

Δοκιμές (Συστήματα) παροδικής έκφρασης γονιδίων

- ↳ Λειτουργία γονιδίου
- ↳ Ανάλυση προαγωγέων
- ↳ Συμπληρωματικότητα διαγονιδίων
- ↳ Παραγωγή πρωτεϊνών

Πλεονεκτήματα σε σχέση με σταθερό μετασχηματισμό

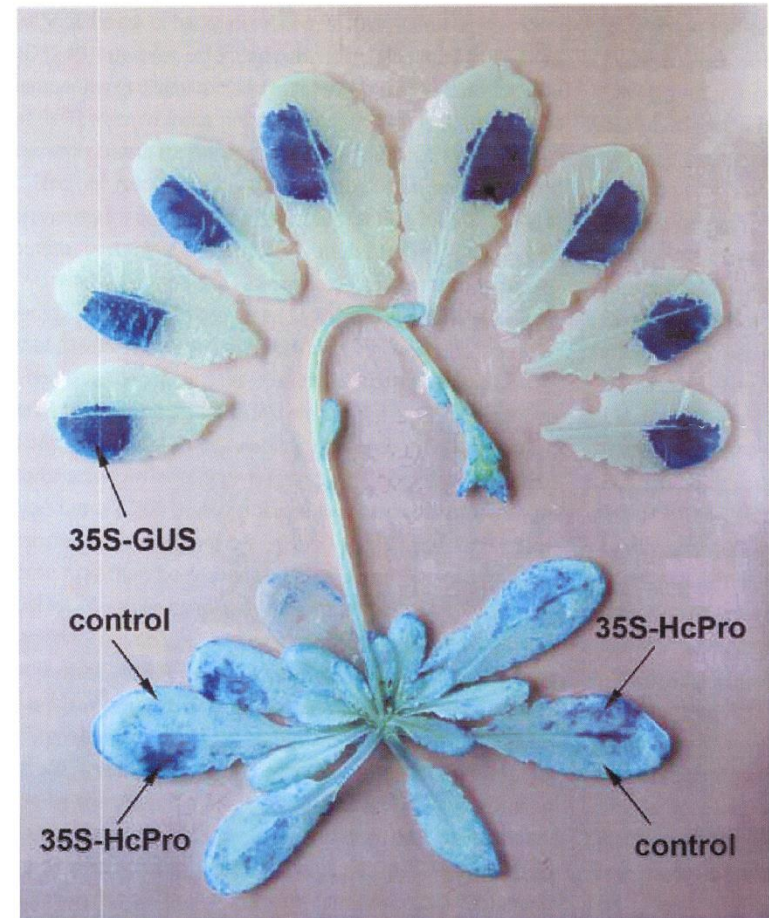
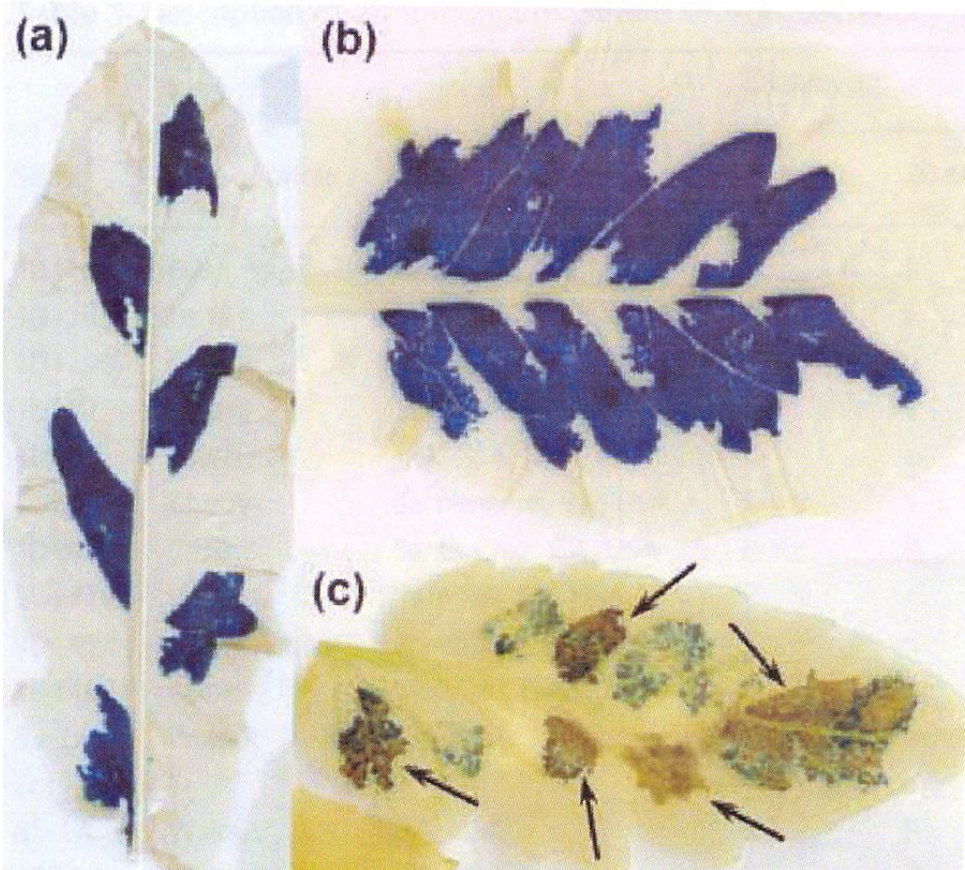
- ταχύτερη προσέγγιση του ζητήματος υπό μελέτη
- επιτρέπει την ανάλυση έκφρασης γονιδίων με επιβλαβείς επιδράσεις στην ανάπτυξη και αύξηση του φυτού
- ταυτόχρονη ανάλυση ανεξάρτητων μετασχηματισμένων κυττάρων χωρίς σωματοκλωνική ποικιλότητα
- εξασφαλίζει επαρκή ποσότητα ιστού για ανάλυση RNA και πρωτεϊνών
- εξασφαλίζει σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης του διαγονιδίου

Μειονεκτήματα

- Αποτελεσματική μόνο σε ορισμένα είδη φυτών
- μελέτη γονιδίων με «μετρήσιμο» φαινότυπο σε σύντομο χρονικό διάστημα

“Agroinoculation”- “Agroinfiltration” (“vacuum- infiltration”)

Διείσδυση βακτηρίων *Agrobacterium*, μετασχηματισμένα με καταλληλο πλασμιδιακό φορέα, με ένεση στο υπέργειο τμήμα του φυτού (συνήθως φύλλα)



Στρατηγική “full-virus”

Φορείς οι οποίοι μεταφέρουν και εκφράζουν ένα γονίδιο-υπο-μελέτη μέσα στα φυτικά κύτταρα αλλά συμπεριφέρονται όπως οι ιοί άγριου τύπου π.χ. TMV, PVX, AMV

Μόλυνση των ξενιστών με ολόκληρα ιικά σωματίδια

(a) A typical expression vector based on TMV



π.χ. σύντηξη με πρωτεΐνη καψιδίου

Πλεονεκτήματα

Ταχύτατη έκφραση

Μεγάλη απόδοση έκφρασης

Διασυστηματική μεταφορά (?)

Μειονεκτήματα

Μεταφορά μόνο μικρού μεγέθους ένθετων

Μη έκφραση σε πολλούς επιθυμητούς ιστούς

π.χ. άνθη, ώριμα, πρώτα φύλλα

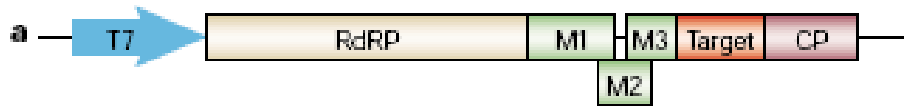
Αυξημένη επικινδυνότητα

Γονιδιακή Σίγηση

Ειδοξειδίκευση

Στρατηγική “deconstructed virus”

- Φορείς οι οποίοι φέρουν ορισμένα μόνο στοιχεία του ιικού μηχανισμού (*in vitro* transcription για τους RNA ιούς)



- Αντιγραφα του ιικού φορέα εισάγονται είτε με απευθείας εφαρμογή στα φυτά ή εισάγονται πρώτα σε T-DNA φορείς και μεταφέρονται μέσω *Agrobacterium* (**agroinfection**) → ανασυνδυασμένοι ιοί προκύπτουν με μεταγραφή από έναν ισχυρό προαγωγέα

Ή αντίγραφα προκύπτουν από το φυτικό χρωμόσωμα (και υπό ρύθμιση)



(a)



1. Localized infection with virus/RNA

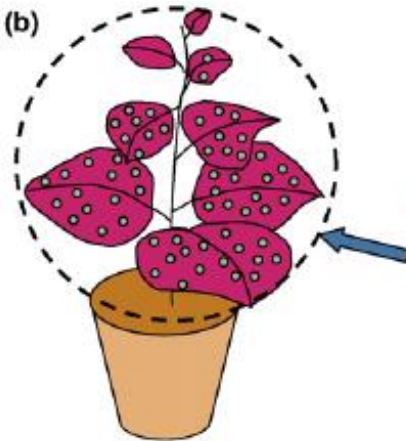


2. Cell-to-cell movement



3. Cell-to-cell movement, systemic spread, accumulation of viral particles

(b)



1. Whole plant transfection with *Agrobacterium*

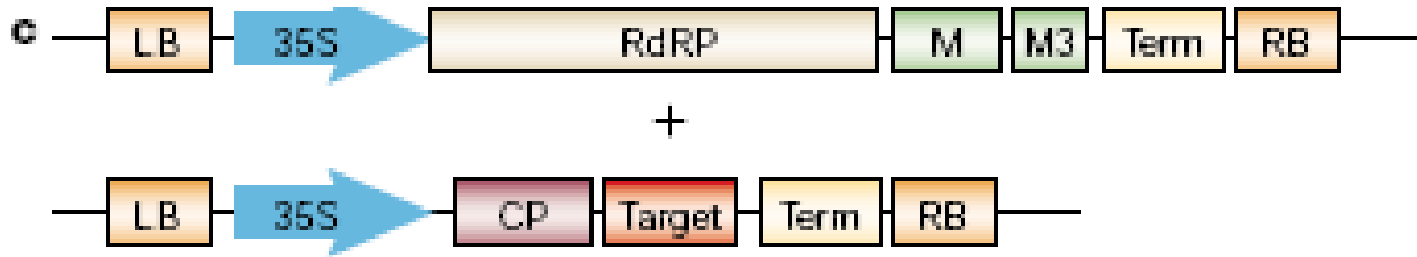


2. Cell-to-cell movement



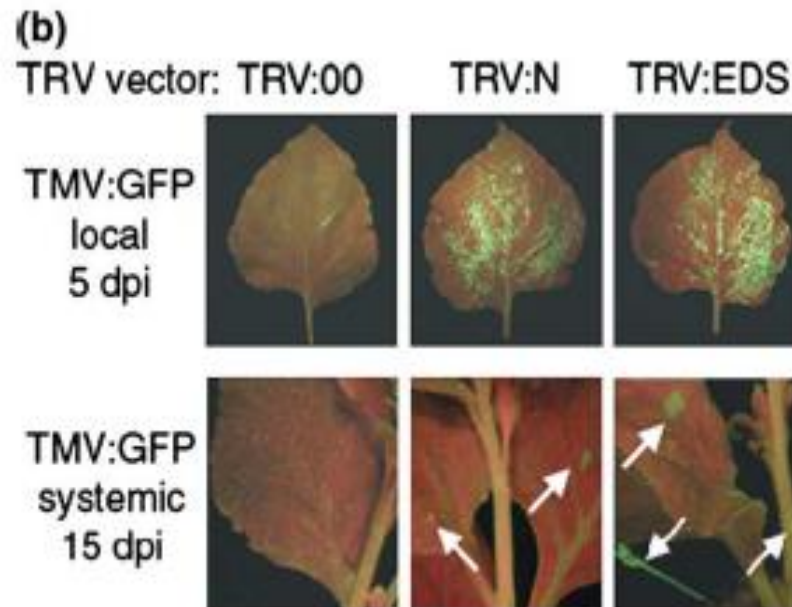
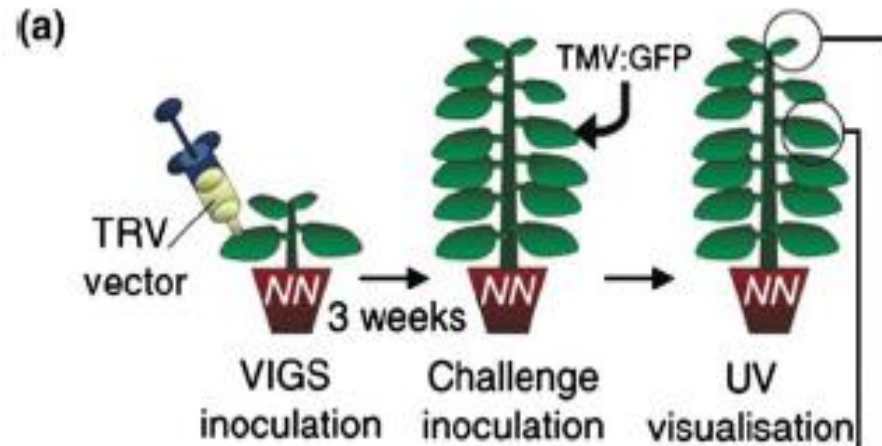
3. Cell-to-cell movement

- Κάποιες ιδιότητες του ιικού μηχανισμού προσφέρονται *in trans* από δεύτερο φορέα και από το φυτό (π.χ. πολυμεράση, πρωτεΐνη μεταφοράς από κύτταρο-σε-κύτταρο, πρωτεΐνη του καψιδίου)



- Αποτελεσματικότερη μόλυνση αλλά και πάλι λίγα κύτταρα μολύνονται
- Η διασυστηματική μεταφορά δεν είναι πάντα επαρκής και απαιτεί τη δημιουργία ενεργών ιών
- Η παραγωγή RNA αντιγράφων ιών με agroinfection είναι πολύ περιορισμένη για εφαρμογής μεγάλης κλίμακας (αλλά δεξ *Magniffection, Marillonet et al, Nature Biotechnology, 2005, 23: 718*)

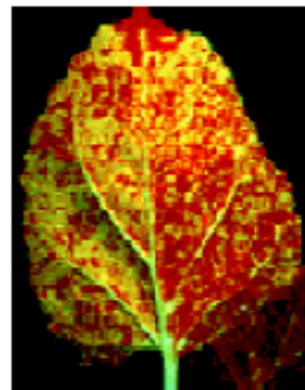
Χρήση των ικών φορέων για γονιδιακή σίγηση στα φυτά



Virus-Induced Gene Silencing (VIGS)



0 dpl

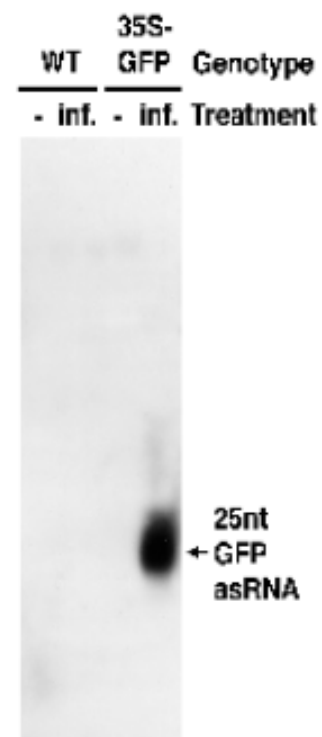
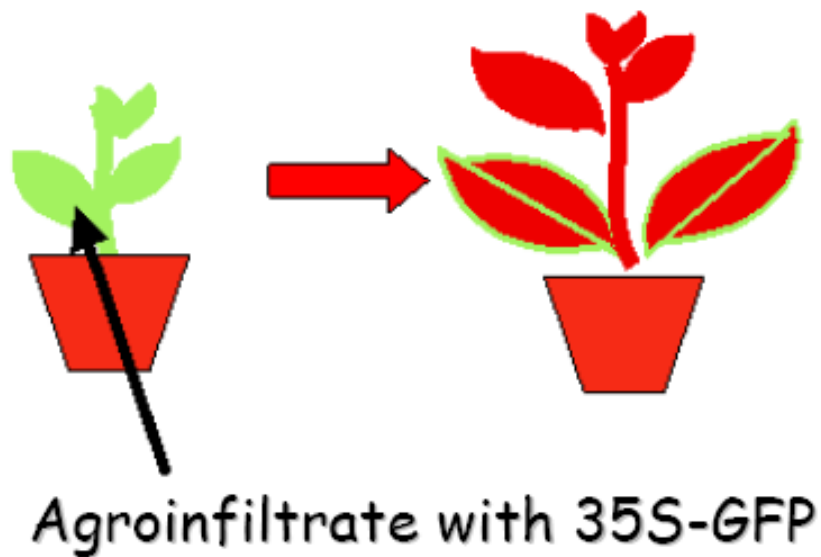


13 dpl

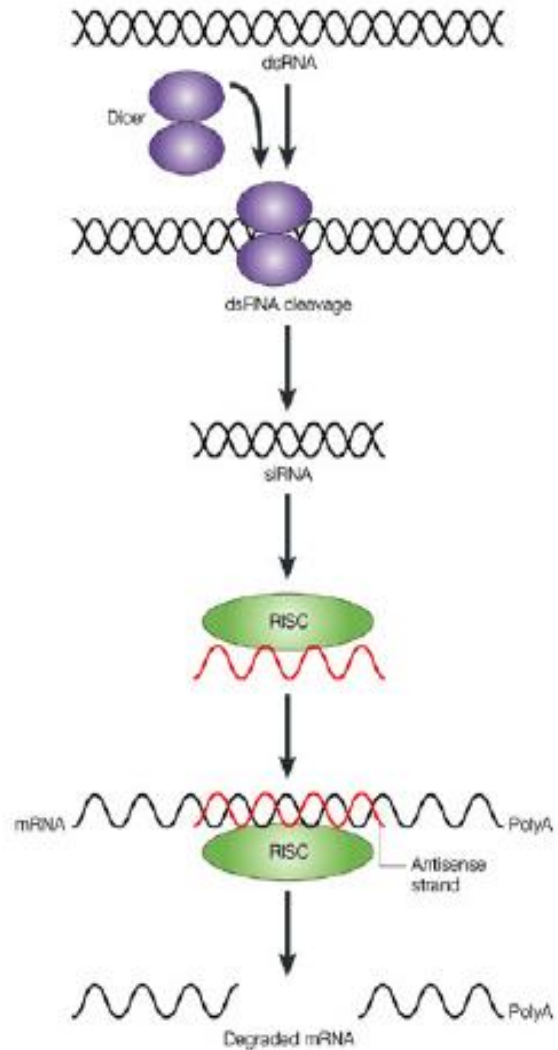
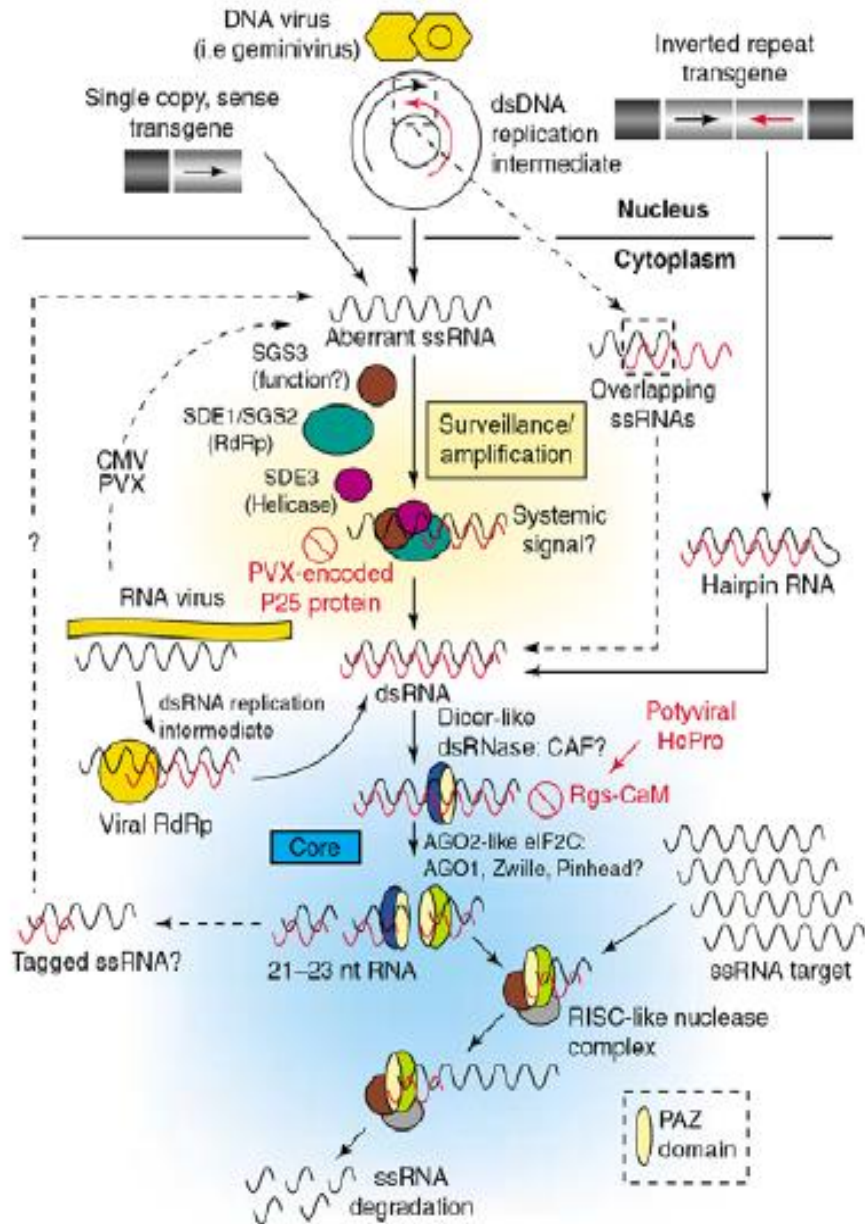


20 dpl

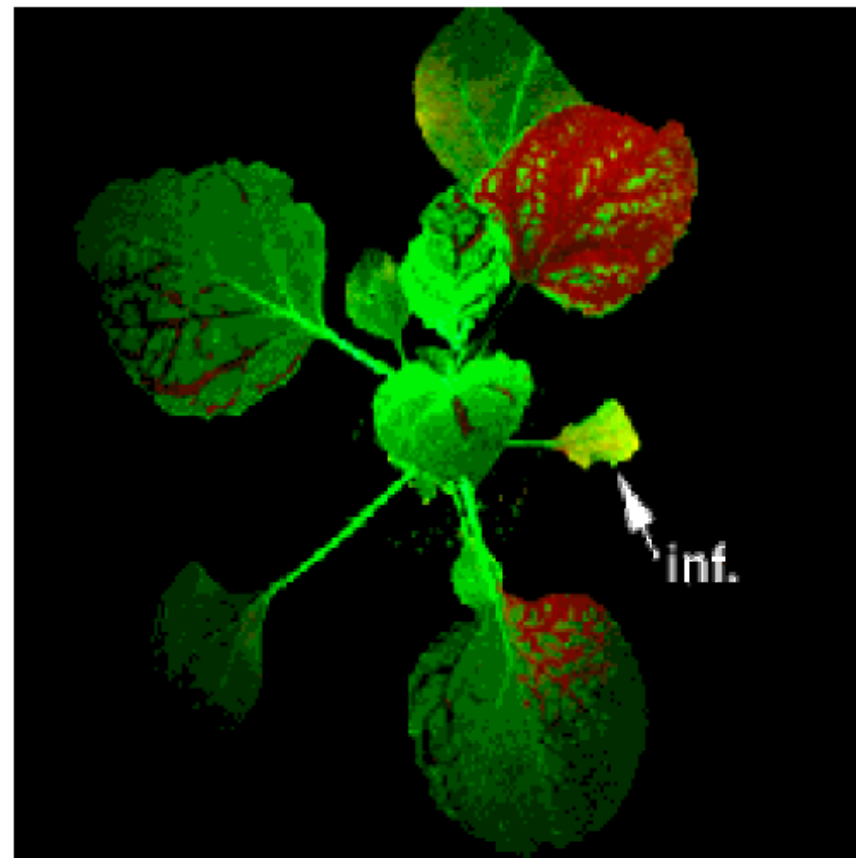
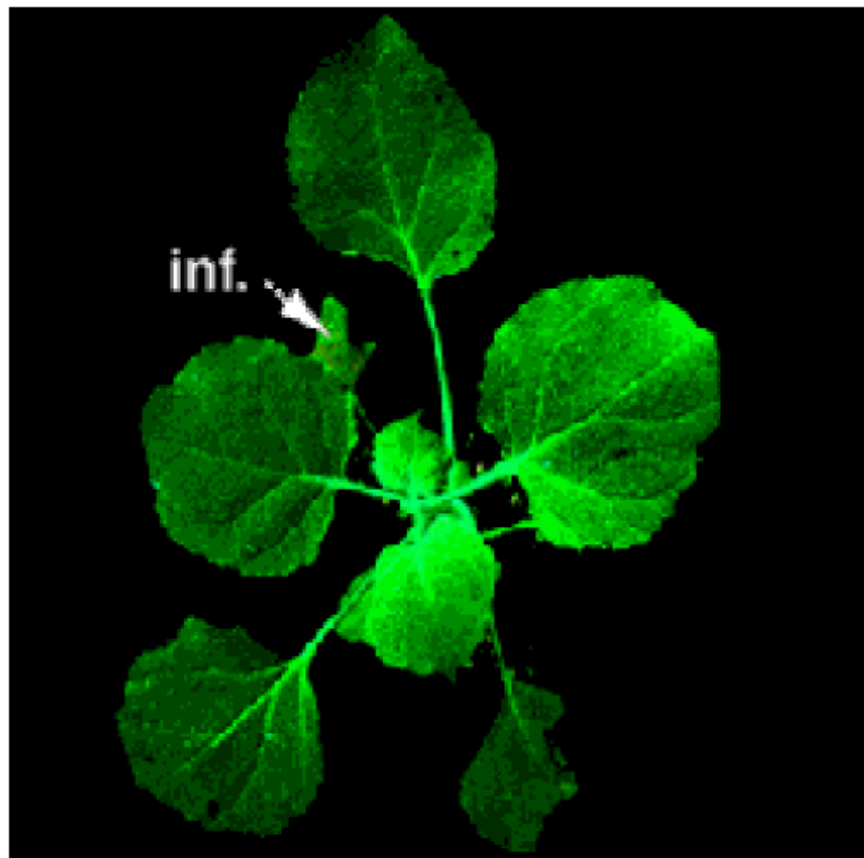
Systemic Gene Silencing



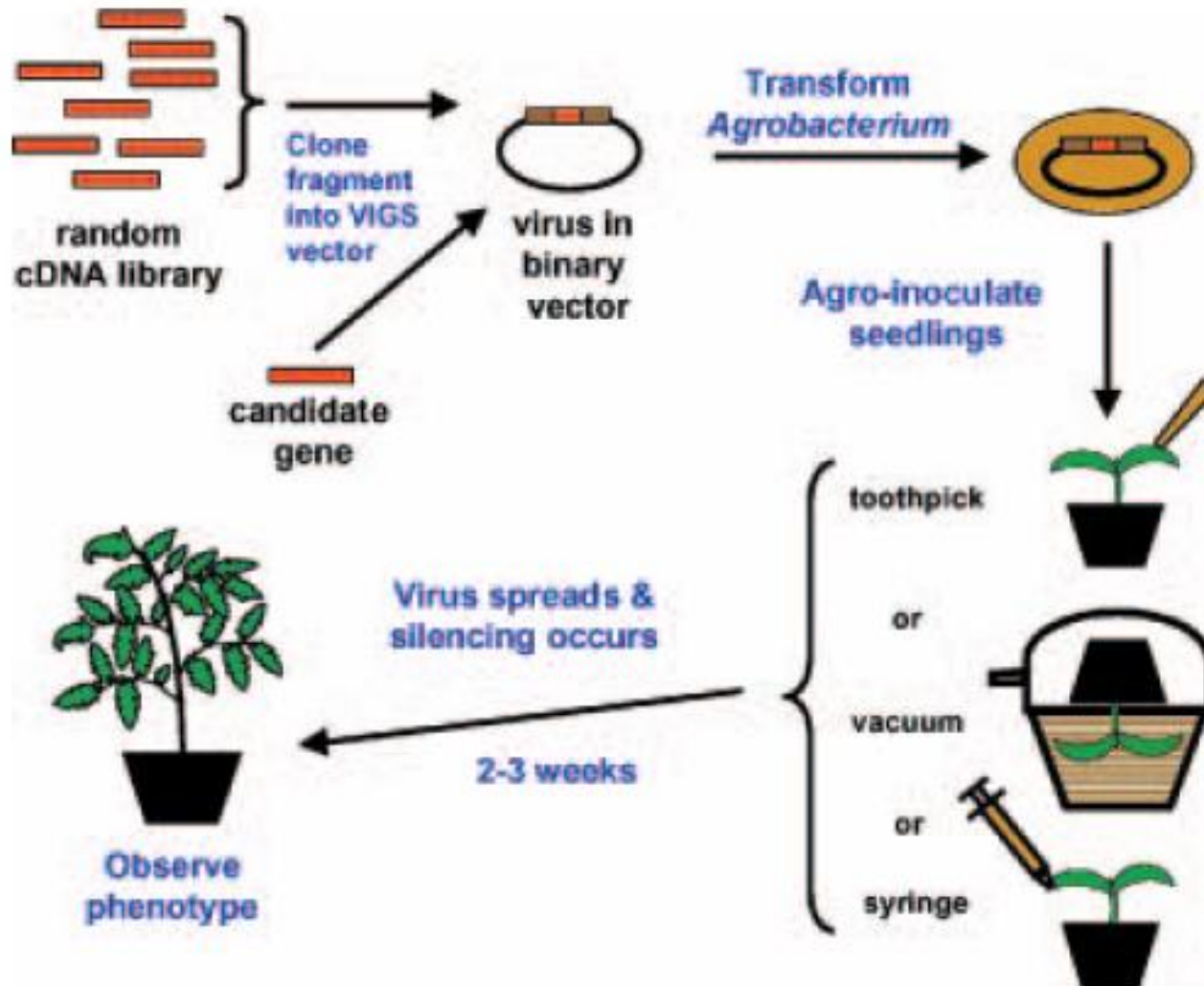
RNA gene silencing - PTGS mechanism



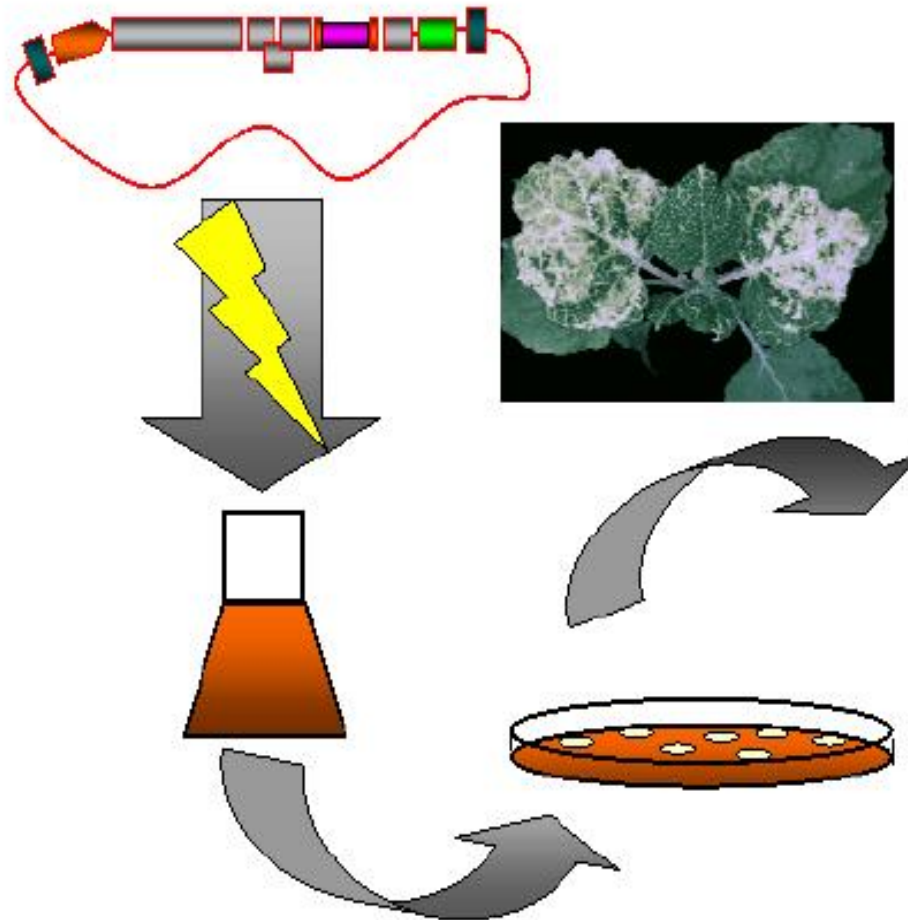
Systemic Gene Silencing



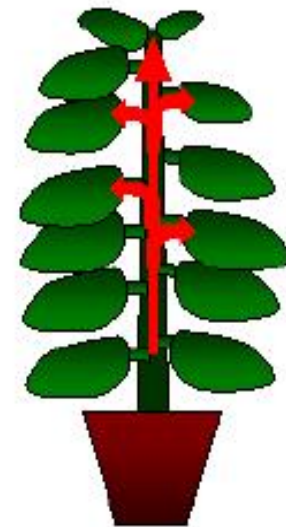
High-throughput VIGS



VIGS in Fast-Forward Genetics



Systemic infection
and silencing



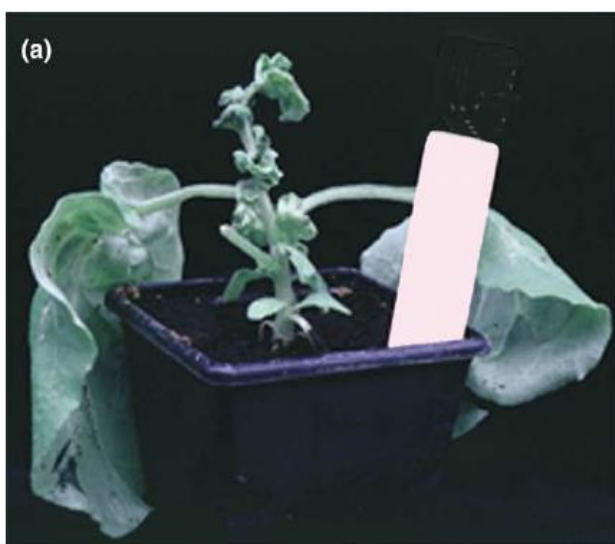
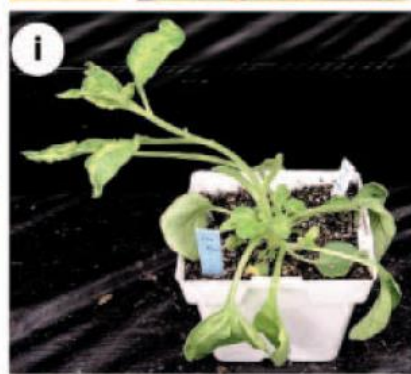
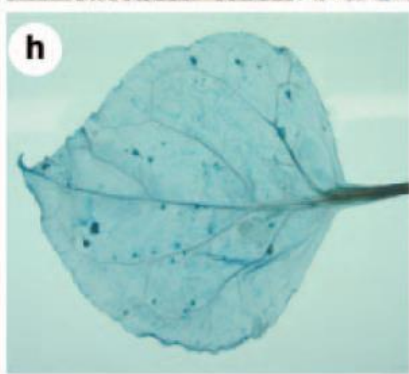
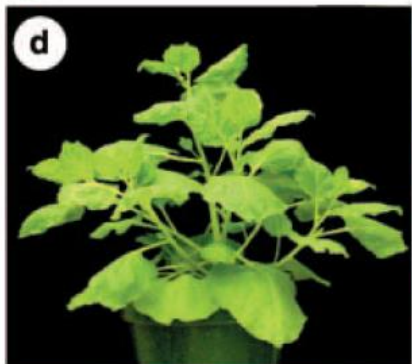
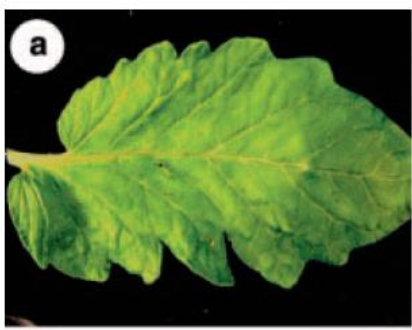


Fig. 2. Selected VIGS phenotypes. From a VIGS survey of 5000 different *N. benthamiana* cDNAs approximately 15% produced pronounced symptoms resulting in suppression of plant growth or development. These images illustrate three of the symptom types due to silencing of ubiquitin (a), magnesium chelatase (b), or an unknown gene (c).



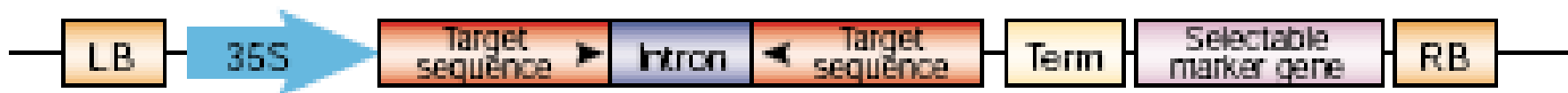
[+]

- Ταχύτητα
- δεν απαιτείται γενετικός μετασχηματισμός
- παρακάμπτεται η παρουσία περισσότερων του ενός γονιδίου με παρομοια λειτουργία
- εφαρμογή σε διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα/ φυτά

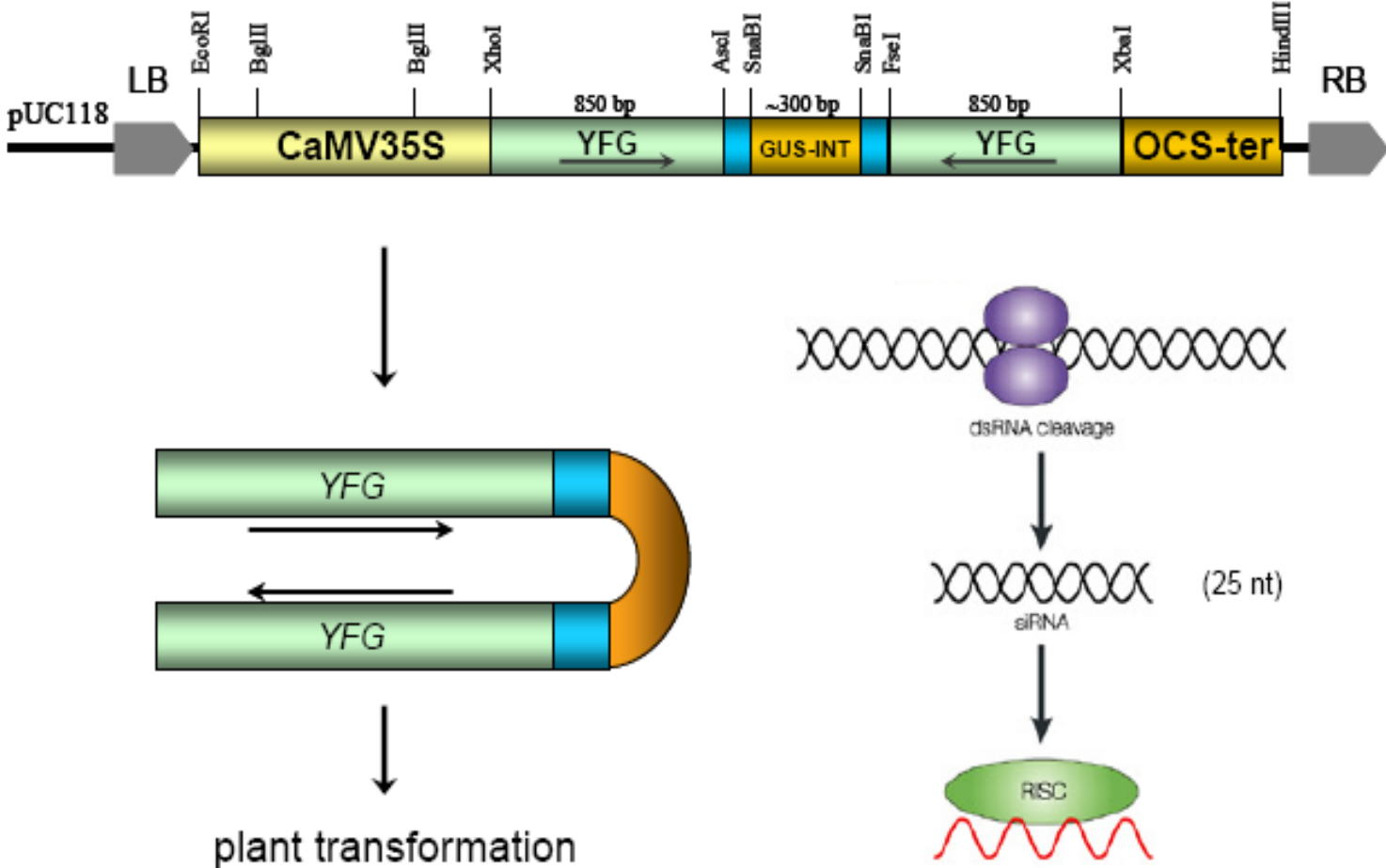
[-]

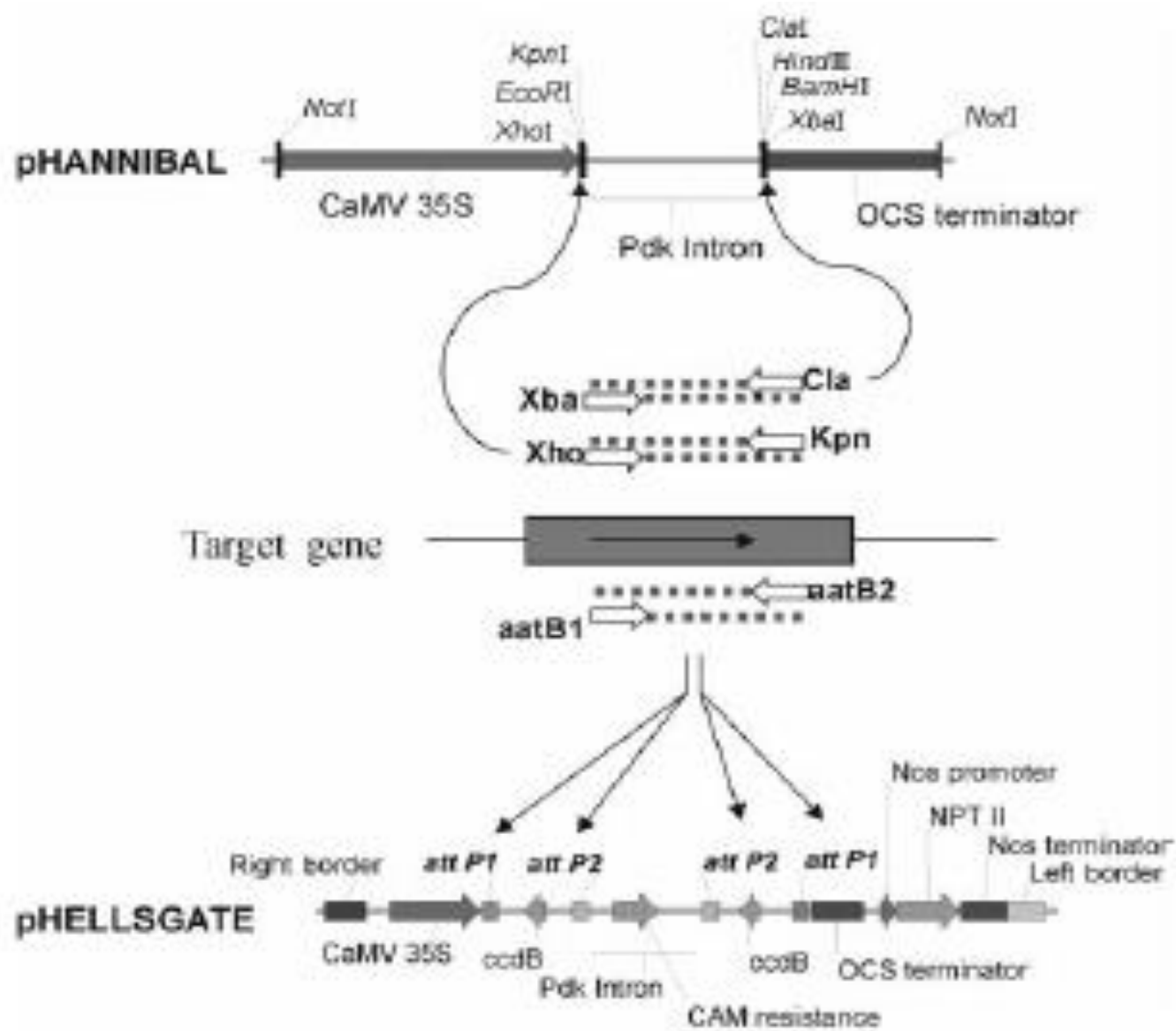
- Σπανίως συμβαίνει ολική καταστολή της εκφρασης του γονιδίου
- Η απουσία φαινοτύπου δεν σημαίνει ότι το γονίδιο δεν έχει δράση
- Δεν υπάρχει σε όλο το φυτό ίδιος βαθμός σίγησης
- Διαμεσολάβηση παθογόνου
- πιθανή καταστολή και άλλων γονιδίων (μη στοχων- ιδίως όταν το γονιδίωμα του φυτού δεν είναι γνωστό)

Φορείς για γονιδιακή σίγηση στα φυτά με φορείς-φουρκέτα (Hairpin vectors)



Gene function studies through gene silencing





Παραγωγή διαγονιδιακών φυτών ελεύθερων από γονίδια επιλογής - clean gene technology

Χρήση κατάλληλων πλασμιδιακών φορέων, οι οποίοι

1. φέρουν γονίδια επιλογής χωρίς επικίνδυνες βιολογικές δραστηριότητες
π.χ. *gfp*, *ipt*
2. επιτρέπουν την ένθεση του ξένου γονιδίου και του γονιδίου επιλογής σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος του φυτού, μη συνδεδεμένες μεταξύ τους



Γενετική ανάλυση των απογόνων για την αναγνώριση των επιθυμητών φυτών

3. αυξάνουν τη συχνότητα των ανασυνδυασμών με αποτέλεσμα την εξαγωγή του γονιδίου επιλογής
4. επιτρέπουν την εξαγωγή του γονιδίου επιλογής από το φυτικό γονιδίωμα με χρήση συστημάτων ρεκομπινάσης με εξειδίκευση θέσης

Συστήματα ρεκομπινάσης με εξειδίκευση θέσης

CRE-*lox* από τον φάγο P1

FLP-*frt* από *Saccharomyces cerevisiae*

R-*RS* από *Zygosaccharomyces rouxii*

- Το γονίδιο επιλογής τοποθετείται ανάμεσα σε θέσεις αναγνώρισης μιας ρεκομπινάσης (*lox*, *frt*, *RS*)
- Η ρεκομπινάση (CRE, FLP, R) παράγεται
 - ο είτε από έναν φορέα με παροδική έκφρασή της
 - ο είτε με κάποιο σύστημα επαγωγής της έκφρασής της (επαγώμενος προαγωγέας)
 - ο είτε με διασταύρωση των φυτών με φυτά που παράγουν ρεκομπινάση

Left hand palindrome

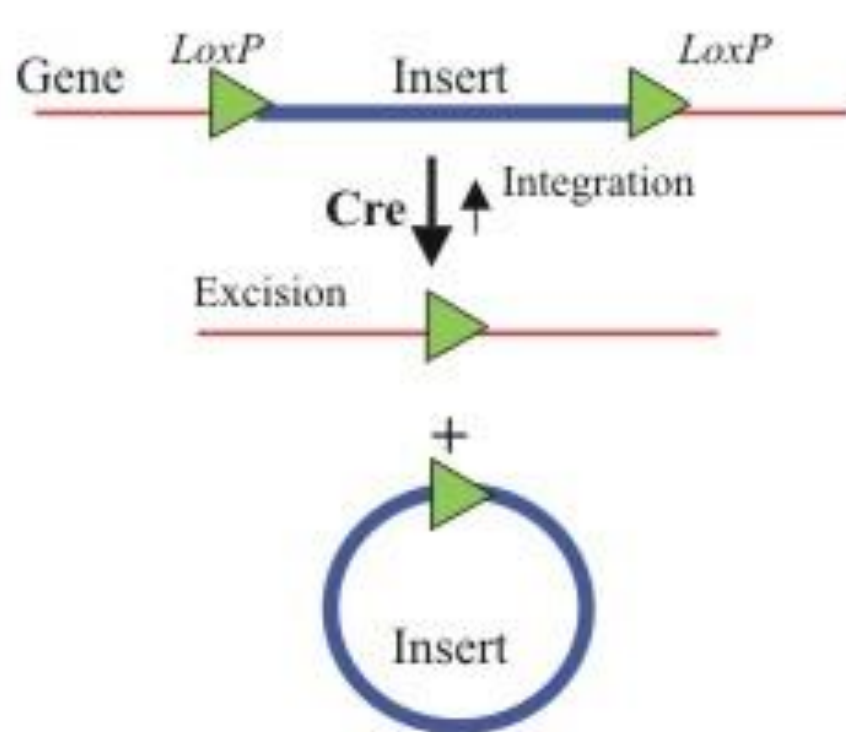
Right hand palindrome

8 bp core

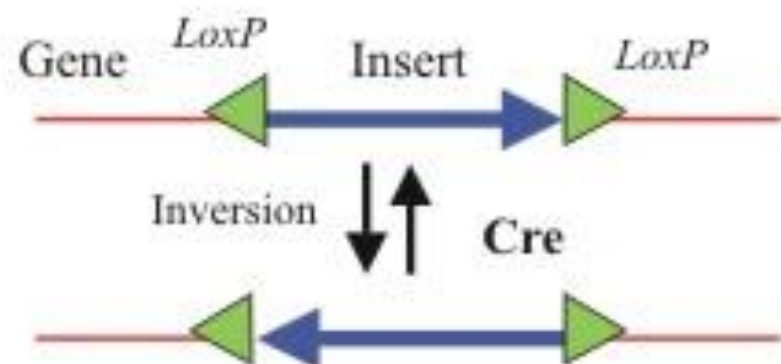
loxP

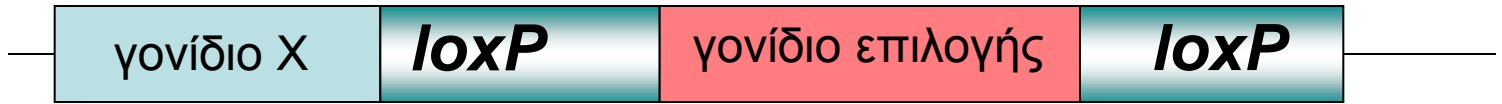
ATAACTTCGTATA GCATACAT TATACGAAGTTAT

A.



B.

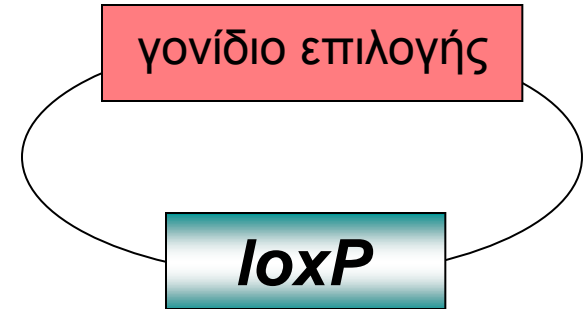




CRE



+



loxP

ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT



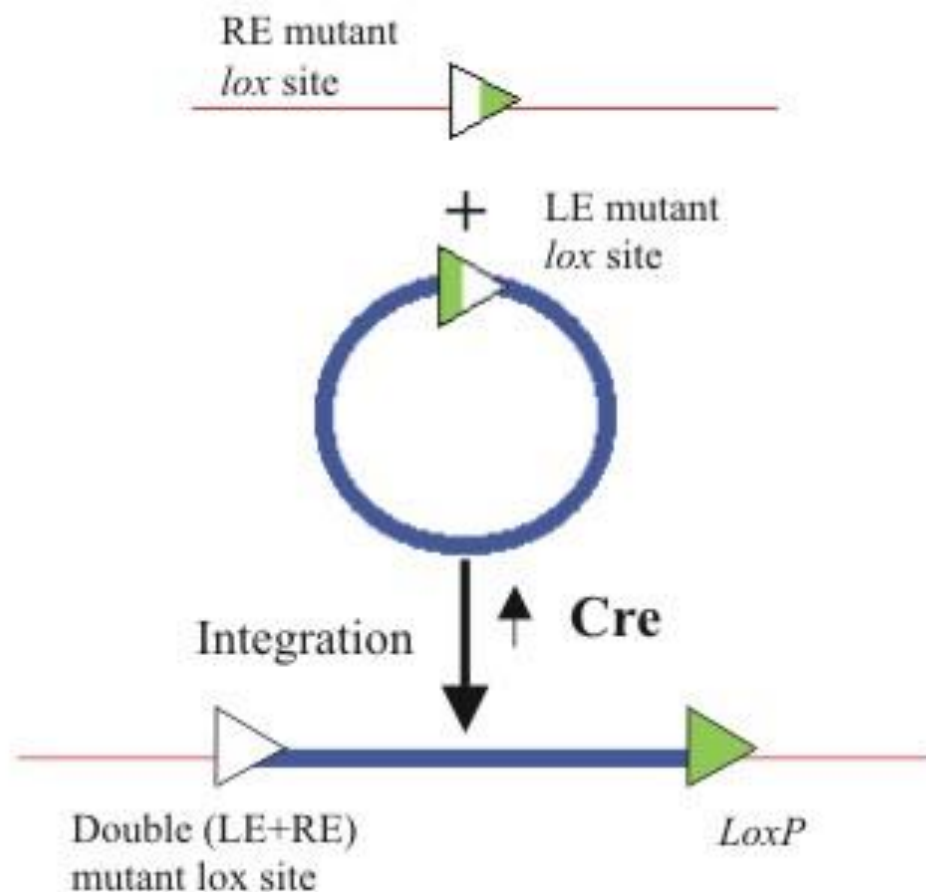
Στρατηγική μεταλλαγμένης θέσης lox για ενσωμάτωση γονιδίων

A. Sequences of LE and RE *lox* sites.

LE Mutant: TACCGTTCGTATA GCATACAT TATACGAAGTTAT
RE Mutant: ATA ACTTCGTATA GCATACAT TATACGAA CGGTA

8 bp core

B. *De novo* Lox site generation in DNA recombination.

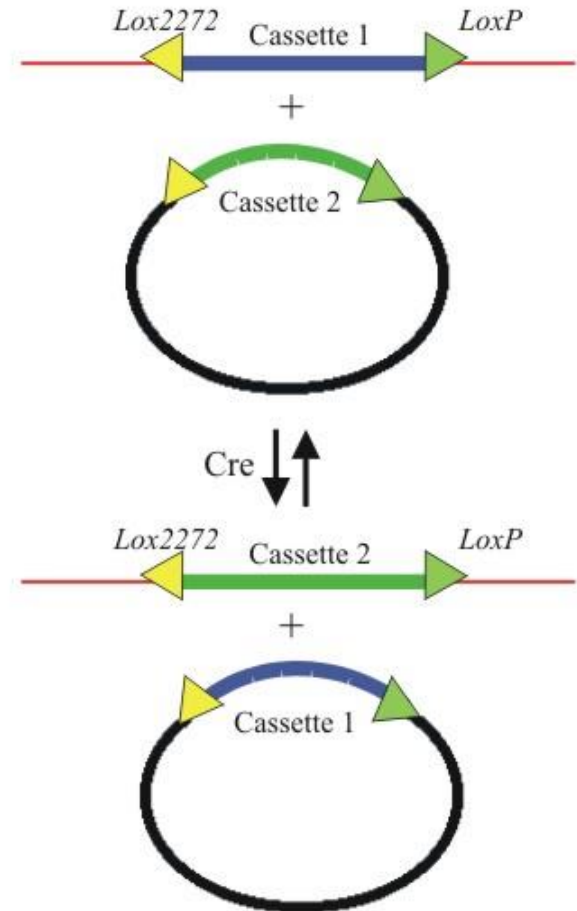


Στρατηγική
μεταλλαγμένης θέσης lox
για ενσωμάτωση γονιδίων

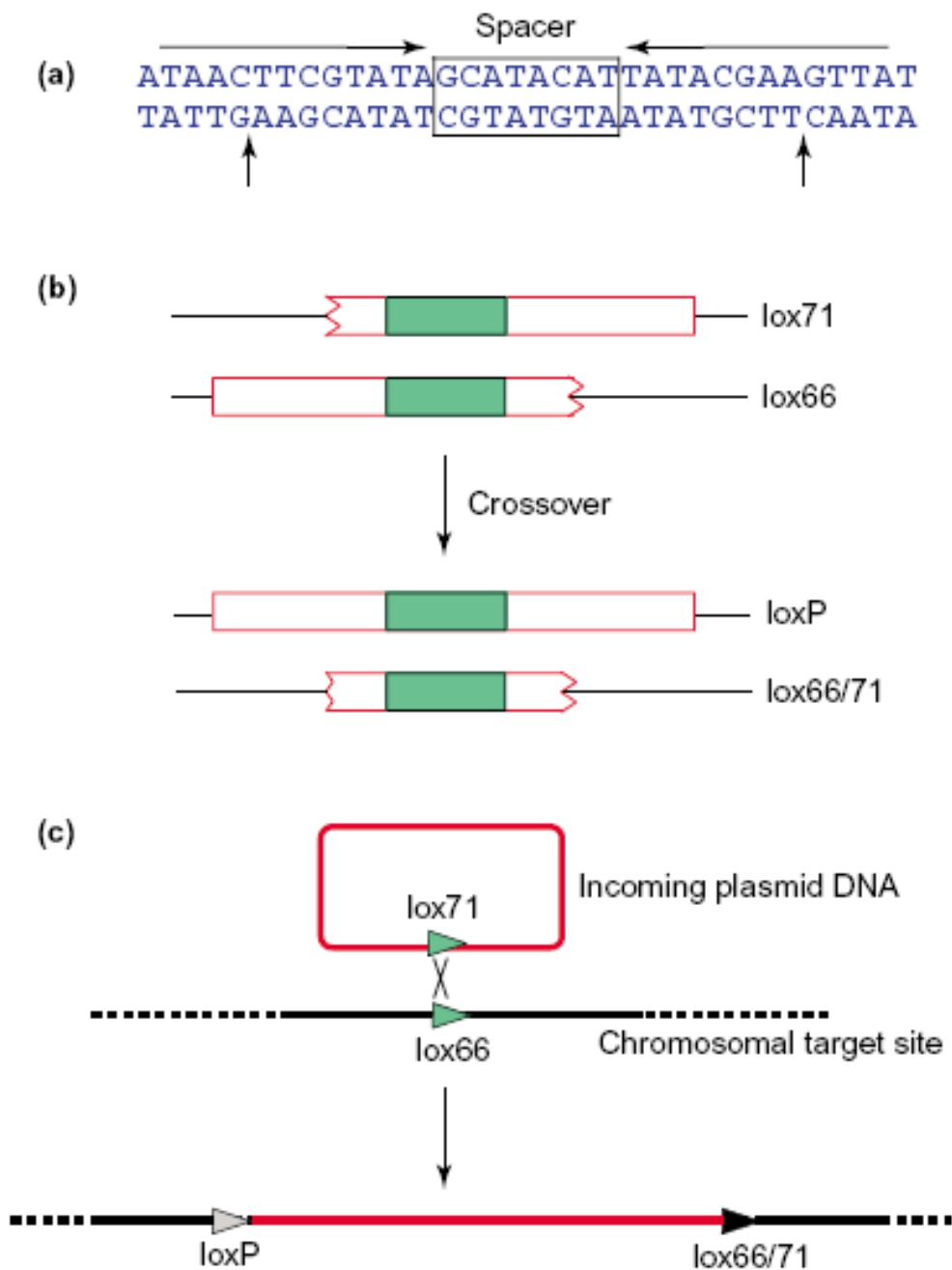
A. WT *loxP* and Mutant *lox* sequences:

		<u>8 bp core</u>	
<i>loxP</i>	ATAACTTCGTATA	GCATACAT	TATACGAAGTTAT
<i>lox FAS</i>	ATAACTTCGTATA	TACC TTTC	TATACGAAGTTAT
<i>lox 2272</i>	ATAACTTCGTATA	GGATAC TT	TATACGAAGTTAT
<i>lox 2372</i>	ATAACTTCGTATA	GGATACCT	TATACGAAGTTAT
<i>lox 511</i>	ATAACTTCGTATA	GTATACAT	TATACGAAGTTAT

B. Insertion of *floxed* sequences via double reciprocal recombination.



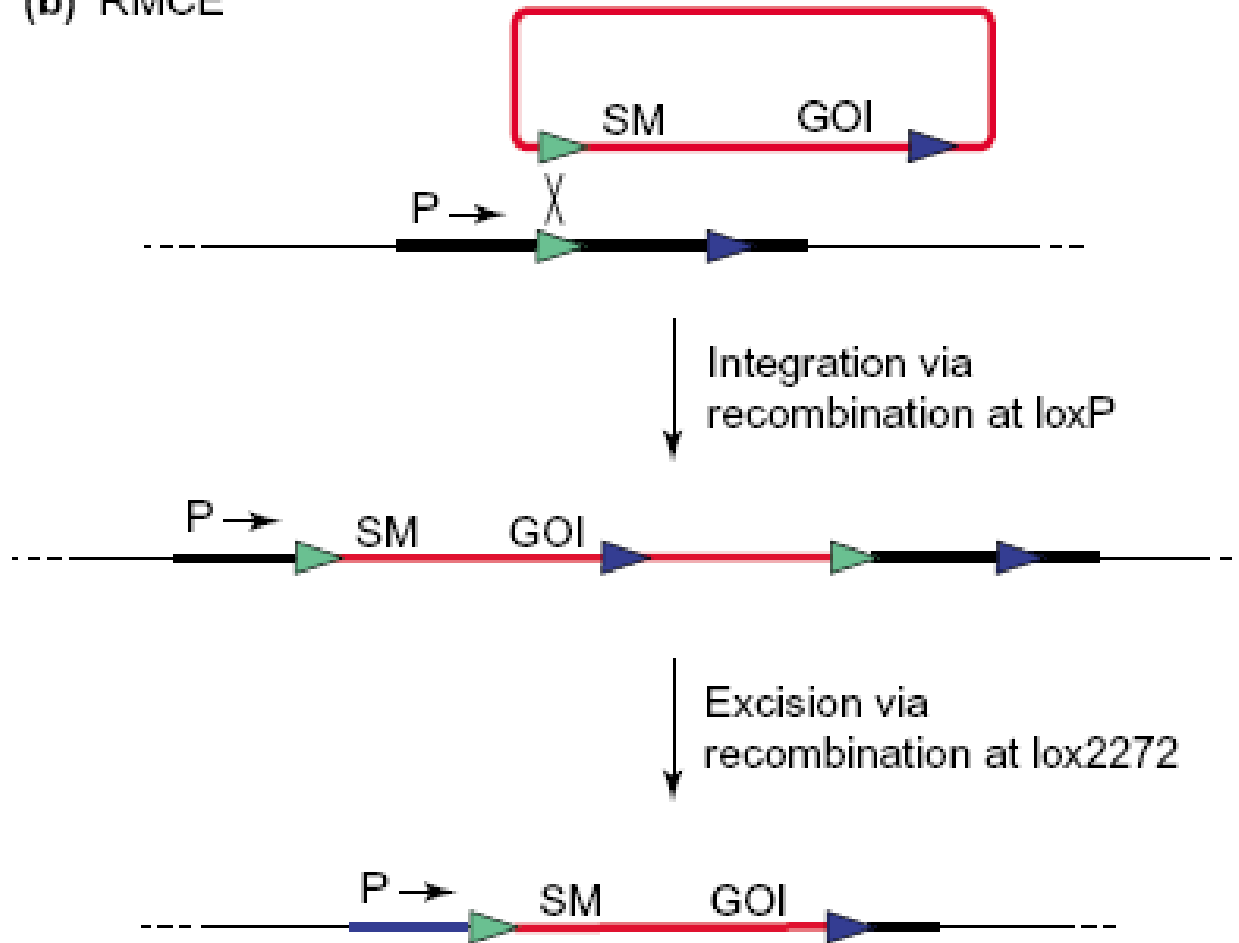
Κατευθυνόμενη εισαγωγή γονιδίου στο φυτικό γονιδίωμα



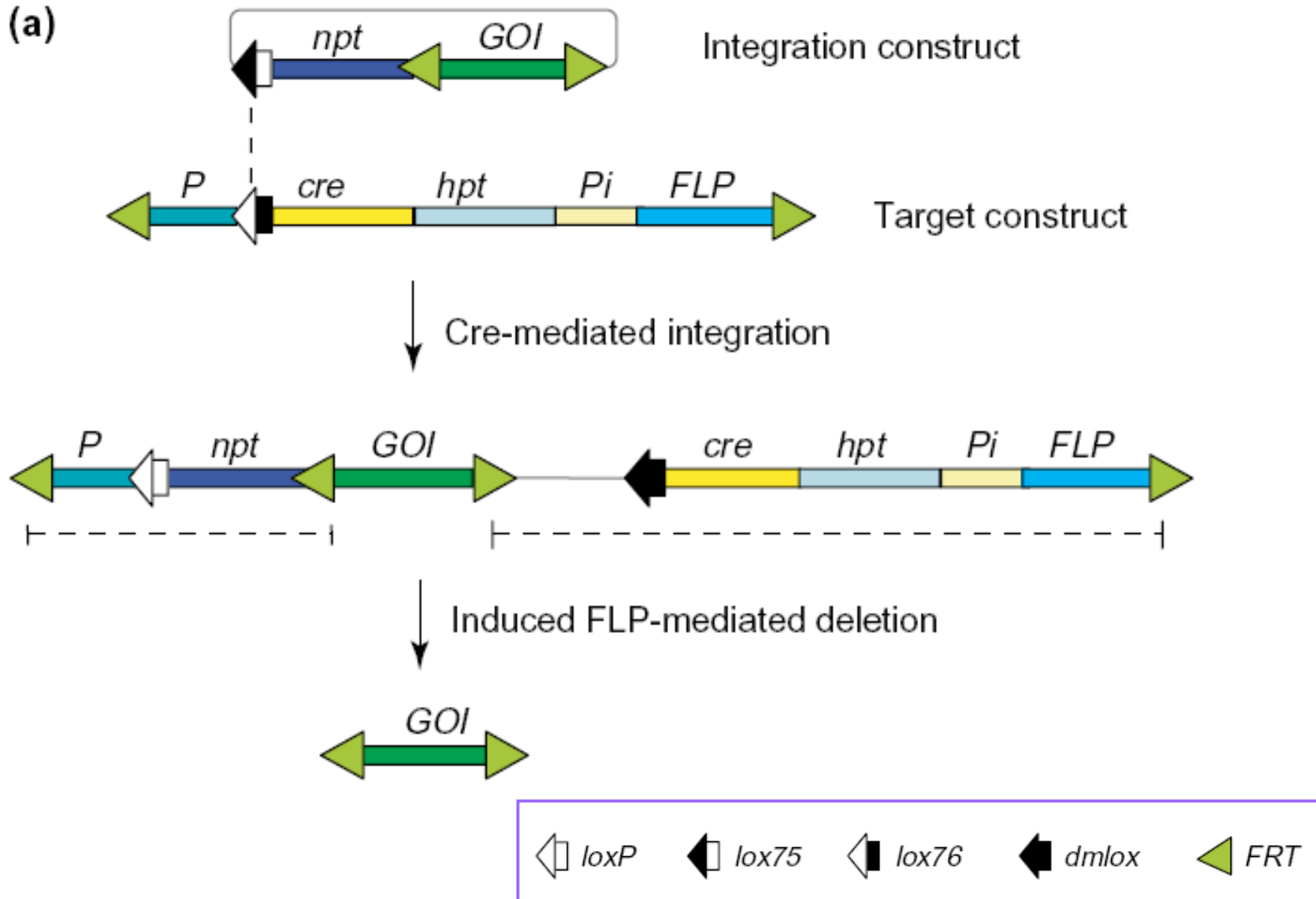
Απομάκρυνση του φορέα

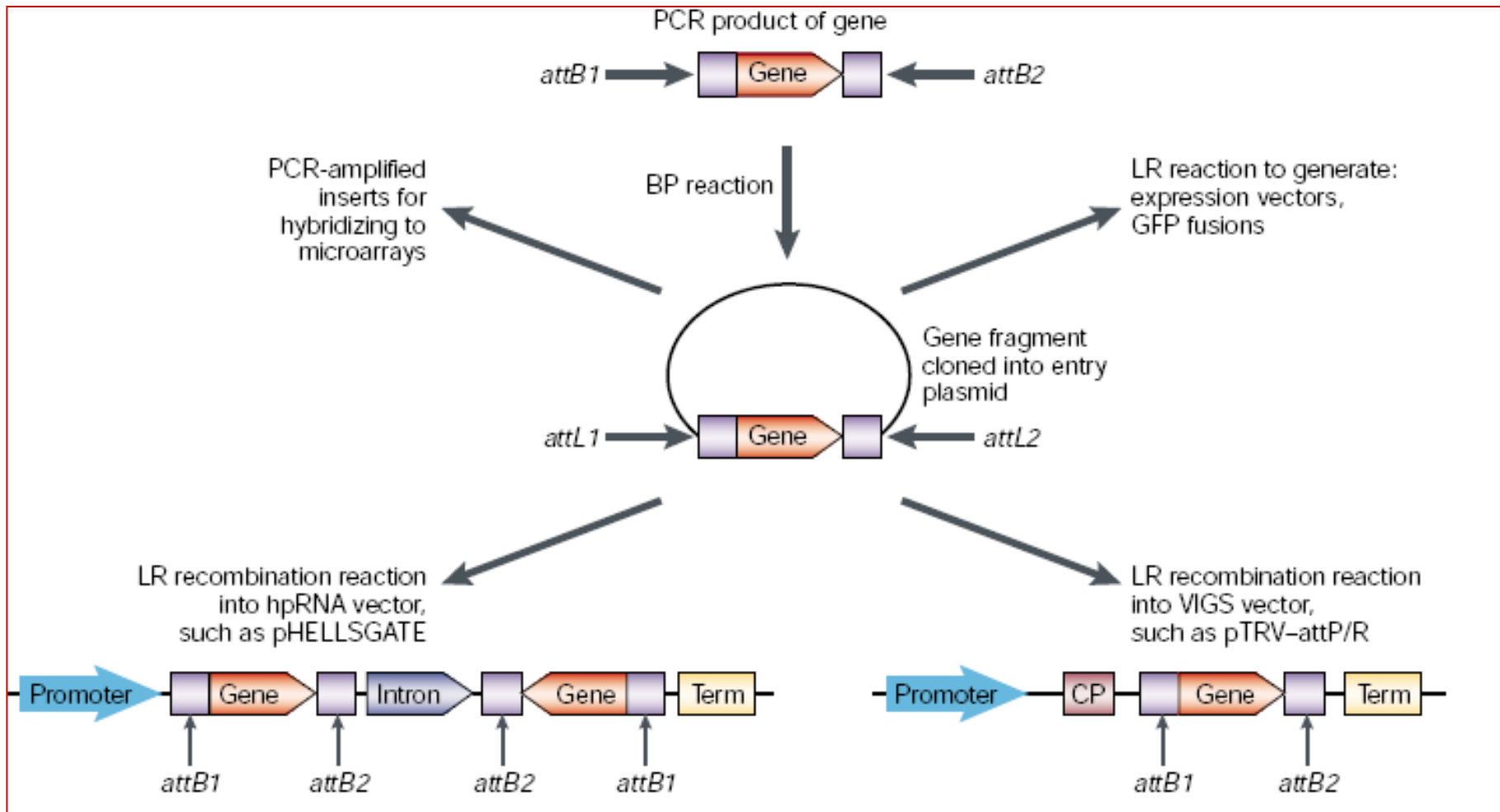
(Recombinase mediated cassette exchange)

(b) RMCE



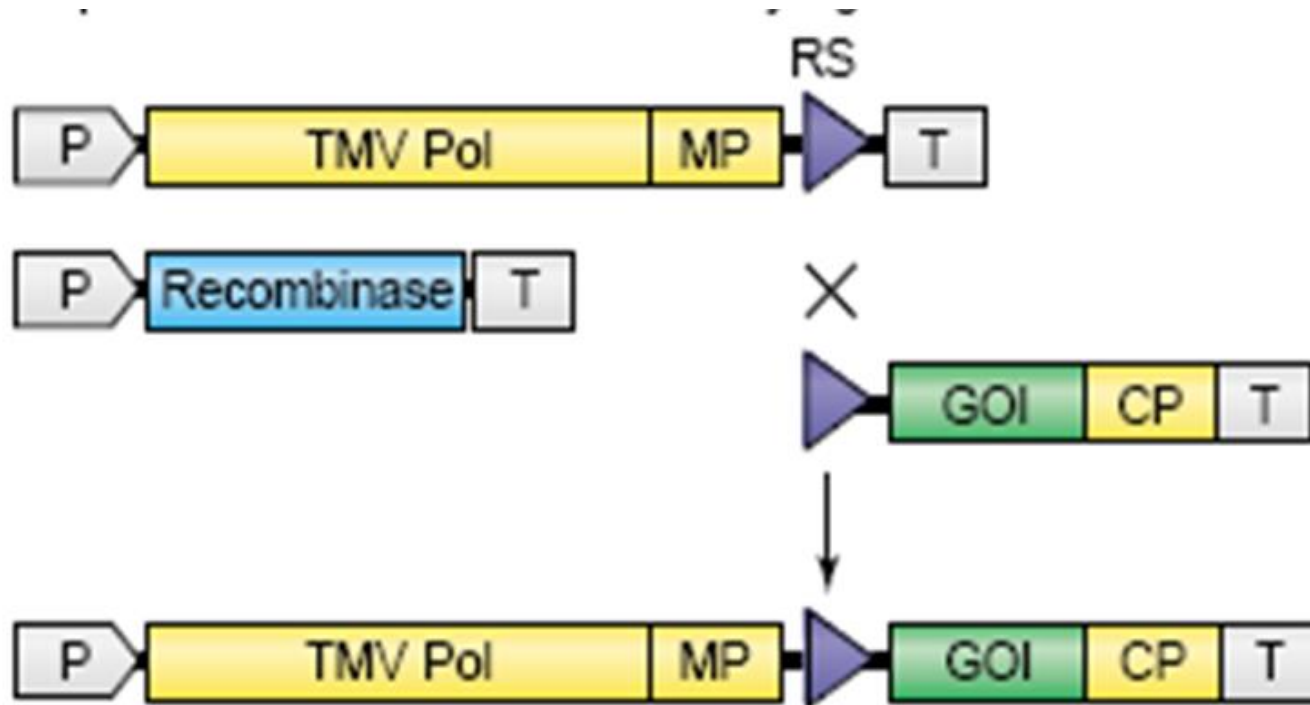
Εισαγωγή γονιδίου και απαλοιφή του γονιδίου επιλογής



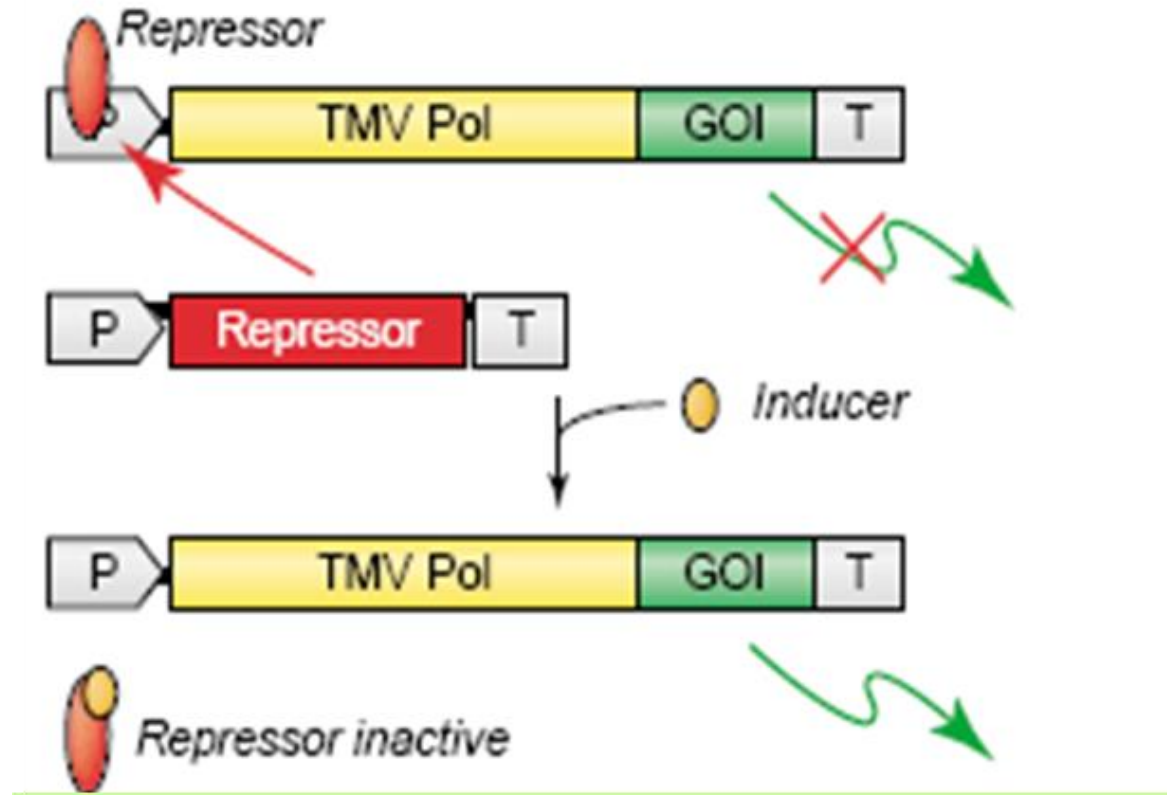


Ίικοί φορείς

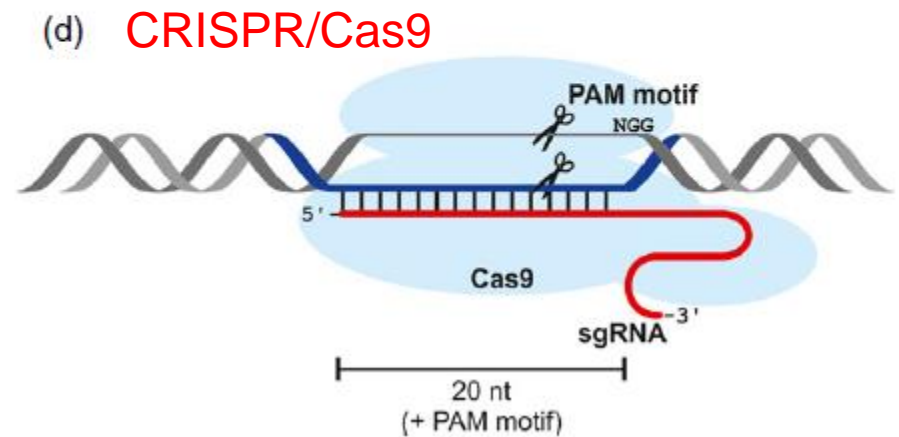
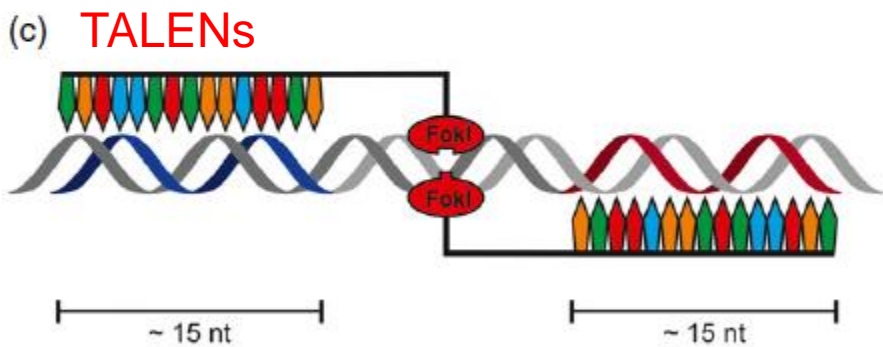
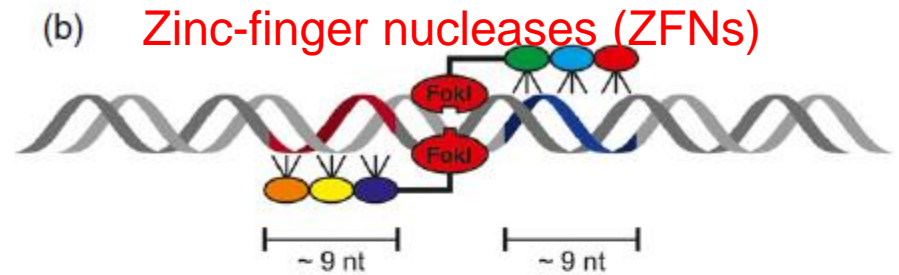
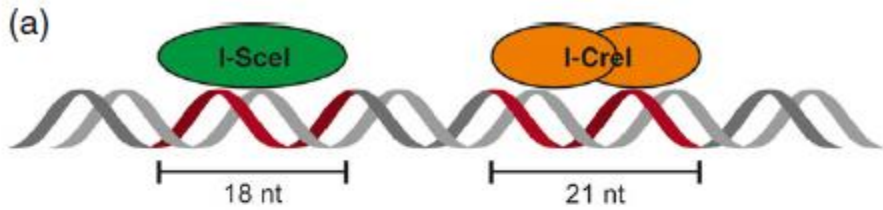
Σύστημα προ-φορέα για τη συγκρότηση ικών amplicons *in planta* μετά τη μεταφορά με *Agrobacterium*



Σύστημα ρυθμιζόμενης έκφρασης του ιικού amplicon από το φυτικό χρωμόσωμα με χημική επαγωγή



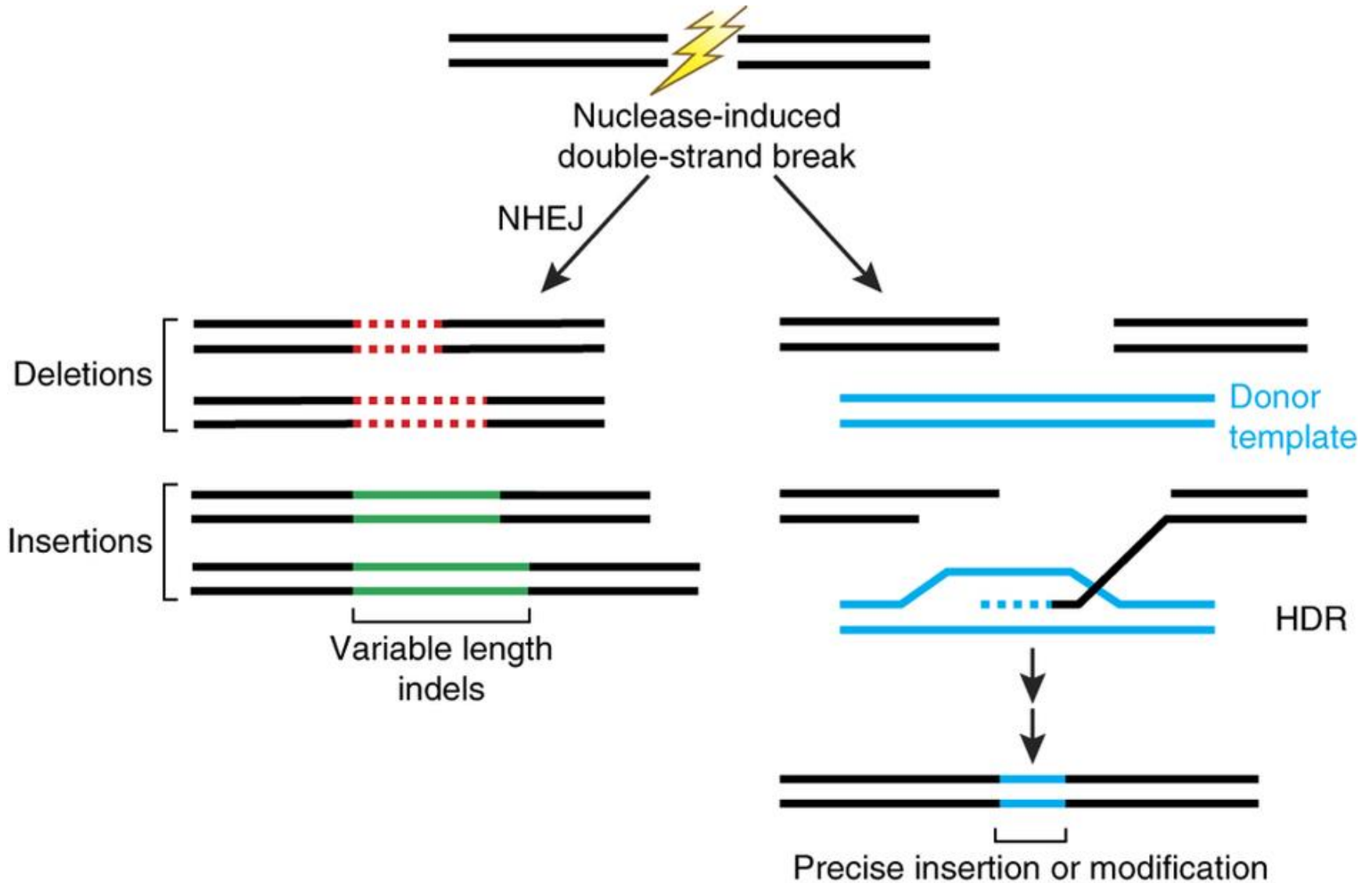
Συνθετικές Νουκλεάσες για Γονιδιωματική Μηχανική



ενσωμάτωση με ακρίβεια θέσης του επιθυμητού γενετικού υλικού σε πολύ καθορισμένες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα (genome editing)



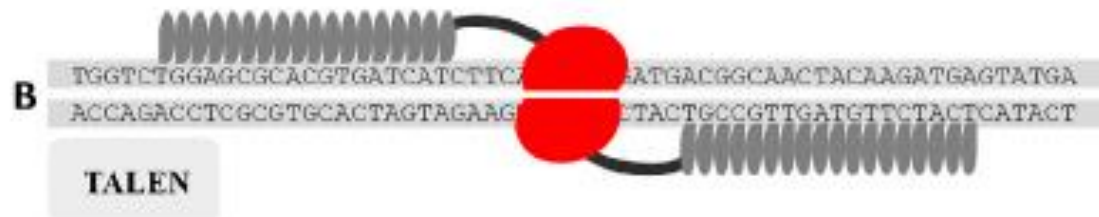
Nuclease-induced genome editing



sequence-specific nucleases



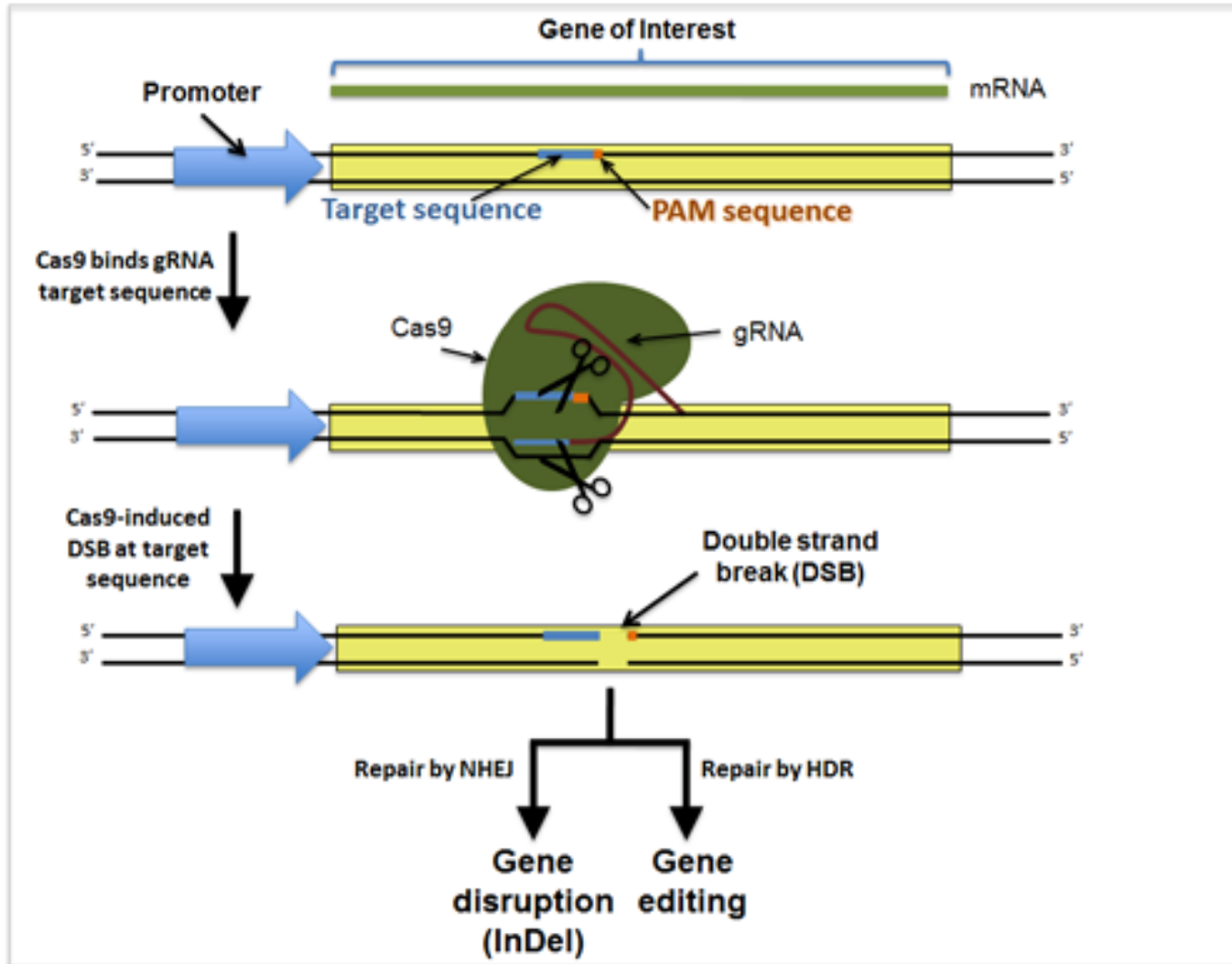
Zink-finger nuclease

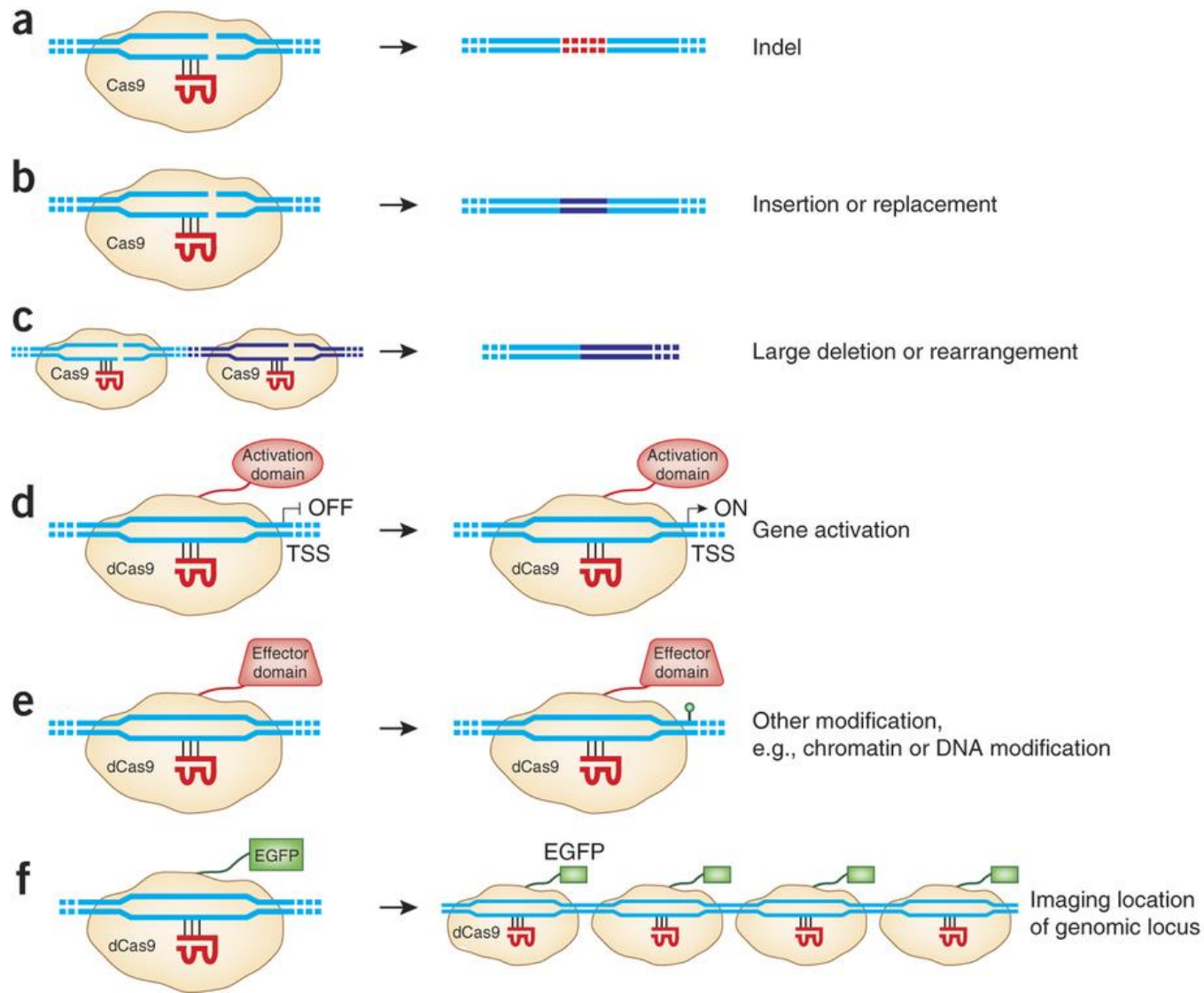


Transcription activator-like effector nuclease



Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Type II system (CRISPR) / Cas 9





Katie Vicari

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΦΥΤΩΝ

- Με PCR, με εκκινητές εξειδικευμένους
 - για τα γονίδια προς ένθεση
 - για τα συνοριακά
 - για περιοχές δίπλα στα συνοριακά (για εξακρίβωση ενσωμάτωσης DNA του φορέα)
 - Ανάστροφη PCR (IPCR)

- Με Southern ανάλυση για την αναγνώριση μοναδιαίου αντίγραφου του ένθετου γονιδίου στο φυτικό γονιδίωμα

- FISH

T-DNA fingerprinting

A. DNA isolation



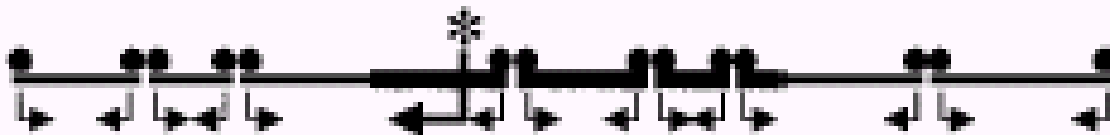
B. Tetracutter digestion



C. Adaptor ligation



D. Anchored PCR



E. Detection



I-PCR

