

Mimojaderná dědičnost

1. **Charakteristika mimojaderné DNA**
2. **Charakter dědičnosti u různých organismů**
3. **Aplikační oblasti organelové DNA**

Literatura

- 1. Brooker R.J. – Genetics, 2005. p.178**
 - 2. Snustad a Simmons – Genetika. Nakladatelství MU, 2009.**
 - 3. In: Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (Eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants, pp. 260–310, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 2000.**
-

Jaderná genetická informace

□ Mendelistická dědičnost
Mendelovy zákony

□ Předpověď fenotypu podle
několika principů:

- 1) dominantní a recesivní vztahy alel,**
 - 2) genové interakce,**
 - 3) vliv pohlaví,**
 - 4) vazba genů.**
-

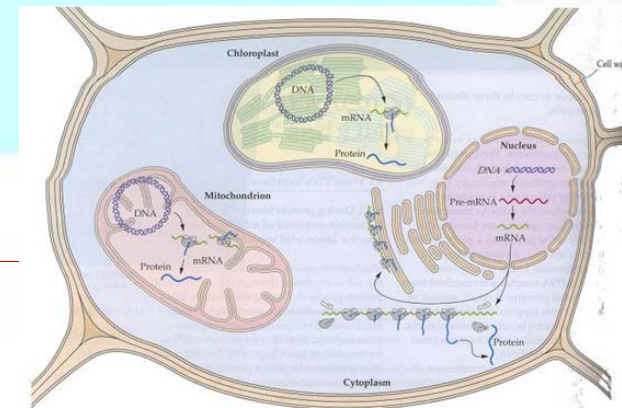
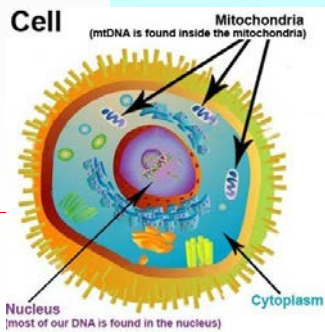
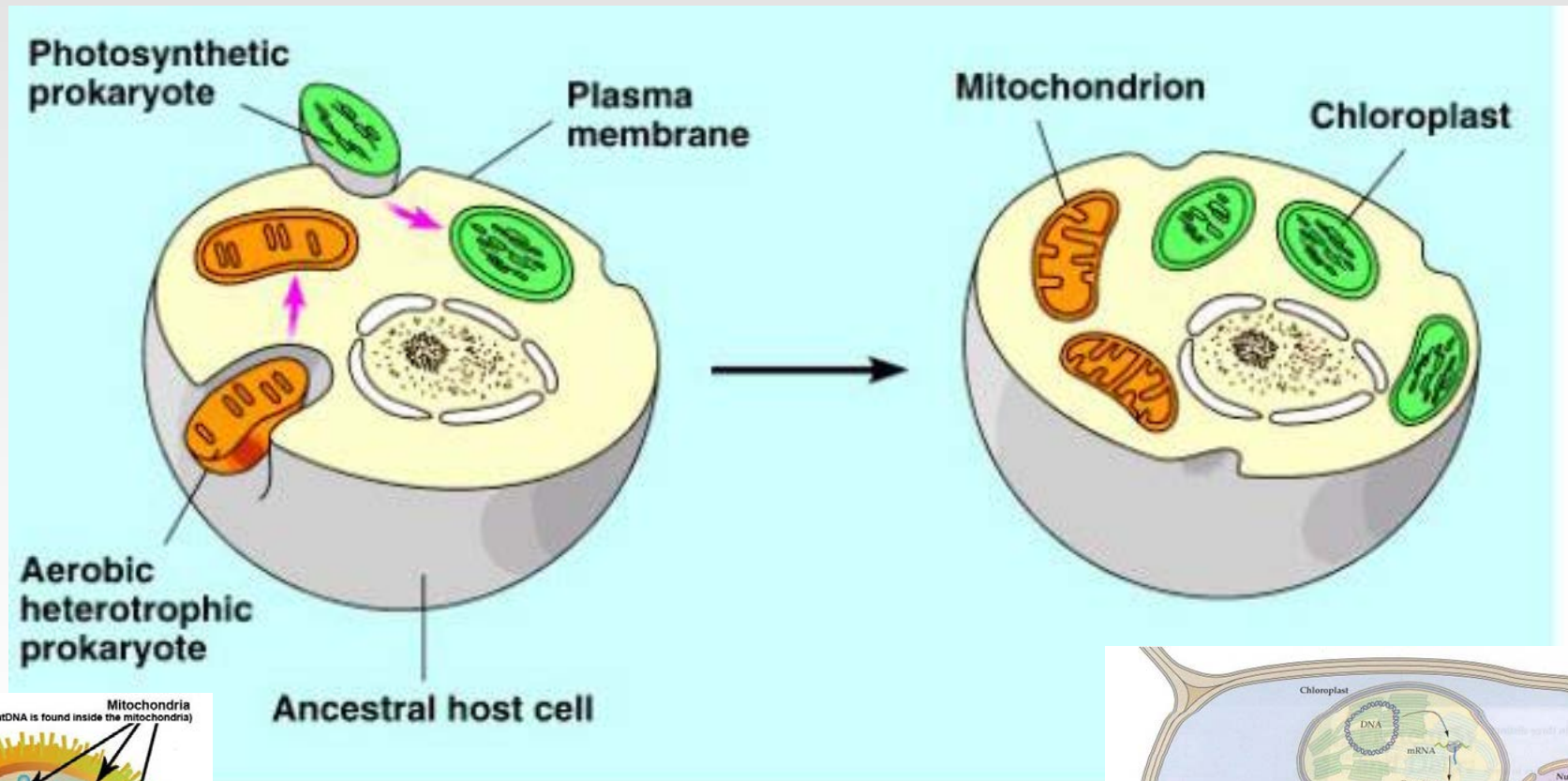
Nemendelistická dědičnost

- 1) maternální efekt,
 - 2) epigenetická dědičnost,
 - 3) **mimojaderná dědičnost =
cytoplazmatická dědičnost**
-

Mimojaderná dědičnost

- Genetické složení mitochondrií a plastidů (charakteristika)
 - Způsob přenosu těchto organel (DNA, genů) na potomstvo
 - Příklady charakteru dědičnosti odlišné u různých organizmů
-

1) Genomy mitochondrií a chloroplastů jsou vyvinuté z endosymbiotických vztahů





- **1883 Andreas Schimper** (1856-1901)
- **plastidy** vznikly z endosymbiotického vztahu mezi cyanobakteriemi a eukaryotickou buňkou.



- **1922 Ivan Wallin** (1883-1969)
endosymbiotický původ **mitochondrií**

- **1967 Lynn Margulis** (*1938)
The Origin of Mitosing Eukaryotic Cells

1981 Symbiosis in Cell Evolution



2) Mitochondrie a chloroplasty obsahují kružnicové chromozomy s mnoha geny

□ **r. 1951 Y. Chiba**

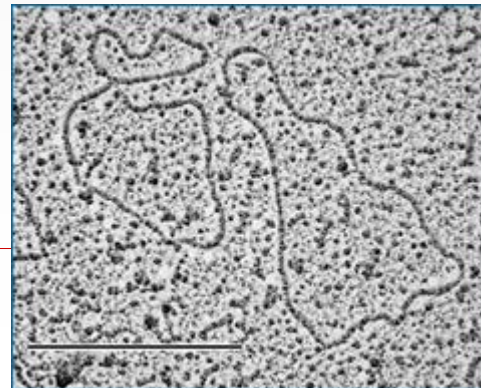
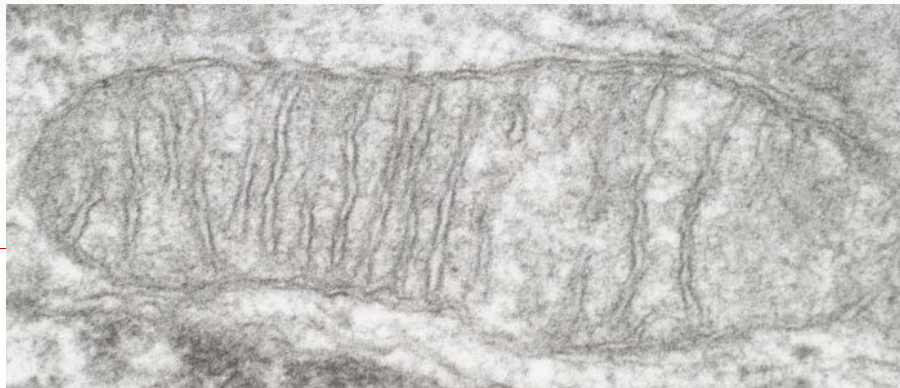
Barvení barvivem specifickým pro DNA

Izolace organelové DNA

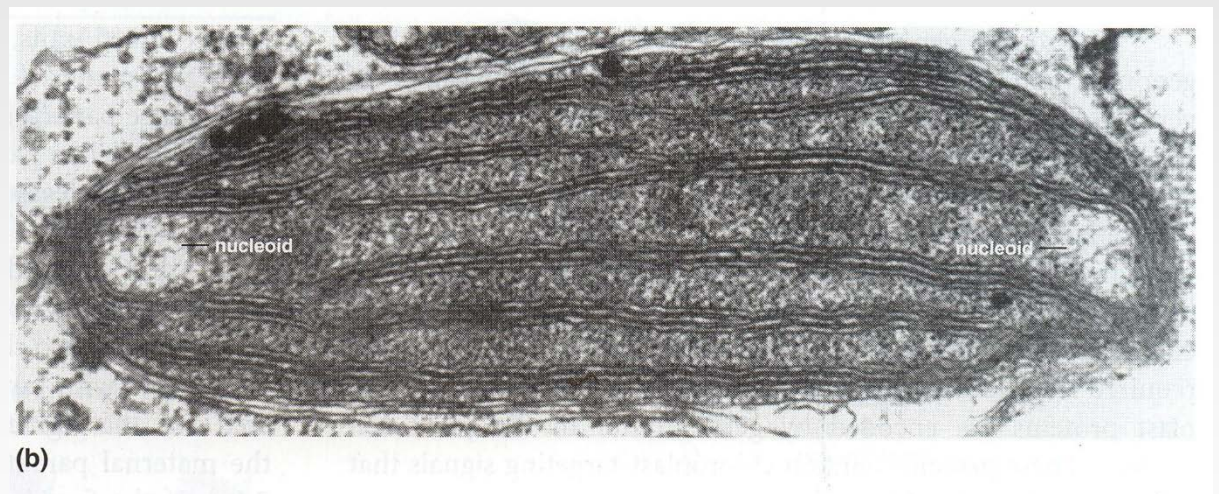
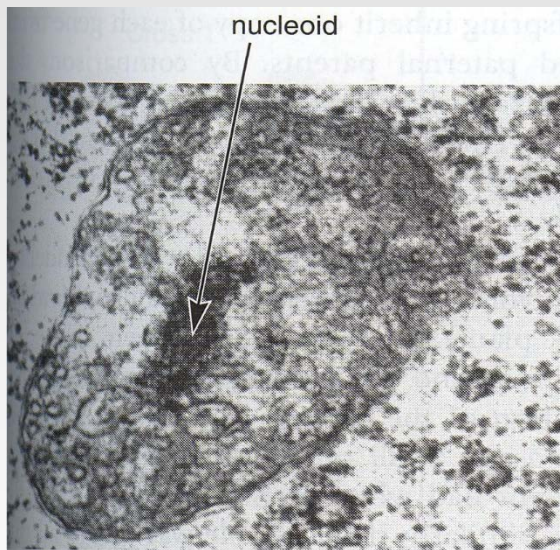
Elektronová mikroskopie

□ **70. a 80. léta 20. st.**

Sekvenování organelové DNA



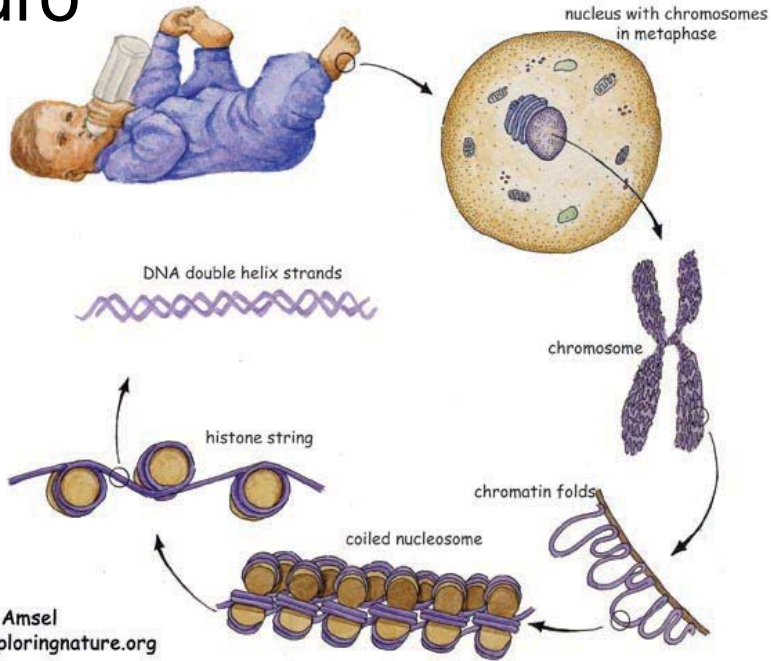
Rozmístění DNA v organele



Počty nukleoidů a molekul DNA v organelách

Druh	Organela	nukleoidy /organela	Celk počet molekul DNA/organela
Tetrahymena	mitoch	1	6-8
Obratlovci	mitoch	5-10	
Myš	mitoch	1-3	5-6
Vyšší rostliny	mitoch	20-40	
<i>Chlamydomonas</i>	chloropl	5-6	75
<i>Euglena</i>	chloropl	20-34	100-300
Vyšší rostliny	chloropl	12-25	asi 60 až 100

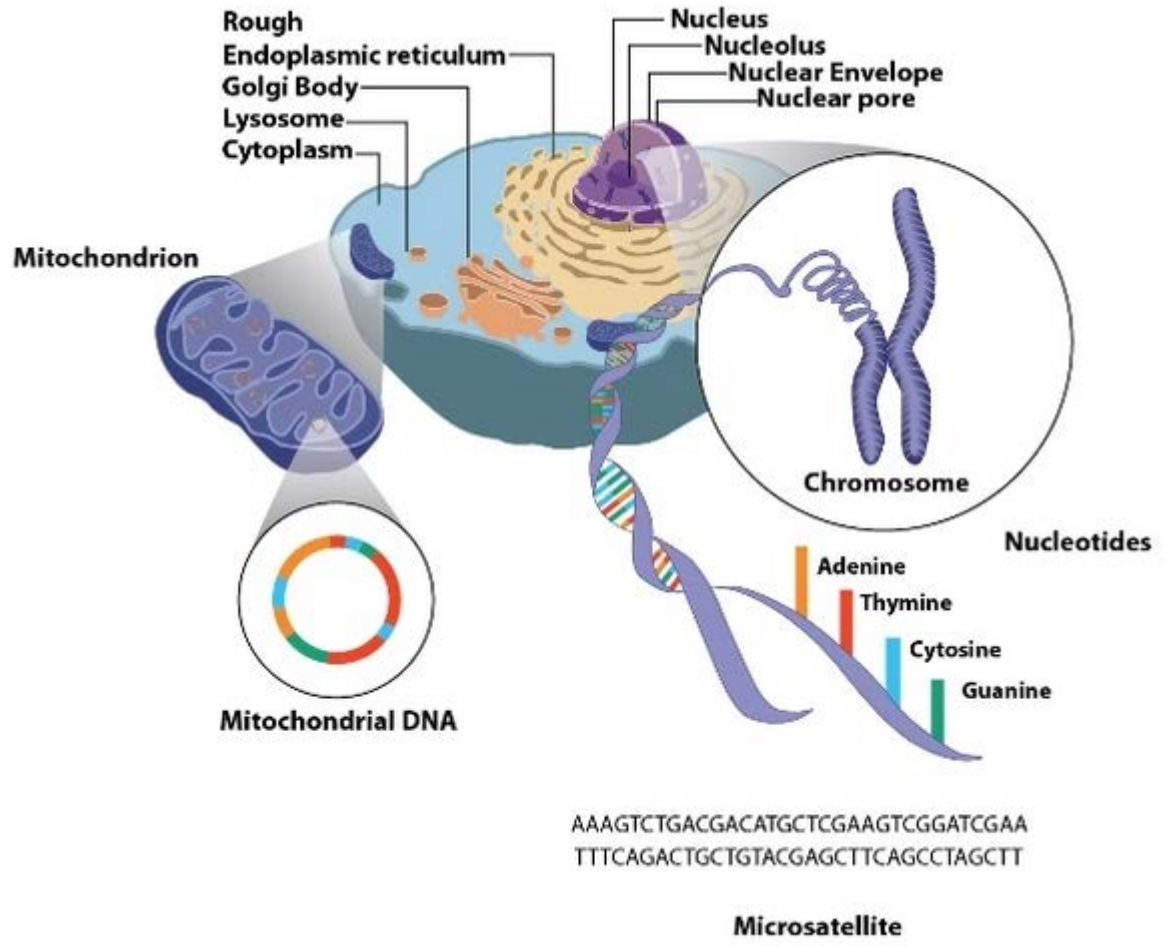
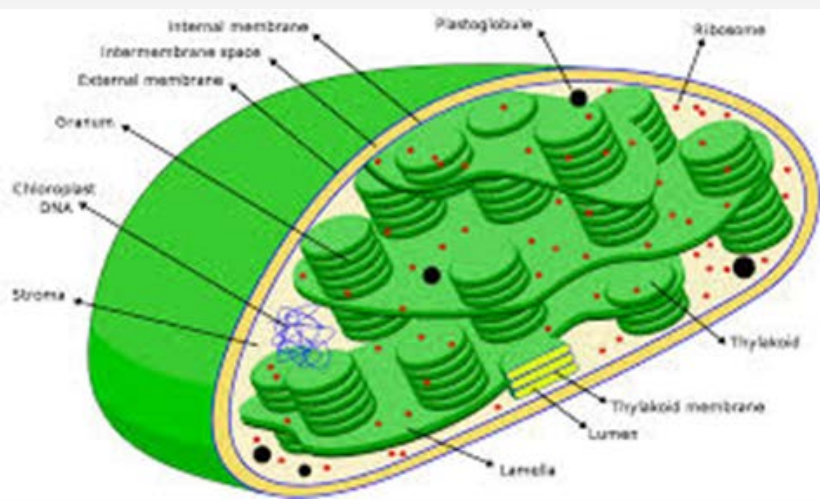
Jádro



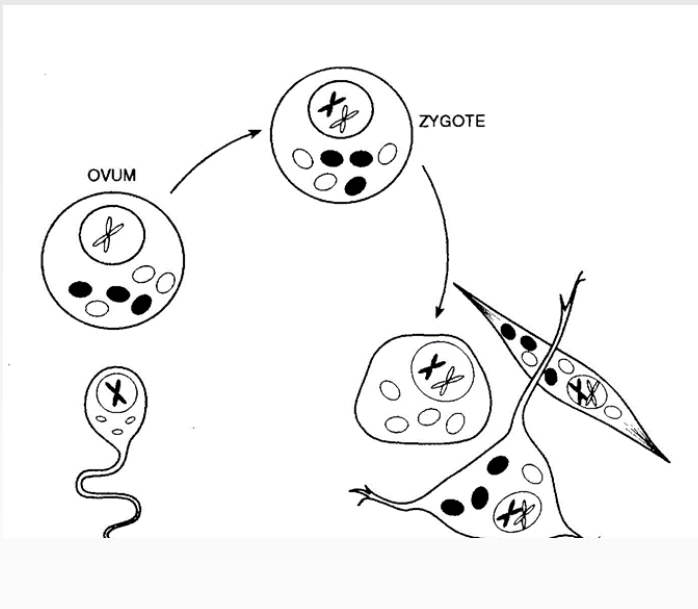
Struktura DNA

Mitochondrie

Chloroplasty

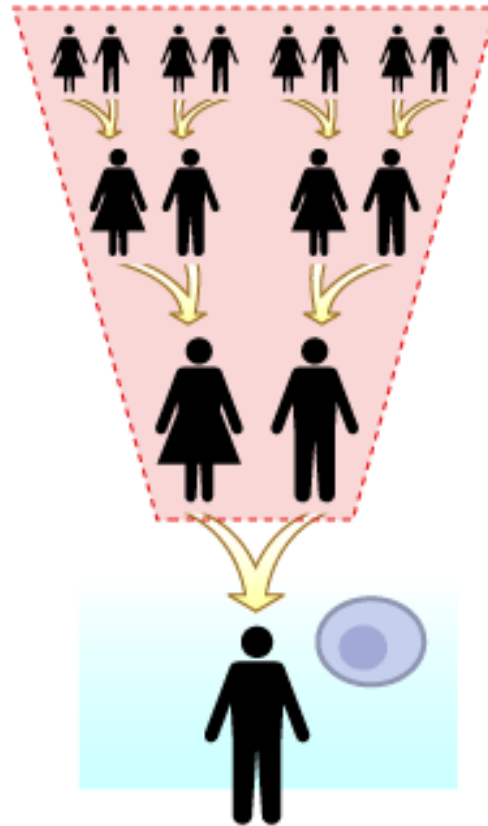


3) Přenos DNA do dceřiných buněk je náhodné a na potomstvo ...

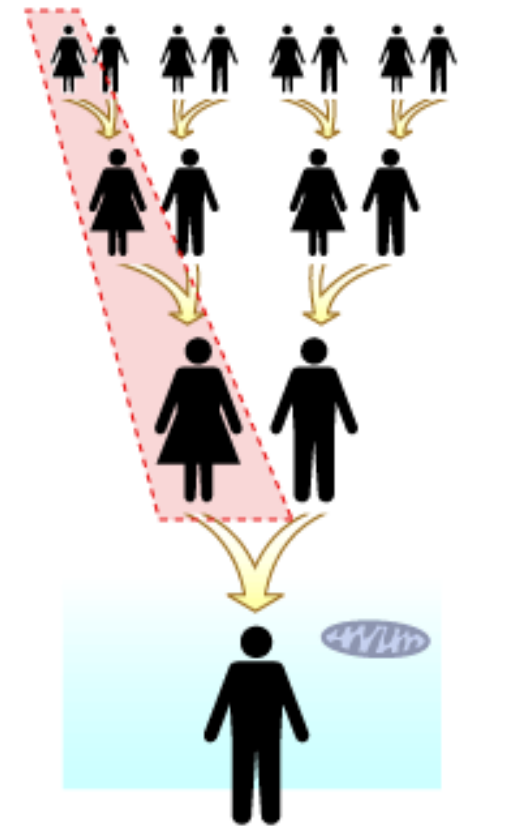


Člověk dědičnost maternální

Nuclear DNA is inherited from all ancestors.



Mitochondrial DNA is inherited from a single lineage.



Další poznatky

Sekvenování organelové DNA

Mitochondriální 6070 genomů eukaryot

Houby 321 genomů

Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Candida albicans

Živočichové 5309 genomů

Savci 758 genomů

Caenorhabditis elegans, Danio rerio, Drosophila melanogaster, Xenopus laevis, Homo sapiens, Mus musculus, Macaca mulatta, Rattus rattus

Rostliny a řasy 277 genomů

Chlamydomonas reinhardtii (zelená řasa), Arabidopsis thaliana, Beta vulgaris, Brassica napus, Carica papaya, Nicotiana tabacum, Oryza sativum, Triticum aestivum, Vitis vinifera, Zea mays

Chloroplastový 718 genomů eukaryot

Rostliny

588 genomů

Řasy

56 genomů

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/?report=5>

Velikost DNA

Mitochondriální

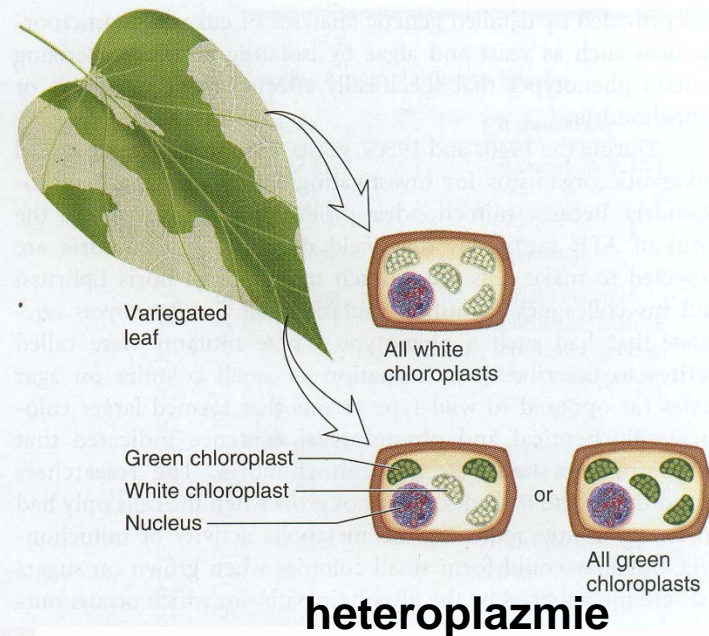
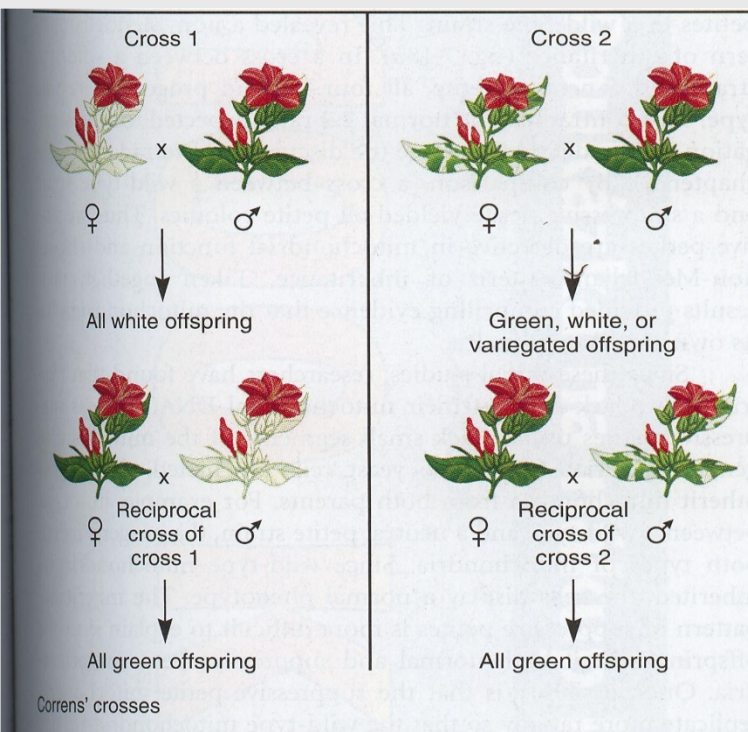
- **Řasy a protista** střední genom
Saccharomyces 75 kb
- **Živočichové** malý genom 16 – 17 kb
(méně než 1% bakteriálního chromozomu)
- **Rostliny** velký genom
200 – 2600 kb

Chloroplastová

- **Řasy** **Chlamydomonas** 200 kb
 - **Rostliny** 120 až 160 kb
-

4) Charakter dědičnosti organelové DNA - mutace

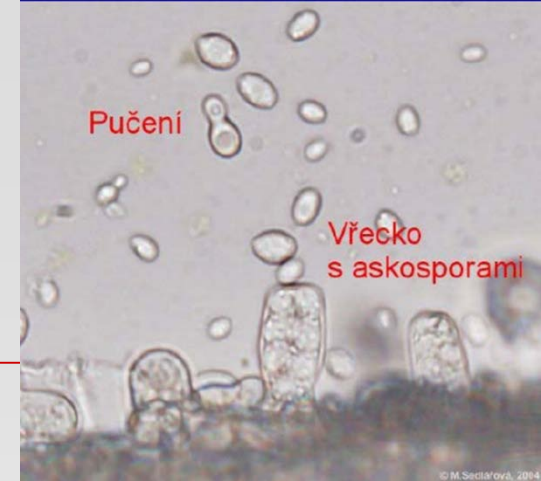
1908 Carl Correns – pigmentace u *Mirabilis jalapa*



Chloroplasty se dědí přes cytoplazmu vaječné buňky, ne přes cytoplazmu spermatických buněk. Dědí se náhodně.

Dědičnost uniparentální

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*



Boris Ephrussi (1901 -1979)



Normální kolonie



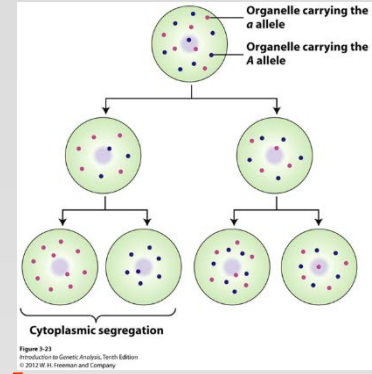
Petitové kolonie



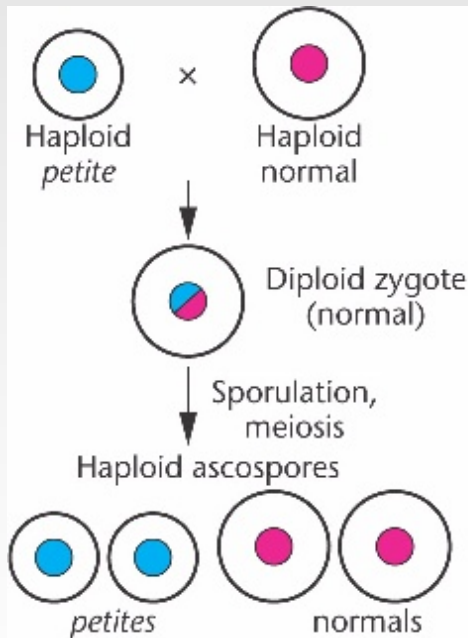
Zakladatel mitochondriální genetiky

„There are two kinds of genetics – nuclear and unclear“

Typ dědičnosti



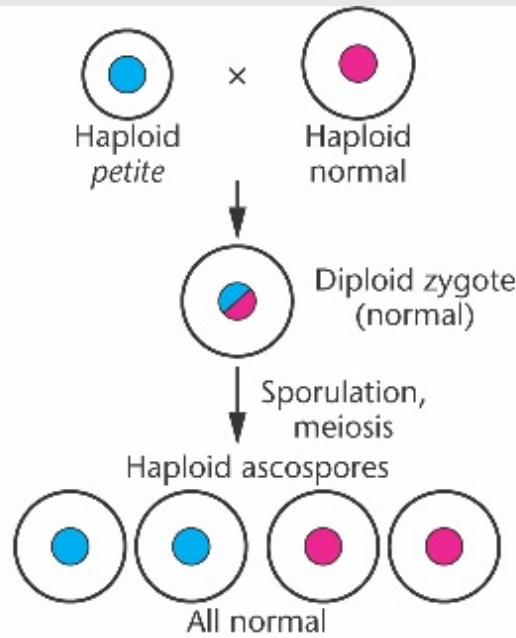
Štěpení mendelistické petity SEGREGUJÍCÍ



Mutace v jaderných genech
Mendelistické štěpení
1:1 (2:2)

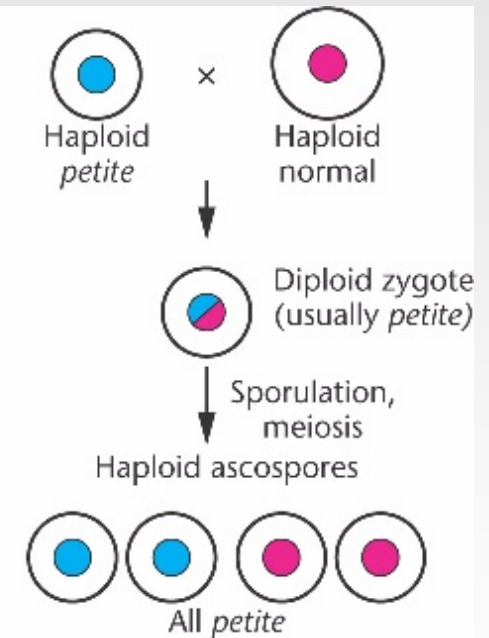
Štěpení nemendelistické petity VEGETATIVNÍ

NEUTRÁLNÍ



Podílejí se jiné geny než jaderné
Potomci získají standardní
mtDNA

SUPRESIVNÍ

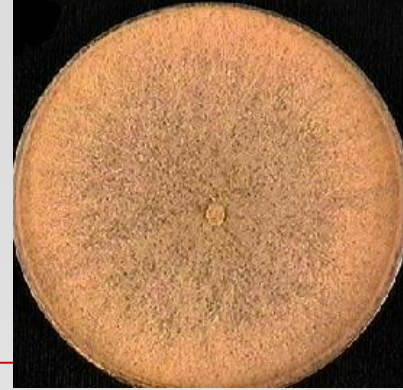


suprese
standardní funkce
mtDNA

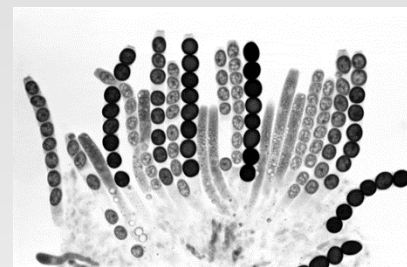
Dědičnost biparentální

Plíseň chlebová

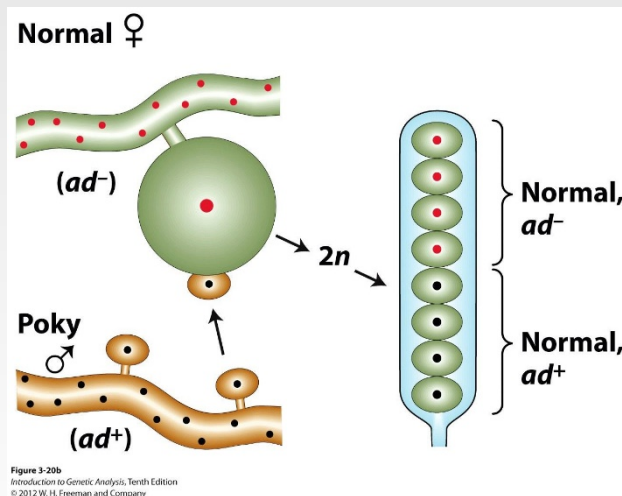
Neurospora crassa



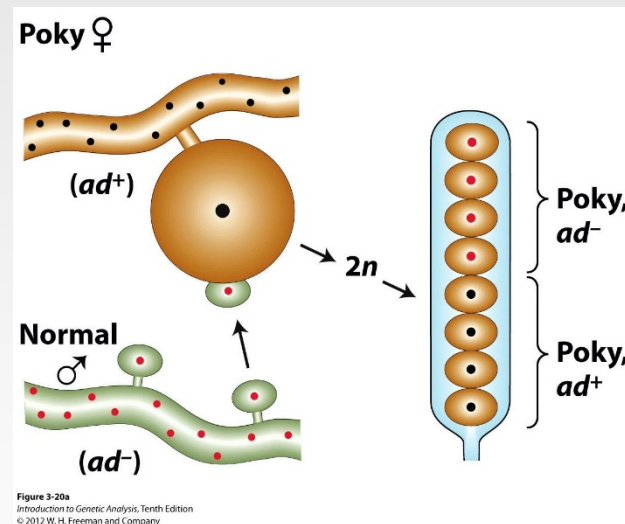
1952 Mary B. Mitchell a Hershel K. Mitchell
 Mutace *poky* = *mi-1* (maternal inheritance)
 Pomalý růst kolonií



Aska a askospory



wt x poky
 kolonie wt



poky x wt
 kolonie poky

Dědičnost uniparentální – maternální

Molekulární podstata snížené mitochondriální funkce: defekty v mt genech pro cytochromy, které jsou nezbytné pro transport elektronů na vnitřní membráně

Zelená řasa *Chlamydomonas*

1954 Ruth Sager

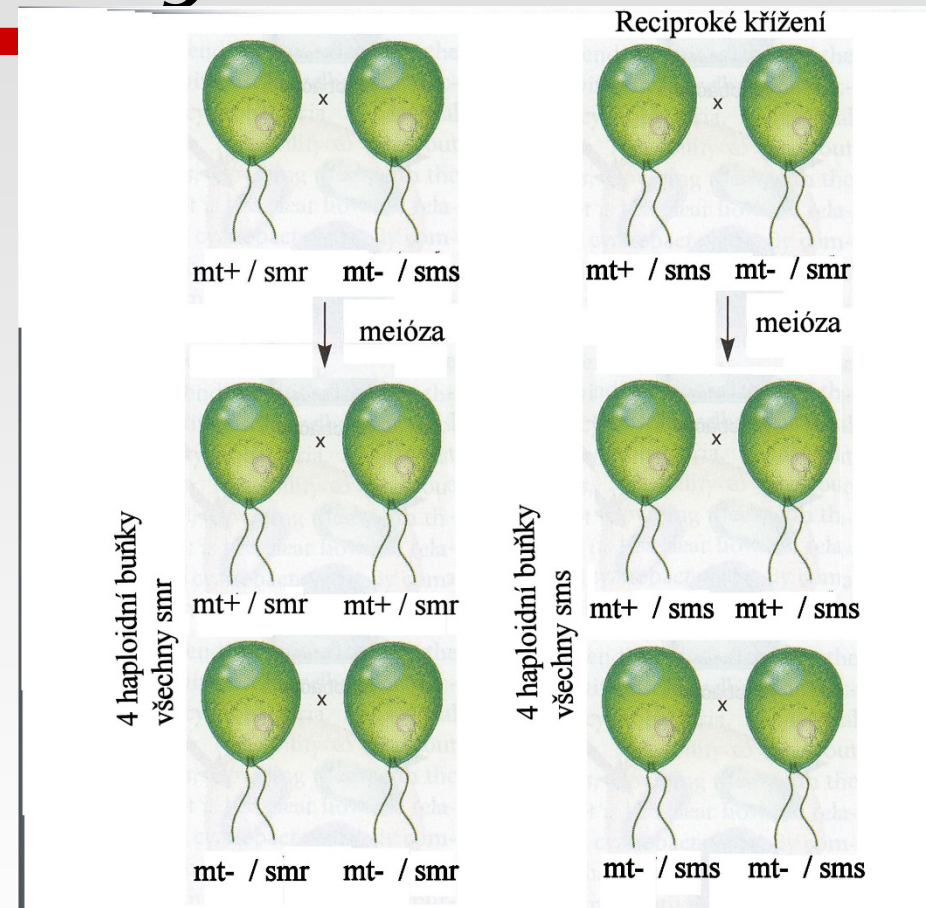
2 pohlavní typy mt^+ a mt^-
Mutace – rezistence
ke streptomycinu sm^r
citlivost ke strepto-
mycinu sm^s

Potomstvo:

genetická informace rodiče mt^+

genetická informace rodiče mt^- degeneruje

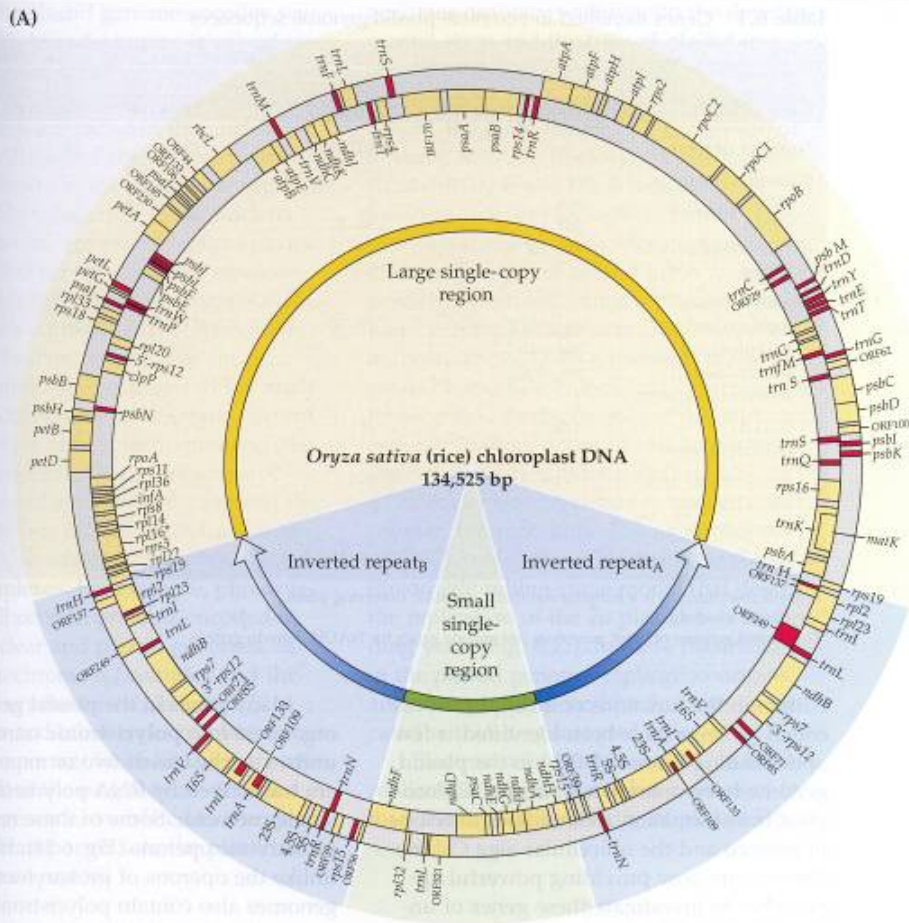
Dědičnost uniparentální



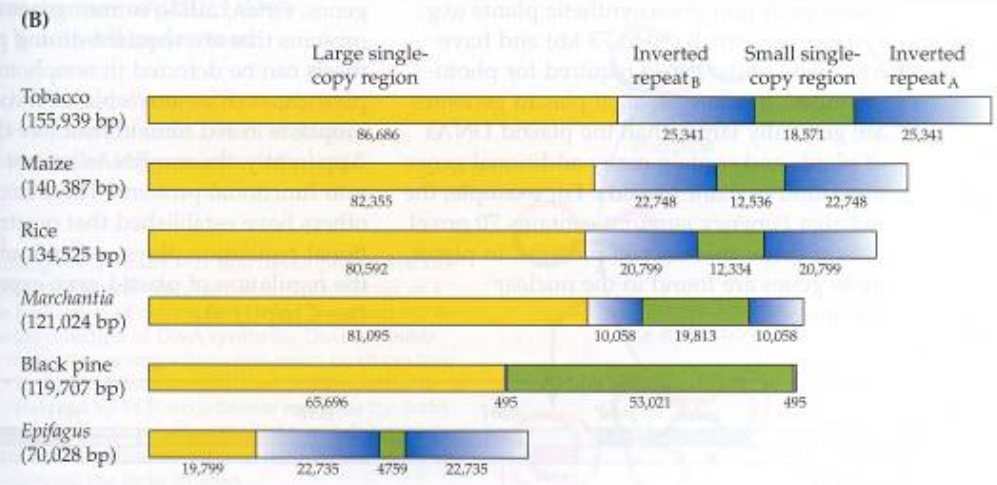
Způsob dědičnosti mitochondrií a plastidů se liší u různých druhů

Druh	organela	dědičnost
Savci	mitochondrie	maternální
Mlži	mitochondrie	biparentální
<i>S. cerevisiae</i>	mitochondrie	biparentální
Plísně	mitochondrie	obvykle maternální, <i>Allomyces</i> – paternální
<i>Chlamydomonas</i>	mitochondrie	po rodiči mt^-
<i>Chlamydomonas</i>	chloroplasty	po rodiči mt^+
Rostliny Angiosperma m.	a plastidy	maternální (u některých druhů i biparentální)
Gymnosperma m.	a plastidy	obvykle paternální

Molekulární organizace a genové produkty cpDNA



2 invertované repetice
 Velká oblast jednokopiových genů
 Malá oblast jednokopiových genů



Lidská mtDNA

16 569 pb

2 geny pro rRNA pro translaci

~~22 tRNA pro translaci~~

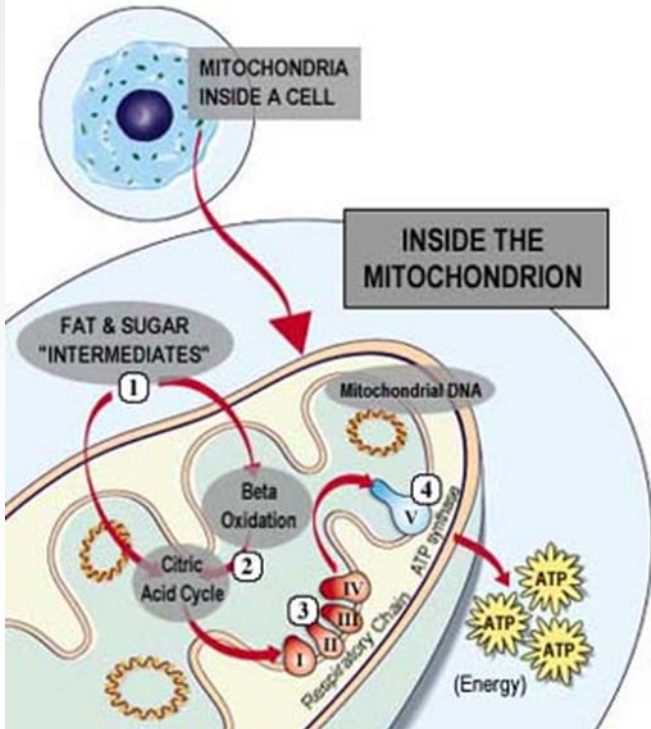
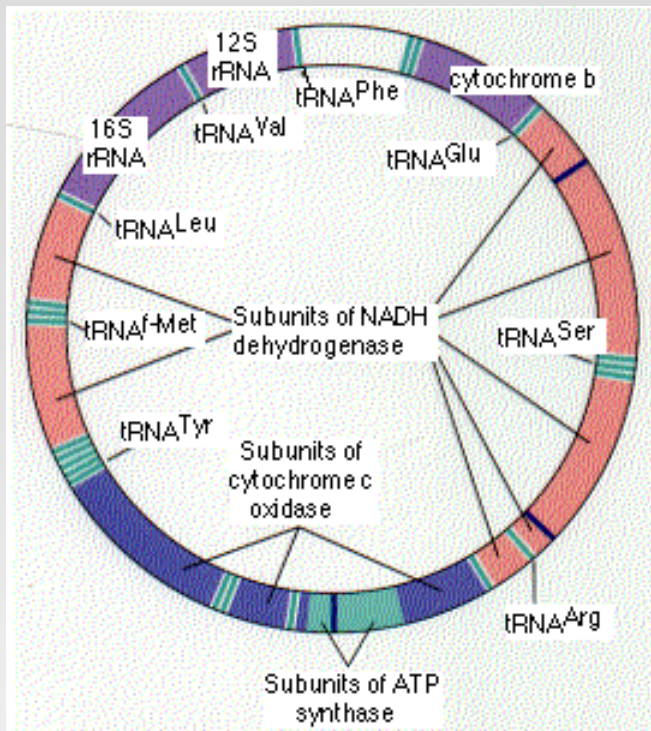
13 genů pro polypeptidy

◀ NADH dehydrogenáza (7 genů)

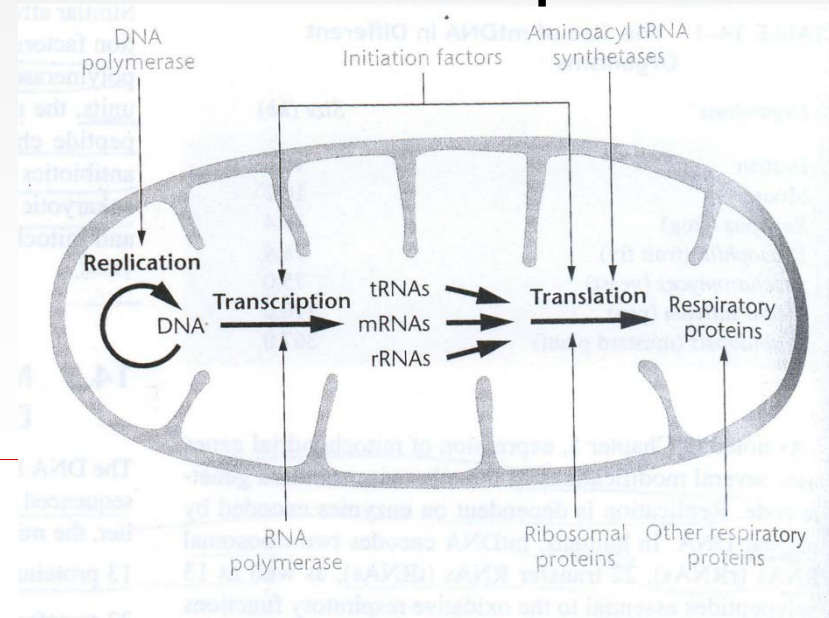
Cytochrom C oxidáza (3 geny)

ATP syntáza (2 geny)

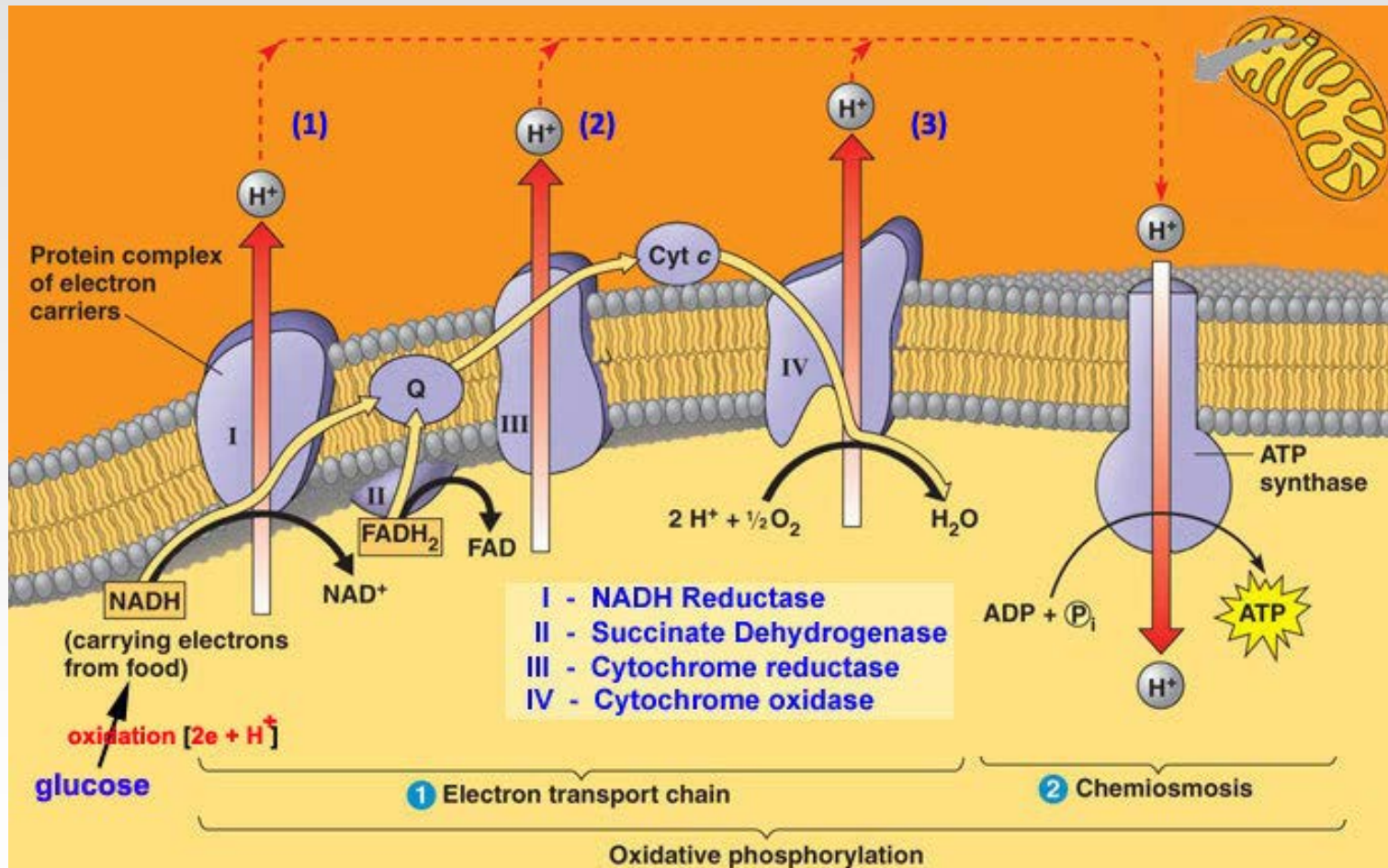
Cytochrom b (1 gen)



Vlastní replikační aparát mitochondrií
Replikace → Transkripce → Translace



Aerobní oxidace – přenos elektronů mitochondriální mutace



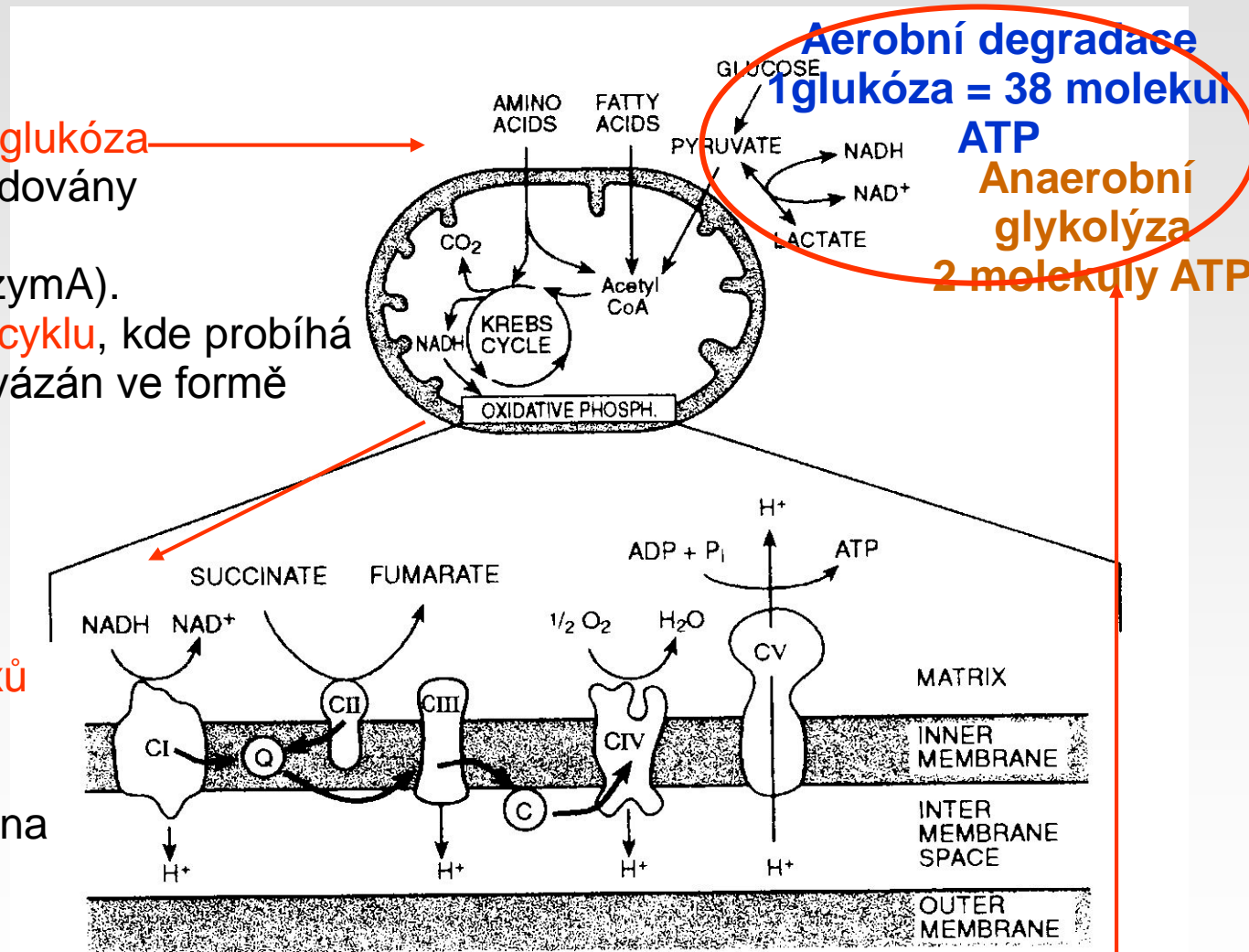
Aerobní oxidace – přenos elektronů mitochondriální mutace

Aminokyseliny, mastné kyseliny a glukóza vstupují do mitochondrií a jsou oxidovány

za tvorby **acetyl CoA** (acetyl koenzymA). Acetyl CoA vstupuje do **Krebsova cyklu**, kde probíhá **oxidační kaskáda**. Její výtěžek je vázán ve formě redukovaného **koenzymu NADH** (nicotinamid adenin dinukleoid).

NADH přenáší své redukční ekvivalenty na **5 enzymových komplexů** CI až CV.

Silné šipky ukazují **tok elektronů v respiračním řetězci**, který probíhá na vnitřní **mitoch. membráně**.



NADH
dehydroge-
náza

Sukcinyl
dehydro-
genáza

Cytochrom
C oxidore-
duktáza

Cytochrom
C oxidáza

ATP
syntáza

Aplikační oblasti organelové DNA

Vzácné lidské choroby

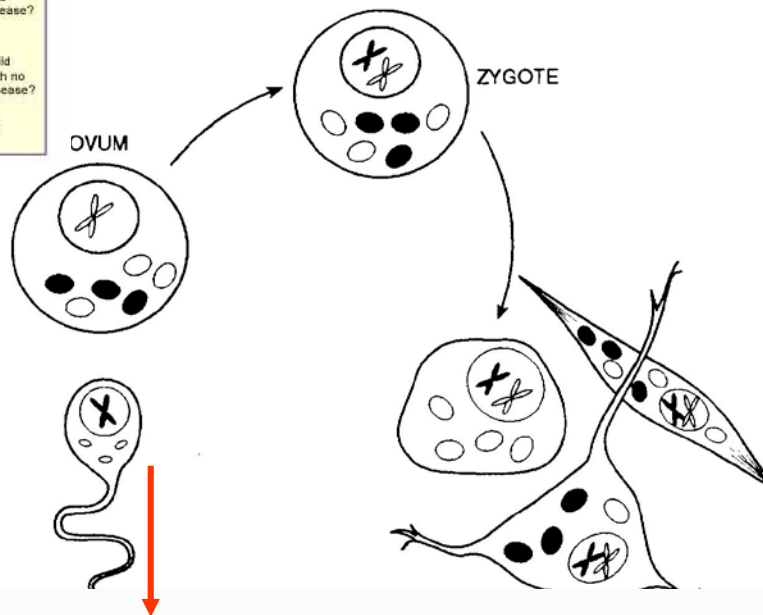
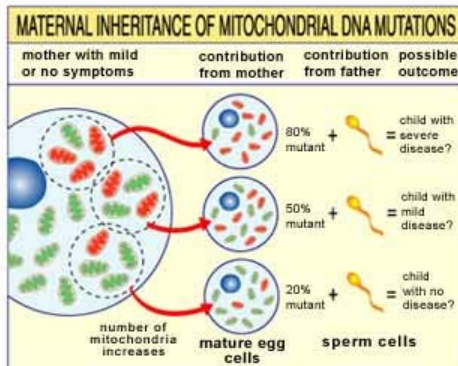
Forenzní vědy

**Chloroplastové genové
inženýrství**

**Samčí sterilita ve šlechtění
rostlin**

Vzácné lidské choroby

Mutace mtDNA a heteroplazmie



Zygota

získává velký počet organel prostřednictvím vajíčka
Organely s mutací – černé
Organely bez mutace – bílé

Tkáně

Organely se množí autonomně
Dospělý jedinec má buňky s různou směsí normálních a abnormálních organel

Heteroplazmie 10 až 20%

V případě mutací způsobujících choroby mohou mít různé tkáně různé množství mutantní a normální mtDNA. Děti jedné matky tak mohou mít odlišné fenotypy v závislosti na množství mutantní mtDNA v jednotlivých tkáních

Historie

- ❑ **1962** První zpráva o lidské chorobě v důsledku narušené energetické aktivity mitochondrií. Symptomy **demence**.
 - ❑ **Souvislosti mezi poruchou energetické aktivity mitochondrií a degenerativními postiženími mozku, myokardu i kosterních svalů, ledvin a žláz s vnitřní sekrecí.**
Názor, že příčinou jsou **mutace jaderných genů**.
 - ❑ **80. léta 20. st.** prokázáno, že **mutace mitochondriálních genů** způsobují poruchy syntézy proteinů, jejichž prostřednictvím je tvořena H⁺-ATPáza. **Důsledek** narušení účinnosti komplexu respiračních reakcí, neboli tvorby energie v buňce.
 - ❑ **Choroby způsobené dysfunkcí mitochondrií jsou popisovány až od roku 1988.**
-

Genetická klasifikace mitochondriálních chorob

□ Defekty v jaderné DNA

Defekty v transportu a využití substrátu

Defekty v importu proteinů

Defekty v Krebsově cyklu

Defekty v oxidačně-forforylačních krocích

Defekty v respiračním řetězci

□ Defekty v mtDNA (genech)

Velká přeuspořádání mtDNA – delece a duplikace

Bodové mutace mtDNA

= defekty v respiračním řetězci

(viz. komplexy enzymů s podjednotkami kódovanými
mtDNA)

☐ Defekty v komunikaci mezi mtDNA a jadernou DNA

Tvorba opakovaných delecí mtDNA

Ztráta mtDNA

Defekty v respiračním řetězci (komplexy s podjednotkami kódovanými mtDNA)

☐ Získané defekty mtDNA

Toxiny

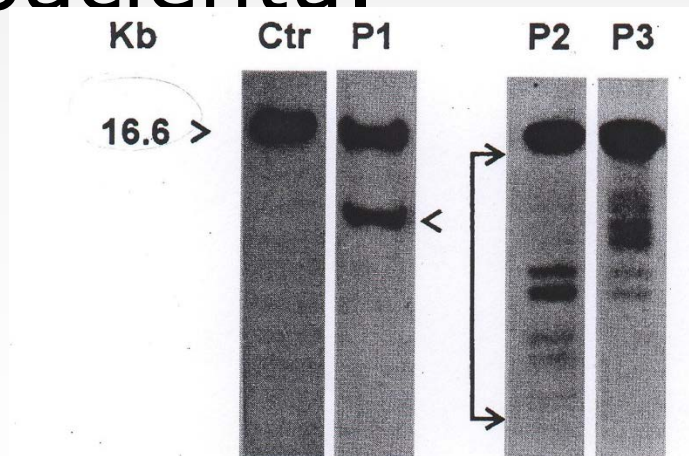
Léčiva – zidovudin

Stárnutí

Typy genových defektů mitochondriálních chorob

□ Velká přeuspořádání mtDNA

1988 Holt a kol. koexistence normální a mutantní mtDNA s jednou velkou delecí (především) ve svalstvu pacientů.



Diagnostika podle délky fragmentů mtDNA

Ctr mtDNA standard

P1 mtDNA standard + mtDNA s delecí (kratší fragment)

P2, P3 vícenásobné delece

P2 30 let

P3 60 let = s věkem se zvyšuje množství mutantní mtDNA

□ Bodové mutace mtDNA

Diagnostika - všechny tkáně včetně leukocytů

Mutace genu pro 12S rRNA, nukleotid 1555, A-G. homoplazmie, hluchota.

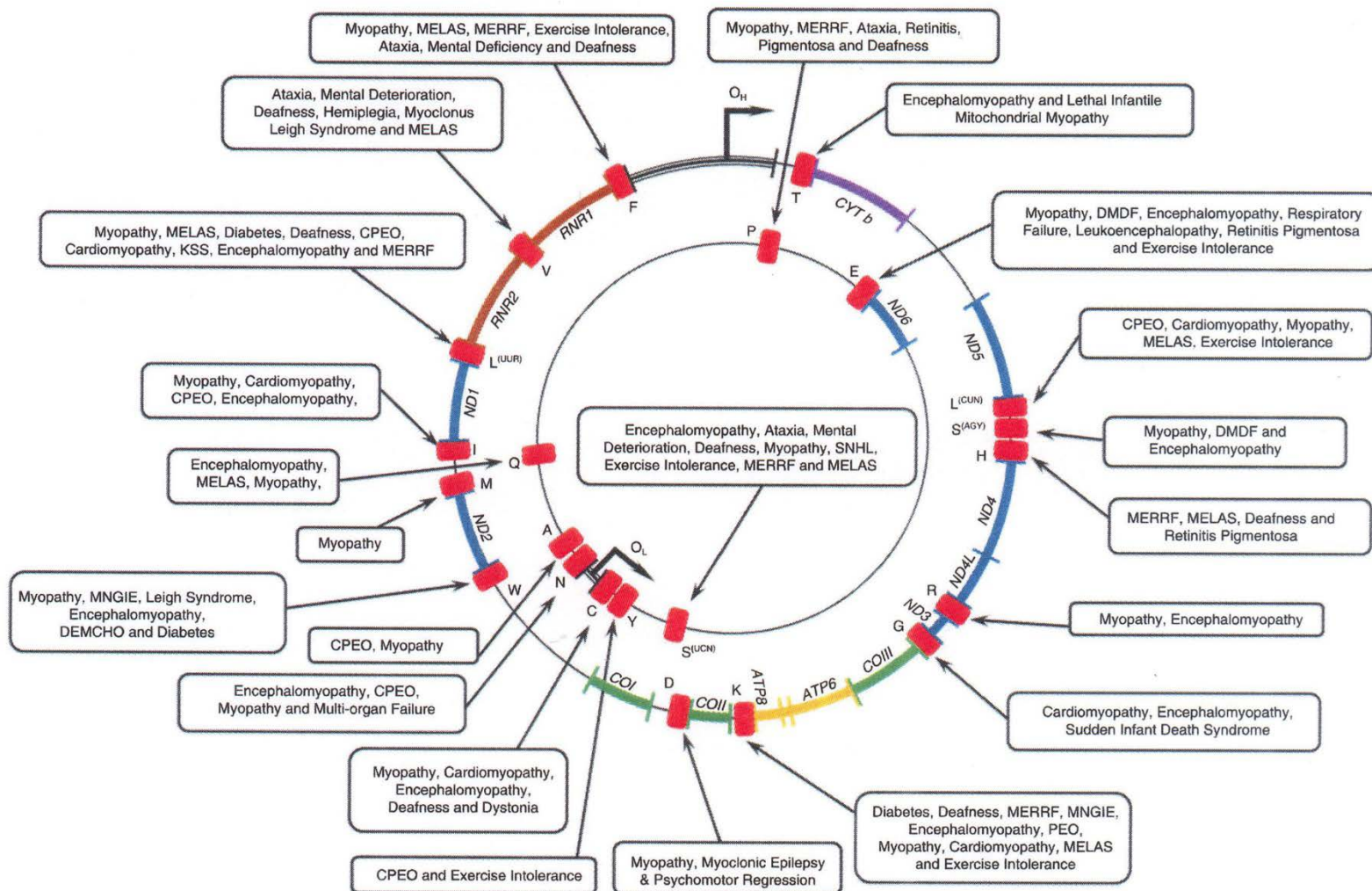
22 genů tRNA – identifikována řada substitucí

tRNA pro Leu, nt 3243 A-G

Onemocnění MELAS

Příznaky: opakované záchvaty mrtvice před dosažením 40 let, často již v dětství, demence, hluchota. Asi 1-2% pacientů s diabetes mellitus má tuto bodovou mutaci v genu pro tRNA.

Mutace v 22 genech mtDNA pro tRNA



Analýza mtDNA

Histologické preparáty svalových vláken (barvení na cytochrom c oxidázu a sukcinyldehydrogenázu)

Sekvenování

Amplifikace fragmentů mtDNA a restriční analýza

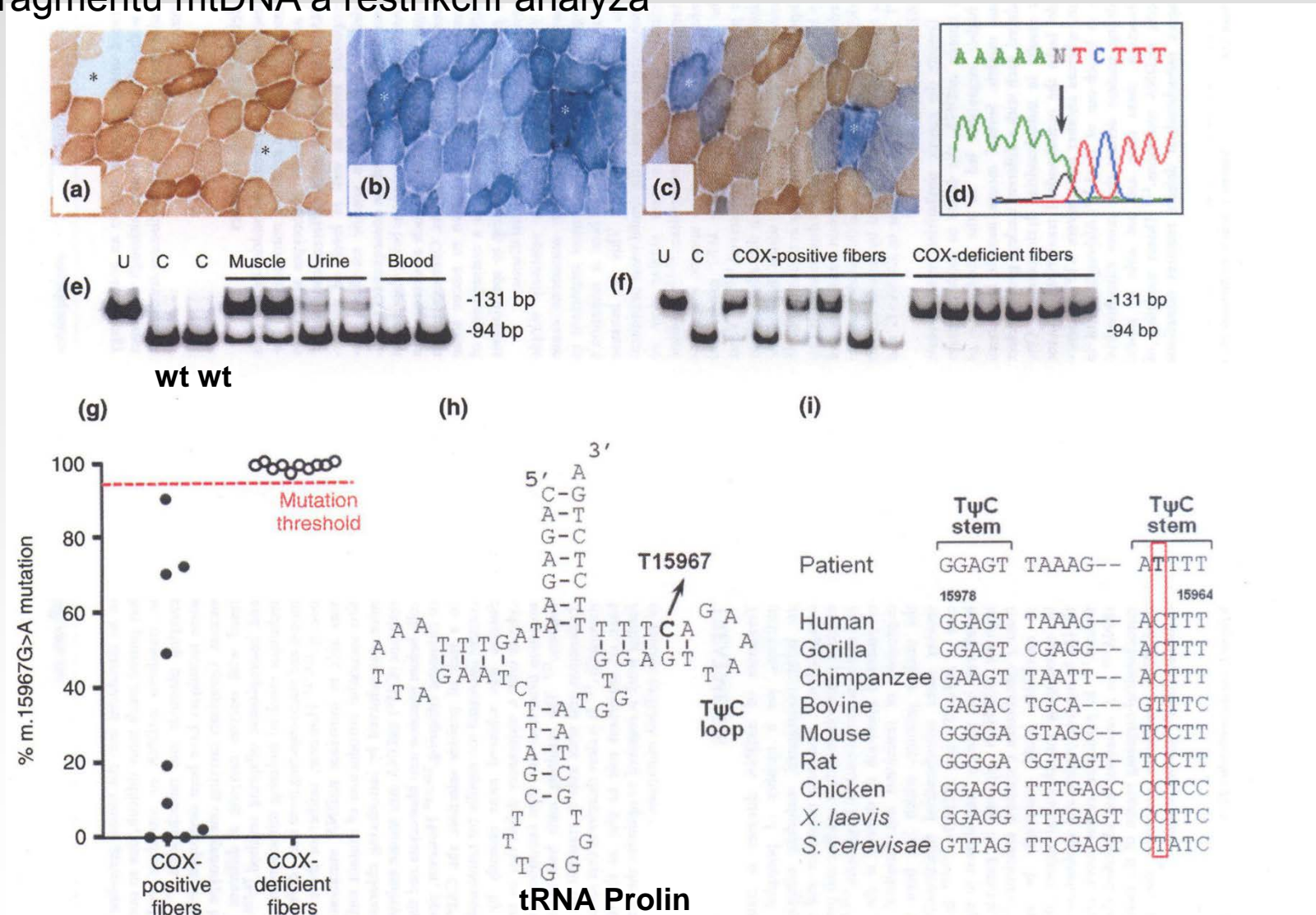
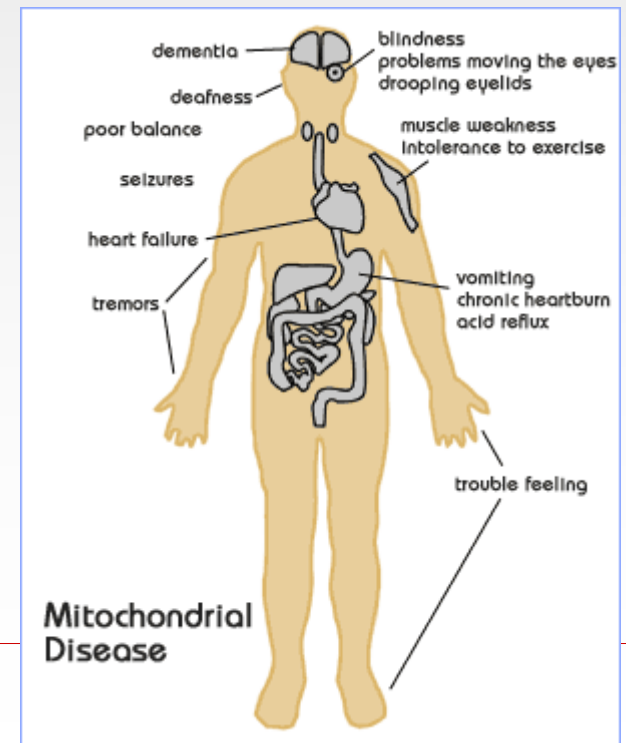
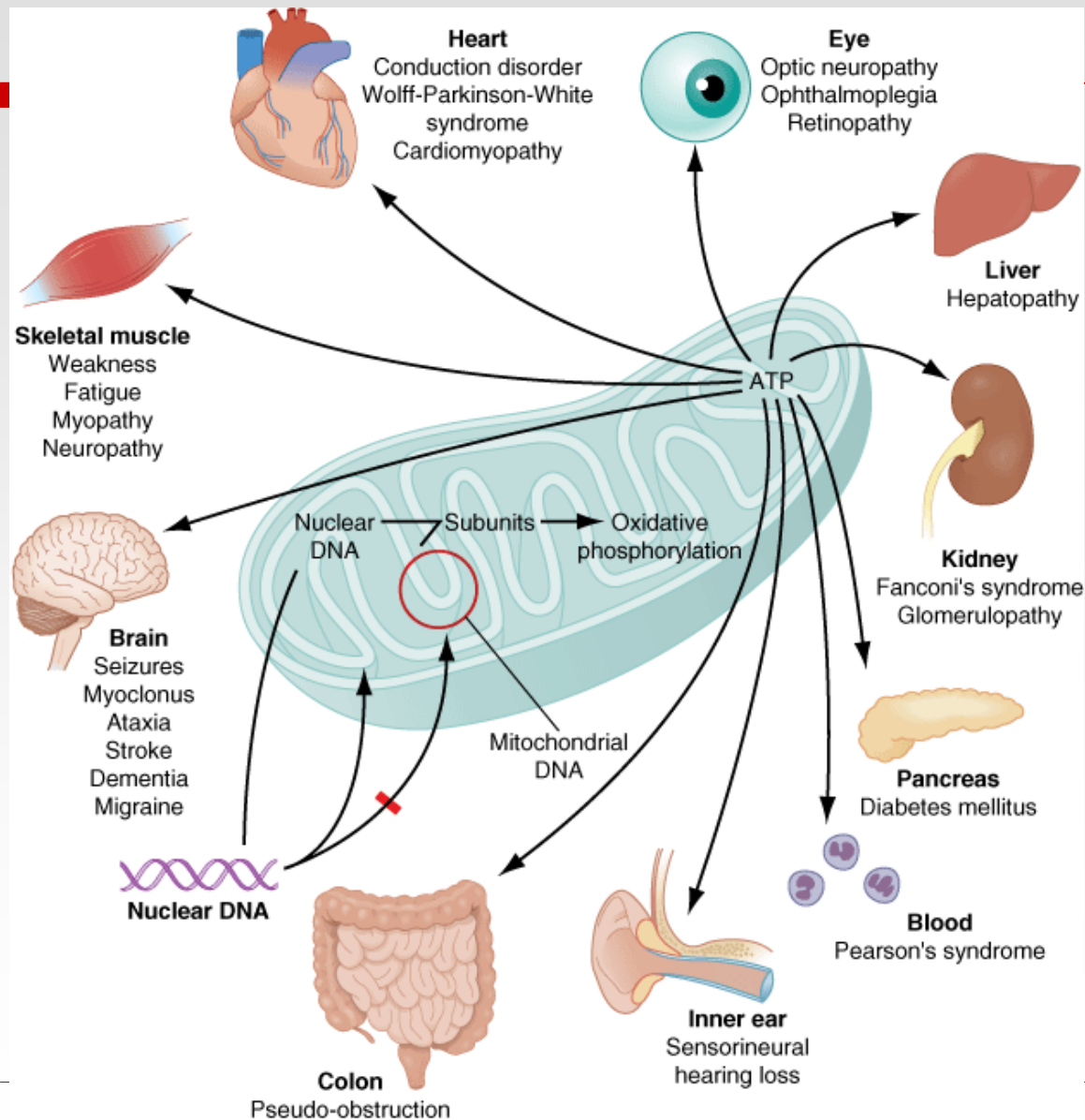


FIGURE 2 | Laboratory investigation of novel mt-tRNA variants based on a previously published m.15967G>A *MTTP* mutation.⁶⁵ Two muscle fibers (highlighted by an asterisk) are shown in a sequential series of transverse muscle sections from the patient highlighting the following

Důsledky mitochondriálního defektu



Neurologické příznaky mitochondriálních chorob

- Obrna okohybných svalů
 - Poškození zrakového nervu
 - Mozková mrtvice u mladého člověka
 - Křeče
 - Svalové poškození
 - Únava, neschopnost fyzické zátěže
 - Ataxie – porucha koordinace pohybů
 - Demence
 - Periferní neuropatie – potížení nervů
vlivem nedostatečného cévního zásobování nervů
 - Kalcifikace bazálních ganglií
-

Projevy poškození orgánů

- Poruchy vedení srdečního vzruchu
- Kardiomyopatie¹
- Diabetes mellitus
- Šedý zákal
- Laktátová acidóza²
- Poškození ledvinných glomerulů
- Poškození sluchu
- Poškození jater
- Poškození slinivky břišní
- Intestinální pseudoobstrukce³
- Epizodické zvracení
- Pancytopenie⁴
- Deprese

¹Úbytek a ochabování příčně pruhovaného svalstva.

²Nadbytek kyseliny mléčné v séru. Laktát je syntetizován při anaerobní glykolýze a při oxidativním aerobním metabolismu je rychle odbouráván. Defekty mitochondrií vedou k poruchám oxidativního metabolismu a tím k hromadění laktátu.

³Poruchy vyprazdňování střeva ⁴Současný pokles všech typů krevních tělísek.

Chronická externí oftalmoplegie

CPEO

- ❑ Genetický základ – bodové mutace v genech pro tRNA
 - ❑ Paralýza okohybných svalů (oftalmoplegie)
 - ❑ V pokročilejším stádiu i svalů dolních končetin
 - ❑ Mikroskopické vyšetření - svalová vlákna se jeví jako “potrhaná”
-

Kearns-Sayrův syndrom

KSS

- ❑ Genetický základ - delece v různých pozicích mtDNA
 - ❑ V dětském věku - žádné symptomy, objevují se až v dospělosti (po 20. roku)
 - ❑ Ztráta vidění- choroba retinis pigmentosa. Sítnice nefunguje jak má – nejdříve jsou nefunkční okrajové buňky tyčinky (špatné vidění za šera, v noci). Později jsou zasaženy i čípky = zrakové buňky ve středu oka = narušení barevného vidění.
 - ❑ Ztráta sluchu
 - ❑ Srdeční choroby – vady
 - ❑ Demence, malý vzrůst
 - ❑ Ataxie
 - ❑ Čím větší je podíl mtDNA s delecí, tím rozsáhlejší jsou symptomy = neuromuskulární choroba
-

Leberova dědičná oční neuropatie

LHON

- ❑ Mutace v mt genech pro respirační proteiny: *ND1, ND2, ND4, ND5, ND6, CO1, cytb*
 - ❑ Přes 50% případů je způsobeno v určité pozici genu kódujícího jednu podjednotku NADH dehydrogenázy
 - ❑ Postihuje oční nerv, náhlá ztráta zraku u jednoho nebo obou očí Průměrný věk ztráty vidění je 27 let
 - ❑ Srdeční dysrytmie
 - ❑ Výskyt vzácný 1:50000
 - ❑ Maternální dědičnost **X** většinou zjištěna u mužů, druh interakce genů vázaných na X-chromosom s mtDNA
-

Leighův syndrom

- ❑ Mutace genu *ATPase6* pro podjednotku mitochondriální ATP syntetázy
 - ❑ Projevy již v dětském věku, nemoc je letální:
 - ❑ Progresivní ztráta motorických a verbálních schopností
 - ❑ Postupná degenerace bazálních ganglií
 - ❑ Neurogenní svalová slabost
-

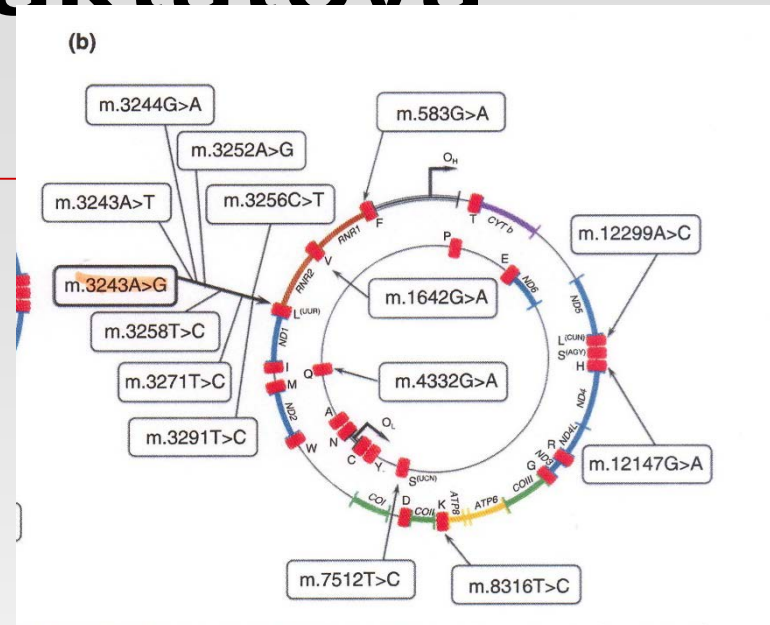
Mitochondriová encefalomyopatie, laktátová acidóza

MELAS

geny pro tRNA pro leucin a lysin

Symptomy v dětském věku:

- Pomalý vzrůst, záchvaty a zvracení.
- Svalová slabost. Ochrnutí očních víček, poruchy sluchu a dýchání. Ztrata schopnosti řeči.
- Poškození mozku (spongiózní degenerace), laktátová acidóza, křeče, mozková mrtvice u mladého člověka.
- Duševní retardace, demence
- Mutace současně příčinou cca. 1,5% případů diabetu - Langerhansovy ostrůvky nemají dostatek energie, ztrácejí schopnost tvorby inzulinu.



Maternálně dědičná myopatie a kardiomyopatie

MMC

- ❑ Myopatie - skupina chorob projevující se postupným úbytkem a ochabováním příčně pruhovaného svalstva
 - ❑ Kardiopatie - trvalé poškození srdečního svalu, zbytnění a rozšíření komor a srdeční slabost
-

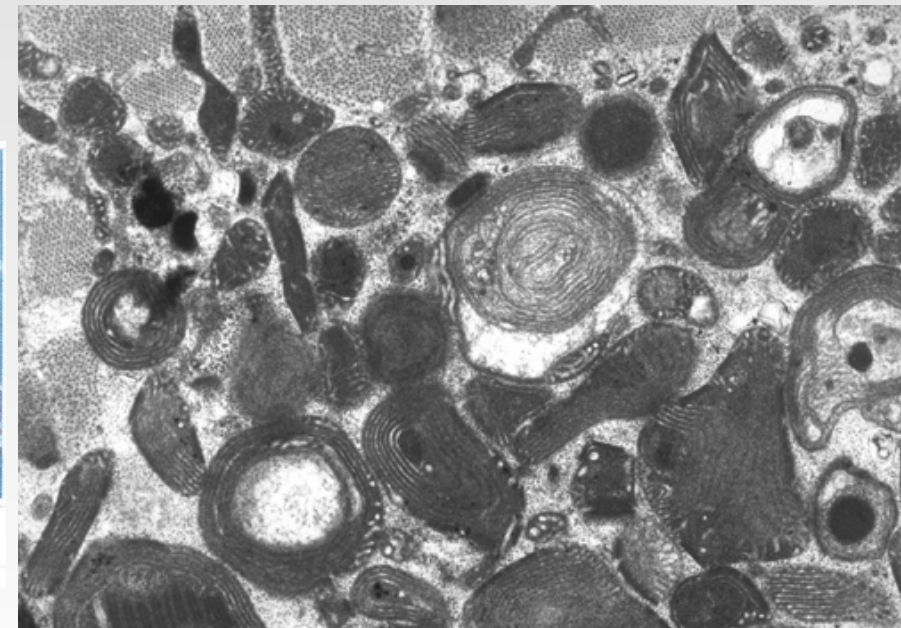
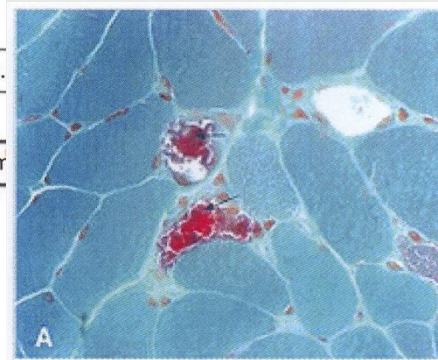
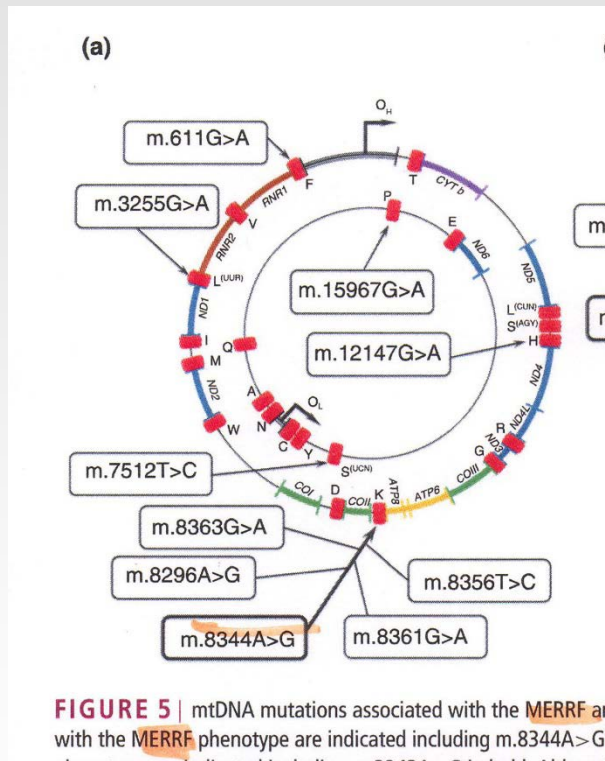
Myoklonická epilepsie s “potrhanými” svalovými vlákny

MERRF

- ❑ Poruchy centrální nervové soustavy, kostry a srdeční činnosti
 - ❑ Epileptické křeče, svalové záškuby
 - ❑ Ataxie – nedostatečná koordinace svalů
 - ❑ Hluchota, demence
 - ❑ Při mikroskopickém vyšetření vypadají svalová vlákna jako “potrhaná”.
-

MERRF

- ❑ Mutace genu pro tRNA pro lysin, tranzice A-G
- ❑ Tato záměna zněmožňuje plnou kapacitu translace mtDNA v organele, což vede krůzným projevům poruchy.



RRF = ragged red fiber = potrhaná vlákna

Diagnostika ve vzorku tkáně svalu po biopsii: RRF obklopují normální svalová vlákna. Ultrastruktura mitochondrií je změněna: jsou zvětšené, zvyšuje se jejich počet, mají defektní systém krist.

Neurogenní svalová ochablost s ataxií a retinis pigmentosa

NARP

- ❑ Neuromyopatie, ataxie a *retinis pigmentosa* degenerace retinálního neuroepitelu,
 - ❑ atrofie zrakového nervu
 - ❑ pigmentové změny na sítnici
-

Získané poruchy mitochondriálního genomu

- ❑ Postupné hromadění mutací mitochondriálního genomu s následnou poruchou funkce mitochondrií bylo označeno za možnou příčinu **Alzheimerovy nebo Parkinsonovy nemoci** a jiných degenerativních chorob stáří.
 - ❑ Mutace postihující gen pro tRNA řídící transport glutaminu je považována za příčinu vzniku asi 5% případů Alzheimerovy choroby v evropské populaci.
-

AIDS

- ❑ Antivirové přípravky = substráty virové DNA-polymerázy, zabudování do virového genomu, poruchy replikace viru
 - ❑ Vedlejší účinky léků na mtDNA
 - ❑ Lék **zidovudin** – u pacientů myopatie
zalcitabin – neuropatie
didanosin – zánět slinivky (u 23% pacientů)
 - ❑ Zabíjecí lék: **fialuridin** - hepatopatie (jaterní choroby)
 - ❑ **Lamivudin** – nezpůsobuje poškození mitochondrií, minimum nežádoucích účinků
-

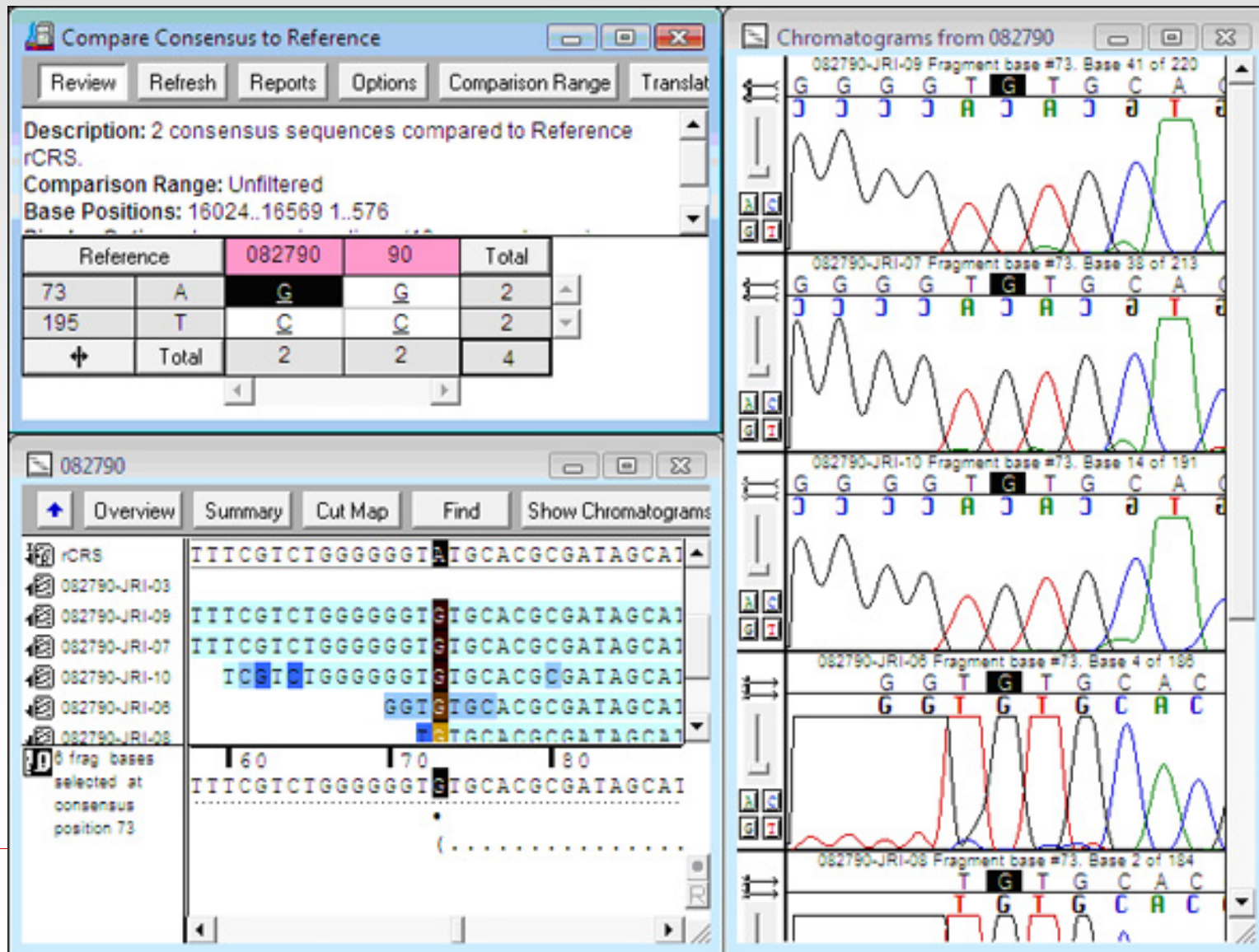
Mitochondrie a smrt buňky

- ❑ Mitochondriální stárnutí
 - ❑ 10x častější vznik mutací než v jaderné DNA
 - ❑ Nadbytek volných radikálů
 - ❑ Degenerativní choroby
 - ❑ Stárnutí organismu
poruchy paměti, sluchu, zraku,
pokles vitality a obranyschopnosti
-

Mt DNA a forenzní vědy

- ❑ **Výhody**
 - ❑ Vysoký počet kopií mtDNA (kvantita)
 - ❑ Nedochozí k rekombinaci (stabilita)
 - ❑ Maternální dědičnost
 - ❑ **Využití:** rutinní analýzy mtDNA starých kostí, zubů, částí vlasů a chlupů (lidské i zvířecí)
 - ❑ **Hypervariabilní oblasti**
 - ❑ **HV1** (nt 16024–16365) a **HV2** (73–340)
-

Analýza hypervariabilních oblastí mt genomu



Využití

Kriminalistika, genealogie, archeogenetika


The Neanderthal
Homo neanderthalensis ▶
Extinct for 30,000 years

Remnants of Neanderthal DNA in the genes of non-African modern humans are linked to a range of health problems, including Type 2 diabetes, Crohn's disease, lupus and biliary cirrhosis

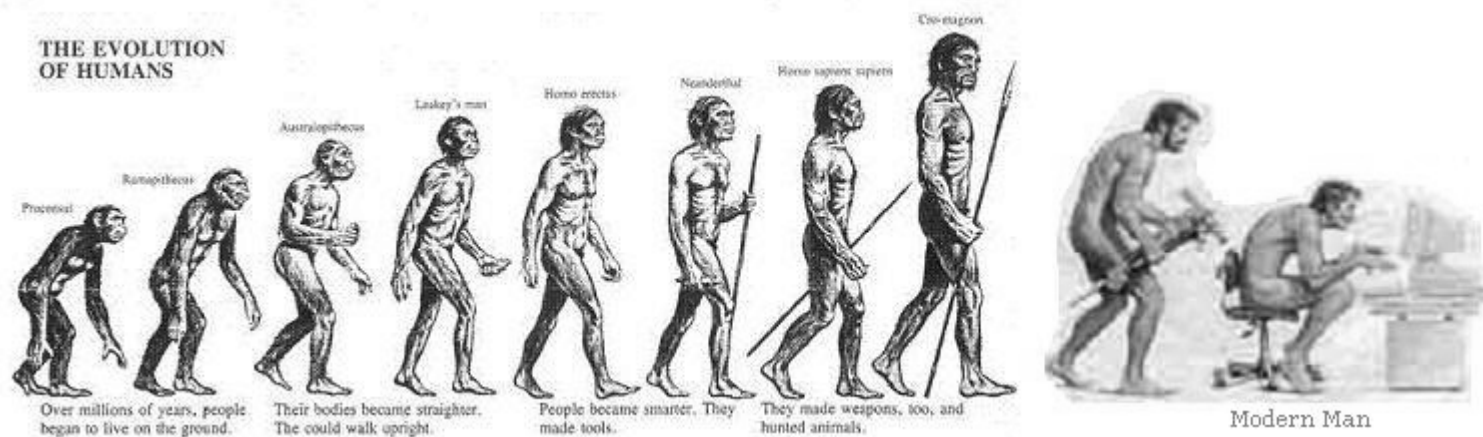
Source: Harvard Medical School

Indigenous people from sub-Saharan Africa, whose ancestors did not migrate out of the continent to breed with Eurasian Neanderthals, carry little or no Neanderthal DNA

Between 2% and 4% of the genome of Europeans and Asians is believed to be a legacy of interbreeding between ancient



DAVE GRANLUND © www.davegranlund.com

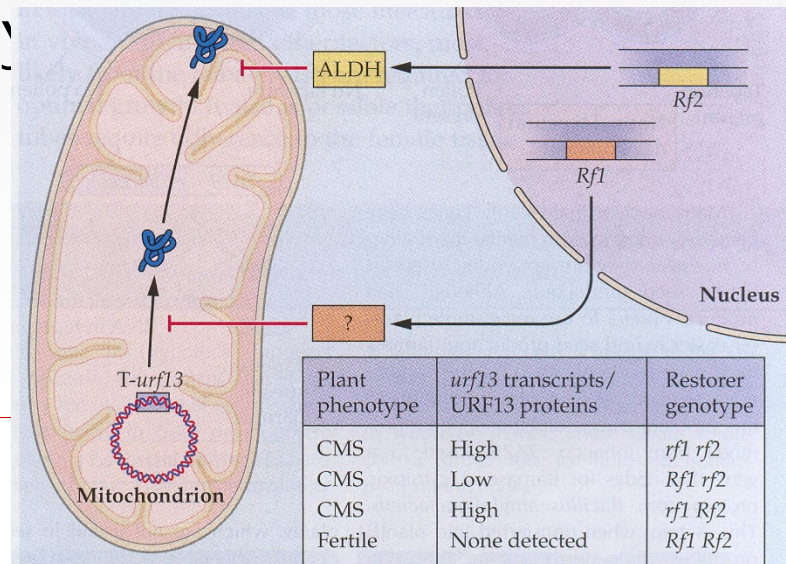


Mt DNA a cytoplazmatická samčí sterilita (CMS) u rostlin

- ❑ 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 alkoholdehydrogenázy odstraňuje toxické látky

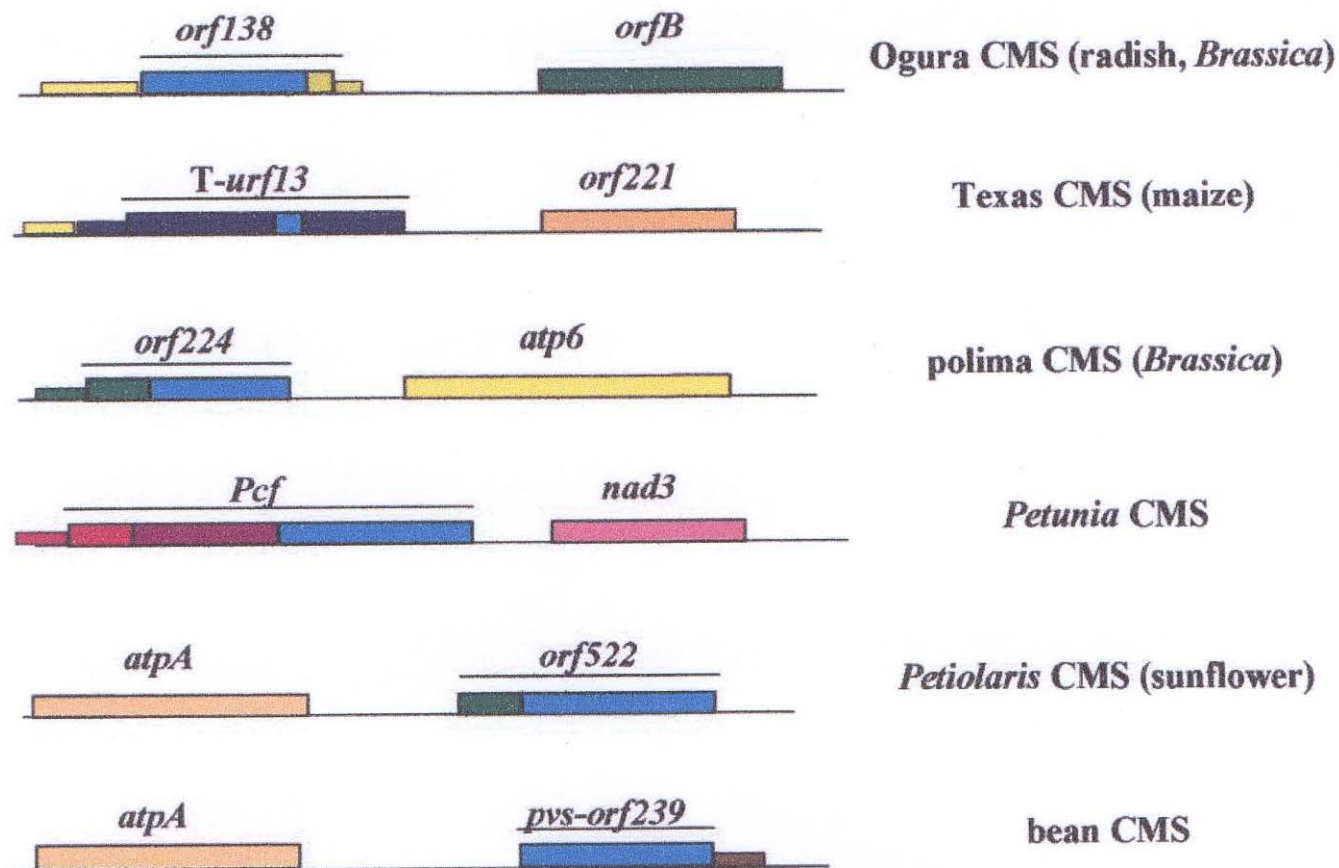
Využití samčí sterility ve šlechtění

- ❑ 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
-

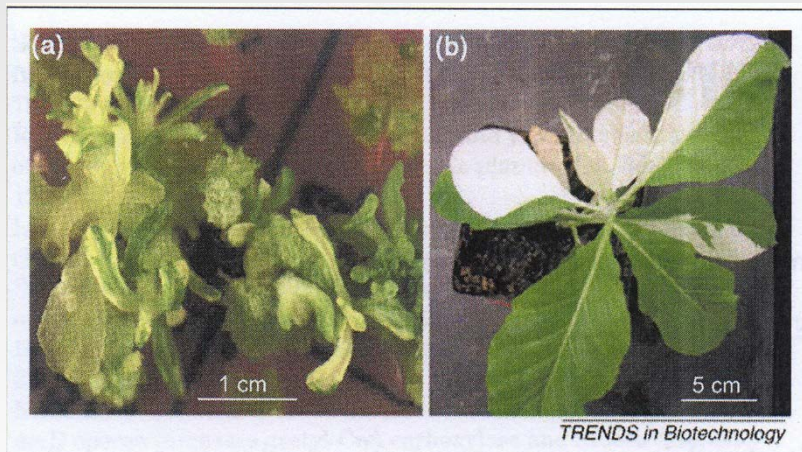
Plastidy rostlin jsou ideálními kandidáty pro genové inženýrství

Výhody

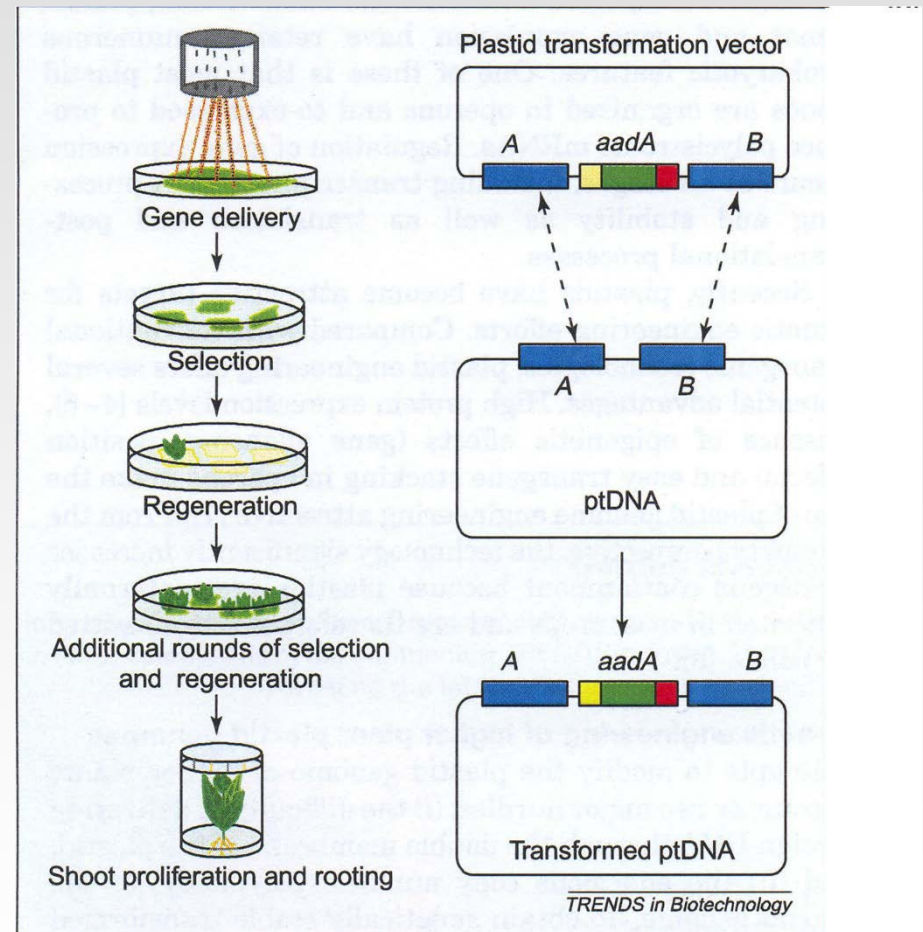
- ❑ 1. Vysoká úroveň exprese plastidových genů
 - ❑ *Kolik kopií každého genu je obsaženo v 1 buňce potenciálně transformované?*
 - ❑ 2. Maternální dědičnost
 - ❑ 3. Absence pozičního efektu – viz způsob introdukce transgenů homologní rekombinací
 - ❑ 4. Absence epigenetických vlivů – nedochází ke změnám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

až

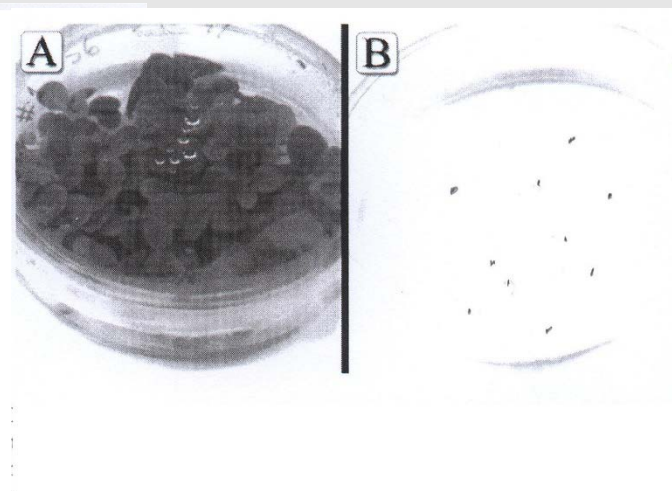
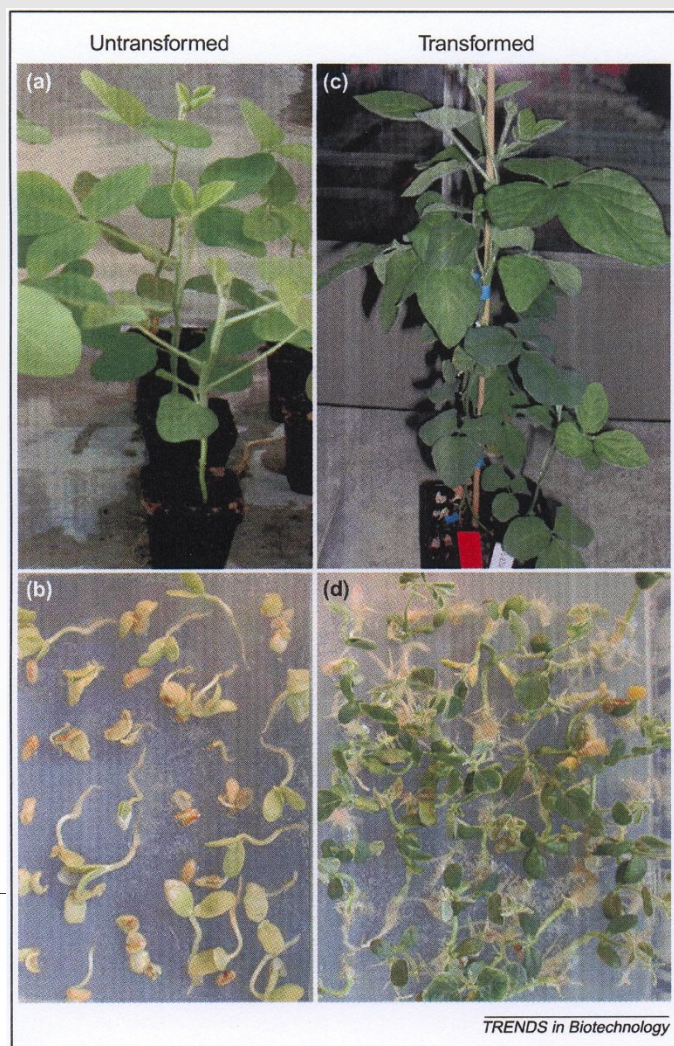
Tvorba funkčního proteinu

- Poznatky plastidové genomiky – sekvenování cpDNA, nezbytnost pro tvorbu vektorů
- Vektory pro transformaci – univerzální vektor neexistuje
- Efektivní regenerace rostlin somatickou embryogenézí
- 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



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 terapeutické proteiny
- Mrkev jedlé vakcíny
- 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~~

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: gen *Cry2Aa2*
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
Heliothis peltigera 348

Rezistence k patogenům

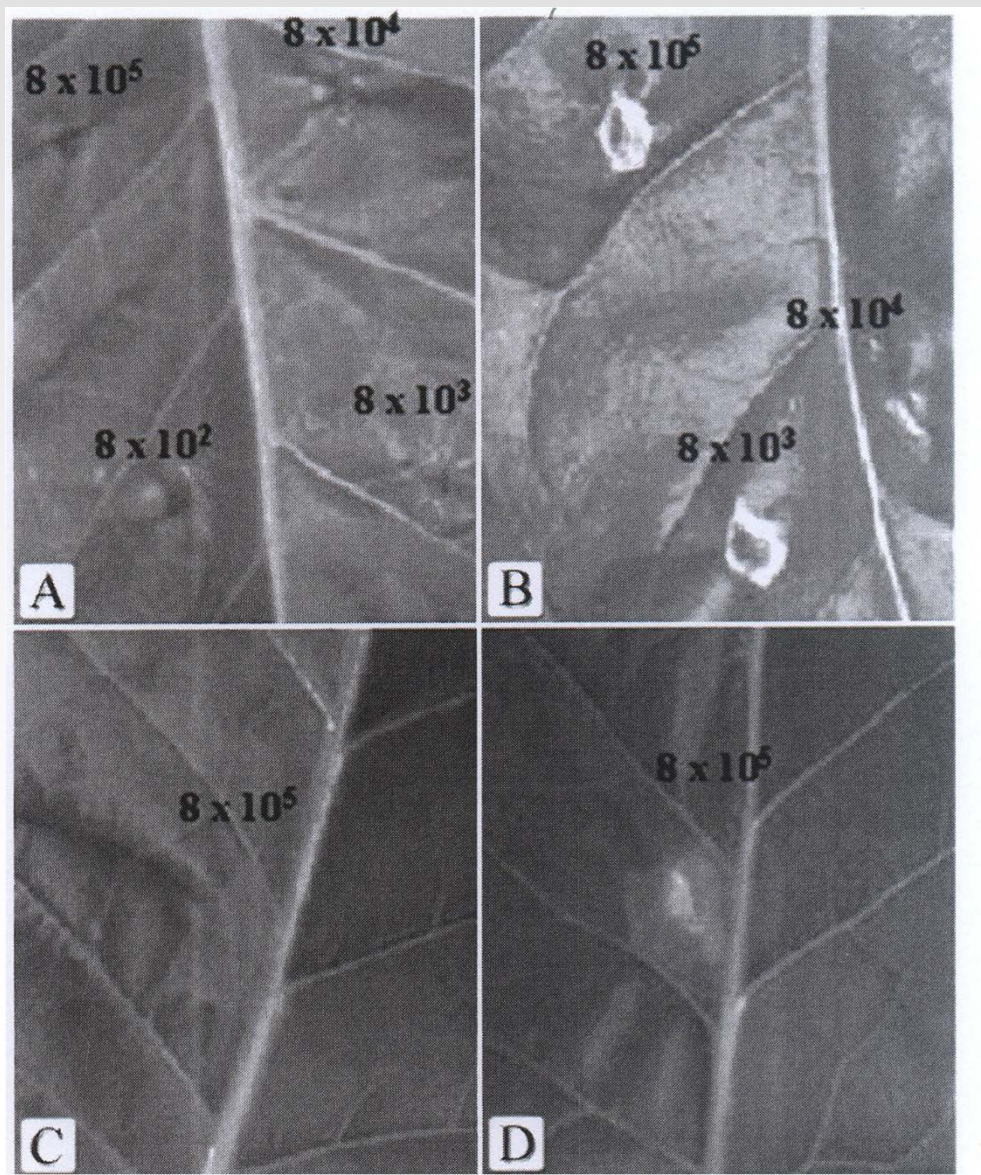
- ❑ **MSI-99** syntetický analog magaininu-2, antimikrobiální peptid – izolovaný ze sekretů kůže drápatky vodní
 - ❑ Mechanismus jeho působení:
 - ❑ vysoce specifický pro fosfolipidy přítomné ve vnější membráně bakterií a hub,
 - ❑ má destrukční účinek na membránu bakterií
 - ❑ lyze buňky = Účinný vůči 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

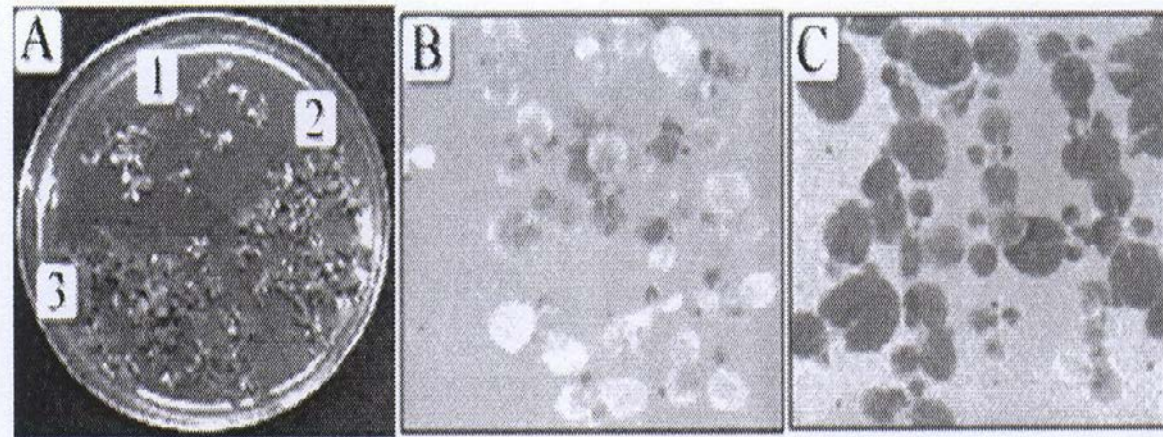
- nízkomolekulární
látky regulující příjem
a zadržování vody

□ Trehalóza

Gen *TPS1* – Trehalózo
fosfát syntáza

□ 25x vyšší akumulace
trehalózy než při
jaderné transformaci

1 netransgenní rostliny
2 transgenní T1
3 transgenní T2

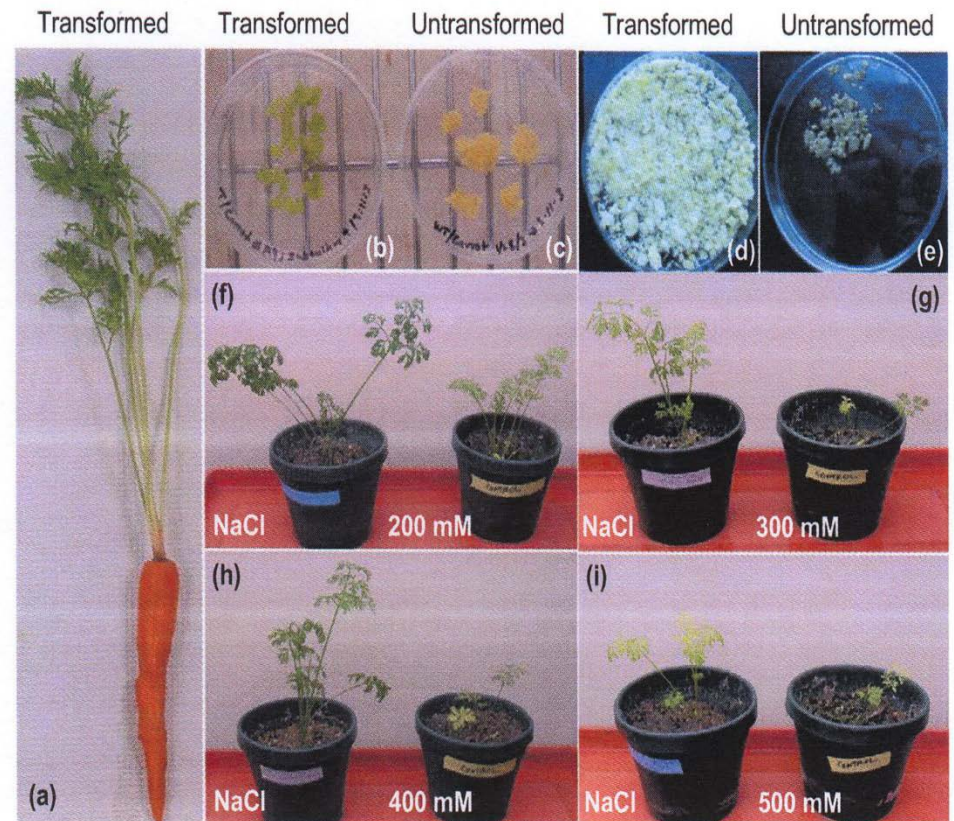


Test: 6% polyetylen glykol
Netransgenní Transgenní
Další testy se zálivkou

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
- Účinnost: transgenní rostliny mrkve rostou při 400 mM NaCl (úroveň halofyt, 50x více betainu)



Fytoremediace

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

Rtuť

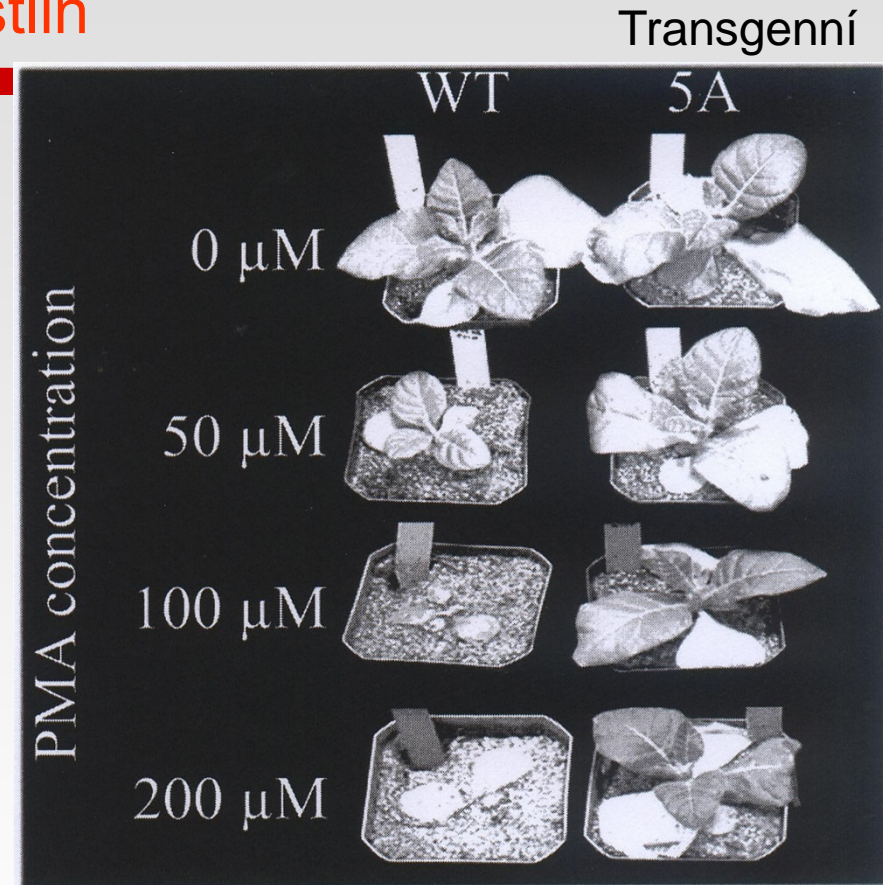
Nejtoxičtější je organická rtuť

Geny – pro bakteriální
enzymy

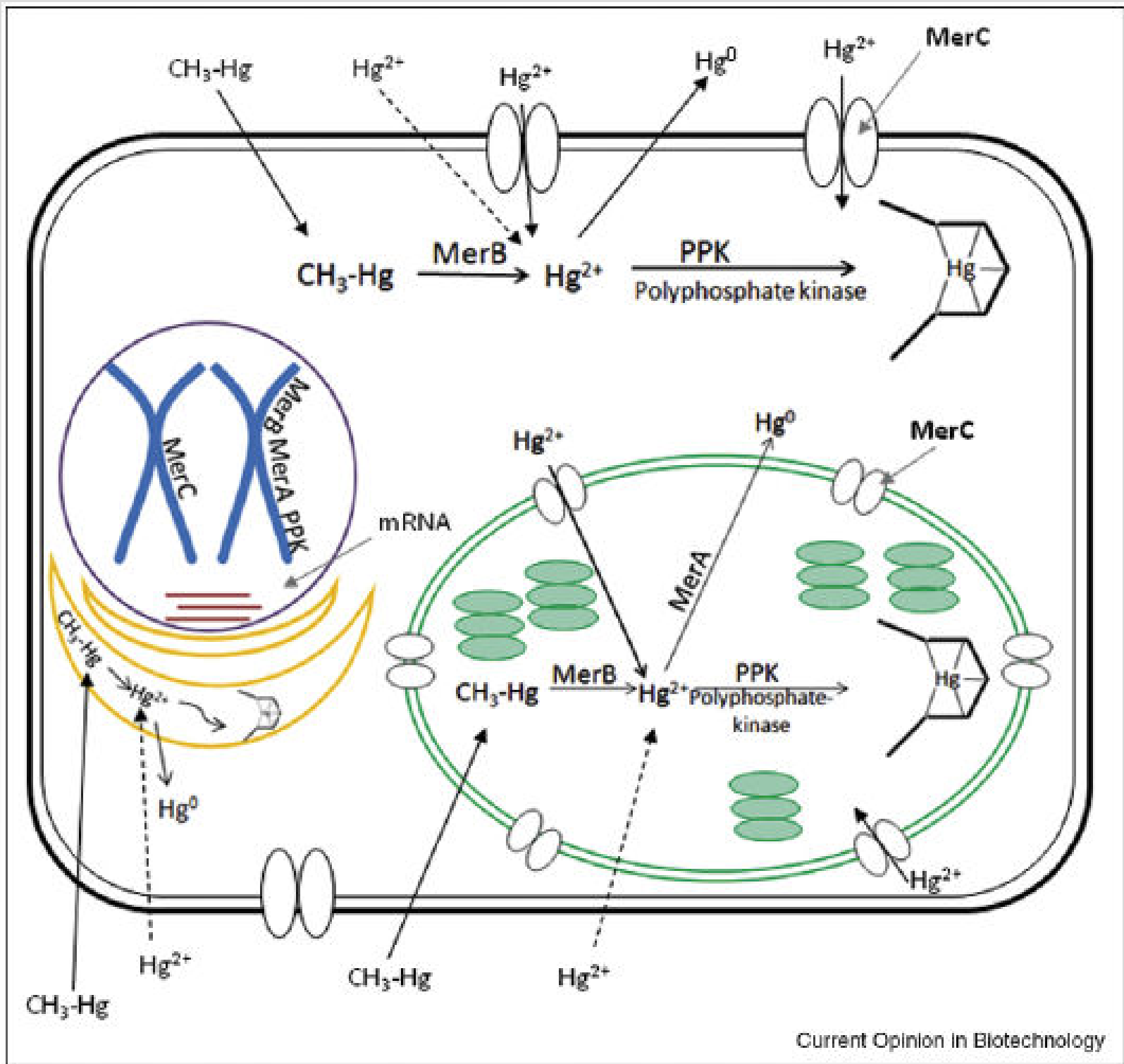
merA – reduktáza

merB – lyáza

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



Transgenní rostliny rostou až do koncentrace 400 µM PMA.



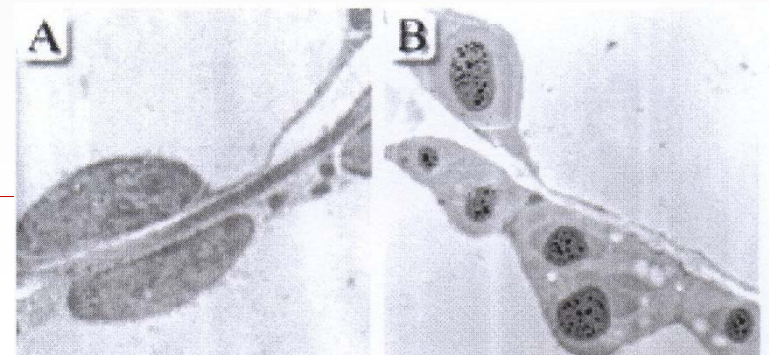
Plastidy jako bioreaktory farmakologických látek

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*
- 11,1% tsp



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 produkováný 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 α 19% tsp
IFN α 2b léčba leukemických buněk
Interferon γ 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 β
Původce *Vibrio cholerae*
- Vakcína antraxu – snět slezinná, původce *Bacillus anthracis*
- Vakcína moru
Původce *Yersinia pestis*
- Zvířecí vakcíny – psí parvovirus

Využití Produkty ve fázi klinických testů

Produkt		Rostlina
Lidský somatotropin	léčba trpasličího vzrůstu u dětí Turnerova syndromu	tabák
Albumin lidského séra	Náhrada krve při traumatických stavech	tabák
	Dow AgroSciences	
Lidský interferon α 2b	Funkce jako léčivo při virových infekcích, leukemii i proti nádorům	okřehek
	Biolex Therapeutics Inc	
Pankreatická lipáza	cystická fibróza doplněk stravy	kukuřice
	Meristem Therapeutics	
Protilátka proti zubnímu kazu	Planet Biotechnology Inc. (CaroX™) schváleno pro EU, ještě není na trhu	tabák
Vakcína psích parvovirů	Large Scale Biology Corp.	tabák

Komerční produkty na trhu

Produkt		Rostlina
Avidin	Prodigene	kukuřice
β-glukuronidáza	Prodigene	kukuřice
Trypsin	Prodigene	kukuřice
Lidský laktoferin	Meristem Therapeutics	kukuřice, rýže
Lidský lysozym	Ventria Bioscience	rýže
Lipáza	Meristem Therapeutics	kukuřice
α-amyláza	Syngenta	kukuřice, tabák

Další příklady mimojaderné dědičnosti

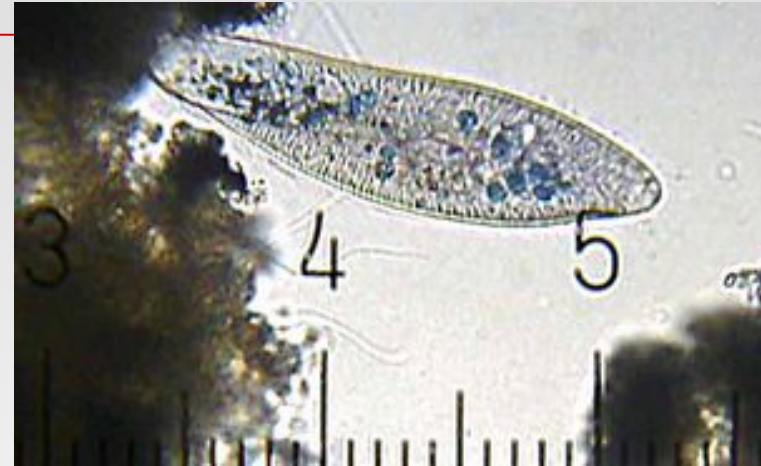
Symbiotické infekční částice

- *Paramecium aurelium*
 - *Drosophila*
-

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

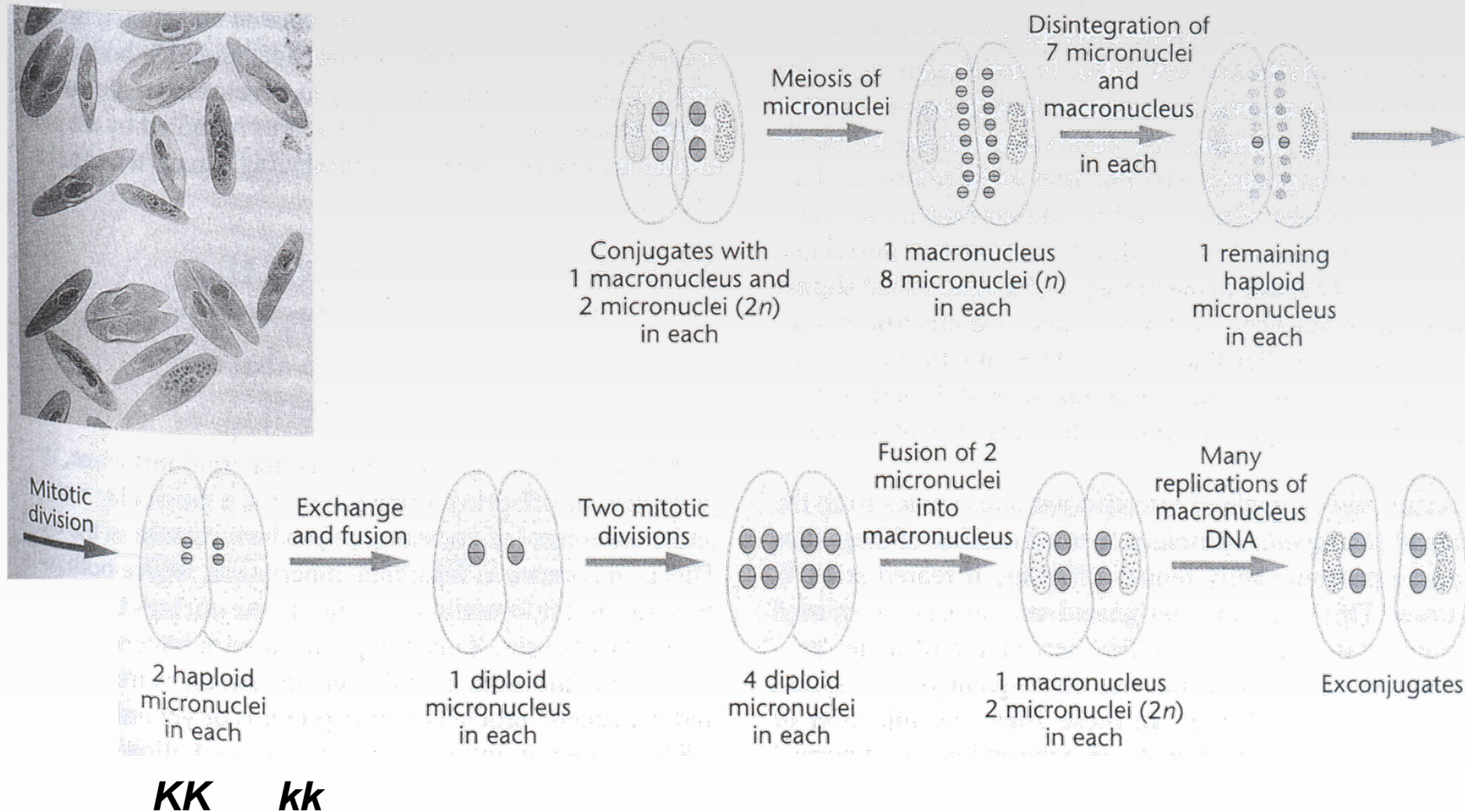


Symbiotické infekční částice **kapa**

Toxin **paramecin** – kmen killer

Jaderný gen *K* determinuje odolnost k paramecinu

Reprodukce – pohlavní výměna konjugací



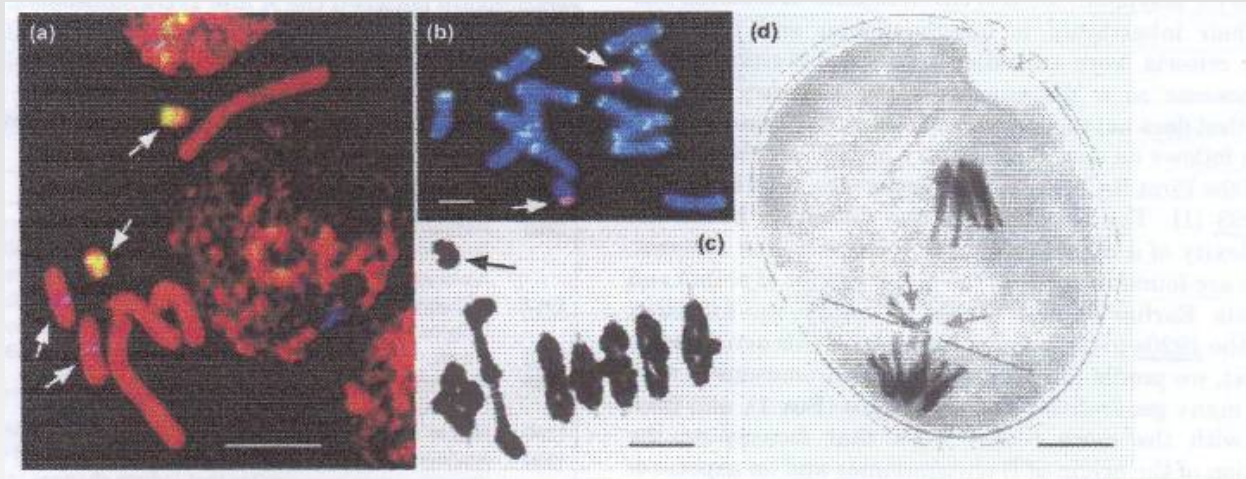
Drosophila melanogaster

- Kmeny citlivé k CO₂
- Virové částice **sigma**

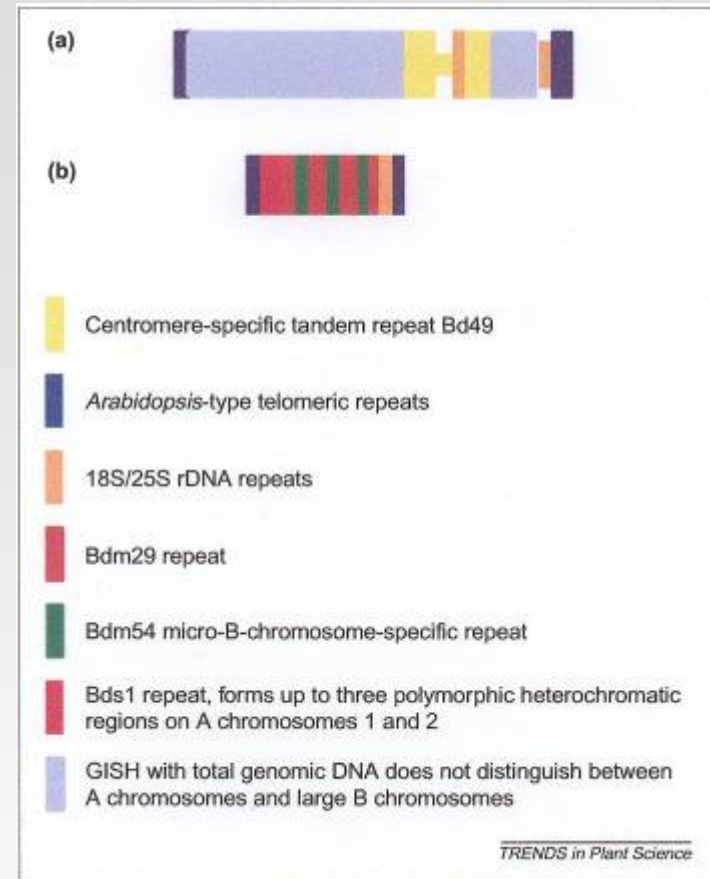
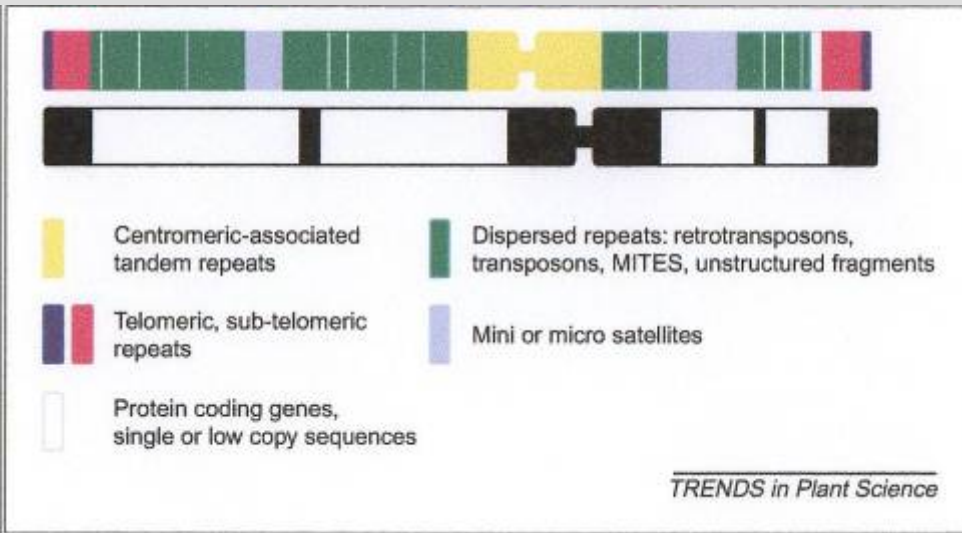
Drosophila bifasciata

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

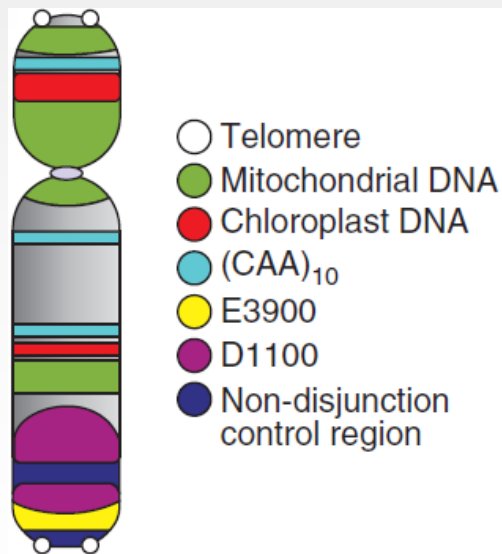
B chromozomy



- a)* *Brachycome dichromosomatica* (mitóza, 2 B a 2 mikro-B chromozomy)
 - b)* *Secale cereale* (metafáze, 2 B chromozomy)
 - c)* *Secale cereale* (metafáze I meiózy, 1 B chromozom, 7 bivalentů)
 - d)* *Secale cereale* (1. mitóza v pylovém zrně, nondisjunkce B chromozomu)
-



➔ B chromozom – struktura



Brachycome dichromosomatica

- a) B chromozom
- b) Mikro-B chromozom

➔ B chromozom *Secale cereale*

➔ oblast nezbytná pro nondisjunkci

Secale cereale

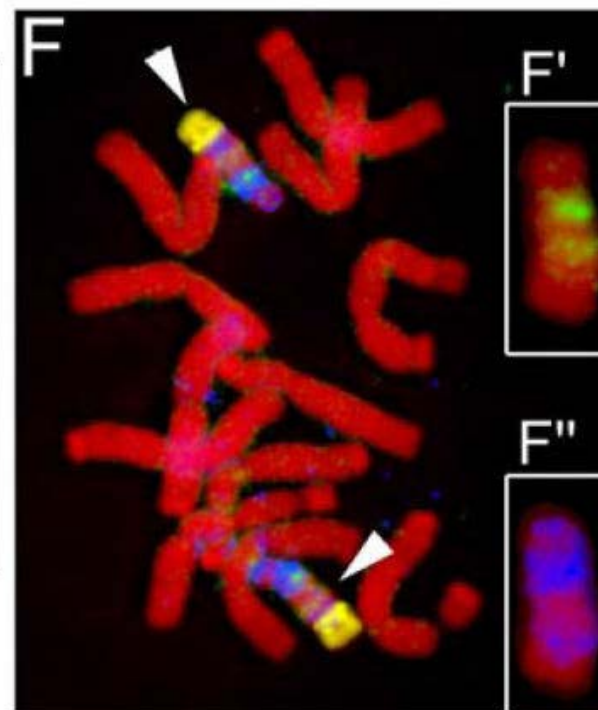
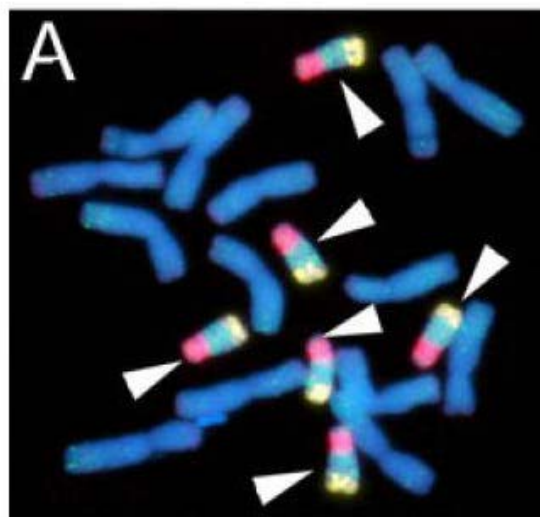
A 6 B chr

3 typy repeticí

F mt DNA modrá

cp DNA zelená

repetice žlutá



B *Brachycome*

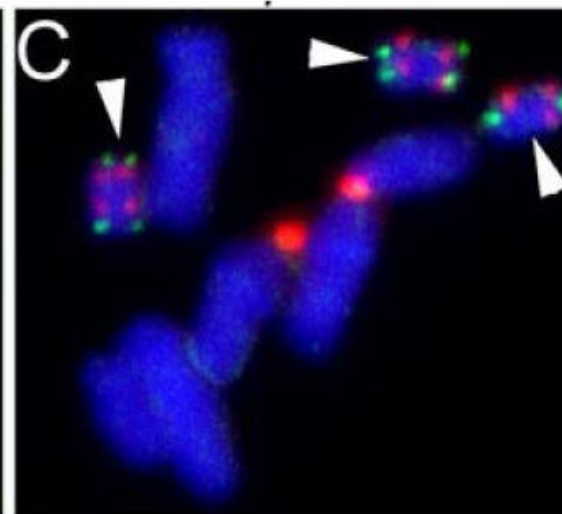
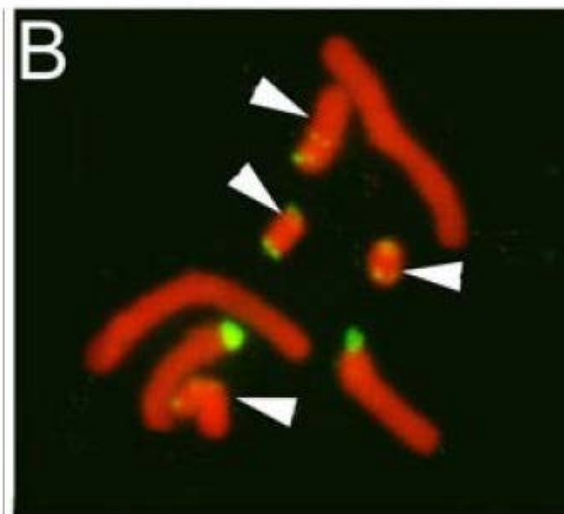
dichromosomatica

45S rDNA zelená

C *Crepis capilaris*

45S rDNA červená

telomery Ath zelená



Evolve vznik B chromozomů

1. Duplikace a částečná duplikace A chr., přeuspořádání/translokace
2. Znemožnění párování A – B v meióze, vytváří se proto-B
3. Akumulace organelové DNA a fragmentů z A (genomická houba) amplifikace spec. sekvencí pro B chr.
inaktivace sekvencí z A chr.

