

Analýza genové exprese

Analýza genomu - genomika

Analýza transkriptomu - transkriptomika

Analýza proteinu - proteomika

Analýza transkripce

- studium množství určitého transkriptu v daném vzorku a v daném čase
- studium transkripční aktivity daného genu

POZOR:

- množství dané molekuly mRNA v dané buňce a v daném čase závisí nejen na transkripční aktivitě, ale také stabilitě mRNA
- množství mRNA nemusí korelovat s množstvím proteinu, který kóduje

Northernový přenos

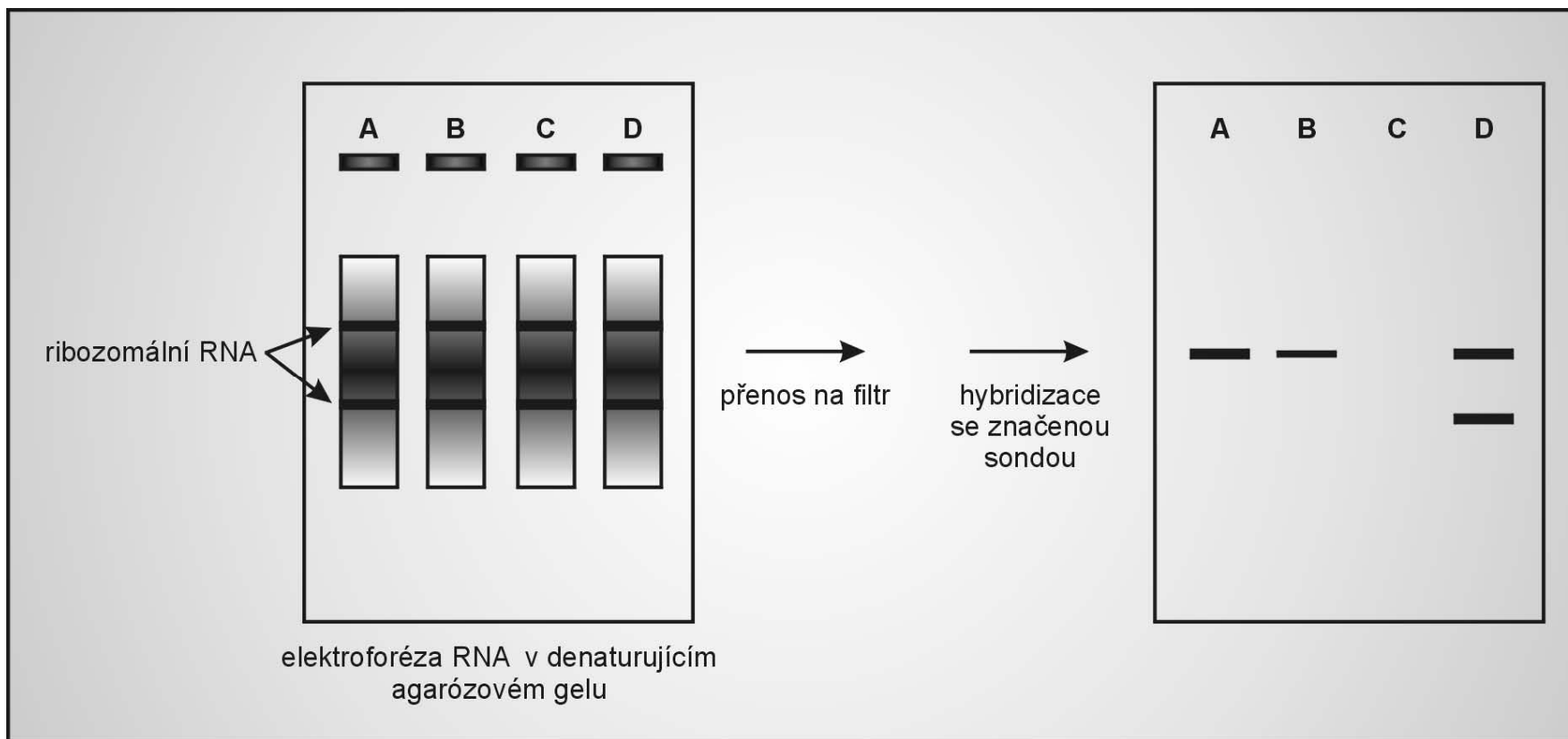
Princip:

- izolace mRNA
- elektroforéza v denaturujícím gelu
- přenos na membránu
- hybridizace se značenou sondou

Výsledek:

- zjištění přítomnosti specifické mRNA
- zjištění relativní molekulové hmotnosti mRNA
- zjištění relativní hladiny mRNA (po kalibraci s využitím hybridizačního signálu pomocného genu o známé úrovni exprese)

Northernový přenos



Northernový přenos - nevýhody

- neposkytuje údaje o absolutním množství dané mRNA
- nízká citlivost (nutnost izolace poměrně vysokých množství RNA - obvykle alespoň 1 μ g polyA mRNA nebo 10 μ g celkové RNA)

Northernový přenos - výhody

- nízké riziko falešných artefaktů ve srovnání s metodami založenými na PCR
- umožňuje určení relativní velikosti transkriptu a existenci různých transkriptů daného genu (alternativní sestřih)

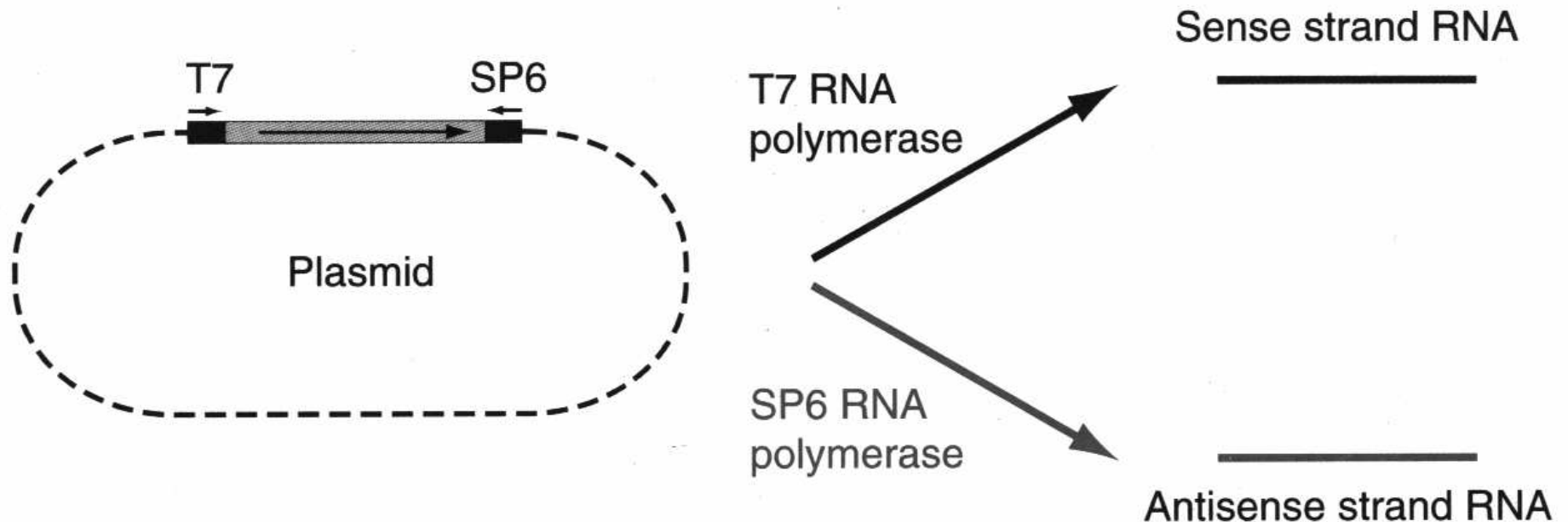
Test rezistence k RNáze

(„RNase protection assay“)

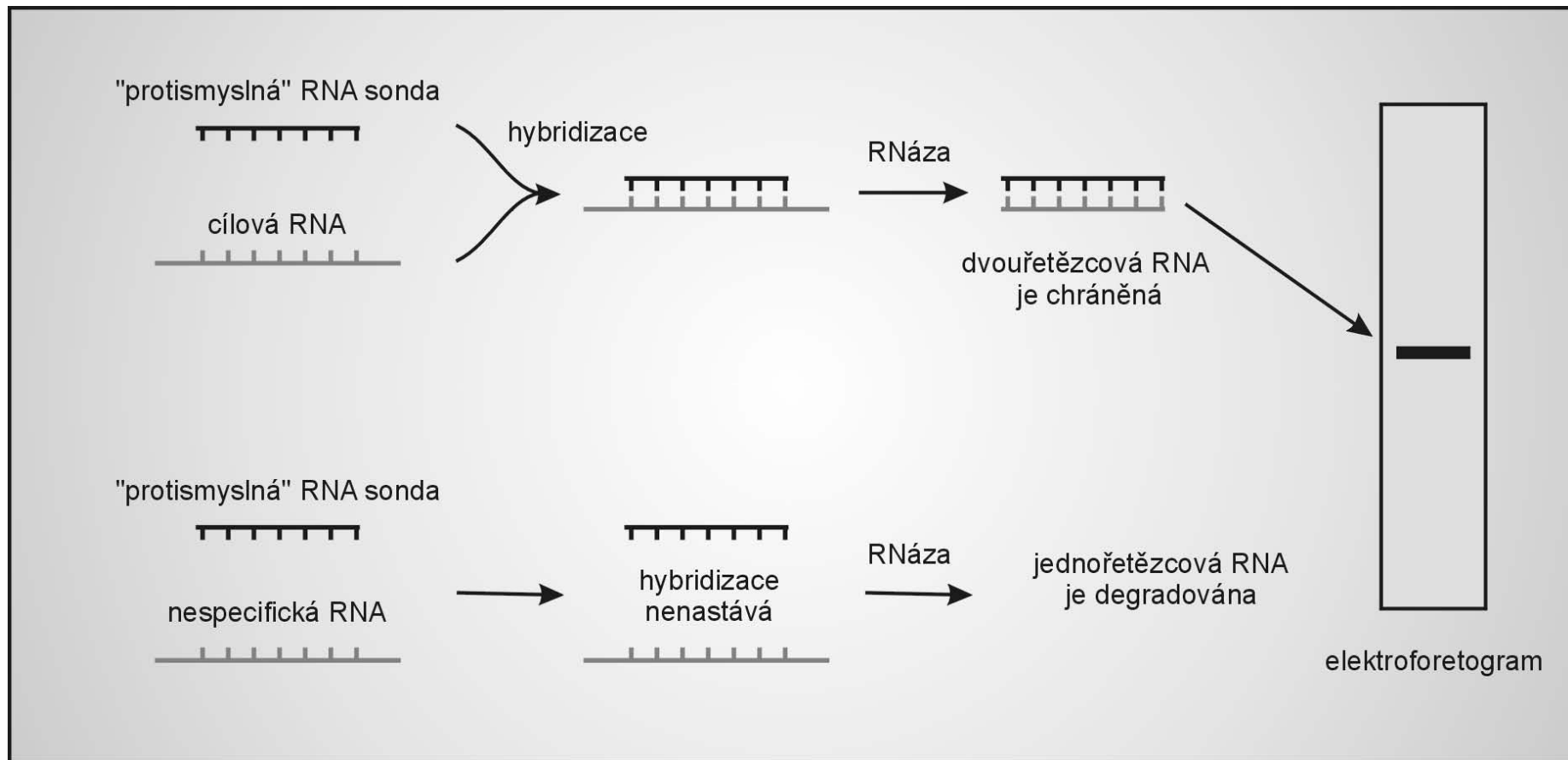
- stanovení přítomnosti určité mRNA ve směsi různých molekul RNA izolovaných z daného vzorku
- značená sonda (protismyslná RNA) se specificky váže k hledané mRNA
- hybridizace probíhá v roztoku
- RNáza degraduje všechny jednořetězcové molekuly mRNA
- zviditelnění neštěpených hybridů gelovou elektroforézou a autoradiografií

Příprava protismyslové RNA

- využití vektorů s opačně orientovanými promotory



Test rezistence k RNáze („RNase protection assay“)



Test rezistence k RNáze („RNase protection assay“)

Výhody:

- vysoká citlivost a přesnost
- toleruje částečnou degradaci vzorků RNA

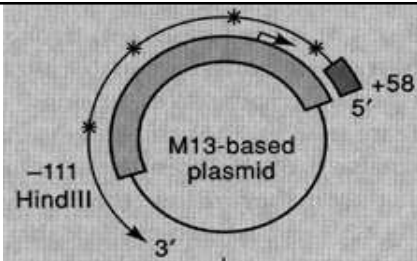
Nevýhody:

- neumožňuje určit velikost transkriptu (pohyblivost proužku v gelu ovlivňuje velikost sondy)
- pracnějši příprava RNA sondy než u northernového přenosu
- nutnost empirické optimalizace reakčních podmínek u nových genů

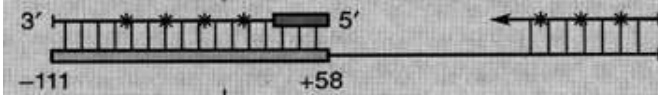
Test rezistence k nukleáze S1 („S1 nuclease protection assay“)

Postup:

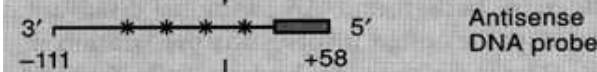
- obdoba „RNase protection assay“
- jako sonda se používá jedno- nebo dvou-řetězcová DNA
- příprava plazmidu nesoucího studovanou oblast s použitím systému M13
- protismyslová radioaktivní sonda hybridizuje s mRNA
- jednořetězcové úseky jsou odstraněny nukleázou S1
- velikost hybridu rezistentního k nukleáze je určena denaturační polyakrylamidovou gelovou elektroforézou



Phage M13-based plasmid includes region of gene containing putative transcription start site and 58 nucleotides downstream of this start site. To make radiolabeled probe, anneal primer to single-stranded phage DNA. Add Klenow and dNTPs (one radiolabeled, asterisks) to extend primer.

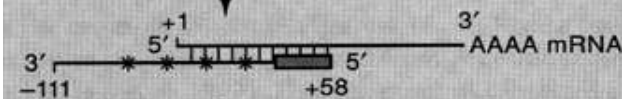


Cut with HindIII to linearize DNA.

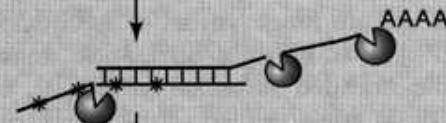


Antisense DNA probe

Isolate radioactive probe by denaturing gel electrophoresis.



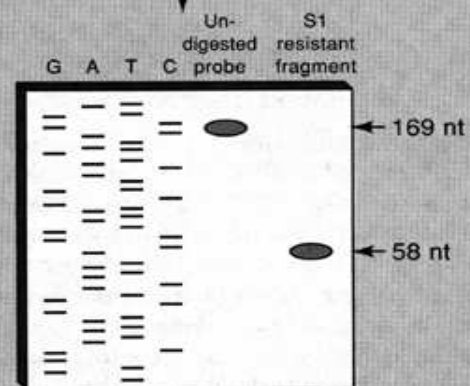
Hybridize probe to isolated mRNA.



Digest with S1 nuclease (cleaves single-stranded RNA and DNA).



Creates a 58-nucleotide double-stranded fragment.

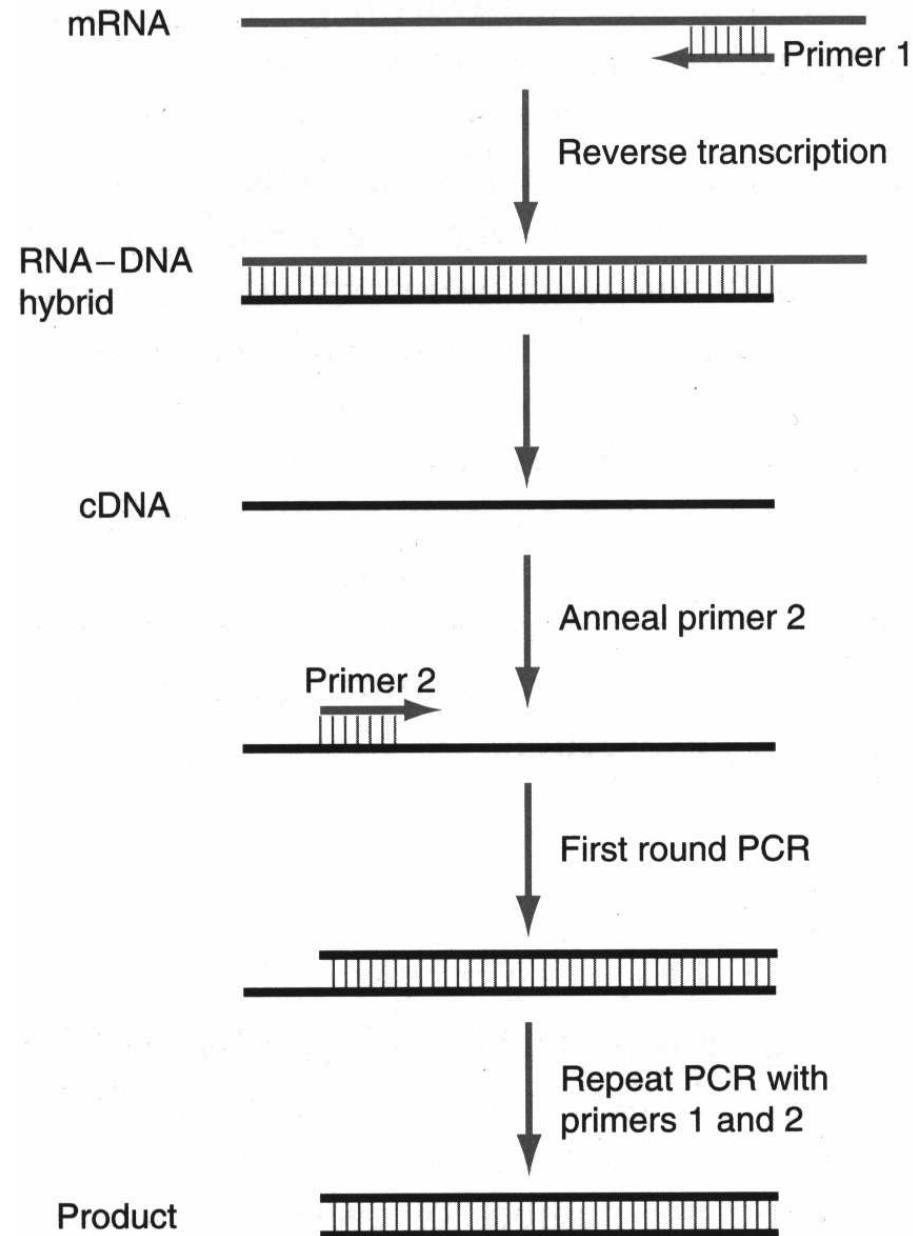


Denature and run on a sequencing gel alongside full-length probe.

RT-PCR

- amplifikace specifické mRNA
- vysoká citlivost: lze detegovat specifickou mRNA v jediné buňce (výhodné pro detekci mRNA, které se v buňkách vyskytují ve velmi nízkých koncentracích)
- nevýhoda konvenční RT-PCR: kvantifikace (není spolehlivá úměra mezi množstvím templátu a množstvím amplifikátu)

RT-PCR



RT-PCR v reálném čase

- cílem je sledování množství produktu reakce od okamžiku jeho vzniku až po ukončení PCR
- využití barviva, které fluoreskuje po navázání na dvouřetězcovou DNA
- ve speciálním přístroji, který funguje jako termocykler a zároveň jako detektor fluorescence lze monitorovat postup PCR v reálném čase

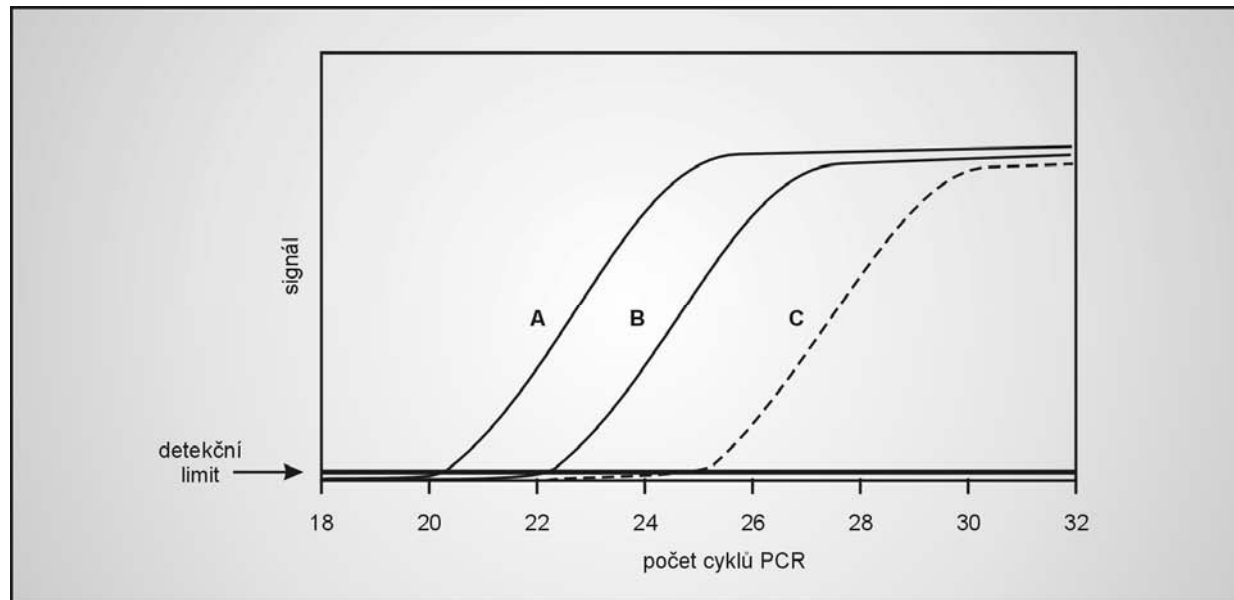
RT-PCR v reálném čase

Jednořetězcový templát: žádný signál

Vytvoření dostatečného množství dvouřetězcového amplifikátu: signál zaznamenán

Extrapolací vzniklé křivky zpět k nule lze určit počet cyklů nutných pro vytvoření detekovatelného množství produktu

Tato hodnota závisí na prvotním množství templátu



RT-PCR v reálném čase

Experimentální požadavky: je třeba zajistit, aby množství vstupního materiálu (počet buněk, celkové množství mRNA) bylo vždy stejné.

Standardizace reakcí pomocí paralelní RT-PCR pro amplifikaci pomocného genu, který se exprimuje konstitutivně.

RT-PCR v reálném čase se rovněž používá pro kvantifikaci určitých sekvencí DNA pro identifikaci specifických změn v genomu (diagnostický význam v medicíně).

Hybridizace *in situ*

- současné využití hybridizace a mikroskopie
- hledaná sekvence RNA (nebo DNA) je imobilizována uvnitř buňky v mikroskopickém preparátu a vizualizována prostřednictvím sondy
- identifikace buněk, které tvoří specifickou mRNA (nebo DNA)
- identifikace buněk infikovaných viry

Nevýhoda: obtížná kvantifikace

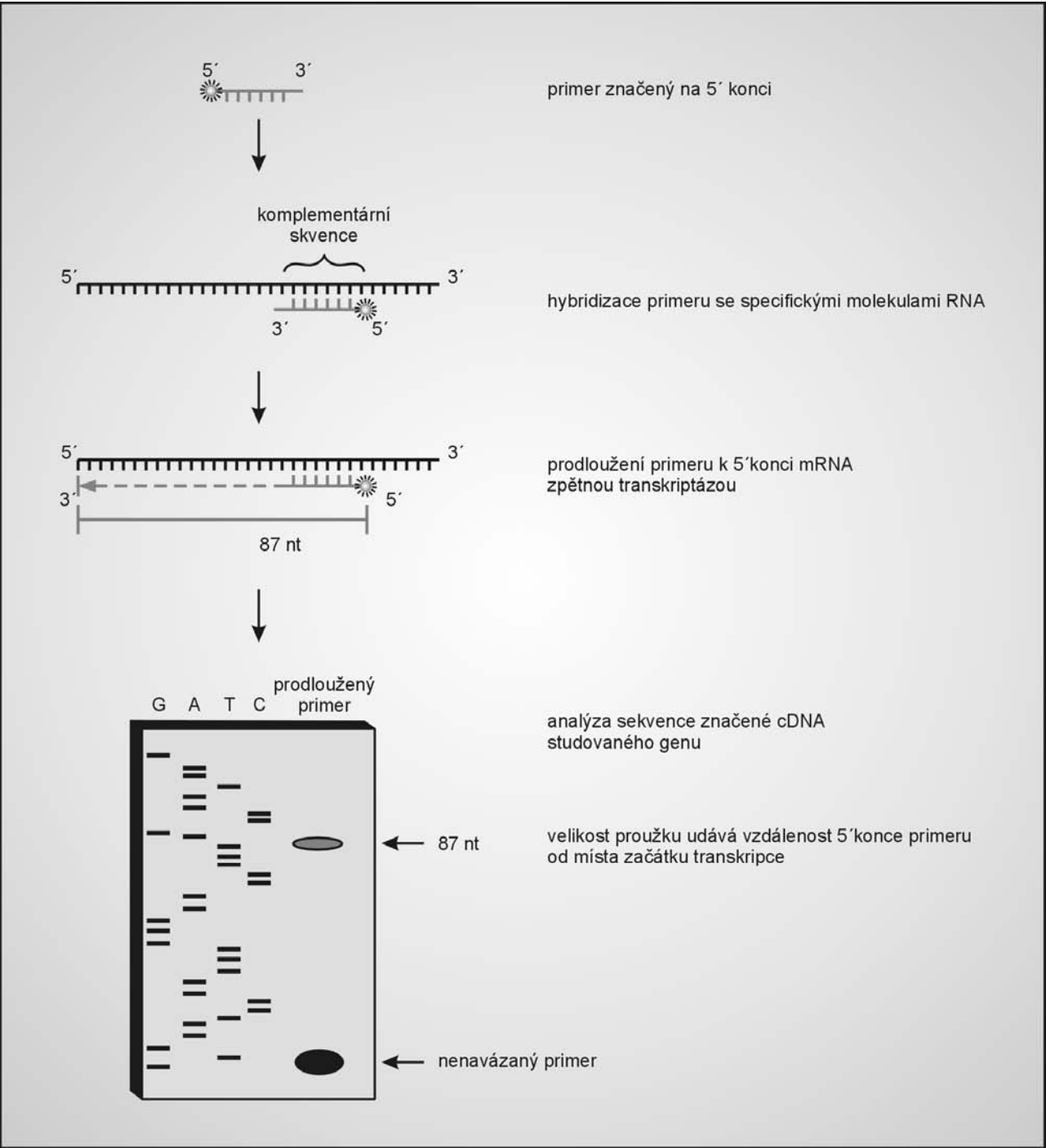
Test prodloužení primeru („Primer extension assay“)

- přesné mapování 5' konce mRNA
- na rozdíl od 3' konce není 5' konec mRNA vždy převeden do cDNA (degradace templátu, přítomnost sekundárních struktur, přítomnost proteinů navázaných na mRNA, zpětná transkripce neproběhne až na konec templátu)
- možnost přesné identifikace začátku transkripce

Test prodloužení primeru („Primer extension assay“)

Postup:

- příprava značeného primeru, který je komplementární k sekvenci mRNA vzdálené 50-150 nukleotidů po proudu transkripce od předpokládaného 5' konce
- izolace celkové RNA nebo mRNA ze studovaných buněk
- hybridizace primeru s cílovou molekulou mRNA
- prodloužení primeru zpětnou transkripcí
- na konci templátu se polymerace automaticky zastaví
- analýza radioaktivní cDNA denaturační polyakrylamidovou elektroforézou
- podle pohyblivosti produktu zpětné transkripce a kombinací se sekvencováním lze určit místo počátku transkripce



Test prodloužení primeru („Primer extension assay“)

Výhody:

- rychlost a jednoduchost
- požadována pouze mRNA a radioaktivně značený primer komplementární k sekvenci uvnitř daného genu

Nevýhody:

- může být obtížné nalézt dobře fungující primer pro dosud nepopsaný gen
- přílišné pozadí může znemožnit přesnou lokalizaci místa startu
- sekundární struktury mRNA ztěžují zpětnou transkripci

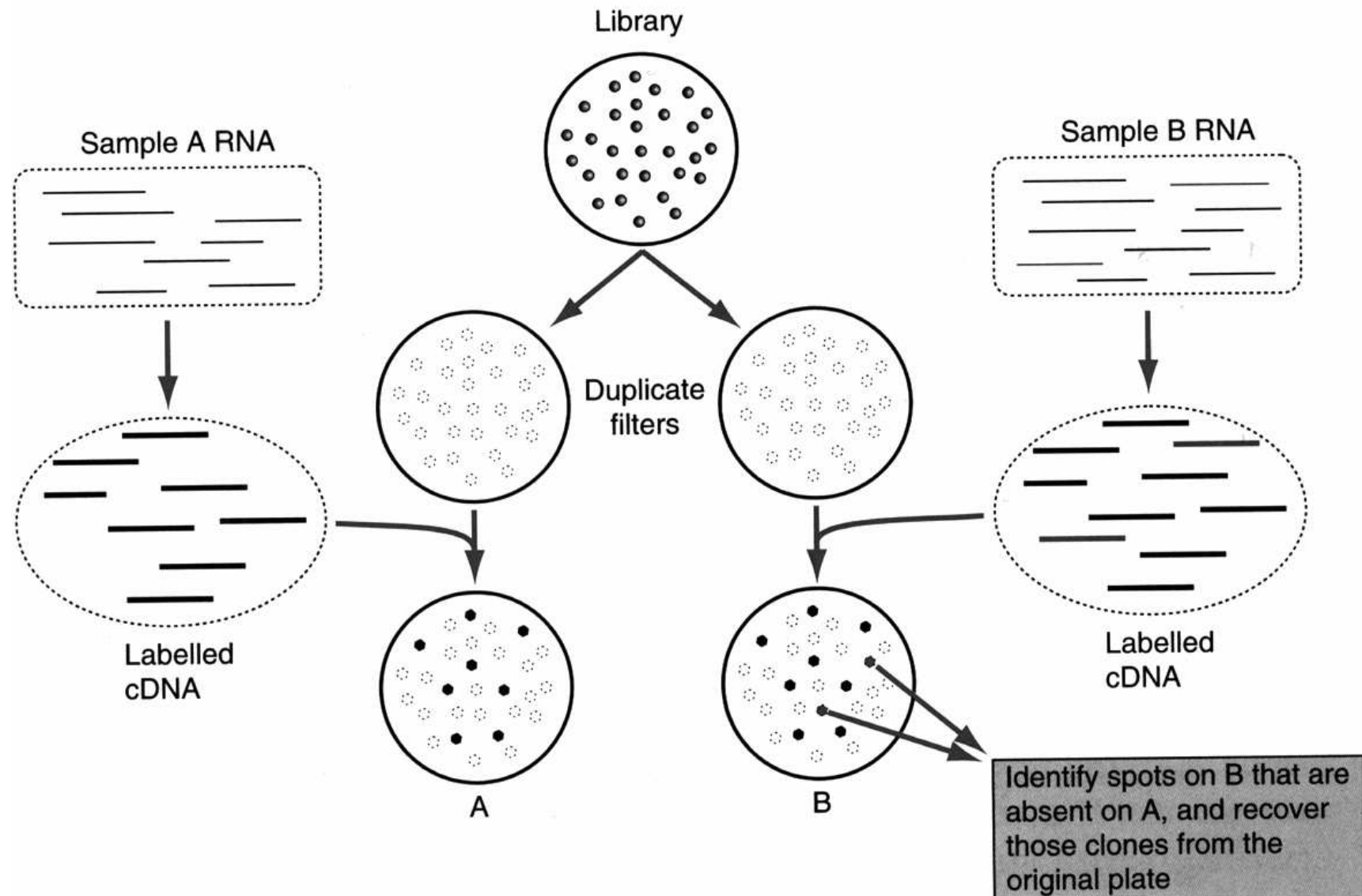
Srovnání transkriptomů

- identifikace genů exprimovaných v jednom organismu (tkáni) a ne v jiném
- identifikace genů exprimovaných za různých podmínek
- poskytuje klinicky významné informace (identifikace genů spojených s genetickými chorobami)

Diferenciální skrínink genové knihovny („Differential screening“)

- nejjednodušší metoda identifikace genů, které se exprimují s odlišnou účinností
- příprava dvou identických kopií genové knihovny na filtrech
- příprava dvou typů značených sond v podobě cDNA připravených z mRNA dvou různých vzorků
- oddělená hybridizace genové knihovny se sondami
- klony, které jsou pozitivní po hybridizaci s jednou, ale ne s druhou sondou, nesou odlišně exprimované geny

Diferenciální skrínink genové knihovny („Differential screening“)



Diferenciální skrínink genové knihovny („Differential screening“)

Nevýhoda:

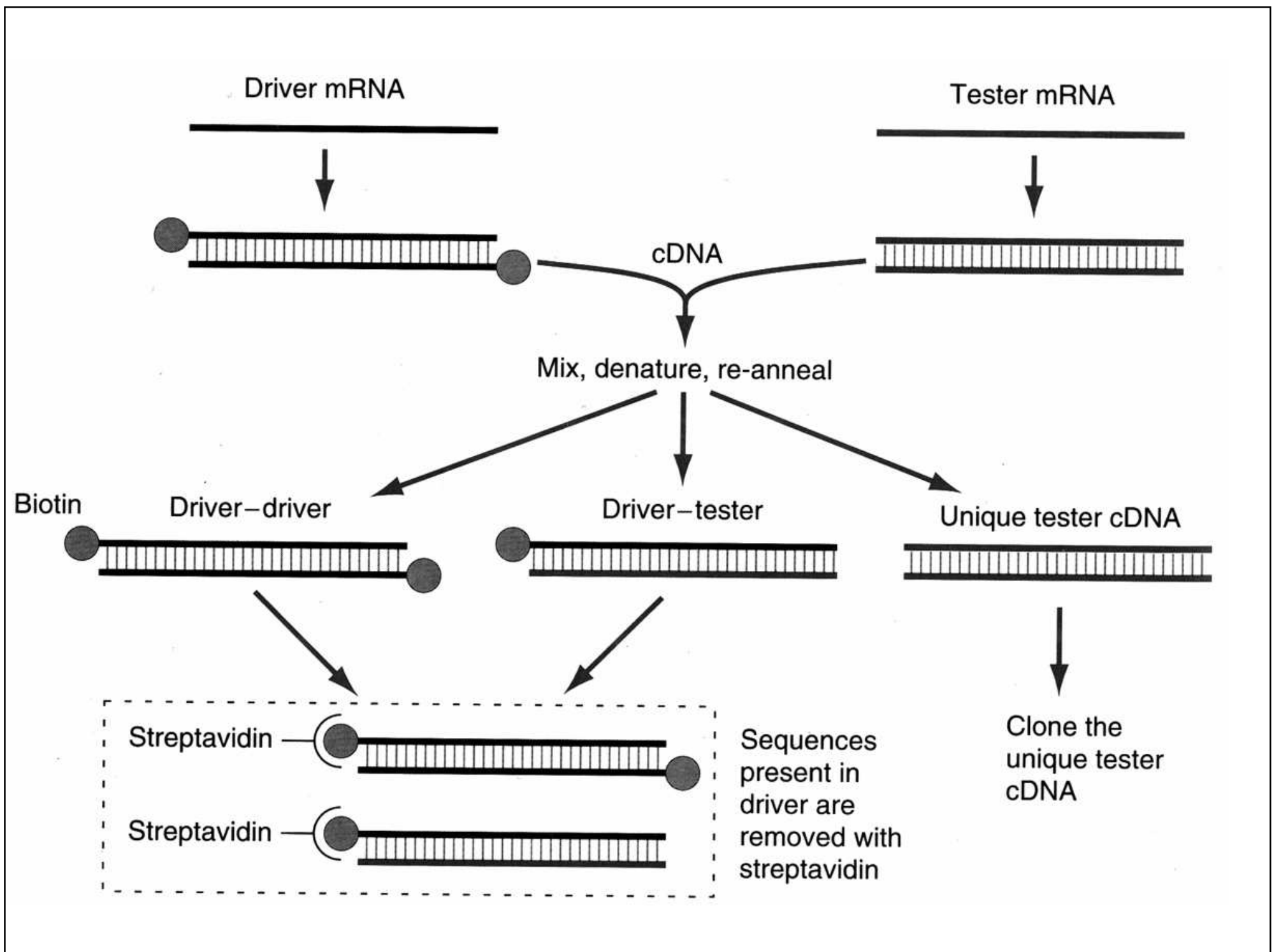
-postup předpokládá, že v jednom vzorku daný transkript není vůbec přítomen (obvykle však exprese genů není zcela vypnuta)

Subtraktivní hybridizace

- ze sondy jsou odstraněny společné sekvence
- hledáme transkripty přítomné v jednom vzorku („tester“) a nepřítomné v druhém vzorku („driver“)

Postup:

- izolace mRNA z obou vzorků a příprava cDNA
- cDNA „driver“ je označena biotinem
- smíchání cDNA „tester“ s nadbytkem cDNA „driver“
- denaturace, renaturace
- molekuly cDNA „tester“, která reprezentuje mRNA přítomné v obou vzorcích, bude tvořit hybridy s cDNA „driver“
- odstranění hybridů driver/tester a driver/driver (streptavidin)
- sonda je tak obohacena o cDNA reprezentující transkripty přítomné jen ve vzorku „tester“
- skrínink genové knihovny nebo klonování a vytvoření subtraktivní knihovny cDNA



Nevýhoda subtraktivní hybridizace

- vzácné transkripty nemusí poskytnout dostatečně silný signál
 - řešení: vytvoření subtraktivní knihovny cDNA

Subtraktivní knihovna cDNA:

- cDNA testeru se prostřednictvím adaptorů vkládá ligací do vektoru
 - vytvoření knihovny bakteriálních klonů
 - systematický skrínink analýzou všech klonů

Nevýhoda: nutnost relativně vysokých množství mRNA

Analýza reprezentativních rozdílů („Representational difference analysis“ - RDA)

Princip:

- vzorky cDNA nebo genomové DNA fragmentované restriktázami, které pocházejí ze srovnávaných vzorků se amplifikují PCR
- po smísení, denaturaci a renaturaci se využívá toho, že hledané molekuly (přítomné v jednom a ne ve druhém vzorku) vzájemně nehybridizují

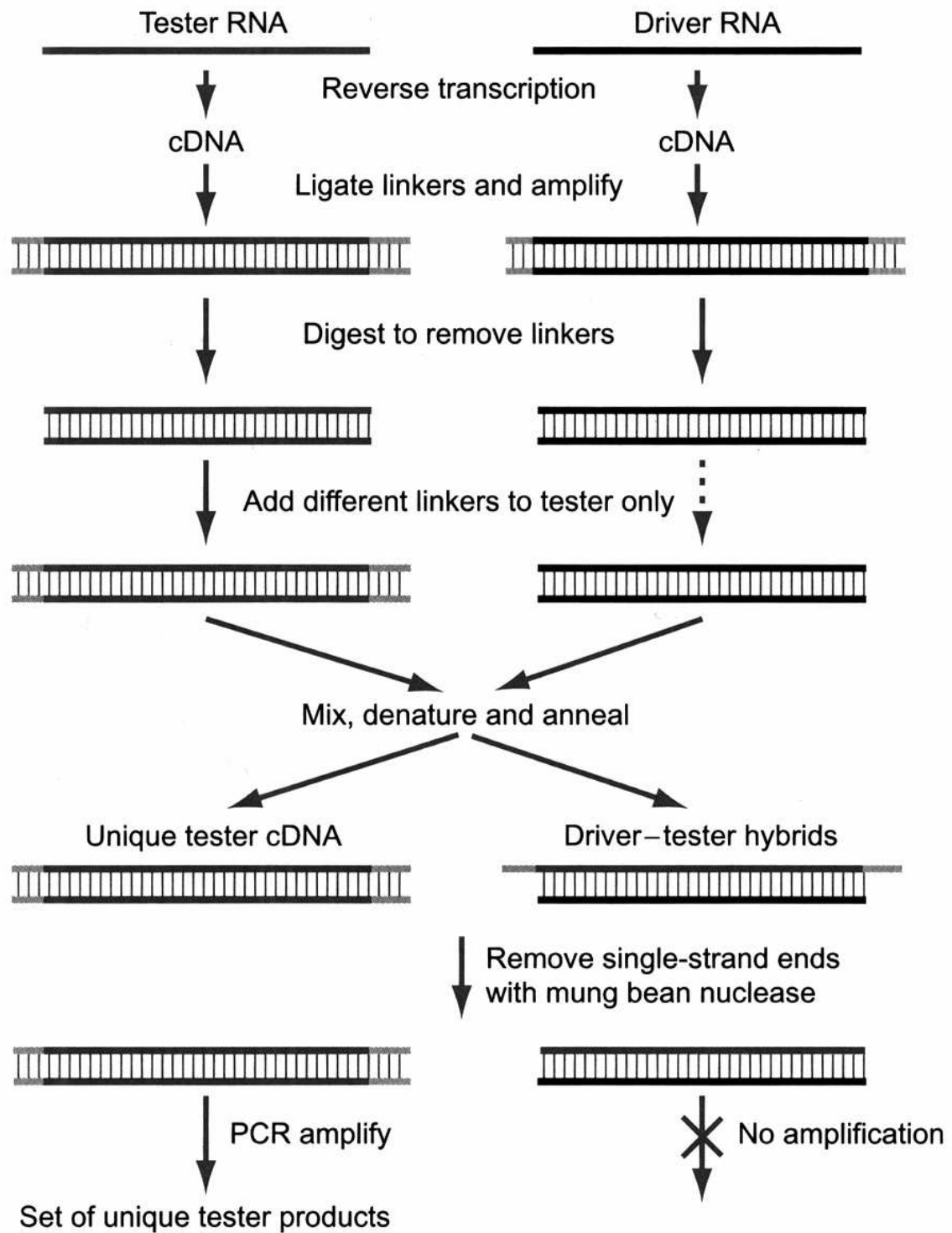
Využití:

- hledání genů, které zodpovídají za dědičné poruchy
- hledání diferenciálně exprimovaných genů

Analýza reprezentativních rozdílů („Representational difference analysis“ – RDA)

Postup:

- příprava cDNA vzorků „driver“ a „tester“
- ligace linkerů na konce cDNA a jejich využití pro amplifikaci PCR
- odstranění linkerů
- jiná dvojice linkerů se připojí k produktu PCR testeru, ale ne driveru
- smísení molekul cDNA testeru a driveru (driver je v nadbytku)
- denaturace, renaturace
- unikátní sekvence testeru nebudou tvořit hybridy s řetězcí driveru, ale jen testeru (komplexy tester/tester)
- PCR budou amplifikovány pouze komplexy tester/tester
- komplexy driver/driver nebudou amplifikovány (absence primerů)
- komplexy tester/driver mají nespárované konce, které mohou být odstraněny nukleázou (nebudou amplifikovány)



Diferenciální display

- metoda srovnávající dvě populace cDNA
- založena na PCR
- jeden primer se váže na sekvenci poly-A
- druhý primer se váže náhodně
- PCR probíhá při velmi nízké připojovací teplotě
- dojde k amplifikaci určité subpopulace molekul cDNA
- tato subpopulace je natolik malá, že ji lze rozdělit na polyakrylamidovém gelu
- stejné primery se použijí k amplifikaci DNA ze srovnávaných vzorků
- metoda neusnadňuje analýzu odlišně exprimovaných genů (nutno zkoušet různé sady primerů)

Metody založené na čipech

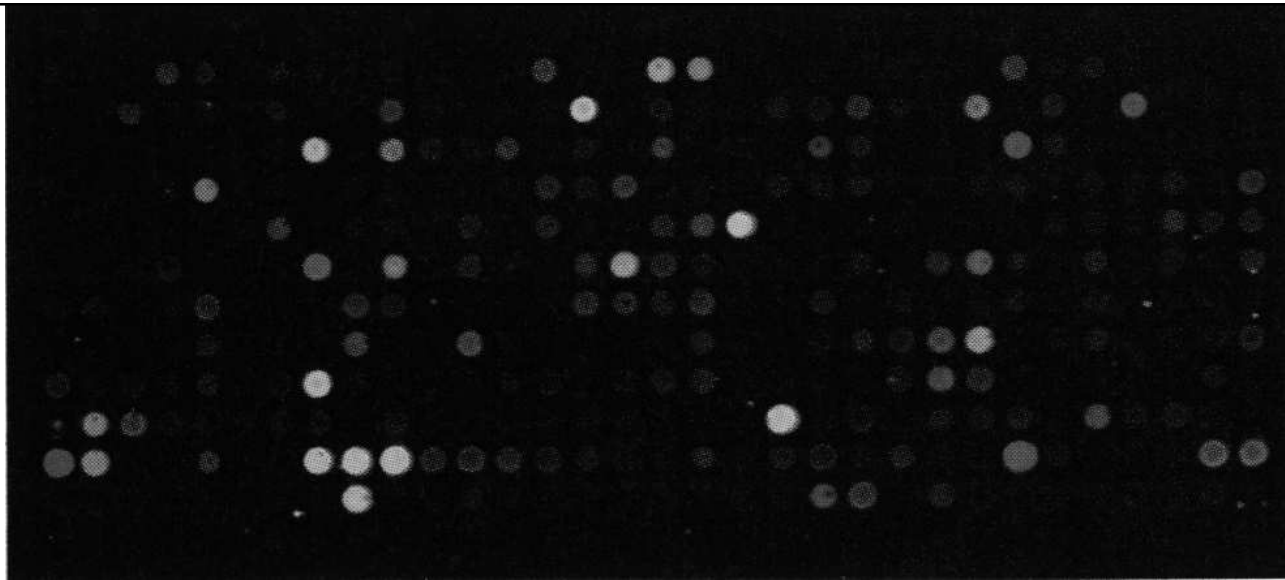
Zodpovídají globálnější otázky typu:

Jaké je celkové spektrum genů, které se exprimují nebo neexprimují za určitých podmínek?

Pro analýzu většího počtu genů není vhodný northernový přenos ani RT-PCR.

Microarrays - DNA čipy

- základem jsou syntetické oligonukleotidy nebo produkty PCR, které odpovídají velkému počtu (nebo všem) genům daného organismu
- robotem se tyto fragmenty DNA kovalentně připojí na speciální skleněnou destičku v podobě uspořádaných teček
- hybridizace se značenou DNA izolovanou z daného vzorku:
 - genomová DNA (genomové studie)
 - cDNA (expresní studie)



- izolace mRNA ze dvou různých vzorků (kontrolního a testovaného)
- vytvoření cDNA zpětnou transkripcí
- označení cDNA z jednoho vzorku červenou fluorescenční barvou a druhého vzorku zelenou fluorescenční barvou
- směs obou značených cDNA (ve stejném poměru) je nanesena na sklíčko s 384 vzorky DNA a výsledek hybridizace je analyzován fluorescenční mikroskopií:
- žlutý signál: cDNA obou vzorků se vážou proporcionalně, daný gen se exprimuje v obou vzorcích ekvivalentně
- červený signál: preferenčně se váže cDNA prvního vzorku
- zelený signál: preferenčně se váže cDNA druhého vzorku

Studium transkripce reportéřskými geny

Reportéřský systém: uměle vytvořený plazmidový konstrukt, který obsahuje sekvence DNA odvozené od specifického genu (včetně promotoru a potenciálních regulačních signálů) připojené k jinému genu, který kóduje snadno detegovatelný produkt

Princip: po vnesení reportéřského konstruktů do organismu, lze podle míry exprese reportéřského genu usuzovat na míru exprese genu, jehož promotorové sekvence jsou reportéřu předřazeny

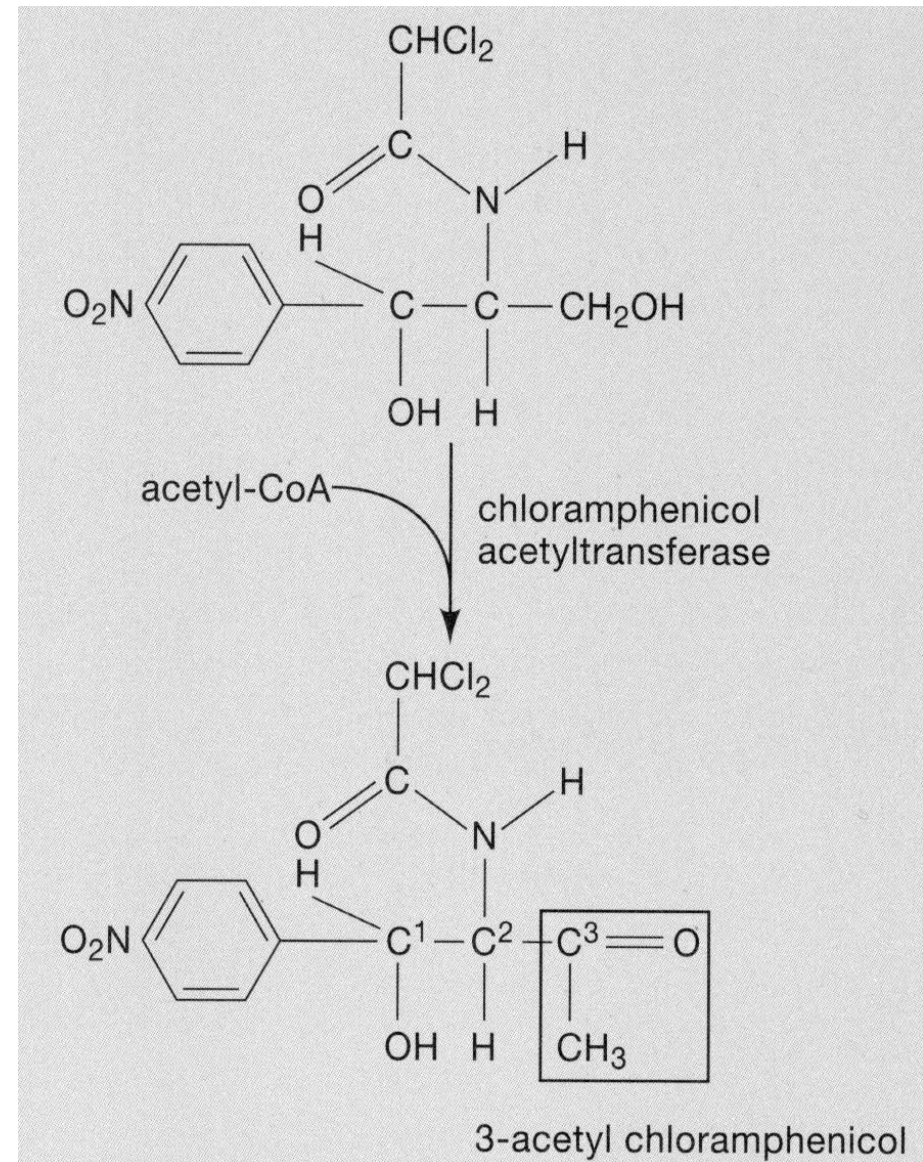
Výhoda: studium změn aktivity regulátorů transkripce např. v průběhu diferenciaci nebo při vystavení různým podmínkám

Běžné reportérské systémy

- Chloramfenikol acetyl transferáza (CAT)
- Luciferáza (luc)
- β -galaktozidáza
- Lidský růstový hormon (hGH)
- Zeleně fluoreskující protein (GFP)

Chloramfenikol acetyl transferáza (CAT)

- enzym katalyzuje přenos acetylové skupiny z acetyl-CoA na chloramfenikol
- test aktivity založen na radiochemické detekci produktu reakce



Princip:

- fragment eukaryotické DNA se umístí proti proudu transkripce od genu CAT
- vzniklý plasmid se přenese transfekcí do eukaryotické buňky
- po určitém čase nutném pro expresi transfekovaného genu se měří aktivita CAT
- pokud je test proveden správně - je míra aktivity CAT úměrná míře transkripce transfekovaného konstruktů
- zaváděním mutací do testované promotorové oblasti a měřením CAT aktivity v transfekovaných buňkách lze definovat regulační sekvence v DNA

Výhody: vysoká citlivost, reprodukovatelnost, absence genu CAT v savčích buňkách

Luciferáza (luc)

- test aktivity založen na luminiscenci (produkci světla)
- katalyzovaná reakce:



Výhody:

- vysoká citlivost (citlivější než CAT)
- nulové pozadí v savčích buňkách (gen je izolován ze světlušek)
- není třeba pracovat s radioaktivními materiály
- velký rozsah linearity
- pufr používaný pro lýzi buněk je kompatibilní s jinými testy (CAT, β -gal)

β -galaktozidáza

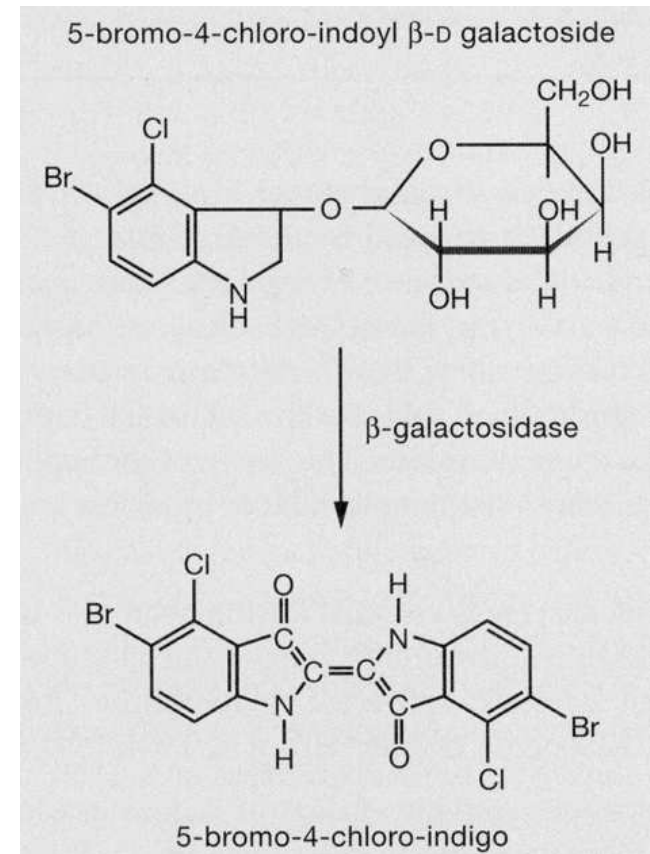
test založen na spektrofotometrické detekci barevného produktu reakce

obvyklé využití: vnitřní reference při transfekčních experimentech

Princip: k transfekci buněk se použije plasmid s eukaryotickým promotorem spojeným s genem *CAT* nebo *luc* zároveň s malým množstvím plasmidu nesoucím gen *β -gal* spojený se silným konstitutivním promotorem

- v extraktech transfekovaných buněk se stanoví aktivita β -gal a *CAT* (*Luc*)
- stanovením podílu aktivity *CAT* (*Luc*) : β -gal se údaje o expresi normalizují

Výhody: bezpečnost, levnost



Lidský růstový hormon (hGH)

- test založen na radioimunologické detekci produktu reakce
- výhoda: jedná se o sekretovaný protein, není třeba lyzovat buňky

Zeleně fluoreskující protein (GFP)

autofluorescence: protein nevyžaduje žádné exogenní kofaktory ani substráty

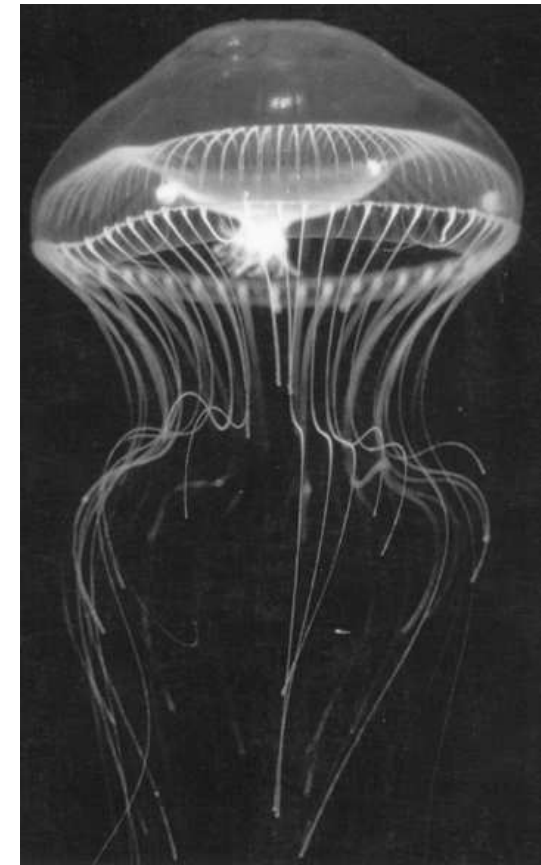
- izolován z buněk medúzy *Aequorea victoria*

Výhody:

- možno měřit v intaktních buňkách
- vysoká stabilita proteinu

Nevýhody: fluorescence se neamplifikuje, podmínkou detekce je použití silných promotorů

Běžné použití: fúze s jinými proteiny, sledování nitrobuněčné lokalizace, transportu a dalšího osudu označeného proteinu



Využití reportérských systémů

- sledování aktivity transkripčních faktorů v průběhu diferenciacce nebo za různých kultivačních podmínek (stabilní transfekce)
- transkripčně aktivační testy (přechodná transfekce): determinace regulátorů transkripce, vazebných míst na DNA, atd.

Analýza regulačních elementů v sekvenci DNA a proteinů vážoucích DNA

- přesná lokalizace promotoru a dalších sekvencí DNA, které jsou zapojeny do regulace transkripce tím, že pro ně zajišťují vazebná místa
- analýza interakcí DNA-protein

Metody:

- kvasinkový jednohybridový systém
- DNaseI footprinting
- gelová retardační analýza

Kvasinkový jednohybridový systém

Účel:

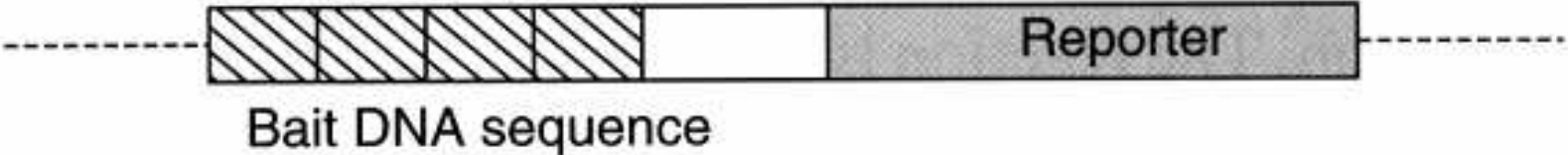
- identifikace proteinů, které interagují s definovanou sekvencí DNA
- lokalizace oblastí DNA, které interagují se známým transkripčním faktorem

Kvasinkový jednohybridový systém

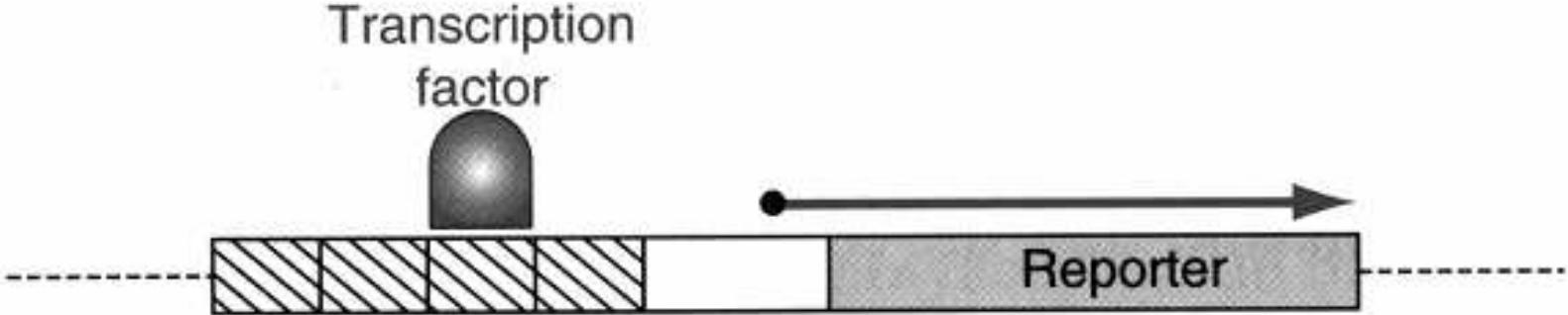
Postup:

- začlenění testované sekvence DNA (*návnada* - „*bait*“) v tandemových kopiích do vektoru proti proudu transkripce od reportérského genu
- začlenění konstruktů do kvasinkového genomu
- za nepřítomnosti transkripčního faktoru vážoucího návnadu nebude reportér exprimován
- po transformaci tohoto kvasinkového kmene expresní knihovnou cDNA bude reportér aktivován v těch klonech, které exprimují příslušný transkripční faktor

Absence of transcription factor: no expression of reporter



Presence of transcription factor: expression of reporter



Využití možnosti kooperace aktivační domény a DNA vážoucí domény z různých proteinů

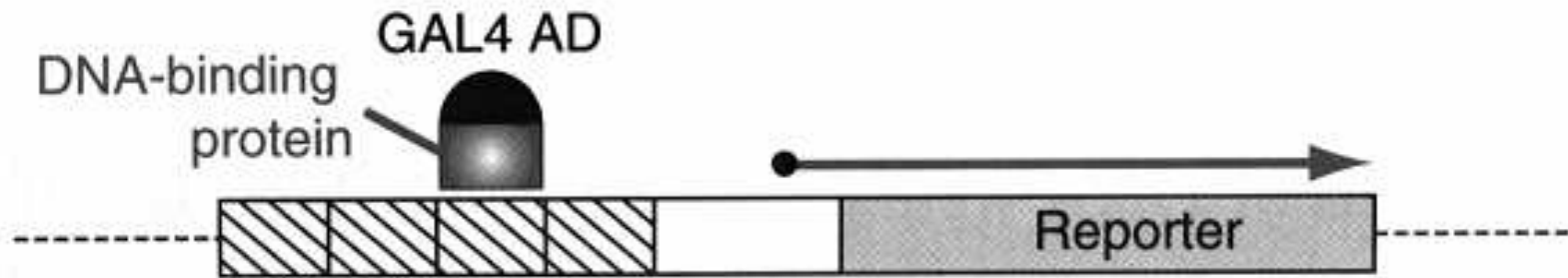
Transkripční faktory obvykle obsahují 2 oddělitelné a nezávislé domény:

- doménu zodpovědnou za vazbu na DNA
- transkripčně aktivační doménu

Proteinové chiméry obsahující tyto domény odvozené z různých proteinů jsou funkční:

- nahrazením DNA-vážoucí domény proteinu GAL4 jinou doménou pro vazbu na DNA vzniká chiméra aktivující transkripci jiné sady genů

Presence of GAL4 AD/DNA-binding protein fusion: expression of reporter



Postup:

- příprava cDNA s použitím speciálního vektoru, který kóduje aktivační doménu transkripčního faktoru *GAL4*
- geny začleněné do tohoto vektoru budou v transformovaných buňkách exprimovány jako proteinové chiméry s aktivační doménou *GAL4*
- reportér bude aktivován pokud vzniklý protein disponuje příslušnou DNA-vazebnou doménou

Výhoda:

- tento systém může odhalit větší množství proteinů vážoucích DNA (nejen transkripční faktory)

Stopování DNázou I („DNase I footprinting“)

Účel:

- identifikace promotorových sekvencí, na které se váže daný transkripční faktor

Princip:

- značená DNA je chráněna proteinem před působením nukleáz
- místo vazby proteinu na DNA je lokalizováno na gelové elektroforéze jako stopa - chybějící fragment

Stopování DNázou I („DNase I footprinting“)

Postup:

- izolace jader z buněk
- purifikace jaderných proteinů
- směs nebo jeden z jaderných proteinů se smíchá s testovaným značeným fragmentem DNA
- vystavení směsi působení DNázy I tak, aby došlo k částečnému (náhodnému) štěpení DNA
- elektroforéza fragmentů
- identifikace neštěpených (tj. navázaným proteinem chráněných) oblastí DNA

Stopování DNázou I („DNase I footprinting“)

Výhoda:

- přesná lokalizace místa dotyku mezi proteinem a DNA na úrovni jednotlivých nukleotidů
- lze provádět i ve variantě *in vivo*

Gelová retardační analýza

Účel:

- Určení sekvence DNA, která je nutná pro vazbu daného proteinu

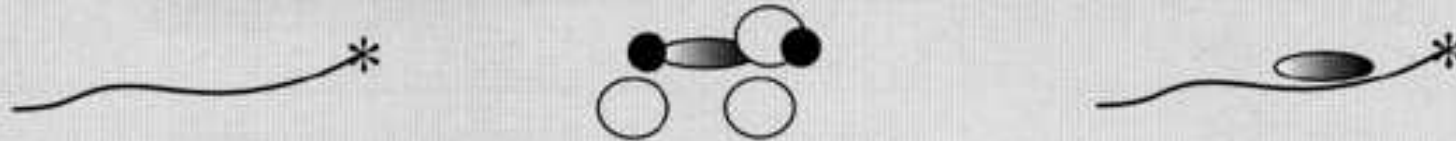
Princip:

- fragment značené DNA obsahující vazebné místo (sonda) je inkubován s příslušným proteinem
- komplexy protein-DNA se oddělí od nenavázané sondy elektroforézou v nedenaturačním polyakrylamidovém gelu
- navázaný protein zpomaluje pohyb sondy gelem

Gelová retardační analýza

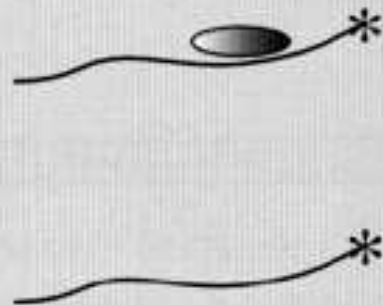
1 Allow proteins to bind DNA

Labelled DNA (probe) + Cellular extract (proteins) = Protein-DNA complex



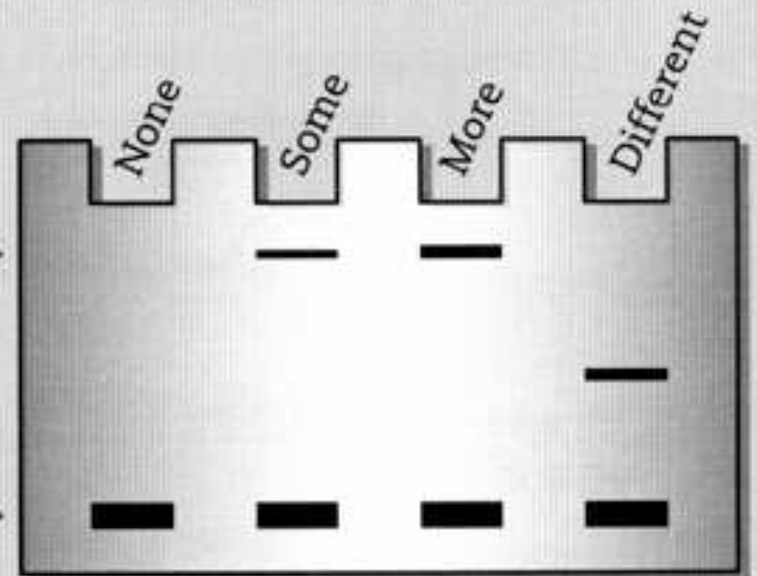
2 Gel separate

Unbound and protein-bound DNA



Protein-DNA complex

'Free'-probe (unbound DNA)



Gelová retardační analýza

Výhody:

- při absenci purifikovaného proteinu lze použít jaderné extrakty (specifitu reakce je třeba ověřit protilátkou -„supershift“)
- lze využít pro analýzu více-proteinových komplexů
- lze využít pro stanovení vazebných parametrů a relativní afinity proteinu k vazebnému místu

Ověření specifity reakce protein - DNA

specifická odpověď na zvýšenou dávku proteinu

- přidání „studené“ neznačené sondy: kompetice se značenou sondou - slabší signál
- přidání protilátky: „supershift“

