

Génazonosítás módszerei a növényekben

BME Transzgénikus organizmusok

Dr. Éva Csaba

Tudományos főmunkatárs

ATK MGI, Martonvásár

2019. szeptember 26.

Két fő megközelítés

- Forward genetika – egy fenotípusért felelős háttér (gén/gének/mutáció) azonosítása
 - Mitől szárazságtűrőbb a Plainsman V búzafajta, mint a Capelle Desprez?
- Reverz genetika – az ismert gén, mutáció funkcióját keressük, hatását a fenotípusra

Génazonosítás céljai

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

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



Gén

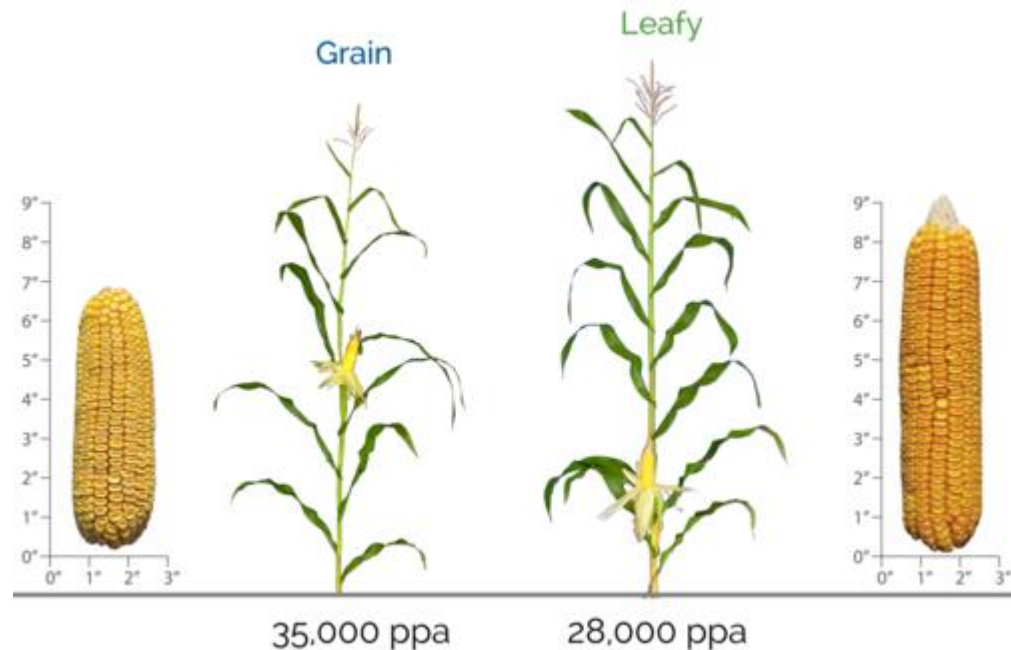
- Az öröklődés egysége
- Tulajdonságot határoz meg
- A genom kódoló része (~1% eukariótáknál)
 - Fehérje
 - tRNS
 - rRNS
 - miRNS
 - siRNS
 - Stb.
- Nem kódoló részek – „junk DNA”-elavult elnevezés

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



Jellegek

- Minőségi jelleg: 1-2 génes, a környezettől kevésbé függ a kialakulásuk. Példa: leafy gén (silókukorica)
- Mennyiségi jelleg: Quantitative trait loci (QTL), pl. termőképesség



Forward genetikai módszerek

- DNS-alapú módszerek
 - Genetikai térképezés
 - Random mutagenézis (TILLING, EcoTILLING, T-DNS inszerció)
 - Teljes genom szekvenálás

- Génexpressziós mintázatok elemzése
 - cDNS-könyvtár készítése
 - Microarray
 - Transzkriptom szekvenálás
 - Proteom elemzése



Genetikai térképezés

- A géntérképezés során a gének egymástól való távolságát, a genomban való viszonylagos elhelyezkedésüket határozzuk meg a teljes genom szekvenálása nélkül.
- A géntérképezés során populációgenetikai adatok is felhasználhatók. Nem szorította ki a teljes genom szekvenálás, inkább kombinálják az új generációs szekvenálós módszerekkel.

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: $Yy Ry \times P2: yy rr$

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

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

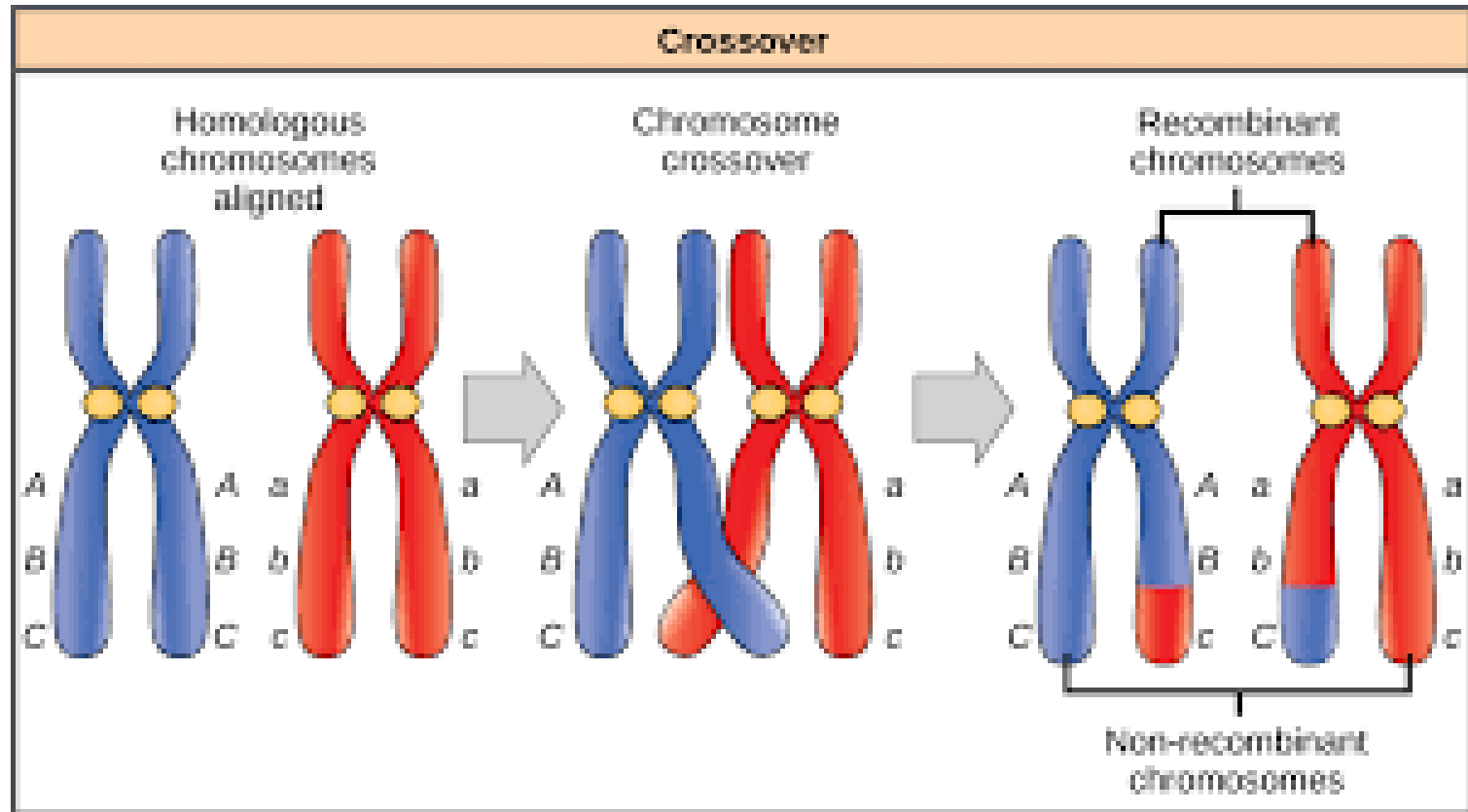
6.5. táblázat. Az $A/a; B/b \times a/a; b/b$ tesztelő keresztezésből származó utódok geno- és fenotípusa. Az A/a és az B/b allélok ugyanannak a kromoszómának a részei, kapcsolatosan öröklődnek.

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.

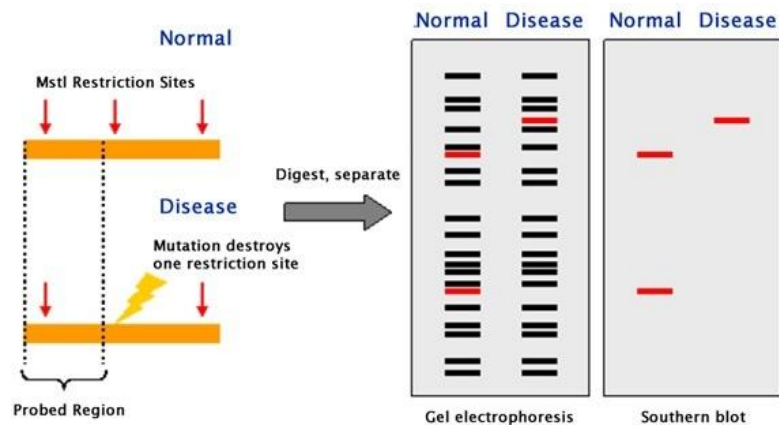
¹ = egy példa.

Crossing over



Korábbi genom vázak

- RFLP (restriction fragment length polymorphism)
 - Genom hasítása restrikciós endonuklázokkal
 - Blottolás membránba
 - Southern-hibridizáció jelölt próbával



- RAPD (random amplified polymorphic DNA)
 - PCR rövid általános primerrel

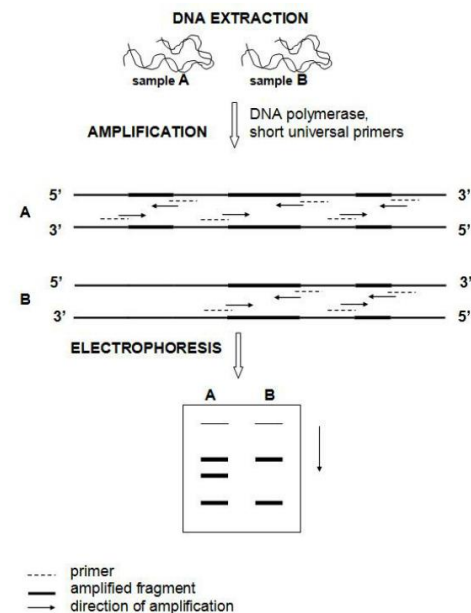


Table 1. Summary and comparison of SNP identification methods

Method for SNP identification	Prerequisites	Current false discovery rate (%)	Specifics, limitations
EST sequence data	Large number of available EST-sequences	15–50	Dependent on the expression level or need for normalized libraries, difficulties in the discrimination of orthologous from paralogous sequences, low sequence quality
Array analysis	Unigene sets based on EST-sequences, array technology	>20	Not all SNPs identified, large genomes require complexity reduction
Amplicon resequencing	Unigene sets based on EST-sequences, amplification primers for many individual genes	<5	High reliability but costly, detailed haplotype analysis possible, many lines can be compared, allele frequency data with pools of DNA
No genomic sequence and next-generation sequencing technologies	Novel sequencing technologies, complexity reduction methods, bioinformatic tools	15–25	Generates large amounts of data, costly bioinformatics, false discovery rate for genomes without full sequence is relatively high
Genomic sequence is available either through conventional sequencing or next-generation sequencing	Reference genome, bioinformatic tools	<5–10	Small genomes can be fully sequenced and compared for SNPs, for large genomes targeted approaches will be necessary (e.g. exon capture and multiplex amplification)

SNP detekció

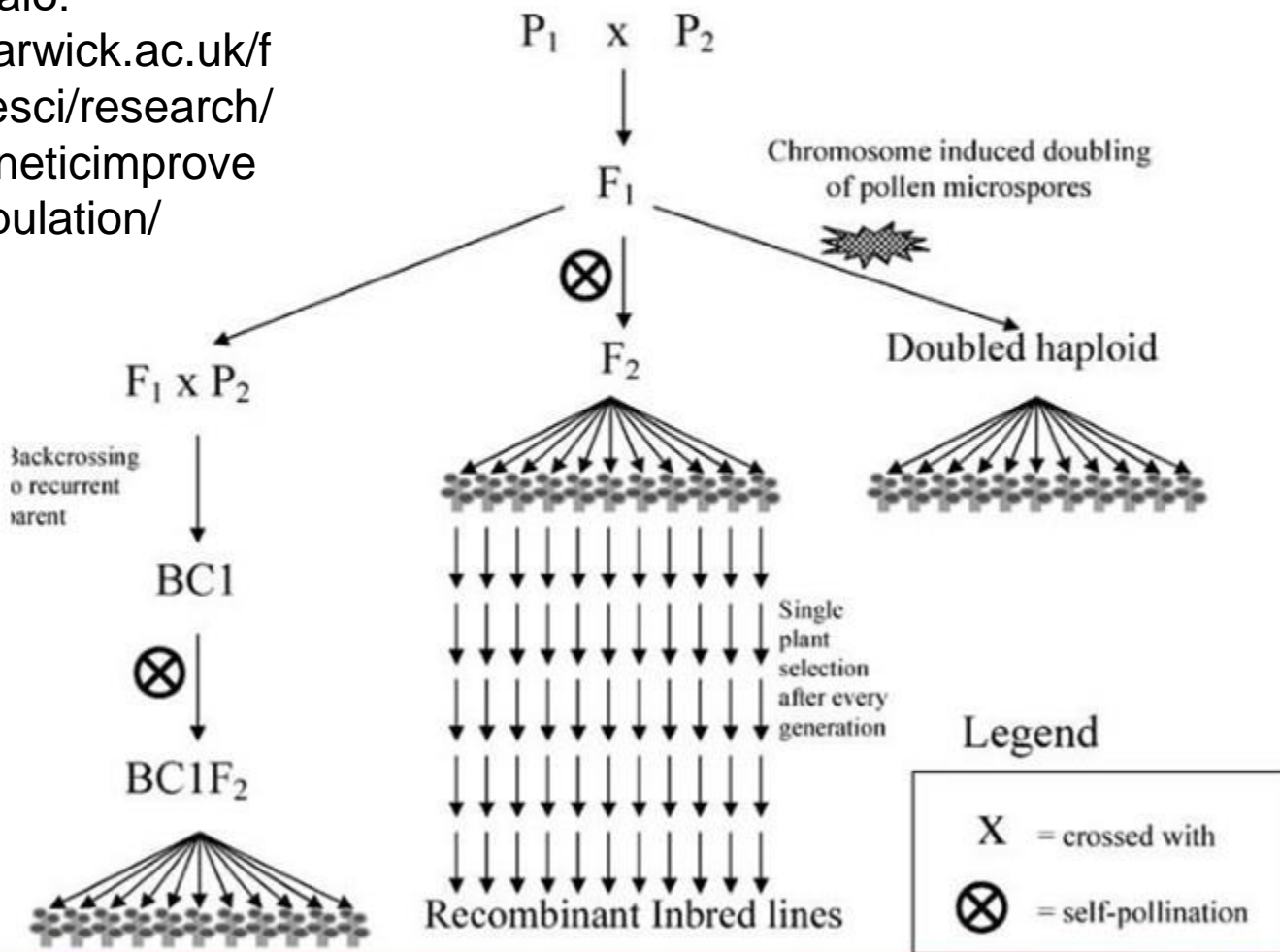
- Ganai és mtsai. Curr Opin Plant Biol 2009
- Az SNP-térképek kezdik kiszorítani a mikroszatellita térképeket
- Ha van SNP-chip a fajra, vizsgálható az összes SNP

2019. szeptember 26.
Éva Csaba

Öntermékenyülő növények térképezési populációinak főbb típusai

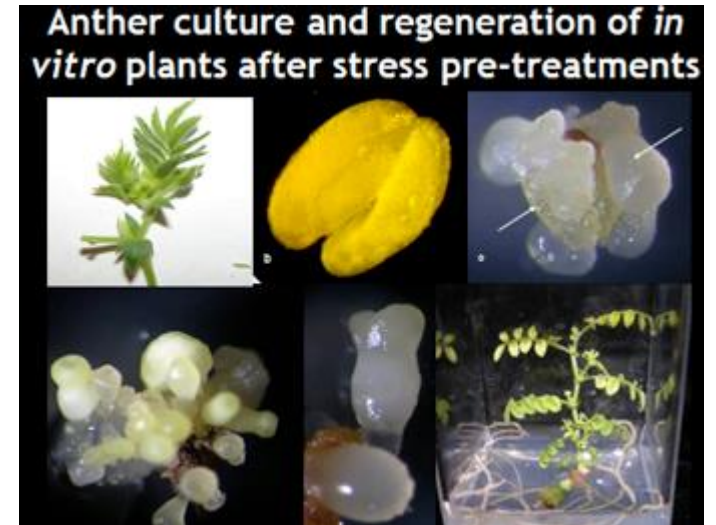
Olvasnivaló:

<https://warwick.ac.uk/fac/sci/lifesci/research/vegin/geneticimprovement/population/>



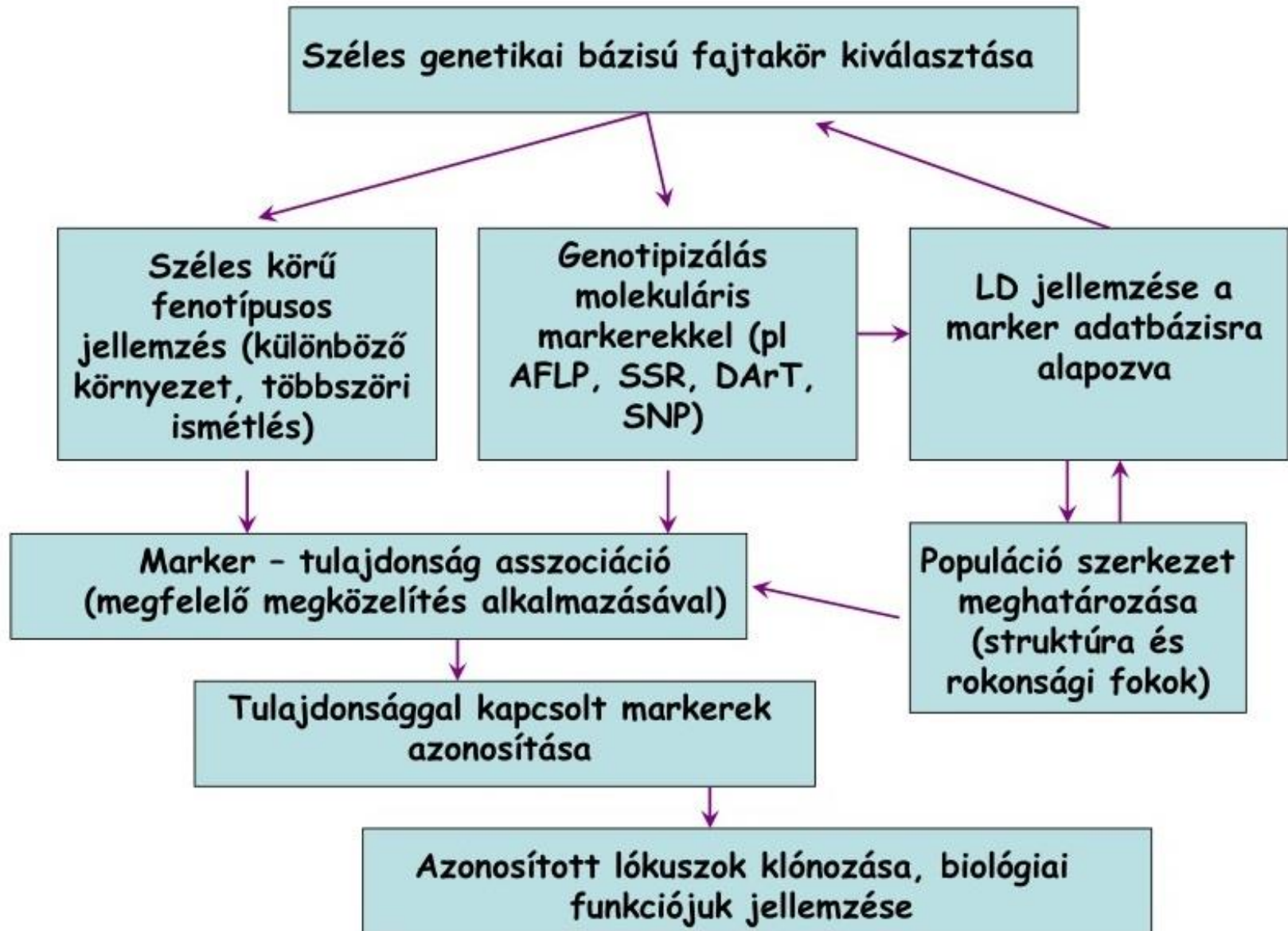
Dihaploid technika

- Pollen mikrospóra-szövettenyésztés, 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>



Asszociációs térképezés

- A két szülő térképező populáció előállítása munkaigényes és csak a két szülő génjeinek vizsgálatára van mód (QTL mapping, biparental mapping)
- Az asszociációs térképezésnél (association mapping, GWAS – genomwide association study) széles genetikai bázisú fajtakör információja használható fel, kell adat a szülőfajtakról is
- Alapja: linkage disequilibrium (LD): egyes fenotípusok kapcsolnak bizonyos SNP vagy SSR markerekkel. Nemrég kerültek be, még nem szegregálódtak el.
 - Fenotipizálás
 - Genotipizálás (SNP vagy SSR térkép)
 - Statisztika



Példa térképezésre

- Börner és mtsai. Theor Appl Genet 2002: Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.)
 - Két szülő térképezés
 - Fenotipizálás, majd pl. virágzási időt, növénymagasságot, ezerszemtömeget meghatározó QTL-ek térképezése mikroszatellita térképre
- Pandit és mtsai. Mol Genet Genomics 2010: Combining QTL mapping and transcriptome profiling of bulked RILs for identification of functional polymorphism for salt tolerance genes in rice (*Oryza sativa* L.)
 - Két szülő: egy sótüdő és egy sóra érzékeny fajta
 - Fenotipizálás
 - SSR térképezés: SSR-ek PCR-ezése és szekvenálása
 - SNP-térképezés: SNP chip
 - A 10. kromoszóma egy régióján talált QTL-ek egybevágnak a szakirodalommal: Na-felvételt és hajtáshosszt meghatározó gének vannak itt

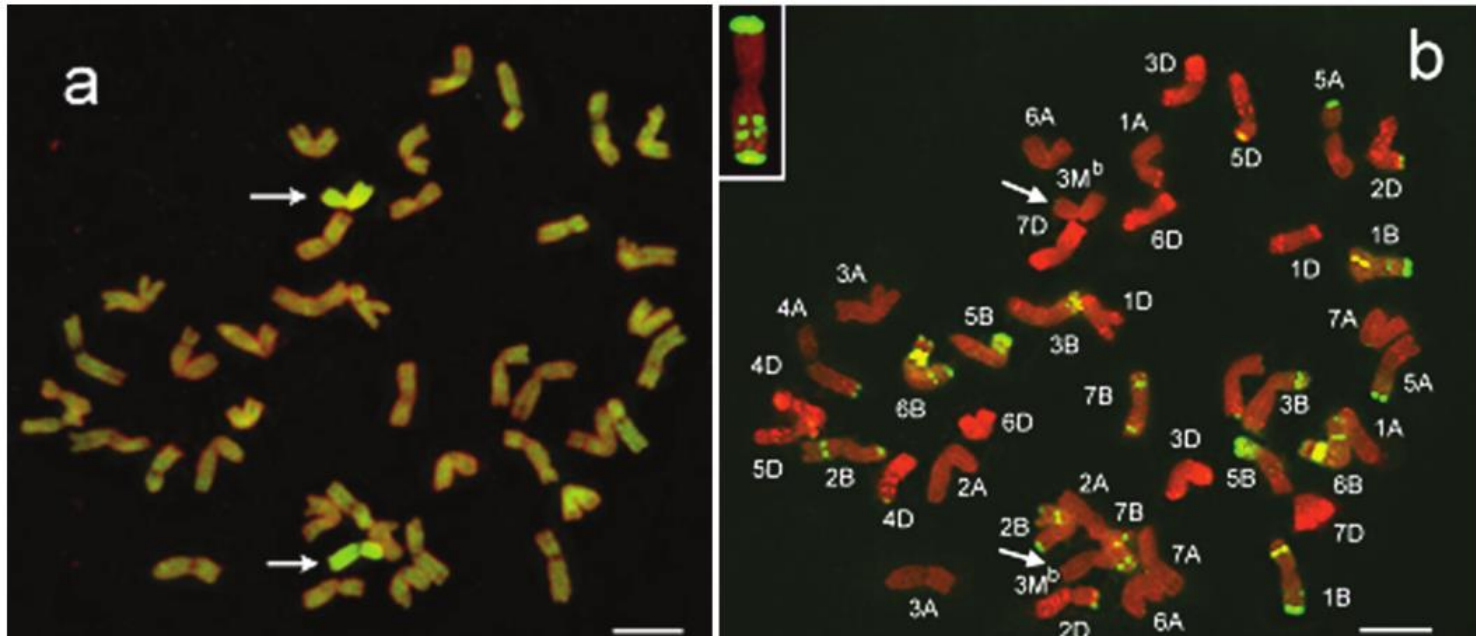
Példa térképezésre

- Zitzewitz és mtsai. The Plant Genome 2010:
The Genetics of Winter hardiness in Barley:
Perspectives from Genome-Wide Association
Mapping
 - Asszociációs térképezés, 148 genotípus
 - Fenotipizálás: fagyűrés
 - SNP chip, számítógépes elemzés
- Ademe és mtsai. Mol Genet Genomics 2017:
gyapot hozamával és a rost minőségével
összefüggő QTL-ek asszociációs
térképezése SSR térképhez

Térképezés haszna

- Nemesítés, marker assisted selection vagy 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.



Génszekvencia információ térképezésből

- ISSR PCR: (inter-short sequence repeat PCR) mikroszatellita markerek közötti rész felPCR-ezése: vektorba klónozható és szekvenálható
- Az SNP-k kódoló génben is lehetnek
 - Lu és mtsai. PNAS 2010: szárazságtűréssel összefüggő QTL-ek térképezése SNP térképhez kétszülős térképező populációkból
 - Az SNP chipeket gén-jelöltekhez rendelték
- Genotyping by sequencing (Elshire, 2011 Plos One)
 - Két szülős térképező populációkon és dihaploid vonalakon végezték
 - Genomi DNS hasítása, a repetitív régiók elkerülése: genom méret csökkentése
 - Adaptor ligálása, szekvenálás
 - Több 10 ezer – több 100 ezer EST térképezése
 - Olcsó, gyors, nem kell előzetes genom információ
 - SNP-k felderítését segíti, az új generációs szekvenálás és a térképezés kombinációja

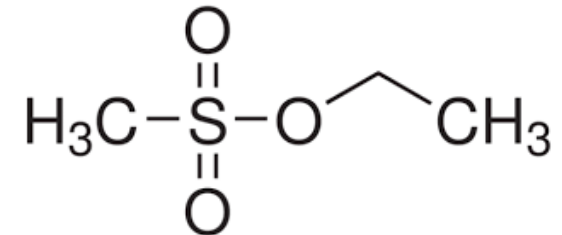
Forward genetikai módszerek

- DNS-alapú módszerek
 - Genetikai térképezés
 - Random mutagenézis (TILLING, EcoTILLING, T-DNS inszerció)
 - Teljes genom szekvenálás
- Génexpressziós mintázatok elemzése
 - cDNS-könyvtár készítése
 - Microarray
 - Transzkriptom szekvenálás
 - Proteom elemzése



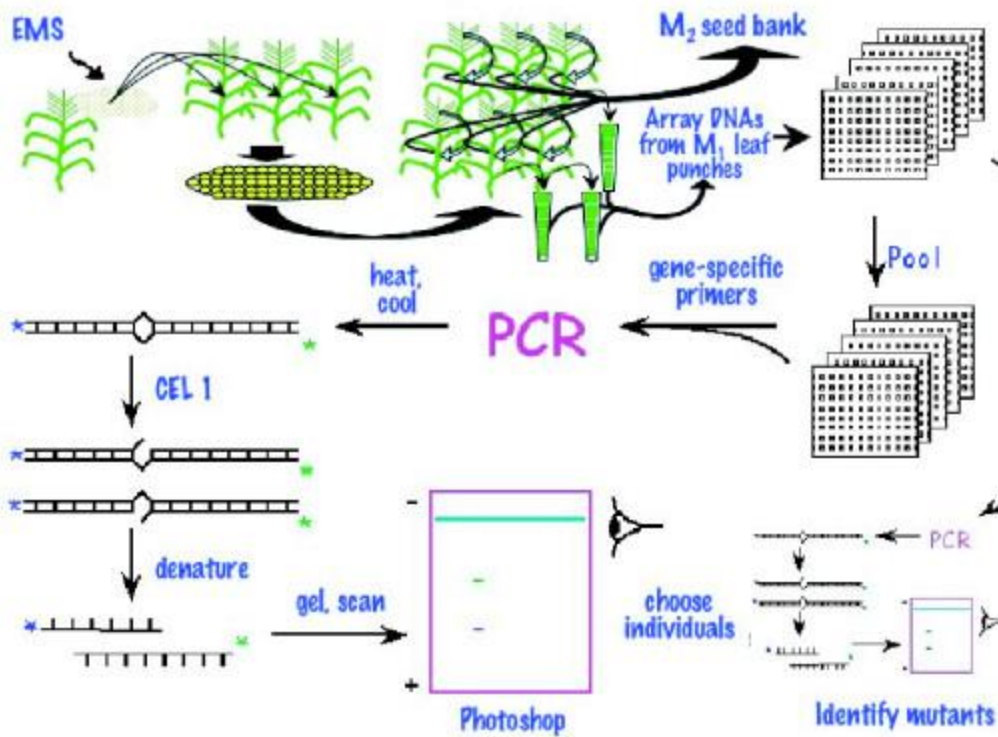
Gén kiütése – mesterséges mutációs populációk

- 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)



Génkiütés – TILLING

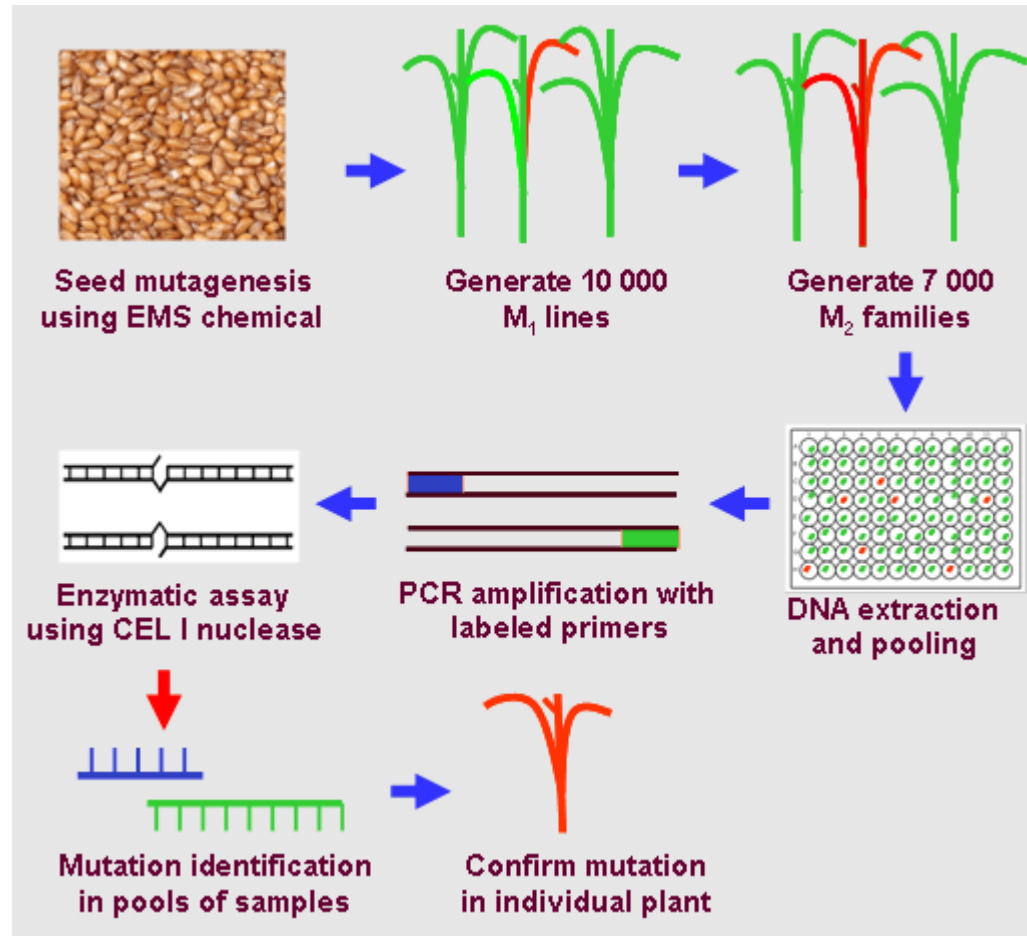
Till és mtsai. BMC Plant Biol. 2004



Schematic diagram of maize TILLING: Fresh pollen is collected and mutagenized with ethylmethanesulfonate (EMS). Pollen is then applied to silks of wild-type plants from the same genetic background. Seeds from the resulting ears are grown into plants of the M₁ generation. Plants of this generation are heterozygous for any induced mutation. Tissue is collected either from each M₁ plant or from approx. 10 M₂ siblings from the M₁ self cross. M₃ seed is generated by randomly intermating 10–12 M₂ siblings. This M₃ seed serves as the seed stock for future studies. DNA is extracted from collected tissue and samples are pooled to increase screening throughput. For mutation detection, sequence specific primers are used to amplify the target locus by PCR. Following amplification, samples are heat denatured and reannealed to generate heteroduplexes between mutant amplicons and their wild-type counterparts. Heteroduplexes are cleaved using CEL I endonuclease and are visualized using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. See reference [34] for further details



Génkiütés – TILLING



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



TILLING – a módszer

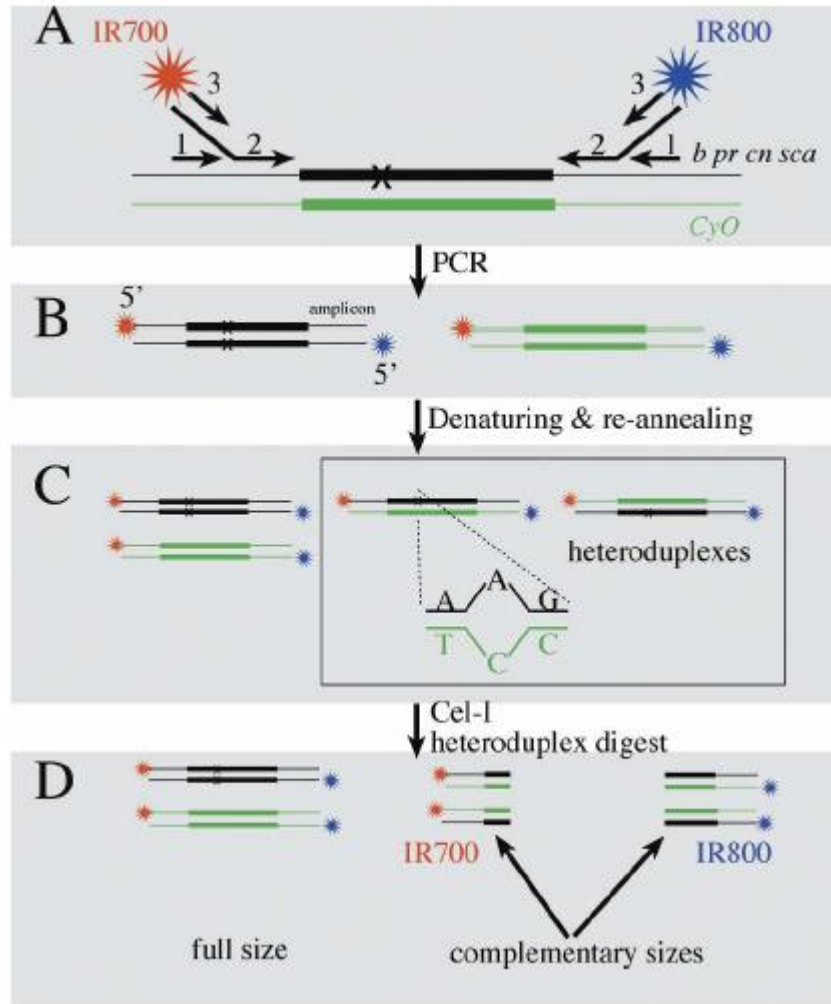


Figure 1. Cel-I-based Tilling strategy. We prepared a genomic DNA library from the mutagenized *b pr cn sca/CyO*, *hb-lacZ* fly lines and performed a three-step (1,2,3) nested PCR reaction (A) for a particular gene of interest. The third PCR reactions included the IRDye700 (red) and IRDye800 (blue) fluorophores 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

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)

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.

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



Forward genetikai módszerek

- DNS-alapú módszerek
 - Genetikai térképezés
 - Random mutagenézis (TILLING, EcoTILLING, T-DNS inszerció)
 - Teljes genom szekvenálás
- Génexpressziós mintázatok elemzése
 - cDNS-könyvtár készítése
 - Microarray
 - Transzkriptom szekvenálás
 - Proteom elemzése

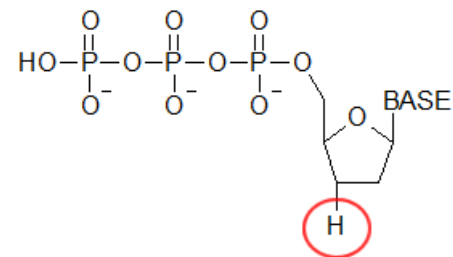
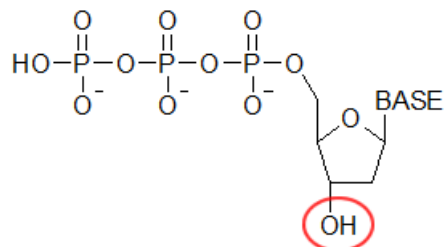


Genom projektek

- 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)

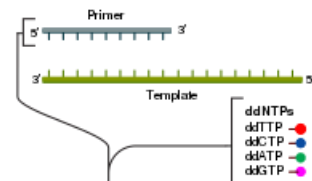
Sanger-szekvenálás (1977)

- 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 és drága

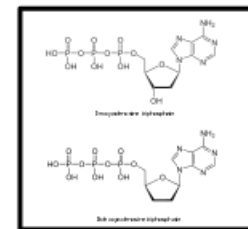
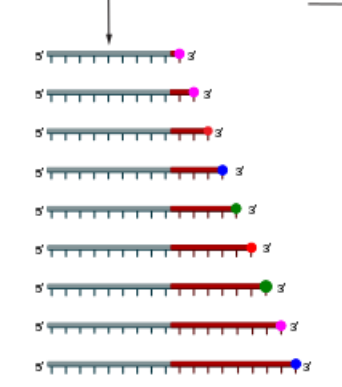


1 Reaction mixture

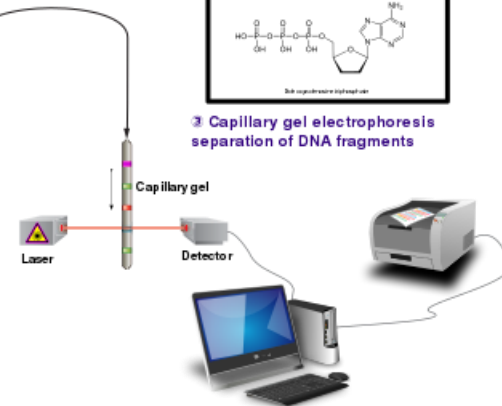
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



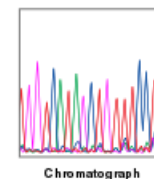
2 Primer elongation and chain termination



3 Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

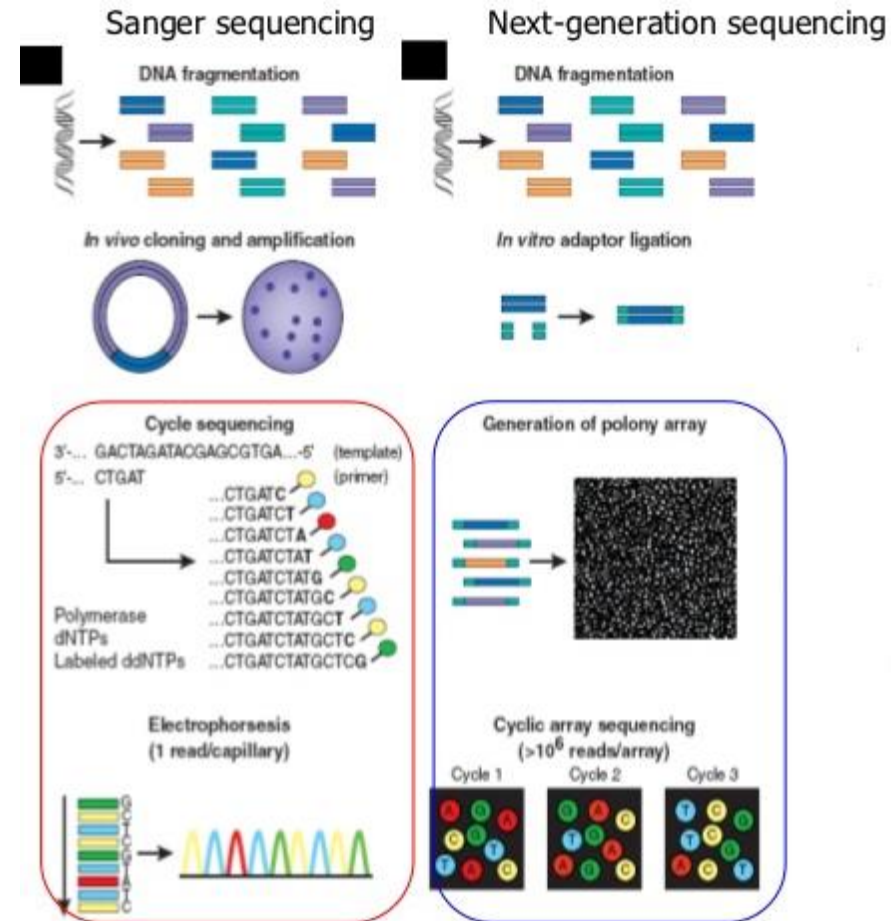


4 Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



Új generációs DNS-szekvenálások

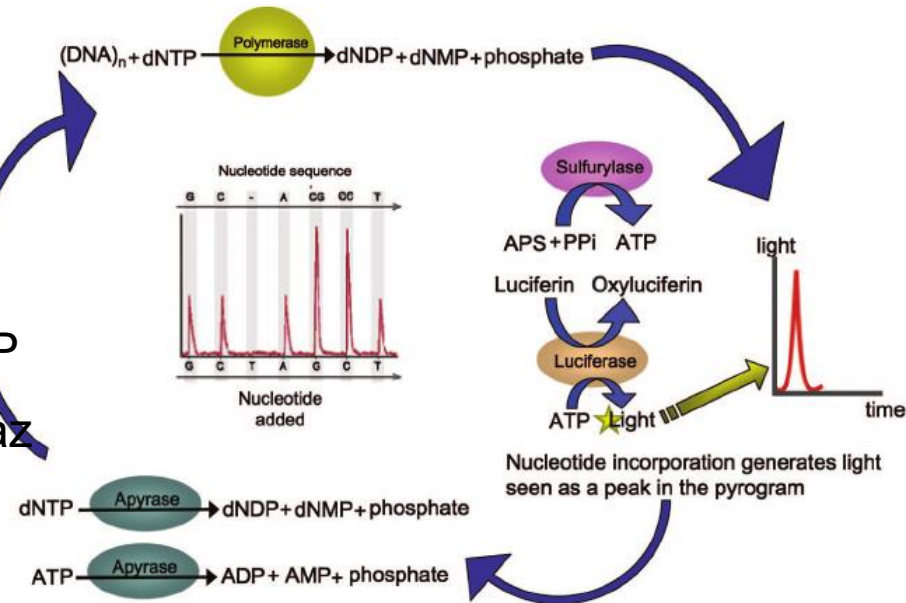
- Párhuzamosan sok, akár millió minta szekvenálása (HTP: high-throughput vagy massively paralel sequencing)
- Vektorba klónozás nincs, homogén templát megoldása: fragmentálás, emulziós PCR
- Szekvencia valós időben (reakció közben)



Új generációs DNS-szekvenálások

- Piroszekvenálás (automatizálva: 2005, 454 Lifesciences)

- Emulziós PCR, a cseppek bejuttatása száloptikás 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 adenzin-5 foszfoszulfátból (APS) az ATP szulfuriláz ATP-t gyárt, ha van ATP a luciferáz fényfelvillanással reagál, maradék ATP és dNTP elbontása apiráz enzimmel, ciklust ismételni



- Illumina/Solexa szekvenálás
 - Chip-en, felszaporítani az egyes darbokat, majd szintézis közben, reverzibilis terminátorokkal követni minden egyes bázis beépülését
- SOLiD (Sequencing by Oligonucleotid 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!

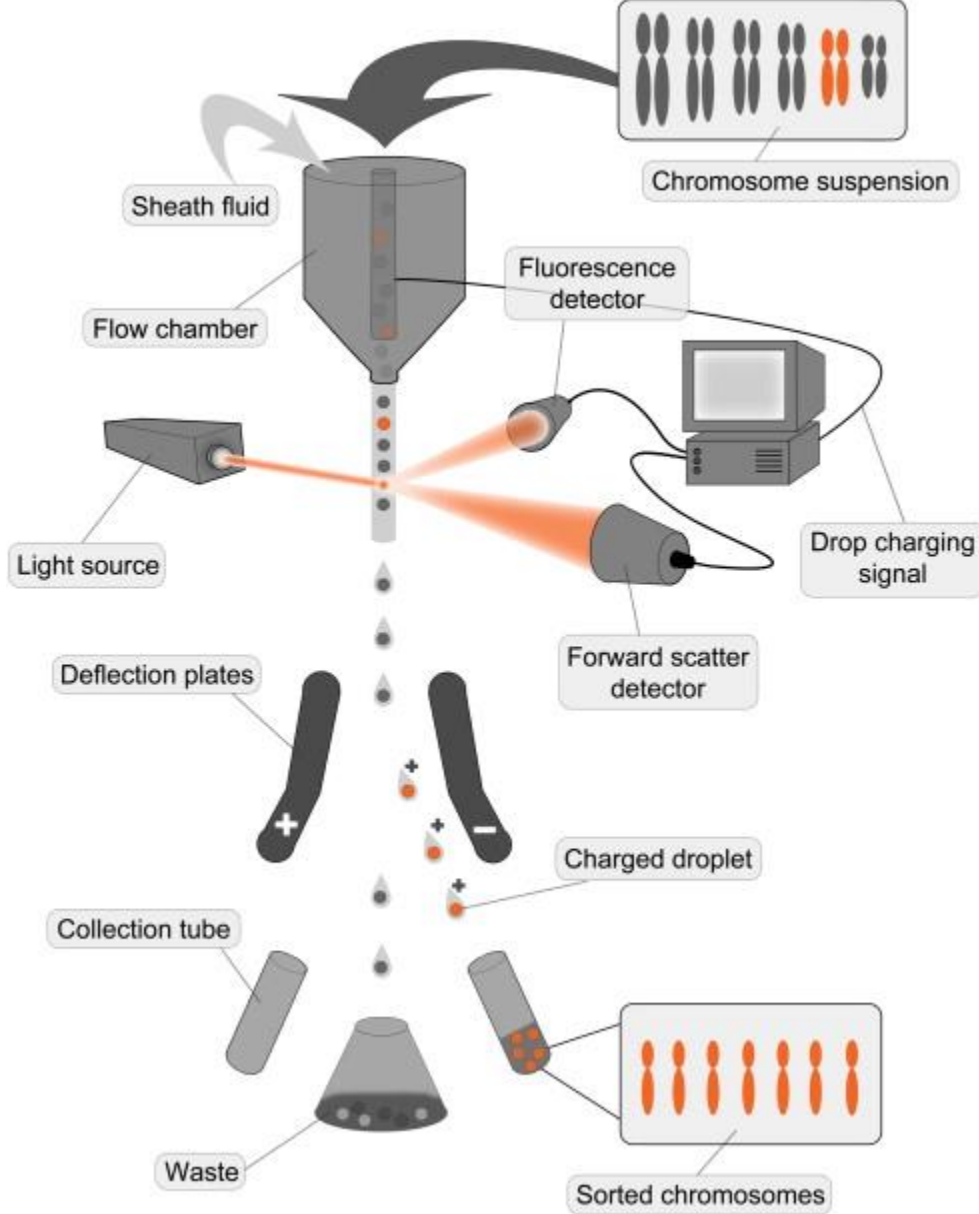
Csudálkozik Mehemed, ilyenek a tehenek? Számlálgatja Mehemed, hány félek a tehenek.

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

Nem tudta ezt Mehemed, s felrúgták a tehenek!

2019. szeptember 26.

Éva Csaba



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.

2019. szeptember 26.

Éva Csaba

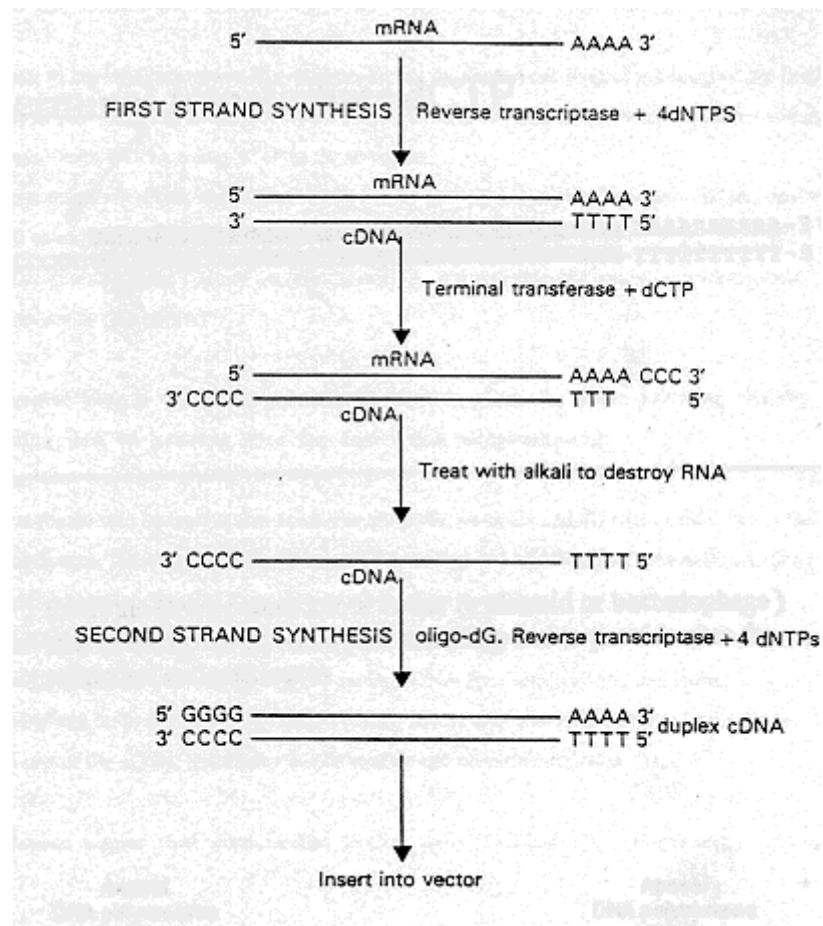
Forward genetikai módszerek

- DNS-alapú módszerek
 - Genetikai térképezés
 - Teljes genom szekvenálás
- Génexpressziós mintázatok elemzése
 - cDNS-könyvtár készítése
 - Microarray
 - Transzkriptom szekvenálás
 - Proteom elemzése



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

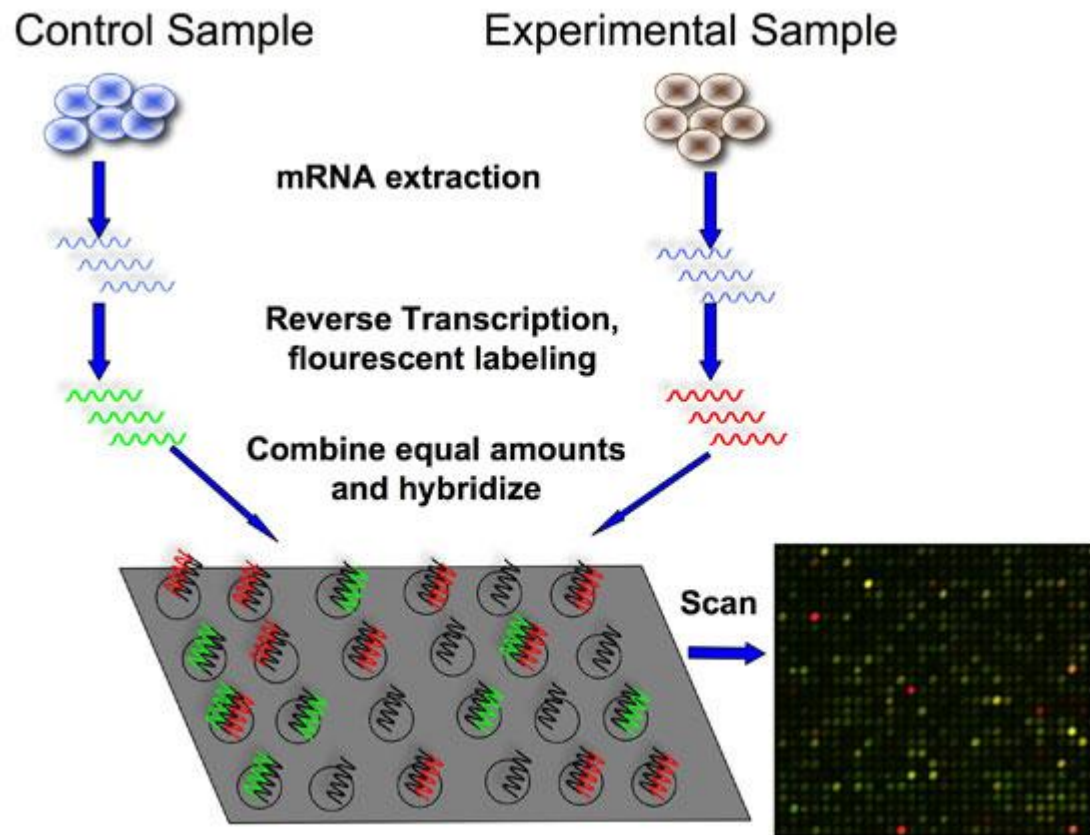


Könyvtár készítése helyett PCR-ezni is lehet a cDNS-en rokon szekvenciára tervezett primerekkel, majd klónozni és szekvenálni a PCR-terméket.



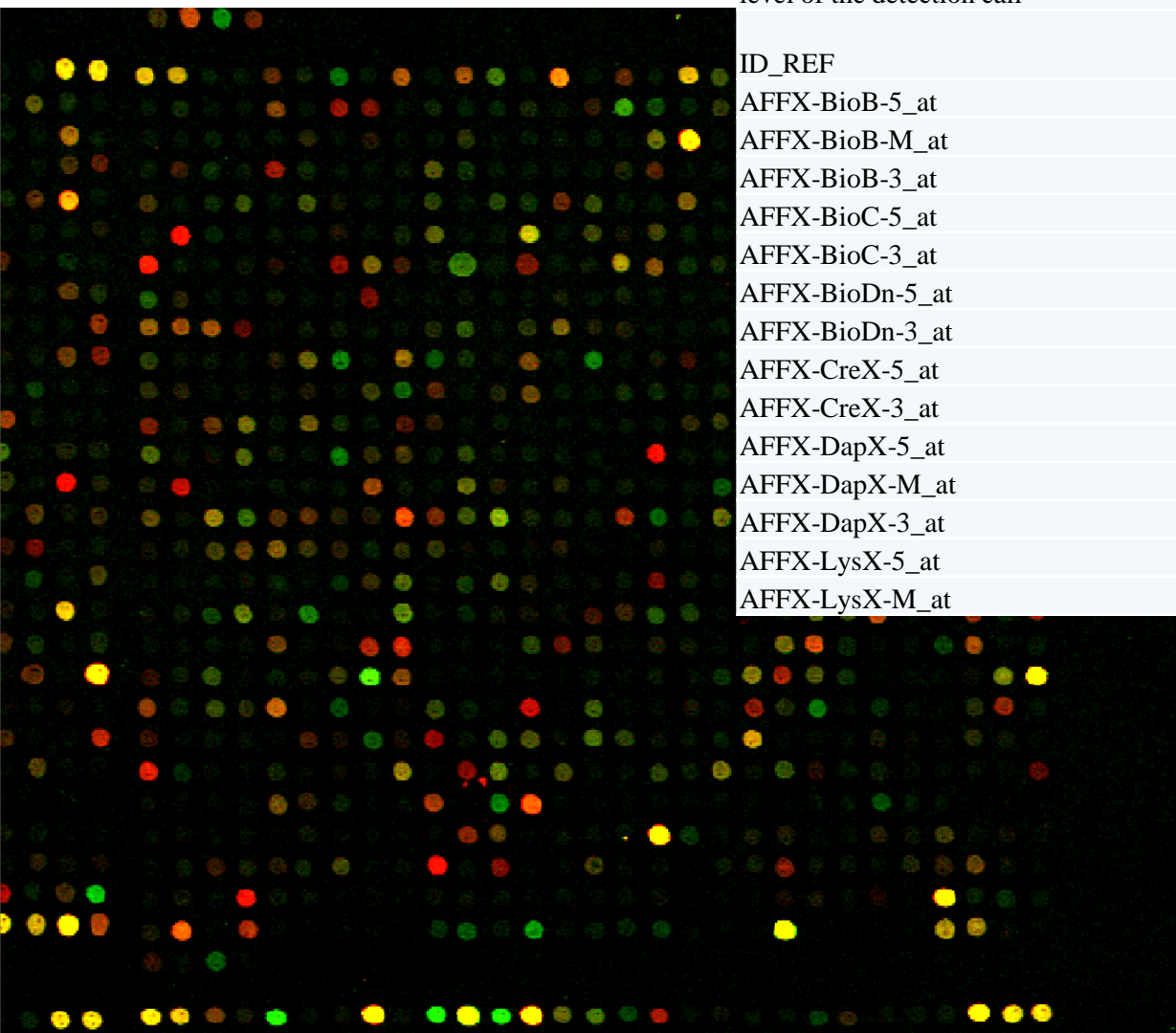
Microarray I.

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

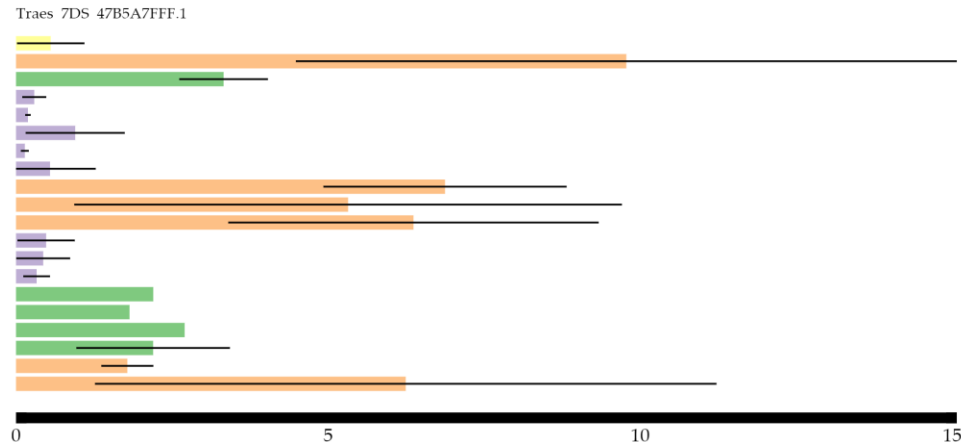
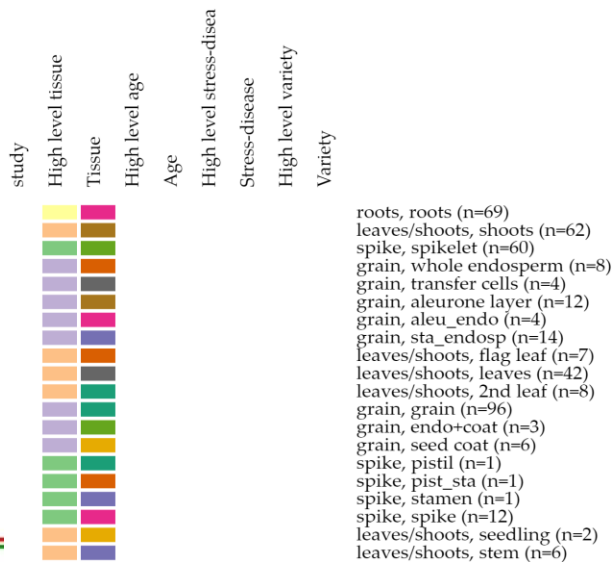
Methylglyoxal (MG) is a toxic metabolite produced primarily as a byproduct of glycolysis. Being a potent glycating agent, it can readily bind macromolecules like DNA, RNA, or proteins, modulating their expression and activity. In plants, despite the known inhibitory effects of MG on growth and development, 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/>



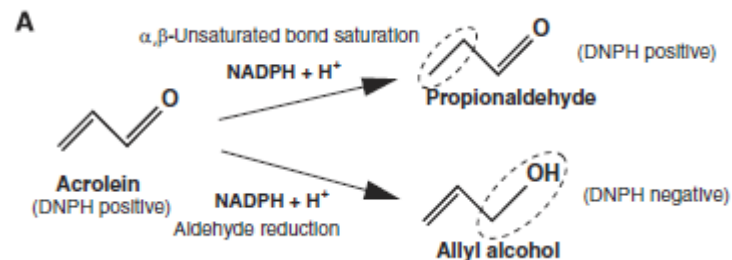
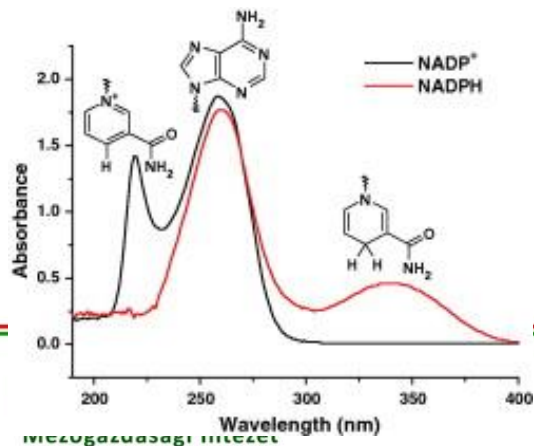
Forward genetikai módszerek

- DNS-alapú módszerek
 - Genetikai térképezés
 - Teljes genom szekvenálás
- Génexpressziós mintázatok elemzése
 - cDNS-könyvtár készítése
 - Microarray
 - Transzkriptom szekvenálás
 - Proteom elemzése



Fehérjekeresés, kiválasztás

- Cél: egy növényfaj vagy szövet vagy sejt-kompartment egy tulajdonságáért felelős fehérje izolálása
- Pl. növényi szövet össz. enzimaktivitása is értelmezhető, keressük a felelős enzimet. Mérés: NADPH koenzim fogyasztására 340 nm-en
 - Pl. 1 mg tök levél nyers fehérjekivonat 35 nmol akrolein-t redukál 1 perc alatt NADPH-val. (35 nmol/perc/mg fehérje enzimaktivitás: Yamauchi és mtsai. J. Biol Chem 2011)
- Kinyerés: össz. vagy kompartment, natív vagy denaturáló körülmények
 - Megfelelő puffer (ált. semleges közeli vagy enyhén lúgos)



Feltárás



Fehérjetisztítás

- Cél: a fehérjekeverékben a kívánt fehérje arányának növelése (pl. néhány ezrelékről közel 100%-ra)
- Nukleinsavak: egységes negatív töltés, szilika oszlopon általánosan tisztíthatók
 - Felszaporítási módszer is van: PCR, nyomnyi mennyiségek kimutatása is lehetséges
- Fehérjék: változatos töltés, vagy akár apolárisak, nincs egységes tisztítási módszer, általában több lépcső
 - Nincs felszaporító módszer, nagy mennyiségből kell kiindulni, hogy a végére is maradjon
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5368116/>



Fehérjetisztító módszerek

- Preparatív módszerek: nagy mennyiség (mg), további felhasználásra
 - Kisózás (ammónium-szulfát), vagy kicsapás PEG-el, szerves oldószerekkel, isoelectric precipitation
 - FPLC (ioncserérés kromatográfia, affinitás kr., reverz fázisú interakciós kr., gélszűrés)
- Analitikai módszerek: kis mennyiség (μg) azonosításra, kimutatásra, kristályosításra
 - Western blot
 - immunoprecipitáció
 - HPLC
 - 1D gél
 - 2D gél

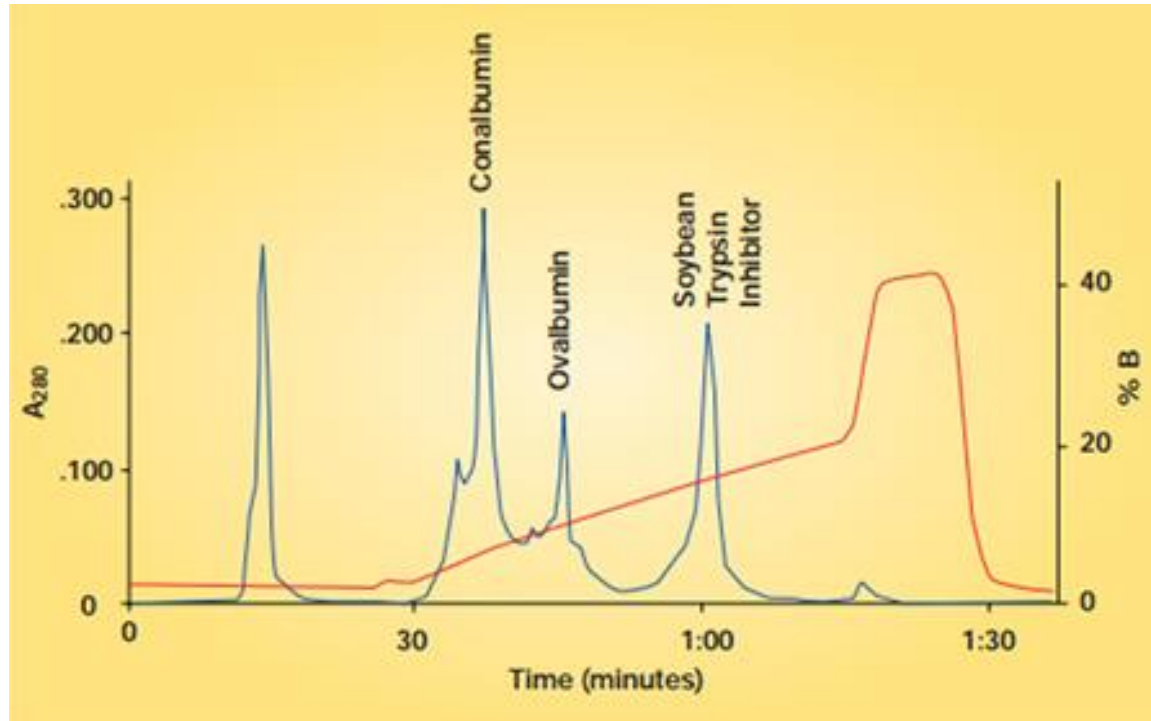


Kromatográfia

- Egy elegy szétválasztása komponensekre álló és mozgó fázis segítségével. A keverék tagjainak különböző oldékonysága ill. az álló fázishoz való kötődése alapján.
 - Mozgó fázis: fehérvérjénél ált. folyadék
 - Álló fázis: fehérvérjénél ált. oszlop
- Többféle oszloptöltet (agaróz, szilika, cellulóz), rajtuk ligandok
- Elúció: izokratikus, lépcsős, vagy gradiens
- Detekció: pl. UV, vezetőképesség
- Csúcs azonosítása standardok és retenciós idő alapján, vagy leszedjük és megfuttatjuk gélen, elküldjük tömegspektrometriára, N-terminális szekvenálásra



Kromatográfia



Ion Exchange Chromatography Workflow, Bio-Rad.

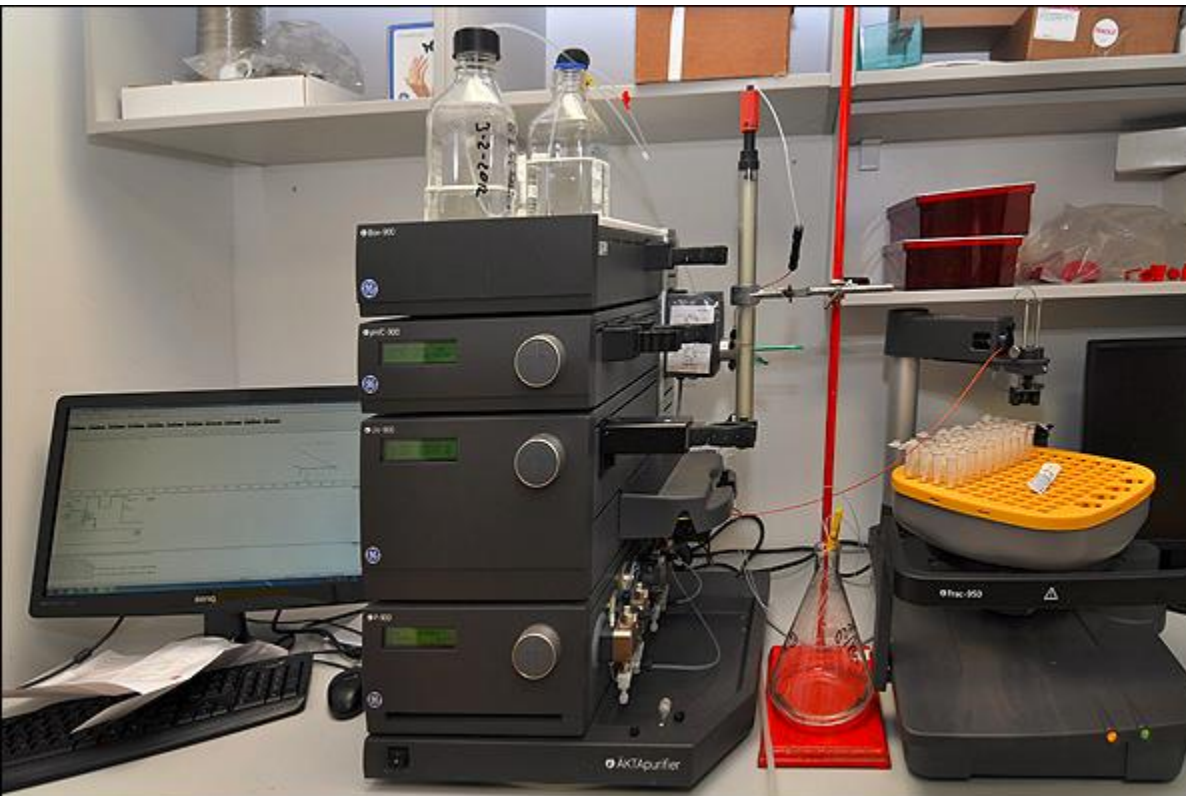
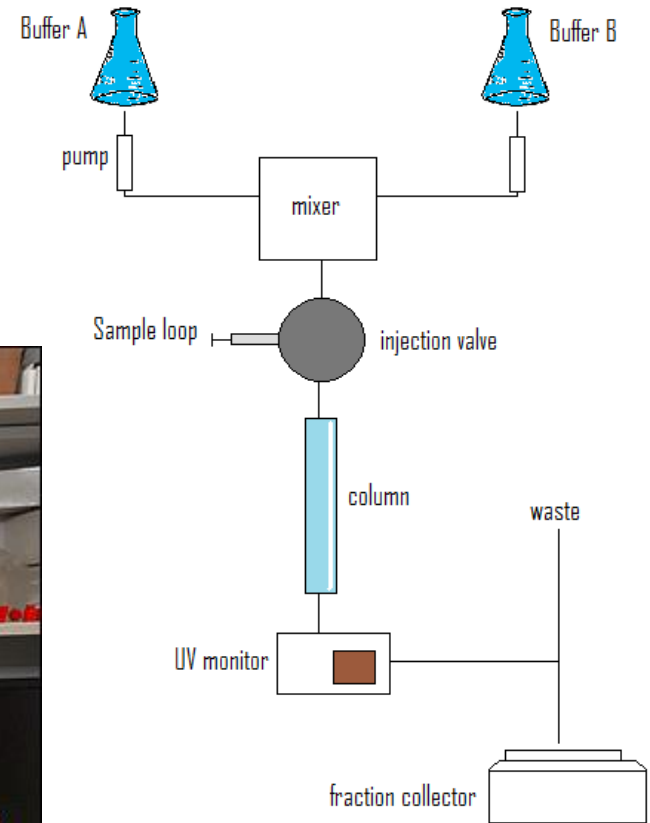
Kék: eluálódó fehérjék

Piros: sókoncentráció



FPLC

- Fast protein liquid chromatography
- Komplex, nyers minták elválasztására is, de ált több lépés kell a tisztasághoz



Kromatográfiás oszloptöltetek

- Ioncserés (IEX)
 - Ált. a fehérjetisztítás elején, a mintának alacsony sótartalmúnak kell lennie
 - Elválasztás: töltés alapján, izoelektromos pont: az a pH, ahol a fehérjének nincs töltése. E fölött negatív (poz. töltésű anioncserélő oszlopon kötődik, pl. DEAE: diamino etil), ez alatt pozitív (neg. töltésű kationcserélő oszlopon kötődik, pl. CM: karboximetil).
 - Elúció: sókoncentráció növelésével vagy pH-változtatással
- Reverz fázisú (RP)/ Hidrofób interakción alapuló interakción alapuló (HIC) kr.
 - Álló fázis: pl. 18 C-tomos CH láncok szilika töltethez kötve
 - Leggyakrabban a fehérjetisztítás későbbi lépésében, ioncserés kr. után, oka: magas sókoncentráció kell hozzá az oldószerben
 - Lehet az elején, kisózás után is
 - Általában savas pH-n végzik (a szilika töltet stabilitása követeli meg). Sav pl. Hexánszulfonsav vagy trifluoroecetsav (TFA)
 - Savas pH-n a karbonsav oldalláncok töltés nélküliek. A fenti savak apoláris farka is segíti a fehérjék megkötését az oszlopon
 - Elúció: izokratikus elúció vagy gradiens a sókoncentráció csökkentésével, vagy szerves anyaggal (pl. etanol, metanol, acetonitril)



Kromatográfiás oszloptöltetek

- Gélszűrés, kizárásos kromatográfia (SEC)
 - Ált. a fehérjetisztítás végén
 - Előny: méret alapján történik – lehet következtetni a méretre, szinte bármilyen oldat használható. Ugyanazon fehérje elválík az aggregátumától
 - Hátrány: gyakran széles, átfedő csúcsok, nem túl érzékeny
- Affinitás-kromatográfia
 - Alapja specifikus kölcsönhatás (antigén-antitest, enzim-szubsztrát, receptor-ligand)
 - A célfehérje specifikus tisztítása antitesttel, vagy a funkciója alapjá
 - Elúció: pH változtatással, sóval, vagy szabad szubsztráttal
 - Hatékony módszer, egylépéses tisztítás is lehetséges, ha kell többlépés akkor az elején legyen az affinitás kromatográfia
 - Elvileg pl. egy enzim szubsztrátja kiköthető agaróz gyöngyökre és segítségével a megfelelő enzim kitisztítható a növényi kivonatból



Preparatív tisztítás, példa

Akrolein-redukáló enzim tisztítása tök levelekből

- Yamauchi és mtsai. J Biol Chem 2011
- Kisózás→
- Visszaoldás→
- Dialízis→
- Ioncserés kr.→

- Ioncserés kr.→

- Hidrofób interakción alapuló kr.→

- Töményítés (30 kDa Millipore szűrő)→
- Gélszűrés→

Purification of Acrolein-reducing Enzyme—Cucumber leaves (100 g) were frozen with liquid nitrogen, and then proteins were extracted with 5 volumes of 50 mM HEPES-NaOH, pH 7.0, containing 1 mM dithiothreitol (DTT) and 0.1 mM EDTA. After centrifugation at $10,000 \times g$ for 20 min, the supernatant was fractionated by the addition of solid ammonium sulfate. Proteins precipitating between 35 and 55% ammonium sulfate saturation were dissolved in a minimum volume of 50 mM HEPES-NaOH, pH 7.0, containing 1 mM DTT (buffer A) and then dialyzed against buffer A. The dialysate was applied to a DE52 column (3.5×27 cm, Whatman) equilibrated with buffer A. After washing with buffer A (500 ml), activity was eluted with buffer A containing 110 mM NaCl (1000 ml). Active fractions were combined and dialyzed against 10 mM sodium phosphate buffer (Na-PB, pH 6.8) containing 1 mM DTT. The dialysate was applied to a hydroxyapatite column (1.5×8 cm, Wako Pure Chemical) and eluted by a linear gradient of 0 to 0.2 M Na-PB (pH 6.8, total 200 ml). After an equal volume of 60% ammonium sulfate saturated in 50 mM K-PB, pH 7.0, containing 1 mM 2-mercaptoethanol was added to the active fraction, the solution was applied to a phenyl-Sepharose column (1.5×8 cm, GE Healthcare) equilibrated with 30% ammonium sulfate saturated in 50 mM K-PB, pH 7.0, containing 1 mM 2-mercaptoethanol and then eluted with a linear gradient of 30 to 0% ammonium sulfate (total 100 ml). Active fractions were concentrated with Microcon-30 (Millipore, Billerica, MA), then applied to a Superose 12 PC 3.2/30 column (0.32×30 cm, SMART system, GE Healthcare) equilibrated with buffer A, and eluted at a flow rate of $40 \mu\text{l}/\text{min}$. All purification steps were done between 0 and 4°C . Protein concentration was determined according to the method of Lowry *et al.* (14) with bovine serum albumin as the standard.



Preparatív tisztítás, példa

Akrolein-redukáló enzim tisztítása tök levelekből

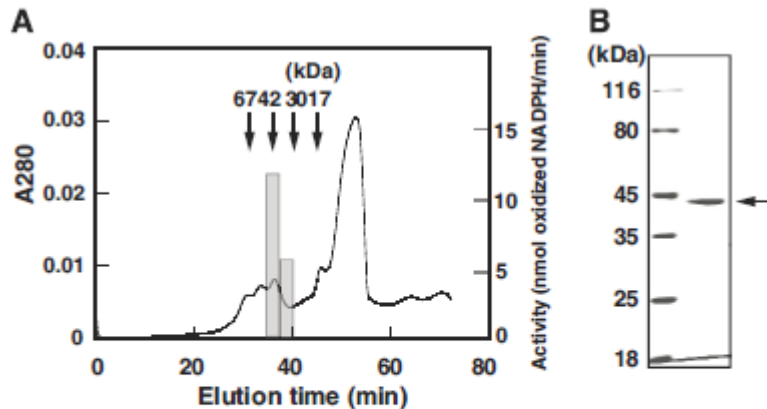


FIGURE 2. Molecular weight of the purified acrolein-reducing enzyme. A, final step in the purification of the acrolein-reducing enzyme by means of gel filtration. Horizontal bar indicates the peak level of acrolein-reducing activity. Arrows indicate elution time of marker proteins BSA (67 kDa), ovalbumin (42 kDa), trypsin (30 kDa), and lysozyme (17 kDa). B, SDS-PAGE profile of the purified enzyme (1 μ g). Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

TABLE 1

Summary of purification of acrolein-reducing enzyme (from 100 g of cucumber leaves)

	Protein	Total activity	Specific activity	Yield	Purification
	mg	μ mol/min	μ mol/min/mg	%	-fold
Crude extract	4160	58.0	0.014	100	1
35–55%(NH ₄) ₂ SO ₄	485	49.6	0.102	85.5	7.29
DE52	173	29.9	0.173	51.6	12.3
Hydroxyapatite	30	16.7	0.558	28.8	39.8
Phenyl-Sepharose	12	13.4	1.12	23.1	80.0
Superose12	0.12	7.2	60.0	12.4	4280



Analitikai módszerek - HPLC

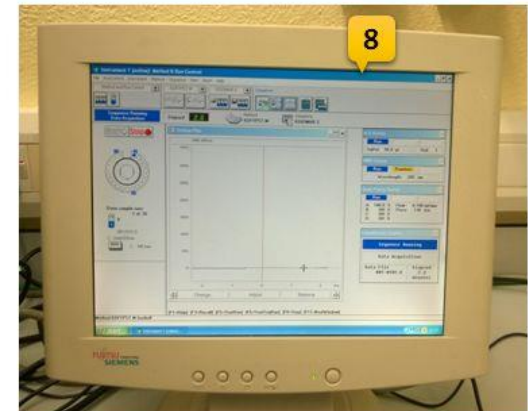
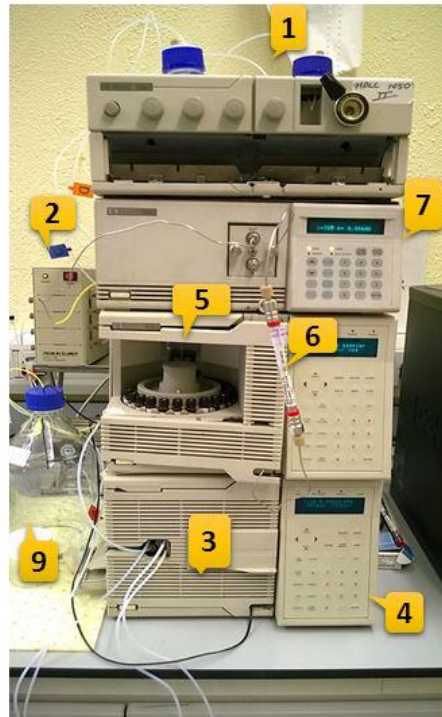
- High performance/pressure liquid chromatography
 - 3-10 μm részecskeméret, több 100 bar nyomás, áramlási sebesség max 1 ml/perc (FPLC: 10-80 μM , 4-5 bar, 1-5 ml/perc)
 - Nyomásálló töltet, ált szilikagél
- Fehérje mérésre, azonosításra való, nagy mennyiségű fehérjetisztításra nem alkalmas. Főleg peptidek, kis fehérjék elválasztására (10 kDa-ig)
- Előzetesen (pl. FPLC-vel) tisztított minta kell hozzá. Nem lehet darab, részecske. Szűrni is kell pl. 45 μm átmérőjű szűrővel.
- A reverz fázisú HPLC közel egyeduralkodó a fehérje elválasztásban
- Az oldószerbe általában kis mennyiségű (pl. 0,1%) trifluoroecetsavat (TFA) kevernek (ion-pairing agent) poláris és apolárisabb része is van köt a poláris fehérjéhez és az apoláris oszlophoz
- Elúció: acetonitril gradiens



Components of the HPLC instrument

- There are 9 main components within the HPLC instrument

1. Solvent reservoir
2. Degasser
3. Mixing chamber
4. Pump
5. Injector
6. Column
7. Detector
8. Computer
9. Waste



Reversed-phase HPLC has found a central role in protein studies because of its versatility, sensitive detection and its ability to work together with techniques such as mass spectrometry. Most of all, however, reversed-phase HPLC is widely used because of its ability to separate proteins of nearly identical structure. As illustrated by the separation of bovine, human and porcine insulin variants (Figure 1), reversed-phase HPLC is able to separate very similar proteins. Bovine and human insulin differ by only three amino acids and are well separated. Bovine insulin has an alanine at residue 8 and a valine at residue 10 on the insulin 'a' chain and an alanine at residue 30 of the 'b' chain. Human insulin has a threonine at residue 8 and an isoleucine at residue 10 on the 'a' chain and a threonine at residue 30 of the 'b'

A Guide to the Analysis and Purification of Proteins and Peptides by Reversed-Phase HPLC (Ace)

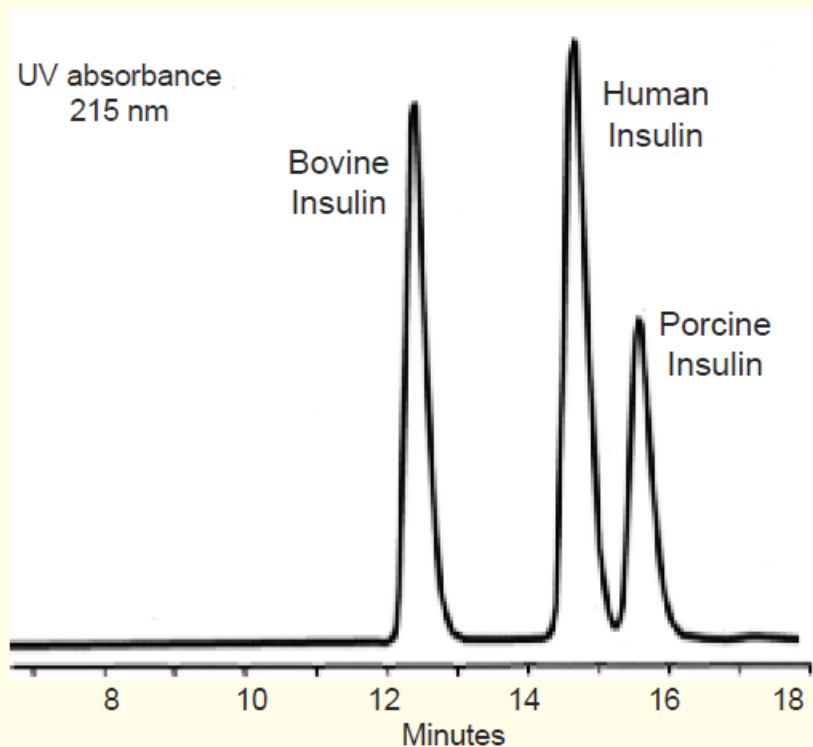
Figure 1 Separation of closely related insulin variants by RP-HPLC

Conditions

Column: ACE 5 C18, 4.6 x 250mm

Eluent: 29.3 - 31.7% ACN in 0.1% TFA over 16 min at 1.0 mL/min

Sample: bovine, human and porcine insulin



HPLC példa

- Zottich és mtsai. Biophysica et Biophysica Acta 2011
- Egy 9 kDa-os antimikrobiális fehérjét tisztítottak Robusta kávéból. Gátolja a *Candida albicans* gombát
- Kisózás→
- Visszaoldás→
- Dialízis→
- Ioncserés kr.→
- Dialízis→
- HPLC→

2.3. Purification of Cc-LTP₁

The purification of peptides from coffee seeds was performed as described by [7] with some modifications. Peptides from seed flour (100 g) were extracted for 2 h (at 4 °C) with 500 mL of extraction buffer (0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)). The precipitate formed between 0 and 90% relative ammonium sulfate saturation was re-dissolved in distilled water and heated at 80 °C for 15 min. The resulting suspension was clarified by centrifugation, and the supernatant was extensively dialyzed against distilled water. The dialyzed solution was recovered by freeze drying (F/0-90) and was further purified by ion exchange chromatography. A DEAE-Sepharose column (1.2×14.6 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) was employed for separation of proteins from the F/0-90 fraction. We eluted at a flow rate of 60 ml/h, first with the equilibrium buffer to obtain fraction P1, and then with 1 M NaCl in equilibrium buffer to obtain bound proteins (P2). The P1 fraction was dialyzed against distilled water, recovered by freeze drying (Freezone 4.5, Labconco) and diluted in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA, Fluka) and injected onto an HPLC (Prominence, Shimadzu) Vydac C18 reverse phase column (250×4.6 mm, Shimadzu) (attached to a C8 pre-column (20×4.6 mm, Pelliguard, Sigma-Aldrich). The solvent flow rate was 0.5 ml/min and the solvent progressed from 100% solvent A (0.1% TFA in water) for 10 min, 0 to 50% solvent B (100% 2-propanol (Merck) containing 0.1% TFA) for 50 min, 50% solvent B for five min and finally returned to 0% of solvent B for 10 min. Elution of proteins was monitored by on-line measurement of the absorbance at 220 and 280 nm.

Protein content was determined as described by Bradford [22].

2019. Szeptember 20.

Éva Csaba



HPLC példa

P1 frakció IEX
FPLC: bázikus,
antifungális
aktivitás

A fő csúcs az
antimikrobiális
peptid.
Azonosítás: N-
terminális
szekvenálás

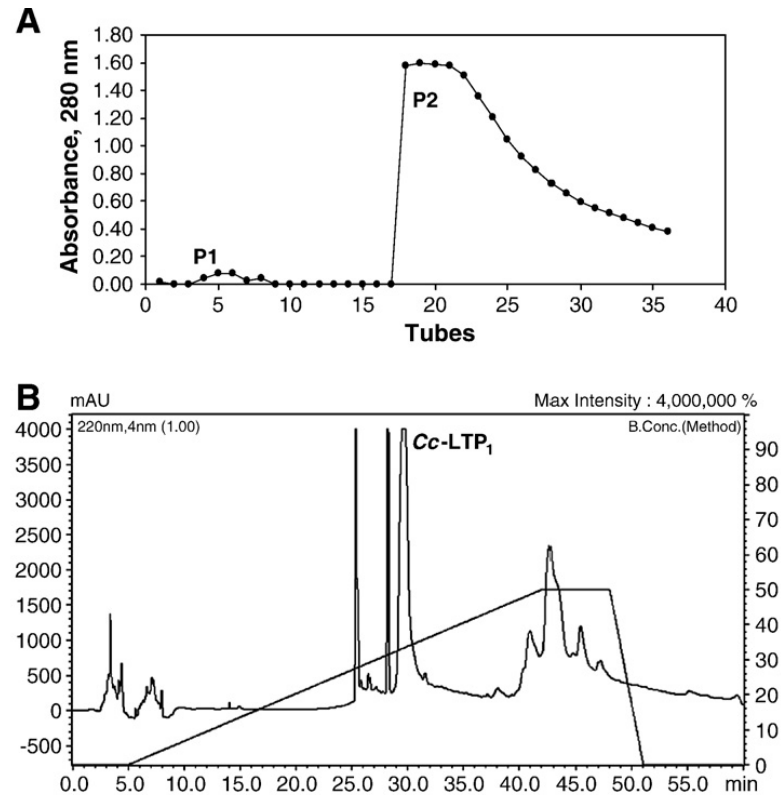


Fig. 1. Purification of Cc-LTP₁ from coffee seeds. (A) Partial purification of the antifungal peptide from *C. canephora* seeds by anion-exchange DEAE-Sepharose chromatography. The column was equilibrated and the sample was initially eluted with 50 mM Tris-HCl pH 8.0 followed by the same buffer containing 1 M NaCl at 60 ml/h. (B) RP-HPLC chromatography. The DEAE-Sepharose fraction (P1) was applied to a C18 reverse-phase column and run in a Shimadzu apparatus. Elution was carried out as described in Section 2.3. The oblique line represents the propanol gradient and the other line represents the protein elution profile at 220 nm.



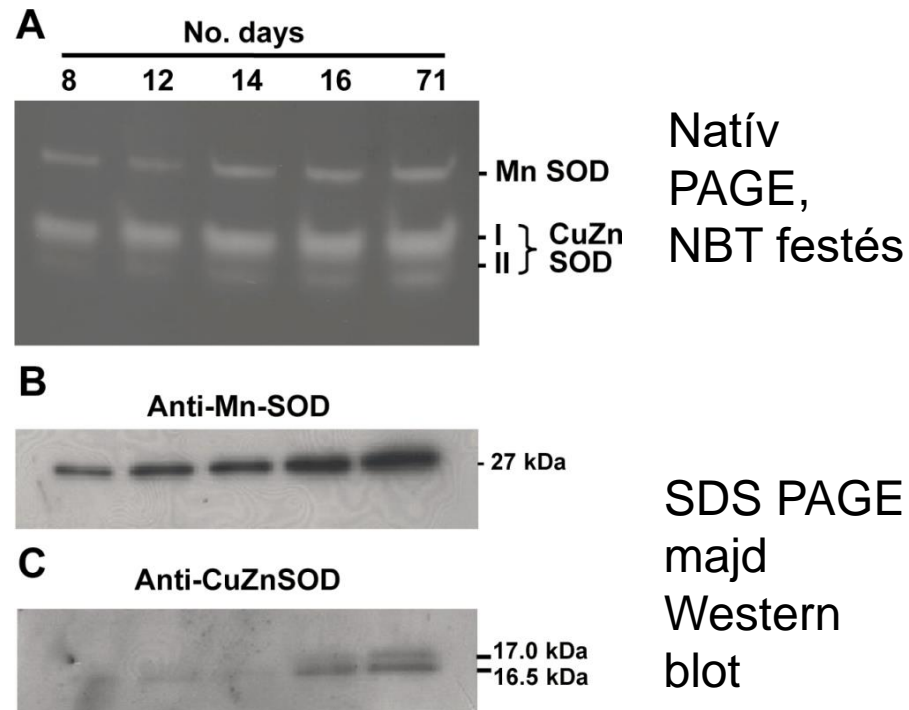
Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

- Gél: akrilamid és N,N'-metilénbiszakrilamid polimerje
- Kis mennyiségű (ált. 20 µg) fehérje elválasztására
- Festés: klasszikus Coomassie (R-250, 100 ng látható), koloidális Coomassie: G-250 10 ng fehérje látható
- Ezüst festés: akár 1 ng is látható
- MS-re lehetőleg érdemes min. 10 ng-ot küldeni



Natív PAGE

- A fehérje mérete, alakja és töltése is befolyásolja az elválasztást
- Natív, aktív fehérjék
- Enzimaktivitás vizsgálható

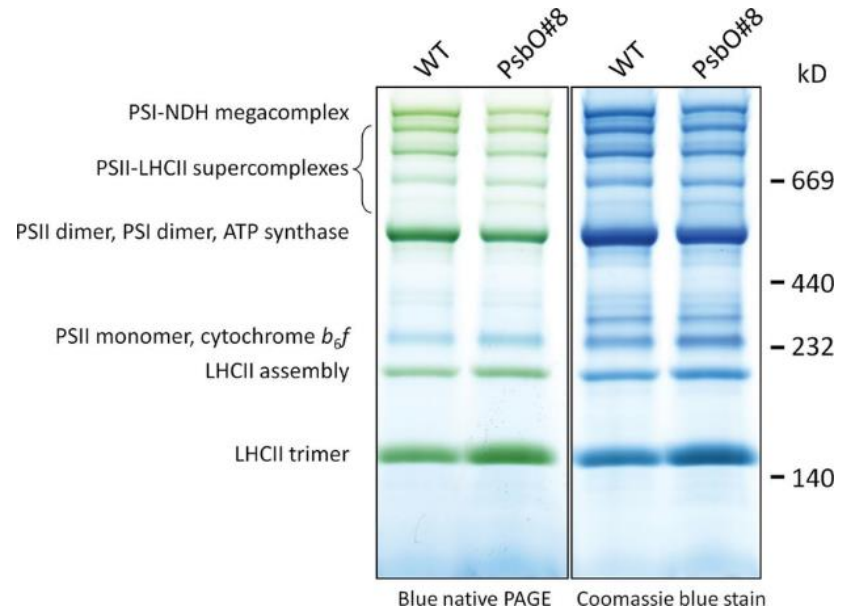


SOD izoenzimek borsó gyökerekben. Morales és mtsai. J Exp Bot 2013



Blue natív PAGE

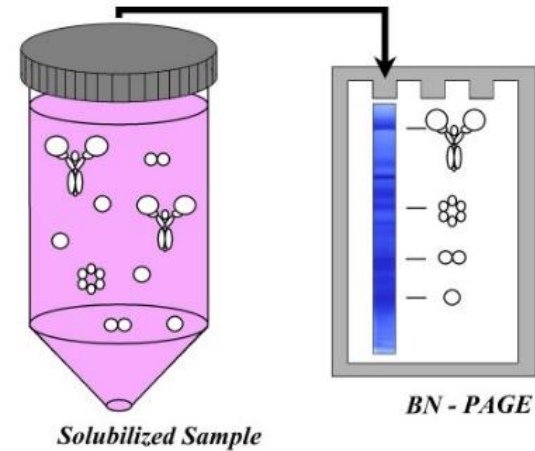
- Blue natív page: fehérjekomplexek (pl. elektrontranszportlánc) tagjai együtt izolálhatók
- Gyenge detergens, pl. TX-100
- Coomassie G-250 a katód pufferben: negatív töltést ad a fehérjéknek
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308860/>



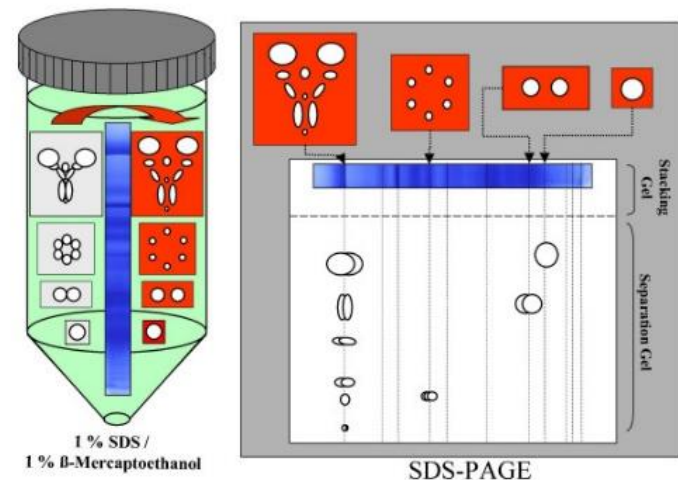
2D-gélelfő

- Blue-natív PAGE
majd SDS PAGE
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1308860/>

A) 1st Dimension - BN-PAGE



B) 2nd Dimension: SDS-PAGE

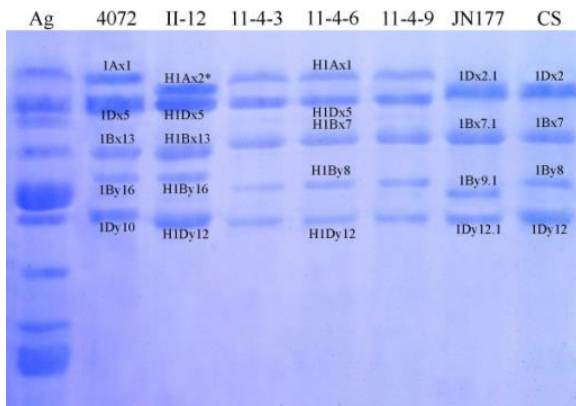


SDS-PAGE

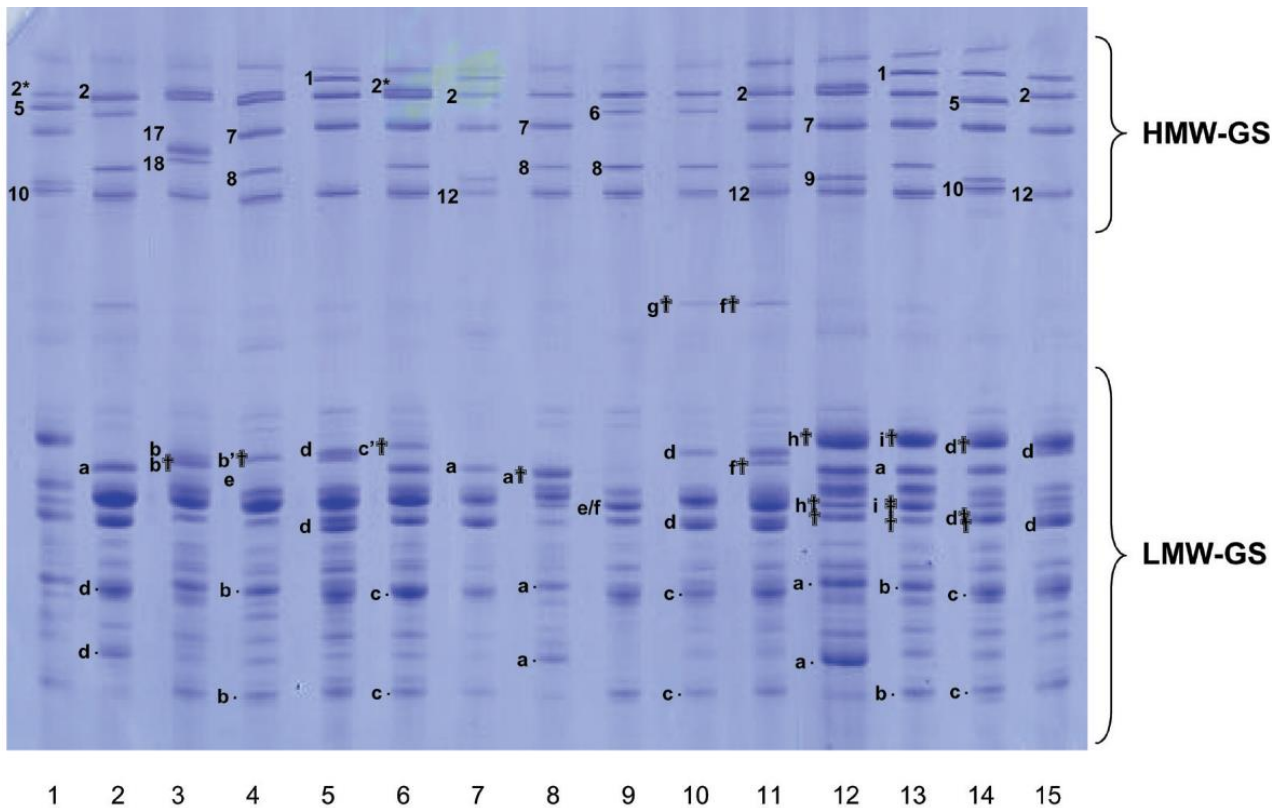
- Elválasztás tisztán méret alapján
- Denaturáció, egységes méret, alak, töltés (SDS)
 - Forralás
 - Utána redukálószer!
- 10-15%-os gél, gyakran felső koncentráció géllel (6%)
- Sáv intenzitása:
Phoretix, GelAnalyzer



Búzafajták glutenin alegység profiljai



Liu és mtsai. BMC
Evol Biol 2007



Branlard és
mtsai. Genetic
Resources
and Crop
Evolution
2003

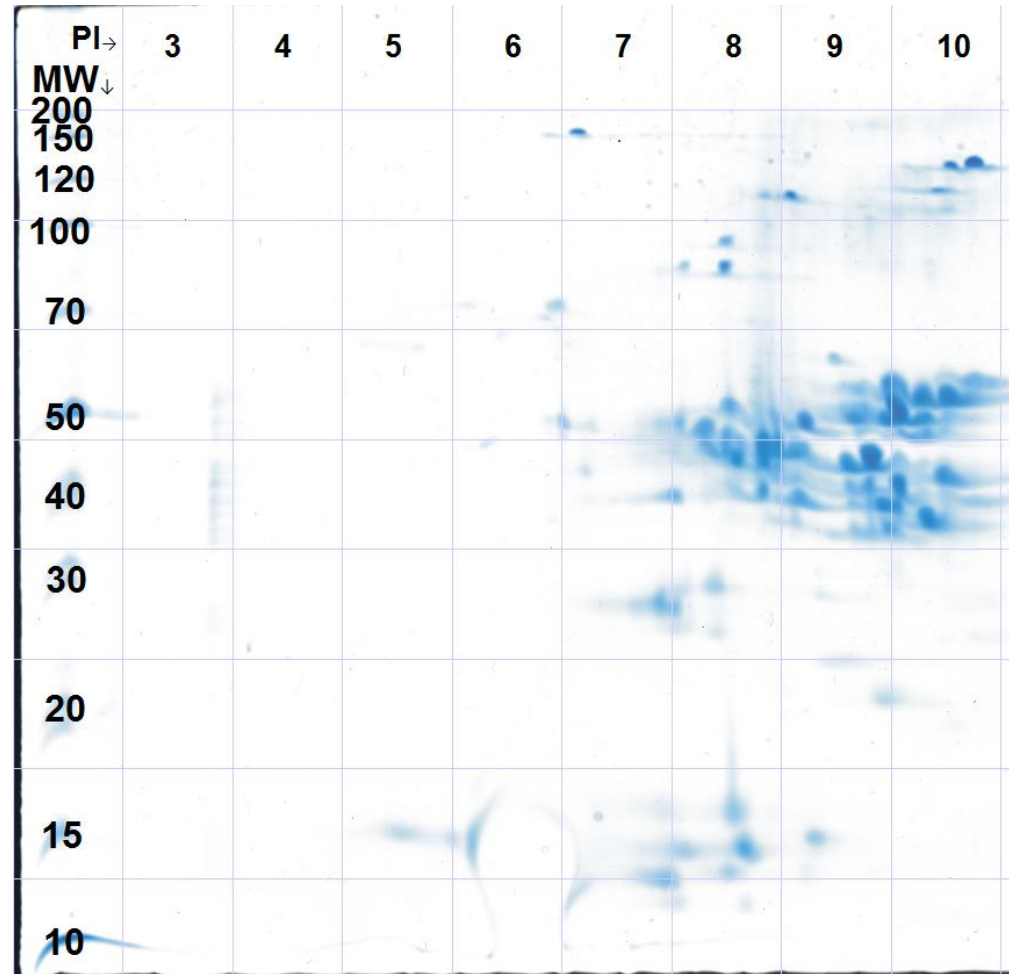
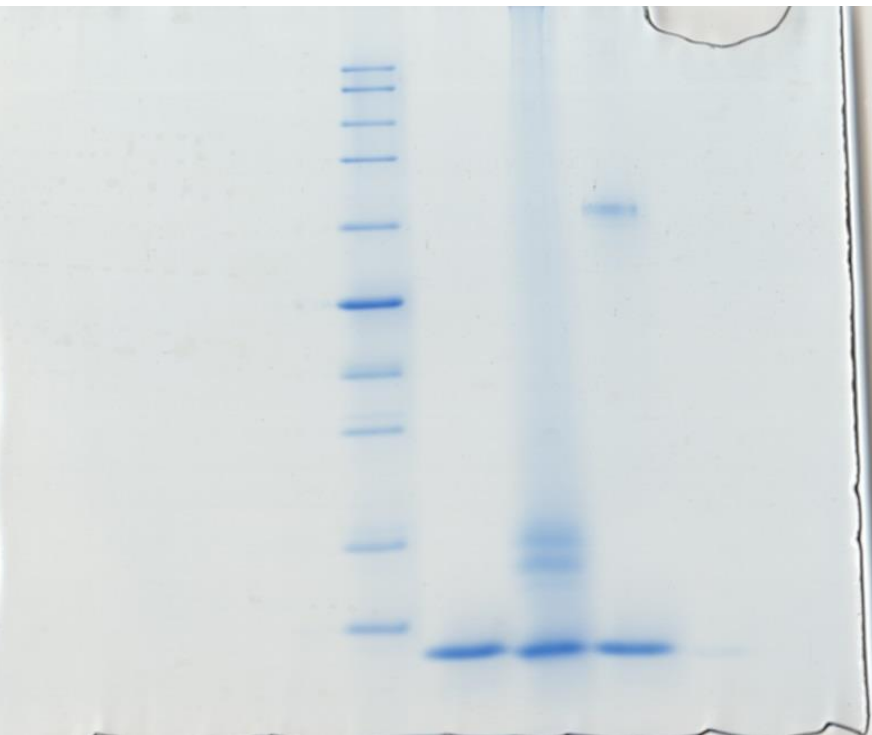
Figure 1. SDS-PAGE separation of the glutenin subunits found in some bread wheat varieties. 1- 'Nisu'; 2- 'Brimstone'; 3- 'Gabo'; 4- 'Radja'; 5- 'Copain'; 6- 'Courtot'; 7- 'Salmone'; 8- 'Chinese Spring'; 9- 'Clément'; 10- 'Arche'; 11- 'Albatros'; 12- 'Democrat'; 13- 'Rempart'; 14- 'Chopin'; 15- 'Orca'

Tipikus 2D: IEF majd SDS PAGE

- Izoelektromos fókuszálás
 - pH gradiens a gélben
 - A fehérjék az izoelektromos pontjuknak megfelelően állnak be
 - Ureával biztosítják, hogy a fehérje oldatban maradjon
- Módszer
 - Fehérje lecsapása acetonnal overnight
 - Centri, mosás acetonnal
 - Beszárítani
 - Rehidratálni (8 M urea, 2% CHAPS, 100 mM DTT, 0.2% karrier amfolit and 0.1% brómfenolkék), rázatás
 - Oldat a vályúba, IEF strip (7 cm Immobiline DryStrips pH 3–10 (GE Healthcare)) rá géllal befelé, a stripre olaj, be ne száradjon, min. 6 óra
 - Fókuszálás: strip géllal felfelé overnight: 250 V 35 p, 4000 V 2 óra, 4000 V 15000 Vh, 100 V 16 óra – utóbbi csak helyén tart
 - Utána equilibrálás SDS-tartalmú pufferrel, alkilálás jódiacetamiddal, fedőagarózzal összekötni és futtatni 2. dimenzióban 12%-os SDS PAGE-el



1D vs. 2D gél



Low Temperature Stress Modulated Secretome Analysis and Purification of Antifreeze Protein from *Hippophae rhamnoides*, a Himalayan Wonder Plant

Ravi Gupta and Renu Deswal*

Molecular Plant Physiology and Proteomics Laboratory, Department of Botany, University of Delhi, Delhi-110007, India

Journal of Proteome Research

Article

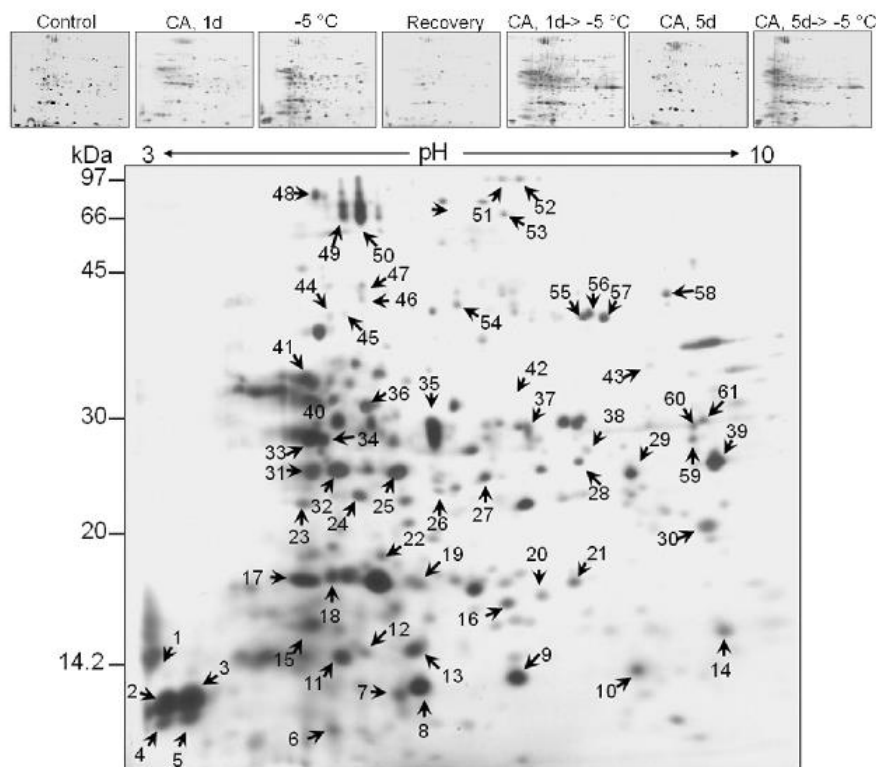


Figure 3. 2-DE reference gels of seabuckthorn ECPs obtained from control, CA (1d), -5°C (1d), recovery, CA (1d) followed by -5°C , CA (5d), and CA (5d) followed by -5°C . LT treated seedlings. ECPs (250 μg) were resolved on 3–10 nonlinear IPG strips for the first dimension and 15% SDS-PAGE for the second dimension. Gels were silver stained and analyzed by ImageMaster2D Platinum software (GE Healthcare). Spots showing a more than 2-fold change in abundance due to LT treatments ($p < 0.05$) are marked by the arrows.

2019. szeptember 26.

Éva Csaba

Low Temperature Stress Modulated Secretome Analysis and Purification of Antifreeze Protein from *Hippophae rhamnoides*, a Himalayan Wonder Plant

Ravi Gupta and Renu Deswal*

Molecular Plant Physiology and Proteomics Laboratory, Department of Botany, University of Delhi, Delhi-110007, India

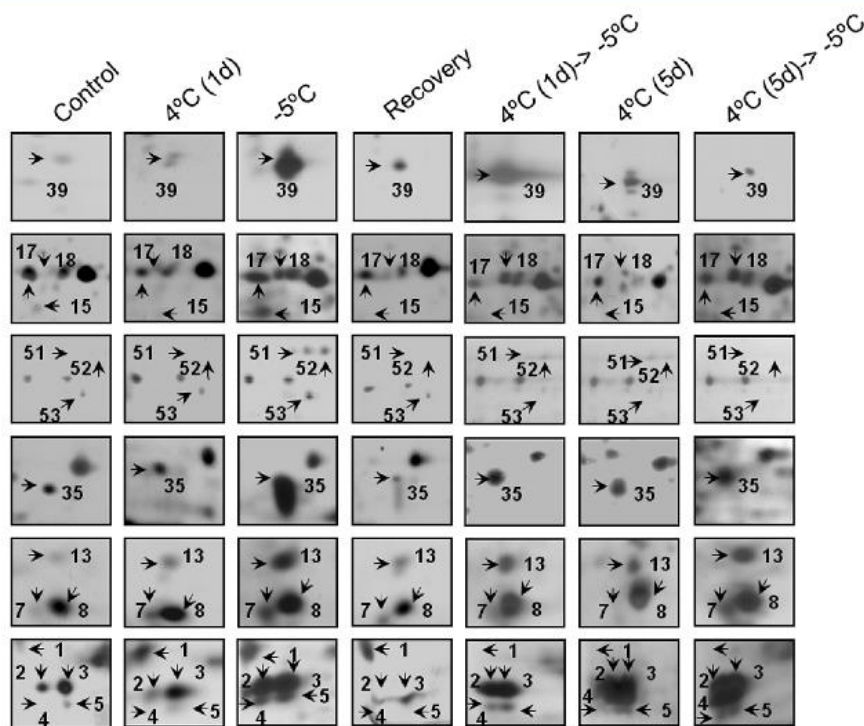


Figure 4. Magnified sections of 2-DE gels of the seabuckthorn shoot secretome showing differential abundance of the proteins after LT stress in a dose dependent manner. Spot numbers in the boxes refer to the spots corresponding to Figure 3.

2019. szeptember 26.

Éva Csaba

Table 1. Identification of the Spots That Showed ≥ 2 -Fold Induction after Freezing Stress by Nano-LC-MS/MS

functional category	spot no. ^a	protein identified	accession no.	protein score ^b	M ^c	SC ^d	th MW/pI	exp MW/pI ^e	loc ^f
redox regulation	24	Lactoylglutathione lyase or Glyoxylase 1	XM_002518424.1	161	2	9	31.7/7.63	24.4/5.5	NC
	15	Superoxide dismutase	P23346	64	1	3	15.2/5.64	15.3/5.1	NC
	6	Thioredoxin	EU056813.1	62	7	5	20.6/9.63	10.4/5.2	C
	35	Aldo/keto reductase	AC160516.1	52	2	4	31.1/6.15	29.9/5.3	NS
	36	Putative lactoylglutathione lyase	Q39366	98	1	4	31.74/5.19	33.58/5.6	NC
defense/stress related	32	Osmotin-like protein	AF304007.1	83	3	7	27.5/7.41	26.7/5.4	C
	32	Thaumatococcus-like protein	P83491	64	7	43	11.42/4.4	26.7/5.4	C
	12	Chitinase	XP_003597296	74	2	3	33.72/5.9	13.89/5.5	C
	18	Similar to pathogenesis-related protein STH-2	AB211525.1	72	3	7	17.34/5.79	17.9/5.2	NS
	7	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	NP_177281	56	3	2	41.5/9.1	11.91/5.9	NC
	37	Dessication related protein	AAM65140	98	1	5	34.4/8.77	29.6/7.2	C
	40	Phenylalanine ammonia lyase	ABD42947	73	1	1	78.2/6	31.91/5.4	NC
	30	Late embryogenesis-like protein	AAU29064	53	1	8	17.32/4.51	21.73/8.8	NC
signaling	1	Calmodulin 1	DQ186609.1	57	3	14	16.9/4.16	14.54/3.1	NC
	55	Calcium dependent protein kinase 23	XP_002309145	50	1	2	60.14/5.91	42.3/8.1	NC
	3	GTPase activating protein	AAQ54568		1	18	8.68/4.96	12.1/3.5	NC
metabolism	4	C-3 sterol dehydrogenase	CAL52542	70	4	1	205.2/7.22	10.9/3.2	NS
	41	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	ACQ82818	147	6	8	42.53/5.96	36.73/5.3	NS
	59	Putative blue light receptor	CAC94940	52	1	1	81.9/8.67		NS
	2	Putative phosphomannomutase	BAD35746	54	1	3	53.7/6.99	11.46/3.2	NC
regulation	20	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homologue	P84565	115	3	51	7.9/4.39	17.04/6.8	NS
	11	Cysteine protease	AF134152.1	70	1	11	15.6/4.12	13.54/5.3	NC
	11	Translation-inhibitor protein	AB082518.1	111	3	11	19.8/7.63	13.54/5.3	C
	25	Pyrrrolidone-carboxylate peptidase family protein	NP_564721	48	1	6	24.3/5.98	26.33/5.9	NS
others	13	Thylakoid lumenal 15 kDa protein, chloroplast (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_566030	88	3	6	24.1/7.55	13.89/5.8	NC
	48	Unknown protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_191832	101	1	5	35.2/5.27	72.37/5.3	C
	5	Predicted protein (<i>Physcomitrella patens</i> subsp. <i>patens</i>)	XP_001763519	56	1	2	67.3/6.78	11/3.2	NC
	11	Unknown (<i>Populus trichocarpa</i>)	ABK93605	179	6	17	21.98/8.76	13.54/5.3	NC
	27	Os10g0125700	NP_001064077	49	1	1	161.8/8.15	26.1/6.3	C
	57	Unnamed protein product (<i>Vitis vinifera</i>)	CBI40282	70	1	4	43.6/4.75	42.3/8.4	NC
	19	Predicted protein (<i>Physcomitrella patens</i> subsp. <i>patens</i>)	XP_001784896	73	4	3	42.83/5.5	17.71/5.9	NC
	9	Hypothetical protein OsI_37876 (<i>Oryza sativa</i> Indica Group)	EEC69045	54	2	1	157.6/6.54	12.5/6.4	NS
	8	Unknown protein 18	P85925	65	1	91	1.39/5.8	12.22/5.9	
	50	Hypothetical protein SORBIDRAFT	XP_002456647	55	1	8	14.8/7.04	67.88/5.6	NC

^aSpot no. refers to the spots labeled in Figure 3. ^bProtein scores are derived from ion scores as a nonprobabilistic basis for ranking protein hits. ^cNumber of matched peptides. ^dSequence coverage. ^eExperimental molecular weight and pI were calculated using ImageMaster2DPlatinum software. ^fPutative location was predicted using SecretomeP and SignalP servers. C, classical; NC, nonclassical; NS,

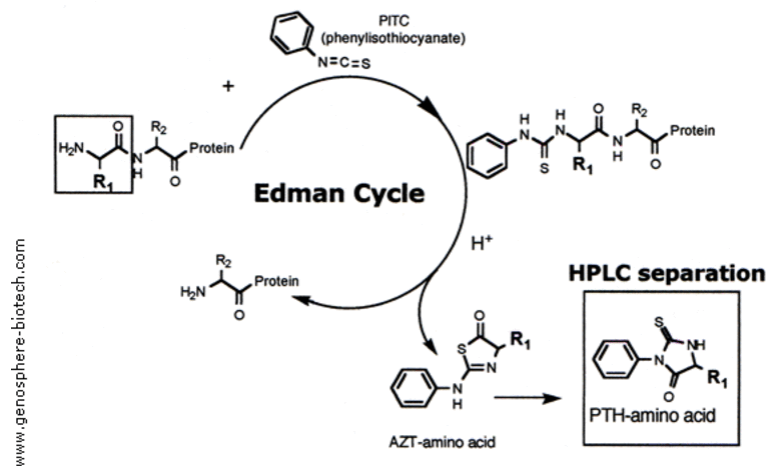
9. szeptember 26.
Csaba



Fehérje azonosítása

- Az Edman-szekvenálás a tömegspektrometriás eljárások elterjedésével háttérbe szorult, de a mai napig használatos technika a fehérjék elsődleges szerkezetének meghatározására. A módszer során a fehérjék elektromos térerő hatására a gélből egy PVDF membránra vándorolnak át, majd a membránon megkötött fehérjéket Edman-szekvenálással azonosítják. A kétdimenziós poliakrilamid-gélelektroforézissel elválasztott fehérjék PVDF-membránra történő blottolása komplex biológiai mintákból is lehetővé teszi a fehérjék azonosítását és jellemzését. Az N-terminális szekvenálást először Pehr Edman (1950) írta le és alkalmazta. Három lépésből áll: a fehérjét először fenilizotiocianáttal reagáltatják, hidrolizálják a módosított N-terminális aminosavat, végül a feniltiohidantoin származékot azonosítják. Enyhe lúgos közegben a fenilizotiocianát reakcióba lép a nem töltött terminális amino csoporttal, és egy feniltiokarbamoil származékot hoz létre. Ebből megfelelő körülmények között lehasad a feniltiohidantoin-aminosav, ami kromatográfiával vagy elektroforézissel azonosítható. A módszer hátránya, hogy a reakciót ismételve maximum 50 vagy 60 aminosav szekvenálható. Több mint 99%-os pontossággal körülbelül 30 aminosavat lehet megszekvenálni. Az Edman-degradálás csak 10-100 pm fehérje esetén alkalmazható megfelelően.

N-terminal sequencing cycle:



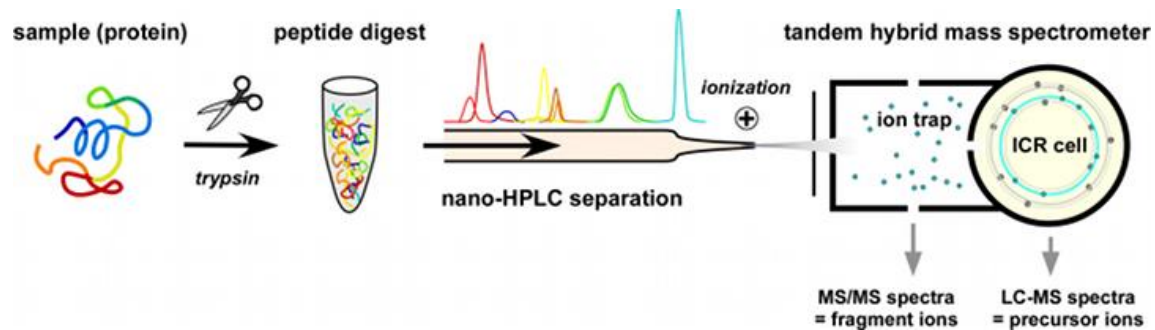
Tömegspektrometria

Protein Identification by On-Line Nano-LC-MS/MS

Gel bands were in-gel digested for 4 h at 37 °C with sequencing grade modified Trypsin (Promega, V5111) after reduction with DTT (Sigma-Aldrich) and alkylation with iodoacetamide (Sigma-Aldrich). The peptide extracts were analysed by mass spectrometry, using on-line nano-LC-MS/MS technique on a nano-Acquity UPLC (Waters) coupled with Orbitrap-Elite LTQ mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Ion-trap CID spectra were acquired from the ten most intense peaks after each survey scan. Proteome Discoverer (Thermo Fisher Scientific) was used for generating MS/MS peak lists, and in-house Protein Prospector v5.10.17 was used for database search against the *T. aestivum* sequences from the UniProtKB.2014.3.12.random.concat (30183/53249714 entries) database. The following search parameters were applied for tryptic peptides: carbamidomethyl-Cys as constant, oxidation of Met, pyro-Glu from Gln and protein N-terminal acetylation as variable modifications. Only fully specific peptides were considered with a maximum of one missed cleavage site. Mass tolerance was set to 5 ppm for the survey and 0.6 Da for the MS/MS measurements. Minimum protein and peptide scores were 51 and 20, respectively, as acceptance criteria. False discovery rate was calculated for each gel band identification and found to be less than 1% in all cases (FDR: $2 \times$ the number of decoy peptide match / the number of identified spectra). In the case of homologous proteins, the one with the highest protein score and the larger sequence coverage were listed.

Éva és mtsai.
Plant Mol Biol
Rep 2019

- Tandem MS
- ion cyclotron resonance



Két fő megközelítés

- Forward genetika – egy fenotípusért felelős háttér (gén/gének/mutáció) azonosítása
 - Mitől szárazságtűrőbb a Plainsman V búzafajta, mint a Capelle Desprez?
- Reverz genetika – az ismert gén, mutáció funkcióját keressük, hatását a fenotípusra

Reverz genetika

- Szekvencia azonosítása
 - BLAST, hasonlóság mértéke
- Fehérje funkciója
 - Enzimaktivitás
 - Interakciós partner keresése (DNS, fehérje)
 - Génexpressziós mintázat jellemzése
- Fenotípus keresése: gén kiütése, csendesítése, túltermeltetése

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/>

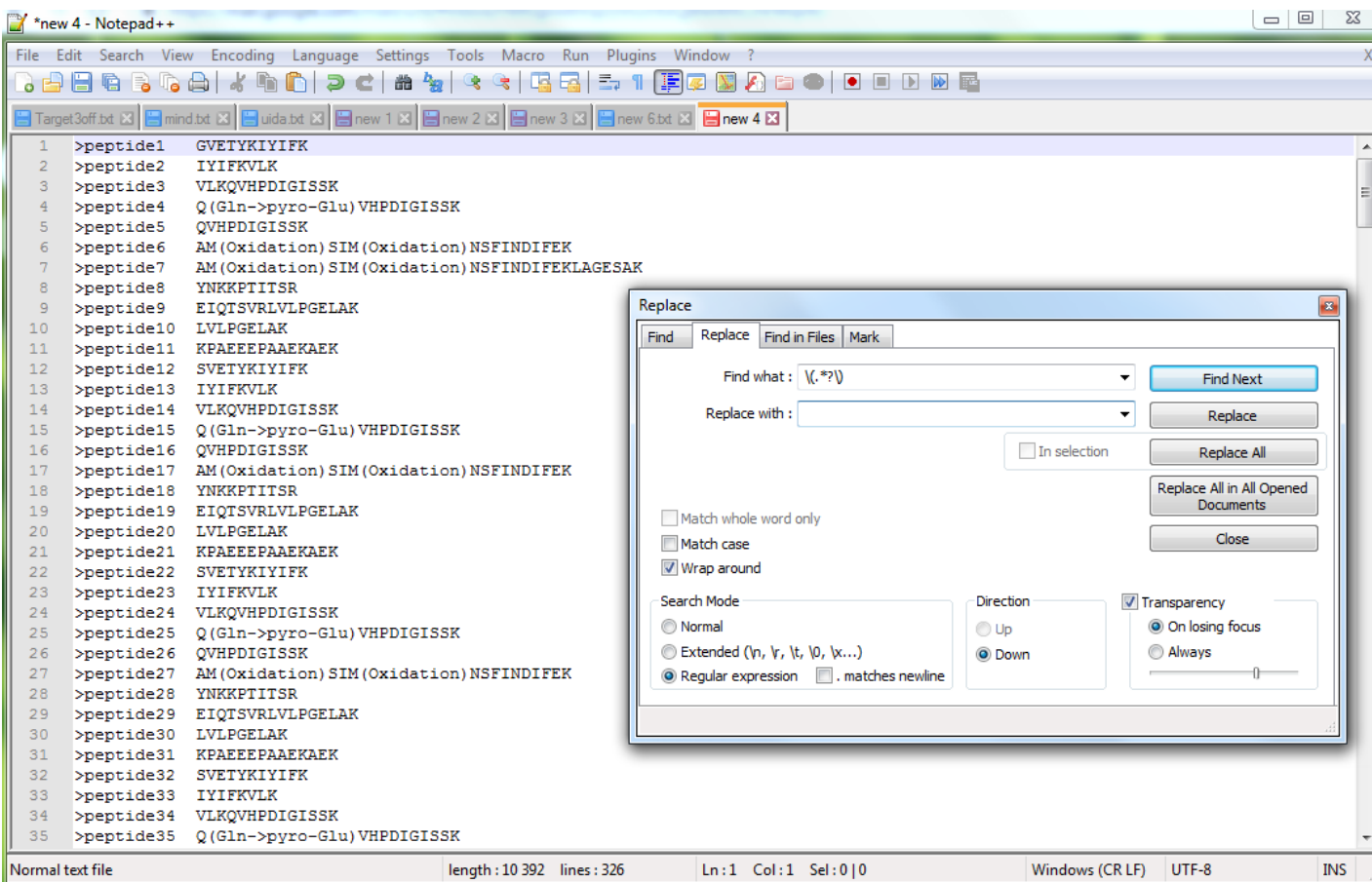
>BPPOM1 sortörés!
 CCACC TCCTGATC TCTC GTC TTGTAGTATAGCCAGGATTAACGAAAATCA
 GGTGGTGCCGTACAGTTGTTCGCGCCCTAAGCC TGATGATATGGAGAAAG
 TTCCGTATTACAAGTTCCCTTCATGACTAAGCTCCGTGTTCTGCAGCCT
 GCTCATGAAGCTAATGAGGAGTATATTGCCAAGTACAATCTGGCGATTAG
 TCGAATGAGAGATCTTGATAAGACACAACCTTTAAACCCATTGGTTTTA
 AGCAACAAGCTAATATACATTGTGCTTATTGTAATGGTGC TTATAGAATT
 GGTGGCAAAGAGTTACAAGTTCATAATTC TTGGCTTTTCTCCCGTTCCA
 TAGATGGTACTTGACTTCCACGAGAGAATCTGGGAAAATTCATTGATG
 ATCCAAC TTTTCGCTTGGCCATTTGGAAATGGGACCATCCAAAGGGTATG
 CGTTTTCC TGCCATGATGATGCTGTGAAGGGACTTCCCTTTTTCGATGTAAC
 AC GTTGACCAAAGTCACC GAAATGGAGCAGTAATCGATCTGGTTTTTCG
 GCAATGAAGTCAAAACAAC TCAACTCCAGTTGATGAGCAATAATTTAACA
 CTAATGTACGCTCAAAATGGTAACTAATGC TCCATGTCC TCGGATGTTCTT
 TGGTGGGCC TTATGATC TCGGGATTAACACTGAAC TCCCGGGAAC TATAG
 AAAACATTTCC TACGGTCC TGCCACATC TGGTCTGGTACAGT GAGAGGT
 TCAAC TTTGCCAATGGTGAATATCAACGGTGAGAATATGGGTCAATTT
 TTACTCAGC TGCTTTGGACCCGGTTTTCTTTGCCATCACAGCAATGTGG
 ATCCGGATGGGAGCGAATGGAAAGCGACAGGAGGGGAAAAGAACAGATATC
 ACACATAAAGATTGGTTGAAC TCCGAGT

>BPPOM2
 GCCACC TCCTGATC TCTC GTC TTGCGAGTAAAGCACTATTAACGAAACTA
 CAGAGGTGCCATACAGTTGTTGCGCTCCTAGGCCCTGATGATATGGAGAAA
 GTTCCGTATTACAAGTTCCCTTCATGACTAAGCTCCGTGTTCTGCAGCC
 TGCTCATGAAGCTAATGAGGAGTATATCCGAAGTACAATTTGGCGGTTA
 GCAAGATGAGAGATCTTGATAAGACACAACCTTTAAACCCATTGGTTTT
 AAGCAACAAGCTAATATACATTGTGCTTATTGTAACGGTGC TTATAGAAT
 TGGTGGCAAAGAGTTACAAGTTCATAATTCATGGCTTTTCTCCCGTTCC
 ATAGATGGTACTTGACTTCTACGAGAGAATCTGGGAAAAC TATTGAT
 GATCCAAC TTTTCGCTTGGCCATATTGGAATTTGGGACCATCCAAAGGGCAT
 GCGTTTTCTTGCCATGATGATGCTGTGAAGGGACTTCCCTTTTTCGATGTA
 CACGTGACCAAAGTCAACGTAATGGGGCAGTTATTGATATTGGTTTTTTTC
 GGCAATGAAGTCAAAAAC TCAACTTTCAGTTGATGAGCAATAATTTAAAC
 ACTAATGTACCGTCAAAATGGTAACTAATGCTCCATGTCC TCGGATGTTCT
 TTGGCGGGCTTTATGATCTCGGGAGTAACGTTGAAC TCCCGGGAAC TATA
 GAAAACATCCCTCACGGTCTGTCCACATTTGGTCTGGTACAGT GAGAGG
 TTCAACTTTGGCCAAATGGTGAATATCAACGGTGAAGTATGGGTCAATTT
 TTACTCAGCTGGTTGGACCTGGTTTTCTTTTGGCCATCACAGCAATGTG
 GATCCGATGTGGACCGAATGGAAAGCGACAGGAGGGGAAAAGAACAGATAT
 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



Fasta-ba tenni: Notepad++



- Zárójelek közötti rész eltávolítása:
- Search/replace (regular expression) `\(.*\?)`
- Search/replace (Extended)
 - Sortörés: `\r\n`
 - Tabulátor: kimásolható, kereshető

2019. szeptember 26.

Éva Csaba

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 aldo-keto reduktáz a Uniprot adatbázisban

GO - Molecular functionⁱ

- alcohol dehydrogenase (NADP+) activity  Source: TAIR 
- aldo-keto reductase (NADP) activity  Source: UniProtKB 
- NADP+ binding  Source: UniProtKB 
- steroid dehydrogenase activity  Source: UniProtKB 

Complete GO annotation...

GO - Biological processⁱ

- oxidation-reduction process  Source: TAIR 
- response to cold  Source: UniProtKB 
- response to salt stress  Source: UniProtKB 
- response to toxic substance  Source: UniProtKB-KW 
- response to water deprivation  Source: UniProtKB 

Complete GO annotation...

GO - Cellular componentⁱ

- chloroplast  Source: TAIR 

Complete GO annotation...

Keywords - Cellular componentⁱ

Chloroplast, Plastid



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.



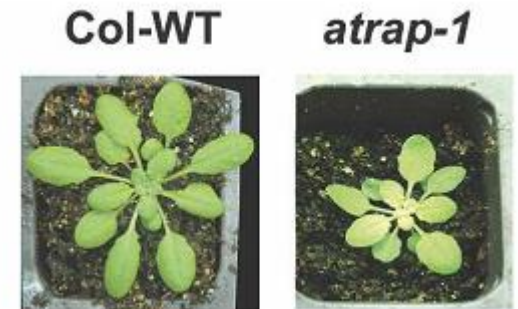
Modell növények

- 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

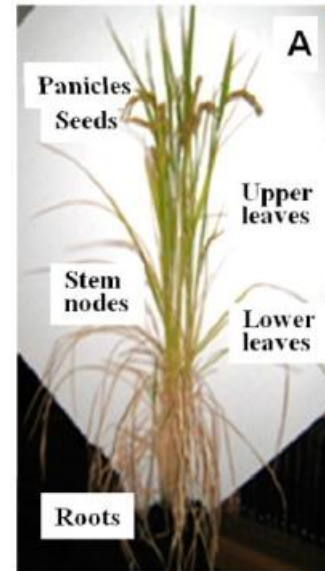


Katiyar-Agarwal és
mtsai, *Genes &
Development* 2007



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



OPEN

The effector AWR5 from the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* is an inhibitor of the TOR signalling pathway

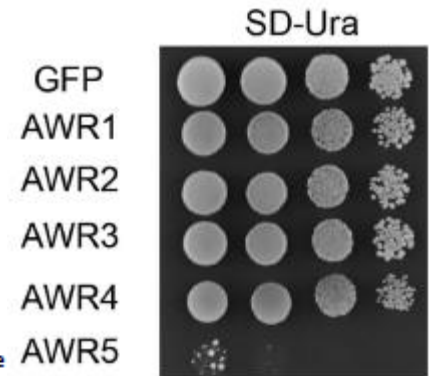
Received: 17 March 2016

Accepted: 12 May 2016

Published: 03 June 2016

Crina Popa^{1,2}, Liang Li¹, Sergio Gil², Laura Tatjer³, Keisuke Hashii⁴, Mitsuaki Tabuchi⁴,
Núria S. Coll¹, Joaquín Ariño³ & Marc Valls^{1,2}

Bacterial pathogens possess complex type III effector (T3E) repertoires that are translocated inside the host cells to cause disease. However, only a minor proportion of these effectors have been assigned a function. Here, we show that the T3E AWR5 from the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* is an inhibitor of TOR, a central regulator in eukaryotes that controls the switch between cell growth and stress responses in response to nutrient availability. Heterologous expression of AWR5 in yeast caused growth inhibition and autophagy induction coupled to massive transcriptomic changes, unmistakably reminiscent of TOR inhibition by rapamycin or nitrogen starvation. Detailed genetic analysis of these phenotypes in yeast, including suppression of AWR5-induced toxicity by mutation of *CDC55* and *TPD3*, encoding regulatory subunits of the PP2A phosphatase, indicated that AWR5 might exert its function by directly or indirectly inhibiting the TOR pathway upstream PP2A. We present evidence *in planta* that this T3E caused a decrease in TOR-regulated plant nitrate reductase activity and also that normal levels of TOR and the Cdc55 homologues in plants are required for *R. solanacearum* virulence. Our results suggest that the TOR pathway is a bona fide T3E target and further prove that yeast is a useful platform for T3E function characterisation.



A hasonlóság néha csalóka...

- Arabidopsis D14 (Dwarf14): strigolakton receptor
 - Strigolakton hormonokat köt és hidrolizál
 - A szignál a hajtás elágazását csökkentheti, de befolyásolja a gyökér struktúrát és más növényekben a mikorrhizáltságot is
 - GenBank ID: NP_566220.1
- DLK2 (Dwarf14-like2)
 - D14 rokona, de se nem köti, se nem hidrolizálja a strigolaktont ((+)5-deoxystrigol)
 - Szerepe van a hipokotilhossz szabályozásában, fényregulációban, esetleg a gyökér tápanyagfelvételében
 - AT3G24420 a TAIR-ban, 37,7% as. azonosság a D14-el
 - Végh és mtsai. Frontiers in Plant Science 2017





Enzimkinetika

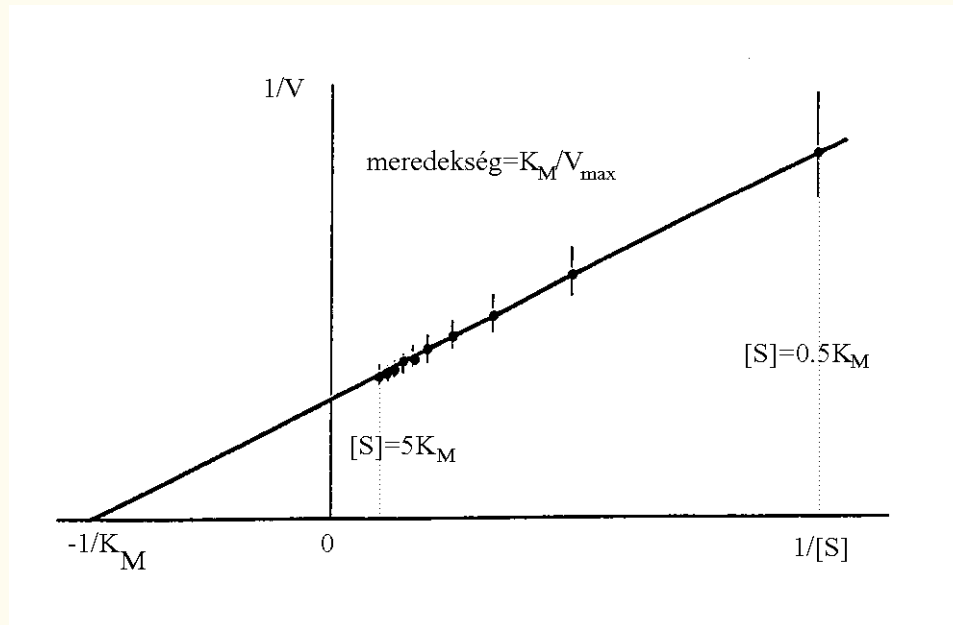
- AKR4C9 tisztítása aff. kromatográfiával, enzim akt. mérés a NADPH elnyelését (340 nm) követve

Szubsztrát	AKR4C9, C-terminális His-tag			AKR4C9, N-terminális His-tag		
	K_m (mM)	K_{cat} (perc ⁻¹)	K_{cat}/K_m (perc ⁻¹ mM ⁻¹)	K_m (mM)	K_{cat} (perc ⁻¹)	K_{cat}/K_m (perc ⁻¹ mM ⁻¹)
Glutáraldehid	1,91	20,79	10,91	1,34	30,85	22,99
Fruktóz	52,63	10,74	0,20	35,15	4,97	0,14

Éva és mtsai. 2014, Plant Growth Regul 74:1



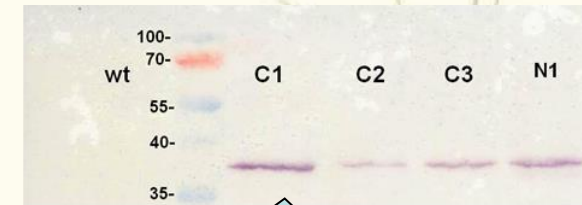
Enzimkinetika





Szorbit-mérés

- Dr. Tömösköziné Farkas Rita, KÉKI
- HPLC-RID

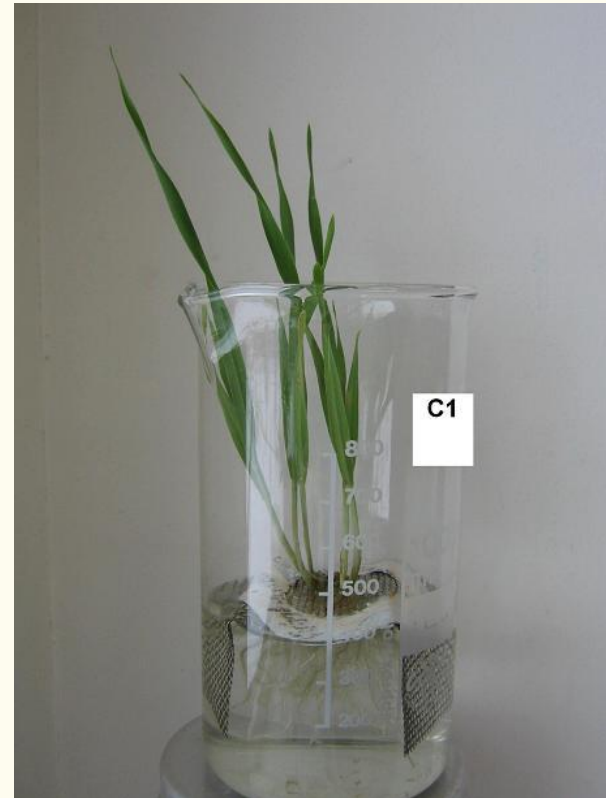
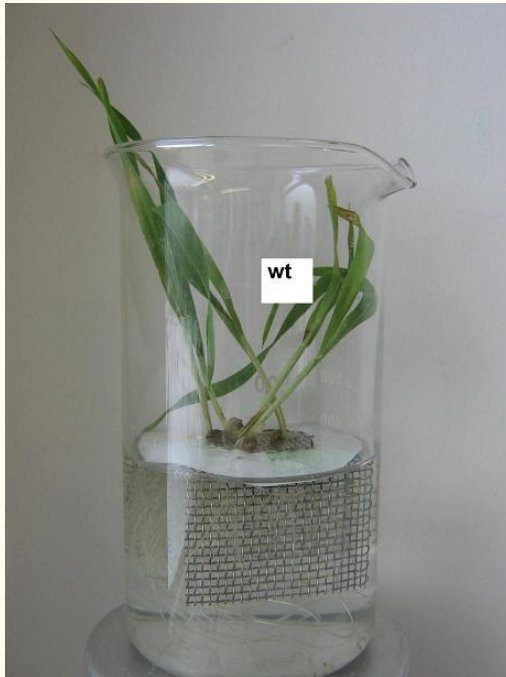


2,5x

¹ Növényi vonal	A. <i>thaliana</i>	WT	C1	C2
² Átlagos szorbit-tartalom (μmol/g frt)	1,66 ± 1,02	0,17 ± 0,23	0,80 ± 0,24	0,30 ± 0,37



Glutáraldehid-kezelés általános hatásai



Reverz genetika

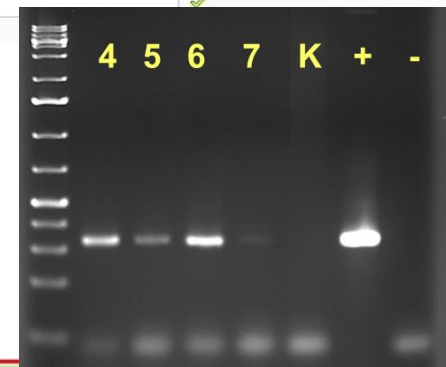
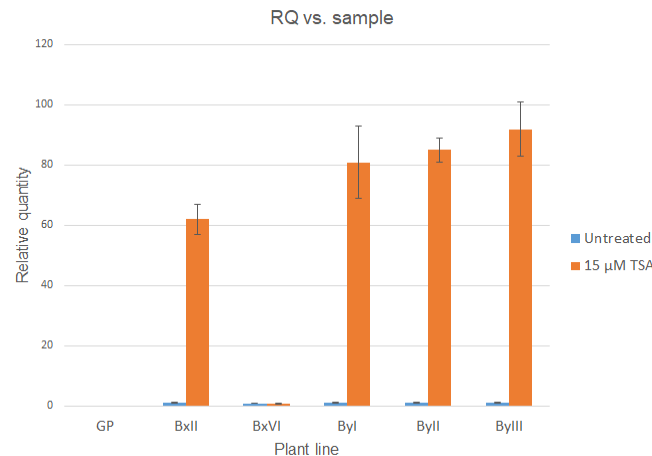
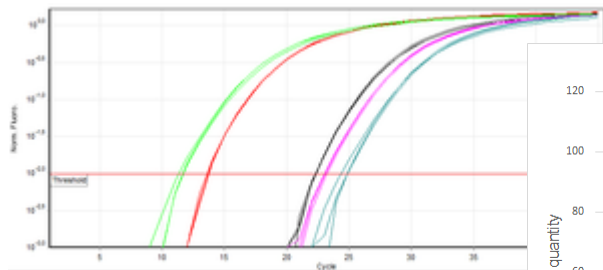
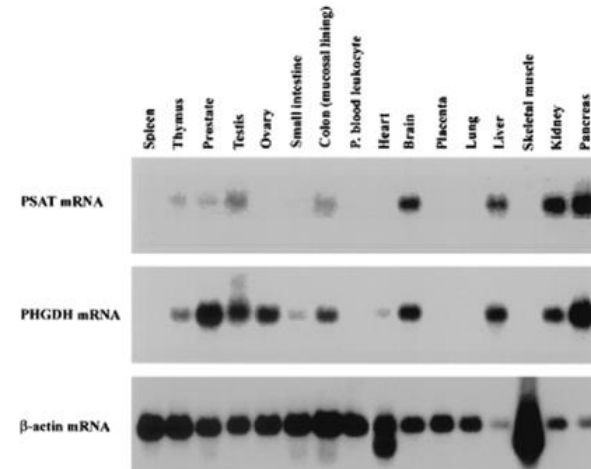
- Szekvencia azonosítása
 - BLAST, hasonlóság mértéke
- Gén, fehérje funkciója
 - Enzimaktivitás
 - Interakciós partner keresése
 - DNS: pl. élesztő egyhibrid-rendszer, kromatin immunoprecipitáció, EMSA
 - Fehérje: pl. élesztő kéthibrid rendszer, ko-immunoprecipitáció, SPR – surface plasmon resonance
 - Génexpressziós mintázat jellemzése
 - Szabályozás leírása: epigenetikai, transzkripcionális, poszt-transzlációs
- Fenotípus keresése: gén kiütése, csendesítése, túltermeltetése

Génszabályozás vizsgálata

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?

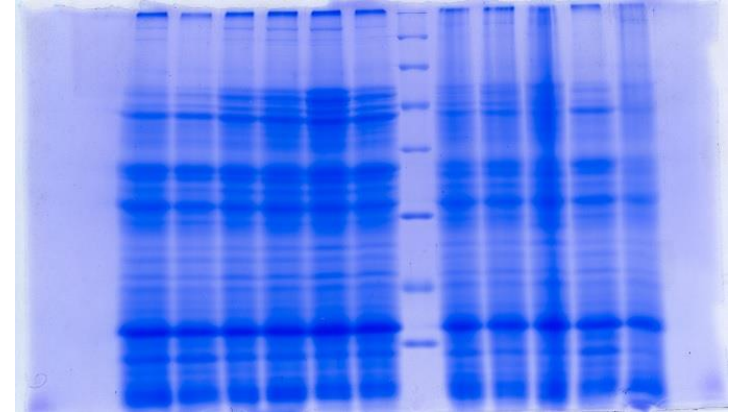
- Génexpresszió követése
 - Northern blot →
 - RT-PCR →
 - qPCR ↓

Northern blot results

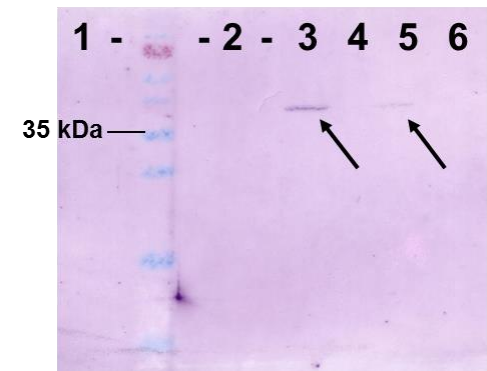
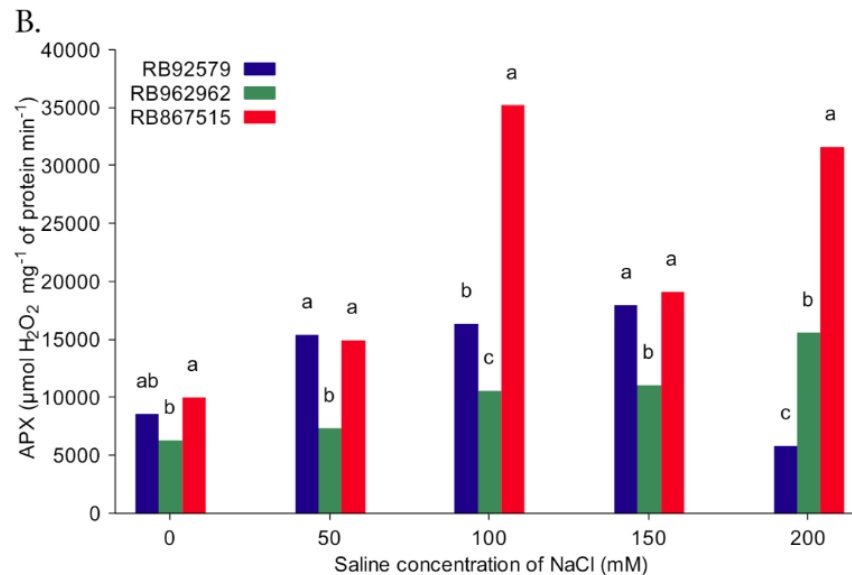


Génszabályozás vizsgálata

- Génexpresszió követése
 - Fehérjeprofил →
 - 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

2019. szeptember 26.

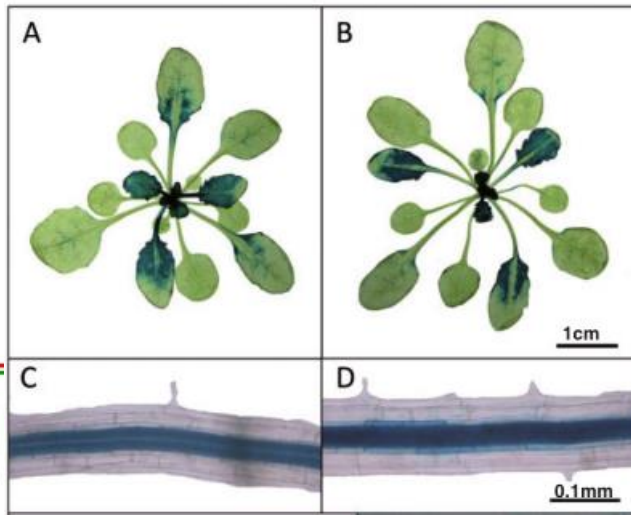
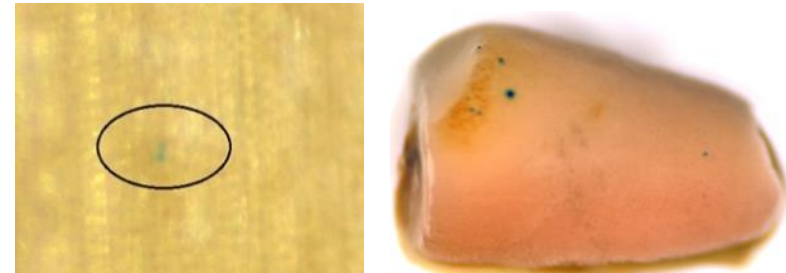
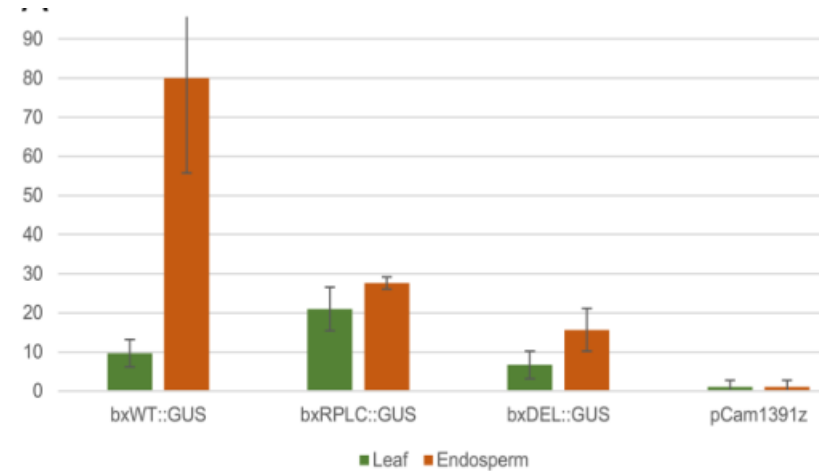
Éva Csaba



MTA
Mezőgazd

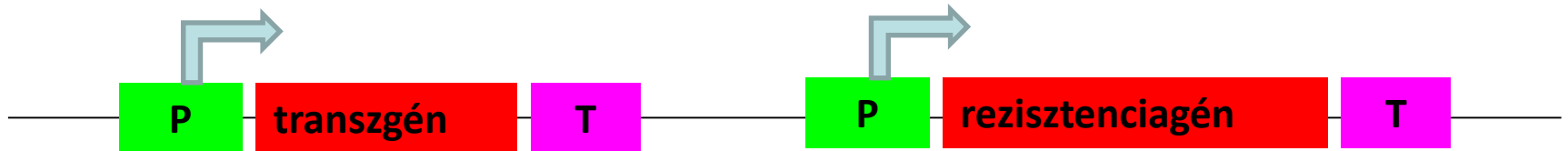
Szövet-specifitás leírása

- Promóter::riportegén konstrukció
- Tranzienst 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



Túltermeltetés: transzgenikus növények

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

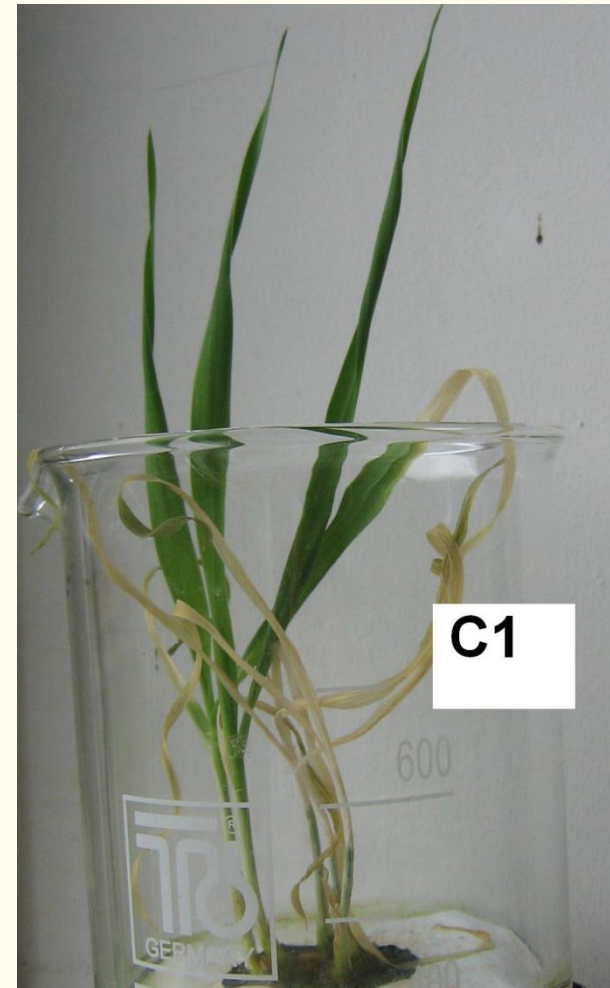




Regeneráció fagystressz után

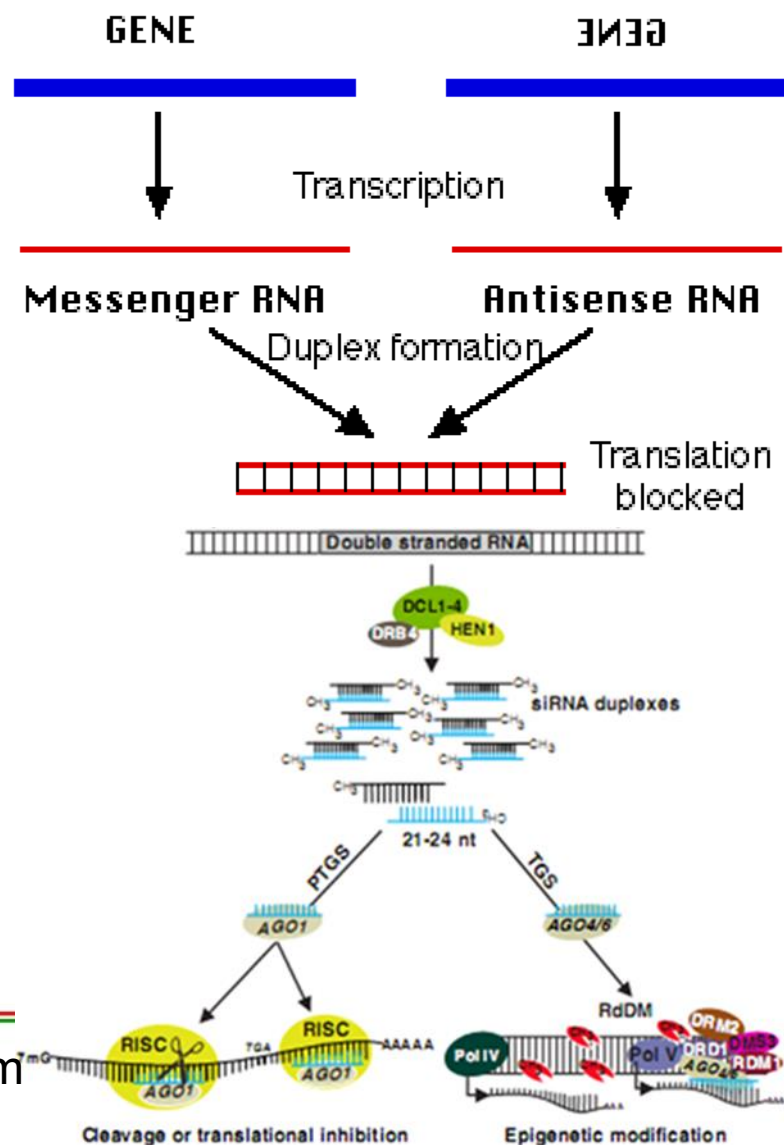
3 nap hideg utókezelés, 3 nap 24/18°C

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



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 \(issuefull\)](#)



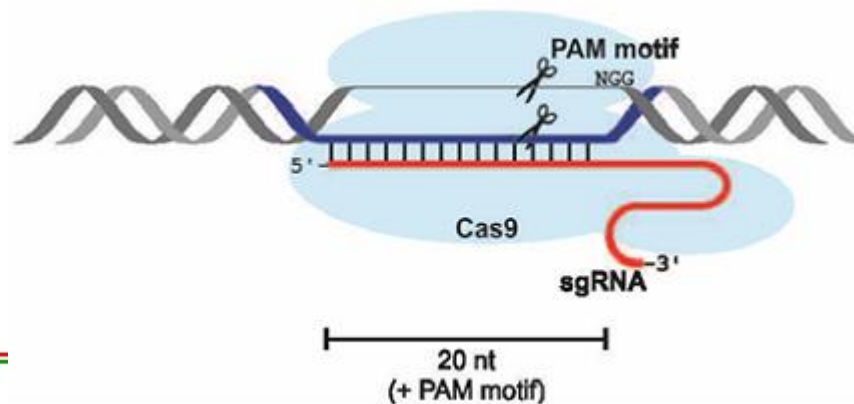
MTA • ATK
Mezőgazdasági Intézet

2019. szeptember 26.
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



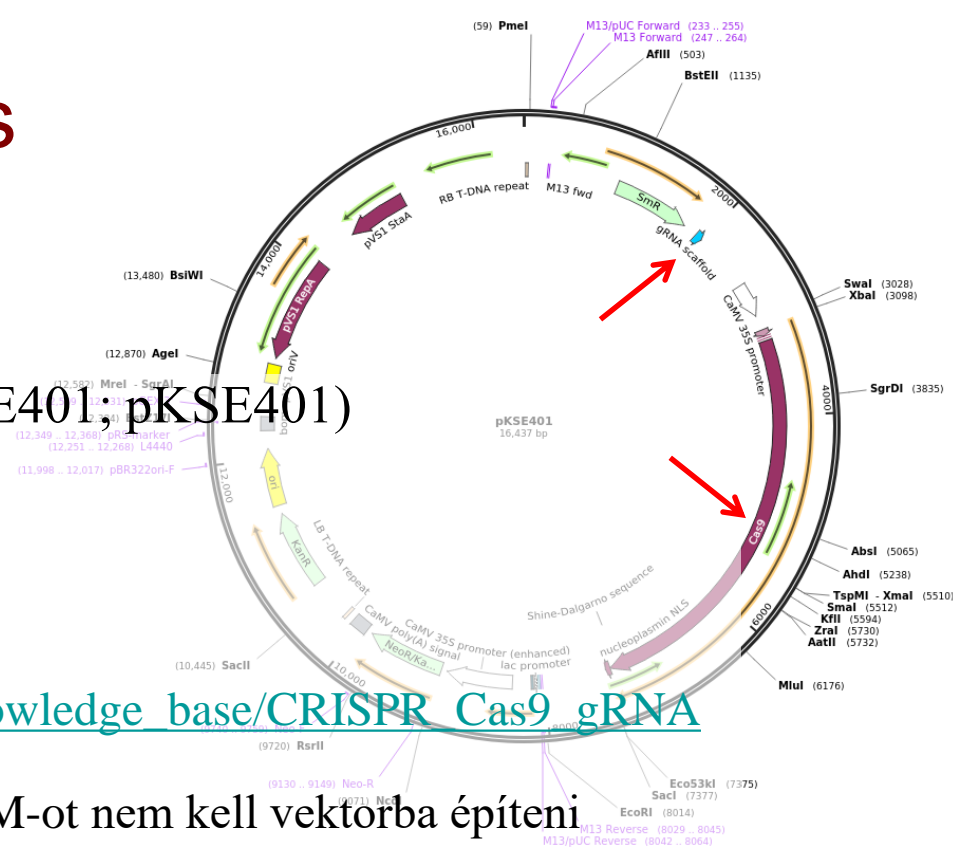
Vektor, target tervezés

Addgene vektorok használhatók (pl. pHSE401; pKSE401)

- Xing és mtsai. BMC Plant Biology 2014
- Transzgenikus növény létrehozásához

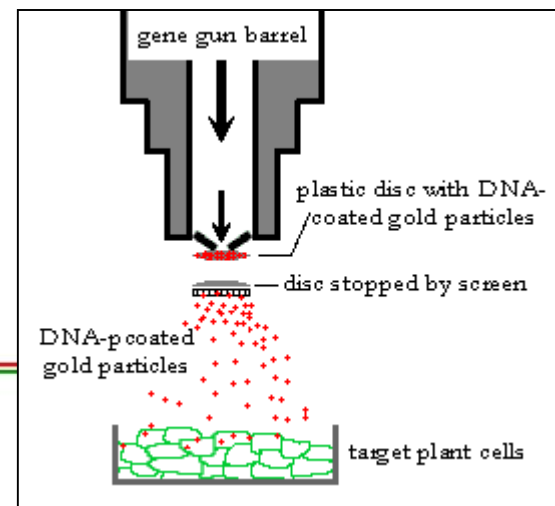
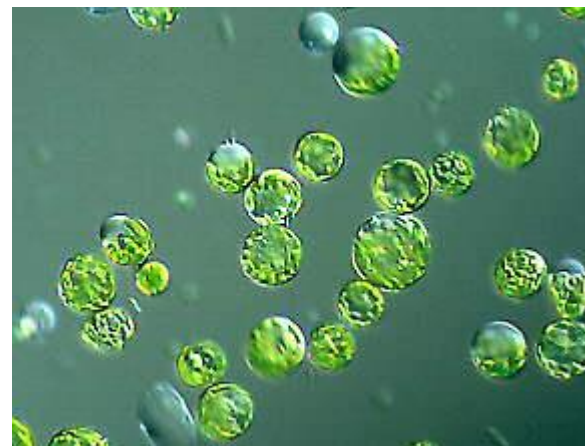
CRISPR-target tervezés szempontjai

- https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/CRISPR_Cas9_gRNA_Design.php
- 17-24 bp a PAM (NGG szek.) előtt, a PAM-ot nem kell vektorba építeni
- Első nukleotid G legyen (vagy hozzáadni): transzkripció kezdete az U6 kisRNS promóternél
- Nem lehet benne TTT: transzkripció leáll az U6 kisRNS promóternél
- GC: 40-80 % (alacsonyabb: specifikusabb, magasabb: jobban működik)
- Komplementer szátra is lehet tervezni
- CRISPOR tervezőprogram (off-target predikció): <http://crispor.tefor.net/>
- A target két szálát primerként megrendelni ragadós végekkel, összehibridizálni, magas aktivitású (5-10 U/μl) T4 ligázzal vektorba építeni, gRNA scaffold elé



Csak fehérje és RNS

- Cas9 fehérje-sgRNA komplex (ribonukleoprotein) bejuttatása Arabidopsis, saláta, dohány és rizs protoplasztokba PEG-el
 - Aktív fehérje, akár 46% mutációs ráta 24 órán belül
 - Woo és mtsai. Nat Biotechnol 2015
- Liang és mtsai. Nature Communications 2017
 - Búza protoplasztot is teszteltek, mutálódott (35-41%), növényt nem regeneráltak belőle
 - Búza embrió, génpuska, 4-5 mutáns 100 kiindulási embrióból
 - Tényleg nem volt DNS
 - Kevesebb off-target, mint DNS-nél



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.



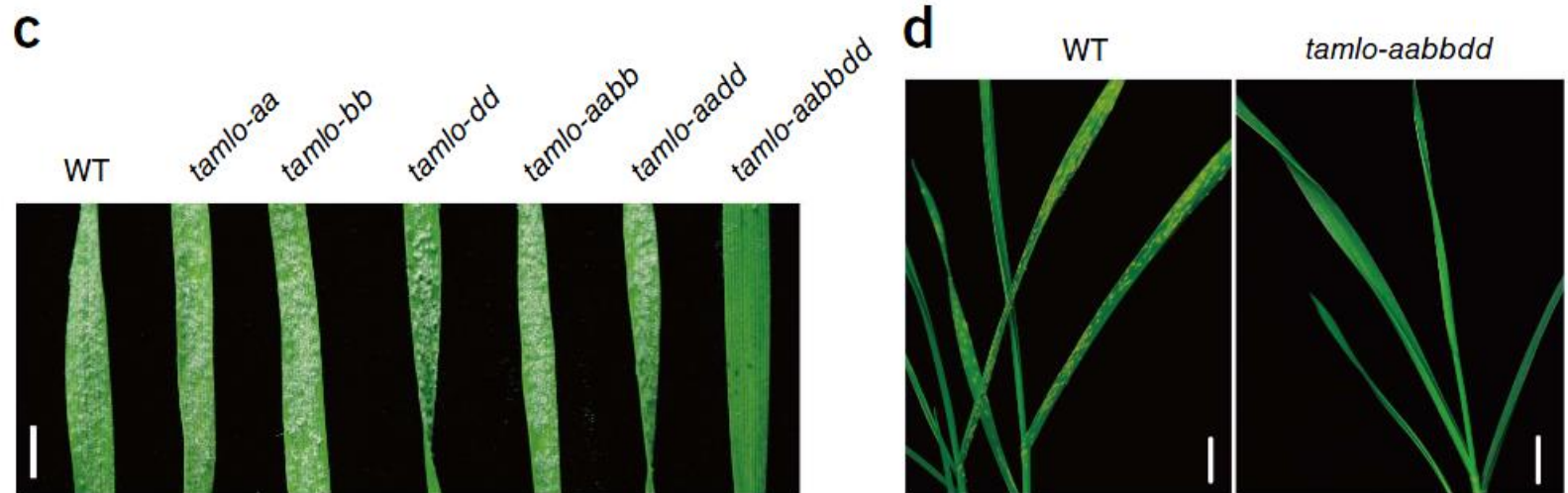
Kártevőkkel szembeni ellenállás

- 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

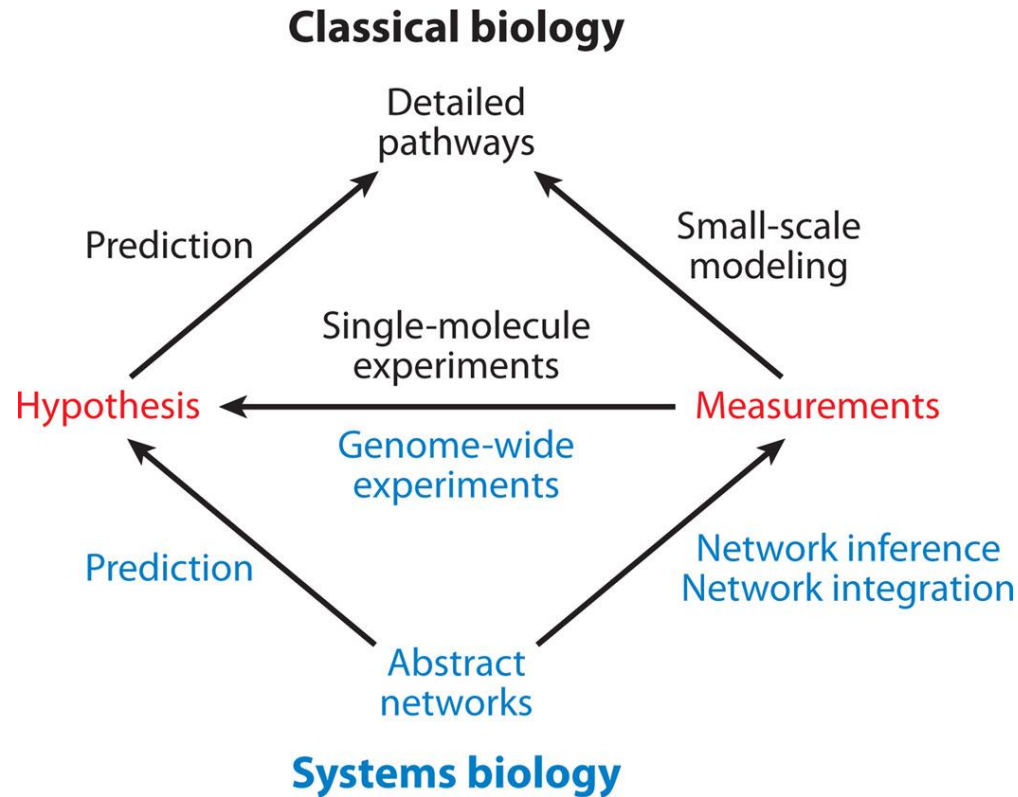
 PDF  TOOLS  SHARE

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.



Systems biology



- Chuang, Han-Yu, Matan Hofree, and Trey Ideker. "A decade of systems biology." Annual review of cell and developmental biology 26 (2010): 721-744.

