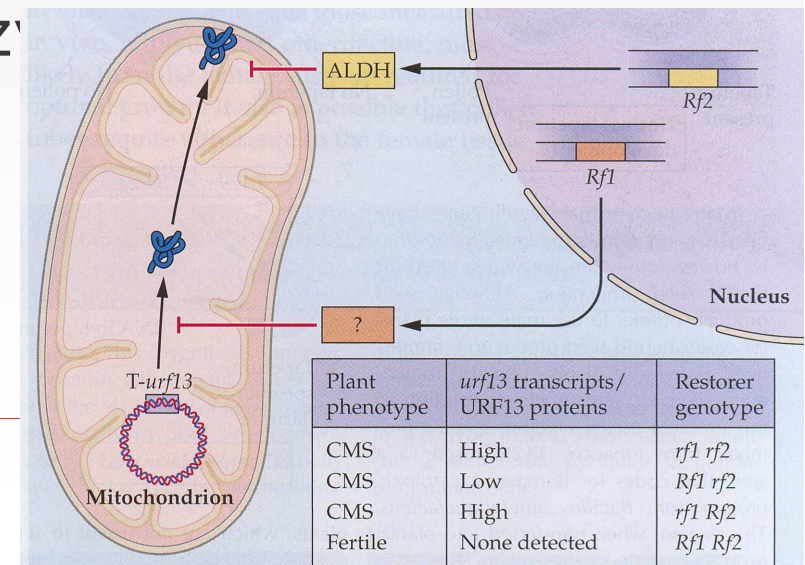


# Mt DNA a cytoplazmatická samčí sterilita (CMS) u rostlin

- ❑ CMS kódována mitochondriálním genomem
- ❑ 150 druhů, 20 čeledí
- ❑ Kukuřice – 3 plazmotypy **cmsT**, **cmsS**, **cmsC**,
- ❑ více jaderných genů obnovy **Rf1**, **Rf2**, **Rf3**, **Rf4** až **Rf8**
- ❑ Mt gen *URF-13* tvoří aldehydy toxické pro mitochondrie buněk tapeta
- ❑ *Rf2* tvorba alkoholdehydrogenáz odstraňuje toxické látky

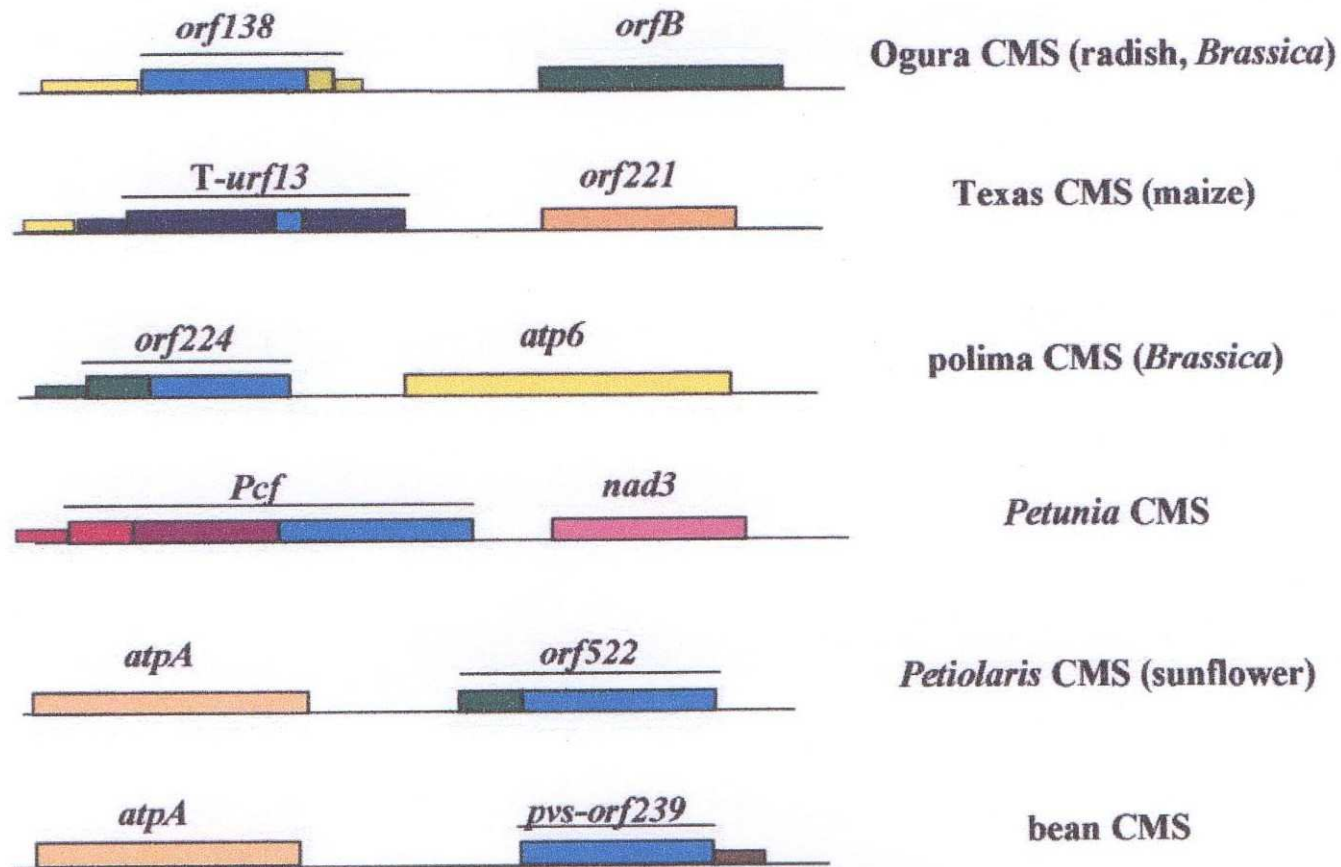
## Využití samčí sterility ve šlechtění

- ❑ Výroba hybridního osiva
- ❑ Heterózní šlechtění



# Klonované mitochondriální geny pro CMS u jednotlivých rostlinných druhů

Chimérický charakter genů – obsahují sekvence z různých genů i jaderných



# Chloroplastové genové inženýrství rostlin

---

## Historie

- ❑ **1980** První introdukce izolovaných chloroplastů do protoplastů
  - ❑ Biolistická metoda transformace (bombardování mikroprojektily)
  - ❑ **1988** První plastidová transformace zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii*
  - ❑ Mutant v genu *atpB* po bombardování mikroprojektily s DNA wt *atpB* genu = introdukovaný gen opravil původní nefunkční gen  
*atpB* – gen pro podjednotku ATP syntázy
  - ❑ Úspěšná komplementace, stabilní integrace do plastidového genomu
-

# *Plastidy rostlin jsou ideálními kandidáty pro genové inženýrství*

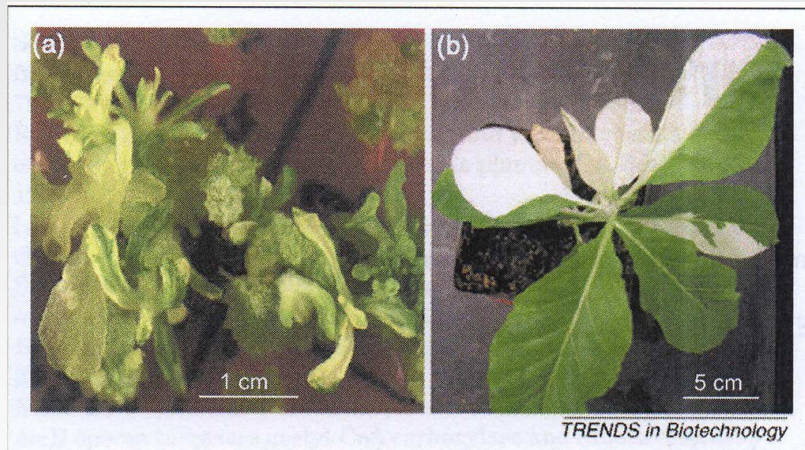
---

## **Výhody**

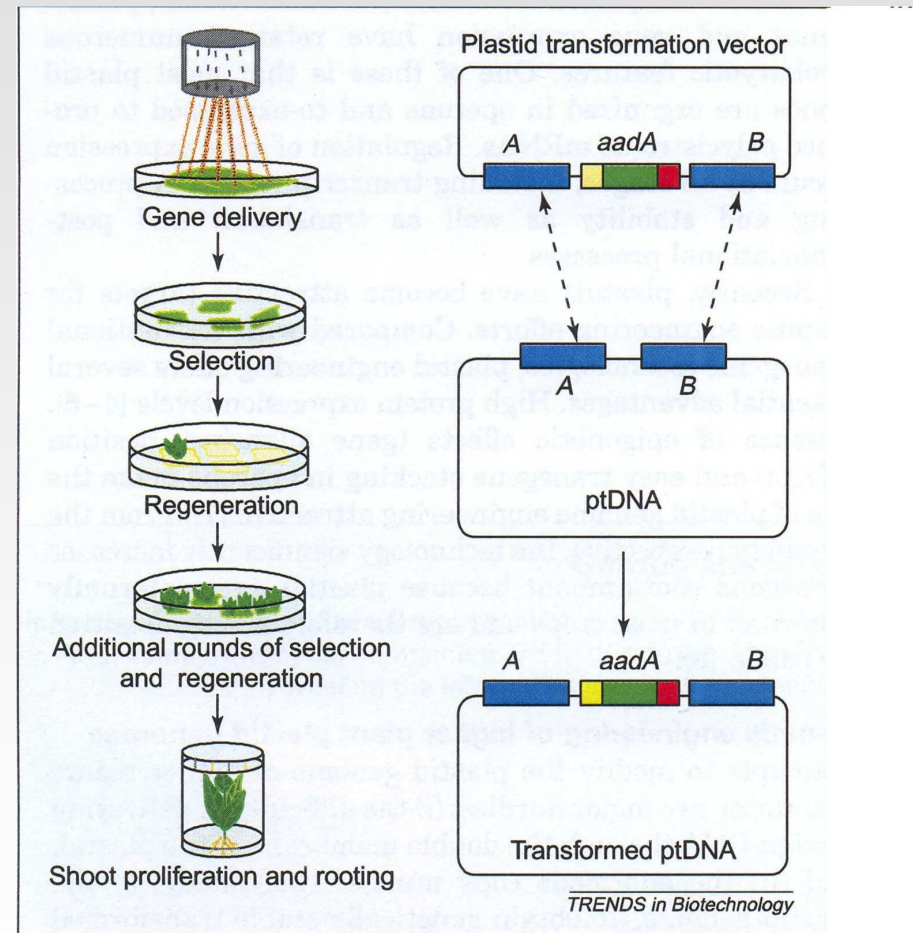
- ❑ 1. Vysoká úroveň exprese plastidových genů
  - ❑ *Kolik kopií každého genu je obsaženo v 1 buňce potenciálně transformované?*
  - ❑ 2. Maternální dědičnost
  - ❑ 3. Absence pozičního efektu – viz způsob introdukce transgenů homologní rekombinací
  - ❑ 4. Absence epigenetických vlivů – nedochází ke změnám v regulaci genů a k jejich umlčování
-

# Introdukce transgenů do cpDNA homologní rekombinací

Inaktivace cp genu pro fotosyntézu  
Transformací (gen Rubisco)



Regenerace rostlin Bílé sektory –  
po transformaci homoplazmie  
-organogeneze  
-somatická embryogeneze  
podmínky *in vitro*



*aadA* – kóduje rezistenci k antibiotiku spektomy-  
cinu a streptomycinu

# Místo začlenění transgenů

až

## Tvorba funkčního proteinu

---

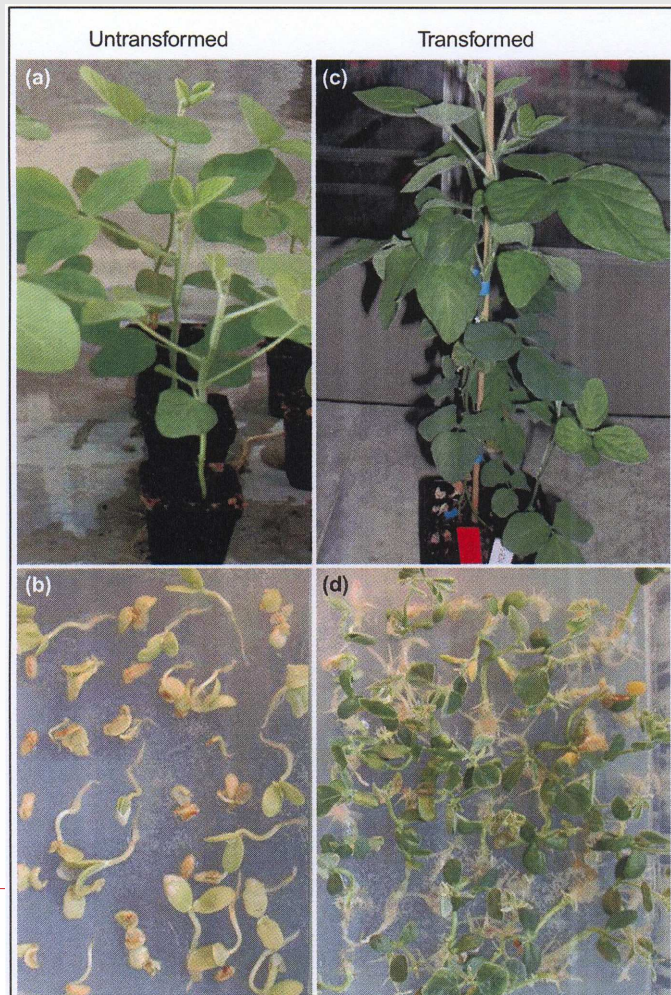
- Poznatky plastidové genomiky – sekvenování cpDNA, nezbytnost pro tvorbu vektorů
- Vektory pro transformaci – univerzální vektor neexistuje
- Efektivní regenerace rostlin somatickou embryogenezí
- Vyloučení genů pro antibiotika z vektoru
- Stabilní integrace a stabilní exprese genu
- Tvorba funkčního proteinu
- Ekonomická produkce cizích proteinů

**?Bezpečnost - rizika?**

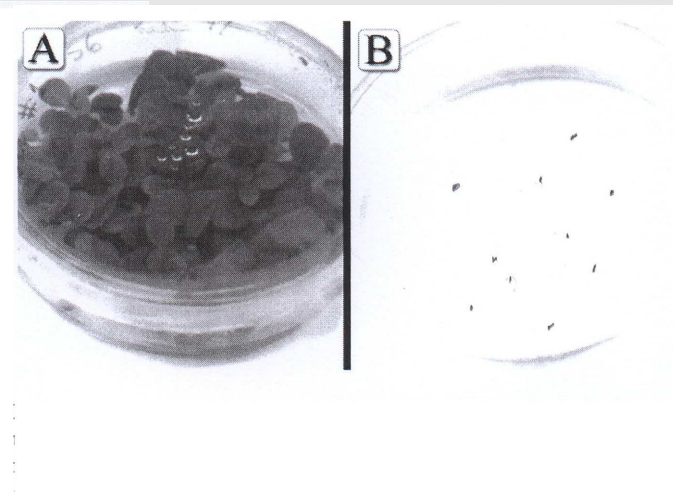
---

# Rezistence k antibiotiku u transgenních rostlin

## Sója



TRENDS in Biotechnology



Potomstvo F1  
transgenní x wt    wt x transgenní

# Praktické aspekty chloroplastového inženýrství

---

## Cíle

### Zlepšení agronomických vlastností

- Rezistence k hmyzu
  - Rezistence k herbicidům
  - Rezistence k chorobám – původci bakterie, houby
  - Tolerance k suchu
  - Tolerance k zasolení
  - Fytoremediace
-



**Terapeutické proteiny**

**Biomateriály**

**Průmyslové enzymy**

**Spektrum druhů**

- Tabák
- Mrkev
- Bavlník
- Sója

# Rezistence k herbicidům

---

## Glyfosát

- Totální herbicid, inhibuje enzym EPSPS nezbytný pro syntézu aromatických aminokyselin. Rostlina uhynie.
- Transformace geny pro necitlivost ke glyfosátu: Gen EPSPS z bakterie obsahuje bodovou mutaci, proto není gen glyfosátem blokován. Funkce enzymu je zachována.
- Chloroplastová transformace *Petunia hybrida*
- Gen *aroA* mezi geny *trnI* a *trnA* v jedné IR
- nebo *rbcL* a *accD* v LSC
- Rezistence vůči 5 mM glyfosátu (10x vyšší než letální)
- 250x vyšší exprese ve srovnání s expresí v jaderném genomu

---

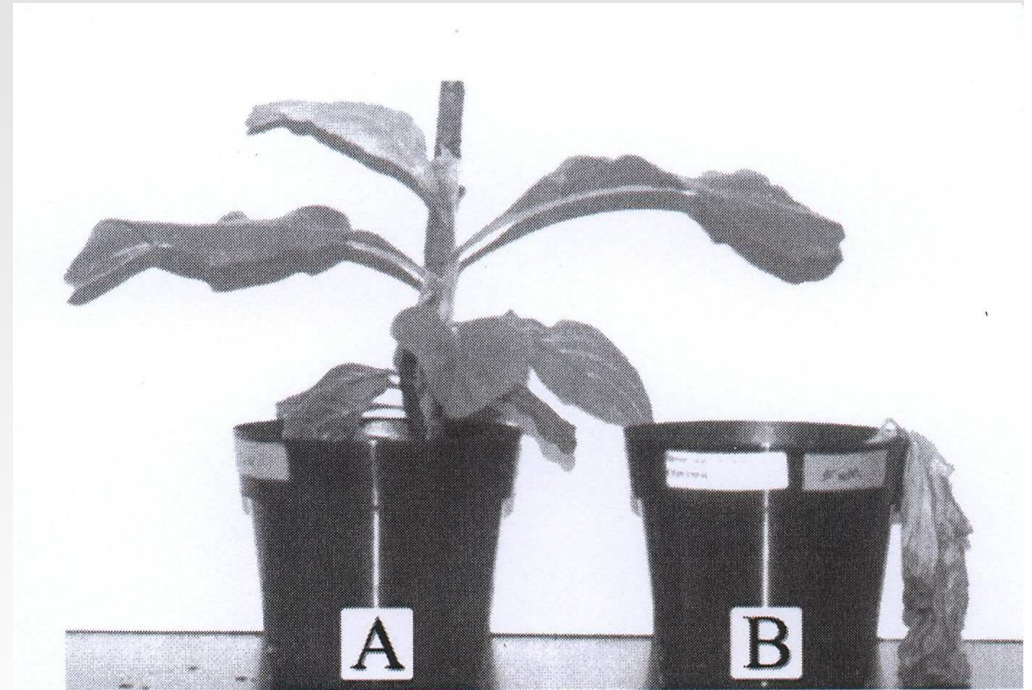
## Fosfinotricin

Totální herbicid, blokuje enzym glutaminsyntázu, který odbourává amoniakové ionty. Rostlina uhynie vlivem hromadění amoniaku.

Transformace tabáku geny pro necitlivost k herbicidu

Gen *bar* z bakterie – kóduje enzym, který přeměňuje herbicid na netoxickou sloučeninu

Nižší exprese genu, dostatečná polní rezistence



# Rezistence k hmyzu

---

- Geny *Cry* pro hmyzí protoxiny z *Bacillus thuringiensis*. Toxické pro larvální stadia hmyzu.
  - Receptory v trávicím traktu hmyzu vážou specificky protoxiny – toxický účinek. Specifita = určitý gen *Cry* proti určitému druhu škodlivého hmyzu.
  - Transformace tabáku: Operón *Cry2Aa2* obsahuje geny *Cry2Aa2* gen pro vlastní toxin *orf1, orf2* geny pro chaperony, které zajišťují tvorbu funkčního protoxinu
  - 46% celkových proteinů chloroplastu (tsp – total soluble protein)
-



**Škůdce tabáku černopáska**  
Transformace cpDNA tabáku  
Účinná exprese genů a  
účinná výsledná rezistence



© - josef hlasek  
[www.hlasek.com](http://www.hlasek.com)  
Heliiothis peltigera 348

# Rezistence k patogenům

---

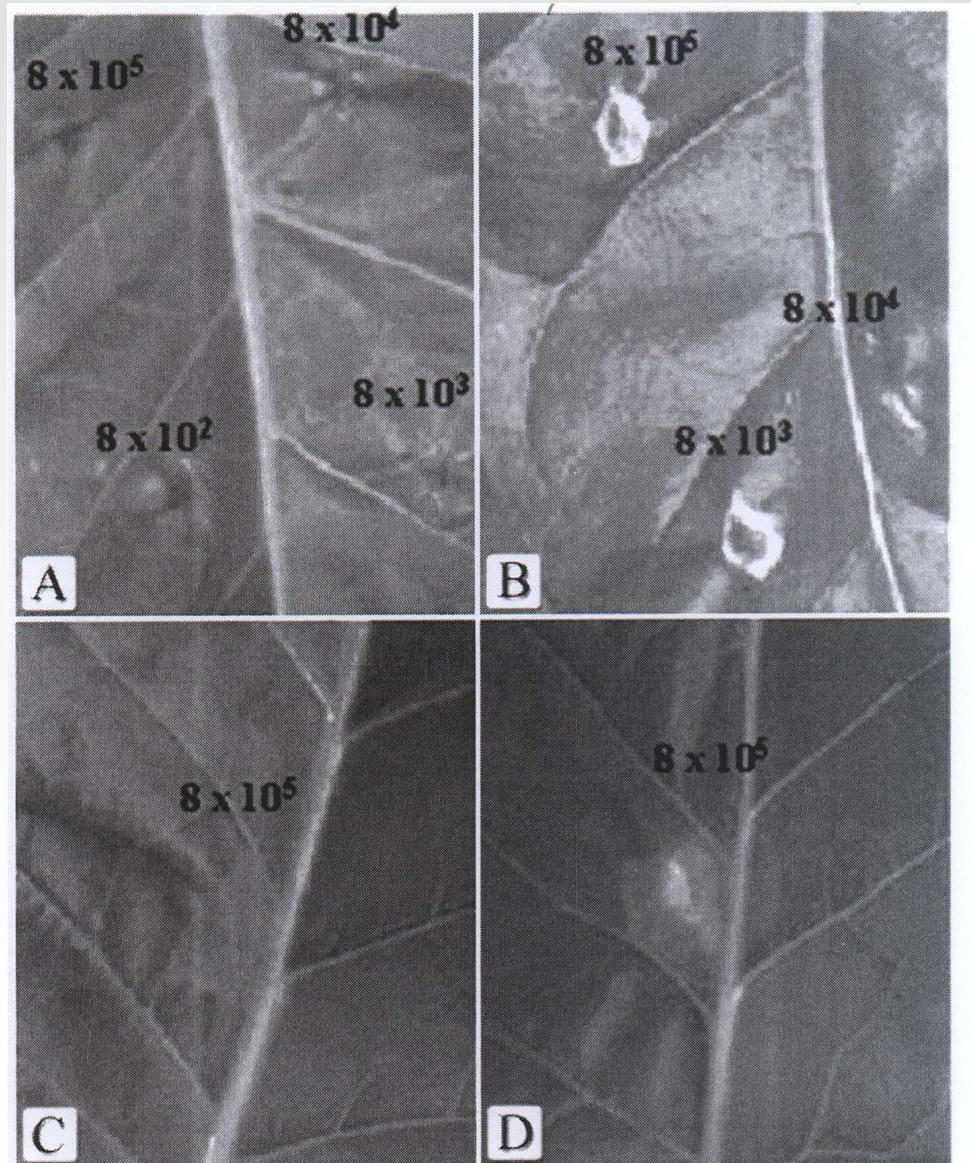
- **MSI-99** syntetický analog magaininu-2, antimikrobiální peptid – izolovaný ze sekretů kůže drápatky vodní
  - Mechanismus jeho působení:  
vysoce specifický pro negativně nabitě fosfolipidy přítomné ve vnější membráně bakterií a hub,  
agregace peptidů a tvorba pórů v membráně – lyze buňky = destrukční účinek na membránu bakterií
  - Účinný vůči širokému spektru mikroorganismů
  - Transformace genem pro MSI-99
  - Vysoká účinnost exprese, dostatečná ochrana rostlin proti bakteriálním a houbovým patogenům
-

# Funkčnost antimikrobiálního proteinu MSI-99 u rostlin vůči patogenním mikroorganismům

Transgenní

Netransgenní

Tabák



# Rezistence k suchu

---

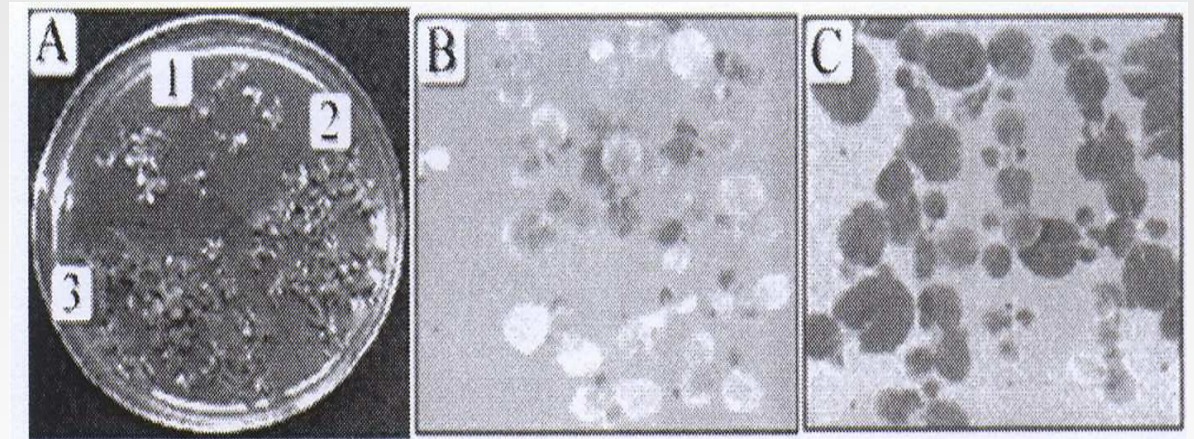
## □ Osmoprotektanta

- nízkomolekulární látky regulující příjem a zadržování vody

## □ Trehalóza

Gen *TPS1* – Trehalózo-fosfát syntáza

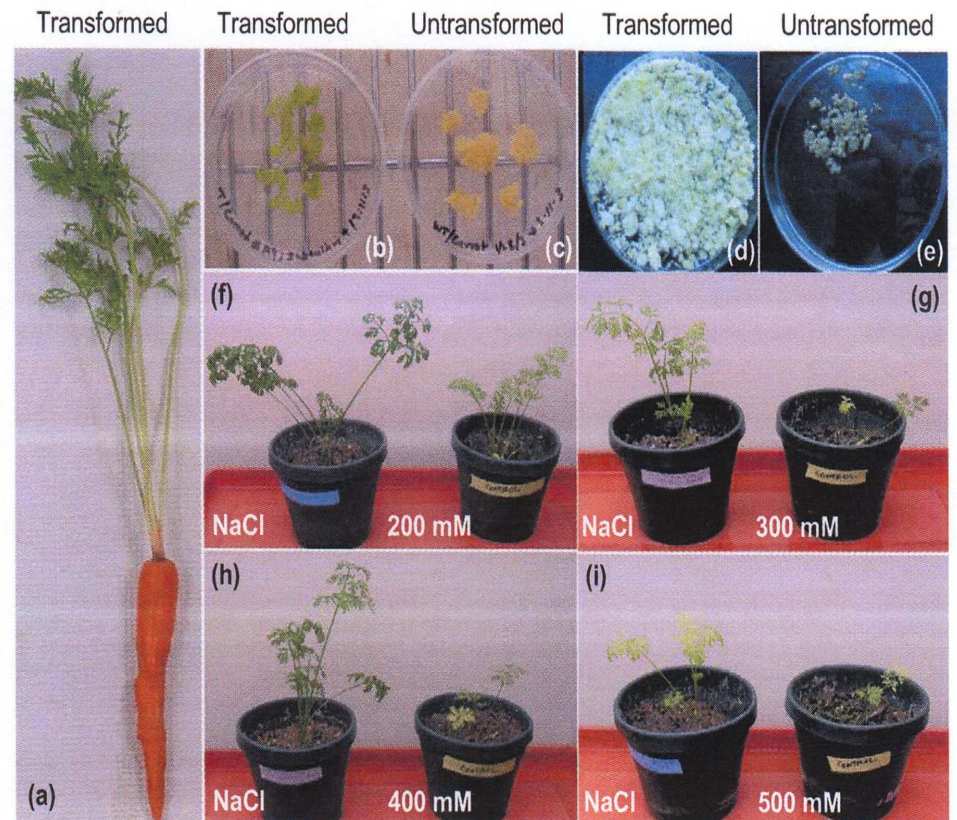
□ 25x vyšší akumulace trehalózy než při jaderné transformaci





# Tolerance k solím

- **Osmoprotektanta**
- **Glycin betain** se akumuluje v některých rostlinách po působení sucha nebo při vyšších koncentracích solí v půdě
- Gen *badh* – enzym betainaldehyd dehydrogenáza přeměňuje toxický betainaldehyd na netoxický glycin betain a  $\beta$ -alanin betain
- Účinnost: transgenní rostliny mrkve rostou při 400 mM NaCl (úroveň halofyt)



# Fytoremediace

Bezpečné a cenově efektivní odstraňování toxických chemikálií z prostředí pomocí pěstování rostlin

## Rtuť

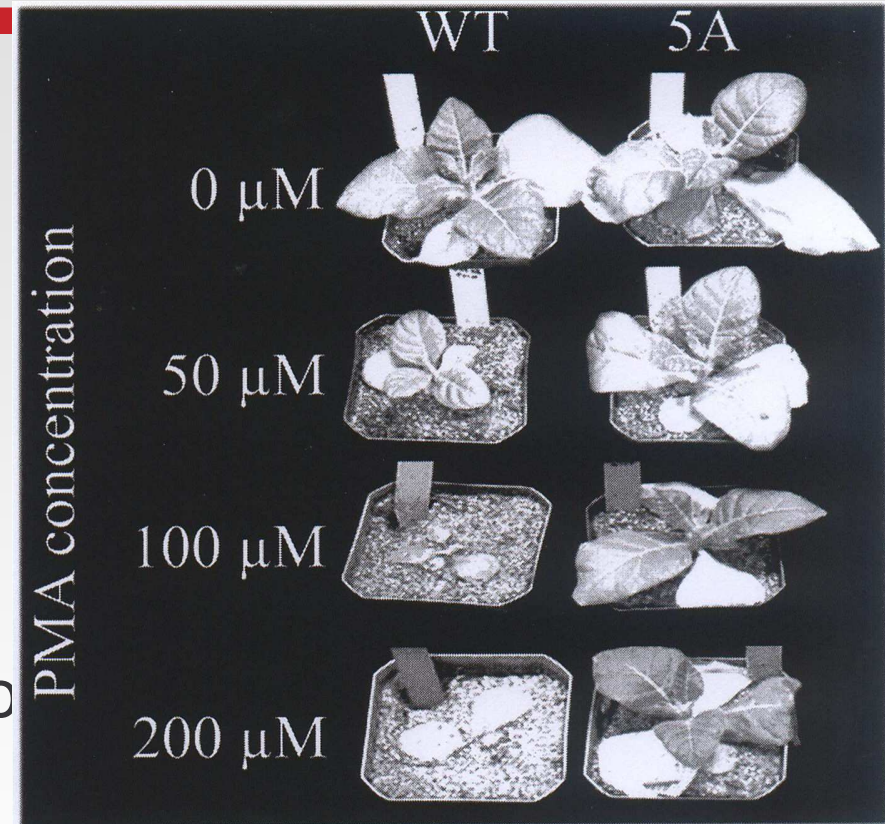
Nejtoxičtější je organická rtuť

Geny – pro bakteriální enzymy

**merA** – reduktáza

**merB** – lyáza

Test pomocí vysoce toxického fenyl acetátu rtuti – **PMA**



Transgenní rostliny rostou až do koncentrace 400 μM PMA.

# Plastidy jako bioreaktory farmakologických látek

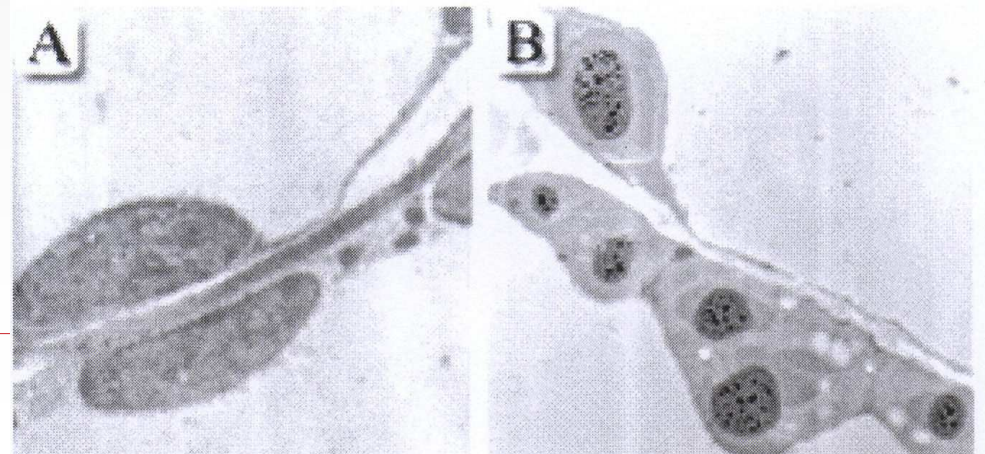
---

## Lidský somatotropin

- Léčba trpasličího vzrůstu u dětí, Turnerova syndromu, chronického selhání ledvin
- Gen *hST*
- 7% tsp

## Albumin lidského séra

- Tvoří 60% proteinů krevního séra. Náhrada krve při traumatických stavech
- Gen *HSA*



## Antimikrobiální peptidy

- MSI-99
- Efektivní i vůči lidským patogenům, efektivní i vůči bakteriím rezistentním k řadě léčiv (*Pseudomonas aeruginosa*)
- Po transformaci tabáku buněčný extrakt účinný vůči rezistentním bakteriím
- 21,5% tsp

## Lidský interferon

- Glykoprotein produkovaný bílými krvinkami jako odpověď na napadení organismu virem.
  - Funkce jako léčivo při virových infekcích, leukemii i proti nádorům (ledvin, kůže, sarkomu, malignímu lymfomu, mnohočetným myelomům aj.)
  - Účinek – tlumí metabolismus některých buněk, tlumí projevy genů odpovědných za nádorovou přeměnu buňky
  - Transgenní tabák
- Interferon  $\alpha$  19% tsp  
IFN $\alpha$ 2b léčba leukemických buněk  
Interferon  $\gamma$  6% tsp

## Monoklonální protilátky

- Immunoglobuliny (Ig)
- Chrání tělo proti toxickým látkám a pronikajícím patogenům
- Protilátka Guy's 13 účinná vůči *Streptococcus mutans*
- psbA regulační sekvence + gen Guy 13 – exprese IgA-G

Studium problematiky na začátku

Výhoda - cena

## Bioreaktory pro vakcíny

- Vakcína cholery  
Gen - podjednotka toxinu cholery CTB  $\beta$
- Vakcína antraxu
- Vakcína moru
- Zvířecí vakcíny – psí parvovirus

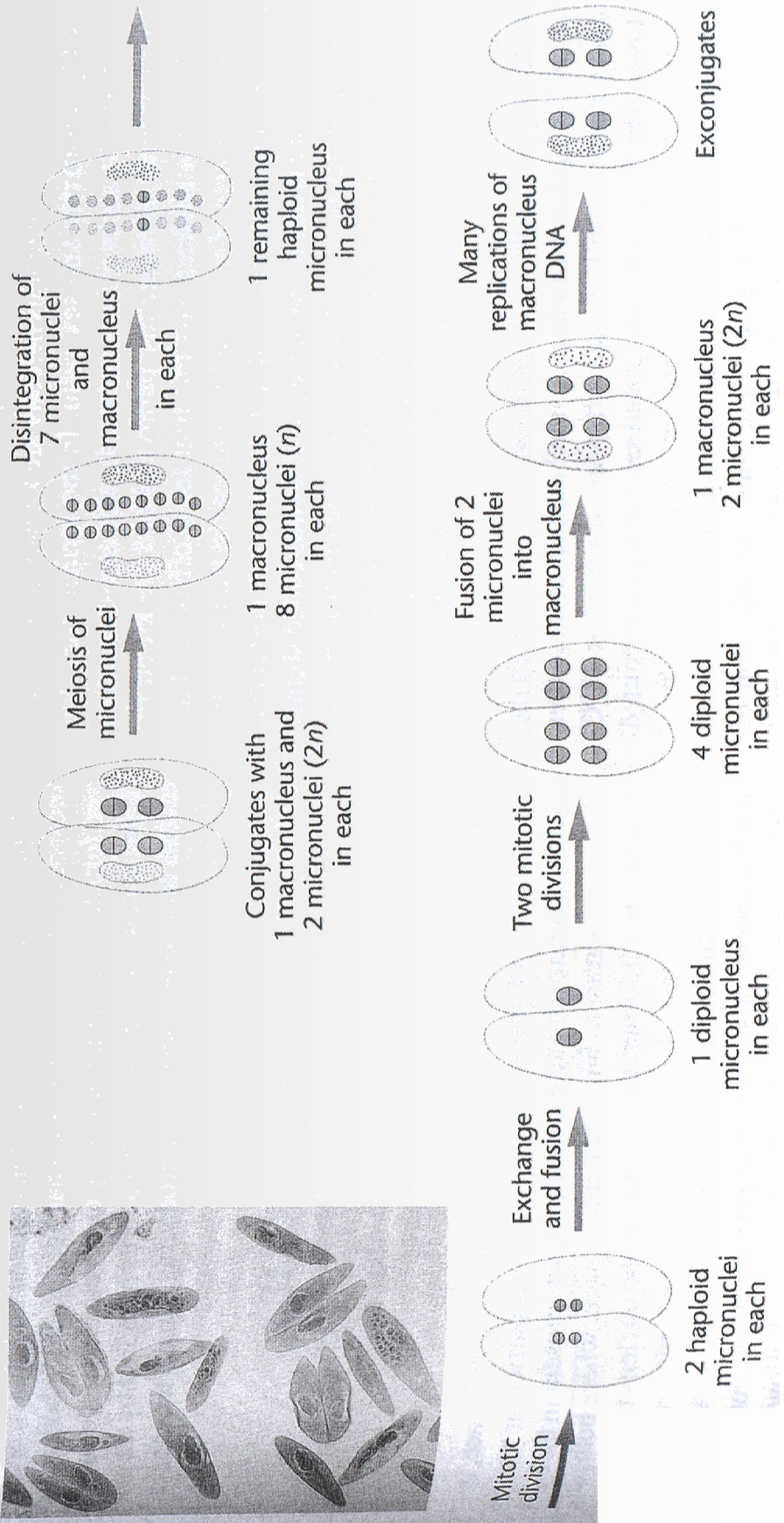
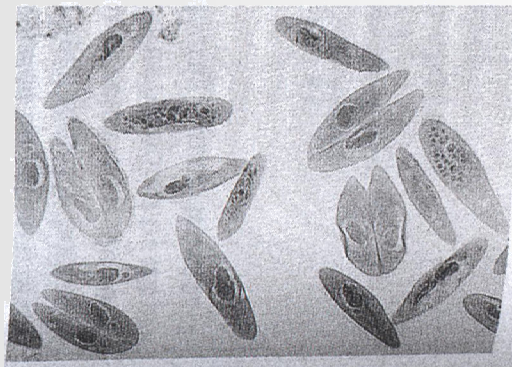
# Další příklady mimojaderné dědičnosti

## Symbiotické infekční částice

---

### *Paramecium aurelium*

- 40. léta 20. st Tracy Sonneborn
  - Symbiotické infekční částice **kapa** s vlastní DNA, 100 až 200 na buňku
  - Toxin **paramecin** – kmen killer
  - Jaderný gen *K* determinuje odolnost k paramecinu
  - Reprodukce – pohlavní výměna konjugací
-



## *Drosophila melanogaster*

- Kmeny citlivé k CO<sub>2</sub>
- Virové částice **sigma**

## *Drosophila bifasciata*

- V potomstvu pouze dcery při 21°C a nižších
- V cytoplazmě samic symbiotický mikroorganismus, letální pro samečky