

Transzgénikus növények alkalmazása a funkcionális genomikai kutatásokban

Dóczi Róbert



Gyakorlatban alkalmazható transzgenikus növények létrehozásának alapfeltétele:
a genomban kódolt gének funkcionális ismerete - **funkcionális genomika**

Funkcionális annotáció: *in silico* predikció (homológia alapján), génexpresszió (korreláció alapján), fehérje-fehérje interakció („guilty by association”) – közvetett módszerek

Génfunkció megbízható megérítéséhez mutáns génváltozatokra (természetes vagy indukált) van szükség.

- **Forward genetika:** mutáns fenotípust okozó gént keressük
- **Reverz genetika:** az ismert génhez keressük a funkciót – pl. **knockout technika**

A „large-scale” kísérleti technikák (transzkriptóm, proteóm analízis, etc.) kombinációja a genom ismeretére épülő genetikai eszközökkel

A kérdéses génekben előidézett mutációk jellemzése: klasszikus fenotípus analízis (pl. fejlődési rendellenességek)

Transzgénikus növények a funkcionális genomika szolgálatában

Állati kísérleti rendszerekben (egér) irányított knockout mutánsok hozhatóak létre: helyspecifikus homológ rekombináció működik.

Növényekben nem, a transzgén beépülése random.

A reverz genetika lehetőségeinek kihasználása a növénybiológiában csak **nagyszabású projektek** keretében valósulhattak meg:

T-DNS inszerciós mutánskollekciók kialakítása: több tízezer független transzformáció, a T-DNS beépülés helyének utólagos megállapítása a határoló szekvencia alapján.

Nyilvános projektek: a vonalak szabadon hozzáférhetőek a tudományos közösség számára.

A transzgénikus növények igazi sikertörténete.

A modellnövény *Arabidopsis thaliana* – a növénybiológia „egere”

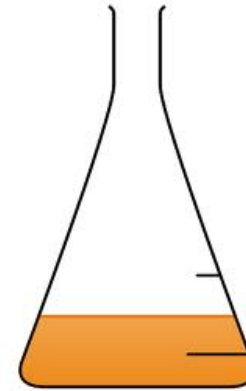
- kis méret (5-10 cm átmérőjű rozetta, 20-25 cm magas)
- rövid generációs idő (6-8 hét alatt magok foghatóak)
- önporzó, de idegentermékenyülő is – ideális genetikai analízis céljából
- kis genom méret (120Mb, 5 kromoszóma, 27 000 gén)
- teljes genom szekvencia ismert 2000 óta (első növényi genom) – a szekvencia közzétételekor a kódolt gének mindössze 10%-ának volt ismert funkciója
- egyszerű, gyors, hatékony transzformáció (flower dip - virág merítés)



***Arabidopsis thaliana* transzformációja virág merítéses módszerrel (flower dip): egyszerű és hatékony transzformációs módszer transzgénikus növények előállítására százezres nagyságrendben**



***Arabidopsis* virágzat
+
Agrobacterium szuszpenzió**



nincs *in vitro*
szövettenyésztési
lépés!

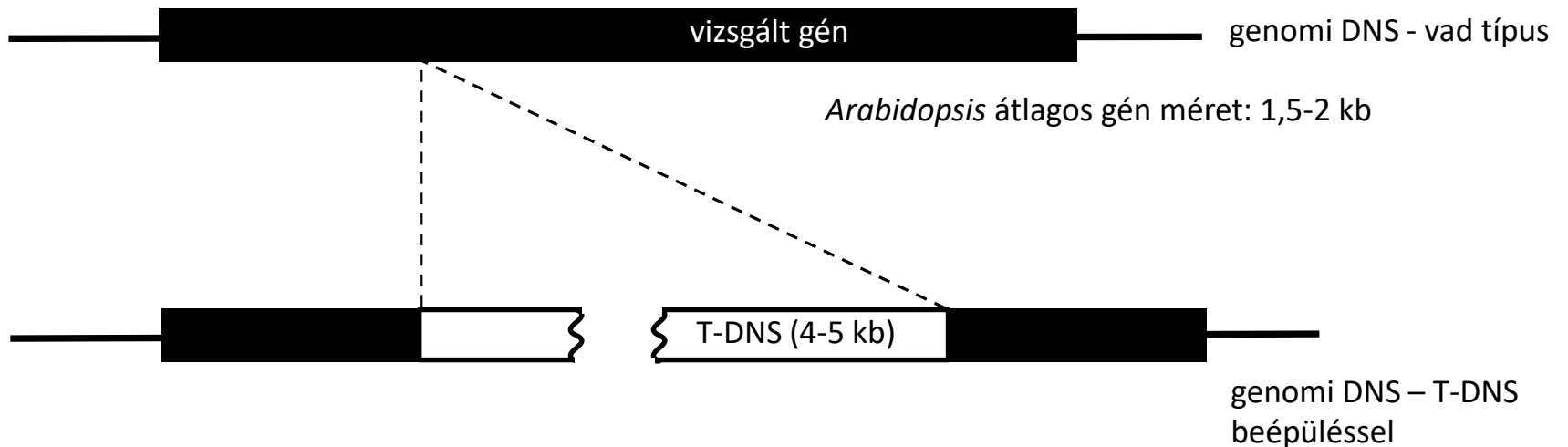
folyadékkultúra ,log fázisig
növesztve, majd detergens
tartalmú (0,05% Silwet L-77)
5% szacharóz oldatban
reszuszpendálva



magok begyűjtése,
transzformánsok
szelekciója (rezisztencia
marker alapján)



T-DNS inzerációs mutagenézis („knockout” technika)



A beépült 4-5 kb méretű T-DNS képes drasztikusan csökkenteni a transzkripció hatékonyságát (kimutathatósági határ alá).

A keltkezett transzkriptumok korai STOP kodonokat tartalmaznak.

jelenleg közel 400 000 T-DNS inzerációs *Arabidopsis* vonal elérhető

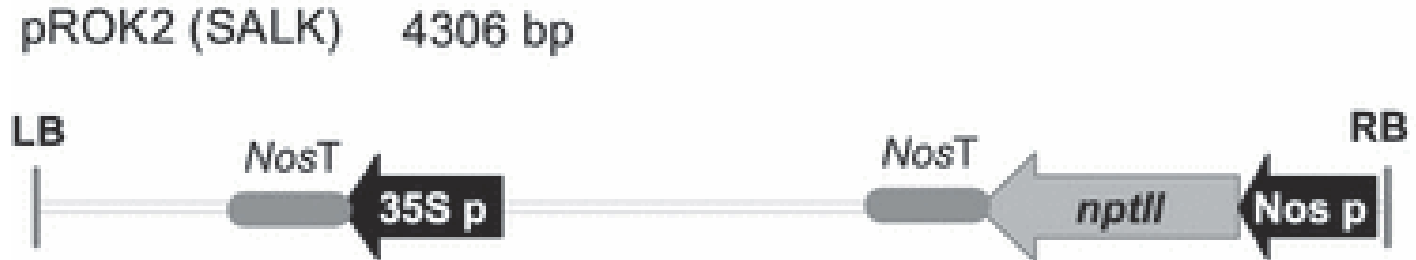
T-DNS inzerció mutagenézis („knockout” technika)

SIGnAL: SALK Institute Genomic Analysis Laboratory

<http://signal.salk.edu/>

T-DNA express

<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>



SALK vonalak előállításához használt pROK2 vektor T-DNS konstrukció

T-DNS inzerációs mutagenézis: több mint knockout

vektor (gyűjtemény)

pROK2 (SALK) 4306 bp



pAC161 (Gabi-Kat) 5799 bp



pAC106 (Gabi-Kat) 5848 bp



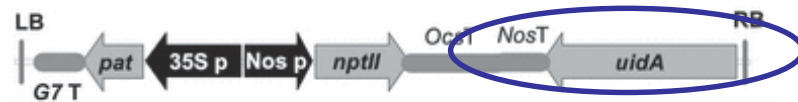
pCSA110 (SAIL) 7178 bp



pDAP101 (SAIL) 4401 bp



pGKB5 (FLAGdb) 6413 bp



különböző rezisztencia markerek

knockout

knockout

knock-up: a 35S promóter 5' upstream beépülése



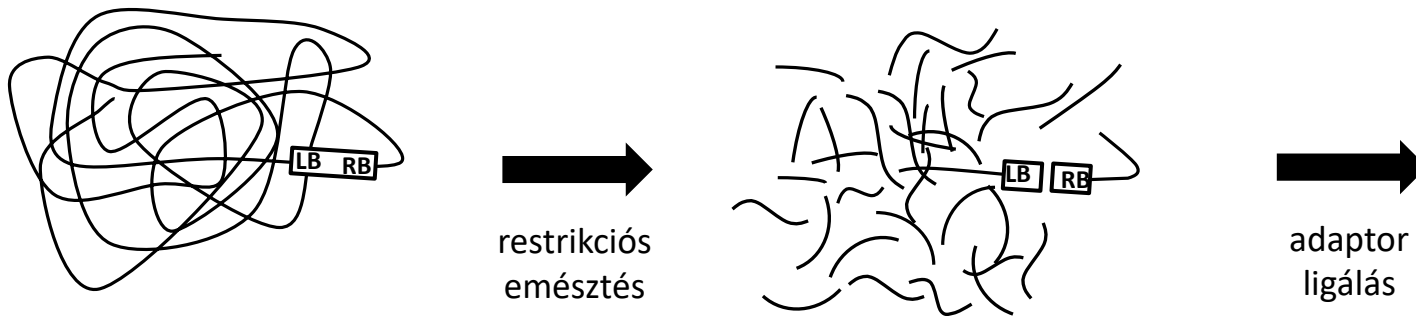
antiszensz: a 35S promóter 3' bépülése, komplementer szál átírása



knockout

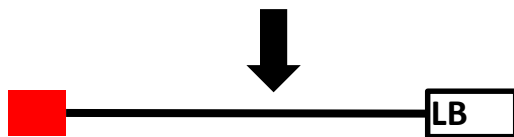
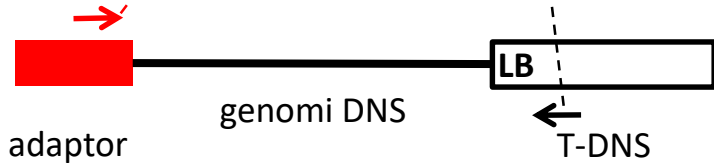
promoter trap: A GUS riporter egy promóter mögé épül be
 → specifikus expressziós mintázatú promóterek izolálhatóak

knockout növényanyagok genotipizálása: beépülési hely azonosítása szekvenálással



genomi DNS

PCR reakció **adaptor** és T-DNS **bal határszekvencia** specifikus primerekkel



PCR termékek szekvenálása bal határszekvencia **nested** primerrel

knockout növényanyagok genotipizálása és nyilvános disztribúciója

Szekvencia adatok feldolgozása:

- adaptor és T-DNS szekvencia eltávolítása
- BLAST, p érték: a beépülés helyének azonosítása az ismert genom szekvencia alapján

elosztás: stock centers (törzsgyűjtemények)

Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University

<http://abrc.osu.edu/>

Európában:

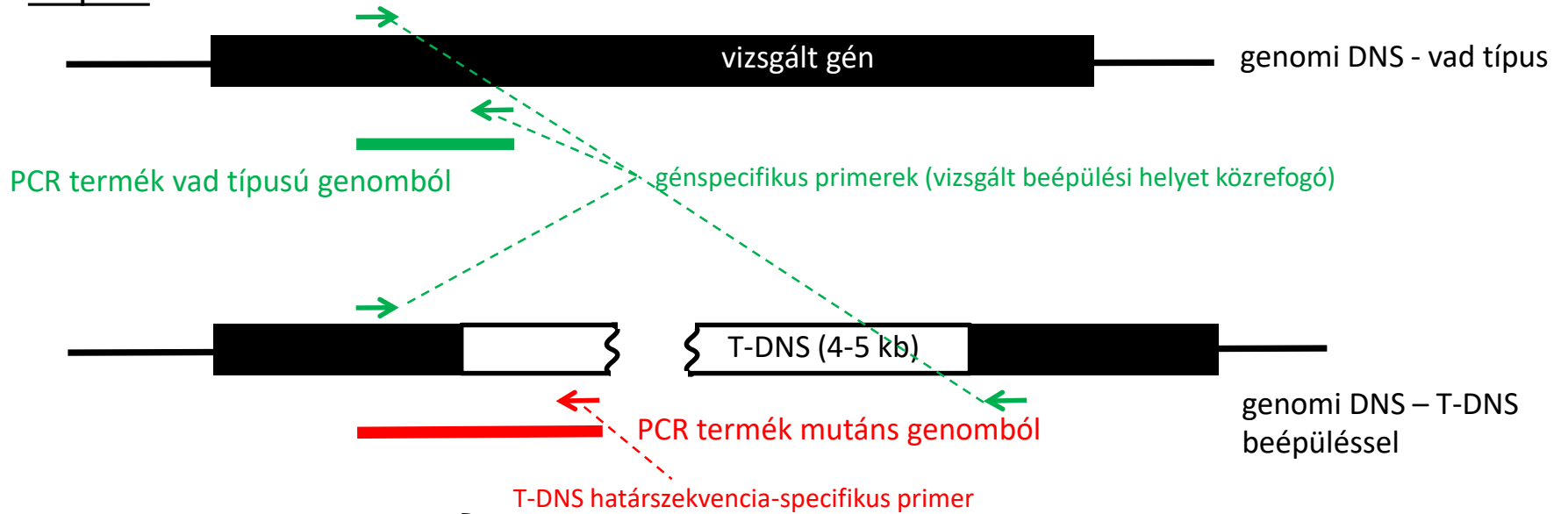
Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASc)

<http://arabidopsis.org.uk/>

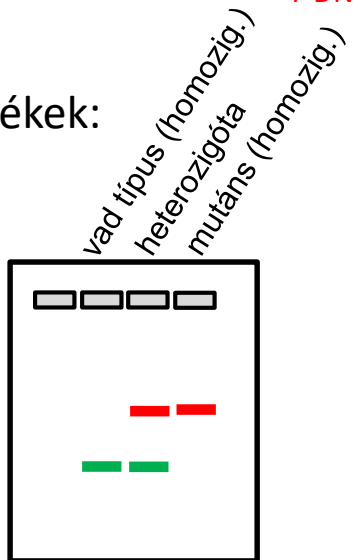
regisztrációt követően a kiválasztott vonalak online megrendelhetők,
jelképes összegért: jelenleg £3.50/vonal + £10.00 „batch fee” rendelésenként

knockout növényanyagok genotipizálása: 3 primeres PCR

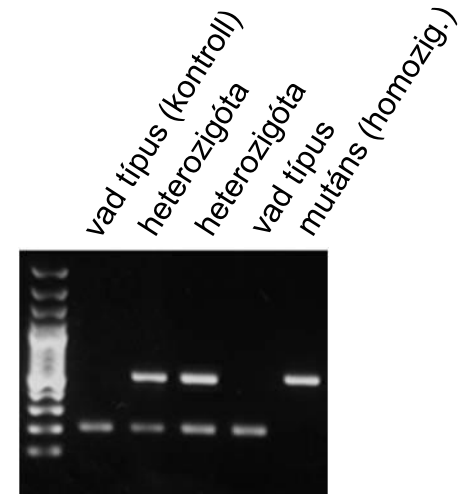
alapelv:



várható PCR termékek:



szegregáló T-DNS hordozó populáció genotipizálása:



inzerációs növényanyagok kísérleti felhasználásának követelményei

Egy T-DNS mutagenizált növényvonalban több mint egy, egymástól független beépülés is lehet – a SALK vonalak átlagos inzert száma 1,5

igazolni kell, hogy a megfigyelt fenotípusok valóban a vizsgált génben bekövetkezett mutáció okozza:

- **független mutáns vonalak** fenotípusainak összehasonlítása – az *Arabidopsis* genom megfelelően telített T-DNS mutánsokkal, hogy két vagy több független T-DNS mutáns elérhető legyen egy génben
- **komplementáció:** a mutáns vonal felültranszformációja a vizsgált gén vad típusú változatával (fenotípus visszaállítása) – eltérő rezisztencia marker fontos!
 - kondicionális komplementáció: a knockout háttérbe transzformált konstrukció csak részleges funkcióvesztést okoz (pl. csökkent enzimaktivitás, kötőhely megszüntetése) – specifikus funkciók részletes analizisét teszi lehetővé
- **túltermeltetés:** vad típusú háttérben erős konstitutív promóterrel (pl. 35S) expresszálatott transzgén – ellentétes fenotípus a KO vonalhoz képest
- **visszakeresztezés** vad típusba: együtt szegregál-e a fenotípus és a genotípus?

Alternatív transzgenikus génfunkció vizsgálati módszerek I.

Knockout mutáns hiányában: **géncsendesítésen** alapuló módszerek: antiszensz, siRNA, amiRNA – hátránya: nem teljes expresszióvesztés, független vonalakban a géncsendesítés mértéke eltérő, generációnként szintén változó mértékű a transzformáns növényanyagok gondos jellemzése elengedhetetlen

túltermeltetés: önmagában kevésbé elfogadott bizonyíték – a nagy mennyiségben jelenlévő fehérje aspecifikus hatásokat okozhat; megjelenik olyan sejttípusokban, és fejlődési stádiumokban is, amikor a vad típusban nem

Alternatív transzgenikus génfunkció vizsgálati módszerek II.

promóter:riporter konstrukció alkalmazása: a génexpressziós vizsgálatok transzgenikus növények létrehozásán alapuló speciális módszere:

közvetett (korrelatív természetű) információt nyerhetünk – önmagában nem funkcionális bizonyíték, segíti a génmutáción alapuló eredmények értelmezését; kiegészítő információ



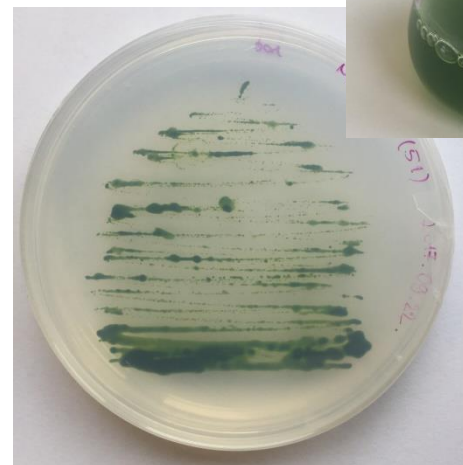
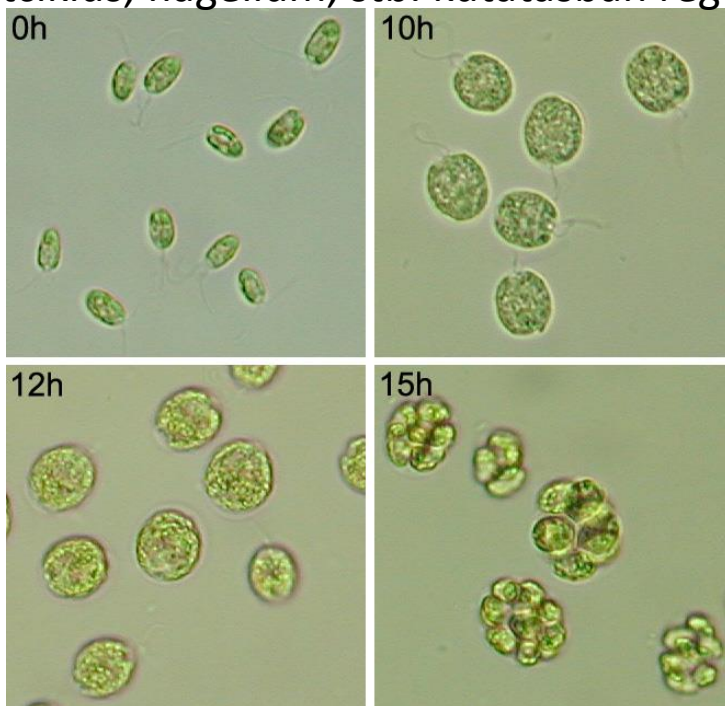
saját promóter szekvencia által szabályozott riporterfúzió: a riporter segítségével a gén expresszióját, a fehérje stabilitását és sejtbeli lokalizációját is nyomon követhetjük



Génfunkció vizsgálat egysejtű fotoszintetikus mikroalgában

A modell alga *Chlamydomonas reinhardtii* – a növénybiológiai „élesztő”

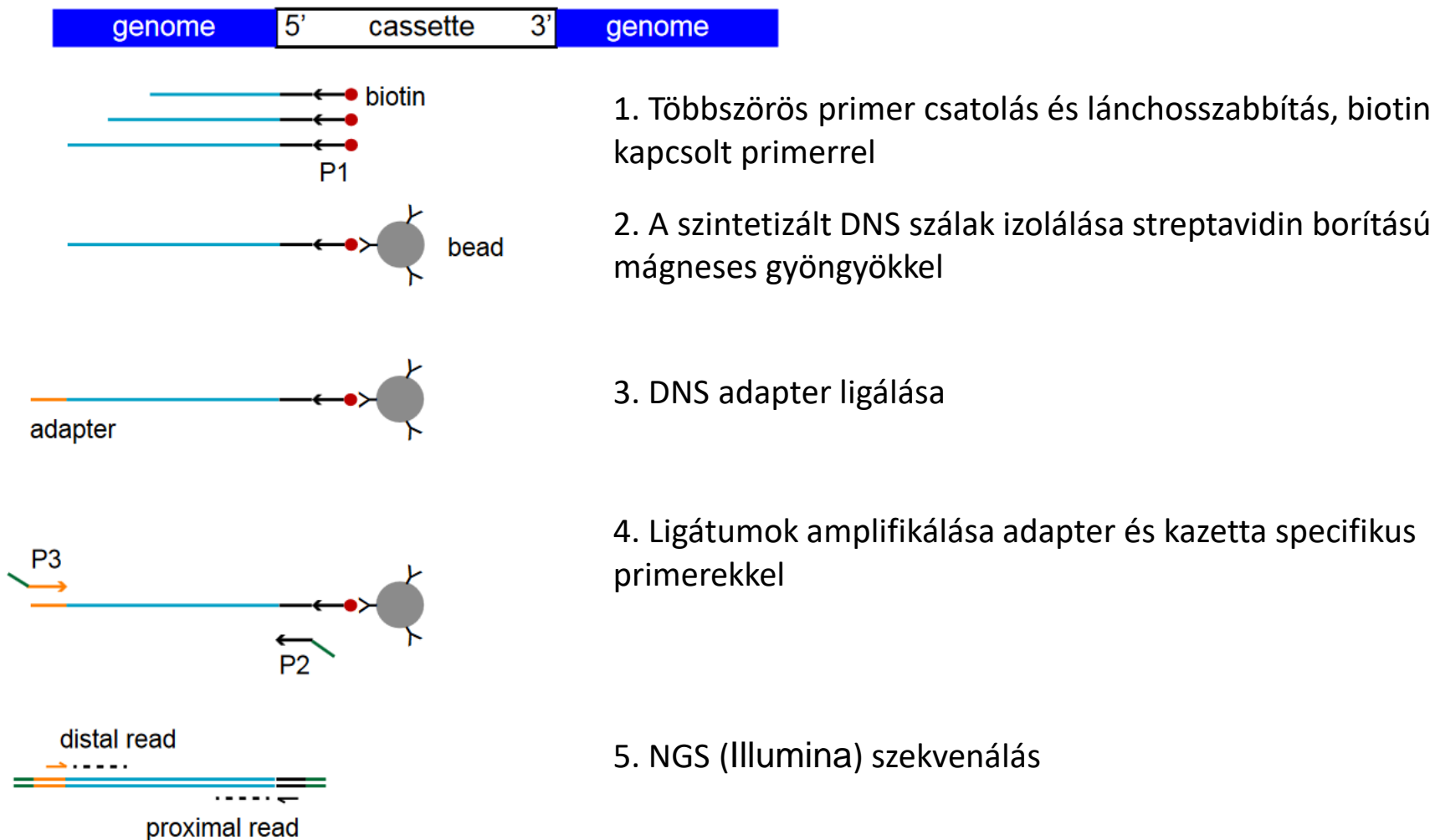
- mikrobiológiai módszerekkel tenyészthető
- sejtciklus ~ 24 h
- fotoszintézis, sejtciklus, flagellum, stb. kutatásban régóta sikeresen használt modell



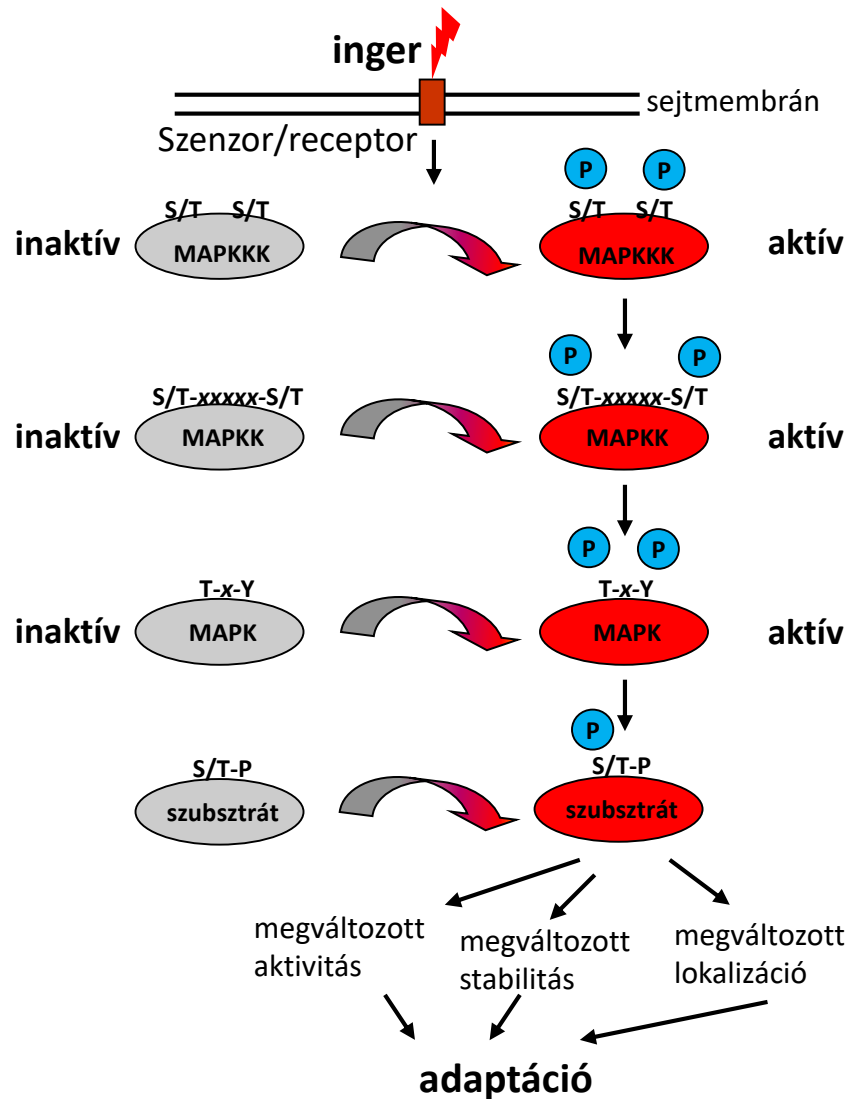
- hatékony transzformáció (plazmid DNS bejuttatása elektroporációval)
- kis genom méret (haploid, 120 Mb, 17 kis kromoszóma, 15 000 gén)
- teljes genom szekvencia ismert 2007 óta

Chlamydomonas reinhardtii inszerciós mutáns könyvtár: Plant Cell 2016 28:367-87.

LEAP-Seq (Linear and Exponential Amplification of insertion site sequence coupled with Paired-end Sequencing)



A MAP (mitogén aktivált protein) kináz kaszkádok alapvető fontosságú jelátviteli mechanizmusok minden eukariótában



A hideg és sötétben központi szabályozó mitogén-aktivált protein kináz kináz, MKK2 funkciójának igazolása transzgénikus kísérleti technikákkal

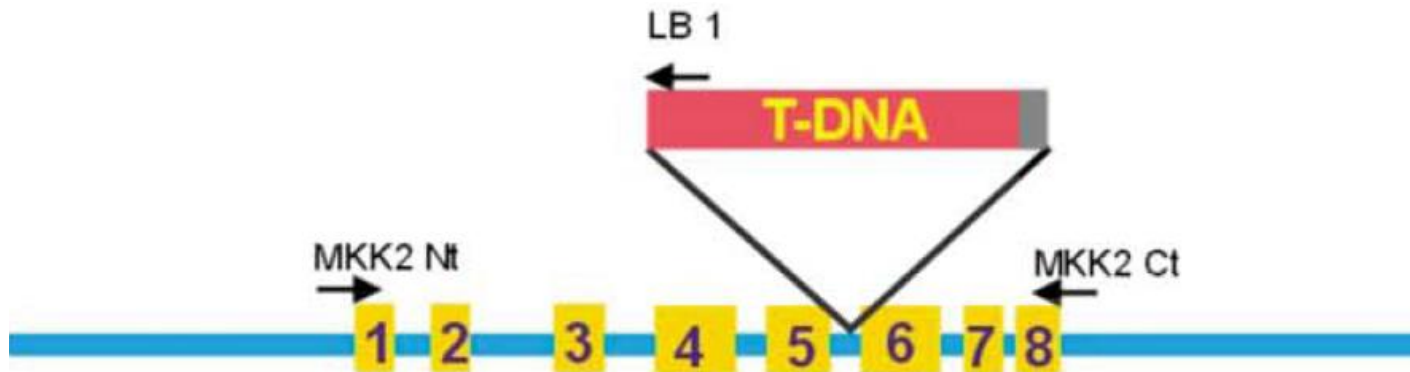
A felhasznált transzgénikus növényanyagok:

MKK2 túltermelő



myc epitóp fúzió: a transzgénről keletkező fehérje egyszerű kimutatására (MKK2 antitest termeltetése nélkül)

mkk2 knockout:



A hideg és sötétben központi szabályozó mitogén-aktivált protein kináz kináz, MKK2 funkciójának igazolása transzgénikus kísérleti technikákkal



A knockout és a túltermelő vonalak ellentétes fenotípust mutatnak!



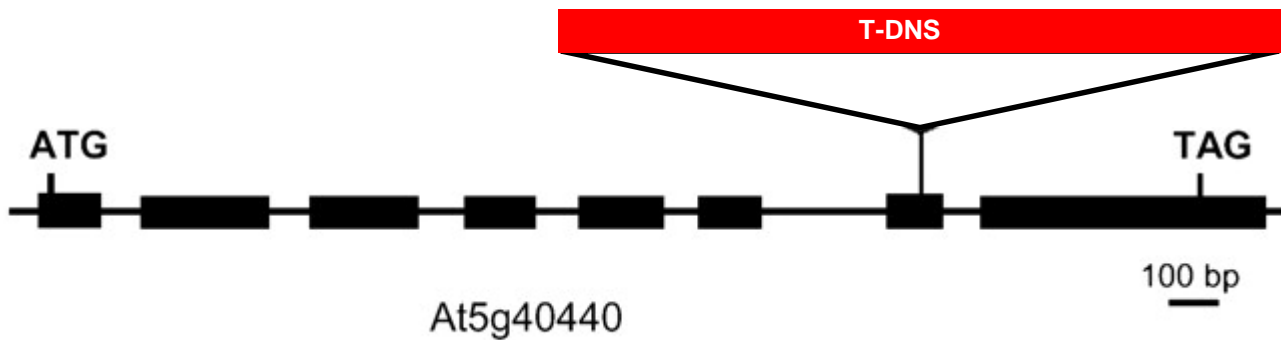
A patogénaválaszban központi szabályozó mitogén-aktivált protein kináz kináz, MKK3 funkciójának igazolása transzgénikus kísérleti technikákkal

A felhasznált transzgénikus növényanyagok:

MKK3 promóter GUS riporter fúzió:



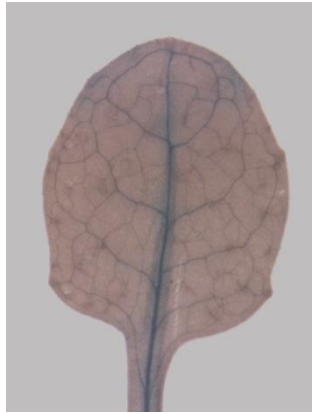
mkk3 knockout:



MKK3 túltermelő:



A patogénválaszban központi szabályozó mitogén-aktivált protein kináz kináz, MKK3 funkciójának igazolása transzgénikus kísérleti technikákkal



kontroll

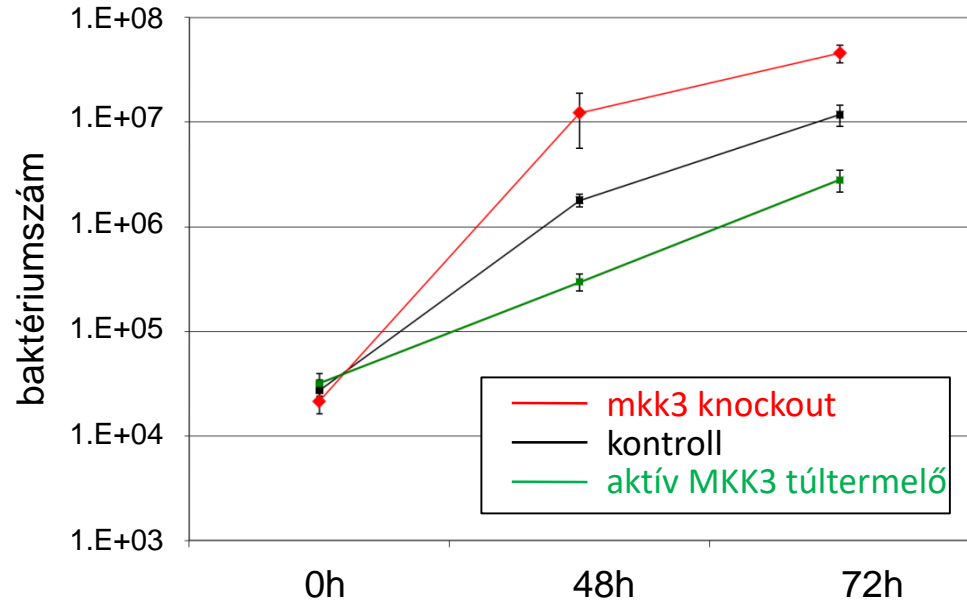


Pseudomonas syringae fertőzés

***ProMKK3:GUS* transzgénikus növények:** a promóter erősen indukálódik bakteriális fertőzés hatására – más stresszekre nem

Korrelatív természetű indikáció: valószínű funkció a patogénválaszban

Patogén baktériumok szaporodása levélmintákban *Pseudomonas syringae* fertőzés után



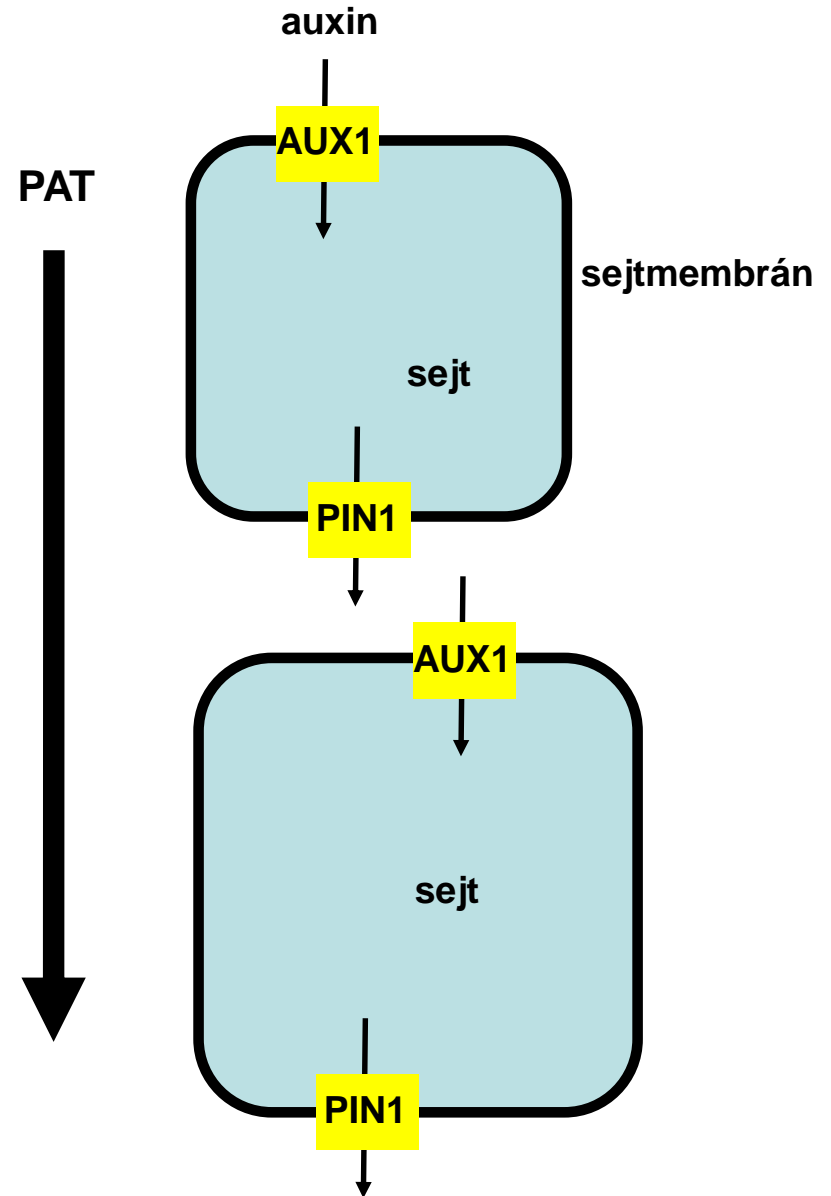
Gyorsabb bakteriális növekedés a knockout, míg lassabb a konstitutívan aktív MKK3 formát túltermelő vonalakban.

A poláris auxin transzport mechanizmusinak feltérképezése: példa a génfúziós riporterkonstrukciók használatára

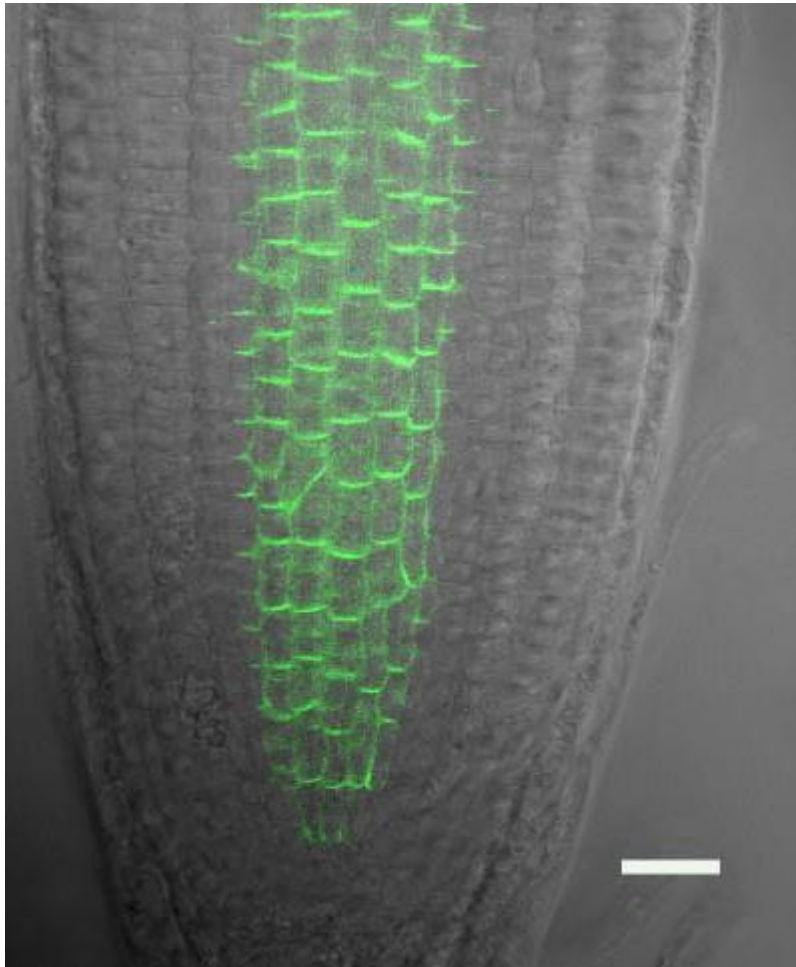
Auxin: növényi növekedési hormon, kulcsfontosságú a szervek normális morfológiai felépítéséhez.

Poláris Auxin Transzport (PAT): az auxin egyirányú aktív áramoltatása, a következtében kialakuló auxin koncentráció maximumok és minimumok irányítják a szervfejedési mintázatok kialakulását.

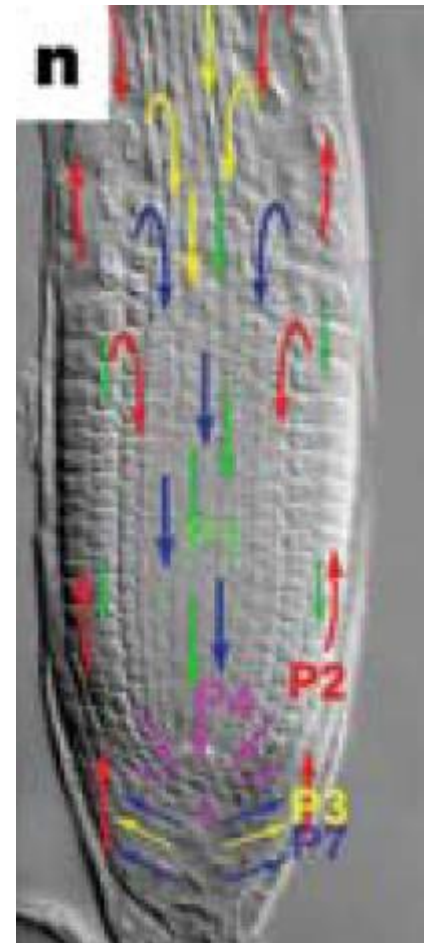
PAT kialakítását **auxin transzporter fehérjék** végzik, pl. PIN.



A poláris auxin transzport mechanizmusinak feltérképezése: példa a génfúziós riporterkonstrukciók használatára

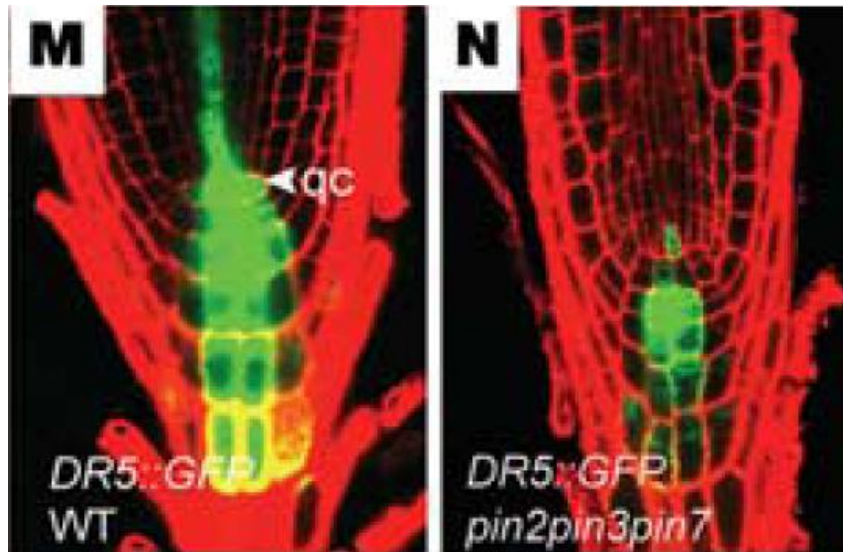


ProPIN1:PIN1:GFP fúziós konstrukció – a PIN1 expresszió a gyökér szállítószövetre korlátozódik, sejten belüli lokalizációja poláris



A PIN géncsalád sejt-specifikus expressziós mintázata és lokalizációja alakítja ki a PAT útvonalait

A poláris auxin transzport mechanizmusinak feltérképezése: példa a génfúziós riporterkonstrukciók használatára



ProDR5::GFP fúziós konstrukció – auxin rezszonzív promóter: magas auxin koncentráció indukálja.

A fejlődő gyökerek gyökércsúcsában kialakuló jellegzetes auxin maximumot jelzi.

pin2pin3pin7 tripla mutánsban az auxin maximum kialakítása sérül, ami gyökérfejlődési abnormalitásokhoz vezet.

Tudástranszfer:

T-DNS kollektciók készítése más fajokban is megkezdődött
feltétel: szekvenált genom – pl. rizs, *Brachypodium* (modell gabona)

ismert gének (pl. *Arabidopsis* ortológok) túltermelése vagy csendesítése
gazdasági növényekben

Géncsendesítési módszerek közül jelenleg a leghatékonyabb: mesterséges mikro
RNS (amiRNA) konstrukció bejuttatása

WMD3 Web MicroRNA Designer:

90 növényfaj – egyedi vagy több gén ellen tervezhető amiRNA szekvenciák

<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>

géncsaládok párhuzamos csendesítésére is alkalmas technika
Arabidopsis KO vonalak keresztezése redundáns gének funkcionális vizsgálatára
bevett gyakorlat



ONCOMPASS™
CANCER TREATMENT STRATEGIES

Köszönöm a figyelmet!

robert.doczi@oncompassmedicine.com

www.oncompassmedicine.com