

Výhody rostlin při genetických manipulacích

- totipotence (protoplasty, kalusy)
- schopnost regenerace (klonování), pěstování ve tkáňových kulturách
- velký počet semen
- krátká generační doba
- asexuální křížení (samosprašnost, homozygotní mutanty)
- biochemické dráhy poskytující průmyslové suroviny a farmaka

Geneticky modelový systém: *Arabidopsis thaliana* (botanická drozofila)

- snadná kultivace, 6 generací za rok
- 10 000 semen
- velikost genomu 8×10^7 bp (6x víc než kvasinka)
- genetická mapa a sekvence genomu
- řada dobře definovaných mutant získaných klasickou genetikou
- snadná T-DNA mutagenéza – vyhledání genů, studium regulace
- **heterologní hybridizace – identifikace genů v kulturních rostlinách**

Způsoby přenosu genů do rostlin

- prostřednictvím vektorů odvozených z Ti- plazmidů *A. tumefaciens*
- elektroporace
- biolistická metoda – nastřelování mikročástic kovů s naadsorbovanou DNA
- mikroinjekce DNA do protoplastů (třípipetová metoda)
- přenos DNA přes lipozomy
- přenos pomocí virových vektorů (přímá infekce nebo agroinfekce)

Plant cell DNA-delivery methods	
Method	Comment
Ti-plasmid-mediated gene transfer	An excellent and highly effective system that is limited to a few kinds of plants
Microprojectile bombardment	Used with a wide range of plants and tissues; easy and inexpensive
Viral vector	Not an effective way to deliver DNA to plant cells
Direct gene transfer into plant protoplasts	Can be used only with plant cell protoplasts that can be regenerated into viable plants
Microinjection	Has limited usefulness because only one cell can be injected at a time; requires the services of a highly skilled individual
Electroporation	Generally limited to plant cell protoplasts that can be regenerated into viable plants
Liposome fusion	Can be used only with plant cell protoplasts that can be regenerated into viable plants

Selektovatelné geny pro rostliny

Umožňují, aby na selektivních mediích přeživaly jen buňky obsahující transgen. Používají se následující:

1. **NPTII (npt)** – rezistence ke kanamycinu (neomycinfosfotransferáza II). Kanamycin lze přidávat do media, nebo jej lze přímo aplikovat na rostliny (v místě kapek vznikají léze).
2. APH IV (hyg) – Chimerický transgen pro rezistenci k hygromycinu (hygromycinfosfotransferáza). Antibiotikum blokuje proteosyntézu (silně toxický i pro člověka).
3. Vzácně – rezistence ke streptomycinu, gentamycinu, bleomycinu a methotrexátu (bakteriální geny).
4. Transgeny **bar a pat** (fosfinotricinacetyltransferáza) ze *Streptomyces* pro rezistenci k herbicidu fosfinotricinu.
5. Transgen pro rezistenci k manoze. Nový systém. U mnoha rostlin je manosa fosforylována enzymem hexokinázou na manosa-6-P, který dále není metabolizován a je silně toxický. Buňky odumírají. Vnesením transgenu kódujícího fosfomanosa-izomerázu (z *E.coli*), se mění manosa-6-P na fruktoza-6-fosfát, který je metabolizován.

Signální (reportérové) geny rostlin

Expresi těchto genů lze snadno detekovat a kvantitativně stanovit a mohou tudíž sloužit jako měřítko exprese transgenů různými promotory, s různou strukturou, v různých genotypch, různých pletivech a za různých podmínek.

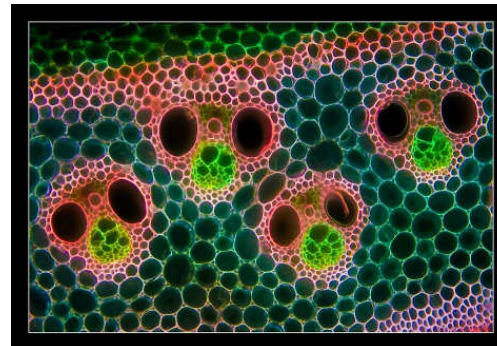
1. **Transgen pro chloramfenikolacetyltransferázu (CAT)**. Bakteriální enzym nepůsobí rezistenci k Clm, protože rostliny jsou přirozeně rezistentní. Enzym acetyluje ^{14}C -chloramfenikol, po přidání extraktu z rostlin se značený Clm přeměňuje na značený acetylovaný Clm, který lze chromatograficky zjistit. Výsledek je možné hodnotit kvantitativně.
2. **Transgen pro β -glukuronidázu**. Bakteriální enzym *E. coli*, který se v rostlinách označuje jako **GUS**. Zatím nejúspěšnější reportérový transgen. Vhodné substráty mění na modré produkty nebo fluoreskující látky. Existují dvě metody detekce aktivity:
 - A. **Fluorescenční** – provádí se v homogenátu se substrátem **MUG**. Po ozáření rozloženého MUG dlouhovlnným UV 365 nm dává modrou fluorescenci 570 nm.
 - B. **Histochemický** – používá se chromogenní substrát **X-gluc** (glukuronid), který po rozštěpení dává modrou barvu, která je nerozpustná a zůstává v buňkách (používají se segmenty listů, kalusy apod.) **Používá se konstrukt genu obsahující intron, který zaručuje, že je detekována jen aktivita v buňkách rostliny, ne v agrobakteriích (kontaminace).**

MUG = 4-metyl umbelliferyl glukuronid >> 4-metyumbelliferon

Signální (reportérové) geny rostlin

1. **Transgen pro luciferázu.** Využívají se cDNA ze světlušky *Photinus pyralis* nebo kódující sekvence *Vibrio harvei*. Po dodání substrátu (**luciferin**, ATP) k rostlinnému extraktu nebo do kultivačního media dochází k emisi záření měřitelného luminimetrem, scintilačním počítačem, CCD kamerou. Luciferin špatně proniká do pletiv, substrát je drahý.
2. **Transgen pro zeleně fluoreskující protein GFP.** Gen z medúzy *Aequorea victoria*. Protein GFP přeměňuje modré světlo na zelené. Má schopnost emitovat zelené světlo po ozáření modrým světlem (440-480 nm). Je to jediný protein, který má schopnost fluoreskovat bez dodání substrátu nebo kofaktorů. Zachovává si schopnost fluoreskovat, i když je fúzován s jiným proteinem, a to jak na C-, tak i A-konci. Mutacemi byl změněn chromofor, takže fluoreskované světlo může mít různou vlnovou délku. Původní gen se dobře exprimuje i v živočišných buňkách (lépe jak v rostlinách). V rostlinných buňkách je přítomen v jádře více než v cytoplasmě. Existuje i **fúzní protein GFP-GUS**, který má obě signální aktivity. U *A. thaliana* bylo prokázáno, že po ozáření rostlin UV světlem lze fluorescenci pozorovat pouhým okem. Vysoká exprese transgenu však může ovlivňovat životaschopnost rostlin nebo schopnost regenerace (nutno ověřit).

N



Charakteristika Ti-plazmidů

Hostitel: *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rubi*, *A. rhizogenes* (Ri- plazmidy)

Ti – tvorba krčkových nádorů (crown galls)

Ri – vláskové kořeny (hairy roots)

Velikost 150-200 kb

Typy Ti-plazmidů (klasifikace podle typu opinů)

- nopalinový
- oktopinový
- agropinový
- sukcinamopinový

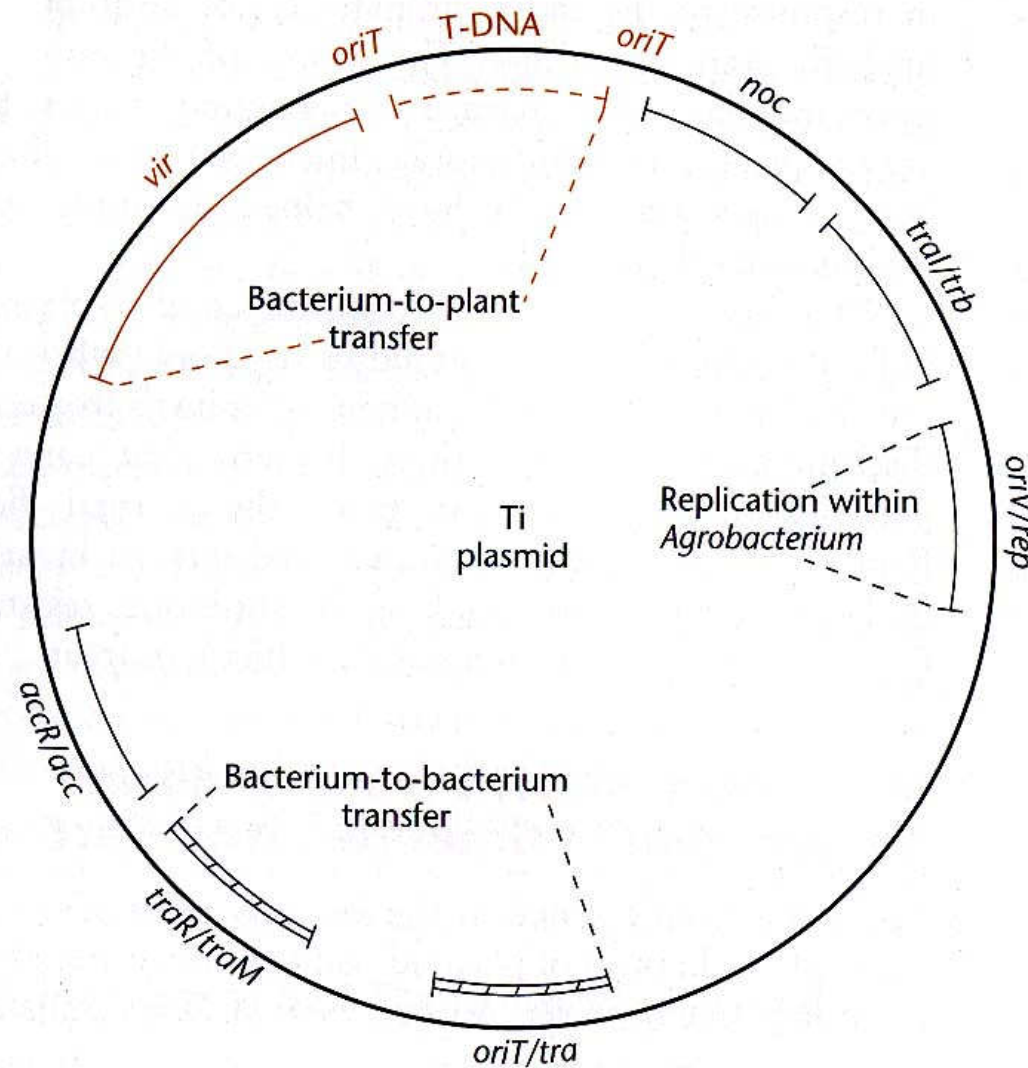
Typy Ri-plazmidů

- manopinový
- agropinový

Geny a funkční oblasti Ti-plazmidů

1. T-DNA (15-45 kb): syntéza fytohormonů, syntéza opinů
2. Geny pro virulenci
3. Geny pro katabolismus opinů
4. Počátek replikace
5. Geny pro transkonjugaci

Struktura Ti-plazmidu



virA-virG – aktivace transkripce genů vir

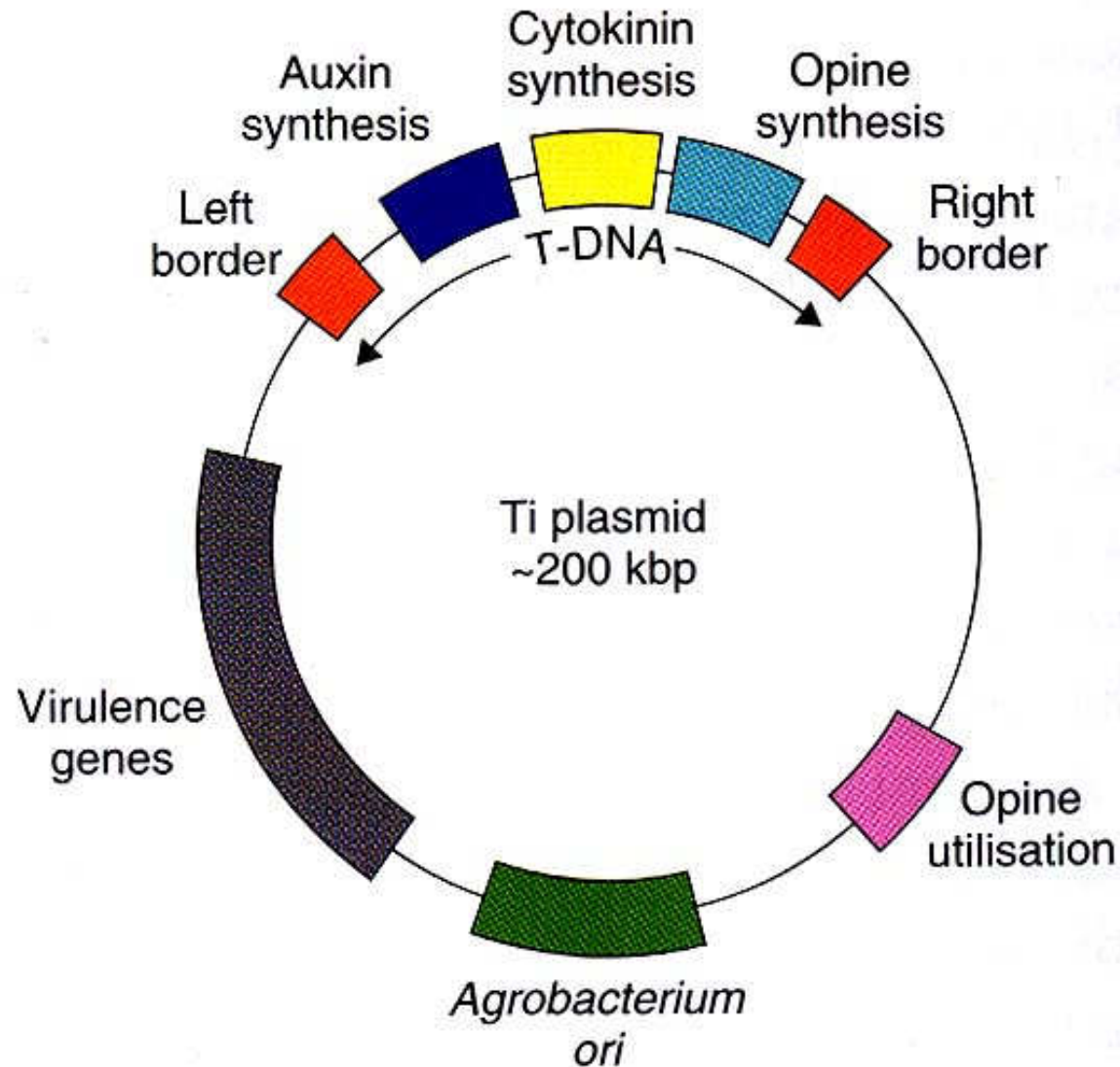
virA-virB – aktivace genů tra

virB2 – pilin (pilus)

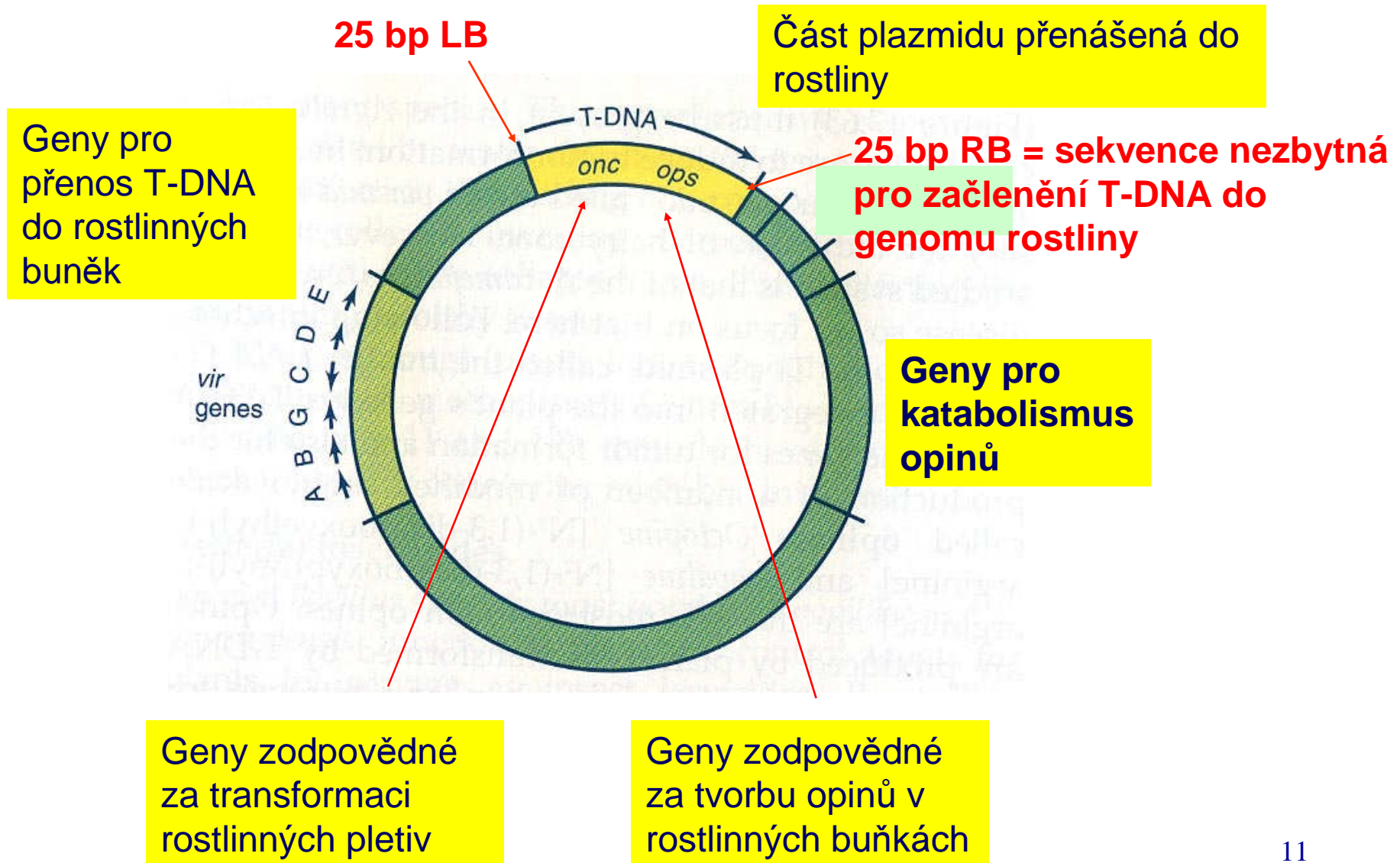
virD2 – relaxáza, NLS – cílení T-DNA do jádra

virE2 – tvorba kanálu v membráně pro vstup T-DNA

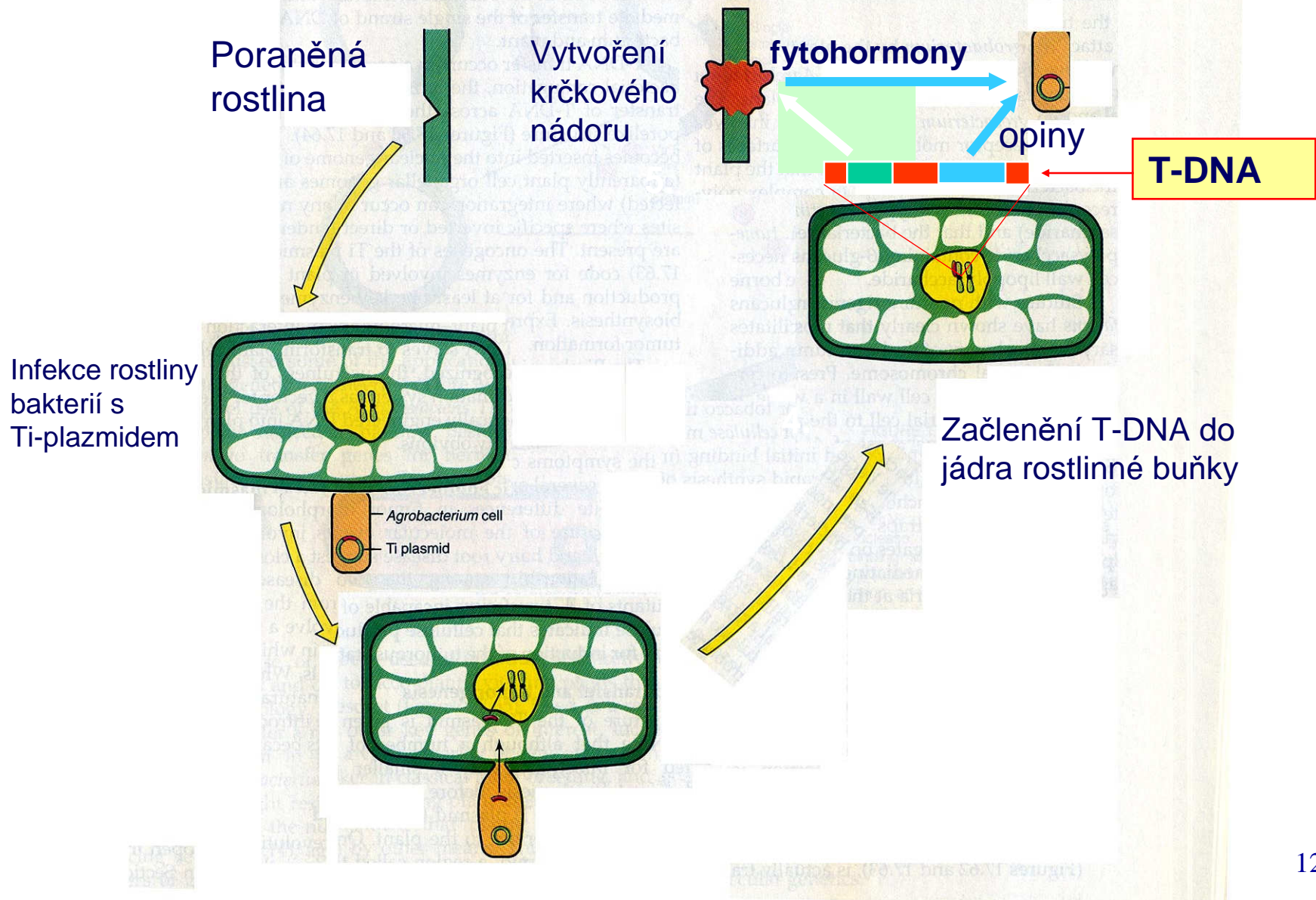
Struktura Ti-plazmidu



Struktura Ti-plazmidu *A. tumefaciens*



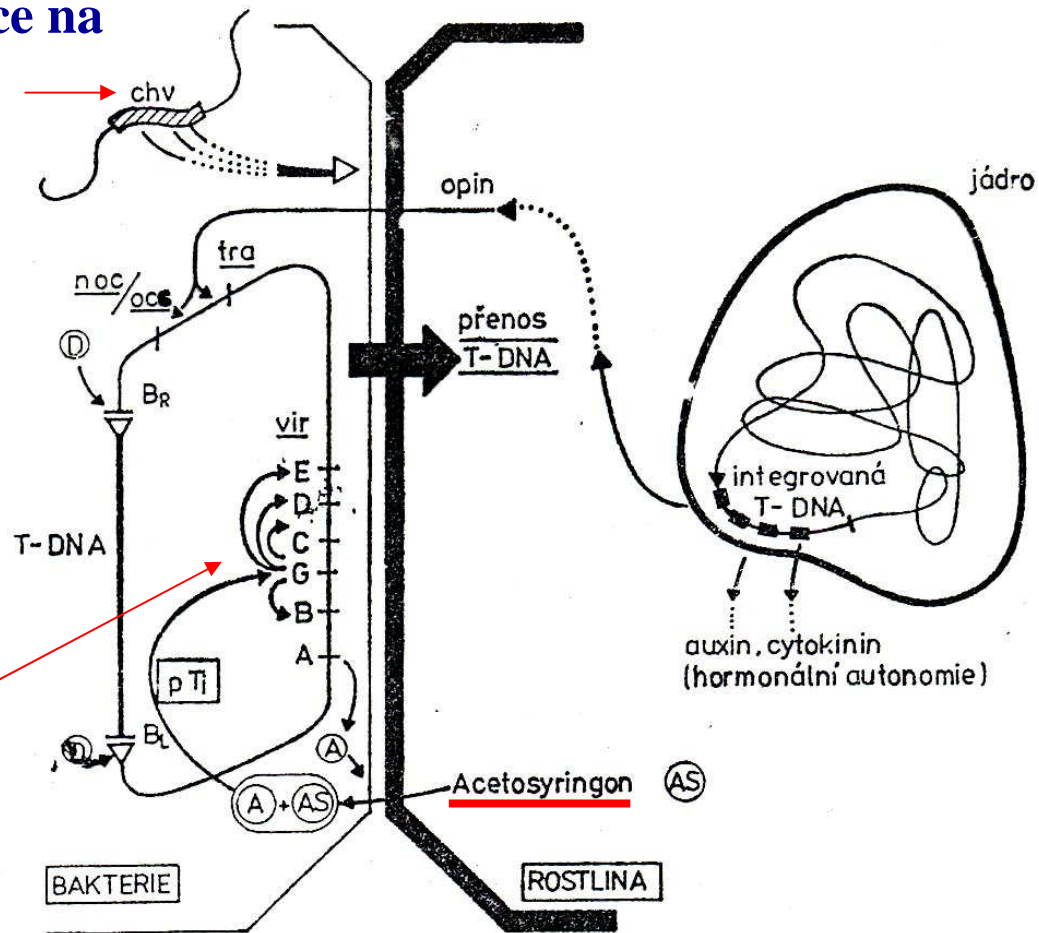
Transformace rostlin navozená Ti-plazmidem *Agr. tumefaciens*



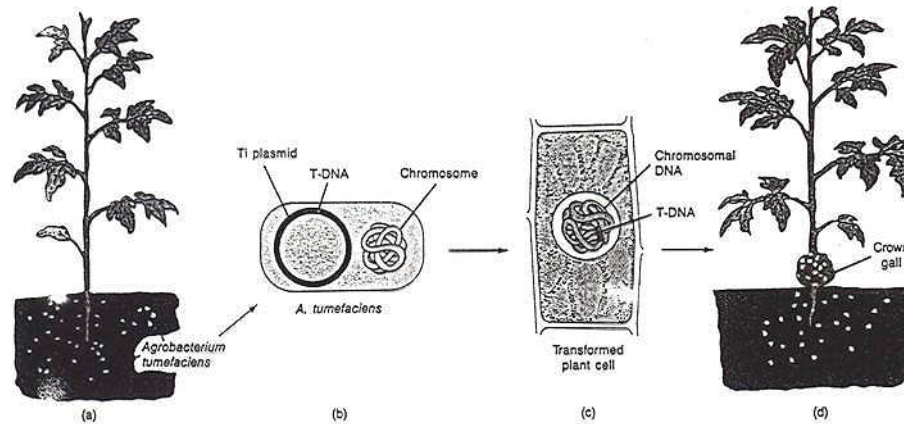
PRŮBĚH PŘENOSU TI-PLAZMIDU DO ROSTLINNÉ BUŇKY

Geny virulence na chromozomu

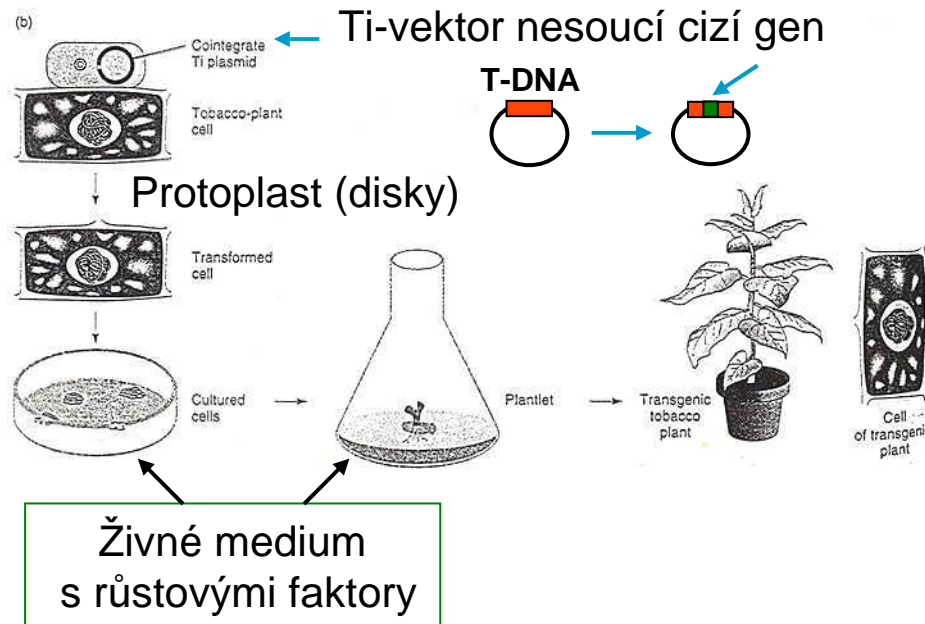
Geny virulence na plazmidu



Přenos cizích genů do rostlin pomocí Ti-plazmidu

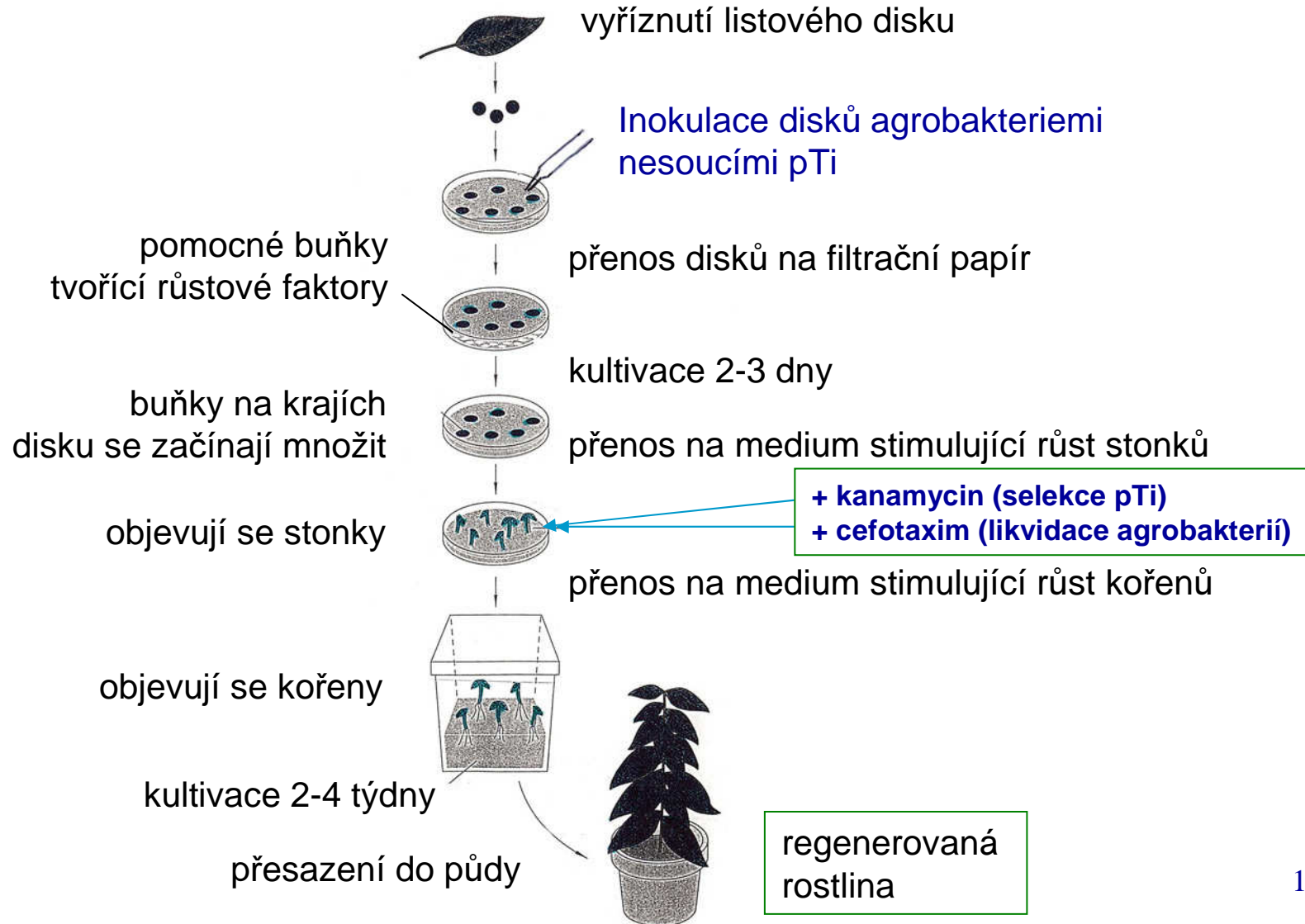


**Helikáza
(celuláza,
pektináza)**



Transgenní
rostlina
přenášející
geny do
potomstva

Regenerace listových disků infikovaných *Agrobacterium tumefaciens*

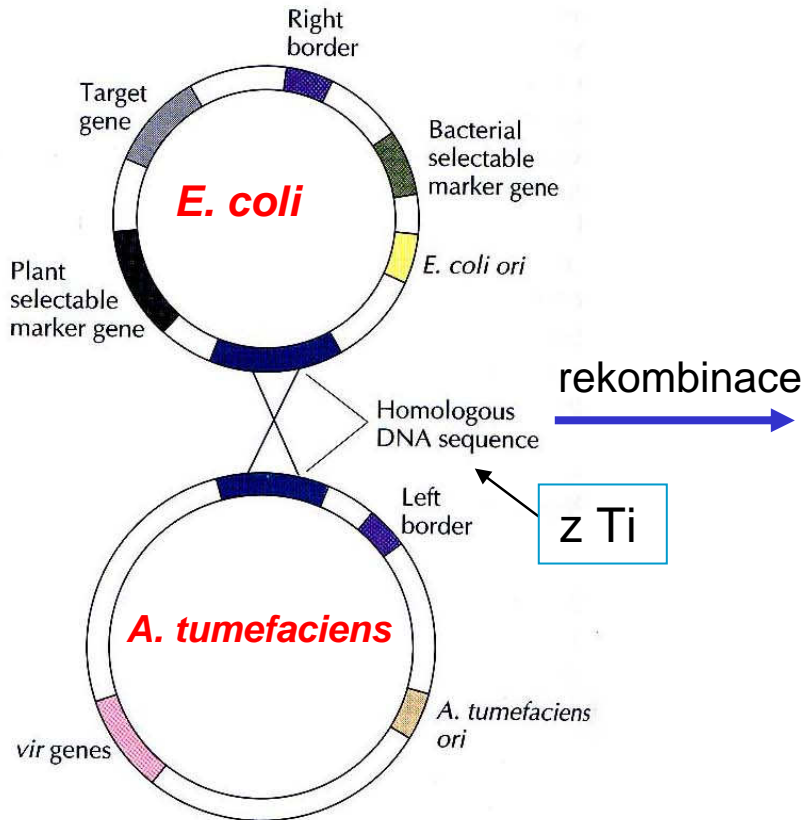


Omezení Ti-plazmidu pro jeho využití jako standardního vektoru

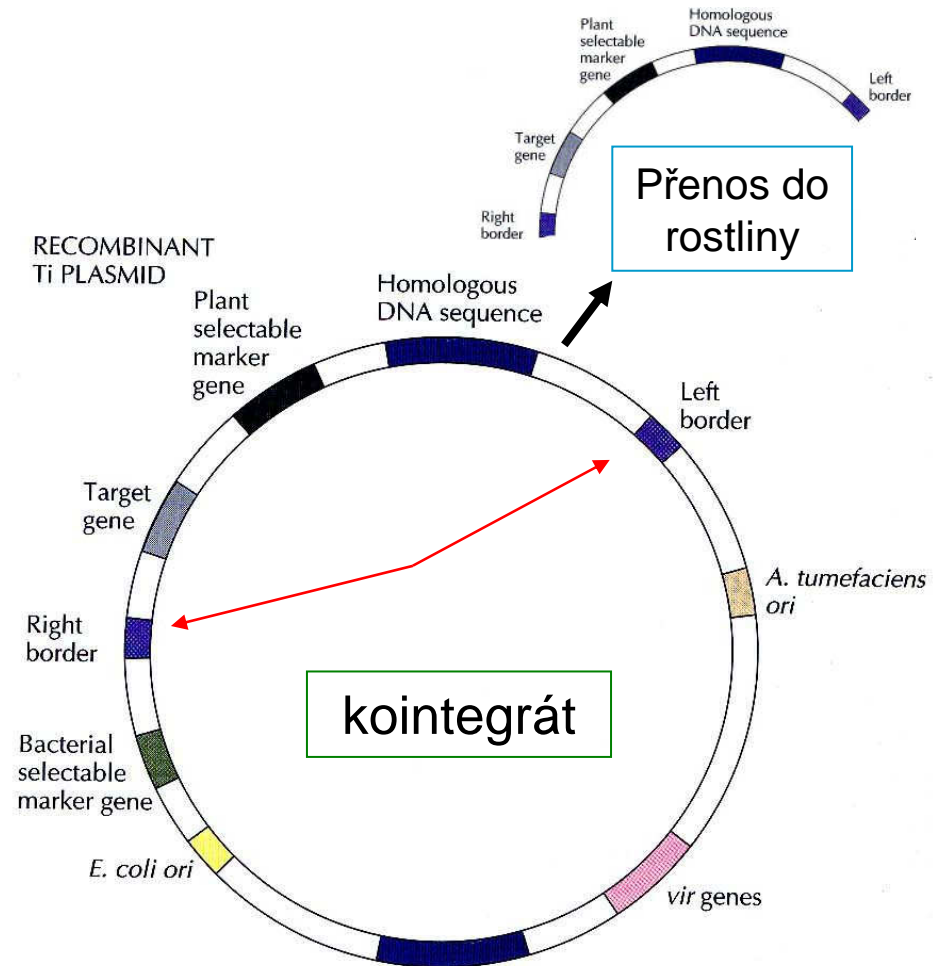
- 1. Tvorba fytohormonů transformovanými rostlinnými buňkami rostoucími v kultuře zabraňuje jejich regeneraci – proto je třeba geny pro auxiny a cytokininy z vektoru odstranit (výsledný Ti-plazmid (vektor) se označuje jako odzbrojený).**
- 2. Gen pro syntézu opinů může negativně ovlivnit růst rostlin – gen je proto z vektoru odstraněn.**
- 3. Ti-plazmidy jsou velké (150-800 kb) – je třeba odstranit úseky, které nejsou pro fungování vektoru nutné**
- 4. Ti-plazmidy se nereplikují v *E. coli* – do vektorů je třeba začlenit vhodný ori**

Kointegrační klonovací vektorový systém

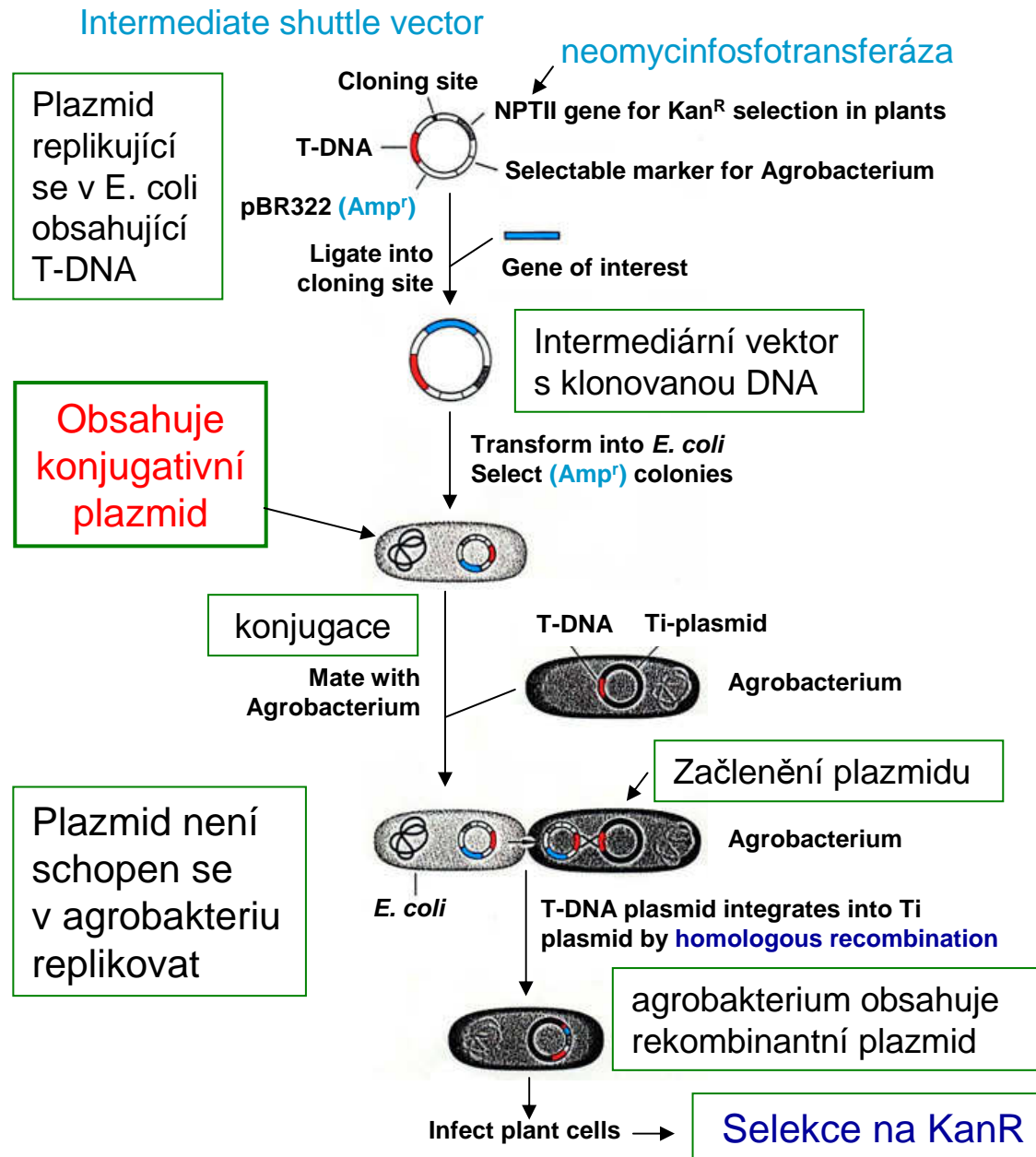
Klonovací vektor



Odzbrojený Ti-plazmid
= pomocný plazmid



Přenos genů do rostlin intermediárním vektorem



Triparentální křížení – před zavedením binárních systémů – intermediární a integrativní vektory

Smíchají se tři bakteriální kmeny.

- *E. coli* nesoucí pomocný plazmid schopný konjugace
- *E. coli* nesoucí rekombinantní plazmid – vlastní konstrukt s transgenem
- Recipientní Agrobacterium, obsahující odzbrojený Ti plazmid, schopný rekombinace s rekombinantním plazmidem přenášeným z *E. coli*.

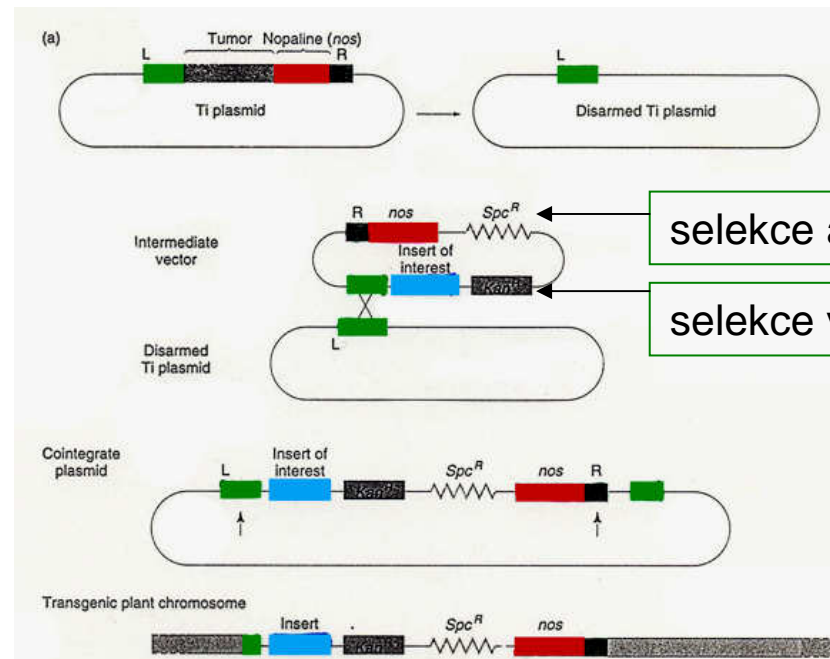
Během inkubace se konjugativní plazmid přenesl z prvního kmene *E. coli* do druhého kmene *E. coli*, kde mobilizuje rekombinantní plazmid do agrobakterie. Ani jeden z plazmidů z kmenů *E. coli* není schopen se v agrobakterii replikovat. V agrobakterii dojde k homologní rekombinaci, během níž se rekombinantní plazmid vloží (přes sekvence pBR322 nebo T-DNA) do rezidentního nerekombinantního Ti plazmidu. Tento kointegrát je pak schopen přenášet T-DNA do rostlin. ¹⁸

Přenos genů do rostlin intermediárním vektorem a kointegrací

1. Příprava odzbrojeného plazmidu

2. Rekombinace plazmidů

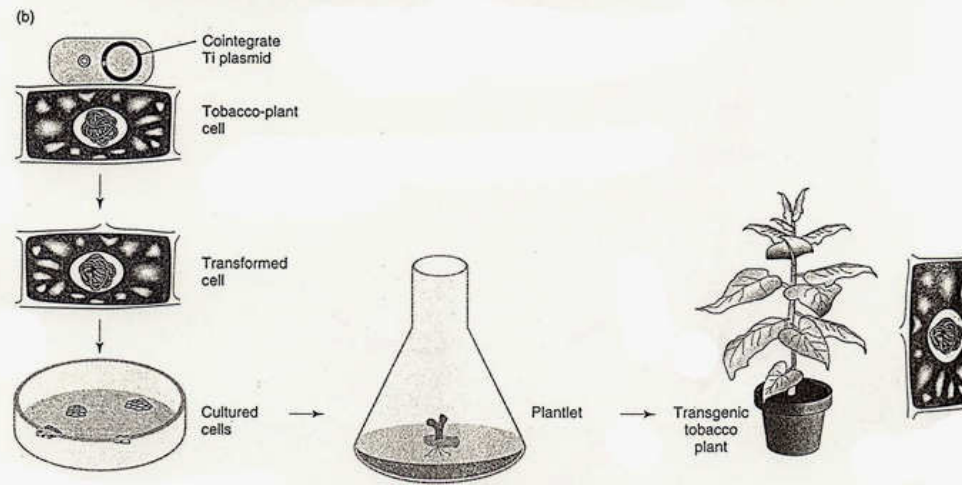
3. plazmidový kointegrát



Obsahuje oblast vir a defektní nebo žádnou T-DNA

selekce agrobakterií

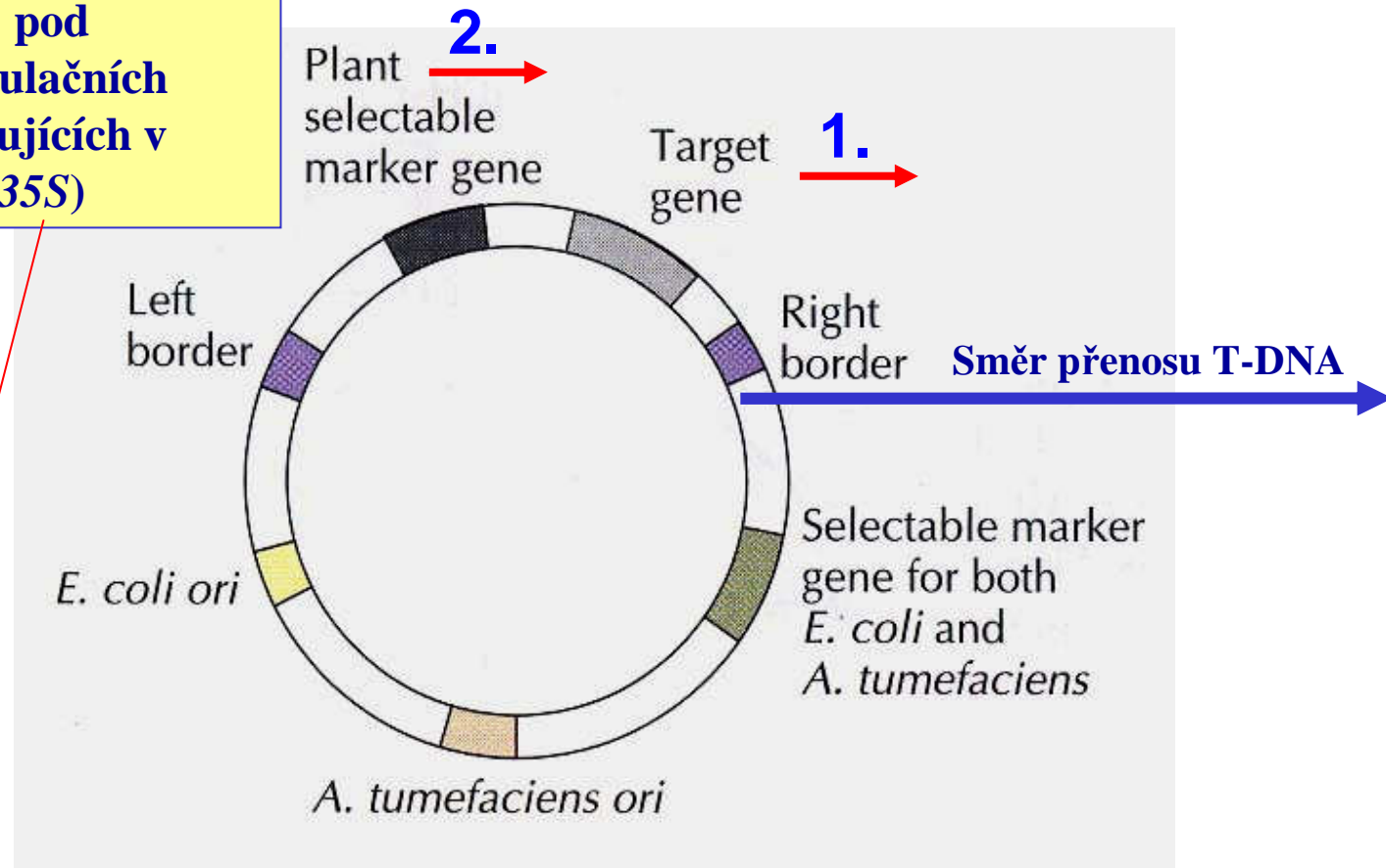
selekce v rostlině



cell of transgenic plant

Binární klonovací vektor odvozený z Ti-plazmidu

Chimerický gen *neo* (*NPTII* z *Tn5*) pod kontrolou regulačních sekvencí fungujících v rostlině (*nos*; 35S)



promotor 35S - velmi silný konstitutivní promotor viru CaMV (35S RNA)

Sekvenční rozdíly mezi levou a pravou hranicí T-DNA

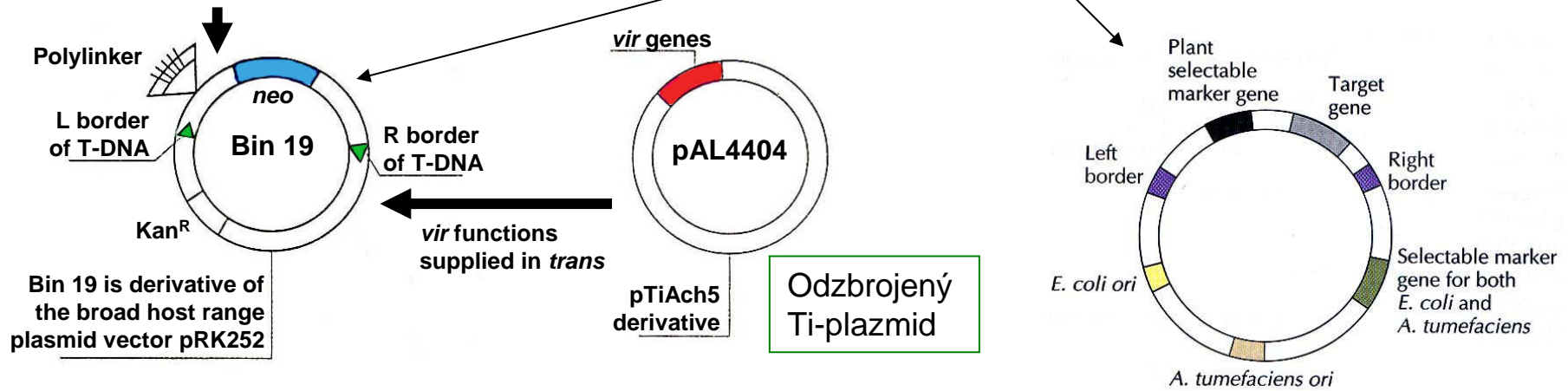
Right **RB** 5'-TGNCAGGATATATNNNNNNGTNANN-3'
Left **LB** 5'-TGGCAGGATATATNNNNNTGTAAAN-3'

DNA je přenášena do rostliny jako lineární jednořetězcová molekula, a **to od pravé hranice (RB) ve směru 5'-3'**. Přenos je zahájen zlomy v obou hraničních sekvencích. Integrace do rostlinného genomu závisí na specifických sekvencích umístěných v RB. LB se integračního procesu nezúčastňuje – často dochází k delecím sekvencí z nechráněného 3' konce LB o délce až stovek nt.

Binární vektorový systém

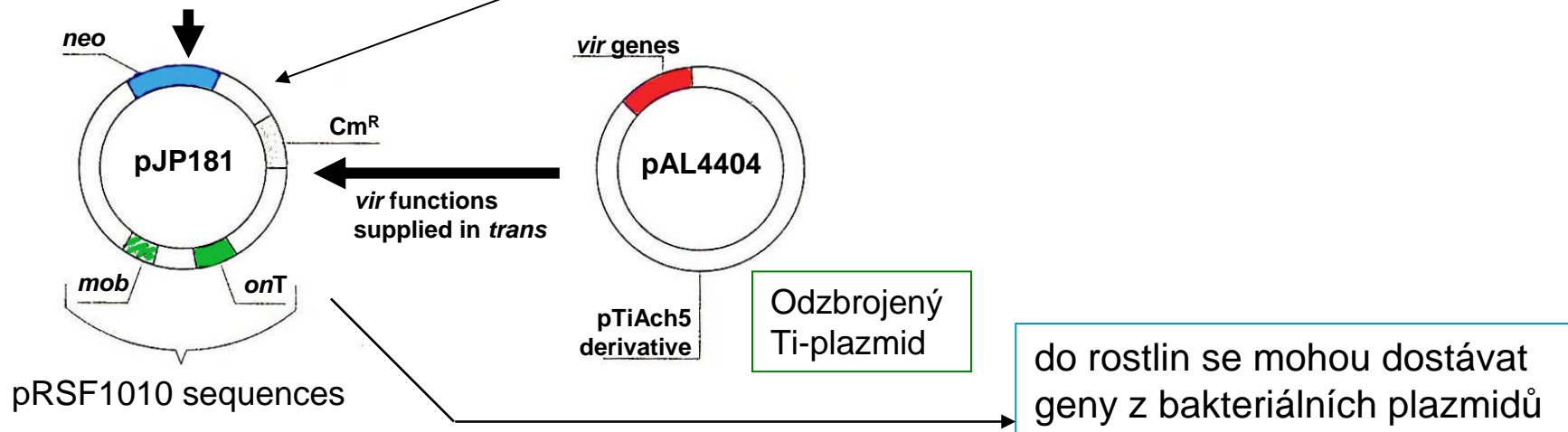
Bin 19 can be transformed into *Agrobacterium* directly or mobilized into *Agrobacterium* by helper plasmid in triparental mating

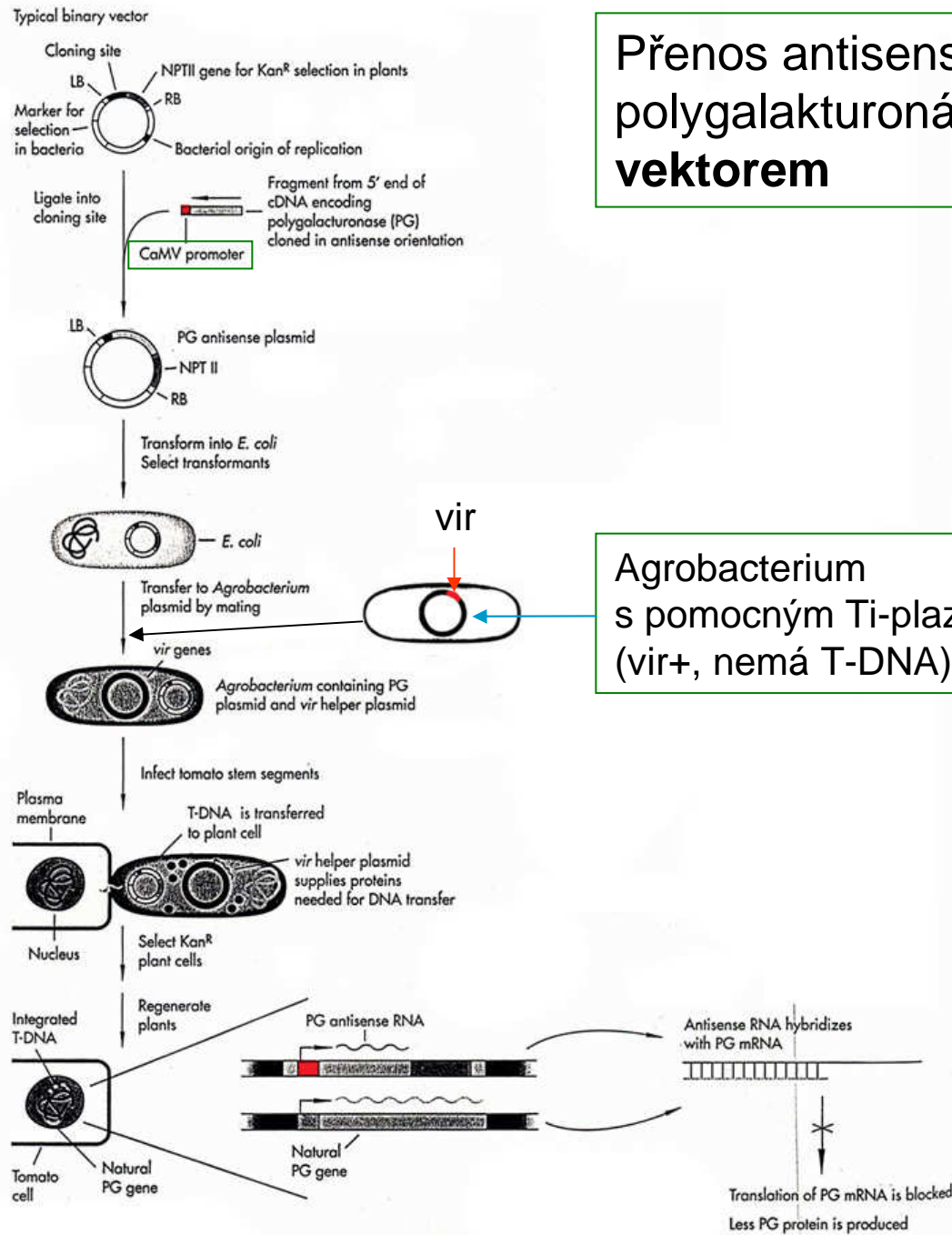
a) s T-DNA sekvencemi



pJp181 can be mobilized into *Agrobacterium* by helper plasmid

b) bez T-DNA sekvencí

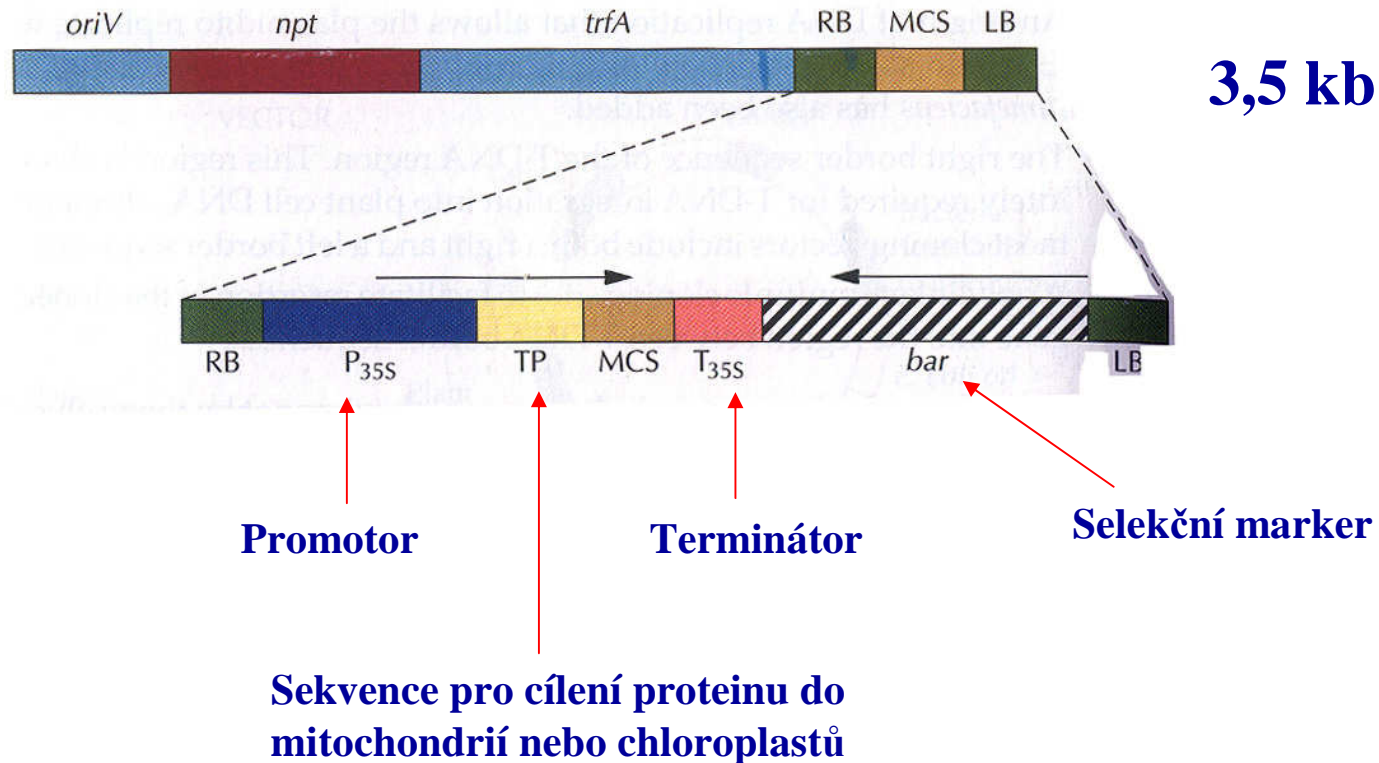




Přenos antisense-genu pro polygalakturonázu **binárním vektorem**

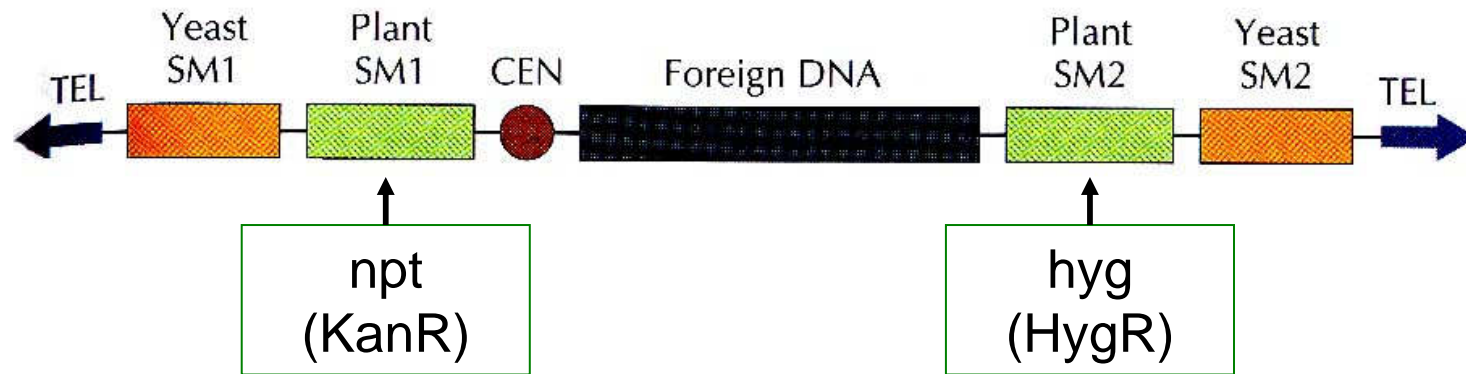
Agrobacterium s pomocným Ti-plazmidem (vir+, nemá T-DNA)

Mini-binární vektorový systém



Klonování genů v *E. coli*, pak přenos elektroporací do *A. tumefaciens* a následně do rostliny

Modifikovaný vektor YAC používaný pro přenos dlouhých úseků DNA do rostlinného genomu



YAC s klonovanou DNA je přenesen **biolistickou metodou** do rostlinných buněk, transformanti jsou selektováni na KanR a přítomnost úplné délky klonované DNA je ověřena rezistencí buněk na hygromycin.

Délka přenesené DNA: 80-550 kb: integrace celé délky prokázána hybridizací – přenos většího počtu genů nebo biosyntetických drah

Virové vektory pro přenos genů do rostlin

- známo přes 600 typů virů rostlin: většina +ssRNA, jen 25 DNA

Výhody:

1. Získání transgenních rostlin rezistentních k virovým infekcím
2. Využití regulačních oblastí virů pro expresi klonovaných genů
3. Infikují i druhy, které nenapadá agrobaktérie
4. K expresi genů dochází i v protoplastech
5. Virus je přítomen v mnoha kopiích, dosahuje se tedy vyšší exprese transgenů (ta je stabilní)

Viry s DNA:

- Geminiviry: ssDNA kružnicová
- Kaulimoviry: dsDNA kružnicová

Virové vektory pro přenos genů do rostlin

Geminiviry: TGMV – tomato golden mosaic virus

- Infikují jedno i dvouděložné rostliny
- Virová kapsida má jeden typ proteinu
- genom tvořen dvěma typy ssDNA o délce 2,5 kb, které mají stejnou velikost, ale různý informační obsah: A = replikace obou jednotek, plášťový protein, B = přenos v rostlině

Přenos možný agroinfekcí nebo transfekcí

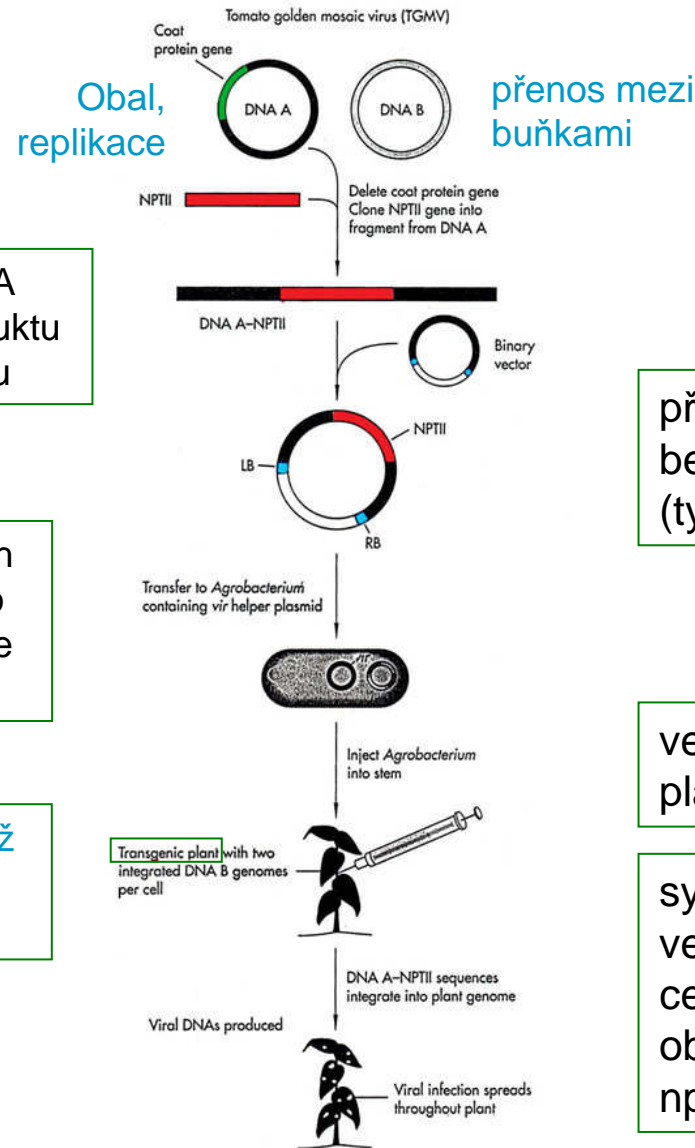
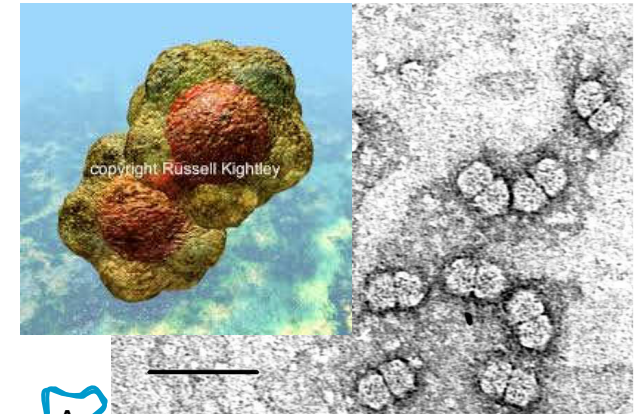
Kaulimoviry CaMV (cauliflower mosaic virus)

- 8 kb dsDNA kruhová, replikuje se reverzní transkripcí
- Infekce virem je systemická – dostává se do všech orgánů - 10^5 virů/ buňku
- **Obsahuje silný promotor: 35S, který je aktivní v řadě rostlin**
- Klonování cizorodých genů do genu II (týká se přenosu virů mšicemi)
- Přenos možný transfekcí nebo části genomu agroinfekcí

Agroinfekce

- = **vnášení virů, virových vektorů, nebo viroidů do rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens***
- virová genomová DNA nebo cDNA se začlení in vitro do vektoru obsahujícího T-DNA, vzniklý konstrukt se přenesení do *Agr. tumefaciens*, kterým se infikují rostliny
- v rostlinné buňce není další osud virové DNA závislý na začlenění T-DNA do rostlinného genomu
- přenášená virová DNA bývá upravena *in vitro* (např. odstranění nežádoucích funkcí: patogenita apod.)
- do virových vektorů lze umístit selekční nebo signální markery
- přenesená virová DNA se v rostlinách šíří **systemicky** (do všech orgánů), tj. přenesené geny se mohou exprimovat v celé rostlině
- vhodný způsob pro přenos virů, které nelze snadno do rostlin inokulovat mechanicky (viry přirozeně přenášené specifickými přenašeči)

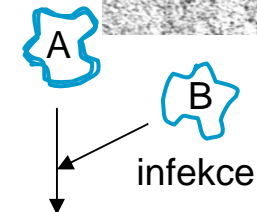
Systemická infekce rostlin rekombinantním vektorem geminiviru



Klonování NPTII do DNA A a začlenění celého konstruktu do intermediárního vektoru

DNA A se může v buňkách replikovat samostatně, pro přenos do dalších buněk je však vyžadována DNA B

Přenos do rostliny, která již obsahuje DNA B (makroinjekce)



přenos DNA mezi buňkami bez obalových proteinů (ty lze nahradit cizími geny)

vektor se replikuje jako plazmid (dsDNA)

systemické rozšíření vektorových molekul do celé rostliny – ty pak obsahují vysokou hladinu npt (tisíce kopií)

Příklady virových vektorů, jejich vlastností a použití (Petřík, 2002)			
virus (rod)	genom	nevýhody	výhody, použití
Caulimoviry	dscDNA	nízký výtěžek, úzký okruh hostitelů, velký genom	DNA genom
Geminiviry	sscDNA	malý kompaktní genom, omezené systémové šíření	DNA genom
Virus mozaiky vigny (Comovirus)	ssIRNA	segmentovaný RNA genom	vysoký výtěžek, exprese peptidů v chloroplastech
Virus mozaiky okurky (Cucumovirus)	ssIRNA		vysoký výtěžek
Virus mozaiky vojtešky (Alfamovirus)	ssIRNA	málo informací o použití	Toleruje velké inzerce v chloroplastech
Potyviry	ssIRNA	ekvimolární exprese	-široký i úzký okruh hostitelů, exprese peptidů i genů
Virus mozaiky tabáku (Tobamovirus)	ssIRNA		velmi vysoký výtěžek, exprese peptidů i genů, existuje modulární systém využívající transgenní rostliny
X virus bramboru (Potexvirus)	ssIRNA	patentované použití proteázy 2A v konstrukci	vysoký výtěžek, exprese genů
Satelitní RNA	ssIRNA	málo informací o použití	toleruje velké inzerce, exprese genů
l = lineární, c - cirkulární			

Transformace chloroplastů – přenos cizorodých genů

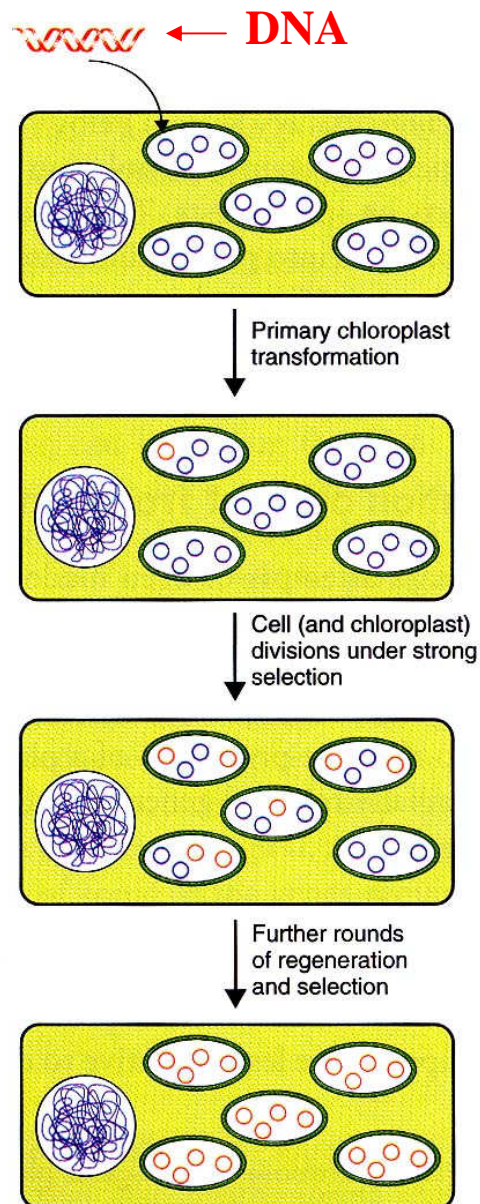
- vlastní ct genom: dsDNA, 35-220 kb, desítky kopií genomu.
- operonové uspořádání chloroplastových genů – možnost exprimovat více genů z jednoho transkriptu
- vysoce ploidní (více kopií genomu) – tisíce chloroplastů
- chloroplasty nejsou v pylu, transgen se nebude přenášet při křížení
- **inzerce DNA do chloroplastového genomu probíhá homologní rekombinací v přesném místě – nedochází k pozičnímu efektu**
- chloroplastové geny jsou transkribovány chloroplastově specifickými promotory
- selekční marker (aadA) – rezistence k spektinomycinu
- selekční marker lze eliminovat pomocí cre-lox rekombinace.
- přenos DNA biolistickými metodami
- vytváření lidských terapeutických proteinů (lidský somatotropin)
- rezistence k hmyzu (toxin B. thuringiensis) – **není v pylu!**

Transgenic	Chloroplast genome	Nuclear genome
Transgene copy number	10–100 plastid genome (single circular chromosome) copies per plastid, and 10–100 plastids per cell depending upon age and type of tissue, resulting in many transgene copies (up to 10 000) per cell	Chromosome number is species-specific, but two copies of each of many chromosomes present per cell results in a few copies of the transgene per cell
Level of gene expression	Polyploidy results in abundant transgene transcripts and a high accumulation of foreign proteins (up to 47% of total soluble protein)	Gene regulation determines the rate of transcription, and accumulation of foreign protein is often a limitation
Gene arrangement and transcription	Genes are often arranged in operons and transcribed into polycistronic RNA so that multiple transgenes can be introduced and expressed in a single transformation event	Each transgene is independently inserted into the chromosome and transcribed into a monocistronic mRNA
Position effect	Site-specific insertion through two homologous Recombination events eliminates position effects on transgene expression	Random insertions result in variable transgene expression levels
Gene silencing	Not reported	Gene silencing results in decrease or elimination of transgene expression. Both transcriptional and post-transcriptional gene silencing have been reported
Gene containment	Maternal gene inheritance in most crop plants results in natural gene containment	Paternal transgene inheritance results in out-crossing among crops and weeds
Folding and disulfide bond formation	Chloroplasts form disulfide bonds and correctly fold human proteins, making them ideal for development of edible vaccines, pharmaceuticals and plantibodies pharmaceuticals and plantibodies	For disulfide bond formation, proteins are targeted to the endoplasmic reticulum
Toxicity of foreign proteins	Adverse effects of toxic proteins might be minimized by chloroplast compartmentalization	Toxic proteins accumulating within the cytosol might result in serious pleiotropic effects
Transgenic lines Homogeneity at ploidy level	Uniform gene expression Chloroplast transgenic lines are mostly homoplasmic (all genome copies are homogeneous for the transgene). Homoplasmy is mostly achieved by repetitive selection and regeneration	Highly variable gene expression Nuclear transgenic lines are either heterozygous or homozygous. Homozygosity is achieved either by selfing or crossing

Srovnání přenosu genů do chloroplastového a jaderného genomu

Vlastnosti transgenů	Chloroplastový genom	Jaderný genom
Počet kopií transgenů	Až 10 000 transgenů/buňku 10-100 kopií plastidových genomů/plastid 10-100 plastidů/buňku	Málo kopií transgenů
Hladina genové exprese	Polyploidie vede k vysokému počtu transkriptů transgenů, vysoká akumulace proteinů (až 47% všech rozpustných)	Rychlost transkripce je regulována a akumulace cizích proteinů může být nízká
Uspořádání genů a transkriptů	Geny často v operonech, transkripty polygenní – možnost vložit více transgenů do jednoho operonu	Každý transgen vložen nezávisle, transkripty monocistronní
Poziční efekt	Místně specifická inserce prostřednictvím HR – poziční efekt eliminován	Náhodná inserce vede k variabilitě genové exprese
Umlčování genů	Nepozorováno	Snížení nebo ztráta exprese transgenů na úrovni transkripčního nebo posttranskripčního umlčení
Kontrola šíření transgenů	Maternální dědičnost – přirozená bariéra šíření transgenů	Paternální dědičnost umožňuje přenos transgenů na plevel
Posttranslační úpravy proteinů	Vytvářejí se disulfidické můstky a proteiny se správně sbalují – ideální pro jedlé vakcíny	disulfidické můstky se vytvářejí v ER
Toxicita cizích proteinů	Nepříznivé vlivy lze minimalizovat	Toxické proteiny se akumulují v cytosolu a mohou mít nepříznivé účinky
Transgenní linie	Uniformní exprese genů	Vysoce variabilní genová exprese
Homogenita na úrovni ploidie	Transgenní linie jsou homoplasmické – dosaženo selekcí	Heterozygotní nebo homozygotní (dosaženo samooplozením nebo křížením)

Selekce homogenně transgenních chloroplastů



Každá buňka obsahuje 50-100 chloroplastů, každý obsahuje 10-20 nukleoidů (nehistonových proteinů s omotanou DNA), z nich každý má 5-10 genomů. Jedna buňka tak může obsahovat více než **10 000 plastidových genomů**

Homoplasmická buňka

Stabilní transformace plastidů tabáku

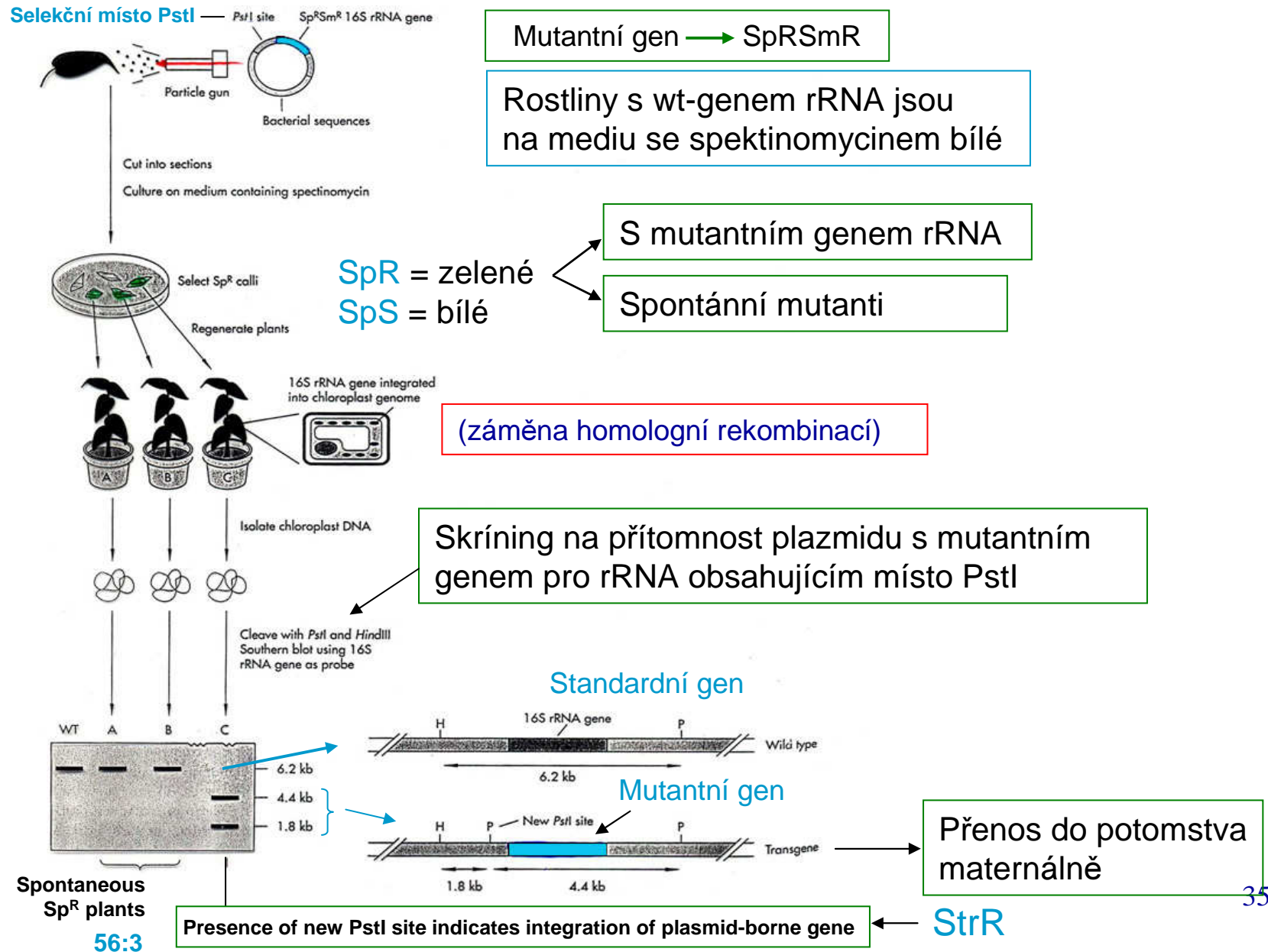


Table 3. Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants^a

Genes and use	Gene products and use	Refs
Selectable markers and reporters		
<i>aadA</i>	Aminoglycoside-3'-adenyltransferase	[14]
<i>nptII</i>	Neomycin phosphotransferase	[52]
<i>codA</i>	Cytosine deaminase	[53]
<i>BADH</i>	Betaine aldehyde dehydrogenase	[4]
<i>uidA</i>	β -glucuronidase	[12]
<i>cat</i>	Chloramphenicol acetyl transferase	[9,11]
<i>gfp</i>	Green fluorescent protein	[24,54]
<i>aadA:gfp</i>	Selectable or screenable fusion protein	[47]
Plant traits: herbicide resistance		
<i>aroA</i>	Glyphosate resistance	[2,19]
<i>bar</i>	Bialaphos resistance	[18,20]
Insect resistance		
<i>Cry1Ac</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) toxin	[15]
<i>Cry2Aa2</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) toxin	[16]
<i>Cry2Aa2</i> operon	<i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) toxin	[3]
Pathogen resistance		
<i>msi-99</i>	Bacterial, fungal resistance	[17]
Drought or salt tolerance		
<i>tps1</i>	Trehalose phosphate synthase	[8]
<i>BADH</i>	Betaine aldehyde dehydrogenase	[4]
Amino acid biosynthesis		
<i>EPSPS</i>	5-enol-pyruvyl shikimate-3-phosphate synthase	[2,19]
<i>ASA2</i>	Anthranilate synthase (AS) α -subunit	[55]
Phytoremediation		
<i>mer A</i>	Mercuric ion reductase	^b
<i>mer B</i>	Organomercurial lyase	^b
Non-plant traits: biopharmaceuticals		
<i>hST</i>	Human somatotropin	[7]
<i>HSA</i>	Human serum albumin	^c
<i>msi 99</i>	Anticancer, lytic antibiotic	[17]
<i>proinsulin</i>	Human insulin α , β chains	^d
<i>IFN α 5</i>	Human interferon α 5	^e
Monoclonals		
<i>Guy's 13</i>	For dental caries against <i>Streptococcus mutans</i>	^c
Biomedical polymer		
<i>gvgvp-120</i>	Bioelastic protein-based polymer	[21]
Edible vaccines		
<i>ctxB</i>	Cholera toxin β -subunit	[6]

^aOnly the first reports are included here, unless a variant or synthetic gene was used in subsequent investigations.

^bO. Ruiz, MS thesis, University of Central Florida, 2001.

^cH. Daniell *et al.*, www.publish.csiro.au/books/bookpage.cfm?PID=3051&TXT=DES#DES

^dO. Carmona-Sanchez, MS thesis, University of Central Florida, 2001.

^eM. Torres, MS thesis, University of Central Florida, 2001.

Rezistence k herbicidům

Rezistence k hmyzím škůdcům a houbám

Odolnost vůči suchu a solím

Syntéza aminokyselin

Fytoremediace (Hg)

Biofarmaka

Vakcíny, protilátky

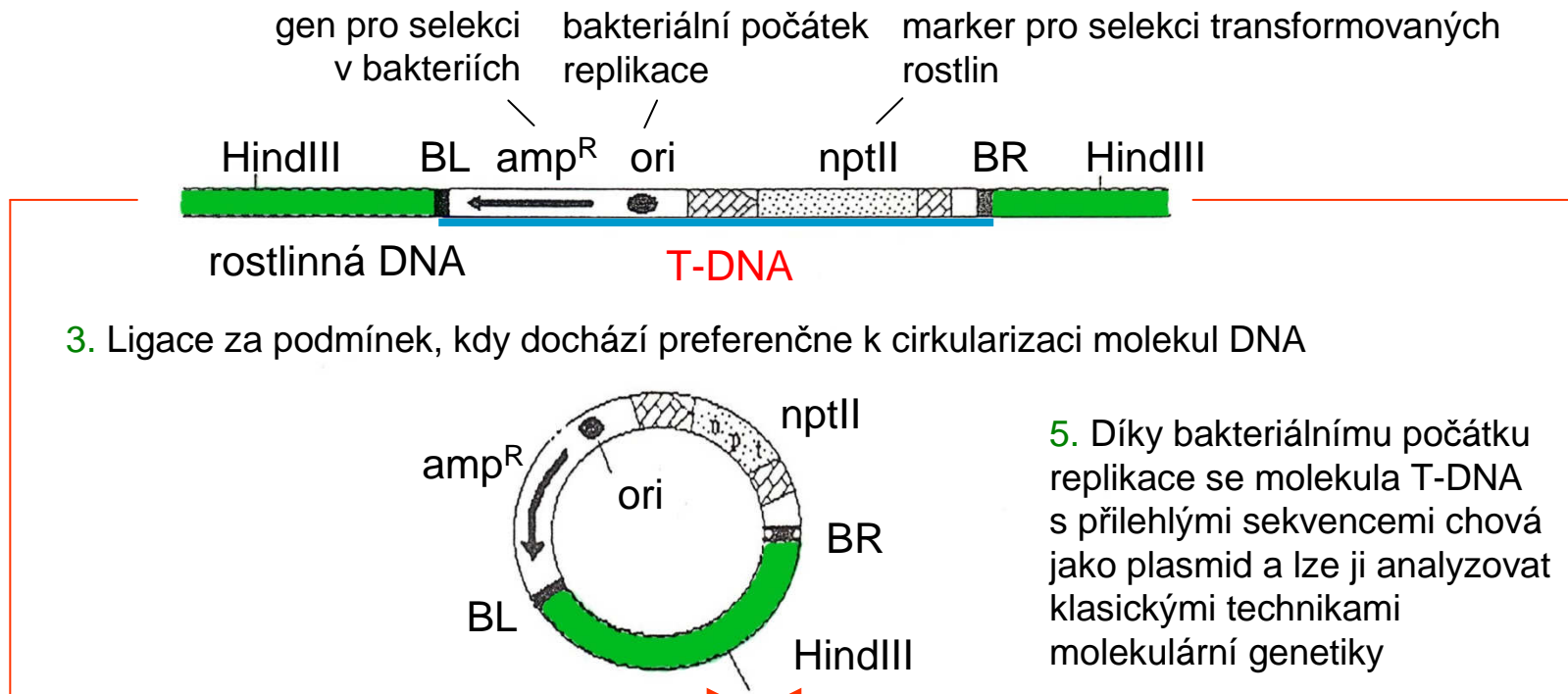
Guy's 13 = mouse monoclonal antibody which recognizes streptococcal antigen I/II (SA I/II), a major cell surface glycoprotein of *Streptococcus mutans*

Vyhledání genu zájmu po mutagenезi pomocí T-DNA

- a) vnesení T-DNA do rostliny
- b) selekce rostlin s identifikovatelnou mutací (změna fenotypu)

„**plasmid rescue**“: izolace genů sousedících s T-DNA

* Izolace rostlinné DNA, štěpení RE, která neštěpí uvnitř T-DNA, cirkularizace, přenos do E. coli



4. Transformace ligační směsi do bakterií a selekce na ampicilin

Vyhledání wt-genu v genové knihovně a jeho analýza

Vektory pro inzerční mutagenezi

1. Past na zesilovače

- Zesilovače působí na dálku neohledě na orientaci. Inzerce transgenu do jeho blízkosti vede ke zvýšení transkripce transgenu.
- T-DNA obsahuje minimální promotor s nízkou aktivitou (proximální část promotoru 35S CaMV) a reportérový gen, jehož produkt musí být kvantitativně hodnotitelný histochemicky (např. GUS).

2. Past na promotory

- Reportérový gen neobsahuje promotor a je lokalizován na 5'konci T-DNA. K aktivaci reportérového genu dochází po začlenění pasti za promotor. Pokud reportér nemá iniciační kodon AUG, dochází k translační fúzi, pokud jej má, dochází k transkripční fúzi (omezení: správná orientace reportérového genu, správný čtecí rámeček).
- Jako reportérové geny se používají: nptII, GUS, luc, GFP

Vektory pro inzerční mutagenezi

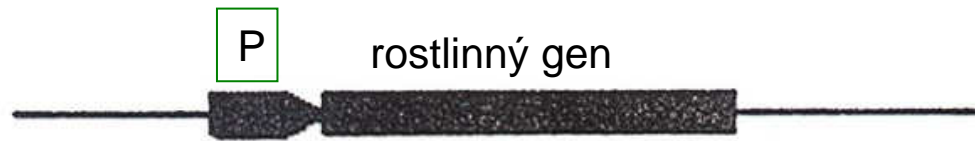
3. Past na geny

- Selektuje se integrace pasti do kódující oblasti genu. Kódující sekvence (původního) genu je přerušena a dochází ke vzniku **chimerického genu a fúzního proteinu**, který obsahuje část aminokyselinové sekvence původního genu a celou sekvenci reportérového genu. Gen vykazuje aktivitu reportérového genu.
- Jsou zde omezení, takže systém funguje jen u některých inzercí.

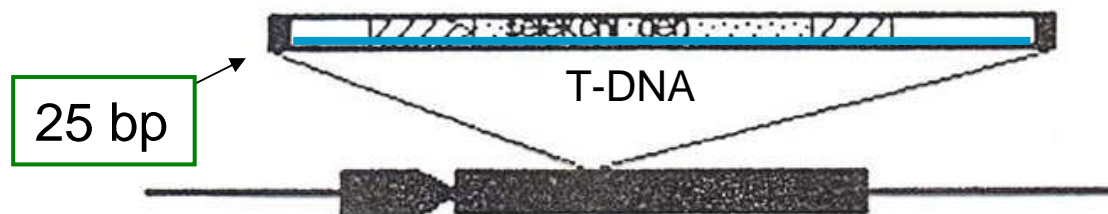
4. Aktivační mutageneza

- Dochází k aktivaci nativního endogenu vneseným zesilovačem transkripce nebo silným promotorem (T-DNA s tetramerním uspořádáním úseku 35S promotoru CaMV). Jsou navozovány dominantní mutace.

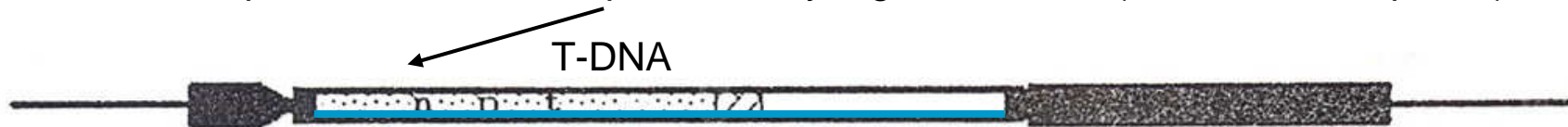
„T-DNA tagging“ – využití T-DNA pro charakterizaci rostlinných genů



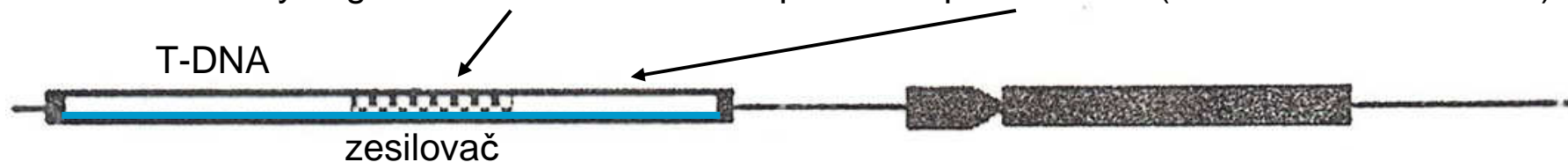
1. Inzerční mutageneze – ztráta funkce genu inzercí T-DNA (inzerční inaktivace)



2. Identifikace promotorů fúzí s bezpromotorovým genem NPTII (T-DNA nese reportér)

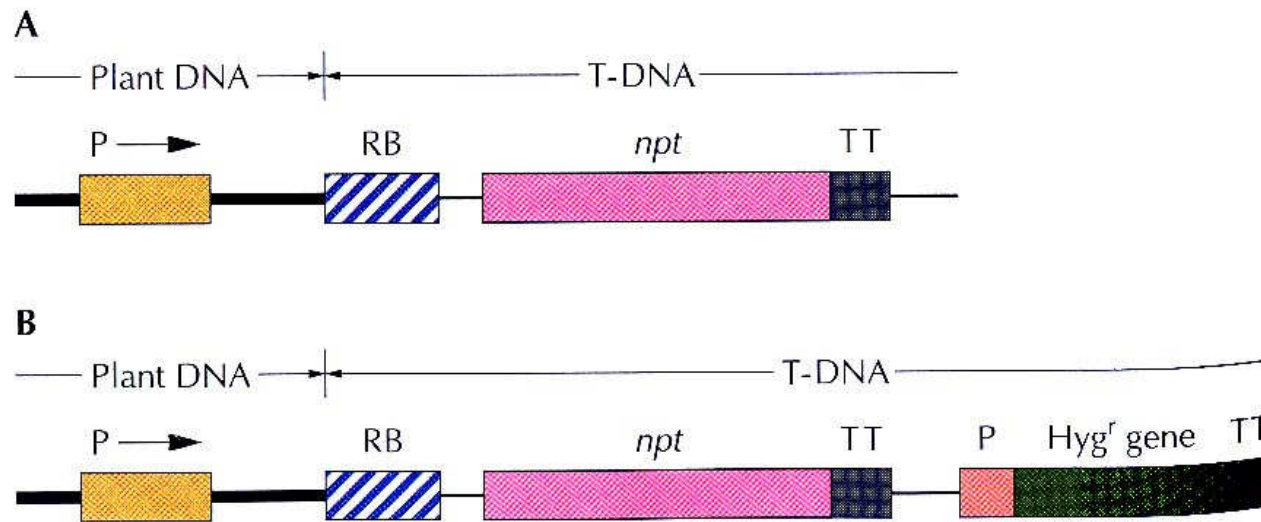


3. Aktivace tichých genů zesilovačem transkripce nebo promotorem (T-DNA nese zesilovač)



Analogicky lze využít i rostlinné transpozony

Použití bezpromotorových reportérových genů k izolaci rostlinných promotorů



- A. Pokud se T-DNA začlení do genomu rostliny za promotor funkčního genu, lze expresi *npt* detekovat přímou selekcí KanR transformantů. Nelze ji však detekovat v případě, kdy je promotor aktivní jen během určité fáze vývoje nebo je indukován specifickým faktorem v prostředí
- B. Kromě bezpromotorového genu *npt* je do konstruktů vložen gen pro rezistenci k hygromycinu (*Hyg^r*) pod kontrolou konstitutivního promotoru. **Selektují se transformanti rezistentní k hygromycinu a mezi nimi se hledají ti, kteří za určitých podmínek exprimují gen *npt* (kde je tudíž tento gen za indukovatelným promotorem).**

Klonování rostlinných genů po transpozonovém značení

wt květ



Rostlina *Antirrhinum* obsahující Tam3

Růst při 15°C, dochází k transpozici

Samosprášení, získání potomstva

Různé další mutanty

Izolace genomové DNA z rostlin Flo+ a Flo-, štěpení HindIII a identifikace fragmentů, hybridizujících s Tam3

Mutant neschopný tvořit květy



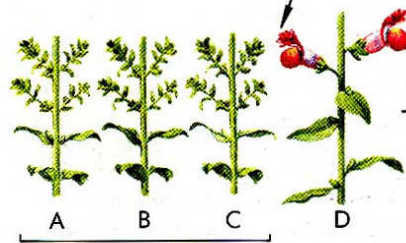
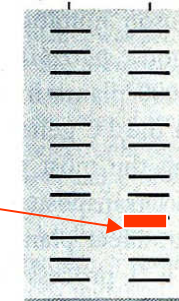
flo 613

Řízkování, regenerace rostlin

Sekvence použité k přípravě sondy pro vyhledání wt genu flo

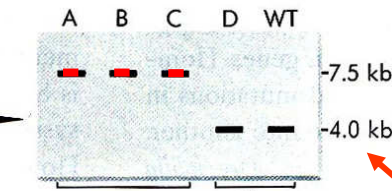
Vzácné revertanty tvoří květy, tj. mutace může být způsobena transpozonem

WT flo-613



Flo-

Flo+



Flo-613 Flo+ fenotyp

hybridizace – stanovení charakteru genu flo s použitím Flo cDNA jako sondy

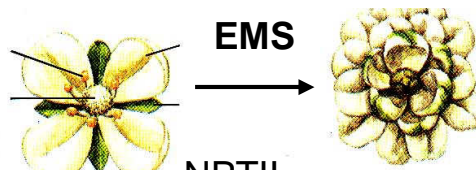
Ztráta Tam3 vede k reverzi, tj. mutace byla způsobena transpozicí

Klonování rostlinných genů po inzerční mutagenезi pomocí T-DNA

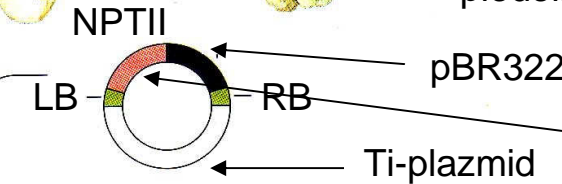
Květ *Arabidopsis* standardního typu: 6 tyčinek, 2 plodolisty, 4 sepala, 4 petala

Zavedení plazmidu do klíčících semen pomocí agrobakteria
Vypěstování rostlin KanR, vizuální identifikace „ag-like“ mutant

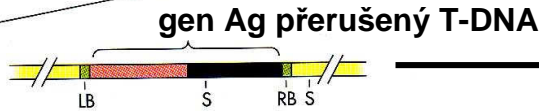
Mutant ag-2 (má vzhled ag-1)



Mutant ag-1 (homeotická mutace)
10 petal (z pestíků), 10 sepal, plodolisty přeměněny v květní lístky

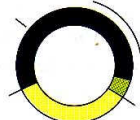


T-DNA



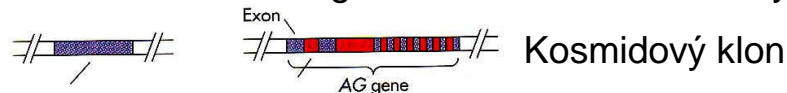
Mutace ag-2 vznikla začleněním T-DNA do rostliny

Izolace celkové DNA, štěpení RE v místech S, ligace, transformace *E. coli* („plasmid rescue“ – naklonování části genu AG)



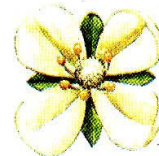
Úseky genu Ag ohraničující začleněnou T-DNA

Příprava sondy a detekce wt-genu AG v genové knihovně wt-rostliny



Zjištění funkce: cDNA klon – sekvence genu Ag kódující TF SRF a MCM1

Zavedení genu AG (wt) do mutantu ag-2



Vnesený gen AG komplementuje mutaci ag-2, rostlina tvoří květy wt typu

Identifikace a izolace rostlinných genů genovou aktivací

- Do rostlinného genomu je pomocí T-DNA vnesena **regulační oblast s aktivační funkcí (zesilovač transkripce nebo silný konstitutivní promotor)**
- jelikož většina rostlinných genů není exprimována konstitutivně (jsou regulovány pletivově-, orgánově- nebo vývojově specifickými signály nebo podněty z vnějšku), **dojde po navození aktivace „tichých“ genů k viditelné změně fenotypu rostliny**
- **Příklad: aktivace genů pro tvorbu auxinu (růst protoplastů na mediu bez auxinu – přežívají jen ty buňky, u nichž došlo k začlenění T-DNA se zesilovačem transkripce do blízkosti auxinového genu)**

Problémy spojené s přenosem genů do rostlin a jejich expresí

- integrace cizích genů a sekvencí do rostlinného genomu je většinou náhodná – dochází i k integraci do heterochromatinu a pozičnímu efektu, kdy se exprese transgenů postupně snižuje a po několika generacích se zcela inaktivuje (i když je v genomu).
- geny jsou často umlčovány – silencing (např. metylací)
- nastává degradace RNA (transkriptů) – RNázy, interference apod.
- dochází k sestřihu i mimo standardní signály sestřihu, např. i v oblastech, kde je hodně uridinu.
- odlišné využívání kodonů, chybění tRNA.

Cílená integrace genů (gene targeting) homologní rekombinací k záměně standardních genů za mutačně pozměněné – nízké frekvence – 10^{-5} až 10^{-4}

(Experimentálně se HR sleduje v systému protoplastů, což umožňuje sledovat statisíce buněk najednou.)

Ztráta aktivity transgenu

- transgen je přítomen, ale od počátku není aktivní
- postupná ztráta aktivity transgenu
- postupná ztráta nejen transgenu, ale i homologického genu rostliny

Normálně je v daném pletivu aktivní asi $\frac{1}{4}$ genů, ostatní jsou spící (silent genes)

Procesy RNAi (RNA interference) – obrana proti virům a retroelementům.

Ztráta aktivity transgenu

Lze rozlišit několik typů ztráty aktivity (umlčování) transgenů:

- **Polohový (poziční) efekt**, známý z klasické genetiky – lokalizace na chromozomu rozhoduje o aktivitě genu.
- **Kosuprese – epigenetická inaktivace**. Zahrnuje vztahy mezi DNA-DNA, DNA-RNA a RNA-RNA. Podstatou je **hybridizace homologních oblastí**. Uplatňuje se hlavně při větším počtu kopií transgenu. Ang. HDGS: homology dependent gene silencing. Dělí se na dva typy:
 - **transkripční inaktivace (TGS)** – k transkripci nedochází. Geny získávají metastabilní stav, se změněným obrazem metylace a změněnou strukturou chromatinu.
 - **posttranskripční inaktivace (PTGS)** – k transkripci dochází, ale mRNA se v cytoplazmě neobjevuje. Dochází k degradaci většiny mRNA, která je dostatečně shodná se sekvencí, jež je příčinou PTGS. Zdá se, že předmětem působení nukleáz jsou dsRNA – ty vznikají tak, že se transgen začlení v několika kopiích a některé jsou obráceně orientované, čímž vzniká antisense RNA. Někdy může transkripce přepsat endogen a následně jednu kopii transgenu nacházející se v opačné orientaci – tím bude potlačena exprese endogenu. U rostlin existuje enzym RNA-dependentní RNA polymeráza, která transkribuje dsRNA za vzniku krátkých RNA, které jsou jak sense tak antisense. Spojují se s RNA a tím ji označí pro RNAázy jako RNA, která má být degradována.

Ztráta aktivity transgenu

- Zvláštností PTGS u rostlin je její schopnost se šířit po rostlině a působit sekvenčně specificky, takže jsou inaktivovány jen homologické geny s transgenem, který inicioval inaktivaci. Inaktivace (**systeme acquired silencing, SAS**) je založena na signálních molekulách (asi RNA), které putují z jedné buňky do druhé prostřednictvím plasmodesmat nebo na dlouhé vzdálenosti floemem (pokusy s roubováním – změna barev u květů rostlin). **Pravděpodobná příčina: RNAi**
- Další změny mohou být navozeny metylací, která vede ke změnám transkripce transgenů.

Praktické aplikace: Možnosti genových manipulací u rostlin

- **Analýza genomu: Vytváření mutací inzerční mutagenézí, vyhledávání a izolace genů, promotorů, zesilovačů transkripce**
- **Vnášení nových genů ovlivňujících agronomické a agrotechnické vlastnosti rostlin**
- **Vnášení nových genů pro produkci cizorodých látek**
- **Potlačení exprese genů pomocí GI-konstruků**

Využití genového inženýrství u rostlin

A. Potravinový a krmivový

- *Ovlivňování agronomických vlastností*
 - rezistence k herbicidům,
 - rezistence k patogenům (hmyzu, virům, plísním apod.)
 - tolerance ke stresům
(vodní stres – sucho, mráz; osmotický stres – zasolení půd)
- *Modifikace posklizňových vlastností*
 - prodloužení skladovatelnosti
 - zpomalení zrání a navození rezistence k skládkovým chorobám
 - vylepšování nutriční hodnoty a chuti
 - Zvýšení obsahu nedostatkových amk (lysin, metionin)

B. Produkce nových látek a sekundárních metabolitů

- studium a přenos genů pro klíčové enzymy biosyntetických drah
- farmakologické přípravky (vitamíny, vakcíny, protilátky aj).

C. Technické plodiny

- produkce škrobu a olejů pro průmyslové využití
- biodegradovatelné plasty

D. Bioremediace

- Odstraňování škodlivin z prostředí

Some antibodies and antibody fragments that have been produced in plants

Host plant

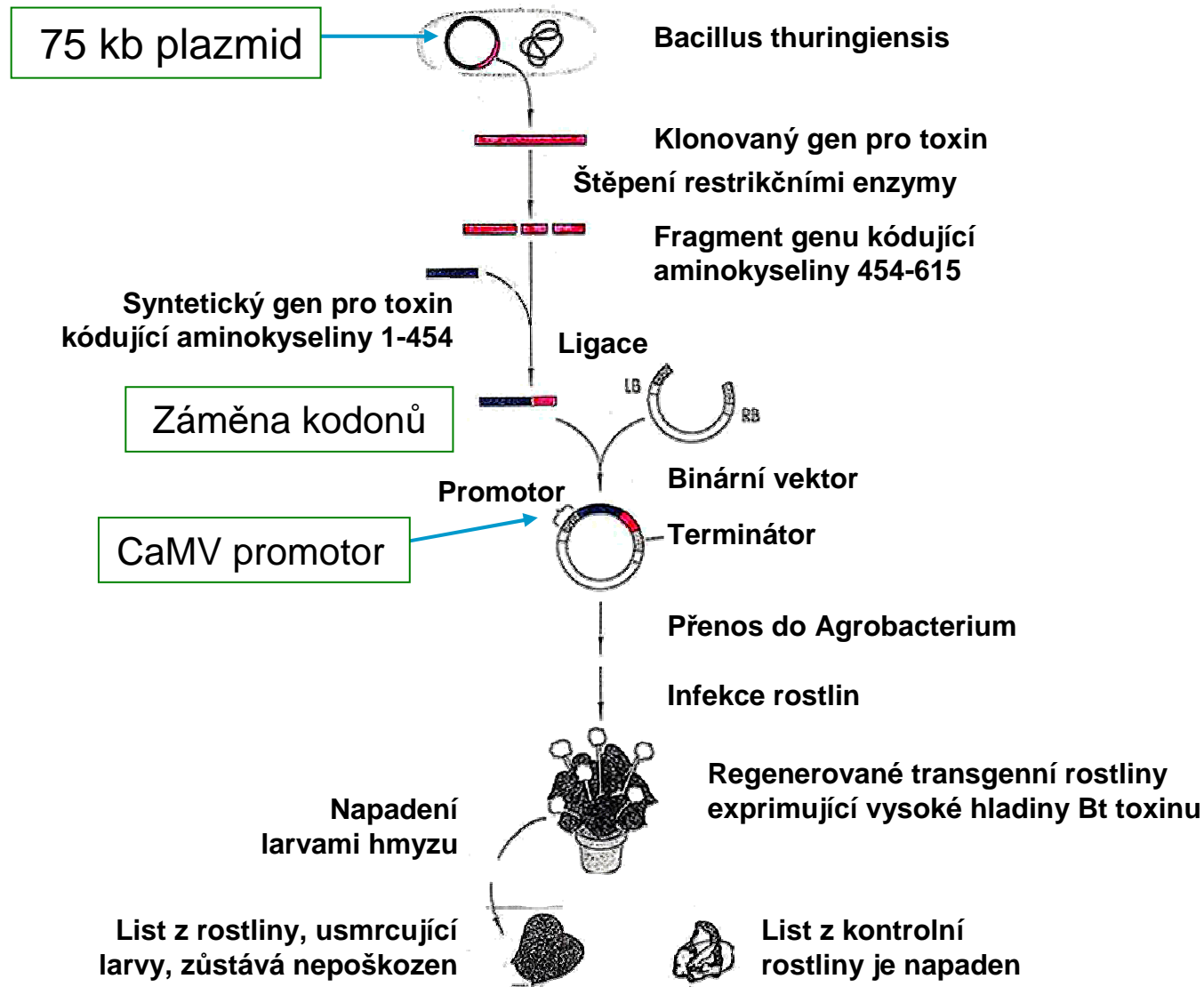
Antigen

Tobacco	Phosphonate ester
Tobacco	(4-Hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl
Tobacco	Phytochrome
Tobacco	Artichoke mottled crinkle virus
Tobacco	Human creatine kinase
Tobacco	<i>Streptococcus mutans</i> cell surface antigen SA I/II
Tobacco	Fungal cutinase
Tobacco	Oxazolone
Tobacco	Abscisic acid
Tobacco	Cell surface protein from mouse B-cell lymphoma
Tobacco	Human carcinoembryonic antigen
Tobacco	Tobacco mosaic virus
Tobacco	Gibberellin
Tobacco	Beet necrotic yellow vein virus coat protein
Tobacco	<i>Stolbar phytoplasma</i> membrane protein
Tobacco	Root rot nematode surface glycoprotein
Petunia	Dihydrofolate reductase
Soybean	Herpes simplex virus
Pea	Abscisic acid
Pea	Human cancer cell surface antigen

Some of the therapeutic agents produced in transgenic plants

Protein	Plant(s)	Application
Human protein C	Tobacco	Anticoagulant
Human hirudin variant 2	Tobacco, canola, Ethiopian mustard	Anticoagulant
Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Tobacco	Neutropenia
Human erythropoietin	Tobacco	Anemia
Human enkephalins	Thale cress, canola	Antihyperanalgesic by opiate activity
Human epidermal growth factor	Tobacco	Wound repair/control of cell proliferation
Human α -interferon	Rice, turnip	Hepatitis C and B
Human serum albumin	Potato, tobacco	Liver cirrhosis
Human hemoglobin	Tobacco	Blood substitute
Human homotrimeric collagen I	Tobacco	Collagen synthesis
Human α 1-antitrypsin	Rice	Cystic fibrosis, liver disease, hemorrhage
Human growth hormone	Tobacco	Dwarfism, wound healing
Human aprotinin	Corn	Trypsin inhibitor for transplantation surgery
Angiotensin-1-converting enzyme	Tobacco, tomato	Hypertension
α -Tricosanthin	Tobacco	HIV therapy
Glucocerebrosidase	Tobacco	Gaucher disease

Rostliny rezistentní k hmyzím škůdcům



Some properties of the insecticidal toxins from various strains of <i>B. thuringiensis</i>			
<i>B. thuringiensis</i> strain or subspecies	Protoxin size (kDa)	Target insects	Serotype
berliner	130-140	Lepidoptera	1
kurstaki KTO, HD-1	130-140	Lepidoptera	3
entomocidus 6.01	130-140	Lepidoptera	6
aizawai 7.29	130-140	Lepidoptera	7
aizawai IC 1	135	Lepidoptera, Diptera	7
kurstaki HD-1	71	Lepidoptera, Diptera	3
tenebrionis (san diego)	66-73	Coleoptera	8
morrisoni PG14	125-145	Diptera	8
israelensis	68	Diptera	14

BT-toxiny - delta toxin ~ Cry proteiny – parasporální krystaly

Mechanismy navozující rezistenci k herbicidům

1. Inhibice příjmu herbicidu
2. Nadprodukce cílového proteinu, na nějž herbicid působí (jeho množství je pak takové, že zajišťuje svou funkci i za přítomnosti herbicidu)
3. Snížení schopnosti cílového proteinu vázat herbicid
4. Vybavit rostliny schopností herbicid metabolicky inaktivovat

Some examples of gene-based herbicide resistance

Herbicide(s)	Mode of development of herbicide resistance
Triazines	Resistance is due to an alteration in the <i>psbA</i> gene, which codes for the target of this herbicide, chloroplast protein D-1.
Sulfonylureas	Genes encoding resistant versions of the enzyme acetolactate synthetase have been introduced into poplar, canola, flax, and rice.
Imidazolinones	Strains with resistant versions of the enzyme acetolactate synthetase have been selected in tissue culture.
Aryloxyphenoxypropionates, cyclohexanediones	These herbicides inhibit the enzyme acetyl coenzyme A carboxylase. Resistance, selected in tissue culture, is due either to an altered enzyme that is not herbicide sensitive or to the degradation of the herbicide.
Glyphosate	Resistance is from overproduction of EPSPS, the target of this herbicide. Resistance has been engineered by transforming soybean with the gene for a glyphosate-resistant EPSPS and tobacco with a glyphosate oxidoreductase gene, which encodes an enzyme that degrades glyphosate.

Some examples of gene-based herbicide resistance

Herbicide(s)

Mode of development of herbicide resistance

Bromoxynil

Resistance to this photosystem II inhibitor has been created by transforming tobacco and cotton plants with a bacterial nitrilase gene, which encodes an enzyme that degrades this herbicide.

Phenoxyacetic acids
(e.g., 2,4-D and 2,4,5-T)

Resistant cotton and tobacco plants have been created by transformation with the *tfdA* gene from *Alcaligenes*, which encodes a dioxygenase that degrades this herbicide.

Glufosinate
(phosphinothricin)

Over 20 different plants have been transformed with either the *bar* gene from *Streptomyces hygroscopicus* or the *pat* gene from *S. viridochromogenes*. The phosphinothricin acetyltransferase that these genes encode detoxifies this herbicide.

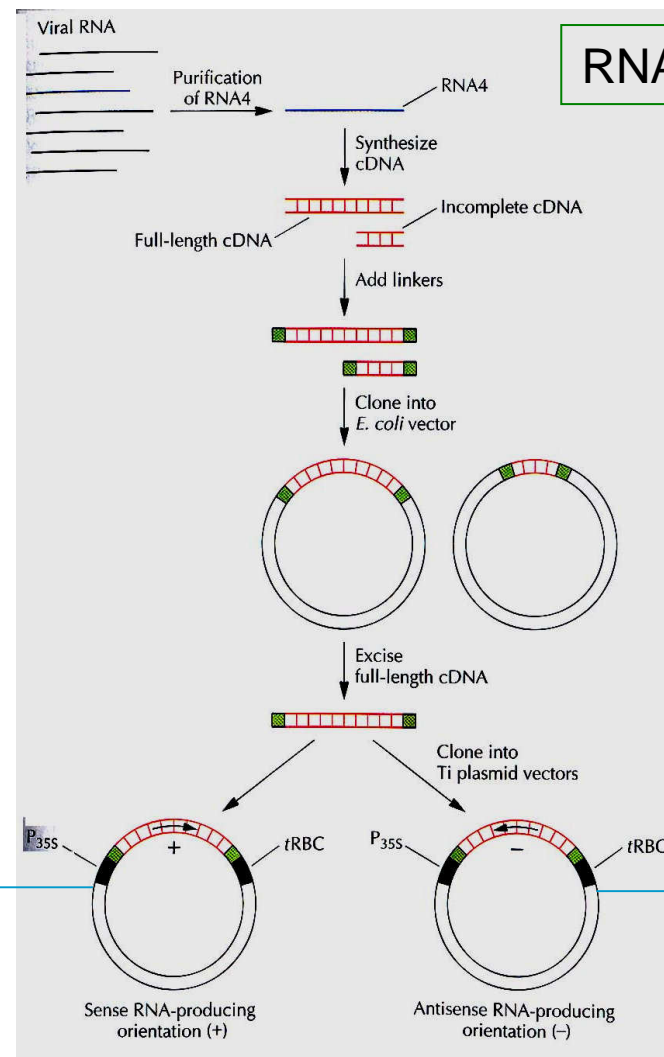
Cyanamide

Resistant tobacco plants were produced when a cyanamide hydratase gene from the fungus *Myrothecium verrucaria* was introduced. The enzyme encoded by this gene converts cyanamide to urea.

Dalapon

Tobacco plants transformed with a dehalogenase gene from *Pseudomonas putida* can detoxify this herbicide.

Zavedení genu pro plášťový protein viru mozaiky okurky do rostlinné buňky



RNA4 kódující plášťový protein

Začlenění cDNA pod kontrolu P35S a tRBC (RUBISCO)

V rostlinách vzniká plášťový protein, rezistence k vysokým koncentracím virů

V rostlinách vzniká antisense RNA – rezistence k nízkým koncentracím virů

Some transgenic plants engineered to have viral coat protein-mediated protection against viral infection

Viral source of coat protein

Transgenic plant

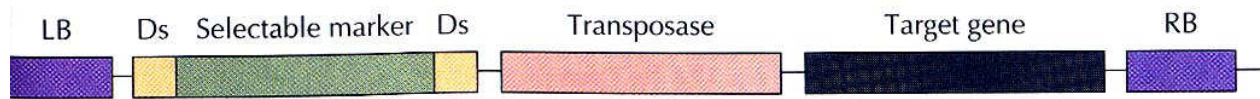
Alfalfa mosaic virus	Alfalfa, tobacco, tomato
Arabis mosaic virus	Tobacco
Beet necrotic yellow vein virus	Sugar beet
Cucumber mosaic virus	Cucumber, tobacco
Cymbidium ringspot virus	Tobacco
Grapevine chrome mosaic virus	Tobacco
Maize dwarf mosaic virus	Sweet corn
Papaya ringspot virus	Papaya, tobacco
Plum pox virus	Tobacco
Potato aucuba mosaic virus	Tobacco
Potato leaf-roll virus	Potato
Potato virus S	Potato
Potato virus X	Potato, tobacco
Potato virus Y	Potato, tobacco
Rice stripe virus	Rice
Soybean mosaic virus	Tobacco
Tobacco etch virus	Tobacco
Tobacco mosaic virus	Tobacco, tomato
Tomato mosaic virus	Tomato
Tomato rattle virus	Tobacco
Tomato streak virus	Tobacco
Tomato spotted wilt virus	Tobacco
Watermelon mosaic virus II	Tobacco
Zucchini yellow mosaic virus	Muskmelon, tobacco

Způsoby odstraňování selekčních markerů z DNA

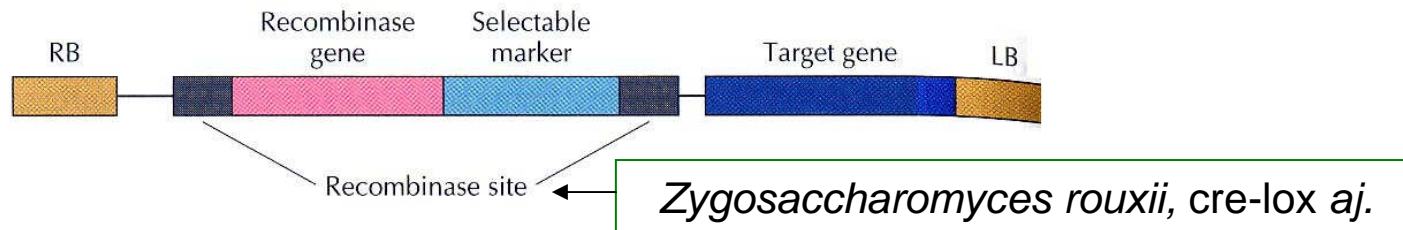
1. Kotransformace selekčního markeru a genu zájmu, křížení potomstva → segregace genů



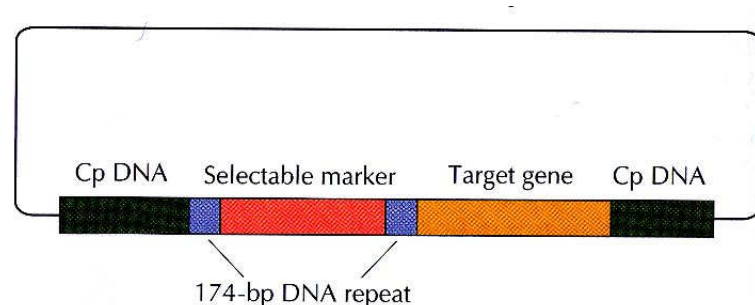
2. Selekční marker je transponován do jiného místa v genomu, pak křížení potomstva



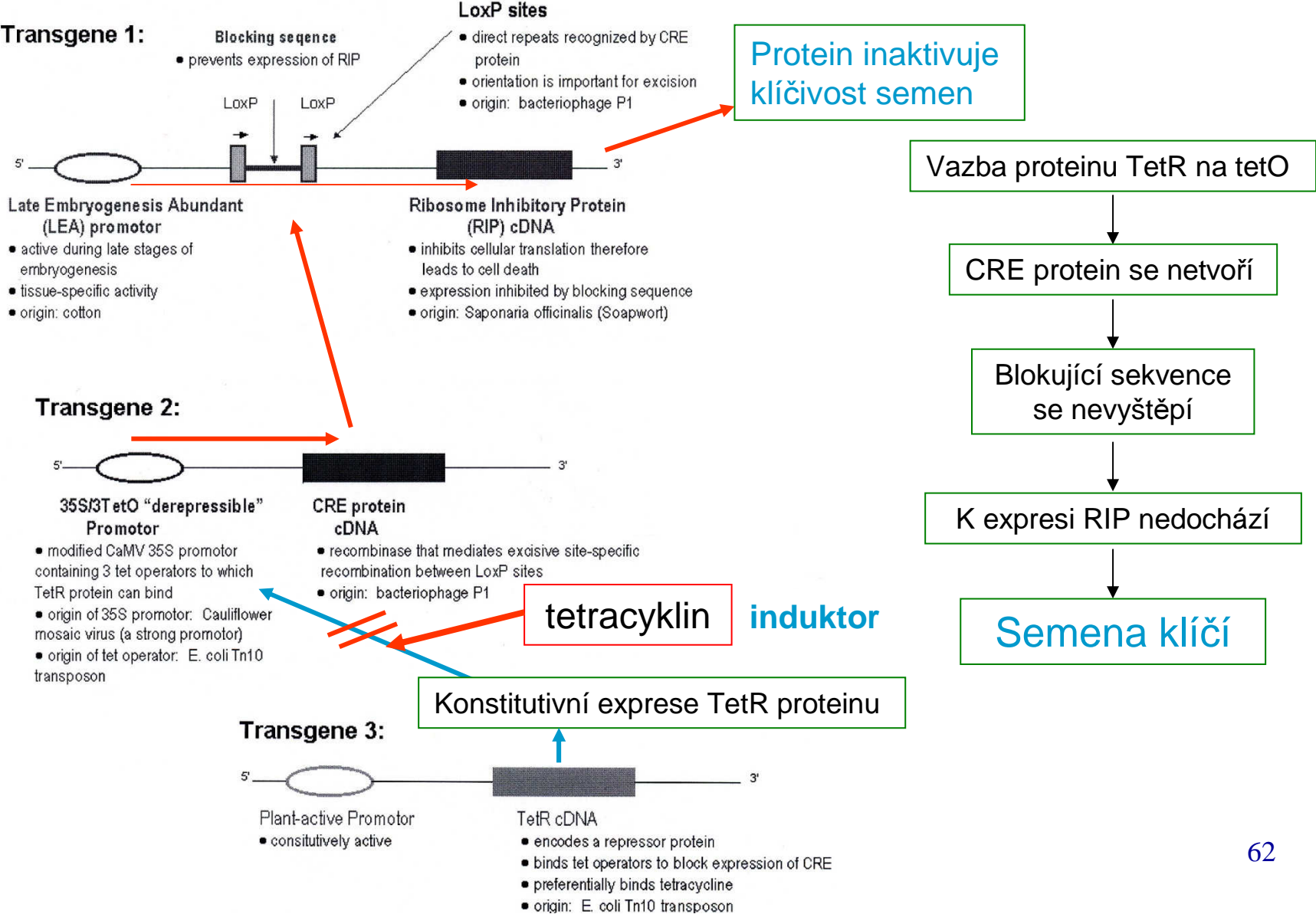
3. Po selekci transformovaných rostlin je selekční marker při další kultivaci vyčleněn



4. Po začlenění plazmidu do chloroplastové DNA homologní rekombinací je při následné kultivaci bez selekčního tlaku selekční marker odstraněn **homologní rekombinací** mezi 174 bp-DR



Terminátorový systém vedoucí k neklíčivosti semen

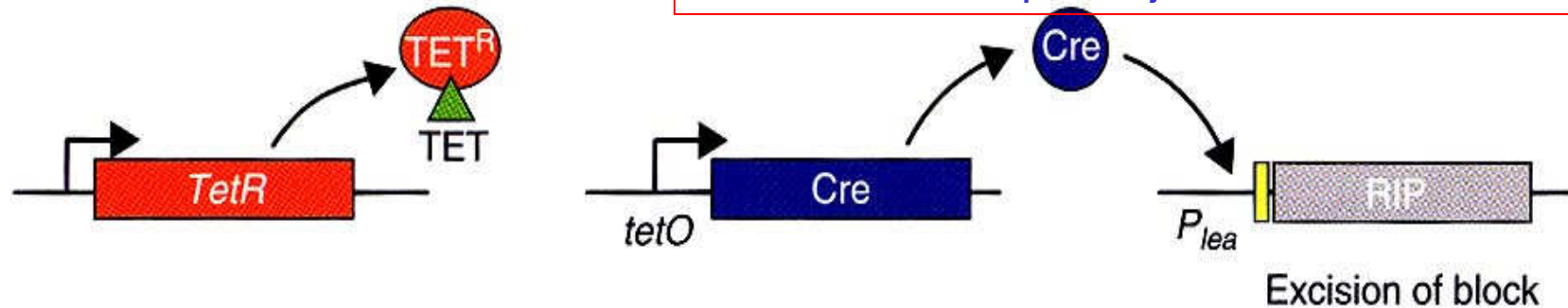


Terminátorová technologie pro přípravu sterilních semen

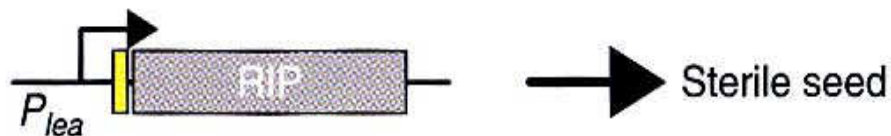
— Tetracycline (producer)



+ Tetracycline (soak seeds before sale)



— Tetracycline (farmer)



Farmář vypěstuje ze semen rostliny, ale semena těchto rostlin jsou sterilní

Metoda využívá 3 transkripčních funkčně spjatých jednotek.

První obsahuje segment kódující RIP (ribozomový inhibiční protein), jehož exprese vede k pletivově-specifické inhibici translace. Exprese RIP je řízena dvěma mechanismy:

- a) použitím dočasně aktivního promotoru LEA (late embryogenesis abundant). Tento promotor se stává aktivní jen v pozdním stadiu embryogeneze semen, čímž je exprese RIP omezena nejen na embryonální pletivo, ale je omezena též na určité stadium jeho vývoje. Aby se umožnila germinace (klíčení) rostlin, obsahuje tento gen blokuující sekvenci umístěnou mezi promotor a RIP sekvenci. Přítomnost této sekvence zabraňuje expresi letálního fenotypu, což umožňuje distributorům opakovaně pěstovat tyto rostliny před prodejem semen farmářům.
- b) místně specifický rekombinanční systém CRE/LOX odvozený z fága P1 zprostředkuje odstranění blokuující sekvence a tím expresi RIP-proteinu.

Druhá transkripční jednotka kóduje CRE protein a je pod kontrolou reprimovatelného promotoru tetO. Kontrola tohoto promotoru je zprostředkována systémem Tn10 (třetí TJ). Navození exprese CRE a tím indukce exprese RIP je dosaženo externím stimulem, jímž je tetracyklin. Tetracyklin se váže na TetR represor, tím jej uvolňuje z promotorového místa tetO, což vede k expresi CRE proteinu.

Když se na semena působí tetracyklinem hned po skončení embryogeneze (tj. po časovém období, v němž je RIP exprimován), umožní se klíčení semen a vznik dospělých rostlin, které budou tvořit semena exprimující RIP, v důsledku čehož budou tato semena sterilní.

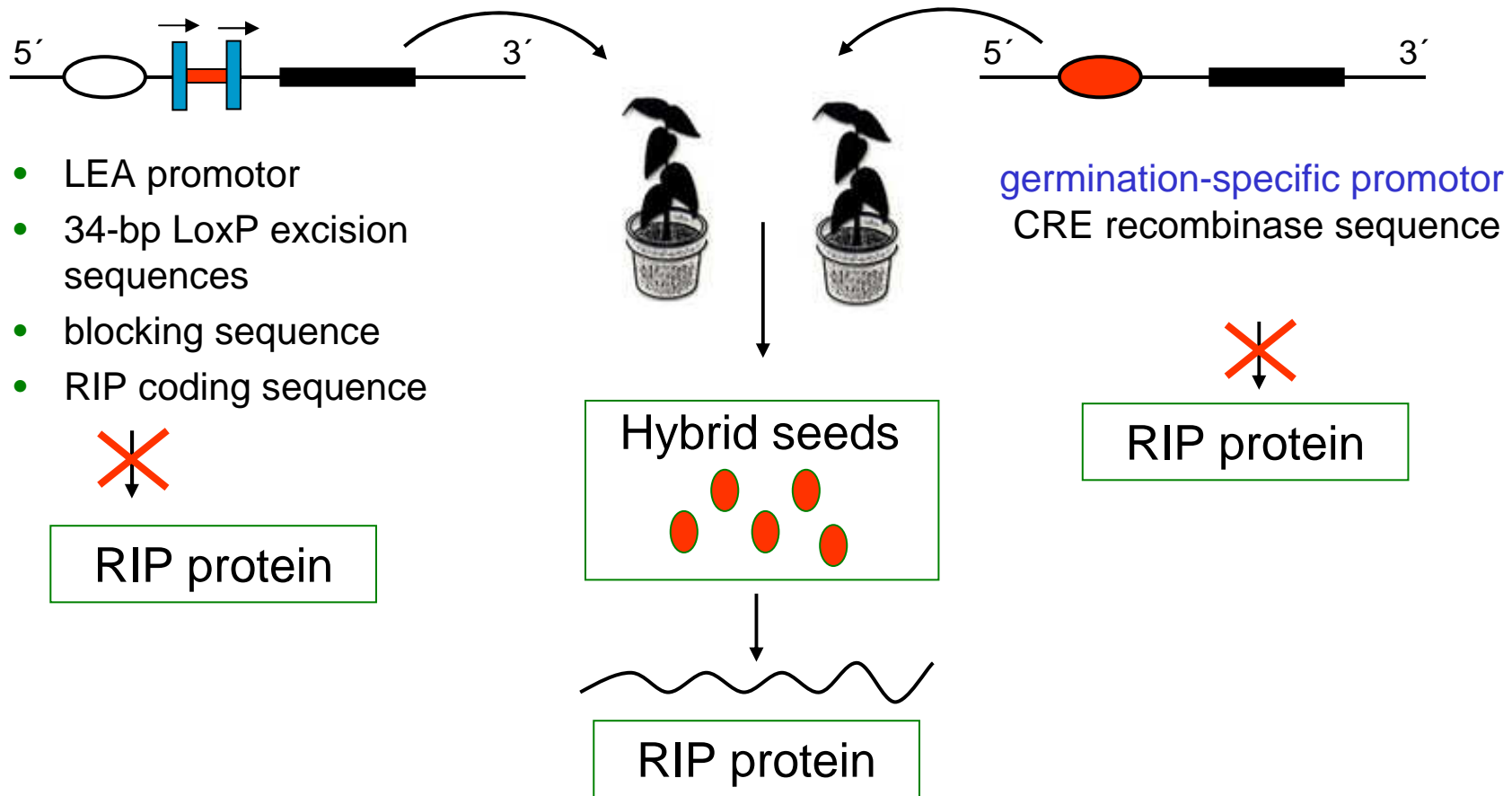
System pro navození samčí sterility

barnáza – bakteriální ribonukleáza (B. amyloliquefaciens)

barstar – inhibitor barnázy

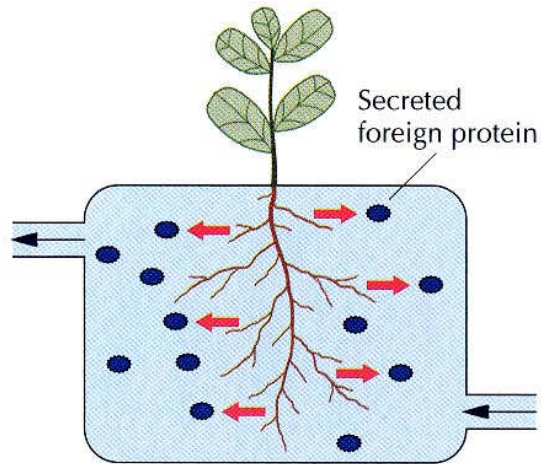
Method 2: Creation of sterile, hybrid plants

Involves cross-breeding of 2 fertile transgenic, parental plants containing the following transgenes:



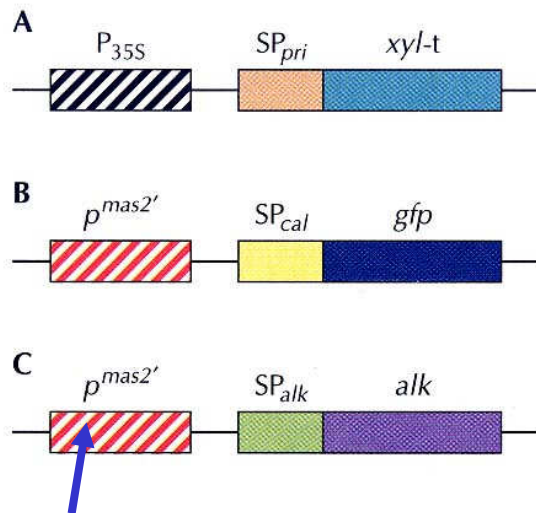
CRE expressed after embryogenesis, so hybrid seeds survive

Dosažení sekrece proteinů kořeny rostlin



„Rhizosekrece“ – Hydroponická kultura transgenní rostliny sekretující cizorodý protein do apoplastu buněk a následně do prostředí

Normálně sekretované: nízkomolekulární látky (aa + cukry) – kořenné exudáty (výživa bakterií)



$P^{mas2'}$ = mannopin-syntáza

Experimentálně dosažená exkrece různých proteinů v kořenech rostlin

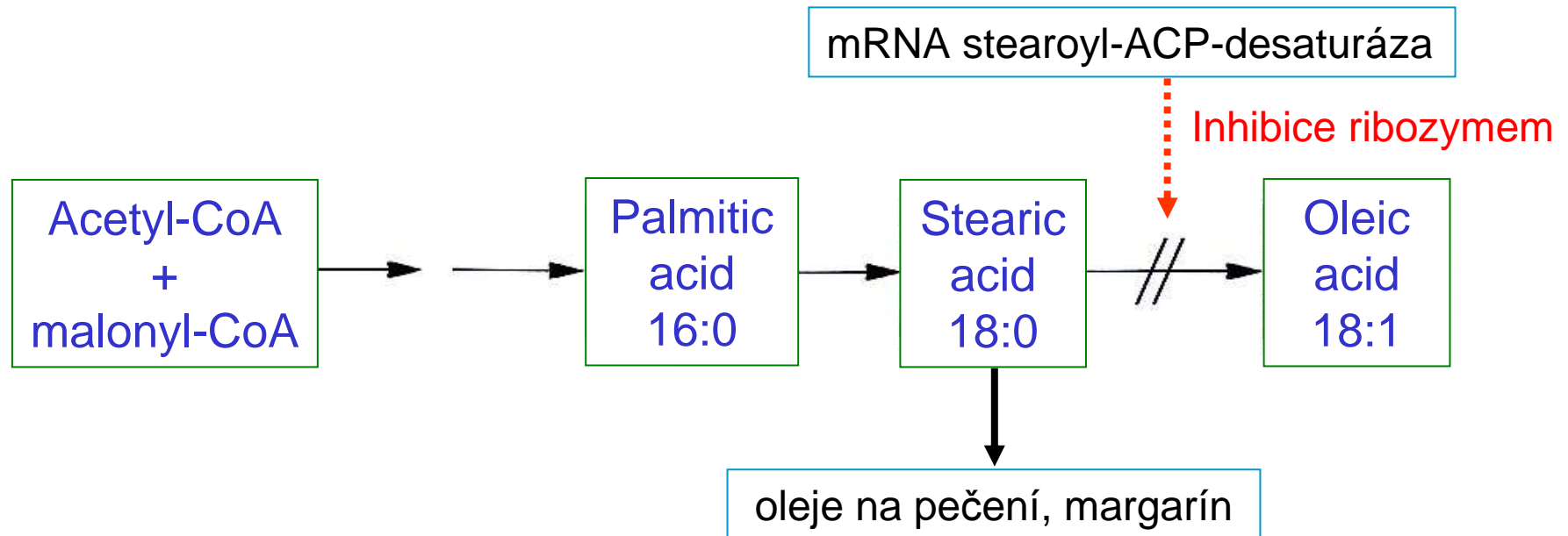
A, B. Signální peptid proteinázového inhibitoru tabáku

C. Signální peptid lidské alkalické fosfatázy

Listové exudáty (gutace)

Cílené změny exprese mRNA

Modifikace biosyntetické dráhy mastných kyselin u kukuřice



Inhibice exprese mRNA:

1. Dodání přídatné kopie genu (kosuprese)
2. Vložení antisense-verze genu
3. Použití ribozymů se sekvenčně-specifickou endoribonukleázovou aktivitou

Potenciální rizika spojená s pěstováním transgenních rostlin

1. Nepříznivý vliv genů pro rezistenci k antibiotikům používaných jako selekční markery
2. Vznik nových druhů plevelů, zvýšení plevelného charakteru současných plevelů
3. Vznik nových typů rostlinných virů nebo viroidů jako důsledek rekombinace s viry používanými pro přenos transgenu (transenkapsidace)
4. Produkce látek toxických nebo alergenních pro člověka, zvířata nebo přírodní společenstva

