

# Μεθοδολογίες άμεσης μεταφοράς γονιδίων στο φυτό

μεταφορά μεγάλων ποσοτήτων «γυμνού DNA» σε παροδικώς διαπερατά φυτικά κύτταρα

μεταμόρφωση φυτών με φυσικές, χημικές και μηχανικές μεθοδολογίες:

- ✓ **βομβαρδισμός σωματιδίων**  
(particle bombardment- biolistics)
- ✓ **ηλεκτροπόρωση**
- ✓ **χημική μεταφορά με τη χρήση PEG**
- ✓ μικροέγχυση
- ✓ μεταφορά DNA με τη χρήση laser
- ✓ μεταφορά DNA με τη χρήση ινών σιλικόνης (silicon carbide fibres-WHISKERS)

# Χημική μεταφορά γονιδίων

εισαγωγή DNA σε πρωτοπλάστες με χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης - PEG- παρουσία δισθενών ιόντων

Η PEG προκαλεί:

- ελάττωση απώσεως ομοίως φορτισμένων μορίων (μεμβρανή κυτταρού-DNA)
- καθίζηση DNA πάνω στις μεμβράνες του κυττάρου
- ερεθισμός του πρωτοπλάστη για φαγοκύτωση μεγαλομορίων

## παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη

- ❖ μοριακό βάρος και συγκεντρωση PEG
- ❖ συγκέντρωση και φυσική κατάσταση του DNA
- ❖ παρουσία και συγκέντρωση του «συνοδού” DNA
- ❖ αριθμός πρωτοπλαστών
- ❖ μέσο και pH επώασης (συγκεντρώσεις ιόντων Ca / Mg)
- ❖ χρόνος επώασης
- ❖ θερμοκρασία
- ❖ τρόπος επώασης (π.χ. ανάδευση)

# Χημική μεταφορά γονιδίων

## Πλεονεκτήματα

⌘ Αποτελεσματική για πολύ μεγάλο αριθμό φυτών

## Μειονεκτήματα

⌘ Εφαρμόζεται μόνο σε πρωτοπλάστες

⌘ Ανακατατάξεις των εισαχθέντων γονιδίων

# Ηλεκτροπόρωση

(ηλεκτροέγχυση, ηλεκτροδιαμόλυνση, ηλεκτρική μικροέγχυση)

Φαινόμενο κατά το οποίο η μεμβράνη του κυττάρου (πρωτοπλάστες) εκτίθεται σε μικρούς χρονικά παλμούς υψηλού ηλεκτρικού πεδίου με αποτέλεσμα την παροδική αποσταθεροποίησή της και τη δημιουργία "μεμβρανικών πόρων", οι οποίοι στη συνέχεια κλείνουν με κατάλληλη περαιτέρω επεξεργασία

## παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη

- ❖ φυσιολογική κατάσταση πρωτοπλαστών
- ❖ συγκέντρωση και καθαρότητα του DNA
- ❖ πυκνότητα των κυττάρων
- ❖ μέσο της ηλεκτροπόρωσης (ιοντική και ωσμωτική ισχύς του διαλύματος)
- ❖ ένταση του ρεύματος
- ❖ χρόνος επώασης
- ❖ θερμοκρασία

# Ηλεκτροπόρωση

## Πλεονεκτήματα

- ⌘ Μεγαλύτερη αποδοτικότητα ως προς τη μεταφορά μορίων - ανεξαρτήτου μεγέθους- από τις υπόλοιπες μεθόδους
- ⌘ Μη διεισδυτική
- ⌘ Μη χημική, μη τοξική
- ⌘ Δεν επηρεάζει τις βιολογικές δομές ή λειτουργίες των κυττάρων-στόχων

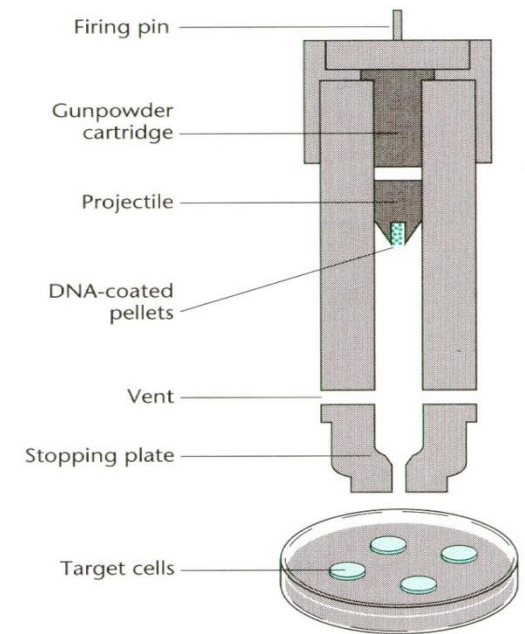
## Μειονεκτήματα

- ⌘ Εφαρμόζεται κυρίως σε πρωτοπλάστες φυτών
- ⌘ Χρησιμοποιείται για μελέτες παροδικής έκφρασης
- ⌘ Απαιτείται μεγάλος αριθμός κυττάρων ανά πείραμα
- ⌘ Η έκβαση των αποτελεσμάτων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες

# Βομβαρδισμός σωματιδίων

(βιολιστική, βομβαρδισμός προεξοχών, επιταχυντής σωματιδίων, γονιδιακό όπλο, όπλο σωματιδίων)

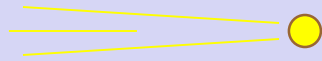
Χρήση επιταχυνόμενων με μεγάλη ταχύτητα σωματιδίων -προεξοχών (απο χρυσό ή βολφράμιο) στα οποία συνδέεται το DNA προς μεταφορά έτσι ώστε να διαπερνώνται οι εξωτερικές κυτταρικές στοιβάδες ή τα κυτταρικά τοιχώματα και να εισέρχεται το DNA στο κύτταρο



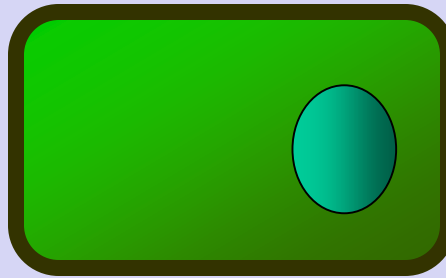
**Figure 15.3**

**DNA Particle Gun.** The DNA particle gun, developed by John C. Sanford of Cornell University, fires tungsten pellets coated with DNA into plant cells. The pellets are held by a plastic microprojectile, which is accelerated by a gunpowder charge. The plate stops the microprojectile; momentum sends the DNA-coated pellets into the target. The instrument shown is the Biolistic® system from Bio-Rad, but other instruments using variations of this basic principle have been developed.

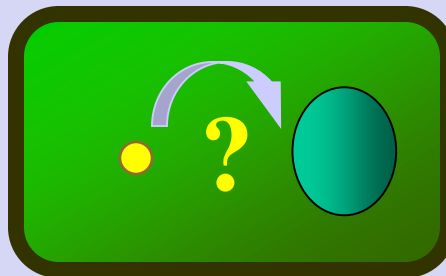
# Βιολιστική



Σωματίδια χρυσού  
επικαλυμμένα με  
DNA



Κυτταρικό τοίχωμα



# Βομβαρδισμός σωματιδίων

## Φυσικές παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη

- ❖ χημική σύσταση σωματιδίων
- ❖ μέγεθος και σχήμα σωματιδίων (0.6-1.2  $\mu\text{m}$ )
- ❖ ταχύτητα σωματιδίων (επιτάχυνση, απόσταση στόχου, κενό)
- ❖ αριθμός μικροσφαιριδίων ανά μονάδα εισαγωγής (ικανοποιητική κάλυψη του κυτταρικού επιπέδου στόχου και εισχώρηση στο κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα χωρίς την υπερβολική νέκρωση των επιφανειακών κυτταρικών ιστών)
- ❖ διάμετρος στόχευσης

## Βιολογικές παράμετροι που λαμβάνονται υπόψη

- 🌸 απαραίτητως κύτταρα ή ιστοί με δυναμικότητα αναγέννησης (μεριστωματικός ιστός ή έκφυτα που βομβαρδίζονται και κατόπιν επάγονται για εμβρυογένεση ή κύτταρα κάλλου και εμβρυογενών καλλιιεργειών, έμβρυα, γύρη)
- 🌸 στάδιο κυτταρικού κύκλου
- 🌸 δομή και μέγεθος DNA
- 🌸 συγκέντρωση DNA (bead-loading rate): μέχρι 5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  σωματιδίων



# Βομβαρδισμός σωματιδίων

## Πλεονεκτήματα

⌘ Αποτελεσματική και για σταθερό μετασχηματισμό (μεταμόρφωση) κυττάρων- ιστών -οργάνων **αλλά και οργανιδίων** (χλωροπλάστες)

⌘ Αποτελεσματική σε περιπτώσεις όπου οι άλλες προσεγγίσεις αποτυγχάνουν

π.χ. \* μεταμόρφωση μονοκοτυλήδων φυτών

\* *in planta* μετασχηματισμός βλαστών ή άνθων με βομβαρδισμό μεριστωμάτων

## Μειονεκτήματα

⌘ πολλαπλότητα των ενθέσεων

⌘ ανακατατάξεις των εισαχθέντων γονιδίων

Ένθεση ως single copy event, plasmid concatamers, interspersed clusters

- Agrolistic transformation
- Εισαγωγή ζωντανών βακτηρίων *E.coli* / *Agrobacterium*
- Εισαγωγή YAC

**Agro, ηλεκτροπόρωση**

καλλιέργεια κυτταρικών αιωρημάτων

**Agro, βιολιστική**

έκφυτο

κάλλος

πρωτοπλάστες

**Agro, ηλεκτροπόρωση, PEG**

**Agro, βιολιστική**

**Agro, βιολιστική**

**Agro, βιολιστική**

άμεση οργανογένεση

σωματική εμβρυογένεση

οργανογένεση

# Μεταμόρφωση χλωροπλαστών

## Γονιδίωμα πλαστιδίων (plastome- ptDNA)

- ο Στα ανώτερα φυτά πολύ συντηρημένο, με μικρή ποικιλομορφία στην οργάνωση και τη
- ο 120-130 γονίδια ανήκουν σε δύο κατηγορίες:
  - γονίδια του γενετικού συστήματος (rRNAs, tRNAs, ριβοσωμικές υπομονάδες, RNA πολυμεράση)
  - γονίδια φωτοσύνθεσης
- ο Γονίδια οργανωμένα σε οπερόνια και έκφρασή τους σε πολυκιστρονικά mRNAs

## Μέθοδοι μεταμόρφωσης

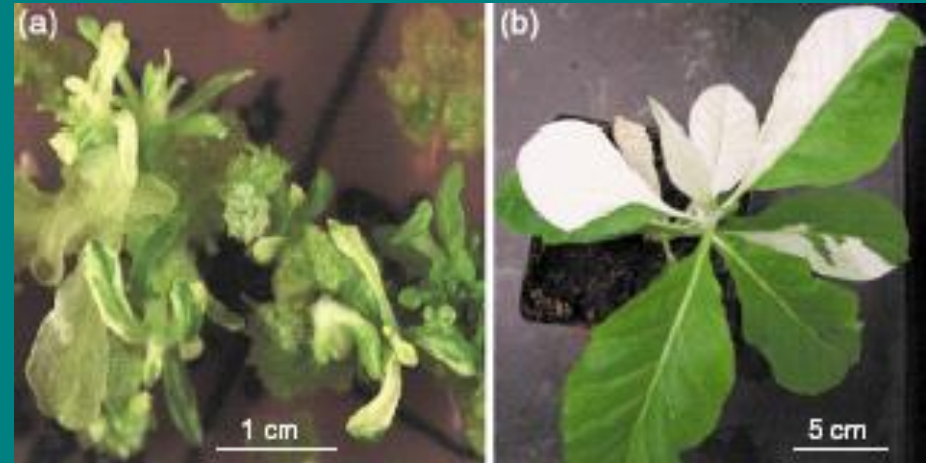
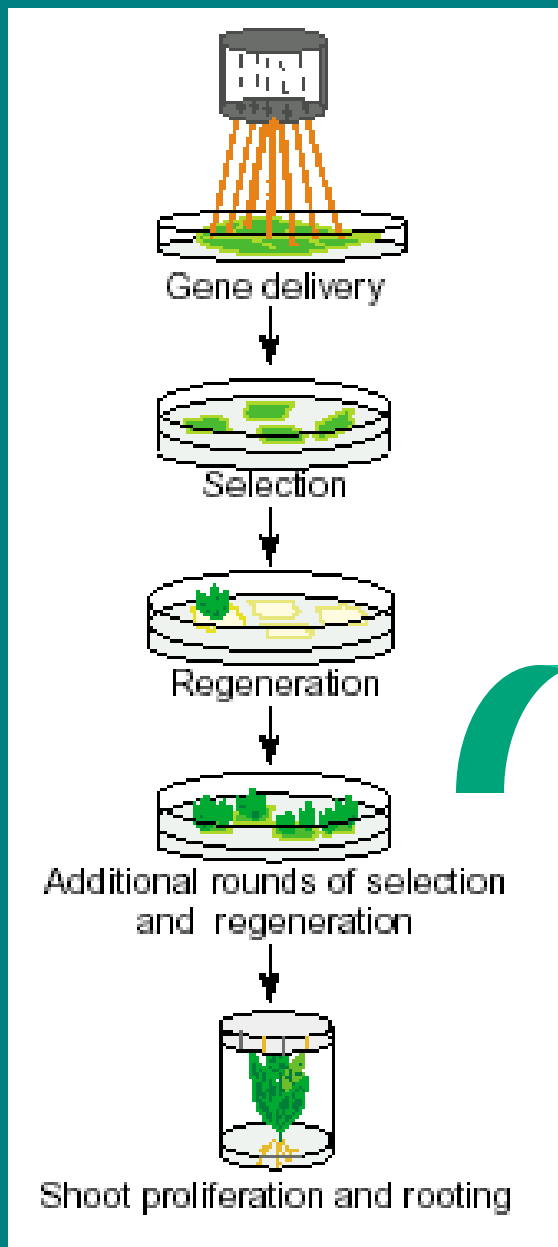
Βομβαρδισμός σωματιδίων και χημική μεταφορά με PEG  
(φορείς που επιτρέπουν ομόλογο ανασυνδυασμό με το ptDNA)

## Πλεονεκτήματα γενετικής μεταμορφωσης πλαστιδίων

- ο Υψηλά επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών (μέχρι και 46% της ολικής διαλυτής πρωτεΐνης) λόγω της μεγάλης πολυπλοειδίας του ptDNA (π.χ.10-14 νουκλεοειδή ανά χλωροπλάστη, μέχρι και 100 χλωροπλάστες ανά κύτταρο)
- ο Απουσία επιγενετικών επιδράσεων (γονιδιακή σίγηση, επίδρασης θέσης)
- ο Τοποθέτηση πολλαπλών γονιδίων σε οπερόνια
- ο Κληρονόμηση πλαστιδίων από το Θηλυκό γονέα και όχι από τη γύρη

## Μειονεκτήματα- Προβλήματα

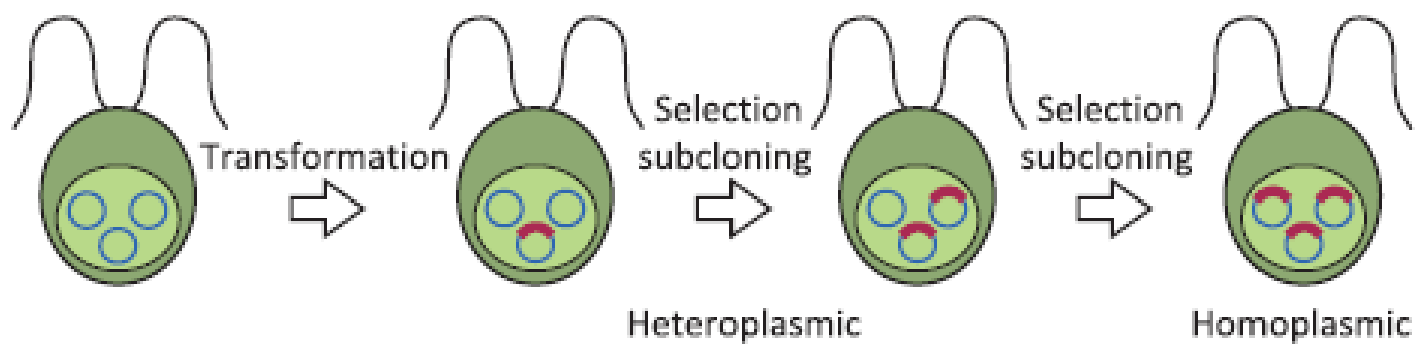
- ο περιορισμένος αριθμός ειδών είναι επιδεκτικός σε μεταμόρφωση χλωροπλαστών (καπνός, τομάτα, πατάτα, *Brassica napus*, *Oryza sativa* με πολλά προβλήματα γονιμότητας και ετεροπλασμίας)
- ο απαιτούνται πολλές γενεές σε κυτταροκαλλιέργεια πριν την απόκτηση γενετικά σταθερών διαγονιδιακών φυτών



Hager *et al*, 1999

Απαλοιφή των γονιδιωμάτων άγριου-τύπου και εγκαθίδρυση γενετικής τροποποίησης σε κάθε αντίγραφο του χλωροπλαστικού γονιδιώματος σε κάθε φυτικό κύτταρο :

Ομοιοπλασμία (homoplasmy)



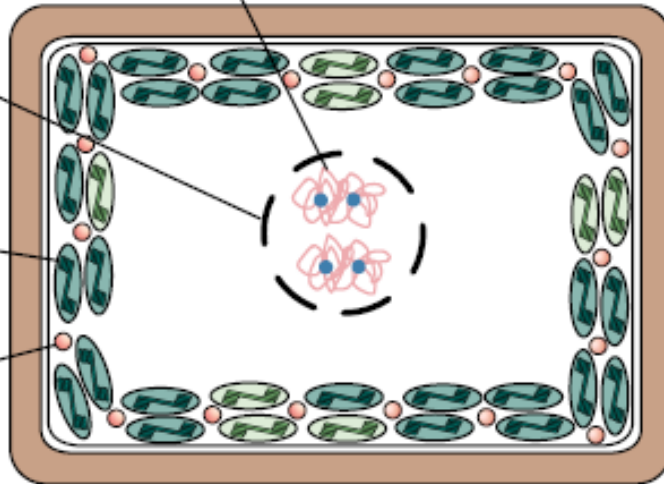
(c)

Eukaryotic nuclear genome

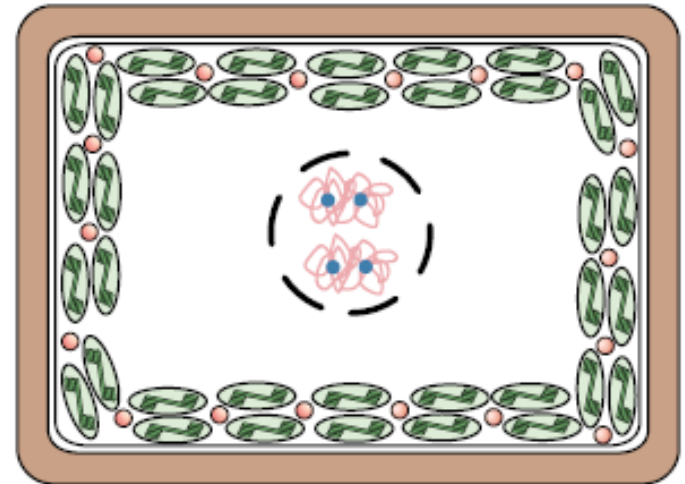
Nucleus

Prokaryotic  
plastid or  
chloroplast

Mitochondria



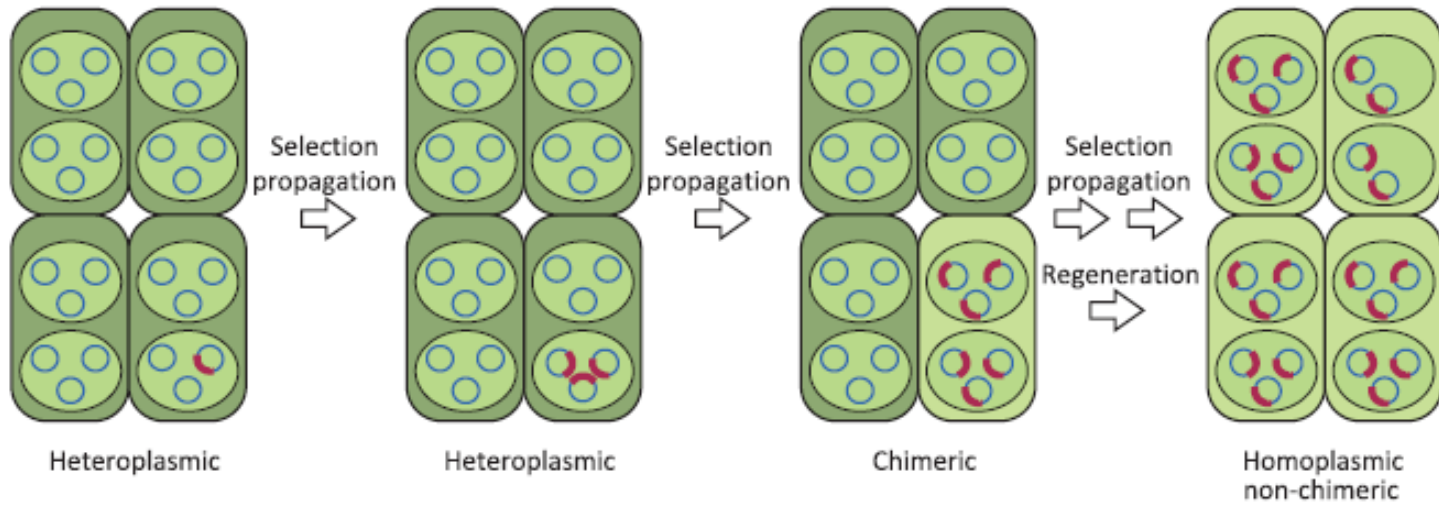
A heteroplasmic diploid plant cell  
(First round of selection)



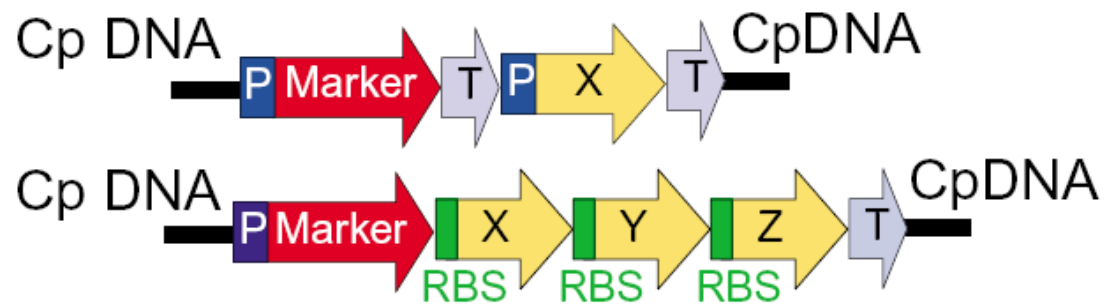
A homoplasmic diploid plant cell  
(Second round of selection)



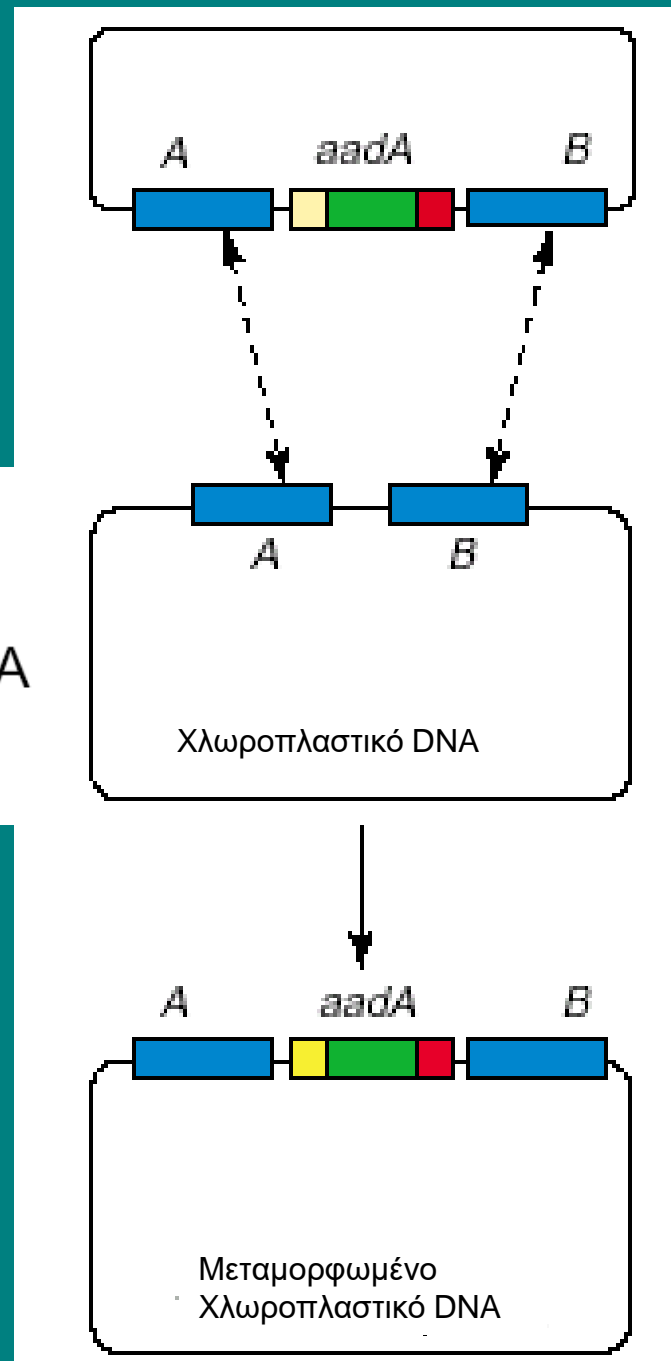
(c)



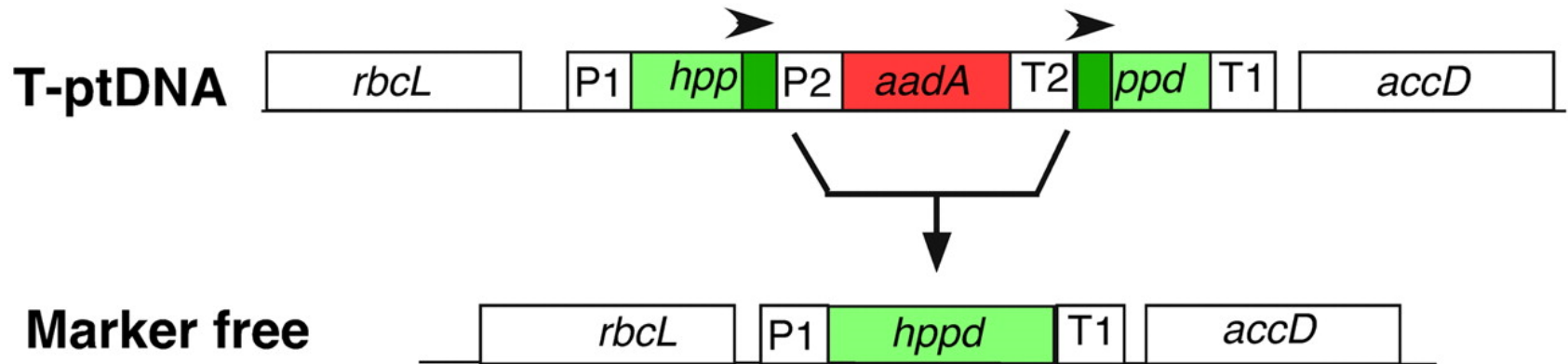
Ένθεση γονιδίου επιλογής *aadA*  
(aminoglycoside adenylyltransferase)  
(ανθεκτικότητα στην σπεκτινομυκίνη)  
στο γονιδίωμα χλωροπλάστη με  
ομόλογο ανασυνδυασμό



*badh* (betaine aldehyde dehydrogenase)  
για μεταμόρφωση χλωροπλαστών χωρίς  
γονίδιο ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά

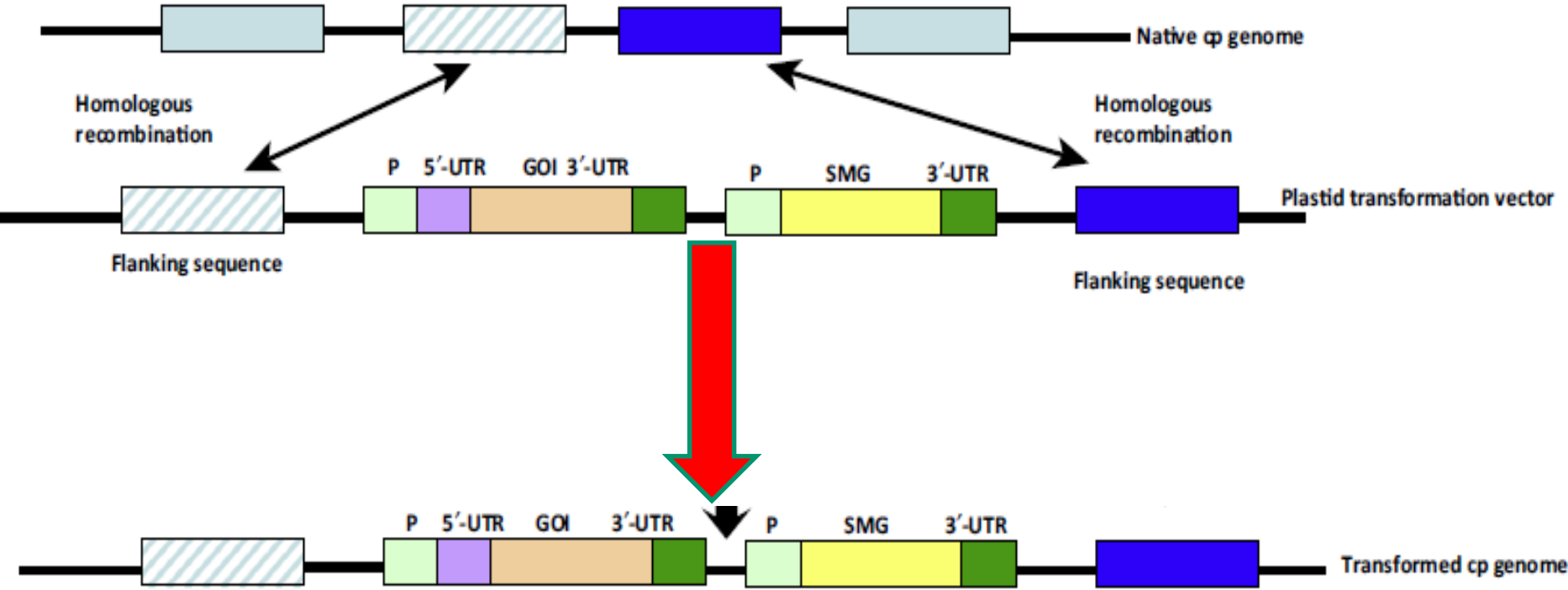


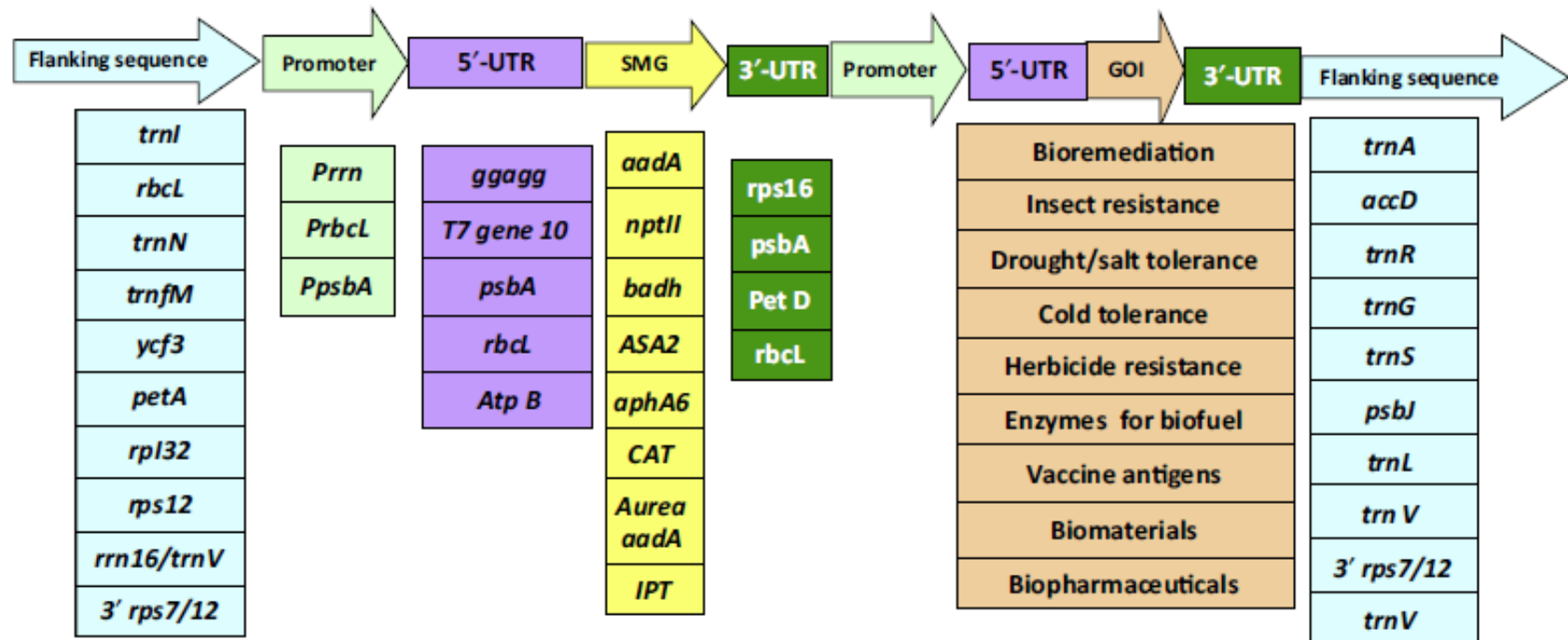
Marker-free plastids by repeat-mediated deletion of the marker gene.

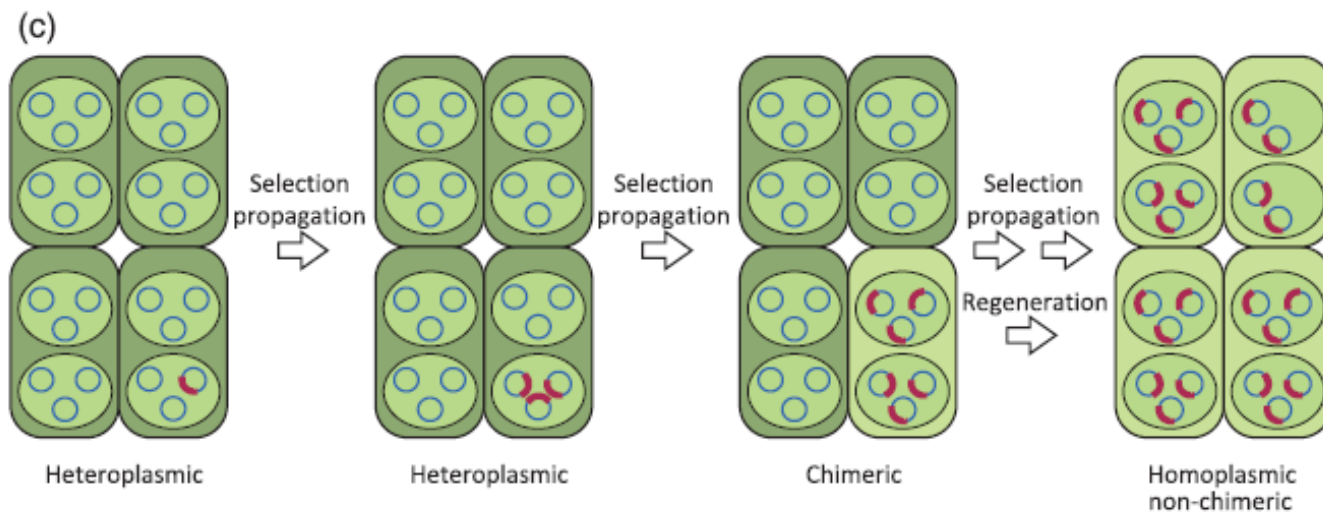
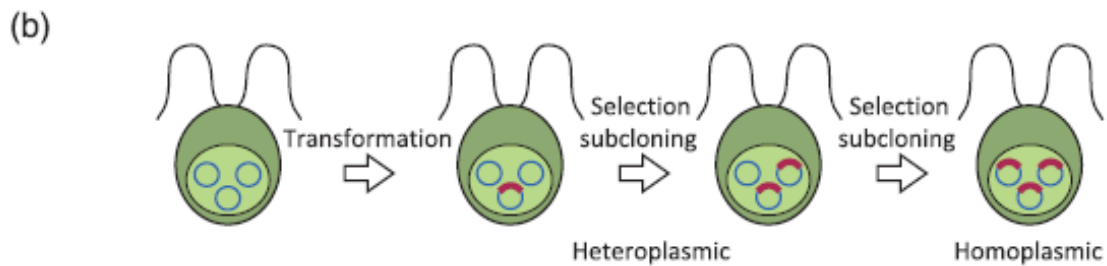
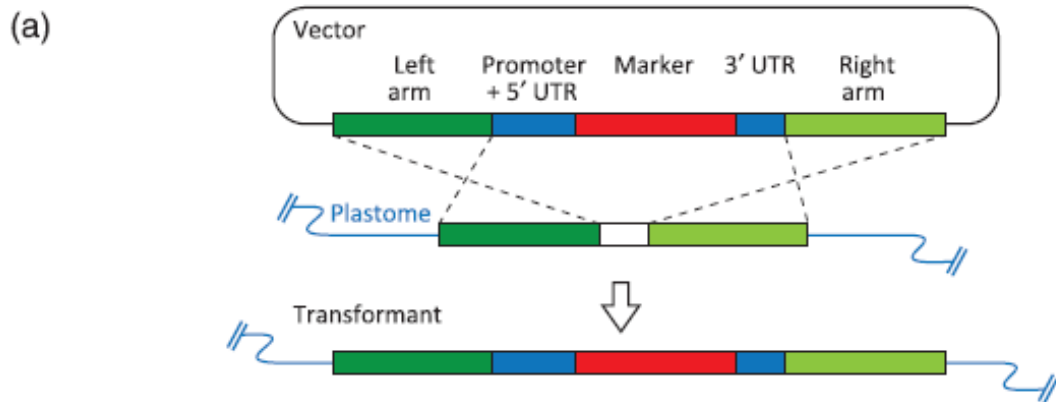


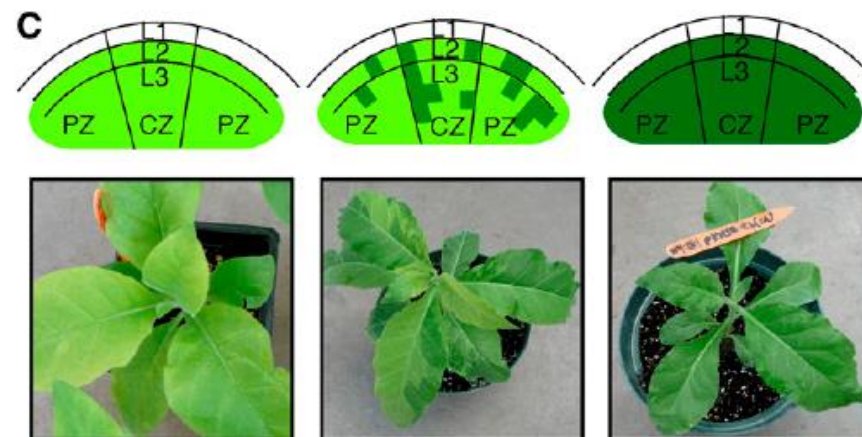
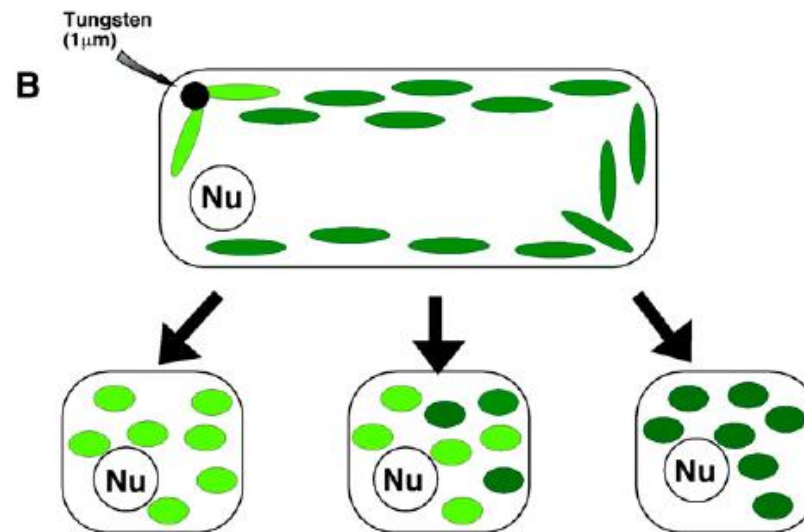
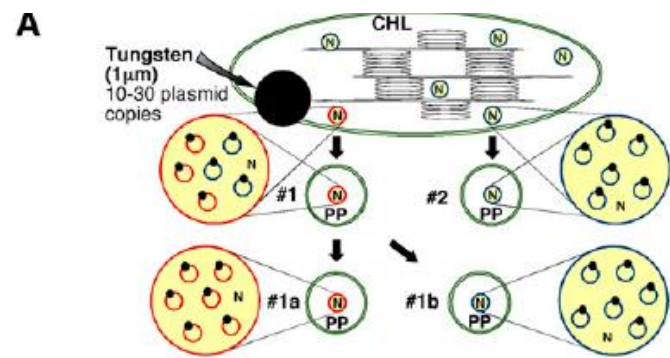
*hppd* herbicide tolerance gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), an enzyme in the tocopherol biosynthetic pathway

(A) Schematic Representation Of Transgene Sequence Integration Into Plastid Genome By Homologous Recombination



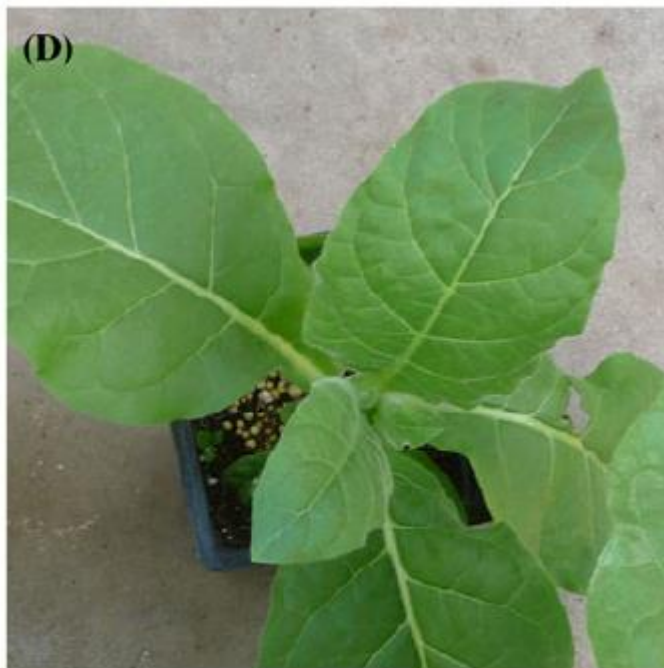
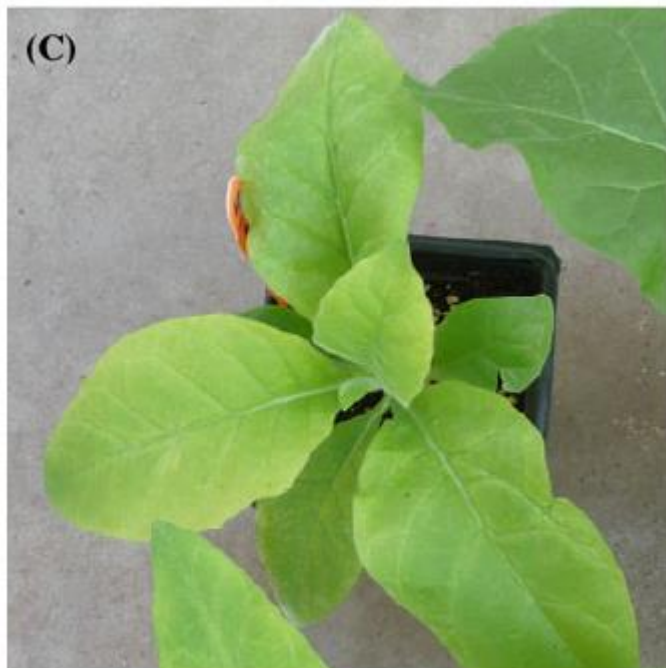
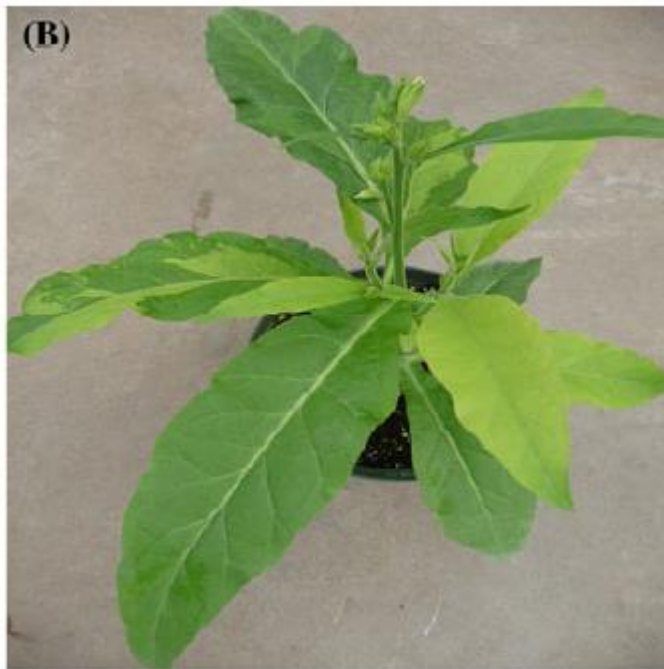
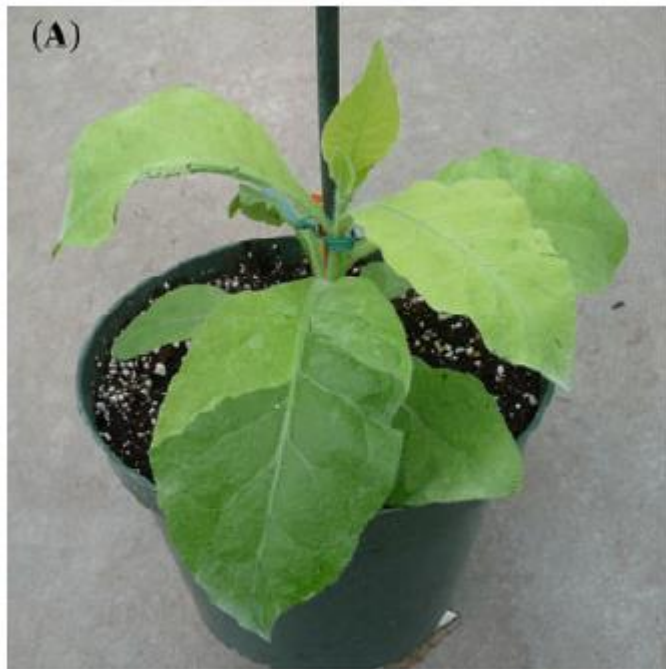




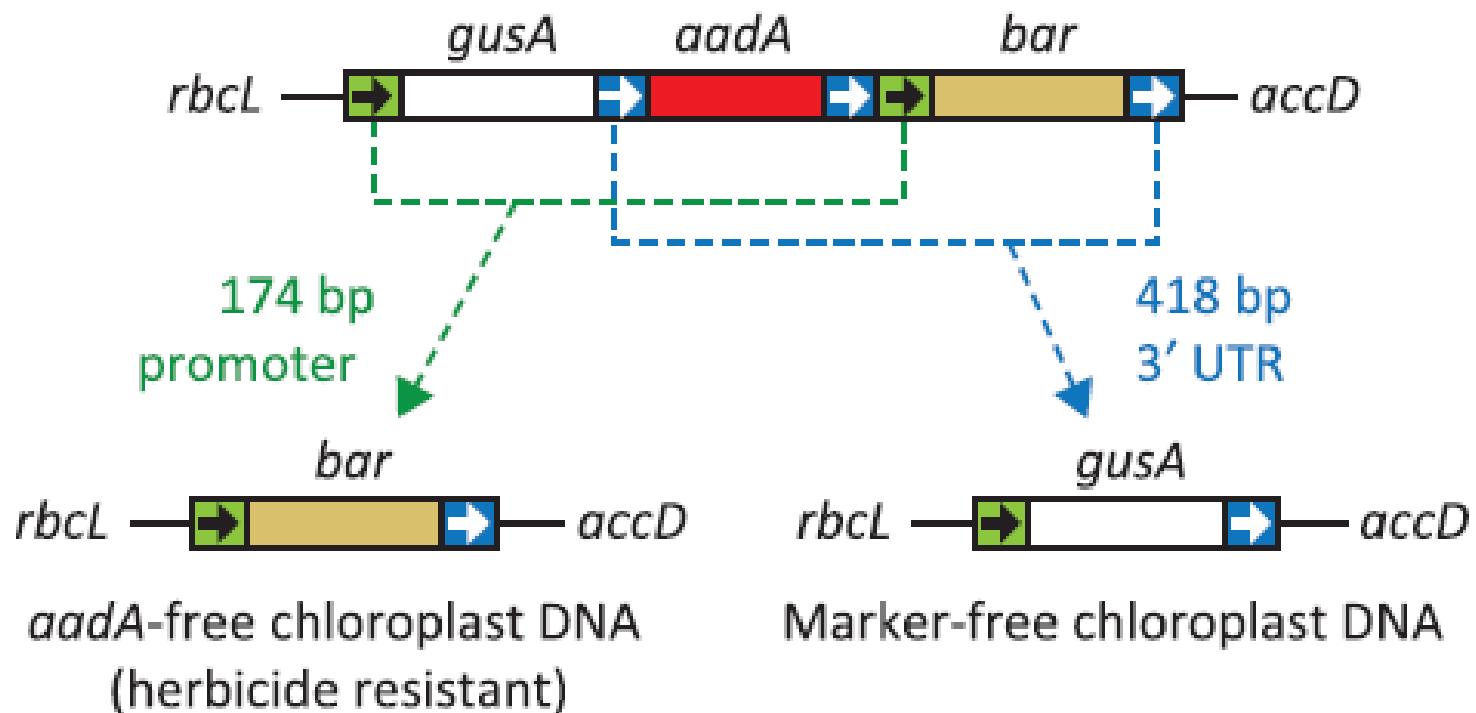




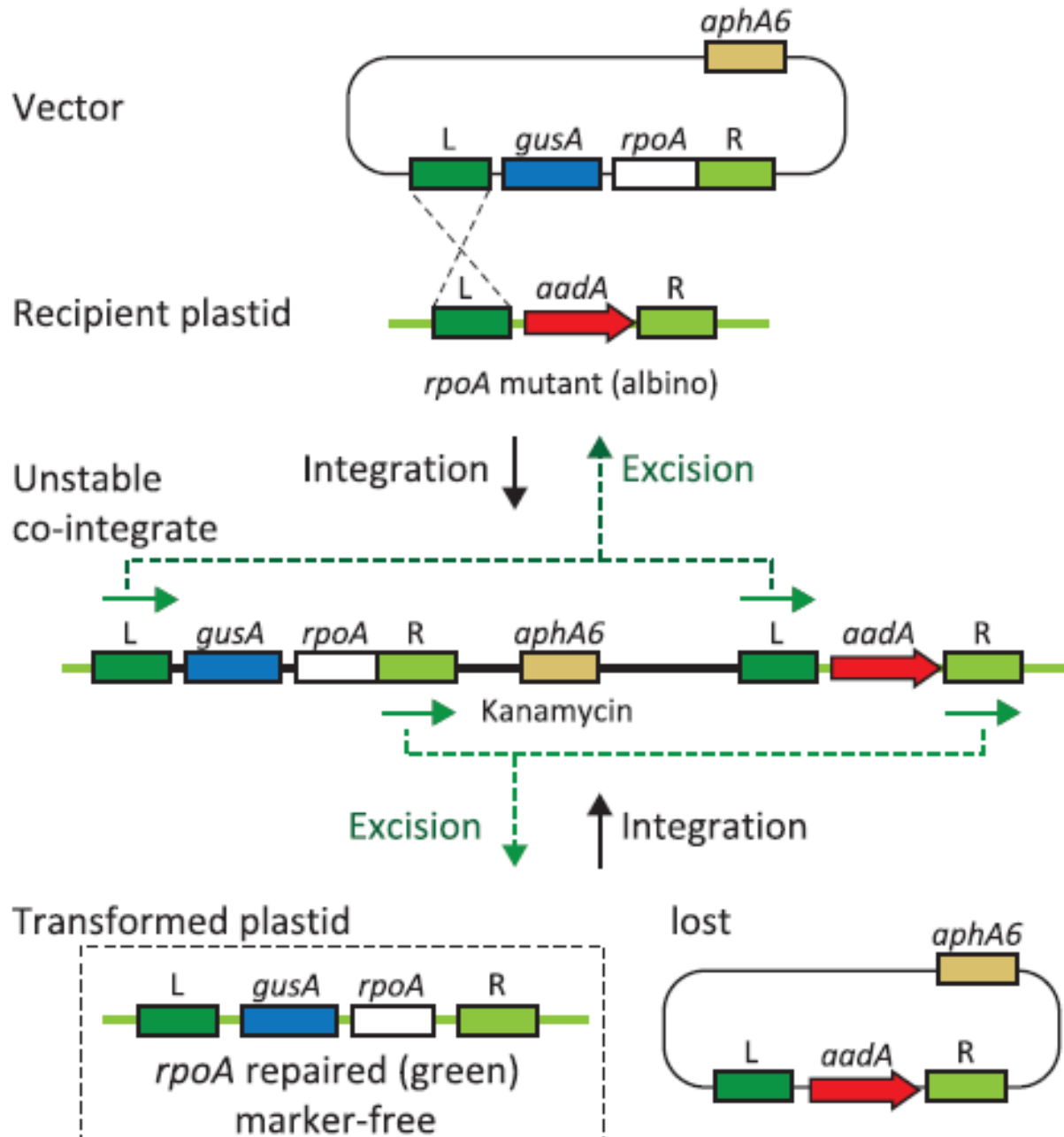




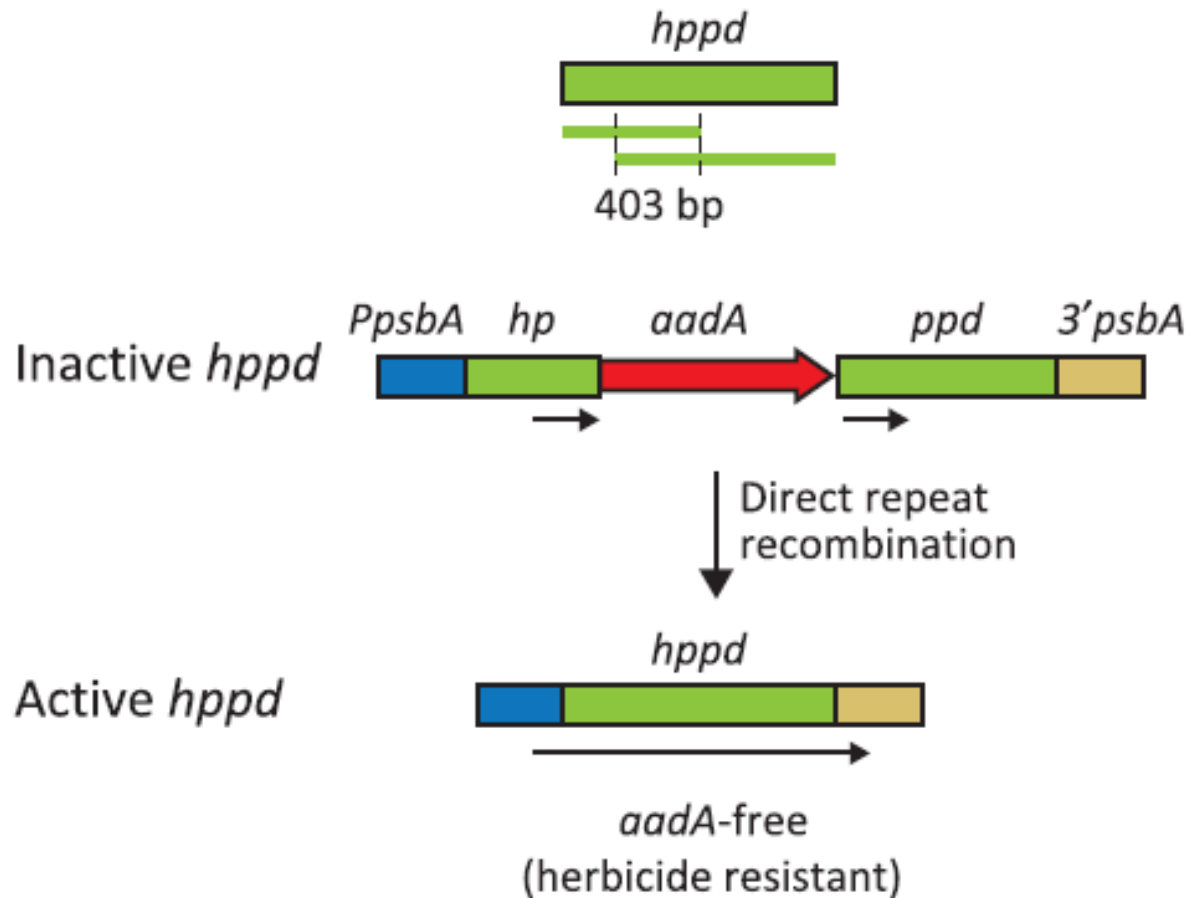
## Direct-Repeat-Mediated Excision (homologous recombination)



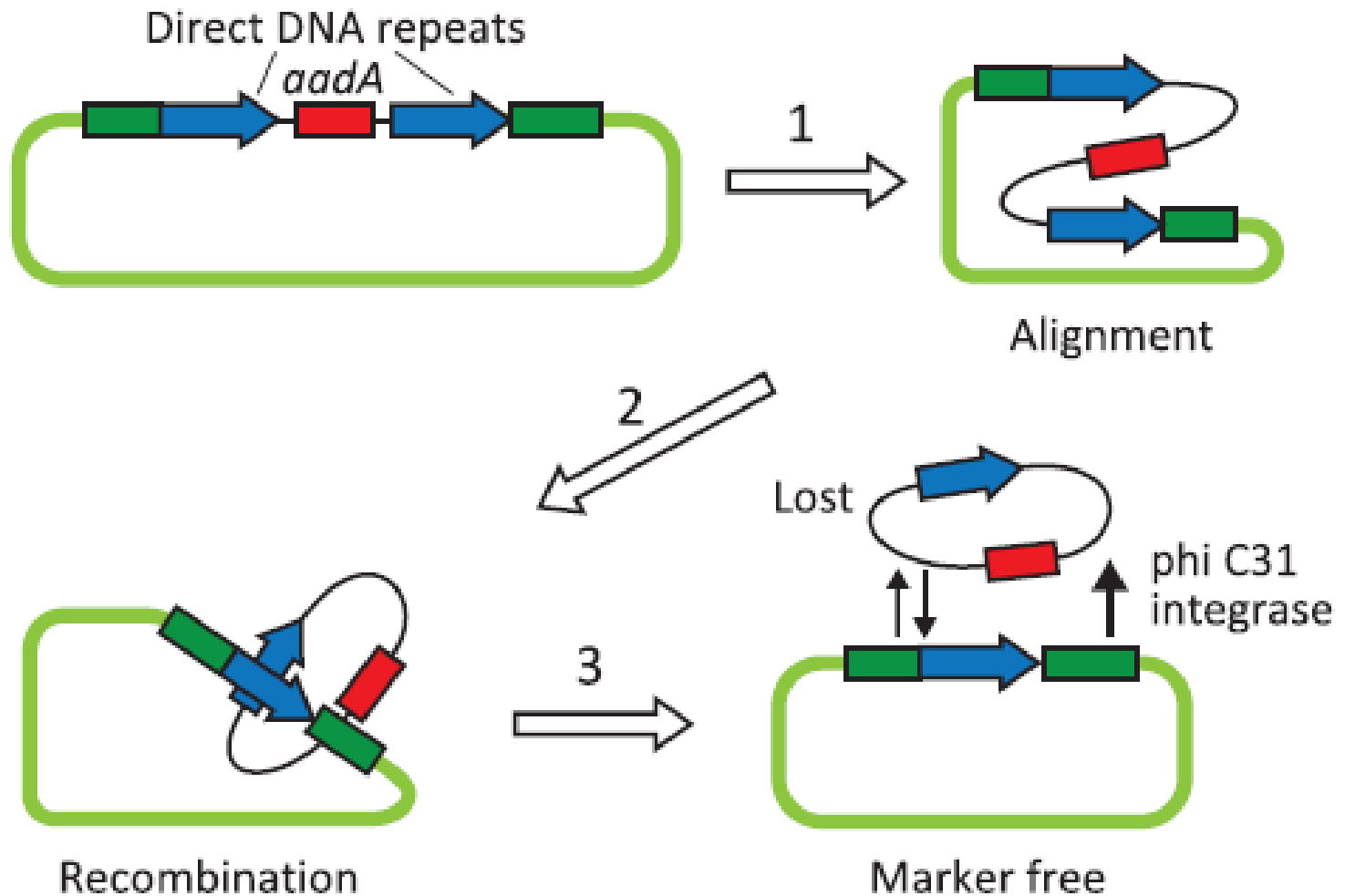
# Transient co-integration of the marker gene



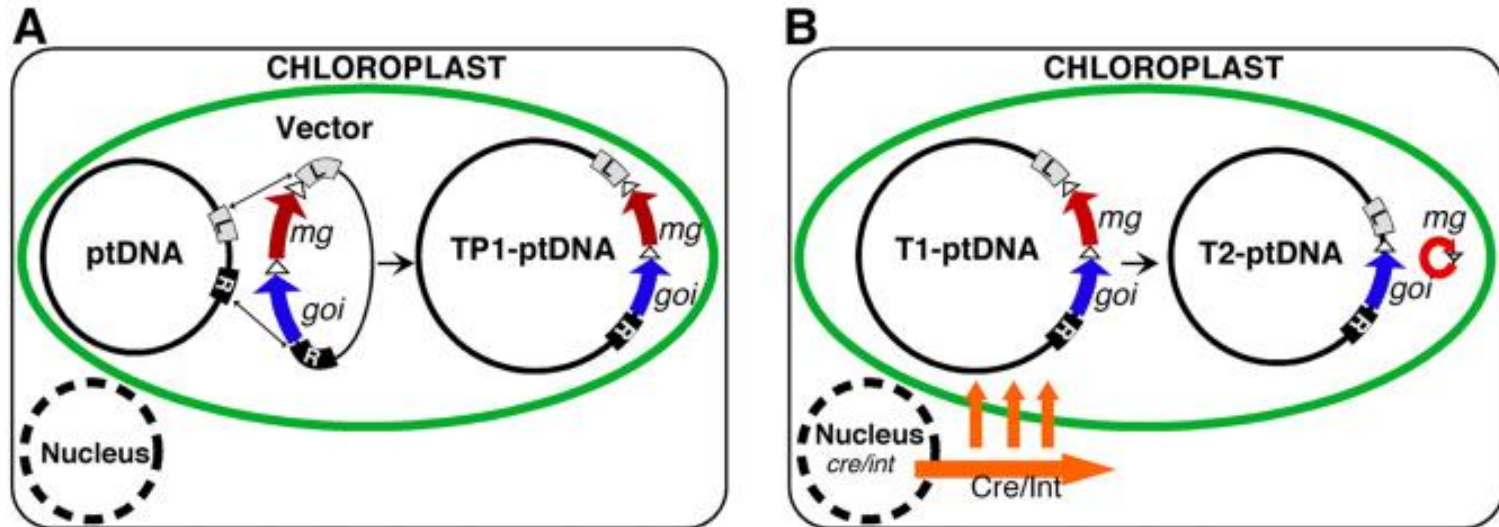
# Gain -of- function-mediated excision



## Direct-Repeat-Mediated Excision (use of recombinase)



Excision of marker genes by site-specific recombinase enzymes.

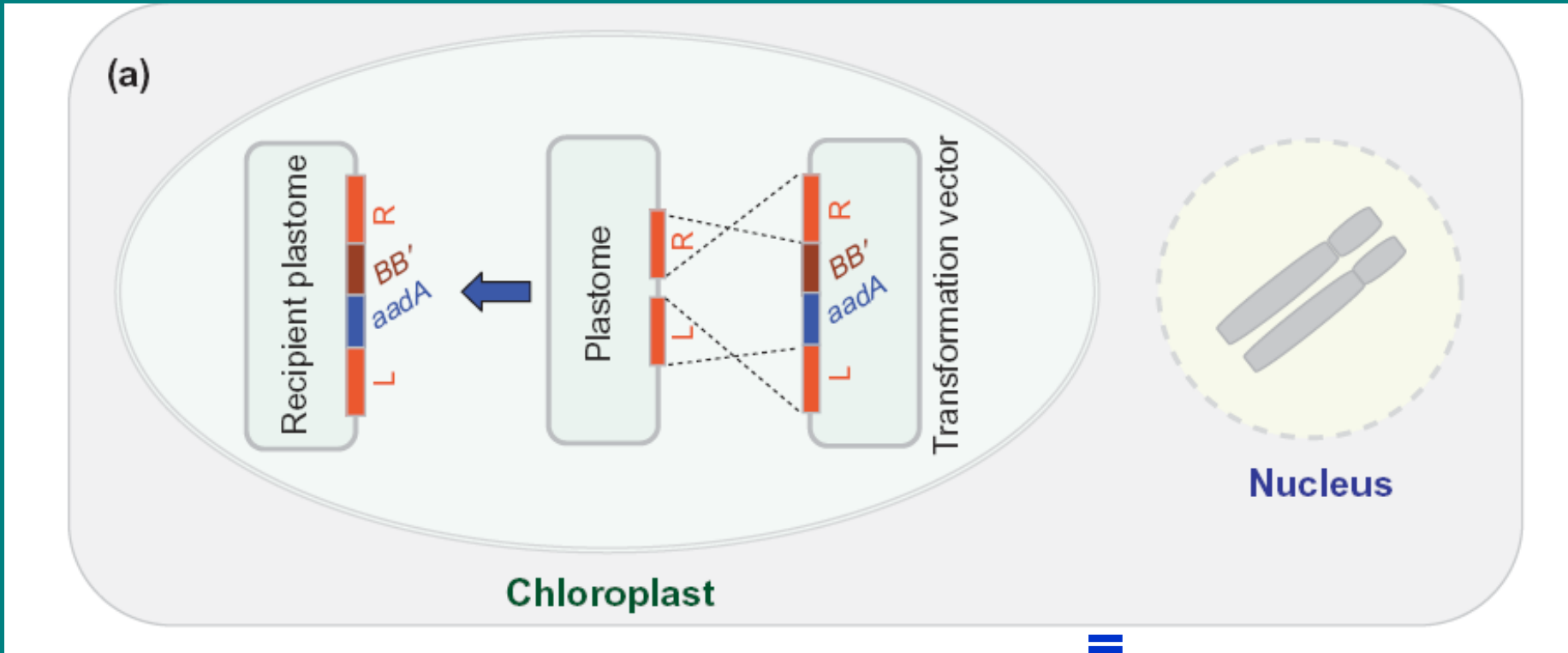


Pal Maliga, and Ralph Bock *Plant Physiol.* 2011;155:1501-1510

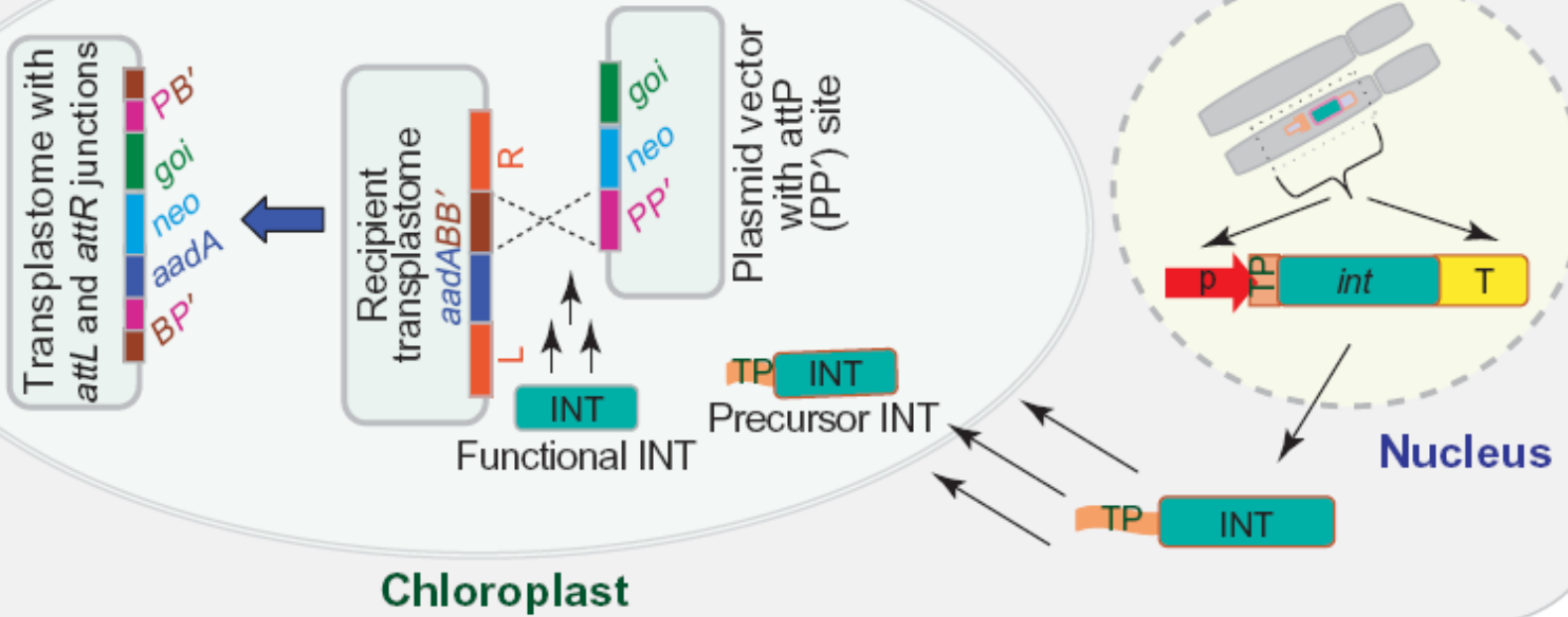
©2011 by American Society of Plant Biologists



Μετασχηματισμός πλαστιδίων με χρήση  
ρεκομπινάσης ( *phiC31 integrase* )

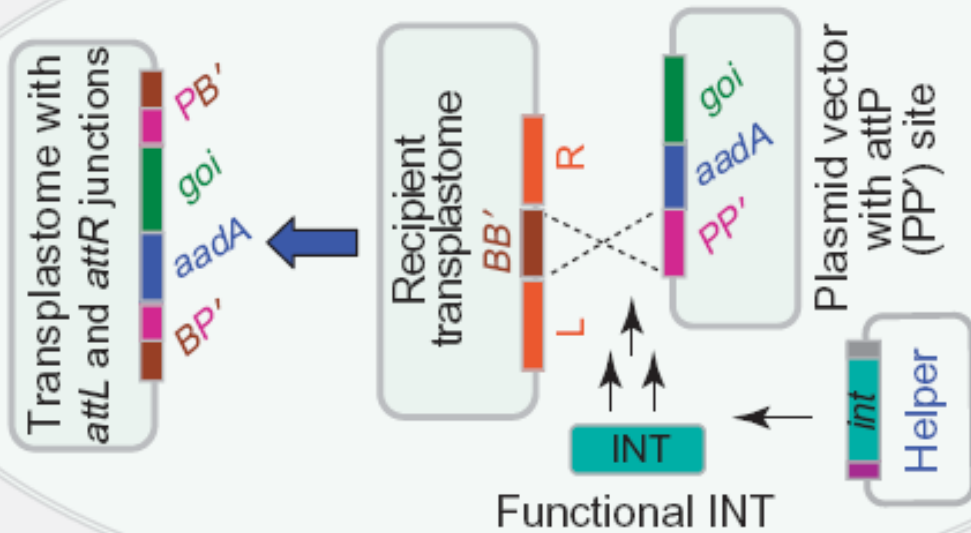


(b)





(c)



Nucleus

Chloroplast

# A protocol for expression of foreign genes in chloroplasts

Dheeraj Verma, Nalapalli P Samson, Vijay Koya & Henry Daniell

Department of Molecular Biology and Microbiology, College of Medicine, University of Central Florida, Biomolecular Science, Building #20, Room 336, Orlando, Florida 32816-2364, USA. Correspondence should be addressed to H.D. (daniell@mail.ucf.edu).

Published online 3 April 2008; doi:10.1038/nprot.2007.522

Plant Biotechnology  
Journal



Plant Biotechnology Journal (2015) 13, pp. 435–446

doi: 10.1111/tpbi.12355

## Engineered chloroplast dsRNA silences *cytochrome p450 monooxygenase*, *V-ATPase* and *chitin synthase* genes in the insect gut and disrupts *Helicoverpa armigera* larval development and pupation

Shuangxia Jin<sup>1,2</sup>, Nameirakpam D. Singh<sup>1,1</sup>, Lebin Li<sup>2</sup>, Xianlong Zhang<sup>2</sup> and Henry Daniell<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Departments of Biochemistry and Pathology, School of Dental Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

<sup>2</sup>National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China

## Multiple gene expression

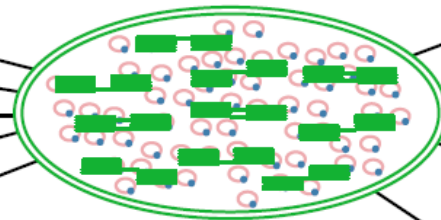
*Bt* operon

PHB operon

Mer operon

Vitamin A genes

Plantibodies,  
monoclonals



Transgenic  
chloroplast

## Single gene expression

Plant traits: insect, pathogen  
(bacterial and fungal) and  
herbicide-resistance,  
drought tolerance



Biopharmaceuticals



Edible vaccines