

# CG020 Genomika

## Přednáška 6

### Genová exprese

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](mailto:hejatko@sci.muni.cz), [www.ceitec.eu](http://www.ceitec.eu)

**MUNI**  
**SCI**



# Genomika 06

## ▪ Zdrojová literatura

- Brady, S. M. et al. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*. **318** (5851), 801-806 (2007).
- 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* **71**, 173-181.
- Stahl, P. L. et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*. **353** (6294), 78-82 (2016).
- Xia, K. et al. The single-cell stereo-seq reveals region-specific cell subtypes and transcriptome profiling in arabidopsis leaves. *Dev Cell*. **57** (10), 1299-1310 e1294 (2022)

# Osnova

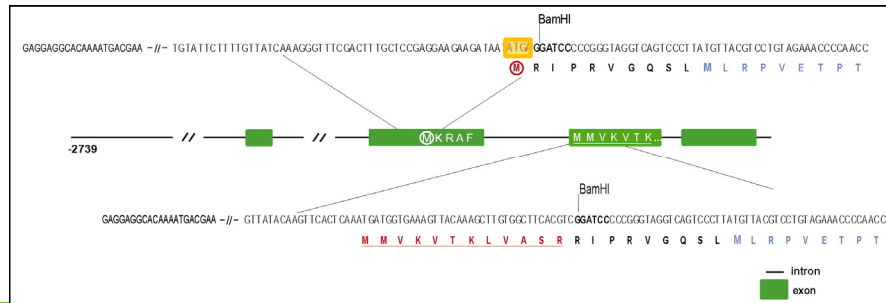
- Metody analýzy **genové exprese**
  - **Kvalitativní analýza exprese genů**
    - Příprava **transkripční fúze** promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
    - Příprava **translační fúze** kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
    - Využití dostupných dat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

# Osnova

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

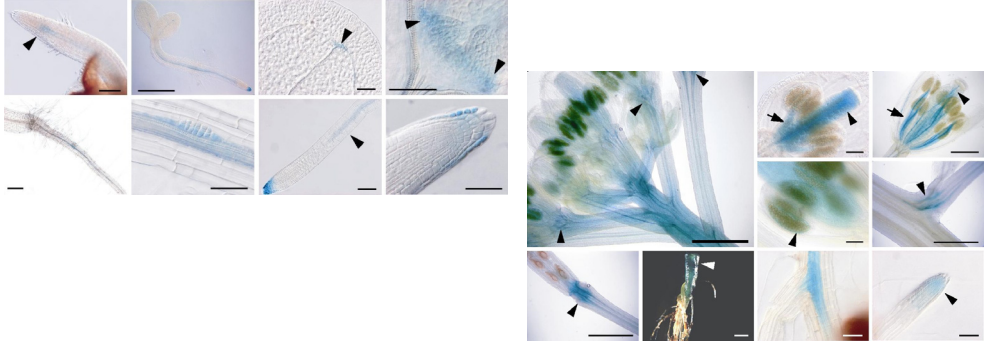
# Transkripční fůze

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



# Transkripční fůze

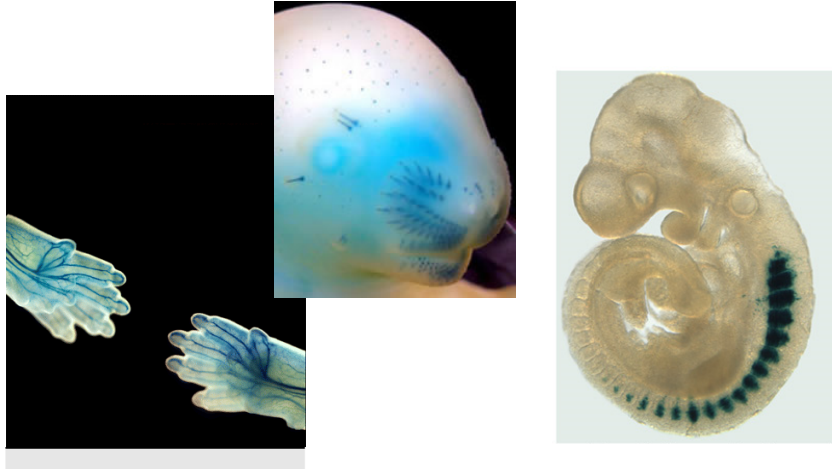
- **Transkripční fůze s promotorovou oblastí**
  - Identifikace a klonování promotorové oblasti genu
  - příprava rekombinantní DNA nesoucí promotor a reportérový gen (uidA, GFP)
  - příprava transgenních organismů nesoucích tuto rekombinantní DNA a jejich histologická analýza



6

CEITEC

# GUS reporter in mouse embryos



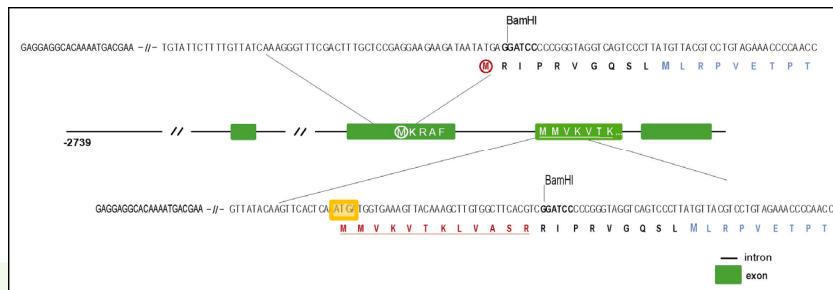
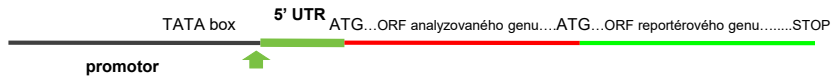
# Osnova

- 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)



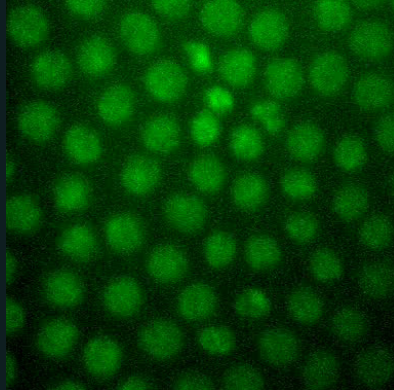
CEITEC

# Translační fúze

- **Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s repetérovým 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



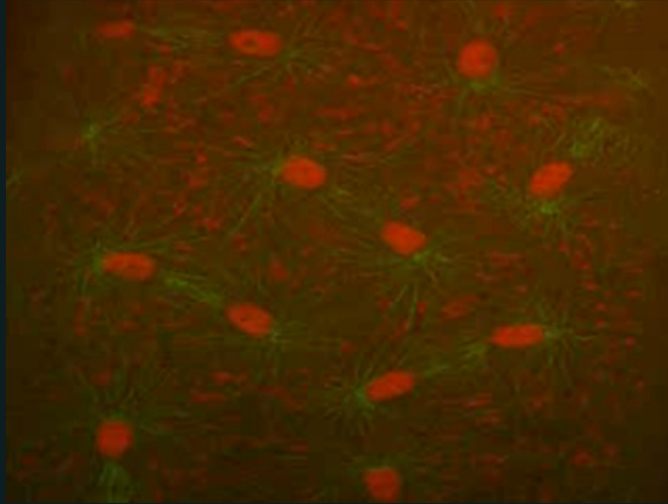
PIN1-GFP in *Arabidopsis*



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

# Translační fúze

- Translační fúze kódující oblasti analyzovaného genu s repotérovým genem

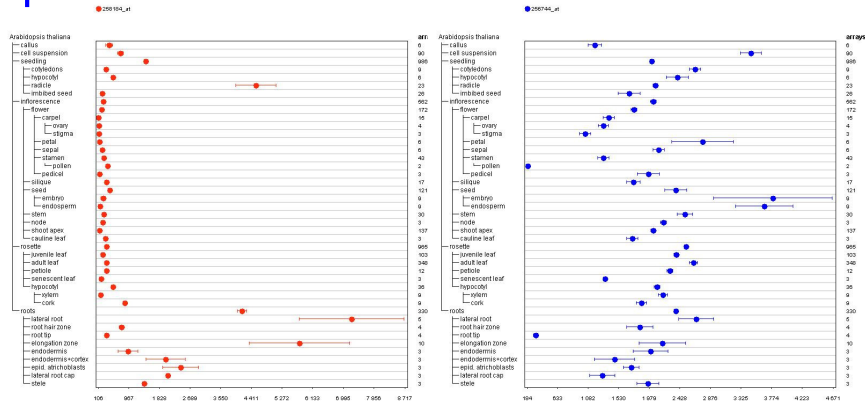


# Osnova

- 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**

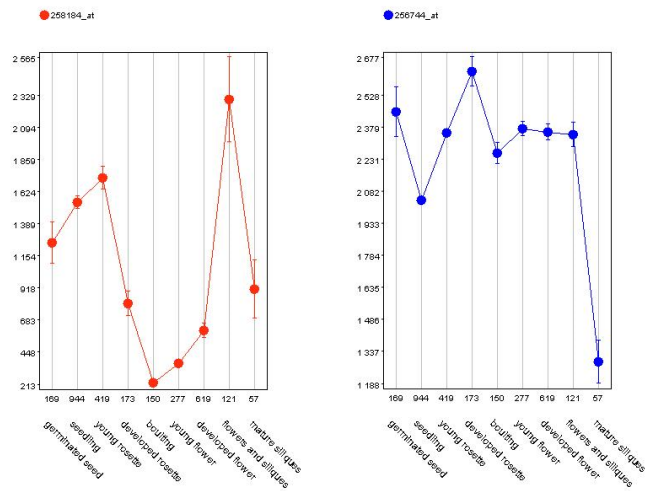
# Databáze

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



# Databáze

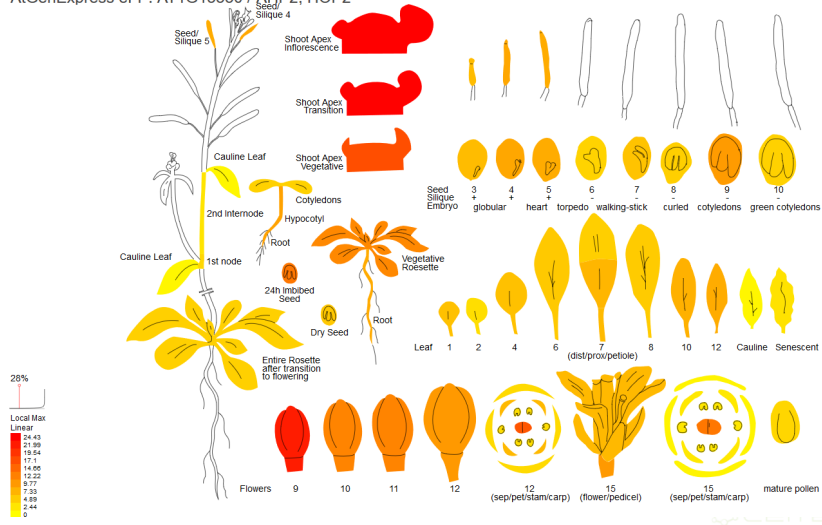
- **Analýza exprese pomocí Genevestigator (*AHP1* a *AHP2*, *Arabidopsis*, Affymetrix ATH 22K Array)**



# Databáze

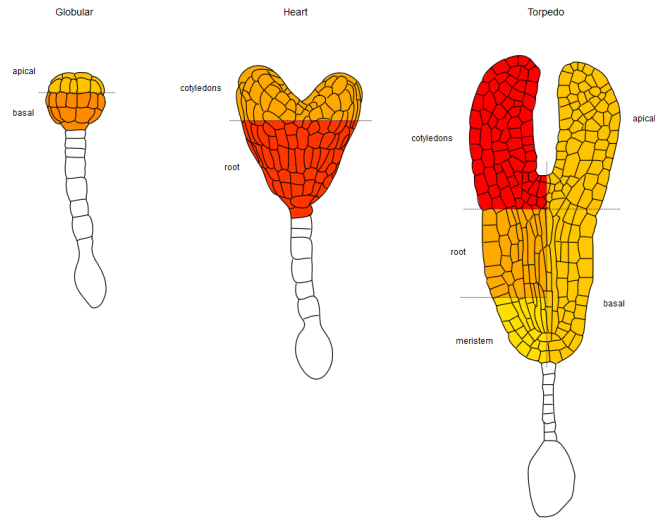
□ **Analýza exprese pomocí ePlant**

AtGenExpress eFP: AT1G13330 / AHP2, HOP2



# Databáze

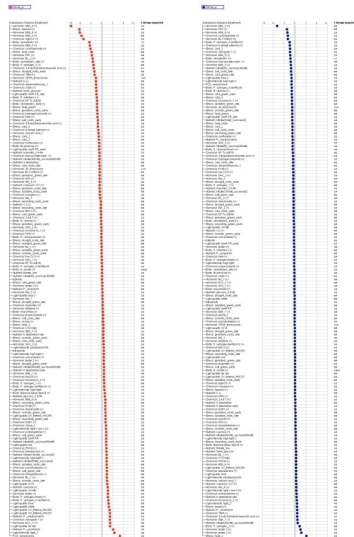
## □ Analýza exprese pomocí ePlant





# Databáze

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

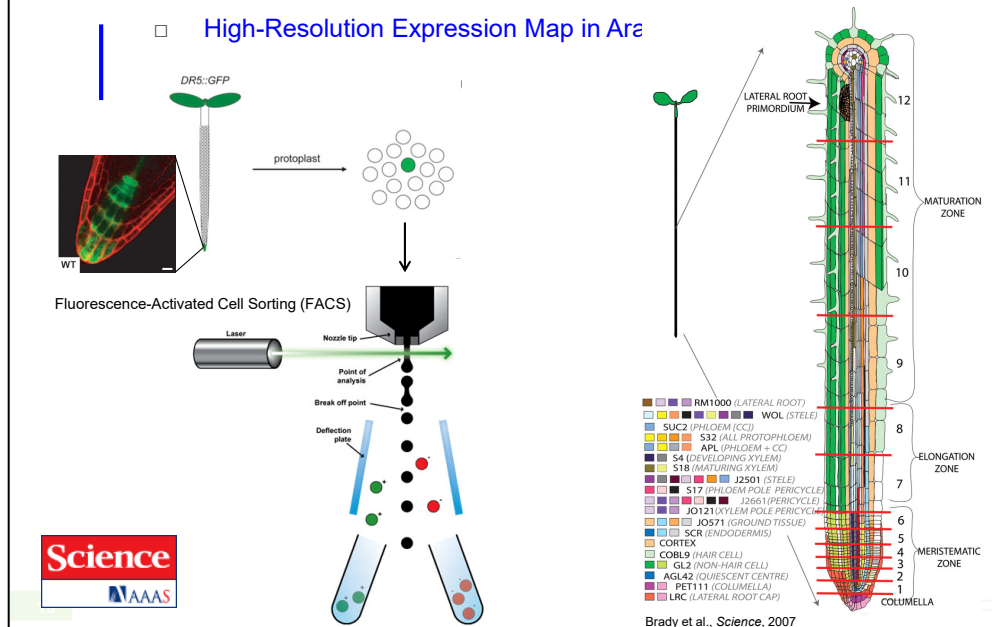


# Osnova

- 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

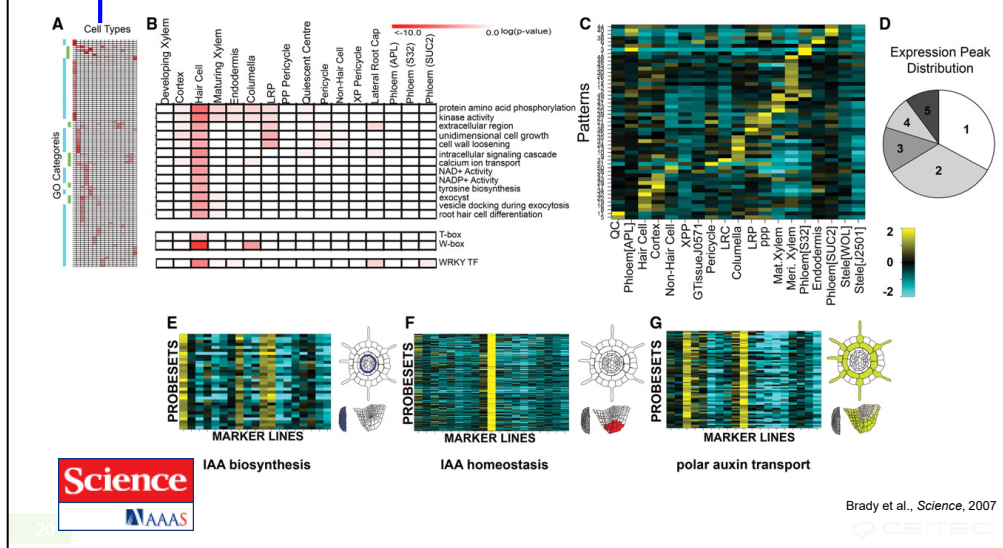
## High-Resolution Expression Map in *Ara*



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.

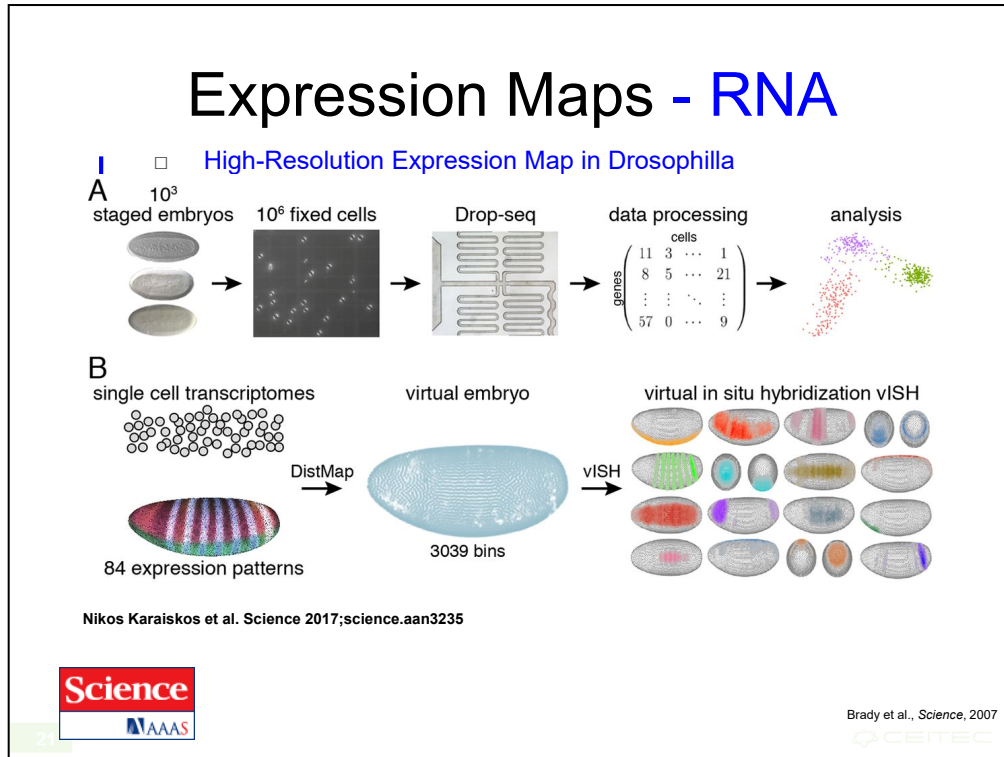
# Expression Maps - RNA

## 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



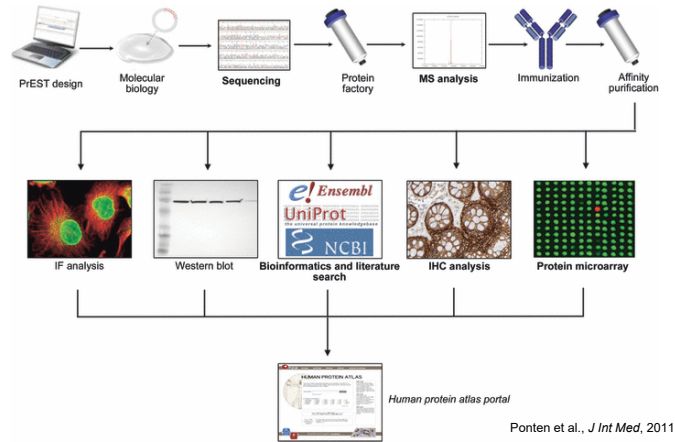
## Deconstructing and reconstructing the embryo by single-cell transcriptomics combined with spatial mapping.

**(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



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 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/>)

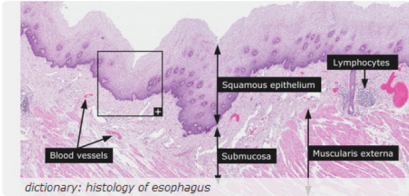
## THE HUMAN PROTEIN ATLAS

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



**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

 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 nucleolus  
 Additional location(s) Localized to the nucleus but excluded from the nucleolus.  
 Staining summary  
 Reliability (APE) High  
 Antibodies in assay CAB039238, CAB039239

**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

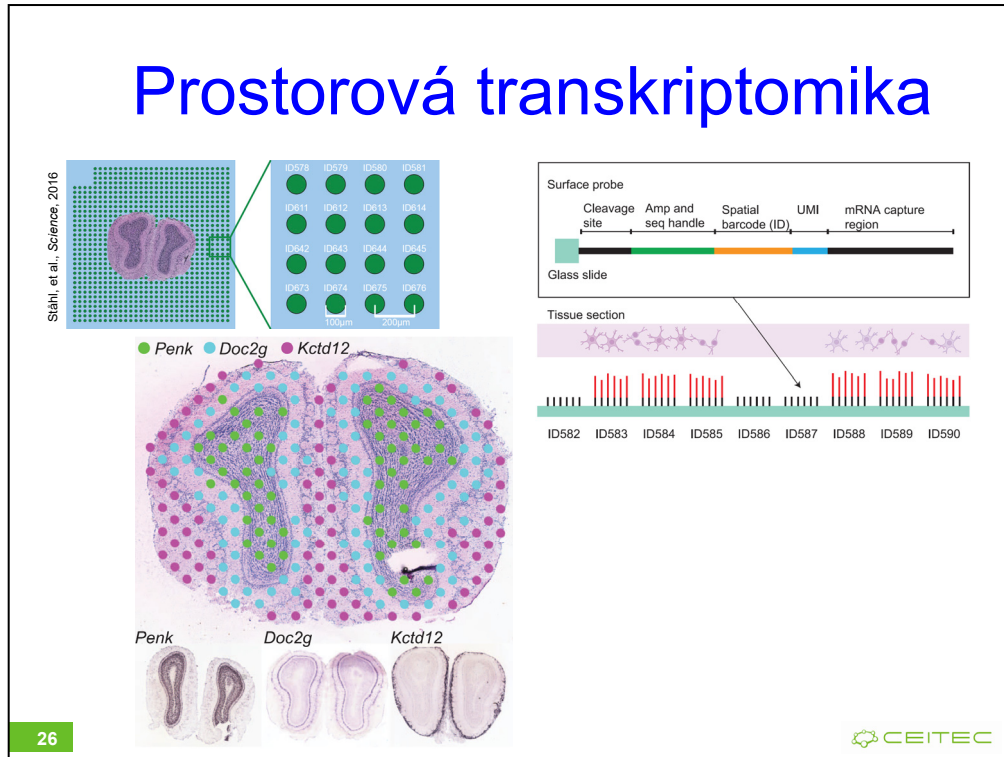
Organ	No of cell types	Protein expression
CNS (brain)	11	Low
Hematopoietic (blood)	8	Low
Liver and pancreas	5	Low
Digestive (GI-tract)	13	Low
Respiratory (lung)	4	Low
Cardiovascular	1	Low
Female tissues	13	Low
Placenta	2	Low
Male tissues	5	Low
Urinary tract (kidney)	3	Low
Skin and soft tissues	14	Low
Endocrine tissues	3	Low



# 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
    - Tkáňové a buněčně specifická analýza genové exprese
    - **Prostorová transkriptomika**

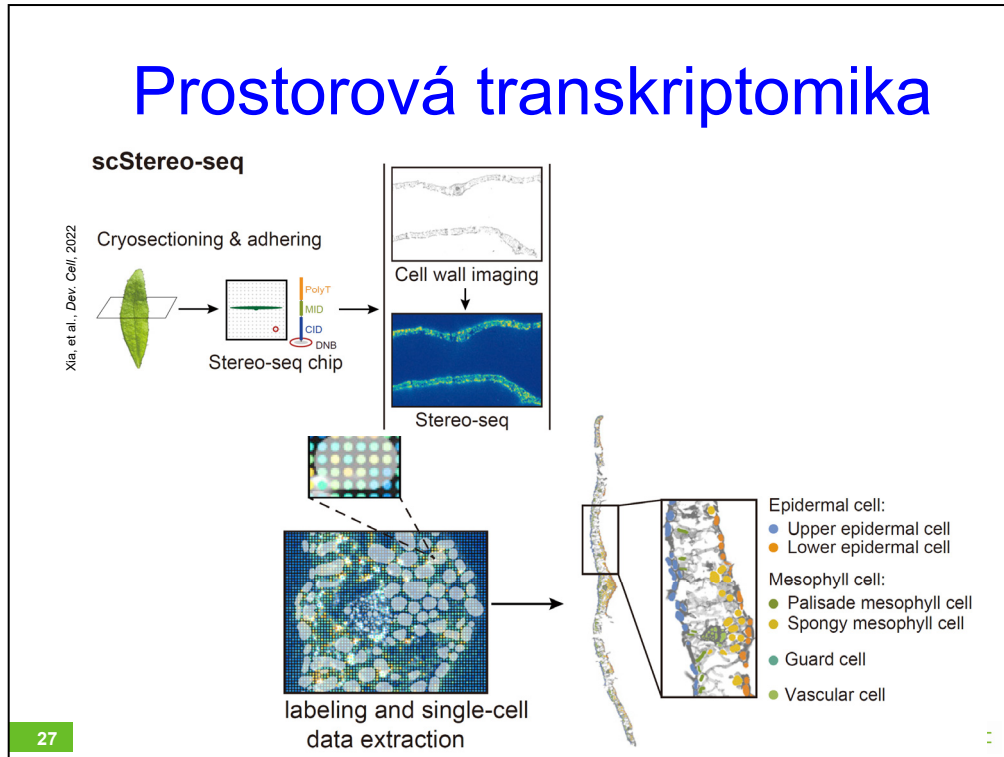
# Prostorová transkriptomika



Spatially resolved gene expression. (A) Each array feature contains unique DNA-barcoded probes containing a cleavage site, a T7 amplification and sequencing handle, a spatial barcode, a unique molecular identifier (UMI), and an oligo(dT) VN-capture region, where V is anything but T and where N is any nucleotide. cDNA (red) is generated from captured mRNA by reverse transcription.

(B) Visualization of the expression of three genes by spatial transcriptomics (top) and in situ hybridization (bottom). Penk and Kctd12 in situ images are from the Allen Institute. Cutoff normalized counts, Penk, 8; Doc2g, 13; and Kctd12, 19.

# Prostorová transkriptomika



Cauline leaves were cryo-sectioned and positioned on top of four separate chips (or sections) with seven leaf samples on each chip. On the surface of the chip, a DNA nanoball (DNB) is docked in a

grid-patterned array of spots. Each spot is 220 nm in diameter and the center-to-center distance between neighboring spots is 500 nm (Figure 1A). The DNB contains random barcoded sequences, the coordinate identity (CID), molecular identifiers (MIDs), and polyT sequence-containing oligonucleotides designed to capture mRNAs. After cell wall staining and imaging, the chips were used for Stereo-seq library construction and data acquisition. In short, mRNA was released from tissue cells through permeabilization and was captured by polyT in the DNB. The released mRNA was then reverse-transcribed and amplified into cDNA, which

was used for PCR amplification and library sequencing. The sequencing data were visualized in the STOmics visualization system (<https://stereomap.cngb.org/>) and processed using a series of Stereo-seq exclusive tools, including SAW (<https://github.com/BGIResearch/SAW>) and stereopy (<https://github.com/BGIResearch/stereopy>). In total, we selected data from 26 leaf samples with good morphology in these four chips for further analyses.

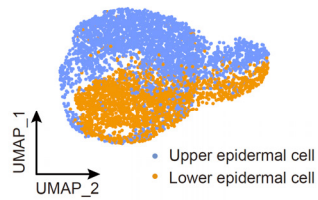
(A) Schematic representation of the single-cell Stereo-seq procedure. *Arabidopsis thaliana* cauline leaves are cryo-sectioned and positioned on top of the chip surface with DNA nanoball (DNB) docked in a grid-patterned array of spots, and the capture probes contain identifiers, and PloyT oligos to enable the recordation of the spatial coordinates, the identification of unique transcripts per gene, and the capture of mRNAs.

After cell wall staining and imaging, the same section is sequenced with Stereo-seq. Through the combined high-resolution image and MID, a single-cell level of MID distribution is achieved. A robust extraction method is built to be used in extracting single cells and in the identification of major cell types in cauline leaves. Using spatial single-cell data, several cell subtypes are distinguished (i). Next, the leaf is divided into four distinct parts, and spatial gene expression pattern (ii) and spatial developmental trajectory (iii) are determined.

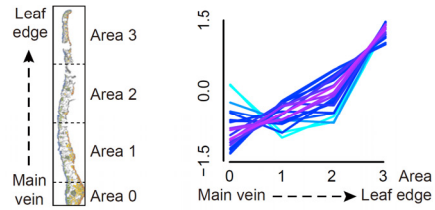
# Prostorová transkriptomika

## Spatial single-cell transcriptome analysis

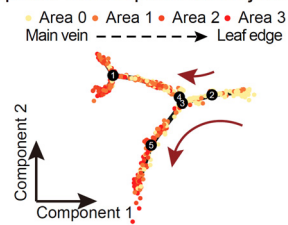
(i) Cell sub-type identification



(ii) Spatial gene expression pattern



(iii) Spatial developmental trajectory



# 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**
    - **Tkáňové a buněčně specifická analýza genové exprese**
    - **Prostorová transkriptomika**
  - **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

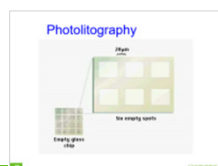
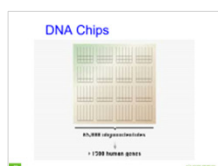
- k dispozici komerčně dostupné sady pro celý genom

- 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 fotonografické techniky-usnadnění syntézy oligonukleotidů např. pro celý genom člověka (cca 3,1 x 10<sup>9</sup> 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, ...)

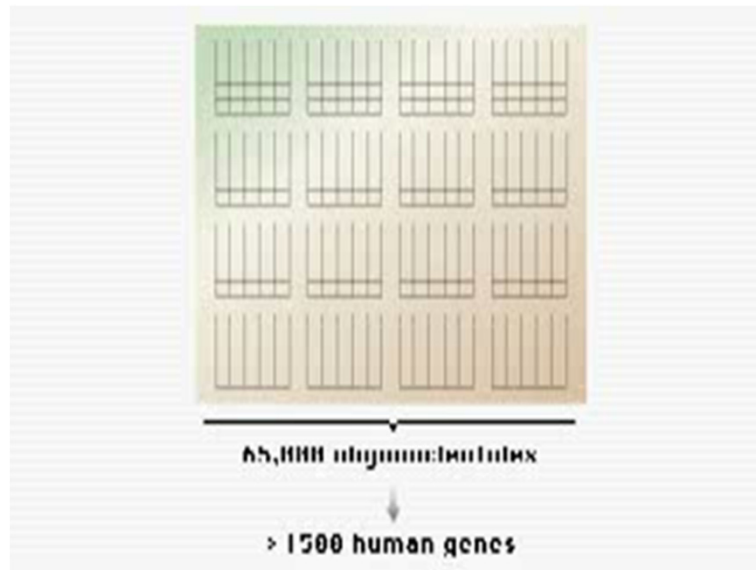
Affymetrix ATH1 *Arabidopsis* genome array



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	1:1
Control sequences	<i>E. coli</i> genes <i>bacD</i> , <i>bacC</i> , <i>bacD</i> , <i>B. 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*

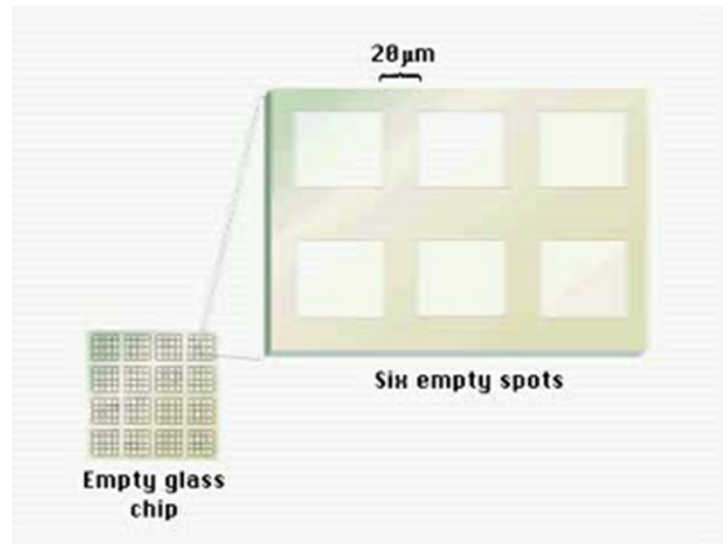
\*As measured by detection in comparative analysis between a complex target containing spiked control transcriptions and a complex target with no spikes.

# 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 195M6T7 in response to chemical treatment

Experiment: Aluminum Stress

Slide (name & description)	External ID	Replicate # (id name)	Replicate type	Reverse replicate	Sample	Experimental variables	Label	Get Data
HoekengaS711 Aluminum Stress 1 (strong spatial bias)	AFGC7304	63	Aluminum Stress	technical	7304_Cy3,7305_Cy5	no treatment (pool of 2, 8, and 24 hours)	Cy3	Download
HoekengaS711 Aluminum Stress 2 (strong spatial bias)	AFGC7305	64	Aluminum Stress	technical	7304_Cy3,7305_Cy5	Aluminum (50 μM AICD3 pool of 2, 8, and 24 hours)	Cy3	Download

Che et al., 2002

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

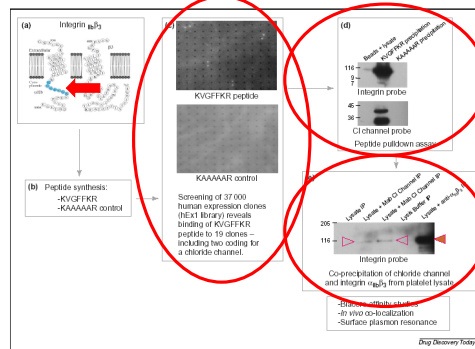
# Protein Chips

- 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 $\alpha$ , Kramer et al., 2004)



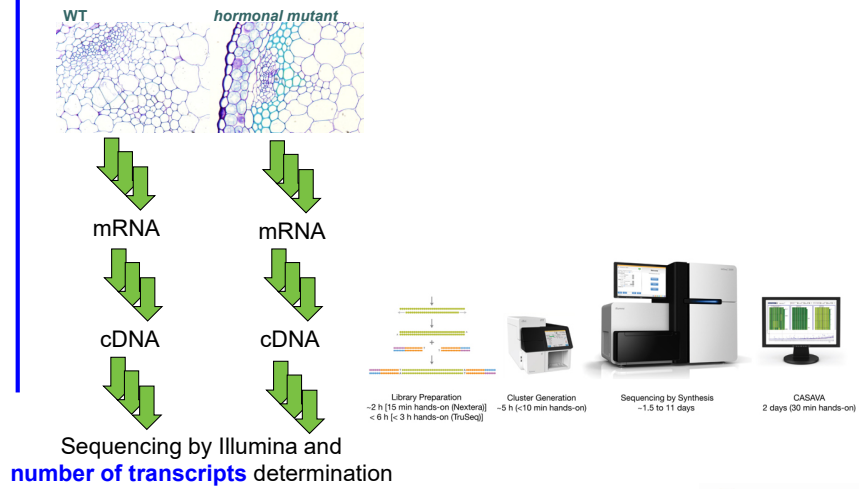
Lueking et al., 2005

# 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**
    - **Tkáňové a buněčně specifická analýza genové exprese**
    - **Prostorová transkriptomika**
  - **Kvantitativní analýza exprese**
    - **DNA a proteinové čipy**
    - **Next gen transkripční profilování**

# Next Gen Transcriptional Profiling

- *Transcriptional profiling via RNA sequencing*



# 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	6.61994e-06	0.00053505	yes
ATMLD14	1:9227472-9232296	WT	MT	OK	0	0.514609	1.79769e+308	1.79769e+308	9.74219e-05	3.50131e-05	5 yes
NRT1.6	1:9400663-9403789	WT	MT	OK	0	0.877865	1.79769e+308	1.79769e+308	3.2692e-08	0.00000000	yes
AT1G22570	1:9576425-9582376	WT	MT	OK	0	2.0829	1.79769e+308	1.79769e+308	9.76039e-06	0.647e-05	yes
AT1G60095	1:22159735-22162419	WT	MT	OK	0	0.688588	1.79769e+308	1.79769e+308	9.95901e-08	0.00000000	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	0.00000000	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	0.00000000	yes
AT1G48700	1:18010728-18012871	WT	MT	OK	0	0.596525	1.79769e+308	1.79769e+308	6.53917e-05	0.00037473	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	0 yes
AT4G12520	4:7421025-7421738	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
AT3G19360	5:4967235-4969162	WT	MT	OK	0.0588273	56.4834	9.1587	-10.4392	0	0	yes

38

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

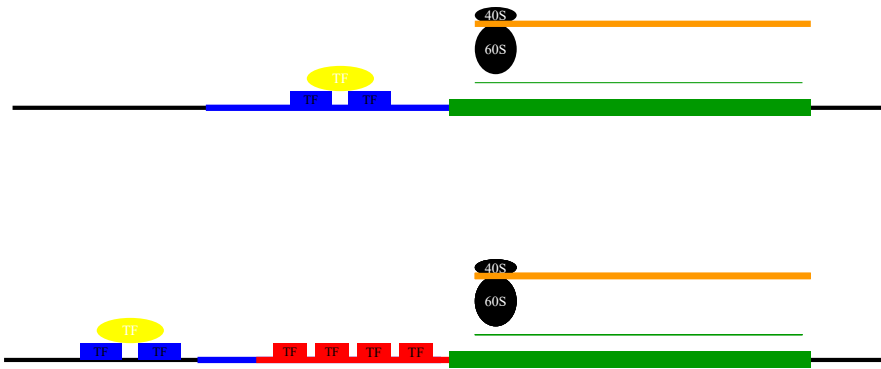
- **Metody analýzy genové exprese**
  - **Kvalitativní analýza exprese genů**
    - Příprava **transkripční fúze** promotoru analyzovaného genu s reporterovým genem (gen zpravodaj)
    - Příprava **translační fúze** kódující oblasti analyzovaného genu s reporterovým genem
    - Využití dostupných dat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



# Gain-of-Function Approaches

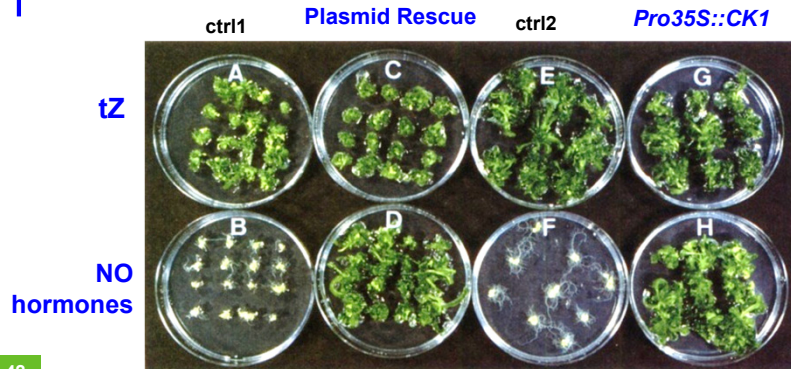
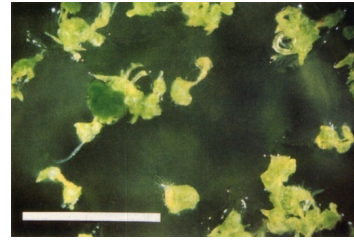
- Metody identifikace funkce genů pomocí přístupů získané funkce
  - T-DNA aktivační mutagenese
    - metoda umožňující izolaci dominantních mutantů prostřednictvím náhodné inserce konstitutivního promotoru, vedoucí k nadměrné expresi genu a tím odpovídajícím fenotypovým změnám
    - prvním krokem je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



42

Kakimoto, *Science*, 1996

CEITEC

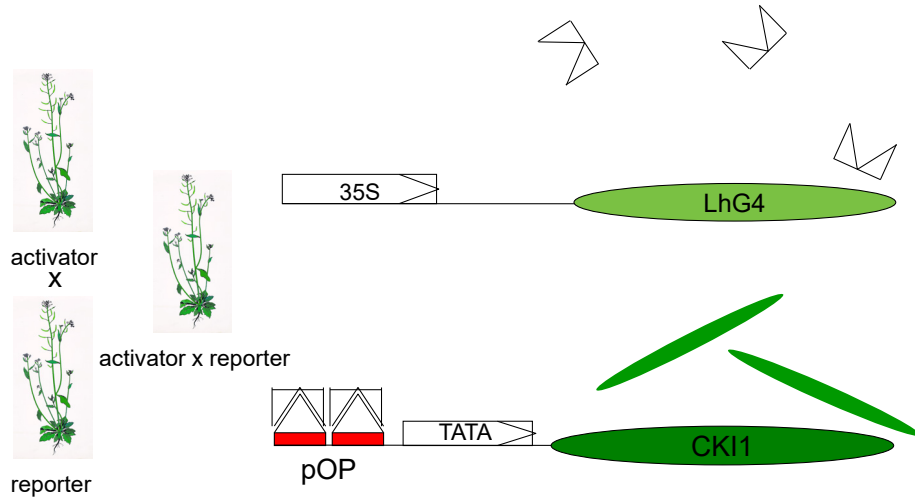
# Osnova

- 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
    - Tkáňové a buněčně specifická analýza genové exprese
    - Prostorová transkriptomika
  - Kvantitativní analýza exprese
    - DNA a proteinové čipy
    - Next gen transkripční profilování
  - Regulace genové exprese v identifikaci funkce genů
    - přístupů získané funkce
      - T-DNA aktivační mutagenese
      - Ektopická exprese a systémy regulovatelné genové exprese

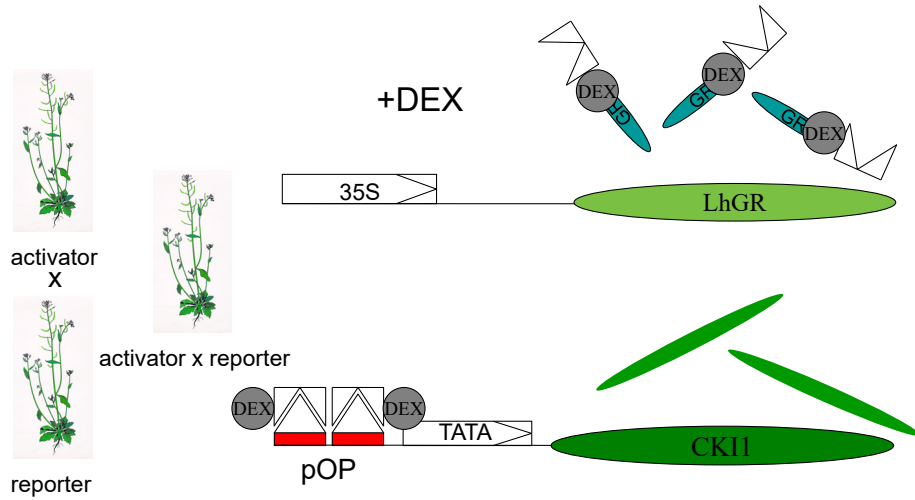
# Regulated Expression Systems

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

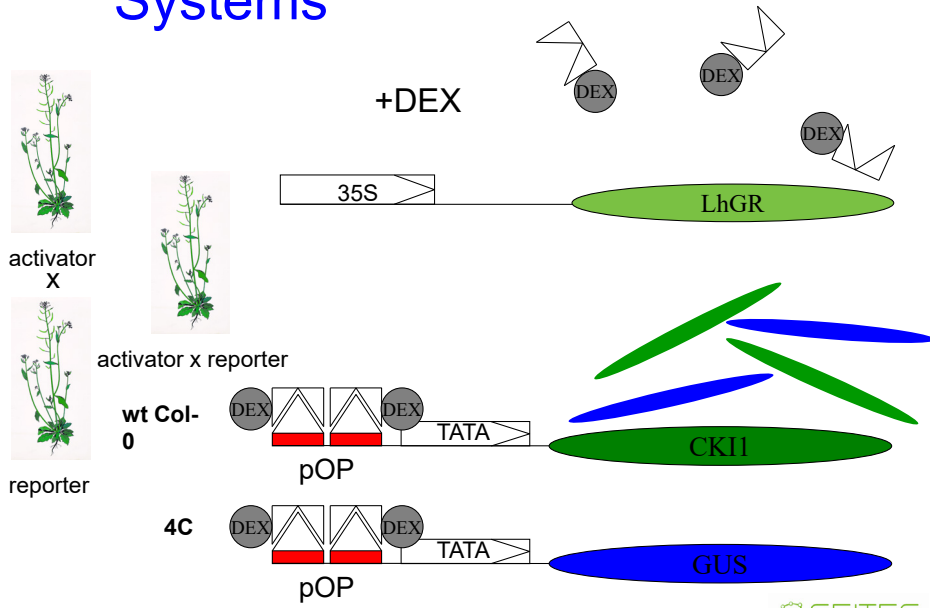
# Regulated Expression Systems



# Regulated Expression Systems



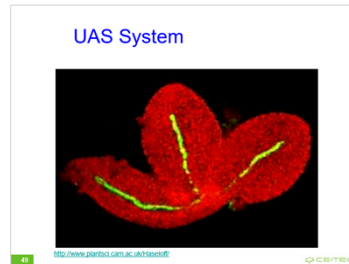
# Regulated Expression Systems



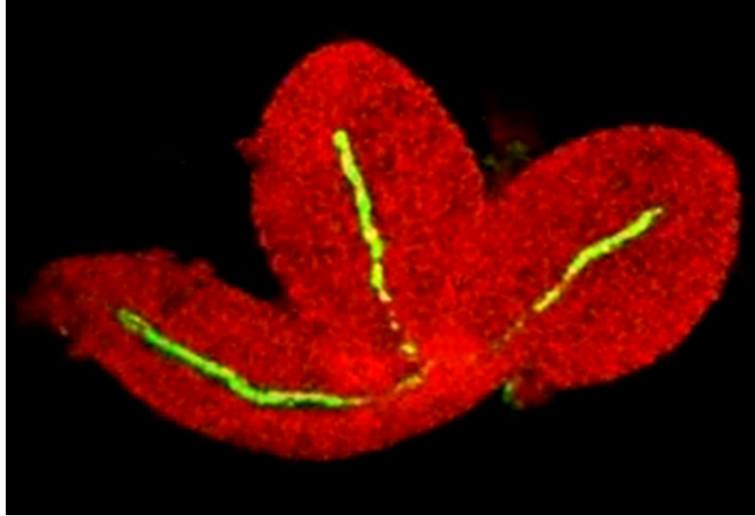


# Regulated Expression Systems

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



# UAS System



# 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**

# Diskuse