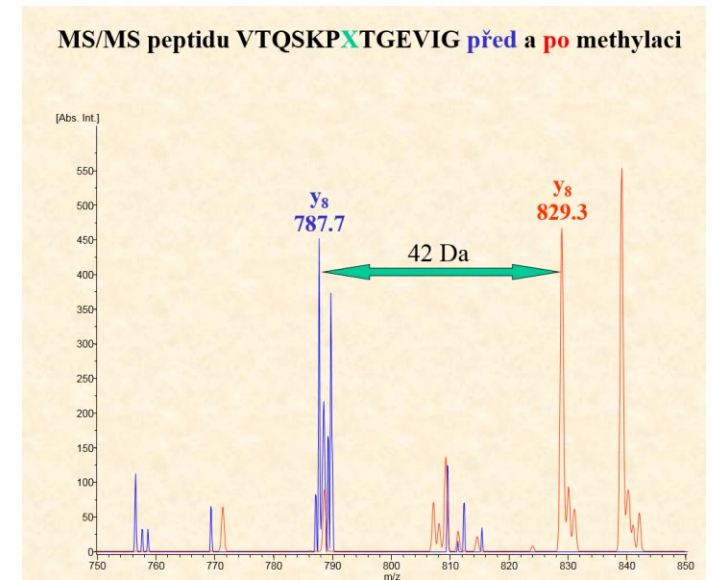
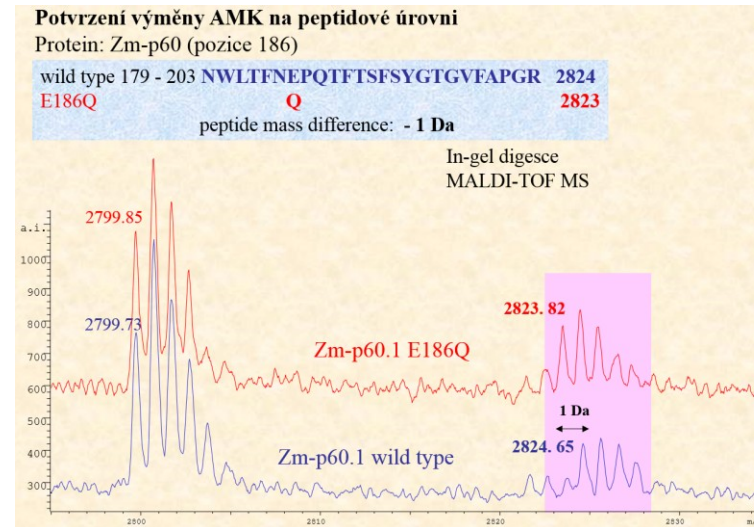
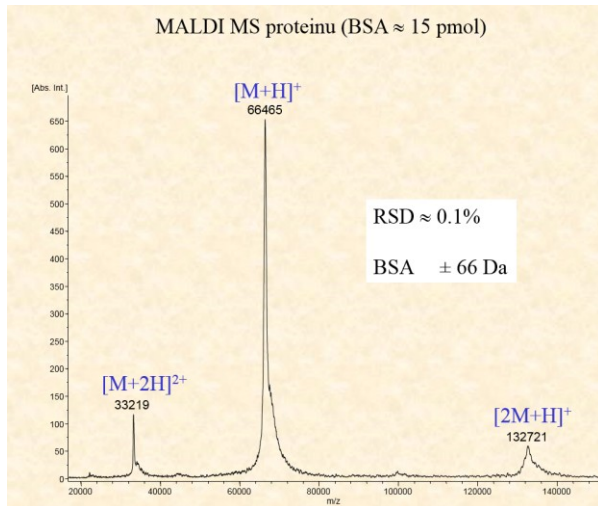
Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)

- Odseparované částice je možné použít na „další kolo“ hmotnostní spektrometrie
- Separované částice jsou fragmentované – například pomocí kolize s neutrálními molekulami (He, N...) po jejich urychlení (Collision-induced dissociation - CID)
- Fragmentované částice jsou znovu separované podle m/z a detekované detektorem

b ₁	A NELLLNVK	Y ₈
b ₂	AN ELLLNVK	Y ₇
b ₃	ANE LLLNVK	Y ₆
b ₄	ANEL LLNVK	Y ₅
b ₅	ANELL LNVK	Y ₄
b ₆	ANELLL NVK	Y ₃
b ₇	ANELLLN VK	Y ₂
b ₈	ANELLNV K	Y ₁

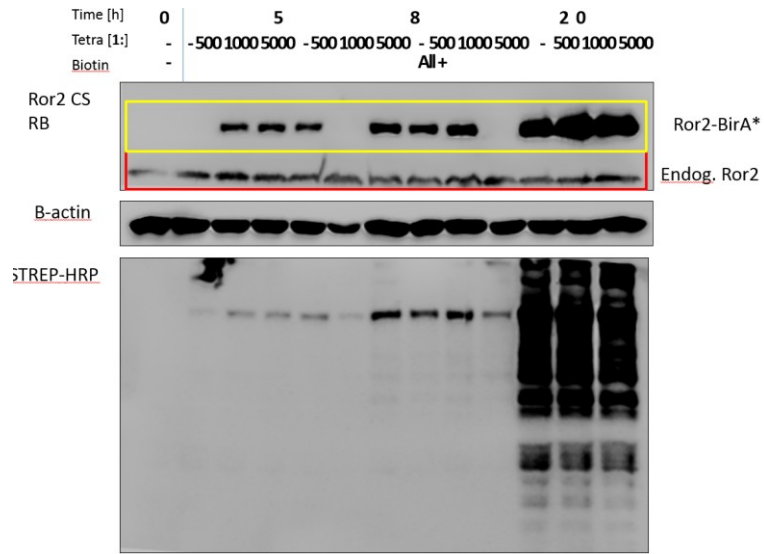


Analýza MS spektra



(Z. Zdráhal)

BioID

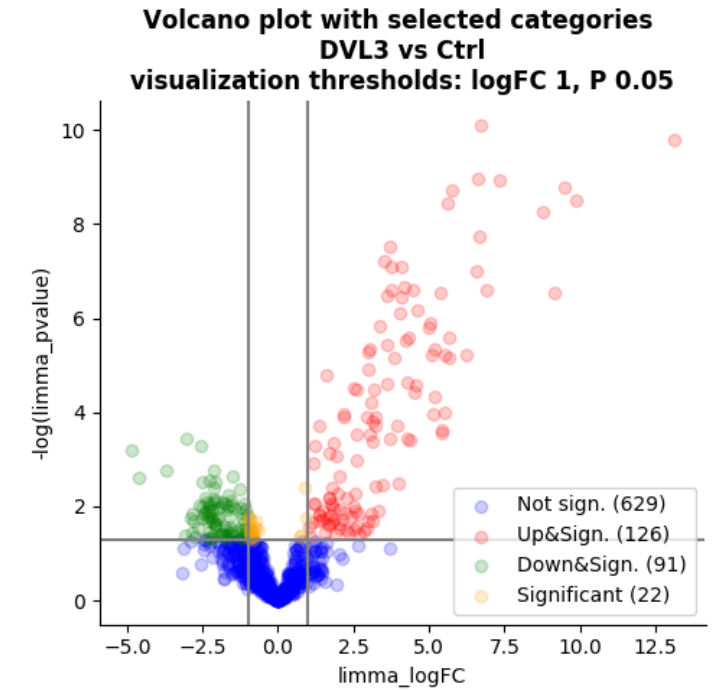
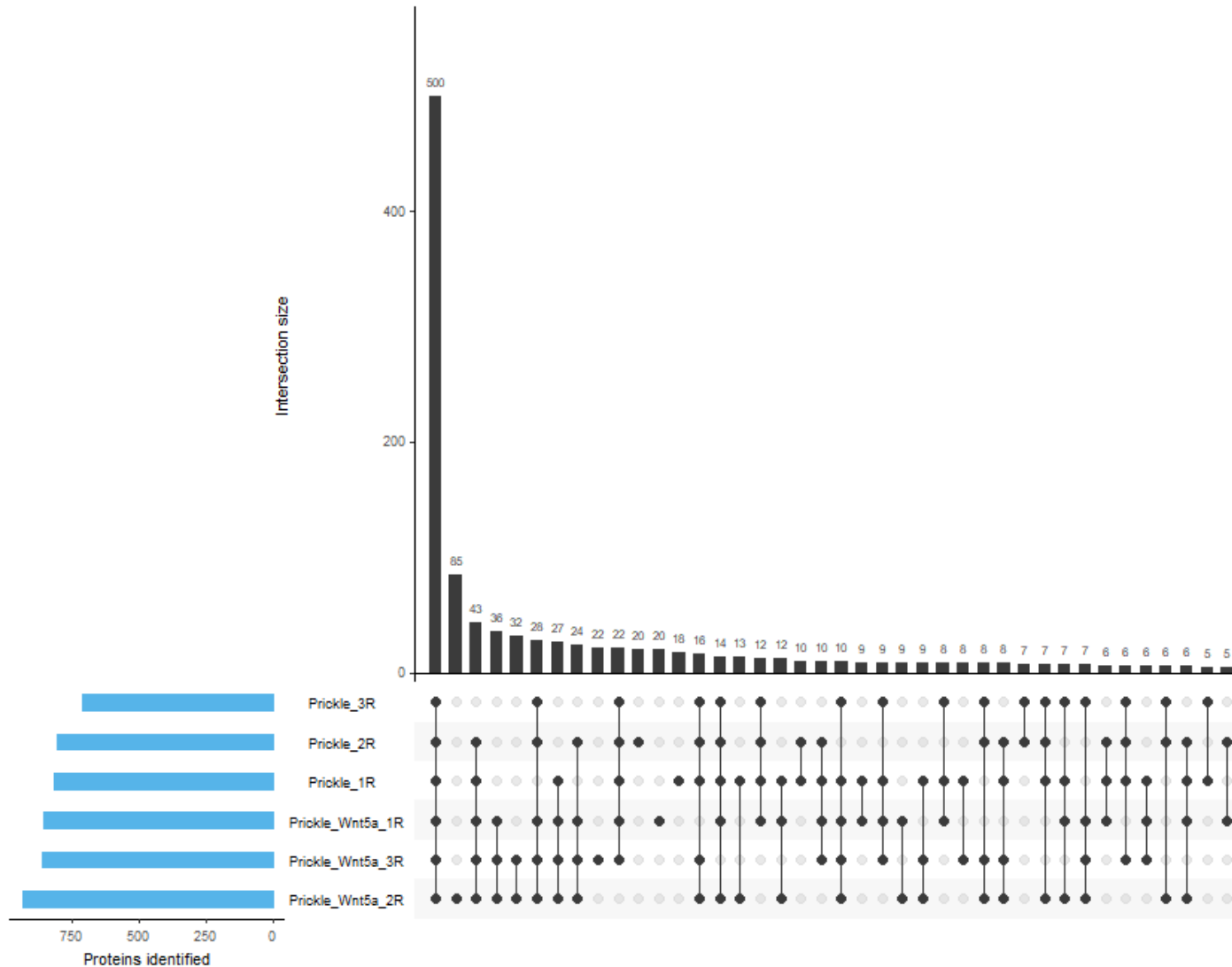


WB analýza BioID experimentu

Header		Protein Info		Statistical evaluation	
PGs	proteins	Representative pro	Alternative protein(s) info		
total	1391	1621			0,15 1,11
shown	220	236			
PG ID	Accession	Description	h	Memb	Sort
605	P51196	Aladin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AFON PE=1 SV=3	True	1	5,1E+09
1370	Q9ULH7	MKL1/myocardin-like protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MKL2 PE=1 SV=3	True	1	3,1E+09
1089	Q8TDM6	Disks large homolog 5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLG5 PE=1 SV=4	True	1	3,1E+09
60	O14640	Segment polarity protein dishevelled homolog DVL-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DVL1 F	True	2	2,1E+09
1435	Q9Y5K6	CD2-associated protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD2AP PE=1 SV=1	True	1	2,1E+09
1316	Q9NZC7	WW domain-containing oxidoreductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=WWOX PE=1 SV=1	True	1	2,1E+09
1057	Q8D2H2	5-3 exonuclease 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=XRN1 PE=1 SV=1	True	1	1,1E+09
1231	Q9C0D5	Protein TANC1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TANC1 PE=1 SV=3	True	1	1,1E+09
732	Q01638	Interleukin-1 receptor-like 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IL1RL1 PE=1 SV=4	True	1	1,1E+09
1320	Q9PDK7	Ankyrbin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=RAI14 PE=1 SV=2	True	1	9,1E+08
311	P11274	Breakpoint cluster region protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BCCR PE=1 SV=2	True	1	8,1E+08
1017	Q86724	Transcriptional regulator Kaiso OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZBTB33 PE=1 SV=2	True	1	6,1E+08
518	P46108	Adaptor molecule OK OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OK PE=1 SV=2	True	1	6,1E+08
765	Q07157	Tight junction protein 20-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TP1 PE=1 SV=3	True	1	5,1E+08
1252	Q9HG17	UPF0705 protein C11orf49 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C11orf49 PE=1 SV=2	True	1	4,1E+08
878	Q15154	Pericentriolar material 1 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCM1 PE=1 SV=5	True	1	4,1E+08
1128	Q92616	eIF-2-alpha kinase activator GCN1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GCN1 PE=1 SV=6	True	1	4,1E+08
90	Q43432	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EIF4G3 PE	True	1	4,1E+08
1024	Q86V48	Leucine zipper protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LUZP1 PE=1 SV=2	True	1	3,1E+08
1009	Q72417	HHAUS augmin-like complex subunit 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HAUS6 PE=1 SV=2	True	1	3,1E+08
574	P51610	Host cell factor 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HCFC1 PE=1 SV=2	True	1	3,1E+08
955	Q5V7D6	Centrosome-associated protein 350 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CP350 PE=1 SV=1	True	1	2,1E+08
1228	Q9C089	Zinc finger CCHC domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ZCCCH2 PE=1	True	1	2,1E+08
900	Q15652	Probable JmjC domain-containing histone demethylase protein 2C OS=Homo sapiens OX=9	True	1	2,1E+08
527	P46821	Microtubule-associated protein 1B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MAP1B PE=1 SV=2	True	1	2,1E+08
821	Q13625	Apoptosis-stimulating of p53 protein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TP53BP2 PE=1 SV=2	True	1	2,1E+08
786	Q12959	Disks large homolog 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DLG1 PE=1 SV=2	True	1	2,1E+08
1141	Q96A65	Exocyst complex component 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EXO4 PE=1 SV=1	True	1	2,1E+08
947	Q5T5P2	Sickle tail protein homolog OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KIAA1217 PE=1 SV=2	True	1	2,1E+08

Výstup z analýzy hmotností spektrometrie BioID experimentu- až několik stovek interakčních partnerů

UpSet Plot/Volcano plot



Statistická analýza:
 FC – fold change
 p value – statistická významnosť

FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

- Principem je přenos neradiační energie mezi dvěma na světlo senzitivními molekulami
- Intramolekulární FRET
 - Měření vzdálenosti mezi dvěma proteiny
- Intermolekulární FRET
 - Měření vzdálenosti mezi dvěma místy uvnitř jedné molekuly

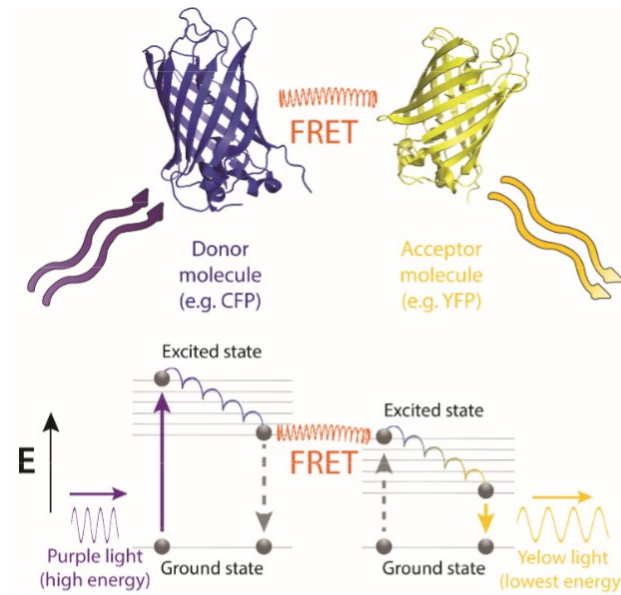


FIGURE 10. SCHEMATIZED VIEW OF FÖRSTER RESONANCE ENERGY TRANSFER (FRET) BETWEEN CFP (CYAN) AND YFP (YELLOW FLUORESCENT PROTEIN). FOR MORE DETAILS, SEE THE MAIN TEXT; E STANDS FOR ENERGY.

Experimentální buněčné systému pro studium funkce proteinů

Dva základní principy:

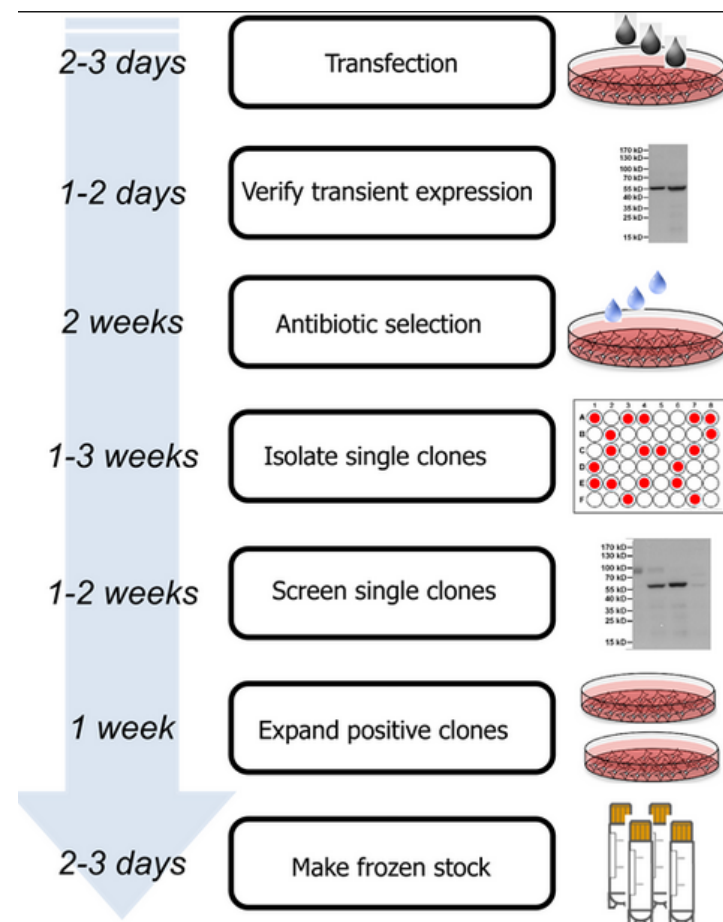
1. „gain-of-function“ (GOF)
2. „loss-of-function“ (LOF)
3. Možno kombinovat v tzv. „rescue“ esejích

GOF: Konstitutivní vs. inducibilní exprese

- Konstitutivní exprese genu-stálá a průběžná exprese daného genu (přírozně housekeeping geny), stabilní buněčné linie, silné promotory: CMV, RSV, SV40, LTR MoMULV
- Inducibilní exprese genu- exprese genu je aktivovaná pouze za určitých podmínek (světlo, antibiotika, živiny, kyslík atd..), inducibilní buněčné linie
- Tkáňově nebo vývojově specifická exprese genu

Tvorba stabilních buněčných linií

- Transfekce buněk plazmidem kodující gen našeho zájmu a obsahující antibiotikovou rezistenci
- Selekcce daným antibiotikem
- Izolace jednotlivých single cell klonů
- Napěstovat a ověřit expresi daného genu



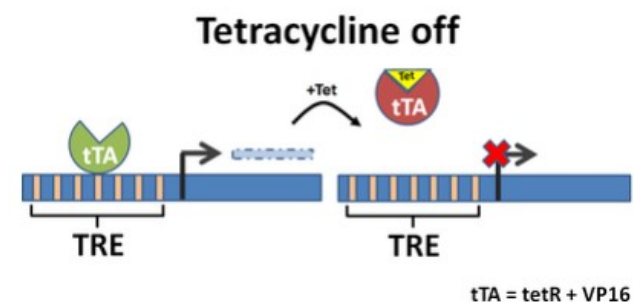
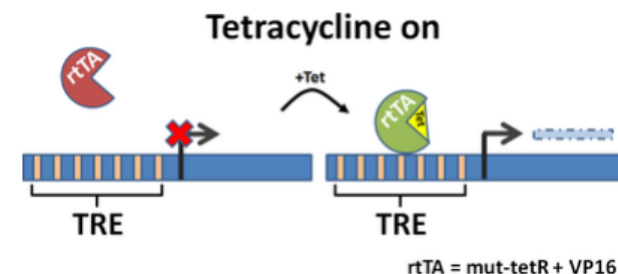
Inducibilních buněčné linie

- TetON systém

- Expresse genu po přidání tetracyklinu do média
- přítomnost tetracyklinu na reverse Tet represoru (rtTA) → vazba na TRE (Tet Response Element) spouští transkripci genu nacházejícího se za TRE

- TetOFF systém

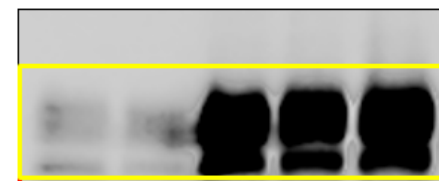
- Tetracyklin se váže na tetracycline-controlled transactivator (tTA) → zánik vazby na TRE → transkripce genu je zastavena



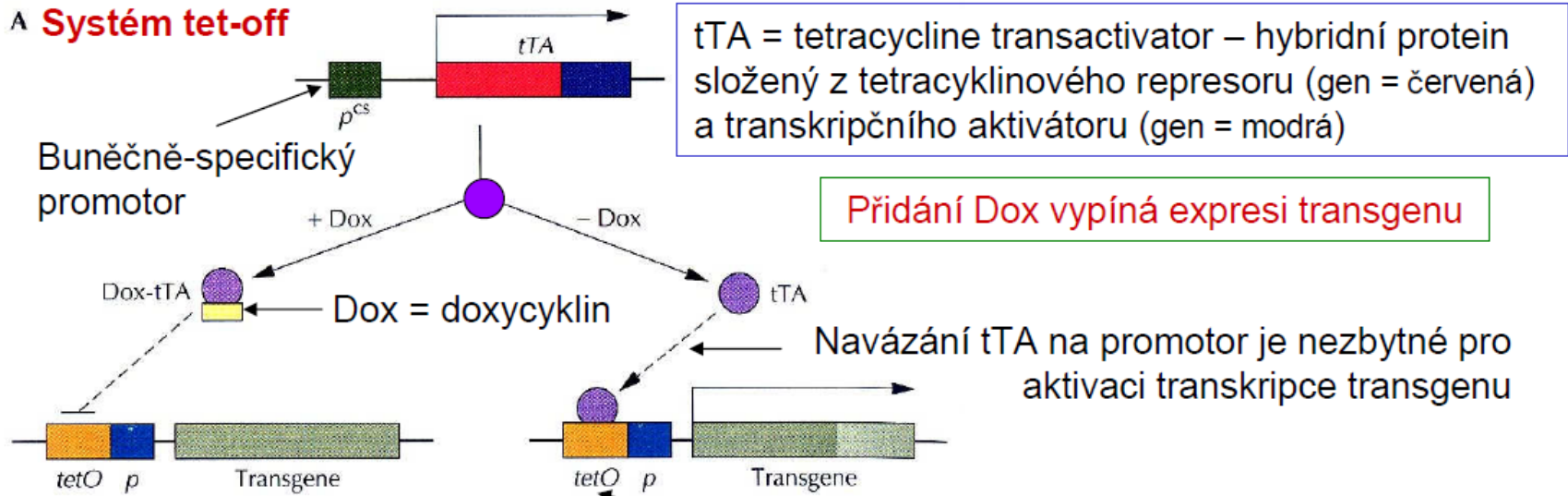
Time [h]	0	5
Tetracyklin [1:]	-	500 1000 5000

Biotin

Dvl3 8027



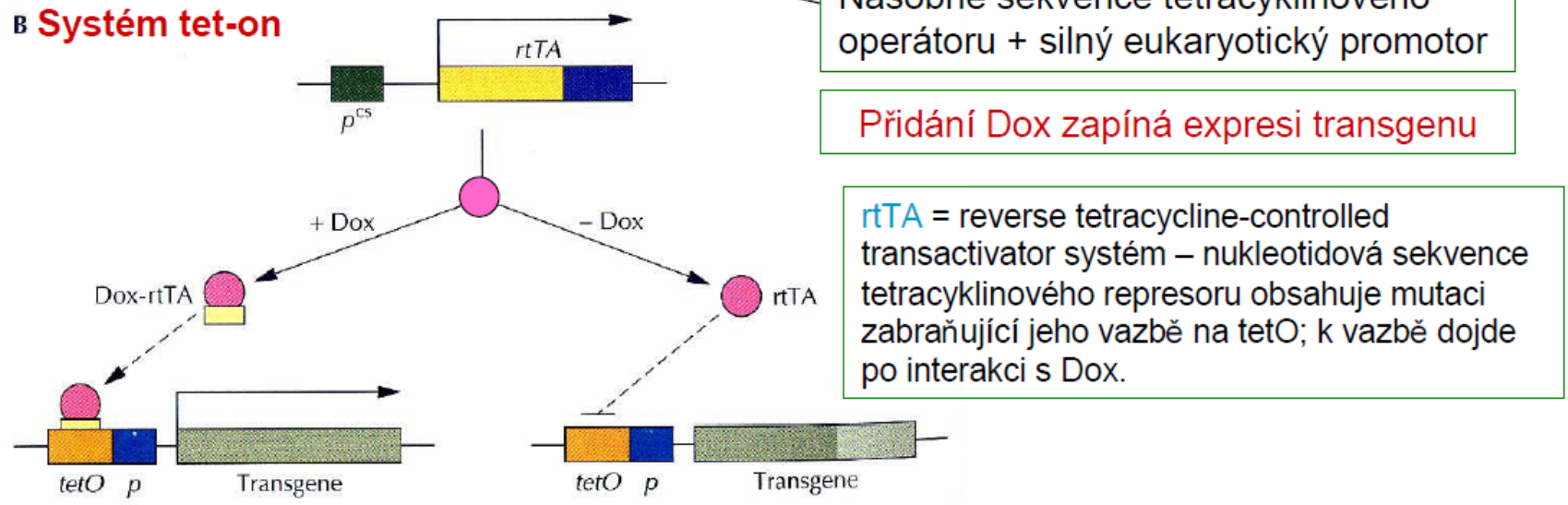
A Systém tet-off



Přidání Dox vypíná expresi transgenu

Násobné sekvence tetracyklinového operátoru + silný eukaryotický promotor

B Systém tet-on

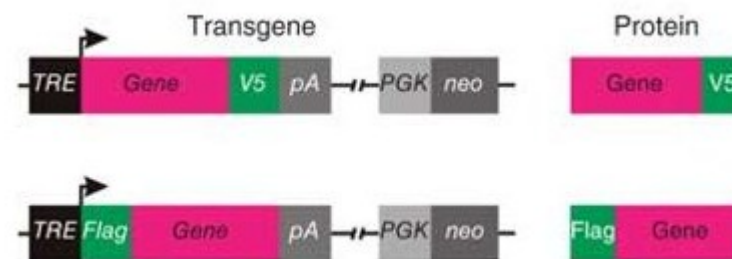


Přidání Dox zapíná expresi transgenu

Tvorba inducibilních buněčných linií

- Tvorba transgenů obsahující TRE, gen našeho zájmu a gen pro antibiotickou rezistenci
- Transfekce buněk plazmidem s transgenem
- Selektce daným antibiotikem
- Izolace jednotlivých single cell klonů
- Napěstovat a ověřit expresi daného genu

- Nebo speciální buněčné linie př. T-REx™ buněčné linie stabilně exprimující TRE

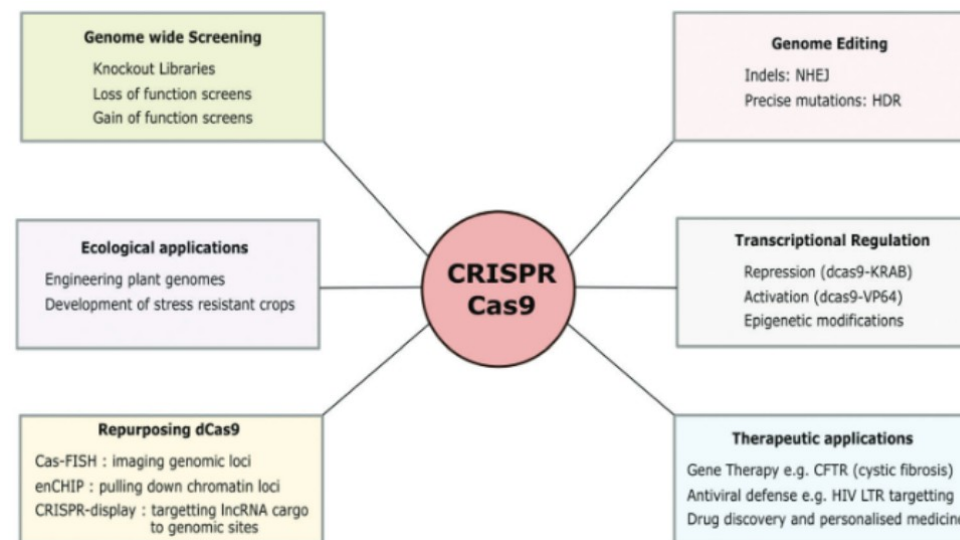
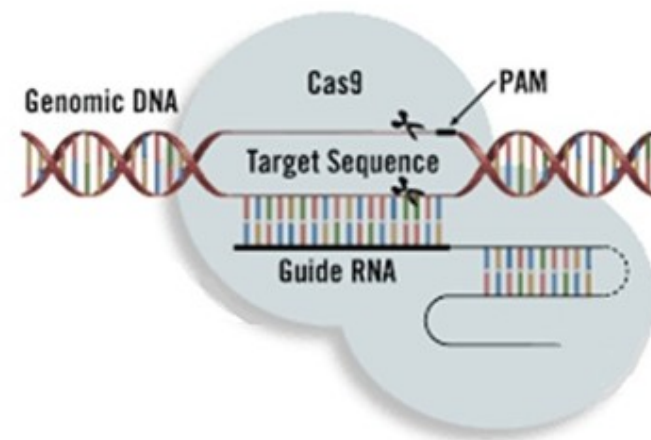


Přechodná vs. stabilní exprese genu

- Přechodná (transientní) exprese genu
 - Gen je exprimován pouze v řádu dnů
 - Transfekce
 - PEI transfekce
 - Transfekce lipofektaminem
 - Nukleofekce
 - Elektroporace
- Stabilní exprese genu
 - Gen je neustále průběžně exprimován
 - Viz. stabilní buněčné linie

LOF: CRISPR/Cas9

- Metoda umožňující jednoduše, rychle a efektivně modifikovat sekvenci jakéhokoliv genu
- 2 komponenty
 - Cas9- endonukleáza
 - gRNA- RNA komplementární k sekvenci genu, který chceme modifikovat
- Využití
 - Delece genu
 - Změna sekvence genu (př. oprava mutace-využití při léčbě nemocí)
 - Vložení genu (gene knock-in)
 - Označení specifické sekvence (dCas9)



CRISPR/Cas9 hands on

Created with SnapGene®

- All in one systém (Cas9+ gRNA)
 - Plazmid kodující Cas9, fluorescenční tag +restrikční místa pro jednoduché vkolonování gRNA (komerční př. Addgene)
 - Možnost transfekovat a targetovat několik genu najednou (různé fluorescenční tagy)

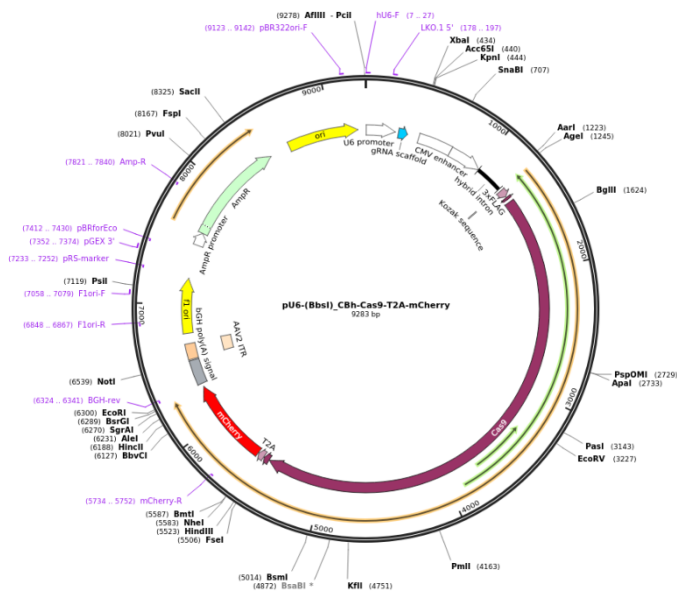
• Postup

- Design gRNA- Broad gRNA design tool navrhne nejlepší gRNA pro námi zvolený protein
<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>
- Vklonování gRNA do plazmidu-ověření sekvenací
- Transfekce plazmidu s naší gRNA do buněk
- Další den natransfekované buňky flourosceční svítí-sorting jednotlivých natresfekovaných buněk na 96 jamkovou misku
- Nechat klony růst zhruba dva až tři týdny
- Otestovat kolonie- WB analýza, RE analýza a sekvenace

3dny+sekvenace

2dny

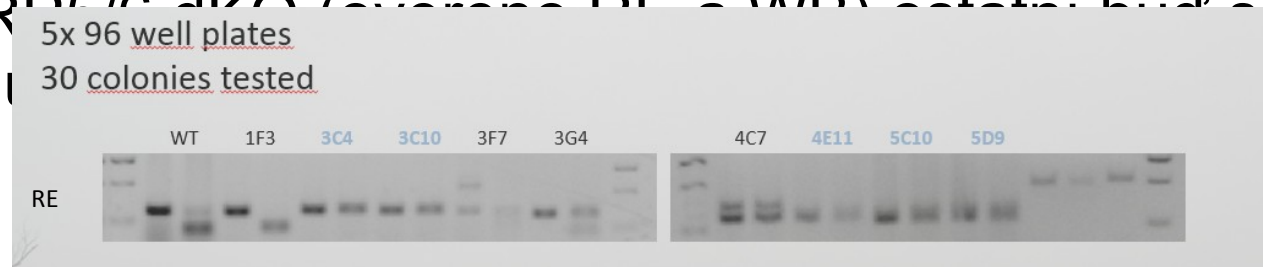
2-3 týdny



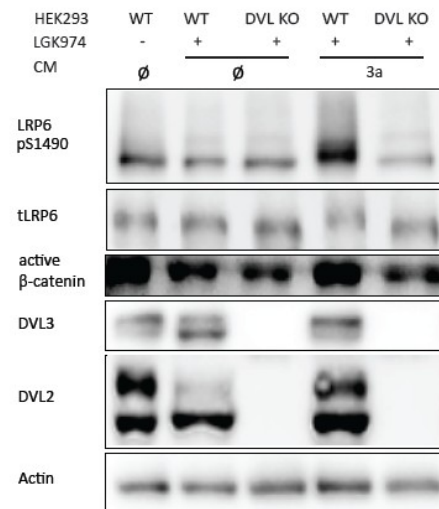
Validace CRISPR/Cas9

- Tvorba TREX buněk, které jsou knockout pro proteiny DVL1, DVL2 a Dvl3
 - Vyseto 5x96 jednotlivých buněk
 - Cca 30 jednotlivých kolnů narostlo
 - 5 klonů LRP6/3a KO (ověřeno RT-PCR) a 5 klonů single KO nebo cca 5 klonů

Restrikční štěpení



Validace Western blotting



Sekvence

DVL1 gRNA	ACATGTCGCCGGGCTCGATGCGG
DVL2 gRNA	AAAAAGTACTTGGCGCCCGCG GG
DVL3 gRNA	GCGAGAGCGGCCACG CCGGAGGG

WT DVL1	GCTGACGGCCGCATCGA GCCCGGCGACATG	Chro 1 1275427 - 1275456
KO	GCTGACGGCC-----CGGCGACATG	
WT DVL2	AGCGGCC CGCG GGCGCCAAGTACTTTTCAAGTCTATG	Chro 17 7137402 - 7137439
KO	AGCGGCCCGCG-----TTTTCAAGTCTATG	
WT DVL3	CCCAGCGAGAGCGGCCACG CCGGAGGGATGGCCAG	Chro 3 183882348 - 183882383
KO	CCCAGCGAGAGCGG-----GGGATGGCCAG	

Exprese na pozadí endogenních proteinů vs. rescue systém

- Overexpresní systémy

- Exogenní exprese daného genu a jeho následné studium
 - + protein je přirozeně málo abundatní
 - +overexprimovaný protein obsahuje tag- lépe se detekuje a analyzuje
 - interference s endogením proteinem
 - nefyziologické podmínky (to, co funguje v overexprimovaném systému nemusí fungovat za přirozených podmínek)

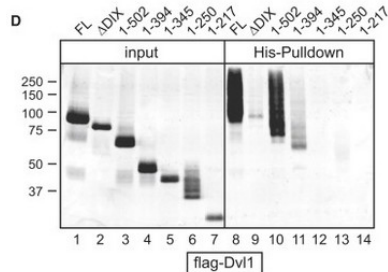
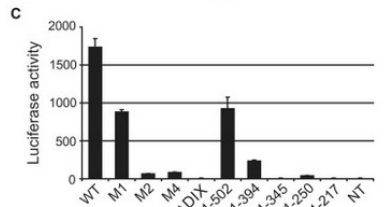
- Rescue systémy

- Exprese proteinů v systému, kde byl různými metodami (CRISPR, siRNA) gen deletován a jeho následné studium (rescue)
 - + není interference s endogenními proteinem
 - +více fyziologické
 - nutnost tvorby KO linie

Expresse na pozadí endogenních proteinů vs. rescue systém

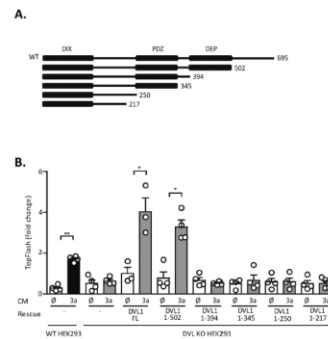
- Overexpresní systém

- DEP doména proteinu Dishevelled není potřebná pro Wnt/ β -cateninovou signalizaci

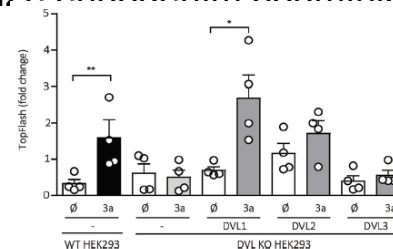


- Rescue systém

- CRISPR/Cas9 editovaná linie Dvl1/2/3 KO HEK
- DEP doména je potřebná pro Wnt/ β -cateninovou signalizaci



- Rescue jednotlivými formami proteinu DVL- jsou redundantní? (nelze studovat ve WT buňkách-interference s endogenně exprimovanými DVL proteiny, ale rescue musí být, co nejlíže endogenním podmínkám)



- CRISPR/Cas9 editované linie
- Vždy dvě ze tří isoform genů Dvl jsou deletované- umožňuje nejpřirozenější možnou formu studia jednotlivých isoform proteinu DVL- žádná interference s endogenními formami DVL proteinů a jednotlivé DVL isoformy jsou exprimovány fyziologicky

