

# Modifikace dědičné informace rostlin I

## Klasická genetická modifikace

Lukáš Fischer, KEBR

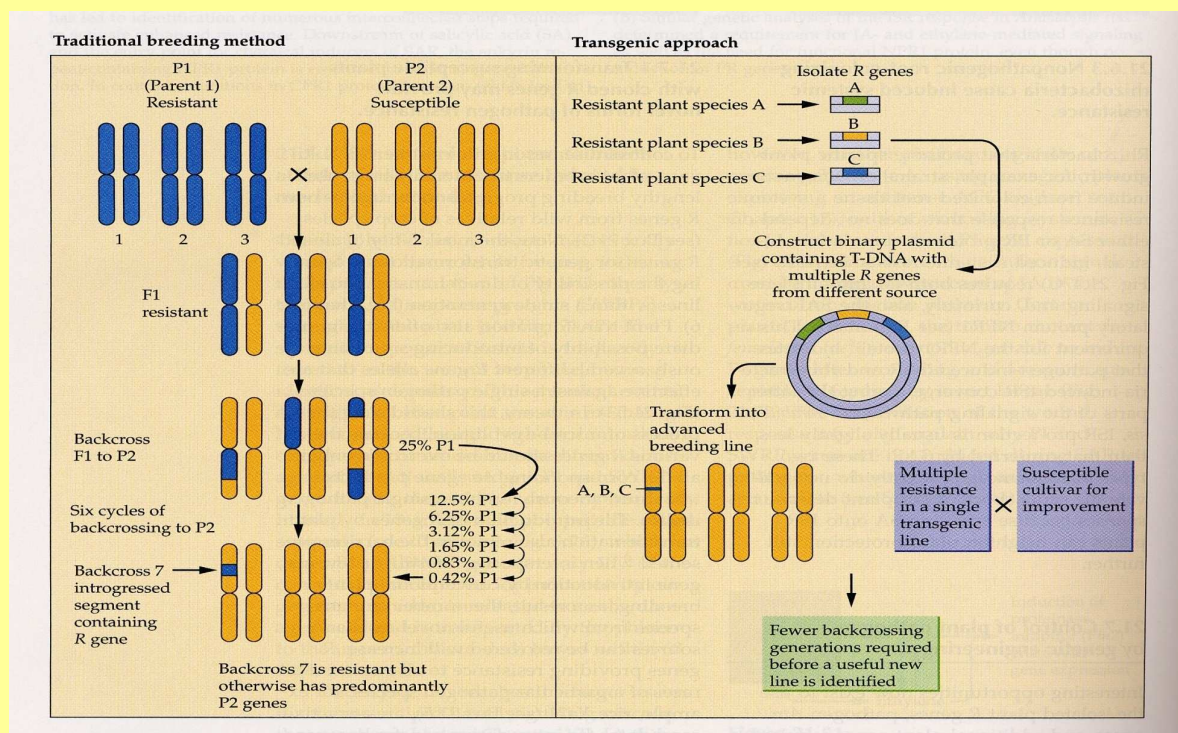
### Legislativa: Genetická modifikace (GM)

= vnesení genetické informace (úseku DNA) či změna > 20 nt způsobem, který se v přírodě nevyskytuje přirozeně (jiné změny nejsou považovány za GM)

- **Transgenoze** – vnesen jakýkoli úsek DNA (nekřížitelné druhy, syntetické molekuly, ...)
- **Intragenoze** – vnesen úsek DNA vytvořený výhradně z fragmentů DNA z téhož či křížitelného druhu (včetně např. konstruktů navozujících RNAi)
- **Cisgenoze** – vnesen nezměněný celistvý úsek DNA z téhož či křížitelného druhu (velmi blízké přirozeným procesům)

# Cisgenoze napodobuje klasické křížení

- ale nutnost dlouhé řady zpětných křížení!



## Obsah přednášky

- Jak zlepšit vlastnosti rostlin
- Principy přípravy GMR
  - Příprava genových konstruktů
  - Genový přenos do jaderného a plastidového genomu
  - Selektce a odvození transgenních rostlin
- Umlčování exprese transgenů a rostlinných genů
- Analýzy transgenních rostlin
- Nové techniky šlechtění















# Obsah přednášky

- Jak zlepšit vlastnosti rostlin
- Principy přípravy GMR
  - Příprava genových konstruktů
  - Genový přenos do jaderného a plastidového genomu
  - Selekcce a odvození transgenních rostlin
- Umlčování exprese transgenů a rostlinných genů
- Analýzy transgenních rostlin
- Nové techniky šlechtění

**Vloha** (gen) → (protein) → **vlastnost** (znak)

Geny **předurčují** vlastnosti organismů!



semeno		květ	luska		stonek	
tvar	dělohy	barva	tvar	barva	umístění	velikost
						
šedý & kulatý	žluté	bílá	plný	žlutý	lusky a květy podél stonku	dlouhý
						
bílý & svrasklý	zelené	fialová	příškrčený	zelený	koncové lusky, vrcholový květ	krátký
1	2	3	4	5	6	7



J. G. Mendel

# Jak změnit vlastnosti (fenotyp) organismu?

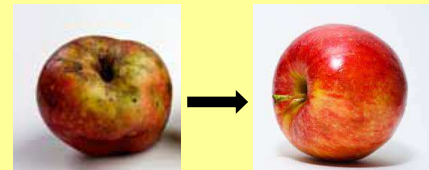
Genotyp  $\xrightarrow{\hspace{2cm}}$  Fenotyp

změnou genetické informace:  
(či jejího stavu)

- šlechtění klasické, hybridizace (i vzdálená)
- mutageneze náhodná či cílená
- genetické modifikace, epimutageneze, ...

změnou prostředí:

- výběr lokality
- zálivka, hnojení
- hubení škůdců
- další péče (řez, ...)



**Cíl: vylepšené či zcela nové vlastnosti**

klíčové je vymyslet: jaké vlastnosti měnit?  
jak toho dosáhnout?

## Strategie při přípravě GMR

**Jak geneticky podmínit různé vlastnosti?**

Vnesení jednoho genu = jeden „výkonný“ protein:

- produkce rekombinantních proteinů (např. pro medicínské účely)
- antigenu - jedlá vakcína
- navození odolnosti (Bt toxin)
- odolnost x herbicidům – degradační enzym či necitlivý isozym
- zásobní protein (zvýšený obsah esenciálních amk)

Vnesení více genů – př. vytvoření celých biosyntetických drah:

- zvýšený obsah určitých metabolitů ( $\beta$ -karoten; mastné kyseliny, ...)

**Lze některých vlastností dosáhnout i bez genetické modifikace?**

# Strategie při přípravě GMR

## Jak geneticky podmínit různé vlastnosti?

### Vnesení regulačních genů

- transkripční faktory, enzymy syntézy fytohormonů:
  - zvýšení odolnosti vůči stresu
  - zvýšení/snížení obsahu určitých metabolitů, ...

Lze dosáhnout stejného cíle i bez genetické modifikace?

# Strategie při přípravě GMR

## Jak geneticky podmínit různé vlastnosti?

### Blokování rostlinného genu - vnesením RNAi konstruktů

- RNAi (antisense RNA, vlásenka, ...):
  - snížení obsahu určitého metabolitu (blokování enzymu syntézy)
  - snížení obsahu alergenního proteinu
  - prodloužení trvanlivosti (blok genů „stárnutí“)

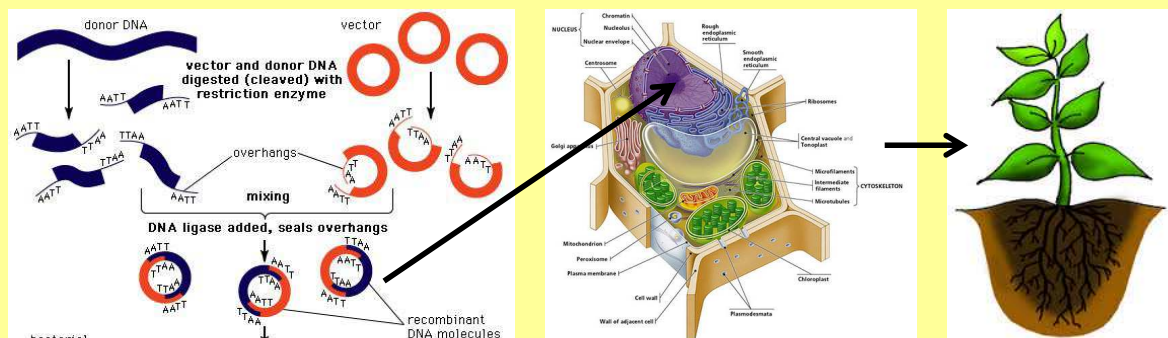
Lze dosáhnout stejného cíle i bez genetické modifikace?

# Obsah přednášky

- Jak zlepšit vlastnosti rostlin
- **Principy přípravy GMR**
  - Příprava genových konstruktů
  - Genový přenos do jaderného a plastidového genomu
  - Selekcce a odvození transgenních rostlin
- Umlčování exprese transgenů a rostlinných genů
- Analýzy transgenních rostlin
- Nové techniky šlechtění

## Jak připravit GM rostlinu?

- vytvořit genový konstrukt (rekombinantní DNA)
- zabudovat gen(y) do genomu jedné buňky
- z této (transformované) buňky vypěstovat rostlinu



# Transformace

## Stabilní

- dochází k integraci do genomu (jaderného, popř. plastidového)  
= dědičná změna genetické výbavy

## Transientní

- nedochází k integraci vnesené DNA do genomu
- vnesený gen se nereplikuje, až posléze vymizí
- vnesený gen je ale zpravidla dočasně exprimován

x **Virové vektory** – infekce GM virem (virovou NK ~ transientní transformaci, pokud není vnesená DNA integrována do genomu)

- vyšší počet kopií oproti klasické transformaci
- silná exprese - rychlá akumulace produktu  
(přirozené supresory silencingu x PTGS)
- systémové šíření rostlinou
- často široké hostitelské spektrum

## Příprava GMR – genový konstrukt

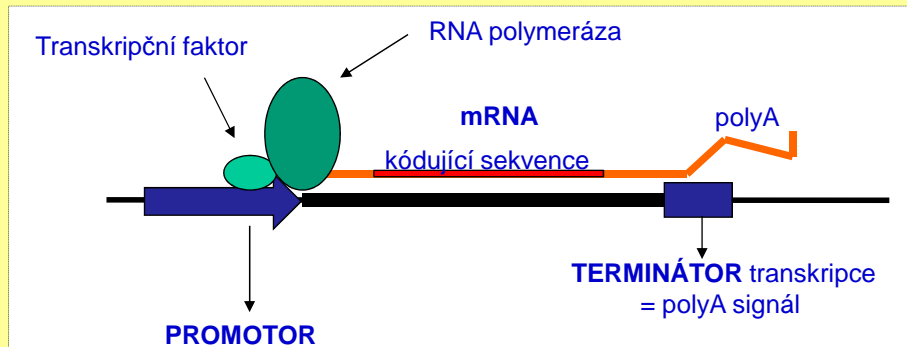
- zpravidla geny kódující bílkoviny (příp. návod k blokování genu RNAi)
- kódující sekvence genu univerzální, jen instrukce pro expresi genu „v jazyce příjemce“

Exprese genu (= tvorba funkčního proteinu, popř. tvorba specifické RNA) v jiném organismu:

- nutné **regulační sekvence**, které jsou rozpoznány transkripčním (i translačním) aparátem příjemce,
- jinak prakticky nejsou bariéry ani při přenosech mezi vzdálenými organismy (x editace, sestřih, „codon usage“)

# Příprava GMR – genový konstrukt

regulační sekvence a „výkonné“ sekvence  
(KDY, KDE, KOLIK?) (CO?)



**regulační sekvence:** promotor, UTR, terminátor, Kozakové sekvence (u ATG), introny, ...

**„výkonné“ sekvence:** protein kódující sekvence (ORF),  
templát pro tvorbu RNA

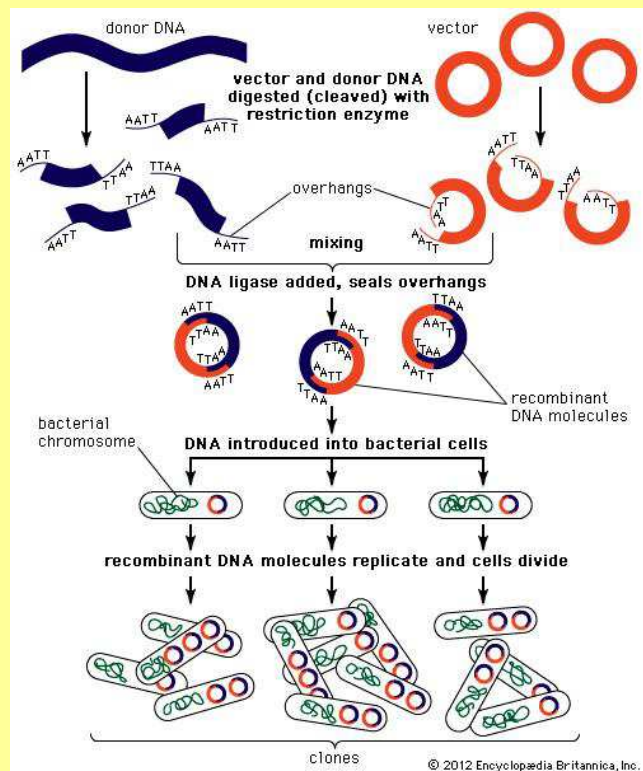
## Příprava genových konstruktů - základní předpoklady

- enzymy
  - sekvenčně specifické štěpení DNA – restriktázy
  - spojování DNA – ligázy
  - kopírování DNA – DNA polymerázy
  - zpětný přepis RNA do DNA – reverzní transkriptázy
- plasmidy – pomnožení (selekce) žádoucích konstruktů
- PCR - pomnožení (izolace) úseků DNA
  - Taq polymeráza, umělá syntéza krátkých úseků DNA
- sekvenování – kontrola konstruktů, objevování genů



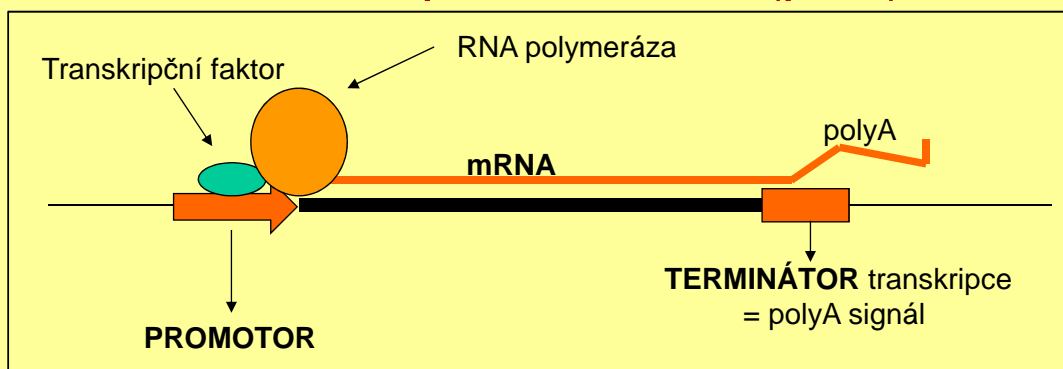
# Příprava genových konstruktů - základní principy

- izolace genů – PCR  
(RT PCR, syntetická DNA,  
štěpení zdrojové DNA)
- štěpení a spojování  
(v plasmidech)
- pomnožení plasmidů  
(v baktériích)



## Exprese genu (jaderného):

### 1. krok - transkripce = tvorba (pre-)mRNA



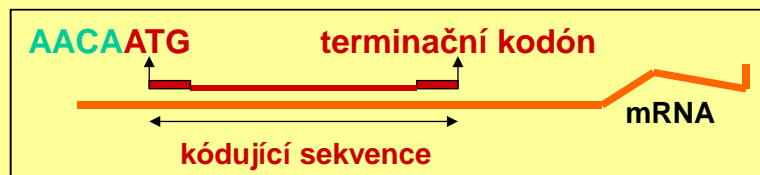
### PROMOTOR

- určuje začátek a směr transkripce
- konstitutivní, indukibilní promotory, orgánově (pletivově) specifické
- rostlinné, či z rostlinných patogenů (DNA virů, agrobaktéria)

Schopnost promotoru vázat určité transkripční faktory a přítomnost těchto faktorů v buňce ovlivňují, kde a jak bude gen exprimován!

# Expresse genu:

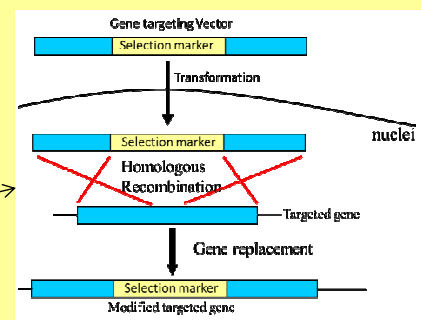
## 2. krok translace = syntéza proteinu



## Faktory ovlivňující expresi transgenu (sílu, místo, čas)

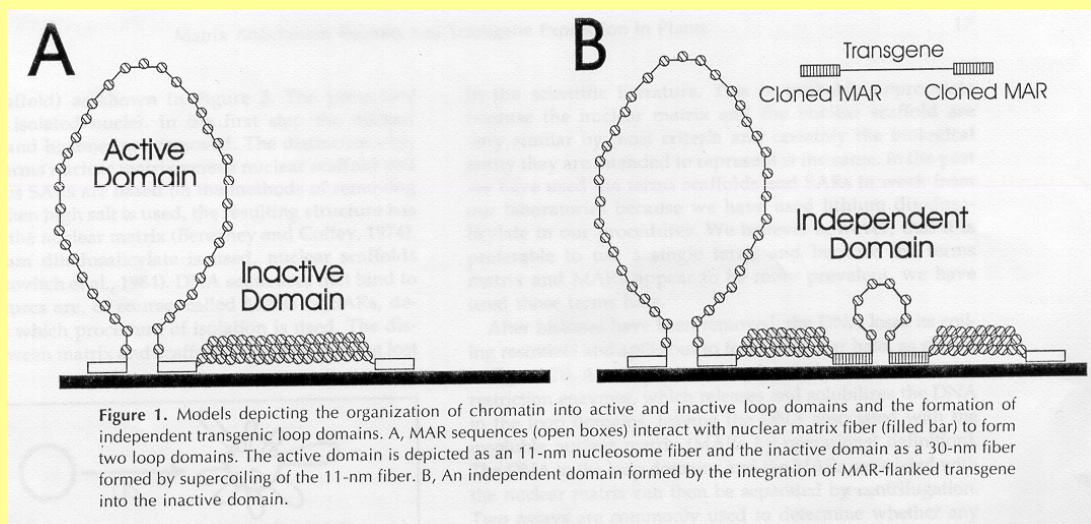
- **promotor** (terminátor)
- charakter sekvence před iniciačním kodónem (nasedání ribosomu)
- stabilita transkriptu (množství, síla terminátoru, introny, UTR, ...)
- počet kopií transgenu (PTGS)
- místo integrace (enhancery, SAR, MAR...) - TGS

- u rostlin nelze jednoduše navodit vložení do určitého místa jaderného genomu
- malá účinnost homologní rekombinace, kromě mechu *Physcomitrella patens*



## MAR sekvence

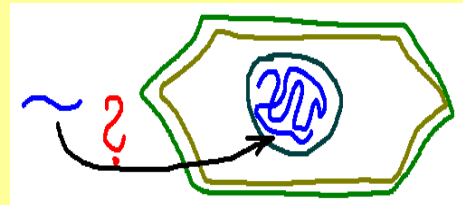
- poblíž transgenu zvyšuje expresi a snižuje variabilitu exprese v souboru nezávislých transformantů



# Obsah přednášky

- Jak zlepšit vlastnosti rostlin
- Principy přípravy GMR
  - Příprava genových konstruktů
  - **Genový přenos do jaderného a plastidového genomu**
  - Selekcce a odvození transgenních rostlin
- Umlčování exprese transgenů a rostlinných genů
- Analýzy transgenních rostlin
- Nové techniky šlechtění

## Metody transformace (stabilní i transientní)



### „přirozené“ metody

- **via Agrobacterium**
  - varianty (agroinfiltrace - transientní, floral dip, ...)
- pomocí rostlinného viru
  - přechodná (transientní) transformace
  - vnesení – přirozenou infekcí virovými částicemi (ale často agroinfiltrací či nastřelením konstruktů, jehož transkripce vzniká virový RNA+ genom)

### **biolistika** („particle bombardment“, „microprojectile bombardment“)

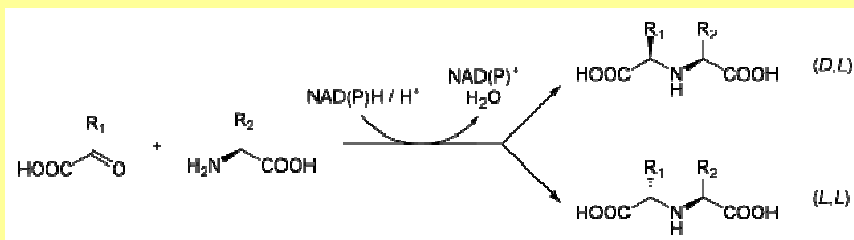
### vnesení DNA do protoplastu:

- elektroporací
- působením PEG (polyethylenglykol)

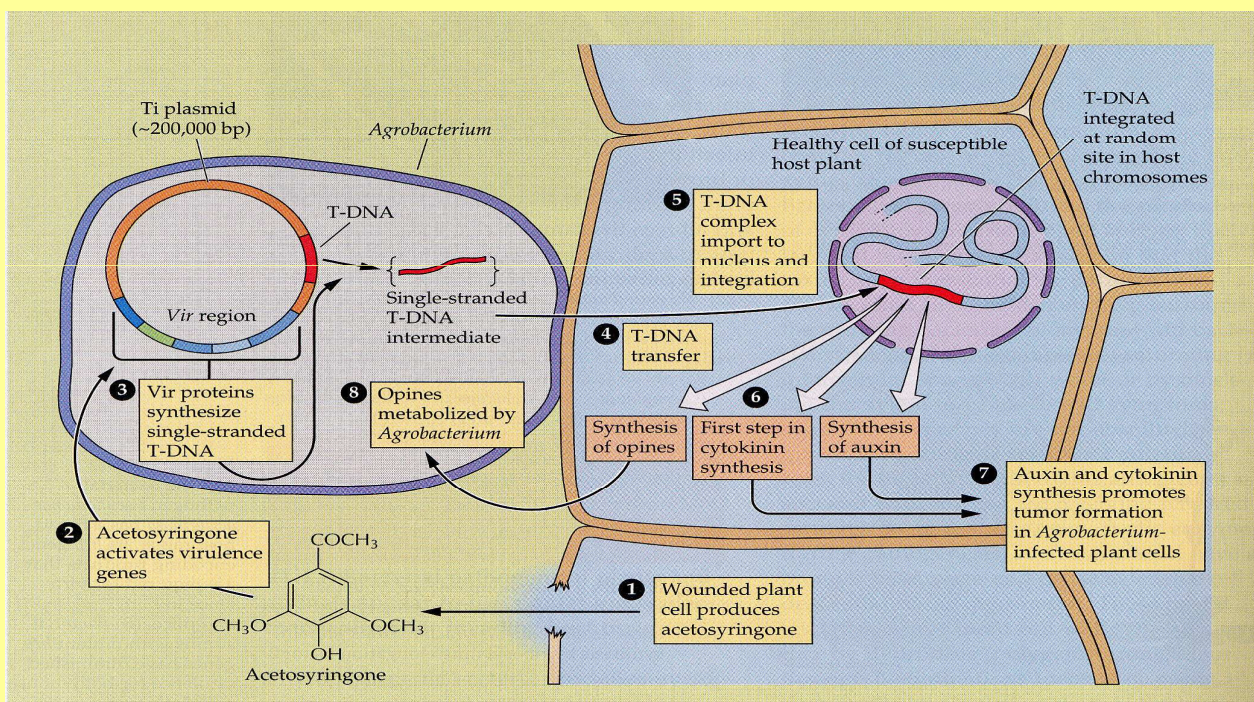
### mikroinjekce

# Přirozená transformace agrobaktériem (*Agrobacterium tumefaciens*)

- půdní bakterie G<sup>-</sup> (*Rhizobiaceae*), Ti plasmid
- „genetický parazitismus“ na dvouděložných rostlinách (pro transformaci jednoděložných rostlin je nutné indukovat *vir* geny agrobaktéria externě)
- přenáší několik svých genů do rostlinné buňky v místě poranění
- z transformované buňky se tvoří nádor:
  - ipt* – isopentenyl transferase
  - iaaH* – indolacetamid hydrolase
- produkce výživných látek (opinů) pro agrobaktérium



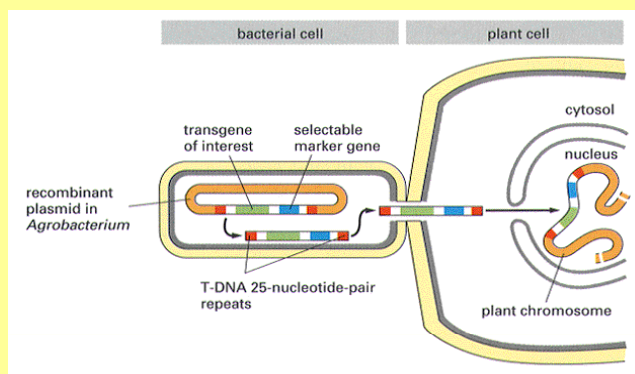
# Přirozená transformace agrobaktériem



# Upravené agrobaktérium

- geny způsobující vznik nádoru a syntézu opinů odstraněny

- T-DNA v binárním plasmidu (*vir* geny, zodpovědné za přenos T-DNA alokovány na pomocném plasmidu *in trans*)



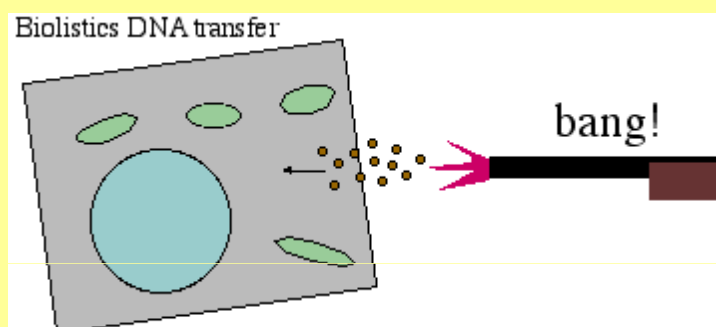
Využita jen schopnost agrobaktéria přenášet T-DNA (definovanou krátkými hraničními sekvencemi) do genomu rostlinných buněk

Výhody:

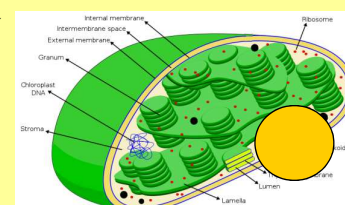
- poměrně vysoká frekvence stabilní transformace
- menší počet kopií (menší riziko umlčení exprese)
- možnost přenosu delších úseků DNA (desítky kbp)

# Balistická metoda, transformace

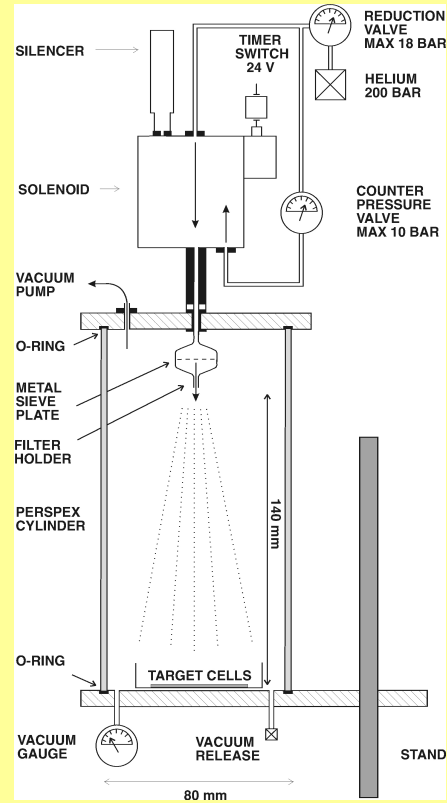
biolistická, biobalistická, nastřelování, "particle/gene gun"



- nabalení DNA na zlaté či wolframové kuličky
- nastřelení na rostlinný orgán, celé rostliny, buněčnou kulturu,...
- univerzální použitelnost bez druhových limitací
- možnost transformace organel (plastidů)



# Balistická metoda transformace



nastřelování pomocí podtlaku či přetlaku

## Transformace chloroplastů

### Výhody:

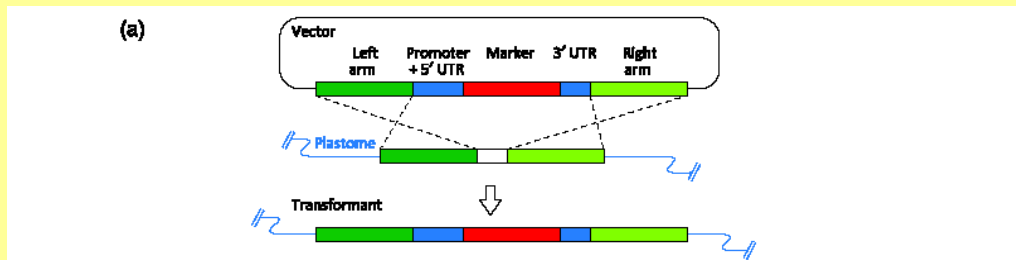
- vysoký počet kopií v genomu, vysoké hladiny proteinu (buňky lépe tolerují, u Bt toxinu brání vzniku rezistence a zasažení necílových organismů – není v pylu)
  - možno produkovat i RNA (dsRNA) x herbivorům
- možnost cílení do určitého místa – homologní rekombinace
- vyrovnaná exprese (není silencing/RNAi a poziční efekt)
- plastidový genom je většinou nepřenosný pylem (pokud se nezačlení do jaderného genomu)
- tvorba proteinů i v chromoplastech

### Nevýhody:

- nejsou eukaryotické posttranslační modifikace (jsou ale S-S)
- příprava homoplasmických a nechimerických rostlin je časově náročná

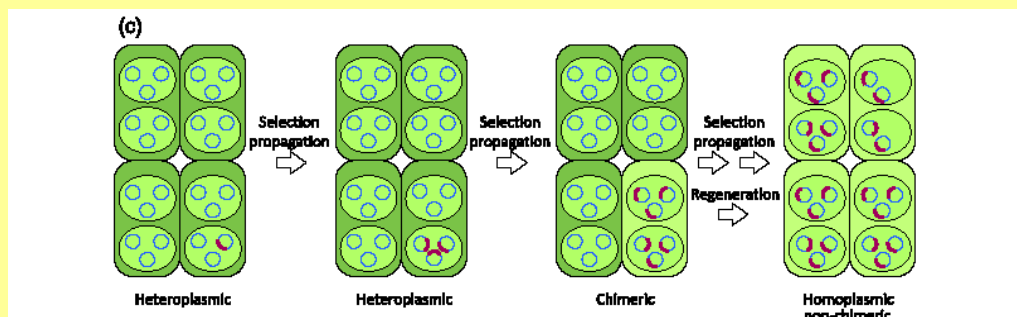
## Integrace rekombinací

– transgen obklopený chloroplastovými sekvencemi (vyplatí se cílit do operonů – transkribovaných sekvencí mezi geny)



Postupná selekce

**homoplasmických buněk a nechimerických rostlin**



**aadA** - adenosyl-3'-adenyltransferáza (spektinomycin, streptomycin)

**nptII** - neomycinfosfotransferáza (kanamycin); **cat** - chloramfenikolacetyltransferáza

## Regulační oblasti

Promotory: plastidových genů pro 16S rRNA, tRNA, LS Rubisco, protein D1 fotosystému II, ...  
- plastidová RNA polymeráza (PEP)

5'-UTR (nebo 5'-TCR - translation control region):

5'-UTR plus počátek plastidového genu (několik aa),  
- translační fúze  
- zvýšení účinnosti transkripce (stability RNA?)

3'-UTR – zvýšení stability mRNA (z psbA, rbcL, rps16)

# Transformace mitochondrií

- jen jednobuněčné organismy (kvasinka, *Chlamydomonas*)
- biolistická transformace, ale zvažovány i jiné postupy (např. transformace izolovaných mitochondrií)
- prakticky chybí selekční geny
- editace RNA v mitochondriích může komplikovat genovou expresi (změna kódování)

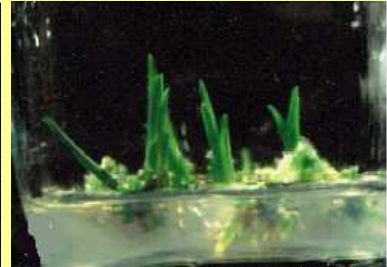
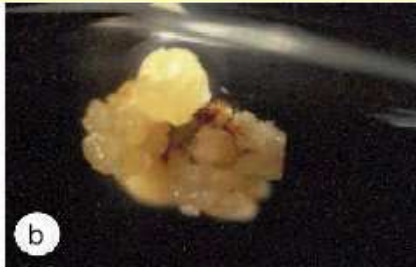
## Obsah přednášky

- Jak zlepšit vlastnosti rostlin
- Principy přípravy GMR
  - Příprava genových konstruktů
  - Genový přenos do jaderného a plastidového genomu
  - **Selekce a odvození transgenních rostlin**
- Umlčování exprese transgenů a rostlinných genů
- Analýzy transgenních rostlin
- Nové techniky šlechtění



# Jak udělat z jedné buňky celou rostlinu?

- organogeneze (kalus – prýt – rostlina)

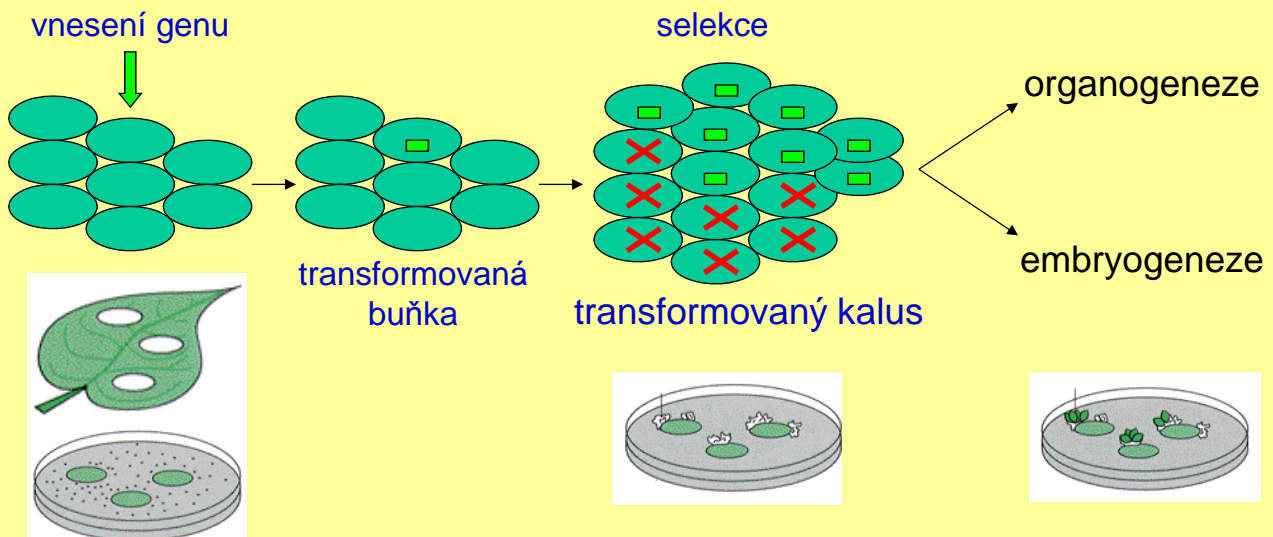


- somatická embryogeneze (som. embryo – rostlina)



## Princip přípravy transgenních rostlin

1. Na začátku je jedna transformovaná buňka!  
(nelze transformovat všechny buňky rostliny naráz)
2. Pomnožení transformovaných buněk na „selekčním médiu“
3. Indukce organogeneze či somatické embryogeneze  
(aplikací regulátorů rostlinného růstu v *in vitro* podmínkách)



# Selekce transformovaných buněk (rostlin)

**Selekční geny** - pouze transformované, rezistentní buňky se mohou dělit a vytvořit rostlinu

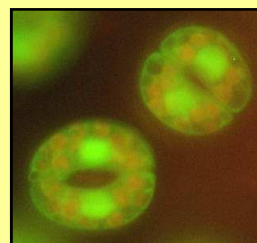
- rezistence k antibiotikům (kanamycin, hygromycin)
- rezistence k herbicidům (Roundup® - glyphosate, Liberty® - glufosinate)  
(produkt selekčního genu buďto degraduje selekční látku, či komplementuje zasaženou buněčnou funkci)
- schopnost využití určité živiny:  
př. PMI (fosfomanóza isomeráza) – přeměna manóza-6-P na fruktóza-6-fosfát, ...



## Reportérové geny

(vizuální selekce transformantů):

- GFP (zelený fluorescenční protein),
- glukuronidáza, luciferáza, ...



# Transformace bramboru pomocí agrobaktéria

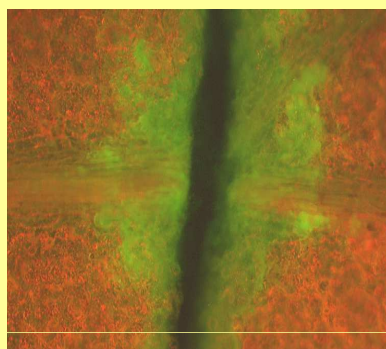
agrobaktérium



kokultivace s poraněnými listy



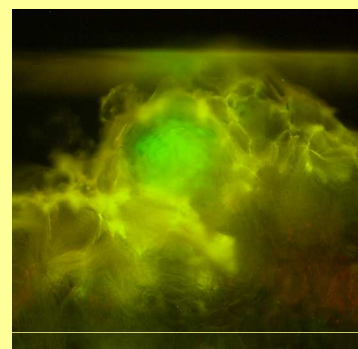
vstup agrobaktéria v místě poranění



kalus – 3 týdny



časný kalus



regenerace – 6 týdnů

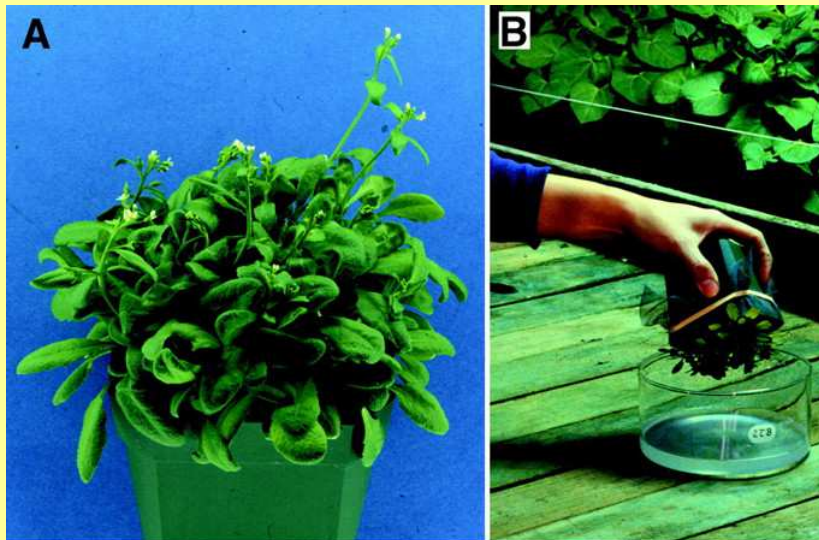


# Transformace *Arabidopsis thaliana* pomocí agrobaktéria – floral dip

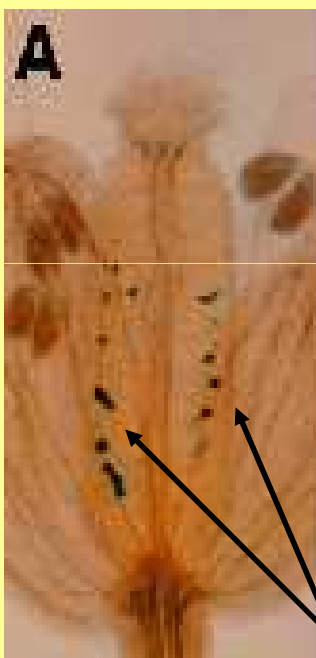
Ponoření květenství s poupaty do suspenze agrobaktéria

Použito i u dalších druhů:

pšenice, rýže, kukuřice, len, vojtěška, ...



# Transformace *Arabidopsis thaliana* pomocí agrobaktéria



- cílem transformace je zřejmě vajíčko (samičí gametofyt)

- z vaječné buňky po oplození transformovaná embrya (semena) a následně rostliny



modře zbarvený produkt enzymové aktivity glukuronidázy, která byla použita jako reportérový gen pro vizualizaci transformovaných buněk

# Agroinfiltrace

- předběžné testování exprese transgenů
- komerční produkce proteinů (vč. protilátek)
- bez nutnosti práce *in vitro*

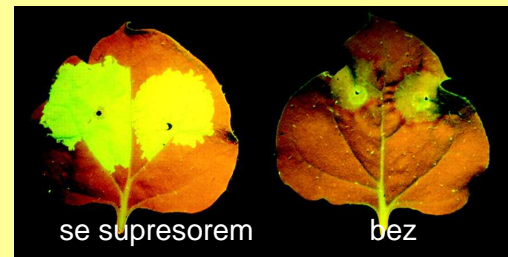


## Ochrana proti inaktivaci exprese (RNAi)

– kotransformace virovým supresorem silencingu  
zpravidla p19 (Tombusviry) či přímo virové vektory

- **Lokální exprese**

- jednoduchá T-DNA



- **Systemická (virový konstrukt):**

- sekvence a geny nutné pro pomnožení viru
- sekvence pro šíření rostlinou (geny pro movement proteiny)