

## Biotechnologie in de plantenveredeling

### 1. inleiding

Dit dictaat is bedoeld om een overzicht te geven van wat biotechnologie in de plantenveredeling kan betekenen, vooral in de breedte en hier en daar in de diepte.. Biotechnologie is een woord dat een brede lading dekt. In boeken die aan het eind van de tachtiger jaren van de vorige eeuw verschenen werd altijd aangegeven dat bierbrouwen en broodbakken net zo goed vormen van biotechnologie zijn als genetische manipulatie. Biotechnologie is dus al heel oud. Er kan dus een onderscheid gemaakt worden tussen 2 hoofdvormen van biotechnologie

1. Het gebruik van levend materiaal om toegevoegde waarde te verkrijgen. Hierbij wordt dan vooral gedacht aan het gebruik van cellen, micro-organismen of planten om waardevolle omzettingen te doen of waardevolle stoffen te produceren
2. Op DNA-niveau werken met genetisch materiaal. Dit kan dan zijn het identificeren, lokaliseren, isoleren, klonen of transformeren van specifieke genen

In het verdere dictaat zal alleen hoofdvorm 2 verder worden uitgewerkt. Het gaat dan om het DNA en het gen zelf, niet om het fenotypische resultaat daarvan.

In de veredeling worden, mede onder druk van de kritiek in de maatschappij, 2 vormen van deze biotechnologie onderscheiden. De eerste is gaat om het knutselen met genen, genconstructen en de technieken die daarbij horen, het terrein van de genetische modificatie. Het andere terrein is het gebruik van moleculaire technieken, ook vaak op DNA-niveau als detectietechniek om de aan of afwezigheid van genen al in een vroeg stadium te weten te komen. De eerste groep, de genetische modificatie, wordt in de maatschappij nog niet breed geaccepteerd, of in ieder geval door regelgeving behoorlijk gecontroleerd, de tweede groep wordt zo langzamerhand door ieder zichzelf respecterend veredelingsbedrijf met redelijke omvang in eigen beheer gedaan.

In de lijn van de veredeling kunnen deze elementen door elkaar heen lopen.

In het nu volgende verhaal ga ik eerst in op de moleculaire technieken om later verder te gaan met het gedeelte dat moet leiden tot genetische modificatie.

De volgende elementen worden achtereenvolgens genoemd:

1. Identificeren. Hiermee wordt bedoeld dat er op DNA niveau genen worden onderscheiden. Dat kan bijvoorbeeld door de start en stopcodons op te zoeken, want deze kunnen het begin en eind van een gen aangeven
2. Lokaliseren. Hiermee wordt bedoeld dat het mogelijk wordt om een gen waarvan de basenvolgorde bekend is terug te vinden in het genoom van een plant
3. Isoleren. Dit is het losknippen van een gen uit zijn natuurlijke achtergrond zodat het een op zichzelf staand werkend stukje DNA is
4. Klonen. Dit is het vermeerderen van het gen, doorgaans in een bacterie
5. Transformeren. Dit is het overzetten van het gen in een ander organisme.

Het geeft een rijtje met mogelijkheden, ze worden zelden allemaal gebruikt. Elk van de onderwerpen zal in dit dictaat aan de orde komen, waarbij vooral bij het eerste relatief veel aandacht wordt besteed. Niet alleen omdat het veel gebruikt wordt, maar vooral omdat daaronder de hele merkertechnologie schuilgaat die een enorme invloed heeft op de snelheid en efficiëntie van het veredelingsproces.

Voorafgaand aan deze 5 onderwerpen zal nog een hoofdstuk worden besteed aan DNA en de organisatie daarvan en hoe daar mee kan worden geëxperimenteerd.

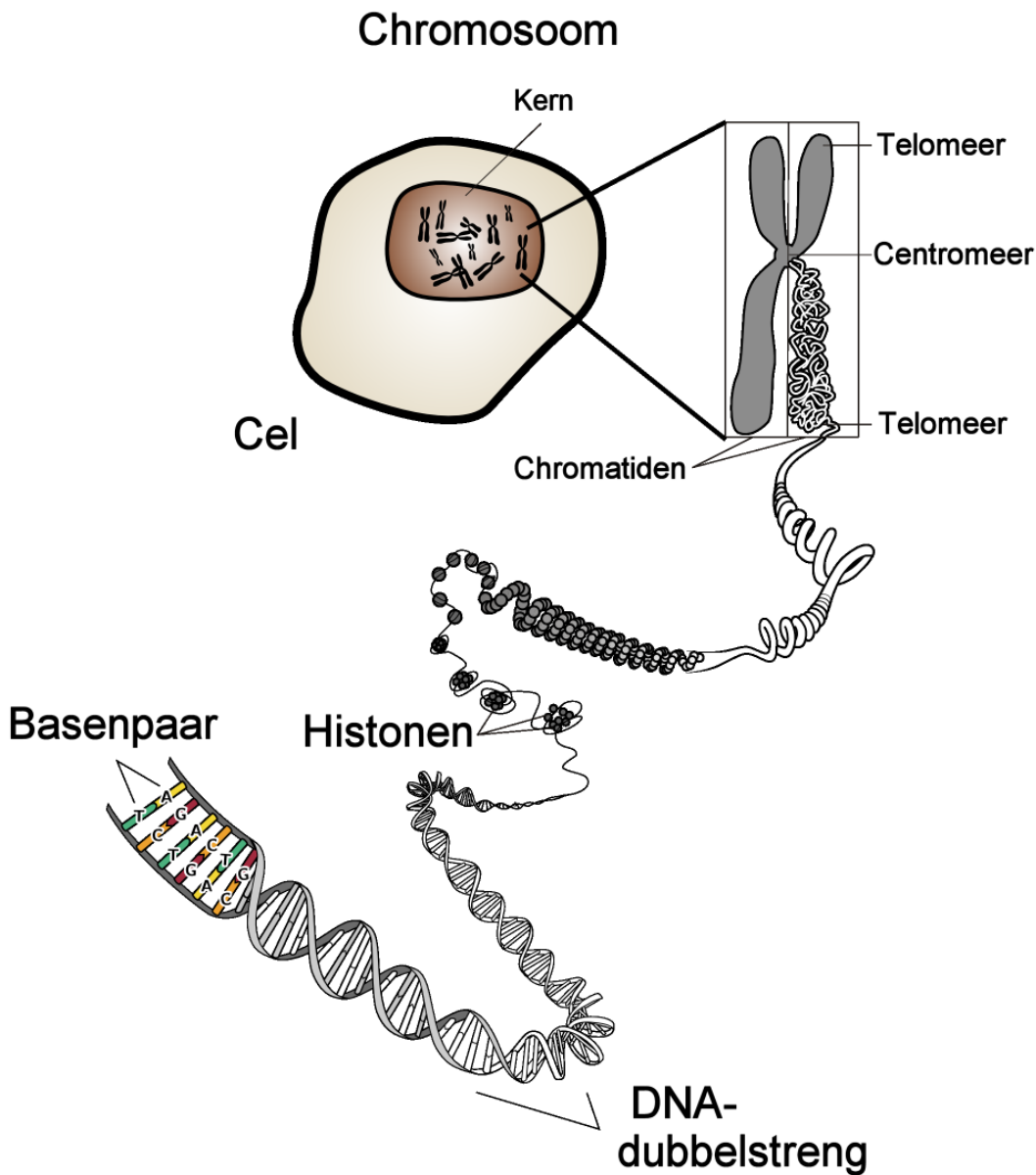
## 2. van DNA en eiwit

Het is niet de bedoeling om alle moleculaire ontwikkelingen van de laatste 50 jaar de revue te laten passeren, maar er zijn een aantal echt belangrijke zaken uitgevonden die er hier ook toe doen. Bij alle moleculaire werk met betrekking tot DNA in de plantenveredeling loop je er vanzelf tegenaan. Er wordt begonnen met een korte herhaling van DNA en eiwitsynthese, Daarna worden er een paar ontwikkelingen behandeld die essentieel waren om de huidige ontwikkelingen mogelijk te maken.

### 2.1. Structuur en werking van het DNA

Sinds Watson en Crick in 1959 de structuur van het DNA hebben ontdekt is er veel veranderd in de toegepaste biologie. Zij ontdekten de dubbele helix structuur en dat het DNA in wezen is opgebouwd uit basen. In de onderstaande figuur is de samenvatting te zien.

Afbeelding 1: Van cel naar basenparen via chromosoom (van wikipedia)



Deze manier van oprollen en opvouwen maakt 2 dingen mogelijk namelijk dat er veel informatie in een zeer klein volume past en dat gedeelten van deze informatie separaat kunnen worden afgelezen en ingezet. Ter illustratie het volgende tabelletje

Tabel 1: Omvang van het genoom in basenparen van enkele organismen

Soort	Omvang DNA van haploid genoom in basenparen
Plantenvirussen	3000 – 50.000
Bacteriën	$10^6 - 10^7$
Insecten	$10^8 - 10^{10}$

<i>Arabidopsis</i>	$2 * 10^8$
Mais	$39 * 10^8$
Erwt	$49 * 10^8$
Tarwe	$173 * 10^8$
Mens	$30 * 10^8$

Elke base vertegenwoordigd een DNA-lengte van  $3,4 * 10^{-10}$  meter. Dat betekent dat als je het DNA van één cel van een mens zou uitrollen er een keten met een lengte van ongeveer 1 meter (haploid) en dus 2 meter diploid ontstaat. Bij een gemiddeld aantal van ongeveer  $75 * 10^{12}$  cellen kun je al gauw uitrekenen dat de totale lengte van het DNA van een mens 150 miljard kilometer is. Om een idee te geven: Van de aarde naar de zon is ongeveer 150 miljoen kilometer! De dubbele helix structuur die dan vervolgens nog eens om histonen wordt gewonden is dus een hele efficiënte.

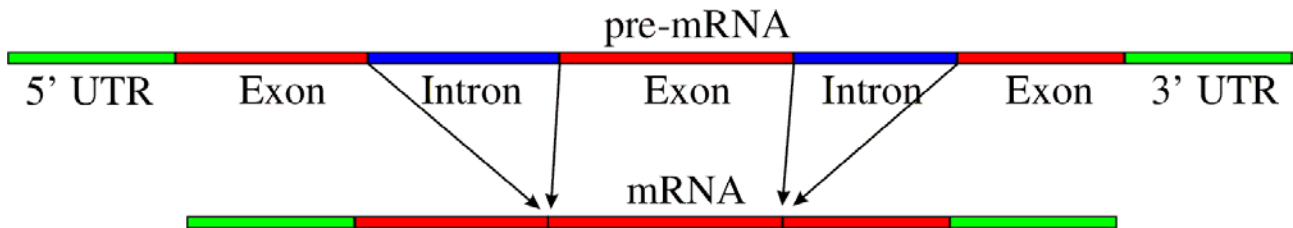
Een gen is een stukje DNA dat een codering bevat voor een eiwit. Eiwitten zijn er in vele soorten en maten en bestaan uit aminozuren. De kleinste eiwitjes hoeven maar 6 aminozuren te bevatten, de grotere hebben er enkele duizenden. Voor de codering van elk aminozuur is een triplet van basen nodig. In de onderstaande figuur is een overzicht gegeven van de tripletten en waar ze voor coderen.

Tabel 2: De vertaling van codons in aminozuren (uit Wikipedia)

		2e base			
		U	C	A	G
1e base	U	UUU <a href="#">Fenylalanine</a> UUC <a href="#">Fenylalanine</a> UUA <a href="#">Leucine</a> UUG <a href="#">Leucine</a> , <i>Start</i>	UCU <a href="#">Serine</a> UCC <a href="#">Serine</a> UCA <a href="#">Serine</a> UCG <a href="#">Serine</a>	UAU <a href="#">Tyrosine</a> UAC <a href="#">Tyrosine</a> UAA Ochre ( <i>Stop</i> ) UAG Amber ( <i>Stop</i> )	UGU <a href="#">Cysteïne</a> UGC <a href="#">Cysteïne</a> UGA Opal ( <i>Stop</i> ) UGG <a href="#">Tryptofaan</a>
	C	CUU <a href="#">Leucine</a> CUC <a href="#">Leucine</a> CUA <a href="#">Leucine</a> CUG <a href="#">Leucine</a> , <i>Start</i>	CCU <a href="#">Proline</a> CCC <a href="#">Proline</a> CCA <a href="#">Proline</a> CCG <a href="#">Proline</a>	CAU <a href="#">Histidine</a> CAC <a href="#">Histidine</a> CAA <a href="#">Glutamine</a> CAG <a href="#">Glutamine</a>	CGU <a href="#">Arginine</a> CGC <a href="#">Arginine</a> CGA <a href="#">Arginine</a> CGG <a href="#">Arginine</a>
	A	AUU <a href="#">Isoleucine</a> , <i>Start</i> <sup>2</sup> AUC <a href="#">Isoleucine</a> AUA <a href="#">Isoleucine</a> AUG <a href="#">Methionine</a> , <i>Start</i> <sup>1</sup>	ACU <a href="#">Threonine</a> ACC <a href="#">Threonine</a> ACA <a href="#">Threonine</a> ACG <a href="#">Threonine</a>	AAU <a href="#">Asparagine</a> AAC <a href="#">Asparagine</a> AAA <a href="#">Lysine</a> AAG <a href="#">Lysine</a>	AGU <a href="#">Serine</a> AGC <a href="#">Serine</a> AGA <a href="#">Arginine</a> AGG <a href="#">Arginine</a>
	G	GUU <a href="#">Valine</a> GUC <a href="#">Valine</a> GUA <a href="#">Valine</a> GUG <a href="#">Valine</a> , <i>Start</i> <sup>2</sup>	GCU <a href="#">Alanine</a> GCC <a href="#">Alanine</a> GCA <a href="#">Alanine</a> GCG <a href="#">Alanine</a>	GAU <a href="#">Aspartaat</a> GAC <a href="#">Aspartaat</a> GAA <a href="#">Glutamaat</a> GAG <a href="#">Glutamaat</a>	GGU <a href="#">Glycine</a> GGC <a href="#">Glycine</a> GGA <a href="#">Glycine</a> GGG <a href="#">Glycine</a>

Het kan opvallen dat er van deze 22 aminozuren er één is die maar met 1 codon worden vertaald (Methionine) terwijl er één is die met 6 codons kan worden bereikt (Leucine). Ook zijn er start en stopcodons te zien. Een streng basen bevat dus ook coderingen die als leestekens fungeren. Bij prokaryoten (bacteriën vooral) codeert vrijwel alle DNA binnen de start en de stop voor een eiwit. Bij eukaryoten zijn er ook nog

introns en exons te onderscheiden. De exons (**expressed regions**) worden tijdens de splicing van de introns gescheiden. Wat er dan overblijft is het mRNA dat naar de ribosomen gaat om afgelezen te worden. In de onderstaande figuur is dat nog eens weergegeven.



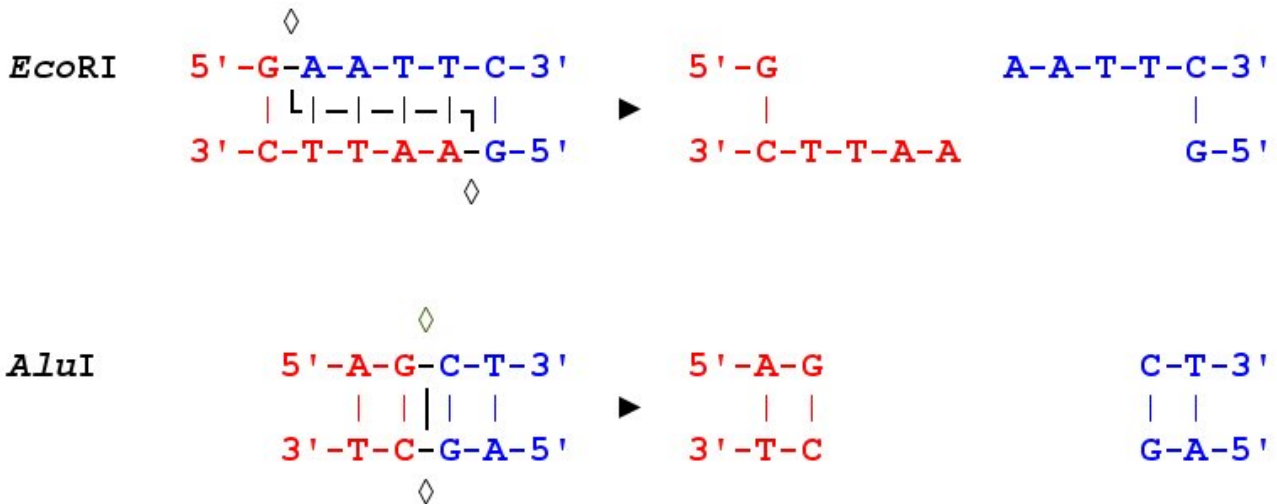
Afbeelding 2: van pre mRNA naar mRNA, het "splicen" (uit Wikipedia)

Als er dan ook nog een aantal regelsequenties aan zo'n serie tripletten worden toegevoegd die regelen wanneer een gen moet worden afgelezen en hoe vaak dan is het gen gebruiksklaar. De meest bekende regelsequentie is een promotor. Deze bepaalt of een gen "aan" staat..

Als DNA wordt afgelezen dan worden de strengen zover ontrolld dat een eiwit er op kan hechten en de twee strengen uit elkaar kan halen. Het leest dan een van de strengen af en vormt zo een kopie van basen die na splicing de celkern kan verlaten. Het uit elkaar halen van de strengen kan ook via verwarming tot 95°C. Als het weer afkoelt zullen de strengen weer tegen elkaar aan gaan plakken (hybridiseren). Een inmiddels zeer veel gebruikte techniek is op dit principe gebaseerd. Dat is de PCR (Polymerase Chain Reaction)

## 2.2 Restrictie enzymen

De ontdekking van de restrictie-enzymen hebben het mogelijk gemaakt om de kennis die over het DNA werd verkregen ook te gebruiken. De ontdekking was goed voor een Nobelprijs in 1978. Zonder restrictie enzymen veel minder markers, geen genetische modificatie en zelfs ook de genetische karakterisatie wordt dan lastig.. Zoals de naam al zegt zijn het echte enzymen dus katalysatoren: moleculen die iets tot stand kunnen brengen in de cel zonder dat ze zelf worden verbruikt. Doorgaans zorgen enzymen voor een knip of een plak actie. Bijvoorbeeld zetmeel wordt door  $\alpha$ -amylase in suikermoleculen geknipt, of 2 isopreen-eenheden worden door tot een terpeen gesmeed. In het geval van restrictie enzymen wordt het DNA doorgeknipt. Er blijken vele soorten restrictie-enzymen te zijn en elk enzym heeft een eigen vaste plaats om te knippen. Naarmate de ontwikkelingen vorderen wordt er ook steeds meer bekend over deze enzymen en blijken er weer meerdere typen te onderscheiden te zijn. (zie <http://nl.wikipedia.org/wiki/Restrictie-enzym>) Ik beperk me hier tot het type 2, namelijk die enzymen die een bepaalde sequentie in het genoom herkennen en daar kunnen knippen. Het knippen kan daarbij ook nog op 2 manieren, met een stomp uiteinde of met een vrijhangend uiteinde. In het onderstaande plaatje is AluI een enzym dat een stomp uiteinde overlaat (blunt-end) en EcoR1 een enzym dat een vrijhangend uiteinde overlaat (sticky-end). De enzymen knippen daarbij in een palindroom van 4 tot 8 basen. Een palindroom is een sequentie of een woord dat van voor naar achter gelezen hetzelfde oplevert als van achter naar voor. (bijv. parterretrap). Voor erg leuke voorbeelden daarvan zie: <http://nl.wikipedia.org/wiki/Palindroom> In het geval van EcoR1 is het een 6 basen-sequentie (GAATTC) bij Alu1 is het een 4 basen-sequentie (AGCT). Er wordt in de praktijk vooral gebruik gemaakt van de sticky-ends knippers omdat het zo makkelijk is om aan de uiteinden weer iets anders vast te zetten.



Afbeelding 3: 2 voorbeelden van de werking van restrictie-enzymen

Als een restrictie-enzym het DNA knipt dan ontstaan er een grote hoeveelheid stukjes van verschillende lengte. Het aantal stukjes, en daarmee de grootte van de stukjes wordt bepaald door het gebruikte enzym. Als een enzym gebruikt wordt dat een "zeldzame knipper" is dan betekent dat dat het palindroom wat wordt herkend als knipplaats niet zo vaak in DNA voorkomt en diens gevolg zullen er ook weinig, maar grote brokken DNA ontstaan

### 2.3 Southern blotting

Dit is een techniek die niets met windstreken van doen heeft. Meneer E. Southern is de ontdekker van een techniek die in staat is om stukjes DNA uit een soep te vissen. Het met restrictie-enzymen geknipte DNA levert een grote hoeveelheid fragmenten op. Eerst wordt er elektroforese toegepast zodat de brokken DNA op basis van grootte worden gesorteerd en dan wordt het verwarmd totdat de strengen van het DNA uit elkaar gaan en vervolgens wordt het DNA gebonden aan een drager, bijv. nylon of nitrocellulose. Dat proces van binden heet blotten. Als je nu een stukje van de sequentie weet van het stuk DNA waarnaar je op zoek bent dan kun je dat stukje in spiegelbeeld namaken en over dat filter uitgieten. De plek waar dat zelf gemaakte stukje DNA aan blijft plakken is dan het gezochte DNA.

Later zijn er nog meer windstreken aan het blotten toegevoegd. Zo is er de Northern Blot waarbij RNA wordt gebonden, de Western Blot (ook wel immuno-blot) om eiwitten te vinden en tenslotte de Eastern Blot om 3D veranderingen in eiwitten te kunnen opsporen

### 2.4 Reverse transcriptase

Zoals al in de eerste paragraaf van dit hoofdstuk is besproken wordt DNA afgelezen tot mRNA wat vervolgens de cel in gaat en daar wordt afgelezen in een aminozuurvolgorde. Het officiële woord voor overschrijven is transcriberen en het enzym dat helpt om deze vertaalslag te maken is dan ook DNA-transcriptase. Er bleek echter ook een enzym te zijn die geen RNA streng als product heeft maar een complementaire DNA streng. Dit wordt dan ook cDNA genoemd. Zo is het ook mogelijk geworden om eiwit via RNA in DNA te vertalen zonder een DNA-synthesizer.

### 2.5 Probe

Een ondersteunende techniek die in veel van de DNA-technieken weer terugkomt als een hulpmiddel is een probe. Die kun je synthetisch maken als je een sequentie hebt. Het is een stukje DNA dat plakt aan die basenpaarsequentie die je hebt bepaald, een stukje complementair DNA dus. Je kunt die probe ook labelen met een stofje zodat je de probe meteen kunt terugvinden. Vaak wordt daar een fluorescerend molecuul voor gebruikt. Bij belichting met een bepaalde golflengte, doorgaans UV, licht dat molecuul dan op. Dat is bijvoorbeeld in te zetten als volgt: Je hebt DNA geïsoleerd en geknipt met een enzym. Alle brokjes DNA worden met een buffer aangebracht op een gel. Door de gel onder spanning te zetten gaan de stukjes DNA

zich door de gel bewegen. De grote het langzaamste en de kleine het snelste. Na verloop van tijd is de "run" klaar en breng je de gelabelde probe over het oppervlak van de gel. Daar waar de basenvolgorde past bij de probe zal deze eraan gaan hechten. Na verloop van tijd wordt de rest van de probe afgewassen. Door nu het label te activeren wordt de positie van de probe zichtbaar. Zo kunnen er bijvoorbeeld conclusies worden getrokken over het al dan niet gelijk zijn van de DNA samenstelling in de verschillende laantjes. Het grootste voordeel is dat je alleen die stukjes DNA zichtbaar hebt waarvan je van tevoren weet dat ze belangrijk zijn.

## 2.6 PCR

Voor verschillende toepassingen in de genetechnologie is een bepaalde hoeveelheid DNA nodig. Wanneer er niet genoeg DNA in een monster zit, dan zal het moeilijk worden om proeven te doen met dit monster. De Amerikaan Kary Mullis heeft in 1983 een oplossing bedacht voor dit probleem. Hij heeft een methode ontwikkeld die het mogelijk maakt om DNA in principe oneindig te kunnen vermenigvuldigen. Hij heeft er in 1983 de Nobelprijs voor de Scheikunde voor gekregen. Hij maakte gebruik van de al eerder genoemde eigenschappen van het DNA om bij hoge temperatuur in twee strengen uiteen te smelten en bij langzame afkoeling weer goed aan elkaar te plakken. Door toevoeging van de juiste ingrediënten kan het DNA zichzelf kopiëren als de omstandigheden maar in de juiste volgorde afwisselen. In zijn eerste proeven was hijzelf degene die de buisjes van het ene temperatuurbad in het andere moest zetten, maar de industrie had al vrij snel een apparaat geconstrueerd die dat van hem overnam.

Naast DNA dat vermeerderd moet worden, zitten er dus ook nog andere ingrediënten in het apparaat. Dit zijn:

- losse nucleotides (A,T,C en G),
- korte enkelstrengs DNA moleculen (de primers),
- Taq polymerase. Dit is een enzym dat ook bij hoge temperaturen zijn werk kan doen,
- Buffer oplossing.

Het proces van DNA vermeerderen ziet er als volgt uit:

- **Stap 1:** Eerst wordt het monster **1 minuut** verwarmd tot ca. 90 –95°C. De dubbele streng DNA splitst zich nu in 2 enkele strengen. Het verwarmen van het monster zorgt er voor dat de waterstofbruggen tussen de 2 strengen wordt verbroken. De waterstofbruggen zijn namelijk zwakker dan de bindingen tussen de nucleotides binnen een streng.
- **Stap 2:** De temperatuur in het apparaat wordt nu verlaagd tot 54°C. Door dit afkoelen kan de primer zich aan de enkele strengen DNA binden. De primers kunnen zich binden omdat ze passen aan sommige volgordes van een streng die naast het DNA-gedeelte liggen dat moet worden gerepliceerd. Deze stap duurt maar **45 seconden**. De binding met de primer is nu zo sterk dat deze niet meer wordt verbroken bij opwarming.
- **Stap 3:** De temperatuur wordt nu **2 minuten** verwarmd tot 72°C. De primers die niet goed gebonden zijn aan de enkele strengen, zullen nu weer los komen van deze strengen. De Taq polymerase gaat nu het DNA verlengen. Hiervoor worden de losse nucleotides gebruikt. Uiteindelijk is het resultaat van deze 3 stappen een complementaire keten op een oorspronkelijke enkele keten.

Na elke cyclus zullen er dus 2 keer zoveel stukjes DNA aanwezig zijn. Voor een voldoende grote hoeveelheid DNA zal de cyclus dus nog enkele keren herhaald moeten worden. De hoeveelheid DNA zal exponentieel groeien. (2-4-8-16-enz.). Na 35 keer verdubbelen kom je ongeveer uit op 68 miljard keer zoveel DNA dan waarmee je bent begonnen. Met deze hoeveelheid kan je vervolgens andere proeven doen. Om dit aantal te krijgen ben je al snel 3 tot 4 uur bezig. In het onderstaande schema is het nog eens weergegeven (afbeelding 4).

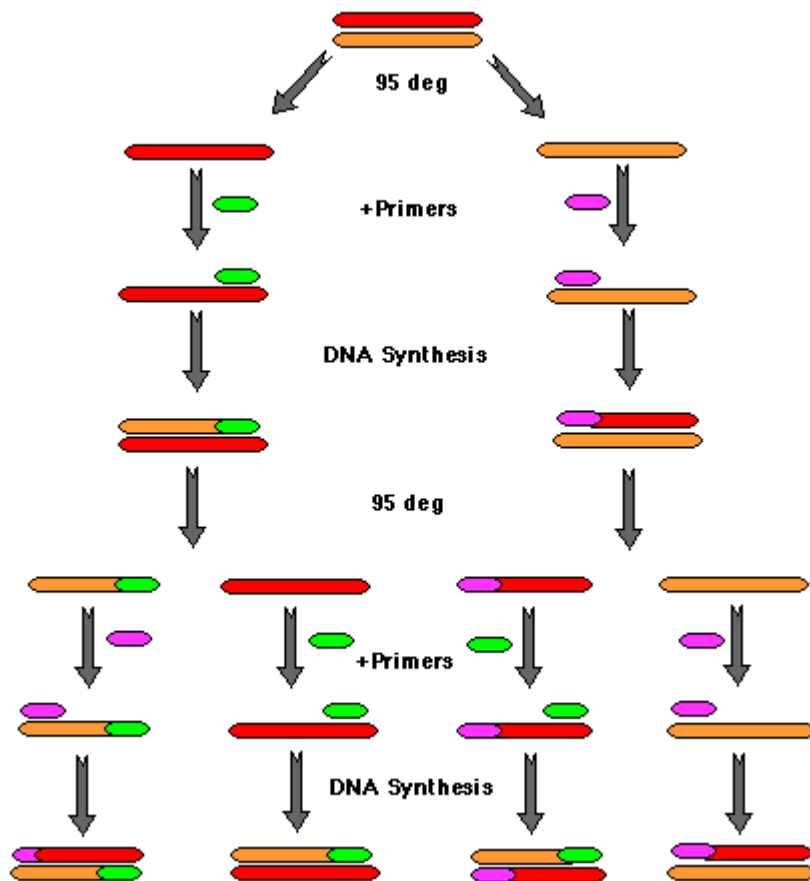
[http://www.bioplek.org/animaties/moleculaire\\_genetica/PCR.html](http://www.bioplek.org/animaties/moleculaire_genetica/PCR.html)

Essentieel zijn natuurlijk de ingrediënten. De primers zijn stukjes DNA van 6-15 basen lang die zich hechten aan het DNA waar dat maar kan. De keuze van de primers bepaalt dan ook het resultaat. Hoe beter je weet hoe de basenvolgorde in het DNA is hoe gericht je een bepaald deel van het DNA kan vermeerderen. In een volgende paragraaf zal daar op terug gekomen worden.

Een ander ingrediënt dat dit proces sowieso mogelijk maakt is de Taq-polymerase. Taq is de afkorting van *Therm(ophil)us aquaticus*, een extremofiele bacterie die gevonden is in hete bronnen in het Yellowstone park en dus niet zoals al het andere leven bij 45°C al denatureert. Omdat deze alg bij 80°C nog kan groeien zal er ook eiwitsynthese bij die temperatuur plaats moeten kunnen vinden. Ook de enzymen moeten dan dus werken. Deze enzymen kunnen dan ook ingezet worden bij experimenten onder hoge temperaturen.

De methode kan gebruikt worden voor de forensische geneeskunde, (bijvoorbeeld bij DNA onderzoek van een dader), of voor het aantonen van bacteriën en virussen die maar op een zeer beperkte schaal aanwezig zijn in een monster.

De PCR heeft een tijdperk ingeluid van een groot aantal afgeleide procedures die ons in staat stellen soms al real-time te zien welke stukjes DNA aanwezig zijn. De detectiedrempel is sterk afhankelijk van de primerkeuze maar in principe slechts 1 DNA molecuul. Natuurlijk zijn er ook mogelijkheden om het verkeerdt te doen of om er verkeerd resultaat uit te krijgen. Het is mogelijk dat er een besmetting door een ander stukje DNA in het monster terecht komt. Een huidschilfer, een vingerafdruk een kuchje.... Met een beetje pech hechten zich daar ook 2 primers aan en wordt dat stukje DNA ook vermeerderd.



Afbeelding 4: Schema van PCR in de 3 stappen (bron: [http://www.scientistsatwork.be/files/imagecache/foto\\_group/files/pcr.gif](http://www.scientistsatwork.be/files/imagecache/foto_group/files/pcr.gif))

### 2.3 Moleculaire markers.

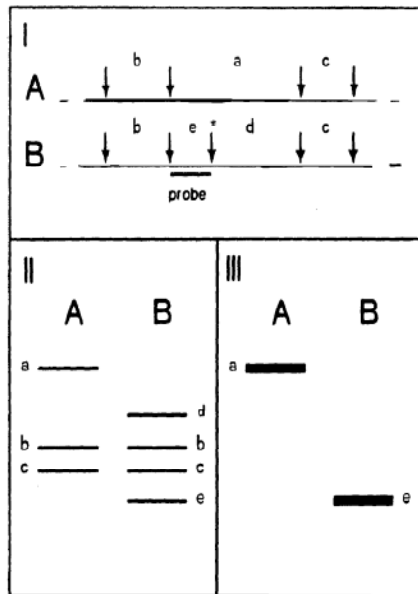


Om iets op DNA niveau aan karakterisering te doen maakt men gebruik van markers. Oorspronkelijk werd er gekeken naar de eiwitten die het gevolg waren van DNA-expressie. De aanwezigheid van een eiwit, of een variant daarvan (bijv. een isozym) verraadde dan de aanwezigheid van het gewenste gen. In de 80-er jaren van de vorige eeuw werd het knippen van DNA mogelijk en daarmee de RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphism). Sindsdien heeft de ontwikkeling en het gebruik van merkers een grote vlucht genomen. Het is zo'n veelgebruikte techniek geworden dat er al een tijd sprake is van marker assisted breeding. Een techniek waarbij de resultaten van het al of niet aanwezig zijn van bepaalde markers bepaald of er met dat individu verder moet worden gekruist of juist niet. Aan de andere kant is er veel verwarring rond het woord "markers" of "merkers". Dat komt omdat er van alles gemerkt wordt en dat dat begrip dan overal terecht wordt gebruikt. In deze paragraaf gedeelte gaat het over DNA-markers. Hierbij wordt bedoeld dat het een molecuul is wat aangeeft waar een bepaald stukje DNA, een bepaalde sequentie, op een gel of in een chromosoom terug te vinden is. Het idee hierachter is dat een makkelijk terug te vinden stukje DNA, een merker, erg nauw gekoppeld is aan een eigenschap die niet makkelijk waar te nemen is, zodat je er vanuit kan gaan dat het aanwezig zijn van een speciale merker ook betekent dat een speciale eigenschap aanwezig zal zijn. Je kunt dan selecteren in kiemplantstadium op bijv. bloemkleur. Het is dus niet zomaar het geval, hoewel niet uitgesloten, dat de merker zich bevindt op een gen dat de bepaalde eigenschap veroorzaakt. Het is dus een kwestie van correlatie. In het onderstaande gedeelte zal een aantal veel gebruikte merkertechnieken worden behandeld.

### 2.3.1. RFLP

De oervorm van het gebruik van merkers is de RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism. In de naam zit al besloten dat het gebruik ervan mogelijk wordt gemaakt door restrictie-enzymen. Het idee achter deze merkers is dat als er veranderingen in het DNA optreden deze invloed kunnen/moeten hebben op de sequentie van het DNA en dat zou twee gevolgen kunnen hebben:

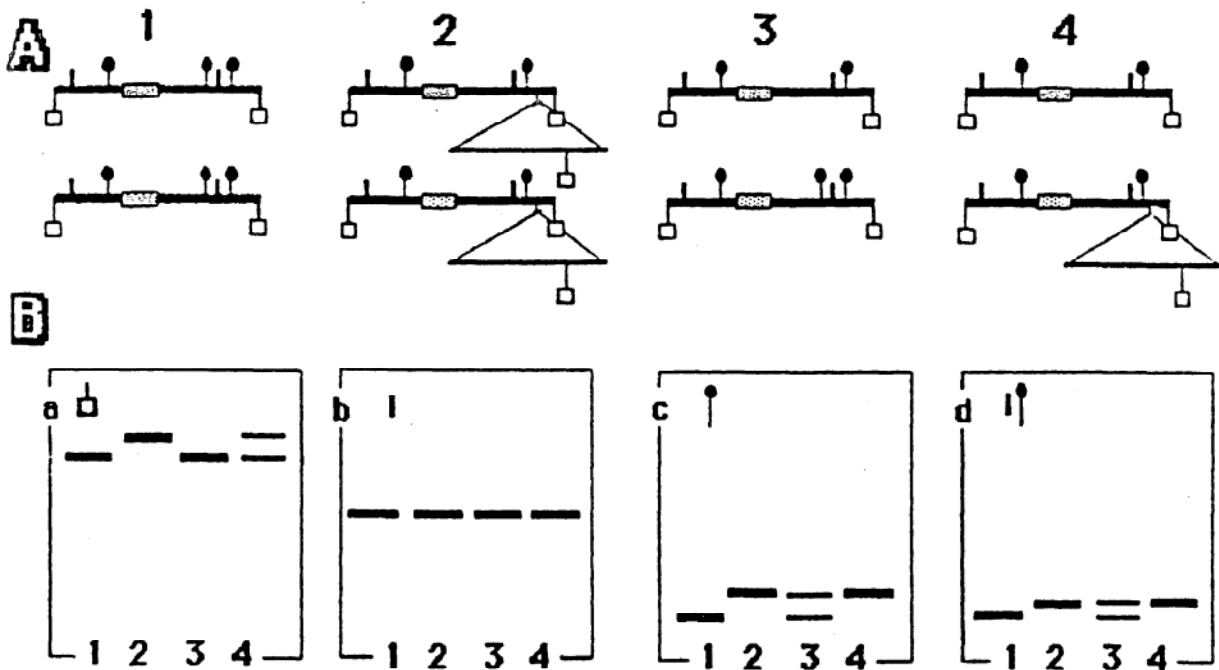
1. Er ontstaat of er verdwijnt een knipplaats voor een restrictie-enzym.
  2. Er ontstaat variatie in lengte tussen de fragmenten die ontstaan na knippen van het DNA
- Essentieel in dit verhaal is de probe, een stukje DNA, meestal van een bekende sequentie, en gelabeld met een stof zodat de plaats ervan herkend kan worden. De volgende plaatjes maken dat waarschijnlijk duidelijk



Afbeelding 5: De werking van RFLP. Een stuk DNA heeft een basisvorm weergegeven met A en een variant, weergegeven in B. I. In stukje a van A is een knipplaats ontstaan in de variant B. II. De stukjes DNA na electroforese. III. Wat er zichtbaar is na toepassing van de probe.

In deze afbeelding is de basisversie van een stuk van het DNA weergegeven als A. B is een variant van A waarbij een knipplaats is ontstaan, aangegeven door een ↓. Als er nu geknipt wordt met het betreffende restrictie-enzym en het DNA wordt op een gel gezet en aan electroforese onderworpen dan ontstaat het patroon zoals in deel II van de afbeelding. A kent 4 knipplaatsen en levert dus 3 fragmenten, waarvan de grootste a is en dus het langzaamste loopt en de kleinste c is en voorop loopt. Als er door welke oorzaak dan ook een verandering in het DNA is gekomen, waardoor een extra knipplaats is ontstaan voor dat enzym dan zal B het resultaat zijn. Gedeelte a van A wordt in tweeën geknipt en zo ontstaat het beeld van B in II. Daarbij is a verdwenen en d en e daarvoor in de plaats gekomen. Deze zijn elk korter dan a en zullen dus wat harder lopen. In het gedeelte III van de afbeelding is gebruik gemaakt van de probe en dus ook de Southern blot. Deze probe hecht aan een stukje van het DNA. In A is dat ergens aan het begin van a. Als de DNA strengen dus uit elkaar worden gesmolten en gefixeerd op het membraan kan de probe zich hechten en zal het te zien zijn als een oplichting van het stukje a van A. De andere stukjes worden niet door de probe herkend en verdwijnen dus uit beeld. In B hecht de probe zich nog steeds aan het overeenkomstige stukje in het DNA maar dat is nu komen te liggen op gedeelte e. Vandaar dat in III alleen e oplicht. De RFLP-merker is dus het gehybridiseerde lijntje dat oplicht in de Southern blot. Als dit duidelijk is gaan we het een beetje ingewikkelder maken. In het voorgaande voorbeeld is elke keer met 1 enzym geknipt. Als er een verandering in knipplaats is opgetreden heb je geen idee of dat gebeurt is en al helemaal niet voor welk restrictie-enzym er een knipplaats is veranderd. Je zou dan alle enzymen moeten proberen om te kijken of er niet ergens een verschil te vinden is. In het volgende voorbeeld wordt daar wat meer mee gespeeld. Er is sprake van meerdere enzymen, die dus moeten worden geplaatst op meerdere gels en ook van een insertie: er is een stukje DNA bijgekomen

# Restriction Sites in Chromosomal DNA



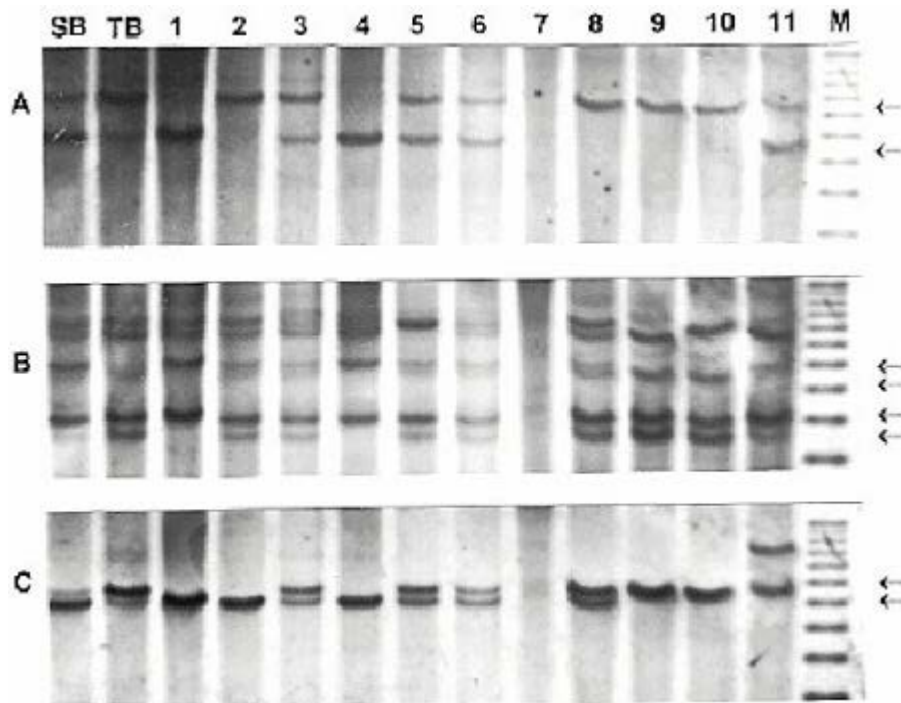
Afbeelding 6: RFLP in bedrijf. In A staan vier planten (1 t/m4) met varianten in DNA sequentie rond een hechtplaats van een bepaalde probe. Planten 1 en 2 zijn homozygoot, maar verschillend, planten 3 en 4 zijn heterozygoot. De verschillende symbooltjes geven de restrictie-plaatsen aan van de verschillende enzymen. In B zijn de resultaten van de gels te zien na hybridisatie met de probe

Als je plant 1 knipt met enzym met symptoom "blokje"(gel a van B) dan krijg je twee even grote stukken die over elkaar heen vallen. Doe je dat bij plant 2 dan zijn er ook twee stukken die over elkaar heen vallen maar omdat er op het rechteinde van de sequentie een stuk tussen zit (t.o.v. 1) is het restrictie fragment langer en in de gel dus dichterbij het begin. Plant 3 is weer vergelijkbaar met plant 1 en plant 4 heeft zowel de korte als de lange variant die hybridiseren met de probe en dus 2 lijntjes, 1 korte en een langere, die elk natuurlijk maar half zo "zwaar" zijn. Zo ook voor de andere restrictie enzymen.

In het voorbeeld is uitgegaan van een beperkte hoeveelheid DNA. Een beetje afhankelijk van het enzym zijn er natuurlijk veel tot zeer veel knipplaatsen en ook de selectiviteit van de probe maakt wel wat uit. Als je bijvoorbeeld als probe een stukje van 4 basen met een label gebruikt is de kans dat die volgorde van 4 basen in het genoom voorkomt een kans van 1 op  $4^4 (= 256)$ . Bij een probe van 8 basen is dat 1 op  $4^8 (= 65536)$ . Zelfs bij een groot genoom levert dat vaak nog wat veel bandjes op. Het mag duidelijk zijn dat het bandjespatroon dat ontstaat karakteristiek is voor de combinatie restrictie-enzym en probe.

Een van de voordelen is dat de sequentie van de probe niet bekend hoeft te zijn. Wil je RFLP's gebruiken als markers dan volstaat het feit dat je een nauwe correlatie aantoonst tussen het aanwezig zijn van een bepaalde eigenschap en de aanwezigheid van een bandje. Een nadeel is dat het wat bewerkelijk en wat traag is.

Een voorbeeld hoe met deze techniek gewerkt wordt biedt het volgende figuurtje

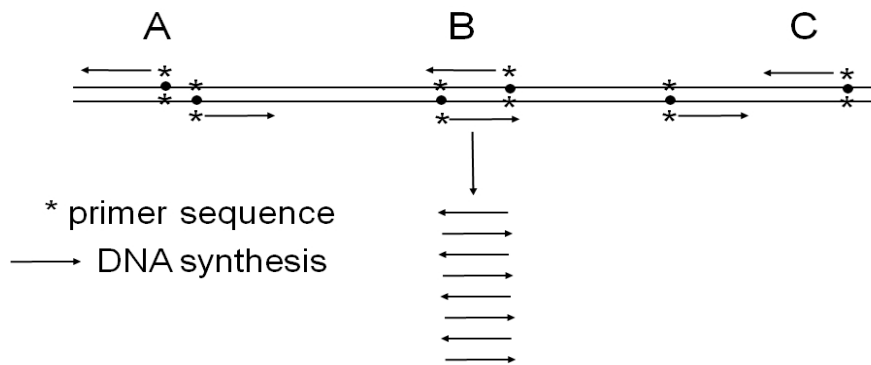


*Afbeelding 7: Southern blots of bulked DNA samples and individual members of the bulks digested with EcoRI and probed with UMC103 (A), CSU155 (B) and UMC48 (C). SB, Al-susceptible bulk; TB, Al-tolerant bulk; 1 to 6, Al-susceptible individuals; 7 to 11, Al-tolerant individuals; M, molecular weight marker. Arrows indicate the polymorphic regions. Uit: Torres et al.: A search for RFLP markers to identify genes for aluminum tolerance in maize*

### 2.3.2. RAPD

RAPD of "Rapids" staat voor Random Amplified Polymorphic DNA. Hier is dus een vermenigvuldigingsstap bij betrokken. Deze vermenigvuldiging gebeurt door PCR. Het voordeel daarvan is dat je maar erg weinig DNA nodig hebt en dat het relatief snel gaat. Het hele DNA wordt vermeerderd en er wordt gebruik gemaakt van relatief korte primers van 10 basen. Vanwege de gevoeligheid voor verontreiniging wordt er meestal ook referentiemateriaal meegenomen, zodat je achteraf kunt zien wat er bij hoorde en wat niet. Het onderstaande figuurtje geeft goed weer wat er gebeurt.

## RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA



**A : DNA synthesis in wrong direction**

**B : DNA amplification**

**C : primer sites too distant**

*Afbeelding 8: Mogelijkheden van random amplification. Alleen bij B ontstaat een bandje. (uit: powerpoint van R. Niks, WUR)*

Mocht je uiteindelijk een band gevonden hebben die correspondeert met het kenmerk waarnaar je op zoek bent dan kun je die band uit de gel snijden, deze nog eens extra vermenigvuldigen en vervolgens sequencen. Met de gevonden basenvolgorde kun je nog beter passende en selectievere primers ontwikkelen. Deze heten dan Sequenced Characterized Amplified Region Marker (SCAR), en zijn dus veel specifiek

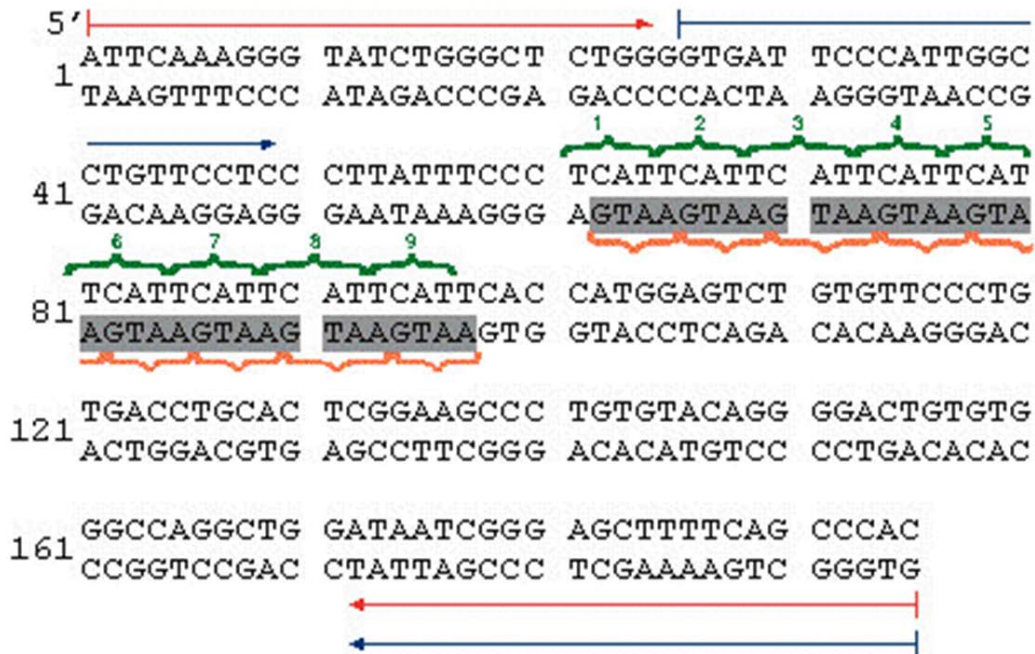
### 2.3.3. Fingerprinting

Dit is meer een containerbegrip. Doorgaans wordt er alleen mee bedoeld dat er een "streepjescode" van DNA-segmenten ontstaat die karakteristiek zou kunnen zijn voor een soort. Zo kan er een dader mee worden gezocht of verwantschap mee worden onderzocht tussen soorten die heel dichtbij of wat verder van elkaar af staan. In meer beperkte zin is het een verdere uitwerking van de vorige stap, de RAPD. Hierbij worden korte primers gebruikt (van 5-8 basen lang). Deze techniek is vooral zinvol als er naar kleine verschillen moet worden gekeken tussen planten, bijvoorbeeld zoals het verschil tussen ras en GM -ras.

### 2.3.4. SSR

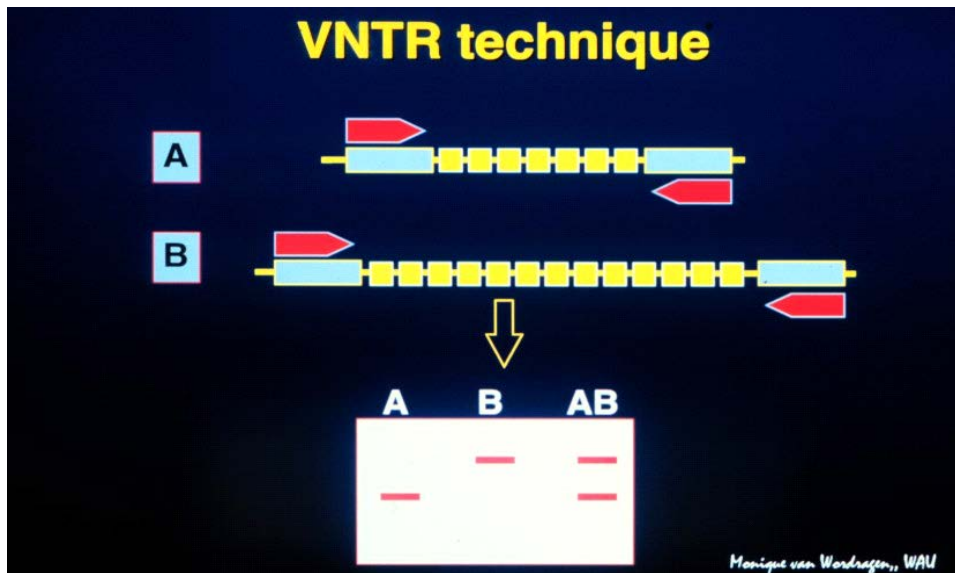
SSR staat hier voor Simple Sequence Repeats, met een ander woord ook wel microsatellieten, Sequence-Tagged Microsatellite Sites (STMS), Variable Number Tandem Repeats (VNTR) of Simple Sequence Repeats Polymorphisms (SSRP) genoemd. Het is een techniek die vooral bij hogere organismen kan worden ingezet, omdat daar van deze repeats in voorkomen. Het blijkt namelijk zo te zijn dat in het genoom bepaalde stukjes DNA verschillende malen achter elkaar voorkomen. Dit kunnen stukjes van 2, 3 of zelfs 4 basen zijn. Dit heeft geen effect op de gen-expressie, wat het zijn doorgaans de introns waar deze herhaalde motieven in voor komen. Onderstaande afbeelding geeft een voorbeeld.

**HUMTH01 Sequence from GenBank**  
(Accession D00269)



Afbeelding 9: Een voorbeeld van een STR bij mensen. Er is hier te zien hoe in een stukje van 195 baseparen 9 keer de sequentie TCAT achter elkaar voorkomt. Bron: internet

Het voorkomen van micro-satellieten is wel karakteristiek voor individuen. De Powerpoint waar dit plaatje uitkomt heet dan ook "Brief History of Forensic DNA Typing ". Doordat er meer of minder herhalingen op dat stukje DNA aanwezig zijn zal in de vermenigvuldiging van het DNA bij PCR ook een verschillende lengte tussen dezelfde primers aanwezig zijn. De volgende afbeelding laat dat zien



Afbeelding 10: Variable Number Tandem Repeats ( VNTR) techniek. Het zorgt voor een variabele lengte van de marker tussen dezelfde primers. (uit: powerpoint van R. Niks, WUR)

### 2.3.5. AFLP

De AFLP-techniek, voluit Amplified Fragment Length Polymorphisms, is weer een verbijzondering van de RFLP. In de onderstaande figuur wordt deze in 3 stappen uitgetekend.

De techniek is gepatenteerd door Keygene, een samenwerkingsverband tussen een aantal grote zaadbedrijven. Het maakt heel slim gebruik van een combinatie van de sticky-ends die restrictie-enzymen achterlaten, daarop aangepaste adapters en primers. Je hoeft niets van de sequentie te weten. Een adapter is een stuk dubbelstrengs DNA met een bekende sequentie van circa 15 – 20 basenparen en een sticky-end dat aansluit op dat van een EcoR1 of MseI restriction site.

Stap 1: Het DNA wordt geknipt met de twee genoemde restrictie-enzymen. Vervolgens worden de adapters eraan geplakt (geligeerd).

Stap 2: Het DNA wordt verwarmd zodat de strengen uit elkaar gaan. Primers worden toegevoegd die zo zijn gemaakt dat ze precies passen bij de sequentie van de adapter + sticky-end + één of meer selecterende basen

Stap 3: de PCR start met als primer de toegevoegde sequentie. Als de gekozen selecterende base(n) niet passen(t) bij het stukje van het DNA dat tussen de adapter-einden zit kan het Taq-polymerase niet hechten en wordt dat stukje niet vermenigvuldigd. Door de selecterende basen kan het aantal te vermenigvuldigen stukjes worden beïnvloed. Bij één base wordt maar een kwart van de stukjes vermenigvuldigd, bij 2 selecterende basen 1/16 en zo verder.

Het resultaat is een gel met 50 – 100 vermenigvuldigde fragmenten, waarvan tot 80% kan dienen als genetische merkers. Het grote voordeel is dat je geen idee hoeft te hebben hoe de sequentie er uit ziet voordat je er iets mee kan gaan doen. Deze techniek wordt nu veel toegepast in verwantschapstudies en vooral voor het correleren van een eigenschap met een merker.

# AFLP-techniek

© Bionieuws / Unger 1995



Extractie kleine hoeveelheid DNA

**1ste reactiestap: knippen en adaptorligatie**

Genoom



Enzymatisch knippen...



Specifieke adaptor



Restrictiefragment

...en ligatie



**2de reactiestap: selecterende basenmatching**

Knip- en ligatieplaats

GACATCTGACGCATGTACGTCTGACGA

Enkelstrengs deel van adaptor Restrictiefragment

Door temperatuurverhoging smelten beide strengen uit.

Specifieke primer

Selecterende basen

5' CTGTAGACTGCGTACATGCAG 3'

3' GACATCTGACGCATGTACGTCTGACGA 5'

Toegevoegde specifieke primer bindt aan één van de strengen van de adaptor.

Als het selecterende 3' uiteinde van de primer niet aan het DNA van het restrictie-fragment past, zal Taq-polymerase niet in staat zijn het fragment te amplificeren.

**3de reactiestap: PCR-cyclus**

Verlenging m.b.v.

Selecterende basen Taq-polymerase kan plaatsvinden

CTGTAGACTGCGTACATGCAGACGC

GACATCTGACGCATGTACGTCTGACGA

Hoe meer basen er aan het selecterende deel van de primer zitten, hoe selectiever de amplificatie.

Selecterende basen passen niet

CTGTAGACTGCGTACATGCAG



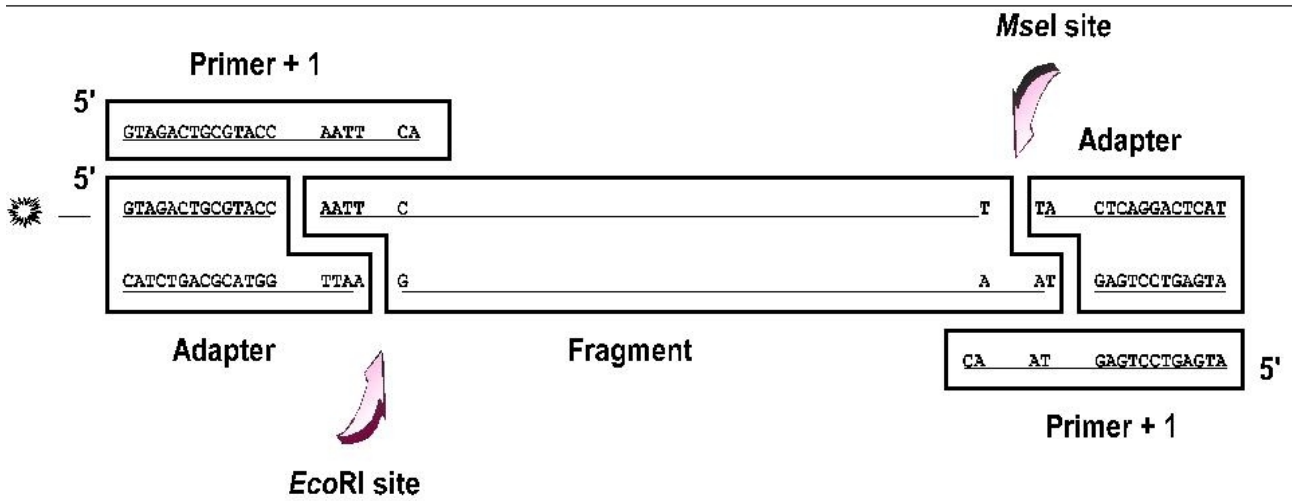
Geen verlenging door Taq-polymerase mogelijk

GACATCTGACGCATGTAGTACTGACGA

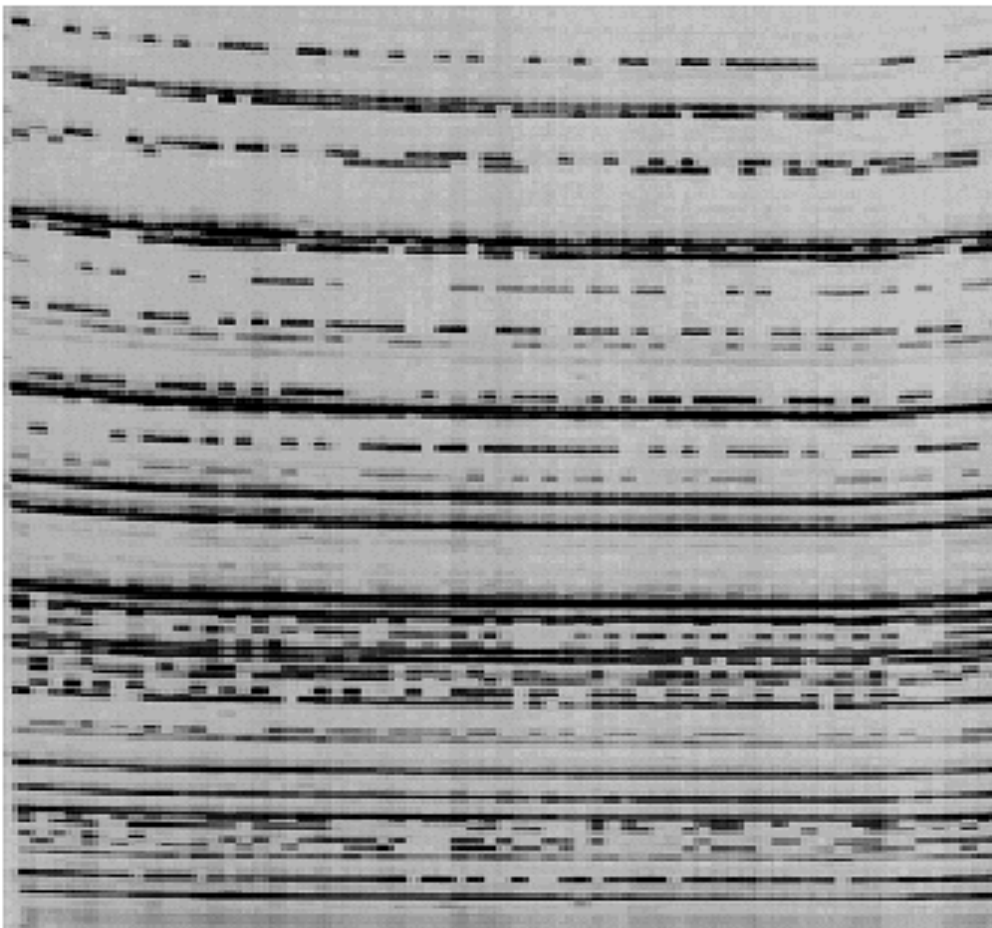
**Gel-elektroforese**

Afbeelding 11: De drie stappen in de AFLP-techniek (bron: Bionieuws)





Afbeelding 12: AFLP adapters en bijpassende primers. Bron: <http://www.plantsciences.ucdavis.edu/gepts/pb143/lec05/AFLP%20Method.jpg>

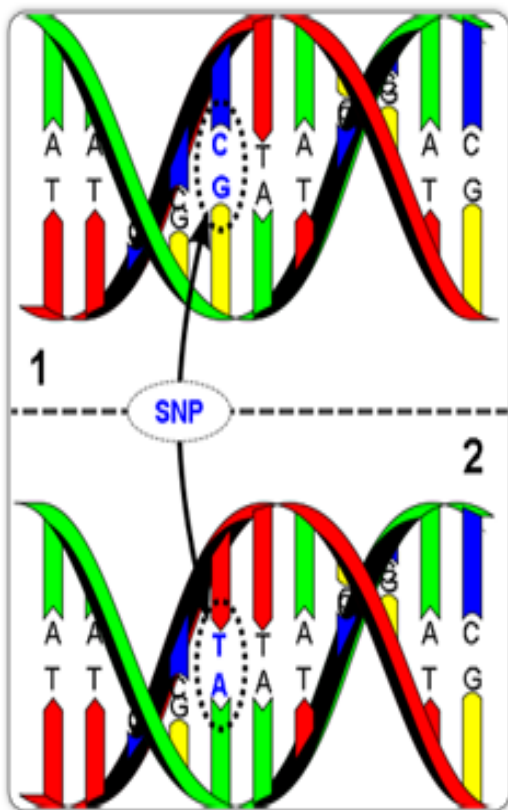


Afbeelding 13: AFLP

analyse van 2 Eucalyptus bomen (laan 1 en 2, en hun nakomelingen).  
Bron: <http://www.ebiotrade.com/buyf/products/aiagen/fig> AFLP analysis of

### 2.3.6 SNP

SNP of Snip staat voor Single Nucleotide Polymorphism. Hierbij is ten opzichte van een ander individu 1 base anders. Schattingen lopen uiteen van 1 op 300 tot 1 op 1000 basen dat dit gebeurt. SNP's zijn daarom geschikt om populaties uit elkaar te houden. Als een SNP optreedt in een individu dan zullen de nakomelingen doorgaans die variant ook kunnen vertonen. Omdat de nakomelingen vaak in een bepaalde omgeving blijven kan zo een populatie van een soort ontstaan die net even iets anders is dan de populatie van nakomelingen van een ander individu die misschien wel een andere SNP heeft ondergaan. Na verloop van tijd zullen zo geografische verschillende populaties ontstaan. Bij mensen kunnen deze verschillen leiden tot genetische afwijkingen die kunnen worden gekoppeld aan erfelijke ziekten. In andere gevallen hebben SNP geen enkel fenotypisch effect.



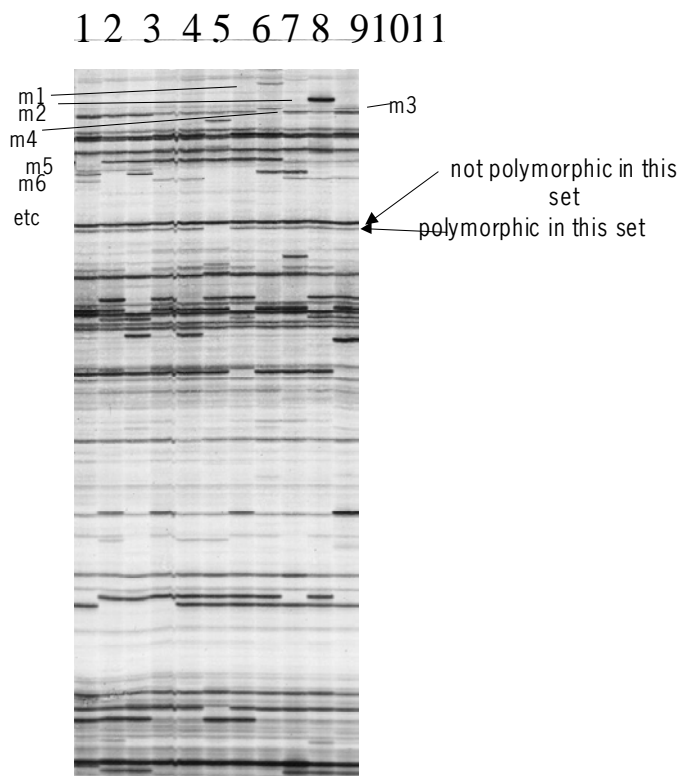
Afbeelding 14: Een illustratie van een

SNP (uit:

<http://www.saudibio.com/Services/Research/SNPGenotyping/tabid/89/Default.aspx>)

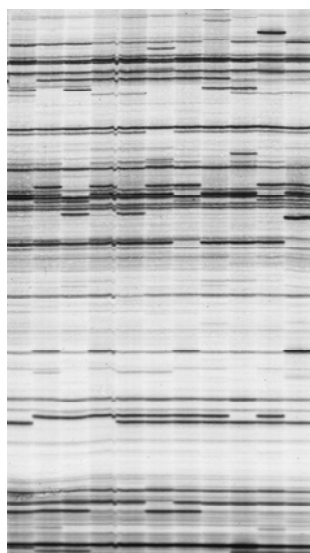
### 2.4. Het bruikbaar maken van merkers

Er zijn in het voorgaande een grote variatie aan mogelijke moleculaire technieken gepasseerd die allemaal op een of andere manier bandjes op een gel opleveren. Er is al even genoemd dat deze bandjes als merker kunnen worden opgevat. Maar hoe bepaal je nu of zo'n bandje een bruikbare merker is? Allereerst ga je het voorkomen van de bandjes vastleggen. Het makkelijkste gaat dat door ze in een tabel te zetten. Je hebt dan een tabel waarin je per plant hebt vermeld welke bandjes



Afbeelding 15: AFLP fingerprints van 11 kruisingslijnen van gerst (Niks, WUR)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
m1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
m2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
m3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
m4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
m5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
m6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
m7	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
m8	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1

convert to data table

m9  
m10  
m11  
m12  
m13  
m14  
m15  
m16  
m17  
m18

Afbeelding 16: Het

resultaat van de AFLP-fingerprint kan worden gedigitaliseerd (Niks, WUR)

er voorkomen. Op zich zegt dat natuurlijk nog niets. Je moet je wel realiseren dat als je een andere techniek

gebruikt de verschillen tussen de individuele planten weer anders zullen zijn. Ook het gebruik van andere ingrediënten (bij AFLP bijvoorbeeld andere knippers of andere primers) levert een onvergelijkbaar resultaat. Dus bij het vastleggen van een bandjespatroon hoort ook een beschrijving van de werkwijze en de gebruikte materialen. Vervolgens kun je er 2 dingen mee. Je kunt gaan zoeken welke bandjes altijd samen voorkomen, welke bandjes wat minder vaak samen voorkomen of welke bandjes elkaar uitsluiten. Dit wordt verder beschreven in het hoofdstukje "mapping" In het andere geval ga je verbanden zoeken met waargenomen eigenschappen. In beide situaties schakel je de computer in om dat voor elkaar te krijgen. De figuren 15 en 16 geven een idee hoe je zo iets aanpakt.

### 3. Een begin van genetic mapping

Hoe pak je het nou aan om genen te mappen? In dit geval betekent mappen zoiets van "een plaats geven op een chromosoom". Maar of dat er van komt is maar de vraag. Er wordt eerder gestreefd naar een "linkage map", een overzicht van merkers die vaak samen gaan met het voorkomen van een bepaalde eigenschap. Ik zal bij de uitwerking steunen op de powerpoint van Dr. R. Niks van de WUR die "Molecular Approaches in crop improvement heet" en gerst als voorbeeld neemt.

Het gaat dus om het gebruik van merkers. In het voorgaande hoofdstuk is er een poging gedaan om duidelijk te maken hoe een aantal vormen van merkers hun vorm gekregen hebben en worden ingezet, nu zullen we de merkers gaan koppelen aan eigenschappen. In feite is het gebruik van merkers in plaats gekomen van de selectie op complexe polygene en meest fenotypische eigenschappen zoals resistentie of opbrengst. Waar je naar op zoek bent is een of andere merker waarvan het voorkomen in de plant samenvalt met een gewenste eigenschap. Hoe pak je nu zoiets aan?

De gebruikelijke manier is om een "mapping population" te maken. Dat gebeurt door 2 ouders te kruisen en de nakomelingen allemaal te scoren op de gewenste eigenschap, maar ook op het voorkomen van een of andere merker. Een eerste stap kan zijn het homozygoot maken van de plant. Dat kan bijvoorbeeld door planten te regenereren uit pollenkorrels. Daarmee zorg je ervoor dat alle eigenschappen naar voren komen die in zitten; dominant kan recessief niet meer maskeren. Dit is een van de mogelijkheden om aan "mapping population" te komen. Het werkt wel sneller bij het fenotypisch karakteriseren van de planten. Dan kruis je de ouders en bewaart alle zaden die worden gevormd. Het hangt een beetje af van welke weg je kiest maar uiteindelijk krijg je een "mapping population". In de onderstaande figuur zijn de mogelijkheden te zien voor het opbouwen van zo'n populatie.

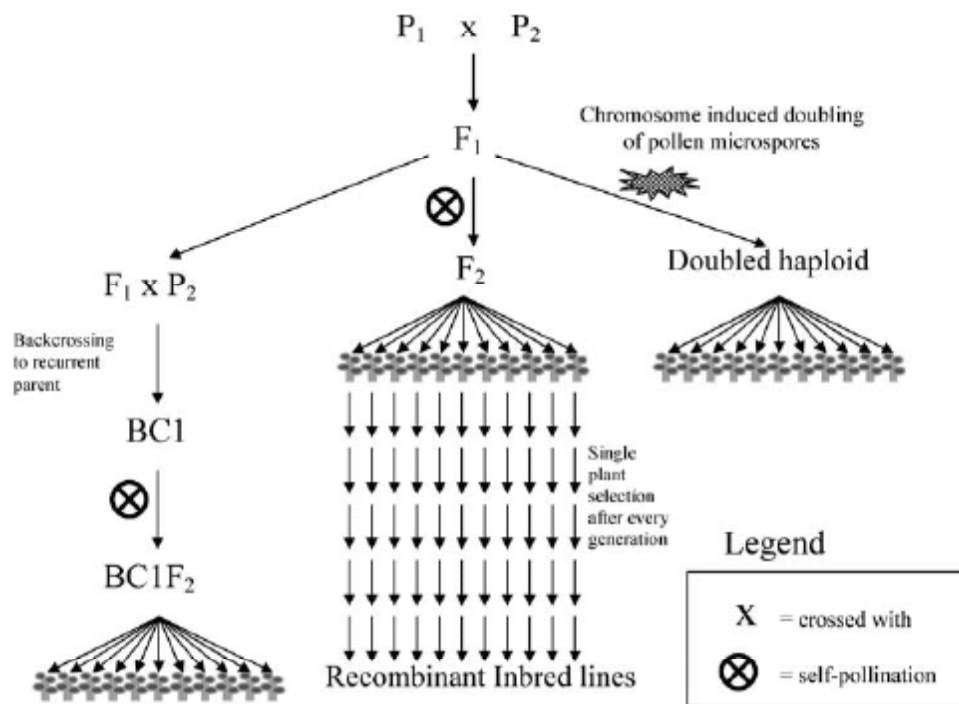
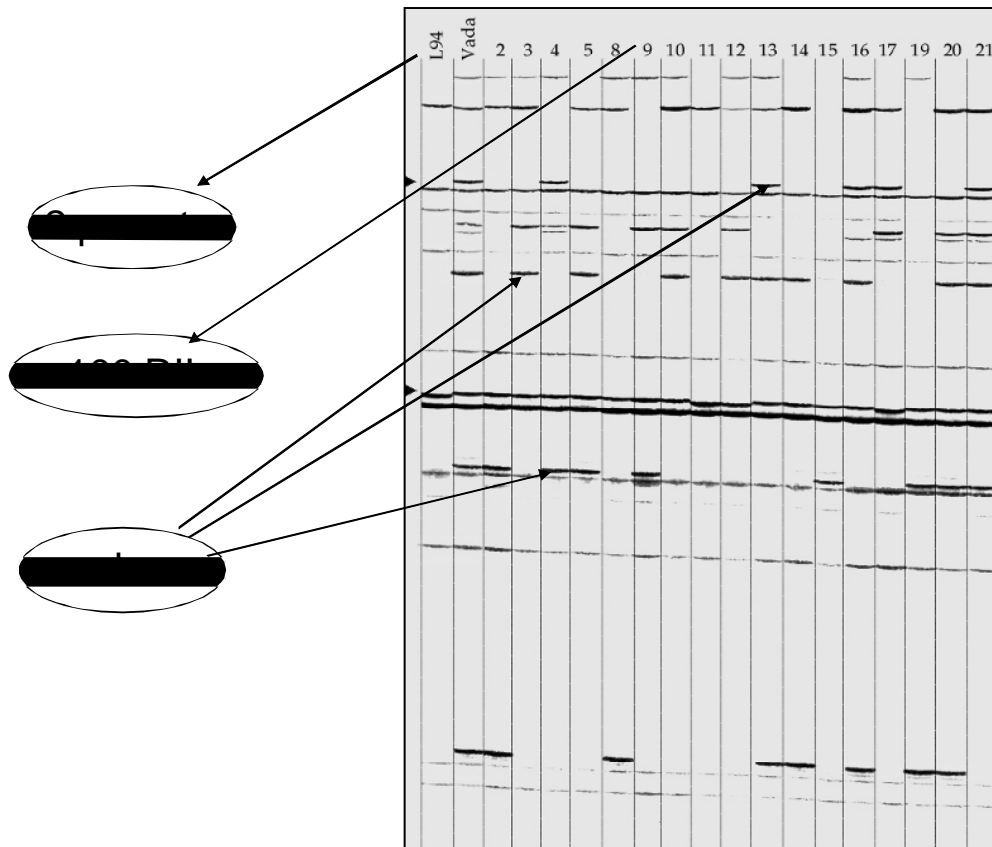


Figure 4. Diagram of main types of mapping populations for self-pollinating species.

Afbeelding 17: Opbouw van een "mapping population" (uit: Collard et al., 2005)

In het midden wordt gebruik gemaakt van SSD (Single Seed Descent), of te wel de nakomelingen van elk individuele plant volgen. Omdat gerst een zelfbevruchter is kun je na een 8 tal generaties er wel van uitgaan dat hij weer homozygoot is. Van elk van deze planten in de populatie ga je nu een AFLP profiel maken. In onderstaande foto van een gel is een mogelijk resultaat te zien.

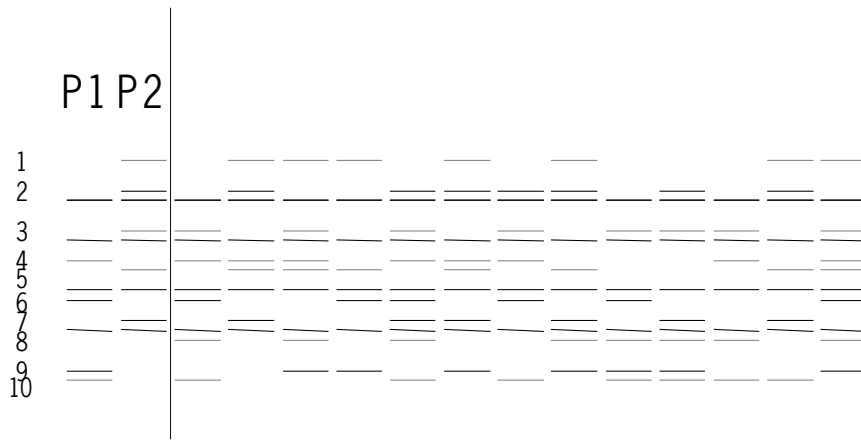


Afbeelding 18:

Voorbeeld van een AFLP-resultaat. De eerste 2 laantjes zijn de ouders, de volgende de RIL's

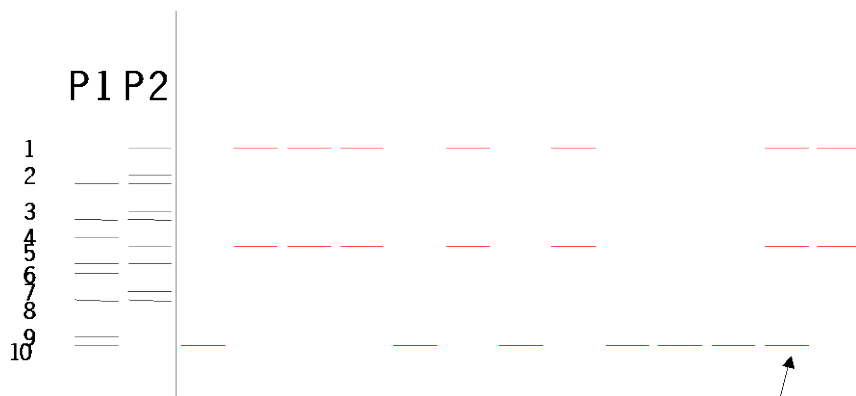
Je kunt daarin zien dat er bepaalde lijntjes in de laantjes van de nakomelingen van de ene ouder komen en andere lijntjes van de andere ouder. Ook zijn er bepaalde bandjes die overal voorkomen. Die zijn niet bruikbaar als merker in deze vergelijking. Andere bandje maken wel verschil tussen individuen en komen dus wel voor verdere analyse in aanmerking. In de onderstaande figuren is geprobeerd daar wat handen en voeten aan te geven.

Belangrijk daarbij is dat je je realiseert dat je nog steeds met DNA bezig bent en dat alles wat met kruisingen te maken heeft nog gewoon opgaat. In Minor A is al besproken dat de kans op nieuwe recombinaties afhankelijk is van de afstand op het genoom. Dicht bij elkaar liggende eigenschappen op het chromosoom zullen vaker samen vererven en bij verder van elkaar gelegen eigenschappen op het chromosoom zal er eerder een ont koppeling plaatsvinden. Dat werkt bij merkers net zo. Hoe vaker bepaalde merkers samen voorkomen hoe dichter ze op het chromosoom bij elkaar zullen zitten. De frequentie van gekoppeld voorkomen wordt dus vertaald in een aantal centimorgan (cM) afstand op het chromosoom



Afbeelding 19: Een voorbeeld

van merkers in een "mapping population". De ouders (P1 en P2) en nakomelingen (de laantjes rechts ervan) en het voorkomen van een 10-tal merkers (linkerkolom) (bron: Niks, WUR)



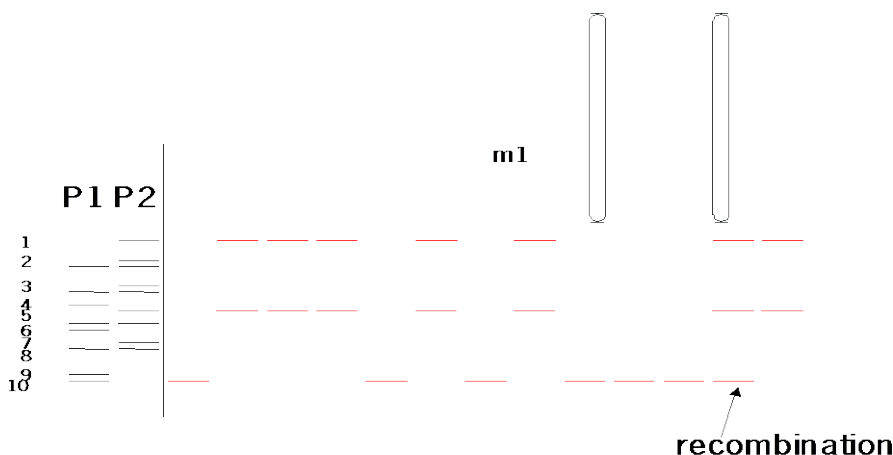
recombination

Afbeelding 20:

Dezelfde populatie als boven. Merkers 1 en 5 komen altijd samen voor en merker 10 komt niet voor als 1 en/of 5 erin zitten. Alleen in plant 11 blijkt dat niet op te gaan. Daar heeft een recombinitie plaatsgevonden. De andere merkers zijn voor de duidelijkheid niet weergegeven (bron: Niks, WUR)

Als je zo van veel merkers de recombinatiefrequentie hebt bepaald en daarmee ook een idee van de afstand die ze van elkaar op het chromosoom liggen kun je dus kaarten gaan maken van het chromosoom op basis van je merkers. Vervolgens kun je op dezelfde manier een kaart maken van de recombinatiefrequentie van de eigenschappen en die over elkaar leggen. Je kunt dan een poging doen om een koppeling te maken tussen basensequentie en eigenschappen.

Welke bandjes kun je linken aan een eigenschap? Voor dat laatste stapje moet je wel je populatie beoordelen op die eigenschap en dan doorgaans eerst maar eens een kwalitatief verband leggen.

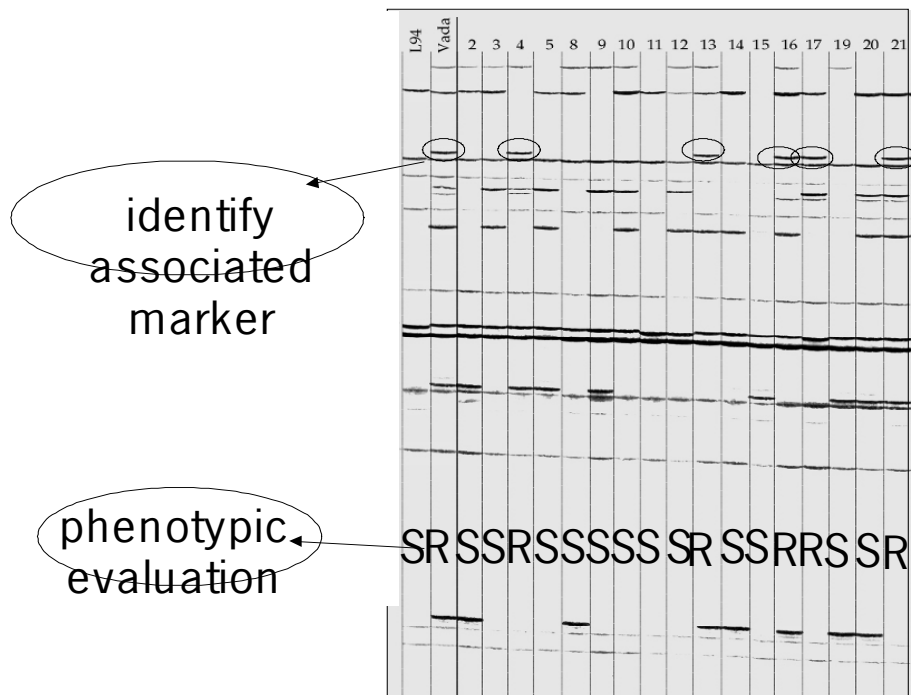


recombination

Afbeelding 21: Er is een

merker 11 bij getekend die gekoppeld is aan 10. Bovendien is er een poging gedaan om een map te maken (bron: Niks, WUR)

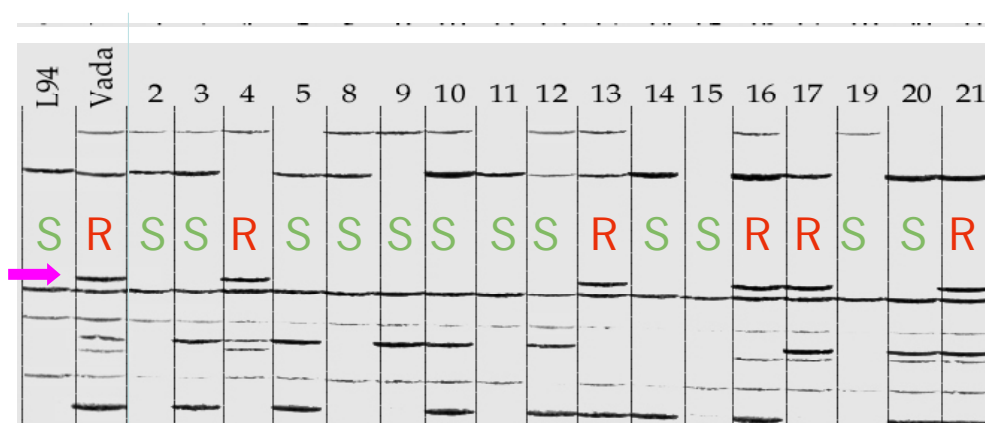
Waar je vooral naar op zoek bent zijn bandjes die voorkomen als een bepaalde gewenste eigenschap voorkomt. Bijvoorbeeld als het om resistentie gaat is een populatie meestal vrij eenvoudig te scoren. Je bepaalt van alle planten of ze resistent zijn of niet en gaat die resultaten vergelijken met de gel of in het laantje van die plant die resistent is een bandje voorkomt en in het laantje van een vatbare plant juist niet. Het bandje is dan een merker voor een eigenschap. De volgende afbeelding is daar een voorbeeld van.



Afbeelding 22: De twee

ouders en een aantal nakomelingen van een kruising bij gerst waarbij een verband bestaat tussen het voorkomen van een bandje en het voorkomen van een eigenschap. (S is susceptible (vathaar) en R is resistent) (Bron: Niks WIR)

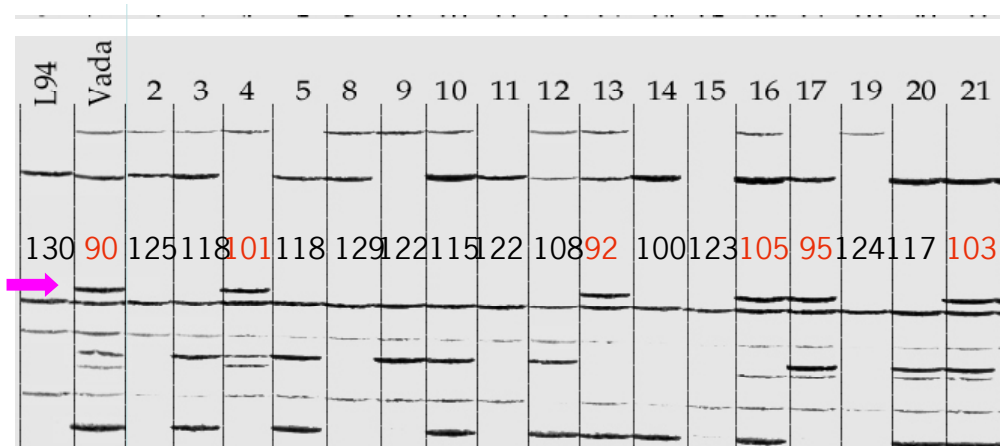
Het omcirkelde bandje boven in de gel komt altijd samen voor met de fenotypische eigenschap Resistent. Het komt ook voor in de ouder "Vada" terwijl andere bandjes die alleen in Vada voorkomen in die resistente planten niet allemaal terug te vinden zijn. Het is dus niet zo dat de waarneming "er zit een VADA-gen in een nakomeling" automatisch de conclusie oproept "die nakomeling is resistent". Je kunt nog iets geavanceerder te werk gaan en de resistentie kwantitatief gaan benaderen. Dus niet alleen kijken of de resistentie er is, maar ook proberen een maat te vinden voor de mate van resistentie. In de volgende figuur is dat gebeurd.



Afbeelding 23: Het

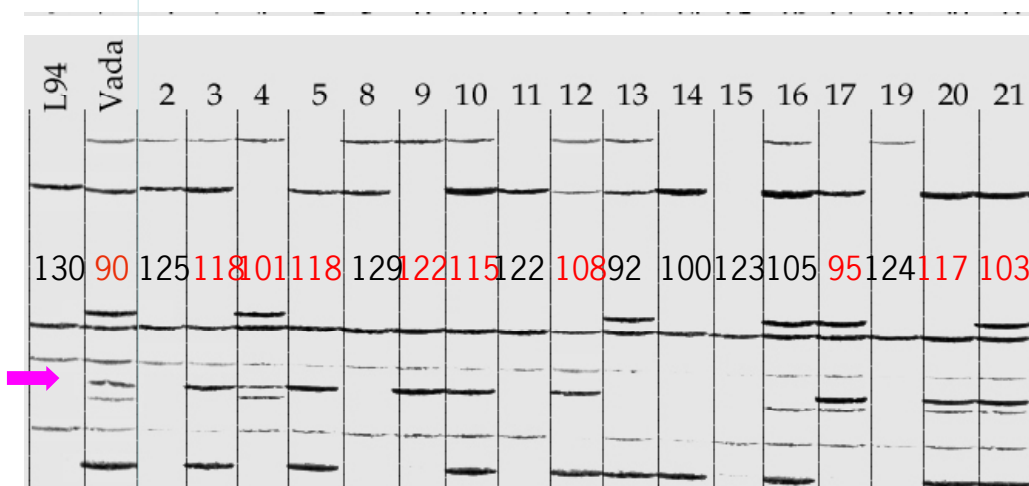
bandjespatroon van de kruisingsouders en een aantal nakomelingen en per laan aangegeven of de plant resistent (R) of vatbaar (S) scoorde in de toets (bron: Niks WIR)





Afbeelding 24: De

resistentie van de vorige afbeelding gekwantificeerd als lengte van de latentie periode in uren. De gemiddelde waarde van de planten met het VADA allel is dan 99,2 en de gem. waarde met het L94 allel is 115. Voor een ander bandje kun je zo ook een waarde uitrekenen.



Afbeelding 25:

De gemiddelde waarde van de planten met dit andere Vada-allel is nu 110,8 en de gemiddelde waarde met het L94 allel 115 (bron:Niks, WUR)

Je kunt met een ANOVA zo alle markers op de gel nagaan en via de eerder beschreven methode (kwalitatief) de volgorde construeren van de markers op het chromosoom. Vervolgens kun je gaan uitzoeken welke marker het beste correleert met je eigenschap. Dat maakt het bruggetje naar het volgende hoofdstuk.

## Identificeren van genen

In het voorgaande hoofdstuk zijn een heel aantal technieken de revue gepasseerd die kunnen helpen om verwantschap op te sporen en onderscheid te maken tussen populaties. Om in de veredeling sneller vooruit te komen zou het handig zijn als je van een DNA sequentie weet wat de functie is. Het is dan mogelijk om met een moleculaire merker de aanwezigheid van een DNA sequentie vast te stellen en daarmee ook zeker te weten dat een eigenschap (= doorgaans de expressie van het DNA) aanwezig is. In dit hoofdstuk zullen de methoden worden behandeld die worden gebruikt om erachter te komen welke genen welke functie kunnen hebben en waar die genen dan zitten in het genoom. Een tussenvorm komt eerst aan bod, het gebruik van QTL

### 4.1. QTL

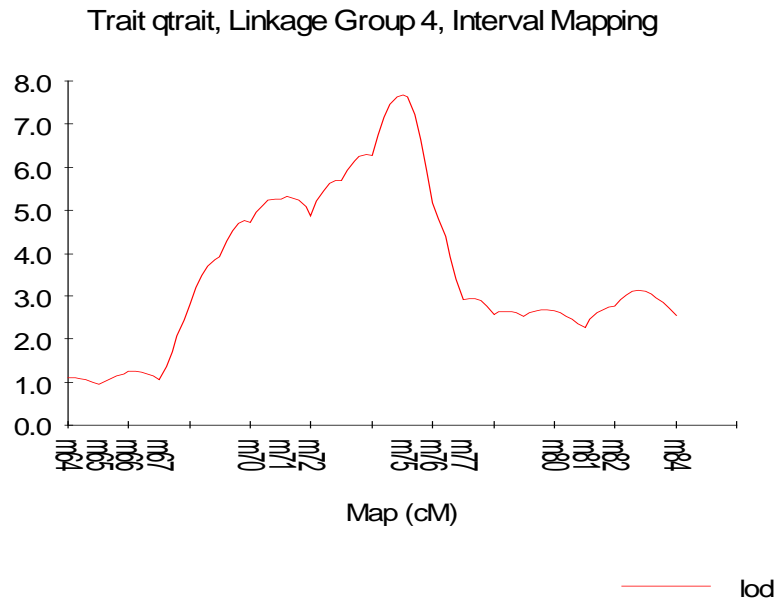
QTL staat voor Quantitative Trait Loci. Dit is een erg belangrijke groep van loci omdat bijna alle gewenste eigenschappen kwantitatief zijn. Veredelingstechnisch betekent het dat het polygene eigenschappen zijn en dat deze verantwoordelijk zijn voor een deel van de waargenomen genetische variatie die fenotypisch wordt beoordeeld. Een QTL komt in zekere zin overeen met een gen, maar het geeft meer de plek in het genoom aan waar de genen in de buurt zouden kunnen zitten. Het is in strikte zin het vinden van een correlatie tussen een waargenomen fenotypische eigenschap en het aanwezig zijn van allelen of merkers. Het wordt overigens pas een QTL genoemd als het random correlatie is, er moet dus wel een verband zijn tussen de allelen en de plaats van de merkers op de linkage map. Er is dus nog wel een onderscheid tussen QTL's en genen. Je kunt ze isoleren als DNA fragmenten maar het is van de meeste niet duidelijk of het regulerende stukken DNA zijn of stukken van genen.

In de gewone mapping studies wordt de afstand op het chromosoom tussen eigenschappen bepaald door de frequentie waarmee ze samen tegelijk voorkomen. Hoe dichter bij elkaar hoe vaker ze samen aanwezig zijn. Dat is gewoon een kwestie van meten en tellen. Bij QTL's die gebonden zijn aan polygene eigenschappen is die een-op-een correlatie niet mogelijk. Bovendien is bij de expressie ook het milieu nog een belangrijke factor om in de beschouwing mee te nemen. Er moeten dus allerlei statistische analyses bij worden gebruikt om verbanden te vinden. Er zijn dan ook constant nieuwe ontwikkelingen op dit gebied van de ICT. De meest gebruikte is de LOD-score. Je kunt via statistiek de waarschijnlijkheid uitrekenen dat een QTL merker gekoppeld is aan een locus van een eigenschap. Je stelt dat de locus over het hele genoom voor kan komen en als 0-hypothese dat er geen QTL is en als alternatieve hypothese dat er een belangrijke QTL is. Je krijgt dan de volgende formule:

$$LOD (locus) = \log_{10} [ \text{max. waarschijnlijkheid (locus)} / \text{max. waarschijnlijkheid (geen locus)} ]$$

Nu is ook de afkorting LOD te verklaren: Logarithm of the ODDs, vrij vertaald de logaritme van de waarschijnlijkheid.

Om verder te borduren op het voorbeeld van gerst met resistentie van het vorige hoofdstuk volgt hier een uitwerking van het LOD-profiel met behulp van MapQTL. Je bepaalt zelf een bepaalde kritische waarde waarboven de waarde van de merker uit moet komen en de merkers die dan nog voldoen kun je gebruiken. In het onderstaande figuurtje is dat weergegeven. Wat wel opvalt is dat er een heel aantal merkers voldoen en die liggen ook nog dicht bij elkaar. Het zou dus zo kunnen zijn dat dat gedeelte van het chromosoom waar die merkers worden gelocaliseerd ook de regio is waar de eigenschap in de vorm van DNA (het gen) moet worden gezocht. Dat geeft een aanknopingspunt voor de volgende paragraaf.



*Afbeelding 26: Het LOD profiel van de gerstresistentie. Merker 75 heeft de hoogste waarde en is dus de beste voorspellende merker (bron: Nils WITP)*

#### 4.2 reverse genetics

Waar het allemaal om draait is dat je, als je met merkers en DNA wilt werken, een sequentie wilt hebben bij een eigenschap. De vorige paragraaf liet daar iets van doorschemeren. Helemaal essentieel is het vinden en isoleren van het gen als je dat gen wilt gebruiken om via transformatie in een ander organisme te zetten, de genetische modificatie. Maar daarover in een later hoofdstuk.

Heel recht-toe-recht-aan geredeneerd hoort bij elke eigenschap een eiwit dat er voor zorgt dat die eigenschap tot expressie komt. Als je dat eiwit kunt isoleren dan kun je ook uitvinden wat de samenstelling van het eiwit is en daarmee de aminozuurvolgorde. Via de genetische code zoals in het vorige hoofdstuk te vinden is het mogelijk om een sequentie te bepalen die codeert voor die aminozuurvolgorde. Dat hoeft niet voor het hele stuk te zijn, een basepaar of 25 is meestal al genoeg.

Een complicerende factor is wel dat de meeste aminozuren meerdere codes hebben. Als je daar de verkeerde van kiest dan is het al niet volledig complementair meer. Er is daar echter ook een work-around voor. Er zijn bepaalde basen die niet normaal in het RNA of DNA voorkomen en die zowel kunnen paren met 2 als met 3 bruggen. Op het moment dat je niet goed weet welke base je in wilt zetten kun je zo'n "wildcard" gebruiken. Het is zoiets als een \* of een ? bij de computer.

Als je die sequentie hebt kun je ook een synthetische probe maken. Vervolgens knip je het DNA met restrictie enzymen en brengt het op een gel. Vervolgens pas je electroforese toe en je krijgt een hele serie DNA-bandjes. Met die probe ga je dan "vissen" in het DNA. Je krijgt dan een plaats op de gel waar de probe hecht. Dat stukje snij je eruit en gaat dat verder sequencen. Zo kom je uiteindelijk achter een lange DNA sequentie waar het oorspronkelijk gefabriceerde stukje een gedeelte van is. Met een beetje geluk kom je op dat langere stuk DNA nog start en of stopcodons tegen en dan heb je een gen te pakken. Het is een vrij omslachtige weg en je zult er ook een cDNA library voor moeten aanleggen maar het heeft in de begintijd van de biotechnologie wel aan de wieg gestaan van de eerste successen.

#### 5. lokaliseren van genen

Door veel kruisingen te maken en heel goed waar te nemen kun je uiteindelijk erachter komen dat bepaalde

eigenschappen vaker samen overgeërfd worden dan andere. Als reden wordt aangenomen dat de genen voor de beide eigenschappen dicht bij elkaar op een chromosoom liggen dan de genen voor andere eigenschappen. Op grond van de frequentie van samen op gaan in de kruisingen kan zo de afstand berekend worden tussen twee genen op een chromosoom. Uiteindelijk kun je zo komen tot een koppelingskaart van een (deel van een) chromosoom. Hier is geen high-tech lab voor nodig alleen veel goede waarnemingen en een stuk statistische ondersteuning. Alle gegevens samen zouden kunnen leiden tot een kaart van het hele genetische materiaal van een soort.

Deze methode werd al lang toegepast voordat er iets van DNA-analyse kon worden gedaan. In het gedeelte populatiegenetica wordt dat uitgebreid behandeld.

Er zijn ook andere manieren om uit te vinden waar een bepaald gen zit. Achtereenvolgens zullen behandeld worden:

van mRNA naar cDNA

chromosome walking

Transposon tagging

### 5.1. Van mRNA naar cDNA

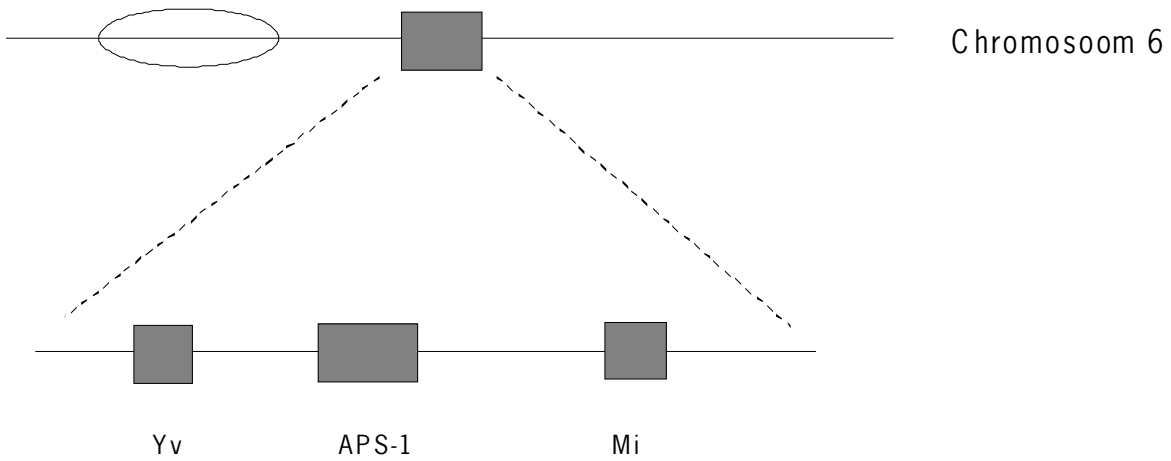
Een veel gebruikte methode is het uitgaan van mRNA's of zelfs eiwitten die in planten met een bepaalde eigenschap wel, en in planten die die eigenschap niet bezitten niet gevormd worden. Je isoleert dan mRNA uit een paar geselecteerde planten en scheidt die met 2D-electroforese. Vervolgens bekijk je welke mRNA het verschil maakt. Je snijdt het betreffende mRNA uit de gel en je kunt dan een cDNA's-bank screenen en de bijbehorende cDNA oppikken. Voorwaarde hiervoor is dat het gen voldoende tot expressie komt zodat er genoeg mRNA is om te isoleren en te zuiveren. Natuurlijk moet je ook een cDNA-bank van het organisme hebben. Een cDNA-bank is een verzameling bacteriën die in hun plasmide DNA allemaal een stukje van het DNA van de te onderzoeken plant of dier bevatten en zo samen alle DNA van dat te onderzoeken organisme vertegenwoordigen. In het verleden, toen sequencen nog een hele toer was, was het aanleggen van zo'n bank onvermijdelijk. Voor meer informatie omtrent aanleg, doel en mogelijkheden volg:

[http://en.wikipedia.org/wiki/CDNA\\_library](http://en.wikipedia.org/wiki/CDNA_library)

Een soortgelijke benadering is het uitgaan van een geïsoleerd eiwit waarbij de aminozuurvolgorde in dat eiwit bepaald wordt. Op grond van die volgorde kun je een voorspelling doen over de basenvolgorde in het bijbehorende DNA. Vervolgens worden stukjes DNA gesynthetiseerd die als probe gebruikt kunnen worden om een cDNA-bank te screenen. Op deze wijze is bijvoorbeeld een Avirulentie-gen van de schimmel *Cladosporium fulvum* (een pathogeen van tomaat) gekloneerd. Dit gen is verantwoordelijk voor het aanzetten van de resistentiereactie in tomaat. In de paragraaf reverse-genetics is daar wat uitvoeriger op ingegaan

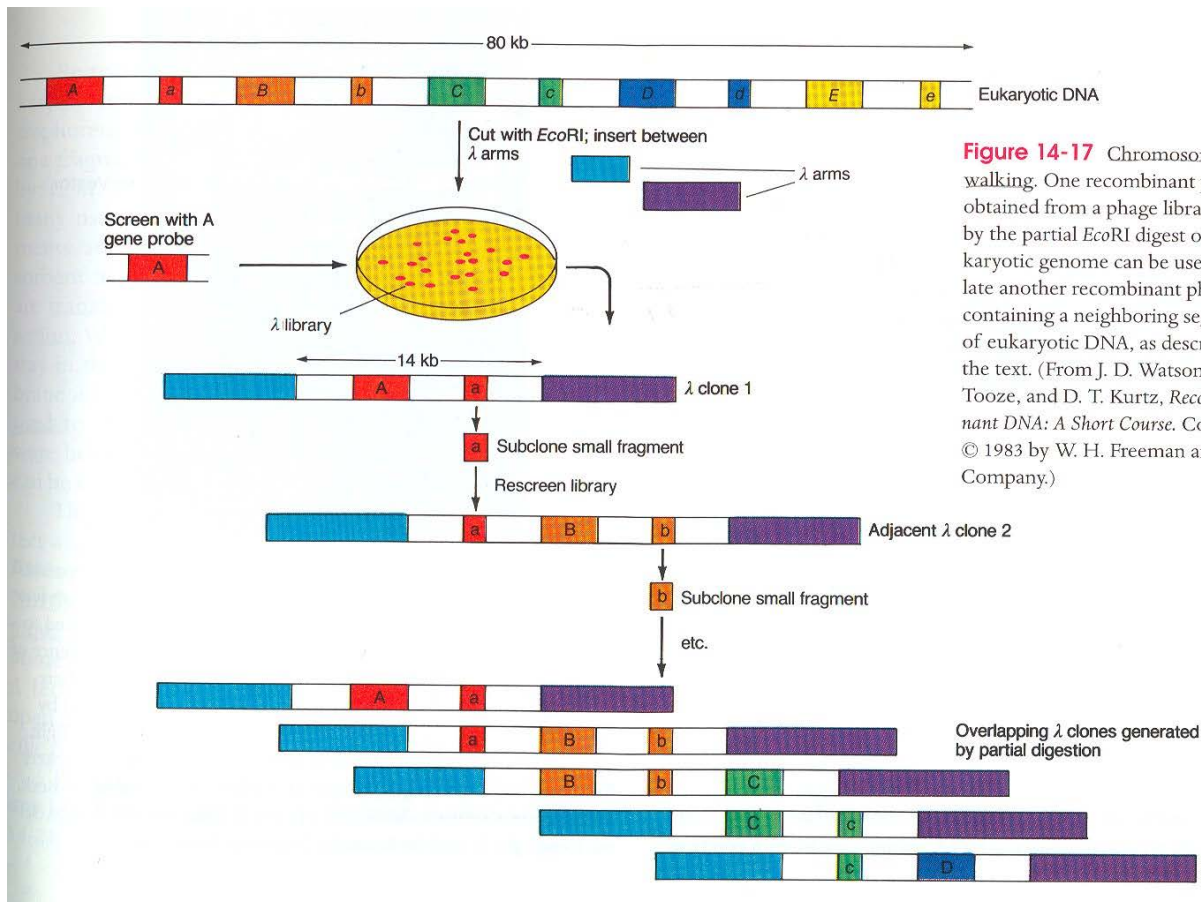
### 5.2. Chromosome walking

Deze technologie is oorspronkelijk ontworpen voor *Drosophila* en later toegepast op diverse eukaryoten. Het principe is dat vanuit een gen of een andersoortig stuk DNA (bijv. een RFLP-merker) over het chromosoom wordt gewandeld in de richting van het op te sporen gen (Your Favourite Gene). Voorwaarde is dat de merker nauw gekoppeld is aan YFG en dat die merker gecloneerd is. Een veel gebruikt voorbeeld in dezen is de chromosome walk vanuit het APS-1 gen (coderend voor zure fosfatase) naar het Mi-gen (coderend voor resistentie tegen *Meloidogyne incognita*, het wortelknobbelaaltje) in tomaat. De situatie op chromosoom 6 - waar zich dit alles afspeelt - is weergegeven in de figuur 27.



Afbeelding 27: De plaats van een aantal genen van tomaat op chromosoom 6. Yv = Yellow virescent, een fenotypische merker; Aps-1 = het gen voor zure fosfatase en Mi = het gen voor resistentie tegen *Meloidogyne incognita*. De ellips geeft de lengte van 1 centimorgan aan, dit komt overeen met een afstand van 600 - 100 kilobase.

Als marker-gen dient hier het APS-1 gen. Er wordt gebruik gemaakt van een genenbank van tomaat. Er is gekloneerd in de  $\lambda$ -bakteriofaag.



Afbeelding 28: Chromosome-walk. (bron: Campbell)

In fig. 28 is schematisch weergegeven hoe de chromosome walk in zijn werk gaat. Het gelabelde Aps-gen wordt als probe gebruikt om de genenbank te screenen. Het DNA wordt geïsoleerd uit de kloon die een positieve reactie geeft. Dit DNA wordt in kleine stukjes gesubcloneerd in pBPr322. Eén van de stukjes wordt daarna gelabeld en gebruikt om de bank opnieuw te screenen. Voorwaarde voor dit stukje is dat het verschillend is van de oorspronkelijke probe en dat het DNA is dat slechts in enkelvoud in het genoom voorkomt. Is dat laatste niet het geval dan zullen diverse klonen uit de bank een positief signaal geven. Bij het opnieuw screenen met de subkloon zal niet alleen de oorspronkelijke kloon een signaal geven maar ook een andere. Deze bezit DNA dat vlak naast het DNA in de eerste kloon ligt. Dit komt omdat de beide DNA-fragmenten elkaar overlappen. Chromosome walking maakt dan ook gebruik van het principe van overlap-hybridisatie. Het aldus opgespoorde DNA wordt opnieuw gesubcloneerd, één subkloon wordt weer gebruikt om de bank opnieuw te screenen en een nabij gelegen DNA-fragment kan worden geïsoleerd. Enzovoort. Om het nog eens na te lezen raad ik je aan te gaan naar:

<http://www.bio.davidson.edu/COURSES/GENOMICS/method/Chromwalk.html>

Vanuit het Aps-gen wordt dus langzaam gewandeld in de richting van het Mi-gen. Identificatie van het Mi-gen vindt plaats d.m.v. transformatie van gevoelige planten. Treedt resistentie op dan is de juiste kloon geïsoleerd.

Er is een aantal beperkingen bij een het gebruik van chromosome walking. In de eerste plaats moet je te maken hebben met een monogene eigenschap die fenotypisch ondubbelzinnig onderscheidbaar is. Een andere beperking is de beperkte afstand die kan worden overbrugd. 'Slechts' enkele honderden kilobaseparen kunnen worden geslecht. Maar er zijn ook DNA-regio's die niet over te steken zijn omdat er bijv. veel repeterende sequenties in voorkomen of omdat je te maken hebt met een sequentie die niet fatsoenlijk te kloneren is in standaard-vectoren.

Alternatieven worden dan ook gezocht. In de eerste plaats kan worden gedacht aan het vergroten van het aantal merkgenen op het chromosoom zodat meer plaatsen bereikt kunnen worden. Het ontwikkelen van een uitgebreide RFLP-kaart is daar dienstbaar aan. Een andere mogelijkheid is de afstand per stap in een chromosome walk te vergroten. Ook daar zijn methoden voor ontwikkeld.

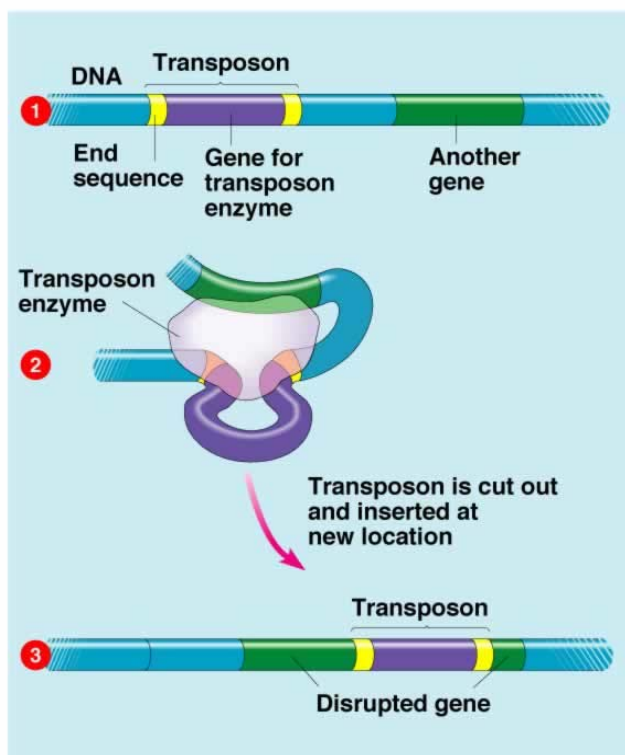
### 5.3. Transposon tagging

Deze techniek maakt gebruik van de natuurlijk voorkomende transposons (ook wel transpositie-elementen of 'jumping genes' genoemd). Een transposon is een stuk DNA dat van het ene chromosoom in een ander kan springen.. Transpositie-elementen komen in prokaryoten en zijn ook in dieren en planten ontdekt. Barbara McClintock (1902-1992) heeft hiervoor in 1983 de Nobelprijs gekregen. Zij deed in mais sinds 1935 onderzoek naar zogenaamde instabiele loci. Bepaalde eigenschappen muteerden snel doordat bepaalde genetische elementen erin sprongen. Door te kijken naar eigenschappen waarvan in bepaalde organen veel expressie (en dus veel mRNA) was en door vervolgens tegen het geïsoleerde mRNA cDNA te maken, was ze in staat te constateren dat het gen in de mutant extra DNA bevatte t.o.v. het wildtype. Dit extra DNA (het transposon) was in het gen gesprongen en had het onwerkzaam gemaakt: de mutatie. Er blijken 2 families transposons te zijn, de autonome elementen en de niet-autonome elementen. De autonome bevatten genen waarmee ze zichzelf kunnen losmaken en reïntegreren, niet-autonome kunnen alleen actief worden als het enzym transposase in de buurt is, bijvoorbeeld door aanwezigheid van autonome transposons.



Afbeelding 29: Kleurafwijkingen in de zaden van maïs veroorzaakt door transposons. (bron: <http://www.nature.com/nature/journal/v443/n7111/images/443>)

Een belangrijk feit is dat als een transposon springt er een voetafdruk wordt gemaakt die bij het eruit springen blijft zitten. Het idee is dat een transposon wordt gestimuleerd te springen, deze ergens terecht komt en door zijn aanwezigheid het gen wat op die plaats zit wordt geïnactiveerd. Dergelijke transposons kunnen nu gebruikt worden om andere genen op te sporen. Je kunt transposons aanpassen door ze bijvoorbeeld een reporter gene mee te geven (zie later) en/of fluorescerend te labelen. Je kunt dan het DNA van de plant knippen en elektroforeseren en dan met het transposon als probe, of , als je een gelabeld transposon hebt



©Addison Wesley Longman, Inc.

Afbeelding 30: Een mogelijke werking van een transposon. Door insertie wordt een gen uitgeschakeld. (bron: <http://www.chrisdellavedova.com/wp-content/uploads/2008/01/transposons1.jpg>)

gebruikt, met behulp van het label, de plaats van het DNA opzoeken waar het transposon in gesprongen is en het gen heeft uitgeschakeld. Door vervolgens dat stukje eruit te halen en te sequencen, en de voetafdruk van het transposon eraf te trekken heb je het gen in handen wat het niet meer doet. Fenotypisch kun je ook zien wat er gebeurd is, dus je kunt een combinatie maken van sequence en functie. In maïs bijvoorbeeld is het bronze-locus gedetecteerd en gecloneerd doordat het Ac-element erin gesprongen was. Door nu bij de mutant het DNA te isoleren, te knippen, te scheiden en te blotten en de blot vervolgens te hybridiseren met het gelabeld Ac-element als probe, kan de plaats van het transposon in het plant-DNA achterhaald worden. Rondom de plaats van de transposon is het gezochte gen gesitueerd. Een dergelijk gen wordt dan ingebracht in een mutant die deficiënt is voor die eigenschap. Aldus kan ondubbelzinnig vastgesteld worden dat we hier te maken hebben met een gen coderend voor die eigenschap. Ook transposon tagging kent zijn beperkingen. Ook hier kan in principe alleen gezocht worden naar monogene eigenschappen die dominant zijn en fenotypisch duidelijk herkenbaar. Bovendien is het belangrijk dat het transposon dicht in de buurt van het gen wordt.

## 5. Geschikt maken van genen voor transformatie

Als je eenmaal een gen hebt gevonden en dat uit een donor geknipt dan kun je het niet zomaar in een ander organisme stoppen. De informatie mag dan eventueel wel bruikbaar zijn maar de cassette past niet. Net zomin als je een cassettebandje in een videorecorder kan doen kun je zomaar vreemd DNA in een recipiënt (ontvangend organisme) stoppen. Daarvoor moeten een aantal stappen worden doorlopen. Het gen moet worden vermenigvuldigd zodat er veel kopien van zijn, vervolgens moet de gencassette worden aangepast aan de recipient en dan moet het zonodig nog aangepast worden aan de manier van transformeren. en dan moet het weer worden vermenigvuldigd.

### 5.1. Het gen in de omgeving van de cel.

Toch wil ik eerst nog even stilstaan bij het functioneren van een gen in zijn omgeving. Een gen kan volgens het centrale dogma DNA-RNA-eiwit zelf niets doen. Het kan alleen worden geactiveerd, het ontrolt zich, wordt afgelezen en uiteindelijk rolt er een aantal van dezelfde eiwitten uit. 80-90% van de eiwitten heeft in het organisme de rol van enzym. Een enzym is een katalysator die een reactie in de cel mogelijk maakt. Het kan een substraat omzetten in een product door er iets aan vast te koppelen of juist iets af te knippen. Dat substraat moet er al zijn en met het product, dat meestal het substraat is van een volgende reactie, moet het organisme iets kunnen. Zomaar in een stap een nieuw product maken dat voor die tijd nog niet aanwezig was is een toevalstreffer. Het maken van een echt anders nieuw product vergt meestal een simpel en algemeen substraat en een stuk of 6, 7 stappen van omzettingen met behulp van enzymen om zo'n product te maken. Als de enzymen er nog niet zijn dan moeten er dus evenveel genen worden ingebracht en tot expressie komen om dat mogelijk te maken. We kunnen nu per transformatie 2 á 3 genen tegelijk overbrengen. Dat houdt voorlopig nog in dat genetische modificatie alleen maar met succes mogelijk is in een beperkt aantal gevallen. Hoe meer genen er worden ingebracht hoe eerder een organisme "het door krijgt" en het vreemde spul zo snel mogelijk uit het DNA verwijderd of op slot zet.

### 5.2. Vermenigvuldigen van het gen

Als een gen niet erg groot is is het mogelijk om een sequentie met daarin een compleet gen via PCR te vermenigvuldigen. Dat is de simpelste manier. De andere, meer gepracticeerde mogelijkheid, is om de sequentie in een plasmide te plaatsen en die plasmide door een bacterie te laten opnemen. De bacterie wordt daarna op kweek gezet en met zijn eigen vermenigvuldiging wordt ook het gewenste DNA vermenigvuldigd. Een plasmide is een stukje cirkelvormig DNA dat bij diverse bacteriesoorten voorkomt en dat geen deel uit maakt van het kern-DNA. Een plasmide kan ook kunstmatig gemaakt worden en dan worden voorzien van een aantal genen wat verdere behandeling makkelijker maakt. Bijvoorbeeld: Hoe weet je dat je kweekje dat je start nu juist de bacteriën zijn met het gewenste gen? Meestal groeien wilde bacteriën veel sneller en daarmee overwoekeren ze die ene of die paar bacteriën met de gewenste genen. Als je nu op het plasmide waar je toch al dat vreemde stukje inzet, ook een gen plaatst met een vorm van antibioticumresistentie, dan kun je de bacteriën kweken op een voedingsbodem met een beetje antibioticum waardoor veel bacteriën al



bij voorbaat de kans wordt ontnomen om de gewenste te overgroeien.

### 5.3. Aanpassen van het gen aan de recipiënt en de transformatiemethode

Tot nu toe wordt veel gebruik gemaakt van genen die afkomstig zijn uit bacteriën. Dat is makkelijker want bacteriën DNA bevat geen niet coderende stukken (introns) omdat een bacterie zijn RNA niet kan splicen. Je kunt ook van te voren even kijken (in een bacterie) of het gen doet wat het moet doen, of er wel wordt gewerkt met een voorkomend substraat en of het product wel effectief is. Het enige wat je dan niet goed kan vaststellen is of een plant of een ander donor-organisme met het DNA wel raad weet. Maar daar kom je vanzelf later achter. Een sequence is ook niet zomaar actief. Er moet een construct van worden gemaakt. Onder een construct wordt een veelheid van mogelijkheden van combinatie van genen, promotor, en andere 'regulatory sequences' verstaan. Deze moeten het mogelijk maken dat een bepaald gen in een gastheer aanwezig blijft, geïntegreerd wordt in eigen DNA en tot expressie komt. Daarbij kunnen ook DNA-sequenties betrokken zijn die met de overdracht door en aanwezigheid in een vector te maken hebben. Er zijn allerlei typen sequenties te onderscheiden. Ik houd het maar bij een eenvoudige driedeling.

#### 5.3.1. Promotoren

Meestal wordt er gebruik gemaakt van constitutionele promotoren, promotoren die altijd "aan" staan. Een van die promotoren is CaMV 35S uit Bloemkoolmozaiekvirus. Het is namelijk een van de weinige plantenvirussen die een dsDNA genoom heeft. Bij plantenvirussen is een ssRNA genoom normaal. De laatste tijd is er wat vraag gekomen naar andere promotoren, vooral om wat meer inzicht te krijgen in de functie en de activiteit van enzymen in de ontwikkeling van de plant. Een andere reden is dat het niet altijd nodig is dat een genproduct in alle stadia van de plant en in alle cellen aanwezig is. Het zou bijvoorbeeld handig zijn als genen die voor resistentie tegen emelten coderen alleen onder de grond "aan" staan. En zo zijn er nog wel meer te bedenken. Het is voor de hand liggend dat zo'n promotor dan gekoppeld wordt met een reporter gen om het te controleren. Ook het gen voor het veranderen van bloemkleur hoeft alleen maar tot expressie te komen in de bloemknoppen. Bij het inbrengen van manlijke steriliteit heeft men gebruik gemaakt van tapetum specific promotors. Het tapetum is het laagje cellen dat de binnenkant van een helmhokje bekleedt en voor de voeding van de groeiende pollenkorrels zorgt. Een aantal voordelen van het gebruik van deze promotor (in combinatie met het RNA afbrekende barnase) zijn:

1. het werkt alleen in het tapetum
2. het beïnvloedt alleen de functie van het er aan geplakte gen
3. het kan als promotor van een anti-sense gen dienen
4. het heeft geen invloed op de hormoon balans
5. je krijgt meeldraadloze mutanten

Een 'inducible' promoter is bijv die van het Cab gen produkt. Deze schakelt aan als er licht op valt.

#### 5.3.2. Operanten

Een operant is een stuk DNA dat als één geheel wordt afgelezen. De indruk bestaat dat het een (gedeelte van een) lus van het DNA is die begrensd wordt door twee MAR's (Matrix Associated Regions). Die MAR's binden het DNA aan de eiwitmatrix. De consequentie daarvan is onder andere dat door de plaats van insertie in het DNA het expressie niveau wordt bepaald. Als je aan je te introduceren DNA aan de linker en rechterborder een MAR inbouwt dat is de kans dat het wordt afgelezen groter. Die MAR's zijn stukjes DNA van ongeveer 3 kB en ze zijn niet erg specifiek voor een organisme. Uit onderzoek waarbij gebruik gemaakt wordt van MAR's afkomstig uit kippe-DNA blijkt bovendien dat een grotere afstand tussen de MAR's een grotere expressie van het construct tot gevolg heeft. Aan de andere kant geeft een kleinere lus ook weer een grotere genactiviteit te zien. De optimale grootte blijkt zo tussen de (5-) 10 tot 300 (-400) kB te liggen.

### 5.3.3. Markers

Een groep sequenties die erg veel aandacht trekt. Het is dan ook een erg belangrijke groep. Deze bepalen op welke methode je de getransformeerde plantendelen kunt selecteren van de niet getransformeerde.

#### 5.3.3.1. Reporter Genen

Het feit dat een cel getransformeerd is, is 'nawijsbaar'. Een reporter gen wordt gebruikt om te koppelen aan een gen van de plant om te kijken wanneer en in welke mate een bepaald gen tot expressie komt. Het is een gen zonder promotor, dus je kunt er ook de werking van promotors mee bestuderen. Het zorgt er dus voor dat je ziet wanneer een bepaald gen "aan" gaat. Het moet dus een enzymatische activiteit hebben die of niet in de plant voorkomt, of daarvan duidelijk onderscheidbaar is en goed kwantitatief en kwalitatief te meten is. Bovendien moeten ze zowel genetisch als biochemisch gekarakteriseerd zijn. Ze moeten een expressie hebben die niet noemenswaardig fluctueert onder variatie van omstandigheden. Het meest gebruikte gen is het B-glucuronidase(GUS)-gen. Na toevoeging van substraat aan het medium zal er in de cel een blauwe kleur ontstaan doordat het substraat door GUS wordt omgezet. Het probleem bij deze methode is dat in sommige gevallen wat GUS in de niet-getransformeerde cellen aanwezig is, zodat blauwe cellen onterecht als transformant bestempeld worden. Daarnaast hebben we te maken met het toxisch zijn van GUS voor de cel; getransformeerde cellen kunnen dus niet geregenereerd worden. Het is alleen een controle of de methodiek in zijn totaliteit zou kunnen werken.

Ze worden onder andere gebruikt om onderscheid te maken tussen individuen uit enzymfamilies.

Een paar voorbeelden zijn:

- Octopine synthase (OCS)
- Chlooramfenicol transferase (CAT)
- Neomycine fosfotransferase II (NPTII)
- B- Galactosidase (B-gal of LacZ)
- S- Glucoronidase (GUS)
- Luciferase uit vuurvlieg (LUC)

#### 5.3.3.2. Selectable en screenable markers

Selectable en vooral de screenable markers lijken er erg veel op reporter genen maar ze kunnen ook van een andere aard zijn. De bedoeling van deze markers is niet dat het gen product direct kan worden aangetoond maar dat de aanwezigheid van het gen in de getransformeerde cellen de mogelijkheid van die cel bepaald om in de selecterende omstandigheden uit te groeien. De eerste groep is die van de genen die resistentie tegen antibiotica geven. Veel gebruikt zijn daarbij het CAT-gen en het NPT II-gen die resistenties geven tegen resp. chloramfenicol en kanamycine. Door deze stoffen aan het medium waarop de cellen groeien toe te voegen, worden de overlevende cellen als transformanten geselecteerd. Een probleem hierbij is de juiste concentratie van het antibioticum in het medium; een te lage concentratie levert wellicht niet-getransformeerde overlevenden op, een te hoge elimineert bepaalde transformanten. Vooral monocotylen staan erom bekend dat ze een vrij hoge tolerantie voor kanamycine hebben. Daarna is er nog het verschijnsel "cross feeding". Daarmee wordt bedoeld dat getransformeerde planten het enzym dat het antibioticum afbreekt ook naar de omgeving laten diffunderen waardoor niet getransformeerde planten daarvan kunnen meegenieten. Ze worden zo 'ontsnappers' aan de werking van antibioticum.

Momenteel wordt nog een andere groep merkers veel gebruikt: de herbicide-resistentiegenen. Vooral ook voor de monocotylen om de hierboven vermelde redenen. De belangrijkste vertegenwoordiger van deze groep is het fosfinotricine acetyltransferase (PAT)-gen. Selectie is eenvoudig: het herbicide wordt in een

bepaalde concentratie aan het medium toegevoegd. De problemen die geschetst werden bij het gebruik van de antibioticum-resistentiegenen zijn hier minder groot.

Nog een voorbeeld: Hormoon synthese genen uit T-DNA. Bijv gen 2 van het Ti-plasmide kan een goede marker zijn. Deze verzorgt de omzetting van IAM in IAA. Het is te controleren door aan het medium geen IAA maar IAM toe te voegen.

#### 5.4. Vermenigvuldigen van het gen.

Als alle aanpassingen gemaakt zijn is het gen klaar en kan het worden vermeerderd. Ook daar wordt meestal een plasmide voor gebruikt, tenminste als het met een bacterie wordt overgebracht. Andere methoden zoals transformatie met naakt DNA vereisen een bacterie vermenigvuldiging en vervolgens een oogst van het gen (weer knippen uit de bacterie) voordat het kan worden overgezet. In het gedeelte over transformeren wordt daar her en der wel weer even op teruggekomen.

### 6. Transformeren van planten

In dit hoofdstuk zal worden geprobeerd een overzicht te geven van de methoden van genetische modificatie van planten, die worden gekenmerkt door het overbrengen van een werkend stukje DNA van het ene organisme naar een ander. Over het algemeen bestaat de indruk dat dat zo onnatuurlijk is dat we ervoor moeten waken dat dat alleen gebeurt onder strikte veiligheidseisen. Bacteriën zijn echter in staat, zeker met een beetje hulp, om DNA uit hun omgeving op te nemen en dat te incorporeren in hun eigen DNA. Dat dat ook bij planten kan opgaan wordt verteld in de volgende anekdote. In het lab van het Max-Planck Instituut in Göttingen (D) is in de 80-er jaren van de vorige eeuw een experiment met tarwe gedaan. Korrels van tarwe werden te kiemen gelegd in een vochtige omgeving waar DNA van muizen aan was toegevoegd. Tijdens de kieming werd het vocht met het DNA opgenomen en in het DNA van de korrels in de aren die er later uitgroeiden kon de aanwezigheid van stukjes van muizen DNA worden aangetoond. De plant had het door alle celdelingen heen meegenomen tot in de nakomelingen. Dat ontlokte de onderzoeker de uitspraak: "Als je niet wilt dat er DNA ontsnapt en in de natuur terecht komt dat moet je ook het begraven verbieden, want daardoor komt menselijk DNA in bacteriën terecht.

Ook in de natuur vindt het proces van (gedwongen) opname van DNA van het ene organisme in een andere plaats. Denk maar aan virussen die hun DNA laten vermeerderen door de gastheer, of bacteriën die planten aanzetten tot het vormen van tumoren doordat de plant gedwongen wordt DNA van het pathogeen tot expressie te brengen. Je kunt daar gebruik van maken door deze organismen te voorzien van het gewenste gen en dat over te laten brengen in het gewenste doelorganisme. Zo'n bacterie of virus wordt dan een vector genoemd. In dit dictaat beperken we ons tot de overdracht van genen naar plantencellen. Dit kan op een aantal verschillende niveaus plaatsvinden. Dit wordt beschreven in de volgende paragraaf. Ook zonder vector kan er genetisch materiaal aan organismen worden toegevoegd. Daarover zal het gaan in de daaropvolgende paragraaf.

#### 6.1. Niveau's van genoverdracht

Bij modificatie van planten kun je een hele kern overbrengen, maar je kunt je ook beperken tot één of enkele genen. Genen kunnen worden overgedragen op:

##### 6.1.1. Celniveau

Cellen (dikwijls afkomstig van verschillende plantensoorten) worden met elkaar gefuseerd. Dit wordt somatische hybridisatie genoemd. Bij deze techniek versmelten zowel de cytoplasma's als de kernen van beide cellen met elkaar. Alle genen - dus ook de niet-gewenste genen - worden overgebracht naar de plant. Vele terugkruisingen zijn dan noodzakelijk om de ongewenste eigenschappen er weer uit te krijgen. Een uitwerking van deze techniek wordt gegeven bij het gedeelte weefselkweek

##### 6.1.2 Organelniveau

Ook hier worden cellen (protoplasten eigenlijk) met elkaar gefuseerd. Vooraf is echter bij één van de fusiepartners de kern verwijderd of geheel of gedeeltelijk buiten werking gesteld.

We spreken hier van somatische cybridisatie. In wezen worden alleen de cytoplasma's en de zich daarin bevindende organellen met een cel versmolten. Met deze methode kunnen genen gesitueerd op mitochondriën en chloroplasten worden overgedragen.

#### 6.1.3. Kernniveau

Zoals hierboven al genoemd kan de kern uit een cel worden verwijderd. Dat kan onder andere door centrifugering. De kern wordt omgeven door een stukje celmembraan (een karyoplast) en kan in die vorm worden ingezet bij een celfusie. In principe is ook een combinatie cytoplast-karyoplast mogelijk.

#### 6.1.4. Chromosoomniveau

Nu worden geïsoleerde chromosomen ingebracht in de protoplast. Dit gebeurt met de techniek van de micro-injectie. De chromosomen die men wil inbrengen worden veelal geïsoleerd met behulp van een doorstroomcytometer.

Een andere benadering is die van de microkernen. Door plantencellen te behandelen met een herbicide wordt de normale structuur van de cel verstoord. De chromosomen die normaal gebundeld liggen in de celkern raken hierdoor verspreid over de hele cel. Na enige tijd vormen de afzonderlijke chromosomen ieder een kleine kern. Deze microkernen laat men fuseren met protoplasten.

#### 6.1.5. Genniveau

De meest ideale situatie is feitelijk de overdracht van alleen de gewenste eigenschap.

Je hebt dan geen last van ongewenste neveneffecten. Deze vorm van genetische modificatie op genniveau wordt ook wel monofactoriële transformatie genoemd. Zij kan worden toegepast door directe overdracht naar de plantencel of door gebruik te maken van vectoren.

Om één eigenschap over te brengen is het wel nodig dat je de plaats kent waarop die eigenschap ligt en dat je dat gen kunt isoleren uit het geheel van de genetische informatie. De speciale technieken die hiervoor nodig zijn, zijn in een eerdere paragraaf besproken.

In de rest van dit verhaal zullen wij ons concentreren op de genetische modificatie op genniveau.

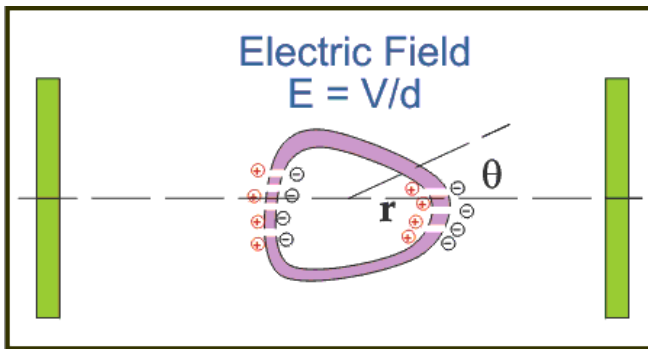
### 6.2. Genoverdracht zonder vector

Er zijn welhaast talloze manieren uitgeprobeerd om DNA in de cellen te krijgen. De belangrijkste waarbij geen gebruik gemaakt wordt van een vector zullen hier worden genoemd.

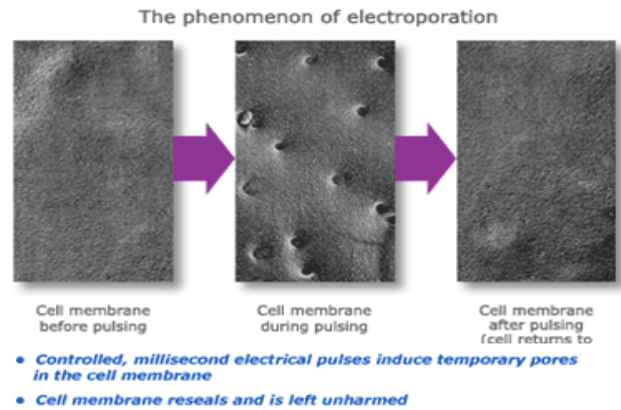
#### 6.2.1. Opname van 'naakt' DNA

Er is verscheidene keren geprobeerd om DNA, dat zich in suspensie bevindt, te laten opnemen door cellen, weefsels, pollen e.d. De successen zijn tot nu toe beperkt, ook wanneer gebruik gemaakt werd van hulpmiddelen als electroporatie en stoffen als PolyEthyleen Glycol (PEG).

Krens et al. (1980) brachten protoplasten samen met Ti-plasmiden van *Agrobacterium tumefaciens* en deze werden in het bijzijn van PEG/Ca<sup>2+</sup> gefuseerd. Om een beter fusieresultaat te krijgen is het belangrijk om de Mg<sup>2+</sup> en de PEG concentratie te optimaliseren en ook de protoplasten goed te wassen. De techniek is verbeterd en meer gericht door Pazskowski. Uiteindelijk gelukte het hem een expressie te krijgen van 1 tot 5% te krijgen ( $1-5 \times 10^{-2}$ ) in plaats van  $1 \times 10^{-5}$  per ontwikkeld microcallus. Met electroporatie zijn ook goede, misschien wel betere, resultaten te behalen. Meestal wordt gekozen voor een stoot van hoge spanning (1-1,5 kV) met korte tijd, maar lagere spanning met langere tijd is ook goed mogelijk. Voor het overtuigen van onwillige bacteriën is deze techniek ook goed bruikbaar. Voordeel van deze techniek: Inbrengen van allerlei niet soortgebonden vormen van DNA is mogelijk, ook bijvoorbeeld constructen, stukken genoom e.d.

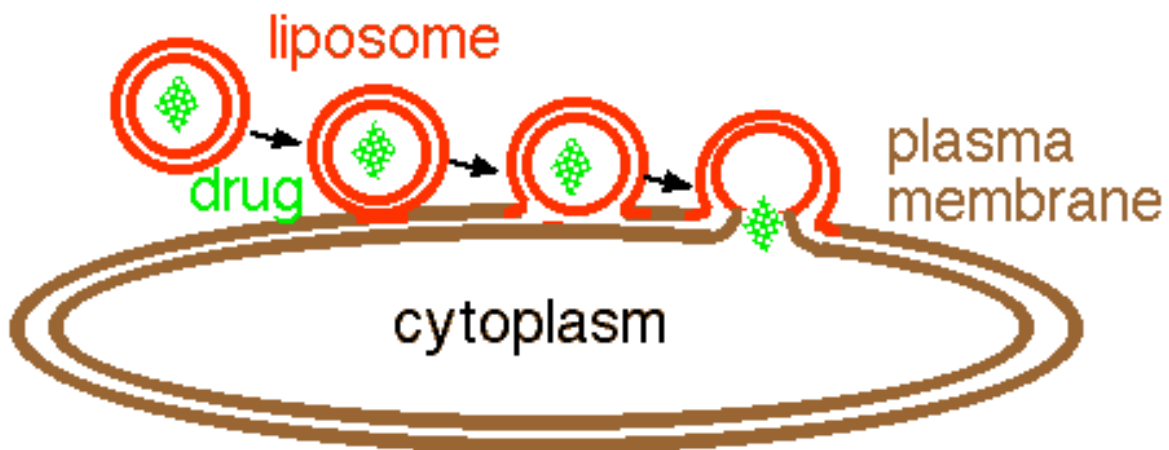


Afbeelding 31: Electroporatie in grote lijnen. Tussen de kathode (links en de anode (rechts) wordt een sterk elektrisch veld aangelegd. Het membraan gaat dan gaatjes vertonen en DNA fragmenten kunnen de cel in. (bron: <http://www.cytopulse.com/pulseagile.html>)



Afbeelding 32: Het effect van electroporatie op het celmembraan (bron: <http://www.inovio.com/technology/howelectroporationworks.htm>)

Beter gaat het wanneer gewerkt wordt met protoplasten. Ook dan is het vaak nuttig om gebruik te maken van bovenbeschreven hulpmiddelen. DNA wordt soms ook verpakt in fosfolipideblaasjes, de zgn. liposomen. Deze laat men dan versmelten met de protoplasten.



Afbeelding 33: Een liposoom bevat DNA en brengt het in de cel. Het membraan rond het DNA fuseert met het membraan van het gast-organisme, waardoor het DNA in de cel komt. (bron: <http://www.bio.davidson.edu/courses/GENOMICS/method/liposome.html>)

### 6.2.2. Microinjectie

Met behulp van een zeer dunne injectienaald kan een bepaalde hoeveelheid DNA vrij nauwkeurig in cellen en zelfs in de kernen daarvan ingebracht worden. De methode vraagt nogal wat vaardigheid, maar kan in principe bij elke plantensoort worden gebruikt waarbij de cellen intact blijven. De methode wordt dikwijls toegepast op jonge embryo's.

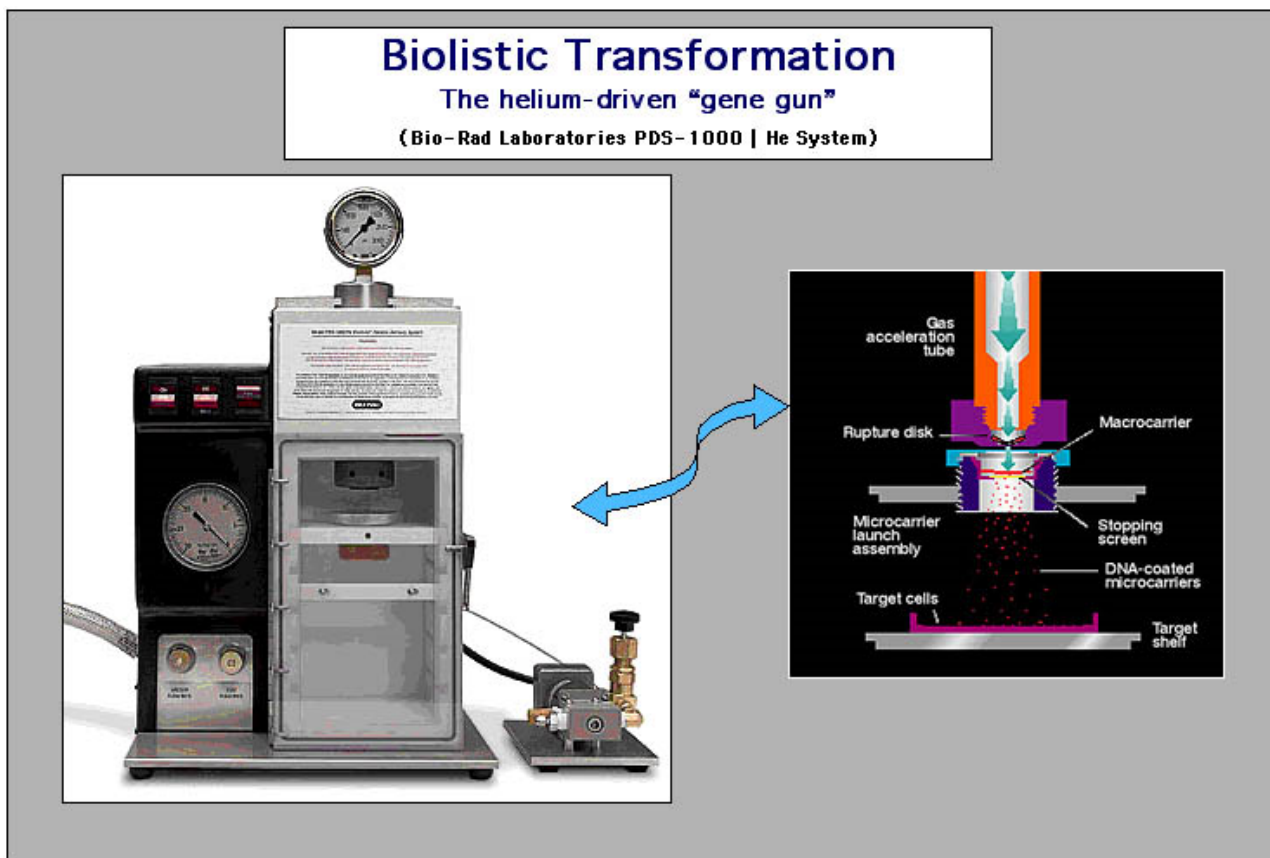


Afbeelding 34: Mico-injectie (bron: <http://www.ohsu.edu/research/transgenics/slide>)

<http://www.ohsu.edu/research/transgenics/slide>

### 6.2.3. 'Partiele gun' methode

Deze methode die ook wel microprojectile bombardment en shot gun klonering wordt genoemd is een Amerikaanse vinding (Hoe kan het ook anders?) Voor het eerst beschreven door Sanford in 1987. Hij gebruikte tungsten korreltjes van  $4\mu\text{m}$  groot die werden gecoat met DNA (liefst een construct). Deze werden via luchtdruk (windbuks) afgeschoten op de epidermiscellen van een ui. De deeltjes schieten er door heen en het DNA blijft achter. Het DNA werd door een paar cellen tot expressie gebracht. Optimalisering heeft in verschillende richtingen plaats gevonden. Als drijvende kracht werd naast van luchtdruk ook van explosieve lading gebruikt. Ook elektrische ontladingen zijn ingezet.



Afbeelding 35: Apparatuur en principe van gas-gedreven particle gun transformatie (bron: [http://silver-server.dur.ac.uk/Teaching/Plant\\_Genetic\\_Engineering/3\\_Particle\\_Bombardment/pages/02\\_BioRad\\_Gene\\_Gun.htm](http://silver-server.dur.ac.uk/Teaching/Plant_Genetic_Engineering/3_Particle_Bombardment/pages/02_BioRad_Gene_Gun.htm))

De particles werden diverser. Nu wordt er gebruik gemaakt van 1-1,2  $\mu\text{m}$  tungsten, goud, platina of palladium deeltjes. Er is ook ge-experimenteerd met een 2-traps projectiel. Een 'macroprojectiel' van poly-ethyleen met een erg hoog molecuulgewicht werd gebruikt als drager voor de kleine, met DNA gecoate projectielen. Het aantal herhalingen bleek belangrijk. 2 - 3 keer "schieten" was belangrijk beter dan 1 keer, terwijl de schade aan de celen niet onaanvaardbaar groter werd. De cellen zelf moesten gezond zijn en in staat om te delen. Het best bevielen losse cellen van jonge plantjes die in-vitro waren opgekweekt. Ook waren er goede resultaten bij gebruik van calli, pollenkorrels, tabaks bladeren en sojabonen meristemen. Er moesten ook niet meer dan 100 mg cellen per Petri-schaal aanwezig zijn. De stoffen in de coating blijken ook belangrijk te zijn. Calciumchloride, Calcium-waterstof-fosfaat en polyamines verhogen de slagingskansen. Vooral spermine heeft een groot effect.

De calli die het marker-gen tot expressie brengen vererven dat lang niet altijd volgens de wetten van Mendel. In die gevallen waar dat niet zo is zijn er meestal chimaere regeneranten in het spel. Waar het wel de wetten van Mendel volgde is er sprake van nieuwe stabiele expressie.

De calli die het marker-gen tot expressie brengen vererven dat lang niet altijd volgens de wetten van Mendel. In die gevallen waar dat niet zo is zijn er meestal chimaere regeneranten in het spel. Waar het wel de wetten van Mendel volgde is er sprake van nieuwe stabiele expressie.

#### 6.2.4. Microlaser techniek

Met een laserstraal is het in principe mogelijk gaatjes te branden in wanden van pollen en van cellen. Tevens is het mogelijk gedurende korte tijd openingen te creëren in membranen. Door die openingen zou dan het DNA naar binnen kunnen. Dit lijkt inderdaad in sommige gevallen te lukken; bewijs echter dat er sprake is van een stabiele transformatie in het nageslacht van het pollen of van de cellen is nog niet geleverd.

#### 6.3. Overdracht m.b.v. vectoren

Er zijn voor planten twee groepen vectoren in gebruik. De eerste groep wordt gevormd door de Ti-plasmiden afkomstig van *Agrobacterium tumefaciens* en de Ri-plasmiden afkomstig van *A. rhizogenes*. De tweede groep bestaat uit plantenvirussen zoals de gemini- en caulimovirussen.

### 6.3.1. Ti- en Ri- plasmiden als vector

*Agrobacterium tumefaciens* is een bodembacterie die de kroongalziekte veroorzaakt bij vele soorten dicotyle planten. Tumoren ontstaan wanneer bacteriën de plant zijn binnengedrongen door een wond op de stengel. De bacterie is in het bezit van een groot plasmide (200 kbp) dat het Ti-plasmide genoemd wordt (Ti = 'tumor inducing'). Op dit plasmide liggen verschillende genen die te maken hebben met het infectieproces.

*Agrobacterium rhizogenes* is een bodembacterie die de zogenaamde 'hairy-root disease' veroorzaakt, eveneens bij dicotyle planten. Het wortelstelsel van een aangetaste plant vertoont een borstelig uiterlijk veroorzaakt door de aanwezigheid van vele haarwortels.

Analoog aan *A. tumefaciens* bezit *A. rhizogenes* een Ri- (Root-inducing)plasmide dat eveneens nauw betrokken is bij het infectieproces.

Beide plasmiden worden als vector gebruikt omdat er sprake is van een natuurlijke genetische 'manipulatie'; er vindt inbouw in het chromosoom van de gastheercel plaats van een gedeelte van het plasmide (het T-gedeelte, T = 'transfer'). Het Ri-plasmide wordt o.a. gebruikt om planten te transformeren met het doel een verhoogde productie van secundaire metabolieten in de wortels te verkrijgen. Maar ook lijkt het mogelijk om een betere beworteling te krijgen (*Rosa canina*, appelonderstam M9).

Vectoren gebaseerd op het Ti-plasmide zijn echter het meest populair. Om deze reden én omdat de beide systemen (Ri- en Ti-plasmiden) veel op elkaar lijken, zullen wij ons beperken tot het nader analyseren van het Ti-plasmide van *A. tumefaciens*.

### 7.4.2 *Agrobacterium tumefaciens*

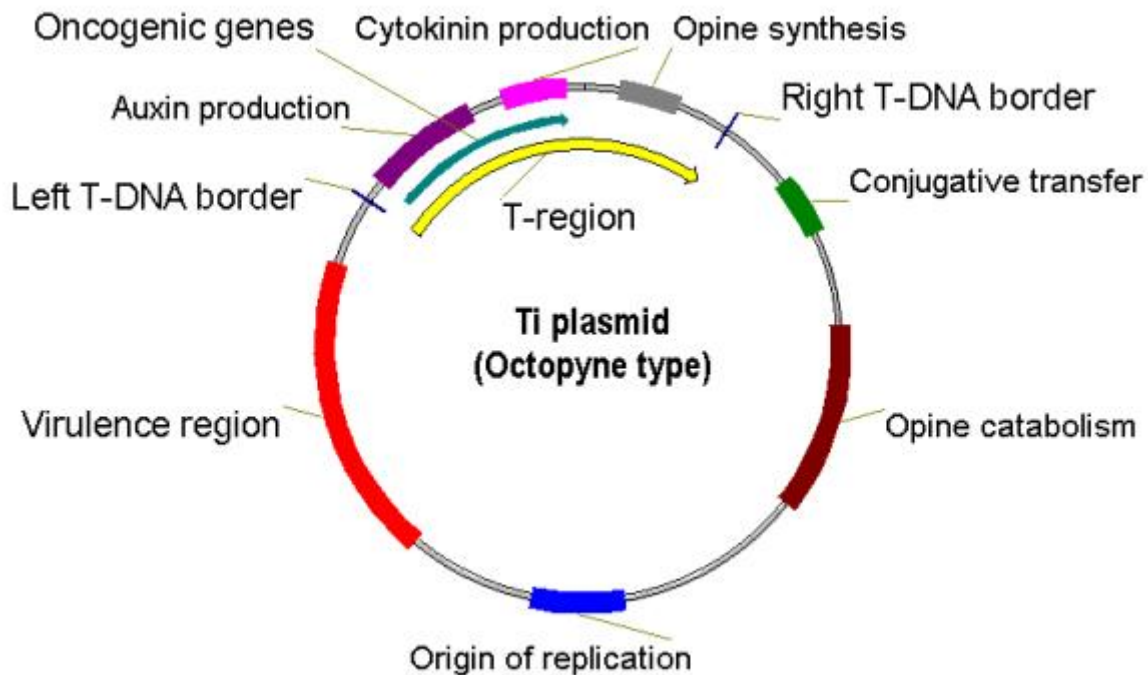
De wijze waarop de infectie met *A. tumefaciens* plaatsvindt is als volgt. Nadat de bacterie de wond is binnengedrongen hecht hij zich aan de celwand en draagt het Ti-plasmide over aan de cel. De bacterie dringt dus niet zelf de plantencel binnen maar transformeert de cel met het plasmide-DNA. Het T-gebied wordt stabiel ingebouwd in de chromosomen van de tumorcel en komt daarin tot expressie. De figuur geeft het proces van genetische modificatie in detail.

De bacterie bezit naast het veel grotere chromosomaal-DNA het Ti-plasmide waarop in het T-gebied 8 genen liggen die o.a. coderen voor opines en voor de hormonen auxine en cytokinine. Wanneer het T-DNA geïntegreerd raakt in het chromosoom van de plantencel, worden deze genen 'aangezet'.

De opines die gevormd worden, worden gebruikt door de bacterie. Allereerst induceren opines conjugatie van bacteriën, en in de tweede plaats dienen ze als voedselbron voor de bacterie (C en N). Opines zijn laag-moleculaire aminozuurderivaten. Er zijn verschillende soorten opines, bijv. octopine, nopaline en agropine. Deze stoffen zijn alleen van nut voor de bacterie, in gezond plantweefsel komen ze niet voor. Ze kunnen daarom als 'merkers' gebruikt worden; is er sprake van opine-synthese, dan is de plantencel getransformeerd.



Naast synthese van opines, is er ook sprake van synthese van auxinen en cytokininen. Deze fytohormonen veroorzaken het tumorkarakter van de getransformeerde cel.



Afbeelding 36: Een overzicht van een Ti-plasmide (bron: <http://www.patentlens.net/daisy/AgroTran/g1/843.html>)

Alvorens het Ti-plasmide als vector te kunnen toepassen, moet eerst gekeken worden naar de bouw van het plasmide. Het Ti-plasmide bestaat uit twee gedeelten (zie fig); een gedeelte voor tumorinductie, bestaande uit het T-DNA en het virulentie-gebied (vir-gebied) en een gedeelte voor degradatie van de geproduceerde opines om ze als voedsel te kunnen gebruiken. In dit gedeelte ligt ook een aantal genen dat betrokken is bij replicatie, conjugatie en incompatibiliteit van het plasmide. Het T-gebied en het vir-gebied worden nauwkeuriger bekeken.

#### 7.4.2.1. T-gebied

Het T-gebied is ca. 22 kb groot. In dit gebied liggen de genen voor hormoon-synthese en opine-synthese. Deze genen bevatten bepaalde regulatorische sequenties die nodig zijn voor eukaryotische cellen. Anders gezegd, in het T-DNA van de bacterie komen bepaalde basenvolgorde voor die het mogelijk maken dat prokaryotische genen in eukaryoten tot expressie komen. Naar het type opine dat gesynthetiseerd wordt in de getransformeerde plantencel kunnen we verschillende typen Ti-plasmiden onderscheiden. De belangrijkste zijn: het octopine- en het nopaline-type.

Het T-gebied van het nopaline-plasmide bestaat uit één geheel (fig. 3) en wordt ook in zijn geheel ingebouwd in het plantgenoom. Het octopine-type daarentegen heeft een T-gebied dat uit twee gedeelten bestaat, een TL- en een TR-regio (links en rechts dus). Het TL-gedeelte bevat de onco-genen (i.c. auxine en cytokinine genen) en het gen voor octopine-synthese. Alleen dit gedeelte wordt ingebouwd in het plantgenoom. De

TR-regio bevat genen voor de synthese van andere opines en wordt niet geïntegreerd in het genoom van de plant.

#### 7.4.2.2. Vir-gebied

Zoals gezegd dringen de bacteriën de plant binnen door wonden. Men spreekt hier wel van 'geconditioneerde' cellen. Na binnendringing gaan de bacteriën zich hechten aan de celwand. De genen die een rol spelen bij die aanhechting liggen waarschijnlijk voor een belangrijk deel op het bacterieel chromosoom. De injectie van het plasmide in de plantencel wordt geregeld door genen in het vir-gebied.

De genen in het vir-gebied worden pas actief wanneer de bacterie bepaalde signaal-stoffen van de plant heeft ontvangen.

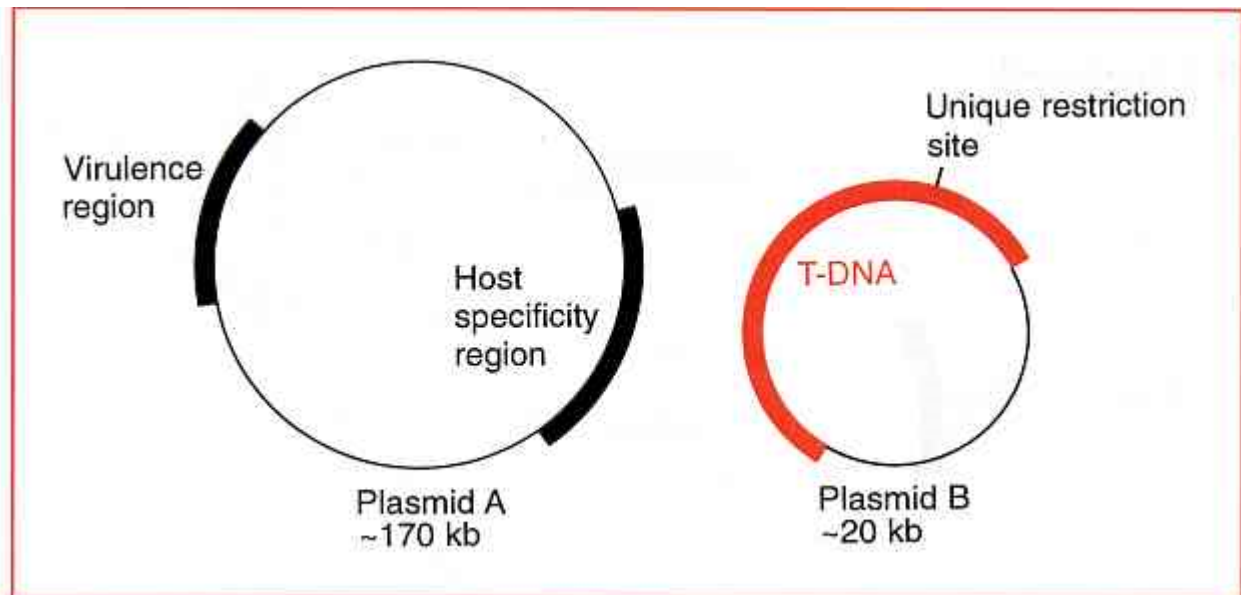
De genen in het vir-gebied zijn betrokken bij het exact uitknippen, overdragen en inbouwen van het T-DNA naar en in het plantgenoom. Ze doen dit echter niet alleen. Ook andere bacterie-eiwitten zijn bij dit precisie-werkje betrokken.

Gezien het feit dat overdracht van DNA op een natuurlijke wijze plaatsvindt, is het niet verwonderlijk dat men in het Ti-plasmide een potentiële plantenvector is gaan zien.

Twee vectorsystemen zijn ontwikkeld: het binaire vectorsysteem en het coïntegratieve systeem.

#### **7.4.3 Binaire vectorsysteem**

Bij dit systeem wordt gebruik gemaakt van een helper-plasmide, die in het bezit is van de vir-functie. Naast dit plasmide is de bacterie, die de plant infecteert, in het bezit van een tweede plasmide. Dit is een klein plasmide met het T-gebied waarin zich een unieke knipplaats voor een restrictie-enzym bevindt.



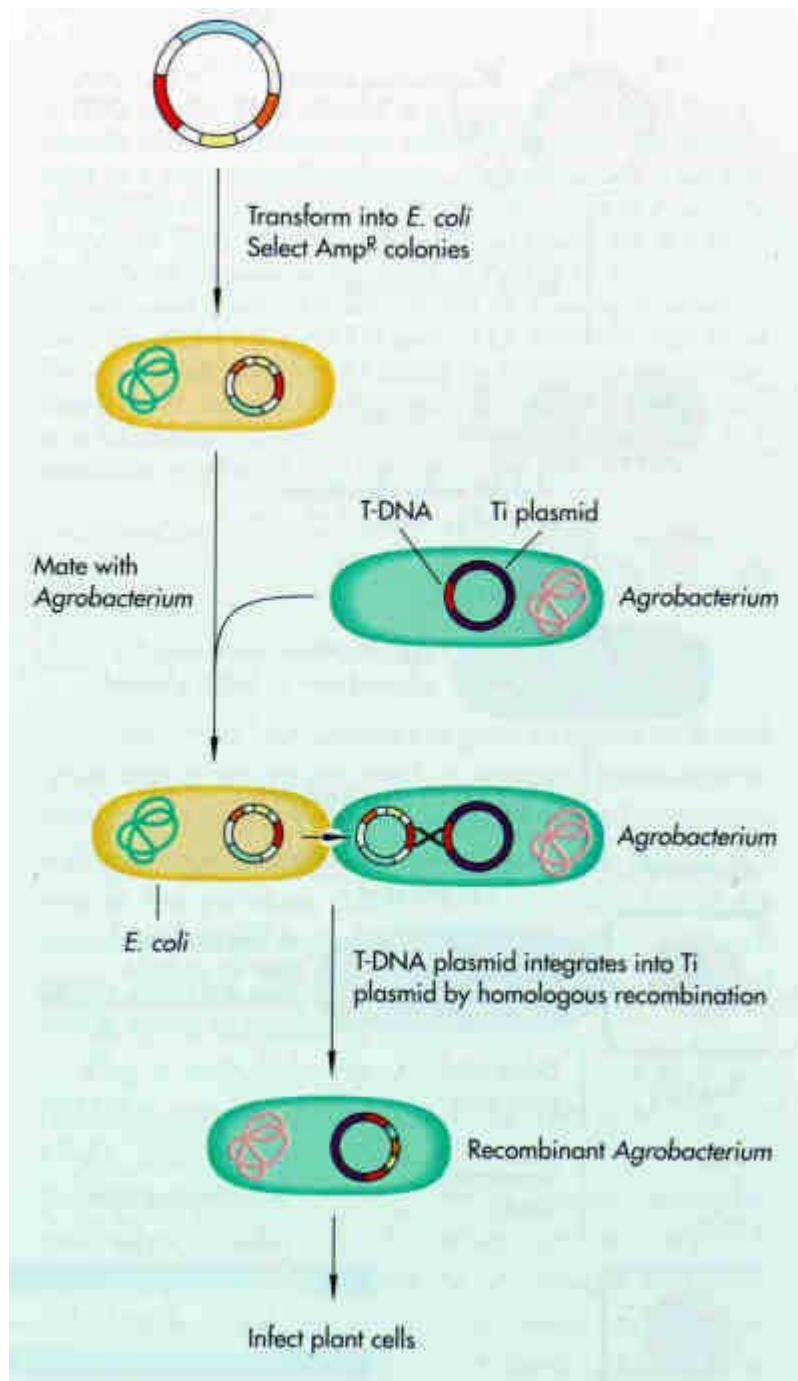
Afbeelding 37: Het binaire vectorsysteem, De benodigde sequenties zijn verspreid over 2 plasmiden (bron: [bioweb.wku.edu/courses/Biol350/CloningVectEuk9/Review.html](http://bioweb.wku.edu/courses/Biol350/CloningVectEuk9/Review.html))

Het T-gebied is aangepast. De tumorgenen en het gen voor de opine-synthese zijn verwijderd en daarvoor zijn in de plaats gekomen een merker-gen en het over te dragen gen. Beide genen zijn voorzien van een promotor die expressie van het gen mogelijk maakt. Veelal wordt gebruik gemaakt van de krachtige 35S-promotor afkomstig van het bloemkoolmozaïekvirus (CaMV). Aan weerszijden van het T-gebied bevinden zich de zogenaamde 'border'sequenties, deze blijken essentieel te zijn voor de integratie in het gastheergenoom.

De merker is van belang om de getransformeerde plantencellen te kunnen selecteren. Veelal is er nog een andere merker aanwezig: een antibioticum-resistentiegen bijvoorbeeld; deze dient voor selectie in bacteriën. Aldus kan geselecteerd worden op het opnemen van het gen in de plasmide. Wanneer een plant aangetast wordt door een *A. tumefaciens* stam in het bezit van de beide bovenbeschreven plasmiden, zal m.b.v. het vir-gebied van het ene plasmide, het T-gebied (met daarin het donor-DNA) van het andere plasmide stabiel geïntegreerd worden in het plantgenoom.

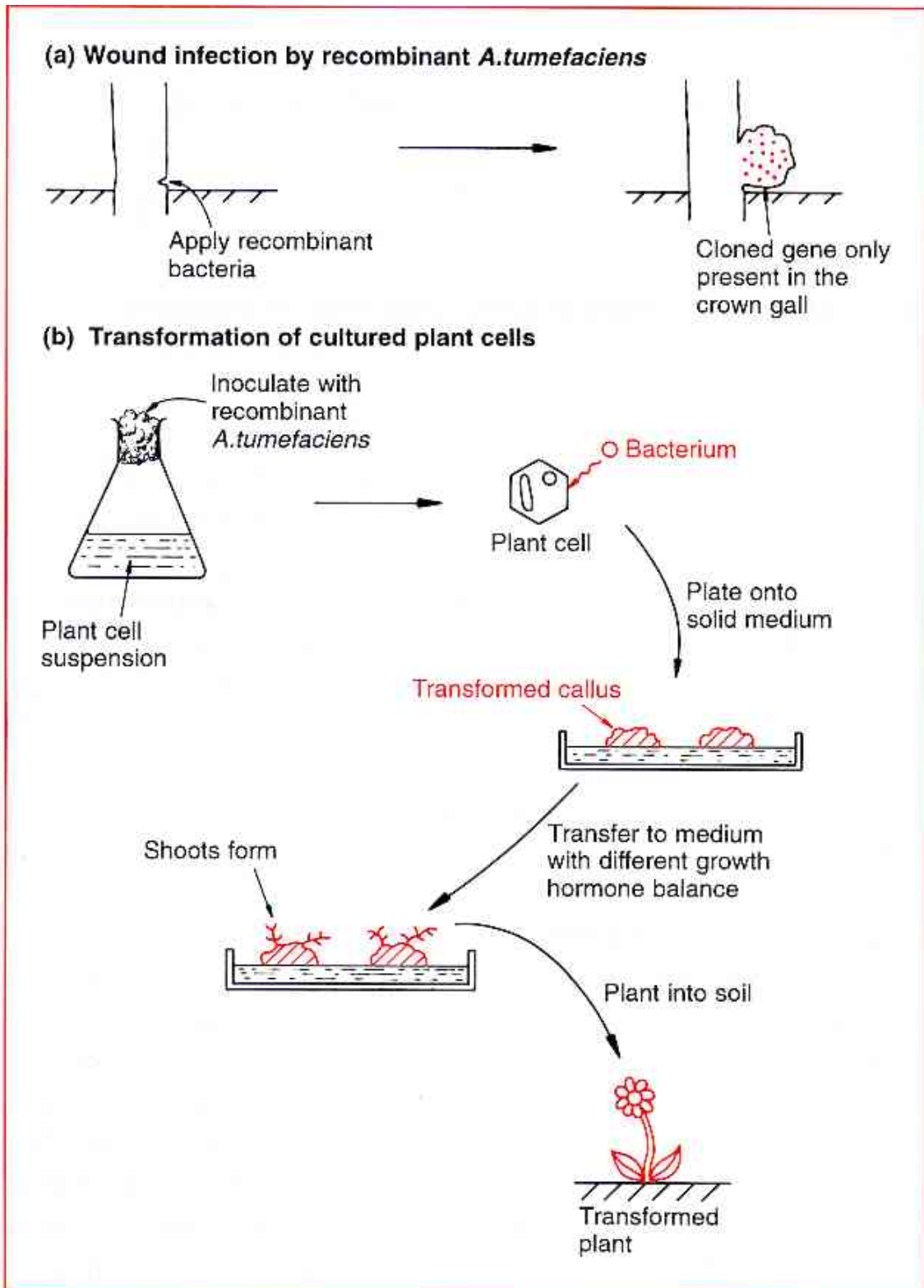
#### 7.4.4 Coïntegratieve systeem

Ook bij dit systeem wordt in eerste instantie gebruik gemaakt van twee plasmiden. Het eerste plasmide is een veel gebruikt pBR-plasmide waaraan het één en ander veranderd is. Het is in het bezit van een klein stukje T-DNA en bovendien is het donor-DNA ingebracht. Dit laatste was eenvoudig omdat het pBR-plasmide klein is en dus unieke knip-plaatsen bezit.



Afbeelding 38: Transformatie volgens de coïntegratieve methode (bron: [http://users.ugent.be/~pdebergh/gen/gen2\\_p03.htm](http://users.ugent.be/~pdebergh/gen/gen2_p03.htm))

Dit pBR-plasmide wordt nu ingebouwd in het T-gebied van een Ti-plasmide (het T-gebied is weer aangepast, de tumor-genen zijn verwijderd) d.m.v. homologe recombinitie.



Afbeelding 39: Overzicht van de transformatie met *Agrobacterium tumefaciens* (bron: <http://bioweb.wku.edu/courses/biol350/CloningVectEuk9/Review.html>)

Na infectie zal het complete T-DNA inclusief het nieuwe gen, in het plantgenoom worden geïntegreerd.

## 7.5 Virussen als vector

De beperking van *A. tumefaciens* als vector is gelegen in het feit dat de bacterie alleen dicotyle planten aantast. Vele belangrijke landbouwgewassen zoals rijst, granen, grassen en mais zijn monocotyl. Incidenteel is gevonden dat ook naar monocotylen genen overgedragen worden door *Agrobacterium*, op grote schaal lijkt dat echter niet te gebeuren. Vandaar dat er in het verleden nogal eens gezocht is naar de mogelijkheid andere pathogenen als vector te gebruiken. Veel onderzoek is gedaan naar plantenvirussen en dan met name de virussen die in het bezit zijn van DNA. Dit is niet gebruikelijk. De meeste plantenvirussen bevatten ss-RNA. Toch zijn er twee kleine groepen die wel DNA bevatten: de caulimo-virussen en de gemini-virussen. Op zich kunnen deze virussen wel gebruikt worden maar door aanpassing van *Agrobacterium* transformaties en het alternatief van particle bombardment wordt er van virussen als transformatie-agens in planten, weinig gebruik gemaakt.

## 7.6 Keuze van overdrachtsysteem. selectie en regeneratie

### 7.6.1 Gastheer

Monocotylen worden doorgaans tot de recalcitrante plantensoorten gerekend. In de eerste plaats vanwege de moeilijke regeneratie (uitzonderingen als lelie daargelaten) maar ook vanwege de problemen met transformatie. Bij de meest gebruikte methode van genoverdracht dat is transformatie met *A. tumefaciens* komen deze problemen samen.

Monocotylen worden met dit systeem nauwelijks voorzien van nieuw DNA. Wanneer we het natuurlijke systeem z'n gang laten gaan en we laten de bacterie los op een plant, dan zitten we met het probleem dat slechts enkele cellen (nl. de 'crown gall') worden getransformeerd terwijl de hele plant de nieuwe eigenschap moet hebben.

### 7.6.2 Stabiliteit

Transformatie van planten m.b.v. *Agrobacterium* kan bijv. op het niveau van protoplasten gedaan. Bij de cocultivatiemethode worden plantprotoplasten gedurende een bepaalde tijd tezamen met bacteriën gekweekt. Het blijkt dat in vitro het T-DNA net zo netjes wordt ingebouwd als in vivo. De transformatiefrequentie kan vrij hoog liggen (tot een paar procent).

Zelfs bij een zeer geslaagd transformatie-experiment zijn meer protoplasten niet dan wel getransformeerd. Aangezien regeneratie van planten uit protoplasten dikwijls een lastig karweitje is, is het noodzakelijk de niet-getransformeerde van de getransformeerde protoplasten te onderscheiden. Selectie is dus nodig.

Literatuur:

[Asuka Nishimura, Ikuko Aichi and Makoto Matsuoka \(2007\): A protocol for Agrobacterium-mediated transformation in rice](#) Nature Protocols 1, 2796 - 2802 (2007). doi:10.1038/nprot.2006.469

Niks (2007): Powerpoint voor de cursus 20806 Plantenveredeling, gedeelte selectiemethoden (WUR)

Torres, G.A., S.N. Parentoni, M.A. Lopes and E. Paiva (1997): A search for RFLP markers to identify genes for aluminum tolerance in maize . Braz. J. Genet. 20 (3) sept.1997, online:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84551997000300017&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84551997000300017&lng=pt&nrm=iso) (20-5-2009)

Internet anoniem:

[Brief History of Forensic DNA Typing.](http://www.cstl.nist.gov/strbase/ppt/intro.pdf) <http://www.cstl.nist.gov/strbase/ppt/intro.pdf> (19-05-09)

<http://www.patentlens.net/daisy/AgroTran/g1/843.html>