

CG020 Genomika

Přednáška 6

Genová exprese a chemická genetika

Jan Hejátko

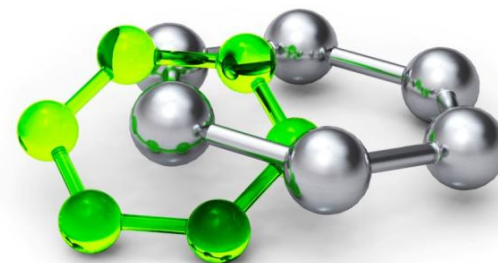
Funkční genomika a proteomika rostlin,
Středoevropský technologický institut (CEITEC)

a

Národní centrum pro výzkum biomolekul,
Přírodovědecká fakulta,

Masarykova univerzita, Brno
hejatko@sci.muni.cz, www.ceitec.eu

M U N I
S C I



Genomika 06

- 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

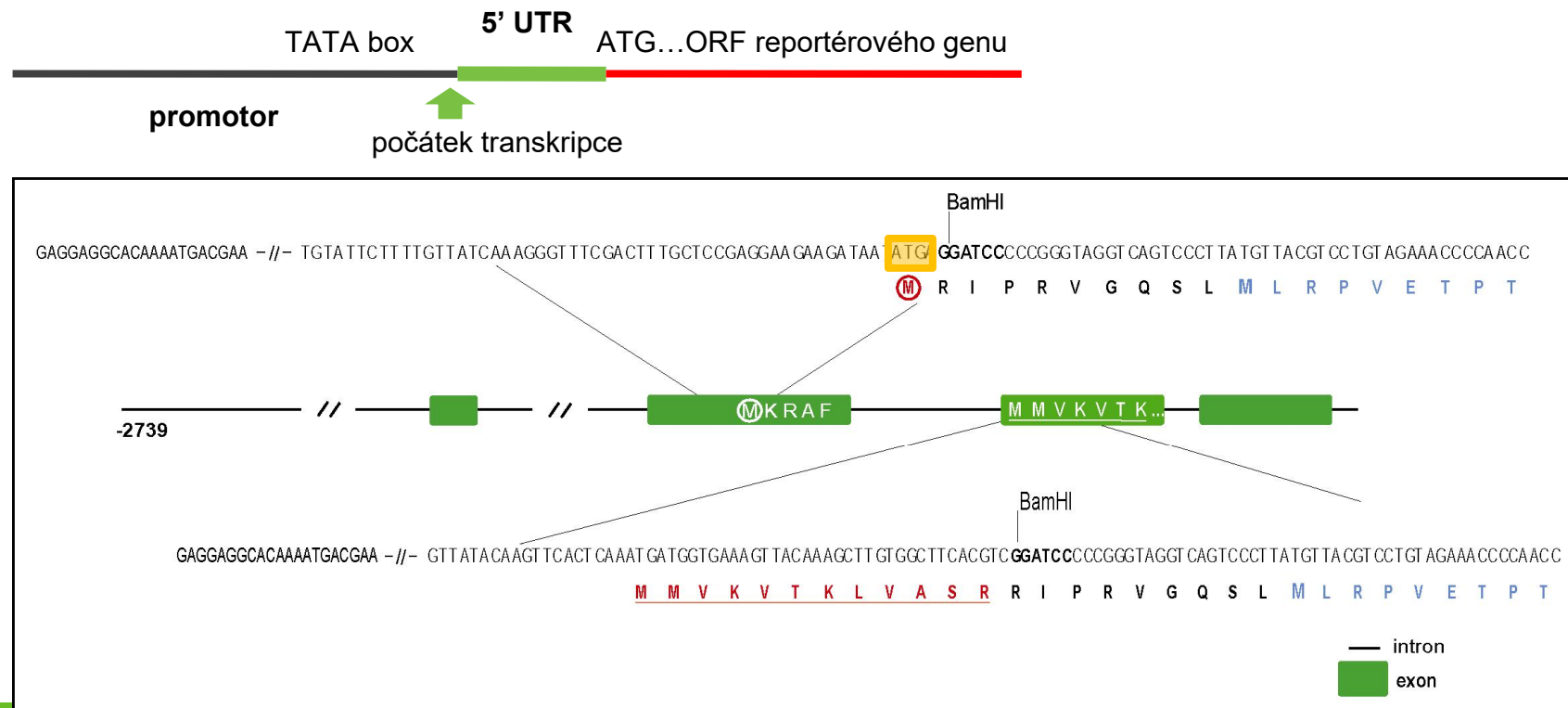
- Metody analýzy **genové exprese**
 - **Kvalitativní** analýza exprese genů
 - Příprava **transkripční fúze** promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava **translační fúze** kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Využití dostupných dat ve **veřejných 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)

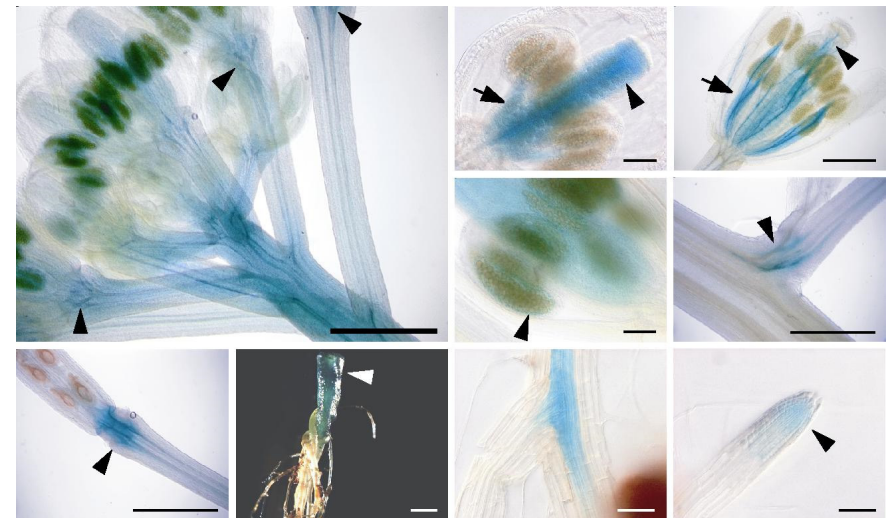
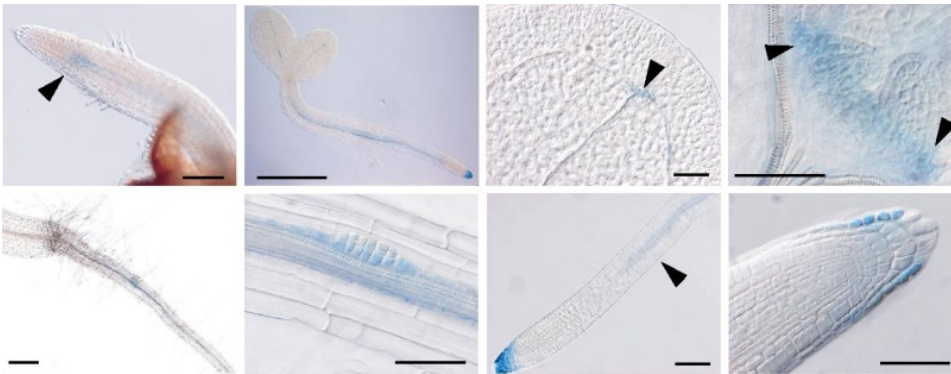
Transkripční fúze

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

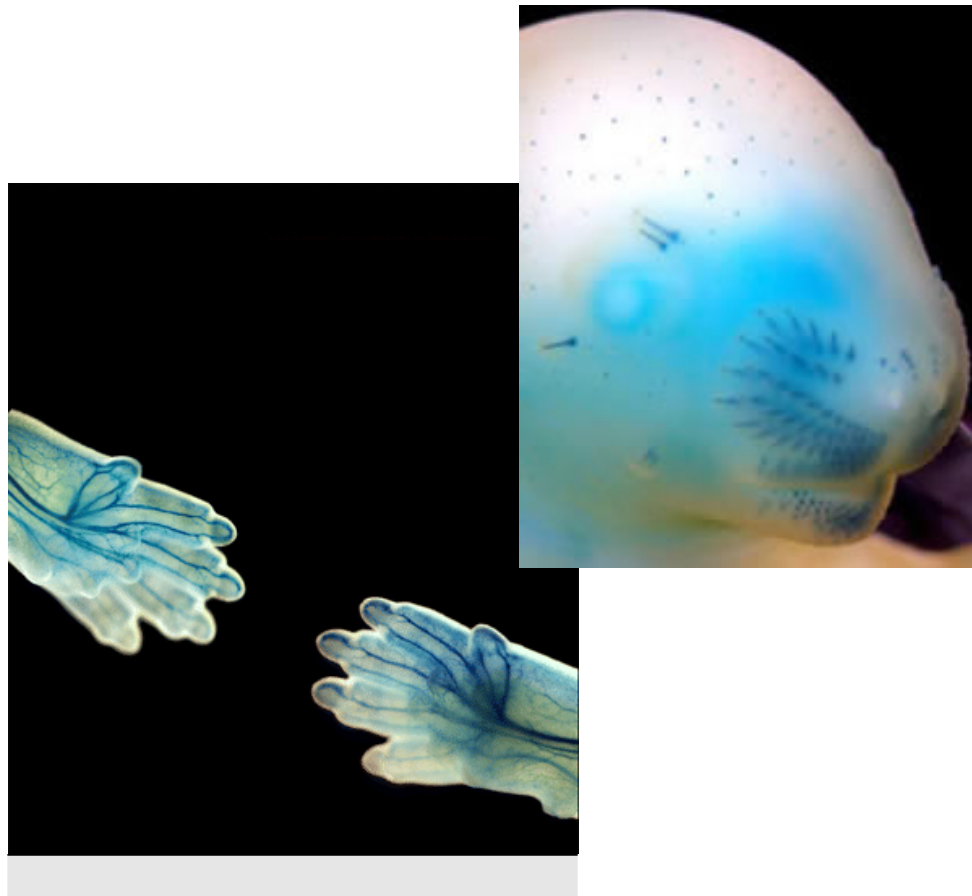


Transkripční fúze

- **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

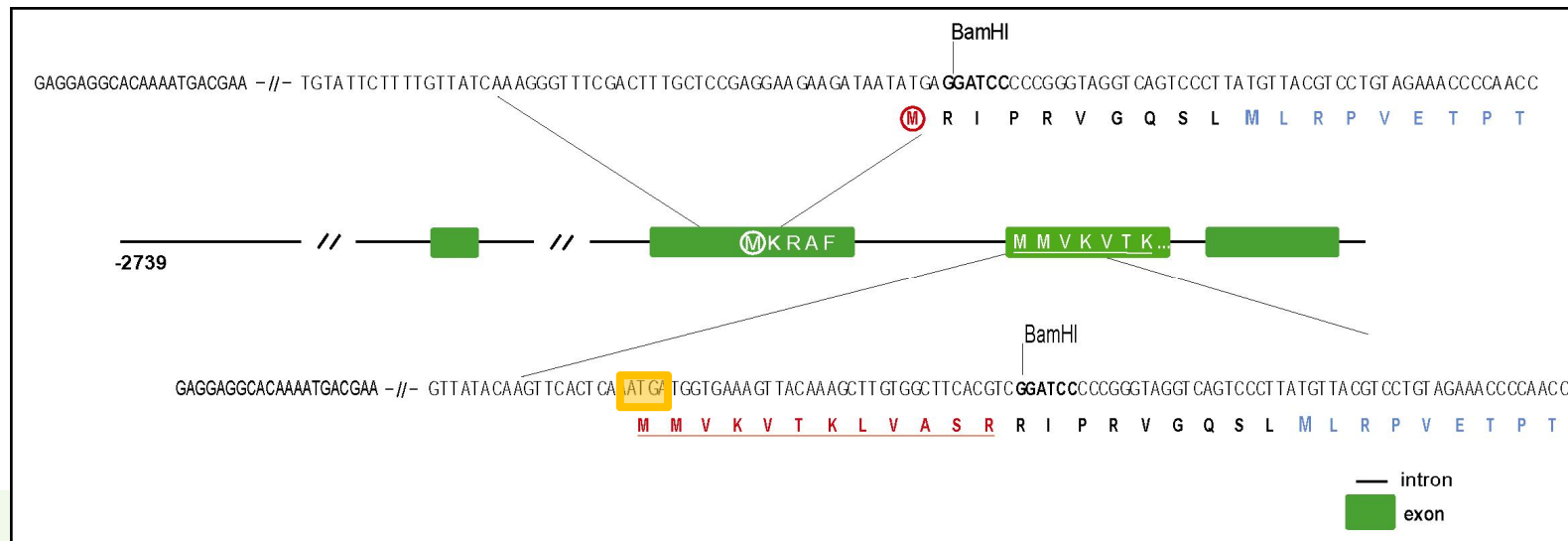
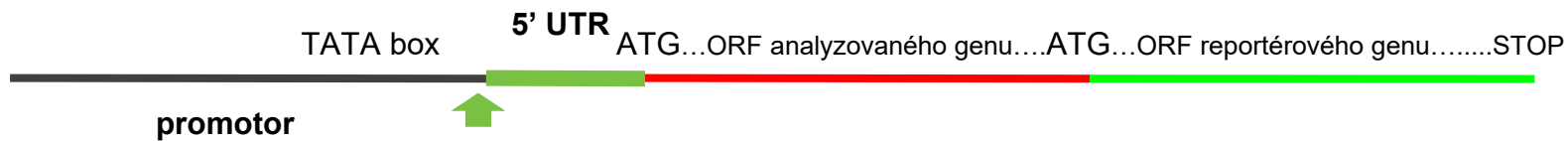


Osnova

- 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

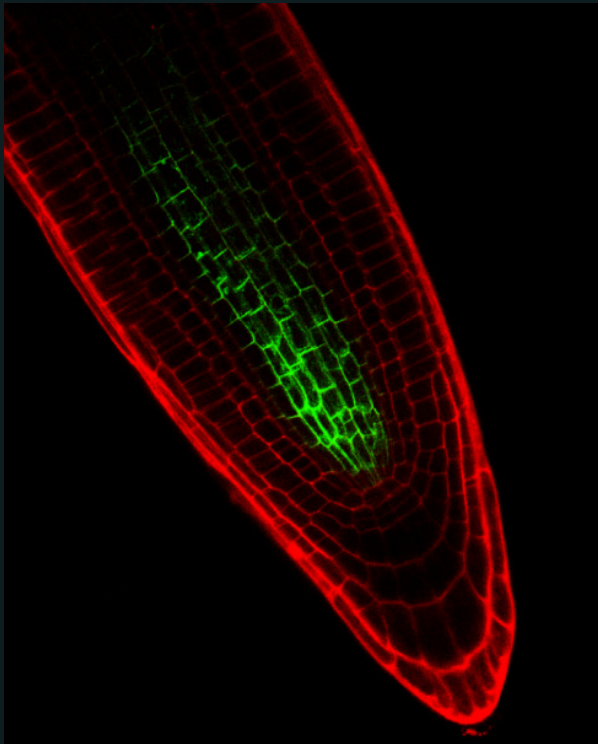
Translační fúze

- **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)

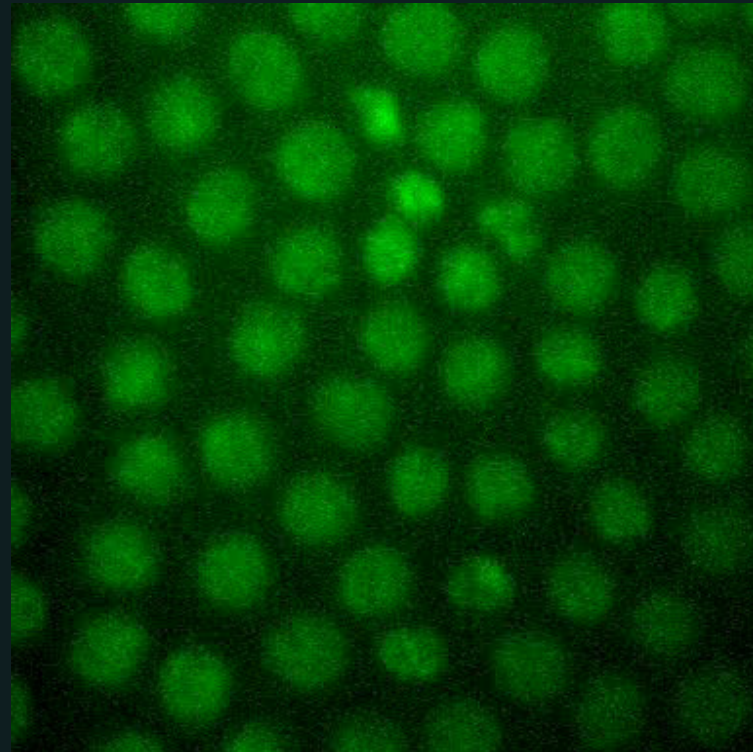


Translační fúze

- **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



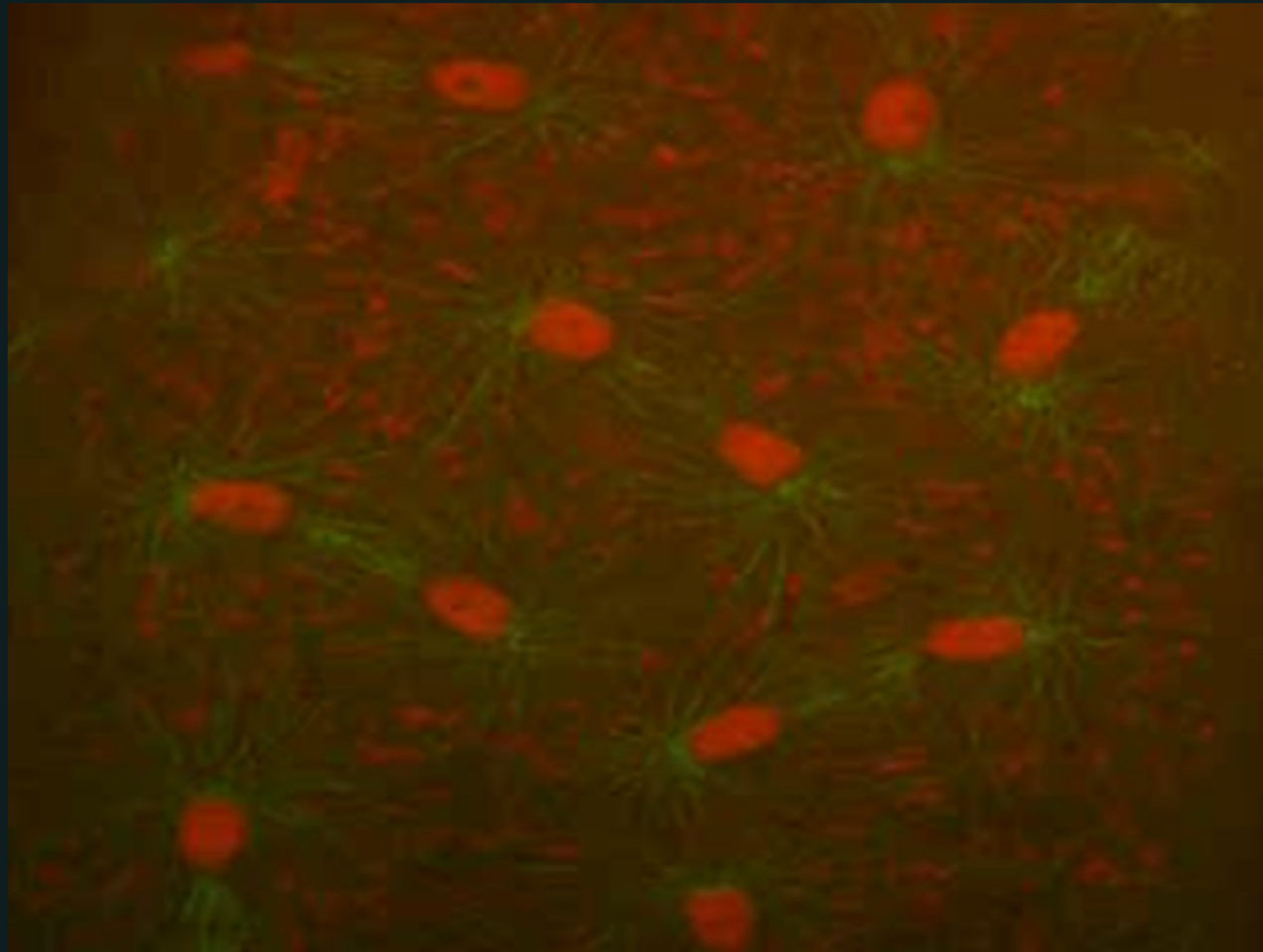
PIN1-GFP in *Arabidopsis*



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

Translační fúze

- Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s repotérovým genem

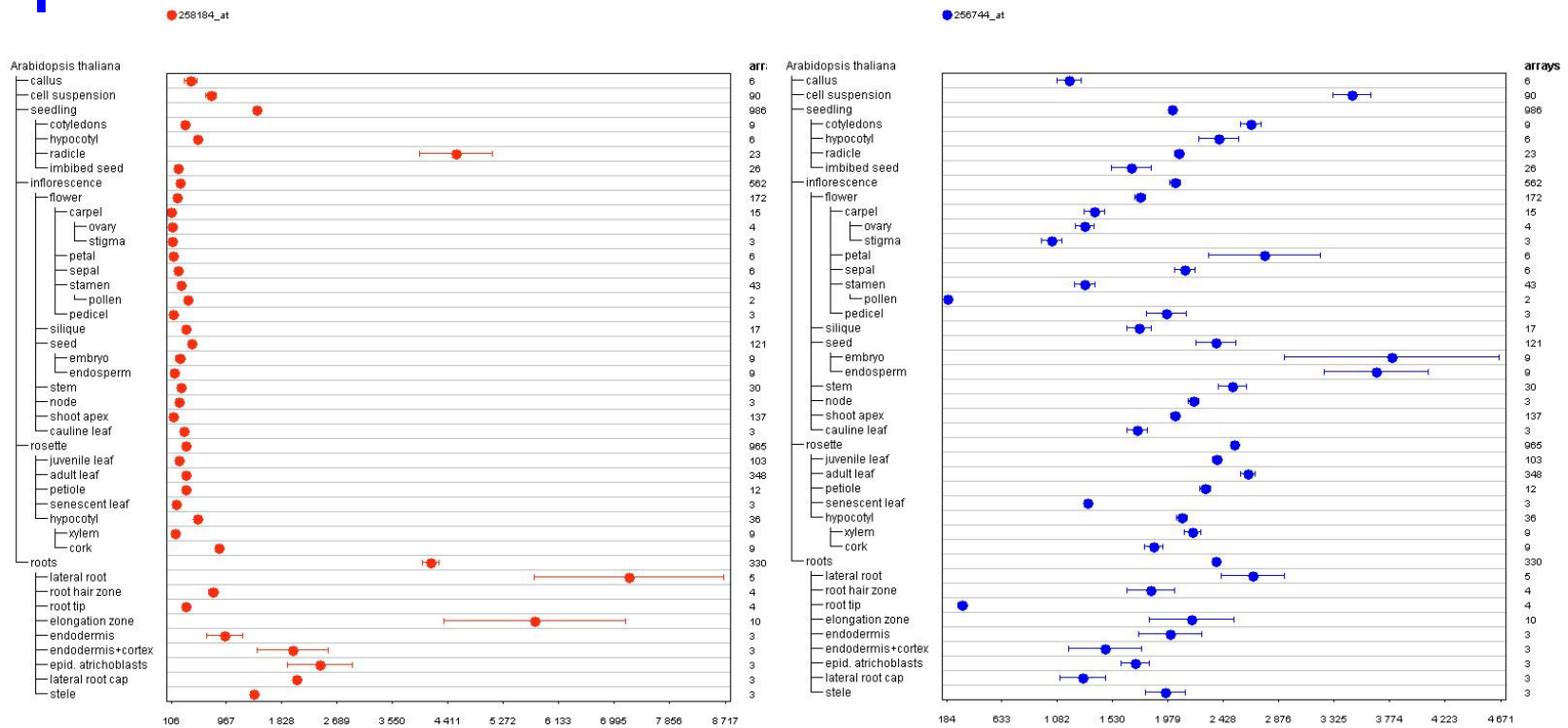


Osnova

- 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**

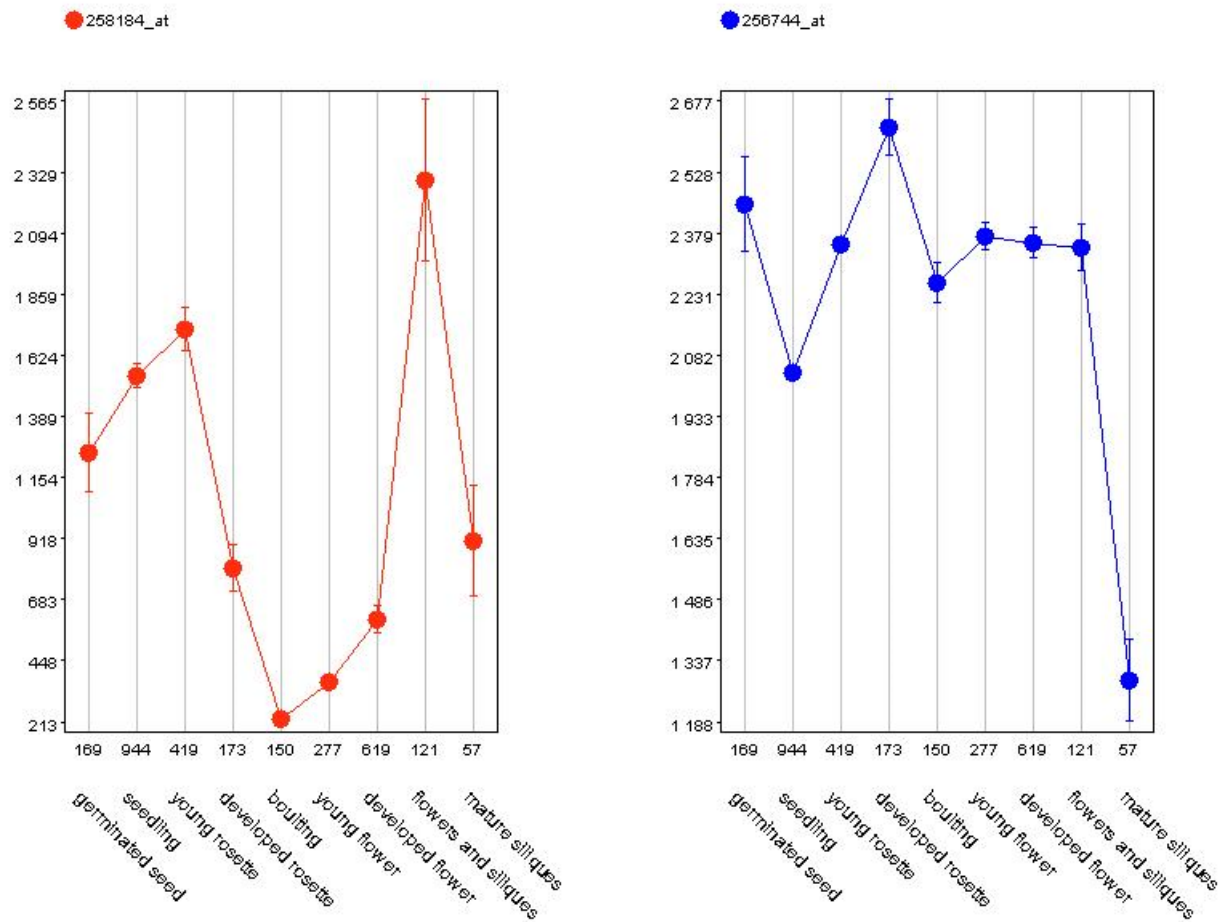
Databáze

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



Databáze

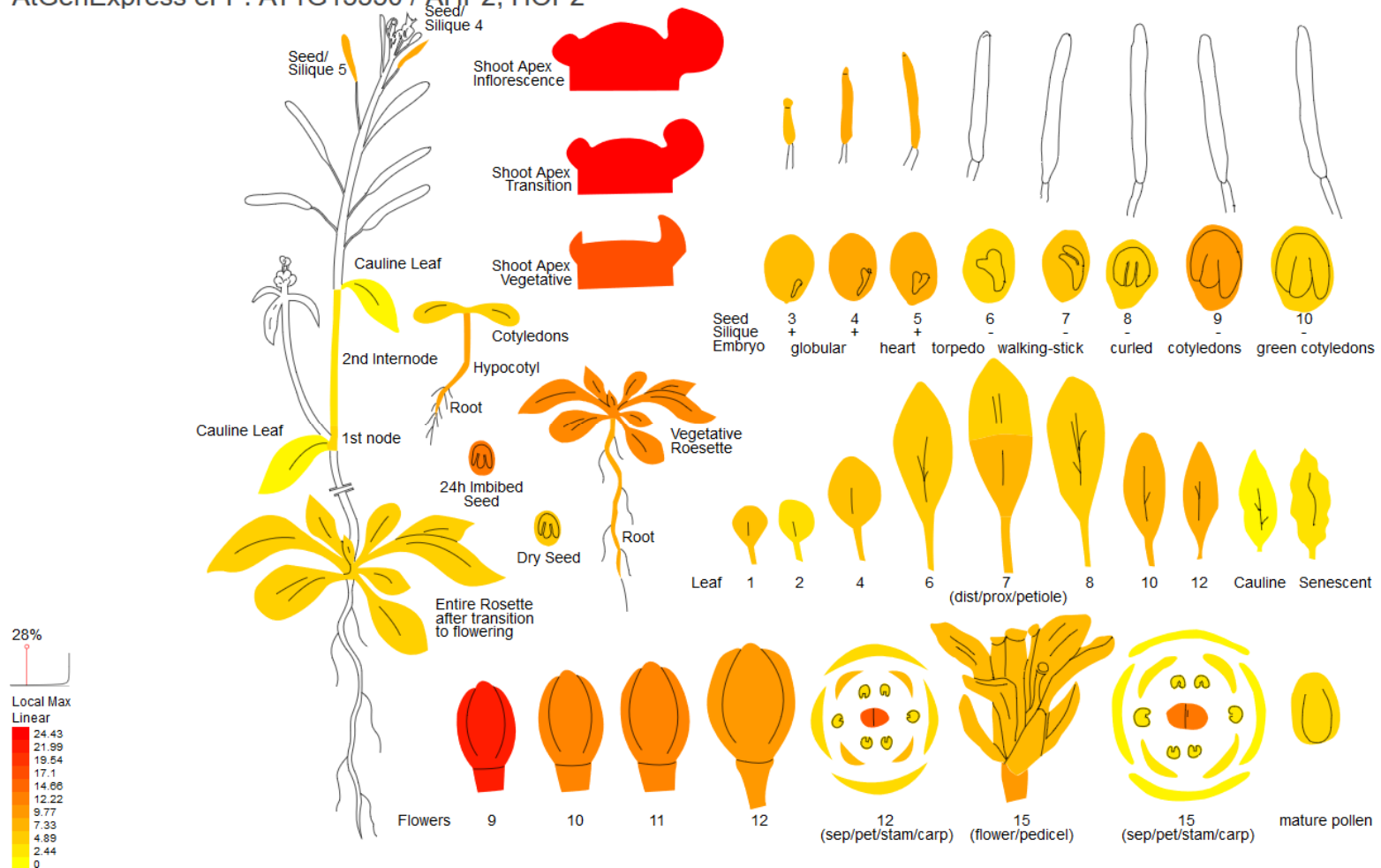
- **Analýza exprese pomocí Genevestigator** (**AHP1** a **AHP2**, *Arabidopsis*, Affymetrix ATH 22K Array)



Databáze

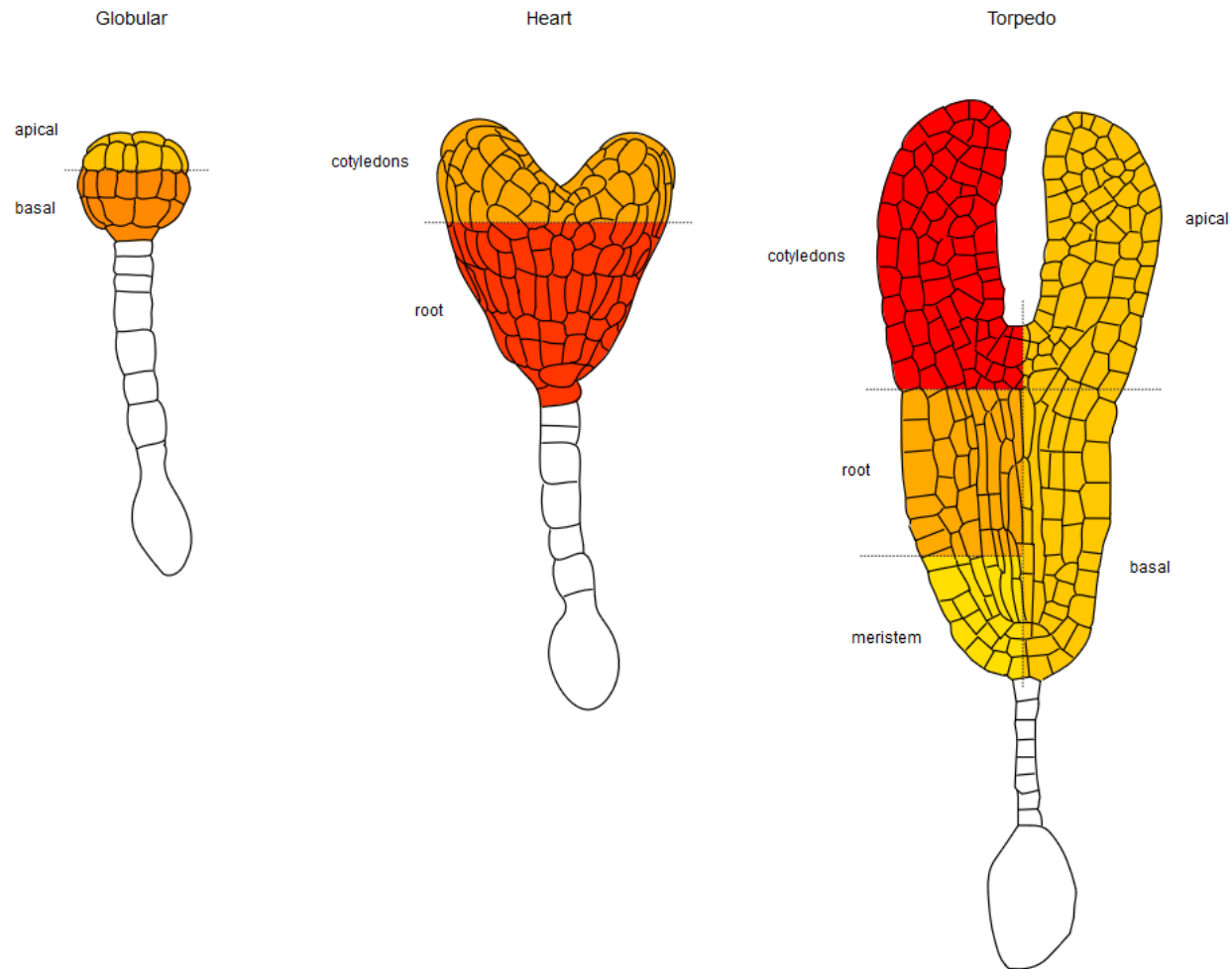
Analýza exprese pomocí ePlant

AtGenExpress eFP: AT1G13330 / AHP2, HOP2



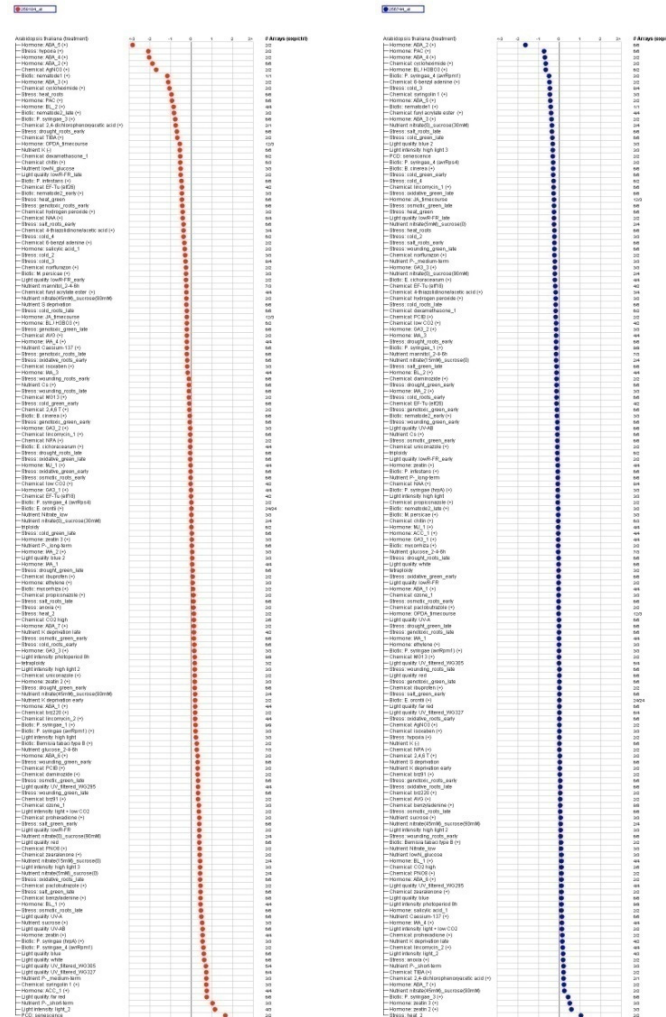
Databáze

□ Analýza exprese pomocí ePlant



Databáze

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

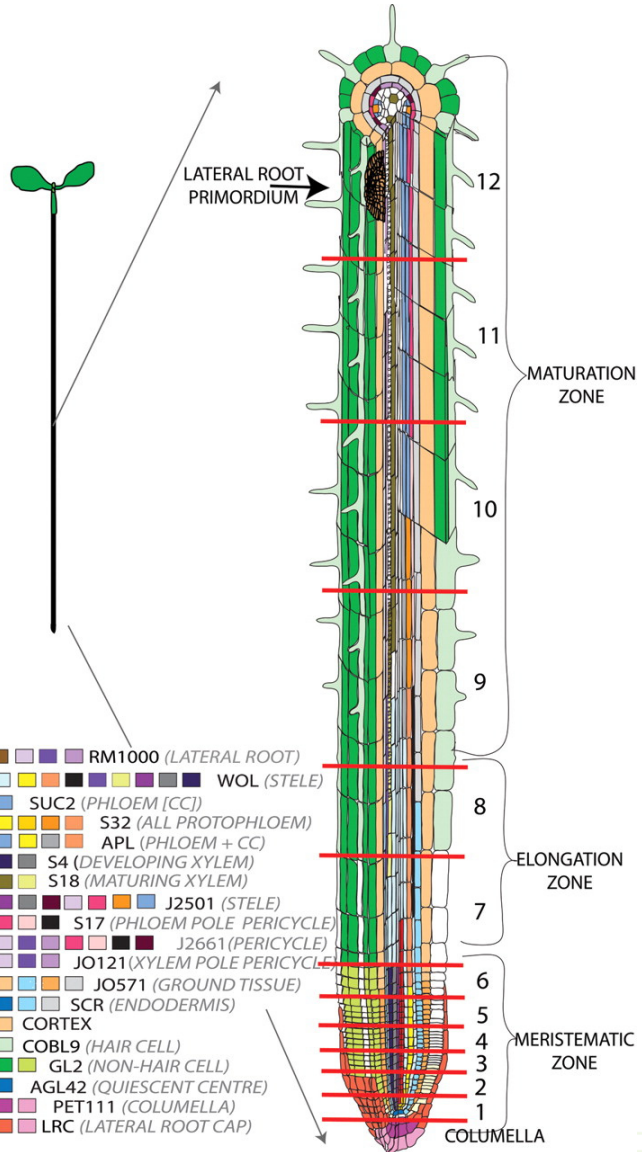
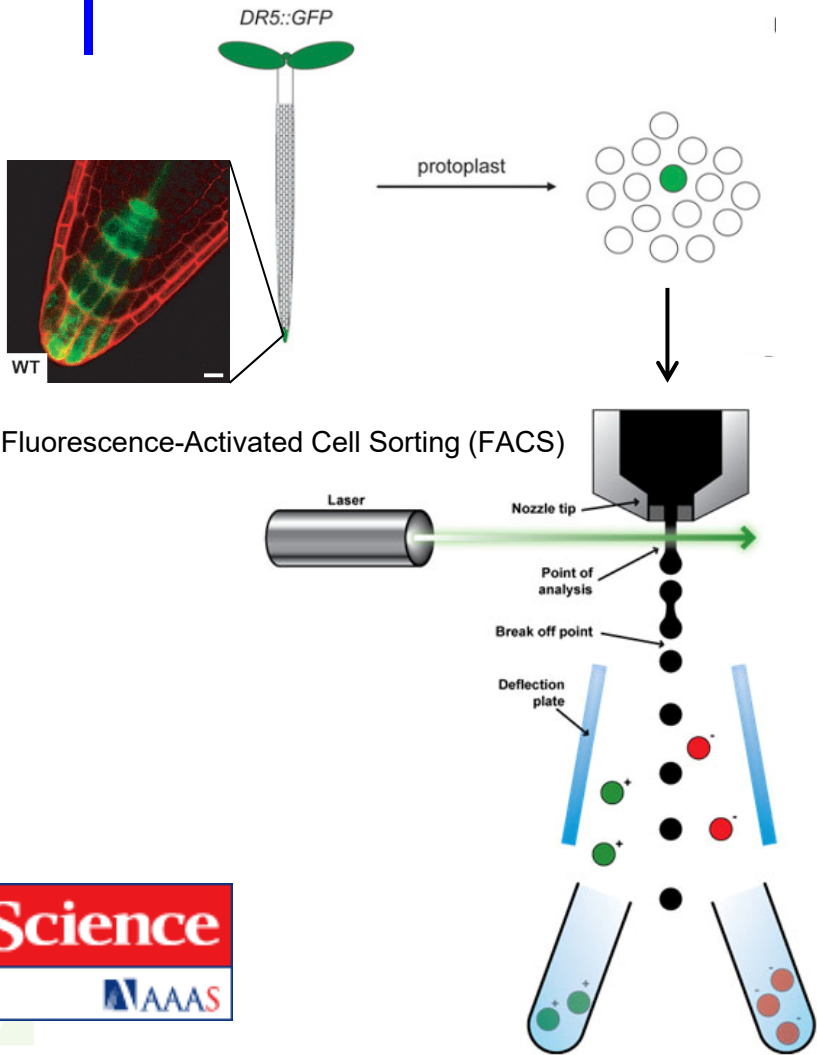


Osnova

- 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 Arabidopsis

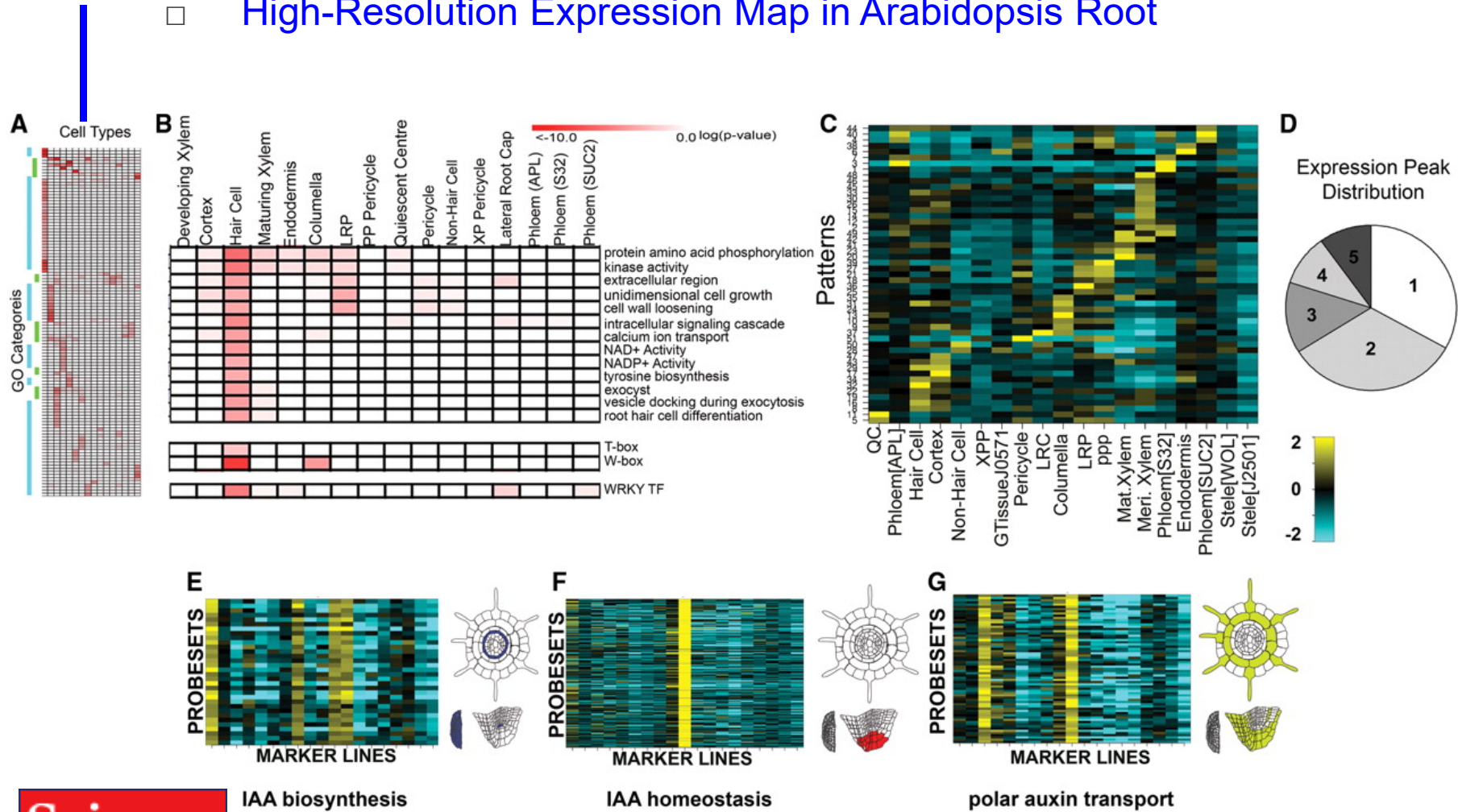


Brady et al., *Science*, 2007



Expression Maps - RNA

High-Resolution Expression Map in Arabidopsis Root



IAA biosynthesis

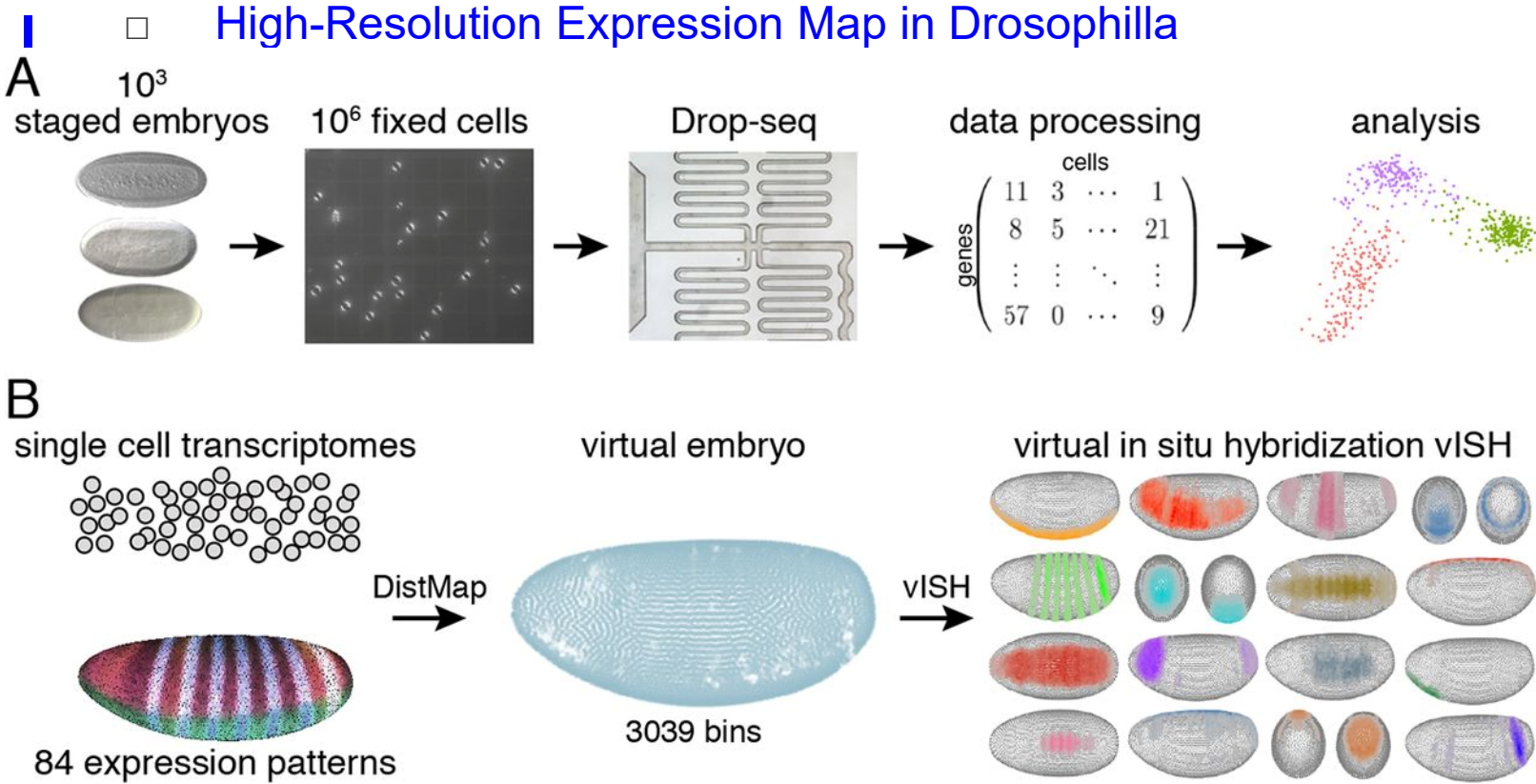
IAA homeostasis

polar auxin transport

Brady et al., *Science*, 2007



Expression Maps - RNA



Nikos Karaikos et al. *Science* 2017;science.aan3235

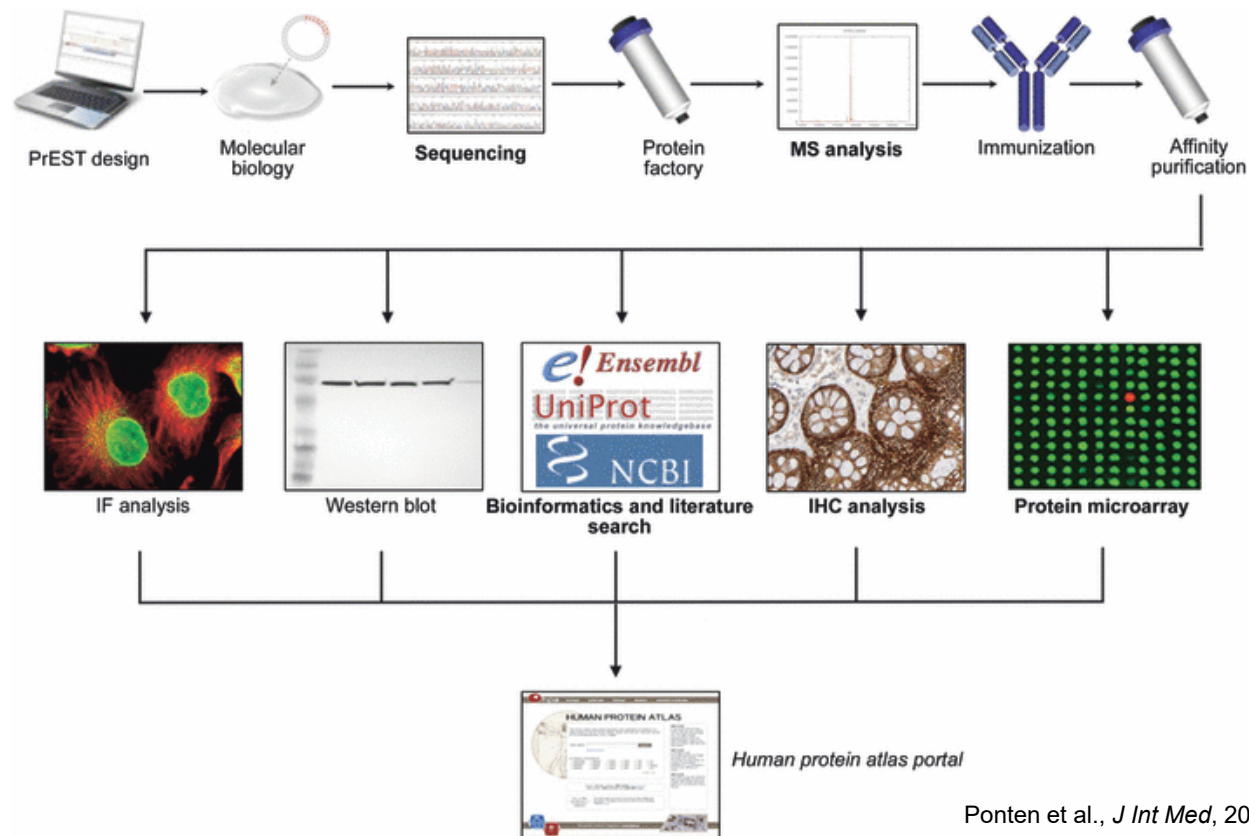


Brady et al., *Science*, 2007



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

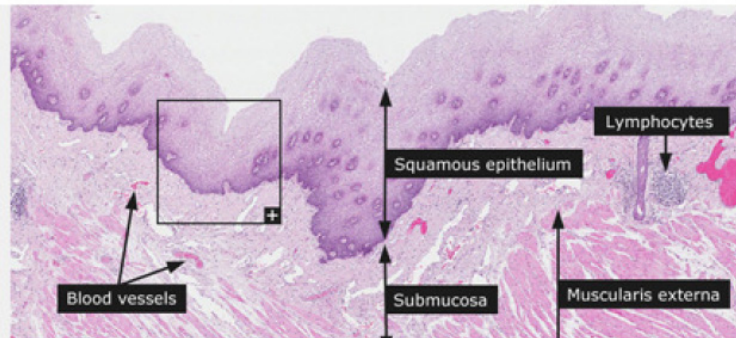
SEARCH ? »

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

Search

Clear

Fields »



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.

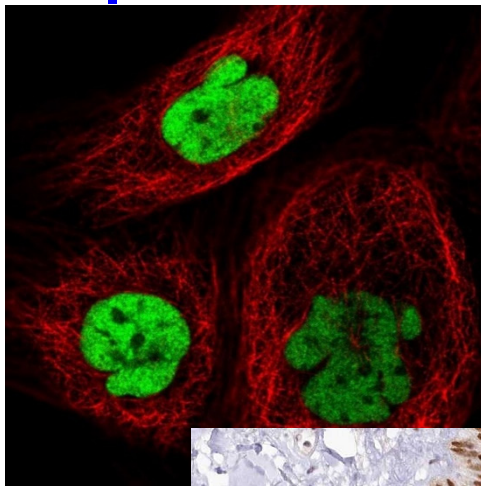
Knut och Alice
Wallenbergs
Stiftelse

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



Expression Maps - Proteins

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



SUBCELLULAR LOCATION SUMMARY

Main location(s) Nucleus but not nucleoli

Additional location(s)

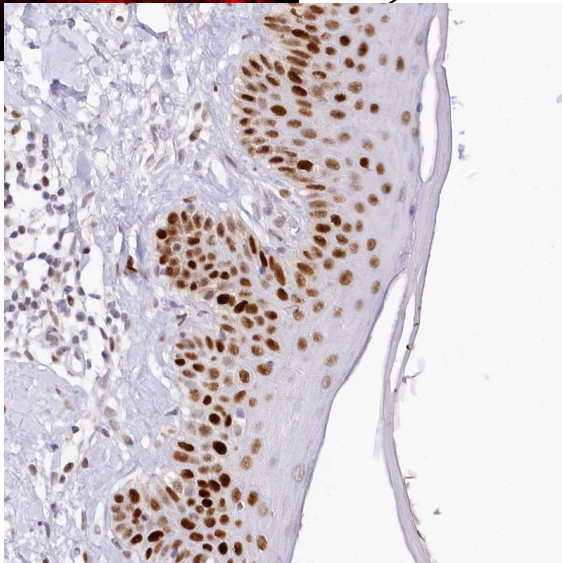
Staining summary Localized to the nucleus but excluded from the nucleoli.

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	<input type="text"/>
Hematopoietic (blood)	8	<input type="text"/>
Liver and pancreas	5	<input type="text"/>
Digestive (GI-tract)	13	<input type="text"/>
Respiratory (lung)	4	<input type="text"/>
Cardiovascular	1	<input type="text"/>
Female tissues	13	<input type="text"/>
Placenta	2	<input type="text"/>
Male tissues	5	<input type="text"/>
Urinary tract (kidney)	3	<input type="text"/>
Skin and soft tissues	14	<input type="text"/>
Endocrine tissues	3	<input type="text"/>

[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 x 10⁹ 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, ...)

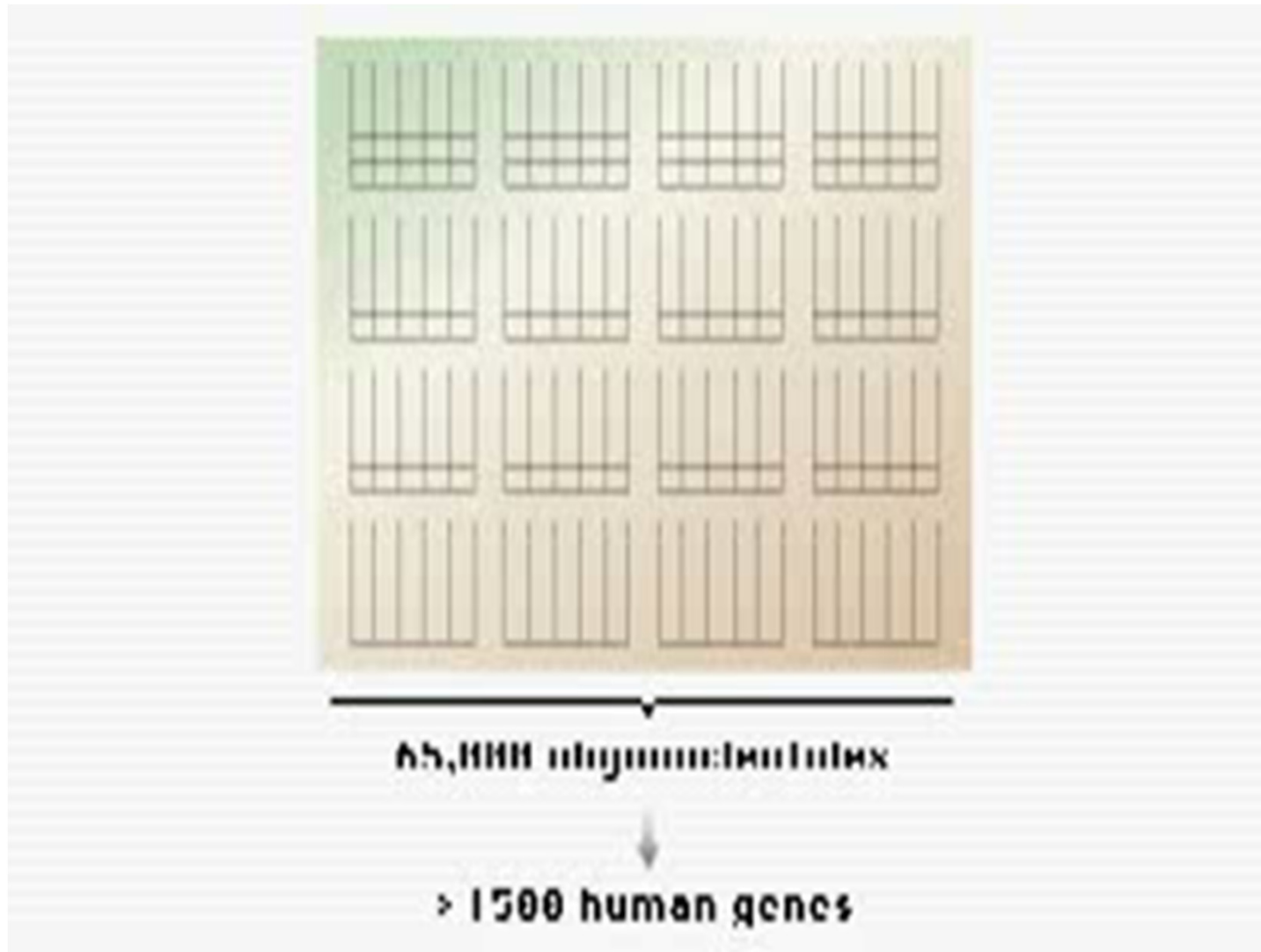


Affymetrix ATH1 *Arabidopsis* genome array

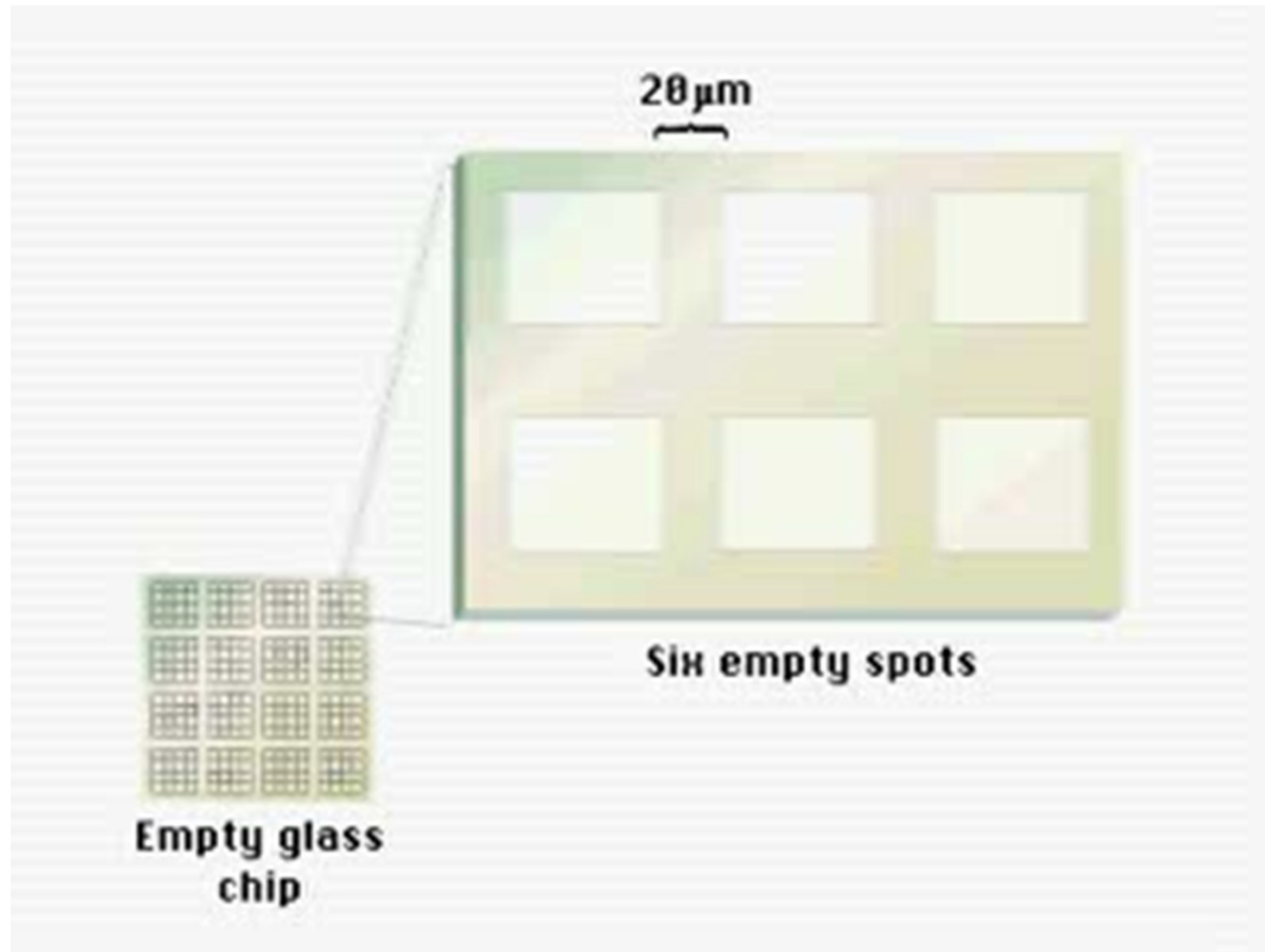
Critical Specifications	
Number of arrays	One
Number of sequence represented	>24,000 gene sequences
Feature size	18 µm
Oligonucleotide probe length	25-mer
Probe pairs/sequence	11
Control sequences	<i>E. coli</i> genes <i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> . <i>B. subtilis</i> gene <i>lysA</i> . Phage 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



Photolithography



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

The screenshot shows the TAIR database interface for the experiment 'Aluminum Stress'. The page title is 'Expression of 195M6T7 in response to chemical treatment'. The navigation bar includes 'Home | About TAIR | Sitemap | Contact | Help | Order | Login'. Below the navigation bar, there is a search bar and a dropdown menu for 'Gene'. The main content area is titled 'Experiment: Aluminum Stress' and has tabs for 'Experiment Summary', 'Samples', 'Slides & Datasets', 'Array Design', and 'View All'. The 'Slides & Datasets' tab is selected, showing a table of slide details. A red circle highlights a portion of the table, specifically the 'Slide (name & description)', 'External ID', 'Replicate (id & name)', 'Replicate type', 'Reverse replicate', 'Sample', 'Experimental variables', and 'Label' columns for the first two rows.

Slide (name & description)	External ID	Replicate (id & name)	Replicate type	Reverse replicate	Sample	Experimental variables	Label	Get Data
HoekengaS7 [1]: 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 [1]: 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

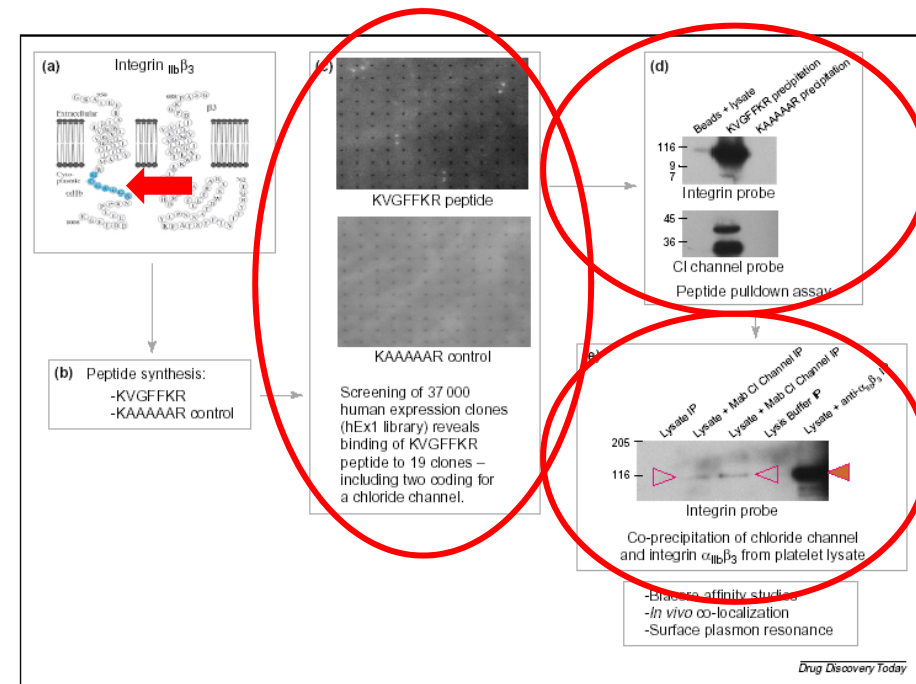
Protein Chips

- 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)



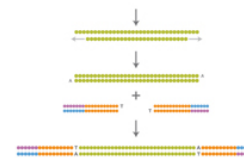
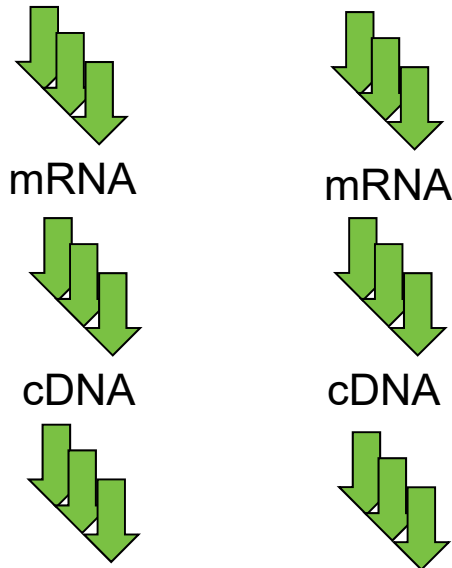
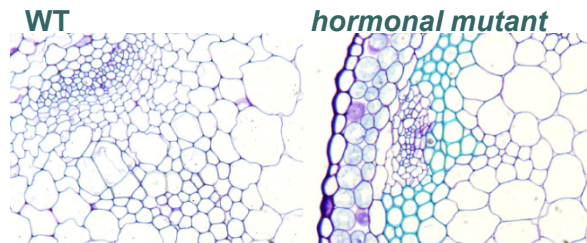
Lueking et al., 2005

Osnova

- **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*



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	6.8885e-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

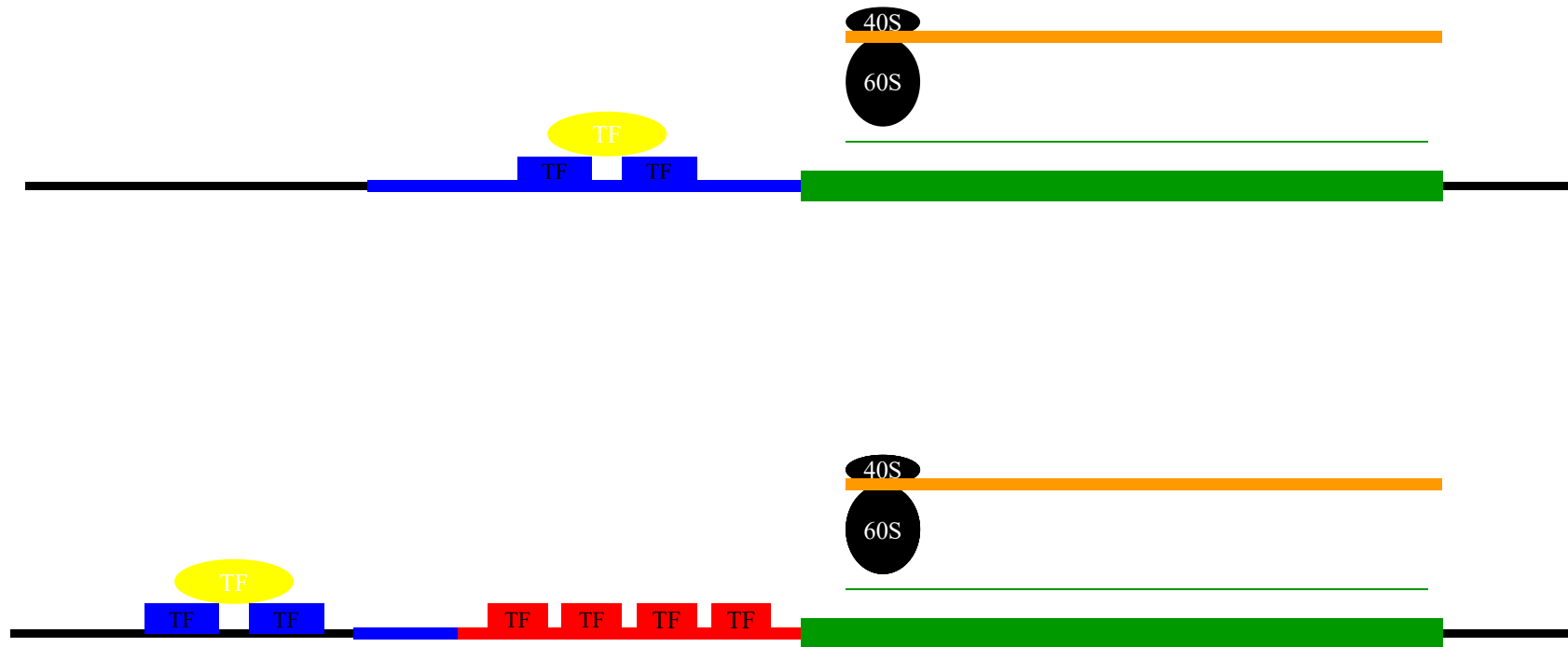
Osnova

- **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

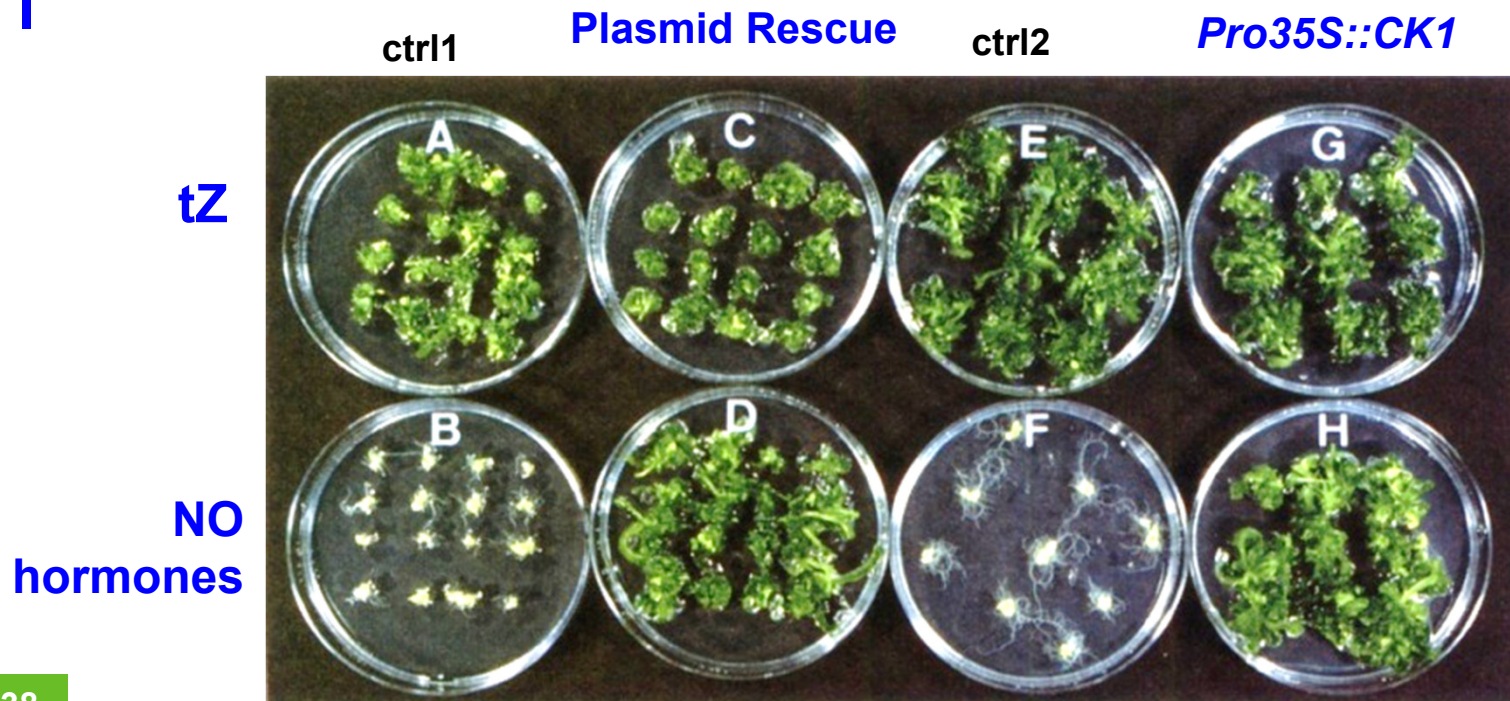
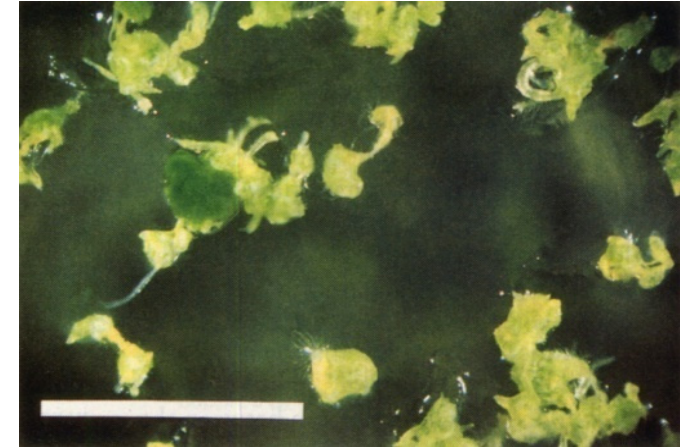
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutagenese
 - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inserce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
 - prvním krokem je příprava 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



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 mutagenese**
 - **Ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese**

Regulated Expression Systems

- umožňují časovou nebo místně specifickou regulaci genové exprese, vedoucí ke změně fenotypu a tím identifikaci přirozené funkce genu
 - pOP systém

Regulated Expression Systems



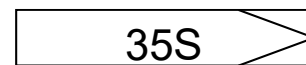
activator
X



activator x reporter



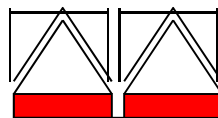
reporter



35S



LhG4



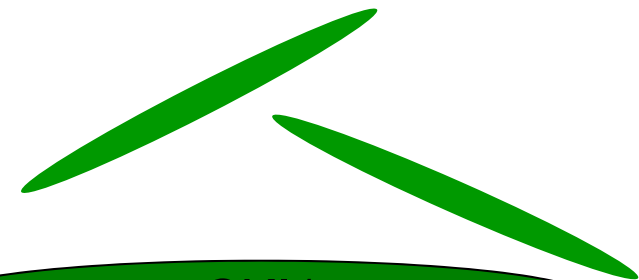
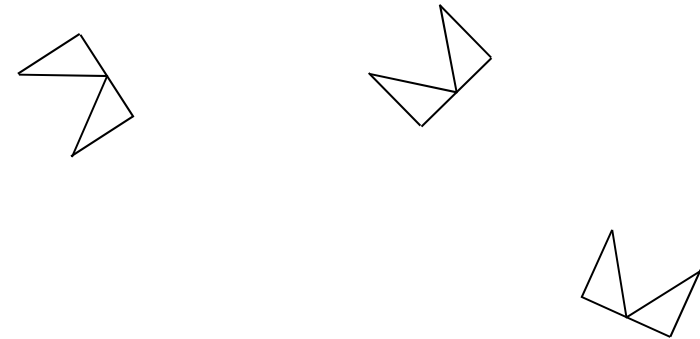
pOP



TATA



CKI1



Regulated Expression Systems



activator
X

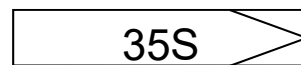


activator x reporter

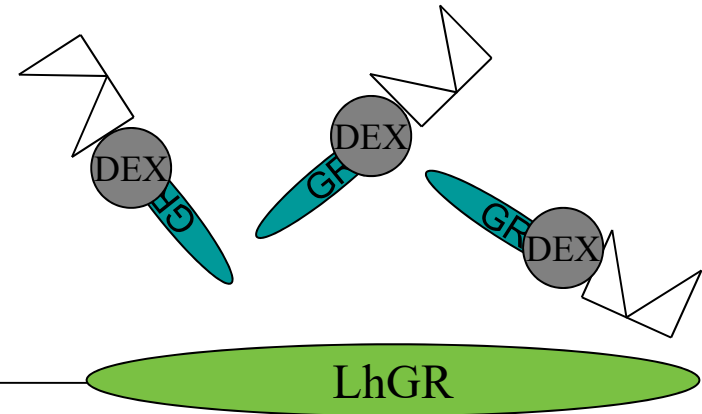


reporter

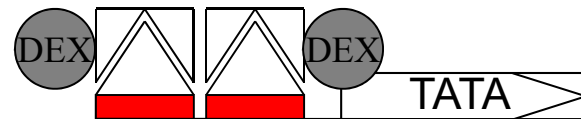
+DEX



35S

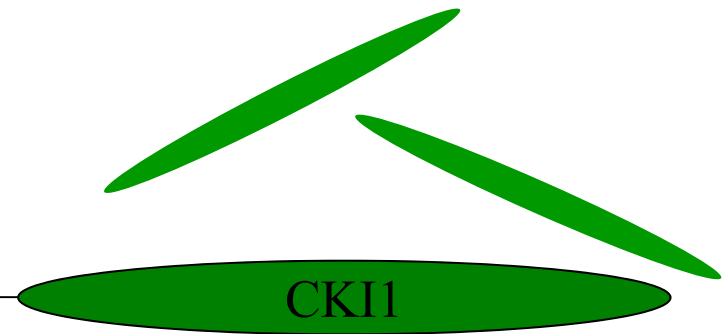


LhGR



pOP

TATA



CKI1

Regulated Expression Systems



activator X

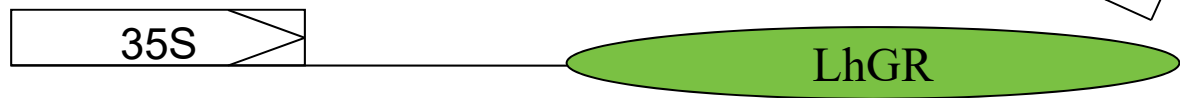


activator x reporter

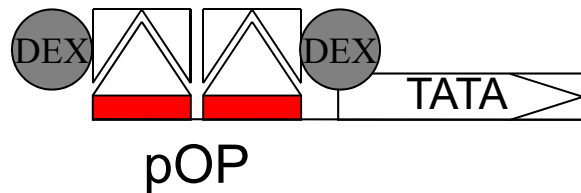


reporter

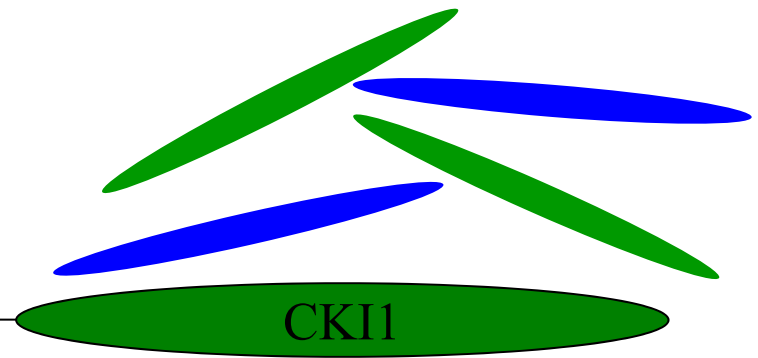
+DEX



wt Col-0

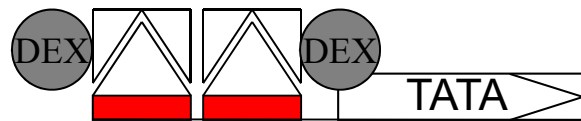


pOP



CKI1

4C



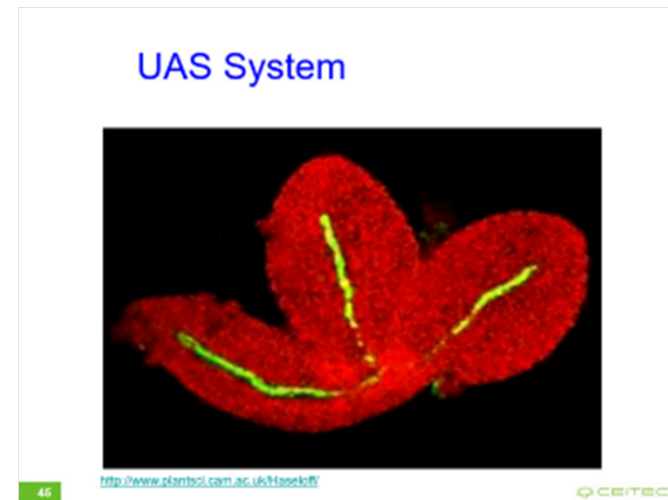
pOP



GUS

Regulated Expression Systems

- umožňují časovou nebo místně specifickou regulaci genové exprese, vedoucí ke změně fenotypu a tím identifikaci přirozené funkce genu
 - pOP systém
 - UAS systém



UAS System



<http://www.plantsci.cam.ac.uk/Haseloff/>

Osnova

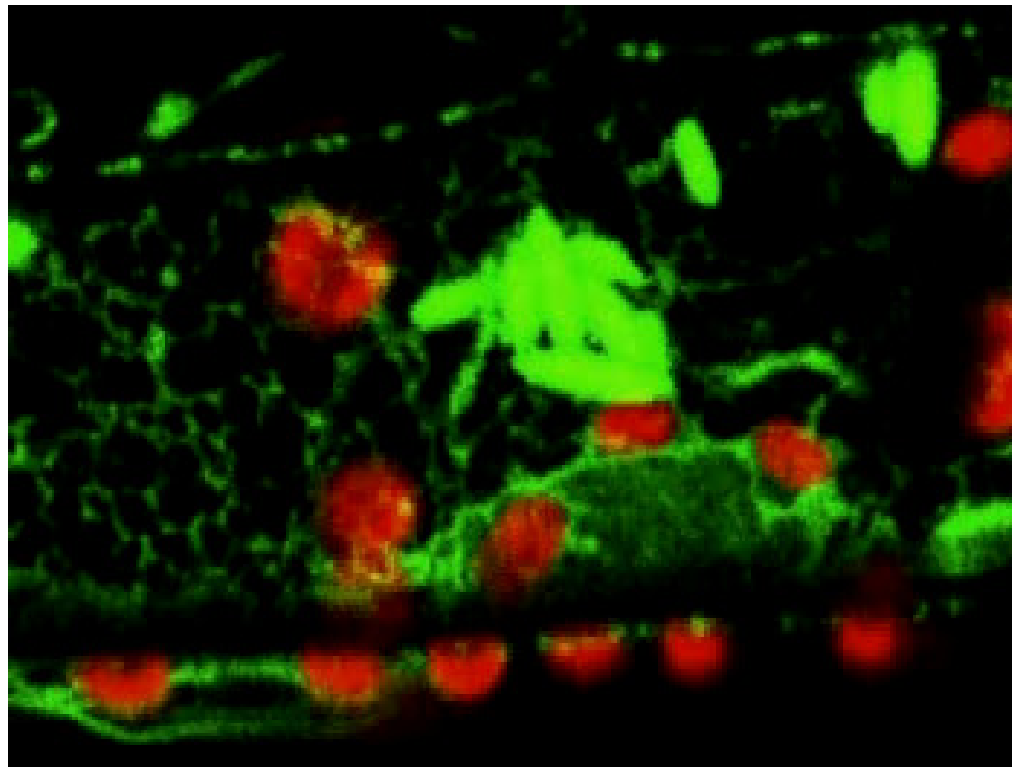
- **Metody analýzy genové exprese**
 - **Kvalitativní analýza exprese genů**
 - Příprava **transkripční fúze** promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava **translační fúze** kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Využití dostupných dat ve **veřejných 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**

Chemical Genetics

- pojem **chemical genetics** – více než **50.000/235,577** záznamů v databázi PubMed (16.10. **2008/19.11. 2020**, **nárůst >470%**)
- 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** nejrozličnějších **chemických látek** (tisíce položek, komerčně přístupné)
- příklad: **analýza endomembránového transportu** u rostlin

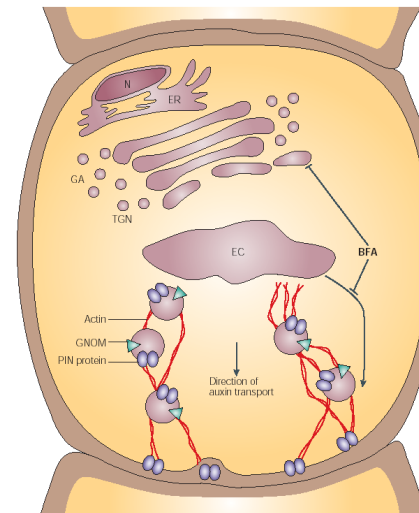
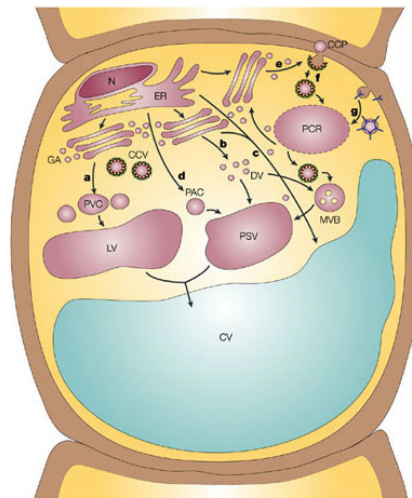
Chemical Genetics

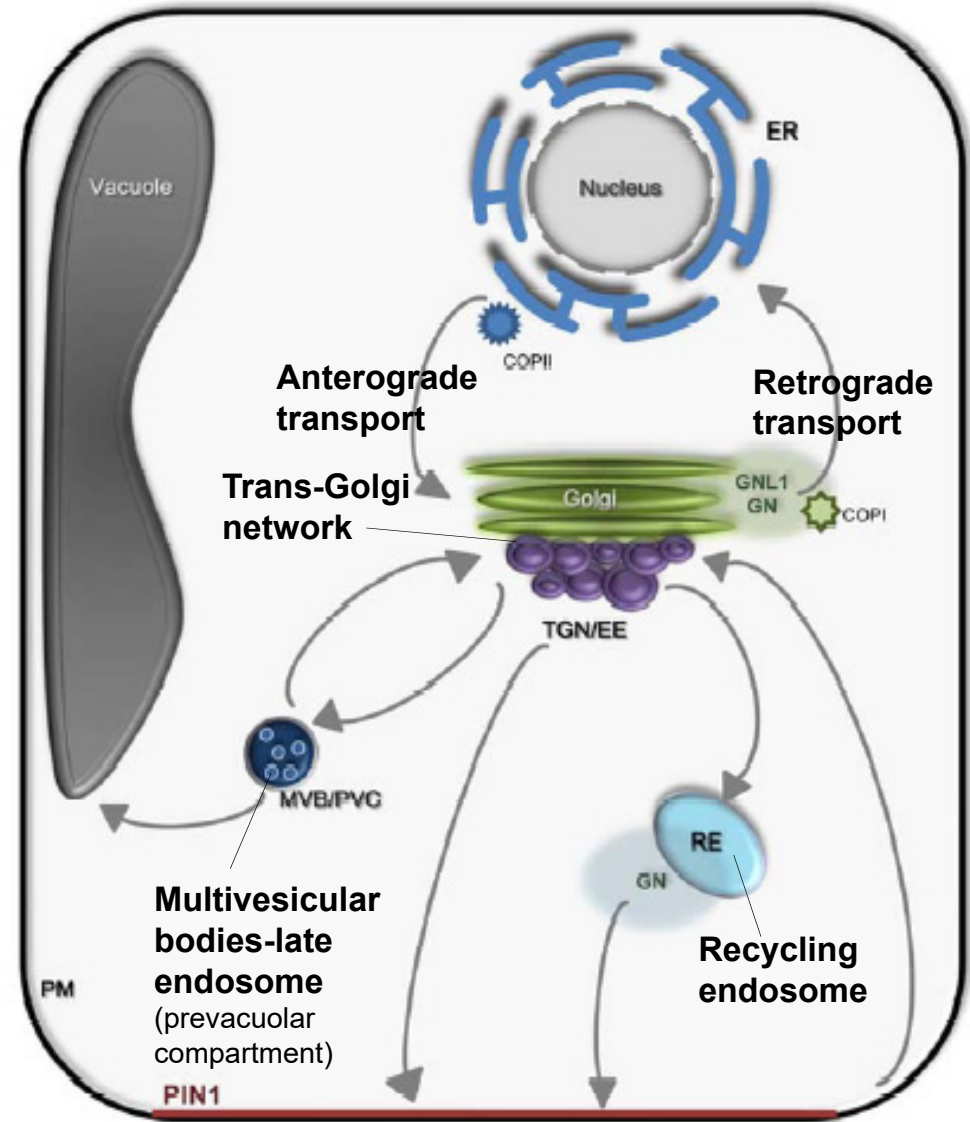
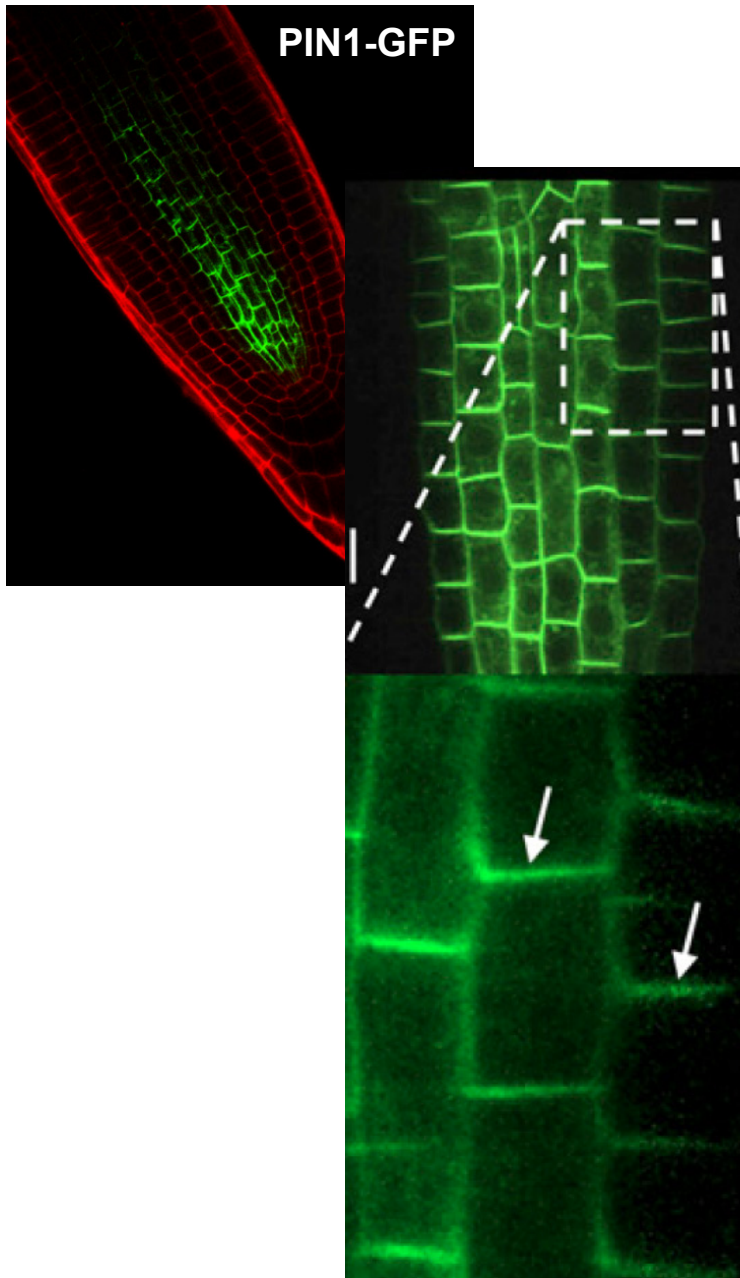
- Analýza mechanismů **endomembránového transportu** přístupy chemické genetiky
 - v rostlinných buňkách dochází k velice dynamickým procesům, zprostředkovaným zejména tzv. endomembránovým transportem (viz film, GFP směřované do ER)



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





Huang et al., 2010

Chemical Genetics

- Analýza mechanismů **endomembránového transportu** přístupy chemické genetiky

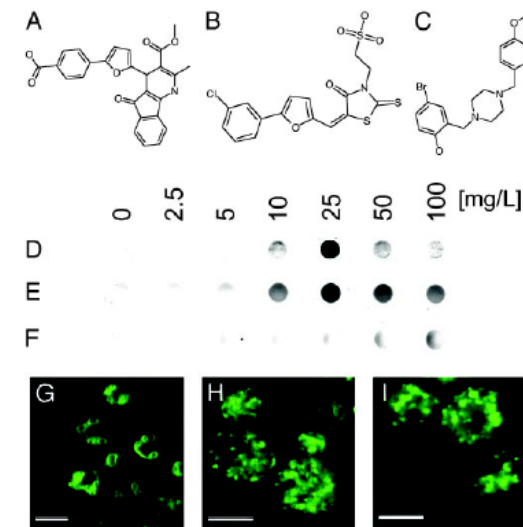
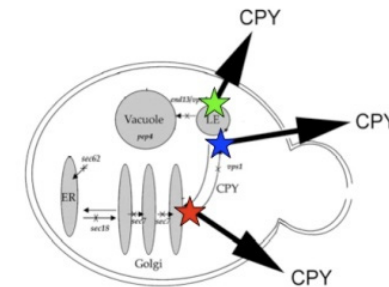
- pomocí **vyhledávání** v „knižovně“ chemických látek byly identifikovány takové, které vedou u kvasinek (*S. cerevisiae*) k **sekreci enzymu** (karboxipeptidázy Y), která je normálně transportována pomocí endomembránového transportu do vakuoly

- analýza **změny sekrece** pomocí **dot-blotu** a imunodetekce karboxipeptidázy Y v kulturačním médiu pomocí monoklonálních protilátek

chemická struktura sortinů

Imunodetekce karboxipeptidázy

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



Zouhar et al., 2004

Chemical Genetics

- Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupy chemické genetiky

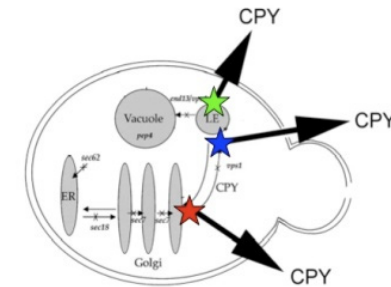
- pomocí vyhledávání v „knižovně“ chemických látek byly identifikovány takové, které vedou u kvasinek (*S. cerevisiae*) k sekreci enzymu (karboxipeptidázy Y), která je normálně transportována pomocí endomembránového transportu do vakuoly

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

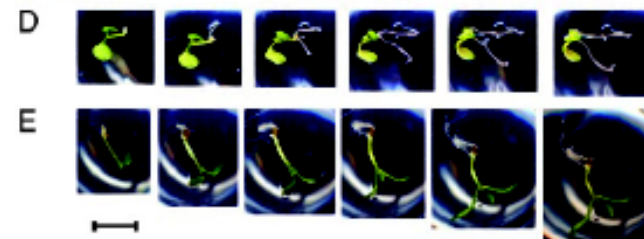
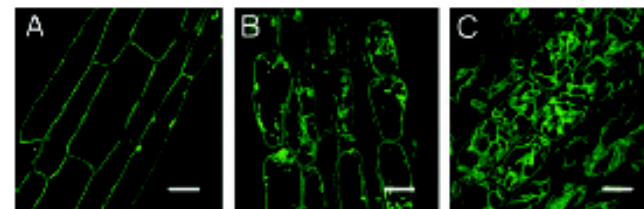
- identifikované látky („sortiny“) byly schopny vyvolat obdobné změny i u *Arabidopsis* - konzervované mechanismy transportu u kvasinek i u rostlin

- 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 hypersenzitivní mutanti)



tvár rostlinných vakuol pomocí EGFP:-TIP

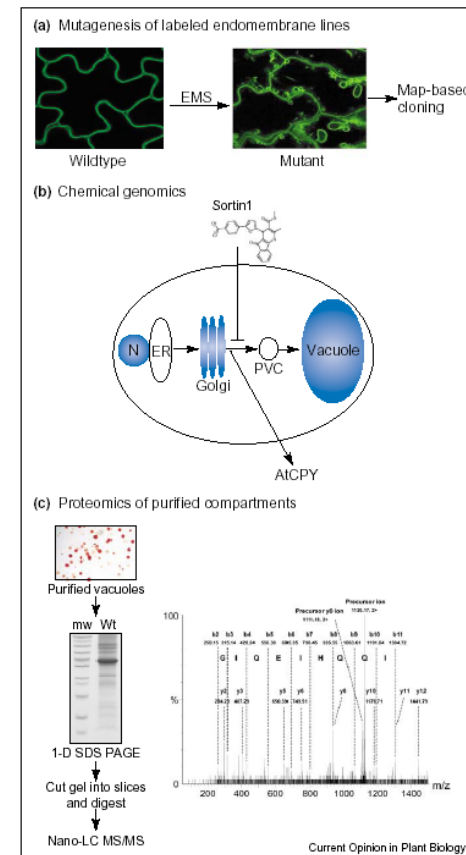


fenotyp semenáčků v přítomnosti sortinů

Zouhar et al., 2004

Chemical Genetics

- Analýza mechanismů endomembránového transportu pomocí chemické genetiky - shrnutí
 - GFP:: α -TIP značení membrány vakuoly (tonoplastu) a identifikace mutací vedoucí ke změně morfologie tonoplastu
 - chemická genetik v kombinaci s klasickou genetikou - identifikace proteinů zúčastňujících se regulace endomembránového transportu
 - proteomické přístupy – identifikace a analýza proteomu vakuol



Klíčové koncepty

- **Genová exprese** je specifická v místě i čase
 - Analýza časoprostorové specifity genové exprese pomocí
 - **Transkripční fúze** promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - **Translační fúze** kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Veřejně dostupné **databáze** často s **buněčným rozlišením**
 - **Kvantitativní** analýza genové exprese
 - **DNA** a **proteinové čipy**
 - **Next gen** transkripční profilování
- **Regulací** genové exprese lze identifikovat **funkci** genů - přístupy získané funkce
- K získání **nových podmíněných fenotypů** lze použít chemickou genetiku

Diskuse