

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Transformácia jačmenného *Hvabc1* génu do tabaku

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Marek Kucej
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný obor:	Biotechnológia a génové inžinierstvo
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok:	2018

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne, s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Zb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bol som oboznámený s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Zb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa.....

.....

Marek Kucej

Pod'akovanie

Ďakujem Ing. Ludmile Ohnoutkovej, Ph.D. za odborné vedenie a cenné rady pri vypracovávaní bakalárskej práce. Ďalej chcem poďakovať Mgr. Tomášovi Vlčkovi a Ing. Tomášovi Takáčovi, Ph.D. za odbornú a technickú pomoc pri vykonávaní experimentálnej činnosti.

Bibliografická identifikácia:

Meno a priezvisko autora	Marek Kucej
Názov práce	Transformácia jačmenného <i>Hvabc1</i> génu do tabaku
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Centrum regiónu Haná pre biotechnologický a poľnohospodársky výskum, Oddelenie chemickej biológie a genetiky
Vedúci práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Záujmový jačmenný gén <i>Hvabc1</i> je ortológ génu <i>Atwbc19</i>, ktorý v nadexpresii udeľuje transgénemu tabaku rezistenciu voči antibiotiku kanamycínu. Transformáciou génu <i>Hvabc1</i> do tabaku bude overená jeho funkcia. Realizáciou navrhutej klonovacej stratégie bol pripravený expresný vektor obsahujúci záujmový gén <i>Hvabc1</i>. Expresný vektor pCBA::<i>Hvabc1</i> bol transformovaný do baktérií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>. Modifikované baktérie boli použité na transformáciu tabaku (<i>Nicotiana tabacum</i> L., cv. Xanthi). Transformované explantáty a regenerované rastliny boli selektované na médiu s obsahom antibiotika kanamycínu. Tranzientnou transformáciou tabaku bola potvrdená správnosť pripraveného konštruktu.</p>
Kľúčové slová	transformácia, tabak, <i>A. tumefaciens</i> , <i>Atwbc19</i>
Počet strán	54
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification:

Author	Marek Kucej
Title	Transformation of barley <i>Hvabc1</i> gene into tobacco
Type of thesis	Bachelor
Department	Centre of region Hana for biotechnological and agricultural research, Department of chemical biology and genetics
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>The barley gene of interest, <i>Hvabc1</i>, is orthologous to the gene <i>Atwbc19</i>, which when overexpressed, confers resistance to antibiotic kanamycin in transgenic tobacco. The function of <i>Hvabc1</i> gene will be determined by transformation into tobacco. The proposed cloning strategy was carried out and expression vector containing the gene of interest <i>Hvabc1</i>, was prepared as a result. The expression vector pCBA::<i>Hvabc1</i> was transformed into bacteria <i>Agrobacterium tumefaciens</i>. Modified bacteria were used for tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i> L., cv. Xanthi) transformation. Transformed explants and regenerated plants underwent a selection process on a medium containing an antibiotic kanamycin. Transient transformation confirmed that the prepared construct was functional.</p>
Key words	transformation, tobacco, <i>A. tumefaciens</i> , <i>Atwbc19</i>
Number of pages	54
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	11
2.1 Metódy transformácie rastlín	11
2.2 Transformácia prostredníctvom <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
2.2.1 Mechanizmus transformácie prostredníctvom <i>A. tumefaciens</i>	12
2.2.2 Regenerácia rastlín z transformovaných buniek	13
2.2.3 Prvá transgénna rastlina	13
2.3 Rastlinný „molecular farming“	14
2.3.1 Produkcia terapeutických proteínov v tabaku	15
2.3.2 Proteínové antibiotiká proti pneumónii	15
2.3.3 Inhibítor transmisie HIV–1 grifitsín	16
2.3.4 Biologicky aktívny ľudský erytropoetín	16
2.4 Rastlinne produkované vakcínové antigény	17
2.4.1 Vakcína proti cholere a malárii	17
2.4.2 Hemaglutinín proti kmeňu vtácej chrípky	18
2.4.3 Cholera toxín B–proinzulín fúzny proteín	18
2.5 Produkcia protilátok v rastlinách	19
2.5.1 Anti–Lewis Y monoklonálna protilátka	19
2.5.2 Idiotypové vakcíny na liečbu non–Hodgkinovho lymfómu	20
2.6 Rezistencia rastlín voči hmyzu a tolerancia k herbicídom	20
2.6.1 Bt tabak	21
2.6.2 Expresia mutantného <i>aroA</i> génu v tabaku	21
2.7 Fytoremediácia	22
2.7.1 Transformácia TNT rastlinami tabaku	22

2.8 Gén <i>Atwbc19</i>	23
2.8.1 Ortológne gény	23
2.8.2 ABC transportéry	24
2.8.3 Nadexpresia génu <i>Atwbc19</i> v tabaku	24
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	26
3.1 Materiál	26
3.1.1 Rastlinný materiál	26
3.1.2 Bakteriálny materiál	26
3.1.3 Zaujmový gén <i>Hvabc1</i>	26
3.1.4 Zoznam použitých chemikálií a roztokov	27
3.1.5 Zoznam použitých prístrojov	28
3.2 Metódy	29
3.2.1 Realizácia klonovacej stratégie	29
3.2.2 Tranzientná expresia	31
3.3 Metodické postupy	32
3.3.1 Linearizácia vektoru pDONR207:: <i>Hvabc1</i>	32
3.3.2 Elektroforéza na agarózovom gély	32
3.3.3 LR klonázová reakcia	32
3.3.4 Transformácia <i>E. coli</i> DH5 α teplotným šokom	33
3.3.5 Izolácia plazmidovej DNA	34
3.3.6 Transformácia <i>A. tumefaciens</i> teplotným šokom	34
3.3.7 Príprava rastlín tabaku na transformáciu	35
3.3.8 Transformácia listových diskov tabaku	36
3.3.9 Tranzientná transformácia tabaku	37
3.3.10 GUS histochemická reakcia	38

4 VÝSLEDKY	39
4.1 Realizácia klonovacej stratégie	39
4.2 Transformácia tabaku	42
4.3 Tranzientná transformácia tabaku	44
5 DISKUSIA	45
6 ZÁVER	47
7 LITERATÚRA	48
8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	53

CIELE PRÁCE

Teoretická časť

- Vypracovanie literárnej rešerše na tému bakalárskej práce.

Praktická časť

- Realizácia navrhutej klonovacej stratégie a overenie správnosti pripraveného konštruktu, vrátane záujmového génu.
- Vykonať transformáciu expresného vektoru do *Agrobacterium tumefaciens* a overiť správnosť vnesenia.
- Príprava rastlín tabaku na transformáciu a kultivácia rastlín v *in vitro* podmienkach.
- Vykonanie transformácie a selekcia transformovaných pletív.
- Vyhodnotenie procesu selekcie a transformácie.

1 ÚVOD

Transformácia rastlín je proces, ktorým je DNA vložená do rastlinných buniek a pletív. Použitá DNA môže pochádzať z akéhokoľvek organizmu. Rekombinantná technológia prenosu génov sa stala súčasťou základnej technológie manipulácie rastlín pre vedecké i komerčné účely. Transgénné rastliny sú vhodné na skúmanie regulácie rastlinných génov. Taktiež sú využiteľné na identifikáciu a posúdenie poľnohospodársky prospešných génov a ich následné vloženie do komerčne významných plodín (Dandekar a Fisk, 2005).

Tabak je jednoročná bylina patriaca do rodu *Nicotiana*, čeľade *Solanaceae*. Pôvodne bola rozšírená v tropickej a subtropickej Amerike, juhozápadnej Afrike, Austrálii a južnom Pacifiku. Medzi najvýznamnejšie druhy patrí *Nicotiana tabacum*, *N. benthamiana*, *N. attenuata* či *N. rustica*. Momentálne je kultivovaná celosvetovo, ako primárny zdroj tabaku, ktorý je fajčený či žutý ako droga pre svoje mierne stimulačné účinky (Goodin *et al.*, 2008, Koob *et al.*, 2014).

Tabak sa stal modelovým objektom pre pletivové kultúry a génové inžinierstvo. Murashige a Skoog (1962) vytvorili médium na základe štúdií s tabakovými kultúrami, ktoré sa dnes využíva ako kultivačné médium pre stovky rastlinných druhov. Štúdie na tabakovom pletive ozrejmili spôsoby kontroly *in vitro* rastu a diferenciácie. Úspešne dosiahnutá bola indukcia haploidov, tvorba embryí odvodených z mikrospóry a prvýkrát bola dosiahnutá i fúzia rastlinných protoplastov. Transgénny tabak je významný pre vývoj v oblasti produkcie rekombinantných proteínov, vakcín a protilátok tzv. rastlinný „molecular farming“ (Ganapathi *et al.*, 2004).

Zaujímavý jačmenný gén, *Hvabc1*, je ortológ génu *Atwbc19* z *Arabidopsis thaliana*, ktorý kóduje „ATP binding cassette“ (ABC) transportér z rodiny „White–Brown Complex“. Gén *Atwbc19* v nadexpresii udeľuje rezistenciu voči kanamycínu u transgénného tabaku (Mentewab a Stewart, 2005), melónu cukrového (Bombale *et al.*, 2010) a hybridného topol'a (Kang *et al.*, 2010). Hybridný topol' vykazoval rezistenciu voči ďalším trom aminoglykozidovým antibiotikám: neomycínu, geneticínu a paromomycínu. Transformáciou génu *Hvabc1* do tabaku bude overená jeho funkcia. Sledovaná bude prípadná podobnosť s vplyvom génu *Atwbc19*, na rezistenciu rastlín voči antibiotiku kanamycínu.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Metódy transformácie rastlín

Metódy genetickej transformácie rastlín sa rozdeľujú na metódy priame a nepriame. Priame metódy sa označujú ako fyzikálne a sú založené na penetrácii bunkovej steny. Elektroporácia je bežne využívaná na transport biochemických látok ako lipidy, proteíny, RNA a DNA do vnútra buniek. Pri elektroporácii dochádza k vytvoreniu pórov na povrchu buniek v dôsledku zmeny polarít membrány v elektrickom poli (Bates *et al.*, 1983; Hofmann a Evans, 1986; Saulis *et al.*, 1991). Elektroporácia sa využíva pri transformácii protoplastov, t.j. buniek zbavených bunkovej steny. Biolistika je založená na vnesení mikročastíc o vysokej hustote obalených DNA a ich nastrení na cieľové rastlinné pletivo. Biolistika môže byť použitá na transformáciu buniek, protoplastov, organizovaných pletív, embryí alebo kalusu. (Sanford *et al.*, 1993). Transformované môžu byť priamo subcelulárne organely, ako jadro či chloroplasty (Boynton *et al.*, 1988). Hlavné aplikácie biolistiky vo výskume rastlín zahŕňajú štúdie tranzientnej expresie génov, produkcia transgénnych rastlín a inokulácia rastlín vírovými patogénmi (Southgate *et al.*, 1995; Sanford, 2000; Taylor a Faquet, 2002).

Metóda vákuovej infiltrácie kombinuje priamy a nepriamy prístup transformácie prostredníctvom baktérií rodu *Agrobacterium*. Vákuum generuje negatívny atmosférický tlak, ktorý spôsobuje zúženie vzdušného priestoru medzi bunkami a umožňuje penetráciu baktérii do medzibunkových priestorov. Výhody vákuovej infiltrácie sú napríklad vytvorenie mnoho nezávisle transformovaných rastlín z jedinej rastliny, redukcia somaklonálnej variácie a možnosť výkonného testovania vďaka rýchlemu procesu transformácie (Bechtold a Pelletier, 1998; Rivera *et al.*, 2002).

Nepriame metódy transformácie sú založené na sprostredkovaní transferu DNA pomocou vhodného vektoru. Medzi nepriame metódy patrí transformácia rastlín prostredníctvom baktérií rodu *Agrobacterium* (podkap. 2.2) alebo prostredníctvom vírových vektorov. Transformácia rastlín vírovými vektormi sa využíva pri tranzientnej produkcii heterológnych proteínov priemyselného významu. Vyvinuté boli vektory prvej a druhej generácie. Vektory prvej generácie sú v podstate funkčné vírusy, ktoré exprimujú okrem vírových génov aj kódovaciú sekvenciu záujmového proteínu. Proteín záujmu je exprimovaný zo silného vírového promotora.

Druhá generácia vírových vektorov využíva *Agrobacterium* ako vektor pre prenos DNA kópii jedného alebo viacerých RNA replikónov do rastlinných buniek (Gleba *et al.*, 2007).

2.2 Transformácia prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens je pôdna baktéria, ktorá spôsobuje u dvojkličnolistových rastlín vznik krčkových nádorov. Infikuje poranené miesta na rastline, kde následne dochádza k proliferácii buniek a vzniku nádoru a syntéze derivátu arginínu opínu (napr. nopalín, oktopín). Opíny sú infikujúcimi baktériami degradované a využité ako zdroj energie. Schopnosť *A. tumefaciens* vytvárať nádory je riadená genetickou informáciou uloženou na Ti-plazmide, ktorý obsahuje dve dôležité oblasti: T-DNA a oblasť *vir*. Počas procesu transformácie je T-DNA vyštiepená z Ti-plazmidu, prenesená do rastlinnej bunky a integrovaná do jej DNA. T-DNA vo svojom úseku obsahuje niektoré gény, ktoré kódujú enzýmy, katalyzujúce syntézu fytohormónov (indol-3-octová kyselina, izopentenyladenozín). Fytohormóny sú zodpovedné za nádorový rast buniek. Oblasť *vir* obsahuje gény potrebné na vyštiepenie, prenos a začlenenie T-DNA behom procesu transformácie. Virulentné gény sú indukateľné fenolickými látkami, ktoré vypúšťa rastlina v mieste poranenia. Fenolickou látkou, je napríklad acetosyringón. Pridaním fenolických látok ku rastlinným bunkám je možné zvýšiť rýchlosť transformácie. V praxi sa využívajú „odzbrojené“ kmene *A. tumefaciens*, ktoré majú odstránené úseky T-DNA zodpovedajúce za vznik nádorov (Snustad a Simmons, 2009).

2.2.1 Mechanizmus transformácie prostredníctvom *A. tumefaciens*

Agrobacterium je priťahované k aminokyselinám, cukrom a organickým kyselinám, ktoré sú vylučované poraneným rastlinným pletivom. Reaguje na tieto chemoatraktanty tým, že vyhľadá poranené bunky, ktoré ich vytvárajú a naviaže sa na ne polárnym prípojným mechanizmom (Winans, 1992; Tzfira a Citovsky, 2002). Behom pripojenia nastáva koordinovaná expresia génových operónov nevyhnutných pre prenos génov (Stachel a Zambryski, 1985). Operóny *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, a *virG* predstavujú „*vir* regulón“ a sú regulované *virA/virG* dvoj-komponentovým systémom. Fenolické látky a monosacharidy spôsobujú autofosforyláciu *virA* transmembránovej receptorovej kinázy, ktorá fosforyluje cytoplazmatický transkripčný faktor *virG*. Aktivovaný *virG* stimuluje transkripciu individuálnych *vir* operónov (Winans, 1992; Zupan *et al.*, 2000).

Génové produkty generované transkripciou z *vir* operónov vykonávajú funkcie potrebné pre prenos T–DNA do rastlinných buniek. Génové produkty *virD1* a *virD2* sú kooperatívne zodpovedné za vyňatie T–vlákna, ktorý sa nachádza medzi pravou a ľavou hraničnou sekvenciou. Proteín *virD2* sa viaže kovalentne na 5' koniec T–vlákna, ktoré je následne obalené proteínom *virE2* v baktérii alebo *in planta* a vzniká T–komplex. T–komplex je exportovaný bakteriálnym sekrečným systémom, ktorý je kódovaný *virB* operónom a *virD4*. Oba proteíny *virD2* a *virE2* obsahujú jadrové lokalizačné sekvencie, ktoré interagujú s rastlinnými komponentmi (Chilton *et al.*, 1977; Tzfira a Citovsky, 2002). Keď sa T–vlákno dostane do jadra, je integrované do rastlinného genómu cez nehomologickú rekombináciu sprostredkovanú rastlinnými proteínmi, ktoré sa zúčastňujú rekombinačných alebo opravných procesov v rastline (Ziemienowicz *et al.*, 2000; van Attikum *et al.*, 2001).

2.2.2 Regenerácia rastlín z transformovaných buniek

Po stabilnej integrácii DNA do rastlinnej bunky, je ďalším krokom regenerácia rastliny z transformovaných buniek. Pozícia, frekvencia a miera regenerácie sú dôležité pre izoláciu transgénnych rastlín. Najčastejšie, je limitujúcim krokom izolácie transgénnych rastlín nedostatok regenerácie z transgénnych bunkových línií. Existuje veľká variabilita vo frekvencii a miere regenerácie medzi rôznymi krytosemennými druhmi, ako aj medzi rozdielnymi kultivarmi istého druhu (Vernade *et al.*, 1988). U väčšiny krytosemenných rastlín boli pozorované dva druhy regenerácie, a to organogéza a somatická embryogéza. Organogéza predstavuje regeneráciu adventívnych výhonov a koreňov cez vytvorenie organizovaných, meristémových pletív. Somatická embryogéza predstavuje vytvorenie embryí alebo embryu podobných štruktúr zo somatických pletív (Dandekar, 1994).

2.2.3 Prvá transgéna rastlina

Barton *et al.* (1983) transformovali tabak prostredníctvom *A. tumefaciens*. Do „rooty locus“ oblasti T–DNA boli vložené klonované sekvencie pre kvasničnú alkohol dehydrogenázu I (ADH I) a bakteriálnu neomycín fosfotransferázu. Kvasničný gén však nebol v rastlinách tabaku exprimovaný. Inzerciou génov do „rooty locus“, však boli vypnuté koreňové mutácie. Týmto krokom, bola prekonaná prekážka pri neschopnosti transformovaných rastlín tvoriť korene a boli regenerované zdravé transgéne rastliny tabaku.

Bevan *et al.* (1983) transformovali tabak génom pre rezistenciu voči antibiotikám. Jednalo sa o gén, odvodený z Tn5 transpozónu, kódujúci enzým neomycín fosfotransferázu II (*neo*). Kódujúca oblasť *neo* bola pod kontrolou nopalín syntázového promotora, konštrukt obsahoval natívny terminátor. Baktérie *A. tumefaciens* nesúce rekombinantný Ti-plazmid boli použité na indukciu tumorov na sterilných stonkových explantátoch *N. tabacum*. Expresia bakteriálneho génu sa prejavila vo zvýšení rezistencie tumorov voči antibiotiku G418.

Rastová krivka neo^+ (AUG iniciačný kodón priľahlý ku promotoru) a neo^- (reverzná orientácia) tumorov bola hodnotená na MS médiu s prídavkom G418. Tumory s neo^- konštruktom prestali rásť pri koncentráciách $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a vyšších, podobne ako kontrolné prírodné tumory. Tumory nesúce neo^+ gén nevykazovali znížený rast po koncentracie G418 15 až $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Výsledky demonštrovali, že chimérny gén zostavený s T-DNA regulačnej, bakteriálnej kódujúcej a T-DNA terminačnej sekvencie je transkribovaný v rastlinných bunkách. Očakávaná enzýmová aktivita asociovaná s transláciou transkriptu, sa prejavila na zvýšenej rezistencii rastlinných buniek voči antibiotiku G418.

2.3 Rastlinný „molecular farming“

Rastlinný „molecular farming“ (PMF) referuje na produkciu rekombinantných proteínov a iných sekundárnych metabolitov v rastlinách. PMF zahŕňa pestovanie, žatie, transport, uskladnenie a „downstream processing“ extrakcie a purifikácie proteínu (De Wilde *et al.*, 2002). Prvý rekombinantný rastlinný farmaceutický proteín, ľudský rastový hormón, bol vyprodukovaný v roku 1986 v tabaku a slnečnici (Barta *et al.*, 1986). V roku 1997, bol prvý krát pre komerčný účel vyprodukovaný rekombinantný proteín avidín v transgénej kukurici (Hood *et al.*, 1997). Odvtedy bolo potvrdené, že rastliny dokážu produkovať aj komplexnejšie cicavčie proteíny s terapeutickou aktivitou, ako ľudské sérové proteíny a rastové regulátory, vakcíny, hormóny, cytokíny, enzýmy a protilátky (Liénard *et al.*, 2007). Rastliny majú potenciál produkovať farmaceutiká vo veľkom množstve a cenovo menších reláciách, než je produkcia tradičnými metódami. Existuje ešte však mnoho výziev pre výrobu, a to doterajšia kolísavá produkcia, rastlinná glykozylácia a problémy pri „downstream processingu“. Aktuálne prekážky tak zatiaľ zamedzili vývoj PMF farmaceutík v klinickej a priemyselnej praxi (Yao *et al.*, 2015).

2.3.1 Produkcia terapeutických proteínov v tabaku

Tabak patrí medzi hlavné plodiny pre „molecular farming“ a ponúka viacero výhod oproti ostatným plodinám. Vytvára množstvo listovej biomasy, má vysoký obsah rozpustných proteínov a nie je jedlý, čím sa minimalizuje kontaminácia potravinového reťazca. Výhodou je tiež flexibilita a efektívnosť genetickej transformácie a regenerácie tabaku. Tabak ponúka rôzne možnosti produkcie záujmových proteínov: produkcia založená na tranzientnej expresii cez agrobaktérium alebo vírovú indukciu, či stabilnú produkciu založenú na jadrovom a chloroplastovom genóme. V tabaku je možné vyrobiť množstvo terapeutických proteínov, vrátane protilátok, vakcín a imunomodulačných molekúl ako sú cytokíny. Tranzientnou produkciou proteínov, je tabak schopný v krátkom čase generovať kvantá proteínu potrebného napríklad pri rapidnej odpovedi na vypuknutie epidémií (Tremblay *et al.*, 2010).

2.3.2 Proteínové antibiotiká proti pneumónii

Oey *et al.* (2009) vytvorili stratégiu, ktorá umožňuje produkciu proteínov v plastidoch tabaku, ktoré sú toxické pre *Escherichia coli*. Stratégia je založená na blokovaní transkripcie v *E. coli* bakteriálnymi transkripčnými terminátormi pred génom záujmu, a ktoré sú vyňaté *in planta* miestne–špecifickými rekombinázami. V štúdií demonštrovali aplikáciu tejto stratégie na vysoko–stupňovú produkciu dvoch proteínových antibiotík, odvodených z fágov napádajúcich *Streptococcus pneumoniae*. Identifikované boli dva veľmi efektívne lyzíny: Cpl1, lyzozým hydrolyzujúci polysacharidové reťazce v bakteriálnej bunkovej stene a Pal, amidáza štiepiaca spojovacie peptidy siete peptidoglykán. Akumulácia proteínov dosiahla hodnoty približne 30 % TSP u Pal ($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) a približne 10 % TSP u Cpl1 ($0,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Biologická aktivita bola proteínov bola stanovená, podľa schopnosti efektívne zabiť *S. pneumoniae*. Na zabitie baktérii v 1 ml hustej kultúry do hodiny stačilo 100 μg Pal a 200 μg Cpl1. Proteíny pracovali synergicky a ich kombinácia mala zosilnené účinky. Lyzíny Pal a Cpl1 sú použiteľné na kontrolu alebo elimináciu kolonizácie nosohltanu pneumokokmi. Efektívna syntéza týchto proteínov bola krokom vpred pri zvládaní celosvetového rozšírenia rezistencie k antibiotikám u pneumokokov.

2.3.3 Inhibítor transmisie HIV–1 grifitsín

O’Keefe *et al.* (2009) vyrobili v *N. benthamiana* jeden z najúčinnějších inhibítorov transmisie HIV, proteín grifitsín (GRFT) z červenej riasy *Griffithsia*. Rastliny boli transdukované vektorom založenom na víruse tabakovej mozaiky, ktorý exprimoval rastlinný grifitsín (GRFT–P). Akumulácia GRFT–P dosiahla hodnoty viac ako 1 gram rekombinantného proteínu na kilogram listového materiálu. *In vitro* anti–HIV aktivita rastlinného grifitsínu, pri inhibícii cytopatických efektov HIV–1_{RF}, bola testovaná na T–lymfoblastických CEM–SS bunkách. Rastlinný proteín vykazoval vysokú aktivitu s hodnotou EC₅₀ 0,156 nM. V porovnaní s pôvodným GRFT (EC₅₀ 0,054 nM) bol menej účinný.

Prevenia pred infikovaním HIV–1 bola testovaná u ľudských explantátov z krčka maternice. Explantáty boli infikované CCR5–tropickým HIV–1 podtypom B, kmeňom BaL. Rastlinný GRFT–P bol vysoko potentný inhibítor infekcie u explantátov z krčka maternice, a bol desaťkrát účinnejší pri prevencii infekcie ako látka kyanovirín–N s virucídnymi účinkami. Testovala sa taktiež infekcia migrujúcich buniek do média, ako vzor pre transmisiu z bunky na bunku. Rastlinný GRFT–P úplne limitoval infekciu pri nízkych koncentráciách ako 100 pM. GRFT–P nevykazoval mitogénne účinky na ľudských lymfocytoch ani iritačné, alebo zápalové účinky *in vitro*, ani *in vivo*, pri testoch na králikoch. Spĺňa teda požiadavky ako mikrobicídna látka, je možné ho produkovať lacno a vo veľkej miere a je účinný už pri pikomolárnych koncentráciách.

2.3.4 Biologicky aktívny ľudský erytropoetín

Gurusamy *et al.* (2017) produkovali rekombinantný ľudský erytropoetín (rhEPO) v koreňovej kultúre tabaku a regenerovaných rastlinách *Nicotiana tabacum*. Transformácia prebehla prostredníctvom *A. rhizogenes*. Vnútrubunková koncentrácia rhEPO bola vyčíslená na 66,75 ng·g⁻¹ celkového rozpustného proteínu (TSP). Maximálna mimobunková sekrécia bola vyčíslená na 185,48 pg·g⁻¹ z 20–dňových koreňových kultúr. rhEPO bol taktiež detegovaný u listov T₀ generácie regenerovaných rastlín, a to 14,8 ng·g⁻¹ TSP.

Biologická aktivita bola potvrdená v MTT teste u sietnicových pigmentovaných epitelových bunkách (ARPE) kedy po pridaní vyprodukovaného rhEPO došlo k úmerne 6,4–násobnému rastu pri koncentrácií 1 ng·ml⁻¹ ako u kontroly. Efekt bol testovaný taktiež testom bunkovej proliferácie využitím BrdU. Koncentrácia rhEPO

bola $1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ a došlo k úmerne trojnásobnému nárastu bunkového delenia. Maximálne hodnoty dosiahli rastliny transformované konštruktom s prítomnosťou cal signálneho peptidu (smerovanie do ER), ktorý bol nevyhnutný i pre sekréciu rhEPO do média.

2.4 Rastlinne produkované vakcínové antigény

Rastlinné bunky sú vhodné bioreaktory na produkciu vakcín a ich následné podávanie či už orálne, alebo injekčne po purifikácii terapeutického proteínu. Eliminujú tak drahé prostriedky fermentácie, uskladnenia v mraze, transportu a sterilného podania. Na produkciu sa využívajú jadrové a chloroplastové expresné systémy či tranzientné vírové systémy (Daniell *et al.*, 2009). Spoločnosť Mapp Biopharmaceutical, Inc. so sídlom v San Diegu vyprodukovala liek v tabakových listoch s názvom ZMapp™, ktorý bol použitý pri boji voči rozšíreniu vírusu eboly v Afrike v roku 2014 (Arntzen, 2015). V októbri 2014, sedem infikovaných pacientov prijalo skorú liečbu experimentálnym ZMapp™ a kompletne sa zotavili. Ďalší pacient v novembri 2014 prijal neskorú liečbu ZMapp™, pacient však chorobe podľahol. Spoločnosť Planet Biotechnology, Inc. vyprodukovala imunoadhezín (DPP4–Fc) v transgénnom tabaku (planetbiotechnology.com – Planet Biotechnology Inc.). Purifikovaný DPP4–Fc sa silne viaže na MERS–CoV a zabraňuje vírusu infikovať pľúcne bunky (Yao *et al.*, 2015).

2.4.1 Vakcína proti cholere a malárii

Davoodi–Semromi *et al.* (2010) vytvorili vakcínu, ktorá udeľuje duálnu imunitu voči cholere a malárii. Podjednotka toxínu B (CTB) cholery (*Vibrio cholerae*) bola pripojená k apikálnemu membránovému antigénu 1 (AMA1) a merozoovému povrchovému proteínu 1 (MSP1). Antigény boli exprimované v chloroplastoch tabaku. CTB–AMA1 a CTB–MSP1 proteíny sa akumulovali na 13,17 %, resp. 10,11 % TSP.

Deväť skupín myší bolo imunizovaných podkožne alebo orálne purifikovaným antigénom, alebo transplastomickými listami tabaku. Významné hodnoty titrov špecifických protilátok imunizovaných myší úplne inhibovali delenie parazita malárie a krížovo reagovali s natívnymi proteínmi parazita v imunoblotoch a imunofluorescenčných štúdiách. Ochrana voči toxínu cholery korelovala s CTB–špecifickými titrami črevných a sérových IgA a IgG1 u orálne imunizovaných myší, u podkožne imunizovaných myši len s IgG1. Zaznamenané boli taktiež zvýšené hodnoty interleukín– 10^+ T buniek, supresia interferónu– γ a absencia interleukínu–17 u zaočkovaných myší, naznačujúc imunitnú odpoveď cez Th1/Th2 dráhu.

Chloroplastové vakcíny, ktoré poskytujú dlhodobú duálnu imunitu (>300 dní) podľa štúdie predstavujú reálnu platformu pre dostupnú vakcináciu.

2.4.2 Hemaglutinín proti kmeňu vtácej chrípky

Shoji *et al.* (2009) pripravili v *N. benthamiana* rastlinný hemaglutinín, ktorý ochránil fretky pred infekciou kmeňom „A/Indonesia/05/05“ vírusu chrípky H5N1. Priemerný výnos bol $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ čerstvej biomasy. Myši imunizované rastlinným hemaglutinínom produkovali špecifické IgG1, IgG2a a IgG2b, naznačujúc imunitnú odpoveď cez Th1 aj Th2 dráhu. Fretky boli imunizované podkožne a intranazálne 45 μg , resp. 90 μg hemaglutinínu, po desiatich dňoch boli infikované homológym vírom vtácej chrípky. Všetky fretky imunizované hemaglutinínom prežili infekciu a preukazovali malú, či žiadnu stratu hmotnosti. V kontrolnej skupine došlo k veľkej strate hmotnosti a 50 % mortalite. Imunizované fretky nepreukazovali žiadne klinické symptómy, až na dvoch jedincov, kde boli symptómy limitované len na tečenie z nosa. Štúdia naznačila, že by rastliny boli vhodné systémy na rýchlu, veľkoplošnú produkciu vakcín proti chrípke v prípade pandemického rozšírenia vírusu.

2.4.3 Cholera toxín B–proinzulín fúzny proteín

Ruhlman *et al.* (2007) vytvorili fúzny proteín v transplastomických líniiach tabaku, ktorý ochránil myši pred vývinom inzultídy u neobéznych diabetických myší. Proteín sa skladal podjednotky toxínu B cholery a ľudského proinzulínu. Produkovaný bol v chloroplastoch. Fúzny proteín sa akumuloval na úrovni 16 % všetkých rozpustných proteínov. Proteín bol podaný diabetickým myšiam orálne v priebehu siedmich týždňov (8 mg podrvených tabakových listov). Pankreas myší vykazoval zníženú infiltráciu lymfocytov, inzulín produkujúce β bunky v pankreatických ostrovčekoch boli výrazne zachované, v kontraste so zlým stavom β buniek u negatívnej kontroly. Zachytená bola zvýšená produkcia imunosupresívnych cytokínov, ako interleukín–4 a interleukín–10, ako aj zvýšené sérové levely IgG1. Výsledky naznačujú, že tolerancia cez Th2 dráhu je pravdepodobným mechanizmom pre prevenciu pankreatickej inzultídy a zachovania inzulín produkujúcich β buniek. V štúdiu bola popísaná možnosť lacnej produkcie a podania ľudských terapeutických proteínov, a možná stratégia pre liečbu rôznych autoimunitných ochorení.

2.5 Produkcia protilátok v rastlinách

Produkcia protilátok v rastlinách bola prvýkrát publikovaná v roku 1989, kedy Hiatt *et al.* (1989) zostavili v tabaku z ťažkých a ľahkých reťazcov myši IgG1. Odvtedy boli vyprodukované úplné, chimerické a sekreторické IgG i IgA, IgM, jednoreťazcové Fv fragmenty, Fab fragmenty či variabilné domény ťažkých reťazcov. Komerčne dostupná, je napríklad chimerická IgG–IgA protilátka proti povrchovému antigénu *Streptococcus mutans*, ktorá zabráňuje rekolonizácii *S. mutans* spôsobujúceho zubný kaz (Ma *et al.*, 1998).

Rastliny sú vhodné na produkciu protilátok vďaka ich komplexnej glykozylácii, ktorá sa však líši od cicavčej, a schopnosti zostaviť štyri polypeptidové reťazce prepojené disulfidovými mostíkmi. Výhody rastlinnej produkcie oproti cicavčím systémom pozostávajú z nižšej ceny produkcie a absencie kontaminácie cicavčimi patogénmi. Ďalej možnosť produkcie vylepšených protilátok vďaka glykoizínierstvu. Nevýhodou je však napríklad proteolytická degradácia protilátok, ktorá predstavuje znížené výnosy i ekonomickú záťaž, či výdavky a problémy pri extrakcii a purifikácii protilátok (De Muynck *et al.*, 2010).

2.5.1 Anti–Lewis Y monoklonálna protilátka

Brodzik *et al.* (2006) opísali produkciu monoklonálnej protilátky BR55–2 (IgG2a) v transgénnom tabaku rozpoznávajúcu antigén Lewis Y oligosacharid (LeY), ktorý je nadexprimovaný ľudskými karcinómami, hlavne karcinómom prs a kolorektálnymi karcinómami. Ťažké a ľahké reťazce protilátky boli produkované oddelene a zostavené v bunkách transgénneho tabaku s nízkym obsahom alkaloidov. Úroveň expresie bola vysoká: 30 miligramov proteínu na kilogram čerstvých listov u T₁ generácie rastlín.

Špecificita protilátok bola testovaná na SK–BR3 ľudských bunkách rakoviny prs a SW948 kolorektálnych rakovinových bunkách nadexprimujúcich LeY. Pri ELISA teste mala protilátka výrazne väčšiu absorbciu k uvedeným bunkám ako u kontroly. Cytotoxicita bola testovaná u SK–BR3 buniek. Miera cytotoxicity dosiahla v ADCC teste 16.8 ± 4.0 % špecifickej lýzy, čo je podobný výsledok ako u myšej protilátky ($20,2 \pm 3.1$ %).

Skúmala sa taktiež schopnosť protilátky spomaliť rast kolorektálneho tumoru (SW948 bunky). Po 35 dňoch bol objem tumoru výrazne menší ako u kontroly (607 mm^3 , $P < 0,002$). Po 25 dňoch sa však oproti myšej protilátke rast tumoru zvýšil,

naznačujúc kratší polčas rozpadu rastlinnej protilátky. Štúdia potvrdila, že rastlinná protilátka BR55–2 preukazuje biologickú aktivitu vhodnú pre imunoterapiu rakoviny.

2.5.2 Idiotypové vakcíny na liečbu non–Hodgkinovho lymfómu

McCormick *et al.* (2003, 2008) vyvinuli personalizovanú rekombinantnú vakcínu na liečbu folikulárneho B bunkového lymfómu. Vakcína pozostáva z idiotypických jednoreťazcových protilátok (scFv) odvodených z pacientovho tumoru proti antigénnym tumor–špecifickým Ig (idiotypom) na povrchu lymfómových B buniek. Protilátka sa skladala z variabilného ťažkého a ľahkého reťazca bez konštantných regiónov. Rastliny *N. benthamiana* boli infikované TMV vektorom obsahujúcim variabilné regióny, ktorých sekvencia bola odvodená z hybridómu tumoru alebo biopsie ľudských buniek tumoru. Vybraných bolo 8 proteínov. Množstvo proteínov v intersticiálnej tekutine z tabakových listov dosahovalo hodnôt 100 až 800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

V klinickej štúdii sa jednalo o fázu I, kedy bola hodnotená bezpečnosť a imunogenita vakcíny. Bunková odpoveď, proliferácia T buniek, nastala u 69 % pacientov (11 z 16), z toho 38 % odpovedí bolo špecifických k pacientovmu scFv. Odpoveď nastala po druhej imunizácii a udržala sa po dobu sedem mesiacov po vakcíne. Z jedenástich pacientov s bunkovou odpoveďou, u siedmich nastala aj humorálna odpoveď. V skupinách, kde bola vakcína podaná s adjuvantom GM–CSF, 71 % pacientov malo špecifickú bunkovú odpoveď a 29 % malo špecifickú humorálnu odpoveď. Celková miera odpovede bola 66 %, z toho 44 % pacientov splnilo kritériá pre antigén–špecifickú odpoveď. Vakcína bola ohodnotená ako bezpečná a imunogénna s tumor–špecifickou odpoveďou.

2.6 Rezistencia rastlín voči hmyzu a tolerancia k herbicídom

Rozvoj v modernej molekulárnej biológii a technológii rekombinantnej DNA vyústil do značného nárastu typov rastlín rezistentných voči hmyzu (IR) a tolerantných k herbicídom (HT). Prvá komerčná plodina rastlina tolerantná k herbicídu bola vyvinutá konvenčným šľachtením v roku 1984, repka olejná rezistentná voči triazínu (Ferry a Gatehouse, 2010). Vďaka schopnosti umelo upravovať rastlinný materiál odvtedy výrazne pribudlo IR a HT rastlín cestou mutagenézy a génového inžinierstva. Mutagenéza spočíva vo využití ionizujúceho žiarenia, chemických mutagénov alebo mobilných genetických elementov v navodení užitočnej mutácie (Krihsnan *et al.*, 2009). Stratégie vývinu geneticky upravených IR transgénnych rastlín bežne spočívajú

v inzercii Bt toxínových génov kódujúcich kryštálový proteín (Cry) z *Bacillus thuringiensis* či iných variant s podobným účinkom (BtCry1Ab, Vip3Aa20). Kryštálové proteíny vytvárajú iónové kanály alebo póry v epitelovej membráne v črevách hmyzu (Lee *et al.*, 2003; Vachon *et al.*, 2012). Využívajú sa taktiež u rastlín prirodzene vyskytujúce sa inhibítory proteáz (Smigocki *et al.*, 2013).

Stratégie vývinu HT rastlín genetickou úpravou spočívajú v zavedení génov kódujúcich enzýmy ako glyfosát-N-acetyl transferáza a glyfosát oxidáza, ktoré degradujú herbicíd na netoxické zlúčeniny. Ďalšou možnosťou je modifikácia rastlinných génov kódujúcich biochemické ciele herbicídu, napr. 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntáza (EPSPS, *aroA*) alebo indukovaním nadprodukcie nemodifikovaného cieľového proteínu (Rao, 2015). Medzi novšie prístupy patrí využitie upravených nukleáz (ZFN, CRISPR/Cas9) alebo „antisense“ technológií („antisense“ DNA a RNA) (Lombardo *et al.*, 2016).

2.6.1 Bt tabak

Vaeck *et al.* (1987) vytvorili transgénny tabak exprimujúci modifikované gény odvodené z *bt2*, z *B. thuringiensis* kmeňu berliner 1715. Bt2 proteín je protoxín a generuje menší polypeptid, ktorý si udržuje plnú toxickú aktivitu a je toxický pre škodcu tabaku, larvy nočného motýľa *Manduca sexta*. Listy transgénnych rastlín boli podané larvám *M. sexta*, pričom mortalita lariev dosiahla 75–100%. Selektované transgénne rastliny boli potom vystavené larvám *M. sexta* v skleníku. Po 18 hodinách sa larvy prestali kŕmiť rastlinami a do troch dní boli mŕtve. Poškodenie rastlín jednotlivými larvami dosahovalo plochy len pár mm². Najviac rezistentné rastliny obsahovali skrátene gény pre *bt2*, fúzané s génom pre neomycín fosfotransferázu. F₁ rastliny tiež preukazovali toxicitu na úrovni 100 % pri 6 dňovom teste. Množstvo proteínu sa u F₁ generácie pohybovalo na úrovni 50 ng·mg⁻¹ oproti 30 ng·mg⁻¹ u rodičovskej rastline.

2.6.2 Expresia mutantného *aroA* génu v tabaku

Comai *et al.* (1985) vložili do tabaku mutantnú alelu génu *aroA* zo *Salmonella typhimurium*, ktorá kóduje enzým EPSPS menej senzitívny ku herbicídu glyfosátu. Zníženú afinitu enzýmu ku glyfosátu spôsobila aminokyselinová substitúcia prolínu za serín bez zmeny v kinetickej aktivite enzýmu (Stalker *et al.*, 1985). Pri teste tolerancie boli rastliny sprejované ekvivalentom 0,5 kg·ha⁻¹ glyfosátu. Kontrolné *aroA*

negatívne rastliny po 20 dňoch vážili len 10 % hmotnosti oproti nesprejovaným rastlinám. Transformované rastliny vážili 30 %, resp. 70 % hmotnosti oproti nesprejovaným rastlinám. Úroveň tolerancie súvisela s úrovňou expresie *aroA* génu u jednotlivých línii. Aktivita enzýmu bola meraná metódou Boococka a Cogginsa, ako rozdiel v aktivite extraktov s prídavkom a bez prídavku antiséra proti bakteriálnemu enzýmu (Boocock a Coggins, 1983). U najmenej tolerantných rastlín bola aktivita enzýmu 9 U (nmol antranilátu·min⁻¹ na gram váhy), stúpajúc ku 38,2 U u najviac tolerantných rastlín. Štúdia demonštrovala, že kľúčové enzýmy rastlinného metabolizmu, môžu byť doplnené o ich bakteriálne náprotivky pri vývoji plodín kompatibilných s environmentálne šetrnejšími herbicídmi.

2.7 Fytoremediácia

Fytoremediácia, ako prístup ku sanácii životného prostredia, využíva vlastnosť rastlín akumulovať prvky a zlúčeniny z prostredia a metabolizovať rôzne molekuly v ich pletivách. Fytoremediácia môže byť použitá na organické aj anorganické znečisťujúce látky nachádzajúce sa v pôde, vode a vzduchu. Hlavným cieľom fytoremediácie sú toxické ťažké kovy a organické znečisťujúce látky (Salt *et al.*, 1998). Fytoremediácia je vnímaná ako rentabilná, efektívna a ekologická technológia akceptovaná verejnosťou (Ali *et al.*, 2013).

Rozdelená bola na viacero odvetví, pričom najväčší záujem vzbudzuje fytoextrakcia a fytodegradácia. Fytoextrakcia spočíva v príjme kontaminujúcich látok z pôdy alebo vody koreňmi rastlín a ich translokácii a akumulácii v nadzemnej biomase (Sekara *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2006; Rafati *et al.*, 2011). Fytodegradácia využíva rastliny a pridružené mikroorganizmy na degradáciu organických znečisťujúcich látok. Rastliny akumulujú organické xenobiotiká zo znečisteného prostredia a detoxifikujú ich cez vlastné metabolické aktivity (Doty *et al.*, 2007).

2.7.1 Transformácia TNT rastlinami tabaku

Hannink *et al.* (2007) vytvorili transgénny tabak konštitutívne exprimujúci *nsfI* gén pre nitroreduktázu z *Enterobacter cloacae* za účelom detoxifikácie 2,4,6–trinitrotoluénu (TNT) a vývinu tolerantnejších rastlín k trhavine. Transgénne rastliny a „wild–type“ rastliny boli kultivované na médiu s koncentráciou TNT 0,1 mM až po koncentráciu TNT 0,5 mM. Transgénne rastliny kultivované v médiách pri koncentrácii TNT vyššej ako 0,1 mM preukazovali lepší rastový index, pribrali približne 3–krát viac biomasy

ako „wild-type“ rastliny a nepreukazovali známky chlorózy. „Wild-type“ rastliny kultivované na 0,1 mM médiu odstránili všetko TNT za 120 hodín. Transgénne rastliny oproti tomu za 25 hodín. Wild-type“ rastliny kultivované na 0,5 mM médiu odstránili za 120 hodín 25 % TNT z média. Transgénne rastliny odstránili v priebehu 50 hodín 100 % TNT z média.

Hlavný produkt transformácie TNT bol identifikovaný ako 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluén. Na základe výsledkov štúdie, bakteriálna nitroreduktáza zlepšuje a urýchľuje transformáciu TNT oproti endogénnym enzýmom tabaku, umožňuje tak lepšiu konjugáciu a sekvestráciu TNT, a tým zníženie fytotoxicity.

2.8 Gén *Atwbc19*

Zaujímavý jačmenný gén použitý v tejto bakalárskej práci, *Hvabc1*, je ortológ génu *Atwbc19* z *Arabidopsis thaliana*. Gén *Atwbc19* kóduje ABC transportér z rodiny „White-Brown Complex“, najväčšej rodiny ABC transportérov u *A. thaliana*. AtWBC19 transportér má typickú organizáciu domén pre členov WBC rodiny, a to jednu ABC doménu, jednu transmembránovú doménu so šiestimi transmembránovými segmentmi. AtWBC19, ako „halftransportér“ pravdepodobne tvorí u tabaku homodimér (Mentewab a Stewart, 2005). Ortológom AtWBC19 u človeka je BCRP/ABCG2, ktorý udeľuje rezistenciu rakovinovým bunkám, napríklad voči protirakovinovému antracyklínom a mitoxantrónu (Kage *et al.*, 2002).

2.8.1 Ortológne gény

Ortológy a paralógy sú typy homológnych génov, ktoré sú príbuzné speciáciou, respektíve duplikáciou. Ortológy sú teda gény odvodené v procese speciácie (vznik nových druhov), kým paralógy sa vyvinuli cez duplikáciu. Predpokladá sa, že ortológne gény si zachovávajú ekvivalentné funkcie a iné kľúčové vlastnosti u rozdielnych organizmov. Pomocou ortológov je možné presne opísať rozdiely a podobnosti v kompozícii génomov rozdielnych druhov. Dôvodom je, že cez ortológy je možné sa dopátrať ku pôvodnému génu, ktorý bol prítomný v spoločnom predkovi porovnávaných druhov (Gabaldón a Koonin, 2013).

2.8.2 ABC transportéry

ABC transportéry sú multidoménné integrálne membránové proteíny, ktoré za využitia energie z hydrolýzy ATP translokujú látky cez bunkové membrány. ABC transportéry sú všadeprítomné od prokaryot až po človeka. Transportujú molekuly ako ióny, cukry, aminokyseliny, vitamíny, peptidy, polysacharidy, hormóny, lipidy a xenobiotiká. ABC transportéry sú teda zapojené v rozmanitých bunkových procesoch ako udržiavanie homeostázy, príjem živín, rezistencia voči xenotoxínom, prezentácia antigénov, delenie bunky, bakteriálna imunita, patogenéza a sporulácia, doprava cholesterolu a lipidov, či vývojová biológia kmeňových buniek (Ames *et al.*, 1990; Higgins, 1992; Fath a Kolter, 1993; Young a Holland, 1999; Martinoia *et al.*, 2002; Bunting, 2002).

ABC transportéry si udržiavajú konzervovanú základnú štruktúru a to dve transmembránové domény (TMD) a dve cytosolické nukleotid–viažúce (NBD) domény. Primárne sekvencie transmembránových domén sú zreteľne variabilné oproti NBD doménam, ktoré obsahujú vysoko konzervované Walker A a B motívy (Walker *et al.*, 1982) a LSGGQ motív (Bianchet *et al.*, 1997), diagnostickú signatúrnu sekvenciu ABC proteínov.

TMD vytvárajú transmembránový kanál, a pravdepodobne obsahujú väzobné miesta pre substrát. NBD sú molekulárne motory, ktoré transformujú chemickú potenciálnu energiu ATP do zmien konformácie proteínu. U eukaryot sa vyskytujú len ABC exportéry, s jedným polypeptidom pre základnú štruktúru s každou NBD C–terminálnou ku každej TMD. Výnimky sú „halftransportéry“. Kompletnú základnú štruktúru „halftransportéru“ tvoria homo– alebo heterodiméry (Jones a George, 2004).

2.8.3 Nadexpresia génu *Atwbc19* v tabaku

Mentewab a Stewart (2005) transformovali tabak génom *Atwbc19*, ktorý transgénnym rastlinám udelil rezistenciu voči kanamycínu. Kanamycín je aminoglykozidové antibiotikum izolované z pôdnej baktérie *Streptomyces kanamyceticus*. Aminoglykozidy pôsobia ako inhibítory proteosyntézy. U prokaryot primárne pôsobia naviazaním sa na 30S podjednotku prokaryotického ribozómu a tým inhibujú proteosyntézu (Mingeot–Leclercq *et al.*, 1999). U eukaryot inhibujú proteosyntézu viazaním sa na ribozomálny komplex (Vasquez, 1979). V štúdií porovnávali účinnosť transformácie tabaku tromi plazmidmi, ktoré obsahovali v nadexpresii gén *nptII* z *E. coli*, *Atwbc19* a oba gény dohromady.

Transgénné rastliny boli získané z každého konštruktu so selekčnou koncentráciou kanamycínu 50, 100, 200 mg·l⁻¹. Keď bol *Atwbc19* použitý ako selekčný gén, väčšina rastlín ktoré regenerovali pri koncentráciách 100 mg·l⁻¹ aj 200 mg·l⁻¹, boli transgénné (73 %, resp. 69 %). Selekcia na 200 mg·l⁻¹ bola menej efektívna ako 100 mg·l⁻¹, kvôli nižšiemu počtu regenerovaných rastlín (19 % oproti 40 %). Javí sa teda, že najvhodnejšia selekčná koncentrácia antibiotika pre tabak, pri využití ABC transportéru pod dvojitým 35S promotorom, je 100 mg·l⁻¹ kanamycínu. Pri týchto podmienkach je táto účinnosť porovnateľná s *nptII* pod dvojitým 35S promotorom, pri koncentrácii kanamycínu 200 mg·l⁻¹. Prítomnosť oboch génov v konštrukte výrazne zvýšila účinnosť transformácie oproti obom génom samostatne. Efekt sa odrazil vo vyššom počte regenerovaných a transgénnych rastlín pri selekcii na médiu s 200 mg·l⁻¹ kanamycínu. V súčasnosti existujú obavy o horizontálny prenos génov bakteriálneho pôvodu, a tým rozšírenia rezistentných kmeňov. Štúdia potvrdzuje využitie génu *Atwbc19* ako selekčný marker, a teda aj ako alternatívu ku selekčným markerom bakteriálneho pôvodu.

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Rastlinný materiál

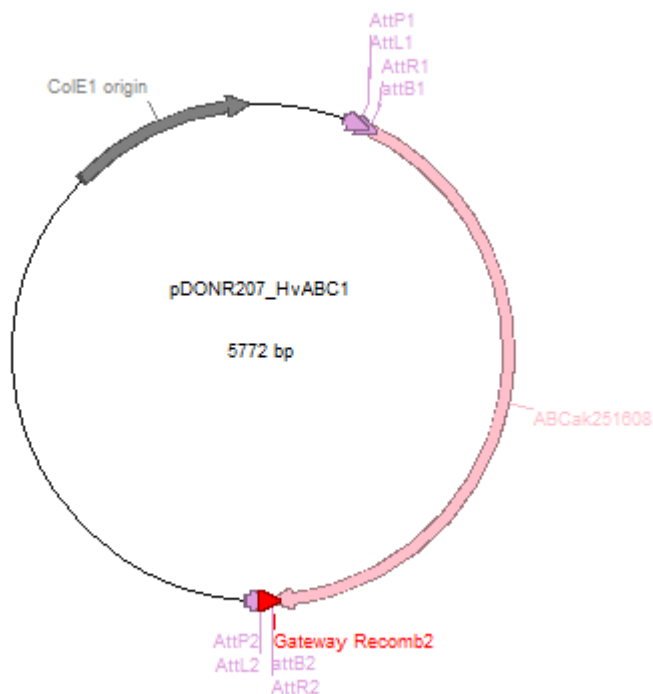
Na transformáciu boli použité rastliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Xanthi.

3.1.2 Bakteriálny materiál

Pre množenie plazmidovej DNA boli použité baktérie *E. coli*, kmeň DH5 α . Na transformáciu tabaku boli použité baktérie *A. tumefaciens*, kmeň GV3850.

3.1.3 Záujmový gén *Hvabc1*

Záujmový gén *Hvabc1* (ABCak251608) bol synteticky pripravený firmou Thermo Fisher Scientific: GeneArt™ a vložený do donorového vektoru pDONR207 (obr. 1) BP klonázovou reakciou. Vektor bol transformovaný do kompetentných buniek *E. coli* One Shot™ OmniMax™. Vektor bol izolovaný z kompetentných buniek pomocou Plasmid Miniprep Kit: Qiaprep Spin Miniprep Kit.



Obr. 1 Donorový vektor pDONR207::*Hvabc1*. – Vytvorené v programe ApE.

3.1.4 Zoznam použitých chemikálií a roztokov

- 3',5'-dimetoxi-4'-hydroxyacetofenón (acetosyringón) (Sigma, kat.č. D134406)
- BAP (Sigma, kat.č. B3408)
- CutSmart pufor (New England Biolabs, kat. č. B7204S)
- Destilovaná voda
- EDTA (Serva, kat. č. 11278.01)
- Etanol (Selico)
- Etídium bromid (Invitrogen, kat. č. 15585-011)
- Gateway® LR clonase® II enzyme mix (Invitrogen, kat. č. 11791-100)
- Gel loading dye, Purple (6X) (New England Biolabs, kat. č. B7024S)
- Glycerol (Sigma, kat. č. G2025)
- Hydroxid draselný (KOH) (Lachema)
- HyperLadder I (Bioline, kat. č. BIO-33025)
- Hexahydrát chloridu horečnatého ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Chlórnan sodný (NaClO) 10 % (Fluka)
- Kanamycín monosulfát (Duchefa, kat. č. K0126)
- Kyselina octová (Pluta)
- LB (Sigma, kat. č. 28713)
- LB agar (Sigma, kat. č. L2897)
- LR klonázový mix Gateway® LR Clonase® (Invitrogen, kat. č. 11791-020)
- MES (Sigma, M8652)
- Murashige & Skoog plant salt base (Duchefa, kat. č. M0222.0050)
- NAA (Sigma, kat. č. N-0640)
- Nikotínová kyselina (Sigma, kat. č. N-0765)
- PCR H_2O (Sigma, kat. č. W4502)
- Phytoagar (Duchefa, kat. č. P1003)
- PvuI-HF (New England Biolabs, kat. č. R3150L)
- Plasmid Miniprep Kit: QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, kat. č. 27106)
- Pyridoxín (Sigma, kat. č. P-8666)
- QIAEX II Gel Extraction Kit (150) (QIAGEN, kat. č. 20021)
- Rifampicín (Duchefa, kat. č. R0146)
- Sacharóza (Lach-Ner, kat. č. 40135-AP0)

- S.O.C. médium (vlastná výroba)
- Tiamín HCl (Sigma, kat. č. T1270)
- Timentín (Duchefa, kat. č. T0190)
- Tris báza (Serva, kat. č. 37180.02)
- Trypton (Duchefa, kat. č. T1332.0100)
- UltraPure™ Agarose (Invitrogen, kat. č. 16500–500)
- X-GlcA, cyklohexylamóniová soľ (Duchefa, kat. č. X1405.0100)

3.1.5 Zoznam použitých prístrojov

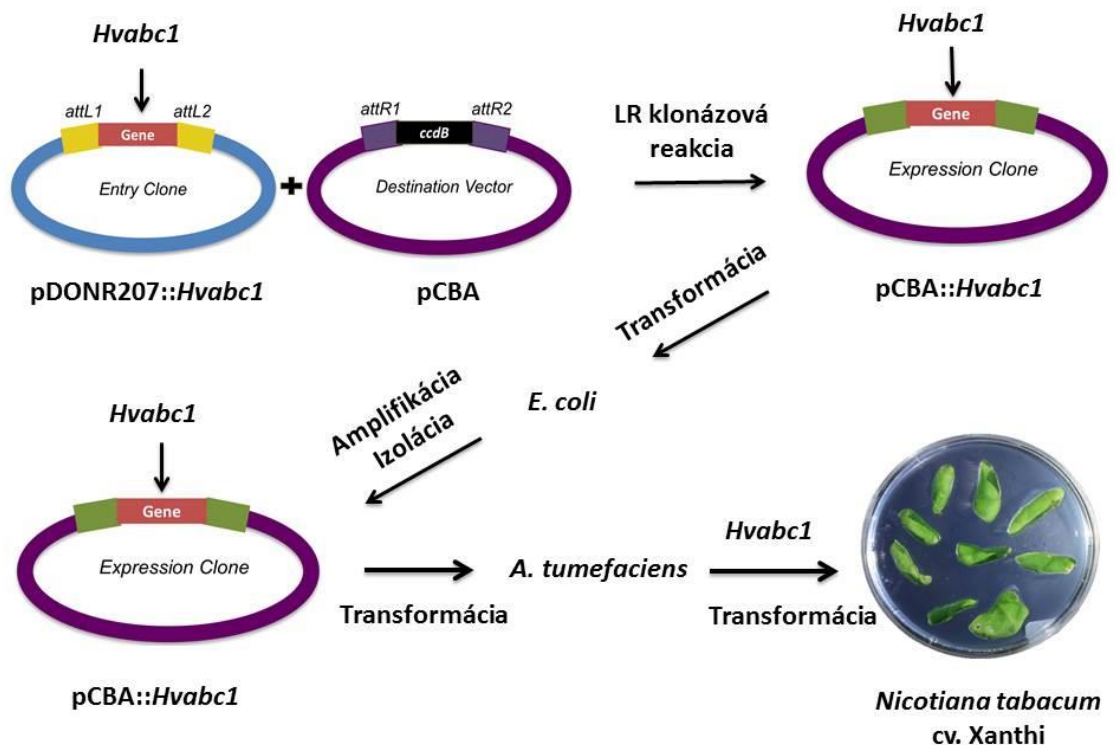
- Autokláv (PS20A, BMT)
- Binokulárna lupa (PZO)
- Digestor (Merci)
- Centrifúga (BR4, Jouan)
- Digitálne váhy (A200S, Sartorius)
- DS–11 Spektrofotometer na mikroobjemy (DeNovix)
- Elektroforetická komora (BioRad)
- Inkubačná trepačka (ES20)
- Kultivačná komora (Adaptis 1000)
- Laminárny box (Thermo Scientific)
- Magnetická miešačka (Variomag)
- Mikroskop Axio Zoom.V16 (ZEISS)
- Minicentrifúga (centrifuge 5418, Eppendorf)
- pH meter (pH526, WTV)
- Vodný kúpeľ (SUB6, Grant)

3.2 Metódy

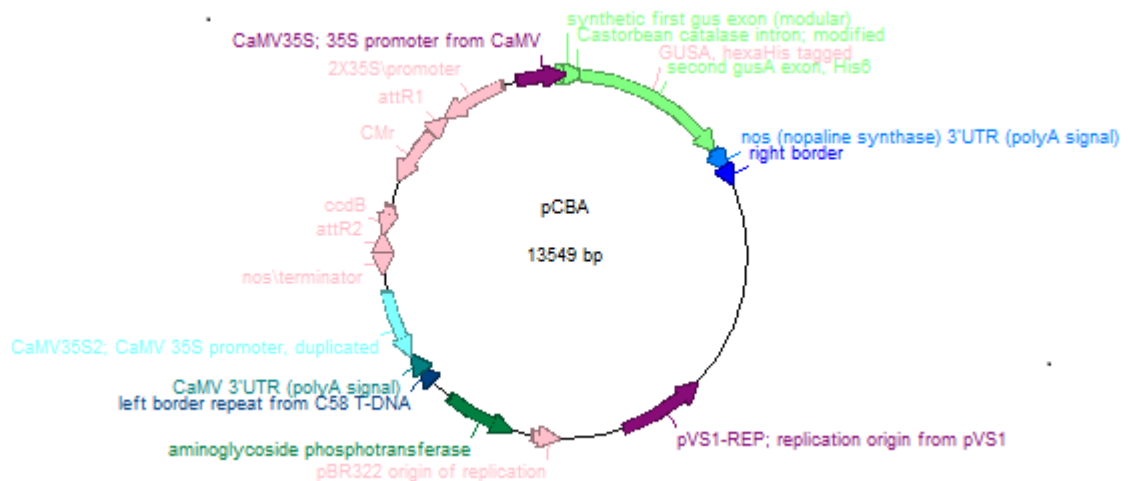
3.2.1 Realizácia klonovacej stratégie

Jedným z cieľov experimentálnej časti bakalárskej práce bola realizácia navrhutej klonovacej stratégie pre vloženie záujmového jačmenného génu *Hvabc1* do expresného vektoru pCBA (obr. 3), a následná transformácia záujmového génu do tabaku.

Donorový vektor pDONR207::*Hvabc1* (obr. 1) nesúci záujmový gén bol linearizovaný pomocou restriktívnej endonukleázy PvuI. Linearizovaný vektor bol použitý v LR klonázovej reakcii, ktorá je súčasťou Gateway® klonovacej technológie. LR klonázová reakcia spočíva v *in vitro* rekombinácii medzi vstupným vektorom, ohraničeným *attL* miestami, a destinačným vektorom obsahujúcim *attR* miesta. Donorový vektor obsahoval gén *Hvabc1* ohraničený *attL1* a *attL2* rekombinačnými miestami. Expresný vektor naproti tomu obsahoval rekombinačné miesta *attR1* a *attR2*. Miestne–špecifická rekombinácia medzi vstupným a destinačným vektorom bola katalyzovaná prostredníctvom Gateway® LR clonase® II enzyme mix.



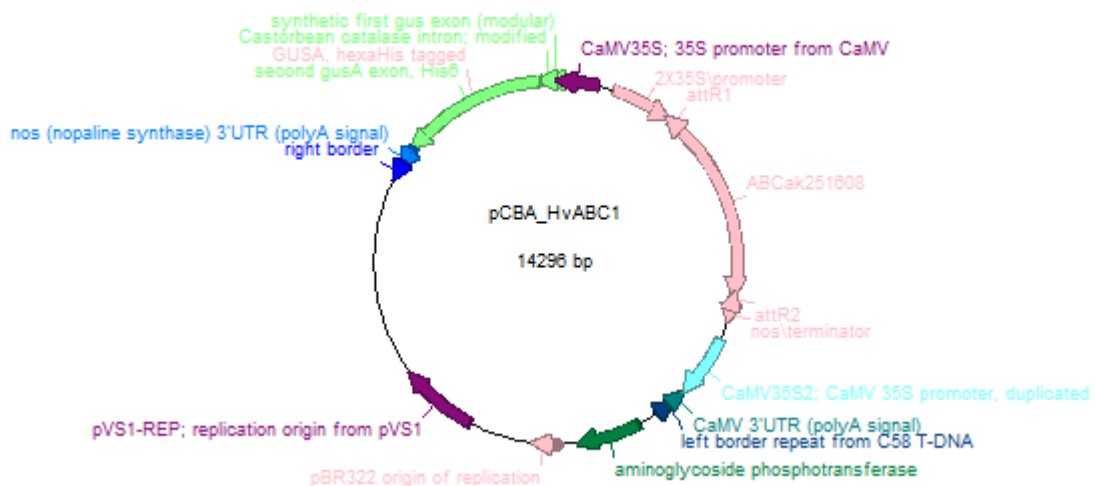
Obr. 2 Schéma navrhutej klonovacej stratégie pre vnesenie génu *Hvabc1* do tabaku.



Obr. 3 Expresný vektor pCBA.– Vytvorené v programe ApE.

Klonázovou reakciou bol vložený gén *Hvabc1* do expresného vektoru pCBA (obr. 3), za vzniku vektoru pCBA::*Hvabc1* (obr.4).

Produkt klonázovej reakcie bol tepelným šokom transformovaný do chemokompetentných buniek *E. coli*, kmeňa DH5a. Vytvorené zásobné glycerolové roztoky boli uchované pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Plazmidová DNA bola izolovaná z buniek pomocou Plasmid Miniprep Kit: Qiaprep Spin Miniprep Kit. Správnosť klonázovej reakcie bola overená restrikciou plazmidovej DNA enzýmom PvuI.



Obr. 4 Produkt klonázovej reakcie: vektor pCBA::*Hvabc1*.– Vytvorené v programe ApE.

Vytvorený expresný vektor pCBA::*Hvabc1* bol transformovaný do chemokompetentných buniek *Agrobacterium tumefaciens*, kmeňa GV 3850, tepelným šokom a boli vytvorené zásobné glycerolové roztoky uchované pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Plazmidová DNA bola izolovaná z buniek pomocou Plasmid Miniprep Kit: Qiaprep Spin Miniprep Kit. Úspešnosť transformácie bola overená restrikciou plazmidovej DNA enzýmom PvuI.

Úspešne transformované baktérie *A. tumefaciens* boli použité na transformáciu tabaku. Na transformáciu tabaku boli použité listové disky z rastlín *N. tabacum* kultivovaných *in vitro*. Transformované listové disky boli kultivované na regeneračnom médiu, s prídavkom antibiotika kanamycínu. Regenerované rastliny boli získané z listových diskov procesom somatickej embryogenézy.

3.2.2 Tranzientná expresia

Prostredníctvom *A. tumefaciens* boli tranzientne transformované 5-týždňové rastliny tabaku kultivované *ex vitro*. Expresný vektor obsahoval reportérový gén *gus*, ktorý kóduje enzým β -glukuronidázu. Enzým β -glukuronidáza premieňa substrát X-Gluc za vznik modrého precipitátu. Expresia reportérového génu *gus*, ktorá sa prejavila v aktivite kódovaného enzýmu bola detegovaná pomocou GUS histochemickej reakcie. Tranzientnou expresiou reportérového génu *gus* bola overovaná správnosť pripraveného konštruktú.

3.3 Metodické postupy

3.3.1 Linearizácia vektoru pDONR207::*Hvabc1*

1. Podľa tab. 1 bola pripravená 3–krát reakčná zmes, ktorá bola inkubovaná pri 37 °C po dobu jednej hodiny.
2. Po jednej hodine bola reakcia zastavená pridaním 10 µl „Gel Loading dye, Purple (6X)“.
3. Objem reakčnej zmesi bol separovaný elektroforeticky na 1% agarózovom géle. Detegované boli fragmenty o veľkosti 5772 bp.
4. Fragmenty boli vyrezané z gélu a plazmidová DNA bola extrahovaná z gélu pomocou QIAEX II Gel Extraction Kit podľa protokolu výrobcu (qiagen.com – Qiagen).

3.3.2 Elektroforéza na agarózovom gély

1. Príprava agarózového gélu: prášková agaróza bola zmiešaná z 1x TAE pufrom v pomere podľa požadovanej tuhosti a objemu gélu.
2. Do zmesi bol pridaný etídium bromid v množstve 1 µl na 40 ml objemu gélu.
3. Po stuhnutí bol gél presunutý do elektroforetickej komory naplnenej 1x TAE pufrom.
4. Vzorky boli nanesené do jamiek a separované v elektrickom poli.
5. Po separácii bol gél umiestnený do UV transiluminátora. Pôsobením UV žiarenia boli vizualizované separované fragmenty.

3.3.3 LR klonázová reakcia

1. Podľa tab. 2 bola pripravená reakčná zmes pre priebeh LR klonázovej reakcie. Reakčná zmes bola inkubovaná cez noc pri 25 °C.

Tab. 1 Zloženie reakčnej zmesi pre restrikciu vektoru pDONR207::*Hvabc1*

Látky	Množstvo
PCR H ₂ O	41,5 µl
CutSmart pufo	5 µl
PvuI–HF	1,5 µl
Plazmidová DNA 1 µg	2 µl
Objem	50 µl

Tab. 2 Zloženie reakčnej zmesi pre LR klonázovú reakciu

Látky	Množstvo
linear. pDONR207:: <i>Hvabc1</i> 100 ng	3 μ l
Expresný vektor pCBA 100 ng	1,5 μ l
LR Clonase II enzyme mix	1,5 μ l
TE pufor, pH 8	0,7 μ l
Objem	6,7 μ l

- Následne bolo do reakčnej zmesi pridaných 0,7 μ l Proteinázy K a zmes bola inkubovaná po dobu 10 minút pri 37 °C.
- Produkt klonázovej reakcie bol transformovaný do *E. coli* kmeň DH5 α .

3.3.4 Transformácia *E. coli* DH5 α teplotným šokom

- Do 150 μ l bakteriálnej suspenzie bolo pridaných 5 μ l produktu LR klonázovej reakcie. Nasledovala inkubácia 20 minút na ľade.
- Po 20 minútach bola bakteriálna suspenzia vystavená teplotnému šoku pri 42 °C po dobu 35 sekúnd vo vodnom kúpeli.
- Bakteriálna suspenzia bola presunutá na ľad a po 5 minútach k nej bolo pridaných 250 μ l S.O.C média.
- Suspenzia baktérii bola kultivovaná 1 hodinu pri 37 °C.
- Po 1 hodine bola suspenzia rozostretá na selekčné tuhé LB médiá s obsahom kanamycínu v koncentrácii 50 mg·l⁻¹.
- Baktérie boli kultivované cez noc pri 37 °C.
- Na druhý deň bolo vybraných 6 vzniknutých kolónii, ktoré boli naočkované jednotlivito do 6 skúmaviek s 2,5 ml LB média a kanamycínom (50 mg·l⁻¹). Baktérie boli kultivované cez noc v trepačke pri 37 °C a 180 rpm.
- Po kultivácii boli založené glycerolové roztoky (250 μ l bakteriálnej suspenzie v 250 μ l 50% glycerolu) a izolovaná plazmidová DNA.
- Úspešnosť transformácie a klonázovej reakcie bola overená restričnou analýzou plazmidovej DNA pomocou enzýmu PvuI.
- Pozitívna kolónia bola použitá na amplifikáciu vektoru. Do 5 ml LB média s kanamycínom (50 mg·l⁻¹) bolo pridaných 5 μ l zo zásobného glycerolového

roztoku. Kultivácia prebehla cez noc pri 37 °C a 180 rpm. Na druhý deň bol izolovaný zo suspenzie vektor pCBA::*HvabcI*.

3.3.5 Izolácia plazmidovej DNA

1. Bakteriálna suspenzia o objeme 5 ml bola centrifugovaná 30 sekúnd pri 10 000 rpm.
2. Supernatant bol odstránený a pelet bol resuspendovaný v 250 µl pufru P1.
3. Po resuspendácii bolo do zmesi pridaných 250 µl pufru P2. Zmes bola premiešaná prevracaním skúmavky.
4. Ďalej bolo pridaných 350 µl pufru N3 a zmes bola ihneď premiešaná prevracaním skúmavky. Zmes bola centrifugovaná 10 minút pri 13 000 rpm.
5. Po centrifugácii bol supernatant prevedený do mikroskúmavky s kolónkou.
6. Supernatant bol centrifugovaný 1 minútu pri 13 000 rpm. Objem, ktorý pretiekol kolónkou bol odstránený a kolónka bola premytá 750 µl PB pufru a centrifugovaná 1 minútu pri 13 000 rpm.
7. Pretečený objem bol odstránený a kolónka bola opäť centrifugovaná 1 minútu pri 13 000 rpm.
8. Kolónka bola prenesená do čistej mikroskúmavky. Do kolónky bolo napipetovaných 30 µl sterilnej vody.
9. Po 1 minúte bola kolónka centrifugovaná 1 minútu pri 13 000 rpm pričom bola plazmidová DNA z kolónky eluovaná.

3.3.6 Transformácia *A. tumefaciens* teplotným šokom

1. Do 50 µl bakteriálnej suspenzie bol pridaný 1 µl vektoru pCBA::*HvabcI*, ktorý predstavoval 100 ng DNA. Nasledovala inkubácia 5 minút na ľade.
2. Po 5 minútach bola bakteriálna suspenzia prenesená do tekutého dusíka na dobu 5 minút.
3. Po zmrazení v dusíku bola bakteriálna suspenzia prenesená na ohriatie do vodného kúpeľa s teplotou 37 °C na ďalších 5 minút.
4. Po ohriatí bol k bakteriálnej suspenzii pridaný 1 ml LB média. Zmes sa kultivovala 2 hodiny v trepačke pri 28 °C a 180 rpm.
5. Po kultivácii bola bakteriálna suspenzia centrifugovaná po dobu 2 minút pri 5000 rpm. Supernatant bol odstránený a bakteriálny pelet bol resuspendovaný v 200 µl LB média.

6. Bakteriálna suspenzia bola rozostretá na pevné selekčné LB médium s obsahom kanamycínu a rifampicínu v koncentrácii $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Baktérie boli kultivované 3 dni pri laboratórnej teplote.
7. Po 3 dňoch boli vybrané 4 vzniknuté kolónie, ktoré boli naočkované jednotlivito do 4 skúmaviek s 2,5 ml LB média s obsahom kanamycínu a rifampicínu $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Baktérie boli kultivované v trepačke pri $28 \text{ }^\circ\text{C}$ a 180 rpm.
8. Po vytvorení zákalu bolo odobraných 250 μl suspenzie a boli pripravené glycerolové roztoky. Objem bol doplnený na 5 ml LB médiom s príslušnými antibiotikami.
9. Po 3 dňoch bola z bakteriálnych suspenzií izolovaná plazmidová DNA.
10. Overenie úspešnosti transformácie *A. tumefaciens* bolo vykonané restričnou analýzou plazmidovej DNA pomocou restričnej endonukleázy PvuI.

3.3.7 Príprava rastlín tabaku na transformáciu

1. Semená tabaku boli sterilizované v 500 μl 70% etanolu po dobu 1 minúty.
2. Semená boli potom premyté 3–krát v 1 ml sterilnej vody po dobu 1 minúty.
3. Po premytí bol k semenám pridaný 1 ml 4% chlórnanu sodného na 10 minút.
4. Po sterilizácii boli semená premývané 4–krát v 1 ml sterilnej vody a nechali sa vysušiť na filtračnom papieri v laminárnom boxe.
5. Semená boli nasadené na kultivačné $\frac{1}{2}$ MS médium (tab. 3) v Petriho miske.
6. Po vyklíčení boli rastliny presunuté do širokohrdlých Erlenmeyerových baniek s kultivačným $\frac{1}{2}$ MS médiom.
7. Rastliny boli kultivované v kultivačnej komore pri režime 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma pri teplote $23 \text{ }^\circ\text{C}$.
8. Na transformáciu boli použité rastliny po 2 mesiacoch *in vitro* kultivácie.

Tab. 3 Zloženie kultivačného $\frac{1}{2}$ MS média

Látka	Množstvo látky na 1 l média
Murashige and Skoog plant salt base	2,2 g
Sacharóza	20 g
B5 vitamíny (tab.4)	2 ml
Sterilná destilovaná voda	doplniť do 1 l
pH 5,8 – úprava KOH	

Tab. 4 Zloženie roztoku B5 vitamínov (2 ml/l média)

Látka	Množstvo látky na 20 ml roztoku
Tiamín HCl	100 mg
Pyridoxín	10 mg
Nikotínová kyselina	10 mg
Sterilná destilovaná voda	doplniť do 20 ml

3.3.8 Transformácia listových diskov tabaku

1. Pripravené bolo 30 ml inokulum *A. tumefaciens*. Do skúmavky s 30 ml LB média bolo pridaných 65 μ l bakteriálnej suspenzie zo zásobného glycerolového roztoku. Inokulum bolo kultivované v trepačke pri 28 °C a 180 rpm.
2. Bakteriálna suspenzia bola kultivovaná do dosiahnutia hodnoty $OD_{600} = 0,8$.
3. Po dosiahnutí optimálnej optickej denzity bola bakteriálna suspenzia centrifugovaná po dobu 15 minút pri 5000 rpm.
4. Supernatant bol oddelený a vzniknutý pelet bol resuspendovaný v 30 ml $\frac{1}{2}$ MS média s koncentráciou acetosyringónu 100 μ M.
5. Z listov tabaku boli pripravené listové disky, ktoré boli vložené do bakteriálnej suspenzie na 10 minút.
6. Po infiltrácii boli disky vysušené na filtračnom papieri a presunuté na regeneračné $\frac{1}{2}$ MS médium.
7. Kokultivácia prebiehala 3 dni v tme.
8. Po 3 dňoch boli disky presunuté na regeneračné $\frac{1}{2}$ MS médium (tab. 5) s obsahom kanamycínu 25 $mg \cdot l^{-1}$, resp. 50 $mg \cdot l^{-1}$ a timentinom (200 $mg \cdot l^{-1}$). Kultivácia prebiehala v kultivačnej komore pri režime 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma pri teplote 23 °C.
9. Rastliny regenerované z listových diskov boli odstrihnuté a prenesené na kultivačné $\frac{1}{2}$ MS médium s obsahom kanamycínu 25 $mg \cdot l^{-1}$, resp. 50 $mg \cdot l^{-1}$ a timentinom (200 $mg \cdot l^{-1}$).

Tab. 5 Zloženie regeneračného ½ MS média

Látka	Množstvo látky na 1 l média
Murashige and Skoog plant salt base	2,2 g
Sacharóza	20 g
B5 vitamíny (tab.5)	2 ml
BAP	1 mg
NAA	0,1 mg
Sterilná destilovaná voda	doplniť do 1 l
pH 5,8 – úprava KOH	

3.3.9 Tranzientná transformácia tabaku

1. Pripravené bolo 5 ml inokulum *A. tumefaciens*. Do skúmavky s 5 ml LB média bolo pridaných 10 µl bakteriálnej suspenzie zo zásobného glycerolového roztoku. Inokulum bolo kultivované v trepačke pri 28 °C a 180 rpm.
2. Bakteriálna suspenzia bola kultivovaná do dosiahnutia hodnoty OD₆₀₀= 0,5.
3. Z bakteriálnej suspenzie bol odobraný objem 1,5 ml. Odobraná bakteriálna suspenzia bola centrifugovaná 3 minúty pri 5000 rpm.
4. Supernatant bol odstránený a pelet bol resuspendovaný v 1 ml infiltračného média (tab. 6). Zmes bola centrifugovaná 3 minúty pri 5000 rpm.
5. Supernatant bol odstránený a pelet bol opäť resuspendovaný v 1 ml infiltračného média. Objem bol doplnený na 10 ml pridaním infiltračného média. Bakteriálna suspenzia bola tým zriedená na OD₆₀₀= 0,05.
6. Rastliny boli 2 hodiny pred transformáciou zaliate vodou pre otvorenie prieduchov. Objem bakteriálnej suspenzie bol nasatý do injekčnej striekačky a vtlačený do listov tabaku.
7. Rastliny boli kultivované deň v tme a následne v bežných podmienkach.
8. Po troch dňoch boli vystrihnuté infiltrované oblasti listov a bola vykonaná GUS histochemická reakcia.

Tab.6 Zloženie infiltračného média

Látka	Koncentrácia látky
MgCl ₂	10 mM
MES	10 mM
Acetosyringón	100 µM
Sterilná destilovaná voda	

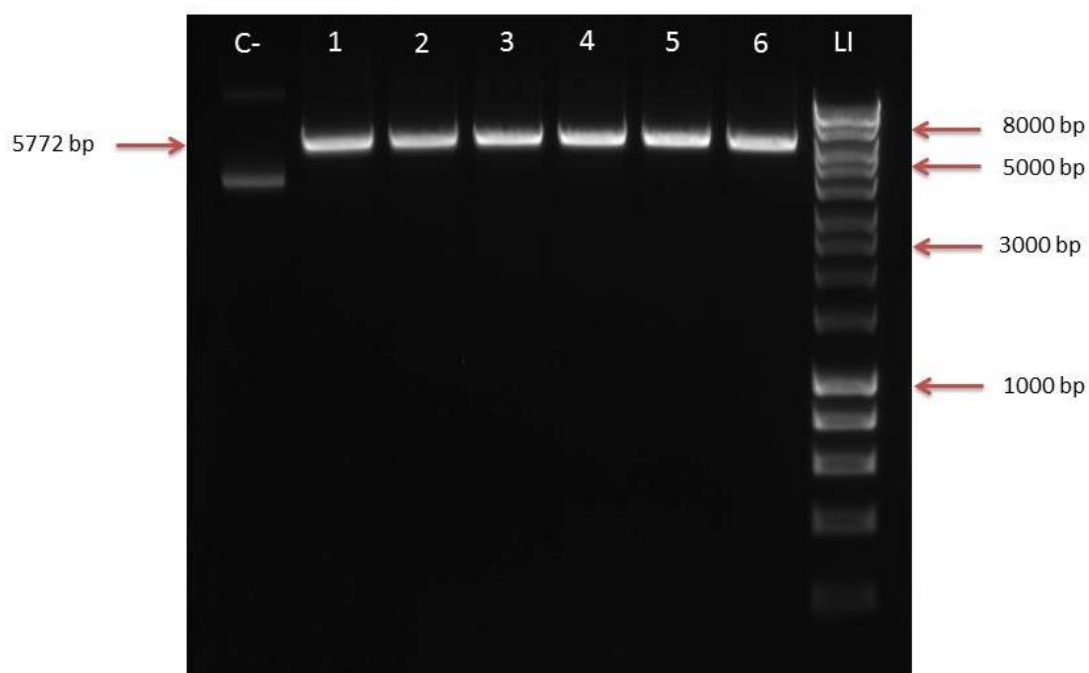
3.3.10 GUS histochemická reakcia

1. Infiltrované oblasti listov boli vložené do skúmavky s 500 µl pripraveného roztoku X-Gluc pre histochemickú reakciu (Jefferson *et al.*, 1987).
2. Pre lepší prienik roztoku do listov boli skúmavky vystavené pôsobeniu vákua po dobu 1 minúty vo vákuovom exikátore.
3. Listy boli inkubované v roztoku 3 dni pri 37 °C pre priebeh histochemickej reakcie.
4. Po priebehu histochemickej reakcie boli listy odfarbené v 96% etanole pri 60 °C a následne uchované v 70% etanole.

4 VÝSLEDKY

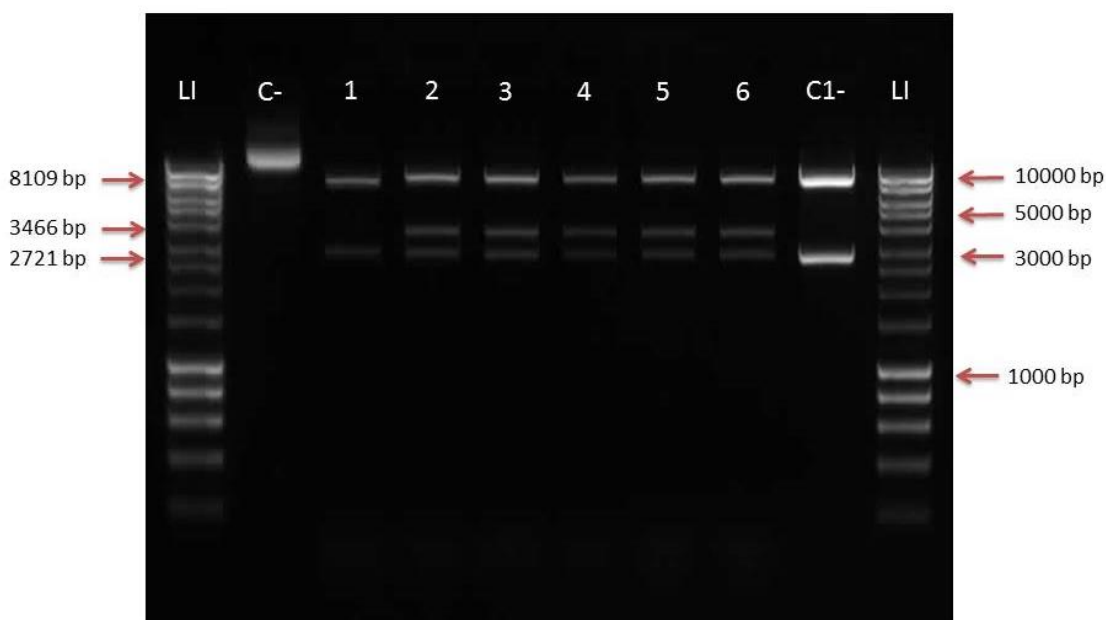
4.1 Realizácia klonovacej stratégie

Vektor pDONR:207::*Hvabc1* nesúci záujmový gén bol pre zvýšenie efektivity LR klonázovej reakcie linearizovaný restriktívnou endonukleázou PvuI. Reakčná zmes bola separovaná na 1% agarózovom gély. Detegované boli fragmenty o veľkosti 5772 bp, ktoré odpovedajú dĺžke linearizovaného vektoru (obr. 5).



Obr. 5 Linearizácia vektoru pDONR207::*Hvabc1*.
C- negatívna kontrola, 1-6 linearizovaný vektor, očakavaný fragment-5772 bp, LI Ladder I.

Záujmový gén *Hvabc1* bol vložený do expresného vektoru pCBA pomocou LR klonázovej reakcie. Produkt LR klonázovej reakcie bol transformovaný do kompetentných buniek *E. coli* DH5 α teplotným šokom. Po transformácii boli baktérie kultivované na tuhom LB médiu s prídavkom selekčného antibiotika. Vzniknuté kolónie boli kultivované v tekutom LB médiu so selekčným antibiotikom. Po kultivácii bola z bakteriálnej suspenzie izolovaná plazmidová DNA, ktorá bola podrobená restriktčnej analýze pomocou enzýmu PvuI. Úspešnosť LR klonázovej reakcie bola potvrdená prítomnosťou troch fragmentov o veľkosti 8109 bp, 3466 bp a 2721 bp. Z 6 testovaných bakteriálnych kolónii bolo 5 pozitívnych, ktoré obsahovali vektor pCBA so začleneným génom *Hvabc1* (obr. 6).

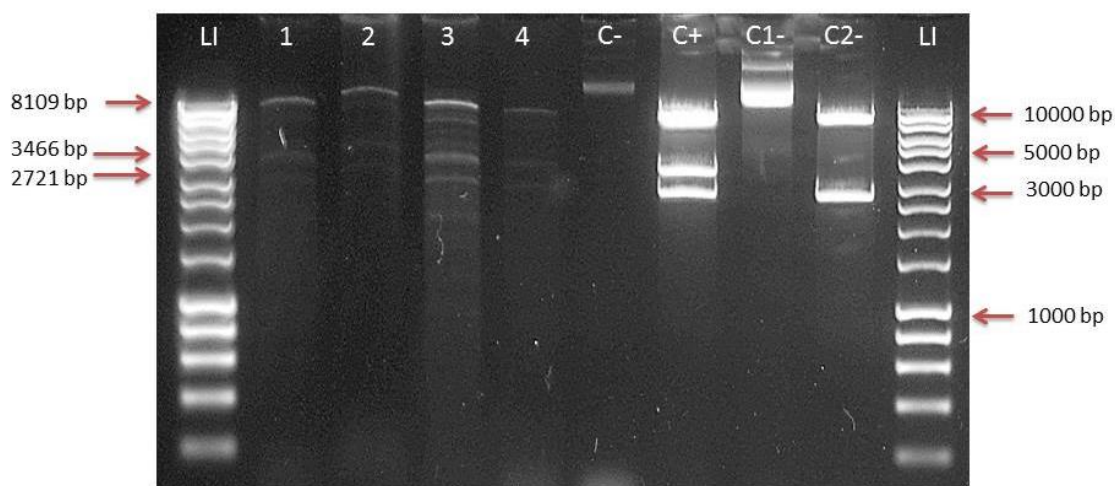


Obr. 6 Restriktčná analýza produktu LR klonázovej reakcie.

LI Ladder I, C- negatívna kontrola, 1 negatívna vzorka

2-6 pozitívne vzorky, vektor pCBA::*Hvabc1*- očakávané fragmenty 8109 bp, 3466 bp a 2721 bp, C1- negatívna kontrola- vektor pCBA bez inzertu, LI Ladder I.

Vektor pCBA::*Hvabc1* bol transformovaný do *A. tumefaciens* GV3850 teplotným šokom. Po transformácii boli baktérie kultivované na tuhom LB médiu, s prídavkom selekčných antibiotík. Vzniknuté kolónie boli kultivované v tekutom LB médiu so selekčnými antibiotikami. Po kultivácii bola z bakteriálnej suspenzie izolovaná plazmidová DNA, ktorá bola podrobená restriktčnej analýze pomocou enzýmu PvuI. Detegované boli tri fragmenty o predpokladanej veľkosti 8109 bp, 3466 bp a 2721 bp. Prítomnosť fragmentov potvrdila úspešnosť transformácie vektoru pCBA::*Hvabc1* do *A. tumefaciens*. Všetky 4 testované bakteriálne kolónie obsahovali správne začlenený vektor pCBA::*Hvabc1* (obr. 7).



Obr. 7 Restriktčná analýza plazmidovej DNA *A. tumefaciens*.
 LI Ladder I, 1–4 pozitívne vzorky– očakávané fragmenty 8109 bp, 3466 bp a 2721 bp,
 C– negatívna kontrola, C+ pozitívna kontrola – vektor pCBA::*Hvabc1*, C1– negatívna kontrola,
 C2– negatívna kontrola – vektor pCBA bez inzertu, LI Ladder I.

4.2 Transformácia tabaku

Z listov tabaku boli pripravené listové disky, ktoré boli transformované suspenziou baktérii *A. tumefaciens* GV3850 nesúcich vektor pCBA::*Hvabc1*. Listové disky boli umiestnené na regeneračné médium s koncentráciou kanamycínu 25 mg·l⁻¹, resp. 50 mg·l⁻¹.

Po 2 týždňoch od transformácie sa začali na explantátoch formovať výhonky. Rastliny boli po 4 týždňoch odstrihnuté a umiestnené na kultivačné médium. Regenerované rastliny boli ďalej kultivované a selektované na kultivačnom médiu s príslušnou koncentráciou antibiotika.

Touto cestou bolo vyselektovaných 18 regenerovaných rastlín na médiu s obsahom kanamycínu 25 mg·l⁻¹. Z listových diskov kultivovaných na médiu s obsahom kanamycínu 50 mg·l⁻¹ boli vyselektované 4 regenerované rastliny (tab. 7).

Tab. 7 Vyhodnotenie procesu regenerácie a selekcie rastlín po transformácii.

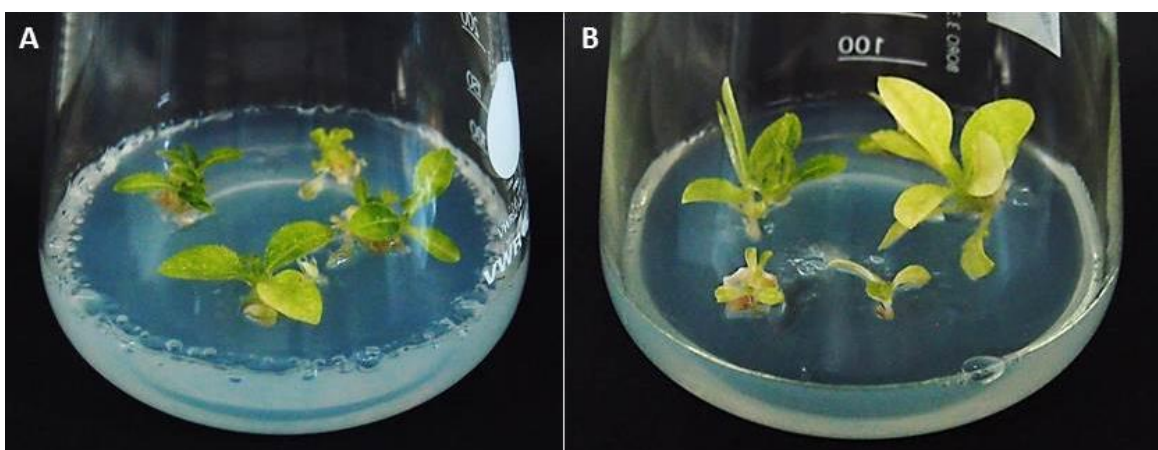
Médium s koncentráciou kanamycínu:	Kan 25 mg·l ⁻¹	Kan 50 mg·l ⁻¹
Počet listových diskov	90	90
Počet regenerovaných rastlín	28	17
Počet vyselektovaných rastlín	18	4



Obr. 8 Transformované listové disky tabaku– 3 dni od transformácie.



Obr. 9 Rastlina regenerujúca z listového disku. 4 týždne po transformácii.

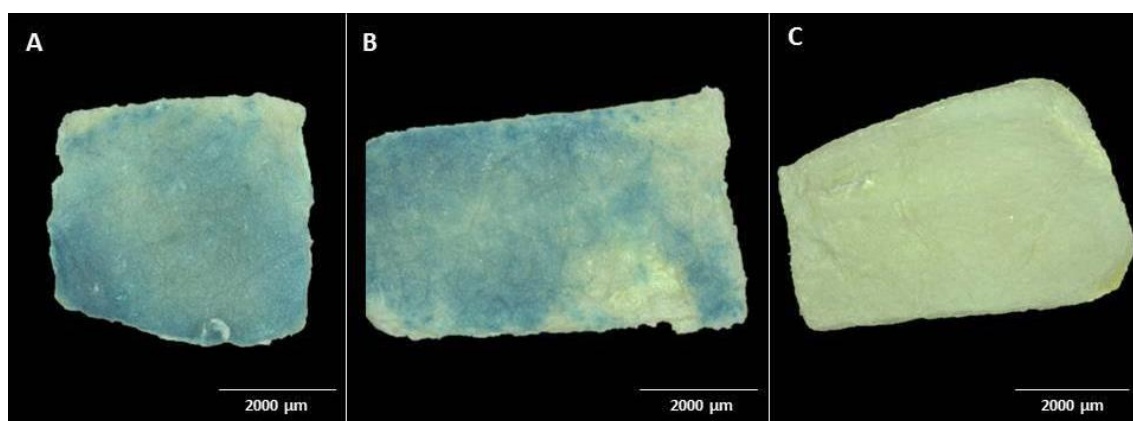


Obr. 10 Regenerované rastliny tabaku kultivované na selekčnom médiu. 7 týždňov po transformácii.

A – Kan 25 mg·l⁻¹ ,B – Kan 50 mg·l⁻¹.

4.3 Tranzientná transformácia tabaku

Tranzientnou transformáciou tabaku bola overená správnosť pripraveného konštruktú na transformáciu tabaku. Úspešnosť transformácie bola hodnotená podľa prítomnosti modrého sfarbenia na transformovaných oblastiach po GUS histochemickej reakcii (obr. 11). Tranzientne transformované boli 3 rastliny tabaku, pričom, listové segmenty všetkých transformovaných rastlín boli sfarbené na modro po GUS histochemickej reakcii. Úspešne transformované boli teda všetky 3 rastliny. Prítomnosť modrého sfarbenia zároveň potvrdila aktivitu enzýmu β -glukuronidázy v transformovaných pletivách, a tým aj expresiu reportérového génu *gus*. Tranzientná expresia reportérového *gus* potvrdila správnosť pripraveného konštruktú pCBA::*Hvabc1*.



Obr. 11 Listy tabaku po GUS histochemickej reakcii. Fotky zhotovené pomocou softvéru Zenblue na mikroskope Axio Zoom.V16 (ZEISS). Mierka 2000 μm .

A – List transformovaný vektorom pCBA::*Hvabc1*, B – pozitívna kontrola, C – negatívna kontrola.

5 DISKUSIA

Realizáciou klonovacej stratégie bol pripravený expresný vektor pCBA::*Hvabc1* s využitím Gateway® klonovacej technológie. Gateway® klonovacia technológia uľahčuje klonovanie cieľových sekvencií s využitím miestne–špecifického rekombinačného systému bakteriofága λ . Gateway® klonovacia technológia je s obľubou využívaná v rastlinných biotechnológiách pri dizajne vektorov. Vektory sú dizajnované na analýzu promotorov, štúdium proteínovej expresie, lokalizácie a vzájomných interakcii, ďalej na „knockdown“ génov pomocou RNAi či pri experimentoch s afinitnou purifikáciou (Earley *et al.*, 2006). Na tieto účely je dostupných na objednávku viac ako 200 Gateway® vektorov na funkčnú *Agrobacterium*–sprostredkovanú transformáciu rastlín (gateway.psb.ugent.be – VIB).

Tabak bol transformovaný prostredníctvom baktérii *A. tumefaciens* nesúcich pripravený konštrukt pCBA::*Hvabc1*, v ktorom bol gén *Hvabc1* pod kontrolou duplikovaného silného 35S promotoru. Konštrukt neobsahoval selekčný gén rezistencie voči kanamycínu v T–DNA úseku. Pozorovala sa schopnosť regenerácie a selekcia rastlín na médiu s obsahom kanamycínu, a prípadné podobnosti so štúdiami s ortológom *Hvabc1*, génom *Atwbc19*.

Pri selekcii na médiu s koncentráciou kanamycínu $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kanamycínu regeneroval nízky počet rastlín, 17 z 90 explantátov, z toho 4 rastliny boli vyselektované po presunutí na kultivačné médium. Zvolená koncentrácia kanamycínu predstavuje silný selekčný tlak na rastliny regenerujúce po transformácii. Rastliny vykazujú pomalší rast a chlorózu oproti rastlinám kultivovaným na médiu s obsahom kanamycínu $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Vykazujú teda známky kanamycínovej toxicity.

Mentewab a Stewart (2005) transformovali listové disky tabaku génom *Atwbc19*. Pri rovnakom selekčnom tlaku regenerovalo približne 100 rastlín na 100 transformovaných explantátov, však pri nízkej frekvencii transformantov (< 8 %) a bol označený ako nedostačujúci. Rastliny boli schopné regenerácie, pri koncentráciách vysokých ako 100 a 200 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kanamycínu, pričom, za najvhodnejšiu koncentráciu označili 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ kanamycínu (73 % transgénnych pri 40 % regenerácii).

Kang *et al.* (2010) skúmali schopnosť regenerácie rastlín z listových segmentov hybridného topľa, transformovaných génom *Atwbc19*, na médiu s obsahom kanamycínu v rozmedzí od 50 do 200 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pri koncentrácii kanamycínu 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bola frekvencia regenerácie rastlín na úrovni 65 rastlín na 100 explantátov. Regenerácia

rastlín bola zaznamenaná do koncentrácie $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pri tejto koncentrácii bola frekvencia regenerácie na úrovni 36 rastlín na 100 explantátov. Transgénne rastliny v oboch štúdiách nevykazovali morfológické odlišnosti.

Frekvencia regenerácie rastlín z listových diskov, pri koncentrácii kanamycínu v médiu $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ nedosahuje hodnoty zaznamenané v štúdiách s génom *Atwbc19*. Pri zníženej koncentrácii kanamycínu v médiu, $25 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, bola dosiahnutá vyššia frekvencia regenerácie. Znížená koncentrácia sa však podľa predchádzajúcich štúdií nejaví ako dostatočne efektívna pri procese selekcie transgénnych rastlín.

6 ZÁVER

Pre zistenie funkcie jačmenného ortológa génu *Atwbc19* bola realizovaná navrhnutá klonovacia stratégia. V rámci bakalárskej práce bol pripravený expresný vektor obsahujúci záujmový gén *Hvabc1*, s využitím Gateway® klonovacej technológie. Tranzientná expresia reportérového génu *gus* potvrdila správnosť pripraveného konštruktu na transformáciu tabaku. Tranzientnou transformáciou bola T-DNA začlenená do genómu transformovaných buniek, genetická informácia bola exprimovaná a expresia sa prejavila na úrovni proteínu. Expresný vektor bol použitý na *Agrobacterium*–sprostredkovanú transformáciu listových diskov tabaku. Získaných bolo 22 regenerovaných rastlín, ktoré boli vyselektované na médiu s obsahom antibiotika kanamycínu. Rastliny budú v budúcnosti testované na prítomnosť transgénu a bude overená jeho funkcia.

7 LITERATÚRA

- Ali H., Khan E., Sajad M.A. (2013): Phytoremediation of heavy metals– Concepts and applications. *Chemosphere* **91**, 869–881.
- Ames G. F.–L., Mimura C. S., Shyamala V. (1990): Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: Traffic ATPases. *FEMS Microbiology Reviews* **75**, 429–446.
- Arntzen C. (2015): Plant–made pharmaceuticals: From “Edible Vaccines” to Ebola therapeutics. *Plant Biotechnology Journal* **13**, 1013–1016.
- Barta A., Sommengruber K., Thompson D., Hartmuth K., Matzke M.A., Matzke A.J. (1986): The expression of a napoline synthase human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Molecular Biology* **6**, 347–357.
- Barton K.A., Binns A.N., Matzke A.J., Chilton M.–D. (1983): Regeneration of intact tobacco plants containing full length copies of genetically engineered T–DNA, and transmission of T–DNA to R1 progeny. *Cell* **32**, 1033–43.
- Bates G., Gaynor J., Shekhawat N. (1983): Fusion of plant protoplasts by electric fields. *Plant Physiology* **72**, 1110–1113.
- Bechtold N., Pelletier G. (1998): In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology* **82**, 259–266.
- Bevan M.W., Flavell R.B., Chilton M.–D. (1983): A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* **304**, 184–187.
- Bianchet M. A., Ko Y.H., Amzel M., Pedersen P.L. (1997): Modeling of nucleotide binding domains of ABC transporter proteins based on a F1–ATPase/recA topology: structural model of the nucleotide binding domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **29**, 503–524.
- Bombale S.L., Gowda P.H.R., Gunnaiah R., Malatheshaiyah N.T., Salome T., Swamidatta S.H. (2010). *In vitro* regeneration and transformation of Muskmelon (*Cucumis melo* L.) with alternative *Atwbc19* marker gene. *International Journal of Biochemistry and Biophysics* **6**, 1–12.
- Boocock M.R., Coggins J.R. (1983): Kinetics of 5–enolpyruvylshikimate–3–phosphate synthase inhibition by glyphosate. *FEBS Letters* **154**, 127–133.
- Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Hosler J.P., Johnson A.M., Jones A.R., Randolph–Anderson B.L., Robertson D., Klein T.M., Shark K.B., Sanford J.C. (1988): Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* **240**, 1534–1538.
- Brodzik R., Glogowska M., Bandurska K., Okulicz M., Deka D., Ko K., van der Linden J., Leusen J.H., Pogrebnyak N., Golovkin M., Stepiewski Z., Koprowski H. (2006): Plant–derived anti–Lewis Y mAb exhibits biological activities for efficient immunotherapy against human cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 8804–8809.
- Bunting K. D. (2002): ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem Cells* **20**, 11–20.
- Chilton M.–D., Drummond M. H., Merlo D. J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**, 263–271.
- Comai L., Facciotti D., Hiatt W.R., Thompson G., Rose R.E., Stalker D.M. (1985): Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* **317**, 741–744.
- Dandekar A. M. (1994): Genetic transformation of angiosperms In: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants*. Vol. 1 (Jain, S. M., Gupta, P. K., Newton, R. J., eds.), Kluwer Academic, Dordrecht, Holandsko, 193–225.

- Dandekar A.M., Fisk H.J. (2005): Plant Transformation: *Agrobacterium*-Mediated Gene Transfer. In: *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. Vol. 286 (Peña L., eds.), Humana Press, Totowa, USA, 35–46.
- Daniell H., Ruiz G., Denes B., Sandberg L., Langridge W. (2009): Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function. *BMC Biotechnology* **9**, 33.
- Davoodi-Semiromi A., Schreiber M., Nallapali S., Verma D., Singh N.D., Banks R.K., Chakrabarti D., Daniell H. (2010): A green vaccine confers dual immunity against cholera and malaria by oral and injectable immunization. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 223–242.
- De Muynck B., Navarre C., Boutry M. (2010): Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 529–563.
- De Wilde C., Peeters K., Jacobs A., Peck I., Depicker A. (2002): Expression of antibodies and Fab fragments in transgenic potato plants: a case study for bulk production in crop plants. *Molecular Breeding* **9**, 271–282.
- Doty S.L., Shang Q.T., Wilson A.M., Moore A.L., Newman L.A., Strand S.E. (2007): Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian P450 2E1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 6287–6291.
- Earley K.W., Haag J.R., Pontes O., Opper K., Juehne T., Song K., Pikaard C.S. (2006): Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal* **45**, 616–629.
- Fath M. J., Kolter R. (1993): ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiological Reviews* **57**, 995–1017.
- Ferry N., Gatehouse A.M.R. (2010): Transgenic crop plants for resistance to biotic stress. In *Transgenic Crop Plants: Utilization and Biosafety*. Vol. 2 (Kole C., Michler C.H., Abbott A.G., Hall T.C., eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Nemecko, 1–66.
- Gabaladón T., Koonin E.V. (2013): Functional and evolutionary implications of gene orthology. *Nature Reviews Genetics* **14**, 360–366.
- Ganapathi T.R., Suprasanna P., Rao P.S., Bapat V.A. (2004): Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)—A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology* **3**, 171–184.
- Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. (2007): Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 134–141.
- Goodin M.M., Zaitlin D., Najdu R.A., Lommel S.A. (2008): *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant–pathogen interactions. *Molecular Plant–Microbe Interactions* **21**, 1015–1026.
- Gurusamy P.D., Schäfer H., Ramamoorthy S., Wink M. (2017): Biologically active recombinant human erythropoietin expressed in hairy root cultures and regenerated plantlets of *Nicotiana tabacum* L. *PLoS ONE* **12**:8.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0182367>.
- Hannink K.N., Subramanian M., Rosser J.S., Basran A., Murray J.A.H., Shanks J.V., Bruce N.C. (2007): Enhanced transformation of TNT by tobacco plants expressing a bacterial nitroreductase. *International Journal of Phytoremediation* **9**, 385–401.
- Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. (1989): Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**, 76–78.
- Higgins C.F. (1992): ABC transporters—from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* **8**, 67–113.
- Hofmann G. A., Evans G.A. (1986): Electronic genetic – physical and biological aspects of cellular electromanipulation. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine* **5**, 6–25.
- Hood E.E., Witcher D.R., Maddock S., Meyer T., Baszczyński C., Bailey M., Flynn P., Register J., Marshall L., Bond D., Kulisek E., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C., Mehig R.J., Hernan R., Kappel W.K., Ritland D., Li C. P., Howard J.A. (1997): Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding* **3**, 291–306.

- Jefferson R., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987): GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6**, 3901–3907.
- Jones P.M., George A.M. (2004): The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 682–699.
- Kage K., Tsukahara S., Sugiyama T., Asada S., Ishikawa E., Tsuruo T., Sugimoto Y. (2002): Dominant–negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S–S dependent homodimerization. *International Journal of Cancer* **97**, 626–630.
- Kang B., Ye X., Osburn L.D., Stewart C.N., Cheng Z.M. (2010). Transgenic hybrid aspen overexpressing the *Atwbc19* gene encoding an ATP–binding cassette transporter confers resistance to four aminoglycoside antibiotics. *Plant Cell Reports* **29**, 643–650.
- Koob G.F., Arends M.A., Le Moal M. (2014): *Drugs, Addiction and the Brain*. 1st ed., Academic Press, Oxford, Spojené kráľovstvo, 350 strán.
- Krishnan A., Guiderdoni E., An G., Hsing Y.i. C., Han C.–d. Lee M.C., Yu S.–M., Upadhyaya N., Ramachandran S., Zhang Q., Sundaresan V., Hirochika H., Leung H., Pereira A. (2009): Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiology* **6**, 165–170.
- Lee M.K., Walters F.S., Hart H., Palekar N., Chen J.–S. (2003): The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab d–endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4648–4657.
- Liénard D., Sourrouille C., Gomord V., Faye L. (2007): Pharming and transgenic plants. *Biotechnology Annual Review* **13**, 115–147.
- Lombardo L. (2014): Genetic use restriction technologies: a review. *Plant Biotechnology Journal* **12**, 995–1005.
- Ma J.K.C., Hikmat B.Y., Wycoff K., Vine N.D., Chargelegue D., Yu L., Hein M.B., Lehner T. (1998): Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nature Medicine* **4**, 601–6.
- Martinoia E., Klein M., Geisler M., Bovet L., Forestier C., Kolukisaoglu U., Müller–Röber B., Schulz B. (2002): Multifunctionality of plant ABC transporters more than just detoxifiers. *Planta* **214**, 345–355.
- McCormick A.A., Reinl S.J., Cameron T.I., Vojdani F., Fronfield M., Levy R., Tusé D. (2003): Individualized human scFv vaccines produced in plants: humoral anti–idiotypic responses in vaccinated mice confirm relevance to the tumor Ig. *Journal of Immunological Methods* **278**, 95–104.
- McCormick A.A., Reddy S., Reinl S.J., Cameron T.I., Czerwinski D.K., Vojdani F., Hanley K.M., Garger S.J., White E.L., Novak J., Barrett J., Holtz R.B., Tusé D., Levy R. (2008): Plant–produced idiotype vaccines for the treatment of non–Hodgkin’s lymphoma: safety and immunogenicity in a phase I clinical study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 10131–10136.
- Mentewab A., Stewart C.N. Jr. (2005): Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nature Biotechnology* **25**, 1177–1180.
- Mingeot–Leclercq M.P., Glupczynski Y., Tulkens P.M. (1999): Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 727–737.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Oey M., Lohse M., Scharff L.B., Kreikemeyer B., Bock R. (2009): Plastid production of protein antibiotics against pneumonia via a new strategy for high–level expression of antimicrobial proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6579–6584.

- O'Keefe B.R., Vojdani F., Buffa V., Shattock R.J., Montefiori D.C. Bakke J., Mirsalis J., d'Andrea A.L., Hume S.D., Bratcher B. Saucedo C.J., McMahon J.B., Pogue G.P., Palmer K.E. (2009): Scaleable manufacture of HIV-1 entry inhibitor griffithsin and validation of its safety and efficacy as a topical microbicide component. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6099–6104.
- Rafati M., Khorasani N., Moattar F., Shirvany A., Moraghebi F., Hosseinzadeh S. (2011): Phytoremediation potential of *Populus alba* and *Morus alba* for cadmium, chromium and nickel absorption from polluted soil. *International Journal of Environmental Research* **5**, 961–970.
- Rao V.S. (2015): *Transgenic Herbicide Resistance in Plants*. 1st ed., CRC Press, Boca Raton, USA, 478 strán.
- Rivera A. L., Gómez-Limb M., Fernández F., Loske A.M. (2012): Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews* **9**, 308–345.
- Ruhlman, T., Ahangari R., Devine A., Samsam M., Daniell H. (2007): Expression of cholera toxin B–proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts – oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 495–510.
- Salt D.E., Smith R.D., Raskin I. (1998): Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 643–668.
- Sanford J.C., Smith F.D., Russel J.A. (1993): Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology* **217**, 483–509.
- Sanford J.C. (2000): The development of the biolistic process. *In Vitro Cellular & Developmental Biology– Plant* **36**, 303–308.
- Saulis G., Venslauskas M.S., Naktinis J.: Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* **26**, 1–13.
- Sekara A., Poniedzialek M., Ciura J., Jedrzczyk E. (2005): Cadmium and lead accumulation and distribution in the organs of nine crops: implications for phytoremediation. *Polish Journal of Environmental Studies* **14**, 509–516.
- Shoji Y., Bi H., Musiyuchuk K., Rhee A., Horsey A., Roy G., Green B., Shamloul M., Farrance C.E., Taggart B., Mytle N., Ugulava N., Rabindran S., Mett V., Chichester J.A., Yusibov V. (2009): Plant-derived hemagglutinin protects ferrets against challenge infection with the A/Indonesia/05/05 strain of avian influenza. *Vaccine* **27**, 1087–1092.
- Smigocki A.C., Ivic-Haymes S., Li H., Savić J. (2013): Pest protection conferred by a beta vulgaris serine proteinase inhibitor gene. *PLoS ONE* **8**:2.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057303>.
- Snustad D.P., Simmons M.J. (2009): *Genetika*. 5th ed., Mupress, Brno, Česká republika, 894 strán.
- Southgate E.M., Davey M.R., Power J.B., Marchant R. (1995): Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. *Biotechnology Advances* **13**, 631–651.
- Stachel S.E., Zambryski, P.C. (1985): *virA* and *virG* control the plant induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens*. *Cell* **46**, 325–333.
- Stalker D.M., Hiatt W.R., Comai L. (1985): A single amino acid substitution in the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase confers resistance to the herbicide glyphosate. *The Journal of Biological Chemistry* **260**, 4724–4728.
- Taylor N.J., Fauquet C.M. (2002): Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology* **21**, 963–977.
- Tremblay R., Wang D., Jevnikar A.M., Ma S. (2010): Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances* **28**, 214–221.
- Tzfira T., Citovsky V. (2002): Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends in Cell Biology* **12**, 121–128.
- Vachon V., Laprade R., Schwartz J.-L. (2012): Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* **111**, 1–12.

- Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H., Jansens S., De Beuckleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montagu M., Leemans J. (1987): Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* **328**, 33–37.
- van Attikum H., Bundock P., Hooykaas P.J.J. (2001): Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration. *The EMBO Journal* **20**, 6550–6558.
- Vasquez D. (1979): Inhibitors of Protein Biosynthesis. In: *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*. Vol. 30, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Nemecko, 1–306.
- Vernade D., Herrera-Estrella A., Wang K., Van Montagu M. (1988): Glycine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by acetosyringone at low pH. *Journal of Bacteriology* **170**, 5822–5829.
- Walker J. E., Saraste M., Runswick M. J., Gay N. J. (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO Journal* **1**, 945–951.
- Winans S.C. (1992): Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiological Reviews* **56**, 12–31.
- Yao J., Weng Y., Dickey A. and Wang K.Y. (2015): Plants as Factories for Human Pharmaceuticals: Applications and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 28549–28565.
- Yoon J., Cao X., Zhou Q., Ma L.Q. (2006): Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment* **368**, 456–464.
- Young J., Holland I. B. (1999): ABC transporters: bacterial exporters revisited five years on. *Biochimica et Biophysica Acta* **1461**, 177–200.
- Ziemienowicz A., Tinland B., Bryant J., Gloeckler V., Hohn B. (2000): Plant enzymes but not *Agrobacterium* VirD2 mediate T-DNA ligation *in vitro*. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 6317–6322.
- Zupan J., Muth T.R., Draper O., Zambryski P. (2000): The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* **23**, 11–28.

Internetové zdroje:

Planet Biotechnology Inc.: <http://www.planetbiotechnology.com/products.html> (12.2.2018)

Qiagen: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=13d33145-9f64-426a-a43b-394211d8cf2b&lang=en> (15.3.2018)

VIB: <https://gateway.psb.ugent.be/search> (6.5.2018)

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

- 35S – 35S promotor vírusu karfiolovej mozaiky
- ABC transportér – „ATP-binding cassette“ transportér
- ADCC – bunková cytotoxicita závislá na protilátkach
- AMA1 – apikálny membránový antigén 1
- BAP– benzylaminopurín
- bakteriofág λ – bakteriofág lambda
- bp – pár báz
- Bt – rastliny modifikované génom z *Bacillus thuringiensis*
- BrdU – bromodeoxyuridín
- cal – signálny peptid proteínu kalretikulínu
- CCR5 – C–C chemokínový receptor 5
- CRISPR/Cas9 – „CRISPR-associated protein-9“ nukleáza
- CTB – podjednotka toxínu B cholery (*Vibrio cholerae*)
- cv. – kultivar
- EC₅₀ – polovičná maximálna efektívna koncentrácia
- ER – endoplazmatické retikulum
- Fv – variabilný fragment
- Fab – antigén–viažuci fragment
- GM-CSF – granulocytový–makrofágový kolónie–stimulačný faktor
- GRFT – grifitsín
- GRFT–P – rastlinný grifitsín
- HIV–1 – vírus ľudskej imunodeficiencie podtyp 1
- HT – rastliny tolerantné k herbicídom
- Ig – imunoglobulín
- IgA – imunoglobulín A
- IgG – imunoglobulín G
- IgG1, IgG2a, IgG2b – podtriedy imunoglobulínu G
- IgM – imunoglobulín M

IR – rastliny rezistentné voči hmyzu
Kan – kanamycín
KOH – hydroxid draselný
LB – Luria–Bertani
LeY – Lewis Y oligosacharid
MERS–CoV – koronavírus MERS
MgCl₂ – chlorid horečnatý
MSP1 – merozoový povrchový proteín 1
MTT – 3–(4,5–dimetyltiazol–2–yl)–2,5–difenylnitrotetrazólium bromid
NAA – naftalénoctová kyselina
NBD – nukleotid–viažuca doména
PMF – rastlinný „molecular farming“
rhEPO – rekombinantný ľudský erytropoetín
RNAi – RNA interferencia
rpm – otáčky za minútu
scFv – jednoreťazcový variabilný fragment
T–DNA – transferová DNA
TAE – Tris–acetát–EDTA
Ti–plazmid – „Tumor indukujúci“– plazmid
TMD – transmembránová doména
TNT – 2,4,6–trinitrotoluén
Th1/Th2 – typ 1 T–pomocných buniek/ typ 2 T–pomocných buniek
TMV – vírus tabakovej mozaiky
TSP – celkový rozpustný proteín
U – jednotka aktivity enzýmu
X–Gluc – 5–bróm–4–chlór–3–indolyl–beta–D–glukurónová kyselina
ZFN – „zinc finger“ nukleázy