



SZÉCHENYI TERV

NÖVÉNYGENETIKA

Az Agrármérnöki MSc szak tananyagfejlesztése
TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0010



MAGYARORSZÁG MEGÚJUL



A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

A MEMBRÁN TRANSZPORTEREK AKTIVITÁSÁNAK ELEMZÉSE MICROARRAY TECHNIKÁVAL

avagy

TRANSZKRIPTOMIKA

előadás áttekintése

A génexpresszió vizsgálati módszereinek áttekintése.

**A microarray módszer és felhasználási lehetőségei,
előnyei.**

**A stressz hatásra bekövetkező génaktivitás változás
elemzése**

**A géncsaládok funkcionális jellemzése, valamint a
környezetre adott expressziós változások elemzése**

A génkifejeződés változásainak mérése *egy, v. néhány* gén esetén

- hibridizációs technikák,
- polimeráz láncreakción alapuló módszerek,
- szemi-kvantitatív eljárás (riporter-gén)

Sok gén, vagy akár **valamennyi transzkriptum**
változásának egyidejű nyomon követéséhez

„**transzkriptomika**” (transcriptomics)

nagy áteresztő képességű technológia szükséges.

array = sor, rend, sorrend

→ „gének sorba rendezése”

a vizsgálni kívánt géneknek megfelelő cDNS-eket sorokba rendezve viszik fel valamilyen hordozóra

a kötött nukleinsavakat jelölt cDNS-sel hibridizálják

A microarray eljárással lehetőség nyílik annak tanulmányozására, hogy a növények gén-expressziója **hogyan reagál a tápanyagellátás változására,** vagy más stresszhatásra.

Kezdetben cellulóz-filter alapon
(dot-blots, macroarray).

De: a membrán *autofluoreszcenciája*
kizárja multiplex fluoreszcens próbák használatát.

A microarray módszernél
mikroszkópi tárgylemez a hordozó

A felvitt minta mennyisége alapján megkülönböztetünk:

"**macroarray**"-t (20-40 μ g RNS)

"**microarray**"-t (1-10 μ g RNS)

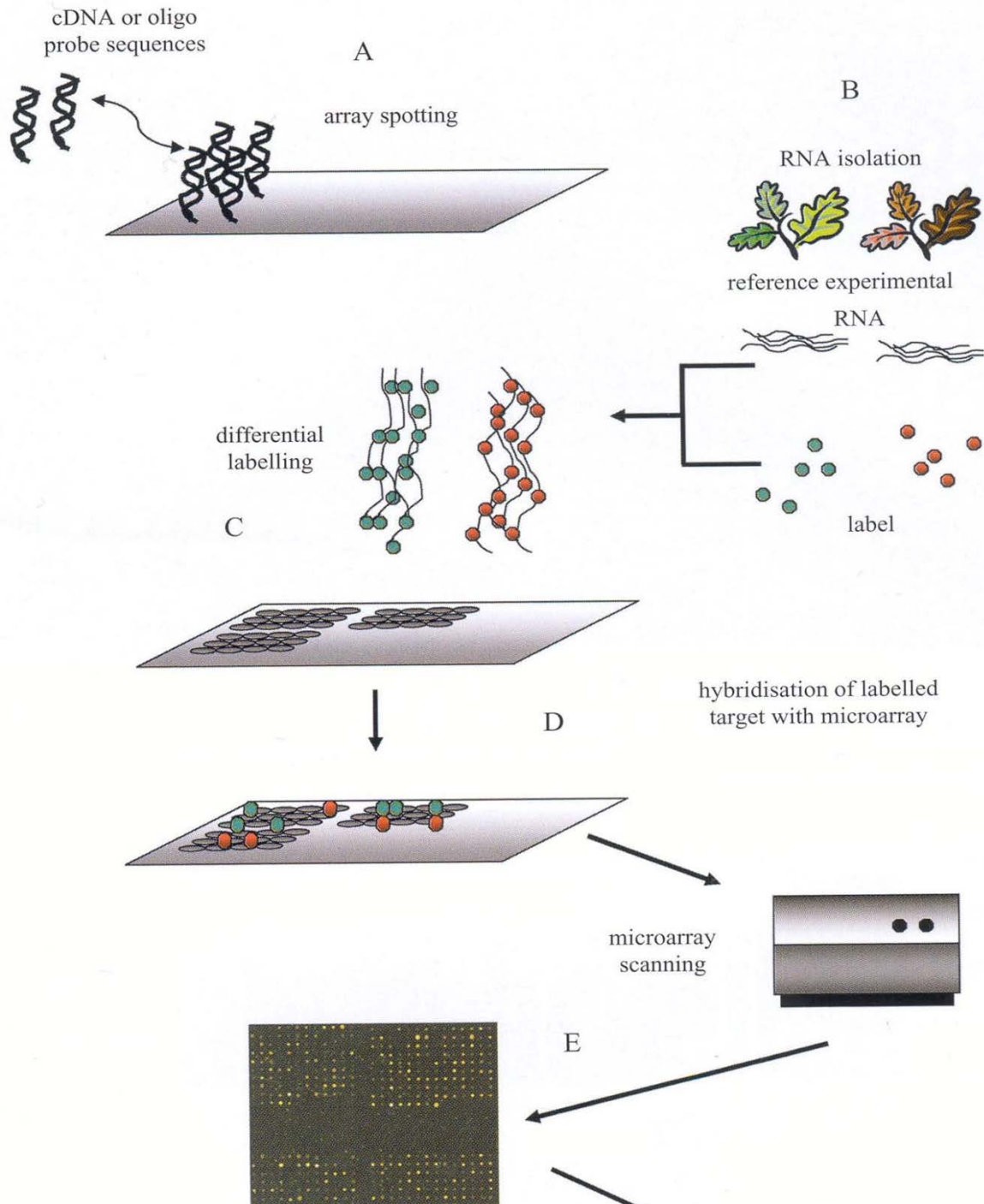
További különbségek:

macroarray:

legfeljebb 10.000 szekvencia vihető fel

radioaktív jelölést használnak

a hordozón 300 μ m-nél nagyobb folt (spot) keletkezik



A módszer sikerének feltétele a megfelelő minőségű RNS izolálása.

Microarray:

több 10.000 szekvencia vihető fel

a kontrollt és a kezelt mintát

két különböző *fluoreszcens* színnel jelölik és

a két minta keverékét hibridizáltatják egy lemezen

A *foltok színe* mutatja a

génexpressziós különbségeket:

a génműködés intenzitásának változása

nyomon követhető

A microarray (transzkriptom) eredmények kiértékelése

1. kép (image) analízis (képolvasóval/scanner)
2. szignál–normalizáció:
az eltérő festékekkel történt jelölések esetén az egyes jeleket egymáshoz igazítani
3. az eltérő expresszivitású gének azonosítása
4. gén – klaszterezés (csoportosítás)
5. biológiai értelmezés

Minden lépésre különböző eljárások ismertek.

A microarray-technika **előnye:**

sok kísérlet eredményét képes ötvözni

→ **azonosíthatóak a közös szabályozás alatt álló gének**

lehetőséget ad pl. az

- egyes **táplálkozási stresszekre** adott reakcióban,

- az **általános stressz-reakcióban** szerepet játszó
gének elkülönítésére

- az adott stresszorra **eltérően reagáló**
fokozott – csökkentett,
korai - késői reakció
gének csoportosítására

A microarray technika mezőgazdasági hasznosítása

A tápanyag-hasznosító képesség javítása érdekében ismernünk kell a stressz hatásra bekövetkező génaktivitás változását.

Kérdés: a tápanyag érzékelése (hiány – többlet) és a jelátvitel

- a géncsaládok koordinált szabályozását, vagy az
- egyes gének szelektív működését indukálja-e és
- melyek az ellenőrzési pontok

Ezek tisztázására két,
microarray-technikán alapuló megközelítést ismerünk:

- I. egyes gének, illetve géncsaládok
funkcionális jellemzése
- II. a kérdéses környezetre / kezelésre adott
expressziós változások elemzése

I. Géncsalád alapú megközelítés

Az azonos géncsaládhoz tartozó
transzporterek transzkripciója
eltérő környezeti hatásokra következnek be:
differentiált szabályozás

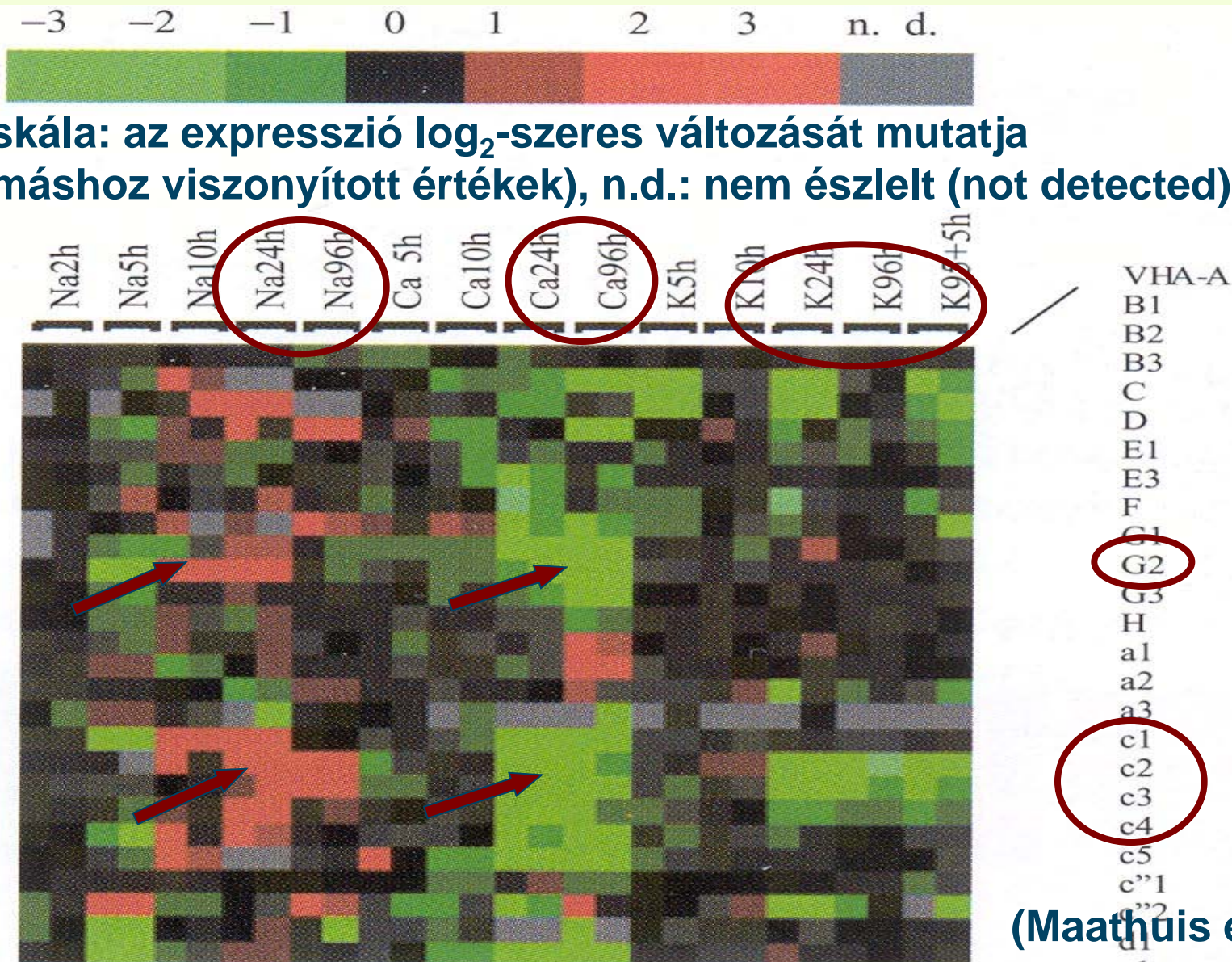
A családon belüli differenciált szabályozás érdekes esete a vakuólum H⁺-ATP-áz gén transzkripciója.

A protein 12 alegységből épül fel, melyek közül néhányat több gén kódol.

Arabidopsisban: 26 H⁺-ATP-áz gén ismert

A V-ATP-áz alegységek génjeinek transzkripciós szabályozása *A.t.*-ban 2-96 ó.át tartó NaCl-stressz, K⁺, v. Ca²⁺ hiány hatására.

Színskála: az expresszió log₂-szeres változását mutatja (egymáshoz viszonyított értékek), n.d.: nem észlelt (not detected)



(Maathuis et al., 2003).

Az egyes V-ATP-áz kódoló gének (V: vakuólum) szelektíven reagálnak a tápanyag ellátottságra:

Sóstresszre: **fokozott** transzkripció
főként a stresszhatás késői fázisában

Ca²⁺- hiány a legtöbb V-ATP-áz gén transzkripciójának **csökkenését** eredményezte

A K⁺-hiány csak **néhány** V-ATP-áz gén működését befolyásolta

A funkcionális proteinek
szabályozásának **szintjei**:

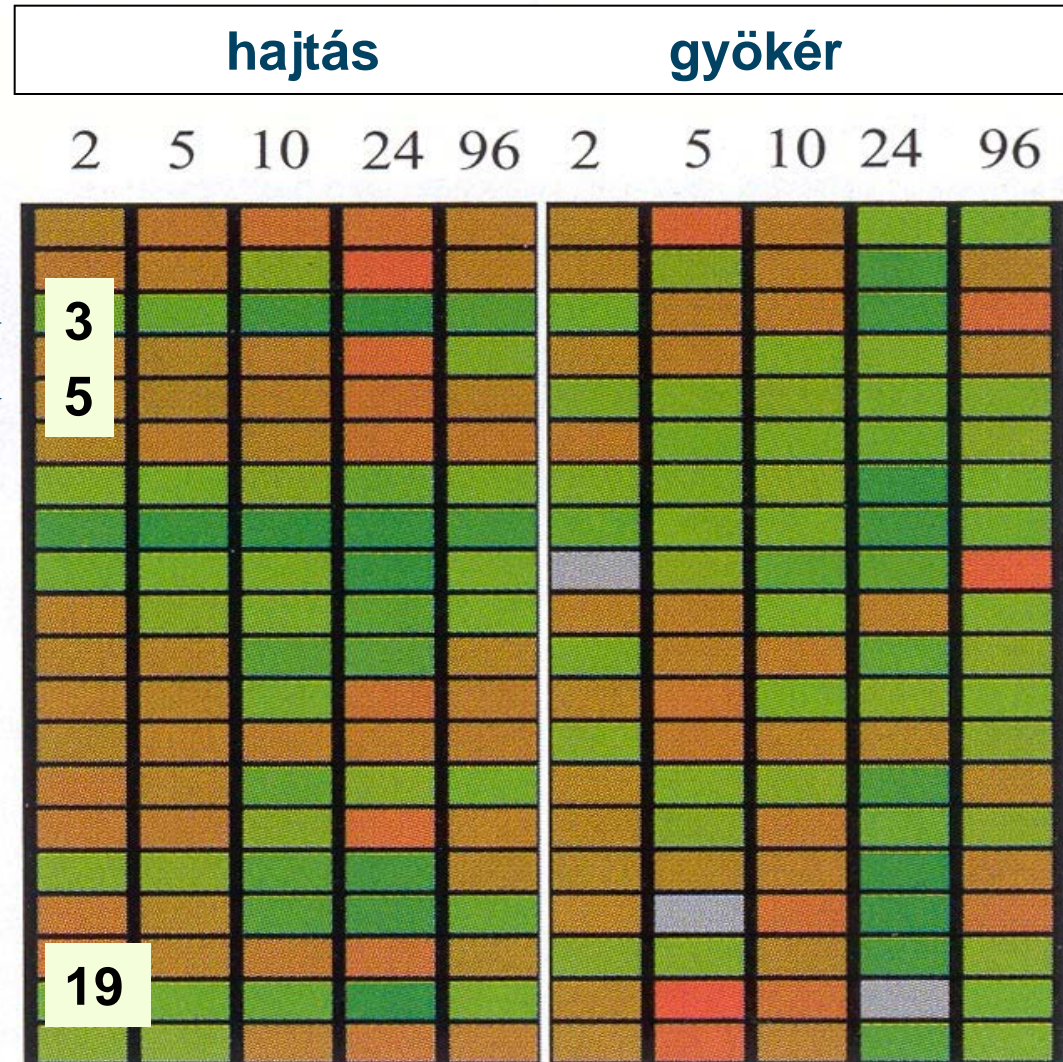
- az alegységek transzkripciós szabályozása
- poszt-transzkripciós szabályozása
- a fehérje élettartama

A CNGC gének szövetspecifikus expressziója A.t. hajtásában és gyökérében 2-96 órán át tartó NaCl kezelés után.

Hua et al., (2003).

CNGC:
(cyclic nucleotide gate channel)

színskála a kifejeződés \log_2 -szeres változását mutatja



CNGC géncsalád
(cyclic nucleotide gate channel)

szövet-specifikus szabályozás a CNGC (cyclic nucleotide gate channel) géncsaládnál

Az 5. gén esetében
a **hajtásban** nincs szignifikáns változás,
a **gyökérben** egyértelmű csökkenés.

A 19. génnél fordított helyzetet találunk.

Továbbá:

a hajtásban 3., 8. és 9. gén expressziója 2-6 szoros
csökkenést mutatott, míg az 5., 6. és 13. gén
transzkripciója lényegében nem változott

A microarray: átlagos expressziós szintet adja meg, lehetővé téve a transzkripció változásának nyomon követését

Ez a módszer azonban **nem alkalmas** a gén funkciójának megállapítására, de jó kiinduló pontja lehet az adott hatásra aktiválódó gének további vizsgálathoz történő kiválasztására.

II. A környezetre (külső/belső *) változására adott expressziós változások elemzése

*****: egyedfejlődés

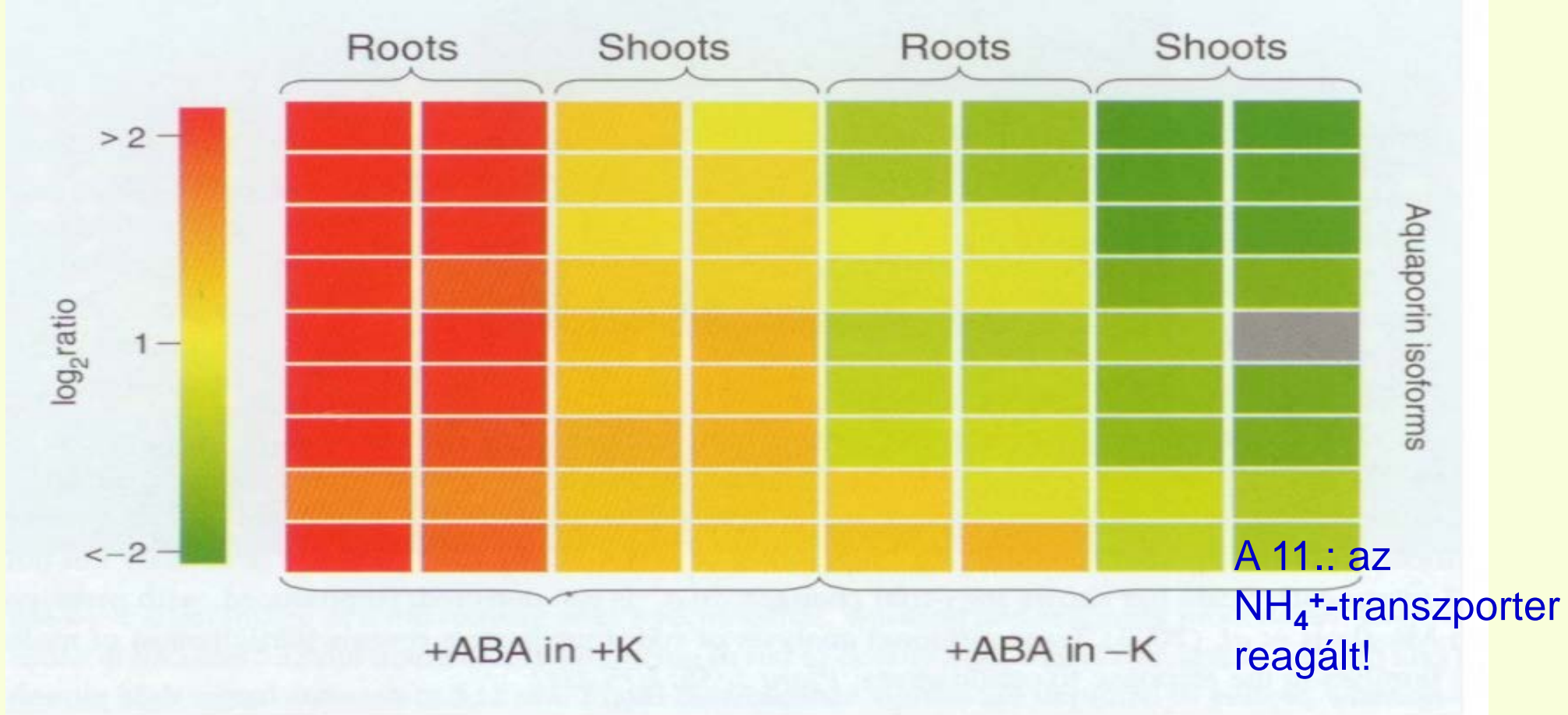
Maathuis et al., 2003:

több mint 1000 ismert, ill. feltételezett

membrán transzporter szerepét és interakcióját

tanulmányozták *A.t.* gyökérben

K^+ és C_a^{2+} hiányos, v.mint Na^+ stresszes környezetben



A transzporter gének expressziójának változása a kezelés (K⁺ és Ca₂⁺ hiány, Na⁺ stressz) hatására.

100%: a funkcionális transzporter osztályba tartozó gének száma

K⁺ nagyon gyenge transzkripciós reakciót váltott ki
idős növényeken!

de: **fiatal** növényeken megismételt kísérlet:
a kezelés után 6 órával számos transzporter
aktivitása megnőtt:

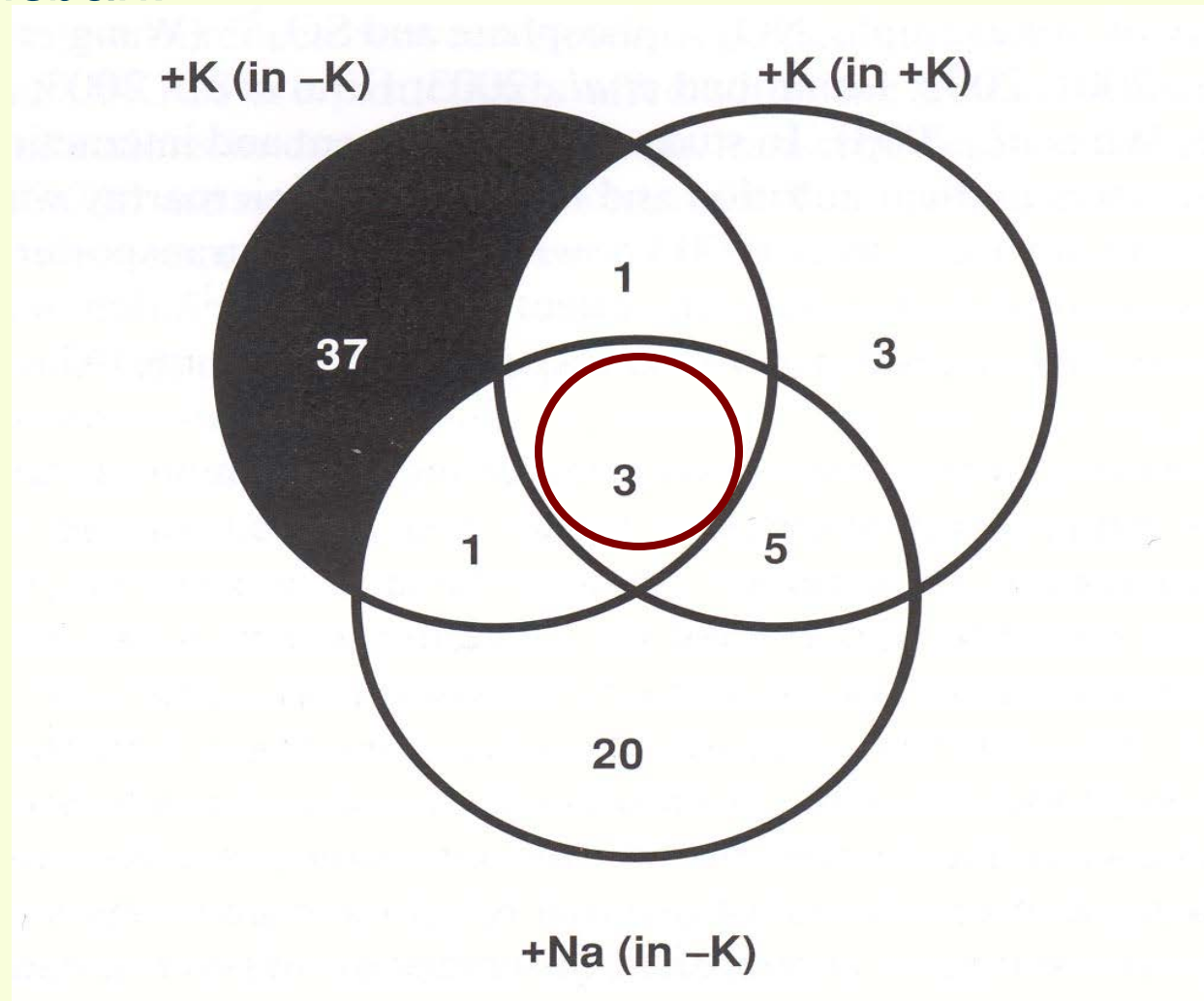
Oka: az **idős** növények már felhalmozták
a szükséges K^+ -mennyiséget

a **fiatal** növények a gyors növekedésükhöz és
az ozmotikus nyomás fenntartásához
sok K^+ -ot igényelnek

EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE !!

Külső és belső környezeti hatások egyidejű értelmezése

K⁺ ellátottságra reagáló gének száma fiatal *Arabidopsis*ban:



Maathuis et al., 2003

+K (in -K): K⁺-hiányos növ.ek kezelése 10 mM KCl-dal

+Na (in -K): 10 mM NaCl-dal

+K (in +K): K⁺-al jól ellátott n. kezelése 50 mM KCl-dal

A microarray eredmények Northern blottal, vagy RT-PCR-rel történő **ellenőrzése**, megerősítése szükséges annak érdekében, hogy a **nemspecifikus** változásokat és az **esetleges félrevezető következtetéseket** elkerülhessük.

A microarray nem egyszerűen új módszert jelent, hanem új dimenziókat nyitott meg élő szervezet működésének megismerésében.

A nagy mennyiségű expressziós adatból az azonos mintázatot (idő, kezelés, mutáns, stb.) követő gén-klaszterek megtalálását (annotáció) (annotáció: rövid ismertetés; kivonatolás; feljegyzés) computeres algoritmusok segítik:

kialakítható a funkcionálisan összetartozó gének csoportja

tisztázható a gének anyagcsere folyamatban betöltött szerepe

azonosíthatóak a regulációs hálózatok

Az előadás összefoglalása

A microarray technika alkalmas a gének ezreinek egyidejű megfigyelésére.

Az expressziós mintázat környezeti hatásokkal való egybevetésével és időbeli változásának tanulmányozásával megtalálhatóak a közösen szabályozott gének, vagy az általános (nem specifikus) stressz-reszponzív gének.

Komprehenzív képet kapunk a gének aktivitásáról, amely a környezeti és fejlődési változásokra adott integrált reakciót eredményezi.

Az előadás ellenőrző kérdései

- **Ismertesse a microarray módszert és felhasználási lehetőségeit.**
- **Mutasson be példát a környezeti (külső/belső) változására adott expressziós változásra.**
- **Milyen előnyei vannak a microarray-technika alkalmazásának?**

A következő előadás címe:

**A NÖVÉNYEK VÍZHASZNOSÍTÁSÁNAK
GENETIKAI ALAPJAI**

KÖSZÖNÖM A FIGYELMÜKET

Az előadás anyagát készítette: Dr. Hoffmann Borbála