

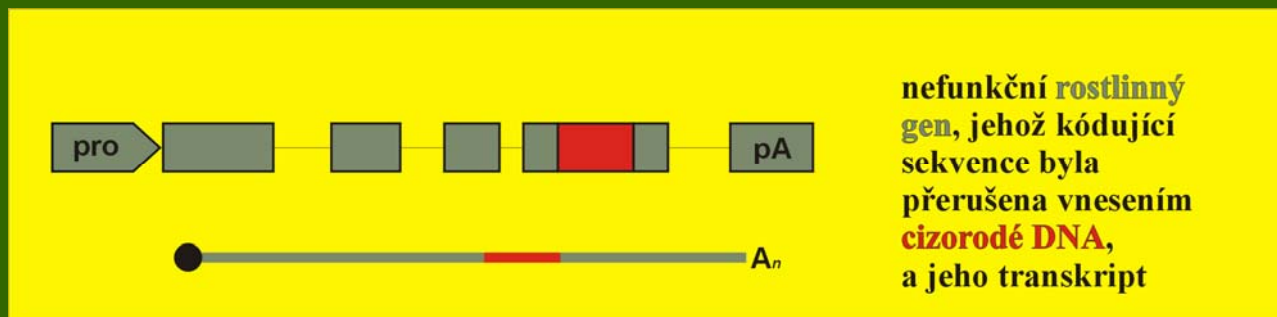
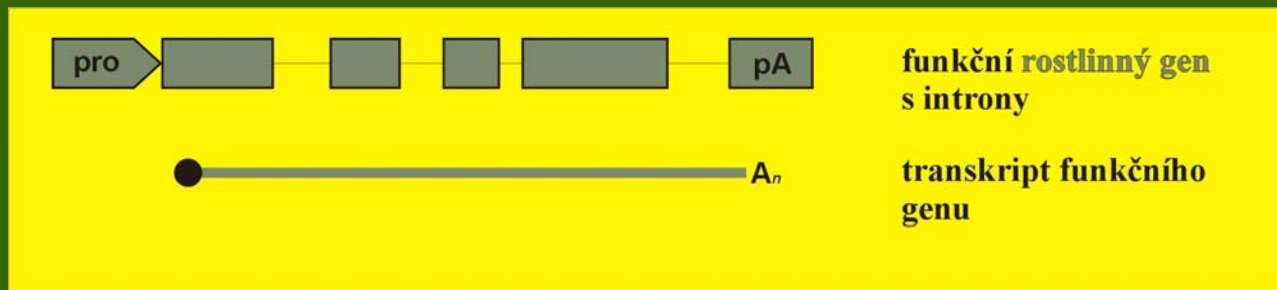
Transgenoze a reverzní genetika

Metody transformace
rostlinných buněk
Rekombinace

Využití transgenozy

2

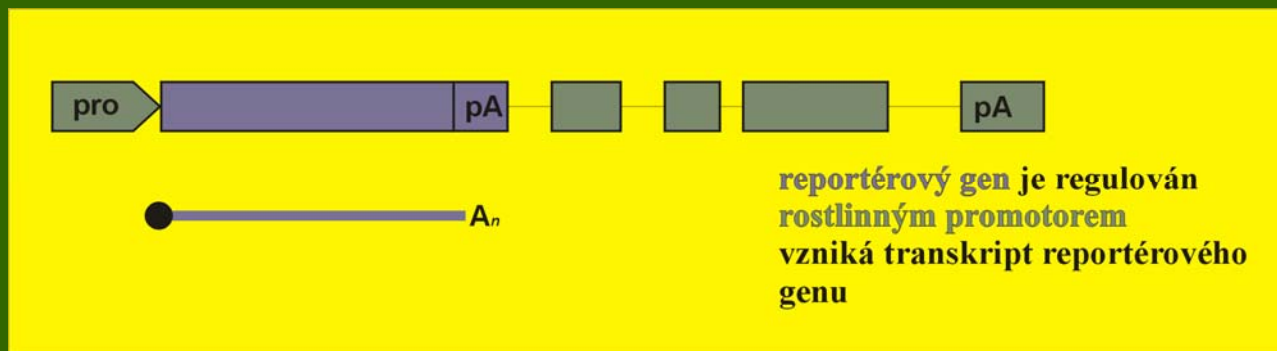
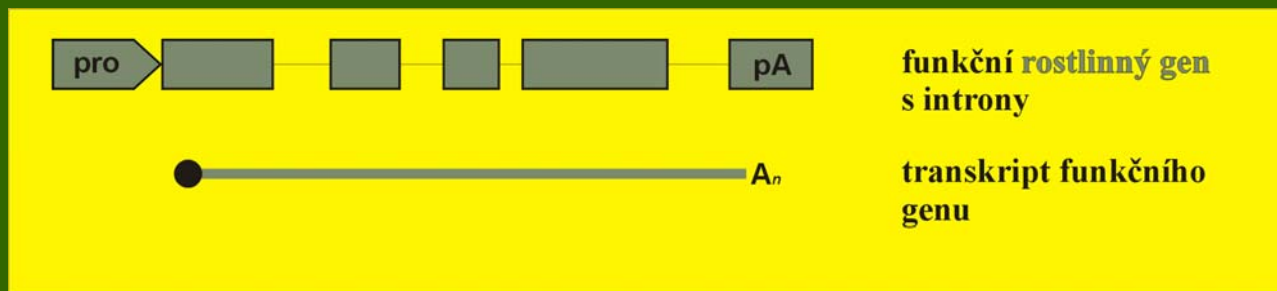
- Mutageneze (ztráta funkce)



Využití transgenozy

3

- Charakterizace promotoru na základě exprese reportérového genu

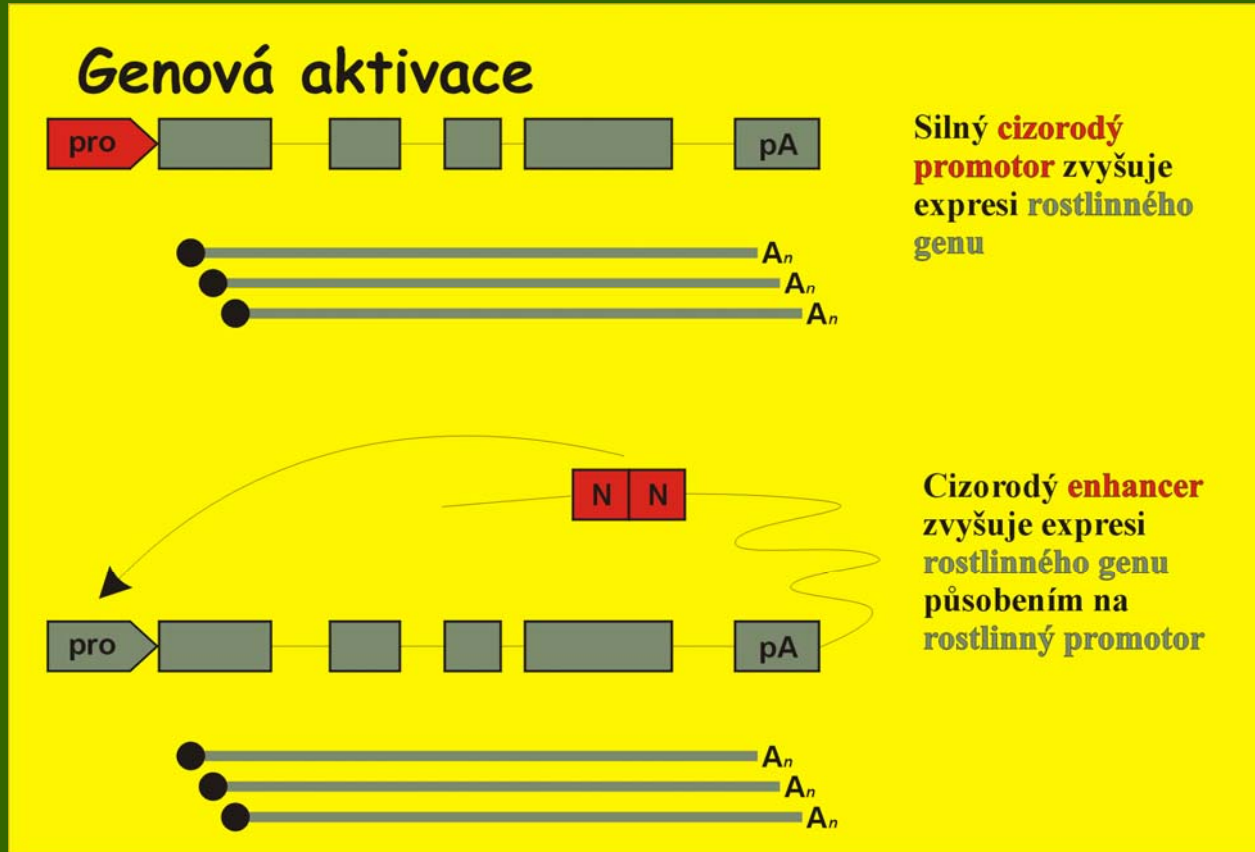


Využití transgenozy

- Charakterizace kódující oblasti zesílením její exprese (enhancer, promotor)

Využití transgenozy

5



Využití transgenozy

- Exprese cizorodého genu

Využití transgenozy

Gene therapy

7

- Cílené potlačení funkce genu, jehož produkt spouští kaskádu reakcí vedoucích k onemocnění
- Náhrada či oprava chybějícího, vadného genu

Optimalizace transformace

- výběr
 - rostlinného materiálu (schopnost buněčného dělení, případně regenerace)
 - účinné metody přenosu DNA
 - selekčního systému

Metody transformace

9

„přirozená“ metoda

- *via Agrobacterium*
 - další modifikace metody (agroinfekce, vakuová infiltrace)
- pomocí rostlinného viru
 - přechodná (transientní) exprese

„direct gene transfer“

vnesení DNA do protoplastu pomocí:

- elektroporace
- působením PEGu (polyethylenglykol)

mikroinjekce

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

agrolistika (kombinace využití agrobakteria a biolistiky)

Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

rod *Agrobacterium*

- půdní, gram - bakterie
- *Rhizobiaceae*
- fytopatogenní druhy *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*
(vyvolání onemocnění podmíněno přítomností velkého plasmidu, 150 - 200 kb)

rod *Agrobacterium*

A. tumefaciens

Ti plasmid („tumor-inducing“)
onemocnění „crown gall disease“

A. rhizogenes

Ri plasmid („root-inducing“)
onemocnění „hairy root disease“

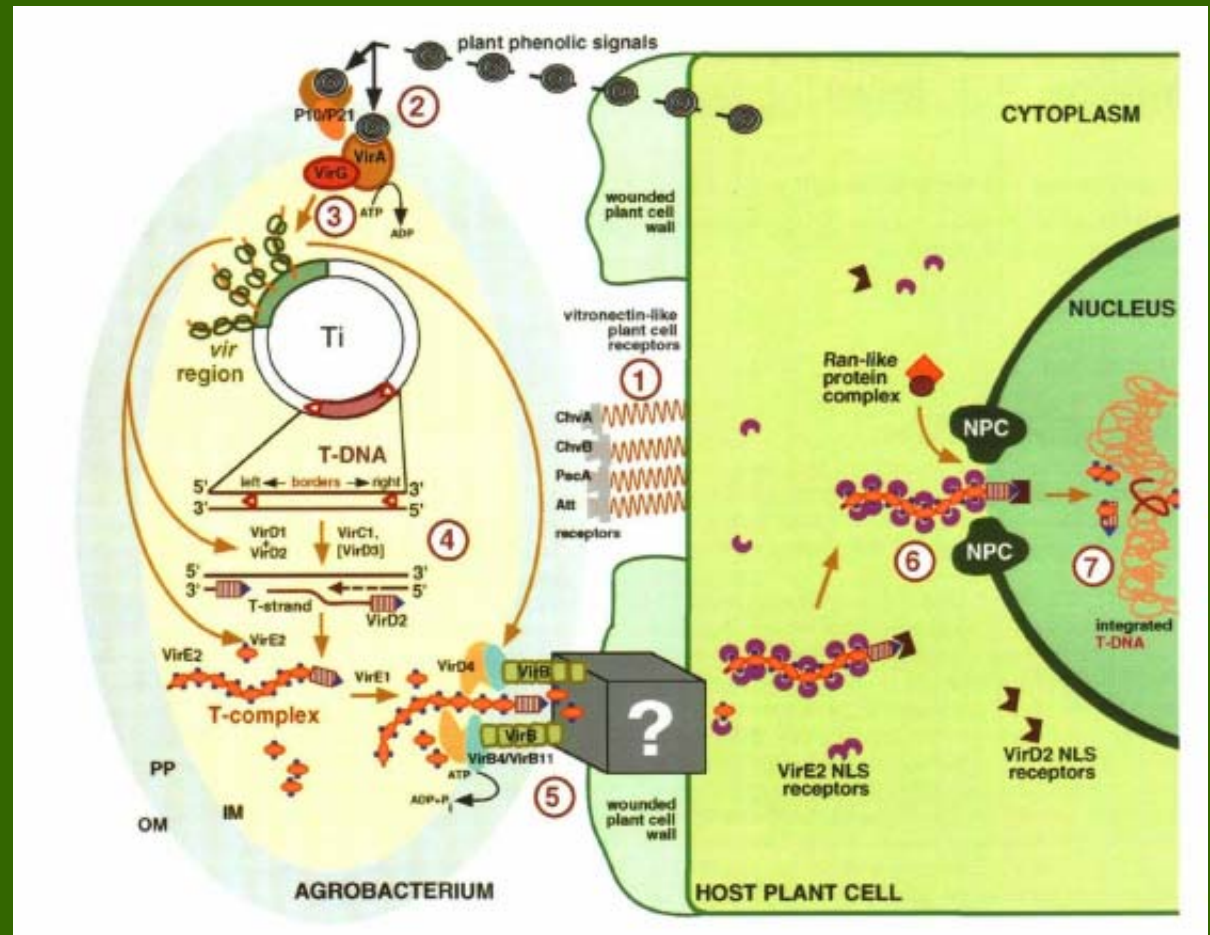


Agrobacteriální infekce

12

součinnost tří
genetických komponent:

- přenos části Ti, Ri plasmidu (T-DNA) do jádra rostlinné buňky
- *vir* oblast (Ti, Ri plasmid)
- chromozomální geny agrobakteria



T-DNA

„tranferred DNA“

geny pro syntézu opinů (zdroj C, N, energie pro agrobakterium)
a látek hormonální povahy

T-DNA může sestávat z jednoho či dvou úseků

T_L-DNA (left), T_R-DNA (right)

velikost T-DNA 15-45 kb

T-DNA ohraničena levou a pravou hraniční oblastí

(přímé repetice 25 bp)

Hraniční oblast

5'-CGGCAGGATATATTCAATTGTAAAT

GCCGTCCTATATAAGTTAACATTTA-5'



a

5'- TGGCAGGATATATACCGTTGTAATT

ACCGTCCTATATATGGCAACATTAA-5'



b

Fig. 3a,b. Site of the nick between 3rd and 4th basepairs (▲) of the 25-bp border repeat (*underlined*, T-strand portion). **a** Left border. **b** Right border

vir oblast („virulence region“) Ti, Ri plasmidu

geny pro přenos T-DNA do rostlinné buňky

produktem *Vir* proteiny

induktory exprese nízkomolekulární fenolické sloučeniny
(acetosyringon), produkce v reakci na poranění u většiny 2D rostlin

Funkce Vir proteinů:

indukce exprese *vir* oblasti (VirA, VirG - reakce na fenolickou látku)

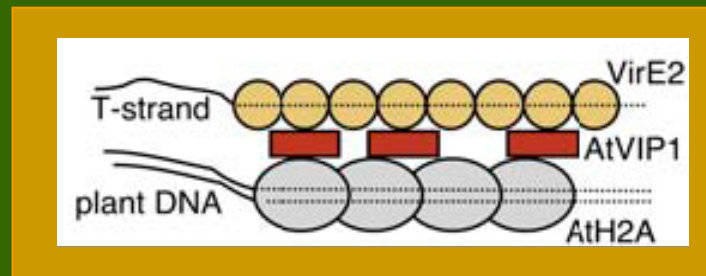
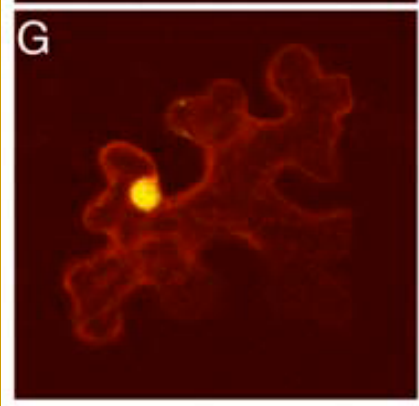
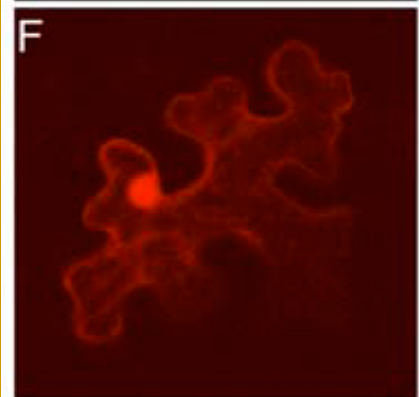
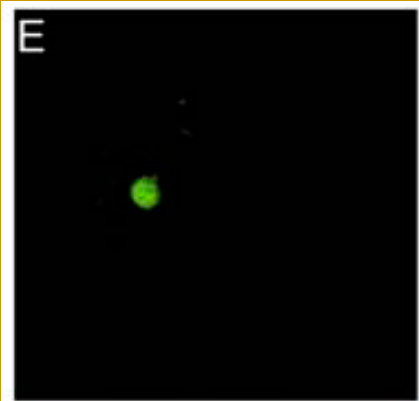
vystřižení T-DNA (VirD1, VirD2)

tvorba póru pro mezibuněčný přenos (VirB1-11)

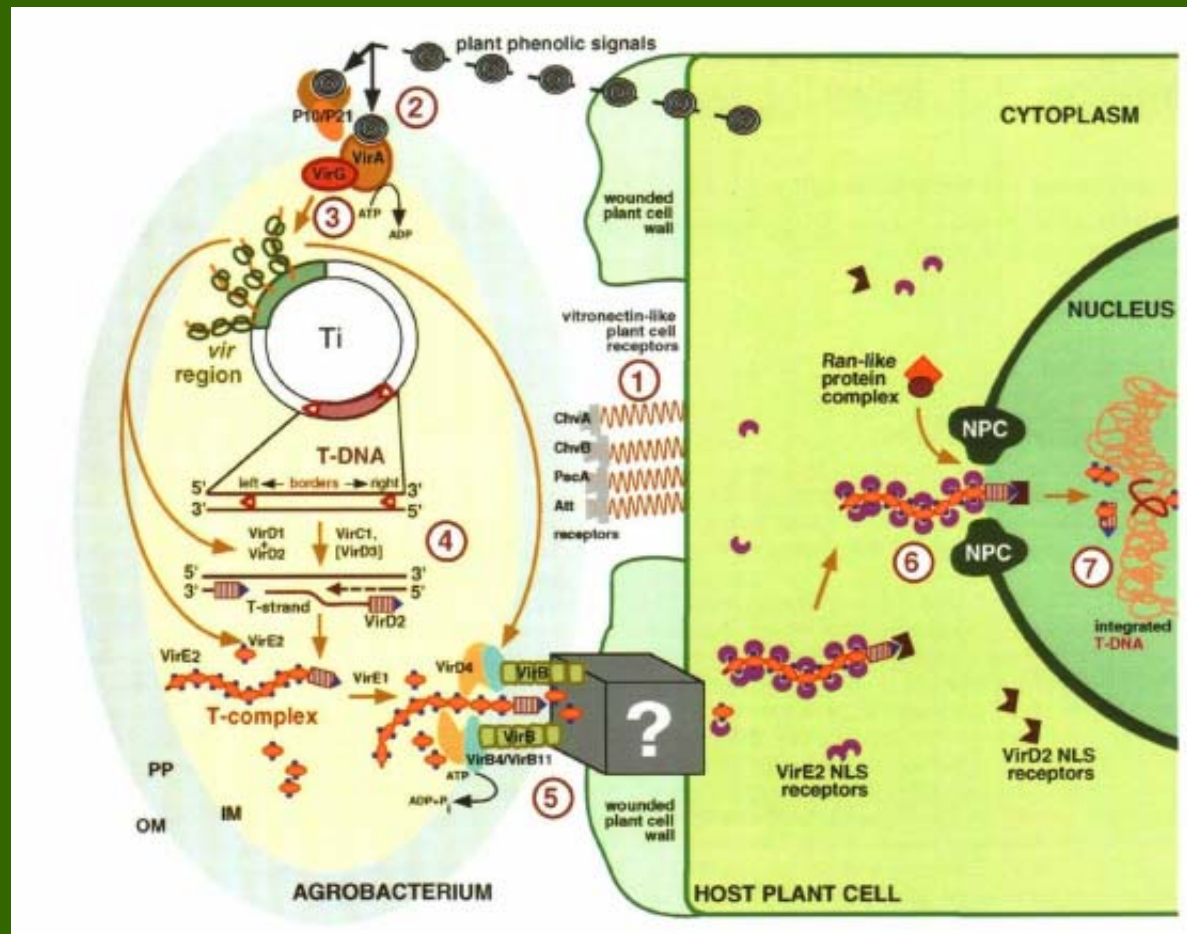
? ochrana T-řetězce před degradací (VirE2)

přenos T-DNA (VirE2 vazba na rostlinný faktor VIP, VirD2 s NLS vazba na KAP- α) a integrace do genomu rostlinné buňky

cílená proteolýza proteinů T-komplexu před integrací (VirF)

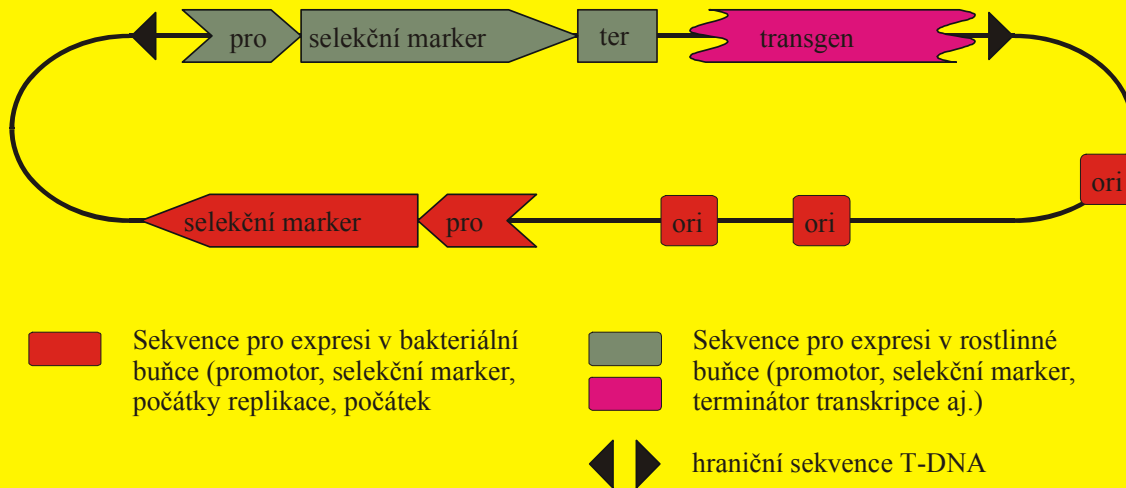


oblast chromozomální virulence



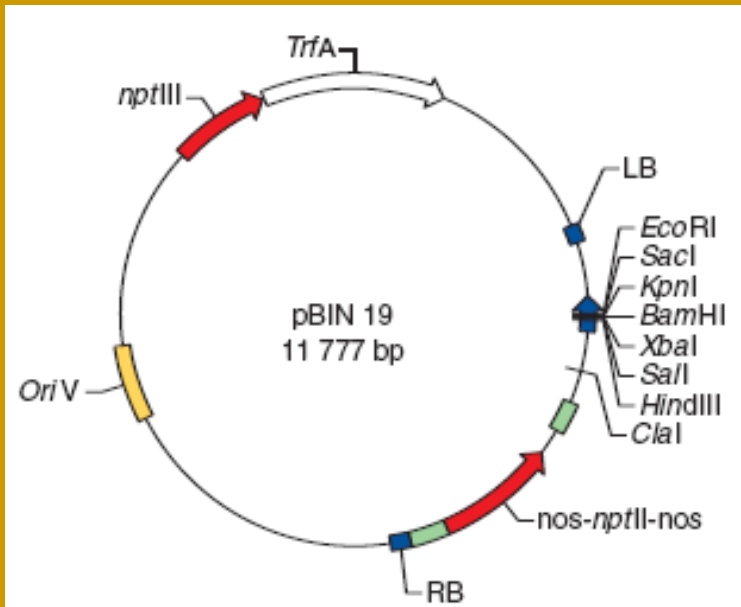
Binární vektory

Schema binárního transformačního vektoru pro přenos do rostlinné buňky pomocí agrobakteria



- upravený Ti plasmid:
- *helper* plasmid
- binární vektor
- BIBAC (binary bacterial artificial chromosome)

pBIN19



- upravený Ti plasmid:
- *helper* plasmid binární vektor

LB, RB

hraniční sekvence T-DNA

oriV

počátek replikace

nos-*nptII*-nos

gen Km resistance s promotorem a polyA

polylinker

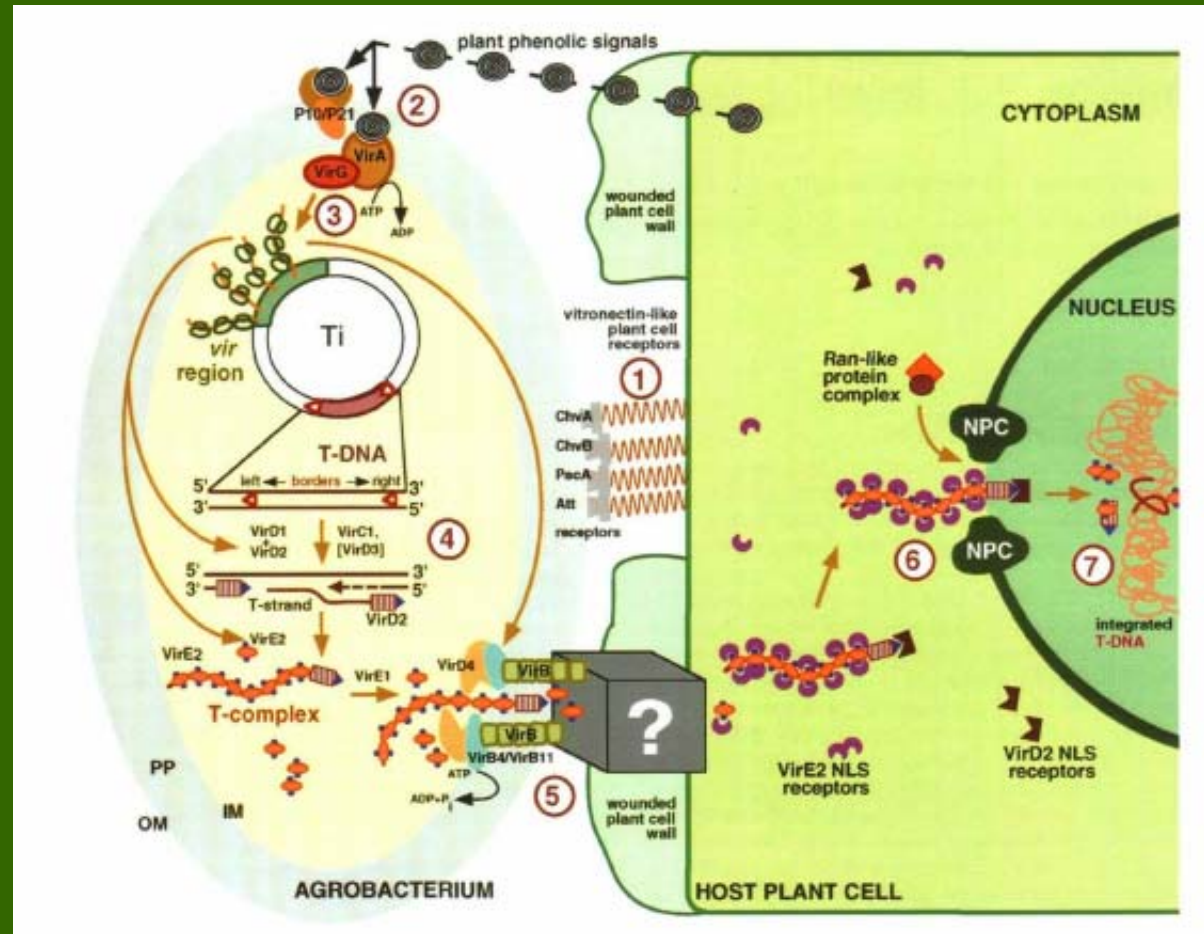
nptIII

Km resistance v bakterii

Transformace pomocí agrobakteria

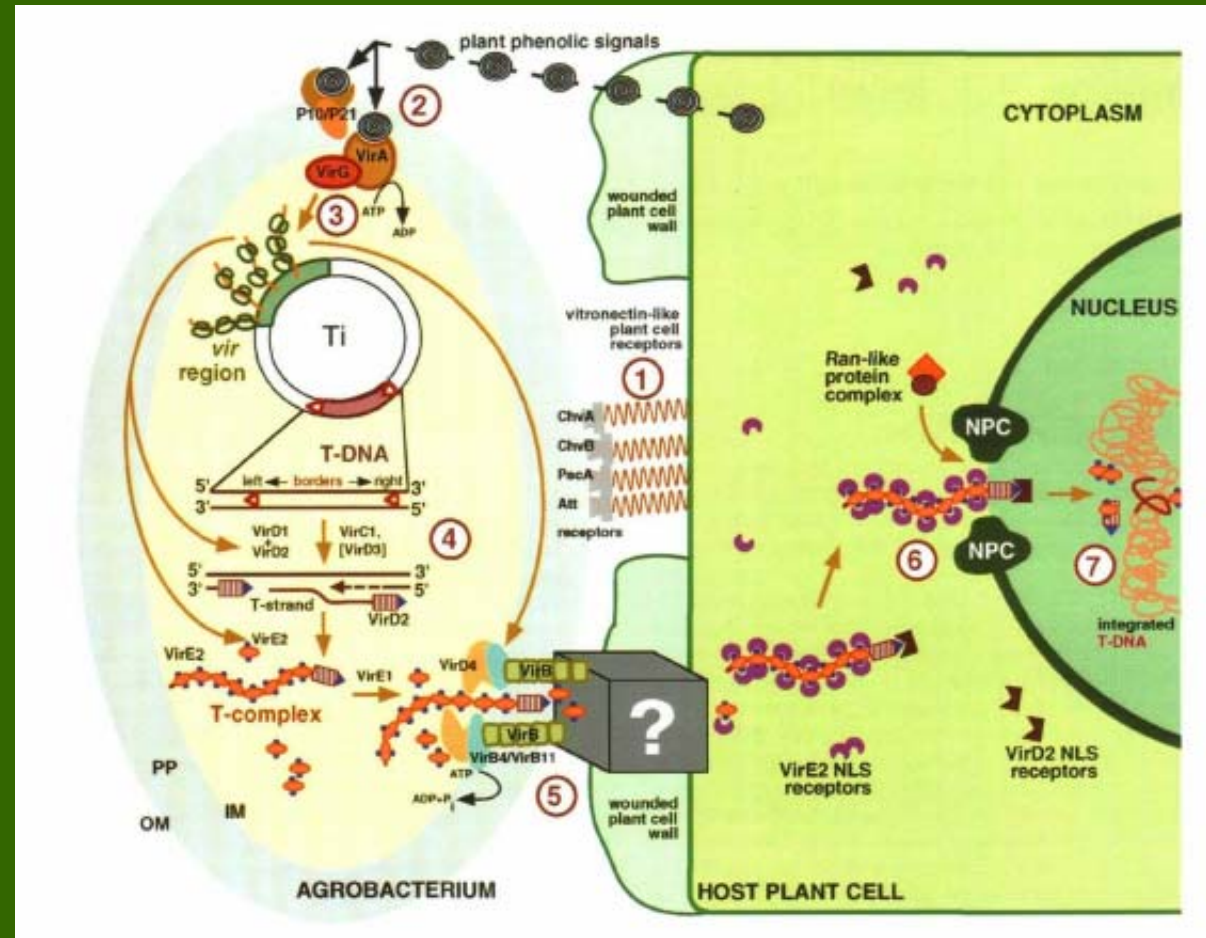
20

- kokultivací agrobakteria s rostlinným pletivem, buněčnou kulturou, protoplasty *in vitro*
- vakuovou infiltrací agrobakteria do pletiva
- inokulací in planta



Transformace pomocí agrobakteria

indukce *vir* oblasti
fenolickými
sloučeninami



Transformace pomocí agrobakteria

T-strand

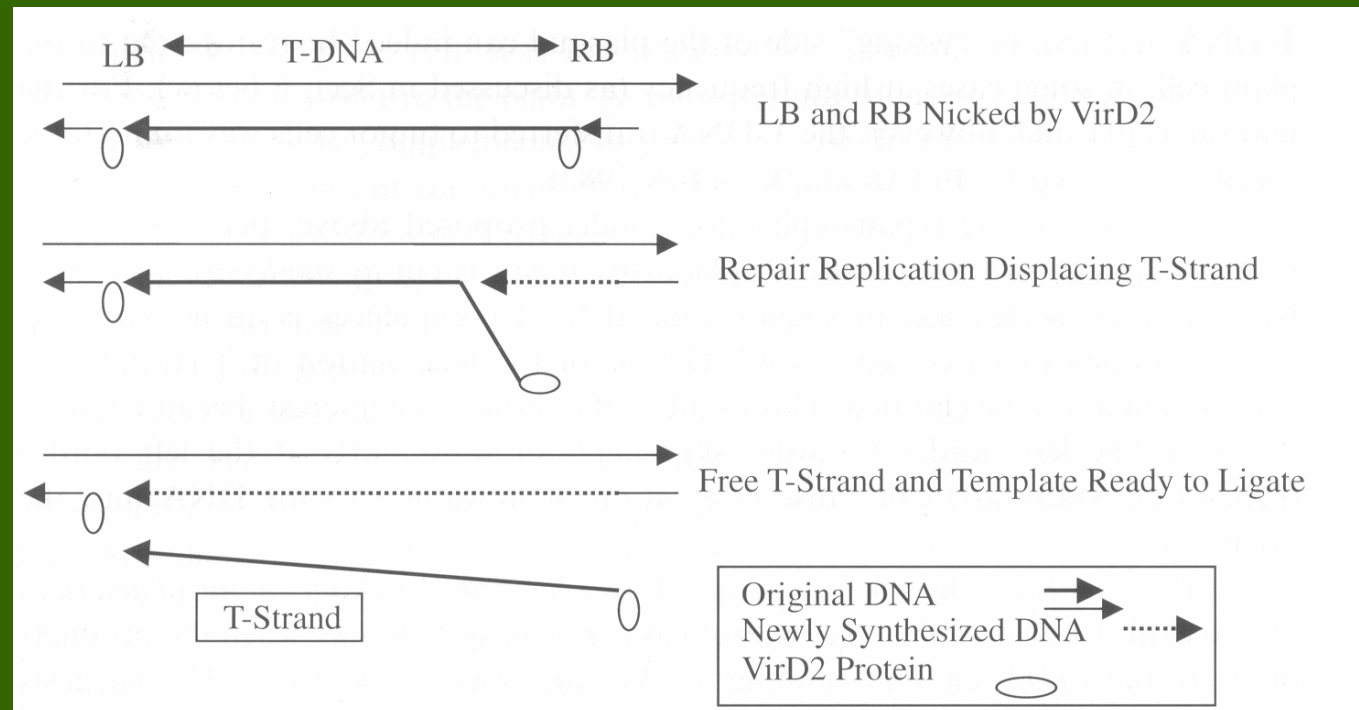


Fig. 4. The possibility of the nick at the right border of T-DNA serving as a starting point for DNA repair synthesis. This would displace the T-strand as it proceeds until the next nick site is reached at its 3' end (left border)

Transformace pomocí agrobakteria

vznik T-komplexu

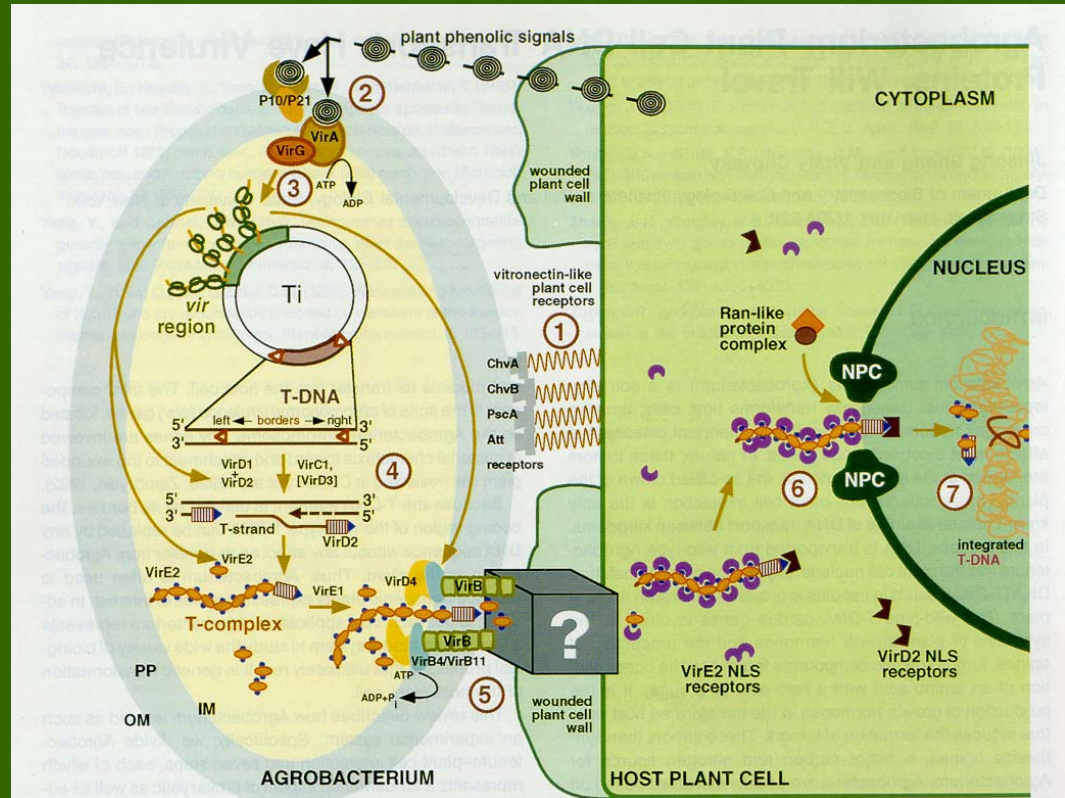
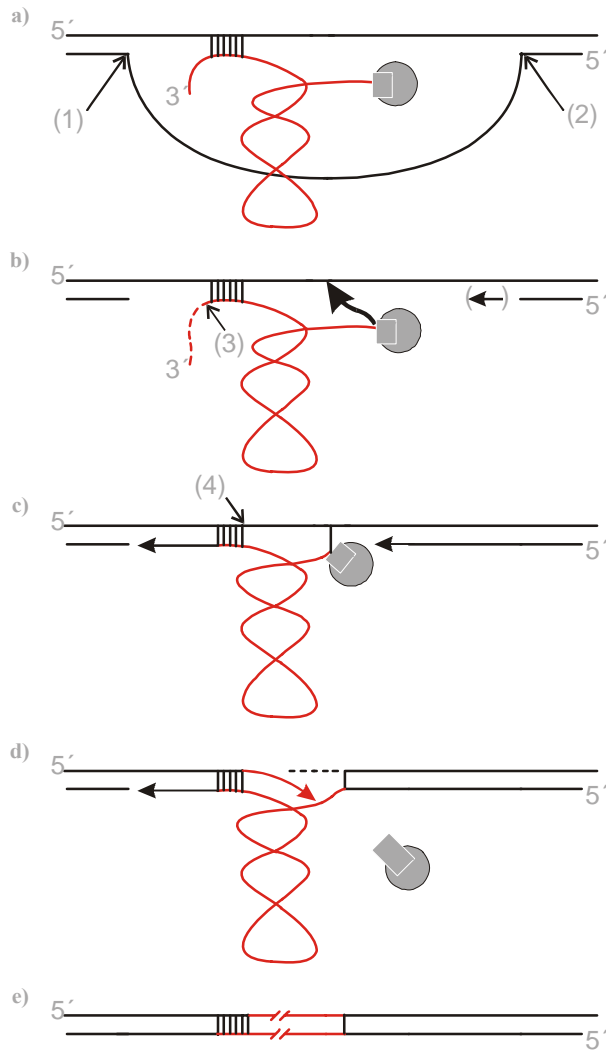


Figure 1. Agrobacterium–Plant Cell Interactions.

This diagram summarizes all major cellular reactions involved in T-DNA transport. Steps 1 through 7 indicate sequential processes that occur during Agrobacterium infection. Step 1, binding of Agrobacterium to the host cell surface receptors; step 2, recognition of plant signal molecules by the bacterial VirA/VirG sensor–transducer system; step 3, activation of the bacterial *vir* genes; step 4, production of the transferable T-strand; step 5, formation of the T-complex and its transport into the host plant cell; step 6, nuclear import of the T-complex; and step 7, T-DNA integration. IM, bacterial inner membrane; NPC, nuclear pore complex; OM, bacterial outer membrane; PP, bacterial periplasm.

Integrace T-DNA do genomu



modely:

dvojřetězcový zlom
oprava jednořetězcové mezery
model mikrohomologií

Přímá metoda transformace protoplastů

25

zbaveny buněčné stěny (bariéra přenosu DNA do buňky)

*průchod buněčnou membránou pomocí PEG a/nebo elektroporace nebo lipozomů

Přímá metoda transformace protoplastů

26

*nevýhodou

- integrace většího množství kopií (až 100 kopií integrováno do genomu, často do jediného místa)
- nepřesnost integrace (kopie často zkrácené, přeuspořádané)
- malá účinnost (ve srovnání s transformací agrobakterií)

*výhodou uniformita regenerovaného pletiva

Přímá metoda transformace protoplastů

27

izolace protoplastů

- *nejčastěji z mesophylových buněk, buněčné suspenzní kultury
- *poškozením buněčné stěny mechanicky nebo enzymaticky
- *po dobu regenerace buněčné stěny vyžadují vysokou osmotickou hodnotu média

Přímá metoda transformace protoplastů

28

PEG (polyethylen glykol)
možno kombinovat s elektroporací

elektroporace
podmínky elektroporace (síla pole) závislé na průměru buňky
důležitá délka a množství pulsů

liposomy
umělé lipidové váčky pro přenos DNA
ochrana DNA před degradací Dnázami
přenos DNA do protoplastu fúzí a endocytózou

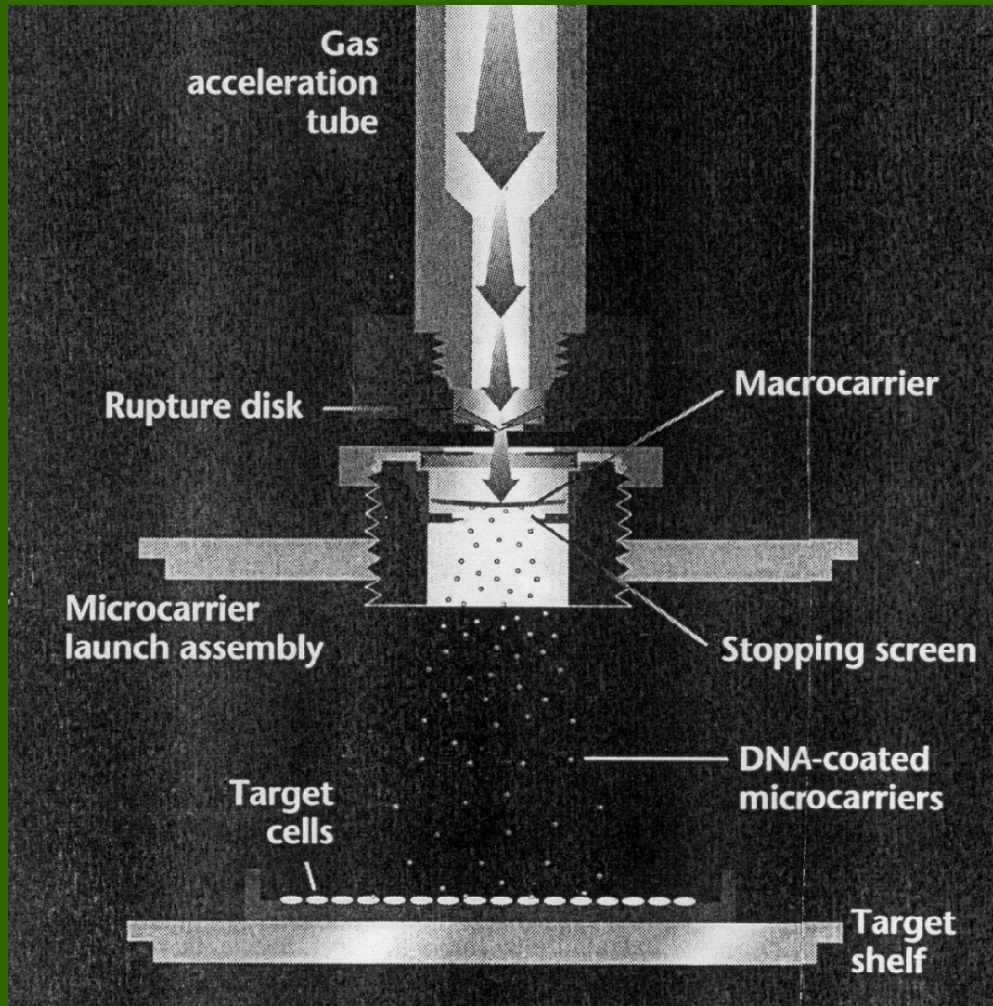
Biolistika

(„microprojectile or particle bombardment“)

- *mikroprojektily (Au, W)
- *particle gun

Particle gun

30



biolistika („microprojectile or particle bombardment“) 31

*použitelné pro jakékoli pletivo a rostlinný druh, limitováno jen schopností regenerace (výhodné pro transienční expresi), optimalizací přenos přímo do jádra či chloroplastu

Agrolistika (varianta biolistiky)

- plasmid s geny pro proteiny VirD1 a VirD2
- plasmid s hraničními oblastmi T-DNA ohraničujícími transgen a selekční marker

Způsobnost rostliny pro transformaci

32

❖ rostliny se liší

- velikostí genomu
- procentem vysoce repetitivních sekvencí (nekódující oblast)
- ploidii

druh	velikost haploidního genomu (bp)	hodnota 2C (obsah DNA v pg)	počet genů (odhad/ skutečný)	podíl vysoce repetitivních sekvencí
<i>Arabidopsis thaliana</i> (huseníček)	1.17×10^8	0.3	~ 25 000	10%
<i>Lilium longiflorum</i> (lilie)	9×10^{10}			
<i>Lycopersicon esculentum</i> (rajče)	6.55×10^8	5.1		
<i>Nicotiana tabacum</i> (tabák)	3.8×10^9	15.4	~ 60 000	>60%
<i>Oryza sativa</i> (rýže)	4×10^8	0.9		>50%
<i>Pinus resinosa</i> (borovice)	6.8×10^{10}			
<i>Psilotum nudum</i> (kapradina)	2.5×10^{11}			>80%
<i>Zea mays</i> (kukuřice)	5×10^9	11		
Phi-X 174 (virus <i>E. coli</i>)	5.3×10^3		10	
<i>E. coli</i>	4.6×10^6		4 377	
obojživelníci	$10^9 - 10^{11}$			
<i>Homo sapiens</i>	3.3×10^9		~ 60 000	

Způsobilost rostliny pro transformaci

34

- ❖ rostliny se liší velikostí genomu a procentem vysoce repetitivních sekvencí (nekódující oblast), ploidií
- ❖ integrace T-DNA do transkripčně aktivních oblastí - u tabáku a *Arabidopsis* stejná (oproti tomu při přímém přenosu či biolisticce není žádná preference)
- ❖ odlišná schopnost regenerace různých rostlinných druhů a jejich pletiv
- ❖ odlišná rychlost růstu a životního cyklu

Selekční systémy

35

❖ pozitivní selekční marker

- získání **resistance** k selekčnímu agens - **antibiotikum, herbicid**
- produkt selekčního markeru ± přidaný substrát způsobí **barevnou reakci, fluorescenci, luminiscenci, tzv. reportérové geny**

❖ selekce podle fenotypu - somaklonální variabilita

mohou vznikat **chiméry**



Somaklonální variabilita

- ❖ existence buněk, pletiv a celých rostlin, které vykazují fenotypovou odchylku od průměrného či normálního fenotypu somatické buňky, pletiva nebo rostliny, z nichž byly odvozeny (klonovány)
- ❖ odráží drobné spontánní změny v genotypu nebo v genové expresi

Transformační vektor

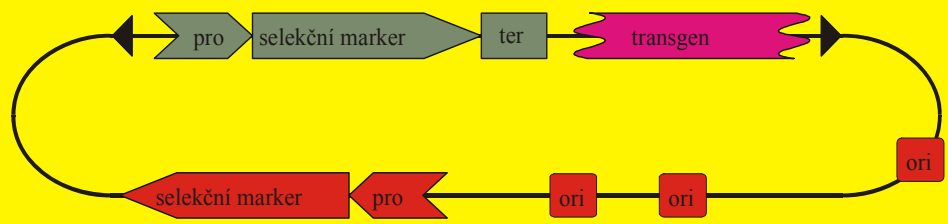
pro klonování v E. coli

- *počátek replikace
- *selekční marker pod kontrolou bakteriálního promotoru

pro přenos do agrobakteria a udržování

- *počátek mezibakteriálního přenosu
- *počátek replikace

Schema binárního transformačního vektoru pro přenos do rostlinné buňky pomocí agrobakteria



- █ Sekvence pro expresi v bakteriální buňce (promotor, selekční marker, počátky replikace, počátek
- █ Sekvence pro expresi v rostlinné buňce (promotor, selekční marker, terminátor transkripce aj.)
- ◄► hraniční sekvence T-DNA

pro přenos do rostliny pomocí agrobakteria

- *hraniční sekvence

pro selekci transgenních buněk

- *selekční marker pod kontrolou rostlinného promotoru

Kotransformace

transformace více vektory (u agrobakteria také více T-DNA, které mohou být na jednom vektoru nebo na odlišných vektorech)

každý vektor (T-DNA) nese jiný selekční marker

Selekční markery

39

gen	produkt genu	princip selekce	selekční agens
<i>nptII</i>	neomycinfosfotranferáza II	rezistence k antibiotiku	kanamycin neomycin
<i>hpt</i>	hygromycinfosfotransferáza		hygromycin
<i>dhfr</i>	dihydrofolátreduktáza		methotrexát
<i>ble</i>	vazebný protein bleomycinu		bleomycin
<i>cat</i>	chloramfenikolacetyltransferáza		chloramfenikol
<i>bar</i>	fosfinotricinacetyltransferáza	rezistence k herbicidu	fosfinotricin bialaphos
<i>ALS</i>	acetolaktátsyntáza		chlorsulfuron
<i>deh1</i>	dehalogenáza		dalapon

Transformace chloroplastů

- prokaryotická transkripce
- vysoký počet kopií v genomu
- plastidový genom nepřenositelný pylem
- není silencing
- „transplastome“

Rekombinace a oprava DNA

rekombinace molekul DNA zajišťuje v buňce

- genetickou variabilitu (crossing over při meiozi)
- opravu DNA po poškození
- inkorporaci transgenů do genomu

Rekombinace a oprava DNA

42

bakterie, kvasinky

preference homologní rekombinace při opravě DSB (dvojřetězcový zlom DNA) i při inkorporaci transgenů

rostliny, živočichové (většina eukaryot)

oprava DSB a inkorporace transgenů zajištěna zejména nehomologní rekombinací (spojení konců DNA)

Využití rekombinace v transgenozí

43

gene targeting

cílený a přesný zásah do genomu

pomocí homologní rekombinace mezi chromozomální a vnášenou DNA

rostliny, živočichové (většina eukaryot)

opravou syntetickými chimerickými oligonukleotidy RNA/DNA

Homologní rekombinace

44

frekvence homologní rekombinace

stanovuje se (experimentálně) *poměrem* buněk, u nichž dvě defektní (vzájemně komplementující) části genu vytvoří (homologní rekombinací) *funkční gen* a těch, v nichž jsou přítomny obě části genu, ale *gen není funkční*

Homologní rekombinace

45

1. **extrachromozomální rekombinace** rekombinace mezi dvěma vnášenými molekulami DNA

holé molekuly DNA i T-komplexy
u rostlin frekvence 1 až 4%

2. **intrachromozomální rekombinace**
rekombinace mezi dvěma úseky DNA na tomtéž chromozomu

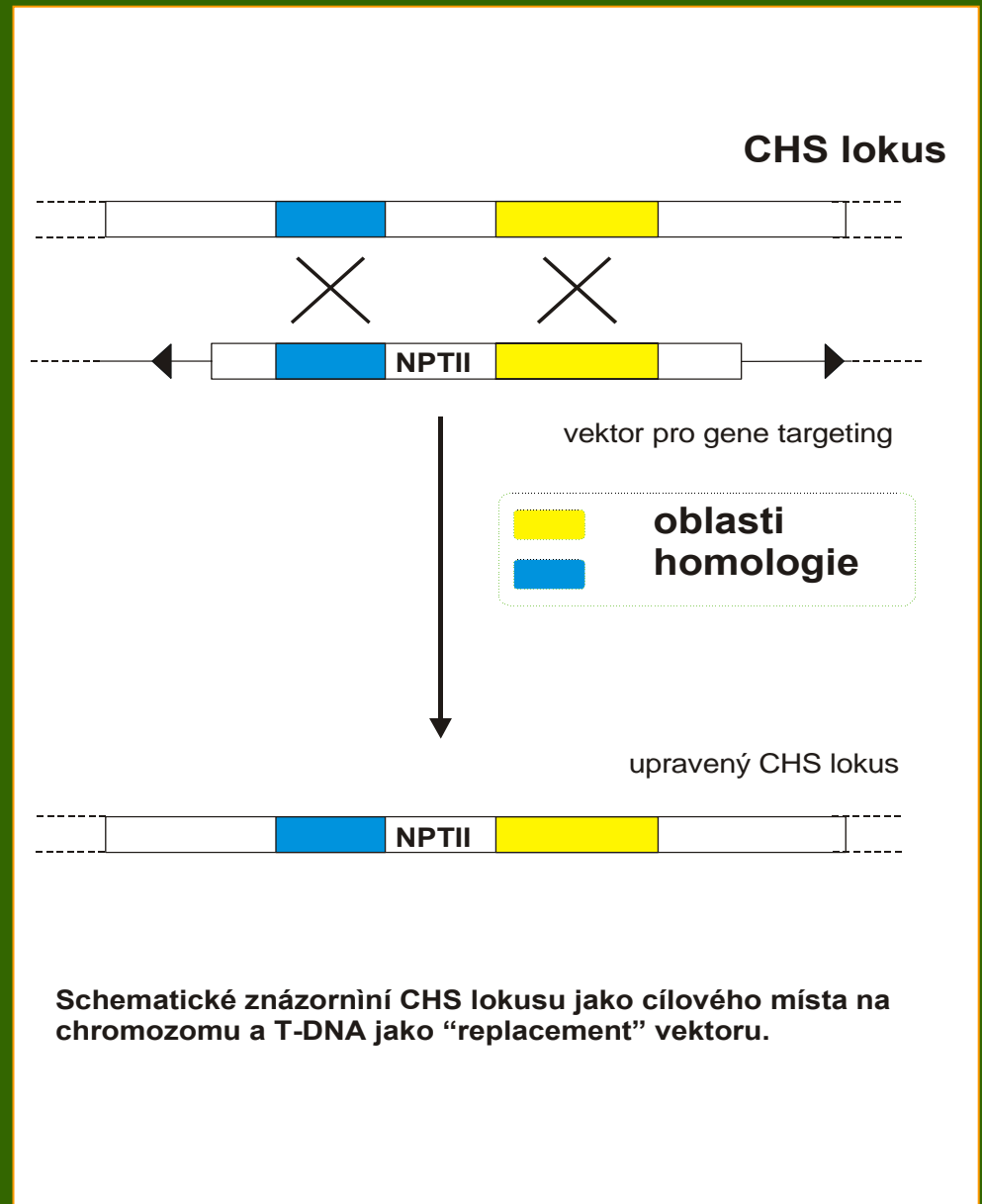
u rostlin frekvence 10^{-5} až 10^{-6}

pravděpodobně složitější mechanismus než u extrachromozomální rekombinace (nutné narušení struktury chromatinu)

3. **gene targeting**
rekombinace mezi vnášenou DNA a cílovým místem na chromozomu

Gene targeting

46



Ilegitimní (nehomologní) rekombinace

47

❖ integrace T-DNA

jenom několik bazí mikrohomologie s hraniční sekvencí v místě integrace
delece, přeuspořádání, **filler** (vyplňující) sekvence

zachována zpravidla pravá hraniční oblast (chrání VirD2 protein)

převládající způsob integrace DNA i u přímých metod transformace

Faktory ovlivňující homologní rekombinaci 48

• poměr homologní/nehomologní rekombinace (vysoká frekvence ilegální rekombinace u rostlin překážkou pro homologní rekombinaci)

vyšší rostliny 10^{-3} až 10^{-6}

savci 10^{-2} až 10^{-5}

nižší eukaryota (kvasinky, prvoci, vláknité houby) nad 10%

mech *Physcomitrella patens* 90%

• délka homologní sekvence

• ??? ploidie

• buněčný typ a fáze buněčného cyklu

Gene targeting

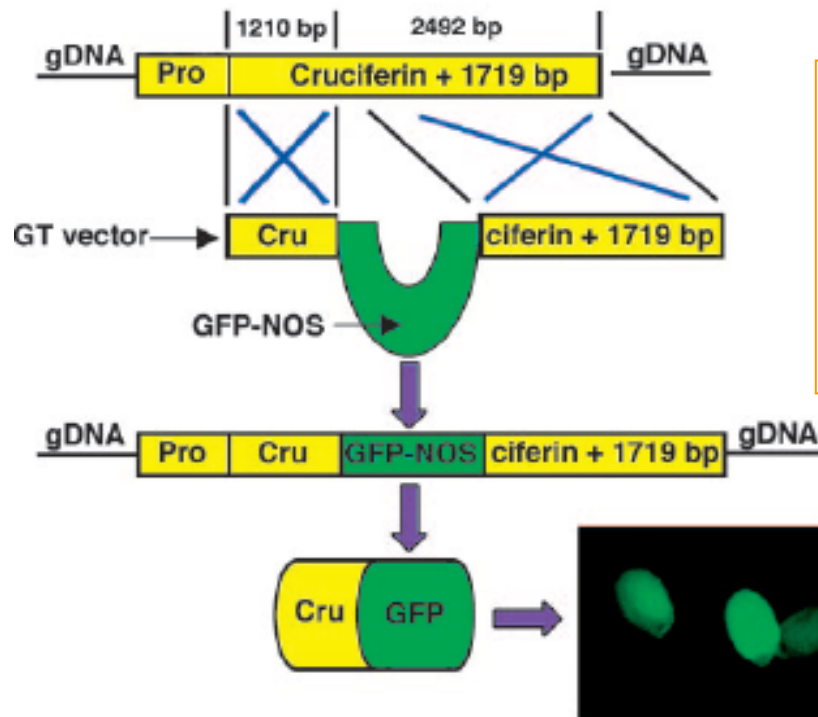


Fig. 2. The seed-based gene-targeting assay. The assay is based on the activation of GFP upon homologous integration of the gene-targeting vector (pHS-GT1, described in Fig. 1) into the genomic DNA (gDNA) of the *Arabidopsis Cruciferin* gene. Such events are identified by visualization of green fluorescent seeds under a fluorescent microscope (see black box with green seeds on the bottom right). The vector is a linear T-DNA sequence replacement vector with homology to the target *Cruciferin* gene on both sides of the vector (1,210 and 2,492 bp, respectively). The gene-targeting product gives rise to a dimeric Cru-GFP fusion protein expressed in the seed under the control of the *Cruciferin* promoter. *NOS*, Nopaline synthase.

Stimulace přesné integrace transgenu

50

- ❖ expresí rekombinačních enzymů
- ❖ represe či mutageneze genů účastnících se ilegitimní rekombinace, inhibice jejich produktů
- ❖ vytvořením DSB chemicky (látky poškozující DNA), (přechodnou) expresí místně specifické endonukleázy
- ❖ blokování 3' konce přenášené molekuly DNA (pouze při přímých metodách transformace)
- ❖ použitím **místně specifických rekombinačních systémů** prokaryot a nižších eukaryot (*rekombináza/ rozpoznávané cílové místo*)

Cre/lox

bakteriofága P1

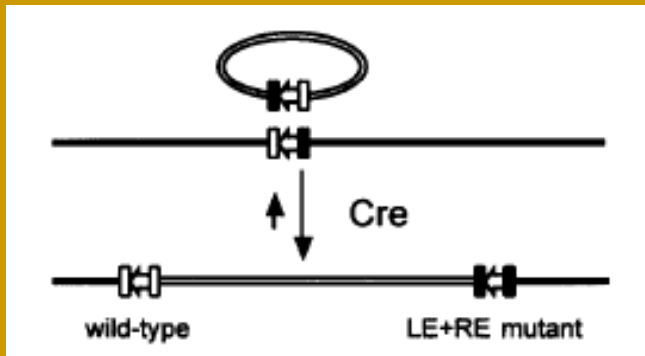
Flp/ frt

Saccharomyces cerevisiae

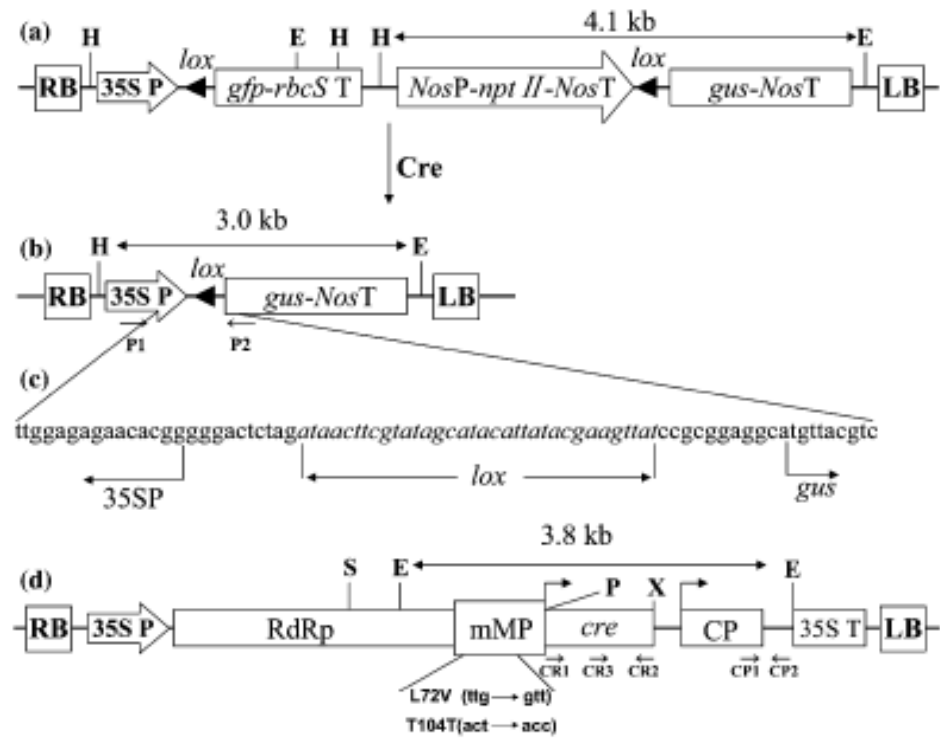
R/RS

Zygosaccharomyces rouxii

Cre/lox

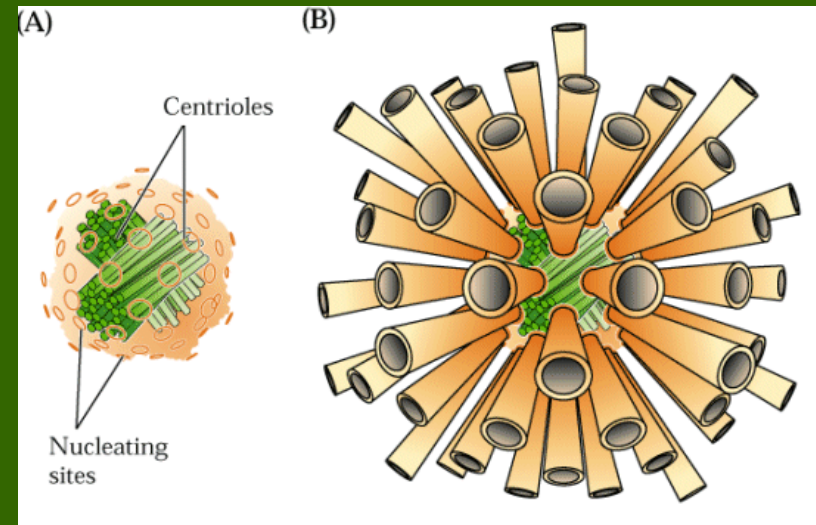
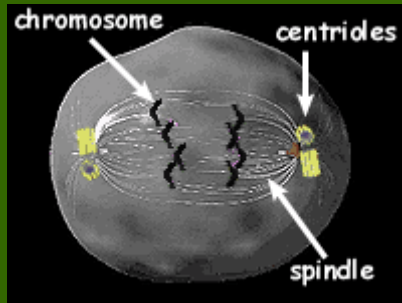


specifické vystřížení selekčního markeru



Centrosomes

52



The Centrosome and the Centrioles

ANIMAL CELL CENTROSOME: The centrosome, also called the "microtubule organizing center", is an area in the cell where microtubules are produced. Within an animal cell centrosome there is a pair of small organelles, the centrioles, each made up of a ring of nine groups of microtubules. There are three fused microtubules in each group. The two centrioles are arranged such that one is perpendicular to the other.

During animal cell division, the centrosome divides and the centrioles replicate (make new copies). The result is two centrosomes, each with its own pair of centrioles. The two centrosomes move to opposite ends of the nucleus, and from each centrosome, microtubules grow into a "spindle" which is responsible for separating replicated chromosomes into the two daughter cells.

PLANT CELL CENTROSOME: Plant cells have centrosomes that function much like animal cell centrosomes. However, unlike centrosomes in animal cells, they do not have centrioles.