

Molekulární biotechnologie č.12

Využití poznatků molekulární biotechnologie. Transgenní rostliny.

Využití molekulární biotechnologie – v mnoha oblastech

- Molekulární diagnostika
- Bioremediace a využití biomasy
- Využití škrobu a sacharidů, utilizace celulózy
- Mikrobiální insekticidy
- Baktérie stimulující růst rostlin
- Vakcíny a terapeutické proteiny.
- Využití transgenních mikroorganismů.
- Příprava a využití transgenních rostlin. Nové potraviny.
- Příprava a využití transgenních zvířat.
- Genová terapie lidských somatických buněk.

Transgenní organismy

- Transgenní organismus: Organismus, jehož genom byl geneticky modifikován cizorodou DNA.
- Mikroorganismy
- Rostliny
- Živočichové

Transgenní rostliny

- Pro přenos cizorodých genů do rostlinných buněk se využívá přirozené schopnosti bakterií rodu *Agrobacterium tumefaciens* napadat poraněné rostliny a přenášet do nich část své genetické informace.
- Některé kmeny obsahují Ti plasmid (tumor indukující), jehož část (T DNA) se přenáší z bakteriálních do rostlinných buněk a začleňuje se do náhodných míst v rostlinném genomu.

T DNA (T segment) obsahuje

- Geny zodpovědné za tvorbu fytohormonů (navozují dediferenciaci rostlinných pletiv a jejich transformaci na krčkové nádory).
- Geny, které kódují syntézu opinů.
- Nádorové rostlinné pletivo produkuje opiny do prostředí, kde jsou agrobakteriemi využívány jako zdroj živin.

Schematické znázornění Ti plasmidu

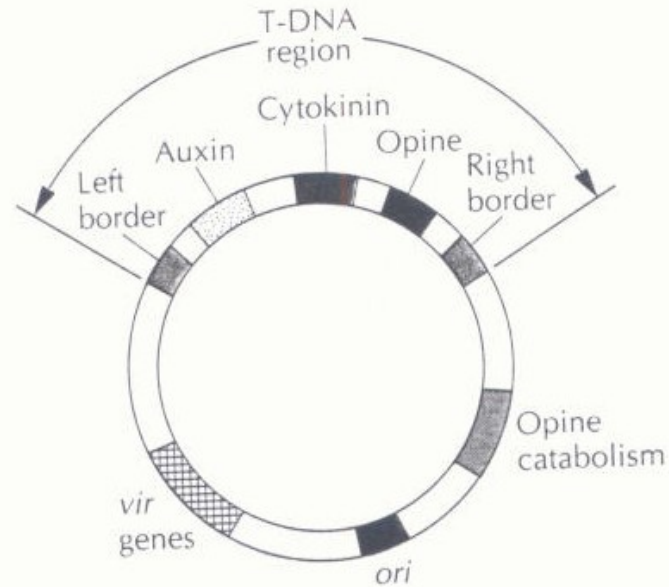


Figure 14.2 Schematic representation of a Ti plasmid. The T-DNA is defined by its left and right borders and includes genes for the biosynthesis of auxin, cytokinin, and an opine; these genes are only transcribed and translated in plant cells. Outside of the T-DNA region, there is a cluster of *vir* genes, a gene(s) that encode enzyme(s) for opine catabolism, and an origin of DNA replication (*ori*), which permits the plasmid to be stably maintained in *Agrobacterium tumefaciens*. None of these features is drawn to scale.

Vektory odvozené z Ti plasmidu

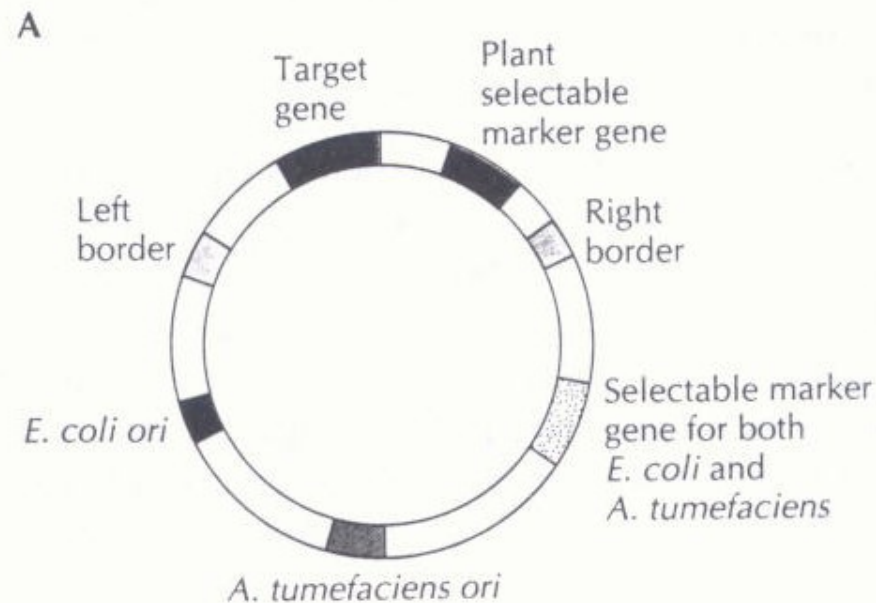
- Se používají pro přenos cizorodých genů do rostlinného genomu
- Ze sekvence T DNA byly odstraněny geny pro tvorbu fytohormonů a opinů a ty jsou nahrazovány při klonování cizorodou DNA (transgenem)

Binární vektorový systém

- Je založen na použití dvou plasmidových vektorů
- Plasmidový vektor typu pBR322 obsahuje: počátek replikace a selekční marker funkční v *E. coli*, modifikovanou sekvenci T-DNA (bez genů pro tvorbu fytohormonů a opinů), v níž byly zachovány hraniční oblasti nezbytné pro její přenos do rostlinných buněk s klonovacím místem pro začlenění cizorodé DNA a selekční marker pro identifikaci rostlinných buněk, do jejichž genomu byla cizorodá DNA začleněna.
- Rekombinantní plasmid se množí v buňkách *E. coli* a pak se konjugací přenese do buněk *Agrobacterium tumefaciens*, v nichž se nachází druhý tzv. pomocný Ti-plasmid.
- Pomocný Ti-plasmid neobsahuje oblast T-DNA (byla z něj odstraněna), poskytuje však všechny funkce nezbytné pro přenos T-DNA z rekombinantního plasmidu do rostlin.

Binární klonovací vektor

Figure 14.5 Two Ti plasmid-derived cloning vector systems. **A.** The binary cloning vector has origins of DNA replication (*ori*) for both *E. coli* and *A. tumefaciens* (or a broad-host-range origin), a selectable marker gene that can be used in either *E. coli* or *A. tumefaciens*, and both a target gene and a plant selectable marker gene inserted between the T-DNA left and right borders. (Figure continues.)



Kointegrační klonovací vektor

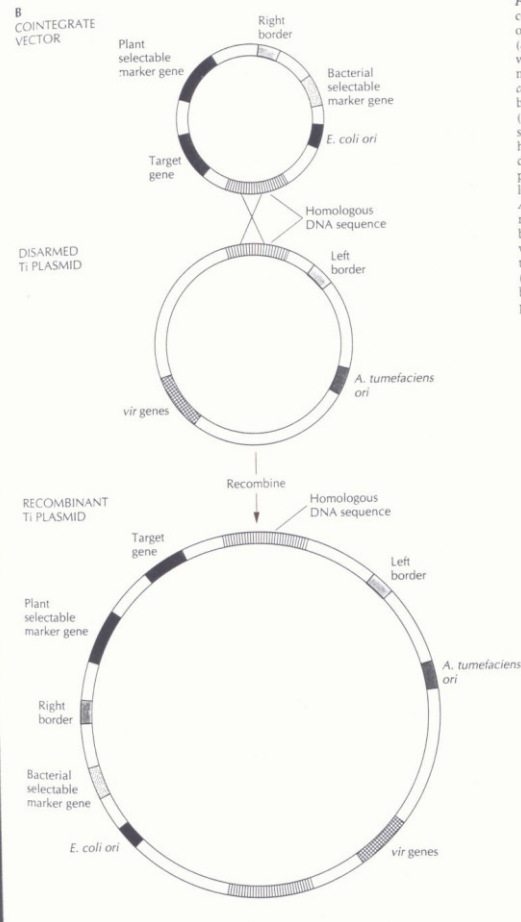


Figure 14.5 (continued) B. The cointegrate cloning vector (top) carries only an *E. coli* origin of replication (and cannot exist autonomously within *A. tumefaciens*), a selectable marker that can be used in either *E. coli* or *A. tumefaciens*, a T-DNA right border, a plant selectable marker (reporter) gene, a target gene, and a sequence of Ti plasmid DNA that is homologous to a segment on the disarmed Ti plasmid. The disarmed Ti plasmid (middle) contains the T-DNA left border, the *vir* gene cluster, and a *A. tumefaciens* origin of DNA replication. Following recombination between the cointegrate cloning vector and the disarmed Ti plasmid, the final recombinant plasmid (bottom) has the T-DNA left and right borders bracketing the cloned and plant reporter genes.

Po infekci rostlinných buněk, kousků pletiv nebo protoplastů

- buňkami *A. tumefaciens* se T-DNA spolu s klonovanou DNA vyčlení z rekombinantního plasmidu a přenese do rostlinné buňky, kde se začlení do některého z chromosomů
- Kultivací těchto buněk v růstových mediích obohacených o rostlinné hormony stimulující růst kořenů a prýtů lze postupně regenerovat celé rostliny.
- Výsledná transgenní rostlina obsahuje transgen ve všech buňkách a přenáší ho do potomstva.

Další vektory pro vnášení genů do rostlin

- Virové vektory (virus zlaté mozaiky rajčete – TGMV, virus mozaiky kvěťáku – CaMV)
 - šíří se rostlinnými pletivy a přenášejí transgen do celé rostliny.

Metody pro vnášení cizorodé DNA do rostlin

Table 14.1 Plant cell DNA-delivery methods.

Method	Comment
Ti plasmid-mediated gene transfer	An excellent and highly effective system that is limited primarily to dicotyledonous plants
Microprojectile bombardment	Used with a wide range of plants and tissues; easy and economical but inefficient in yielding stable integrative events
Viral vectors	Not an effective way to deliver DNA to plant cells
Direct gene transfer into plant protoplasts	Can only be used 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; it requires the services of a highly skilled individual
Electroporation	Its use is generally limited to plant cell protoplasts that can be regenerated into viable plants
Liposome fusion	Can only be used with plant cell protoplasts that can be regenerated into viable plants

Metody vnášení cizorodé DNA do rostlin

- Fyzikální metody – biolistická metoda (nastříkuje se přímo do buněk DNA navázaná na povrchu mikročástic kovu)
- Lipofekce (DNA se obalí vrstvou syntetických lipidů za vzniku částic podobných liposomům)
- Elektroporace
- Mikroinjekce DNA přímo do buněk
- Makroinjekce DNA do rostlinných pletiv

Selekční a reporterové markery

Table 14.2 Plant cell reporter gene systems.

Enzyme activity	Dominant selection	Readily assayed
Neomycin phosphotransferase (Kanamycin kinase)	Yes	Yes
Hygromycin phosphotransferase	Yes	Yes
Dihydrofolate reductase (Tetrahydrofolate dehydrogenase)	Yes	Yes
Chloramphenicol acetyltransferase	Yes	Yes
Gentamycin acetyltransferase	No	Yes
Nopaline synthase	No	Yes
Octopine synthase	No	Yes
β -D-Glucuronidase	Yes	Yes
Streptomycin phosphotransferase	No	Yes
Firefly luciferase	No	Yes
Bacterial luciferase	Yes	Yes
Threonine dehydratase	Yes	No
5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	Yes	Yes
Phosphinothricin acetyltransferase	Yes	No
Acetolactate synthase	Yes	No
Bromoxynil nitrilase	Yes	No

Adapted from Walden and Schell 1990. *Eur. J. Biochem.* **192**:563–576.

Cíle transgenoze u rostlin

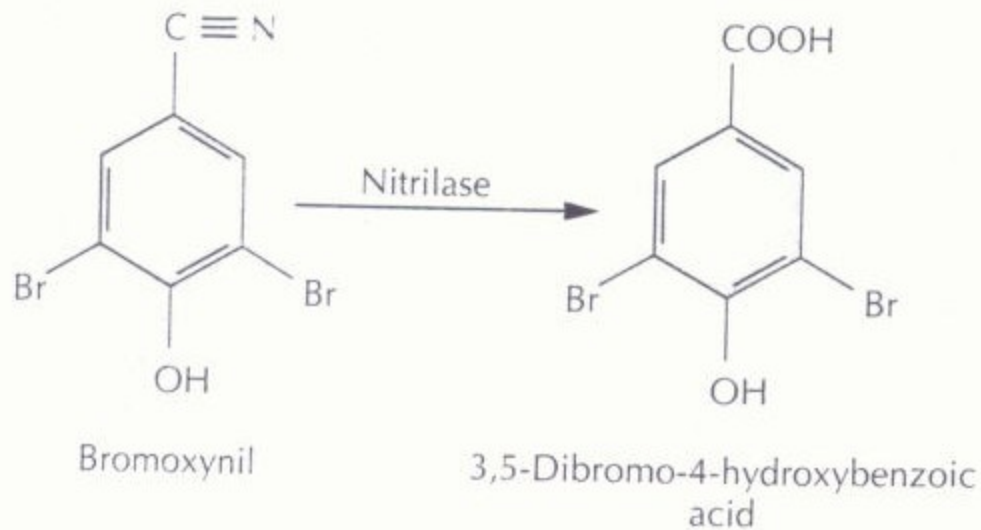
- Ovlivnit vlastnosti, které zvyšují výnosy kulturních rostlin nebo vedou k vyšší kvalitě plodů a semen (rostliny odolné k hmyzím škůdcům, virovým, bakteriálním a houbovým chorobám, nepříznivým podmínkám prostředí jako jsou sucho, mráz, zasolení půd či odolným herbicidům používaným k jejich ochraně před plevely)
- Transgenní odrůdy byly připraveny u mnoha druhů (více jak 50) obilovin, kukuřice, rýže, soji, některých druhů zeleniny, ovoce, řepky olejné, vojtěšky, byly připraveny transgenní dřeviny (smrk, topol)

Příklady transgenních rostlin

- Bt-rostliny (ochrana vůči hmyzím škůdcům, endotoxin toxický pro larvy hmyzu)
- Transgeny odolné vůči virům – odolnost navozena přenosem genu pro tvorbu plášťového proteinu virusu tabákové mozaiky
- Odolnosti vůči herbicidům (např. glyfosát) bylo dosaženo vnesením genů pro enzymy, které herbicid inaktivují nebo zabrání jeho vstupu do buňky a tak k němu učiní rostlinu rezistentní
- Prodloužení trvanlivosti plodů rajčat bylo docíleno pomocí transgenu, jehož účinkem se inaktivuje enzym pektináza, která se podílí na zrání plodů.
- Odolnosti vůči chladu bylo u jahodníku docíleno přenosem genů z ryb. Syntetizuje se protein, který rostlinu ochrání před chladem.

Klonování genu z *Klebsiella ozaenae*

Figure 14.10 Detoxification of the herbicide bromoxynil by the enzyme nitrilase from *Klebsiella ozaenae*.



Klonovací vektor nesoucí Bt toxinový gen

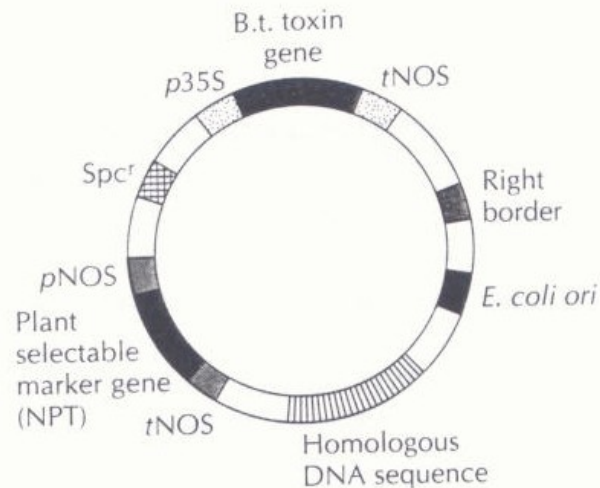


Figure 14.6 Cointegrate cloning vector carrying a *Bacillus thuringiensis* (B.t.) insecticidal toxin gene. The toxin gene is under the control of the strong, constitutive 35S promoter (*p35S*) from cauliflower mosaic virus and the nopaline synthase transcription terminator–polyadenylation site (*tNOS*). The vector has a *E. coli* origin of DNA replication (*ori*), a spectinomycin resistance gene (*Spc^r*), which allows the vector to be maintained and selected in *E. coli* cells, a T-DNA right border, a plant selectable marker gene, and a region of DNA that is homologous to DNA in the disabled Ti plasmid, for integrating the two plasmids. The neomycin phosphotransferase (*NPT*) gene, which acts as a plant reporter gene, is under the transcriptional control of nopaline synthase gene sequences (*pNOS*, *tNOS*), and is used to select for kanamycin-resistant transformed plant cells.

Citlivost rajčat divokého typu a transgenních rajčat k hmyzím škůdcům

Table 14.3 Susceptibility of wild-type and transgenic tomato plants to insect damage.

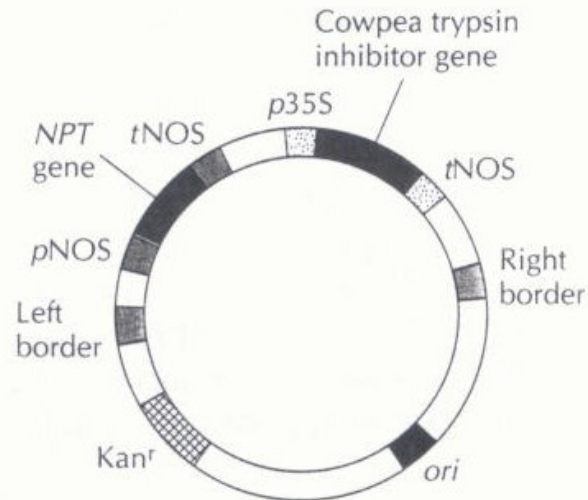
Insect	Percentage of damaged wild-type tomato plants ^a		Percentage of damaged transgenic tomato plants ^a	
	- Insecticide	+ Insecticide	- Insecticide	+ Insecticide
Tobacco hornworm	47.5	3.75	1.25	0.0
Tomato fruitworm	20.1	N.D.	6.4	N.D.
Tomato pinworm	99.7	95.1	94.2	80.4

^a The data are expressed as the percentage of tested plants (in the case of the tobacco hornworm) or fruits (for tomato fruitworm and tomato pinworm) that were damaged. The designation +Insecticide indicates that chemical insecticide was used; - Insecticide means that chemical insecticide was not used. N.D., not determined.

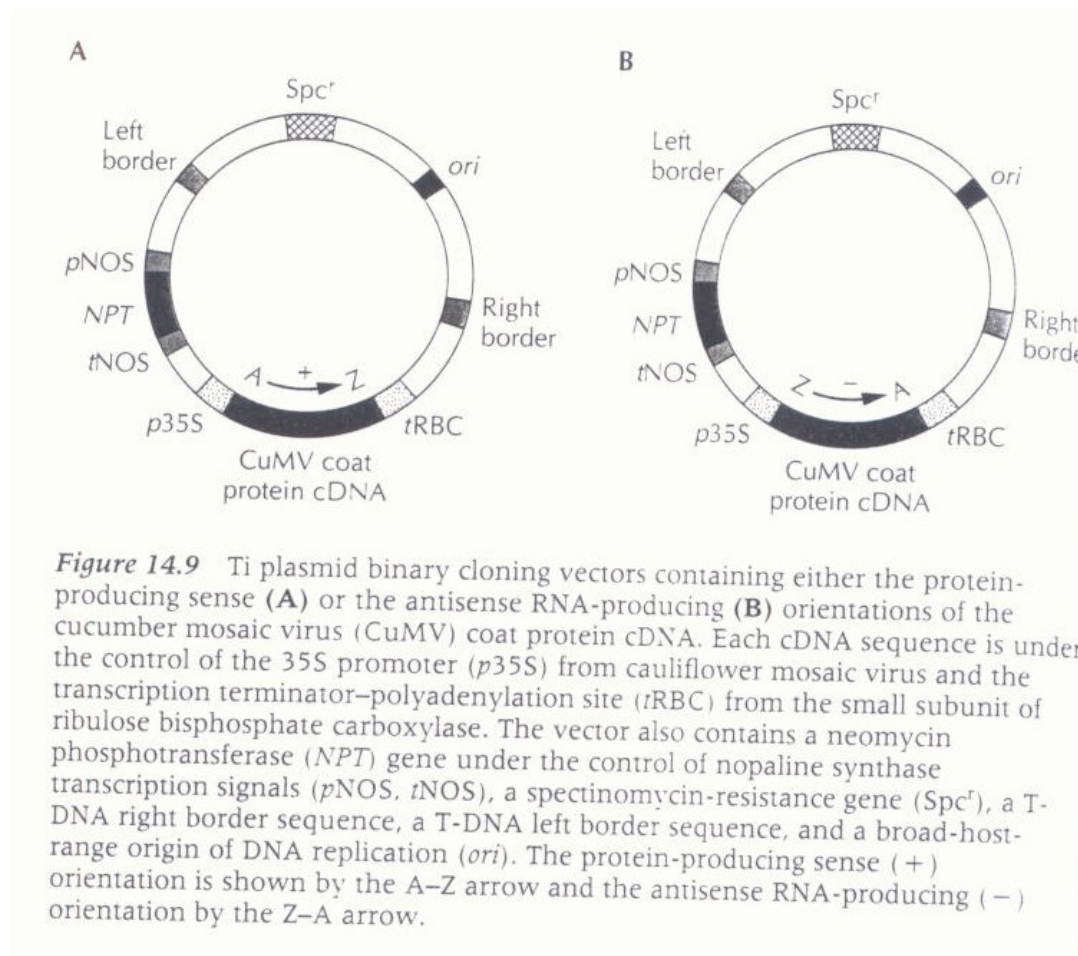
Adapted from Delannay et al. 1989. *Bio/Technology* 7:1265-1269.

Binární klonovací vektor nesoucí cizorodý gen, jehož exprese vede k rezistenci vůči hmyzím škůdcům u hrachoru

Figure 14.7 Binary cloning vector carrying a cowpea trypsin inhibitor gene. The vector contains a broad-host-range origin of DNA replication (*ori*) and a kanamycin-resistance gene (*Kan^r*), which function in both *E. coli* and *A. tumefaciens*. Between the T-DNA left and right borders there are (1) a neomycin phosphotransferase (*NPT*) gene under the transcriptional control of nopaline synthase signals (*pNOS* and *tNOS*), which enables kanamycin-resistant transformed plant cells to be selected, and (2) the cowpea trypsin inhibitor gene, which is under the control of the 35S promoter (*p35S*) from cauliflower mosaic virus and the transcription terminator–polyadenylation region from the nopaline synthase gene (*tNOS*).



Vektory kódující sense a antisens RNA



Průmyslově významné transgenní rostliny

- Slouží jako zdroj nových surovin pro průmysl
- odrůdy řepky olejné s pozměněným složením zásobního oleje v semenech slouží jako surovina pro výrobu mýdel, mazadel, nylonu, bionafty – biologicky degradovatelná, při spalování nevznikají škodlivé látky.
- Transgenní rostliny pro přípravu nových materiálů (biodegradovatelné polymery využitelné jako plasty)
- Transgenní rostliny pro produkci cizorodých látek s farmakologickými účinky (antigeny využitelné jako vakciny vůči bakteriálním a virovým onemocněním), zelenina, v níž se tvoří povrchový antigen virusu hepatitidy B
- Snížení chemizace v zemědělství – snížení pesticidů nebo nahrazení stávajících typů herbicidů takovými, které mají krátkou životnost a jsou k prostředí šetrnější.