

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

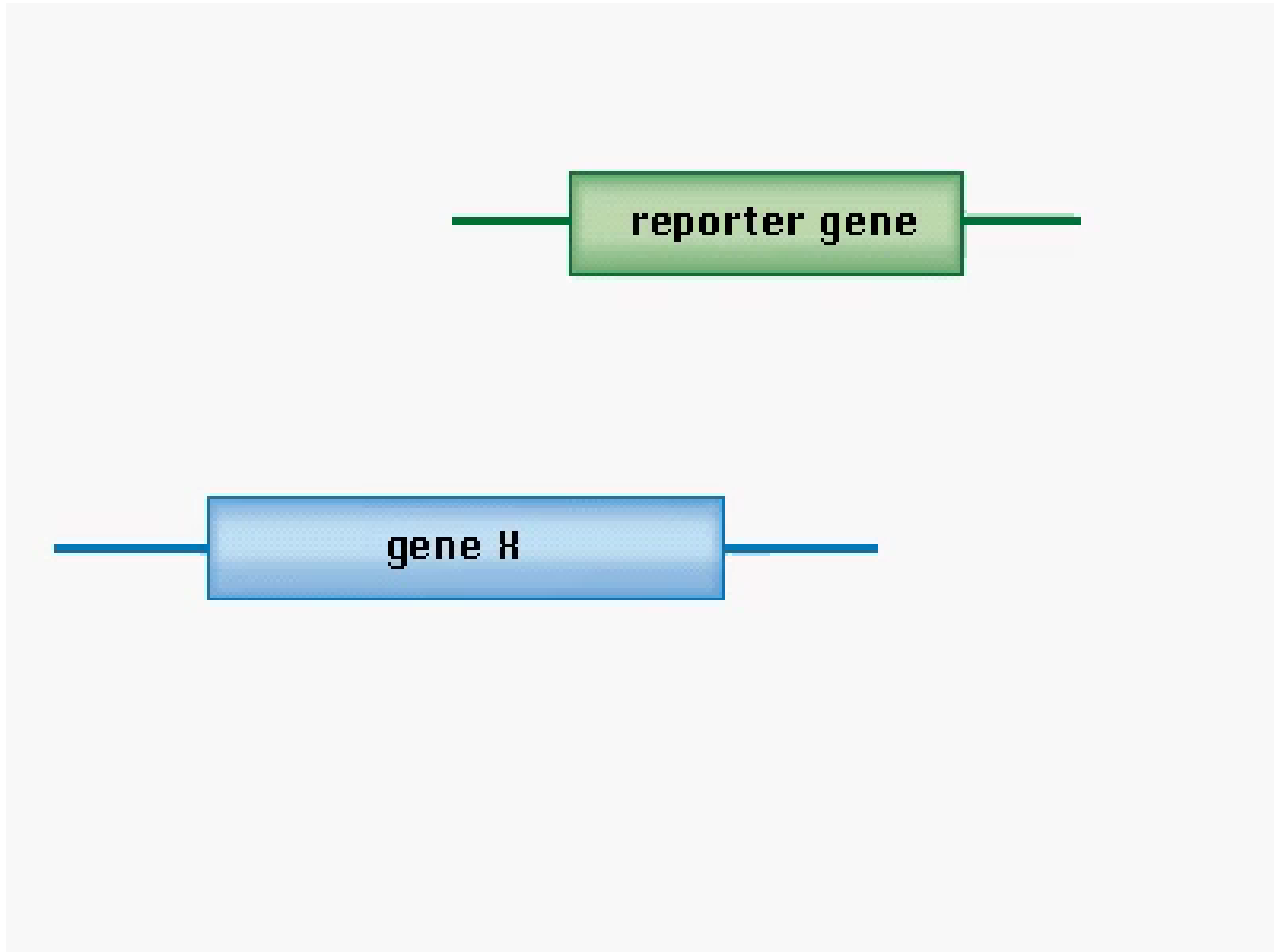
Osnova

- 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
přístupy získané funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - Ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese
- Chemická genetika

Osnova

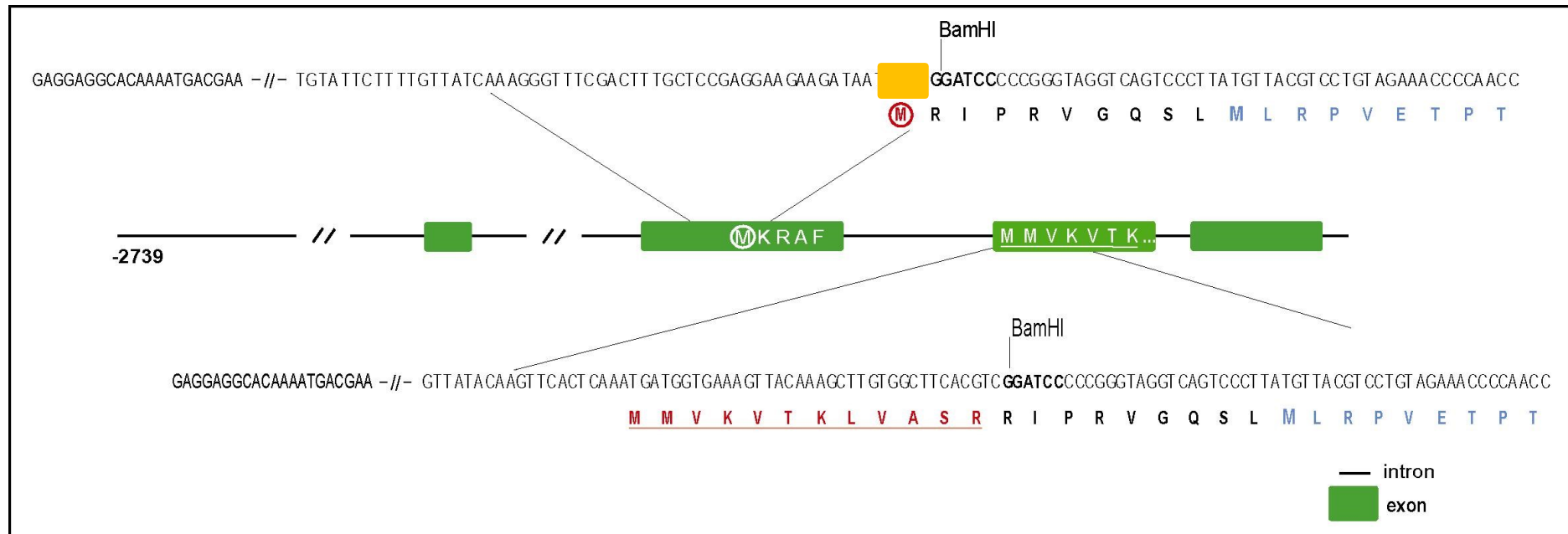
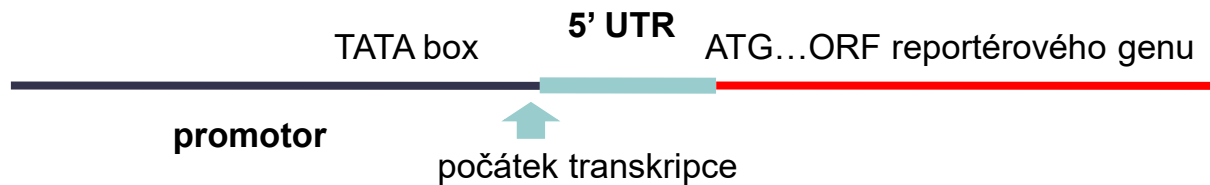
- Metody analýzy genové exprese
 - Kvalitativní analýza exprese genů
 - Příprava transkripční fúze promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)

Příprava rekombinantní DNA



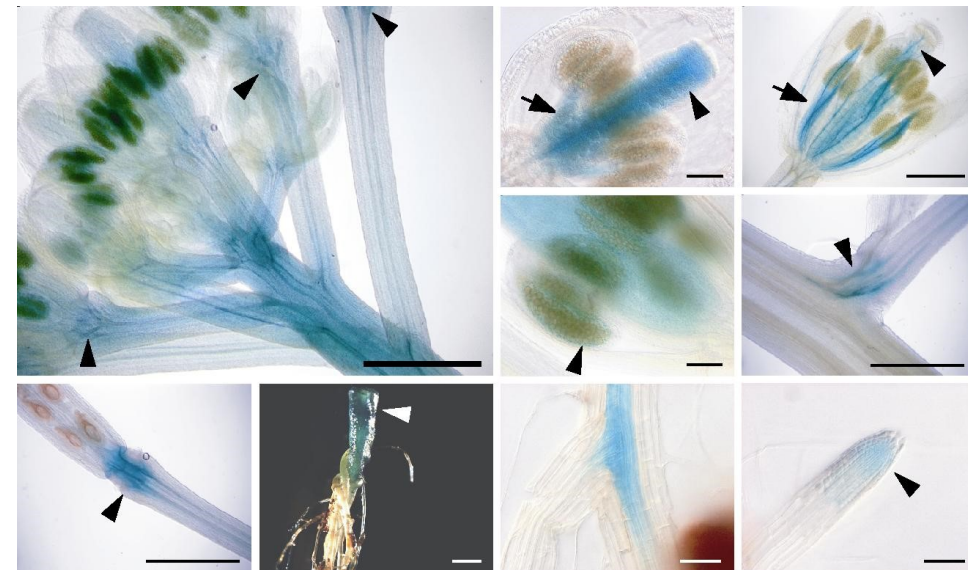
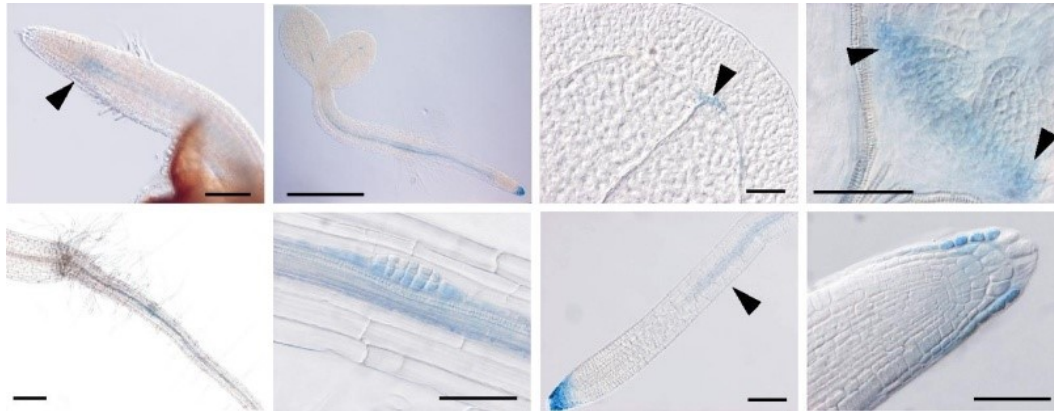
Genová exprese

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

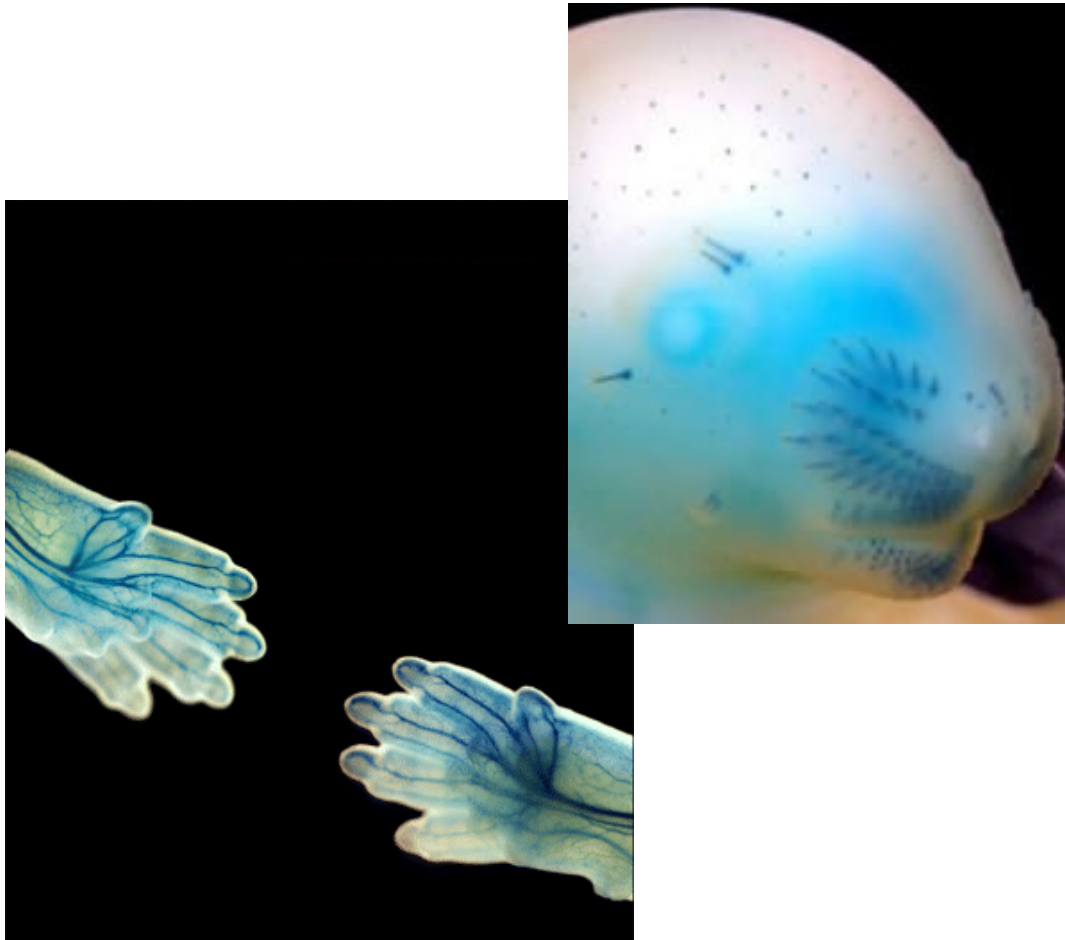


Genová exprese

- **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



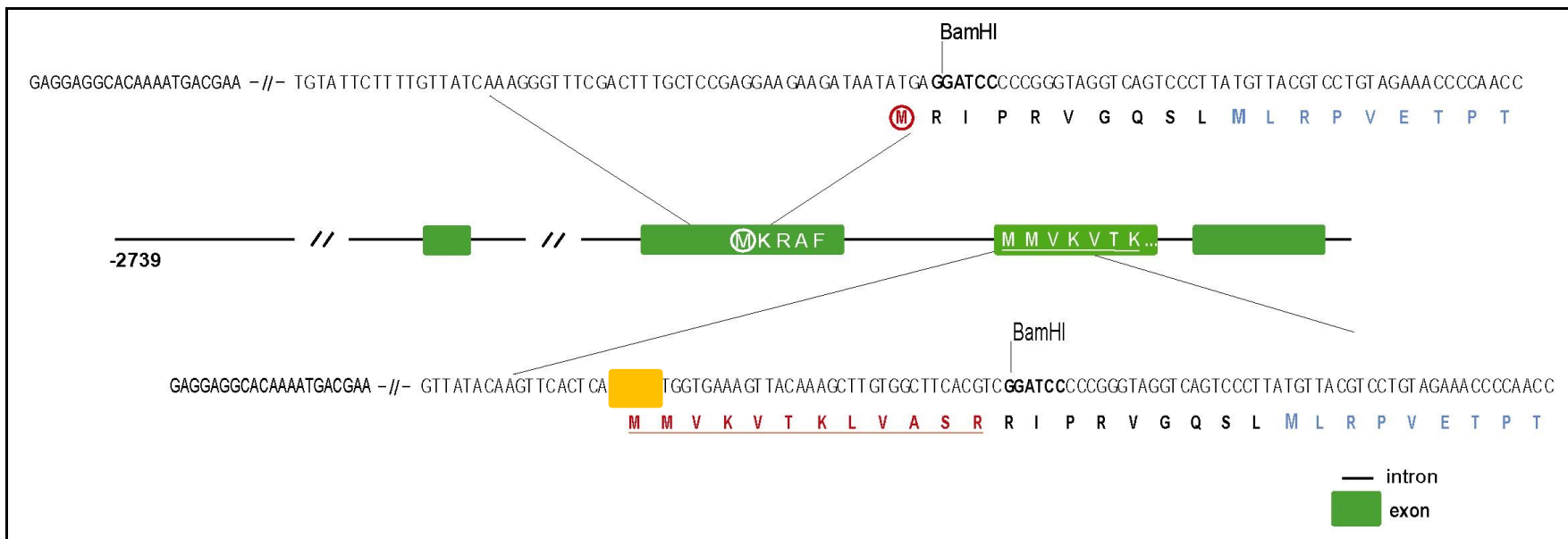
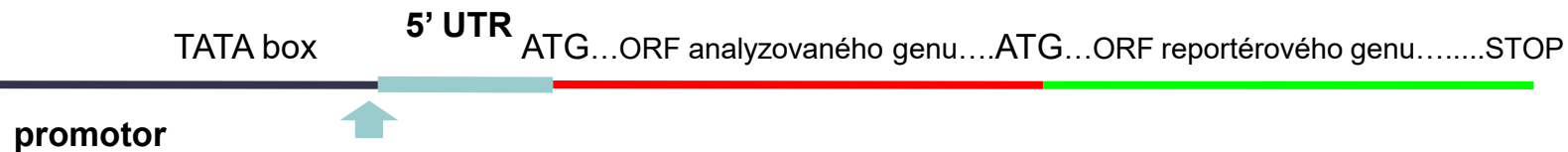
LacZ activity marks the cells of the developing myotome.

Osnova

- Příprava translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem

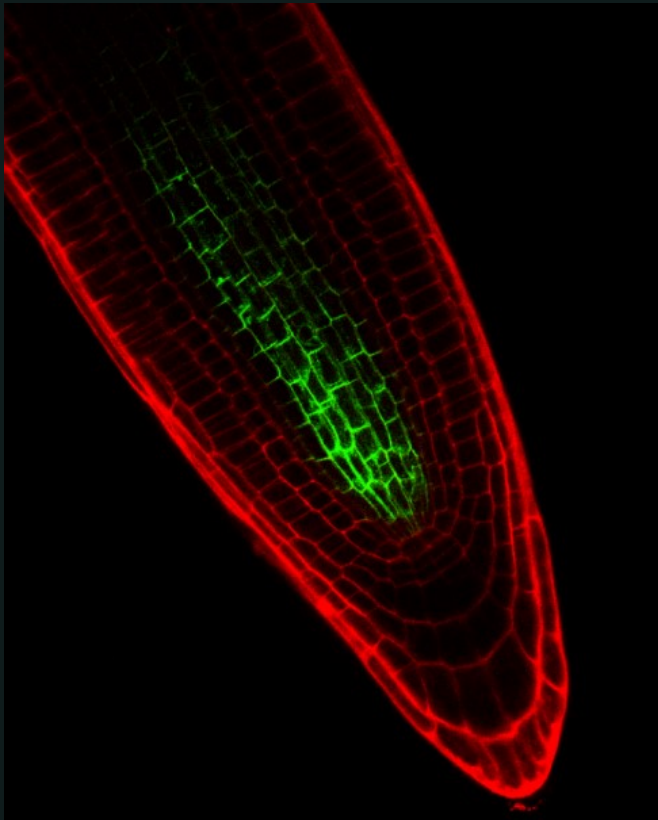
Genová exprese

- **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)

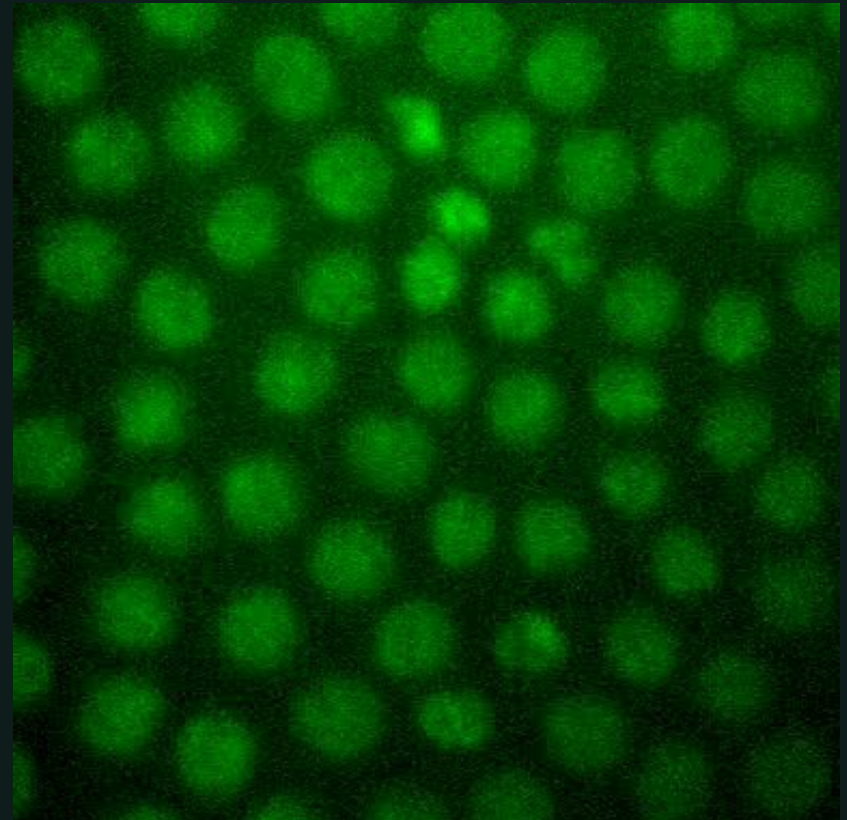


Genová exprese

- **Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s reportérovým 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



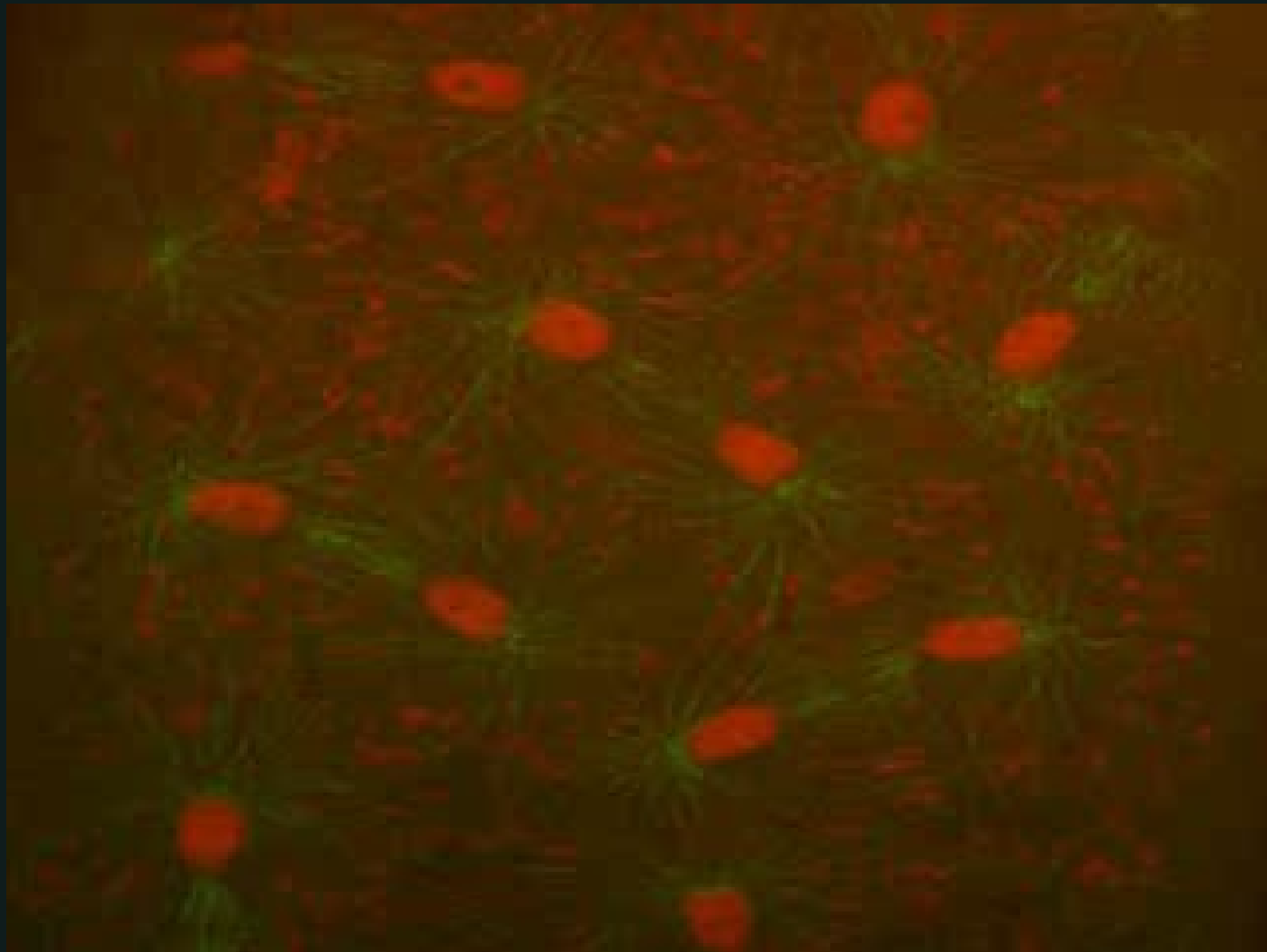
PIN1-GFP in *Arabidopsis*



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

Genová exprese

- Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s repotérovým genem

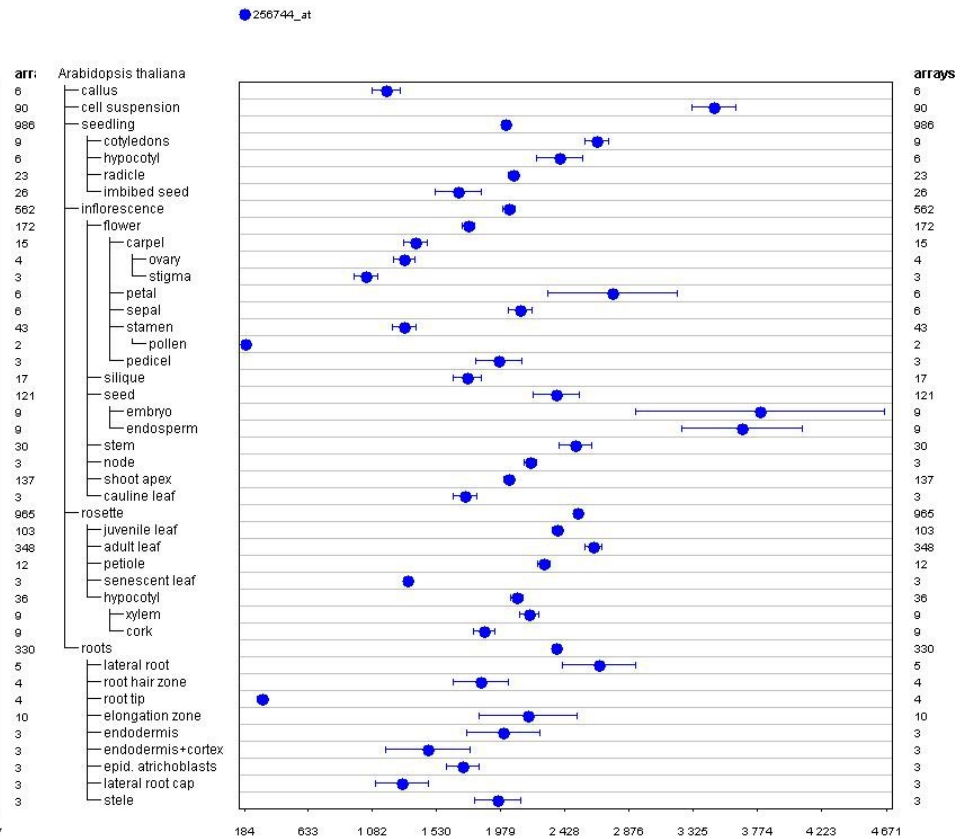
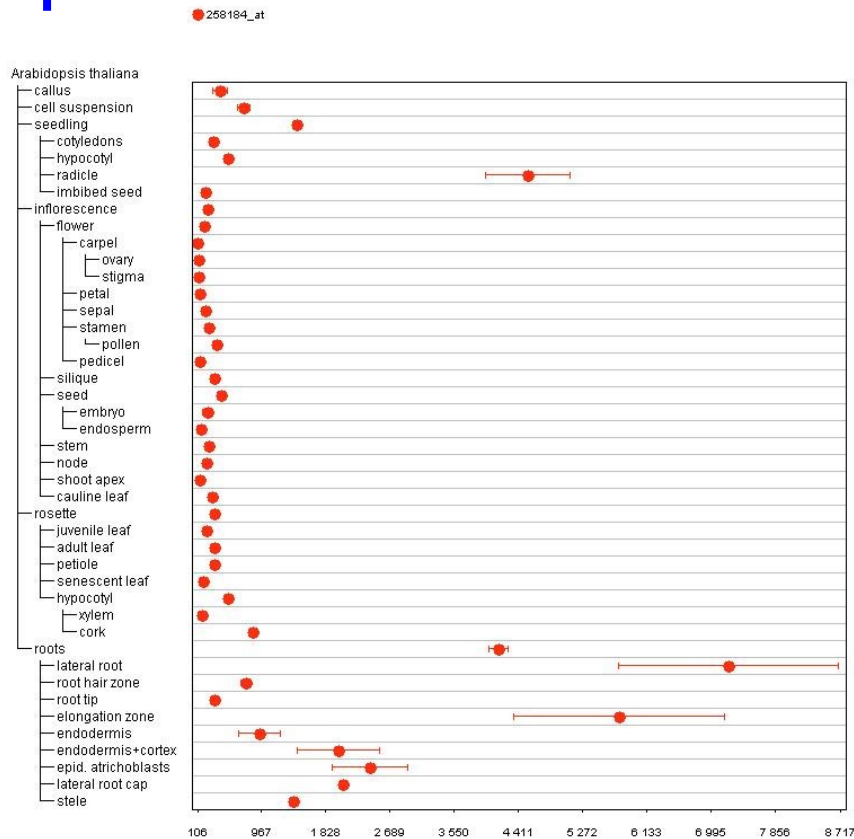


Osnova

- Využití dostupných dat ve veřejných databázích

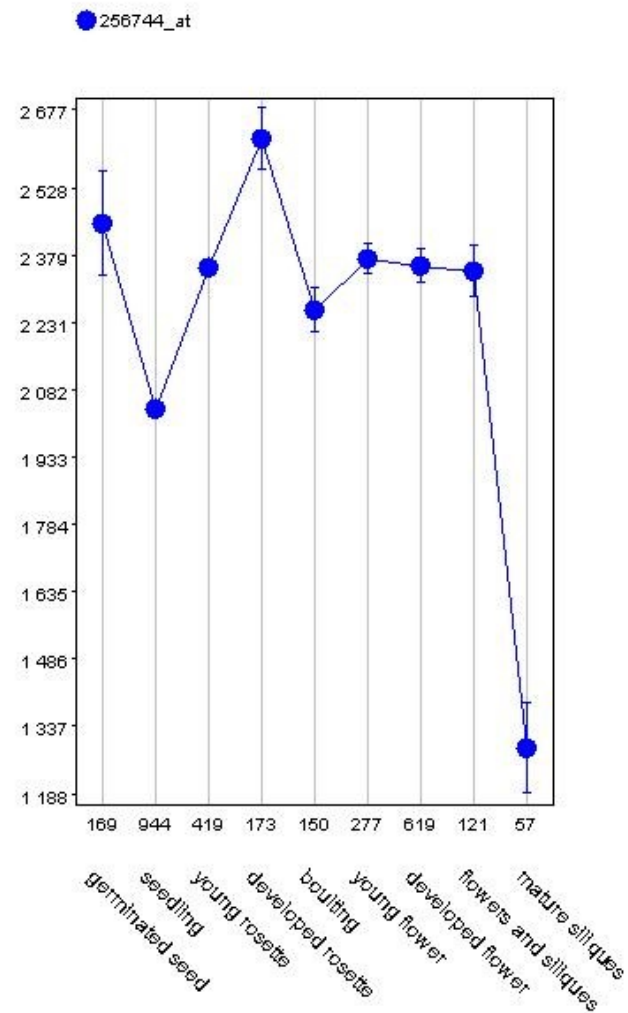
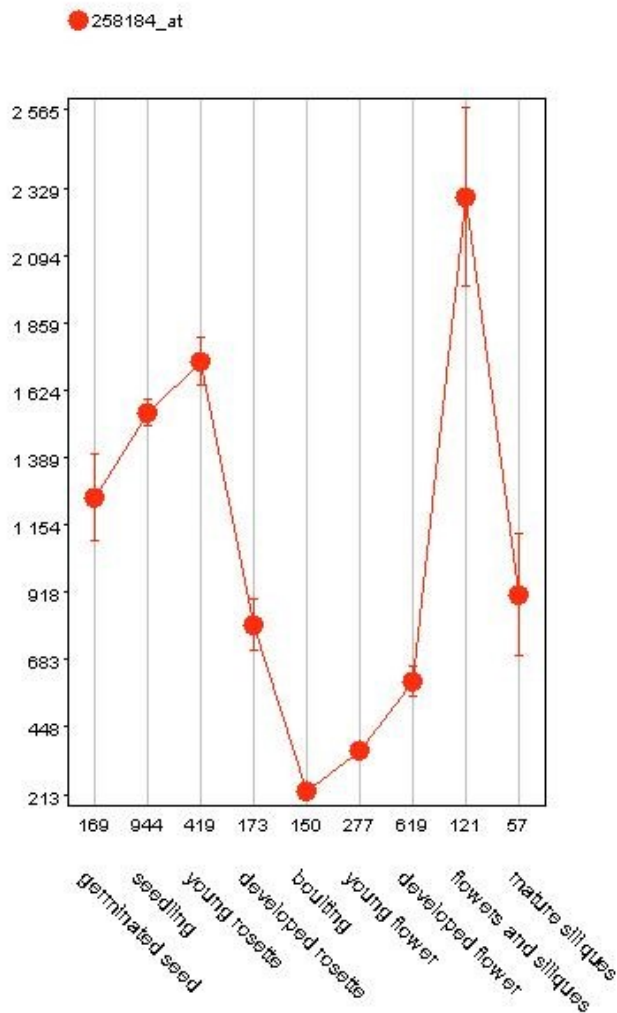
Genová exprese

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



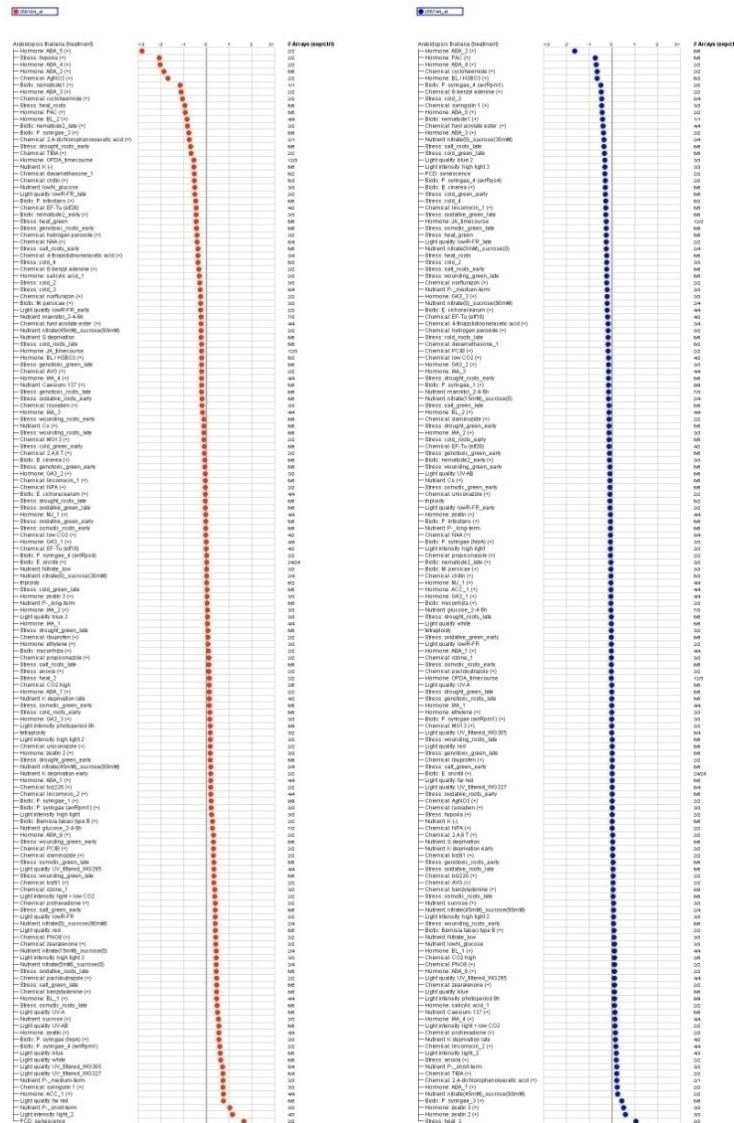
Genová exprese

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



Genová exprese

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

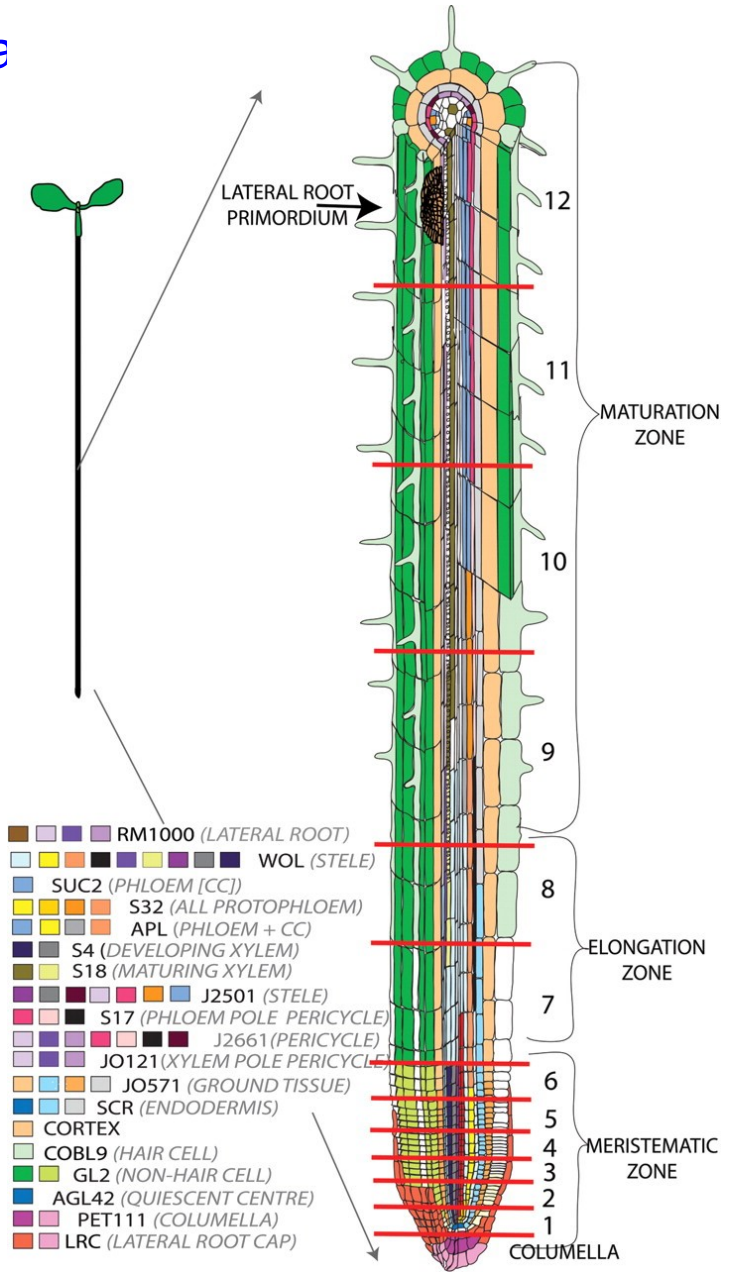
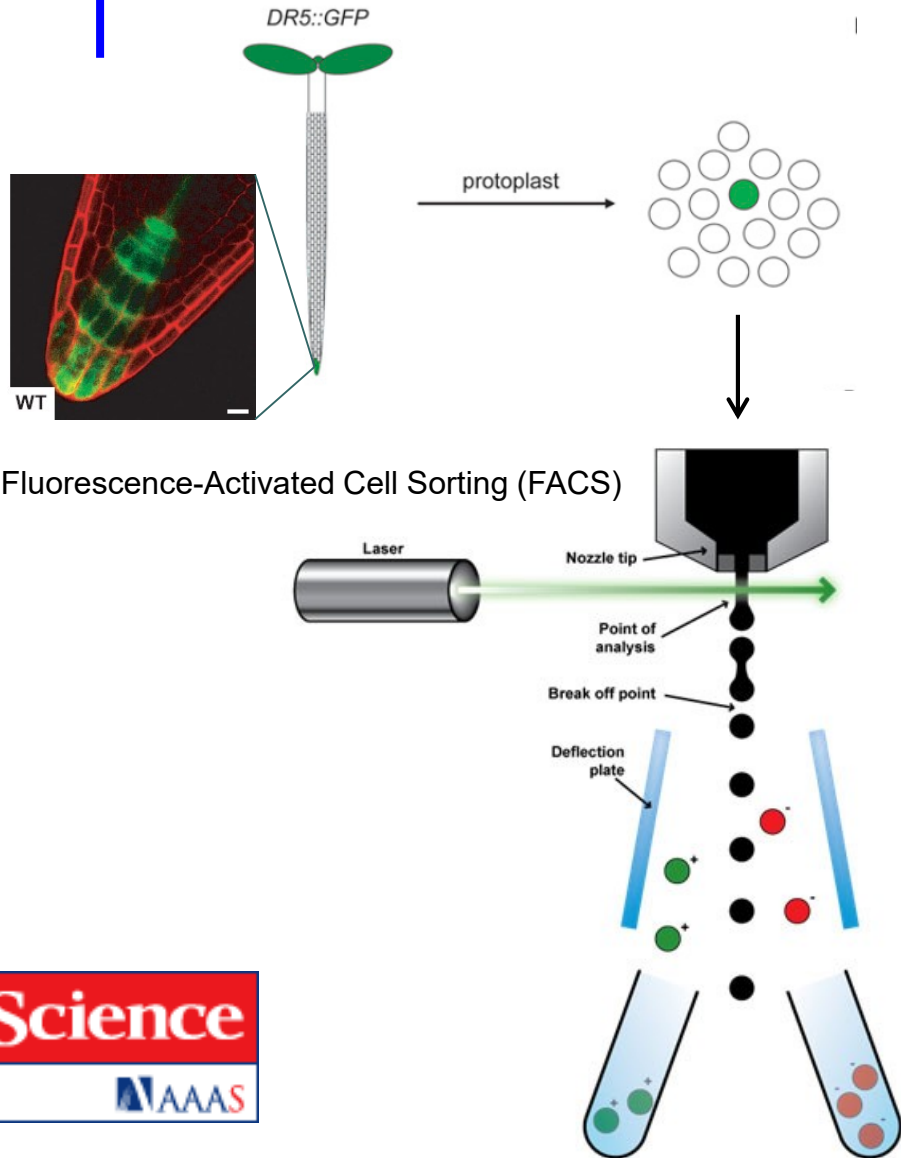


Osnova

- Tkáňově a buněčně specifická analýza genové exprese

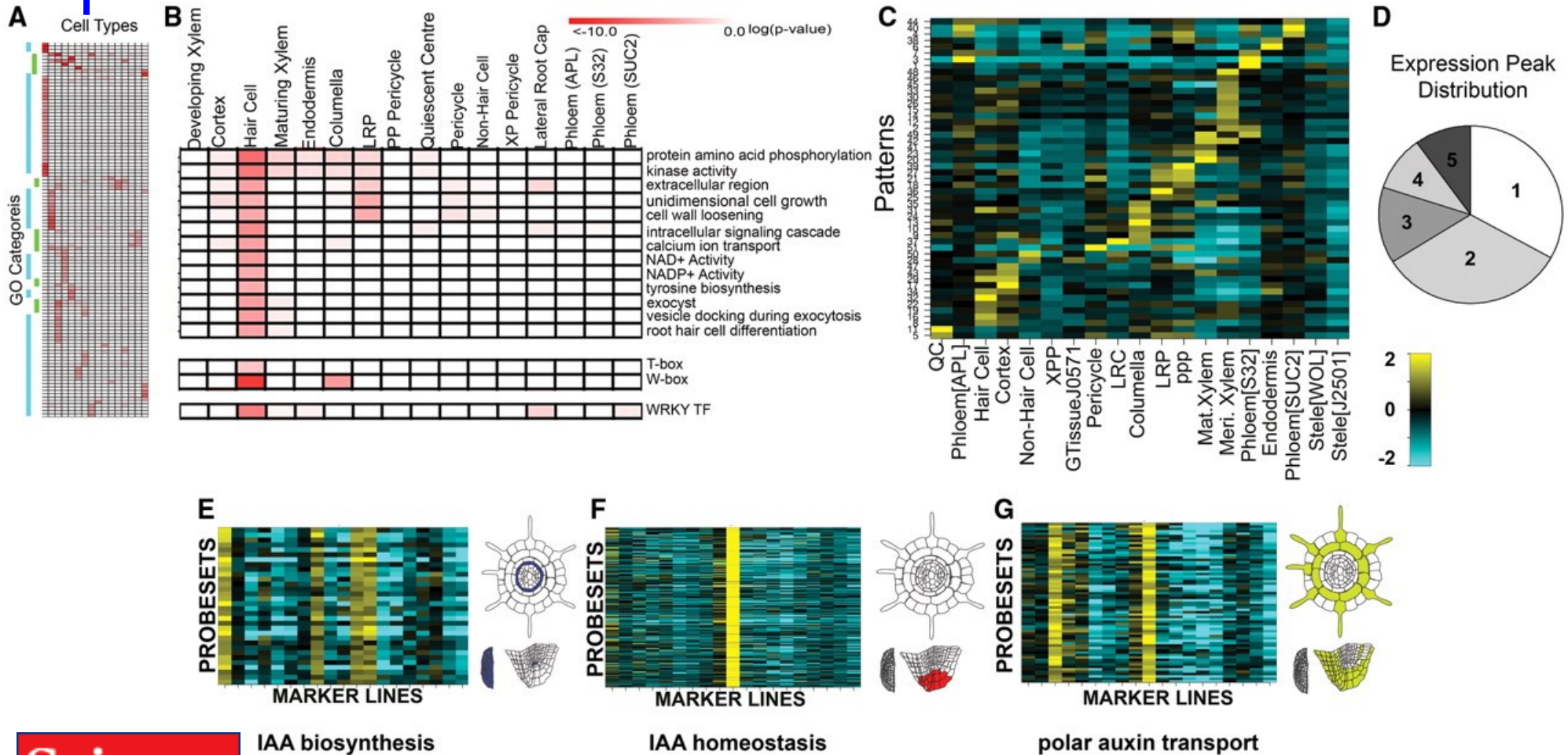
Expression Maps - RNA

High-Resolution Expression Map in Ara



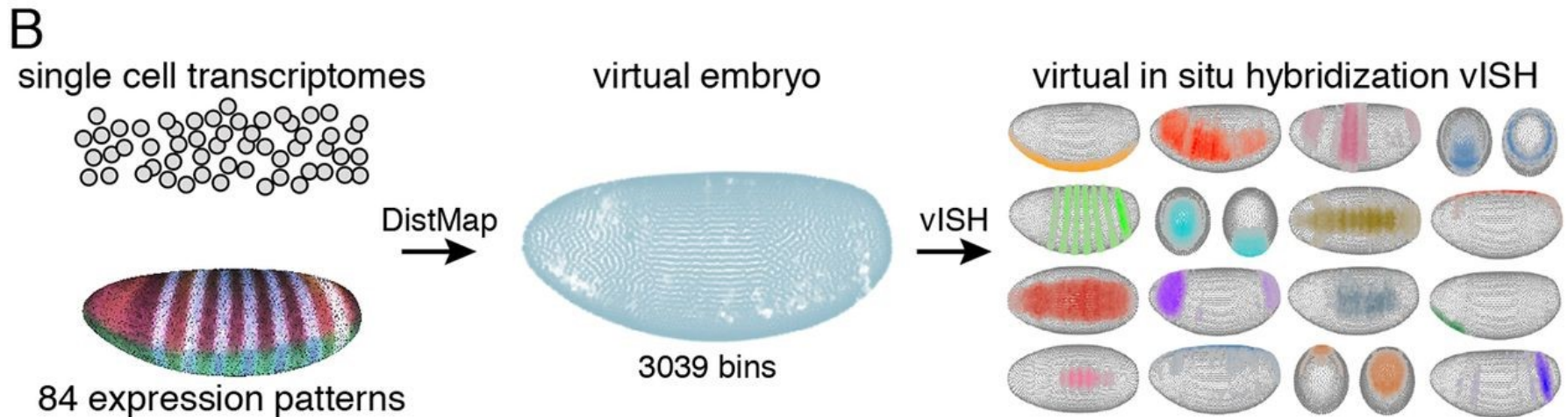
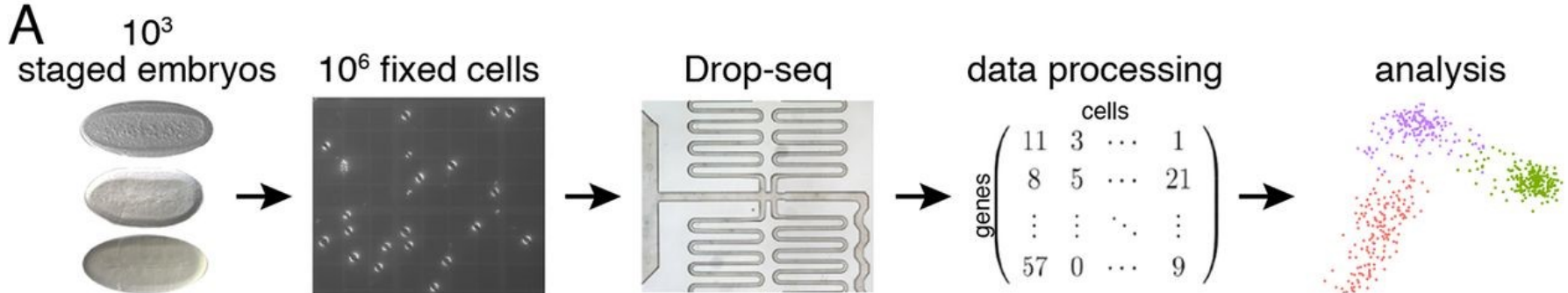
Expression Maps - RNA

High-Resolution Expression Map in Arabidopsis Root



Expression Maps - RNA

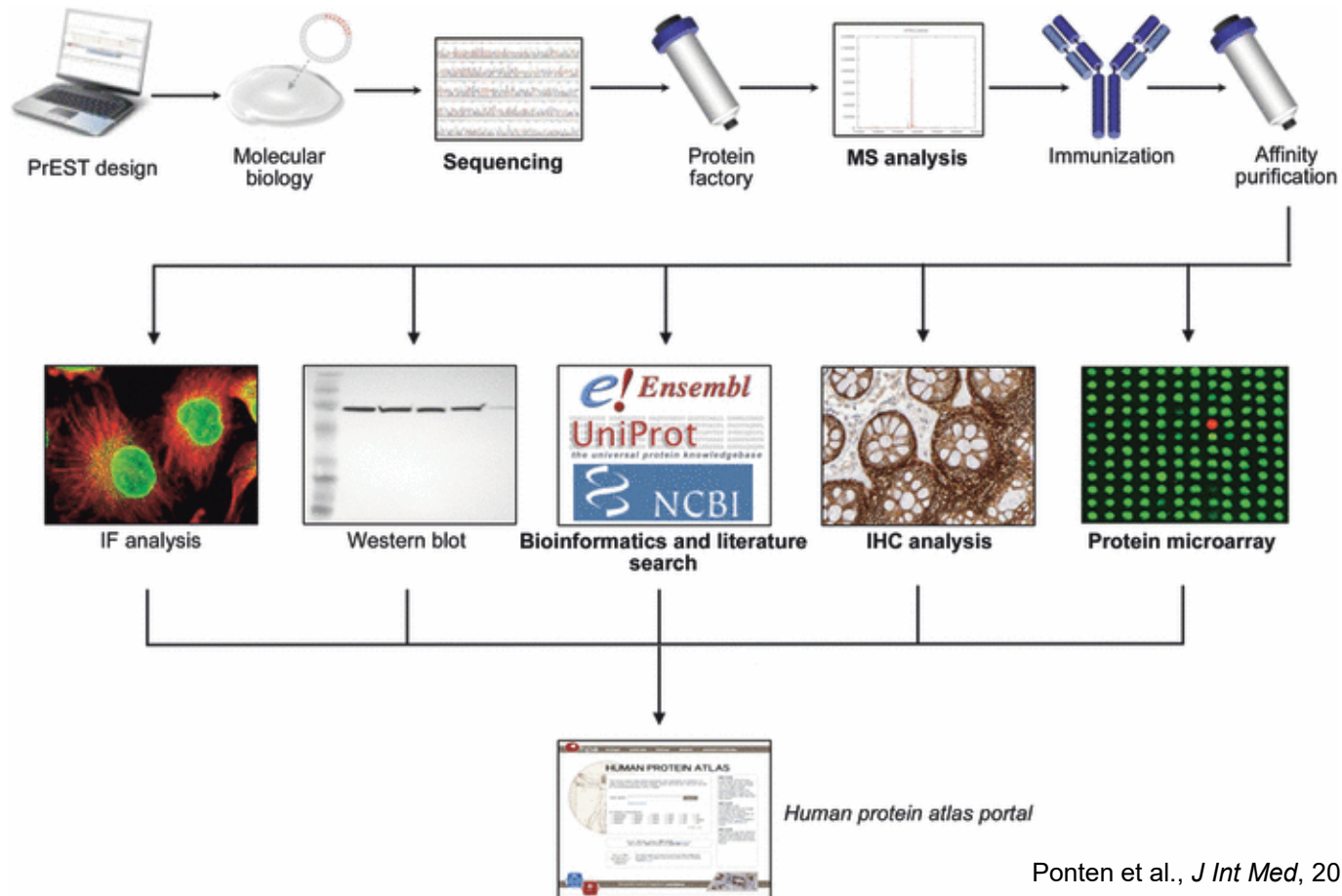
High-Resolution Expression Map in Drosophilla



Nikos Karaïskos 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

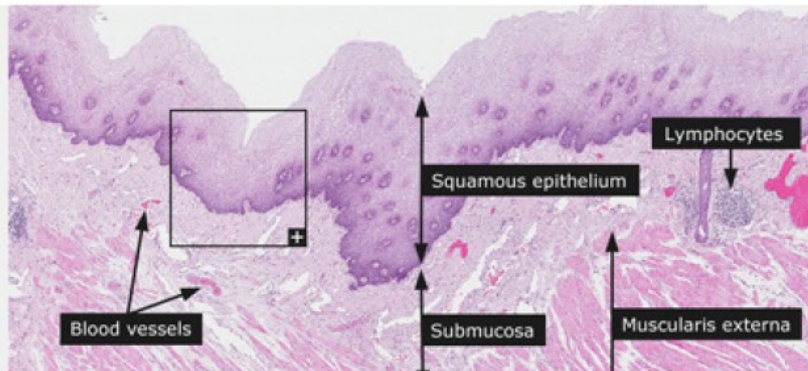
SEARCH ? »

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.

*Knut och Alice
Wallenbergs
Stiftelse*

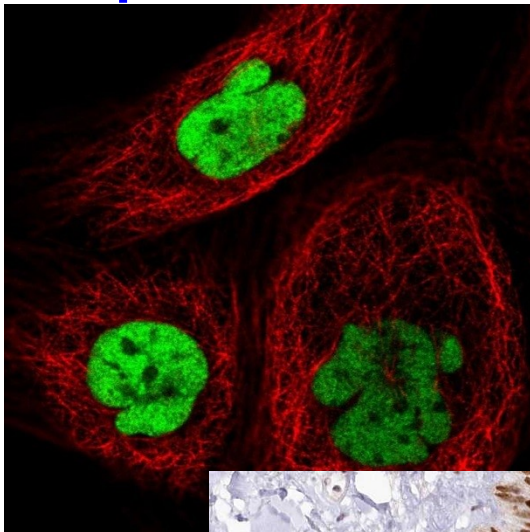
The Human Protein Atlas project is funded by the Knut & Alice Wallenberg foundation.


UPPSALA
UNIVERSITET

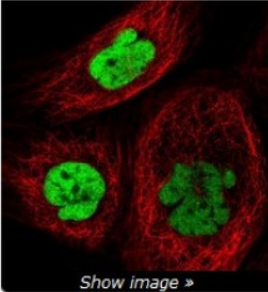

KTH
KTHNORRA
UNIVERSITET


Expression Maps - Proteins

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



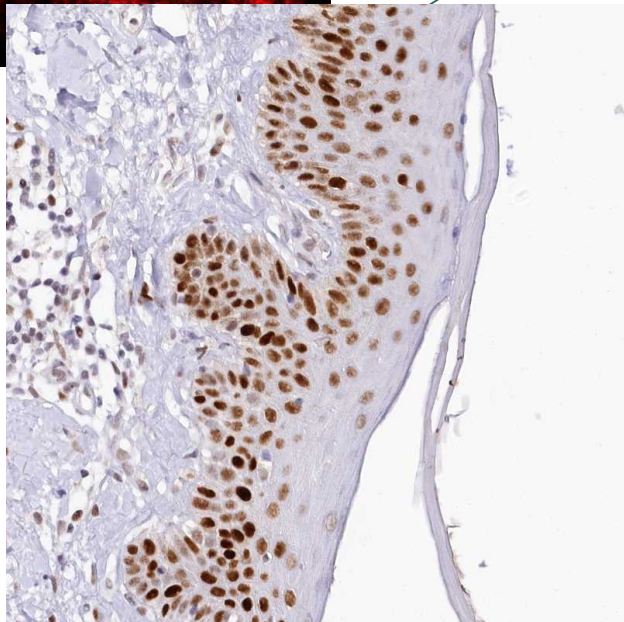
SUBCELLULAR LOCATION SUMMARY ? »



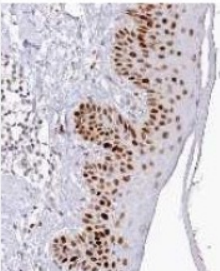
Main location(s) Nucleus but not nucleoli
Additional location(s)
Staining summary Localized to the nucleus but excluded from the nucleoli.
Reliability (APE)  High
Antibodies in assay CAB039238, CAB039239


[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

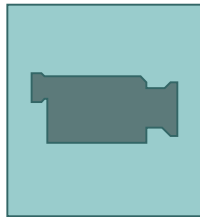
Osnova

- Kvantitativní analýza exprese
 - DNA a proteinové čipy

DNA Chips

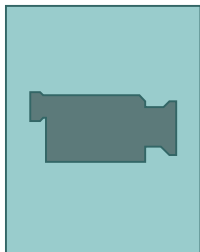
- DNA čipy

- 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 fotalitografické techniky-usnadnění syntézy oligonukleotidů např. pro celý genom člověka (cca $3,1 \times 10^9$ bp) je touto technikou možno připravit 25-mery v pouze 100 krocích)



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

Critical Specifications

| | |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Number of arrays | One |
| Number of sequence represented | >24,000 gene sequences |
| Feature size | 18 μ m |
| Oligonucleotide probe length | 25-mer |
| Probe pairs/sequence | 11 |
| Control sequences | <i>E. coli</i> genes <i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> . <i>B. subtilis</i> gene <i>lysA</i> . Phage P1 <i>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 [] Search

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 AlCl3, pool of 3, 8, and 24 hours) | Cy5 | |
| HoekengaS8 (*) : Aluminum Stress 2 [strong spatial bias] | AFGC: 7305 | 64: Aluminum Stress | technical | 63 | 7304_Cy5.7305_Cy3 | Aluminum (50 5M AlCl3, pool of 3, 8, and 24 hours) | Cy3 | Download |
| | | | | | 7304_Cy3.7305_Cy5 | no treatment (pool of 3, 8, and 24 hours) | Cy5 | |

- v současnosti je již velké množství výsledků různých experimentů lokalizovaných ve veřejně přístupných databázích

Che et al., 2002

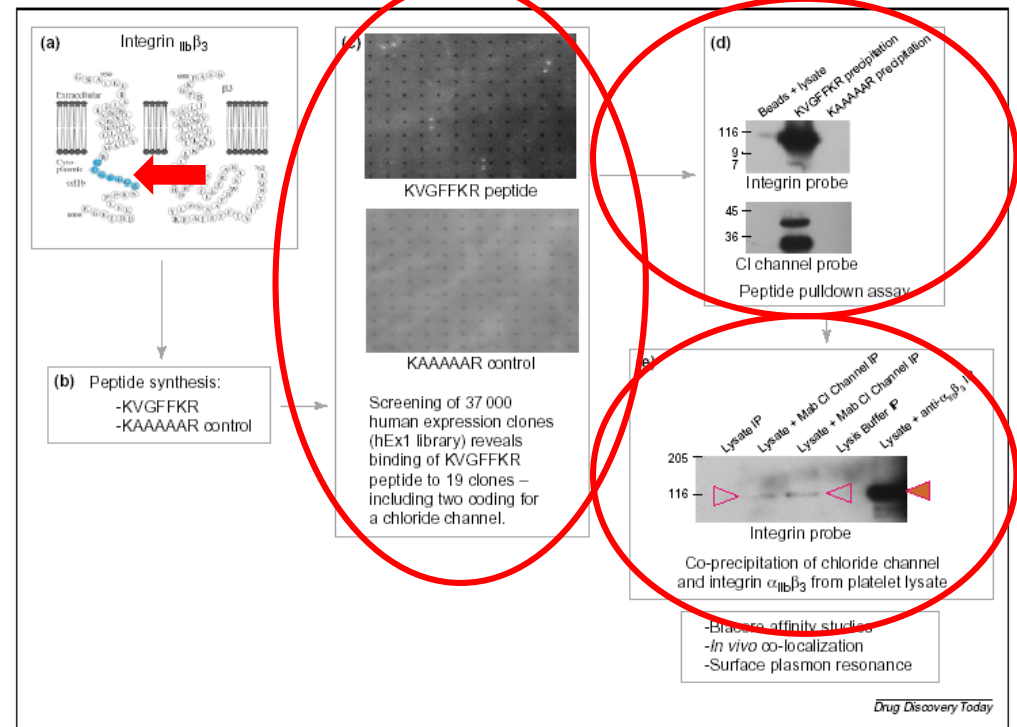
Protein Chips

- 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)



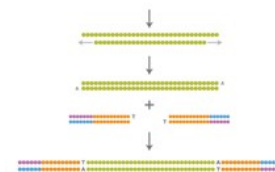
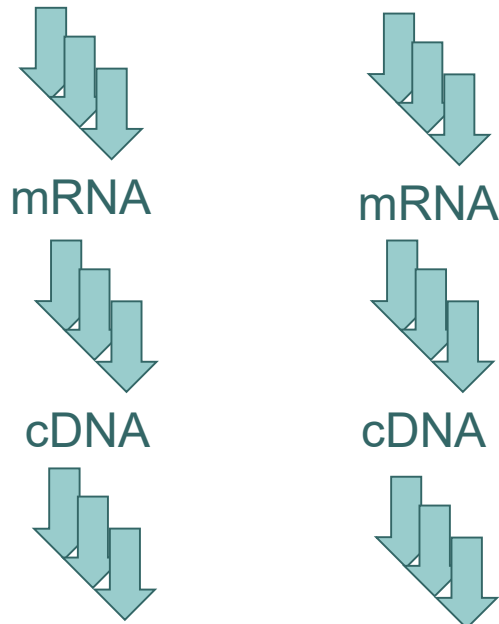
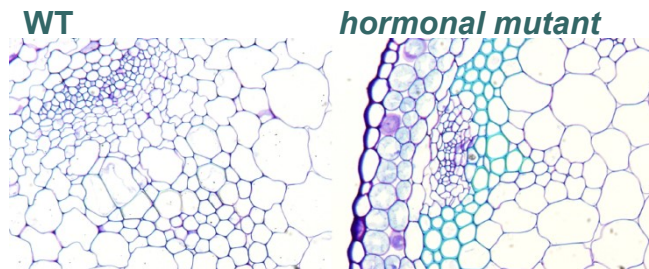
Lueking et al., 2005

Osnova

- Next gen transkripční profilování

Next Gen Transcriptional Profiling

- *Transcriptional profiling* via *RNA sequencing*



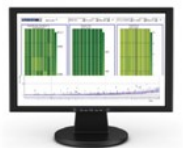
Library Preparation
~2 h [15 min hands-on (Nextera)]
< 6 h [< 3 h hands-on (TruSeq)]



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...**

Dii 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 |

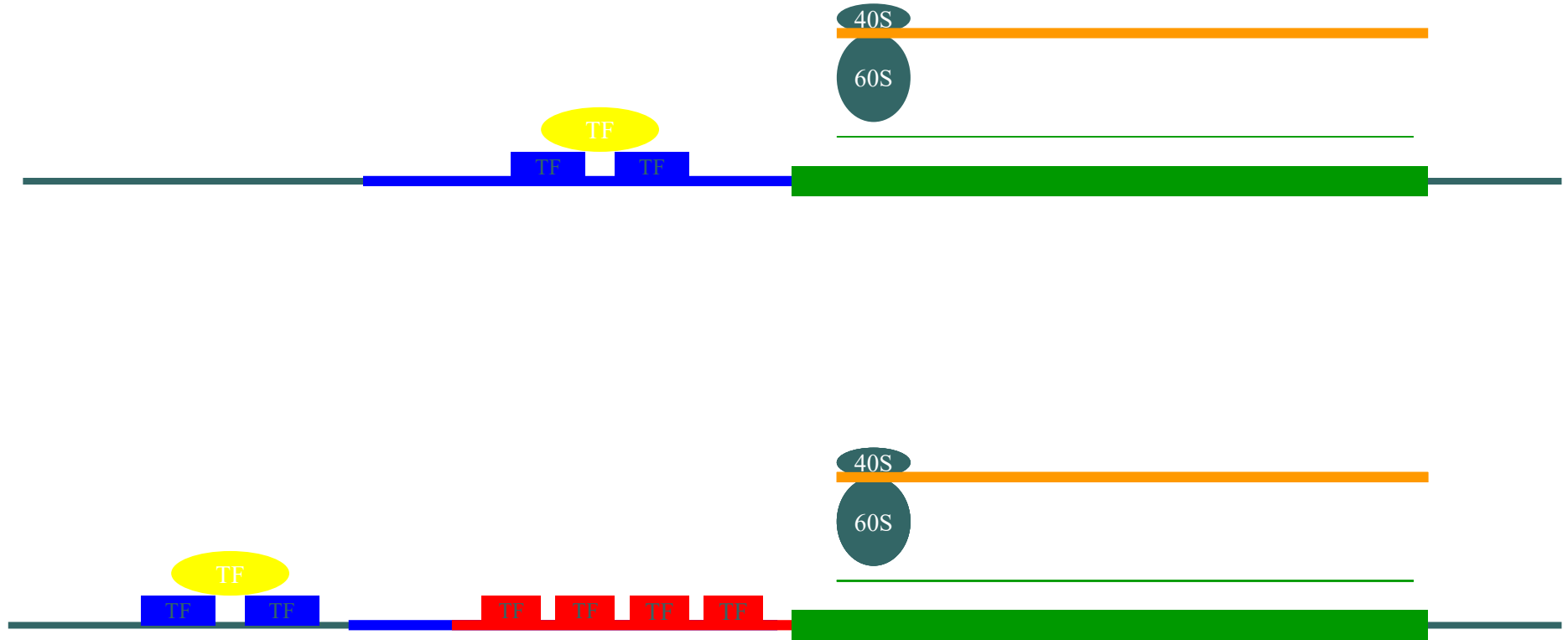
Osnova

- Regulace genové exprese v identifikaci funkce genů
přístupy získané funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze

Gain-of-Function Approaches

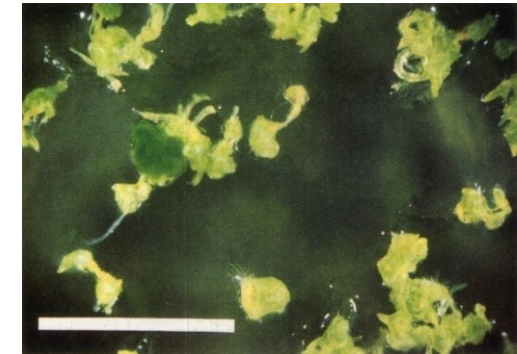
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inserce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
 - prvním krokem je příprava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

Activation Mutagenesis

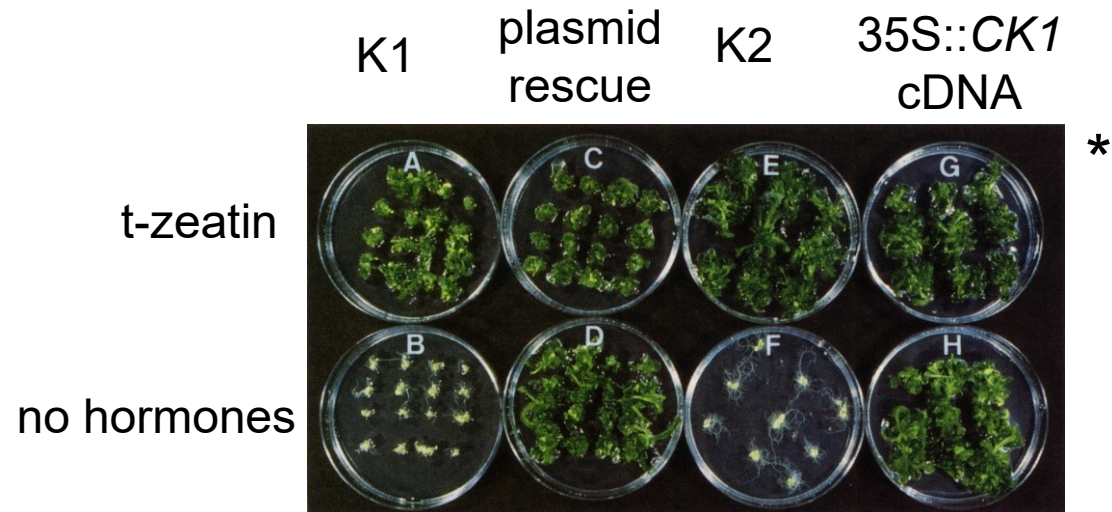


Izolace genu *CK11*

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



- mutantní fenotyp je fenokopii exogenní aplikace cytokininů (*CK11*, C*YTO*K*ININ* I*NDEPENDENT* 1)



Osnova

- Regulace genové exprese v identifikaci funkce genů
přístupy získané 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

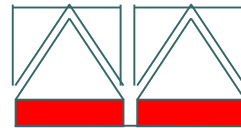


reporter

35S



LhG4



pOP

TATA



CKI1

Regulated Expression Systems



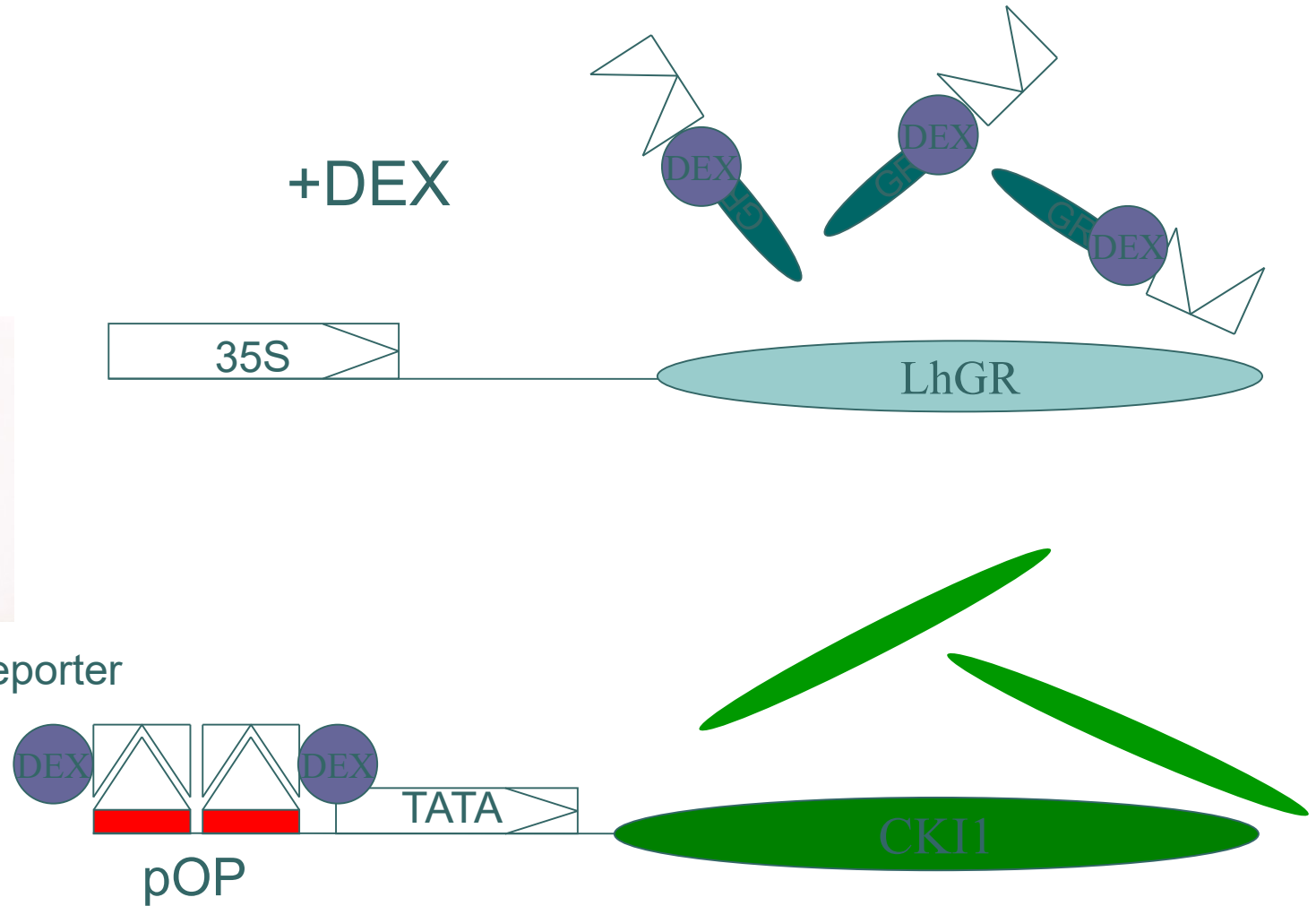
activator
X



activator x reporter



reporter



Regulated Expression Systems



activator
X



activator x reporter



reporter

+DEX

35S

LhGR

DEX

DEX

DEX

wt Col-0

DEX

DEX

TATA

pOP

CKI1

4C

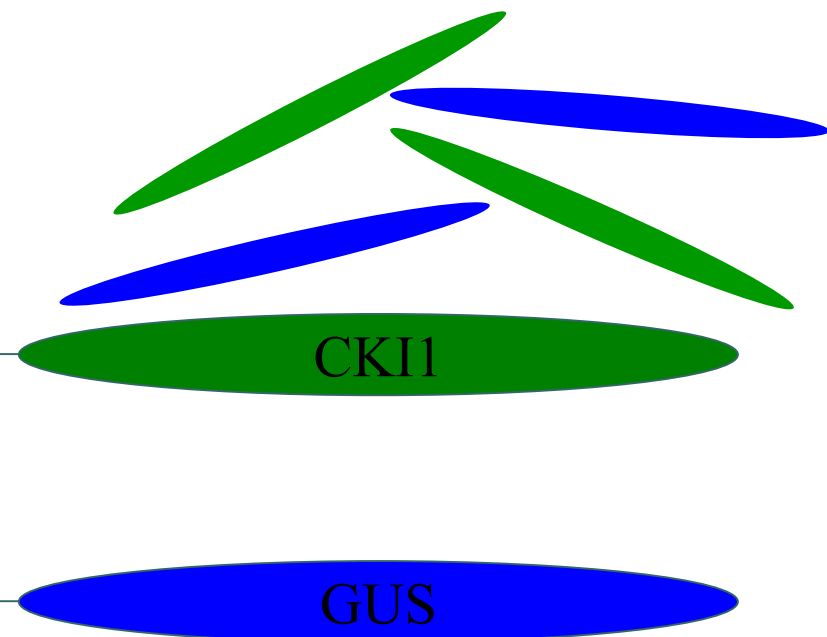
DEX

DEX

TATA

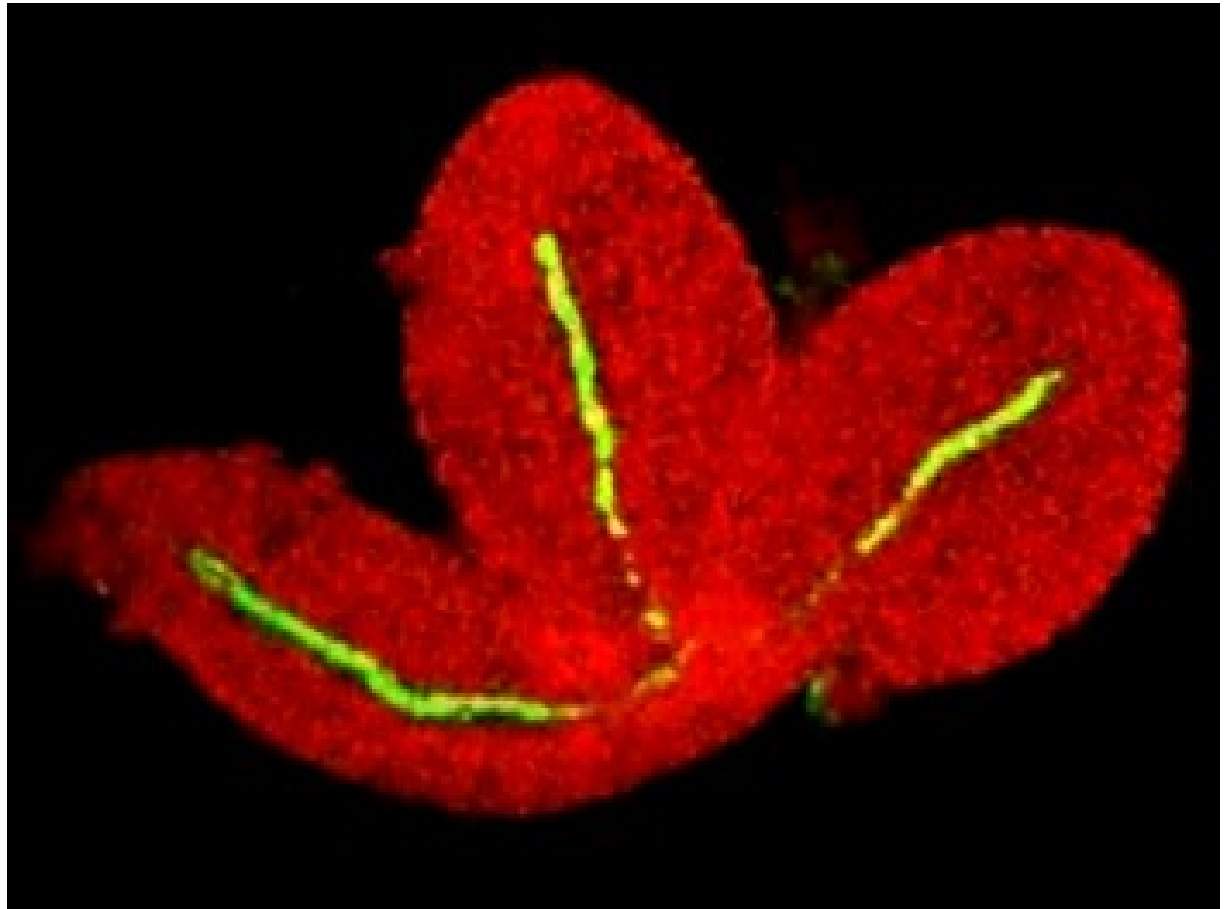
pOP

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



- Chemická genetika

Chemical Genetics

- Nové trendy
 - chemická genetika
 - pojem **chemická genetika** – více než **50.000/89.631** záznamů v databázi PubMed (16.10. **2008/29.10. 2015**, **nárůst 65%**)

The screenshot displays the PubMed search interface. At the top, the NCBI logo and 'PubMed' text are visible, along with the text 'A service of the U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health' and the URL 'www.pubmed.gov'. Below this, there are navigation tabs for 'All Databases', 'PubMed', 'Nucleotide', 'Protein', 'Genome', 'Structure', 'OHM', 'PMC', and 'Journals'. The search bar contains the text 'PubMed for chemical genetics' with 'Go' and 'Clear' buttons. There are also links for 'Advanced Search (beta)' and 'Save Search'. Below the search bar, there are buttons for 'Limits', 'Preview/Index', 'History', 'Clipboard', and 'Details'. The 'Display' section shows 'Summary' selected, 'Show 20' items, and 'Sort By' and 'Send to' options. The search results show 'All: 50407' and 'Review: 5562'. The first three results are listed with their titles, authors, and PMIDs. A 'Recent Activity' box on the right shows a search for 'chemikalogenika (50407)' with a 'PubMed' link.

NCBI PubMed
A service of the U.S. National Library of Medicine and the National Institutes of Health
www.pubmed.gov

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure OHM PMC Journals

Search PubMed for chemical genetics Go Clear Advanced Search (beta) Save Search

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display Summary Show 20 Sort By Send to

All: 50407 Review: 5562

Items 1 - 20 of 50407 Page 1 of 2521 Next

1: [Luchowski E, Mateeva EG, Grysinski J, Isperichig EA, Patankar L, Lucio G, Bonjio J, Grysinski Z.](#) Re: Brief Articles
Single Molecule Studies of Multiple-Fluorophore Labeled Antibodies. Effect of Homo-FRET on the Number of Photons Available Before Photobleaching.
Curr Pharm Biotechnol. 2008 Oct;9(3):411-20.
PMID: 18833493 [PubMed - in process]

2: [Kobayashi M, Iwata Y, Shinkai J.](#) Re: Brief Articles, Links
Five cases of beta-ureidopropionase deficiency detected by GC/MS analysis of urine metabolome.
J Mass Spectrom. 2008 Oct 14. [Epub ahead of print]
PMID: 18833477 [PubMed - as supplied by publisher]

3: [Zhou M, Peng Z, Hsu-Lylycz P, Wu H.](#) Re: Brief Articles, Links
A conserved C-terminal thirteen amino acid motif of Gap1 is required for the Gap1 function and necessary for biogenesis of a serine-rich glycoprotein of Streptococcus parasanguinis.
Infect Immun. 2008 Oct 13. [Epub ahead of print]
PMID: 18832249 [PubMed - as supplied by publisher]

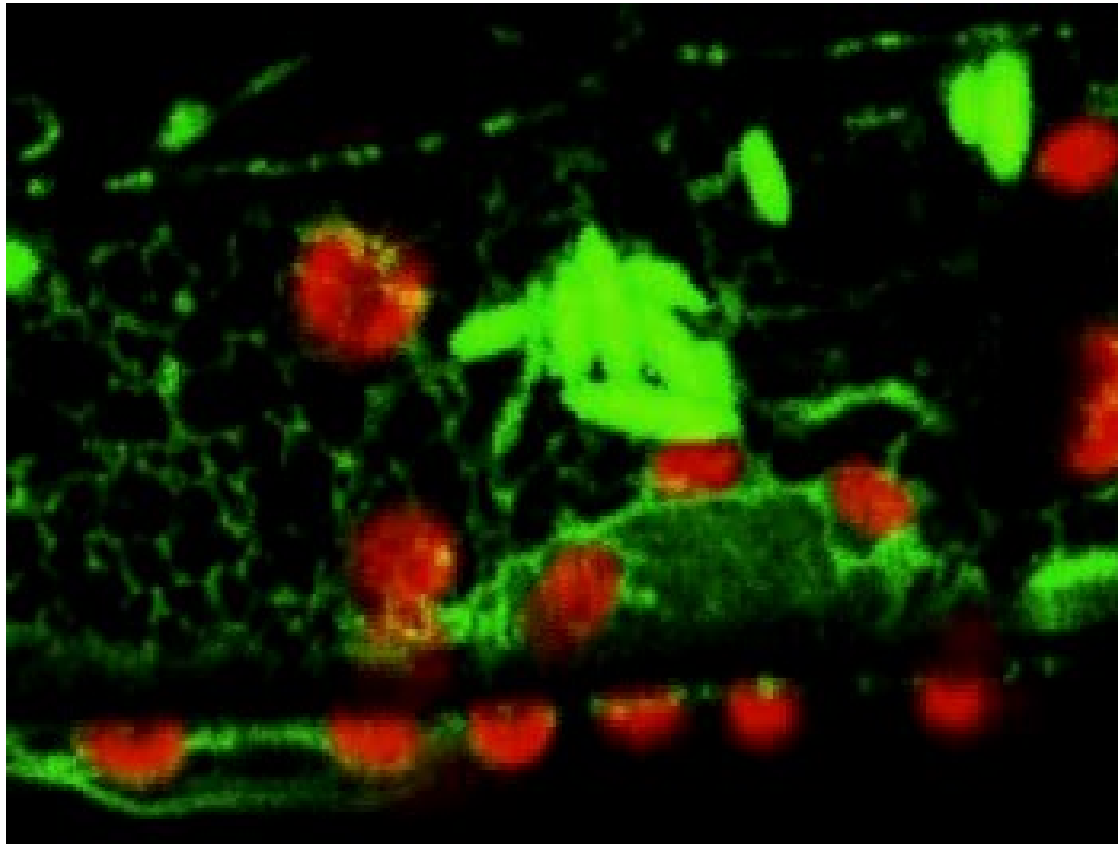
Recent Activity
chemikalogenika (50407) PubMed

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

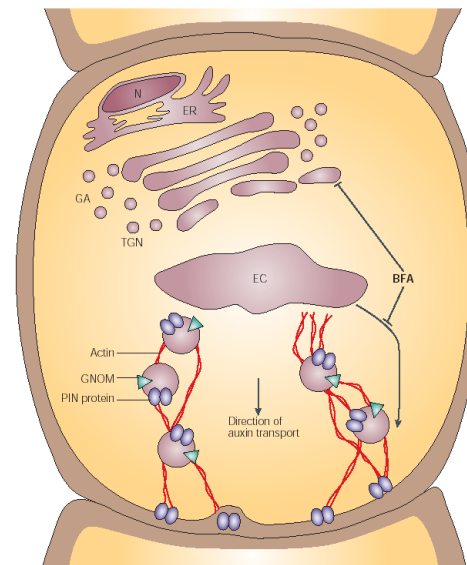
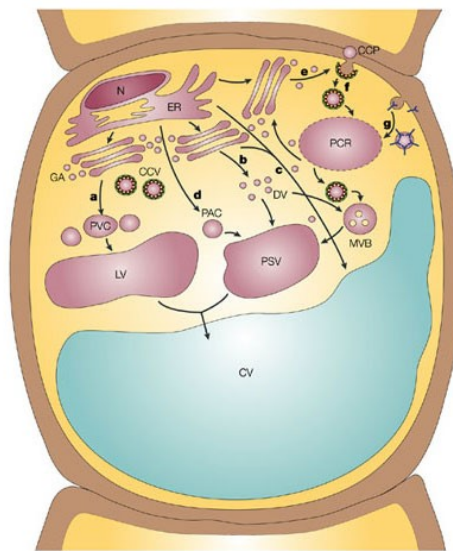
Chemical Genetics

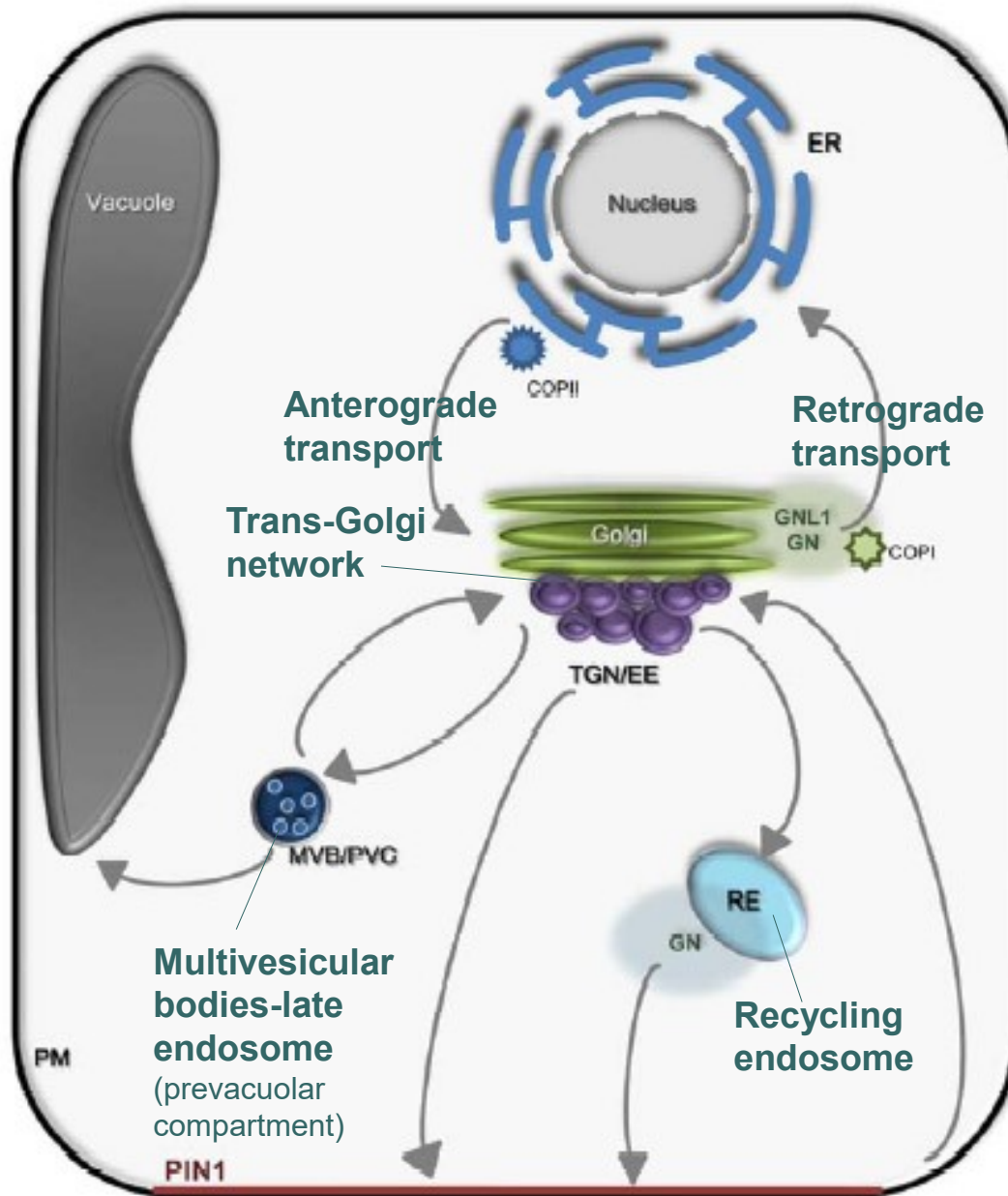
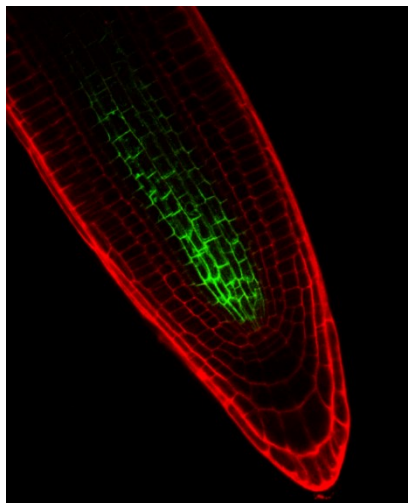
- Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupů chemické genetiky
 - v rostlinných buňkách dochází k velice dynamickým procesům, zprostředkovaným zejména tzv. endomembránovým transportem (viz film, GFP směřované do ER)



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



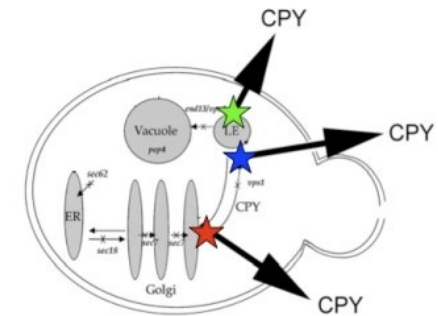


Richter et al., *E J Cell Biol* (2010)

Chemical Genetics

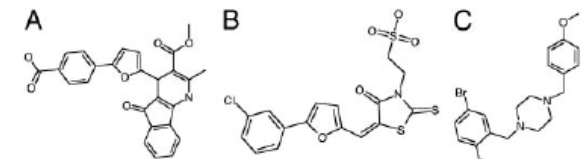
- Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupy chemické genetiky

- 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

chemická struktura sortinů

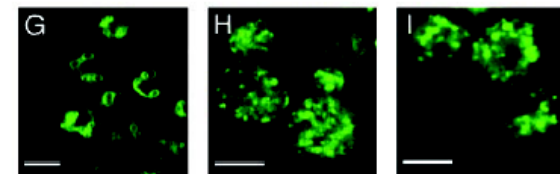


0 2.5 5 10 25 50 100 [mg/L]



Imunodetekce karboxypeptidázy

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



Chemical Genetics

- Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupy chemické genetiky

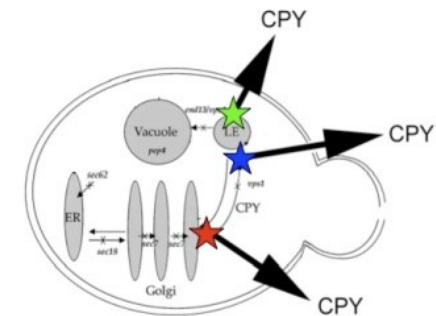
- pomocí vyhledávání v „knihovně“ chemických látek byly identifikovány takové, které vedou u kvasinek (*S. cerevisiae*) k sekreci enzymu (karboxipeptidázy Y), která je normálně transportována pomocí endomembránového transportu do vakuoly

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

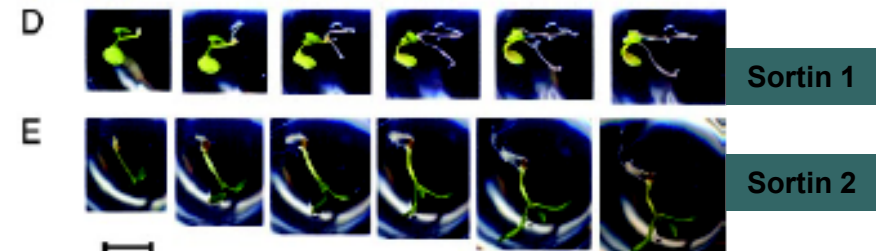
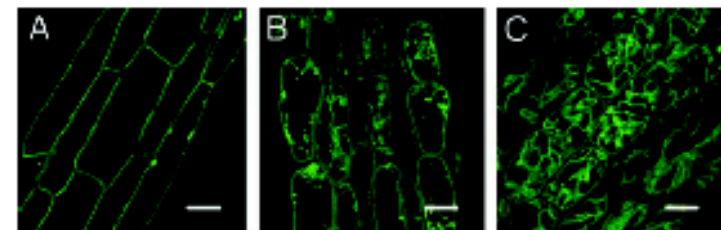
- identifikované látky („sortiny“) byly schopny vyvolat obdobné změny i u *Arabidopsis* - konzervované mechanismy transportu u kvasinek i u rostlin

- 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 změnou citlivostí k sortinu 1 (hyper- nebo hypo-senzitivní mutanti)



tvary rostlinných vakuol pomocí EGFP::TIP



fenotyp semenáčků v přítomnosti sortinů

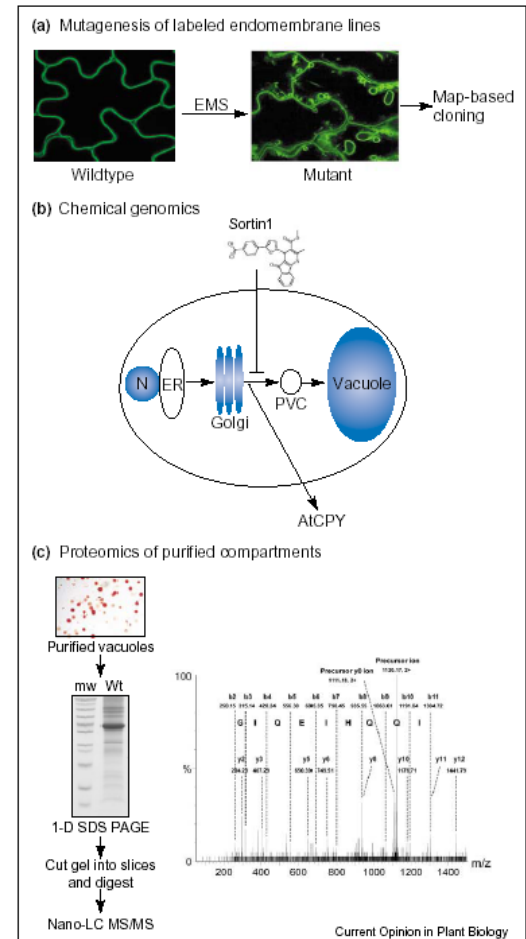
Chemical Genetics

- 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



Diskuse



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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