

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,

MUNI
SCI

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



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

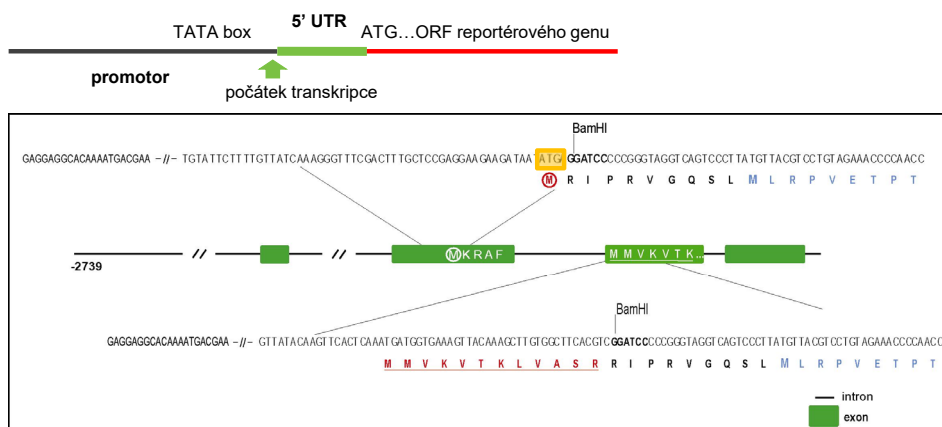
- **Metody analýzy genové exprese**
 - **Kvalitativní analýza exprese genů**
 - Příprava **transkripční fúze** promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava **translační fúze** kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Využití dostupných dat ve **veřejných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

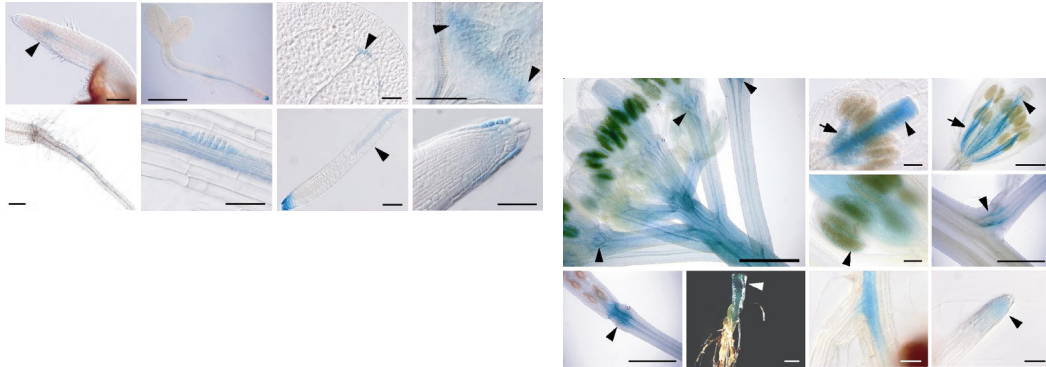
Transkripční fúze

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



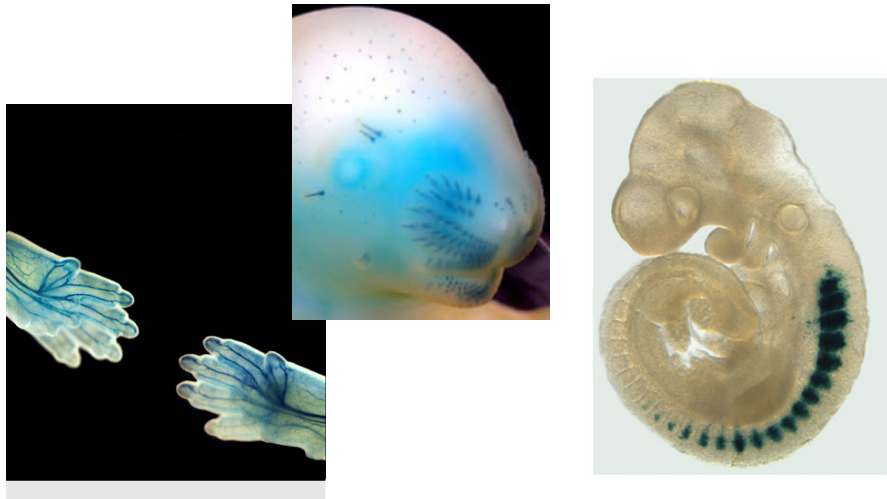
Transkripční fúze

- **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



6

GUS reporter in mouse embryos

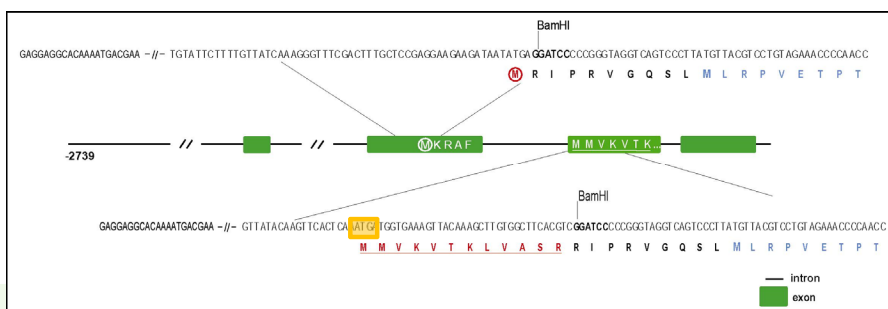
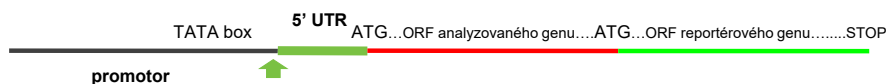


Osnova

- 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

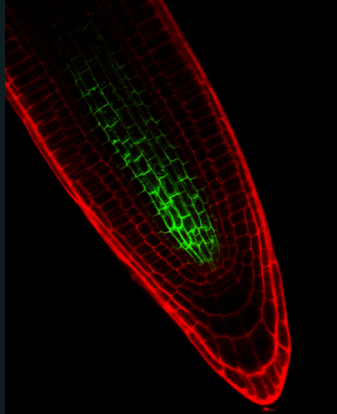
Translační fúze

- **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)

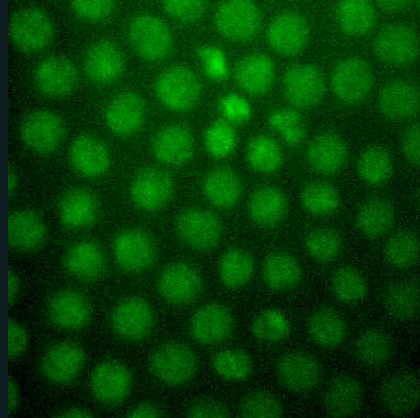


Translační fúze

- **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



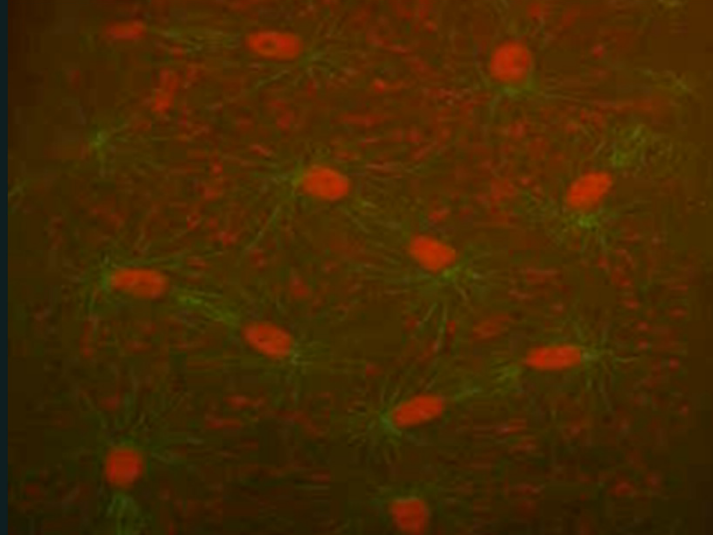
PIN1-GFP in *Arabidopsis*



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

Translační fúze

- Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s repotérovým genem

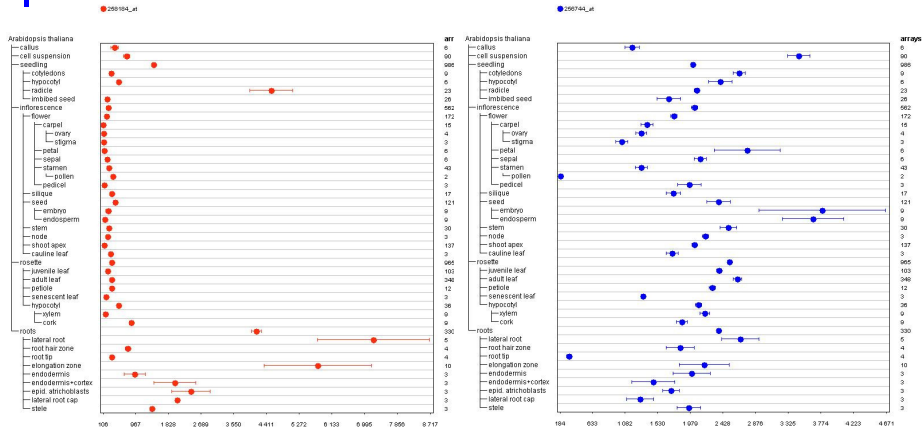


Osnova

- 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**

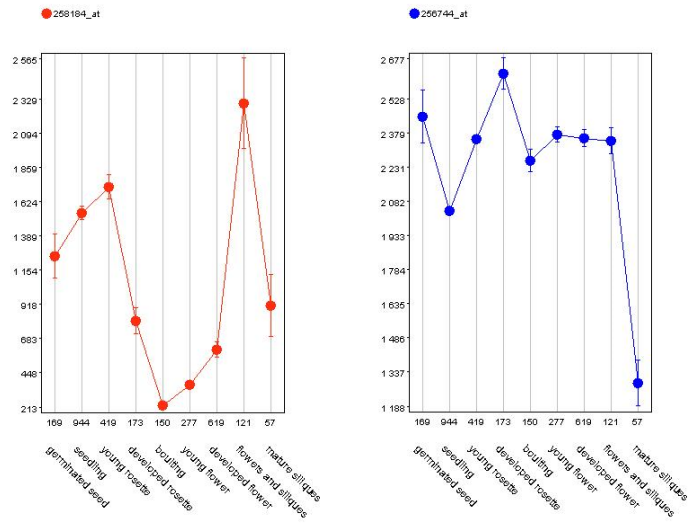
Databáze

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



Databáze

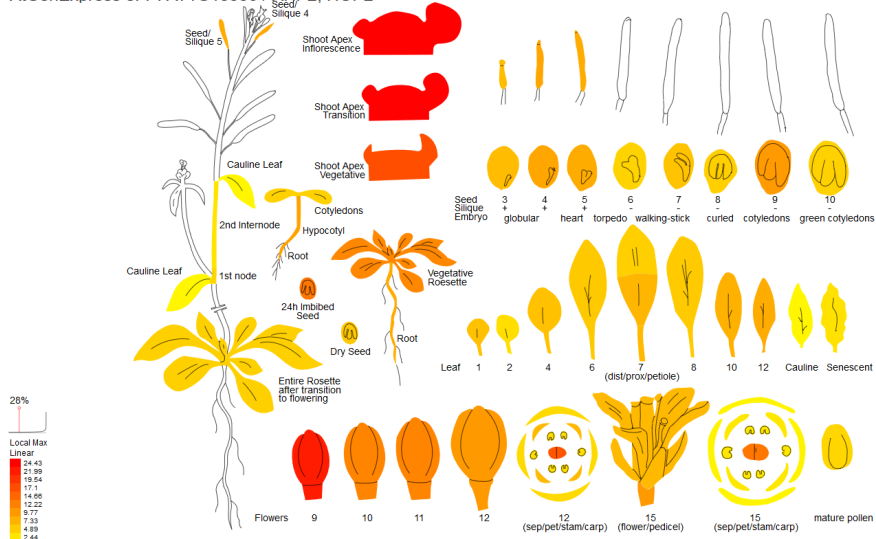
- **Analýza exprese pomocí Genevestigator (*AHP1* a *AHP2*, *Arabidopsis*, Affymetrix ATH 22K Array)**



Databáze

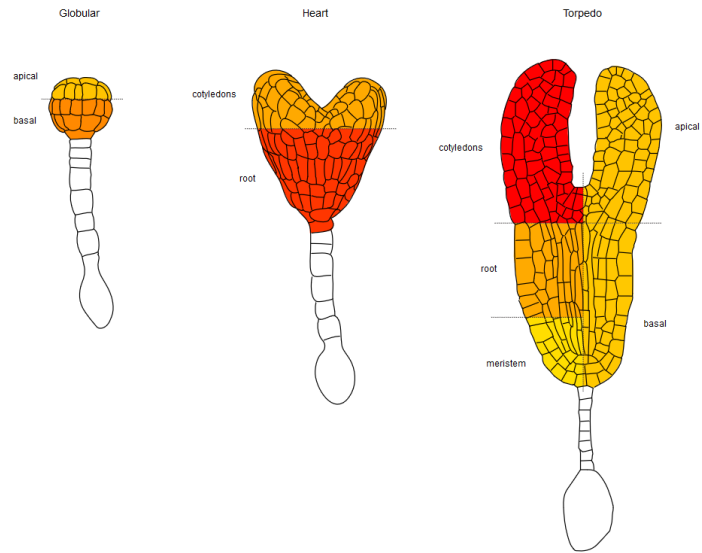
□ Analýza exprese pomocí ePlant

AtGenExpress eFP: AT1G13330 / AHP2, HOP2



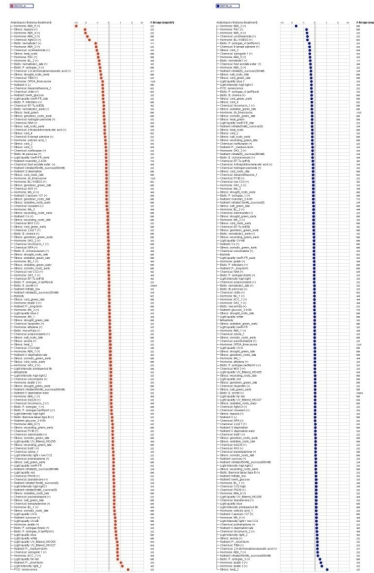
Databáze

□ Analýza exprese pomocí ePlant



Databáze

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

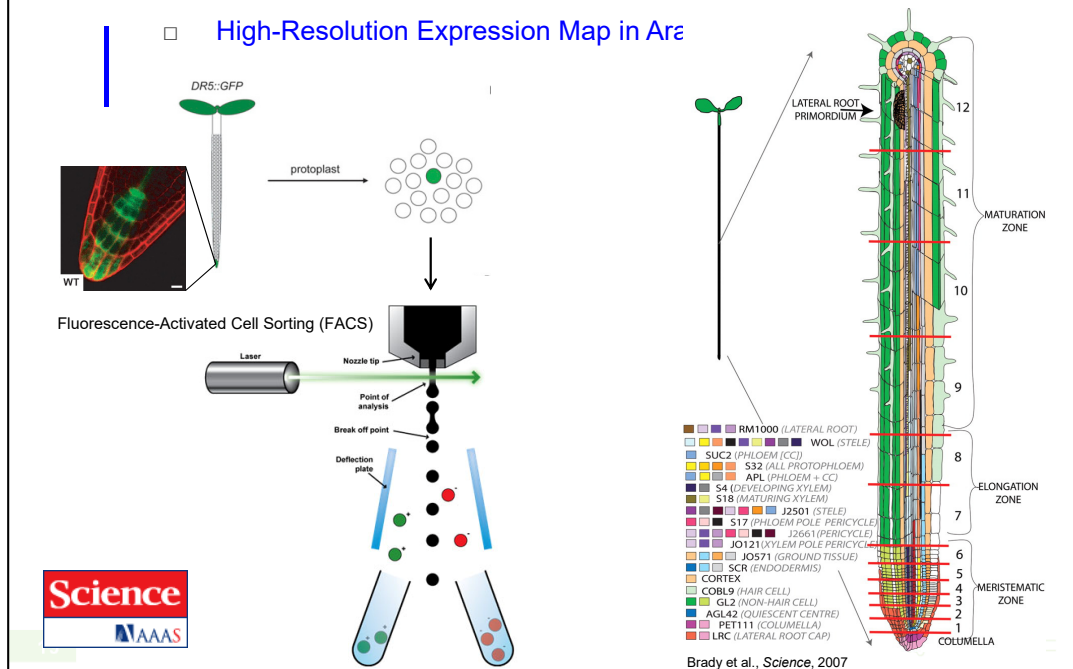


Osnova

- 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

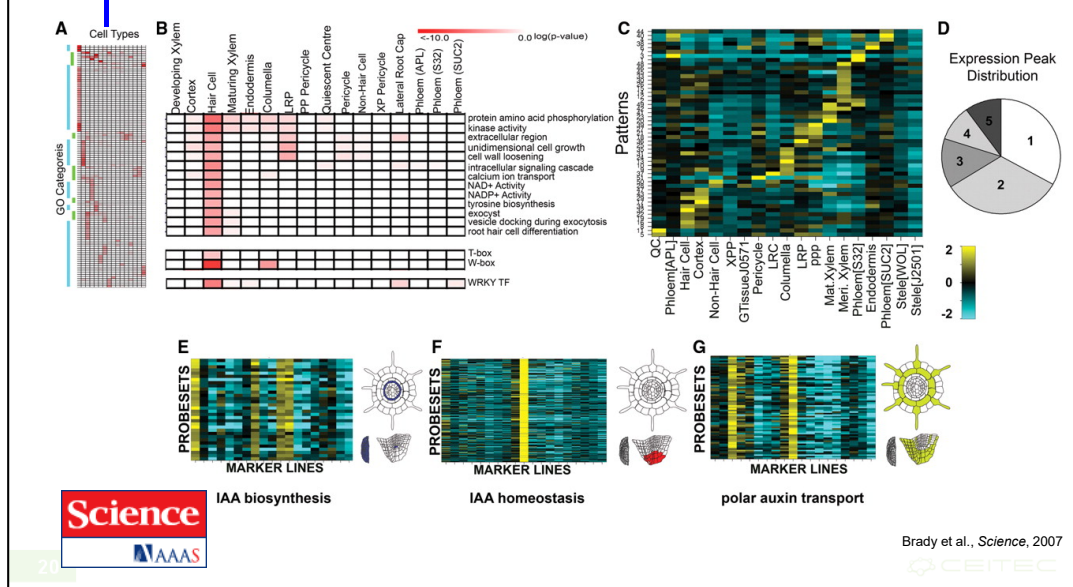
High-Resolution Expression Map in *Arabidopsis*



Microarray expression profiles of 19 fluorescently sorted GFP-marked lines were analyzed (3–9, 23, 24). The colors associated with each marker line reflect the developmental stage and cell types sampled. Thirteen transverse sections were sampled along the root's longitudinal axis (red lines) (10). CC, companion cells.

Expression Maps - RNA

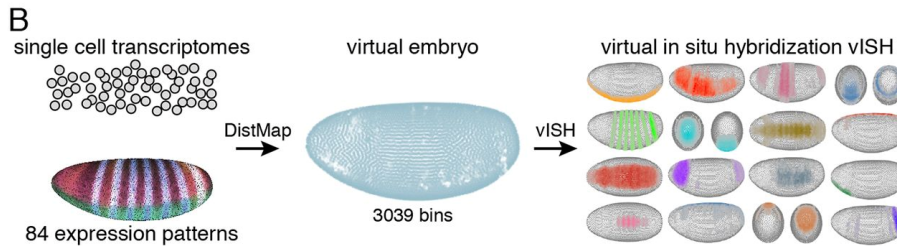
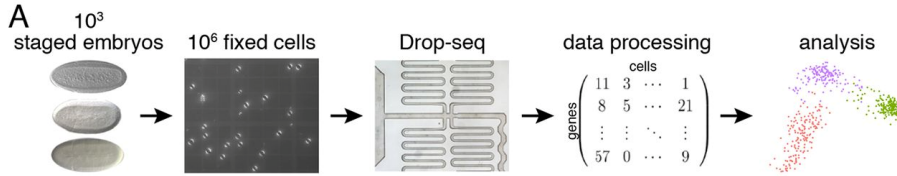
High-Resolution Expression Map in Arabidopsis Root



(A) The majority of enriched GO terms (hierarchically clustered) are associated with individual cell types (blue bar). A smaller number are present across multiple cell types (green bar). (fig. S2) **(B)** GO category enrichment for hair cells confirms a previous report (15). Enriched cis-elements and an enriched TF family were also identified. **(C)** From the top 50% of varying probe sets, 51 dominant radial patterns were identified. Pattern expression values were mean-normalized (rows) and \log_2 transformed to yield relative expression indices for each marker line (columns). Marker line order is the same for all figures; see table S1 for marker line abbreviations. **(D)** Pattern expression peaks were found across one to five cell types. **(E to G)** Patterns where expression is enriched in single and multiple cell types support transcriptional regulation of auxin flux and synthesis. In all heat maps with probe sets, expression values were mean-normalized and \log_2 transformed. Expression is false-colored in representations of a root transverse section, a cut-away of a root tip, and in a lateral root primordium. **(E)** Auxin biosynthetic genes (*CYP79B2*, *CYP79B3*, *SUPERROOT1*, and *SUPERROOT2*) are transcriptionally enriched in the QC, lateral root primordia, pericycle, and phloem-pole pericycle ($P = 1.99E^{-11}$, pattern 5). All AGI identifiers and TAIR descriptions are found in table S14. **(F)** Auxin amido-synthases *GH3.6* and *GH3.17* that play a role in auxin homeostasis show enriched expression in the columella, just below the predicted auxin biosynthetic center of the QC ($P = 8.82E^{-4}$, pattern 13). **(G)** The expression of the auxin transporter, *PIN-FORMED2*, and auxin transport regulators (*PINOID*, *WAG1*) are enriched in the columella, hair cells, and cortex ($P = 1.03E^{-4}$, pattern 31).

Expression Maps - RNA

I □ High-Resolution Expression Map in Drosophilla



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



Brady et al., *Science*, 2007



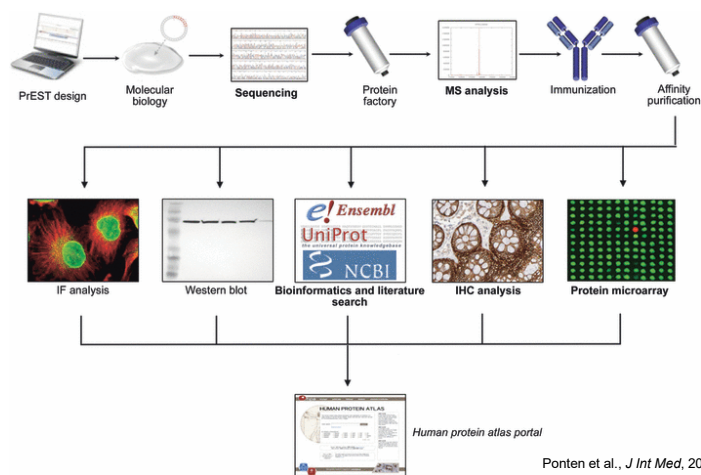
Deconstructing and reconstructing the embryo by single-cell transcriptomics combined with spatial mapping.

(A) Single-cell sequencing of the *Drosophila* embryo: ~1000 handpicked stage 6 fly embryos are dissociated per Drop-seq replicate, cells are fixed and counted, single cells are combined with barcoded capture beads, and libraries are prepared and sequenced. Finally, single-cell transcriptomes are deconvolved, resulting in a digital gene expression matrix for further analysis.

(B) Mapping cells back to the embryo: Single-cell transcriptomes are correlated with high-resolution gene expression patterns across 84 marker genes, cells are mapped to positions within a virtual embryo, and expression patterns are computed by combining the mapping probabilities with the expression levels (virtual in situ hybridization).

Expression Maps - Proteins

□ Human Protein Atlas



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

Schematic flowchart of the Human Protein Atlas. For each gene, a signature sequence (PrEST) is defined from the human genome sequence, and following RT-PCR, cloning and production of recombinant protein fragments, subsequent immunization and affinity purification of antisera results in immunospecific antibodies. The produced antibodies are tested and validated in various immunoassays. Approved antibodies are used for protein profiling in cells (immunofluorescence) and tissues (immunohistochemistry) to generate the images and protein expression data that are presented in the Human Protein Atlas (Ponten et al., *J Int Med*, 2011).

Expression Maps - Proteins

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


THE HUMAN PROTEIN ATLAS

ABOUT & HELP

SEARCH ? »

[Fields >](#)

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



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.

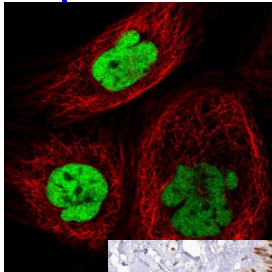
dictionary: histology of esophagus

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



Expression Maps - Proteins

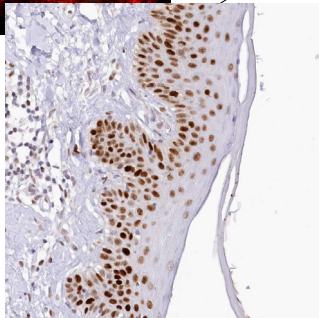
- Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>)



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 »



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 »

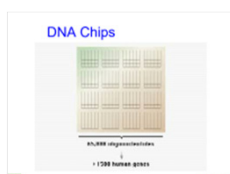
Osnova

- 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)



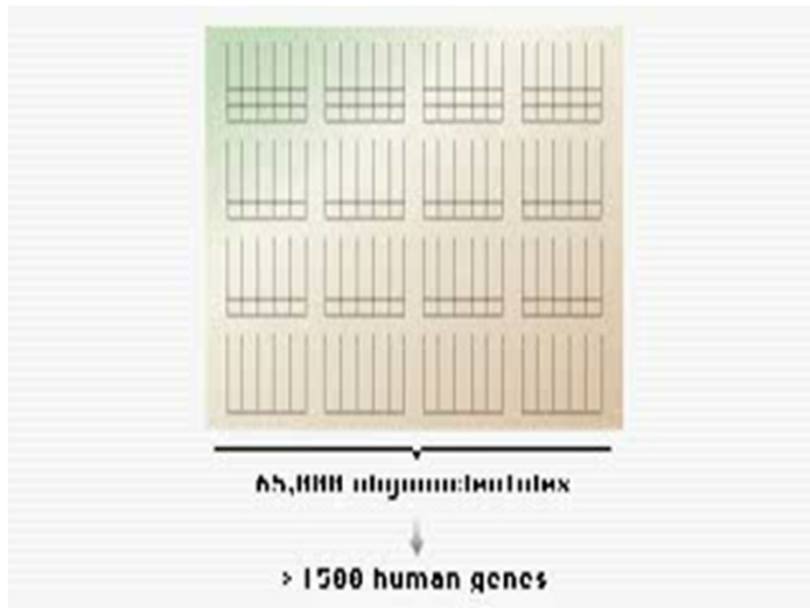
- čipy nejen pro analýzu exprese, ale např. i genotypování (SNP polymorfizmy, sekvenování pomocí čipů, ...)

Affymetrix ATH1 *Arabidopsis* genome array

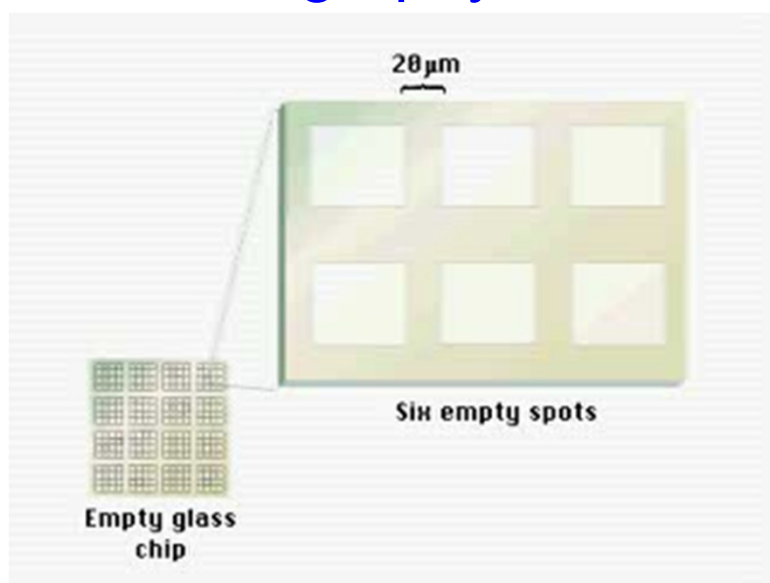
Critical Specifications	
Number of arrays	One
Number of sequence represented	>24,000 gene sequences
Feature size	18 µm
Oligonucleotide probe length	25-mer
Probe pairs/sequence	11
Control sequences	<i>E. coli</i> genes <i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>S. subtilis</i> gene <i>lysA</i> , Phage P1 <i>cro</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 čípech se stejným vzorkem, vynesení stejných vzorků analyzovaných na různých čípech 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 195M677 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 (name & description)	External ID	Replicate (id & name)	Replicate type	Reverse replicate	Sample	Experimental variables	Label	Get Data
HoekengaS7 Aluminum Stress 1 (strong spatial bias)	AF0C7304	63	Aluminum Stress	technical	7304_Cy3.7306_Cy5	no treatment (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy3	Download
					7304_Cy5.7306_Cy3	Aluminum (50 μM AlCl ₃) (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy5	Download
HoekengaS8 Aluminum Stress 2 (strong spatial bias)	AF0C7305	64	Aluminum Stress	technical	7304_Cy5.7306_Cy3	Aluminum (50 μM AlCl ₃) (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy3	Download
				63	7304_Cy3.7306_Cy5	no treatment (pool of 3, 8, and 24 hours)	Cy5	Download

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

Che et al., 2002

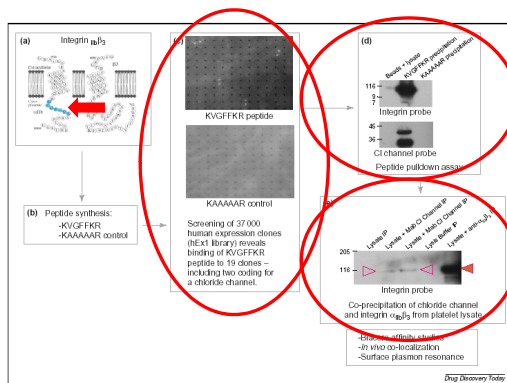
Protein Chips

- 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)



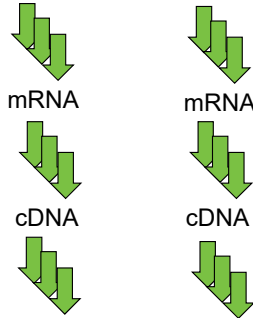
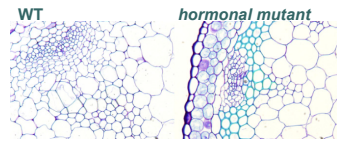
Lueking et al., 2005

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
 - Tkaňově 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*



Sequencing by Illumina and
number of transcripts determination

Results of -omics Studies vs Biologically Relevant Conclusions

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

Ddii et al., *unpublished*

gene	locus	sample_1	sample_2	status	value_1	value_2	log2(fold_change)	test_stat	p_value	q_value	significant
AT1G07795	1:2414285-2414967	WT	MT	OK	0	1.1804	1.79769e+308	1.79769e+308	6.88885e-05	0.00039180	1 yes
HRS1	1:4556891-4558708	WT	MT	OK	0	0.696583	1.79769e+308	1.79769e+308	4.67708e-08	4.67708e-08	yes
ATML014	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	9.94952e-08	9.95901e-08	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-06	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
ATS33251	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	1.4989e-12	yes
ATS315360	5:4987235-4989182	WT	MT	OK	0.0988273	56.4834	9.1587	-10.4392	0	0	yes

34

Example of an output of transcriptional profiling study using Illumina sequencing performed in our lab. Shown is just a tiny fragment of the complete list, comprising about 7K genes revealing differential expression in the studied mutant.

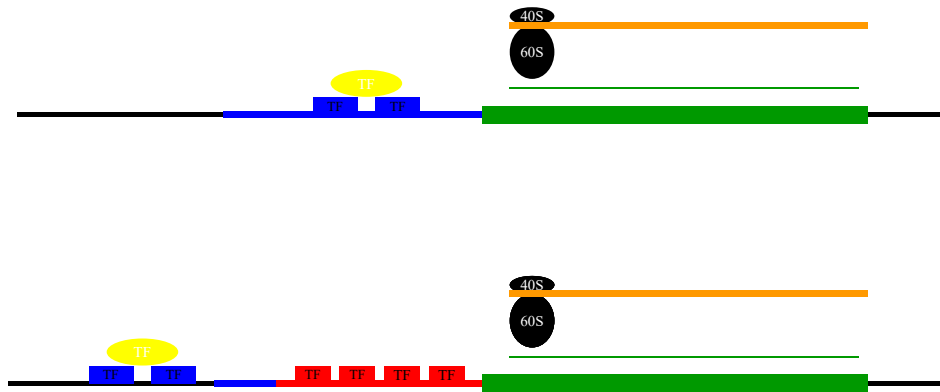
Osnova

- **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**
 - **Tkaňově 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

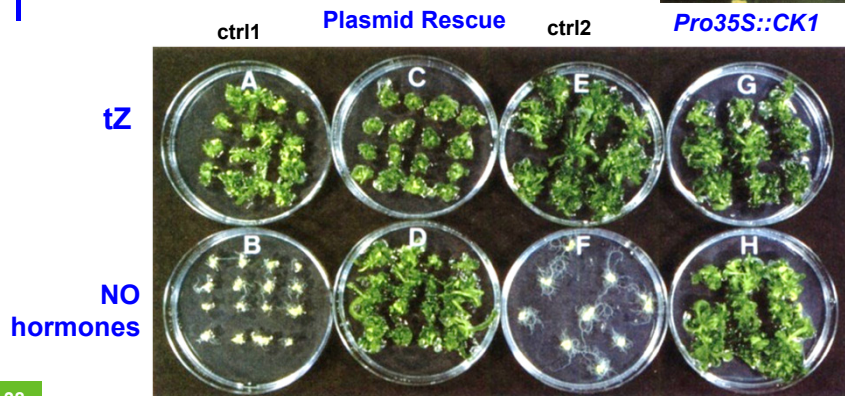
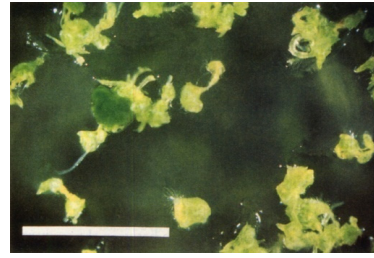
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce T-DNA aktivační mutagenese
 - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inserce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
 - prvním krokem je příprava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



38

Kakimoto, *Science*, 1996

CEITEC

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
 - přístupů získané funkce
 - T-DNA aktivační mutageneze
 - 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



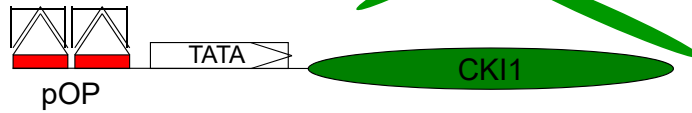
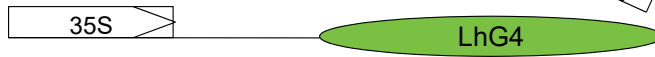
activator
X



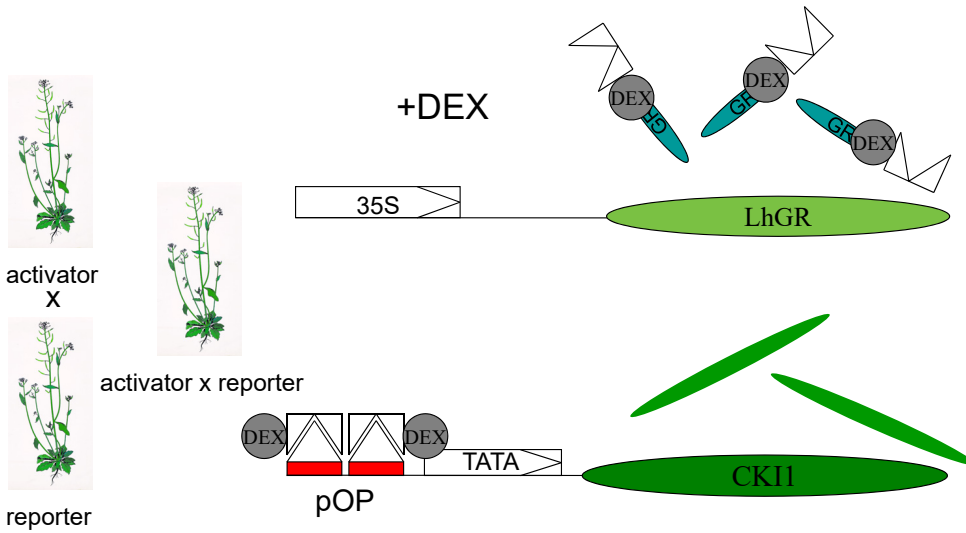
activator x reporter



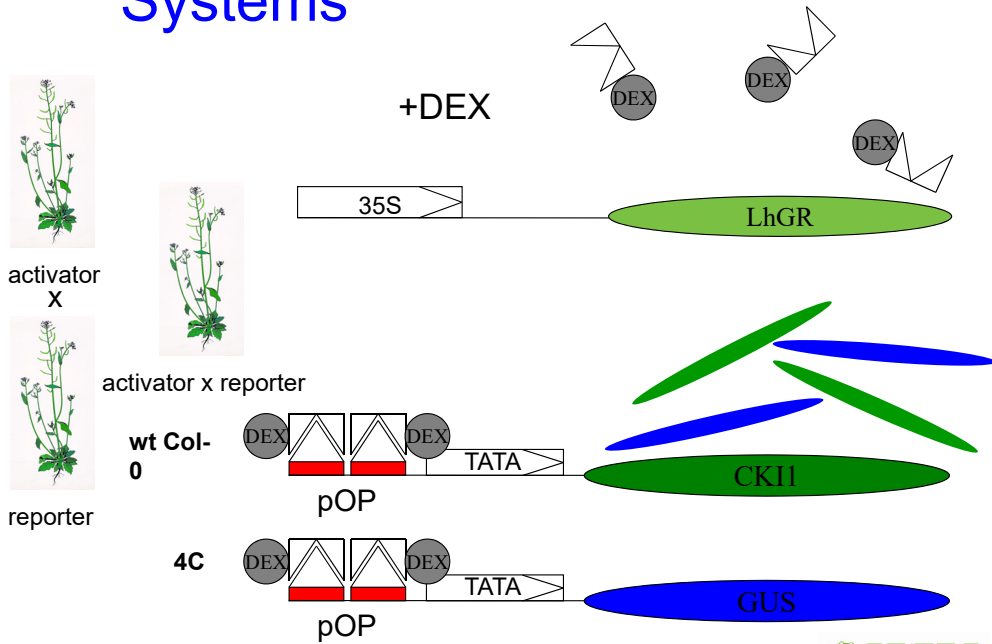
reporter



Regulated Expression Systems

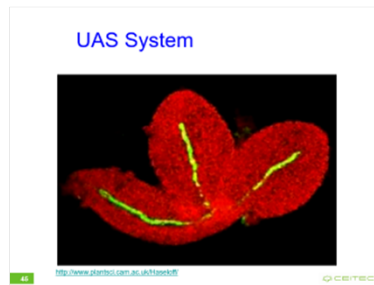


Regulated Expression Systems



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



Osnova

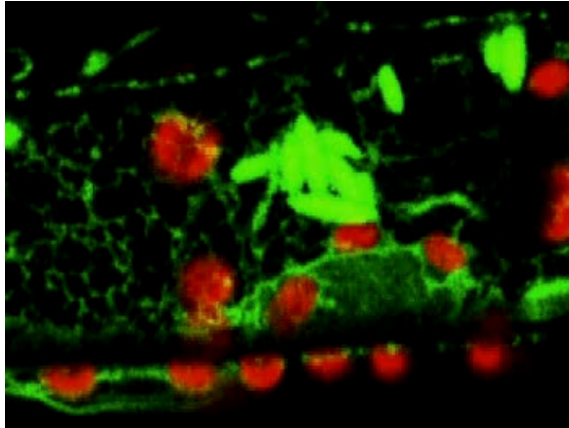
- **Metody analýzy genové exprese**
 - **Kvalitativní analýza exprese genů**
 - Příprava **transkripční fúze** promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
 - Příprava **translační fúze** kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
 - Využití dostupných dat ve **veřejných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

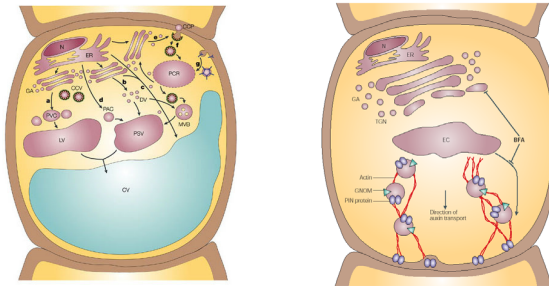
Chemical Genetics

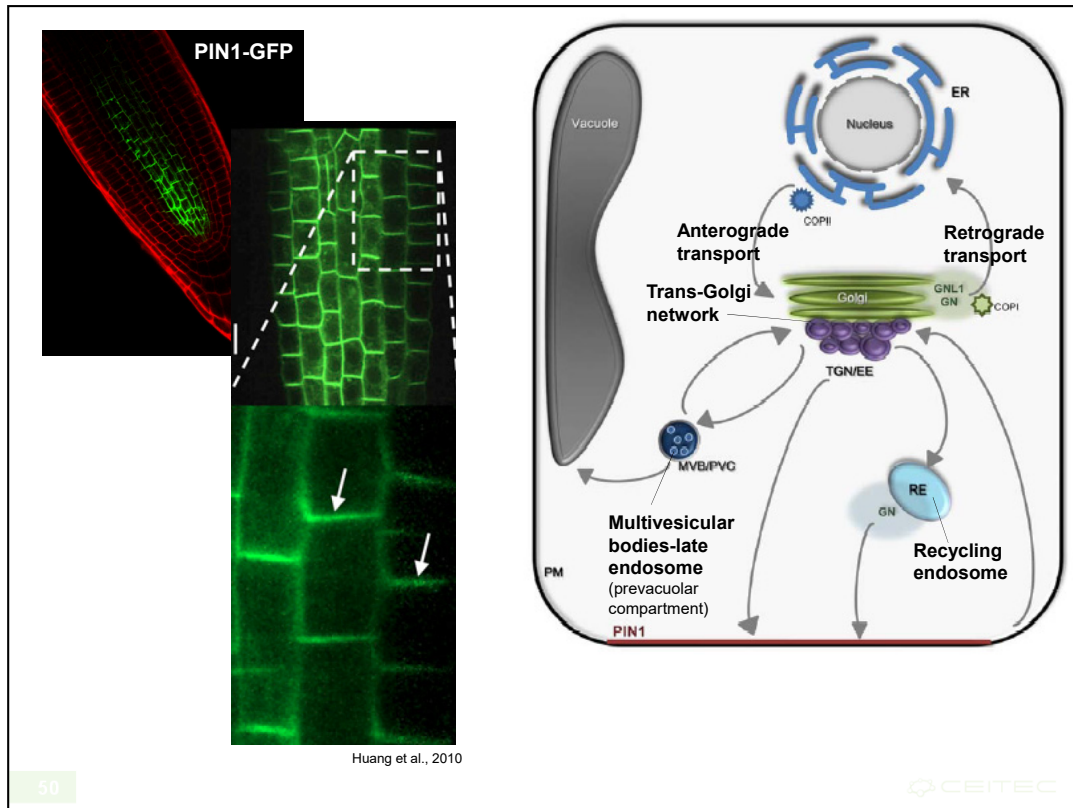
- Analýza mechanismů **endomembránového transportu** přístupy chemické genetiky
 - v rostlinných buňkách dochází k velice dynamickým procesům, zprostředkovaným zejména tzv. endomembránovým transportem (viz film, GFP směřované do ER)



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





In the figure, there is simplified scheme of vesicle trafficking pathways, regulated by GNOM and its closest relative, GNOM-LIKE1 (GNL1).

Secretory and membrane proteins are synthesised at the ER (blue) and passed onto the Golgi apparatus (green) by anterograde trafficking in COPII-coated vesicles.

The retrograde route from the Golgi apparatus to the ER is regulated by the ARF-GEFs GNOM (GN) and GNL1, which regulate the recruitment of COPI coats to the Golgi membrane. On the secretory route, proteins are transported to the sorting station, the trans-Golgi network (TGN; lilac).

From there, proteins are either transported to the vacuole (grey) via multivesicular bodies (MVB, also called prevacuolar compartment, PVC, which corresponds to the late endosome; deep blue) or trafficked to the plasma membrane (PM).

Plasma membrane proteins like the auxin efflux carrier PIN1 (red), which accumulates at the basal PM at steady state, are continually internalised and trafficked to the TGN, which resembles the early endosome (EE) in plants.

From the TGN, PIN1 is recycled to the plasma membrane via the recycling endosome (RE; light blue). This pathway is regulated by the ARF-GEF GNOM.

Chemical Genetics

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

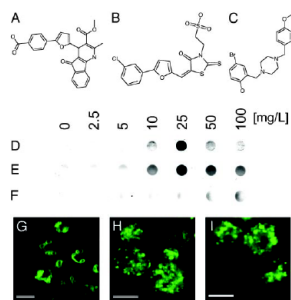
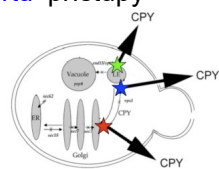
- pomocí vyhledávání v „knižovně“ chemických látek byly identifikovány takové, které vedou u kvasinek (*S. cerevisiae*) k **sekreci enzymu (karboxipeptidázy Y)**, která je normálně transportována pomocí endomembránového transportu do vakuoly

- 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)



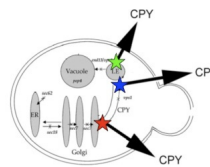
Zouhar et al., 2004

CEITEC

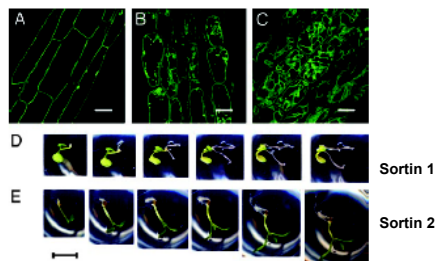
Chemical Genetics

▪ Analýza mechanismů endomembránového transportu přístupů 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 změněnou citlivostí k sortinu 1 (hyper- nebo hypersenzitivní mutanti)



tvary rostlinných vakuol pomocí EGFP:-TIP



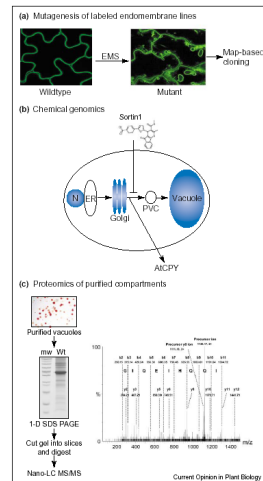
fenotyp semenáčků v přítomnosti sortinů

Zouhar et al., 2004

CEITEC

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 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