

Génazonosítás módszerei a növényekben

**BME Alkalmazott biokémia, transzgénikus
organizmusok**

Éva Csaba, Makai Szabolcs, Karsai
Ildikó, Mészáros Klára
2018. szeptember 13.

Gén

- Az öröklődés egysége
- Tulajdonságot határoz meg
- A genom kódoló része (~1% eukariótáknál)
 - Fehérje
 - tRNS
 - rRNS
 - miRNS
 - siRNS
 - Stb.
- Nem kódoló részek – „junk DNA”-elavult elnevezés



Just because of you don't understand,
you can't call us "Junk"!



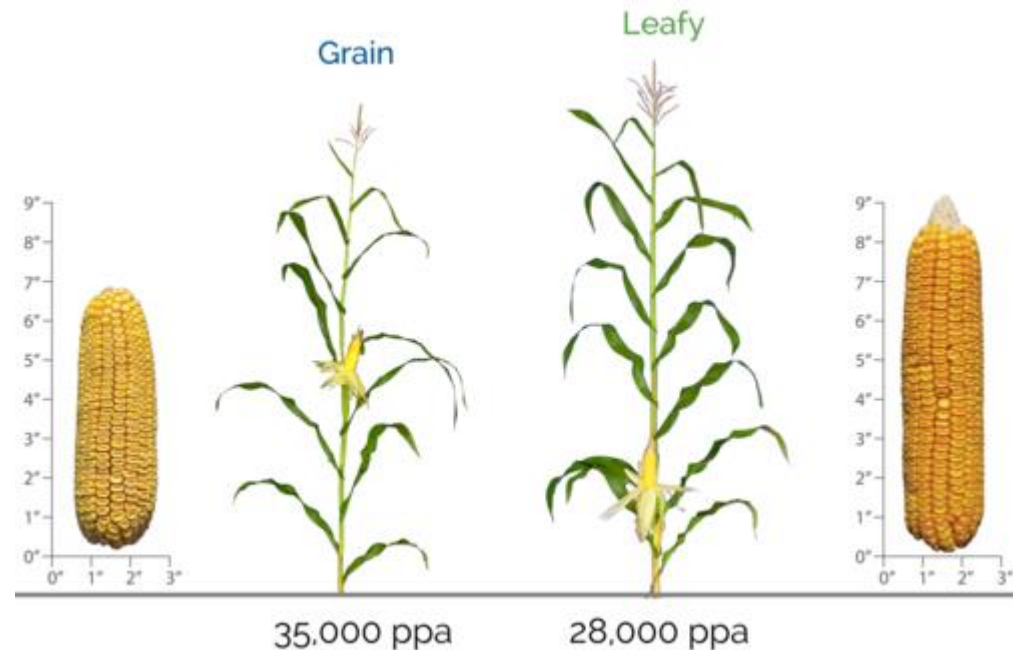
Minőségi és mennyiségi tulajdonságok

- Azok a tulajdonságokat amelyek mértékegységgel nem, vagy csak nehezen mérhetők, kialakulásuk kevésbé függ a környezet hatásától, **minőségi tulajdonságoknak** nevezzük. Megnyilvánulásukat egy vagy néhány gén határozza meg. Pl: betegség ellenállóság
- A mértékegységgel mérhető tulajdonságok, amelyek kialakulásában a környezet hatása jelentős szerepet játszik: **mennyiségi tulajdonságok**. Kifejeződésük általában sok gén kölcsönhatásának eredménye pl: termőképesség



Minőségi jellegek

- Quantitative trait loci (QTL)
- Példa: leafy silókukorica



Génazonosítás céljai

- Alap kutatás
 - Biológiai folyamatok megértése
- Alkalmazott kutatás
 - Növénynevelés támogatása
 - Magasabb termésbiztonságú, megnövelt stressztűrősségű, jobb víz és N hasznosítású, magasabb fotosz. hatékonyságú, kedvezőbb beltartalmi értékű, iparilag jobban feldolgozható, stb.



Gén azonosítás főbb módszerei I.

- Genetikai térképezés
 - Két szülői térképező populációk
 - Széles genetikai bázist képviselő fajtakör
- Random mutagenézis
 - TILLING
 - ECOTILLING

Eddig hagyományos módszerek↑

- Teljes genom szekvenálás
- Génexpressziós mintázatok elemzése
 - cDNS-könyvtár készítése
 - Microarray
 - Transzkriptom szekvenálás



Gén azonosítás főbb módszerei II.

- Modell növények
 - Mutánsgyűjtemény
 - Új generációs DNS-szekvenálás
 - Szekvencia-összehasonlítás, annotáció
- Talált gén funkciójának vizsgálata
 - Túltermeltetés
 - Csendesítés
 - Kiütés
 - Stb.
- Génszabályozás vizsgálata



Genetikai térképezés

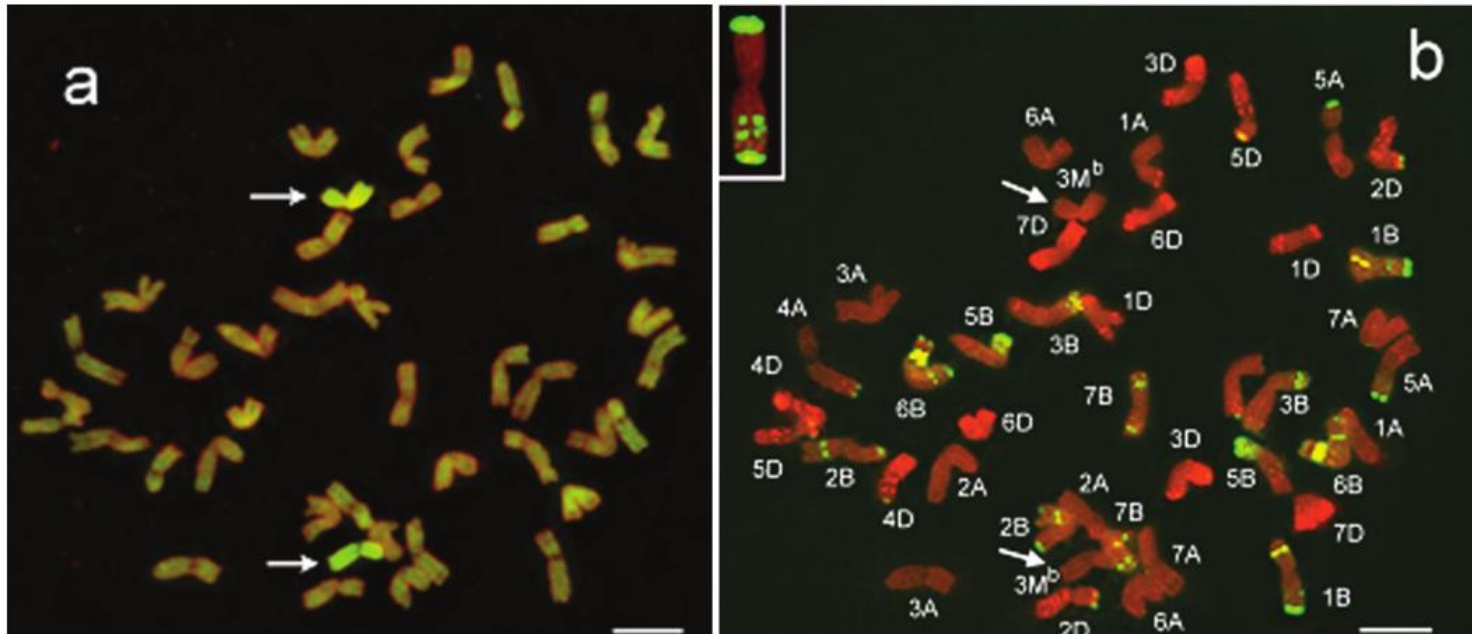
- A géntérképezés során a gének egymástól való távolságát, a genomban való viszonylagos elhelyezkedésüket határozzuk meg anélkül, hogy valóban megszekvenálnánk a DNS-t.



Térképezés haszna I.

- Citogenetika
- Itt *Aegilops biuncialis* kromoszómarész áthelyeződését követték búza kromoszómára
- Megnövelt Zn és Mn tartalom
- Farkas és mtsai. Genome 2014

Fig. 1. Molecular cytogenetic identification of 3M^b(4B) substitution (a, b) and 3M^b.4BS centric fusion (c, d). (a, c) GISH discrimination of 3M^b (green) and wheat (brown) chromosomes. (b, d) FISH using Afa family (red), pSc119.2 (green), and pTa71 (yellow) repetitive DNA probes. The FISH pattern of the missing 4B chromosome can be seen in the insert. Scale bar = 10 μm.



Térképezés haszna II.

- Marker-assisted selection
 - Szinténia - kapcsoltság
 - Morfológiai markerek
 - Oregon Wolfe-barley lines
 - <http://news.gramene.org/node/314>



Oregon Wolfe Barley Map

1 (7H)

2 (2H)

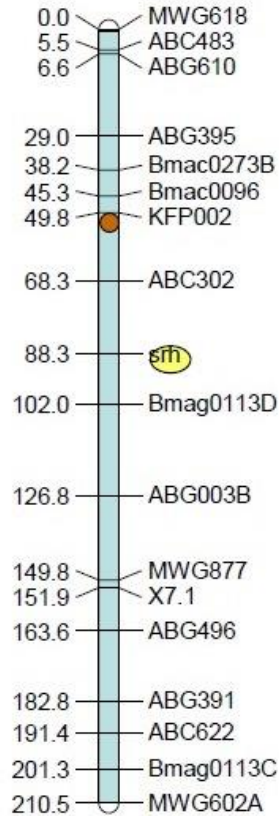
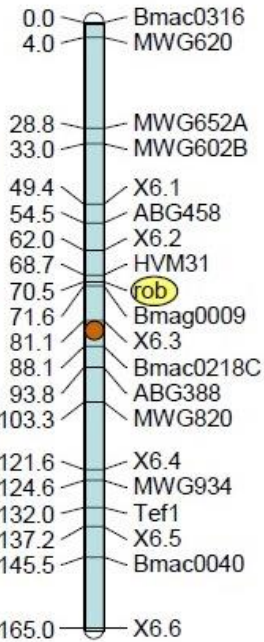
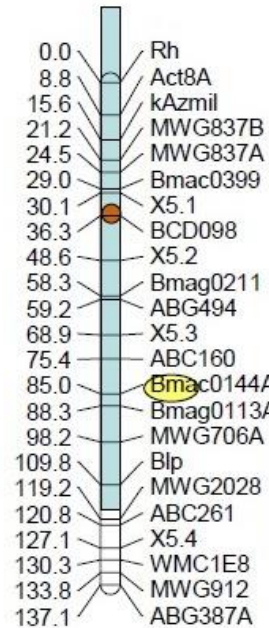
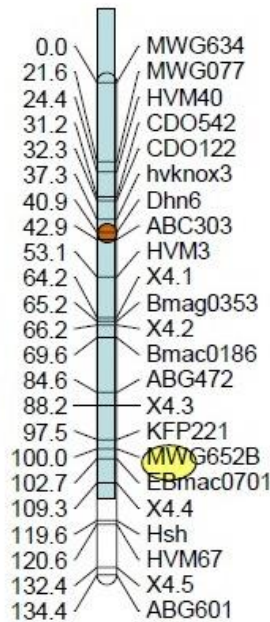
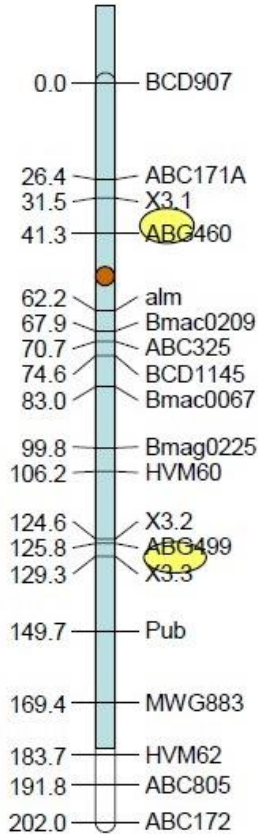
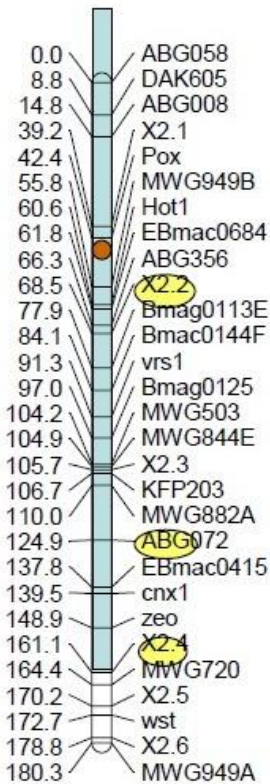
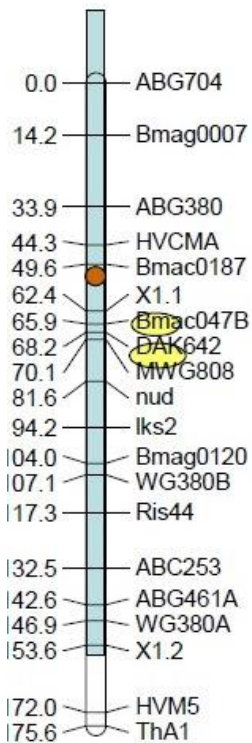
3 (3H)

4 (4H)

5 (1H)

6 (6H)

7 (5H)



Centromere

Morphological marker



Agricultural Institute

Centre for Agricultural Research
Hungarian Academy of Sciences

Marker kapcsoltsági térképek

➤ Genetikai markerek

A genetikai markerek az vizsgált szervezetek közötti genetikai különbségeket teszik láthatóvá.

➤ Morfológiai marker

➤ Biokémiai markerek

➤ Molekuláris markerek

➤ Nukleotid azaz DNS szintű variabilitás vizsgálatára alkalmasak. Számuk korlátlan, megnyilvánulásuk nem függ a környezeti hatásoktól. Az ideális DNS markerre jellemző a nagyfokú polimorfizmus

➤ koddomináns öröklődés

➤ Gyakori előfordulás

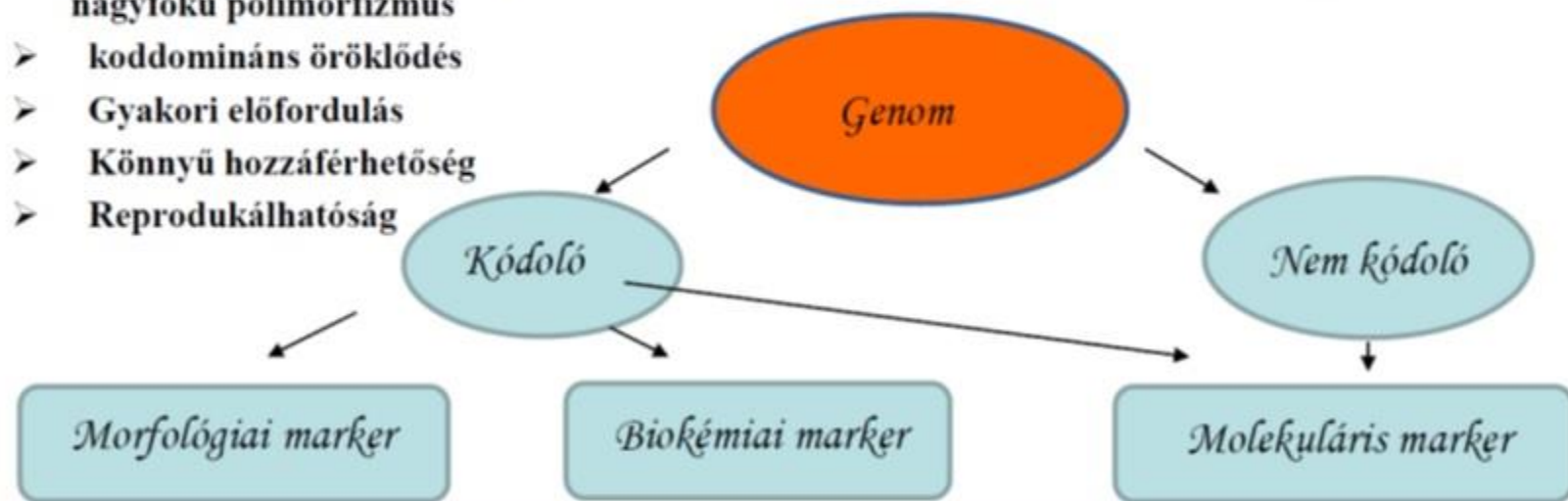
➤ Könnyű hozzáférhetőség

➤ Reprodukálhatóság

Számuk korlátozott megnyilvánulásuk

Környezeti hatástól és

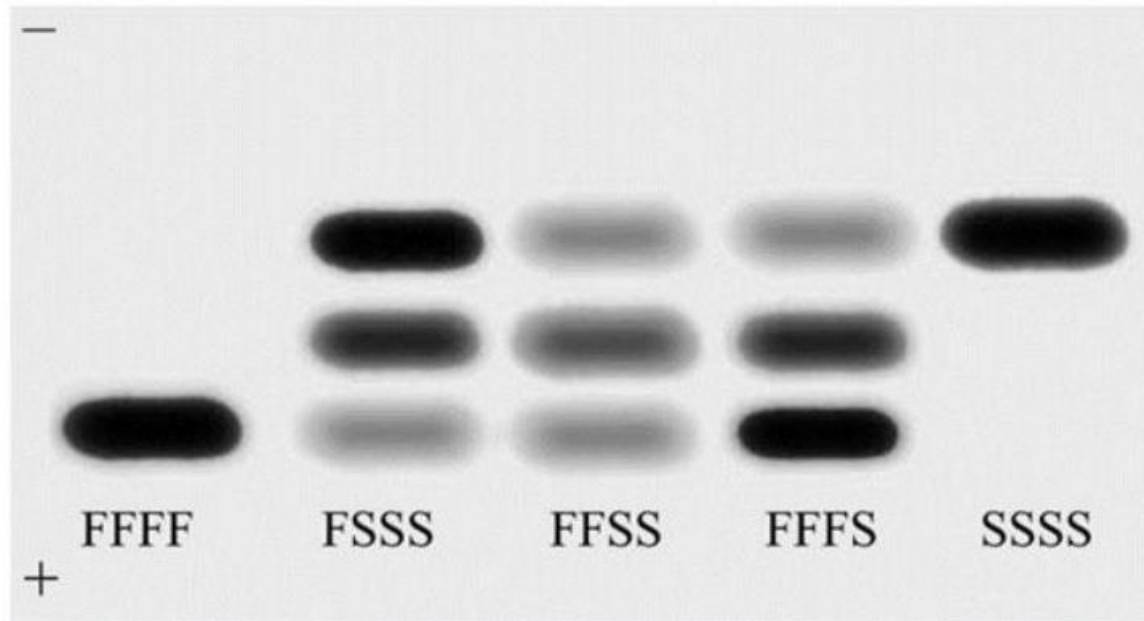
Fejlődési állapottól függő



Biokémiai markerek

Izoenzimek: Az enzimek allél típusait különbözteti meg

Elektroforézis vagy speciális festés segítségével tehetők láthatóvá



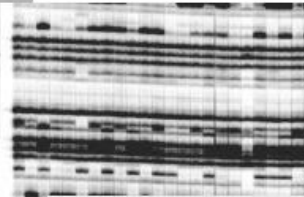
Marker kapcsoltsági térképek

➤ Molekuláris marker technikák

➤ Hibridizáción alapuló RFLP



➤ PCR alapú markerek



➤ ismeretlen kromoszómális elhelyezkedésű: RAPD, AFLP

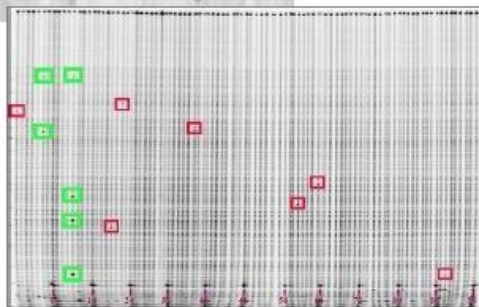
➤ ismert kromoszómális elhelyezkedésű: SSR, STS

➤ funkcionális markerek: EST, SNP, Tilling

➤ HTP marker technikák (DArT)

➤ Szekvencia alapú

Új generációs szekvenálás (Illumina platform)



Marker kapcsoltsági térképek

➤ Molekuláris marker technikák

ismeretlen kromoszómális elhelyezkedésű:

- **RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA),**
Nagyfokú polimorfizmus
Reprodukálhatósága függ a kísérleti körülményektől
A termék szekvenálása után specifikus primer tervezhető (SCAR) Kodominánsá tehető
- **CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)**
A random amplifikáció során kapott monomorf mintázat (azonos méret, de különböző szekvencia) restriktions hasítással polimorffá tehető. Kodomináns
- **AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)**
A genomi DNS restriktions emésztésén és a fragmentumok szelektív PCR amplifikációján alapul. Sok fragmentumot eredményez, domináns markereket eredményez, lokusz-specifikus markerek fejlesztése nehéz.



Marker kapcsoltsági térképek

Molekuláris marker technikák

➤ **ismert kromoszómális elhelyezkedésű:**

➤ **SSR (Simple Sequence Repeat)**

Fajtól függően a genom 10-90% monoton ismétlődő nukleotid motívumokat tartalmaz (AC, AG, CG, TA, AG/TC, AC/TG)

A határszekvenciákra tervezett primerekkel hossz polimorfizmus mutatható ki.

Jól használható genotipizálásra, ujjlenyomat meghatározásra.

➤ **STS (Sequence-Tagged-Site)**

Egyedi szekvenciájú rövid DNS szakasz

Kromoszómális elhelyezkedése ismert

Igen gyors és megbízható eszközzé vált a genetikai vizsgálatokban, mely térképezésre és markerszerlekcióna egyaránt használható



Genetikai térképezés módszere I.

- Mendel I: uniformitás, két gén
 - P: $YY RR \times yy rr$
 - F1: 100% $Yy Rr$
- Mendel III, független kombinálódás →, visszakeresztezés hom. rec. szülővel (tesztelő keresztezés), domináns-recesszív öröklődés
 - F1: $Yy Rr \times P2: yy rr$

6.4. táblázat. Az $Y/y; R/r \times y/y; r/r$ tesztelő keresztezésből származó utódok geno- és fenotípusa. Az Y/y és az R/r allélok különböző kromoszómák részei.

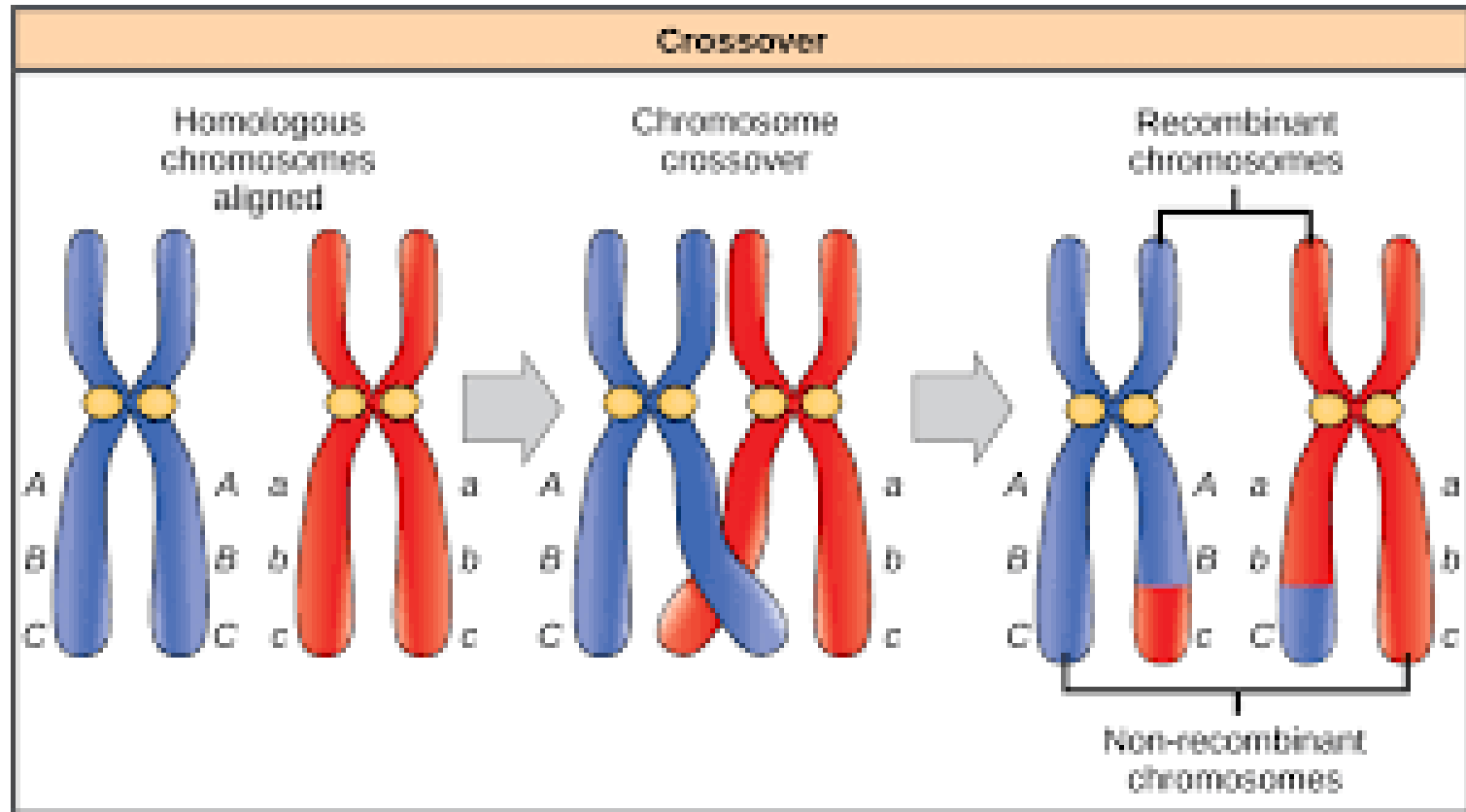
A női ivarsejtek genotípusa	A hímivarsejtek genotípusa $y; r$	Az utódok típusa	Az utód típusok aránya
$Y; R$	$Yy; Rr$ ○	szülői	1
$Y; r$	$Yy; rr$ □	rekombináns	1
$y; R$	$yy; Rr$ ●	rekombináns	1
$y; r$	$yy; rr$ ■	szülői	1

A fenotípusok: ○ = sárga és gömbölyű; □ = sárga és szögletes; ● = zöld és gömbölyű; ■ = zöld és szögletes.

http://web.med.u-szeged.hu/mdbio/hun/anyagok/2012-2013/1.felev/smge/8/Mendeli_genetika,kapcsoltsag..pdf



Crossing over



Genetikai térképezés módszere II.

Kapcsoltság

- F1: Aa Bb × P2: aa bb
- Kapcsoltság esetén nem független a kombinálódás
- Eltérés az 1:1:1:1 aránytól
- 0,01 (vagy 1%) rekombinációs egyenlő 1 térképegységgel (centiMorgan, cM) ~1Mb
- Itt 10%, 10 cM

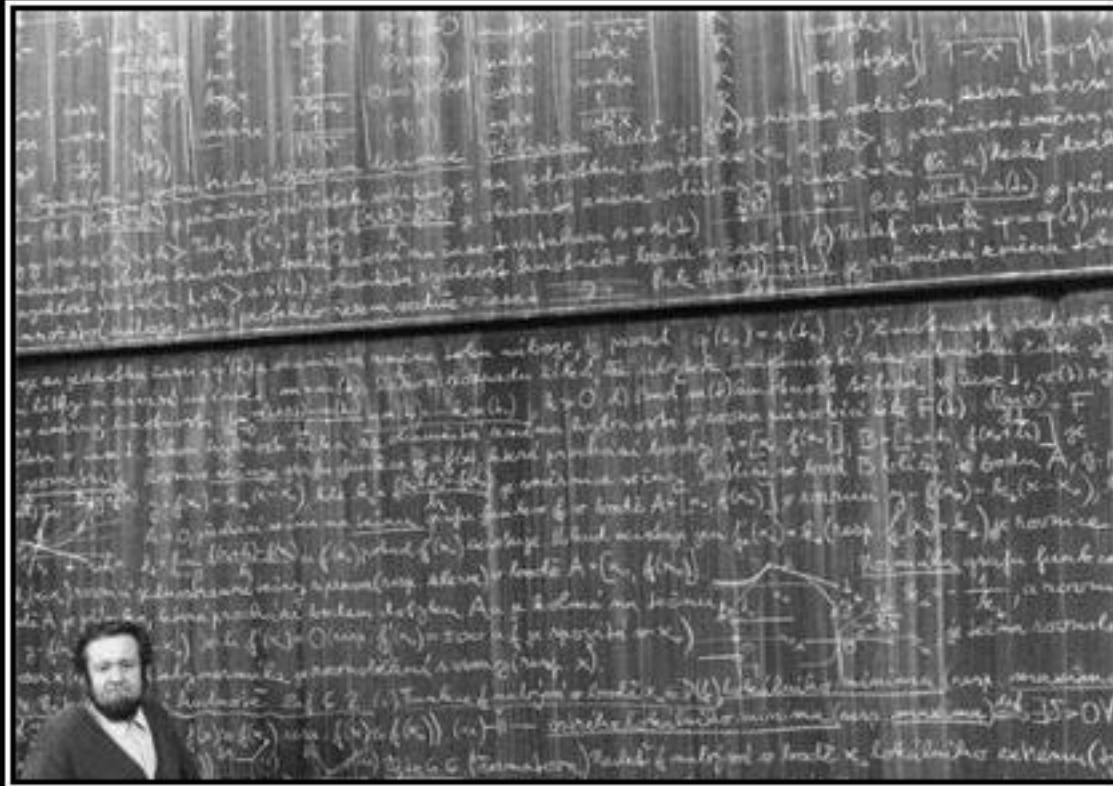
6.5. táblázat. Az $A/a; B/b \times a/a; b/b$ tesztelő keresztezésből származó utódok geno- és fenotípusa. Az A/a és az B/b allélok ugyanannak a kromoszómák a részei, kapcsoltnan öröklődnek.

A női ivarsejtek genotípusa	A hímvarsejtek genotípusa $a b$	Az utódok típusa	Az utód típusok aránya ¹
$A B$	$A B/a b$ ☀	szülői	45
$A b$	$A b/a b$ ☼	rekombináns	5
$a B$	$a B/a b$ ☀	rekombináns	5
$a b$	$a b/a b$ ☼	szülői	45

A fenotípusok: ☀ = sötét, karéjos szíromlevelek; ☼ = fehér, csipkés szíromlevelek; ☀ = fekete, csipkés szíromlevelek; ☼ = fehér, karéjos szíromlevelek.

¹ = egy példa.





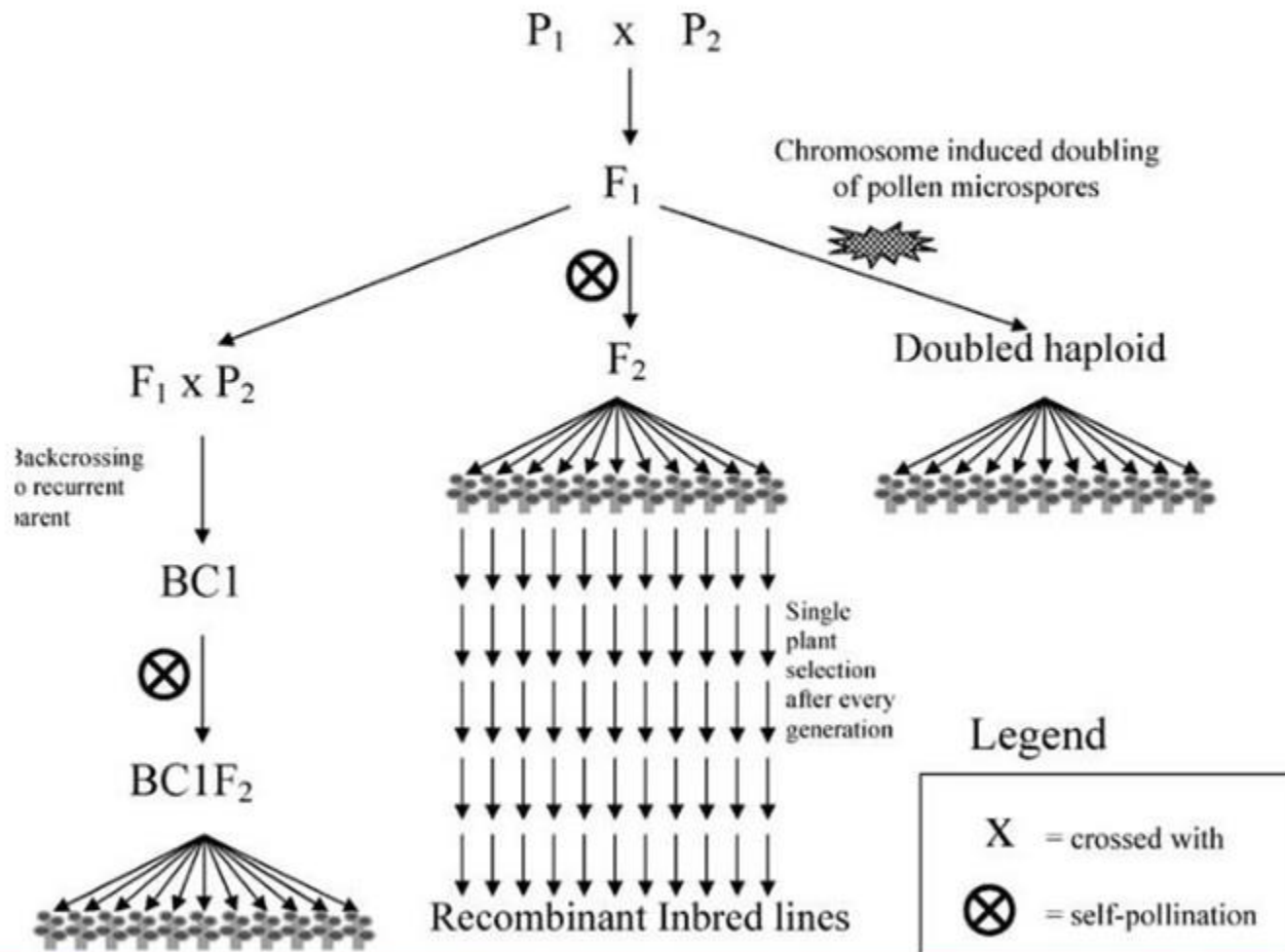
GIRLFRIEND

still working on the equation

VERY DEMOTIVATIONAL .com

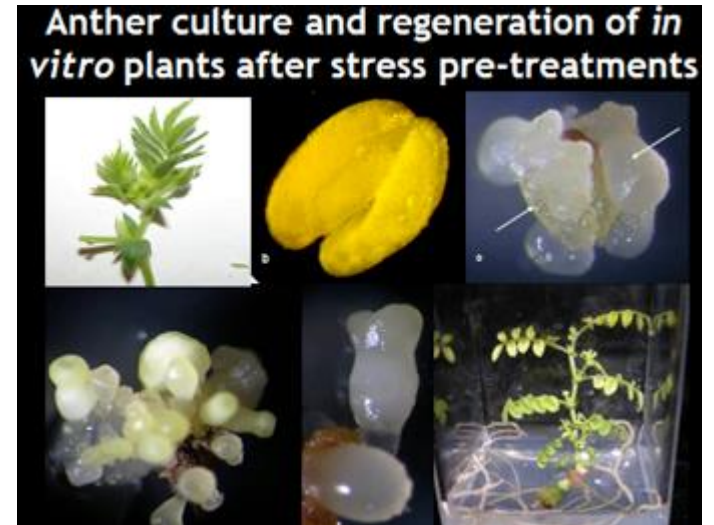


Öntermékenyülő növények térképezési populációinak főbb típusai



Dihaploid technika

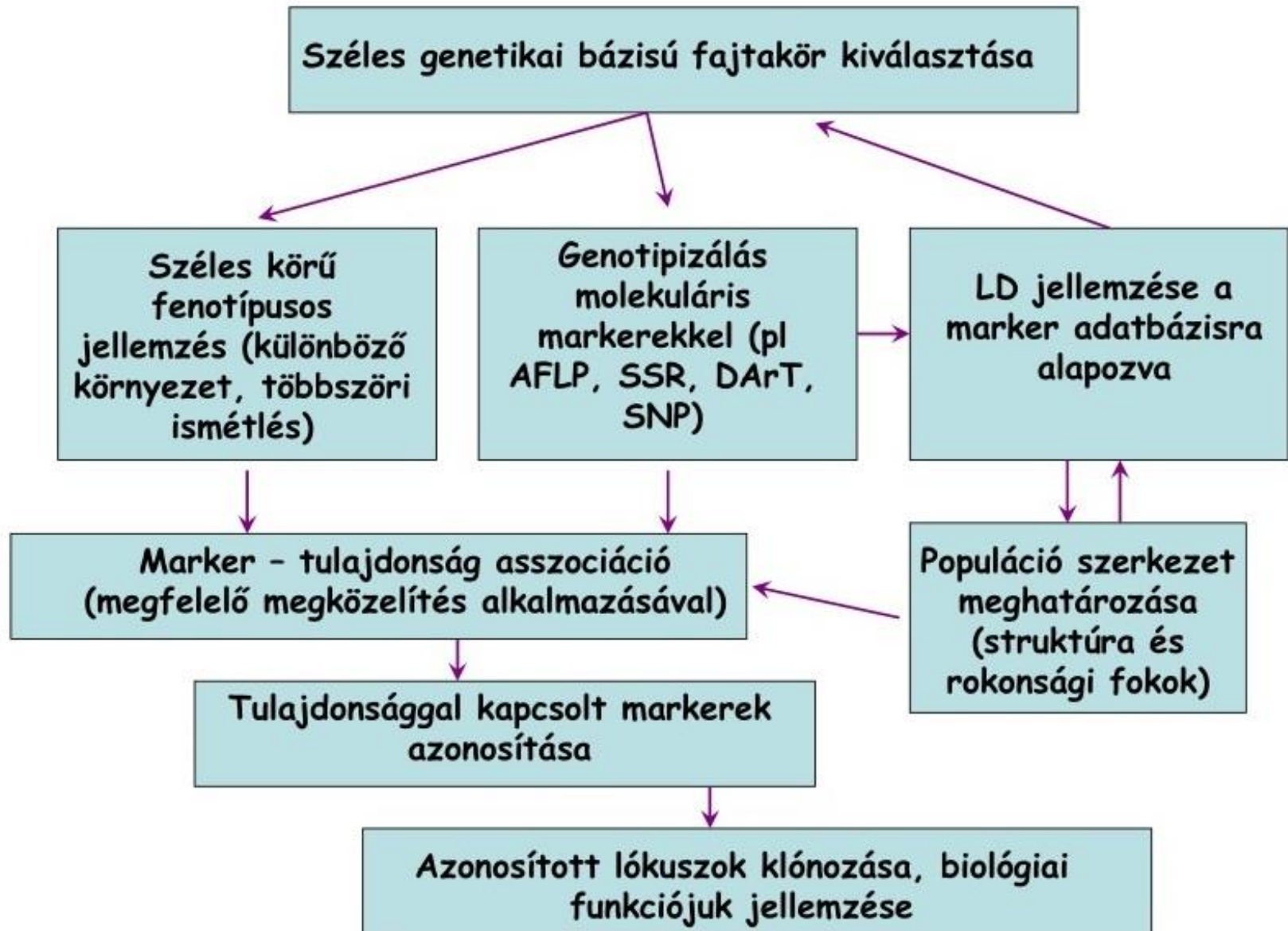
- Pollen mikrospóraszövettenyésztés, növényregeneráció
- Spontán/indukált (pl. kolhicin) diploidizáció - stabilizáció
- Tiszta törzs gyors létrehozása
- <http://knowpulse2.usask.ca/portal/project/Doubled-haploid-and-rapid-generation-turnover-grafting-interspecific-hybridization-embryogenesis-and>



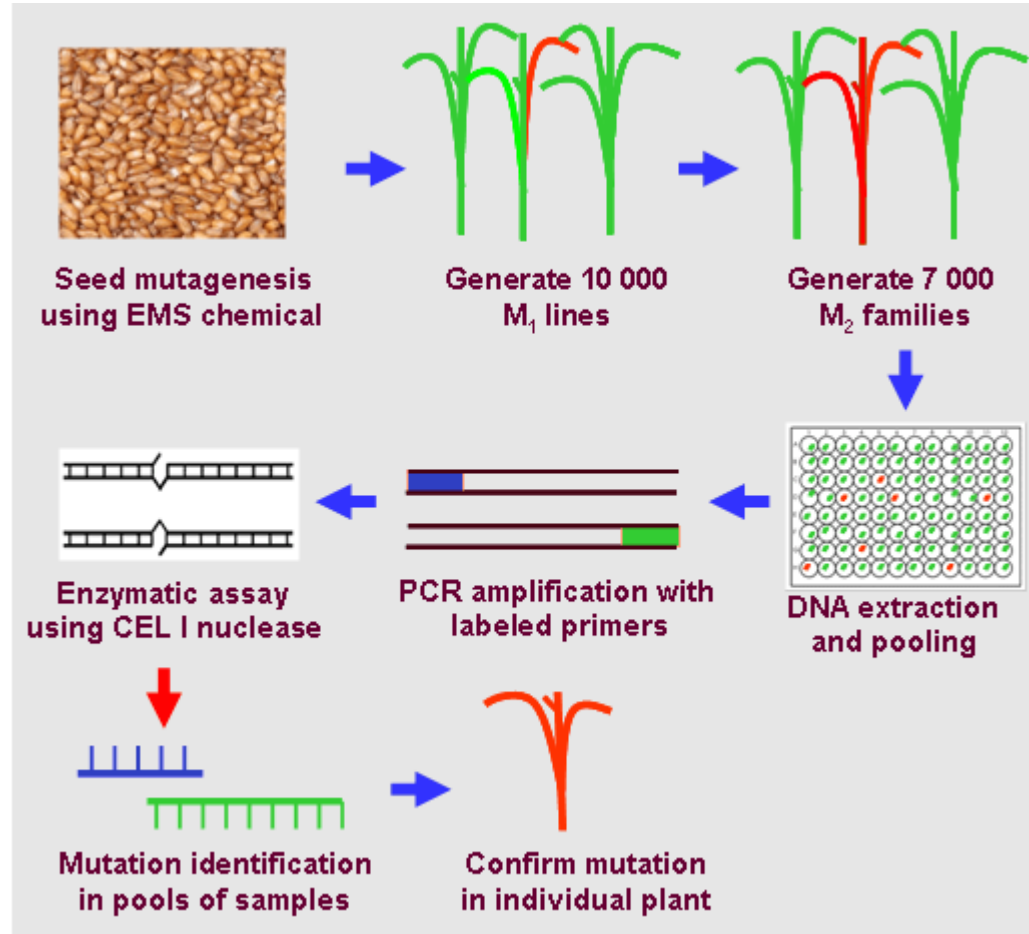
Széles genetikai bázisú fajtakör – asszociációs genetika

- Hagyományos két-szülős térképező populációk hátrányai:
 - Előállításuk idő és munka igényes
 - Lókuszonként csak két allél hatásának vizsgálatára van mód
 - A két szülő közti hasonlóság korlátozza az egyes gének azonosítási lehetőségeit
 - Adott populációban azonosított QTL csúcshoz szorosan kapcsolt marker nem polimorf a nemesítési anyagban
 - Gén (allél) kölcsönhatások vizsgálata limitált





Mesterséges mutációk populációk – TILLING

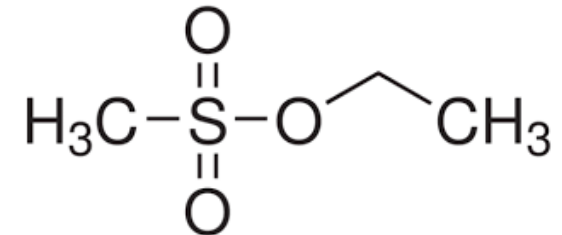


<http://www.botany.unibe.ch/deve/research/projects/tefbiotech/index.htm>



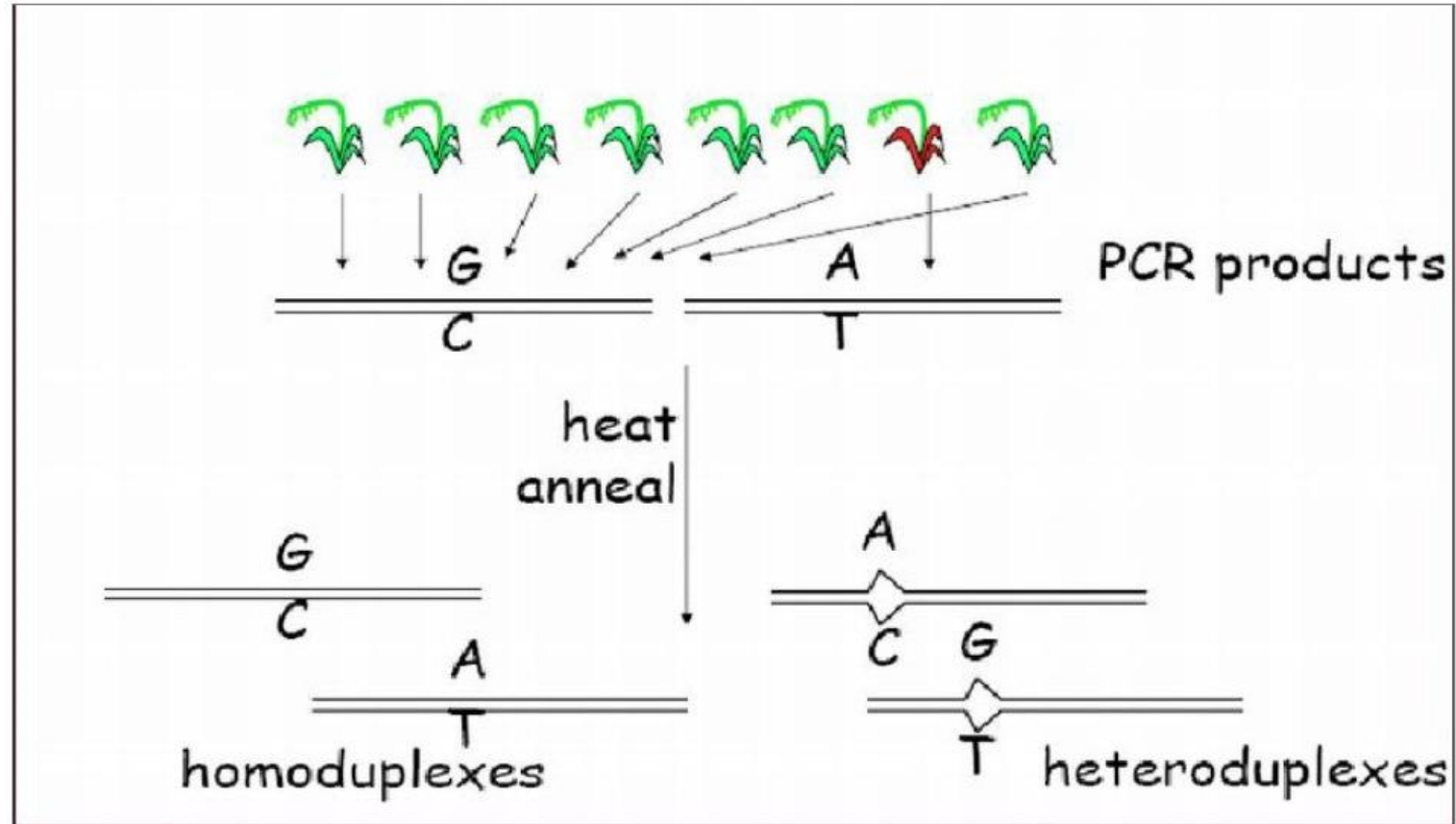
Gén azonosítás – mesterséges mutációs populációk

- TILLING - Targeting Induced Local Lesions in Genomes
- EcoTILLING – normál környezeti mutációk
- Etil-metánszulfonát (EMS) mutagenézis
 - G-re etilcsoport
 - Replikáció során az O⁶-etilguaninnal szemben gyakran timin
- Mutáció azonosítása – mismatch buborék hasítása (pl. T7, Cel I endonukleáz)



TILLING – a módszer

Heteroduplex formációk



TILLING – a módszer

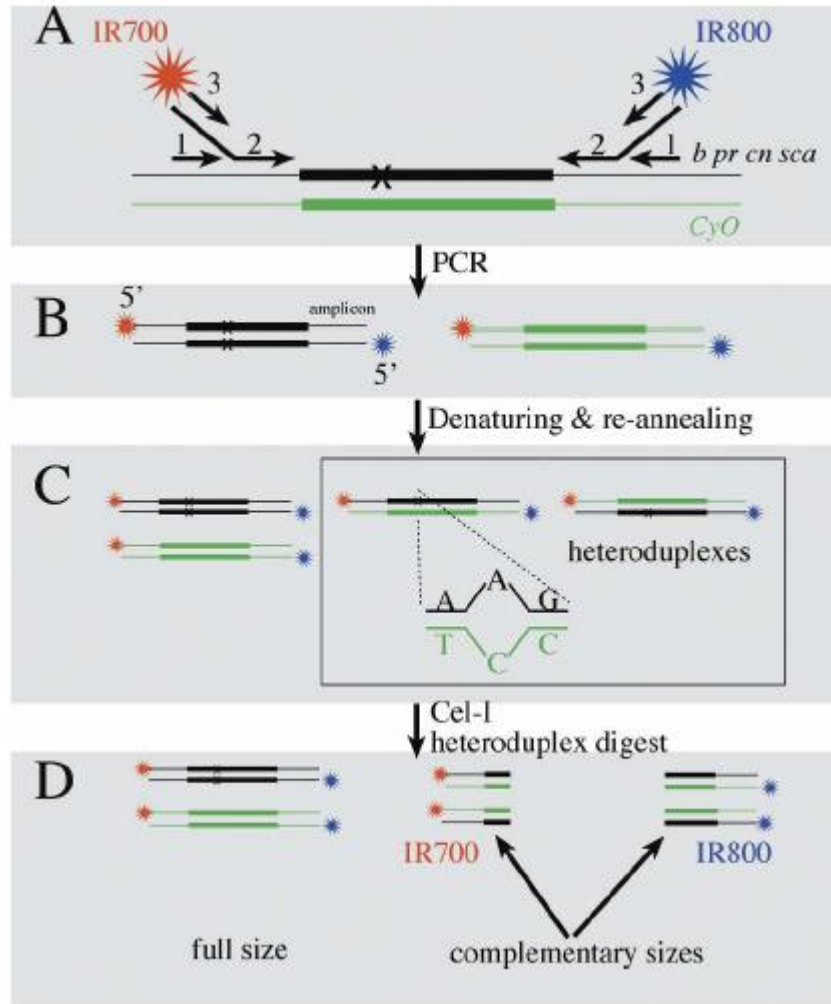


Figure 1. Cel-I-based Tilling strategy. We prepared a genomic DNA library from the mutagenized *b pr cn sca/CyO*, *hb-lacZ* fly lines and performed a three-step (1,2,3) nested PCR reaction (A) for a particular gene of interest. The third PCR reactions included the IRDye700 (red) and IRDye800 (blue) fluorophores bound to the forward and reverse primers, thereby differentially labeling the two ends of the amplicons (B). Then we denatured and reannealed the fragments to generate balancer/mutant heteroduplexes (C) that were digested by Cel-I (D). When a SNP is present, cleavage of the heteroduplexes generates two fragments labeled by IRDye700 and IRDye800, respectively, which can be detected upon denaturing polyacrylamide gel electrophoresis in a LI-COR setup. A typical LI-COR signal shows two fragments with complementary sizes that must sum up the original amplicon size. Subsequently, we sequenced the PCR products to confirm the molecular lesions (see Methods).

- Winkler és mtsai.
Genome Research,
2005



TILLING – a módszer

LI-COR 4300 DNA Analyzer

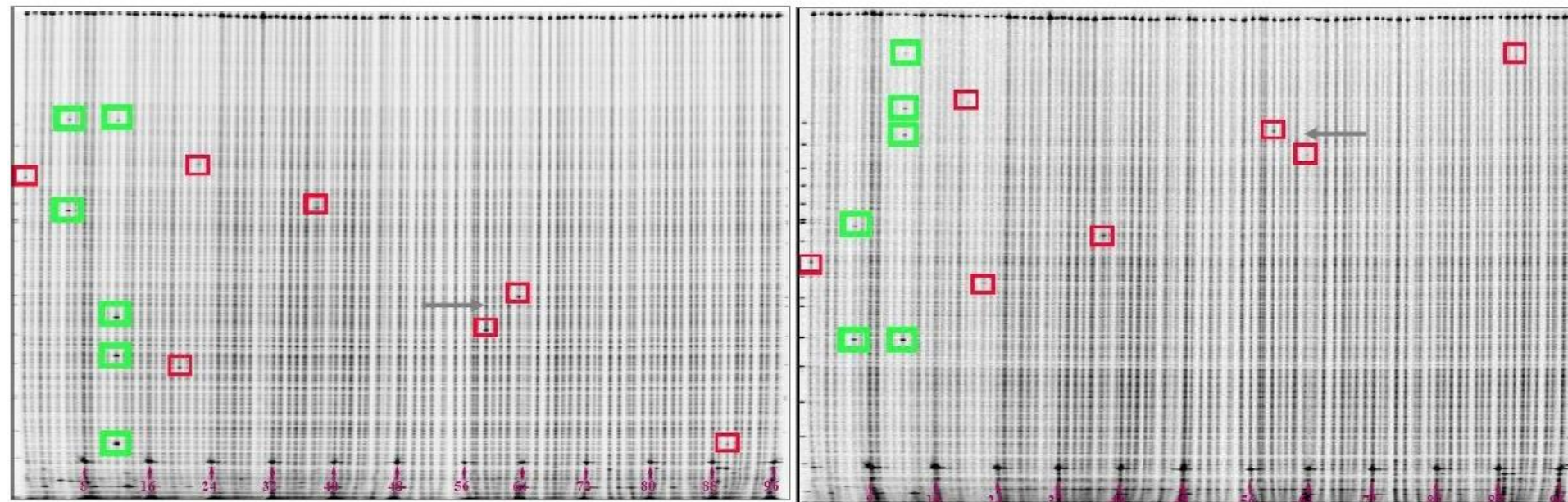


Agricultural Institute

Centre for Agricultural Research
Hungarian Academy of Sciences

TILLING

Elválasztás



IR 700

IR 800



Agricultural Institute

Centre for Agricultural Research
Hungarian Academy of Sciences

mlo-based powdery mildew resistance in hexaploid bread wheat generated by a non-transgenic TILLING approach

Johanna Acevedo-Garcia¹, David Spencer¹, Hannah Thieron¹, Anja Reinstädler¹, Kim Hammond-Kosack², Andrew L. Phillips² and Ralph Panstruga^{1*}

¹Unit of Plant Molecular Cell Biology, Institute for Biology I, RWTH Aachen University, Aachen, Germany

²Department of Plant Biology and Crop Science, Rothamsted Research, West Common, Harpenden, Hertfordshire, AL5 2JQ, UK

Received 11 June 2016;

revised 12 August 2016;

accepted 24 August 2016.

*Correspondence (Tel +49 241 8026655;

fax +49 241 8022637; email:

panstruga@bio1.rwth-aachen.de)

Keywords: Targeting Induced Local Lesions in Genomes, powdery mildew, *Mlo*, hexaploid bread wheat, *Blumeria graminis*, plant disease resistance.

Summary

Wheat is one of the most widely grown cereal crops in the world and is an important food grain source for humans. However, wheat yields can be reduced by many abiotic and biotic stress factors, including powdery mildew disease caused by *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*).

Generating resistant varieties is thus a major effort in plant breeding. Here, we took advantage of the non-transgenic Targeting Induced Lesions IN Genomes (TILLING) technology to select partial loss-of-function alleles of *TaMlo*, the orthologue of the barley *Mlo* (*Mildew resistance locus o*) gene. Natural and induced loss-of-function alleles (*mlo*) of barley *Mlo* are known to confer durable broad-spectrum powdery mildew resistance, typically at the expense of pleiotropic phenotypes such as premature leaf senescence. We identified 16 missense mutations in the three wheat *TaMlo* homoeologues, *TaMlo-A1*, *TaMlo-B1* and *TaMlo-D1* that each lead to single amino acid exchanges. Using transient gene expression assays in barley single cells, we functionally analysed the different missense mutants and identified the most promising candidates affecting powdery mildew susceptibility. By stacking of selected mutant alleles we generated four independent lines with non-conservative mutations in each of the three *TaMlo* homoeologues. Homozygous triple mutant lines and surprisingly also some of the homozygous double mutant lines showed enhanced, yet incomplete, *Bgt* resistance without the occurrence of discernible pleiotropic phenotypes. These lines thus represent an important step towards the production of commercial non-transgenic, powdery mildew-resistant bread wheat varieties.



Gén azonosítás főbb módszerei I.

- Genetikai térképezés
 - Két szülői térképező populációk
 - Széles genetikai bázist képviselő fajtakör
- Random mutagenézis
 - TILLING
 - ECOTILLING

Eddig hagyományos módszerek↑

- Teljes genom szekvenálás
- Génexpressziós mintázatok elemzése
 - cDNS-könyvtár készítése
 - Microarray
 - Transzkriptom szekvenálás



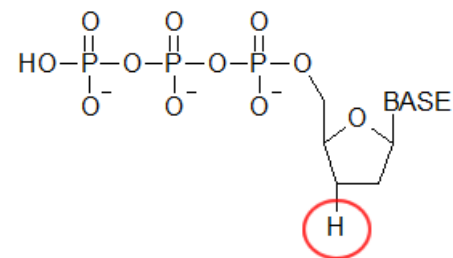
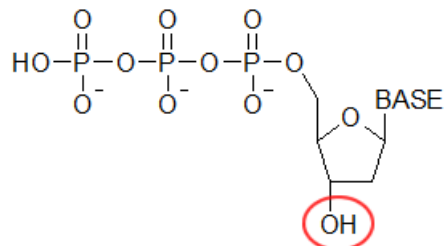
Genom projektek

- Arabidopsis (Nature, 2000)
- Rizs (Nature, 2005)
- *Populus trichocarpa* (Tuskan és mtsai. Science 2006)
- Burgonya (Phureja fajtacsoport)
 - Nature, 2011
- Árpa genom (Morex fajta)
 - Mayer és mtsai. Nature 2012
- Búza genom (Chinese spring)
 - Brenchley és mtsai. Nature 2012
 - Annotálva: Appels és mtsai. Science 2018
- Új generációs szekvenálási módszerek
 - Jelenleg az Illumina cég ~1000 \$-ért szekvenál egy haploid humán genomot (3,5 Gb)



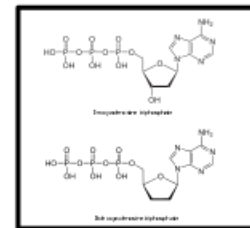
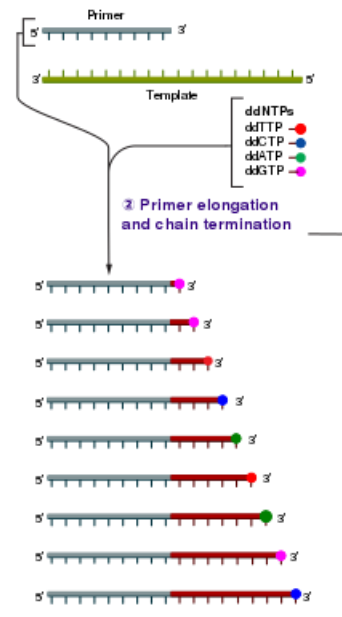
Sanger-szekvenálás (1977)

- Előtte ált. vektorba klónozás szükséges
- Kb. az 50.-től az 1000. nukleotidig olvasható
- Szekvencia a reakció lezajlása után
- Új primer tervezés, chromosome walking
- Vagy tördelés, klónozás „shotgun sequencing”
- Genom-szekvenálásokra 2005 előtt
- Új módszerekhez hasonlítva nagyon lassú

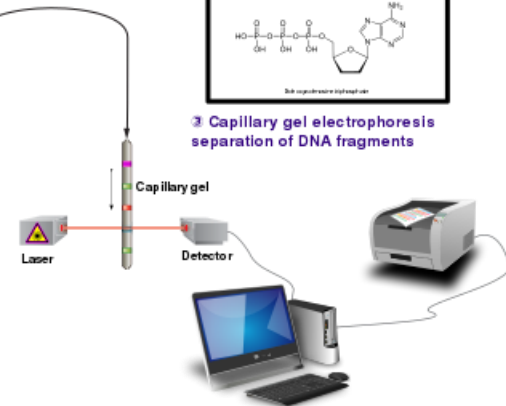


1 Reaction mixture

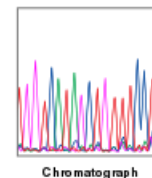
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



2 Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

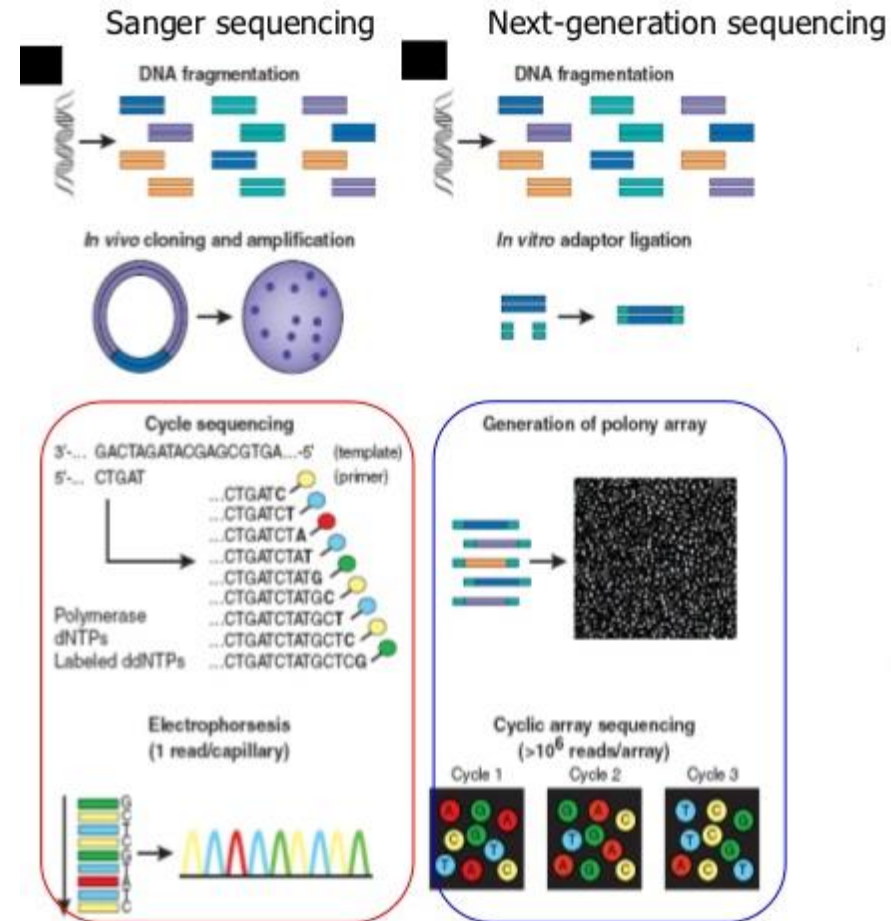


3 Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



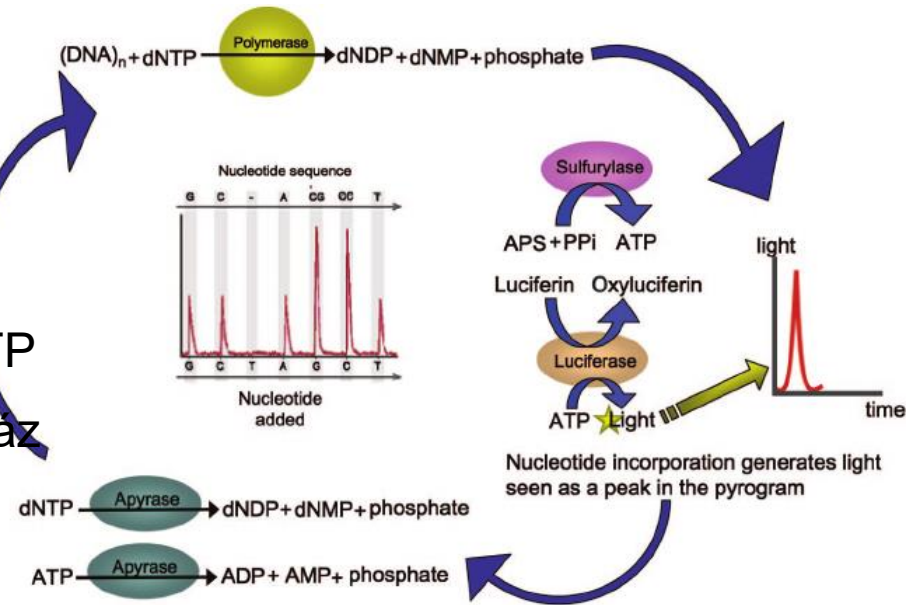
Új generációs DNS-szekvenálások

- Párhuzamosan sok, akár millió minta szekvenálása (HTP: high-throughput vagy massively paralel sequencing)
- Vektorba klónozás nincs, homogén templát megoldása: fragmentálás, emulziós PCR
- Szekvencia valós időben (reakció közben)



Új generációs DNS-szekvenálások

- Piroszekvenálás (automatizálva: 2005, 454 Lifesciences)
 - Emulziós PCR, a cseppek bejuttatása szál-optikás lemez nanomélyedéseibe
 - fragmentálás, adaptor ligálása, primer csatlakozás, egyszerre egyféle dNTP adása (dATP helyett dATP α S – nem luciferáz szubsztrát), ha beépül pirofoszfát (PPi) hasad le, ebből és az adenozin-5 foszfoszulfátból (APS) az ATP szulfuriláz ATP-t gyárt, ha van ATP a luciferáz fényfelvillanással reagál, maradék ATP és dNTP elbontása apiráz enzimmal, ciklust ismételni
- Illumina/Solexa szekvenálás
 - szintézis közben, reverzibilis terminátorok
- SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection)
 - Ligálás alapján



Új generációs DNS-szekvenálási módszerek alkalmazásai, korlátai

- Fragmentálás, tördelés, ismétlések→
- Búzánál vagy más poliploid genomnál gyakran kromoszóma-szétválogatás szükséges
 - Doležel és mtsai. Biotechnology Advances 2014
- Más növénynél e nélkül is működik, teljes genom szekvenálás elérhető átlag labor számára is
- Elérhető még
 - Transzkriptom szekvenálás (néhány 100 e Ft)
 - Microarray (néhány 10 e Ft)

Móricz Zsigmond: A török és a tehenek

Volt egy török, Mehemed, sose látott tehenet. Nem is tudta Mehemed, milyenek a tehenek.

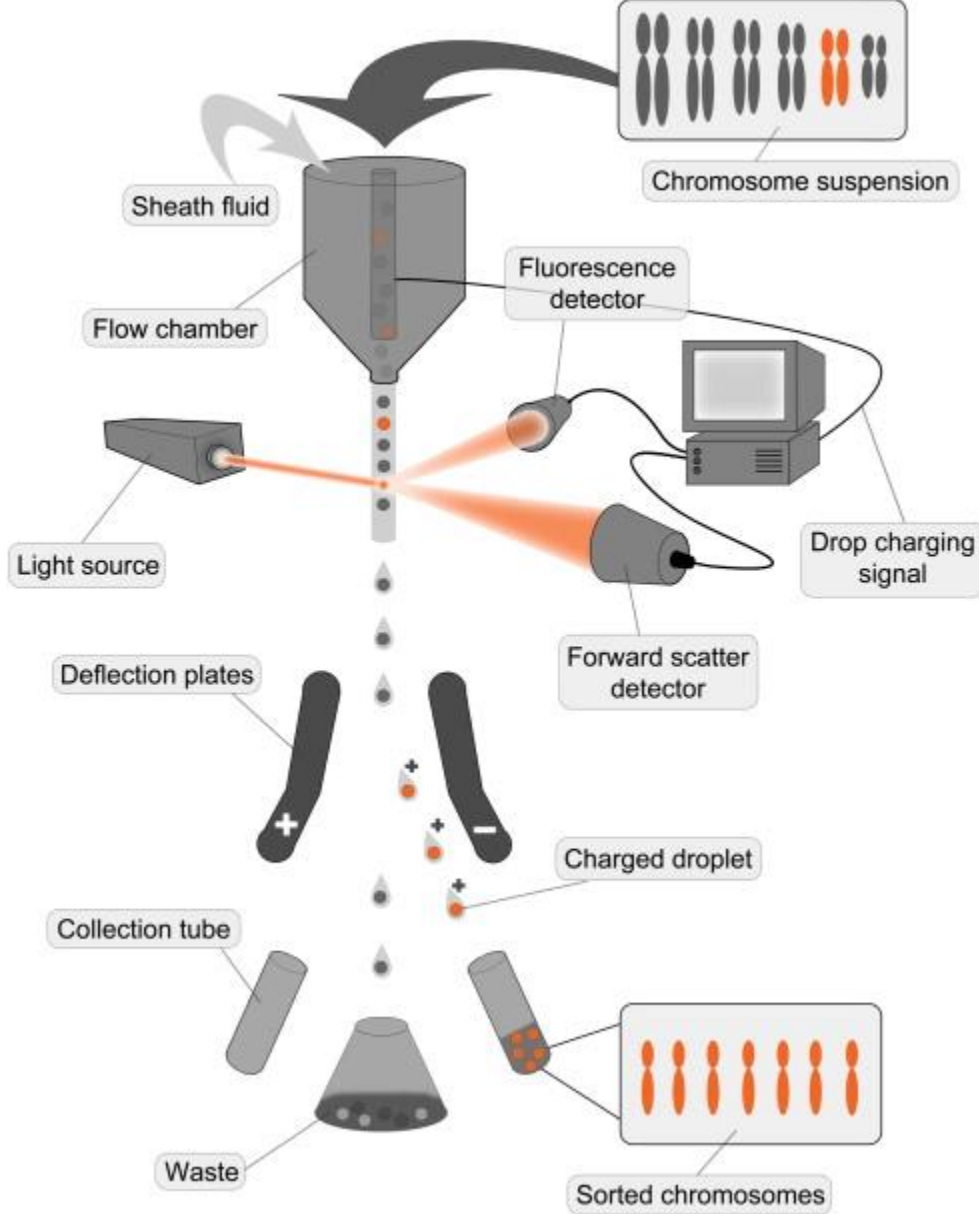
Egyszer aztán Mehemed, lát egy csomó tehenet. Én vagyok a Mehemed! Mi vagyunk a tehenek!

Csudálkozik Mehemed, ilyenek a tehenek? Számlálgatja Mehemed, hány félek a tehenek.

Meg is számol Mehemed három féle tehenet: Fehéret, feketét, tarkát, meg ne fogd a tehén farkát!

Nem tudta ezt Mehemed, s felrúgták a tehenek!



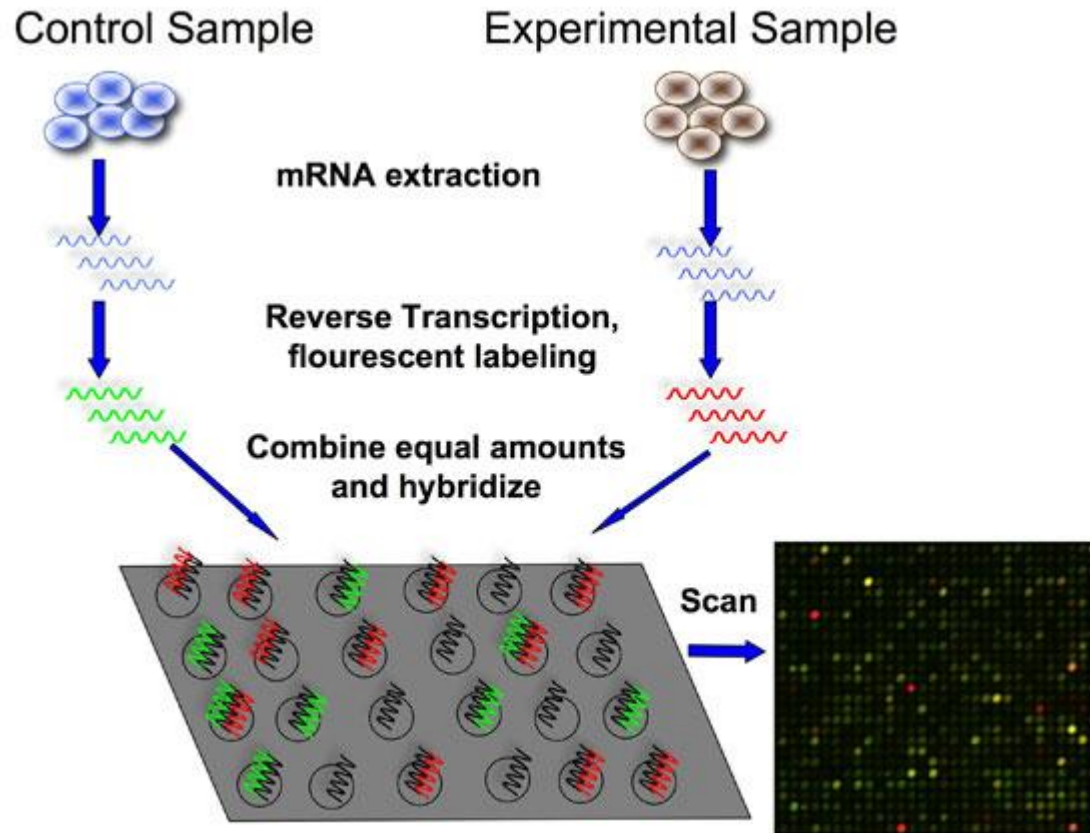


Doležel és mtsai. *Biotechnology Advances* 2014

Fig. 2. The mechanics of flow-sorting. Chromosomes held in liquid suspension are stained by a fluorochrome and passed into a flow chamber containing sheath fluid. The geometry of the chamber forces the chromosome suspension into a narrow stream in which the chromosomes become aligned in a single file, and so are able to interact individually with an orthogonally directed laser beam(s). Pulses of scattered light and emitted fluorescence are detected and converted to electric pulses. If the chromosome of interest differs in fluorescence intensity from other chromosomes, it is identified and sorted. The sorting is achieved by breaking the stream into droplets and by electrically charging droplets carrying chromosomes of interest. The droplets are deflected during passage through electrostatic field between deflection plates and collected in suitable containers.

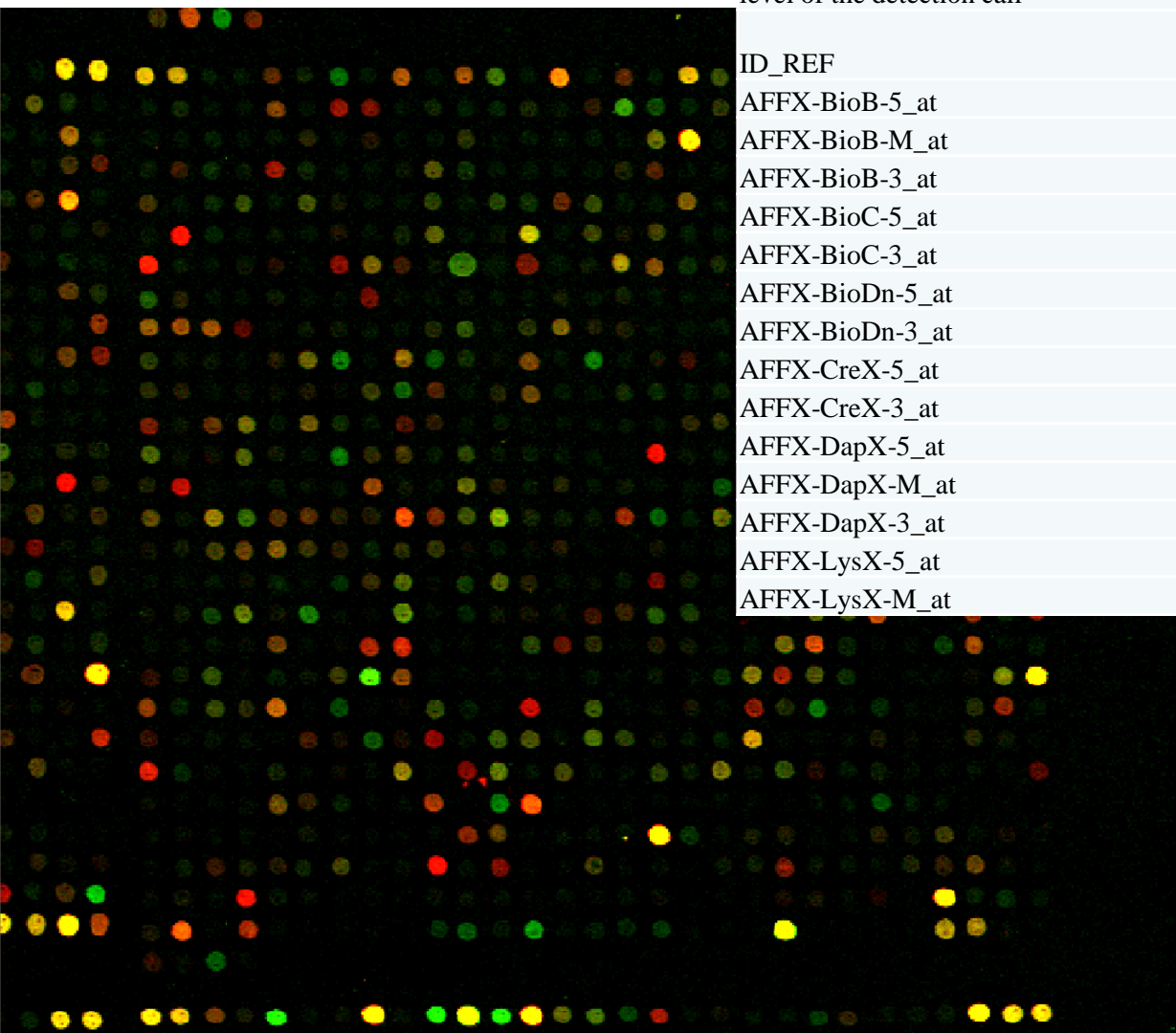
Microarray I.

Kontrol próbák:
PCR-el
amplifikálják
cDNS-könyvtár
alapján



Microarray II.

#ID_REF = Affymetrix probe set ID
 #VALUE = GCOS-calculated signal intensity
 #ABS_CALL = the call in an absolute analysis that indicates if the transcript was present (P), absent (A), marginal (M), or no call (NC)
 #DETECTION P-VALUE = 'detection p-value', p-value that indicates the significance level of the detection call



ID_REF	VALUE	ABS_CALL	DETECTION P-VALUE
AFFX-BioB-5_at	563	P	0,00039
AFFX-BioB-M_at	690	P	0,000081
AFFX-BioB-3_at	515,4	P	0,00011
AFFX-BioC-5_at	1872,1	P	0,00006
AFFX-BioC-3_at	2116,2	P	0,000052
AFFX-BioDn-5_at	3951,1	P	0,000052
AFFX-BioDn-3_at	9589,7	P	0,000052
AFFX-CreX-5_at	24038,8	P	0,000052
AFFX-CreX-3_at	33964,2	P	0,000044
AFFX-DapX-5_at	863,1	P	0,000044
AFFX-DapX-M_at	1811,3	P	0,000169
AFFX-DapX-3_at	2316,1	P	0,000081
AFFX-LysX-5_at	155,1	P	0,000127
AFFX-LysX-M_at	259,4	M	0,050229

Analysis of global gene expression profile of rice in response to methylglyoxal indicates its possible role as a stress signal molecule

Charanpreet Kaur¹, Hemant R. Kushwaha², Ananda Mustafiz^{1†}, Ashwani Pareek³, Sudhir K. Sopory¹ and Sneh L. Singla-Pareek^{1*}

¹ Plant Molecular Biology Group, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, New Delhi, India, ² Synthetic Biology and Biofuels Group, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, New Delhi, India, ³ Stress Physiology and Molecular Biology Laboratory, School of Life Sciences, Jawaharlal Nehru University, New Delhi, India

OPEN ACCESS

Edited by:

Girdhar Kumar Pandey,
University of Delhi, India

Reviewed by:

Jin Chen,
Michigan State University, USA
Giridara Kumar Surabhi,
Regional Plant Resource Centre, India

*Correspondence:

Sneh L. Singla-Pareek,
Plant Molecular Biology Group,
International Centre for Genetic
Engineering and Biotechnology, Aruna
Asaf Ali Marg, New Delhi 110067,
India
sneh@icgeb.res.in

† Present Address:

Ananda Mustafiz,
Faculty of Life Science and
Biotechnology, South Asian University,
New Delhi, India

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 05 June 2015

Accepted: 17 August 2015

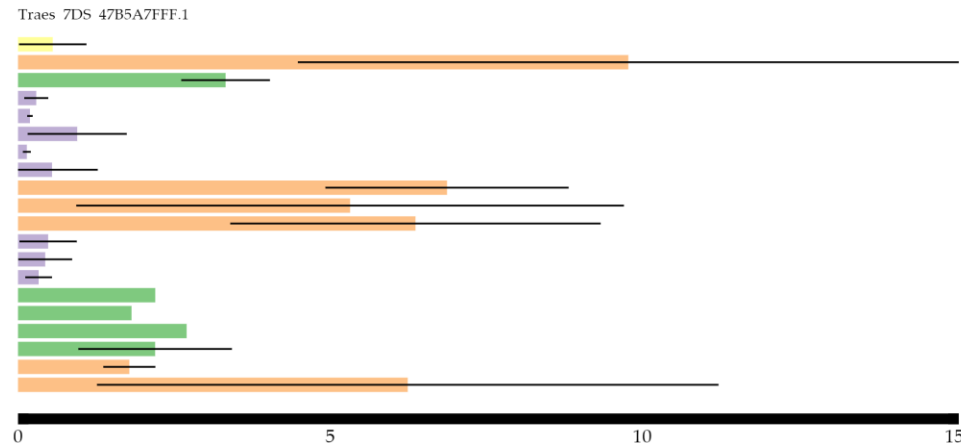
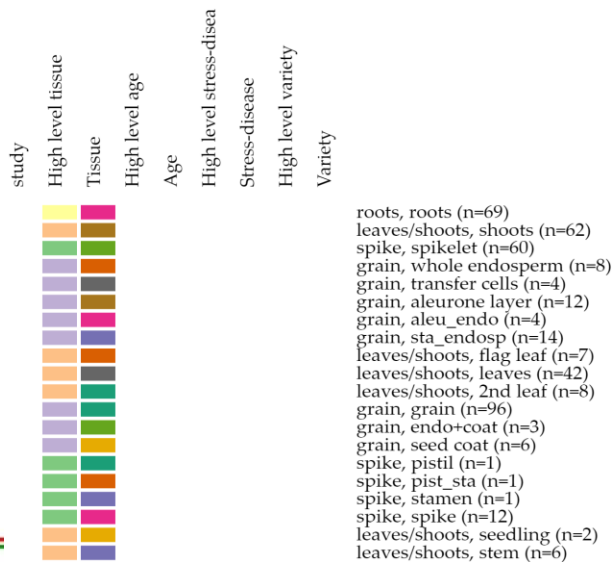
Methylglyoxal (MG) is a toxic metabolite produced primarily as a byproduct of glycolysis. Being a potent glycating agent, it can readily bind macromolecules like DNA, RNA, or proteins, modulating their expression and activity. In plants, despite the known inhibitory effects of MG on growth and development, still limited information is available about the molecular mechanisms and response pathways elicited upon elevation in MG levels. To gain insight into the molecular basis of MG response, we have investigated changes in global gene expression profiles in rice upon exposure to exogenous MG using GeneChip microarrays. Initially, growth of rice seedlings was monitored in response to increasing MG concentrations which could retard plant growth in a dose-dependent manner. Upon exposure to 10 mM concentration of MG, a total of 1685 probe sets were up- or down-regulated by more than 1.5-fold in shoot tissues within 16 h. These were classified into 10 functional categories. The genes involved in signal transduction such as, protein kinases and transcription factors, were significantly over-represented in the perturbed transcriptome, of which several are known to be involved in abiotic and biotic stress response indicating a cross-talk between MG-responsive and stress-responsive signal transduction pathways. Through *in silico* studies, we could predict 7–8 bp long conserved motif as a possible MG-responsive element (MGRE) in the 1 kb upstream region of genes that were more than 10-fold up- or down-regulated in the analysis. Since several perturbations were found in signaling cascades in response to MG, we hereby suggest that it plays an important role in signal transduction probably acting as a stress signal molecule.

- Kaur és mtsai. Frontiers in Plant Science 2015
- Későbbi munkák alapja
- Microarray-nél validálás szükséges (qPCR)



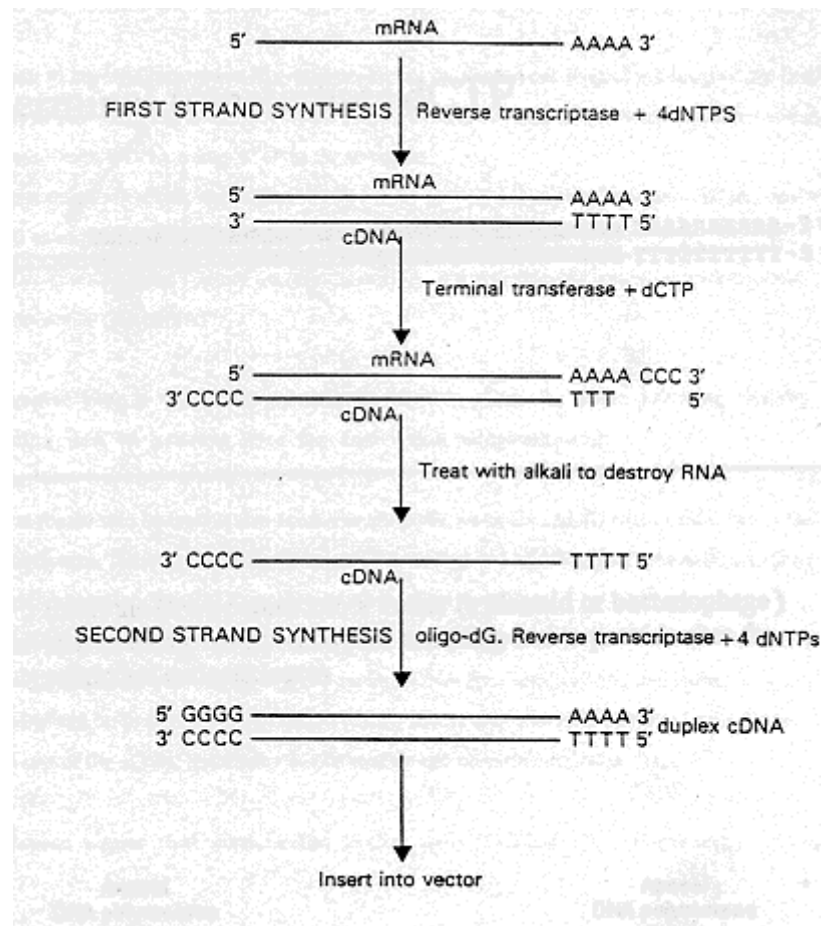
Expressziós adatbázisok

- <https://www.arabidopsis.org/portals/expression/>
- <http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/>
- <http://www.plexdb.org/>
- <http://www.wheat-expression.com/>



cDNS-könyvtár készítése

- mRNS átírása cDNS-é oligodT-vel (reverz transzkriptáz)
- C-k rárakása az egyszálú cDNS 3' végére (terminális dezoxiribonukleozid-transzferáz, TdT)
- Lúgos kezelés vagy RNázH emésztés
- oligodG primer csatlakozása, komplementer DNS-szál szintézise (DNS-polimeráz)
- Vektorba klónozás, E. coli transzformáció



Könyvtár készítése helyett PCR-ezni is lehet a cDNS-en rokon szekvenciára tervezett primerekkel, majd klónozni és szekvenálni a PCR-terméket.



Modell növények – cél

- A modell növényekből kinyert szekvenciák, a megszerzett növényélettani és növényi molekuláris biológiai ismeretek segítik a vizsgált növényen kapott szekvencia-adatok és kísérleti eredmények értelmezését.



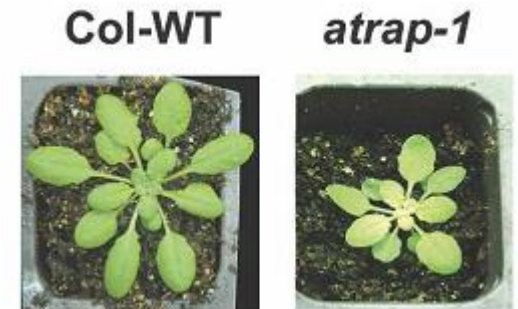
Modell növények

- Modell növények: lúdfű (*Arabidopsis thaliana*)
 - Kis generációs idő: 6-8 hét
 - Diploid
 - Kis genom: ~135 Mb (rizs: 420 Mb, búza: 17 Gb)
 - Genomja már 2000 óta ismert
 - GABI-Kat T-DNS inszerciós mutánsgyűjtemény 2002 óta
 - Fontosabb ökotípusok: Columbia (Col), Landsberg Erecta (LER)
 - Könnyen transzformálható (Floral dip)



Betegség-ellenálló mutáns

- AtRAP, a RAP-domén fehérjék közerváltak, plasztiszfejlődést szabályoznak
- AtRAP KO. mutáns növény: növekedésgátlás, photobleaching, de nagyobb *Pseudomonas* rezisztencia

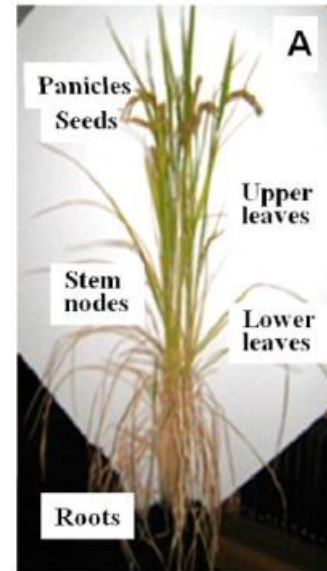


Katiyar-Agarwal és
mtsai, *Genes &
Development* 2007



Egyéb modellek

- Rizs (*Oryza sativa*)
 - A genom 2005 óta ismert
 - Diploid, 420 Mb
 - Jól transzformálható
 - T-DNS inszerciós mutánsgyűjtemény fejlesztés alatt
 - Generációs idő: min. 2 hónap
 - Nehezen nevelhető
- Szálkaperje (*Brachypodium distachyon*)
 - Diploid, 272 Mb genom
 - Generációs idő: 8-12 hét
 - Könnyű nevelni



Szekvencia-összehasonlítás

- BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)
 - Score
 - Identity
 - E-value (legyen min 10^{-4})
- A megfelelő adatbázisban blastolni!
 - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> általános
 - <http://www.uniprot.org/blast/> búzára jobb
 - <https://solgenomics.net/tools/blast/> burgonyára
 - <http://brassicadb.org/brad/> repcére
 - Stb.



BLAST

- DNS szekvencia: 5'-3'
- Fasta formátum (így sok szekvenciát lehet blastolni)→
- Blast keresés eredménye ↓
<https://solgenomics.net/tools/blast/>

>BPPOM1 sortörés!
 CCACC TCCTGATC TCTC GTC TTGTAGTATAGCCAGGATTAACGAAAATCA
 GGTGGTGCCGTACAGTTGTTCGCGCCCTAAGCC TGATGATATGGAGAAAG
 TTCCGTATTACAAGTTCCCTTCATGACTAAGCTCCGTGTTCTGCAGCCT
 GCTCATGAAGCTAATGAGGAGTATATTGCCAAGTACAATCTGGCGATTAG
 TCGAATGAGAGATCTTGATAAGACACAACCTTTAAACCCATTGGTTTTTA
 AGCAACAAGCTAATATACATTGTGCTTATTGTAATGGTGC TTATAGAATT
 GGTGGCAAAGAGTTACAAGTTCATAATTC TTGGCTTTTCTCCCGTTCCA
 TAGATGGTACTTGACTTCCACGAGAGAATCTGGGAAAATTCATTGATG
 ATCCAAC TTTTCGCTTGGCCATTTGGAAATGGGACCATCCAAAGGGTATG
 CGTTTTCC TGCCATGATGATGCTGTGAAGGGACTTCCCTTTTTCGATGTAAC
 AC GTTGACCAAAGTCACC GAAATGGAGCAGTAATCGATCTGGTTTTTTCG
 GCAATGAAGTCAAAACAAC TCAACTCCAGTTGATGAGCAATAATTTAACA
 CTAATGTACCTCAAAATGGTAACTAATGC TCCATGTCC TCGGATGTTCTT
 TGGTGGGCC TTATGATC TCGGGATTAACACTGAAC TCCCGGGAAC TATAG
 AAAACATTTCC TACGGTCC TGCCACATC TGGTCTGGTACAGT GAGAGGT
 TCAAC TTTGCCAATGGTGAATATCAACGGTGAGAATATGGGTCAATTT
 TTACTCAGCTGCTTTGGACCCGGTTTTCTTTGCCATCACAGCAATGTGG
 ATCCGGATGTGGAGCGAATGGAAGCGACAGGAGGGGAAAAGAACAGATATC
 ACACATAAAGATTGGTTGAAC TCCGAGT

>BPPOM2
 GCCACC TCCTGATC TCTC GTC TTGCGAGTAAAGCACTATTAACGAAACTA
 CAGAGGTGCCATACAGTTGTTGCGCTCCTAGGCCCTGATGATATGGAGAAA
 GTTCCGTATTACAAGTTCCCTTCATGACTAAGCTCCGTGTTCTGCAGCC
 TGCTCATGAAGCTAATGAGGAGTATATCCGAAGTACAATTTGGCGGTTA
 GCAAGATGAGAGATCTTGATAAGACACAACCTTTAAACCCATTGGTTTT
 AAGCAACAAGCTAATATACATTGTGCTTATTGTAACGGTGC TTATAGAAT
 TGGTGGCAAAGAGTTACAAGTTCATAATTCATGGCTTTTCTCCCGTTCC
 ATAGATGGTACTTGACTTCTACGAGAGAATCGTGGGAAAAC TATTGAT
 GATCCAAC TTTTCGCTTGGCCATATTGGAATTTGGGACCATCCAAAGGGCAT
 GCGTTTTCTGCCATGATGATGCTGTGAAGGGACTTCCCTTTTCGATGTAA
 CACGTGACCAAAGTCAACGTAATGGGGCAGTTATTGATATTGGTTTTTTTC
 GGCAATGAAGTCGAAAACAAC TCAACTTACAGTTGATGAGCAATAATTTAAAC
 ACTAATGTACCGTCAAATGGTAACTAATGCTCCATGTCC TCGGATGTTCT
 TTGGCGGGCTTTATGATCTCGGGAGTAACGTTGAAC TCCCGGGAAC TATA
 GAAAACATCCCTCACGGTCTGTCCACATTTGGTCTGGTACAGT GAGAGG
 TTCAACTTTGGCCAAATGGTGAATATCAACGGTGAAGTATGGGTCAAT
 TTTACTCAGCTGGTTGGACCTGGTTTTCTTTTGGCCATCACAGCAATGTG
 GATCCGATGTGGACC GAATGGAAGCGACAGGAGGGGAAAAGAACAGATAT
 CACACATAAAGATTGGTTGAAC TCCGAGT

QueryId	SubjectId	id%	Aln	Mm	Gaps	qstart	qend	sstart	send	eval	Score	Description
BPPOM1	PGSC0003DMC400032951	96.43	952	34	0	1	952	253	1204	0.0	1618	PGSC0003DMT400048684 Polyphenol oxidase
BPPOM1	PGSC0003DMC400032952	84.03	952	152	0	1	952	253	1204	0.0	682	PGSC0003DMT400048685 Polyphenol oxidase A, chloroplastic
BPPOM1	PGSC0003DMC400051503	84.03	833	126	7	125	952	371	1201	e-162	571	PGSC0003DMT400076055 Polyphenol oxidase
BPPOM1	PGSC0003DMC400032949	83.70	828	135	0	125	952	254	1081	e-162	571	PGSC0003DMT400048681 Polyphenol oxidase
BPPOM1	PGSC0003DMC400051502	82.04	540	92	5	124	662	376	911	6e-75	281	PGSC0003DMT400076054 Catechol oxidase B, chloroplastic
BPPOM1	PGSC0003DMC400032955	85.71	224	32	0	276	499	120	343	2e-47	190	PGSC0003DMT400048692 Polyphenol oxidase
BPPOM1	PGSC0003DMC400032961	95.58	113	5	0	378	490	444	556	1e-45	184	PGSC0003DMT400048703 Polyphenol oxidase
BPPOM1	PGSC0003DMC400032962	90.21	143	14	0	337	479	30	172	4e-42	172	PGSC0003DMT400048706 Polyphenol oxidase B, chloroplastic
BPPOM1	PGSC0003DMC400032962	91.59	107	9	0	395	501	182	288	1e-32	141	PGSC0003DMT400048706 Polyphenol oxidase B, chloroplastic
BPPOM1	PGSC0003DMC400032960	90.91	88	6	2	188	275	410	495	8e-22	105	PGSC0003DMT400048699 Catechol oxidase B, chloroplastic
BPPOM2	PGSC0003DMC400032953	89.77	88	7	2	188	275	410	495	2e-19	97.6	PGSC0003DMT400048686 Catechol oxidase B, chloroplastic
BPPOM2	PGSC0003DMC400032951	96.85	951	30	0	1	951	254	1204	0.0	1647	PGSC0003DMT400048684 Polyphenol oxidase
BPPOM2	PGSC0003DMC400032952	84.65	951	146	0	1	951	254	1204	0.0	728	PGSC0003DMT400048685 Polyphenol oxidase A, chloroplastic
BPPOM2	PGSC0003DMC400032949	83.82	828	134	0	124	951	254	1081	e-164	579	PGSC0003DMT400048681 Polyphenol oxidase
BPPOM2	PGSC0003DMC400032949	100.00	38	0	0	1	38	128	165	7e-13	75.8	PGSC0003DMT400048681 Polyphenol oxidase
BPPOM2	PGSC0003DMC400051503	84.03	833	126	7	124	951	371	1201	e-162	571	PGSC0003DMT400076055 Polyphenol oxidase
BPPOM2	PGSC0003DMC400051502	83.62	403	66	0	259	661	509	911	4e-73	276	PGSC0003DMT400076054 Catechol oxidase B, chloroplastic
BPPOM2	PGSC0003DMC400032955	86.16	224	31	0	275	498	120	343	7e-50	198	PGSC0003DMT400048692 Polyphenol oxidase
BPPOM2	PGSC0003DMC400032961	96.46	113	4	0	377	489	444	556	4e-48	192	PGSC0003DMT400048703 Polyphenol oxidase
BPPOM2	PGSC0003DMC400032962	91.61	143	12	0	336	478	30	172	7e-47	188	PGSC0003DMT400048706 Polyphenol oxidase B, chloroplastic
BPPOM2	PGSC0003DMC400032962	91.89	111	9	0	390	500	178	288	6e-35	149	PGSC0003DMT400048706 Polyphenol oxidase B, chloroplastic



Szekvencia-összehasonlítás még

- Páros szekvenciaillesztés – needle:
 - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/>
- 30% as. azonosság a teljes szakaszon: vsz. homológ
- 60% fölött vsz. a funkció is azonos
 - Lee és mtsai. Nat Reviews 2007
- Annotáció – PFAM
 - <http://pfam.xfam.org/>
 - GO-term

Homológ – közös ős

- Ortológ – faj szétválás eredménye, hasonló szekvencia és funkció külön fajokban
- Paralóg – génduplikáció eredménye











A gén értelme – gén ontológiai (GO)

- Lehet fehérje vagy nukleinsav
- Kontrollált szótár
 - Reprodukálható (automatizálható) legyen
 - Kereshető legyen
- Három főszótár (GO domain)
 - Biológiai folyamat (biological process)
 - Molekuláris funkció (molecular function)
 - Sejtszerkezet (cellular compartment)













AKR4C9 aldó-keto redukáz a Uniprot adatbázisban

GO - Molecular functionⁱ

- alcohol dehydrogenase (NADP+) activity  Source: TAIR 
- aldó-keto redukáz (NADP) aktivitás  Source: UniProtKB 
- NADP+ binding  Source: UniProtKB 
- steroid dehydrogenase activity  Source: UniProtKB 

Complete GO annotation...

GO - Biological processⁱ

- oxidáció-redukció folyamat  Source: TAIR 
- hideg hatására való válaszreakció  Source: UniProtKB 
- sóstressz hatására való válaszreakció  Source: UniProtKB 
- mérgező anyag hatására való válaszreakció  Source: UniProtKB-KW 
- vízhiány hatására való válaszreakció  Source: UniProtKB 

Complete GO annotation...

GO - Cellular componentⁱ

- chloroplast  Source: TAIR 

Complete GO annotation...

Keywords - Cellular componentⁱ

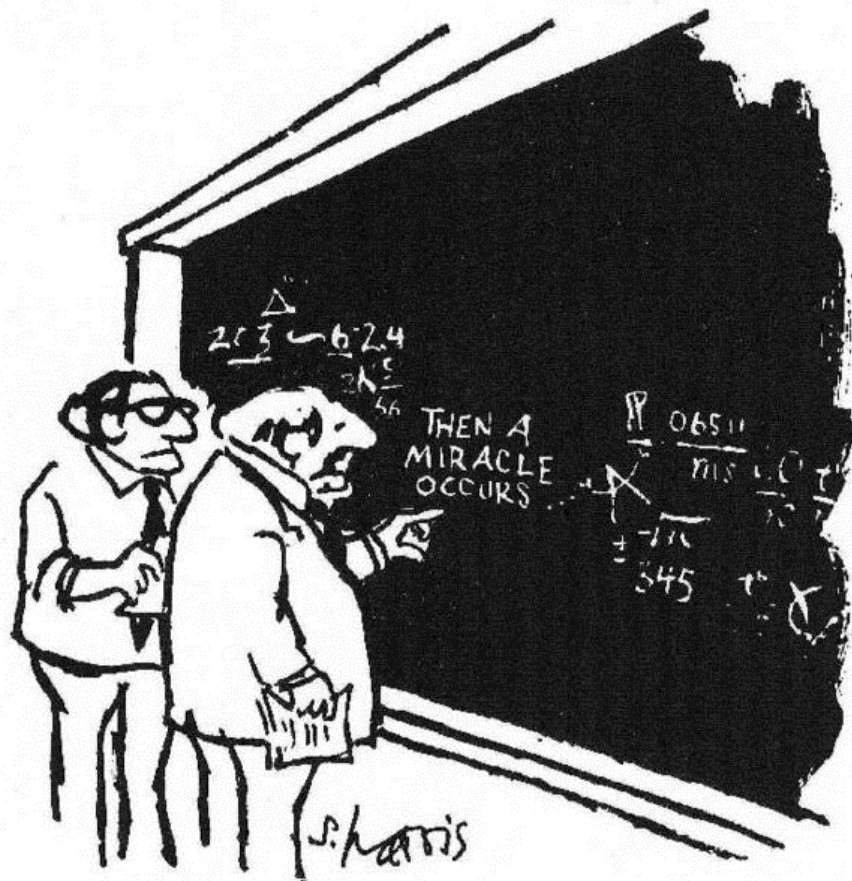
Chloroplast, Plastid



Gén azonosítás főbb módszerei II.

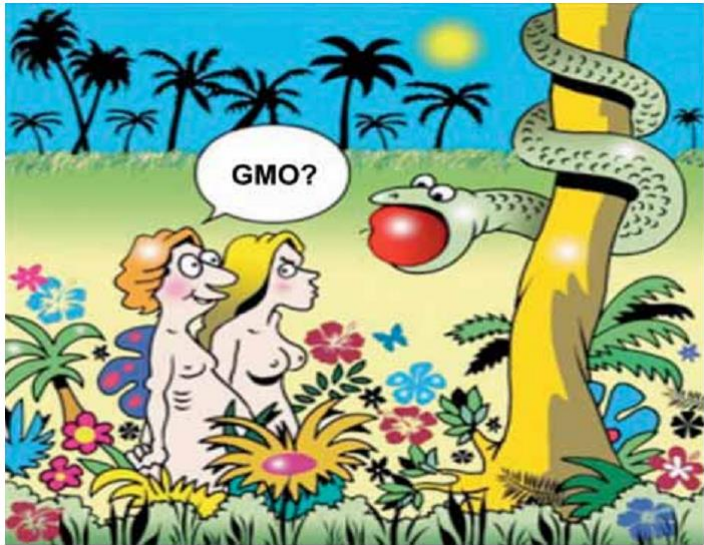
- Modell növények
 - Mutánsgyűjtemény
 - Új generációs DNS-szekvenálás
 - Szekvencia-összehasonlítás, annotáció
- Talált gén funkciójának vizsgálata
 - Túltermeltetés
 - Csendesítés
 - Kiütés
 - Stb.
- Génszabályozás vizsgálata





"I think you should be more explicit here in step two."





Túltermeltetés: transzgenikus növények

- Génkonstrukció
 - Promóter::gén::terminátor
 - Konstitutív v. szövetspecifikus, fejlődés-specifikus promóter
- Transzformáció: ált. génpuska vagy agrobaktérium

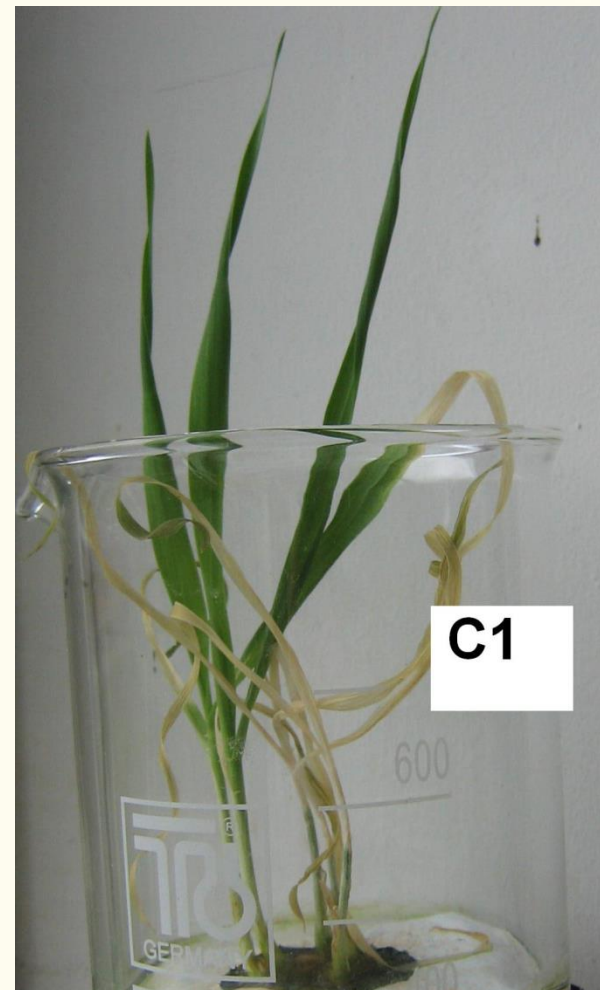




Regeneráció fagystressz után

3 nap hideg utókezelés, 3 nap 24/18°C

- Vad típusú és Arabidopsis AKR4C9 enzimet termelő trg. árpa fagyűrése



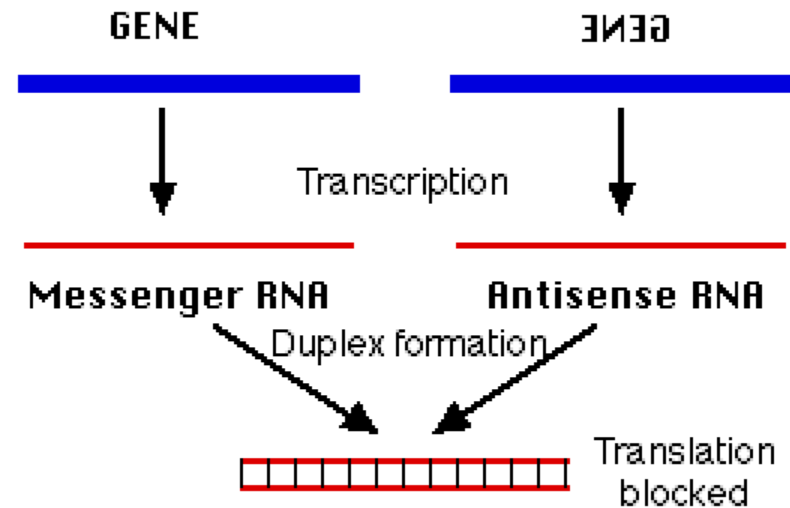
Fotoszintetikus hatékonyság növelése

- Rubisco szubsztrát-ellátottságának növelése
- Fruktóz-1,6-biszfoszfátáz és/vagy szedoheptulóz-1,6-biszfoszfátáz túltermeltetése
- 20-30 % fotoszintetikus javulás
- Miyagava és mtsai, 2001, Nature Biotechnology
- Lefebvre és mtsai, 2005, Plant Physiology



Csendesítés

- Antiszensz gátlás
- Fordítva klónozni a gént pl. konstitutív promóter mögé
 - Tranzienst expresszió
 - Stabil transzformáció
- Nem kell az egész kódoló rész
- Ált. csak 50-60%-os a gátlás



Antisense Expression of the CK2 α -Subunit Gene in Arabidopsis. Effects on Light-Regulated Gene Expression and Plant Growth

Yew Lee, Alan M. Lloyd, Stanley J. Roux

Published March 1999. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.119.3.989>

Article

Figures & Data

Info & Metrics

PDF

Copyright © 1999 American Society of Plant Physiologists

Abstract

The protein kinase CK2 (formerly casein kinase II) is thought to be involved in light-regulated gene expression in plants because of its ability to phosphorylate transcription factors that bind to the promoter regions of light-regulated genes *in vitro*. To address this possibility *in vivo* and to learn more about the potential physiological roles of CK2 in plants, we transformed Arabidopsis with an antisense construct of the CK2 α -subunit gene and investigated both morphological and molecular phenotypes. Antisense transformants had a smaller adult leaf size and showed increased expression of *ochs* in darkness and of *cab* and *rbcS* after red-light treatment. The latter molecular phenotype implied that CK2 might serve as one of several negative and quantitative effectors in light-regulated gene expression. The possible mechanism of CK2 action and its involvement in the phytochrome signal transduction pathway are discussed.



View this article with **LENS**

In this issue



Plant Physiology

Vol. 119, Issue 3
Mar 1999

[Table of Contents](#)

[About the Cover](#)

[Index by author](#)

[Table of Contents \(issuefull\)](#)



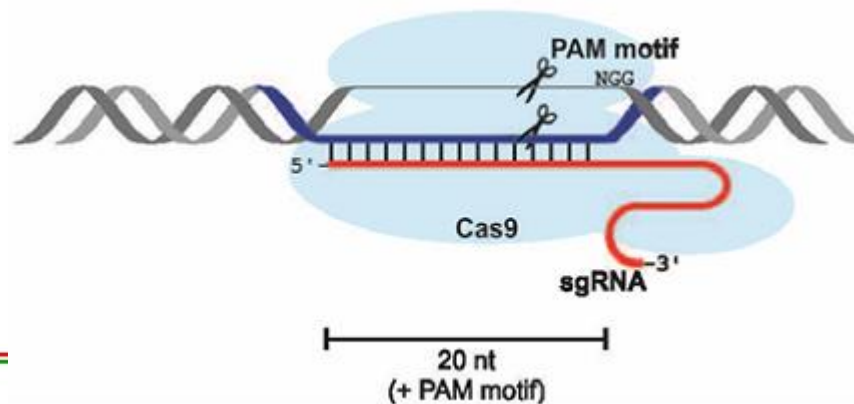
MTA • ATK
Mezőgazdasági Intézet

2018. szeptember 13.
Éva Csaba

Kiütés: CRISPR/Cas rendszer

Jinek és mtsai. Science 2012

- Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats interference system with CRISPR-associated endonuclease
- Baktérium „adaptív immunrendszer” része
- Eredetileg 2 RNS: CRISPR RNS (crRNS, ez alapján megy a felismerés) és transactivating CRISPR RNS (tracrRNS, kell a rendszer működéshez)
- Alkalmazás: single guide RNS (sgRNS)
- A hasításhoz NGG kell (Protospacer Adjacent Motif (PAM))
- Ettől upstream van a protospacer régió – felismerés
- Hasítás tökéletlen javítása – mutáció, két helyen hasítva nagyobb rész is kiejthető



Reduced drought tolerance by CRISPR/Cas9-mediated SIMAPK3 mutagenesis in tomato plants

Liu Wang, Lin Chen, Rui Li, Ruirui Zhao, Meijing Yang, Jiping Sheng, and Lin Shen

J. Agric. Food Chem., Just Accepted Manuscript

DOI: 10.1021/acs.jafc.7b02745

Publication Date (Web): September 5, 2017

Copyright © 2017 American Chemical Society

Abstract

Drought stress is one of the most destructive environmental factors that affect tomato plants adversely. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are important signaling molecules that respond to drought stress. In this study, SIMAPK3 was induced by drought stress, and the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (CRISPR/Cas9) system was utilized to generate *slmapk3* mutants. Two independent T1 transgenic lines and wild-type (WT) tomato plants were used for analysis of drought tolerance. Compared with WT plants, *slmapk3* mutants exhibited more severe wilting symptom, higher hydrogen peroxide content, lower antioxidant enzymes activities, and suffered more membrane damage under drought stress. Furthermore, knockout of SIMAPK3 led to up- or down-regulated expressions of drought stress-responsive genes including *SILOX*, *SIGST*, and *SIDREB*. The results suggest that SIMAPK3 is involved in drought response in tomato plants by protecting cell membranes from oxidative damage and modulating transcription of stress-related genes.



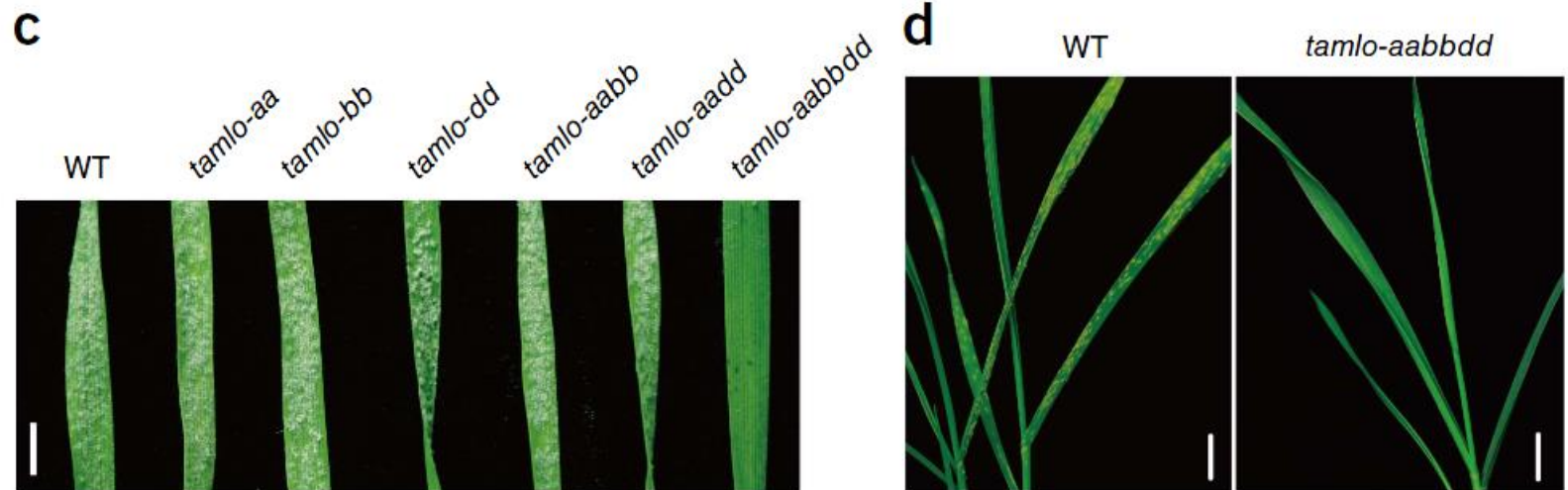
Kártevőkkel szembeni ellenállás

- OsERF922 negatív immunoregulátor kiütése rizsben – megnövelt rezisztencia járványos barnulás (*Magnaporthe oryzae* gomba) ellen (Wang és mtsai. Plos One 2016)
- OsSWEET 14 érzékenységi gén promóterének editálása TALEN-el rizsben – megnövelt rezisztencia *Xanthomonas oryzae* ellen (Blanvillain-Baufumé és mtsai. Plant Biotechnology J 2017)





Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew

Yanpeng Wang^{1,3}, Xi Cheng^{2,3}, Qiwei Shan¹, Yi Zhang¹, Jinxing Liu¹, Caixia Gao¹ & Jin-Long Qiu²






Original Article

Production of low-Cs⁺ rice plants by inactivation of the K⁺ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system

Manuel Nieves-Cordones , Sonia Mohamed, Keitaro Tanoi, Natsuko I. Kobayashi, Keiko Takagi, Aurore Vernet, Emmanuel Guiderdoni, Christophe Périn, Hervé Sentenac, Anne-Aliénor Véry 

First published: 3 July 2017 | <https://doi.org/10.1111/tpj.13632> | Cited by:2

 PDF  TOOLS  SHARE

Summary

The occurrence of radiocesium in food has raised sharp health concerns after nuclear accidents. Despite being present at low concentrations in contaminated soils (below μM), cesium (Cs^+) can be taken up by crops and transported to their edible parts. This plant capacity to take up Cs^+ from low concentrations has notably affected the production of rice (*Oryza sativa* L.) in Japan after the nuclear accident at Fukushima in 2011. Several strategies have been put into practice to reduce Cs^+ content in this crop species such as contaminated soil removal or adaptation of agricultural practices, including dedicated fertilizer management, with limited impact or pernicious side-effects. Conversely, the development of biotechnological approaches aimed at reducing Cs^+ accumulation in rice remain challenging. Here, we show that inactivation of the Cs^+ -permeable K^+ transporter OsHAK1 with the CRISPR-Cas system dramatically reduced Cs^+ uptake by rice plants. Cs^+ uptake in rice roots and in transformed yeast cells that expressed OsHAK1 displayed very similar kinetics parameters. In rice, Cs^+ uptake is dependent on two functional properties of OsHAK1: (i) a poor capacity of this system to discriminate between Cs^+ and K^+ ; and (ii) a high capacity to transport Cs^+ from very low external concentrations that is likely to involve an active transport mechanism. In an experiment with a Fukushima soil highly contaminated with $^{137}\text{Cs}^+$, plants lacking OsHAK1 function displayed strikingly reduced levels of $^{137}\text{Cs}^+$ in roots and shoots. These results open stimulating perspectives to smartly produce safe food in regions contaminated by nuclear accidents.



Egyéb génfunkció-vizsgálatok

- Génexpressziós változások követése
 - Pl. stressz alatt qPCR-el
- Enzim termeltetés *E. coli*-ban, tisztítás, enzimaktivitásmérés
- Interakciós partnerek keresése
 - DNS (pl. EMSA)
 - Fehérje (pl. élesztő két hibrid)
- Stb.



Gén azonosítás főbb módszerei II.

- Modell növények
 - Mutánsgyűjtemény
 - Új generációs DNS-szekvenálás
 - Szekvencia-összehasonlítás, annotáció
- Talált gén funkciójának vizsgálata
 - Csendesítés
 - Kiütés
 - Túltermeltetés
 - Stb.
- Génszabályozás vizsgálata



Gén izolálás helye

- Van gén, nincs gén
 - *Ralstonia solanacearum* baktérium egy virulencia-fehérjéjét *Arabidopsis thaliana* ND1 ökotípusban két receptor: RRS1-R és RPS4 felismeri, HR lesz (Deslandes és mtsai, PNAS 2003), más ökotípusokban nincs
 - Földimogyoró AhRRS5 receptor, máshol nincs– trg. dohányban megtermeltetve rezisztenciát ad (Zhang és mtsai Plant Biotechnology J 2017)
- Mindkét fajtában megvan a gén, csak az expressziója tér el
 - Plaisman V sz.tűrő búza még jól öntözve is sok TaGSTU1B és TaGSTF6 GPOX-t termel (Gallé és mtsai. J Plant Phys 2009)
 - Ezek termelése vízhiány hatására az érzékeny Cappelle Desprez fajtában is fokozódik, de nem éri utol a Plainsmant
 - **Szabályozás fontossága!**



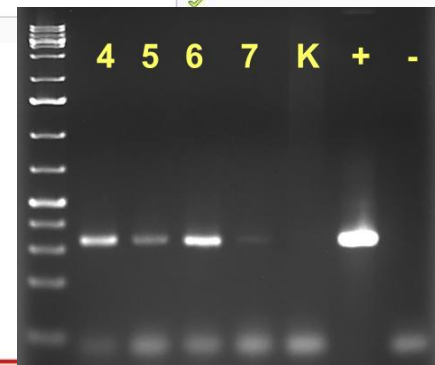
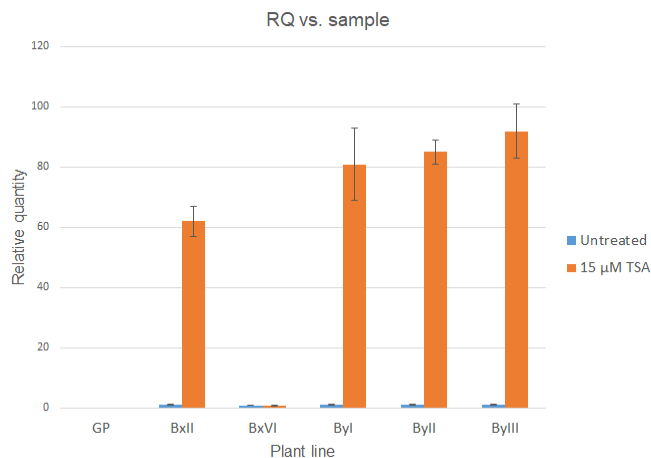
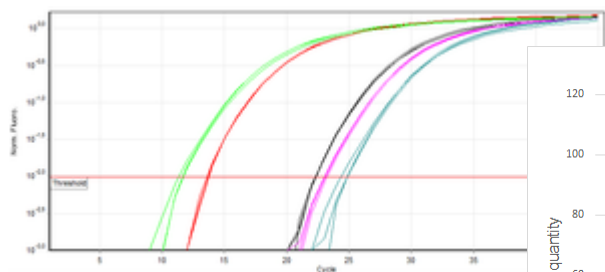
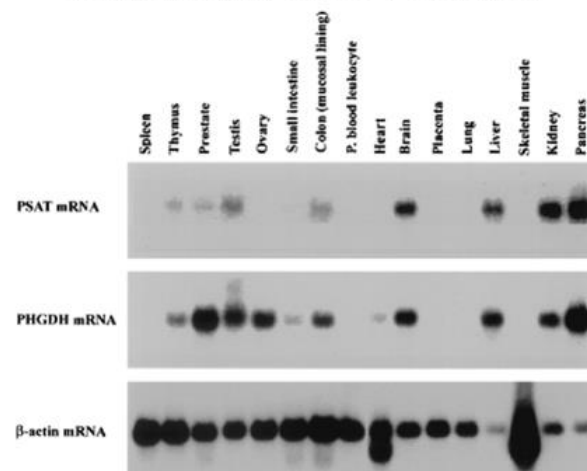
Szabályozók vizsgálata

- Génexpresszió követése

- Northern blot →
- RT-PCR →
- qPCR ↓
- Microarray

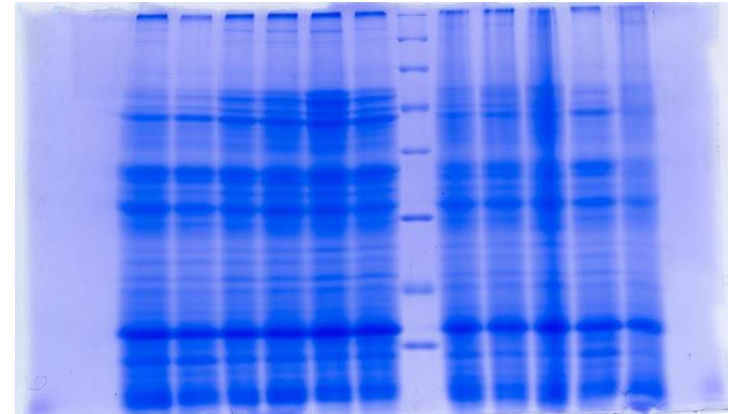
The figure below shows Northern blot analysis of different human tissues. Three probes were used: PSAT, PHGDH and Actin. Actin was used as a loading control, meaning transcription of actin is consistent between human tissues. Which tissue showed the highest level of transcription of the PSAT gene?

Northern blot results

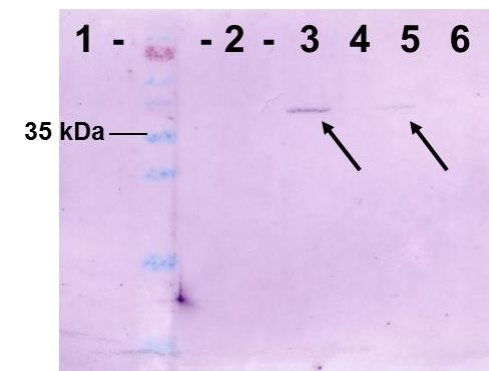
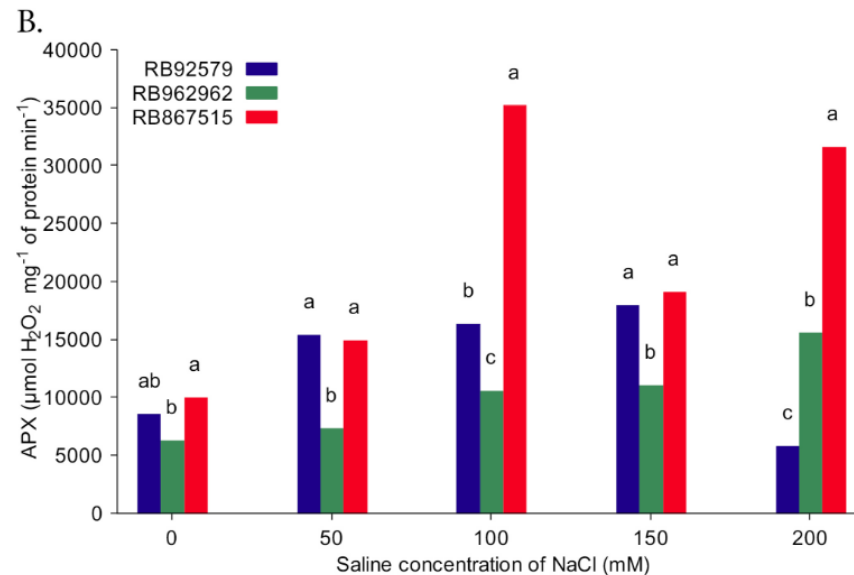


Szabályozók vizsgálata

- Génexpresszió követése
 - Fehérjeprofil →
 - Western blot →
 - Enzimaktivitás mérése ↓



Carvalho és
mtsai. Soil,
water and
plant
management
2016



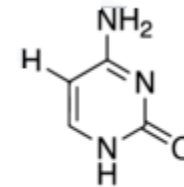
Means of a variety followed by same letters do not differ by Tukey test at 0.05 probability level

Figure 3 Evaluation of the ascorbate peroxidase (APX) activity ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1}$ of protein min^{-1}) of sugarcane leaves. (A) Comparison between APX values obtained for the varieties subjected to different levels of salt stress; (B) Comparison between APX values obtained for the varieties at each saline level

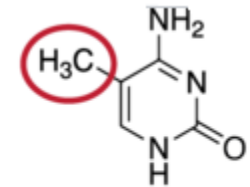


Epigenetikai szabályozás

- DNS metiláció (ált. citozin), gátlás, pl. LMW gluteninek, gliadinok

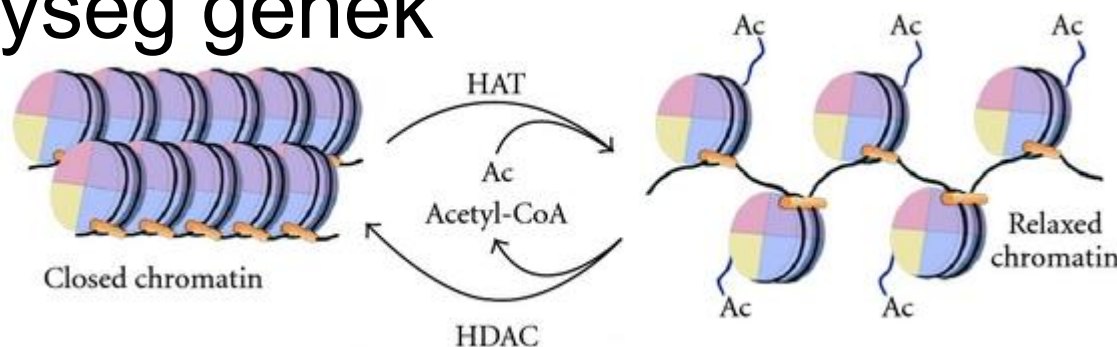


Cytosine



methyated Cytosine

- Hiszton acetiláció (N-terminális lizinek), dinamikus: HAT, HDAC, pl. HMW glutenin alegység gének



Epigenetikai szabályozás mérése

- Epigenetika
 - DNS-metiláció-mérése: szekvenálás, emésztés antitesttes kimutatás
 - Hiszton-acetiláció mérése: antitest, hiszton hiperacetiláció HDAC-inhibítorokkal (pl TSA). Tanaka és mtsai. Plant Physiol 2008: TSA-kezelt Arabidopsis levelén embrió-szerű struktúrák→

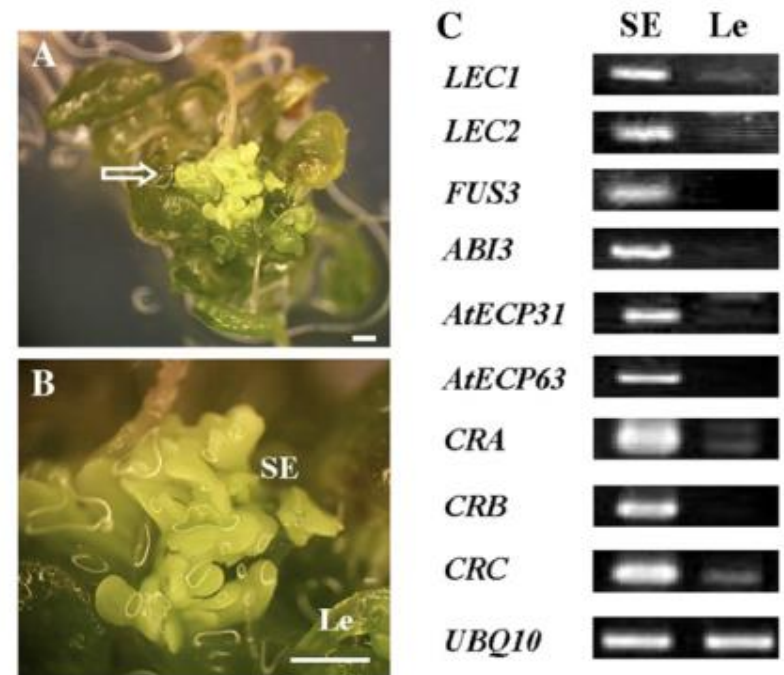


Figure 3. Effects of TSA treatment on plant growth after transfer to inhibitor-free conditions. Wild-type seeds (Col) treated with 50 μM TSA for 14 d on phytohormone-free Gamborg's B5 solid medium were transferred to inhibitor-free B5 liquid medium and cultured for an additional 4 weeks. A, Seedlings grown from seeds after the transfer to inhibitor-free medium. Note the formation of embryo-like structures on the true leaves (white arrows). B, Enlarged image of the embryo-like structures in A. Bar = 1 mm. C, Expression of embryogenesis-related genes in the embryo-like structures. Embryogenesis-related gene expression, as indicated in Figure 2A, was analyzed by RT-PCR in the embryo-like structures (SE) and in the remaining true leaves after elimination of the embryo-like structures (Le). *UBQ10* was used as an internal standard.



Transzkripcionális szabályozás

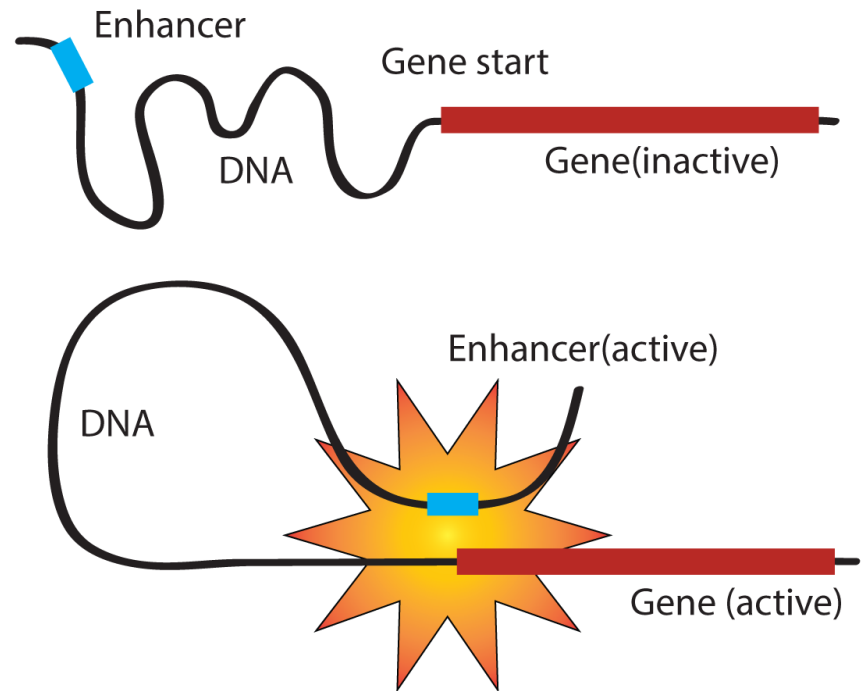
- Promóter
 - RNS-polimeráz kötőhelye
 - TF kötőhelyek
 - Géntől közvetlenül 5' irányban
 - Konstitutív
 - Indukálható (pl. hideg, meleg, hormon, alkohol, stb.)
 - Szövet, szerv, fejlődés-specifikus
- Transzkripció terminátor
 - Géntől közvetlenül 3' irányban
 - Szerep a szabályozásban



Transzkripcionális szabályozás II.

- Enhancer

- A géntől távol, 5' vagy 3' irányban is lehet
- DNS hajlítás
- Ráerősítés
- PI. HMW enhancer

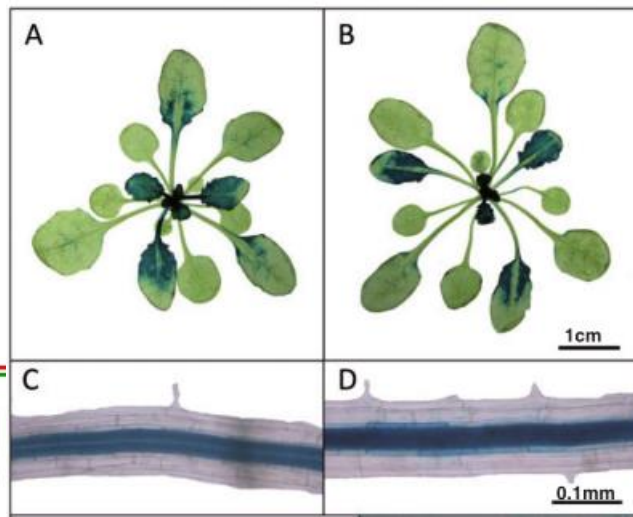
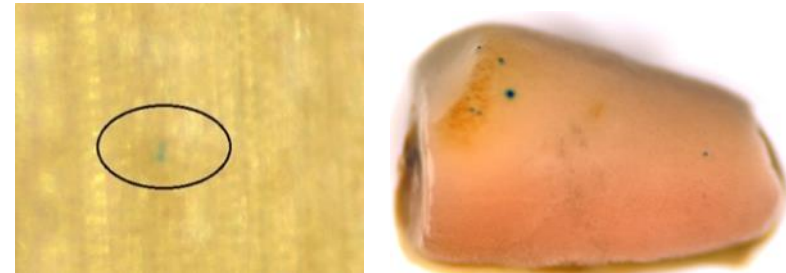
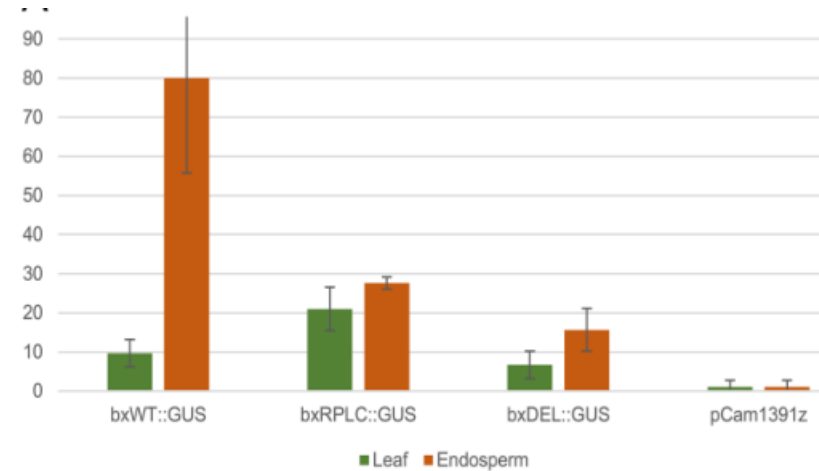


- Inzulátor

- Enhancer és promóter kapcsolatát gátolja

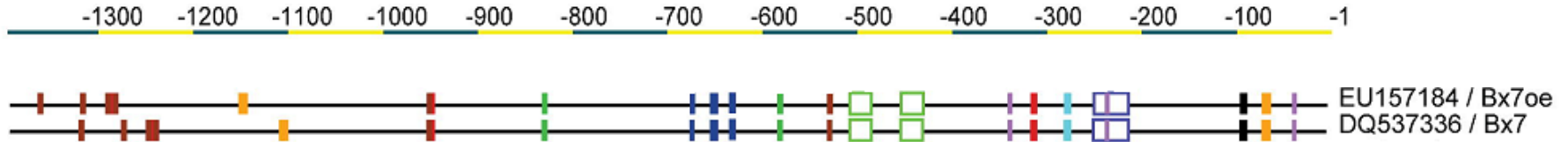
Transzkripcionális szabályozás vizsgálata I.

- Promóter::riportegén konstrukció
- Tranzien্স expresszió→
 - Itt HMW GS promóter::*uidA::nos*
 - Makai és mtsai. FIGS 2015
- Stabil transzformáció↓
 - Itt Peters és mtsai. Plant Cell Physiol 2010
 - Sink-spec. *atpsip2* promóter





Ha a promóter ugyanaz...



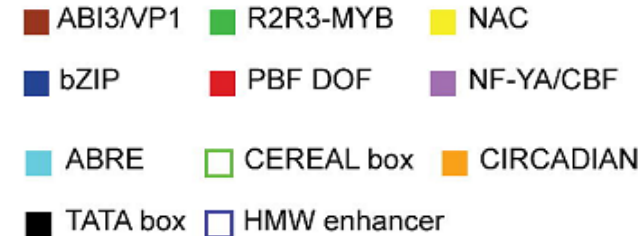
- Expresszió:
Bx7oe (Glenlea)>>Bx7 (Chinese Spring)

• Akkor pl. az egyes fajták TF-összetétele térhet el.

• Makai és mtsai. BioRxiv, 2014;

➤ TF-ek direkt hatása magi tartalékfehérje-termelésre

- B3 (ABI3, FUSCA3) (Moreno-Risueno Plant J, 2008)
- SPA bZIP (Ravel és mtsai. Plant Physiol, 2009)
- DOF (Gupta és mtsai. Plant Mol Biol Rep, 2010)
- NAC (Matthews és mtsai. FIGS 2016)



Transzkripcionális szabályozás – transzkripciós faktorok

- Izolálásuk nehéz, ált. közvetetten vizsgálják őket
- Transzaktivációs kísérlet
- ChIP
- EMSA →
 - Wang és mtsai, 1992, Cell

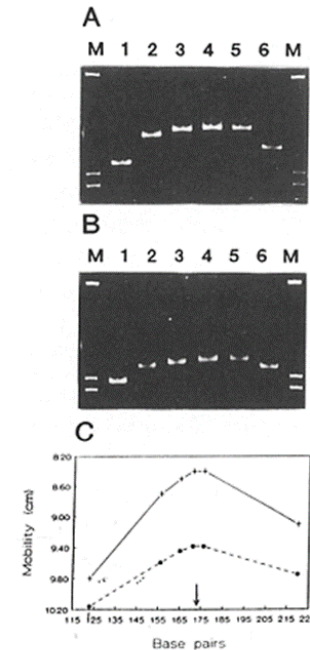


Figure 7. Ligand-Relaxed Bending of the *occQ-occR* Intergenic Region by OccR Protein

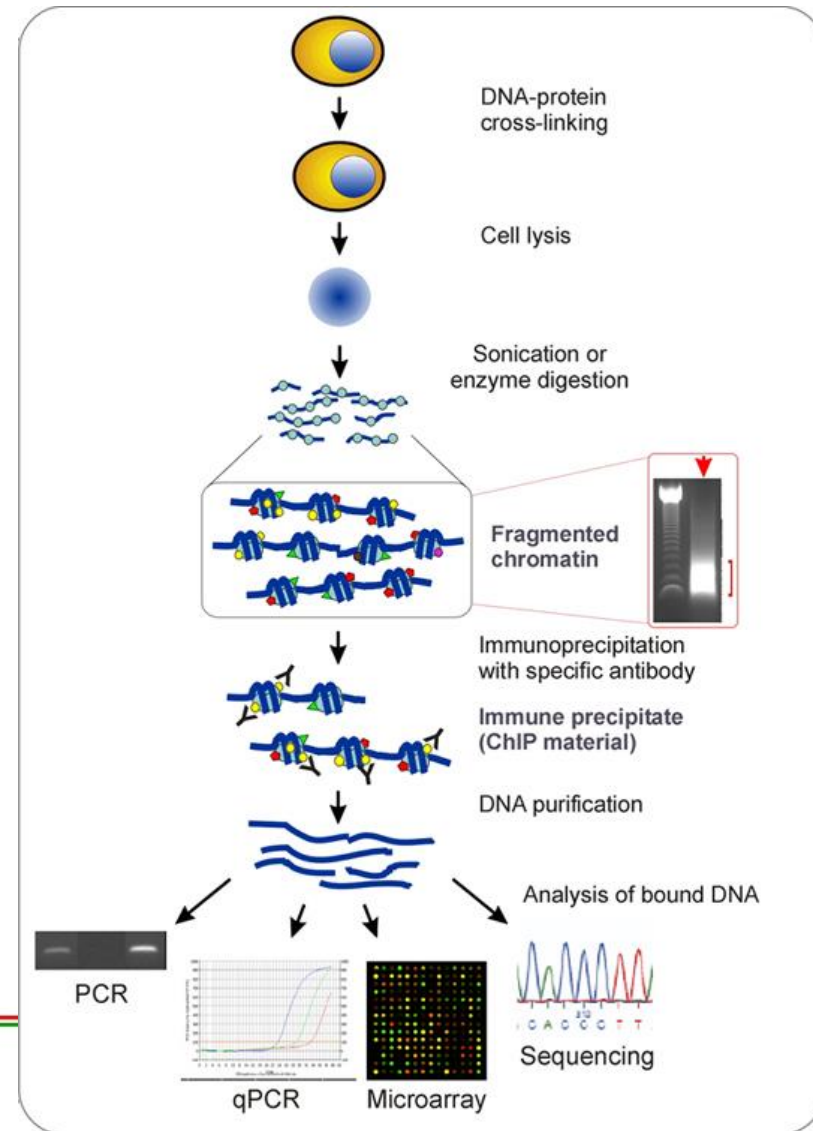
(A–B) A 112 bp PCR fragment containing the OccR binding site was cloned into plasmid pBend3. The resulting plasmid was digested with the restriction endonucleases BglIII (lanes 1), XhoI (lanes 2), EcoRV (lanes 3), PvuII (lanes 4), SmaI (lanes 5), or BamHI (lanes 6). The resulting fragments were incubated with OccR protein in the absence (A) or presence (B) of 100 μ M octopine and size fractionated using polyacrylamide gels lacking (A) or containing (B) 100 μ M octopine. (C) Localization of the bend site of the *occQ-occR* intergenic region. Migration (Y axis) was plotted as a function of the number of nucleotides separating the EcoRI site at the left end of the multiple cloning site from the middle of each permuted fragment. The peak (arrow) represents the middle of the DNA bend site.



Kromatin immunoprecipitáció

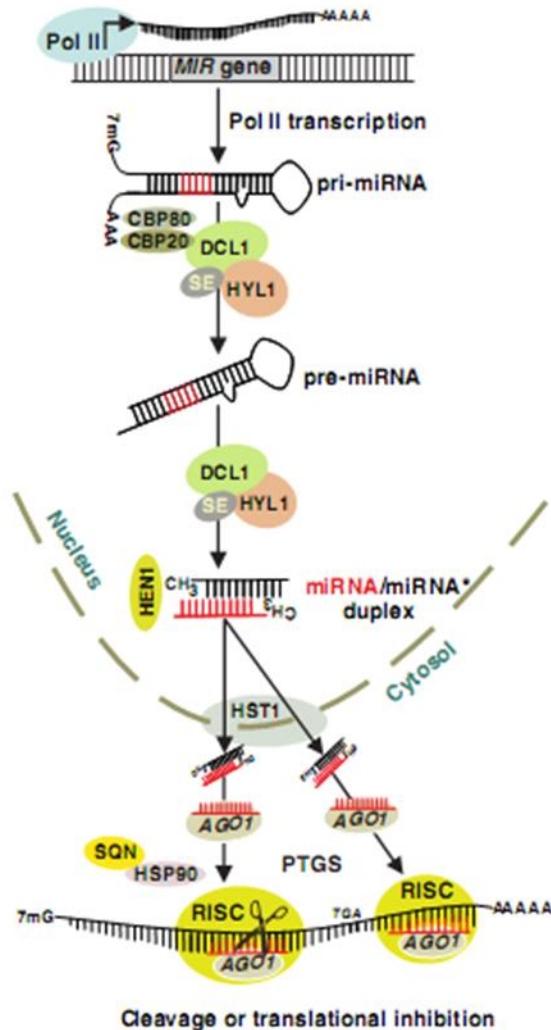
ChIP

- Formaldehydes keresztkötés (DNS-hez transzkripciós faktorok)
- Szonikálás
- Kött DNS-fehérje izolálás TF elleni antitesttel
- Keresztkötések felbontása
- DNS-szekvenálás

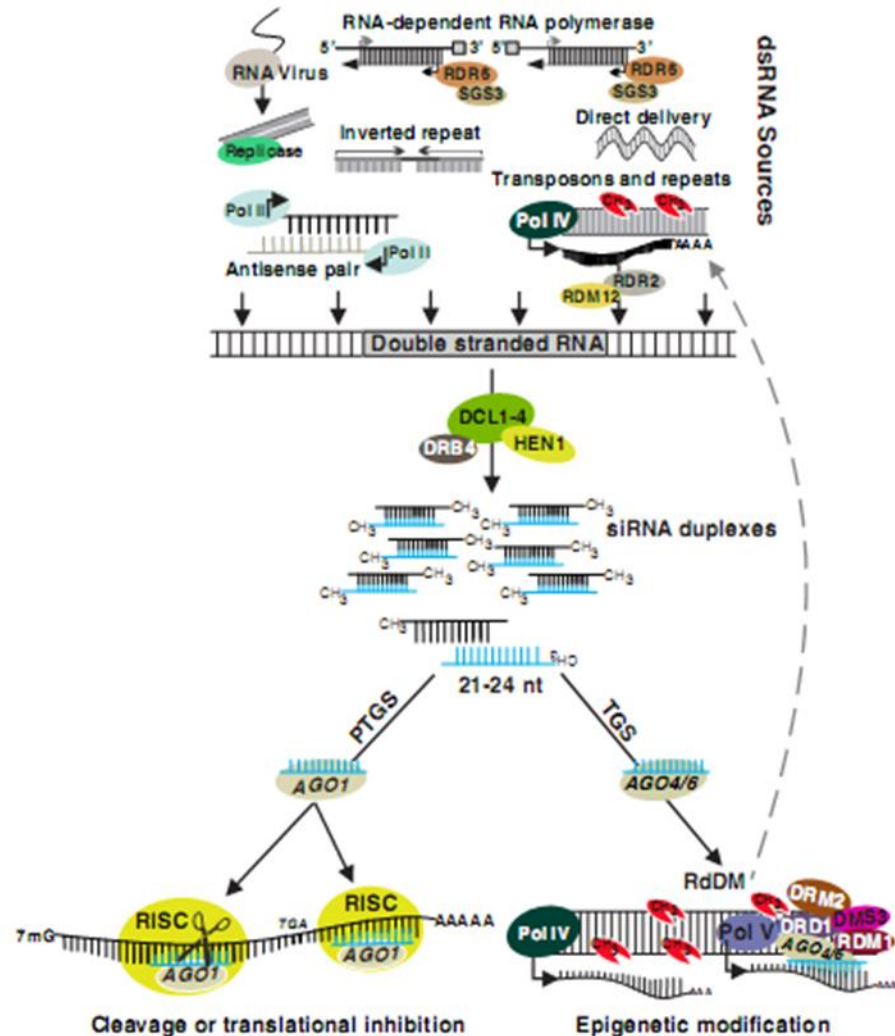


Transzkripció csendesítése – RNS interferencia

A) miRNA biogenesis and function



B) siRNA biogenesis and function



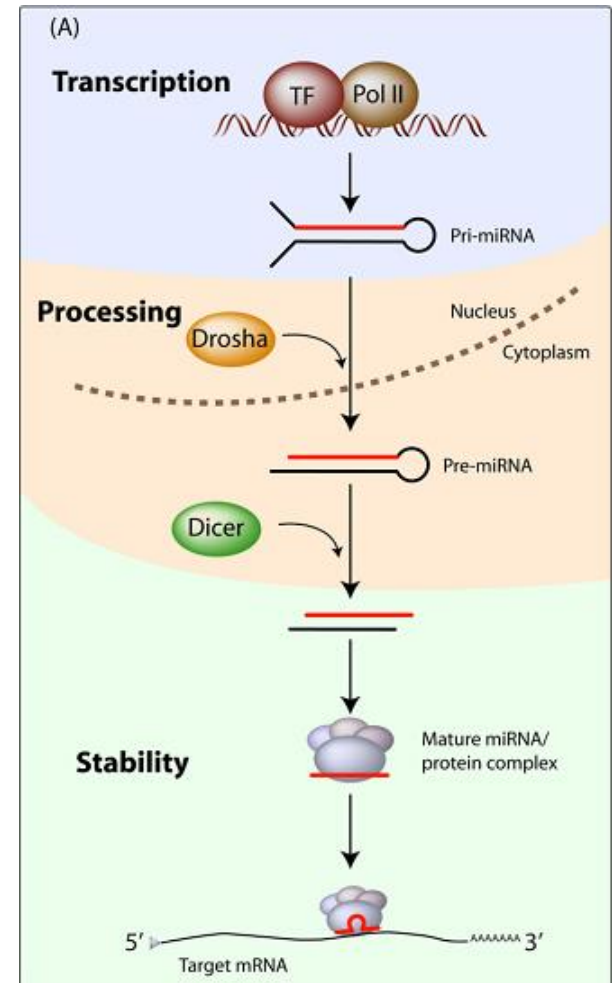
mikroRNS-ek I.

- Ált. 0-3 mismatch a célponttal
- Két szál
 - Vezető (leader) szál → érett miRNS, gátló hatás
 - Kísérő (passenger) szál (miRNS*): ált. degradálódik, de néha gátol ez is
- Nagy szerep stresszkor, rugalmas válasz
- Hosszú féléletidő, akár 12 nap (edzés!)
- Emlősökben a gének 60%-a miRNS-el szabályozott, míg a növényekben csak <1%, de ezek szinte mindig szabályozók!
- Leung és Sharp, Mol Cell 2010
- Sunkar és mtsai, Trends in Plant sci 2012
- Kim és mtsai, Genome 2012

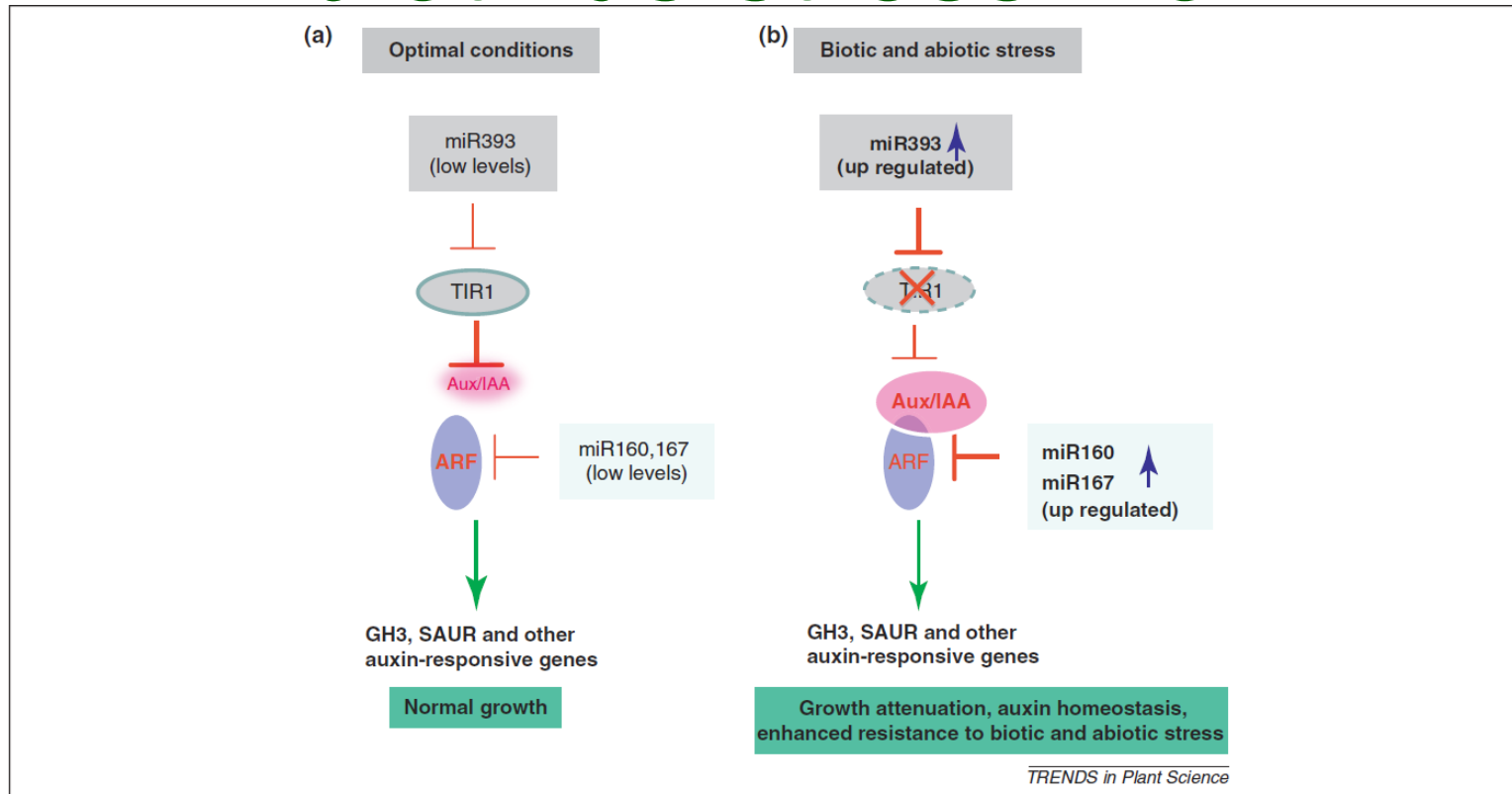


mikroRNS-ek I.

- Saját eukarióta (pl. növény) genomban
- Ált. a célszekvencia fordított duplikációjából (inverted repeat) keletkeznek
- Hairpin formájú pri-miRNS íródik, metilálódik, transzport a citoplazmába, később ebből vágódnak ki
- A mikro RNS-ek ált az mRNS-ek 3' utr-jéhez kapcsolódnak, de néha kódoló részhez
- Leung és Sharp, Mol Cell 2010
- Sunkar és mtsai, Trends in Plant sci 2012



Auxin szignalizáció gátlása biotikus stresszkor



- TIR1 (transport inhibitor response 1 – auxin receptor), ARF (auxin responsive factor)
- Sunkar és mtsai review, Trends in Plant Sci 2012



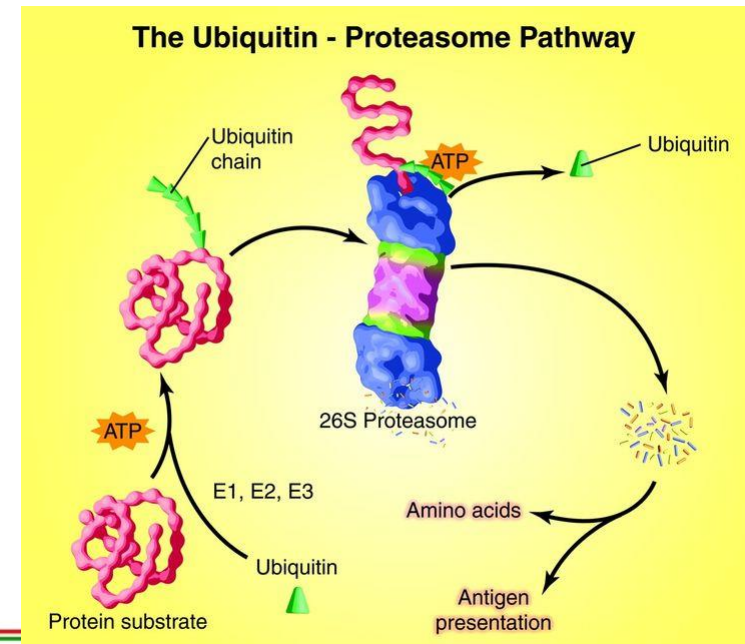
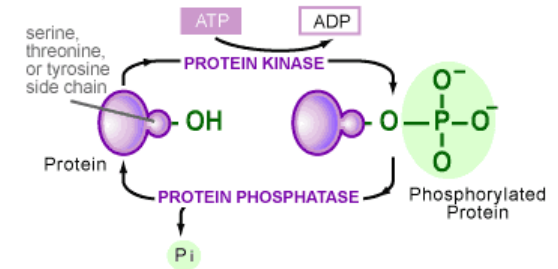
Auxin szignalizáció gátlása biotikus stresszkor

- Auxin gátlása
 - növekedés↓ fejlődés↓ rezisztencia↑ (a növekedés és f. a baciknak is táplálékot ad)
 - Auxin az SA antagonistája
- miR393↑ : PTI aktiválja flagellin (Flg22) érzékelésekor. Az miR393* az ETI-t serkenti, antimikrobiális PR (pathogenesis-related) proteinek↑. miR393 tt. trg. Arabidopsis: csökkent apikális dominancia (kb. mint auxin-mutánsok), nagyobb rezisztencia *Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000* ellen



Transzláció, poszt-transzláció szabályozás

- Transzláció gátlása – miRNS-ek
- Enzim aktivitás szabályozása
 - Kovalens módosítás: szerin, treonin (de)foszforiláció, lizin (de)acetiláció
 - Inhibítor termelése (pl. RNáz inhibítor)
- Fehérje féléletidő szabályozása
 - Ubikvitiniláció – kijelölés lebontásra



Egyéb szabályozók mérése

- MikroRNS-ek vizsgálata
 - RNS-degradom szekvenálása
 - miRNS gének prediktálása genomban
 - miRNS adatázis:
<http://www.mirbase.org/>
 - Target predikció:
<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>
- Fehérje módosítások – 2D gél majd MS
 - 2D gél, itt 1. D: IF (PI=3-10); 2. D: 15% SDS-PAGE (10-200 kDa)

