

***Penicillium chrysogenum* antifungális fehérje (PAF) termeltetése transzgenikus dohány (*Nicotiana tabacum*) növényben**

Oláh Judit – Balla Zoltán – Fári Miklós – Miskei Márton

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Kertészettudományi Intézet, Debrecen
ojud2@yahoo.com

ÖSSZEFOGLALÁS

A RET – Regionális Tudásközpont – „Molecular farming” program (gyógyszer molekulák előállítása transzgenikus növényekkel) keretében 2007-ben PAF antifungális proteinnel transzformált dohány növény előállítási kísérletek indultak meg a DE AMTC Kertészettudományi és Növényi Biotechnológiai Intézetben. A cél a transzformációs módszerek elsajátítása volt. Ehhez egy modell szervezetet (*Nicotiana tabacum*) és egy modell fehérjét (PAF) választottunk.

Munkánk során a paf gént különböző vektorkonstrukciókban dohánynövénybe transzformáltuk nukleáris és kloroplaszt transzformációs technikával, majd DNS, RNS és fehérje szinten kimutattuk a transzgen jelenlétét, amit PCR technikával és szekvenálással igazoltunk.

Kulcsszavak: GMO, PAF, *Nicotiana tabacum*, *Agrobacterium tumefaciens*, nukleáris transzformálás, kloroplaszt transzformálás

SUMMARY

Under the „Molecular farming” research program (product vaccines and substances for medical use with gene manipulated plant) in 2007 in UD Centre for Agricultural Sciences and Engineering Faculty of Agricultural Science Institute of Horticulture Department of Plant Biotechnology experiments were launched to transform tobacco plant by PAF antifungal protein. Our aim was to learn the transformation technics. We chose the *Nicotiana tabacum* and PAF as model systems.

Our work was to express several different paf constructions in plants with nuclear and plastid transformation too. After that we confirmed the presence of paf gene in the level of DNA and RNA.

Keywords: GMO, PAF, *Nicotiana tabacum*, *Agrobacterium tumefaciens*, nuclear transformation, plastid transformation

BEVEZETÉS

A munkacsoportunk célként tűzte ki, hogy Magyarországon adaptálja a dohány kloroplaszt transzformációs technikát, amit már az Amerikai Egyesült Államokban (Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey) Prof. Maliga Pál vezetésével alkalmaznak. Emellett célunk volt, hogy sikeresen alkalmazzuk a Debreceni Egyetemen a nukleáris transzformációs technikákat. Munkánk során modellnövényként a dohányt (*Nicotiana tabacum*) választottuk. Transzgenként egy antifungális hatású *Penicillium chrysogenum* gomba fehérjét (PAF) használtuk.

***Penicillium chrysogenum* antifungális fehérje (PAF)**

PAF (*Penicillium* Antifungal Protein) egy kis molekulatömegű, ciszteinben gazdag bázikus antimikrobiális protein, mely nagy mennyiségben választódik ki a *Penicillium chrysogenum* fonalas gomba által (Marx et al., 1995). A PAF gátolja több gazdaságilag jelentős növény- és állat patogén fonalas gomba növekedését (pl. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma koningii*). Ezekben a gombafajokban oxidatív stressz keletkezik a PAF fehérje hatására, ezen túl rendellenes hifák alakulnak ki, és gátolt a szaporodás, azonban nem mutat semmilyen hatást élesztőkön és baktériumokon (Kaiserer et al., 2003). A PAF az érzékeny gombákban K⁺-effluxot (10 µg/ml PAF esetén), reaktív oxigénformák (ROS) akkumulálódását és csökkent metabolikus aktivitást eredményez (Kaiserer et al., 2003). Ugyanakkor hasonlóan más antimikrobiális fehérjékhez, a PAF káros hatása látványosan kivédhető kationok jelenlétében (pl. Mg²⁺, K⁺ és Na⁺). Immunfluoreszcens festéssel kimutatták, hogy a PAF bejutása aktív transzporttal, endocitózissal történik, amely megakadályozható a légzési lánc gátlásával, konkrétan a KCN és NaN₃ alkalmazásával (Oberparleiter et al., 2003).

A PAF fehérjét 276 bázispárból álló gén kódolja. A PAF egy 18 aminosavból álló proszekvenciát, 19 aminosavból álló proszekvenciát és 55 aminosavból álló „mature” szekvenciát tartalmaz. A proszekvencia a PAF extracelluláris térbe jutásáért, a proszekvencia pedig a fehérje normális térszerkezetének kialakításáért, míg a „mature” szekvencia a PAF tulajdonságaiért felelős (Kaiserer et al., 2003; Marx et al., 2005). Az 1. ábrán látható PAF szerkezete.

1. ábra: A PAF génszerkezete

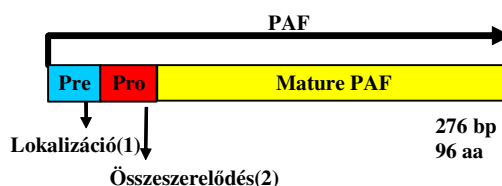


Figure 1: PAF gene structure
Localization(1), Folding(2)

Nukleáris transzformáció

Nukleáris transzformációt több módszerrel is lehet végezni, a legelterjedtebb az *Agrobacterium*-mal történő transzformálás. Ez a természetben is előforduló baktérium a citoplazmájában hordozott plazmidon kódolt génekkel tumor képződést indukál a növényeken (Matthyse és Stunp, 1976). A baktériumok patogenitása a tumorindukáló (Ti) plazmiddal függ össze. A Ti plazmid T-DNS része a transzformálás során átkerül a növényi sejtbe, és a sejtmag DNS-állományába integrálódik. A T-DNS szakaszon elhelyezkedő gének nem létfontosságúak a baktérium számára, ezért azt rekombináns DNS technikák segítségével kicserélhetjük más génekre is, megteremtve ezzel a lehetőséget, hogy a növénybe egy idegen gént juttassunk be.

A kívánt génnel együtt antibiotikum rezisztencia gént is beépítenek, ezért a GM növények szelektálása antibiotikum tartalmú táptalajon történik. Kiszámú esetben spontán mutációval is létrejöhet rezisztencia, emiatt a rezisztencia megnyilvánulása önmagában nem elegendő, a transzgén jelenlétének a bizonyítására további molekuláris bizonyítások szükségesek. DNS, RNS és fehérje szinten igazolják a transzgén jelenlétét.

Kloroplaszt transzformáció

Kloroplaszt transzformálás során a bevitt DNS szakasz nem random helyre, hanem specifikus helyre, homológ rekombinációval épül be. Így nem jöhet létre nem várt fenotípus az esetleges hibás helyre való beépülés miatt. A kloroplaszt nagy mennyiségben tud fehérjét termelni. A gén nem jut be a pollenbe, ezért csekély a lehetőség arra, hogy növényről növényre nem kívánatosan terjedjen. Legegyszerűbb a kloroplaszt transzformálást génpuskával végezni (2. ábra).

2. ábra: Génpuska



Figure 2: Genebooster

A transzformáló DNS-t Wolfram-részecskékhez kötik, ezt felcseppentik a műanyag lövedékre, és vákuumban, nagy sebességgel csapódnak a részecskék a fiatal növényi sejtbe vagy növényi embrióba. A szövet a transzformálás során roncsolódik, ezért regenerátó táptalajra helyezik a leveleket. A transzformált egyedek kiválasztását szintén szelekciós antibiotikum tartalmú táptalajon végzik.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérleteinket a Sambrook: *A Laboratory Manual* leírásai szerint végeztük (Sambrook et al., 1989). A munkánk során alapvető molekuláris biológiai módszereket alkalmaztunk. Ezek között fontos megemlíteni a DNS, mRNS izolálást, a polimeráz láncreakciót, az agaróz gélelektroforézist, a DNS restrikciós emésztést, a ligálást, a kompetens *Escherichia coli* sejt transzformálást, a plazmid izolálást.

Munkánk során *Escherichia coli* DH5a, *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 (Waksman Institute, Rutgers, The State University of New Jersey) baktérium törzseket és *Nicotiana tabacum* (Ottawa) dohány növény fajtát használtunk.

Az *Agrobacterium*-mal történő növénytranszformálás során vad típusú levélkorongokat a vektorkonstraktokat tartalmazó *Agrobacterium* szuszpenzióval kezeltük, majd regeneráció után a levélkorongokat áthelyeztük antibiotikum (kanamycin – Duchefa) tartalmú regeneráló táptalajra. A szelekciót követően regenerált, vélhetőleg transzformáns növényeket molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk (DNS, RNS kivonások – Fermentas kitek, PCR – Promega enzimek, klónozás pGEM-T Easy vektorba – Promega, szekvenálás – Biomi Kft).

A kloroplaszt transzformálás során a levélkorongokat meglőttük a volframhoz abszorbeált DNS részecskékkel a Richter zRt. tulajdonát képező Genebooster (ELAK Bt.) segítségével (Maliga, 2004). Többszörös szelekciót (spectinomycin, streptomycin – Duchefa) követően a regenerálódott növényeket a fentebb említett módszerekkel vizsgáltuk, és bizonyítottuk a transzgén jelenlétét.

EREDMÉNYEK

Nukleáris transzformáció

A nukleáris transzformációhoz szükséges bináris vektor megtervezésekor pPZP100 vektorból indultunk ki (Hajdukiewicz et al., 1994).

A klónozó vektor a jobb (RB) és a bal oldali határ szekvenciák (LB) között két génkzettát tartalmazott. Az egyik kazetta felelős a kanamycin rezisztencia kialakításáért, a másik pedig a transzgént tartalmazta. Promóterként az S35 promótert, terminátorként pedig a Tnos (nopalín-szintetáz) terminációs szakaszt (Svab et al., 1990b; Velten et al., 1984) építettük be a szelekciós kazettába. Az S35 egy konstitutív, erős promóter, amelyet a karfiol mozaik vírusból (CaMV)

izoláltak. A PAF génje elé a P2' promótert építettük be, amely az octopine típusú Ti-plazmidból izolált konstitutív promóter. Itt is a kazetta a Tnos terminációs szekvenciával végződik (3. ábra).

3. ábra: A pPZP100 vektorból kiindult klónozó vektor részlete, ami tartalmazza a kanamycin szelektációs kazettát és a paf gént különböző formákban

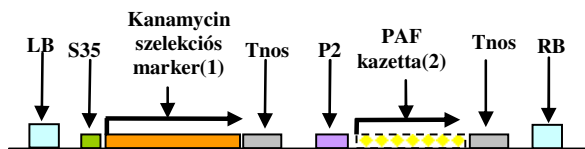


Figure 3: Cloning vector from pPZP100 vector containing the kanamycin selection cassette and different forms of the paf gene
Kanamycin selection marker(1), PAF cassette(2)

Különböző vektorkonstruktokat hoztunk létre, amit a paf kazettába építettünk be (4. ábra):

a. **Pre-Pro-mature-PAF:** A Pre-Pro-mature-PAF tartalmazza a teljes prekursor PAF proteint, mely a periplazmatikus térbe választódik ki.

b. **Pre-Pro-mature-PAF+ozmotin:** Ebben az esetben a gén 3' végéhez fuzionáltattunk egy vakuoláris lokalizációért felelős, az ozmotin 18 ill. 20 aminosavból álló C terminális részét kódoló, rövid szekvenciát (Melchers et al., 1993; Neale et al., 1990).

c. **GE+Pre-Pro-mature-PAF:** A harmadik esetben a paf gént tartalmazó bináris vektorba a gén 5' végére a β -D-glukán exohidroláz szignálját kódoló szekvenciáját raktuk. Ez az N-terminálison található, és a sejten kívülre való szállításért felelős (Matsui et al., 2006).

d. **38P+Pre-Pro-mature-PAF:** A következő Pre-Pro-mature-PAF-ot tartalmazó vektorkonstrukta a 38 kDa peroxidáz szignálját kapcsoljuk, ami szintén a sejten kívülre való szállításban játszik szerepet, és az N-terminálison található (Matsui et al., 2006).

e. **mature-PAF:** Ez a vektorkonstrukta a pre-, proszekvencia nélküli mature PAF-ot tartalmazza.

f. **38P+mature-PAF:** Ez a konstrukta a pre-, proszekvencia nélküli mature PAF-ot tartalmazza, aminek az 5' végére a fentiekben leírt 38 kDa peroxidáz szignálját kapcsoljuk.

4. ábra: A PAF tartalmú transzformált kazetták szerkezete

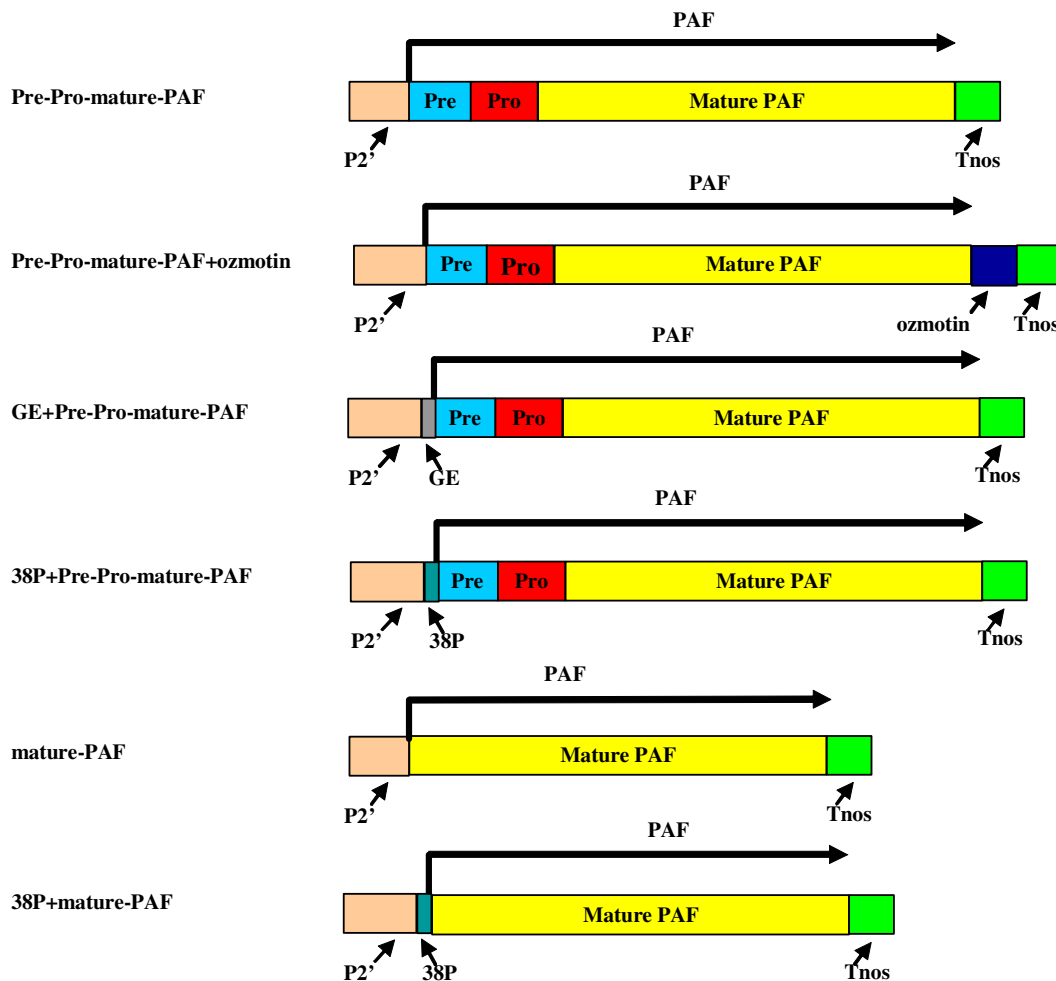


Figure 4: Structure of the transformation cassette with paf

A konstruktokat a pPZP *Agrobacterium tumefaciens* bináris vektorokba (Hajdukiewicz et al., 1994) egy P2 promótert és egy Tnos (nopalín szintetáz) terminátor régiót tartalmazó expressziós kazettába építettük be (Svab et al., 1990b; Velten et al., 1984). A hat különböző bináris vektort tartalmazó *Agrobacterium*-okkal dohány modellnövényeket transzformáltunk (Lutz et al., 2006), majd kanamycin rezisztencia markerrel szelektáltunk (5. ábra).

A feltételezett transzformánsokból DNS és RNS kivonást végeztünk. PCR technikával és szekvenálással bizonyítottuk a *paf* gén jelenlétét, illetve transzkripcióját a dohány növényben (6. ábra).

5. ábra: Kanamycin antibiotikum tartalmú táptalajon regenerálódott *paf* gént tartalmazó dohány növények

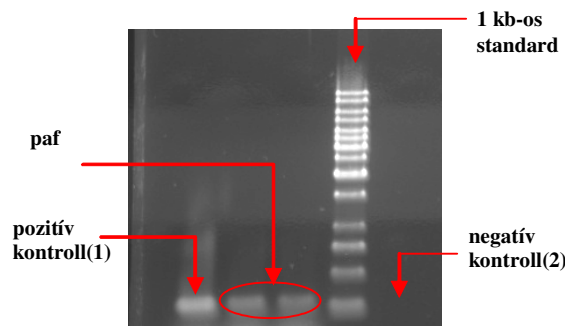


Az első képen a transzformálás után 4 hetes állapotban regenerálódott táptalajon láthatóak a növények, a második képen pedig már új táptalajon a transzformációt követő 8. héten láthatóak(1)

Figure 5: Regenerated tobacco plants contain *paf* gene on media with kanamycin antibiotic

The first picture shows the plants after the transformation 4 weeks, the second after the transformation 8 weeks(1)

6. ábra: Regenerálódott növényből kivont genomi DNS-ből készült PCR-termékek agaróz gélelektroforézis eredménye



Az gélelektroforézis során pozitív kontrollként egy *paf* gént tartalmazó vektorkonstruktot, negatív kontrollnak egy nem-transzformált, vad dohány növényt, standardként 1 kb-os DNS létrát használtunk. A gélképen 276 bp-nyi *paf* gén látható(3)

Figure 6: The result of the gelelectroforesis of the PCR product of DNA from the regenerated plants

Positive control(1), Negative control(2), We used a vector which contains the *paf* gene as positive control, a non-transformed plant as negative control, 1kb ladder as standard. The picture shows the 276 bp *paf* gene(3)

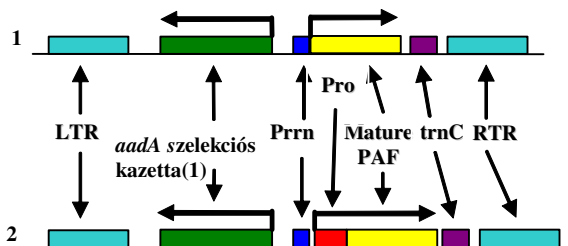
Kloroplaszt transzformáció

A GENOMNANOTECH Debrecen Regionális Egyetemi Tudásközpont (GND RET) keretében az Egyesült Államokban (Waksman Institute Rutgers University, Piscataway, NJ) Prof. Maliga Páltól megtanultuk a kloroplaszt transzformációs eljárást, amelyet Magyarországon még nem alkalmaznak.

A kloroplaszt transzformáció során két különböző vektorkonstruktot állítottunk elő. Abban különböznek egymástól, hogy az 1. konstrukt a PAF-mature, a 2. konstrukt a pro-PAF-mature szekvenciát tartalmazza (7. ábra). Szelekciós markerként a transzformáló vektorba az *aadA* gén van beépítve, amely streptomycin és spectinomycin rezisztenciáért felelős. A konstruktokban megtalálható még a PAF-mature, illetve Pro-PAF-mature szekvencia előtt egy konstitutív promóter (Prn), valamint mögött egy terminációs szekvencia (trnC). A Prn szerepe: rRNS promóter, amely konstitutívan termelődik. A trnC szerepe: plasztisz tRNS gén terminációs szekvenciája. Emellett a konstruktokban megtalálható az LTR (Left Target Region), és a RTR (Right Target Region) szakasz is. Ezek a szakaszok a kloroplaszt genomban ott találhatóak meg, ahová a *paf* gén homológ rekombinációval beépül. Az elkészített PAF szekvenciákat – mature-PAF (1.), Pro-mature-PAF (2.) – tartalmazó kloroplaszt transzformációs vektorokat bejuttattuk dohány növénybe génpuska (2. ábra) segítségével (Maliga, 2004; Svab et al., 1990a; Lutz et al., 2007).

A vektorkonstruktok transzformálása után a növényeket spectinomycin, majd spectinomycin és streptomycin antibiotikum tartalmú táptalajra helyeztük (9. ábra). A regenerálódott feltételezett transzformáns növényekből genomi DNS kivonása után PCR technikával bizonyítottuk a *paf* gén jelenlétét (8. ábra).

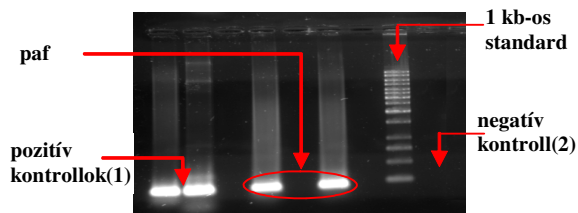
7. ábra: A *paf* gént tartalmazó kloroplaszt transzformációs vektor elkészítése, és szerkezete



Az első kloroplaszt transzformációs rendszer a PAF mature szekvenciáját tartalmazza, a második pedig a Pro-mature szekvenciát(2)

Figure 7: The structure of the *paf* plastid transformation vectors
aadA selection cassette(1), The first plastid transformation system contains the PAF mature sequence, the second contains the Pro-mature(2)

8. ábra: A feltételezeten transzformált növényekből kivont genom DNS-ekből készült PCR-termékek agaróz gélelektroforézis eredménye



A gélelektroforézis során pozitív kontrollként *paf* gént tartalmazó vektorkonstruktokat, negatív kontrollnak egy nem transzformált, vad dohányt, standardként 1 kb-os DNS létrát használtunk. A gélképen 276 bp-nyi *paf* gén látható(3)

Figure 8: The result of the gelelectroforesis of the PCR product of DNA from the plastid transformed regenerated plants Positive controls(1), Negative control(2), We used vectors which contain the *paf* gene as positive controls, a non-transformed plant as negative control, 1kb ladder as standard. The picture shows the 276 bp *paf* gene(3)

9. ábra: Spectinomycin antibiotikum tartalmú táptalajra helyezett transzformált levélkorongok



A második képen egy feltételezett transzformáns növény látható(1)

Figure 9: Transformed leaf disk on media with spectinomycin
The second picture shows a hypothetical transformed plant(1)



DISZKUSSZIÓ

Munkacsoportunk elsődleges célként tűzte ki, hogy a Debreceni Egyetemen elsőként adaptálja a nukleáris és a kloroplaszt transzformációs technikákat. Több vektorkonstrukciót terveztünk, melyek különböző formában tartalmazták a PAF génjét. Ezeket kloroplaszt és nukleáris transzformációs technikákkal transzformáltuk a

dohány növénybe. Az antibiotikus szelekció során sikerült valószínűsíthető *paf* transzformáns növényeket regeneráltatnunk. Majd DNS és RNS szinten bizonyítottuk a transzgén jelenlétét.

Megállapíthatjuk, hogy tanszékünkön sikeres transzformációs eljárásokat adaptáltunk, mely eszközökkel különféle vakcinák, és gyógyászatban használt anyagok növényben való termelése válik lehetővé.

IRODALOM

Hajdukiewicz, P.-Svab, Z.-Maliga, P. (1994): The small, versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.*, 25. 6. 989-94.
Kaiserer, L.-Oberparleiter, C.-Weiler-Görz, R.-Burgstaller, W.-Leiter, E.-Marx, F. (2003): Characterization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF. *Arch. Microbiol.*, 180. 3. 204-10.

Lutz, K. A.-Svab, Z.-Maliga, P. (2006): Construction of marker-free transplastomic tobacco using the Cre-loxP site-specific recombination system. *Nat. Protoc.*, 1. 2. 900-10.
Lutz, K. A.-Azhagiri, A. K.-Tungsuchat-Huang, T.-Maliga, P. (2007): A guide to choosing vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. *Plant Physiol.*, 145. 4. 1201-10.

- Maliga, P. (2004): Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55. 289-313.
- Marx, F.-Haas, H.-Reindl, M.-Stöffler, G.-Lottspeich, F.-Reidl, B. (1995): Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum* paf gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene.*, 167. 167-171.
- Marx, F.-Salvenmoser, W.-Kaiserer, L.-Graessle, S.-Weiler-Görz, R.-Zadra, I.-Oberparleiter, C. (2005): Proper folding of the antifungal protein PAF is required for optimal activity. *Res. Microbiol.*, 156. 1. 35-46.
- Matsui, T.-Hori, M.-Shizawa, N.-Nakayama, H.-Shinmyo, A.-Yoshida, K. (2006): High efficiency secretory production of peroxidase C1a using vesicular transport engineering in transgenic tobacco. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102. 2. 102-109.
- Matthysse, A. G.-Stunp, A. J. (1976): The presence of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid DNA in crown gall tumour cells. *J. Gen. Microbiol.*, 95. 1. 9-16.
- Melchers, L. S.-Sela-Buurlage, M. B.-Vloemans, S. A.-Woloshuk, C. P.-van Roekel, J. S.-Pen, J.-van den Elzen, P. J.-Cornelissen, B. J. (1993): Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and beta-1,3-glucanase in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.*, 21. 4. 583-593.
- Neale, A. D.-Wahleithner, J. A.-Lund, M.-Bonnett, H. T.-Kelly, A.-Meeks-Wagner, D. R.-Peacock, W. J.-Dennis, E. S. (1990): Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell.*, 2. 7. 673-684.
- Oberparleiter, C.-Kaiser, L.-Haas, H.-Ladurner, P.-Andratsch, M.-Marx, F. (2003): Active internalization of the *Penicillium chrysogenum* antifungal protein PAF in sensitive *Aspergilli*. *Antimicrob. Agents and Chemoter.*, 47. 3598-3601.
- Sambrook, J.-Fritsch, E. F.-Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory
- Svab, Z.-Hajdukiewicz, P.-Maliga, P. (1990a): Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 87. 21. 8526-8530.
- Svab, Z.-Harper, E. C.-Jones, J. D.-Maliga, P. (1990b): Aminoglycoside-3"-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. *Plant. Mol. Biol.*, 14. 197-205.
- Velten, J.-Velten, L.-Hain, R.-Schell, J. (1984): Isolation of a dual plant promoter fragment from the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.*, 3. 2723-2730.