

# Modifikace dědičné informace rostlin II

Lukáš Fischer, KFR PřF UK

## 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
- Pokročilé metody šlechtění (NBT)

## Umlčování exprese transgenů: nechtěné x cílené, kosuprese

- integrace transgenů do jaderného **genomu** nezajistí jeho stabilní expresi (zatímco do **plastidového genomu** zpravidla ano!)
- transgen může být umlčen a/nebo může indukovat umlčení homologních sekvencí v rostlinném genomu

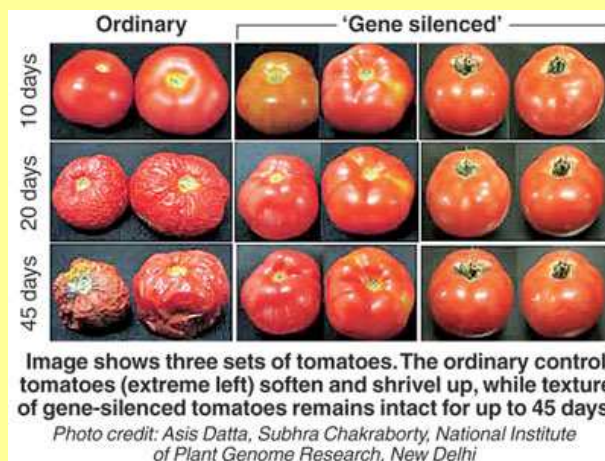
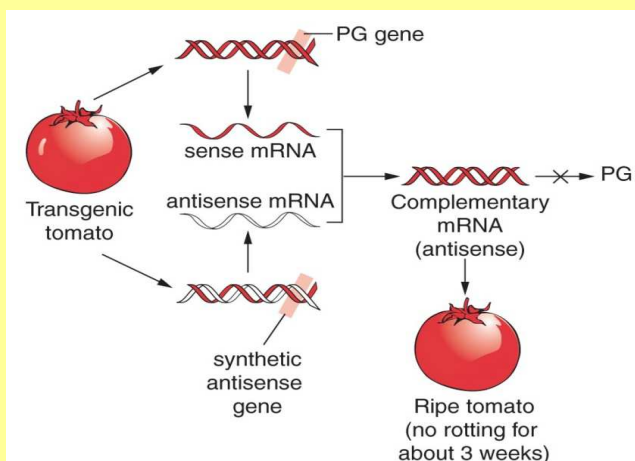
## Společný mechanismus – RNA interference

- umlčování exprese genů prostřednictvím malých RNA homologních k promotoru či transkribované sekvenci genu

## Antisense RNA - využití ve výzkumu i praxi od 80. let 20.stol.

Funkční genomika – vliv inaktivace genu na fenotyp rostliny  
⇒ hledání funkce proteinu

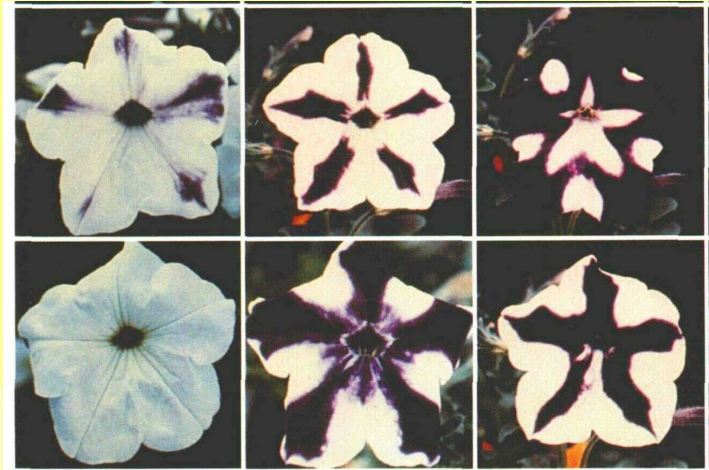
1994: rajčata „Flavr Savr“ s prodlouženou trvanlivostí –  
blokování tvorby enzymu degradujícího BS (polygalakturonáza)



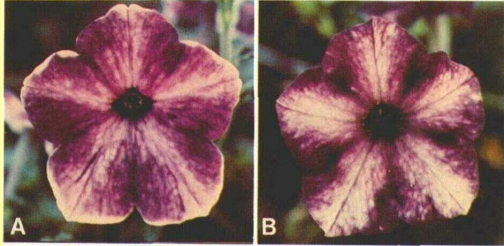
## Kosuprese u Petúnie

Cíl: zvýšení exprese genu pro enzym syntézy pigmentu

Výsledek: ztráta pigmentace v částech květu



antisense RNA ↓



Napoli et al. 1990 Plant Cell 2:279–289

## Úroveň umlčování exprese transgenů

### TGS:

Transcriptional Gene Silencing

#### Gen není přepisován

- metylace DNA promotoru (+ modifikace histonů)
- tvorba heterochromatinu (zamezení přístupu TF)

### PTGS:

PostTranscriptional Gene Silencing

#### Gen je přepisován

- transkript není překládán do proteinu
- transkript je zpravidla degradován či blok translace
- sekvenčně specifickým prostřednictvím malých RNA

# Příčiny samovolného (nechtěného) umlčování exprese transgenů

## Míra exprese, regulační elementy

- indukce vzniku patrně při vysoké expresi – zvýšený výskyt aberantních mRNA – přepis RDR6 (RNA dependentní RNA polymerázou) do dsRNA
- nepřítomnost intronů

## Poziční efekt a charakter vnášené sekvence - TGS

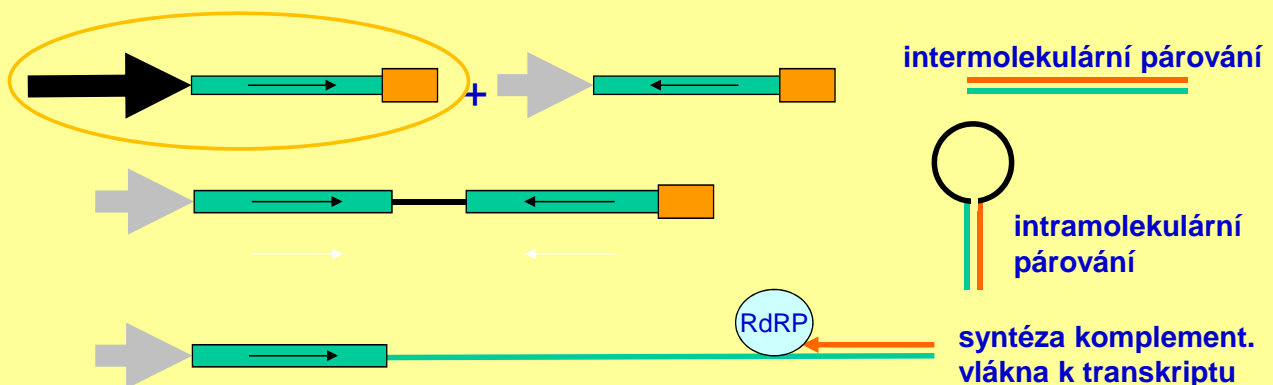
- poloha na chromozómu, charakter sousedních sek. (vzdálenost od heterochromatinu, MARs a SARs, sRNA, pol IV, ...)
- „špatná délka“, špatné „fázování“ s ohledem na pozici nukleozómů, nepřítomnost intronů (?), ...

# Cílená indukce umlčování (PTGS)

navození tvorby dsRNA:

- 1) gen v antisense orientaci (za promotor vložen opačně)
- 2) vnesení vlásečkového konstruktů (např. antisense-intron-sense)
- 3) vnesení genu bez terminátoru (dsRNA díky aktivitě RdRP)
- 4) amiRNA – umělé miRNA (složitá terciární vlásečková struktura RNA)

dsRNA, štěpení DCL, tvorba siRNA, sekvenčně spec. degradace mRNA



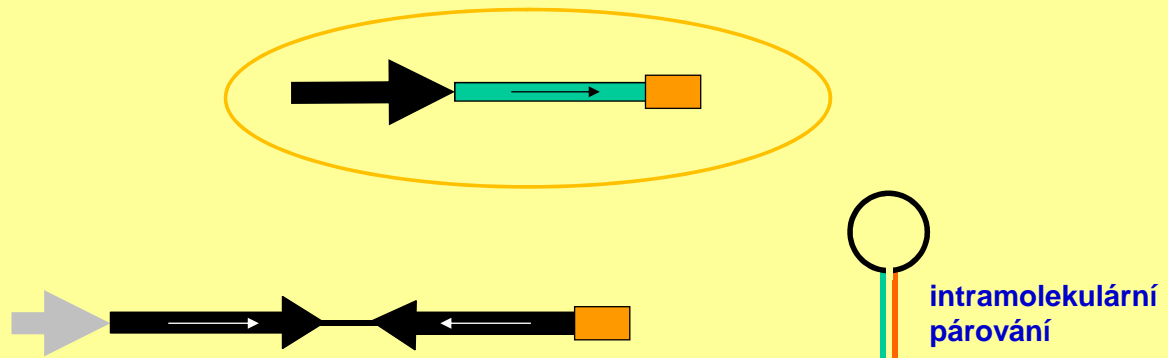
Lze takto indukovat TGS?

# Cílená indukce umlčování (TGS)

navození tvorby siRNA proti promotoru:

2) vnesení vlásenkového konstruktů ze sekvence promotoru  
( ( 4) amiRNA – miRNA cílicí na sekvenci promotoru))

- dsRNA, štěpení DCL, tvorba siRNA, sekvenčně spec. metylace promotoru

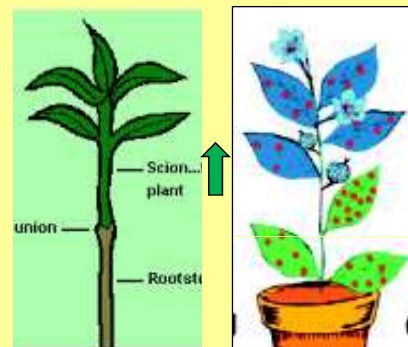


# Epimutagenese

- TGS (změny na úrovni chromatinu) **potenciálně dědičné změny i bez přítomnosti primárního induktoru!** = řadí se mezi NBT

malé RNA mohou vznikat:

- z transgenu
  - z virového vektoru
  - přicházejí z podnože
- } **není GM**



- vznikající sRNA mohou ovlivňovat genovou expresi i u herbivorů (hmyzu, hlístů)  
= epimutagenese škůdce ve volné přírodě

## 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 geneticky upravených rostlin**
  - analýzy změněné genetické informace (přítomnosti transgenů)
  - analýzy místa inserce transgenů (hodnocení rizika)
- Pokročilé metody šlechtění (NBT)

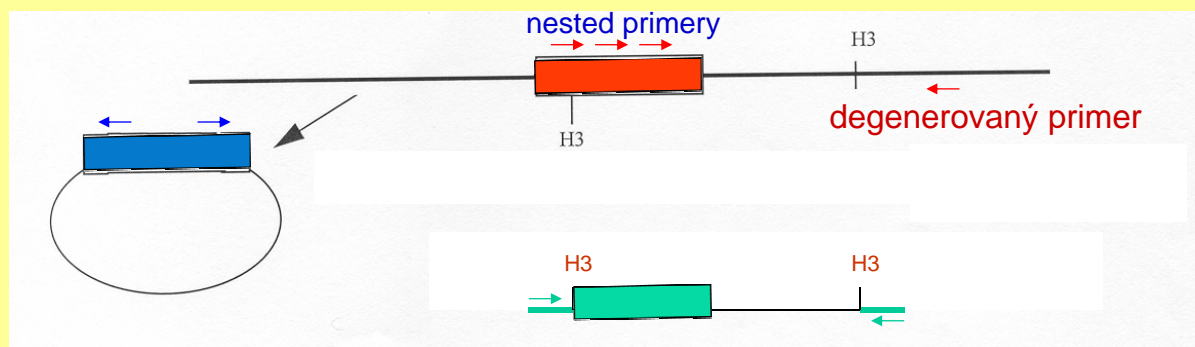
## Kontrola plodin – jsou povolené (=„bezpečné“)?

- Je GM? Obsahuje cizorodou DNA?
  - obsahuje (jen) povolené inserce?
  - jak zjistit nepovolené inserce?
- vzorkování, izolace DNA, PCR či hybridizace na chipech
- detekce známých regulačních sekvencí, *T-DNA LB (RB)*
- detekce běžných transgenů (selekčních genů apod.)
- detekce transgenů někde ve světě povolených

Co když jsou vnesené sekvence původem z téhož druhu?

# Analýzy inserce transgenu

- počet kopií – Southernova hybridizace (qRT-PCR)
- místo inserce:
  - TAIL-PCR (specifické a deg. primery, 2-3 cykly PCR)
  - iPCR (restrikce, ligace - cirkularizace, PCR spec. primery)
  - adaptorová PCR (restrikce, lig.adaptorů, PCR adapt. prim.)



# Analýzy místa inserce - hodnocení rizika

- ovlivnění rostlinných genů – JAK?
  - přímá mutace CDS
  - změny v regulačních sekvencích rostlinných genů
    - problematické hodnocení (*CRE*, enhancery)
  - změny vyvolané regulačními sekvencemi v inserci
  - změny v uspořádání chromatinu (důsledkem inserce)
  - ovlivnění prostřednictvím sRNA
- nově vzniklé ORFs? Jsou nebezpečné?
  - identifikace
  - srovnání (blast) s databázemi toxinů a alergenů
  - *in silico* analýzy štěpitelnosti v trávicím traktu apod.



# Stimulace přesné integrace transgenu

homologní rekombinací:

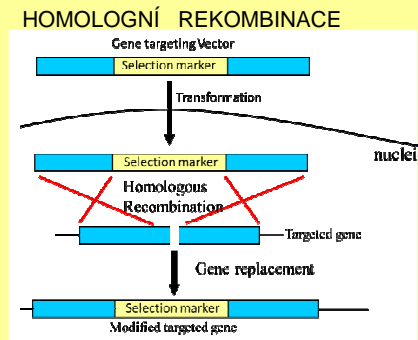
- expresí rekombinačních enzymů (i bakteriálních)
- represe či mutageneze genů účastnících se ilegální rekombinace, inhibice jejich produktů
- cíleným vytvořením **DSB** expresí místně specifické endonukleázy (viz příště)

## Reparace DSB

Místně specifická inzerce transgenu (= GM)

- integrace transgenu s homologními koncovými sekvencemi (homologní rekombinací)
- integrace nehomologní rekombinací v místě DSB

Místně specifická mutageneze



# Stimulace přesné integrace transgenu

nehomologní rekombinací

- použitím **místně specifických rekombinačních systémů** prokaryot a nižších eukaryot (rekombináza/*rozpoznávané cílové místo*) – integrace do místa dřívější integrace úseku DNA s cílovým místem:

*Cre/lox*

*Flp/frt*

*R/RS*

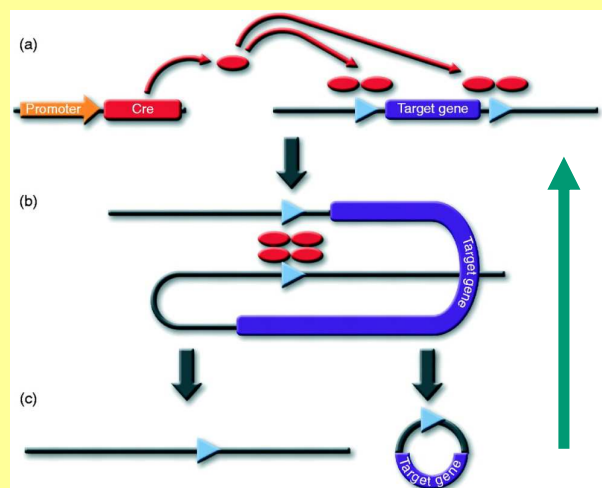
bakteriofága P1

*Saccharomyces cerevisiae*

*Zygosaccharomyces rouxii*

## Cre/loxP

- cílená integrace (↑) do místa předchozí inzerce
- další využití - specifické vystřížení selekčního markeru (↓)

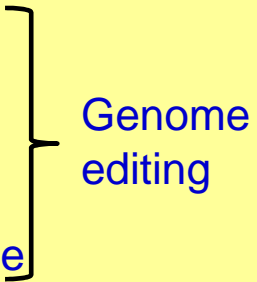




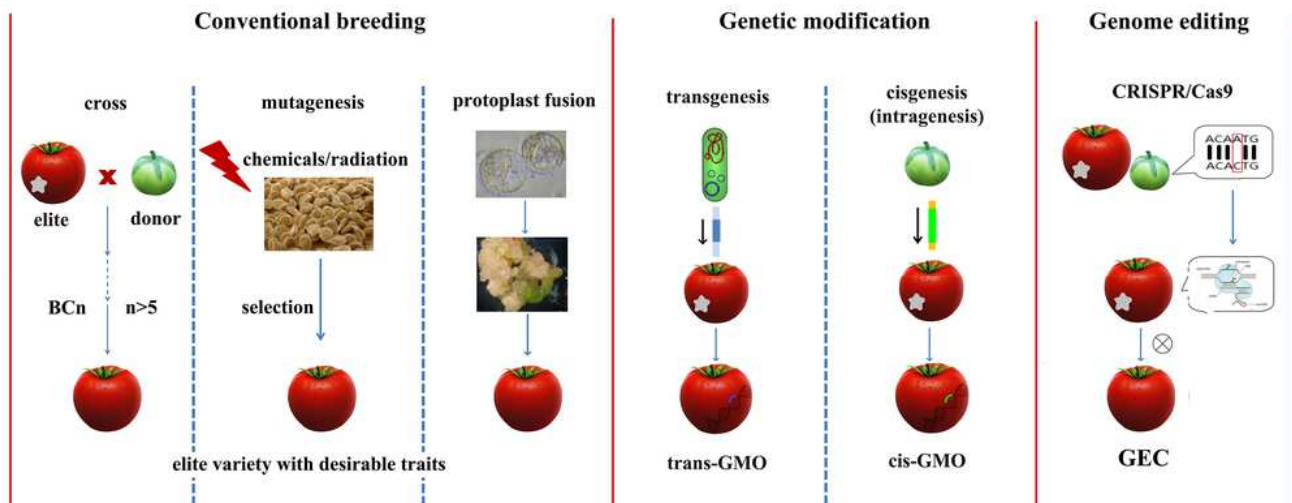
## Obsah přednášky

- 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 geneticky upravených rostlin
  - analýzy změněné genetické informace (přítomnosti transgenů)
  - analýzy místa inzerce transgenů (hodnocení rizika)
- Pokročilé metody šlechtění (NBT)

## New breeding techniques

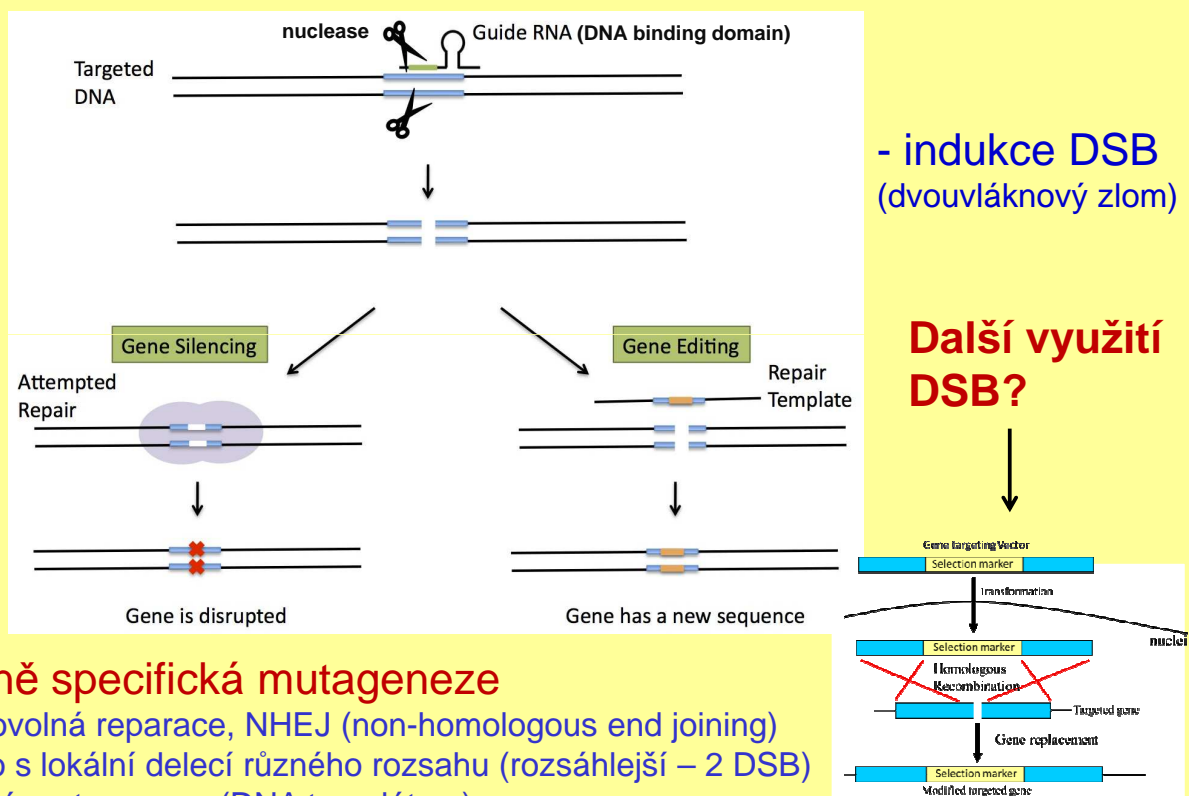
- Místně specifické nukleázy (SDN)
    - Zinc finger
    - TALEN
    - CRISPR/CAS9
  - Oligonukleotidy zprostředkovaná mutageneze
  - Reverzní křížení
  
  - Cisgenoze & Intragenoze
  - Metylace DNA řízená sRNA (epimutageneze)
  - Roubování na GM podnož
  - Agro-infiltrace, Infekce rekombinantním virem
- 

# Klasické šlechtění x GM x genome editing



- limitované využití pro změny vlastností – proč?
- výsledek neodlišitelný od klasické mutagenese (po odkřížení editovacího transgenu / odléčení rekombinantního viru)
- složitější selekce editovaných jedinců – jak?

## Místně specifické nukleázy (SDN)



### Místně specifická mutagenese

- samovolná reparace, NHEJ (non-homologous end joining)
- často s lokální delecí různého rozsahu (rozsáhlejší – 2 DSB)
- řízená mutagenese (DNA templátem)

# Oligonukleotidy zprostředkovaná mutageneze

## Oligonucleotide directed mutagenesis

syn.: oligonucleotide-mediated gene modification, targeted gene correction, targeted gene repair, RNA-templated DNA repair, ...

- mutace navozené oligonukleotidy komplementárními k cílovému místu (s kýženou změnou)
- mutace bodové, krátké delece, krátké inserce
- ne zcela jasný mechanismus (reparační procesy)
- **templát:**
  - DNA oligonukleotidy s modifikovanými konci
  - DNA/RNA duplexy
  - RNA, ...

# Oligonukleotidy zprostředkovaná mutageneze

- vnesení elektroporací, PEG transfekcí, balisticky
- doprovázeno mutacemi v necílových sekvencích
- nízká účinnost (problémy se selekcí – jaké nově získané znaky se dají snadno selektovat?)
- detekce špatného párování opravnými mechanismy a oprava dle původní sekvence

(řešení: DNA s modifikovanými nukleotidy:

2'-Fluoro-Uridine, 5-Methyl-deoxyCytidine, 2,6-Diaminopurine nebo Iso-deoxyGuanosine)

- využití zatím jen okrajové, ale BASF 2009:

CLEARFIELD®Production System

# Cílené vytvoření dvouvláknového zlomu DNA (DSB) – 1. generace ZFN, TALEN

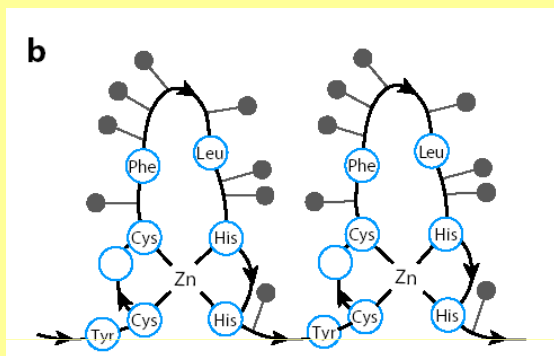
- **zlom v konkrétním místě genomu** (vhodné znát kompletní genomovou sekvenci x chybné cíle)
- **štěpení chimerickými (fúzními) proteiny**

**nukleázová doména:** restriktáza Fok I

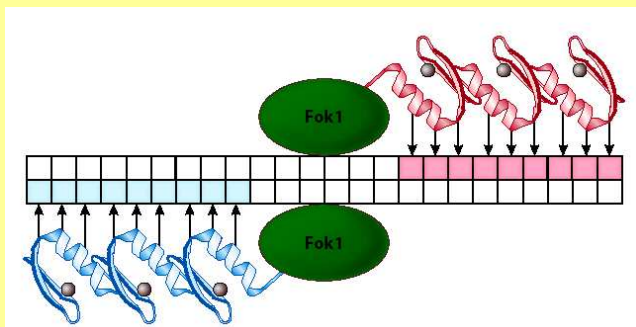
**DNA vazebná doména:**

- **Zn-finger** – transkripční faktory (**ZnF nucleases = ZFN**)
- **transcription activator-like efektoři (TAL effector nucleases = TALEN)**
- původem z bakterií *Xanthomonas*

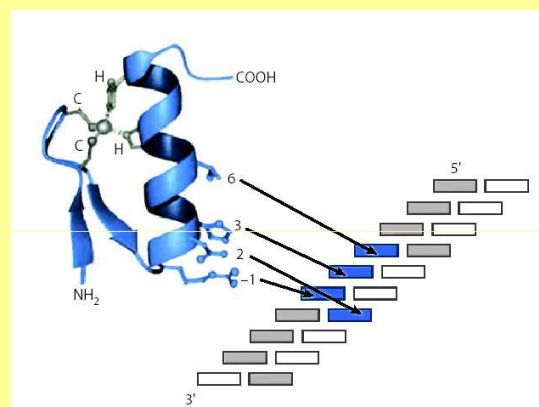
## Zn-finger domény – možnost designovat na míru



- vyznačené konzervované amk
- černá kolečka – amk interagující s DNA



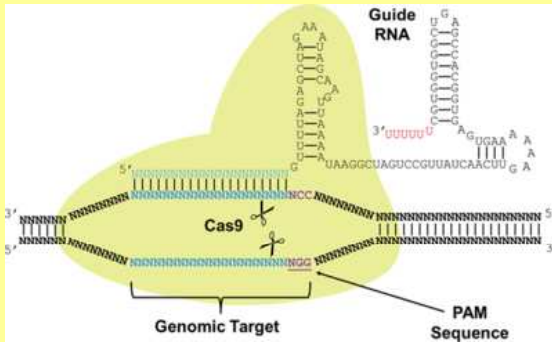
sekvenčně specifické rozpoznání DNA: 3(-4) nt/finger



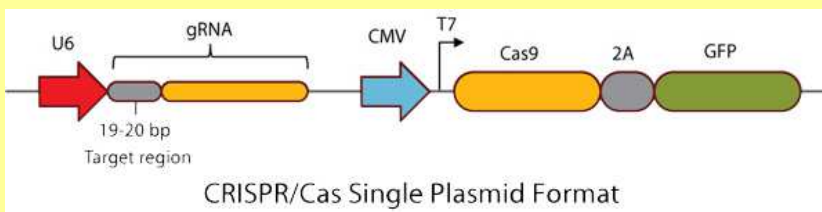
- místně specifické štěpení
- využití k cílené modifikaci DNA (integraci transgenů)

# CRISPR/Cas9

- bakterie a archea – obrana proti invazním DNA (virům a plasmidům) – adaptivní imunita - crRNA guide

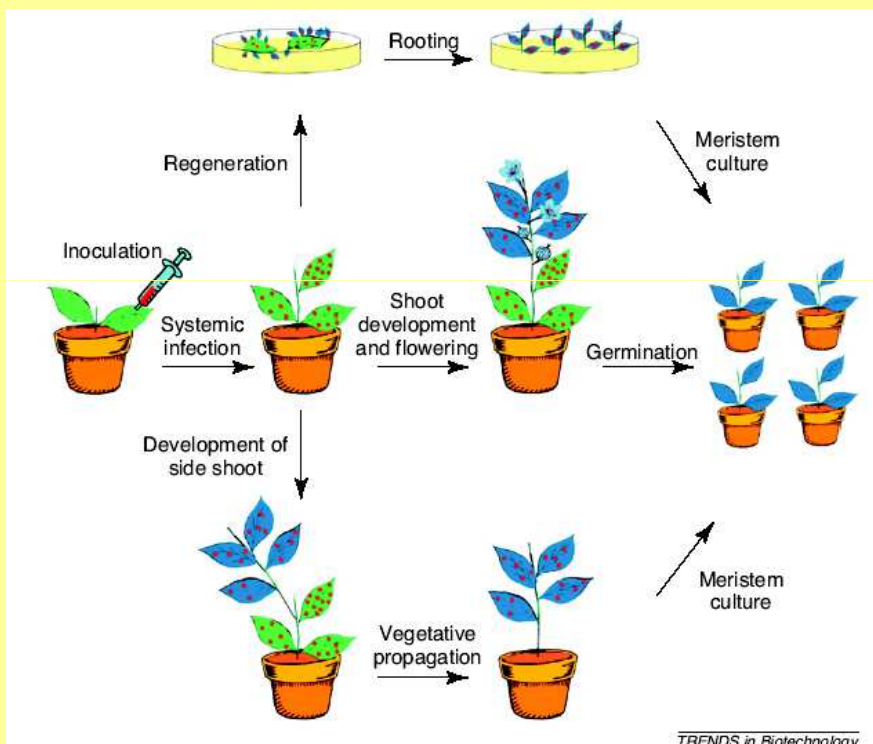


- rozpoznání cílového místa – cca 20 nt (přesnost ?)
- účinná indukce štěpení Cas9 (dvouvláknový zlom)



## Zn-finger nukleázy v kombinaci s virovými vektory

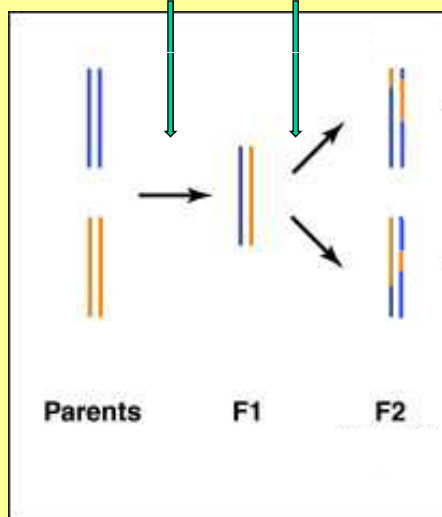
- indukce DSB v určité sekvenci – nepřesná reparace (inaktivace)
- regenerace ne GM rostlin (a potenciálně i bez *in vitro* kultivace)



# Reverse breeding

- **generativní** pomnožení elitních hybridů s využitím GM mezistupně

crossing-over při meióze



→ F1 uniformní - pokud jsou rodiče plně homozygotní (= dihaploidní)

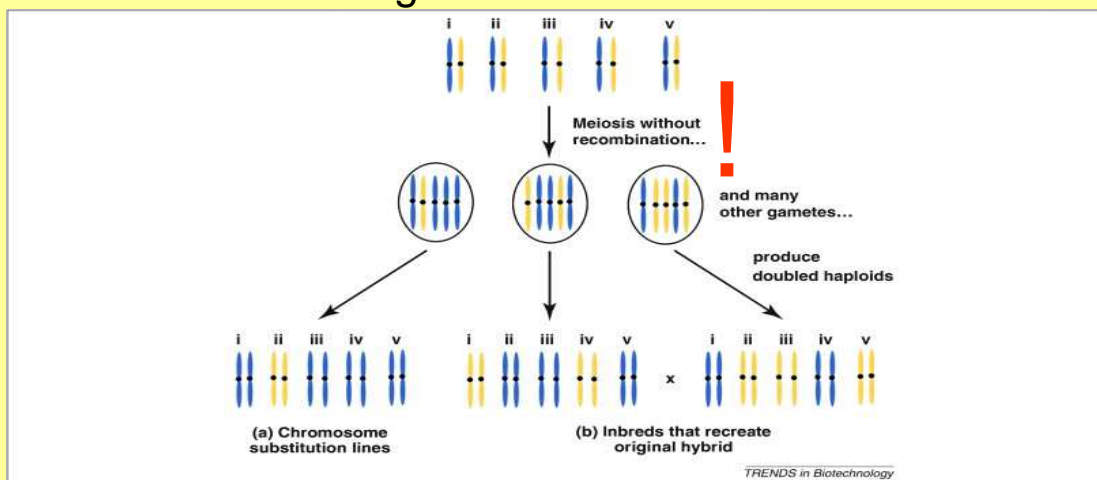
→ F2 – nekonečně kombinací (Mendel studoval geny na různých chromozómech!)

**Jak získat velké množství identických elitních F2 hybridů?**

- vegetativní pomnožení (*in vitro*)
- získání dihaploidních rodičů, jejichž křížením bude vznikat (uniformně)

# Reverse breeding

- získání dihaploidních rodičů s rodičovskými kombinacemi genů na chromozómech



Chan, Trends in Biotech (2010) 28:605-610

**Blokování crossing-overu** – inaktivace esenciálních genů (např. DMC1, Spo11) – např. transformací RNAi konstruktem

**Tvorba haploidů a posléze dihaploidů**

**Výběr dihaploidů s danými kombinacemi chromozómů (a bez transgenů)**