

Legendy k vybraným obrázkům:

Stabilní transformace chloroplastů (plastidů) tabáku. Na plazmidu je přenášen gen pro 16S rRNA. Buňky, které exprimují tuto variantu rRNA budou zelené a SpectR a strR.

Po bombardování byl list rozdělen a rezistentní kalusy byly regenerovány (byla však poměrně vysoká proporce SpR kalusů z nebombardovaných listů). Aby se identifikovaly rostliny obsahující plazmidovou DNA (tj. s transformovanými chloroplasty), byla DNA z SpR rostlin skrínována Southernem na přítomnost PstI místa, které bylo začleněno do klonované DNA poblíž genu pro 16S rRNA. Chloroplastová DNA byla izolována z každé rostliny, štěpena HindIII a PstI, nanesena na elfo, přenesena na nitrocelulózu a probována s 16S-rRNA genovým fragmentem. DNA wt ukázala jeden pruh 6,2 kb, A a B rovněž (spontánní mutanti), C dal 2 hybridizační bandy 1.8 a 4.4 kb, což odpovídá novému místu PstI - tyto chloroplasty mají integrovanou mutantní 16S rRNA. U těchto nebyla přítomna wtDNA, která byla asi odstraněna homologní rekombinací. 3 z 56 transformantů byly mutanty. Tyto 3 byly také strR, který nebyl použit k selekci.

Klonování rostlinného genu metodou transpozon-tagging. Antirrhinum přirozeně obsahuje 3,5 kb transpozon Tam3. Rostliny, obsahující tento Tn byly pěstovány za podmínek umožňujících transpozici (15°C).

40 000 rostlin F2 bylo prozkoumáno vizuálně na fenotyp s ovlivněným vývojem květů a morfologií. Jeden z nich - flo 613, nevyvíjel květy.

DNA z wt (Flo+) a flo-613 (Flo-) byly vyizolovány a štěpeny HindIII a probovány s probou Tam3 (naklonovaná do plazmidu) Southernem.

Mutant flo-613 obsahoval nový fragment 7,5 kb (jelikož tyto rostliny obsahují řadu Tam3 kopií, bylo hybridizujících fragmentů více. Tento 7,5 kb HindIII fragment byl klonován skrínem genové knihovny z flo-613 s použitím Tam3 jako sondy (?). Genomová DNA ohraničující inzertovaný Tam3 byla použita jako proba ke klonu cDNA z wt rostlinné cDNA knihovny. Předpovězená proteinová sekvence nebyla z wt cDNA nebyla příbuzná k žádnému známému proteinu.

Příležitostně mohou vznikat reverzní květy na mutantní rostlině. Potomstvo z těchto květů obvykle vykázalo jen fenotyp Flo-, ale jedna skupina tvořila jak Flo-, tak Flo+ rostliny (tato reverzní událost musela nastat v zárodečné linii). Southernova analýza DNA z této skupiny potomstva prokázala Flo- rostliny (A,B a C) mající stále 7,5 kb HindIII, ale Flo+ revertant (D) měl normální 4 kb fragment. Prozkoumání DNA z těchto Flo+ revertantů ukázalo, že Tam3 byl excidován tak, že byl zachován Flo čtecí rámeček.

Klonování rostlinných genů T-DNA inzerční mutagenézou

Arabidopsis má květy složené ze čtyř sepal, čtyř petal, 2 plodolistů a šesti tyčinek.

Mutantní rostlina ag-1 byla připravena působením EMS a vykázala květy s mnoha vrstvami sepal a tepal. Podobně vypadající mutant ag-2 byl vytvořen inzerční T-DNA mutagenézou. DNA ohraničující inzerci T-DNA byla klonována záchranou (rescuing) plazmidu z ag-2 genové knihovny, v níž byl ag-2 inzertován. T-DNA inzert obsahuje ori E. coli a ApR gen.

SalI neštěpí T-DNA inzert, takže inzert společně s určitými ohraničujícími sekvencemi rostlinné DNA je vyštěpen, když je genomová DNA štěpena tímto enzymem. Po self-ligaci jsou kruhové molekuly transformovány do E. coli, kde se replikují. Pak byla klonovaná genomová DNA izolována a použita jako hybridizační proba k získání cDNA a kosmidu kódujícího wt AG. Když byl kosmid kódující AG zaveden do rostlin ag-2, regenerovaly z transformovaných buněk rostliny s normálními květy. To dalo důkaz, že tento kosmidový klon opravdu obsahoval

gen AG. Předpovězená sekvenční sekvence AG proteinu odvozená ze sekvence cDNA, ukázala homologii k eukaryotickým transkripčním faktorům.

Transformace chloroplastů

(převzato z internetu)

Genové inženýrství rostlin využívající vnášení genů do buněčného jádra je v současné době již vyspělou technologií, která je běžně využívána ať už pro vědecké účely, tak i ke komerčním účelům. Naproti tomu technologie vnášení cizorodých genů do specifického místa chloroplastového chromosomu byla vyvinuta relativně nedávno. Proč byla tato technika vyvíjena, jaké jsou její výhody i omezení si povíme v této přednášce.

Srovnání transformace jádra a chloroplastu

Abychom dosáhli stabilní genetické transformace rostlin, musíme úspěšně realizovat tyto tři kroky: 1) vnesení klonované DNA do vhodné cílové tkáně; 2) selekce buněk, které tuto DNA přijaly a integrovaly do svého genomu; 3) regenerace rostlin schopných dalšího množení nebo pohlavního rozmnožování. To platí pro jadernou i chloroplastovou transformaci.

Podívejme se nejdříve ve stručnosti na **transformaci jadernou**. Zdaleka nejrozšířenější metodou transformace jádra rostlinné buňky je transformace zprostředkovaná baktériemi *Agrobacterium tumefaciens*. Ta byla a stále je široce využívána k transformaci dvouděložných rostlin, avšak jednoděložné bylo obtížné takto transformovat. Transformační systémy však byly postupně zdokonalovány, takže v 2. pol. 80. let se podařilo pomocí *A. tumefaciens* vpravit do buněk kukuřice DNA viru MSV (maize-streak-virus) a byla zjištěna exprese těchto vnesených genů. V letech 1993-94 pak bylo dosaženo *A. tumefaciens* zprostředkované transformace rýže (Hiei *et al.*, Plant Mol. Biol., 35: 205-218, 1997). Účinná transformace kukuřice pomocí *A. tumefaciens* byla popsána v r. 1996 (Ishida *et al.*, Nat. Biotechnol., 14: 745-750, 1996) a pšenice v roce 1997 (Cheng *et al.*, Plant Physiol., 115: 971-980, 1997). Mezitím byly samozřejmě vyvíjeny i další metody transformace, jako např. biolistická metoda, která je velice úspěšnou alternativou k *A. tumefaciens* zprostředkované transformaci u řady rostlinných druhů.

Vývoj byl relativně rychlý a úspěšný, přesto současné techniky transformace jádra rostlinných buněk nepřekonalý určitá omezení. Asi nejvýznamnějším problémem je extrémně veliký rozdíl v úrovni exprese vneseného genu mezi jednotlivými transformanty, z čehož vyplývá nutnost vyprodukovat velké množství transgenních rostlin a mezi nimi testováním vybrat rostliny s nejvyšší úrovní exprese. Tento jev je přisuzován tzv. pozičnímu efektu, přičemž metoda pro řízenou inzerci transgenů do specifických míst jaderného genomu rostlin ještě nebyla vyvinuta. Zmíněná nevýhoda ještě více vystoupí do popředí, jestliže potřebujeme vnést do rostlin více než jeden gen - např. sérii genů kódujících enzymy určité biosyntetické dráhy pro syntézu např. složek buněčné stěny, chlorofylu, aminokyselin atd. Nicméně i toto lze, sice pracně a s obtížemi, překonat, jak ukázal případ tzv. zlaté rýže, která obsahuje hned tři různé transgeny biosyntetické dráhy β -karotenu (Ye *et al.*, Science, 287: 303-305, 2000). Řešením pro vnášení více genů je např. vytvoření T-DNA nesoucí 2 separátní geny, každý s vlastními regulačními sekvencemi. Nicméně poměr jejich exprese může být u různých transformantů různý. To znamená, že klonování několika genů do jediné T-DNA obecně neodstraňuje daný problém proměnlivosti exprese transgenů. Se zajímavým řešením problému přišli Dasgupta *et al.* (Plant J., 16: 107-116, 1998), kteří zkonstruovali a do rostlinné buňky vnesli jediný velký gen kódující

polyprotein skládající se ze tří enzymů. Jednotlivé proteiny byly navzájem odděleny aminokyselinovou sekvencí rozpoznávanou N1a proteasou, která byla jedním ze tří enzymů v polyproteinu. V rostlinách byly detekovány všechny tři peptidy jako enzymaticky aktivní sloučeniny. U bakterií je problém řešen operonovým systémem, který je hojně zachován rovněž v chloroplastech.

Transformace plastidů. Jak víme, v rostlinách existuje několik typů plastidů: (1) chloroplasty (obsahují chlorofyl), (2) chromoplasty (obsahují žluté, oranžové nebo červené karotenoidy), (3) amyloplasty (obsahují škrob), (4) elaioplasty (obsahují oleje), (5) etioplasty (částečně vyvinuté chloroplasty tvořící se při klíčení semen ve tmě) a (6) proplastidy (plastidové prekurzory). Přeměnu fotosyntetizujících chloroplastů do žlutých chromoplastů s karotenoidy můžeme pozorovat např. při zrání banánů, konverze chloroplastů do červených lykopen obsahujících chromoplastů u rajčat. Plastidový genom většiny rostlin je veliký zhruba 50-290 kb a vyskytuje se v každé buňce ve velkém počtu kopií (viz Tab. 1). V plastidech byl nalezen aktivní systém homologní rekombinace, díky němuž existuje plastidový genom ve stavu neustálých inter- i intramolekulárních výměn. Tyto výměny také usnadňují přesné cílení integrace vnášené klonované DNA a její šíření mezi chromozómy daného plastidu. Chloroplastový genom kvetoucích rostlin obsahuje asi 150 genů, zbývající stovky či tisíce plastidových proteinů jsou kódovány jadernými geny. Peptidové složení plastidů lze modifikovat vnesením genů do jaderného genomu, přičemž tyto chimérické geny obsahují N-terminální sekvenci zajišťující transport propeptidu do chloroplastu. Naskýta se proto otázka, proč transformovat plastidy, když proteiny můžeme dostat do specifického kompartmentu plastidu touto cestou. Je to především kvůli zmíněné nevýhodě jaderné transformace - vysoké heterogenitě v úrovni exprese transgenů u jednotlivých transformantů, a dále proto, že exprese transgenů v plastidech je o jeden až dva řády vyšší než exprese transgenů jaderných. Tím jsme se dostali k výhodám transformace plastidů:

a) Plastidy vykazují (až na výjimky) uniparentální přenos, tzn. nejsou přenášeny do další generace pylem. Díky tomu nemohou být transformované plastidy přeneseny do nekulturních příbuzných druhů a vytvořit tak tzv. superplevele, nebo způsobit genetické „znečištění“ jiných plodin.

b) Pomocí transformace plastidů lze řešit problém, kdy plodiny nesoucí transgen pro δ -endotoxin z *Bacillus thuringiensis* v jaderném genomu exprimují tento gen v suboptimální úrovni, což vede rychle k vytvoření rezistentních hmyzích škůdců. Možnosti, jak tento nedostatek překonat, jsou minimálně tři. Jde o podstatné zvýšení exprese genu, vnesení více genů pro různé toxiny (pyramidování) nebo o expresi genu pouze v těch částech rostlin, které jsou nejvíce škůdcem poškozeny, a všechny jsou realizovatelné prostřednictvím transformace chloroplastů (Daniell, Nat. Biotechnol., 17: 855-856, 1999). Např. Kole *et al.* (PNAS, 96: 1840-1845, 1999) dokázali plastidovou hyperexpresí nového genu pro δ -endotoxin zničit stoprocentně nejen citlivé škůdce, ale i škůdce, kteří již vykazovali u jaderně transformovaných rostlin vůči tomuto toxinu rezistenci. Další výhodou přítomnosti Bt genu v plastidovém genu je skutečnost, že se tím zabrání toxickému účinku pylu z transgenních rostlin na jiné hmyzí druhy (známý případ motýla monarcha stěhovavý), neboť pyl díky absenci chloroplastové DNA žádný toxin neobsahuje. To, že toxin v pylu plastidově transformovaných rostlin není vůbec obsažen, bylo ukázáno v r. 2000, přičemž v listech těchto rostlin bylo až 47 % (!) všech rozpustných bílkovin tvořeno právě tímto toxinem (De Cosa *et al.*, Nat. Biotechnol., 19: 71-74, 2000).

Stručná historie transformace chloroplastů

Myšlenka transformovat chloroplasty se objevila v 1. polovině 80. let minulého století. Metodicky však tato doba ještě moc neumožňovala, takže výzkum se soustředil na modely s jediným velkým chloroplastem - *Chlamydomonas reinhardtii*. Boynton *et al.* (Science, 240: 1534-1538, 1988; Genetics, 126: 875-888, 1990) dokázali, že všechny kopie chloroplastové DNA chloroplastu *C. reinhardtii* mohou po použití biolistickej metody obsahovat jimi vnesenou klonovanou DNA. Byly to

pionýrské práce, které stanovily základní předpoklady a pravidla pro transformaci chloroplastů. Daniell *et al.* (PNAS, 84: 6349-6353, 1987) sice již o rok dříve publikovali práci dotýkající se transformace plastidů, ale tam šlo o studium příjmu a exprese bakteriálních a cyanobakteriálních genů jen v izolovaných etioplastech okurky. Základní metodou transformace plastidů se stala biolistická metoda a postupně byly vytvářeny vektory pro transformaci chloroplastů dvouděložných rostlin (Daniell *et al.*, PNAS, 87: 88-92, 1990, transientní exprese v chloroplastech tabáku) i jednoděložných rostlin (Daniell *et al.*, Plant Cell Rep., 9: 615-619, 1991, transientní exprese v chloroplastech listů a kalusů pšenice). Výraznější úspěchy stabilní integrace transgenů do chloroplastu lze pak datovat do nedávné doby, tj. asi do polovina 90. let.

Vedle biolistické metody byla k transformaci chloroplastů v izolovaných protoplastech využita metoda za použití PEGu (Biotechnology, 11: 95-97, 1993; Plant J., 3: 729-738, 1993). Tato metoda má však nižší účinnost než biolistická metoda. Poslední alternativou je zatím přímá mikroinjekce DNA do chloroplastu buněk listového mesofylu tabáku (Knoblauch *et al.*, Nat. Biotechnol., 17: 906-909, 1999).

Pro úplnost je pak třeba dodat, že existovaly i úspěšné pokusy o transformaci chloroplastů pomocí bakterií *A. tumefaciens* (De Block *et al.*, EMBO J., 4: 1367-1372, 1985; Venkateswarfu *et al.*, Biotechnology, 9: 1103-1105, 1991). Tyto výsledky se však již nepodařilo nikdy zopakovat.

Metody transformace plastidů

Transformující DNA musí projít buněčnou stěnou a plasmatickou membránou a poté ještě dvojitou membránou plastidů. Následná stabilní integrace se děje pomocí homologní rekombinace mezi plastidovým genomem a úseky plastidového genomu ve vnášené plasmidové DNA. Jako neúčinnější a proto v současné době nejpoužívanější metodou vnášení cizorodé DNA do plastidů se jeví již zmiňovaná biolistická metoda. Přehled úspěšných transformací chloroplastů podává Tabulka 3 (Daniell *et al.*, 7: 84-91, 2002). Z nich valná většina byla dosažena právě biolistickou metodou.

Příklady transformace plastidů

a) Produkce lidského biologicky aktivního somatotropinu v chloroplastech tabáku (Staub *et al.*, Nat. Biotechnol., 18: 333-338, 2000).

V této práci autoři použili plastidový transformační vektor zobrazený na Obr. 3B. Je vidět, že obsahuje expresní kazetu, v níž je transgen regulován 5' a 3' plastidovými expresními signály, konkrétně promotorem genu *psbA* nebo *rrn* s připojenou RBS (ribosome binding site) sekvencí z leaderu genu *10* bakteriofága T7, resp. 3' stabilizační sekvencí (UTR) z *rps16*. Tato kazeta byla zaklonována do plastidového transformačního vektoru těsně vedle selektovatelného genu *aadA*, zajišťujícího resistenci vůči spectinomycinu resp. streptomycinu (Obr. 3B). Celý tento vektor se v plastidovém genomu integroval homologní rekombinací do oblasti mezi gen *trnV* a operon *rps7/3'-rps12* (Obr. 3C) díky tomu, že části těchto genů byly součástí transformačního vektoru (Obr. 3B). Důkaz, že se jedná o uniformě transformované (homoplasmické) rostliny, byl prováděn po dvou cyklech regenerace a selekce se 300-400 mg l⁻¹ spectinomycinu v médiu (u jaderných transgenů lze použít 40 mg l⁻¹) pomocí Southernovy hybridizace (Obr. 3D). Důležité bylo, že autoři prokázali, že v chloroplastech vznikl biologicky aktivní protein, tj. že po syntéze na ribosomech došlo k vytvoření dvou bisulfidických můstků nezbytných právě k tomu, aby se protein stal aktivním. Obsah proteinu byl velmi vysoký a činil >7 % všech rozpustných bílkovin, tedy zhruba 300x více než v analogickém experimentu využívajícím však jadernou transformaci. Rostliny byly fenotypově normální a fertillní.

Podobně nadějný výsledek získali Daniell *et al.* (J. Mol. Biol., 311: 1001-1009, 2001), když získali integraci nemodifikovaného genu pro β -podjednotku cholerového toxinu (CTB) do genomu tabákových chloroplastů funkční CTB oligomery, a to v množství 4,1 % všech rozpustných bílkovin, tj. 410x více než při jaderné transformaci. Testy prokázali, že tento protein se vázal na příslušný střevní receptor, což znamená, že sbalení a tvorba bisulfidických můstků pentameru CTB proběhla úspěšně i v chloroplastech.

- b) Transplastomické rostliny tabáku bez užití selekce pomocí antibiotik (Daniell *et al.*, Curr. Genet., 39: 109-116, 2001).

Daniell *et al.* publikovali v r. 2001 metodu, kterou lze získat plastidové transformanty bez užití antimetabolitů typu antibiotik při selekci. Univerzální chloroplastový vektor, který zkonstruovali a který směřuje integraci transgenů do oblasti invertovaných opakování, obsahuje takové sekvence chloroplastové DNA, které jsou vysoce konzervativní a mohou být proto užity pro transformaci chloroplastů velké řady vyšších rostlin. Těmito konzervativními sekvencemi jsou geny pro tRNA pro isoleucin (*trnI*) a tRNA pro alanin (*trnA*). Do tohoto vektoru byla vložena expresní kazeta, kde selektovatelným genem nebyl gen zajišťující rezistenci vůči antibiotikům, ale gen pro

ADH (betainaldehyd dehydrogenasu), která zajišťuje konverzi toxického betainaldehydu (BA) na netoxický betainglycin. Druhým transgenem byl gen *aadA*, který zajišťuje rezistenci vůči spectinomycinu resp. streptomycinu a který zde sloužil k porovnání obou typů selekce. Oba geny vytvořily operon ovládaný promotorem Prn genu pro 16S rRNA a regulovaný 3' nepřekládanou oblastí plastidového genu *psbA*. Promotor obsahoval také RBS (ribosome binding site) sekvenci z leaderu plastidového genu *rbcL*, tj. sekvenci zajišťující optimální vazbu chloroplastových ribosomů. Celý proces transformace počínaje vnášením plasmidové DNA pomocí mikroprojektilů a konče přenosem vyselektovaných transgenických rostlin do půdy trval při použití BA 2-3 měsíce, při použití spectinomycinu 3-6 měsíců. Regenerované prýty se objevily při použití BA za 12 dní u 80 % listových disků, a to v počtu až 23 na disk, zatímco při druhém způsobu selekce se regenerované prýty objevily u 15 % disků za 45 dní, a to v počtu 1-2 na disk. Transformační účinnost byla při použití BA 25x vyšší než při použití spectinomycinu. Southernova hybridizace potvrdila stabilní integraci transgenů do genomu plastidů i skutečnost, že v buňkách se vyskytovaly jen transformované plastidy. Rostliny byly fenotypově normální a fertillní.

Závěr

Metoda transformace plastidové (chloroplastové) DNA začíná vyrůstat z plenek a pomalu se stává běžným postupem používaným pro vnášení cizorodých genů do genomu rostlin. Díky četným výhodám je jí věnována velká pozornost, takže se stává stále účinnější a spolehlivější. V současnosti je ohromný potenciál, ať už agronomický nebo průmyslový, exprese transgenů v plastidech stále do značné míry omezen vlastní transformační technologií (i přes zmiňovaný pokrok díky selekci pomocí BA), neboť úspěšně byla aplikována jen u tabáku a příbuzných rostlin. Nicméně lze čekat, že vývoj na tomto poli bude kopírovat vývoj při zavádění jaderných transformačních technologií nebo nověji při hledání účinné transformační metody pro obilniny. Lze se tedy nejlépe nadít dalšího výrazného pokroku.