Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Tereza Ploužková

Možnosti přípravy lidských glykoproteinů v semenech luštěnin

Possibilities of synthesis of human glycoproteins in legumes seeds

Bakalářská práce

Vedoucí práce**: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.**

Školitel: **Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D**.

bakalářský studijní program Biochemie

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením **doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc.** a školitele **Mgr. Tomáše Moravce, Ph.D**. a že jsem všechny literární prameny a informační zdroje, které jsem v práci použila, řádně citovala.

V Praze dne……

Podpis……

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli **Mgr. Tomáši Moravcovi, Ph.D**. za trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval hlavně při experimentální práci, za cenné připomínky a rady, které mi poskytoval po celou dobu naší spolupráce. Dále bych chtěla poděkovat **doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc.** za ochotu, odborný dohled a cenné rady při sepisování bakalářské práce. V neposlední řadě také děkuji Glennu van Haesendonckovi za přípravu plazmid α2:P19.

Mé poděkování patří také celé Laboratoři virologie Ústavu experimentální botaniky Akademie věd ČR za příležitost podílet se na výzkumu, odbornou pomoc a podporu při experimentálním zpracování.

Abstrakt

Exprese rekombinantních proteinů v semenech je výhodná zejména kvůli vysoké koncentraci zásobních proteinů v malém objemu. Rekombinantní proteiny se v semenech akumulují ve vysokých koncentracích, zůstávají stabilní řadu let a díky nízkému obsahu alkaloidů a dalších látek nejsou semena náročná na další zpracování. Mezi další výhody řadíme minimální riziko kontaminace.

Bakalářská práce se zabývá testováním transientní exprese genových konstruktů přímo v dozrávajících semenech sóji. V rámci této práce byly připraveny genové konstrukty pro testování transientní exprese genu *uidA*. Také byl studován vliv aditiv acetosyringonu a dithiothreitolu a jejich kombinací na transientní expresi a aktivitu genu *uidA*. Dále byla studována optimální délka a prostředí sonikace. Na závěr byla také porovnána účinnost transientní exprese metodou *in vitro* a *in vivo*.

Bylo potvrzeno, že acetosyringon má pozitivní vliv pouze na semena, která nebyla předem sonikována. S prodlužující se sonikací klesá relativní aktivita genu *uidA*. Dále byl zjištěn pozitivní vliv dithiothreitolu u nesonikovaných semen. Vyšší hodnoty sledované relativní aktivity genu *uidA* byly také zaznamenány po přidání obou aditiv do infiltračního pufru. Jako optimální délka sonikace byla zjištěna 30 s sonikace v případě metody *in vitro* a 60 s u *in vivo* transformace semen sóji. Bylo pozorováno, že sonikace v buněčné suspenzi *Agrobacterium tumefaciens* zejména s prodlužující se délkou sonikace má negativní vliv na transientní expresi genu *uidA*. Sonikace ve vodě s následným přídavkem buněčné suspenze injekční stříkačkou poskytuje vyšší hodnoty relativní aktivity genu *uidA*. Experimentálně bylo prokázáno, že *in vivo* transformace semen sóji poskytuje 4-krát více pozitivních semen a vyšší hodnoty relativní aktivity v porovnání s metodou v *in vitro* podmínkách.

Klíčová slova: transientní exprese; *Glycine max*; biologie semene; *Agrobacterium tumefaciens*; gen *uidA*

Abstract

The expression of recombinant proteins in seeds is especially advantageous due to the high concentration of storage proteins in a small volume. Recombinant proteins accumulate in seeds at high levels, remain stable for many years, and because of the low content of alkaloids and other substances in seed environment they can be easily extracted. There is also a minimal risk of contamination.

This bachelor thesis deals with the testing of transient expression of gene constructs directly in maturing soybean seeds. In this work, we have have prepared gene constructs for strong transient expression of the *uidA* gene in plant tissues. The impact of the acetosyringone and dithiothreitol additives and the impact of their combinations on the transient expression and activity of the *uidA* gene have been studied as well. Furthermore, the optimal length and environment of sonication have been studied. Finally, the effectiveness of transient expression by *in vitro* and *in vivo* has also been compared.

It has been confirmed that acetosyringone has a positive effect only on seeds that had not been previously sonicated. With prolonged sonication, the relative activity of the *uidA* gene decreases. Furthermore, the positive effect of dithiothreitol on seeds that had not been sonicated has been found. Higher values of the observed relative activity of the *uidA* gene have also been noted after adding both additives to the infiltration buffer. The optimum length of sonication was 30s for *in vitro* method and 60 s *in vivo* transformation of soybean seeds. It has been observed that sonication in the *Agrobacterium tumefaciens* cell suspension, especially with prolonged sonication lengths, has a negative effect on transient expression of the *uidA* gene. The sonication in water followed by addition of the cell suspension by syringe provides higher values of relative activity of the *uidA* gene. *In vivo* soybean transformation has been shown to provide 4 times more positive seeds and higher relative activity in comparison with the *in vitro* method.

(In Czech)

Keywords: transient expression; *Glycine max*; seed biology; *Agrobacterium tumefaciens*; *uidA* gen

Obsah

Seznam použitých zkratek 8
1 Úvod a přehled literatury 9
1.1 Rostliny jako vhodná platforma pro expresi rekombinantních proteinů 9
1.2 Semena jako vhodná platforma pro expresi rekombinantních proteinů 10
1.2.1 Exprese rekombinantních proteinů v semenech 11
1.2.2 Exprese rekombinantních proteinů v semenech *G. max* 12
1.3 Metody transformace rostlin 13
1.3.1 Transformace a infiltrace, *Agrobacterium tumefaciens* 13
1.3.2 Transietní transformace 14
1.3.3 Reportérové geny 15
1.4 Glykosylace proteinů 17
1.5 Monoklonální protilátky 18
2 Cíl práce 18
3 Materiál a metody 20
3.1 Materiál 20
3.1.1 Použité chemikálie a rozpouštědla 20
3.1.2 Použité přístroje 21
3.2 Metody 24
3.2.1 Elektroforéza fragmentů DNA v agarózovém gelu 24
3.2.2. Restrikce plazmidové DNA 24
3.2.3. Izolace plazmidové DNA 24
3.2.4 Restrikčně -ligační reakce 25
3.2.5. Transformace *E.coli* 26
3.2.6 Transformace *A. tumefaciens* 27
3.2.7 Transientní transformace listů *N. benthamiana* a *G. max* 27
3.2.8 Transformace semen *G. max* metodou *in vitro* 28
3.2.9 Transformace semen *G. max* metodou *in vivo* 29
3.2.10 Analýza transientní exprese genu *uidA* 29
3.2.11 Histochemické barvení β-glukoronidásy (*uidA*) 30

4 Výsledky 31
4.1 Příprava reportérových konstruktů pro transientní expresi 31
4.2 Transientní transformace listů *G. max* a *N. benthamiana* 34
4.3 Transientní transformace semen *G. max* metodou *in vitro* 36
4.4 Transientní transformace semen *G. max* metodou *in vivo* 39
5 Diskuse 48
6 Závěr 51
7 Seznam literatury 53

Seznam použitých zkratek

AS	acetosyringon
A. tumefaciens	*Agrobacterium tumefaciens*
β-glukoronidáza	*uidA*/GUS
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
dsRed	červený fluorescenční protein, red fluorescent protein
DTT	dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EHA	Elizabeth Hood *Agrobacterium*
GFP	zelený fluorescenční protein, green fluorescent protein
G.max	*Glycine max* L., sója luštinatá
IgE	imunoglobulin E
LB	Luria Bertani médium
Luc	luciferáza
MES	2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
MS soli	Murashige a Skoog soli
N. benthamiana	*Nicotiana benthamiana* L., tabák
Neu5Ac	N- acetylneuraminová kyselina
Neu5Gc	N- glykolylneuraminová kyselina
OD	optická densita
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
TBSV	Tomato bushy stunt tombusvirus
UEB	Ústav experimentální botaniky AV ČR
W 82	Williams 82
X-gluc	5-brom-4-chlor-3-indolyl- β-D-glukuronid
4-MUG	4-methyl-umbelliferyl-β-D-glukuronid
2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina

1 Úvod a přehled literatury

1.1 Rostliny jako vhodná platforma pro expresi rekombinantních proteinů

S bouřlivým rozvojem moderní biologie a medicíny vzrůstá potřeba produkčních kapacit pro výrobu stále většího množství různých rekombinantních proteinů používaných pro prevenci nemocí (vakcíny), terapii nebo diagnostiku[1,2]. Zejména v rozvojových zemích jsou potřebné cenově dostupné vakcíny, náklady na výrobu, údržbu a dodávku tradičních očkovacích látek jsou často vysoké[1]. V současnosti se většina terapeutických rekombinantních proteinů exprimuje v bakteriálních buňkách, kvasinkách, hmyzích nebo savčích buňkách[2]. Jednodušší proteiny, například inzulín lze ekonomicky výhodně produkovat v jednodušších buňkách, například v bakteriích[3]. Složitější multimerní proteiny jako jsou protilátky je však nutno produkovat v eukaryotických systémech[4]. Proteiny, které procházejí komplexními post-translačními úpravami lze kvalitně produkovat pouze v savčích buňkách. Ty jsou však velmi citlivé na drobné změny podmínek a náročné na kvalitní a komplexní živná média[5]. Nezanedbatelným negativem je i možnost kontaminace lidskými patogenními organismy, viry a podobně[6].

Kromě zlepšování stávajících platforem se hledají i alternativní metody, přičemž jednou z nejslibnějších alternativ pro přípravu rekombinantních terapeutických proteinů včetně enzymů, protilátek či vakcín jsou transgenní rostliny[7,8]. Všeobecně se očekává, že rekombinantní proteiny produkované v rostlinách budou výrazně levnější než proteiny ze savčích produkčních systémů, avšak kromě nízké ceny poskytují rostliny mnoho dalších velmi významných výhod[4].

Exprese rekombinantních proteinů v rostlinných buňkách představuje několik zajímavých výhod[9]. Rostliny jsou schopny vytvářet i ty nejsložitější multimerní nebo repetitivní proteiny za zlomek ceny dosahované současnými systémy[2]. Ke svému růstu potřebují pouze základní minerální živiny, světlo a vodu. Produkci lze také jednoduše škálovat dle potřeby[8]. Významně se snižuje pravděpodobnost kontaminace lidským patogenem[10]. V některých aplikacích by bylo možné použít orální podání terapeutického proteinu nebo vakcíny přímo v jedlé části rostliny tzv. „jedlé vakcíny“, čímž by se omezila nutnost jejich nákladné a složité purifikace[4]. Doposud byla hlavní nevýhodou rostlinných

expresních systému odlišná glykosylace oproti lidským glykoproteinům, v poslední době se však ukazuje, že rostliny jsou velmi vhodné právě pro modifikování glykosylační dráhy a tvorbu specifických glykoforem lidských glykoproteinů[10].

V roce 1986 byl exprimován první farmaceuticky významný protein, lidský růstový hormon byl připraven v tabáku[11]. O tři roky později byla opět v tabáku vyrobena první protilátka. Tím bylo potvrzeno, že rostliny mohou tvořit komplexní funkční proteiny složené z několika podjednotek[12]. V roce 2012 byla pro léčbu Gaucherovy choroby certifikována taligluceráza α získávaná ze suspenzní kultury buněk mrkve, čímž se stala prvním rekombinantním proteinem z rostlin s certifikací pro humánní medicínu. Tento protein je dostupný pod komerčním názvem Elelyso a vznikl ve spolupráci společností Protalix Biotherapeutics a Pfizer[13].

1.2 Semena jako vhodná platforma pro expresi rekombinantních proteinů

Pro expresi farmaceutických proteinů bylo vyvinuto mnoho různých rostlinných produkčních systémů. Většina prvních experimentů se zaměřila na expresi v listech pro relativní snadnost trvalé i transientní transformace. Jako platforma pro produkci rekombinantních proteinů bylo kromě listů také popsáno využití ovoce, hlíz, rostlinných pletiv, suspenzí buněčných kultur, hydroponických systémů, kořenových kultur, mechů, řas nebo vodních rostlin[14,8]. Exprese rekombinantních proteinů v listech může ve spojení s virovými vektory poskytovat vysoké výtěžky ve velmi krátkém čase několika dnů až týdnů, ale exprimované proteiny jsou v listech často nestabilní a musí být ihned po sklizni zpracovány. Pro získání dostatečného množství rekombinantního proteinu je často nutné rychle zpracovat řádově tuny biomasy, protože listy jsou na proteiny celkem chudé, zato obsahují vysoký podíl vody a často i nežádoucích sekundárních metabolitů[15].

Naproti tomu proteiny akumulované v semenech zůstávají stabilní až po dobu několika let[10,16]. Semena jsou evolučně uzpůsobena pro akumulaci zásobních proteinů v relativně malém objemu a také ve stabilním prostředí, které je ochraňuje před degradací[17]. Bylo zjištěno, že protilátky i další rekombinantní proteiny se v semenech akumulují ve vysokých koncentracích a vydrží funkční po dobu několika let[18]. Efektivní

akumulace je způsobena tím, že semeno během zrání ztrácí vodu a zejména v endospermu obsahuje nedostatek proteáz. Dále se v dozrávajícím semeni vyskytuje směs molekulárních chaperonů a disulfidových izomeráz, která zajišťuje správné sbalení proteinů[19]. Pro extrakci a následné zpracování je výhodné, že je možné získat rekombinantní protein ve vysoké koncentraci z relativně malého objemu biomasy[17]. Další výhodou semen na rozdíl od listů *N. benthamiana (Nicotiana benthamiana* L.) jsou nízké hladiny fenolů, alkaloidů a dalších látek, které mohou komplikovat následné zpracování[20]. Rekombinantní proteiny získané ze semen nenarušují vegetační růst rostlin a minimalizují nechtěný kontakt s mikroby nebo býložravci[21].

1.2.1 Exprese rekombinantních proteinů v semenech

Dále se jako výrobní platformy založené na semenech využívají rýže, ječmen, a kukuřice. Nejvyššího ročního výnosu zrna (přes 13 $t \cdot ha^{-1}$) dosahuje kukuřice, která má nejkratší generační dobu a obsah proteinů v semeni se pohybuje kolem 10%. Kukuřici lze snadno transformovat v *in vitro* podmínkách a využívá se k expresi prvních dvou komerčních rekombinantních proteinů, β-glukoronidásy a avidinu[22,23]. Další výzkumy se zabývají výrobou enzymů nebo řady farmaceutických proteinů v kukuřici. Bylo prokázáno, že vakcína proti viru přenosné gastroenteritidy vyrobená v kukuřici, vytváří ochrannou imunitu u selat[24].

Rýže má mnoho společných vlastností s kukuřicí, například vysoký výnos zrn, pohybuje se kolem 3-5 $t \cdot ha^{-1}$. Roční výnos sójových semen je na rozdíl od rýže poloviční, ale obsah proteinů v sóje je podstatně vyšší[17].

Další potenciální platformou je ječmen, i když dosahuje nižších výnosů než kukuřice a rýže. Diagnostické protilátky připravené v zrnech ječmene dosahovaly vysoké koncentrace až 150 $mg \cdot g^{-1}$ hmotnosti semene[25]. V současné době se výzkumem rekombinantních lidských proteinů v ječmeni zabývá Islandská biotechnologická společnost ORF Genetics[17]. Tyto proteiny z ječmene nejsou určeny přímo pro terapeutické použití, ale jako suplementy pro živná media a pro účely *in vitro* diagnostiky[26].

1.2.2 Exprese rekombinantních proteinů v semenech *G. max*

G. max (Glycine max L.) představuje vhodný cíl pro produkci rekombinantních proteinů zejména kvůli velmi vysokému obsahu proteinů v semenech[27]. Zralá semena obvykle obsahují přes 40 % proteinů a 20 % oleje[28]. V semenech jsou 2 hlavní zásobní proteiny, β-konglycinin a glycinin, které představují 70 až 80 % všech proteinů. Proto jsou zodpovědné za řadu fyzikálně-chemických i nutričních vlastností sóji[29,30]. β-konglycinin je trimerní glykoprotein skládající se ze tří typů podjednotek, α, α´ a β. Za alergické reakce je zodpovědná pouze α-podjednotka[31]. Glycinin se skládá z pěti podjednotek, G1, G2, G3, G4 a G5, ve kterých G1 a G2 jsou alergeny[32]. Bylo prokázáno, že umlčení exprese hlavních zásobních proteinů sóji nevede ke snížení celkového podílu proteinů na hmotnosti semene ani ke snížení klíčivosti. Takto upravená semena mají zvýšenou expresi ostatních proteinů. To lze výhodně využít právě pro expresi rekombinantních proteinů. Exprese reportérového genu GFP vzrostla po nakřížení do linie bez glycininu a β-konglycininu z přibližně 2% na 8% z celkového obsahu proteinů v semeni[33]. Při podobných výtěžcích je ekonomicky rentabilní pěstování v uzavřených prostorech. Další výhodnou vlastností sóji je, že je kleistogamická – k opylení dochází ještě před otevřením květu, velmi se tak snižuje riziko případného křížového opylení[34]. Sója je hospodářsky nejvýznamnější luštěninou a díky tomu je rovněž jednou z nejběžnějších transgenních plodin. *G. max* se pěstuje se na 34 miliónech hektarů půdy v USA, v Brazílii, Argentině a dalších zemích Jižní Ameriky. Samotná hodnota této plodiny se odhaduje na 11 biliónů dolarů[27].

Prvním pokusem o využití sójových semen pro produkci protilátky byla humanizovaná protilátka proti herpes viru v roce 1998[35]. V sójových semenech se také podařilo produkovat kasein, výtěžky však byly v obou případech nízké a nevhodné pro přímě použití bez purifikace[36]. První rekombinantní orální vakcínou exprimovanou v sójových bobech v dostatečném množství byla netoxická podjednotka labilního enterotoxinu *E. coli*, která se v semenech akumulovala do přibližně 2-3 % z celkového obsahu proteinů[18]. V dalších letech bylo v semenech sóji produkováno mnoho jiných antigenů a farmaceutických proteinů včetně lidských růstových hormonů, antivirových peptidů a vakcín proti bakteriálním antigenům[27].

Použití semen *G. max* k expresi rekombinantních proteinů kromě výhod přináší i některé nevýhody. Mezi ty můžeme zařadit alergenní potenciál sójových bobů. Přítomnost alergenů je pro produkci rekombinantních proteinů problematická, protože potenciálně výrazně zvyšuje náklady na purifikaci[37]. Alergie na potraviny je silná nežádoucí reakce imunitního systému způsobená antigeny ve výživě. Potravinové alergeny jsou komplexní směsi potenciálně imunoreaktivních proteinů[38]. Alergenní epitopy označují malé oblasti alergenních proteinů, které vyvolávají v organismu odpověď zprostředkovanou imunoglobulinem E (IgE)[39]. Přítomný alergen vyvolá nejprve počáteční IgE protilátkovou odpověď následovanou sekundární IgE odpovědí, která signalizuje alergickou reakci[40]. Navázání alergenu s molekulou IgE způsobuje uvolnění histaminu[38]. Potravinovou alergií trpí 3% dospělé populace a až 6-8% dětí, tedy několik set miliónů lidí na celém světě[41]. Alergické reakce vyvolané sójou mohou být kožní, gastrointestinální nebo respirační obtíže, které mohou vyústit až k anafylaktickému šoku[42]. Především u malých dětí s atopickou dermatitidou byla popsána potravinová alergie na *G. max*[43]. Bylo popsáno a podrobněji charakterizováno nejméně 16 sójových proteinů vázajících IgE. Byly identifikovány i dva nejdůležitější alergeny *G. max*. První je Gly m 5 (β-konglycinin) a druhý byl nazván Gly m 6 (glycinin). β-konglycinin a glycinin patří mezi hlavní zásobní proteiny v semenech a tvoří asi 40% z celkového obsahu proteinů[43]. V současné době bylo zjištěno, že alergeny v semenech *G. max* jsou zodpovědné za přibližně 90% alergenních odpovědí. Tento zdravotní problém ohrožuje jak veřejnost, tak potravinářský průmysl, protože sójový protein se přidává do mnoha potravin[44].

1.3 Metody transformace rostlin

1.3.1 Transformace a infiltrace, *Agrobacterium tumefaciens*

Pro transformaci rostlin cizí DNA se nejčastěji používá buď přímá biolistická metoda transformace[45] nebo se využívá schopnosti patogenní bakterie *Agrobacterium tumefaciens (A. tumefaciens)*, která je schopna přenést část tzv. Ti-plazmidu do jádra rostlinné buňky[46,47]. V počátcích byla transformace pomocí *A. tumefaciens* omezena pouze na několik snadno transformovatelných druhů a kultivarů rostlin, zejména z rodu *Solanaceae*[48]. Dnes již existují protokoly pro použití *A. tumefaciens* pro transformaci mnoha druhů dvouděložných i jednoděložných rostlin jakož i mnoha druhů hub a

kvasinek[49,50,51]. Přesto i dnes může být transformace některých druhů rostlin technicky náročná, zdlouhavá, nepříliš účinná. Tyto problémy se bohužel týkají i většiny luštěnin včetně *G. max.* Vzhledem k hospodářskému významu sóji existuje mnoho protokolů využívajících nodální kotyledony (cotyledonary nodes) ze zralých semen[27]. Transformace zprostředkovaná *A. tumefaciens* u *G. max* byla provedena za použití nodálních kotyledonů[27] i nezralých kotyledonů, ale účinky transformace byly velmi nízké a získané rostliny byly často chimérické[52]. Používané protokoly se navíc postupně vylepšují.

Jedním ze způsobů zvýšení účinnosti transformace mnoha rostlinných druhů je použití ultrazvuku[53]. Během transformace se cílové pletivo ponoří do suspenze *A. tumefaciens* a podrobí se krátkému ošetření v ultrazvukové lázni. Sonikace vytvoří mikroskopické trhlinky jak na povrchu, tak i v hloubce rostlinného pletiva. Tato drobná poranění umožní *A. tumefaciens* proniknout do pletiva a infikovat rostlinné buňky[54]. Zlepšení přenosu DNA použitím sonikace bylo prokázáno na tabáku[55] a dalších dvouděložných rostlinách včetně semen[53] a listů *G. max*[56]. Kritickou podmínkou většiny protokolů jsou intenzita a trvání sonikace, protože je obtížné najít optimální poměr mezi poškozením dostatečným pro infekci *A. tumefaciens* a takovým, které příliš nezničí rostlinu[57].

1.3.2 Transietní transformace

Vzhledem k tomu, že protokoly vedoucí ke vzniku trvale transformovaných transgenních rostlin jsou většinou časově, prostorově a v neposlední řadě i finančně náročné, jsou vyhledávány způsoby pro rychlé ověření funkčnosti konstruktů případně pro dosažení rychlé a přitom silné exprese, těmto postupům se říká transientní exprese [58,59,60].

Účinným a zřejmě nejběžnějším způsobem dosažení transientní exprese je infiltrace rostlinného pletiva pomocí *A. tumefaciens*, tzv. „agroinfiltrace“[56]. Na rozdíl od trvalé transformace, během které dochází k integraci T-DNA do genomu rostliny, během transientní exprese pomocí *A. tumefaciens* sice dojde k přenosu T-DNA do jádra buňky, ale tato T-DNA zřejmě v jádře po dobu několika dní přetrvává ve formě cirkulárního intermediátu[61]. Nejjednodušší forma agroinfiltrace spočívá v přenosu bakteriální suspenze injekční stříkačkou přes průduchy na spodní straně listu do vzduchového prostoru listu[62].

Účinnost pak může být limitována nevhodnou morfologií listů – silnou kutikulou, malými průduchy, hustými trichomy apod[59,63,64]. Agroinfiltrace byla vyvinuta a nejčastěji se používá pro rychlou analýzu funkce genů v listech *N. benthamiana*[65] a nyní se rutinně používá pro mnoho dalších rostlin, včetně prosa prutnatého (*Panicum virgatum* L.), hlávkového salátu (*Lactuca sativa* L.), rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), *Arabidopsis thaliana* L., vinné révy (*Vitis vinifera* L.)[59-60, 66,67]. Při použití v listech *G. max* však byla tato metoda neúspěšná[68]. Transientní exprese genů byla také testována pomocí virové inokulace, bombardování částic a infiltrace rostlinného pletiva *G. max* pomocí *A. tumefaciens*[69,70], tyto metody však jsou technicky náročné a/nebo je nelze využít v dozrávajících, plnících se semenech. Pro úspěšné řešení grantového projektu je potřeba optimalizovat a sladit společnou expresi několika transgenů v dozrávajícím semeni, většina použitých promotorů nemá navíc žádnou nebo jen velmi malou měřitelnou aktivitu v jiných pletivech. V dozrávajících semenech *G.max* byla provedena úspěšná transientní exprese pomocí agroinfiltrace *in vitro* ve spojení se sonikací a vakuovou infiltrací[57].

Účinnost transformace zprostředkované *A. tumefaciens* se může výrazně lišit u různých kmenů *A. tumefaciens*, rostlinných druhů[59] a i mezi různými genotypy[71,72]. Další omezení může být v důsledku nekompatibility mezi kultivarem *G. max* a kmenem *A. tumefaciens*[56].

1.3.3 Reportérové geny

Reporterový gen kóduje enzym nebo protein, které je možné detekovat buď přímo, nebo nepřímo biochemickým testem. Využití účinných reportérových markerových genů usnadňuje detekci transgenních přechodných i stabilních transformantů, umožňuje sledovat aktivitu promotorů a dalších regulačních sekvencí a podobně[73]. Jedním z prvních a zároveň nejvíce používaných reportérových genů u rostlin je β-glukoronidáza (GUS) z *E.coli (Escherichia coli),* kódovaná genem *uidA*[74]. Mezi hlavní výhody tohoto enzymu můžeme zařadit jeho stabilitu, vysokou citlivost a možnost využití ke kvantitativní (fluorometrická nebo spektrofotometrická analýza) i kvalitativní detekci (histochemický test)[73]. Mezi další výhody patří malá nebo žádná detekovatelná aktivita GUS u téměř všech vyšších rostlin[75]. Další nezanedbatelnou výhodou tohoto genu je schopnost zachovat si aktivitu i ve formě fúzního genu s jiným sledovaným genem. GUS z *E. coli* obsahuje konsensuální

glykosylační signální sekvenci. Prochází-li tedy v rostlinné buňce endoplazmatickým retikulem, dojde k jeho glykosylaci. Glykosylovaná forma GUS nemá enzymatickou aktivitu. To limituje možnosti GUS jako fúzního proteinu[75]. Molekulová hmotnost monomeru GUS z *E. coli* je 68 200 g mol^{-1} a předpokládá se, že aktivní je ve formě tetrameru[74]. Substrátem daného enzymu jsou β-glukuronidy, které hydrolyzuje. V rostlinách se nejčastěji používá pro studium funkce rostlinných promotorů[75]. Pro testování aktivity promotorů řídí testovaný promotor transkripci *uidA* a specificky reguluje expresi genu v čase, množství a umístění v buňce nebo v pletivu. Aktivita genu se pak stanoví v transgenních liniích buď biochemicky nebo histochemickým barvením. Pokud je gen *uidA* použit v transientním testu, je vhodné pracovat s reportérovým genem s intronem, aby se tak zamezilo falešně pozitivním výsledkům způsobeným reziduální expresí v agrobakteriích[76].

Jednou z nevýhod genu *uidA* jako reportérového markeru je, že při typickém biochemickém stanovení enzymu GUS je nutné zničit část rostlinného pletiva, které pak není k dispozici pro další měření[73]. Proto může být obtížné testovat vývoj exprese v čase nebo reakci rostliny na konkrétní podnět[77]. Samotný enzym GUS nelze detekovat přímo, k detekci slouží chemická reakce s některým z vhodných substrátů. Mezi nejpoužívanější substráty patří 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β-D-glukuronid (X-Gluc) k histochemické lokalizaci a 4-methyl-umbelliferyl-β-D-glukuronid (4-MUG) umožňující fluorometrickou kvantifikaci[78,79]. Dalším omezením je malé prostorové rozlišení histochemického testu na úrovni shluků několika buněk. Studovat subcelulární lokalizaci fúzních proteinů pomocí *uidA* není možné. Některá z těchto omezení pomáhají řešit reportérové geny na bázi fluorescenčních proteinů. Prvním takovým fluorescenčním reportérovým genem byl zelený fluorescenční protein (GFP), který se podařilo izolovat z *Aequorea victoria*[80]. Dnes se běžně používají fluorescenční proteiny mnoha různých barev a speciálních funkcí jako například proteiny, které mění svoje optické vlastnosti v závislosti na čase nebo na chemickém či fyzikálním podnětu[73].

1.4 Glykosylace proteinů

Jednou z nejběžnějších posttranslačních modifikací proteinů u eukaryot je N-glykosylace, při které je na zbytek asparaginu v konsensuální sekvencí enzymaticky konjugována sacharidová skupina. Správná glykosylace často rozhoduje o řadě funkcí glykoproteinů včetně rozpustnosti, schopnosti vytvářet oligomery, imunogenicitě, stabilitě, funkčnosti a v případě terapeutických proteinů i o jejich terapeutické aktivitě[81]. Oligosacharidy spojené s asparaginem jsou důležité pro skládání proteinů, stabilitu biosyntézy a ovlivňují také výtěžek exprese[82].

Ve většině glykoproteinů jsou sacharidové jednotky připojeny k proteinovému řetězci buď N- nebo O-glykosidickou vazbou. N-glykosidová vazba je vždy připojena na amidu asparaginu, který je součástí sekvence N-X-S /T. Uvedené sekvence jsou často označovány pouze jako potenciální glykosylační místa, protože ne u všech sekvencí dochází ke glykosylaci. Předpokládá se, že pro O-glykosylaci neexistuje žádná specifická sekvence[83].

N-glykosylace začíná v endoplazmatickém retikulu přidáním oligosacharidových prekurzorů $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ na asparaginový zbytek v rámci konvenční sekvence Asn-X-Ser / Thr, kde X může být libovolná aminokyselina s výjimkou prolinu[83]. Tento prekurzor je pak upraven na $Man_8GlcNAc_2$ a protein je transportován do Golgiho aparátu k dalšímu druhově specifickému zpracování. Na rozdíl od biosyntézy nukleových kyselin a proteinů glykosylace není založena na templátu. N-glykosylace tedy způsobuje, že vznikají heterogenní směsi sacharidových struktur na homogenní proteinové struktuře. Těhotenství, nemoc, věk organismu a další fyziologické podmínky silně ovlivňují glykosylaci[81].

Pro expresi terapeutických lidských glykoproteinů se využívají savčí buněčné linie. Nejčastěji se jedná o buňky z vaječníků čínských křečků a myšího myelomu. Jejich buňky produkují velmi podobné N- glykoproteiny jako buňky v lidském těle, ale přesto mezi nimi existují zásadní rozdíly. Hlavním rozdílem je, že lidé již nejsou schopní syntetizovat N-glykolylneuraminovou kyselinu (Neu5Gc), která se vyskytuje na většině savčích glykoproteinech[84].

U zdravých lidí se setkáváme se značnou mírou cirkulace protilátky proti epitopu Neu5Gc[84]. Pokud jsou lidské buňky pěstované na médiích, které obsahují glykany ze zvířecích buněk, mohou inkorporovat Neu5Gc do lidských glykoproteinů[85]. U ptáků a lidí jsou vždy Neu5Ac (N-acetylneuraminová kyselina) terminální kyselé glykany na proteinech. V případě myší, krav, koní nebo ovcí se jedná o Neu5Gc. Se směsí obou glykanů se setkáváme u ostatních savců, například u koček, morčat nebo psů[84].

1.5 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky zastávají jednu z nejslibnějších tříd léčiv za posledních deset let. V současné době jich je celkem 30 schváleno pro klinické použití a ve fázi klinického testování je 240 monoklonálních protilátek[86].

Uměle připravené monoklonální protilátky s danou specifitou nabízí široké terapeutické i diagnostické využití. V dnešní době se terapeutické monoklonální protilátky používají běžně, například proti nádorovým antigenům. Celá řada dalších je podrobena vědeckému výzkumu a klinickému testování[87].

V letech 2014-2015 byla provedena experimentální léčba epidemie viru Eboly v Západní Africe koktejlem tří monoklonálních protilátek ZMapp připravených v glyko-modifikovaných rostlinách tabáku *N. benthamiana*[88]. V preklinické studii, která proběhla na samém konci epidemie, vykazovala léčba rostlinnými protilátkami poměrně slibné výsledky. Díky nízkému počtu 71 pacientů ale neměl experiment dostatečnou statistickou sílu[89].

2 Cíl práce

Bakalářská práce byla součástí grantového projektu Laboratoře virologie v Ústavu experimentální botaniky Akademie věd s názvem „Studium vlivu humanizované glykosylace na akumulaci proteinů v semenech rostlin“. Cílem bakalářské práce bylo transientně transformovat semena *G. max*, otestovat vliv podmínek a jejich kombinaci na expresi proteinu GUS a porovnat výsledky získané *in vitro* a *in vivo* metodou.

Hlavní úkoly práce byly:

1) Připravit genový konstrukt pro silnou transientní expresi reportérových genů *uidA* a GFP v semenech *G. max*.
2) Ověřit a optimalizovat protokol pro transientní expresi v dozrávajících semenech *G. max*

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie a rozpouštědla

Rozpouštědla a chemikálie použitá v bakalářské práci pocházejí z následujících zdrojů:

Duchefa Biochemie, Holandsko: X-gal, 4-MUG, 2,4-D, cefotaxim

Fluka, Švýcarsko: 2-merkaptoethanol, DMF, DMSO, PMSF

Invitrogen, USA: SYBR safe DNA gel stain

Lachema, Česká republika: Chelaton III, Na_2CO_3

Lach-Ner, Česká republika: $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$, ethanol, methanol, glukosa, $MgCl_2$, TBE pufr

Lonza, USA: agaróza

Promega Corporation, USA: Dithiothreitol, Green go tag.

Sigma Chemical CO, USA: $C_6H_{13}NO_4S$ MES, Triton X-100, Tween 20, acetosyringon, Rifampicin

Thermo Scientific, USA: T4 DNA ligáza, T4 ligázový pufr, BsaI, BsmBI, EcoRI, HindIII, Pst I, GeneJet purifikační kit pro izolaci plazmidové DNA

3.1.2 Použité přístroje

Analytické váhy:

2004 MP	Sartorius, Německo

Automatické pipety:

Finnipipette	Thermo Scientific, USA
Multikanálové	Thermo Scientific, USA

Centrifugy:

Multifuge 3 S-R Heraeus, výkyvný rotor	Kendro, Německo
Sigma 1-14, úhlový výkyvný rotor	Sigma Laborzentrifugen, Německo

Destičky:

24 jamková kultivační polystyrenová	BIOFIL, Indie
96 jamková mikrotitrační	Thermo Scientific, Dánsko

Elektroforetická aparatura:

Biorad Wide mini-sub cell GT	BIO-RAD, USA
zdroj PS 305 Electrophoresis Power Supply	Apelex, Francie
Gel Doc systém	BIO-RAD, USA

Flow box:

Flow box s laminárním prouděním	Heraeus, Německo

Hlubokomrazicí box:

HFV 486 TOP	Heraeus, Německo

Homogenizátor:

FastPrep-24, Sample preparation system	MP Biomedicals, USA

Injekční stříkačky:

Omnifix-F 1 ml	B Braun, Německo

Inkubátory:

NB-205	KRD, Česká republika
MIR-253	Sanyo, Japonsko
Heraeus B6	Kendro, Německo
Heraeus B12	Kendro, Německo

Mikrozkumavky:

typu Eppendorf

pH-metr:

Orion star A111	Thermo Scientific, USA

Předvážky:

EW 220-3NM	Kern, Německo

Přístroj na měření OD:

DEN-1 Densitometer	Biosan, EU

Sonikátor:

Ultrasonic Cleaner CE-6200A model, 42 kHz, 70W	JeKen, Čína

Spektrofotometr:

Infinite F200	Tecan Group, Švýcarsko
Nanodrop 1000	Thermo Scientific, USA

Tepelný blok:

Thermoblock TB1	Biometra Německo

Thermocycler:

T100	BIO-RAD, USA

Třepačky:

Gyro-rocker SSL3	Stuart, USA

Vortex:

Top-mix 94323	Heidolph, Německo

Vakuový exsikátor:	Kartell, Itálie

3.2 Metody

3.2.1 Elektroforéza fragmentů DNA v agarózovém gelu

Na přípravu gelu bylo rozmícháno příslušné množství agarózy ve 200 ml 1x TBE pufru na přípravu 0,8%-1,5% roztoku podle velikosti fragmentu. Do roztoku byla přidána barva SYBR safe a následně byl roztok zahříván v mikrovlnné troubě po dobu asi 2 minut za občasného míchání, dokud se veškerá agaróza zcela nerozpustila. Odpařený objem byl doplněn destilovanou vodou po rysku. Mírně ochlazený roztok byl umístěn do formy s hřebenem, kde se gel nechal ztuhnout. Takto připravený gel se umístil do elektroforetického tanku (Biorad Wide mini-sub cell GT) a do vzniklých jamek bylo pipetováno 10 µl vzorků DNA obarvených 2 µl 5x Green Go Taq barvou. Na gel bylo pipetováno také 5 µl 1 kb marker (Fermentas). Na zdroji k elektroforetickému zařízení (Apelex PS 305, Electrophoresis Power Supply) bylo nastaveno napětí 100 V a DNA putovala gelem směrem k anodě. Po asi 45 minutách byla elektroforéza přerušena a gel byl vyfocen (Biorad, Gel Doc systém).

3.2.2. Restrikce plazmidové DNA

Na restrikční štěpení bylo použito vždy 4 µl DNA o koncentraci 50 -150 ng/µl, 2 µl 10x pufru, 0,25 µl restrikčního enzymu a doplněno do 20 µl dH_2O. Reakce byly inkubovány ve 37° C po dobu 3 hodin.

3.2.3. Izolace plazmidové DNA

K purifikaci plazmidové DNA byl využit GeneJET Plasmid Miniprep Kit Fermentas dle protokolu výrobce. Kultura *E. coli* byla očkována 24 hodin předem z glycerinové konzervy do LB média s příslušným antibiotikem a poté centrifugována (centrifuga Sigma 1-14, výkyvný rotor, 14x2,0 ml, 6800x g) po dobu 2 minut. Vzniklá buněčná peleta byla resuspendována ve 250 µl resuspendačního roztoku. Do mikrocentrifugační zkumavky byla pipetována buněčná suspenze. Do mikrozkumavky bylo přidáno 250 µl lyzovacího roztoku, jemně promícháno a vznikl viskózní roztok. Po pipetování 350 µl neutralizačního pufru bylo roztokem ihned jemně promícháno, tím vznikla sraženina. Buněčné zbytky byly dále centrifugovány 10 minut (centrifuga Sigma 1-14, výkyvný rotor, 14x1,0 ml 12000x g) aby sedimentovaly buněčné úlomky a

chromosomální DNA. Čirý supernatant byl přepipetován do připravených popsaných kolonek vložných v mikrozkumavce a centrifugován 1 minutu za stejných podmínek. Část, která protekla kolonkou, byla odstraněna. Do kolonky bylo napipetováno 500 µl promývacího roztoku a centrifugováno 45 vteřin, proteklý objem byl odebrán. Promytí bylo provedeno dvakrát. Mikrozkumavky byly centrifugovány další 1 minutu, aby se zcela odstranil použitý promývací roztok. Poté byly kolonky vloženy do nových 1,5 ml mikrozkumavek, do středu kolonky bylo pipetováno 100 µl předem zahřátého elučního pufru, aby se eluovala plasmidová DNA. Mikrozkumavky byly inkubovány v tepelném bloku (TB1 Biometra) na 2 minuty a centrifugovány také 2 minuty. Nakonec byly kolonky odstraněny a byla změřena koncentrace DNA pomocí spektrofotometru (Nanodrop 1000). Tím, že plasmidová DNA byla eluována do většího objemu, její koncentrace se pohybovala okolo 60-80 $ng \cdot \mu l^{-1}$. Uvedená koncentrace je ideální pro následující restrikčně-ligační reakci a také dochází k menším ztrátám během skladování.

3.2.4 Restrikčně -ligační reakce

Do mikrozkumavek byly postupně pipetovány složky reakční směsi v následujícím pořadí (Tabulka 1):

Tabulka 1: Složky reakční směsi použité k restrikčně-ligační reakci

	Objem (µl)	Koncentrace ($ng \cdot \mu l^{-1}$)
Cílový plazmid UPD (α/ω)	1	60-80
pUPD plazmid s fragmentem 1 (např. promotor)	1	60-80
pUPD plazmid s fragmentem 2 (např. CDS)	1	60-80
pUPD plazmid s fragmentem n (např. terminátor)	1	60-80
Enzym BsaI/BsmBI	1	
10x T4 ligázový pufr	1	

T4 DNA ligáza	1	
ddH_2O	do 10	

Celkový objem byl doplněn do 10 µl ddH_2O a mikrozkumavky byly vloženy do thermocycleru (T100 BIORAD), na kterém byly nastaveny následující podmínky (Tabulka 2, strana 26):

Tabulka 2: Podmínky restrikčně-ligační reakce

Doba trvání cyklu (min)	Teplota (° C)	Důvod
10	37	Iniciace štěpení
2 x 45 cyklů opakování:		Restrikčně ligační reakce
2	37	
5	16	
20	37	Konečné štěpení nezreagovaného cílového plazmidu
30	80	Deaktivace enzymů

3.2.5. Transformace *E.coli*

Kompetentní buňky *E. coli* byly uchovávány v hlubokomrazicím boxu (Heraeus HFV 486 TOP) při -80° C. Po vyjmutí z hlubokomrazicího boxu byly rychle přeneseny do připravené nádobky s ledem, kde se nechaly pomalu rozmrazovat nejméně 10 minut. V ledu byla uchovávána také ligační směs. Z ligační směsi byly odebrány 3µl a přidány k 50 µl kompetentních buněk, jemně proklepány v ruce a uloženy v ledu na půl hodiny. Poté byly mikrozkumavky vloženy do 42°C do tepelného bloku na 2 minuty a na 30 vteřin do ledu. Do mikrozkumavky bylo přidáno 250 µl klávovaného LB (Luria Bertani médium) média, vodorovně se umístily do inkubátoru na 37° C a nechaly se třepat 30 minut. Poté byly mikrozkumavky centrifugovány (centrifuga Sigma 1-14, výkyvný rotor, 14x300 µl, 13000x g) po dobu 1 minuty. Na předem nalité Petriho misky s LB médiem a agarem bylo napipetováno 50 µl Xgal umožňující modro-bílou selekci. Z mikrozkumavek bylo odpipetováno 800 µl supernatantu, sediment se zbytkem média byl promíchán a asi 300 µl

buněčné suspenze bylo pipetováno na Petriho misku a rozetřeno pomocí sterilní skleněné hokejky. Petriho misky byly víčkem dolů inkubovány ve 37° C, aby nedošlo k jejich případnému vyschnutí.

3.2.6 Transformace *A. tumefaciens*

Transformace slouží ke vložení rekombinantního vektoru do kompetentních i bakteriálních buněk. Do označených mikrozkumavek uchovávaných na ledu byl přidán 1 µl plasmidu. Kompetentní buňky *A. tumefaciens* byly pomalu rozmražovány v ledu a poté bylo 40 µl přepipetováno do mikrozkumavek obsahujících DNA. V tekutém dusíku byly mikrozkumavky ponechány po dobu 5 minut. Následně byly mikrozkumavky se zmraženým *A. tumefaciens* umístěny do tepelného bloku se 37° C dokud se bakteriální buňky nerozmrazí. Poté byly opět vloženy do tekutého dusíku i do tepelného bloku za stejných podmínek. Nakonec byly mikrozkumavky uloženy v ledu na dalších 5 minut. K bakteriálním buňkám bylo pipetováno 0,5 ml LB média s příslušným antibiotikem, v případě buněk EHA 105 se jednalo o 50 $\mu g \cdot ml^{-1}$ rifampicinu. V inkubátoru při 28° C byly mikrozkumavky třepány asi 40 minut. Buňky byly centrifugovány 1 minutu na maximální rychlost (centrifuga Sigma 1-14, výkyvný rotor, 14x600 µl 1960x g). Přibližně 400 µl supernatantu bylo odpipetováno a sedimentované buňky byly resuspendovány ve zbývajících 100 µl LB média. Na připravené Petriho misky s LB médiem a příslušným antibiotikem byly pipetovány transformované buňky *A. tumefaciens* a rozetřeny sterilní hokejkou po celé plotně.

3.2.7 Transientní transformace listů *N. benthamiana* a *G. max*

Kultura *A. tumefaciens* kmene EHA 105 byla očkována 24 hodin předem z glycerinové konzervy do LB média s příslušným antibiotikem, centrifugováno (centrifuga Multifuge 3 S-R, výkyvný rotor, 14x4,0 ml 1960x g, 19° C) po dobu 10 minut. LB médium bylo odpipetováno a vzniklý pelet byl resuspendován pomocí Vortexu (Top-mix 94323 Heidolph bioblock scientific) v čerstvém infiltračním roztoku (10mM MES, 10 mM MgCl2, 0,1 mM acetosyringon (AS)). Následně byla zjištěna optická densita (Densitometr DEN-1 Biosan). Bakteriální kultura byla naředěna roztokem na hodnotu $OD_{600\ nm}$ =1,00 a inkubována nejméně 2 hodiny za laboratorní teploty kvůli indukci vir genů. Vir geny jsou geny zodpovědné za přenos T-DNA. Rostliny *N. benthamiana* a *G.*

max kultivar Williams 82 (W 82) byly pěstovány v růstové komoře s 16 hodinovou fotoperiodou. K testování transientní exprese byly použity listové disky vykrojené korkovrtem vložené v plastové zkumavce, do které bylo následně pipetováno *A. tumefaciens*. Následně byly zkumavky vloženy do exsikátoru a infiltrovány ve vakuu 3x 5 minut. Poté byly jednotlivé disky přeneseny na Petriho misku se sterilním papírem, zabaleny parafilmem a nechány v inkubátoru ve 28° C pod LED zářivkami. U listových disků po 5 dnech změřena aktivita genu *uidA*.

3.2.8 Transformace semen *G. max* metodou *in vitro*

Kultivar sóji W 82 byl pěstován v růstové komoře při 28°C a 16 hodinové fotoperiodě. Nezralé lusky byly desinfikovány ve 20 % roztoku Sava a 0,04% Tween-20 po dobu asi 15 minut ve flow boxu, následně byly omyty sterilní vodou. Semena z lusků byla asepticky vyjmuta a embryonální osa jim byla odstraněna. Pomocí skalpelu byla semena oloupána, rozpůlena a umístěna na předem připravené Petriho misky s D40 médiem plochou stranou semena dolů. Médium D40 obsahovalo MS soli, vitamíny B5, 6% roztok glukosy a 40 $mg \cdot l^{-1}$ 2,4-D kyseliny, 0,2% Gelrite, pH 7. *A. tumefaciens* bylo třepáno přes noc ve 28° C v LB médiu. Poté byly bakterie centrifugovány po dobu 10 minut (centrifuga Multifuge 3 S-R, výkyvný rotor, 14x4,0 ml 1960xg, 19° C). Bakterie byly promyty ve 4 ml tekutého D40 média a znovu centrifugovány za stejných podmínek, nakonec byla vzniklá peleta resuspendována v D40 médiu pomocí Vortexu. Následně byla zjištěna optická densita OD_{600nm}. Bakteriální kultura byla zředěna D40 na hodnotu OD_{600nm} = 0.1 a byl přidán 100 µM acetosyringon. Do 1,5 ml mikrozkumavky byly vloženy 4 půlky semen a 0,5 ml bakteriální suspense. Mikrozkumavky byly umístěny na plováček do sonikátoru a sonikovány postupně 1, 10, 20, 30, 60 a 90 s. Poté byla semena přenesena z mikrozkumavek na sterilní filtrační papír umístěný v Petriho misce aby se odstranily přebytečné bakterie a uložena na Petriho misky obsahující D40 médium tak, aby se semena nedotýkala. Petriho misky byly obaleny parafilmem a uloženy do inkubátoru na 2 dny do 24°C a 80% vlhkostí. Poté byly půlky semen omyty sterilní vodou a osušeny na sterilním filtračním papíru a přeneseny na Petriho misky s D40 médiem doplněným 500 $mg \cdot l^{-1}$ cefotaximem aby se zabránilo dalšímu růstu *A. tumefaciens*. Petriho misky byly uloženy v inkubátoru na další dva dny za stejných podmínek.

3.2.9 Transformace semen *G. max* metodou *in vivo*

Sójové kultivary W 82 byl pěstován při 28°C a 16 hodinové fotoperiodě v růstové komoře. Lusky byly pootevřeny pomocí skalpele ze tří stran kolem dozrávajícího semene dlouhého 4-5 mm, poté byly lusky jemně otevřeny a jednotlivá semena byla opatrně nařezána, aby se zvětšil povrch pro působení *A. tumefaciens* a také kvůli uvolnění fenolických látek, které indukují tvorbu vir genů a tím aktivují nekrózu. Kmen EHA 105 *A. tumefaciens* byl použit ke vložení plasmidu 5W:GUS:GFP/ 5W:GUS:dsRed s genovým konstruktem obsahujícím gen β-glukoronidásy (*uidA*) (Obrázek 2, strana 33). *A. tumefaciens* bylo pěstováno, centrifugováno a ředěno za stejných podmínek jako u metody *in vitro*. Infiltrační pufr MES byl složen ze sodné soli 10 mM MES, 10 mM $MgCl_2$ a 100 µM acetosyringonu (AS)[56]. Bakteriální kultura byla zakryta aluminiovou fólií a ponechána nejméně dvě hodiny při laboratorní teplotě. Těsně před transformací semen byl přidán 0,5 mM dithiothreitol (DTT). Bakteriální suspenze byla vložena do sonikátoru a celé lusky byly sonikovány příslušnou dobu. Pokud byl lusk sonikován ve vodě, suspenze bakterií byla na již sonikovaný a osušený lusk dána 1 ml injekční stříkačkou. Poté byly lusky obaleny parafilmem a umístěny v růstové komoře pod LED zářivkami po dobu 5 dní.

3.2.10 Analýza transientní exprese genu *uidA*

Aktivita genu *uidA* byla kvantitativně stanovena pomocí 4-methylumbeliferon β-D-galaktopyranosidu (4-MUG). Z lusků byla vyjmuta semena, embryonální osa i obal byly odstraněny a poloviny všech semen byly odděleny. Část semene, která již byla porušena skalpelem a na kterou bylo aplikováno *A. tumefaciens*, byla rozkrájena na menší kousky a vložena do připravené mikrozkumavky s keramickými kuličkami. Mikrozkumavky byly homogenizovány 2x 30s využitím FastPrep-24. Mezitím byly uchovávány na ledu. Poté bylo k sójovému extraktu přidáno 600µl GUS extrakčního pufru (150 mM Na_2HPO_4, 10 mM EDTA, 0, 1 % Triton X-100, 0.1% Tween, pH 7.00, před používáním byl přidán 1mM DTT, 140 µM PMSF) a znovu homogenizováno 30s. Následně byly mikrozkumavky centrifugovány 5 minut (centrifuga Sigma 1-14, výkyvný rotor, 14x600 µl 14 800 RPM). Čiré extrakty byly přepipetovány do mikrozkumavek, které je možné uchovávat při 4° C několik týdnů. Do bezbarvé 96 jamkové destičky bylo přepipetováno 30 µl extraktu, do kterého bylo přidáno 170 µl GUS assay pufru, který vznikl přidáním 0,5 mM 4-MUG, který byl rozpuštěn v DMSO), 140 µM PMSF a 10 mM β-merkaptoethanol, do GUS extrakčního pufru, vzniklý pufr byl uchováván bez přístupu světla. Ze vzniklého roztoku

bylo přeneseno multikanálovou pipetou 20 µl do černé 96 jamkové destičky, ve které bylo připraveno 180 µl GUS stop pufru (200 mM uhličitanu sodného). Tím vznikl první časový bod T_0. Destička s GUS assay pufrem a napipetovanými vzorky byla uložena v inkubátoru při 37°C ve tmě. Pro druhý časový bod se po 20 minutách z inkubované destičky přepipetovalo dalších 20 µl do černé destičky obsahující GUS stop pufr. Obdobným způsobem vznikly i další dva časové body, po 40 minutách a 20 hodinách. Po 20 hodinách byla měřena aktivita genu *uidA* při 360 nm excitace a 465 nm emise.

3.2.11 Histochemické barvení β-glukoronidásy (*uidA*)

Ke kvalitativnímu stanovení exprese genu *uidA* bylo použito histochemické barvení. Po 5 dnech byla semena vyjmuta z lusků, oloupána a celá vložena do kultivační destičky. Následně bylo připraveno 20 ml GUS barvícího roztoku obsahujícího 10 mg X-gluc, 0,4 ml DMF, 0,2 ml 10% Triton X-100, 0,4 ml 0,5 M EDTA pH 8,00, 33 mg ferikyanidu draselného, 42,2 mg ferokyanidu draselného, 2 ml 1 M fosfátového pufru pH 7,0, 4 ml methanolu a 13 ml vody. Semena byla celá ponořená v barvícím roztoku v 24 jamkové kultivační polystyrenové destičce. Infiltrace byla provedena v exsikátoru ve vakuu po dobu 3x 5 minut. Destičky se přes noc nechaly inkubovat v inkubátoru při 37°C ve tmě. Následně byl roztok odpipetován a semena byla promyta v 50%, 70% a konečně v 90% ethanolu. Poté byla jednotlivá semena vyfocena a byla vyhodnocena na modro obarvená plocha. Obarvená semena byla rozdělena do tří skupin podle velikosti modré plochy.

4 Výsledky

4.1 Příprava reportérových konstruktů pro transientní expresi

Pro měření transientní exprese v listech i semenech byly vytvořeny nové genové konstrukty pomocí konvence GoldenBraid[90] a s použitím genových fragmentů získaných z kolekcí MoClo (Addgene Kit # 1000000047, GB2,0 (Addgene, Kit # 1000000076) a z vlastní kolekce laboratoře virologie UEB. Cílem bylo vytvořit konstrukty, které budou v jediné T-DNA obsahovat kazetu pro expresi fluorescenčního proteinu pro přímou detekci v rostlinných pletivech, kazetu pro expresi enzymu GUS pro histochemické barvení a citlivé enzymatické stanovení a prvky zesilující a stabilizující expresi (Obrázek 2, strana 33). Pro stabilizaci exprese byly použity 5/3 NTR oblasti viru CPMV, které stabilizují mRNA po velmi dlouhou dobu (7-10 dní) a vykazují velmi silnou vazbu ribozómů a silnou translaci[91]. Dalším prvkem bylo použití supresoru genového silencingu P19 z tombusviru TBSV a MAR oblastí z tabáku a sóji[92]. Kromě konstruktu obsahujícího gen *uidA* jsem připravila i kontrolní konstrukt, který obsahoval identické prvky, pouze kazeta exprimující *uidA* byla nahrazena genem pro luciferázu ze světlušky.

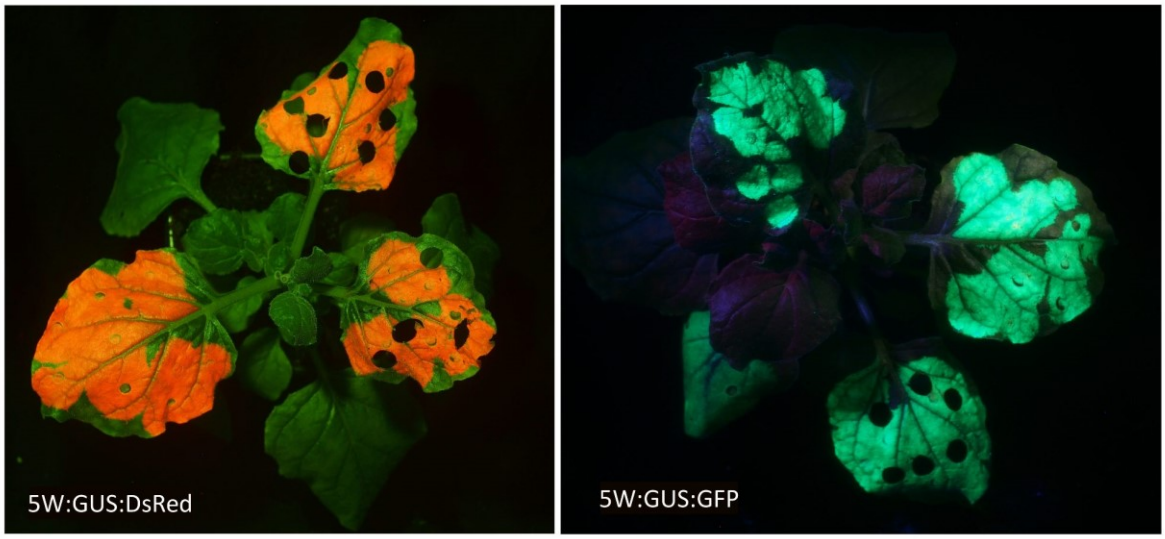
Nejprve bylo restritrikčně ligační reakcí s enzymem BsaI připraveno celkem 6 alfa plazmidů (α 11-14) dle následující Tabulky 3, plazmid α 2:P19 byl připraven v naší laboratoři již dříve. Správnost konstruktů byla ověřena restrikčním štěpením pomocí enzymu EcoRI, 10 z 12 izolovaných plazmidů vykazovalo očekávaný restrikční vzor.

Tabulka 3: Připravené plazmidy úrovně α

Vektor	Backbone plasmidu	Obsažené fragmenty 1 úrovně	Velikost fragmentu
α 11:RB7	pDB1 α 11 (UEB)	RB7-MAR (UEB)	1168 bp
α 12:GUS	pDB1 α 12 (UEB)	35S-CPMV- 5NTR (UEB) GUS-intron (MoClo) Nos-term (Moclo)	840 bp 2010 bp 550 bp
α 12:Luc	pDB1 α 12 (UEB)	35S-CPMV- 5NTR (UEB) Luciferáza (GB2)	840 bp 1653 bp

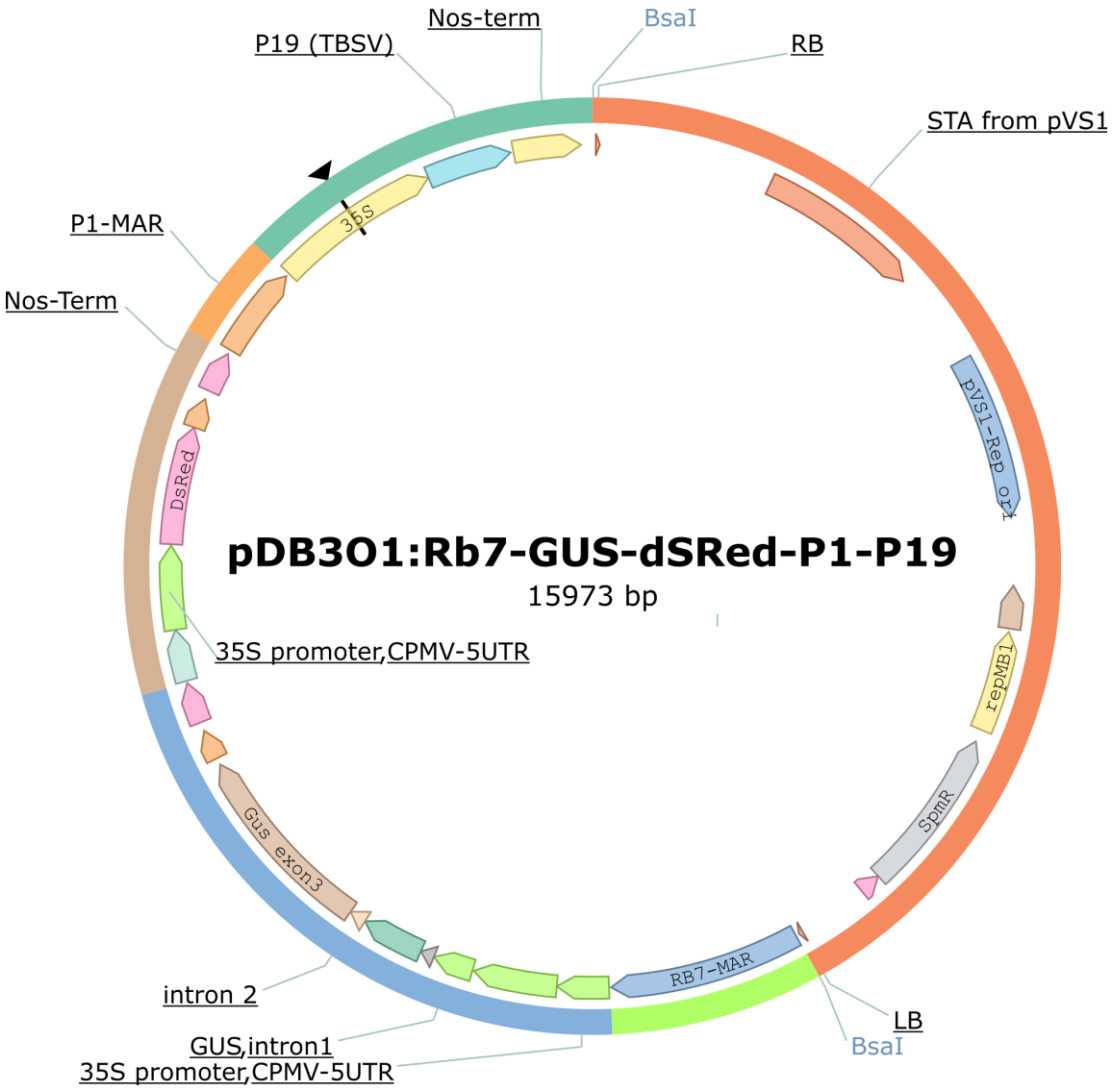
		Nos-term (Moclo)	550 bp
α 13:GFP	pDB1 α 13 (UEB)	35S-CPMV- 5NTR (UEB) GFP (Moclo) CPMV-3NTR-Nos-term (UEB)	840 bp 720 bp 550 bp
α 13:DsRed	pDB1 α 13 (UEB)	35S-CPMV- 5NTR (UEB) DsRed (Moclo) CPMV-3NTR-Nos-term (UEB)	840 bp 678 bp 550 bp
α 14:P1MAR	pDB1 α 14 (UEB)	P1-MAR (UEB)	561 bp
α 2:P19	pDB1 α 2 (GB2)	35S promotor (GB2) P19 supresor (GB2) Nos-term (Moclo)	1027bp 519 bp 467 bp

V dalším kroku bylo resktrikčně ligační reakcí s enzymem BsmBI vždy 5 α plazmidů vloženo do plazmidu pDB3ω2. Celkem jsem připravila tři ω2 konstrukty, dva experimentální s enzymem GUS a s fluorescenčními proteiny buď dsRed nebo GFP a jeden kontrolní s genem Luc a červeným fluorescenčním proteinem. Správnost konstruktů byla ověřena restrikčním štěpením pomocí enzymu EcoRV a funkčnost infiltrací do listů *N. benthamiana* (Obrázek 1).



Obrázek 1: Rostliny *N. benthamiana* infiltrované konstrukty 5W:GUS:DsRed (nalevo) respektive 5W:GUS:GFP.

Pro vizualizaci dsRed bylo použito zelené LED diody s excitačním maximem 535 nm a červený filtr Roscolux R24 Scarlet, pro vizualizaci GFP byly použity LED diody s maximem 405 nm a žlutý filtr Roscolux R15 DeepStraw .



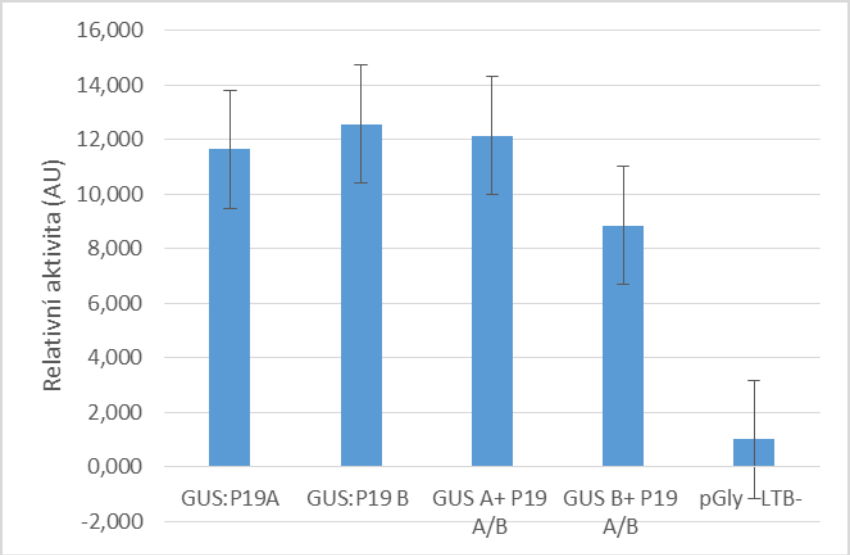
Obrázek 2: Mapa genového konstruktu 5W:GUS:dsRed.

Konstrukt obsahuje dva reportérové geny GUS a dsRed. Oba jsou kontrolované velmi silným virovým promotorem 35S a jejich exprese je stabilizována 5/3' NTR oblastmi viru CPMV. Konstrukt dále obsahuje 2 MAR oblasti - Rb7 z tabáku a P1 z G. max. Silencing během transientní exprese je limitován P 19 supresorem z viru TBSV. Celková velikost T-DNA je 9400 bp.

4.2 Transientní transformace listů *G. max* a *N. benthamiana*

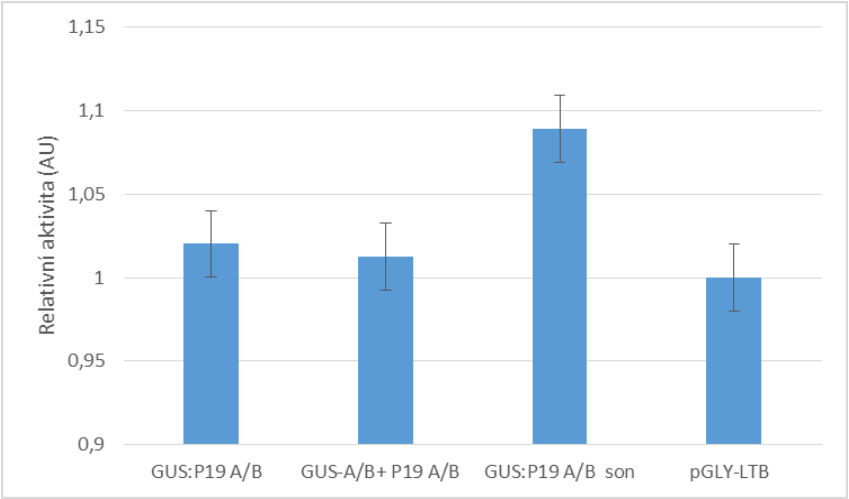
Naším cílem bylo experimentálně prokázat transientní expresi genu *uidA* v listech *G. max* a ověřit funkčnost genových konstruktů pro transientní expresi genu *uidA*. Dále nás zajímalo, zda je podstatný rozdíl mezi různými koloniemi *A. tumefaciens* (na Obrázku 3 označeno A a B) a také mezi genovými konstrukty s kazetou, kde jsou GUS a P19 dohromady (na Obrázku 3 popsáno GUS A+P19) a na druhé kazetě zvlášť (GUS:P19).

Transientní transformace listů byla provedena celkem třikrát, vždy s využitím listů *G. max* genotypu W82 a listů *N. benthamiana* použitých jako pozitivní kontrola k ověření funkčnosti *A. tumefaciens.*



Obrázek 3: Závislost relativní aktivity genu *uidA* na použitém genovém konstruktu. *Byl použit konstrukt s kazetou, kde jsou dohromady (symbol GUS+P19) nebo zvlášť GUS a P19 (symbol GUS:P19) a také s využitím dvou kolonií (označené A,B) A. tumefaciens u rostliny N. benthamiana. Negativní kontrola je označena jako pGly-LTB. Aktivita genu uidA byla měřena po 40 minutách reakce. Relativní aktivita byla vztažena k negativní kontrole, která byla počítána jako 1,0. Symbol AU označuje arbitrary units, jedná se o relativní jednotky dané citlivostí použitého fluorometru.*

Experiment byl proveden s listy metodou *in vivo.* Ze získaných hodnot je patrné, že infiltrace metodou *in vivo* poskytuje vyšší relativní aktivitu genu *uidA* než v případě metody *in vitro* s použitím listů *G. max* (Obrázek 4, strana 35).



Obrázek 4: Závislost relativní aktivity genu *uidA* na použitém konstruktu u rostliny *G. max* metodou *in vitro*.

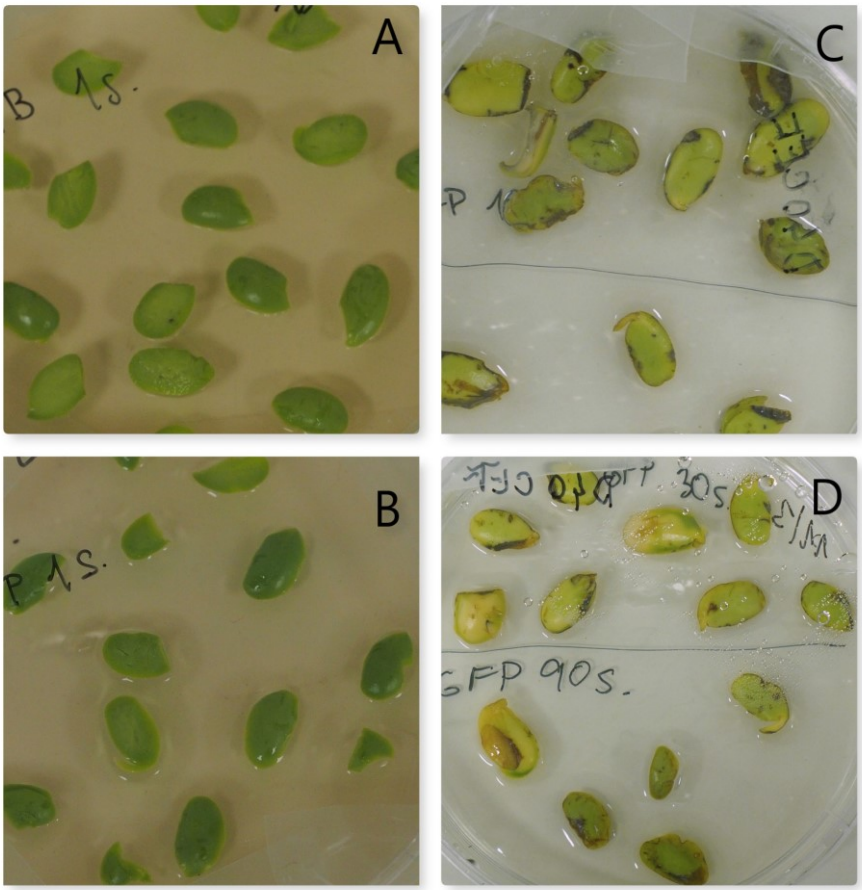
Konstrukt pGly-LTB byl použit jako negativní kontrola. Význam použitých symbolů a podmínky měření jsou stejné jako v případě Obrázku 3. Ve třetím sloupci byla relativní aktivita stanovována na listech G. max, které byly také sonikovány (označeno son).

Z Obrázku 4 je patrné, že rostlinné pletivo *G. max* nevykazuje žádné pozitivní výsledky. Experiment byl proveden v *in vitro* podmínkách, ke stanovení byly využity listové disky. Přestože byl k experimentům využit publikovaný protokol[56], provedená infiltrace listů *G. max* byla neúčinná. Všechny infiltrované listy vykazovaly hodnoty srovnatelné s hodnotami negativní kontrola. Naším hlavním cílem bylo infiltrovat dozrávající semena *G. max*, proto již nebyl doporučovaný postup měněn a optimalizován za jiných podmínek.

Z naměřených hodnot vyplývá, že vyšší hodnoty relativní aktivity genu *uidA* byly zaznamenány u rostliny *N. benthamiana* při metodě *in vivo* než u listů *G. max.* Lepší výsledky mohly být způsobeny tím, že listy byly stále vyživovány rostlinou a nedocházelo tedy k jejich nekróze jako v případě listových disků. V případě listů rostliny *N. benthamiana* nebyl zaznamenán podstatný rozdíl v relativní aktivitě mezi listy s genovým konstruktem se dvěma kazetami GUS a P19 a použitím dvou kolonií *A. tumefaciens* (Obrázek 3, strana 34).

4.3 Transientní transformace semen *G. max* metodou *in vitro*

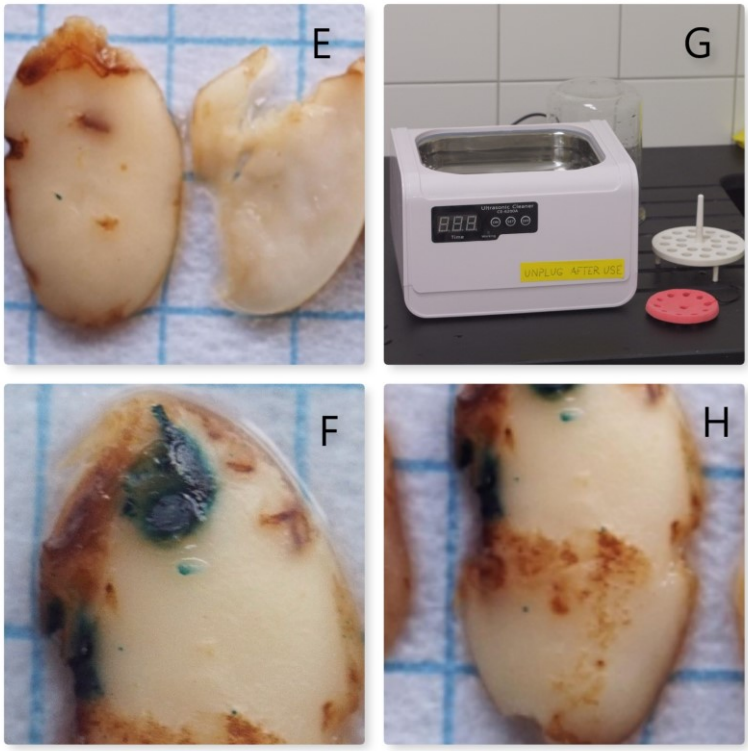
V dostupné literatuře nebyl nalezen vhodný protokol pro rychlou kvantitativní analýzu genových konstruktů v dozrávajících semenech. Nejlépe se studuje transientní exprese. Jako první jsme se rozhodli ověřit protokol publikovaný[57]. Protokol je popsán na následujících Obrázcích 5-6, strana 36-37.



Obrázek 5: Transientní transformace semen *G. max* metodou *in vitro*.

Na obrázku B jsou znázorněné poloviny semen G. max, které byly sonikovány 30s, ihned po transientní transformaci na Petriho misce s D40 médiem. Na obrázku A je zachycena odpovídající negativní kontrola. Na obrázku D jsou vyfotografovány stejná semena G. max pět dní po transientní transformaci. Obrázek C je negativní kontrola.

Na rozdíl od semen vyfotografovaných 5 dní po infiltraci *in vivo* metodou (Obrázek 10, strana 40), je zde (Obrázek 5) možné pozorovat hnědé sektory na semenech způsobených nekrózou, přestože semena byla pouze oloupána a rozpůlena, ale nebyla nařezána a poničena skalpelem.

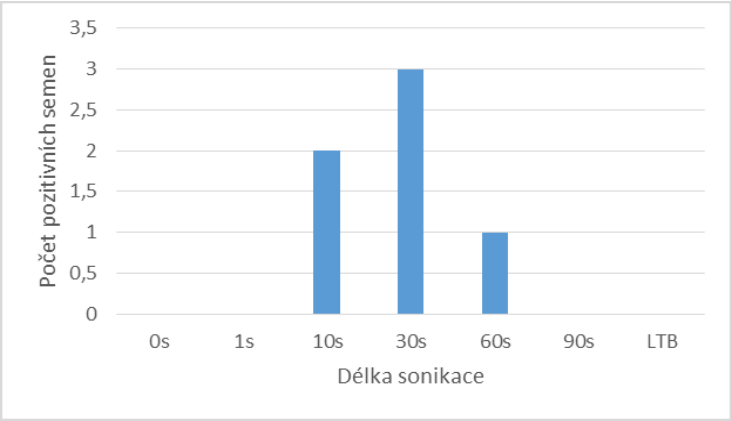


Obrázek 6: Transientní transformace a histochemické barvení semen *G. max* metodou *in vitro*.

Na obrázku F je zachyceno histochemicky obarvené semeno G. max s výraznými modrými plochami. Semeno bylo sonikováno 30s. Obrázek E je příslušná negativní kontrola. Semena G. max byla sonikována určitou dobu v mikrozkumavkách umístěných v plováčku v sonikátoru (obrázek G). Poslední obrázek H představuje 10s sonikované semeno G. max, na kterém jsou patrné modré sektory.

Velikost obarvené plochy semen také odpovídá zjištěným výsledkům uvedeným na Obrázku 8, strana 38.

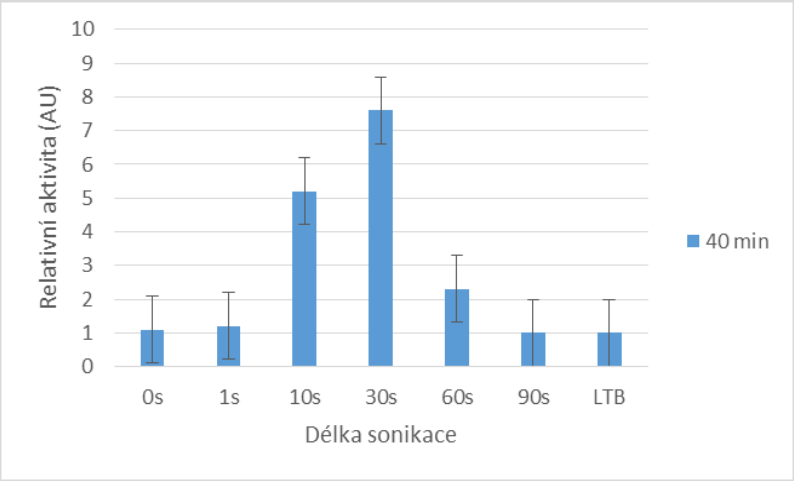
Nejdříve jsme chtěli zjistit optimální délku sonikace semen *G. max*, bylo otestováno celkem 6 různých délek sonikace.



Obrázek 7: Celkový počet pozitivních semen *G. max* v závislosti na zvolené délce sonikace.

Uvedené časy v sekundách udávají délku sonikace. Sloupec LTB představuje negativní kontrolu.

Na Obrázku 7 je zobrazeno, že pouze 10s, 30s a 60s sonikace poskytuje pozitivní semena. U příliš dlouhé (90s) a nedostatečně dlouhé sonikace (0s, 1s) nebyly zaznamenány žádná pozitivní semena.



Obrázek 8: Závislost relativní aktivity genu *uidA* na délce sonikace u semen *G. max* metodou *in vitro*.

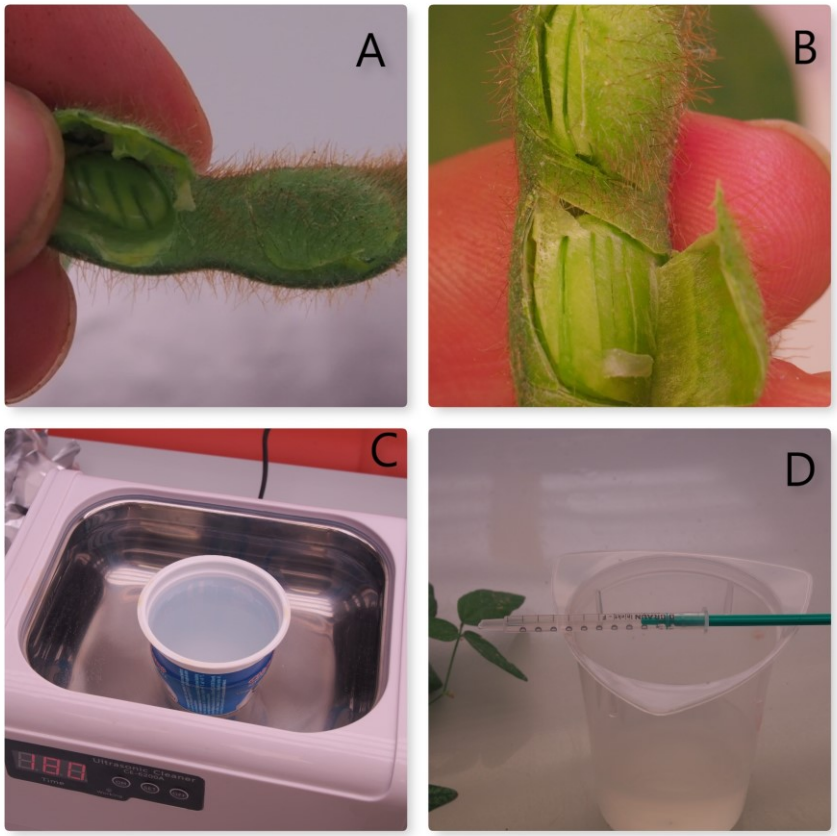
Relativní aktivita byla měřena po 40 minutách reakce.

Ze získaných výsledků (Obrázek 7 a 8, strana 38) je patrný vliv délky sonikace na transientní expresi. Semena, která nebyla sonikována vůbec nebo pouze 1s, byla na úrovni negativní kontroly. Optimální délka sonikace je okolo 30s, delší prodlužování vede k poklesu transientní exprese. U všech semen byla použita sonikace přímo v *A. tumefaciens* a semena byla ošetřena stejným extrakčním pufrem s přídavkem AS, proto mohl být studován pouze vliv rozdílné délky sonikace. Pro každou dobu trvání sonikace byly použity a vyhodnoceny náhodně vybrané minimálně tři semena podobné velikosti (Obrázek 8, strana 38).

Pro experimentální vyhodnocení bylo použito celkem 59 semen včetně 23 semen negativní kontroly, pozitivní výsledky infiltrace byly zaznamenány pouze u 6 semen a to představuje 16,7 % účinnost infiltrace v *in vitro* podmínkách (Obrázek 7, strana 38).

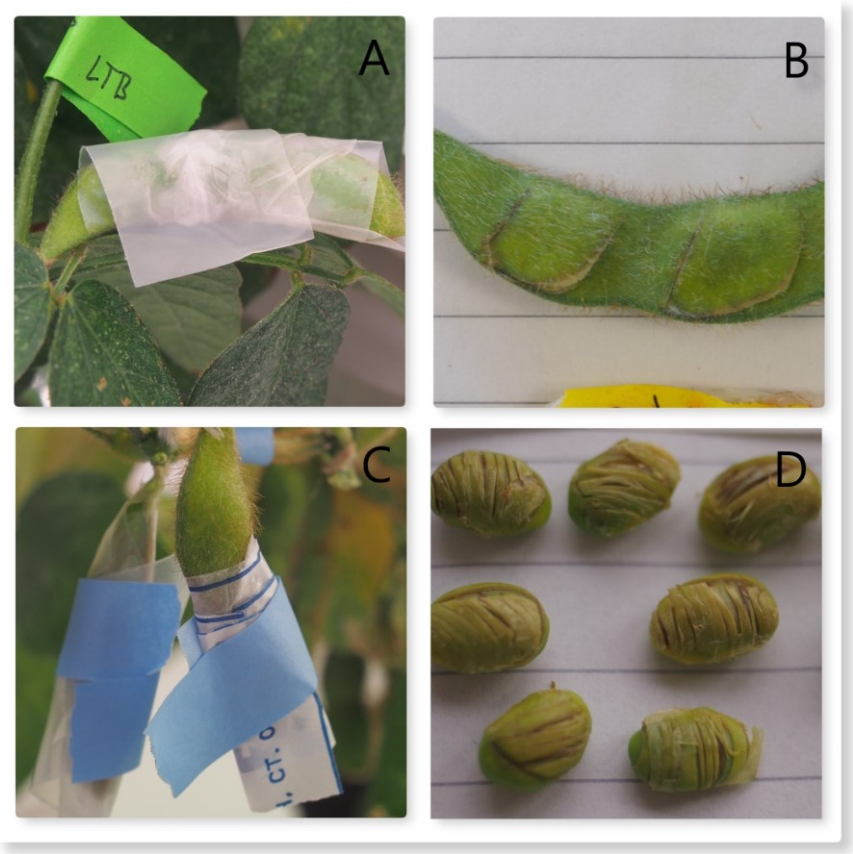
4.4 Transientní transformace semen *G. max* metodou *in vivo*

Transientní transformace semen *G. max* v *in vitro* podmínkách podle publikovaného protokolu nebyla příliš účinná, rozhodli jsme se optimalizovat podmínky infiltrace semen. Zásadním rozdílem bylo využití lusků a semen v *in vivo* podmínkách a také poničení semen skalpelem kvůli indukci genů virulence *A. tumefaciens*. Dalším rozdílem byla sonikace ve vodě a následné přidání buněčné suspenze, která již nebyla poničena ultrazvukem. Protokol je naznačen fotografiemi v následujících Obrázcích 9-12, strana 40-42.



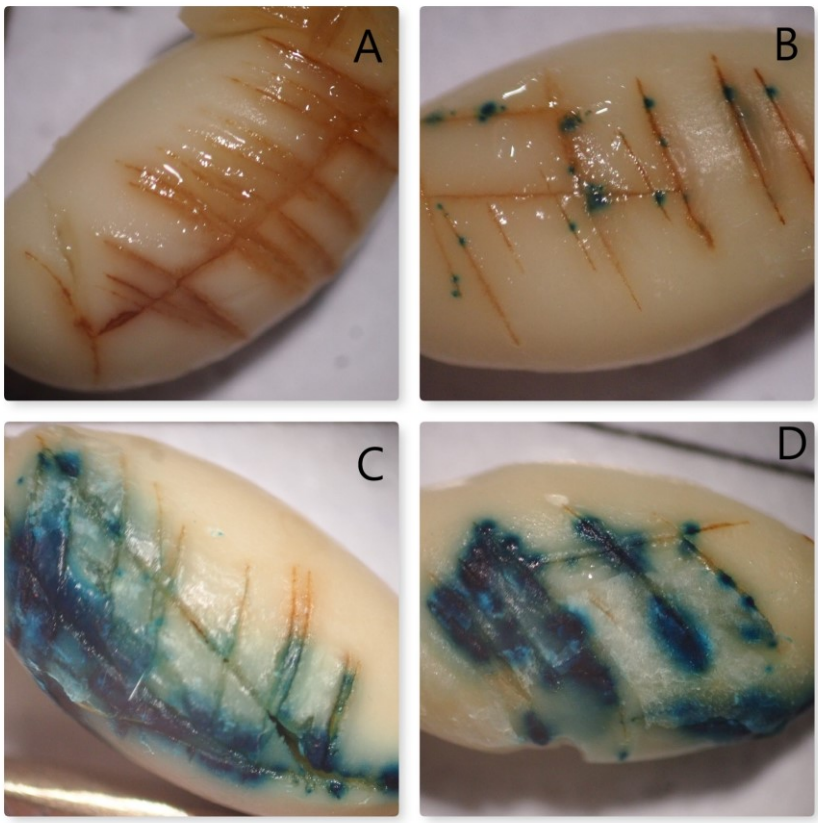
Obrázek 9: Transientní transformace semen *G. max* metodou *in vivo*.

Na obrázcích A a B je znázorněno nakrojení lusku a poničení semenného obalu G. max skalpelem během transientní transformace. Pokud byla semena sonikována v suspensi A. tumefaciens, lusky byly postupně vkládány do kelímku s buněčnou suspensí, kolem kterého byla v sonikátoru voda (obrázek C). Další semena byla sonikována nejprve ve vodě a poté na ně bylo pomocí injekční stříkačky aplikováno A. tumefaciens (obrázek D).



Obrázek 10: Transientní transformace semen *G. max* metodou *in vivo*.

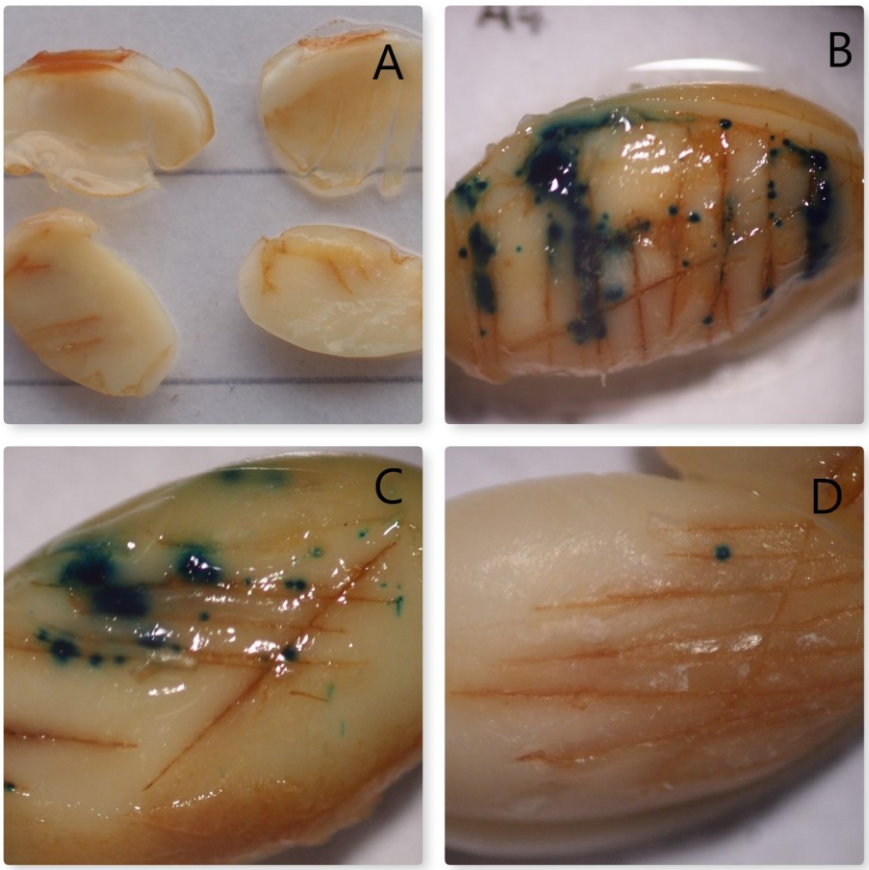
Lusky byly následně po sonikaci osušeny buničinou a obaleny parafilmem, kvůli zachování vlhkosti (obrázek A (negativní kontrola) a C). Na obrázcích B a D jsou vyfotografovány lusky a jednotlivá semena 5 dní po transientní transformaci.



Obrázek 11: Histochemické barvení semen *G. max* sonikovaných ve vodě.

Obrázek A znázorňuje negativní kontrolu, semeno B bylo sonikováno 10s, semeno C 30s a konečně semeno D 60s. Na semeni B je možné pozorovat jednotlivé na modro obarvené tečky, naopak semena označena C a D prezentují obarvené větší modré sektory. Z Obrázku 9 je patrný pozitivní vliv delší sonikace.

Podobný trend byl také pozorován při kvantitativním vyhodnocování (Obrázek 14, strana 44).

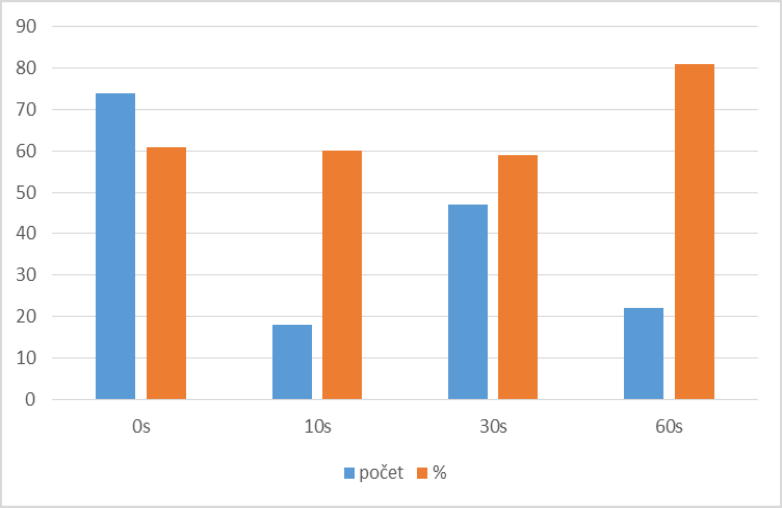


Obrázek 12: Histochemické barvení semen *G. max* sonikovaných v suspenzi *A. tumefaciens.*

Obarvené semeno negativní kontroly je zobrazeno na obrázku A, semeno s 10s sonikací je na obrázku B. Vyfotografovaná semena sonikovaná 30s a 60s jsou na obrázcích C (30s) a D (60s). Jako nevhodná délka pro sonikaci v A. tumefaciens byla zjištěna doba 60s, na obrázku D je patrná jediná modrá oblast. Při použití kratší délky sonikace (10s a 30s) můžeme pozorovat zvětšení a navýšení modrých sektorů (obrázek B a C).

Množství obarvených modrých sektorů na semenech koresponduje s kvantitativními výsledky uvedenými na Obrázku 14, strana 44.

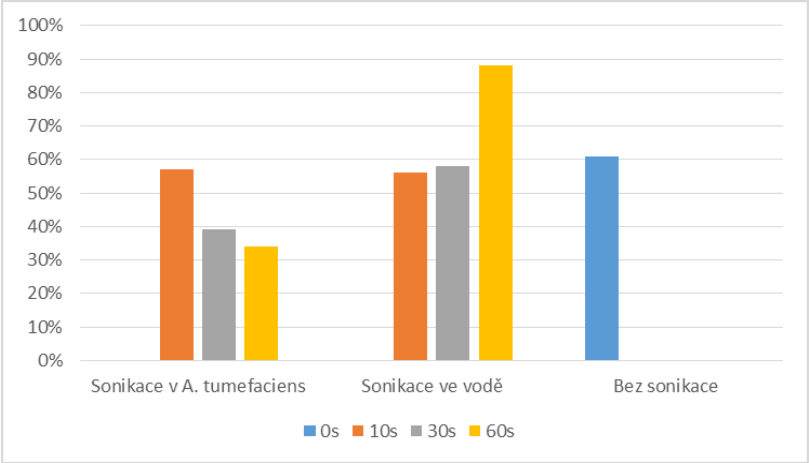
Podobně jako u *in vitro* protokolu jsme se nejprve rozhodli optimalizovat délku sonikace. Vzhledem k předchozím výsledkům transientní transformace v *in vitro* podmínkách byly vybrány pouze optimální délky sonikace, tedy 10s, 30s a 60s.



Obrázek 13: Celkový počet pozitivních semen v závislosti na délce použité sonikace. *Oranžové sloupce představují počet pozitivních semen vyjádřený v procentech, modré sloupce znázorňují celkový počet pozitivních semen.*

Nejvíce pozitivních semen bylo zaznamenáno při 60s sonikaci a to 81%. Tento údaj ale nemusí být přesný. Experimenty s podmínkou 60s byly provedeny až po optimalizaci podmínek, kdy jsme zjistili, že sonikace ve vodě pozitivně ovlivňuje výslednou expresi a také byl ke všem semenům přidán AS a DTT (Obrázek 13).

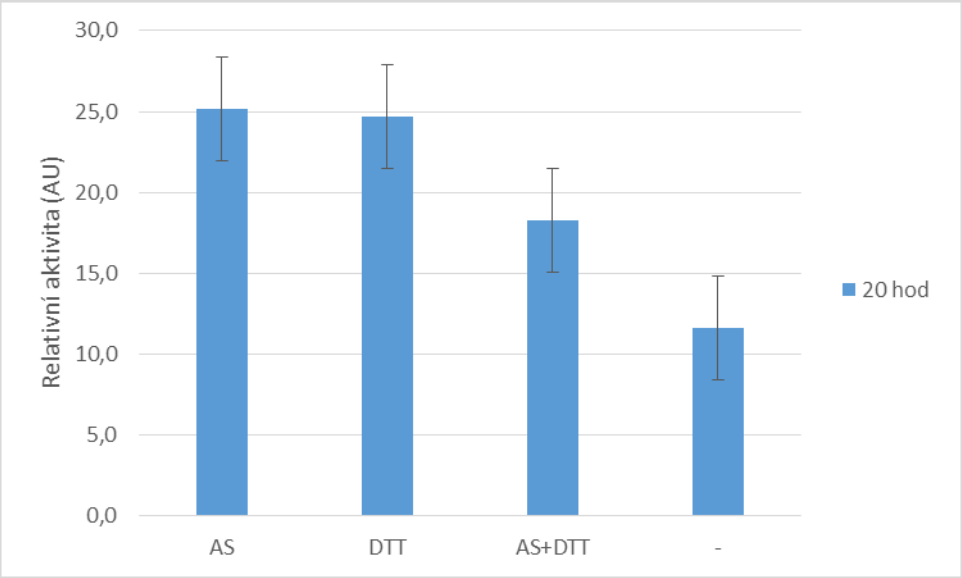
Následně jsme optimalizovali publikovaný protokol o sonikaci nejprve ve vodě a s následným přidáním bakteriální suspense[53]. Optimalizace vedla ke zjednodušení protokolu a také k lepším výsledkům, delší sonikace zřejmě poničí také buňky *A. tumefaciens.*



Obrázek 14: Závislost účinnosti transientní transformace semen *G. max* na délce sonikace a prostředí, kde byla semena sonikována.

Zdá se, že pokud jsou semena nejprve sonikována ve vodě a poté teprve vystavena působení *A. tumefaciens*, dochází ke zlepšení transientní exprese s delším časem sonikace. Naproti tomu byla-li semena sonikována přímo v suspensi *A. tumefaciens*, vedly delší časy ke snížení transientní exprese. Delší (60s) sonikace může semeno trvale poškodit a znemožnit transientní transformaci (Obrázek 14). Sonikace slouží k porušení semenného obalu, k proniknutí do semene a vytvoření mikrotrhlin uvnitř semen. Spolu s mechanickým poškozením semene dochází ke zvětšení povrchu pro působení *A. tumefaciens.* Ultrazvukem poškozené buňky indukují tvorbu genů virulence a tím zprostředkovávají přenos T-DNA[56].

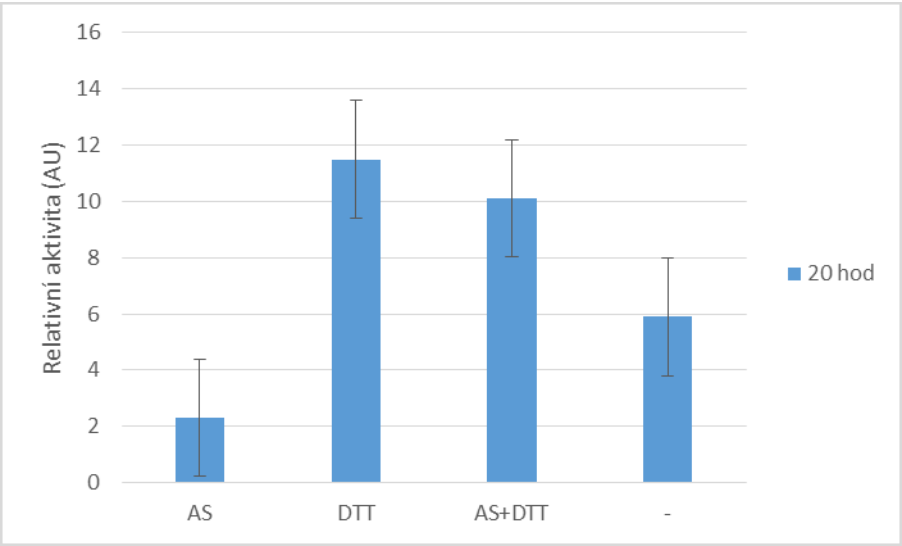
Poté, co jsme analyzovali vliv délky a podmínek sonikace jsme se zaměřili na vliv aditiv. Z literatury je známo, že redukční činidlo DTT snižuje riziko nekrózy a AS je fenolický induktor genů virulence *A. tumefaciens*, pomáhá k přenosu T-DNA[56,93]. Vliv dithiothreitolu a acetosyringonu byl zkoumán při dvou vybraných délkách sonikace 0 s a 30 s.



Obrázek 15: Závislost relativní aktivity genu *uidA* u nesonikovaných semen *G. max* na přidaných aditivech DTT a AS .

Relativní aktivita byla zaznamenána po 20 hodinách reakce. Ve čtvrtém sloupci jsou uvedená semena, ke kterým nebylo přidáno žádné aditivum (-).

Na Obrázku 15 je možné pozorovat pozitivní vliv AS (nejvyšší hodnoty relativní aktivity) a DTT. Pokud se k infiltračnímu pufru přidají obě aditiva (AS+DTT), relativní aktivita je vyšší než získané hodnoty ze semen transformovaných infiltračním pufrem bez aditiv. Naměřené hodnoty bez aditiv poskytují nejnižší hodnoty relativní aktivity.



Obrázek 16: Závislost relativní aktivity semen *G. max* na přidaných aditivech DTT a AS při 30 s sonikaci.

Relativní aktivita byla změřena po 20 hodinách reakce. Ve čtvrtém sloupci jsou uvedená semena, ke kterým nebylo přidáno žádné aditivum (-).

Z Obrázku 16 vyplývá, že DTT opět poskytuje nejvyšší hodnoty relativní aktivity, ale AS při 30 s sonikaci negativně ovlivňuje transientní transformaci. Přídavek DTT do infiltračního pufru s AS má pozitivní vliv na transformovaná semena *G. max*. Je zajímavé, že vyhodnocovaná semena bez přidaných aditiv DTT a AS dosahovaly lepších výsledků, než semena transformovaná infiltračním pufrem obohaceným o AS.

Naším posledním cílem bylo porovnat výsledky získané metodou *in vivo* a *in vitro*. Celkem bylo vyhodnoceno 342 semen *G.max* včetně 83 semen využitých jako negativní kontrola. V experimentech jsme se zaměřili na vybrané délky sonikace 10s, 30s a 60s, případně zcela bez sonikace. Transientní transformace byla úspěšná u 161 dozrávajících semen. Úspěšnost metody *in vivo* dosahuje 62,1%. Z porovnání s úspěšností protokolu *in vitro* vyplývá, že nový protokol poskytuje téměř 4krát více pozitivních výsledků.

Výrazně lepší hodnoty mohly být také způsobeny přidáním DTT. Pět dní po *in vivo* a *in vitro* infiltraci jsou semena v odlišném fyziologickém stavu. U první jmenované skupiny byl patrný výrazně lepší stav semínek, na semenech převládaly zelené sektory i přes pořezání semen skalpelem (Obrázek 10, strana 41). U semen po *in vitro* infiltraci bylo patrné více hnědých nekrotických sektorů (Obrázek 5, strana 36).

Kromě vyššího počtu pozitivních semen, jsme také zaznamenali vyšší hodnoty exprese oproti negativní kontrole. Průměrný nárůst se pohyboval kolem 25 násobku, u jednoho semene byl detekován nárůst 166krát vyšší.

5 Diskuse

Cílem předkládané bakalářské práce bylo ověřit protokol pro kvantitativní porovnání aktivit genových konstruktů v listech a semenech *G. max*. Sérií experimentů bylo zjištěno, že infiltrace listů *G. max* je neúčinná, přestože byla provedena podle publikovaného protokolu[56]. Infiltrace listů byla zkoumána na stejném genotypu *G.max* i s využitím stejného kmenu *A. tumefaciens* EHA 105, jako u uvedeného protokolu. Nefunkčnost infiltrace mohla být způsobena odlišným typem a výkonem sonikátoru, podmínky vakuové infiltrace také nebyly totožné. Dalším rozdílem mohly být odlišné podmínky pro růst rostlin, například intenzita a délka osvětlení v růstové komoře. Infiltrací listů *G. max* se nám nepovedlo dosáhnout žádné transientní exprese, proto je obtížná optimalizace podmínek. Z toho důvodu bylo od dalších experimentů opuštěno. Použité *A. tumefaciens* na transformaci listů *G. max* bylo plně funkční a nebylo zdrojem chyb. Tato skutečnost byla ověřena úspěšnou transientní infiltrací listů *N. benthamiana* s využitím stejné kultury *A. tumefaciens*.

V následujících experimentech bylo hlavním cílem transientně infiltrovat dozrávající semena *G. max*. Důvodem byla nemožnost transientně otestovat konstrukty v jiném systému než v semeni luštěnin. Experimentálně jsme prokázali, že publikovaný protokol v *in vitro* podmínkách[57] je funkční, nicméně je technicky náročný a transientní exprese proteinů nízká. Při experimentálním provedení byl vyvinut nový protokol, který je technicky velmi nenáročný a alespoň v našich podmínkách dosahujeme vyšších hodnot exprese než při použití *in vitro* protokolu. Protokol byl prezentován formou posteru na vědecké konferenci a bude dále podrobněji popsán v připravované vědecké publikaci. Dále bude také využíván při práci na grantovém projektu „Studium vlivu humanizované glykosylace na akumulaci proteinů v semenech rostlin“.

Vyšší hodnoty transientní exprese proteinů při *in vivo* metodě oproti *in vitro* mohou být způsobeny tím, že při první jmenované metodě jsou semena *G. max* vyživovány po celou dobu trvání infiltrace rostlinou, nakrojení lusku a porušení semenného obalu skalpelem ve většině případů nezpůsobují nekrózu, obalení lusku parafilmem poskytuje jednotlivým semenům téměř shodné podmínky pro růst jako neporušený lusk a také zajišťuje ideální vlhkost. Pro snížení možnosti výskytu nekrózy byl také k infiltračnímu

pufru přidán dithiothreitol (DTT) na rozdíl od protokolu v *in vitro* podmínkách. Další nevýhodou transientní transformace semen v *in vitro* podmínkách je práce ve sterilním prostředí flow boxu a také sterilizace veškerých nástrojů a médií.

Podstatně nižší transientní exprese proteinů v nezralých semenech *G. max* infiltrovaných v *in vitro* podmínkách mohla být zapříčiněna sonikací semen přímo v suspenzi *A. tumefaciens*. Sonikace mohla bakterie poškodit a tím snížit účinnost infiltrace. Tento trend je patrný na Obrázku 14. Sonikace v bakteriální suspenzi *A. tumefaciens* je technicky náročná a při větším počtu testovaných konstruktů také možným zdrojem chyb. Například nedokonalé sterilizování sonikátoru mezi jednotlivými infiltracemi může být zdrojem kontaminace a následných nepřesných výsledků.

Při experimentech bylo zjištěno, že hlavním vlivem na úspěšnost transientní transformace je fyziologický stav semene *G. max*. Nestresované a dozrávající semeno v požadovaném okamžiku je rozhodujícím faktorem transientní transformace. Nevýhodou této metody je nemožnost předem zjistit aktuální fyziologický stav lusků a také vystihnout ideální čas dozrávání semen. Tento trend byl pozorován při vyhodnocování, některá semena nereagovala na transformaci vůbec.

Mezi další nevýhodu je možné zařadit náročné vyhodnocování transientní transformace semen *G. max*, které je obtížné při větším počtu zkoumaných semen v našich laboratorních podmínkách. Zdrojem chyb a nesprávných výsledků kromě nepřesného pipetování je také obtížnost dokonalé homogenizace celých semen. Popsaný problém je patrný z histochemického barvení semen *G. max*, kde jsou vidět modré plochy akumulované při sobě a ve většině případů pouze v určité části semene, kterou není možné u nebarvených semen zjistit před vyhodnocováním.

Experimentálně bylo zjištěno, že přídavek AS do infiltračního pufru má pozitivní vliv na výslednou expresi proteinů pouze pokud transformovaná semena nebyla předem sonikována (Obrázek 15 a 16).

V transientní transformaci semen *G. max* je také důležitý poměr mezi zdravým semenem a působením *A. tumefaciens*. Poničení semen skalpelem a vznik mikrotrhlinek

sonikací působí ve prospěch *A. tumefaciens*, naopak redukční činidlo DTT minimalizuje nekrózu a zabalení lusků do parafilmu chrání semena. Přídavek AS také napomáhá infekci *A. tumefaciens*. Bylo pozorováno, že delší sonikace a přídavek AS zřejmě poškodí semena nevratně a výsledná transientní exprese není příliš vysoká.

6 Závěr

Naměřené výsledky byly prezentovány formou posteru na mezinárodní vědecké konferenci „2nd conference of International society for plant molecular farming“ konané v Gentu 25. - 27. 5. 2016.

V bakalářské práci byly připraveny genové konstrukty pro transientní expresi genu *uidA* v semenech *G. max*. V rámci předkládané práce byla studována možnost transientní exprese genu *uidA* v dozrávajících semenech *G. max.* Dále byl studován vliv délky a prostředí sonikace, vliv aditiv dithiothreitolu (DTT), acetosyringonu (AS) a jejich kombinací na transientní expresi genu *uidA*. Experimentálně byly porovnány *in vitro* a *in vivo* metody transientní transformace semen *G. max.*

Výsledky získané v této práci lze shrnout následovně:

Ovlivnění délkou sonikace

Jako nevhodné délky sonikace byly zjištěny 1s a 90s. U semen *G. max* infiltrovaných v *in vitro* podmínkách byla optimální délka sonikace 30s, zatímco u semen v *in vivo* podmínkách infiltrace bylo nejlepších výsledků dosaženo při 60s sonikaci.

Ovlivnění prostředím sonikace

Na základě našich výsledků usuzujeme, že sonikace ve vodě pozitivně ovlivňuje transientní expresi genu *uidA* Sonikace přímo v bakteriální suspenzi s delším časem sonikace má naopak negativní vliv.

Ovlivnění přidáním dithiothreitolu

Při transientní transformaci semen *G. max* metodou *in vitro* nebyl zmíněný vliv zkoumán. U semen infiltrovaných *in vivo* metodou byl prokázán pozitivní vliv DTT. Nesonikovaná semena po přidání DTT dosahovala dvakrát vyšších hodnot relativní aktivity genu *uidA* než semena po 30s sonikaci.

Ovlivnění přidáním acetosyringonu

Výrazně pozitivní vliv AS byl dokázán u nesonikovaných semen. Naopak u semen s delší sonikací docházelo ke snížení transientní exprese.

Ovlivnění kombinací obou aditiv

Přidáním obou aditiv do infiltračního pufru bylo dosaženo lepších výsledků relativní aktivity genu *uidA* pokud semena nebyla sonikována. Pokud byla sonikována 30s, sledovaná relativní aktivita poklesla.

Porovnání metody *in vivo* a *in vitro*

Z experimentálně zjištěných výsledků vyplývá, že protokol pro transientní transformaci v *in vivo* podmínkách dosahuje 4krát více pozitivních semen a také vyšších hodnot relativní aktivity genu *uidA*. Tento protokol poskytuje technicky jednodušší, rychlejší a alespoň v našich laboratorních podmínkách lepší výsledky transientní exprese.

7 Seznam literatury

1. Chargelegue, D.; Obregon, P.; Drake, P. M., *Trends in Plant Science* **2001,** *6* (11), 495-496.
2. Ma, J. K.; Drake, P. M.; Christou, P., *Nature Reviews Genetics* **2003,** *4* (10), 794.
3. Riggs, A. D., *Diabetes Care* **1981,** *4* (1), 64-68.
4. Daniell, H., *Biotechnology Journal* **2006,** *1* (10), 1071-1079.
5. Wurm, F. M., *Nature Biotechnology* **2004,** *22* (11), 1393.
6. Fischer, R.; Emans, N., *Transgenic Research* **2000,** *9* (4-5), 279-299.
7. Korban, S. S., *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **2002,** *38* (3), 231-236.
8. Fischer, R.; Stoger, E.; Schillberg, S.; Christou, P.; Twyman, R. M., *Current Opinion in Plant Biology* **2004,** *7* (2), 152-158.
9. Mason, H. S.; Arntzen, C. J., *Trends in Biotechnology* **1995,** *13* (9), 388-392.
10. Streatfield, S. J.; Howard, J. A., *International Journal for Parasitology* **2003,** *33* (5), 479-493.
11. Barta, A.; Sommergruber, K.; Thompson, D.; Hartmuth, K.; Matzke, M. A.; Matzke, A. J., *Plant Molecular Biology* **1986,** *6* (5), 347-357.
12. Hiatt, A.; Caffferkey, R.; Bowdish, K., *Nature* **1989,** *342* (6245), 76-78.
13. Opar, A., *Nature Reviews Drug Discovery* **2011,** *10* (2), 81-83.
14. Twyman, R. M.; Stoger, E.; Schillberg, S.; Christou, P.; Fischer, R., *Trends in Biotechnology* **2003,** *21* (12), 570-578.
15. Gleba, Y.; Klimyuk, V.; Marillonnet, S., *Current Opinion in Biotechnology* **2007,** *18* (2), 134-141.
16. Larrick, J. W.; Thomas, D. W., *Current Opinion in Biotechnology* **2001,** *12* (4), 411-418.
17. Stoger, E.; Ma, J. K. C.; Fischer, R.; Christou, P., *Current Opinion in Biotechnology* **2005,** *16* (2), 167-173.
18. Moravec, T.; Schmidt, M. A.; Herman, E. M.; Woodford-Thomas, T., *Vaccine* **2007,** *25* (9), 1647-1657.
19. Muntz, K., *Plant Molecular Biology* **1998,** *38* (1-2), 77-99.

20. Moloney, M.; Boothe, J.; Van Rooijen, G., Oil bodies and associated proteins as affinity matrices. patent USA č. 5856452 A, **1996**.

21. Commandeur, U.; Twyman, R. M.; Fischer, R., *AgBiotechNet* **2003,** *5* (110), 1-9.

22. Hood, E. E.; Witcher, D. R.; Maddock, S.; Meyer, T.; Baszczynski, C.; Bailey, M.; Flynn, P.; Register, J.; Marshall, L.; Bond, D., *Molecular Breeding* **1997,** *3* (4), 291-306.

23. Witcher, D. R.; Hood, E. E.; Peterson, D.; Bailey, M.; Bond, D.; Kusnadi, A.; Evangelista, R.; Nikolov, Z.; Wooge, C.; Mehigh, R., *Molecular Breeding* **1998,** *4* (4), 301-312.

24. Lamphear, B. J.; Jilka, J. M.; Kesl, L.; Welter, M.; Howard, J. A.; Streatfield, S. J., *Vaccine* **2004,** *22* (19), 2420-2424.

25. Schünmann, P. H.; Coia, G.; Waterhouse, P. M., *Molecular Breeding* **2002,** *9* (2), 113-121.

26. Sack, M.; Hofbauer, A.; Fischer, R.; Stoger, E., *Current Opinion in Biotechnology* **2015,** *32*, 163-170.

27. Hinchee, M. A.; Connor-Ward, D. V.; Newell, C. A.; McDonnell, R. E.; Sato, S. J.; Gasser, C. S.; Fischhoff, D. A.; Re, D. B.; Fraley, R. T.; Horsch, R. B., *Bio/technology* **1988,** *6* (8), 915-922.

28. Rubel, A.; Rinne, R.; Canvin, D., *Crop Science* **1972,** *12* (6), 739-741.

29. Maruyama, N.; Adachi, M.; Takahashi, K.; Yagasaki, K.; Kohno, M.; Takenaka, Y.; Okuda, E.; Nakagawa, S.; Mikami, B.; Utsumi, S., *The Federation of European Biochemical Societies Journal* **2001,** *268* (12), 3595-3604.

30. Thanh, V. H.; Shibasaki, K., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1976,** *24* (6), 1117-1121.

31. Koshiyama, I., *Seed proteins*, Springer: **1983**; 427-450.

32. Natarajan, S. S.; Xu, C.; Bae, H.; Caperna, T. J.; Garrett, W. M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006,** *54* (8), 3114-3120.

33. Schmidt, M. A.; Herman, E. M., *Plant Biotechnology Journal* **2008,** *6* (8), 832-842.

34. Ahrent, D.; Caviness, C., *Crop Science* **1994,** *34* (2), 376-378.

35. Zeitlin, L.; Olmsted, S. S.; Moench, T. R.; Martinell, B. J.; Paradkar, V. M.; Russell, D. R.; Queen, C.; Cone, R. A.; Whaley, K. J., *Nature biotechnology* **1998,** *16* (13), 1361-1364.

36. Philip, R.; Darnowski, D. W.; Maughan, P. J.; Vodkin, L. O., *Plant Science* **2001,** *161* (2), 323-335.

37. Frias, J.; Song, Y. S.; Martínez-Villaluenga, C.; De Mejia, E. G.; Vidal-Valverde, C., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008,** *56* (1), 99-105.

38. Beyer, K.; Teuber, S., *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **2004,** *4* (3), 197-199.

39. Taylor, S. L.; Hefle, S. L., *Food Technology-Champaign then Chicago-* **2001,** *55* (9), 68-84.

40. Goodwin, P. R., *Journal of Association of Official Analytical Chemists International* **2004,** *87* (6), 1383-1390.

41. Westphal, C. D.; Pereira, M. R.; Raybourne, R. B.; Williams, K. M., *Journal of Association of Official Analytical Chemists International* **2004,** *87* (6), 1458-1465.

42. Mittag, D.; Vieths, S.; Vogel, L.; Becker, W.-M.; Rihs, H.-P.; Helbling, A.; Wüthrich, B.; Ballmer-Weber, B. K., *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2004,** *113* (1), 148-154.

43. Holzhauser, T.; Wackermann, O.; Ballmer-Weber, B. K.; Bindslev-Jensen, C.; Scibilia, J.; Perono-Garoffo, L.; Utsumi, S.; Poulsen, L. K.; Vieths, S., *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2009,** *123* (2), 452-458.

44. Wilson, S.; Blaschek, K.; de Mejia, E. G., *Nutrition Reviews* **2005,** *63* (2), 47-58.

45. Sanford, J. C., *Trends in Biotechnology* **1988,** *6* (12), 299-302.

46. Chilton, M.-D.; Drummond, M. H.; Merlo, D. J.; Sciaky, D.; Montoya, A. L.; Gordon, M. P.; Nester, E. W., *Cell* **1977,** *11* (2), 263-271.

47. Rogers, S. G.; Horsch, R. B.; Fraley, R. T., *Methods in Enzymology* **1986,** *118*, 627-640.

48. Chilton, M.-D.; Tepfer, D. A.; Petit, A.; David, C.; Casse-Delbart, F.; Tempé, J., *Nature* **1982,** *295* (5848), 432-434.

49. van Wordragen, M. F.; Dons, H. J., *Plant Molecular Biology Reporter* **1992,** *10* (1), 12-36.

50. Fisk, H. J.; Dandekar, A. M., *Scientia Horticulturae* **1993,** *55* (1-2), 5-36.

51. Bundock, P.; den Dulk-Ras, A.; Beijersbergen, A.; Hooykaas, P., *The European Molecular Biology Organization Journal* **1995,** *14* (13), 3206.

52. Parrott, W. A.; Hoffman, L. M.; Hildebrand, D. F.; Williams, E. G.; Collins, G. B., *Plant Cell Reports* **1989,** *7* (8), 615-617.

53. Trick, H. N.; Finer, J. J., *Transgenic Research* **1997,** *6* (5), 329-336.

54. Frizzel, L., *Ultrasound, its Chemical, Physical and Biological Effects* **1988**.

55. Zhang, L.-J.; Cheng, L.-M.; Xu, N.; Zhao, N.-M.; Li, C.-G.; Yuan, J.; Jia, S.-R., *Nature Biotechnology* **1991,** *9* (10), 996-997.

56. King, J. L.; Finer, J. J.; McHale, L. K., *Plant Cell Reports* **2015,** *34* (1), 133-40.

57. Santarém, E. R.; Trick, H. N.; Essig, J. S.; Finer, J. J., *Plant Cell Reports* **1998,** *17* (10), 752-759.

58. Marion, J.; Bach, L.; Bellec, Y.; Meyer, C.; Gissot, L.; Faure, J. D., *The Plant Journal* **2008,** *56* (1), 169-179.

59. Wroblewski, T.; Tomczak, A.; Michelmore, R., *Plant Biotechnology Journal* **2005,** *3* (2), 259-273.

60. Chen, X.; Equi, R.; Baxter, H.; Berk, K.; Han, J.; Agarwal, S.; Zale, J., *Biotechnology of Biofuels* **2010,** *3*, 9.

61. Hellens, R. P.; Allan, A. C.; Friel, E. N.; Bolitho, K.; Grafton, K.; Templeton, M. D.; Karunairetnam, S.; Gleave, A. P.; Laing, W. A., *Plant Methods* **2005,** *1* (1), 13.

62. Sparkes, I. A.; Runions, J.; Kearns, A.; Hawes, C., *Nature Protocols* **2006,** *1* (4), 2019.

63. Manavella, P. A.; Chan, R. L., *Nature Protocols* **2009,** *4* (11), 1699.

64. Andrieu, A.; Breitler, J. C.; Siré, C.; Meynard, D.; Gantet, P.; Guiderdoni, E., *Rice* **2012,** *5* (1), 23.

65. English, J. J.; Davenport, G. F.; Elmayan, T.; Vaucheret, H.; Baulcombe, D. C., *The Plant Journal* **1997,** *12* (3), 597-603.

66. Yang, Y.; Zhang, X.; Yu, B., *Natural Products Reports* **2015,** *32* (9), 1331-1355.

67. Zottini, M.; Barizza, E.; Costa, A.; Formentin, E.; Ruberti, C.; Carimi, F.; Schiavo, F. L., *Plant Cell Reports* **2008,** *27* (5), 845-853.

68. Van der Hoorn, R. A.; Laurent, F.; Roth, R.; De Wit, P. J., *Molecular Plant Microbe Interactions Journal* **2000,** *13* (4), 439-446.

69. Nagamatsu, A.; Masuta, C.; Senda, M.; Matsuura, H.; Kasai, A.; Hong, J. S.; Kitamura, K.; Abe, J.; Kanazawa, A., *Plant Biotechnology Journal* **2007,** *5* (6), 778-790.

70. Zhang, C.; Yang, C.; Whitham, S. A.; Hill, J. H., *Molecular Plant Microbe Interactions Journal* **2009,** *22* (2), 123-131.

71. Byrne, M. C.; McDonnell, R. E.; Wright, M. S.; Carnes, M. G., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **1987,** *8* (1), 3-15.

72. Meurer, C.; Dinkins, R.; Collins, G., *Plant Cell Reports* **1998,** *18* (3-4), 180-186.

73. Cervera, M., *Transgenic plants: Methods and protocols* **2004**, 203-213.

74. Jefferson, R. A.; Burgess, S. M.; Hirsh, D., *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1986,** *83* (22), 8447-8451.

75. Jefferson, R. A.; Kavanagh, T. A.; Bevan, M. W., *The European Molecular Biology Organization Journal* **1987,** *6* (13), 3901.

76. Vancanneyt, G.; Schmidt, R.; O'Connor-Sanchez, A.; Willmitzer, L.; Rocha-Sosa, M., *Molecular and General Genetics* **1990,** *220* (2), 245-250.

77. Serres, R.; McCown, B.; Zeldin, E., *Plant Cell Reports* **1997,** *16* (9), 641-646.

78. Kirchner, G.; Kinslow, C. J.; Bloom, G. C.; Taylor, D. W., *Plant Molecular Biology Reporter* **1993,** *11* (4), 320-325.

79. Martin, T.; Wöhner, R.; Hummel, S.; Willmitzer, L.; Frommer, W. B., *GUS Protocols* **1992**, 23-39.

80. Prasher, D. C.; Eckenrode, V. K.; Ward, W. W.; Prendergast, F. G.; Cormier, M. J., *Gene* **1992,** *111* (2), 229-233.

81. Lux, A.; Nimmerjahn, F., Impact of differential glycosylation on IgG activity. In *Crossroads between Innate and Adaptive Immunity III*, Springer: **2011**; 113-124.

82. Shrimal, S.; Cherepanova, N. A.; Gilmore, R., *Seminars in Cell and Developmental Biology* **2015,** *41*, 71-8.

83. Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N., *Biochimica and Biophysica Acta* **1999,** *1473* (1), 4-8.

84. Padler-Karavani, V.; Varki, A., *Xenotransplantation* **2011,** *18* (1), 1-5.

85. Ghaderi, D.; Zhang, M.; Hurtado-Ziola, N.; Varki, A., *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* **2012,** *28*, 147-175.

86. Weiner, L. M.; Surana, R.; Wang, S., *Nature Reviews Immunology* **2010,** *10* (5), 317-327.

87. Hořejší, V.; Bartůňková, J., *Základy imunologie*. Triton: 1998; Vol. 3.

88. Zeitlin, L.; Whaley, K. J.; Olinger, G. G.; Jacobs, M.; Gopal, R.; Qiu, X.; Kobinger, G. P., *Current Opinion in Virology* **2016,** *17*, 45-49.

89. Prevail, I.; Team, M.-N. P. I. S., *The New England Journal of Medicine* **2016,** *375* (15), 1448.

90. Sarrion-Perdigones, A.; Vazquez-Vilar, M.; Palací, J.; Castelijns, B.; Forment, J.; Ziarsolo, P.; Blanca, J.; Granell, A.; Orzaez, D., *Plant Physiology* **2013,** *162* (3), 1618-1631.

91. Sainsbury, F.; Lomonossoff, G. P., *Plant Physiology* **2008,** *148* (3), 1212-1218.

92. Halweg, C.; Thompson, W. F.; Spiker, S., *The Plant Cell* **2005,** *17* (2), 418-429.

93. Fortin, C.; Nester, E. W.; Dion, P., *Journal of Bacteriology* **1992,** *174* (17), 5676-5685.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	**Číslo OP**	**Datum vypůjčení**	**Poznámka**