

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Tranzientní produkce protilátky trastuzumab v rostlinách
tabáku**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Radek Vítek

Obor studia: Biotechnologie a šlechtění rostlin

Vedoucí práce: Ing. Vladimíra Sedláková, Ph.D.

Vedoucí praxe: Mgr. Tomáš Moravec, PhD.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Tranzientní produkce protilátky trastuzumab v rostlinách tabáku" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucí práce Ing. Vladimíře Sedlákové, Ph.D. za trpělivost, ochotu a nápomoc při řešení diplomové práce. Dále bych rád poděkoval vedoucímu odborné praxe Mgr. Tomáši Moravci, Ph.D. za dohled při samotném řešení všech experimentálních částí, stejně tak jako celému kolektivu laboratoře Virologie na Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., kde mohla být experimentální část vypracována.

Tranzientní produkce protilátky trastuzumab v rostlinách tabáku

Abstrakt

Molekulární farmaření je biotechnologické odvětví, které využívá rostliny pro produkci farmaceutických proteinů. Díky tomu lze levně, rychle a bezpečně vyrobit velké množství potřebného biofarmaka. Jedním z nich je trastuzumab, monoklonální protilátka cílící na Her2 pozitivní karcinomy, nejčastěji prsu a žaludku.

Pro potřeby mé diplomové práce byly pomocí metod genového inženýrství vytvořeny 2 typy vektorů, nereplikující se a replikující se (založené na rostlinných viřech TMV a PVX). Ve výsledku však replikující se vektory neposkytly žádnou expresi, a i přes opakované pokusy se nepovedlo vyvolat stabilní expresi protilátky. Nereplikující vektory však s úspěchem poskytly vysokou expresi. Byly vytvořeny 3 pokusné varianty, kdy byla pomocí vakuové agroinfiltrace kvantifikována tranzientní exprese protilátky v rostlinách *N. benthamiana* WT, *N. benthamiana* HCPro a *N. rustica*.

Ke kvantifikaci proteinů byla využita ELISA a naměřené hodnoty byly normalizovány na celkový rozpustný protein. V první části byly rostliny koinfiltrovány vektory pro expresi protilátky trastuzumab a GFP. Byla potvrzena korelace exprese GFP a trastuzumabu, kdy fluorescence GFP dosahovala nejvyšších hodnot 5 DPI a množství trastuzumabu bylo nejvyšší v rozmezí od 6.-7. DPI. GFP tak lze použít pro odhad optimální doby sklizně, kdy rozdíl mezi ním a trastuzumabem je 1-2 dny. Nejvyšší sklizeň biomasy poskytla *N. rustica* (průměrně 26,12 g na rostlinu), ale exprese trastuzumabu se v ní nepodařila. Oba genotypy *N. benthamiana* se ve sklizené biomase statisticky nelišily. U WT linie bylo průměrně sklizeno 9,30 g a HCPro průměrně 8,62 g. Ovšem transgenní linie HCPro poskytla průměrně 9,296 mg trastuzumabu na rostlinu, tedy mnohem větší výtěžek než WT linie s 2,782 mg na rostlinu. Nakonec se protilátku podařilo úspěšně vyizolovat a purifikovat pomocí afinitní chromatografie s proteinem G.

Klíčová slova: tranzientní exprese, monoklonální protilátky, agroinfiltrace, molekulární farmaření, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana rustica*, trastuzumab, afinitní chromatografie, virové vektory

Transient production of trastuzumab antibodies in tobacco plant

Abstract:

Molecular farming is a biotechnology field which enables the use of plants for the production of pharmaceutical proteins. This allows large quantities of the required biopharmaceutical to be produced quickly and at a low cost. One of these is trastuzumab, an antibody targeting Her2-positive carcinoma, most commonly breast and gastric ones.

For the purpose of my thesis, 2 types of vectors, non-replicating and replicating (based on plant viruses TMV and PVX) were created using genetic engineering methods. However, in the result, the replicating vectors did not provide any expression, and despite repeated attempts, a stable expression could not be provide. The non-replicating ones, however, successfully provided high expression. Three experimental variants were designed by using a vacuum agroinfiltration to ensure transient expression of the antibody in *N. benthamiana* WT, *N. benthamiana* HCPro and *N. rustica* plants.

ELISA was used to quantify the proteins and the measured values were normalized to total soluble protein. In the first part, plants were co-infiltrated with vectors for trastuzumab and GFP. The correlation of GFP and trastuzumab expression was confirmed, with GFP fluorescence peaking at 5 DPI and trastuzumab levels peaking from 6.-7 DPI. Thus, GFP can be used to estimate the optimal harvest time, with a difference of 1-2 days compared to trastuzumab concentration. *N. rustica* provided the highest biomass harvest with an average of 26.12 g per plant but failed to express trastuzumab. The two genotypes of *N. benthamiana* were not statistically different in harvested biomass. The WT line yielded an average of 9.30 g and HCPro averaged at 8.62 g. However, the HCPro transgenic line gave an average of 9.296 mg of trastuzumab per plant, a much higher yield than the WT line with 2.782 mg per plant. Finally, the antibody was successfully isolated and purified by protein G affinity chromatography.

Keywords: transient expression, monoclonal antibodies, agroinfiltration, molecular pharming, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana rustica*, trastuzumab, affinity chromatography, viral vectors

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecké hypotézy a cíle práce.....	1
2.1	Vědecké hypotézy	1
2.2	Cíle práce	2
3	Literární řešerše.....	3
3.1	Molekulární farmaření (Molecular pharming).....	3
3.1.1	Význam rekombinantních proteinů	3
3.1.2	Molekulární farmaření	4
3.2	Rostlina jako fotosyntetická továrna.....	6
3.3	Možnosti exprese rekombinantních proteinů v rostlinách.....	9
3.4	Tabák, nejen jako oblíbený model pro produkci proteinů	10
3.5	Protilátky	11
3.5.1	Struktura a funkce	12
3.5.2	Možnosti využití protilátek.....	13
3.6	Trastuzumab.....	14
4	Metodika	15
4.1	Použité chemikálie.....	15
4.2	Popis pokusného materiálu	18
4.2.1	Charakteristika pokusných rostlin	18
4.2.2	Charakteristika pokusných bakterií	18
4.2.3	Vektory	18
4.3	Molekulární klonování pomocí metody GB 2.0.....	19
4.3.1	Získání sekvence a její domestikace.....	20
4.3.2	Transformace <i>Escherichia coli</i> a jejich kultivace.....	21
4.3.3	Izolace plazmidové DNA.....	21
4.3.4	Restrikční analýza.....	22
4.3.5	Sekvenování.....	22
4.3.6	Sestavení finálních vektorů.....	22
4.4	Práce s <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	24
4.4.1	Transformace plazmidů do <i>A. tumefaciens</i>	24
4.4.2	Tvorba glycerolových konzerv	25
4.5	Agroinfiltrace.....	25
4.5.1	Testovací agroinfiltrace	25
4.5.2	Vakuová agroinfiltrace	26

4.6	Kultivace, sklizeň a zpracování rostlin.....	27
4.7	Příprava extraktů.....	27
4.7.1	Extrakce pomocí keramických kuliček.....	27
4.7.2	Tření v tekutém dusíku	27
4.7.3	Příprava extraktu v mixéru	28
4.8	Extrakce trastuzumabu	28
4.8.1	Izolace precipitací	28
4.8.2	Purifikace afinitní chromatografií s proteinem G.....	28
4.9	Obrazové záznamy	29
4.9.1	Fotografická dokumentace.....	29
4.9.2	Fluorescenční mikroskopie	29
4.10	Statistické vyhodnocení	29
4.11	Metody pro kvalifikaci a kvantifikaci proteinů.....	30
4.11.1	Stanovení celkového obsahu rozpustných proteinů.....	30
4.11.2	Fluorescence GFP	30
4.11.3	ELISA	30
4.11.4	Proteiny denaturující SDS-PAGE.....	31
4.11.5	Polosuchý western blot	31
5	Výsledky.....	33
5.1	Statistická analýza.....	33
5.2	Testování vzniklých vektorů a stanovení optické denzity	34
5.3	Stanovení optimální doby sklizně	35
5.4	Sklizeň biomasy	36
5.5	Hodnocení celkové exprese.....	37
5.6	Hodnocení izolace a purifikace	38
5.6.1	Izolace	38
5.6.2	Purifikace	40
6	Diskuse	43
6.1	Vytvoření genových vektorů	43
6.2	Určení ideální doby sklizně	43
6.3	Porovnání celkové exprese	44
6.4	Izolace a purifikace	44
7	Závěr	46
8	Literatura.....	47
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	54
10	Samostatné přílohy	55

1 Úvod

Rostliny představují jeden ze základů zemědělství. Poskytují nejen potravu nám i hospodářským zvířatům, ale také materiál pro řadu průmyslových odvětví. V současné době rozmachu molekulární biologie a genových technologií ale nemusí sloužit jen pro potřeby klasického zemědělství. Pomocí genetických modifikací byly vytvořeny např. rostliny, které v sobě dokážou hyperakumulovat těžké kovy z půdy. Jejich potenciál je pak využití v procesu fytořemediace (ozdravování půdy pomocí rostlin). Obdobně pak mohou být využity pro fytomining, tedy k cílenému získávání kovů z půdy nebo odpadních kalů (Kotrba et al. 2009). Rozvíjí se tak nová biotechnologická využití rostlin.

Další využití můžeme najít v nově vznikajícím odvětví zvaném molekulární farmaření. Pomocí genetických modifikací můžeme rostliny upravit tak, aby tvořily významné farmaceutické molekuly, především proteiny. Může se jednat o protilátky, hormony, růstové faktory, enzymy a další (Engelhard 2007). Významné jsou především protilátky, které jsou kromě využití ve farmacii nepostradatelné v řadě diagnostických metod (ELISA, antigenní testy apod.) (Campbell et al. 1991). Kromě toho nachází využití i v tzv. biologické léčbě nádorových onemocnění, kdy umožňují cílenou léčbu. Často bez drastických negativních následků v porovnání s klasicky používanou chemoterapií a radioterapií (Schirrmacher 2019). Příkladem může být trastuzumab, hlavní složka přípravku Herceptin®. Ten je úspěšně používán pro léčbu karcinomů s nadměrnou expresí povrchového receptoru pro EGF, např. karcinom prsu a žaludku (Roy & Perez 2009, Park et al. 2020).

Rostlinný expresní systém nám poskytuje řadu výhod, díky fotosyntéze není náročný na výživu a neobsahuje žádné dosud objevené patogeny přenosné na člověka. Pěstování transgenních rostlin, se až na přísnější byrokracii a větší důraz na bezpečnost, nijak neliší od pěstování běžných rostlin. Díky tomu může tento model poskytnout levnou, nenáročnou a bezpečnou alternativu k současným a běžně používaným metodám. To v kombinaci s predikovaným růstem populace, zvýšeným výskytem civilizačních chorob a klimatickými změnami představuje hlavní důvody, proč se této problematice věnovat (Engelhard 2007).

2 Vědecké hypotézy a cíle práce

2.1 Vědecké hypotézy

Pro moji diplomovou práci byly vytvořeny následující hypotézy, které budou dále ověřeny.

1. Existují rozdíly v expresi protilátky trastuzumabu mezi jednotlivými druhy a genotypy tabáků.
2. Existují rozdíly při použití replikativních a nereplikativních vektorů na výslednou expresi proteinů.
3. Koexprese GFP jakožto reportérového genu koreluje s expresí a akumulací protilátky, a tudíž lze GFP použít pro odhad optimální doby sklizně.

2.2 Cíle práce

Na základě uvedených hypotéz byly formulovány cíle práce:

1. Vytvořit genové vektory, které vyvolají velmi silnou expresi rekombinantní protilátky trastuzumab v rostlinách.
2. Vypěstovat dostatečné množství rostlin pro následnou agroinfiltraci genovými vektory.
3. Sklidit rostliny a vyhodnotit jednotlivé kvantitativní parametry (sklizená biomasa a množství trastuzumabu a GFP).
4. Vytvořit extrakty, které budou dále analyzovány pomocí metody ELISA.
5. Provést statistické vyhodnocení výsledků s cílem porovnat rozdíly v expresi mezi jednotlivými genotypy rostlin a použitými vektory.
6. Izolovat trastuzumab z rostlinného materiálu a následně ho vypurifikovat pomocí afinitní chromatografie

3 Literární rešerše

3.1 Molekulární farmaření (Molecular pharming)

3.1.1 Význam rekombinantních proteinů

Podstatou genového inženýrství je práce s rekombinantní DNA (rDNA). Jedná se o molekulu DNA vytvořenou v laboratoři kombinací několika sekvencí různého původu a je upravena pro zdárné začlenění a funkci v cílovém organismu. DNA může mít přírodní původ (izolována z konkrétního organismu), nebo být připravena synteticky na zakázku ve specializované laboratoři (Biologics International Corp 2018). Pomocí rDNA tak můžeme přenášet DNA mezi organismy pro potřeby výzkumu (identifikace, analýza funkce a mapování genů), tvorbu genetických modifikací (rostliny odolné škůdcům a chorobám), produkci rekombinantních proteinů apod. (Vashishth & Tehri 2015).

Rekombinantní protein je takový, který byl uměle vyprodukovan podle rDNA v cílovém organismu, do kterého byla rDNA zaklonována metodami genového inženýrství. Cílem je nejčastěji produkce velkého množství proteinu při relativně nízkých nákladech, které mají široké uplatnění v řadě oborů (Biologics International Corp 2018). Produkovány jsou v expresních systémech, tedy v modelových organismech, se kterými je snadná manipulace, poskytují vysoké výtěžky, mají známé genetické pozadí a rychlou generační dobu. Nejpoužívanější organismy pro produkci rekombinantních proteinů jsou např. *E. coli*, *S. cerevisiae*, různé linie hmyzích a savčích buněk (např. CHO a HEK) a systémech odvozených od rostlin, které budou podrobněji popsány dále. Každý systém má některé výhody a nevýhody. Pro potřeby produkce konkrétního proteinu je tak třeba zvolit vhodný expresní systém (Burnett & Burnett 2020). Uplatnění rekombinantních proteinů najdeme ve výzkumu, lidské a veterinární medicíně, průmyslu, diagnostice chorob a nemocí, potravinářství a v dalších oborech (Biologics International Corp 2018).

Konkrétní příklady rekombinantních proteinů jsou například enzymy nepostradatelné pro výzkum, jako různé typy polymeráz a restriktáz. Dále se jedná o protilátky používané v diagnostice (western blot, ELISA) a terapeutické protilátky, používané například v tzv. biologické léčbě rakoviny. Řada enzymů je využívána v potravinářství, např. chymosin pro výrobu sýrů nebo pektinázy a glukonázy pro úpravu džusů. Díky enzymům v pracích prášcích (amylázy, proteázy, lipázy) je praní účinné i při nižších teplotách. V neposlední řadě je to celá řada farmaceutických proteinů, které mají nezastupitelnou úlohu v léčbě nemocí a chorob (Bhatnagar 2007, Moon et al. 2019).

3.1.2 Molekulární farmaření

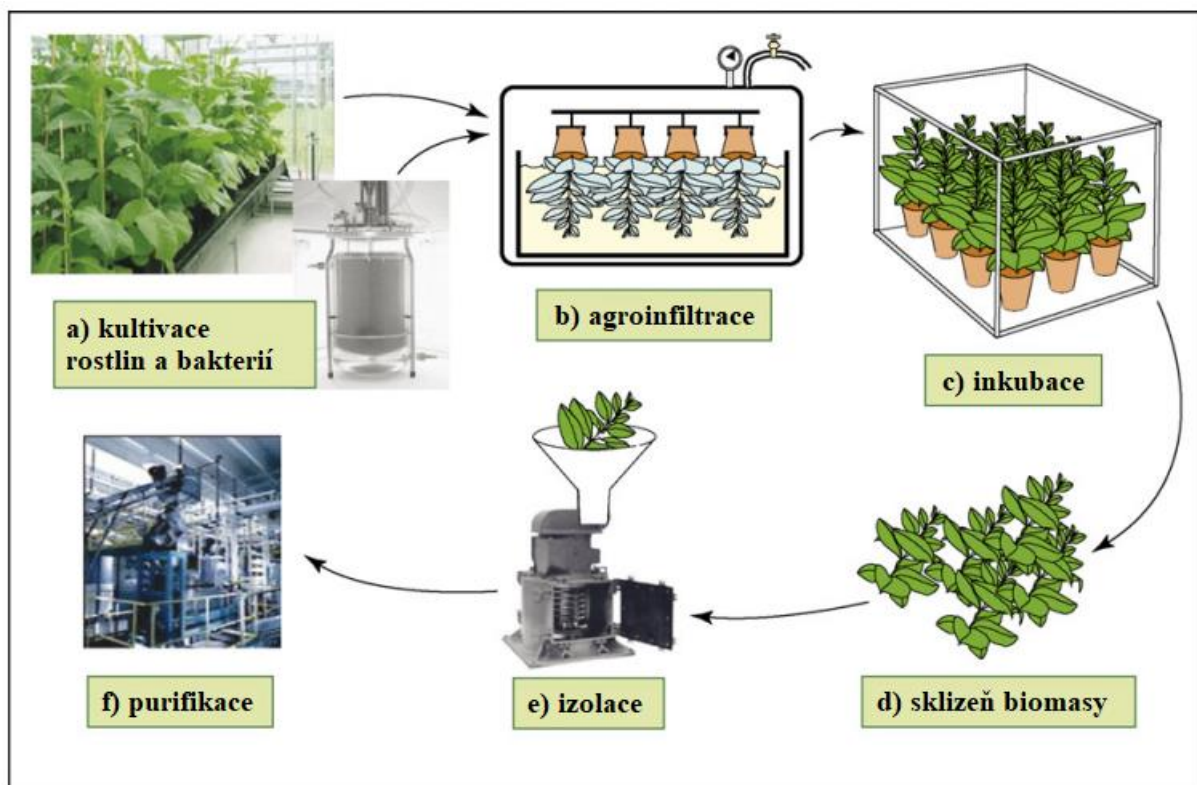
V anglicky psané literatuře se setkáváme s výrazem „*molecular pharming*¹“ tedy složeninou ze slov „*pharmaceutical*“ (farmaceutické) a „*farming*“ (farmaření). Jedná se o biotechnologické odvětví, které využívá geneticky modifikovaných rostlin a živočichů k produkci významných farmaceutických sloučenin, nejčastěji rekombinantních proteinů (Engelhard 2007) popřípadě sekundárních metabolitů (Ma & Wang 2012). Můžeme zmínit např. protilátky, hormony, enzymy, komponenty vakcín a další. Tyto molekuly je doposud složité připravit uměle a jejich získávání z přirozeného biologického materiálu má také svá omezení. Proto se jejich produkce pomocí metod genového inženýrství v živých organismech jeví jako velice perspektivní. Na proteinech založená léčiva jsou pak významná kvůli své specifitě, bezpečnosti a bioaktivitě (Engelhard 2007). V některých případech jsou dokonce nenahraditelnou součástí léčby, např. inzulin (Aronson 2012).

Rozvoj genového inženýrství, tedy přenos genů mezi jedinci, začal v 70. letech minulého století. Historicky prvním lidským rekombinantním proteinem se stal v roce 1977 somatostatin produkovaný v *E. coli* (Itakura et al. 1977). Zanedlouho následoval rekombinantní inzulin produkovaný taktéž v *E. coli*, který se roku 1982 stal prvním rekombinantním proteinem uznaným jako léčivo pod značkou Humulin® (Quianzon & Cheikh 2012). Lék znamenal velký přínos, protože do té doby se inzulin izoloval z prasečích a kravských slinivek, ale jeho struktura neodpovídá plně lidskému inzulinu. Od té doby bylo vytvořeno nespočet proteinů a mnoho dalších uznáno jako léčivo. Produkovány jsou nejčastěji v mikroorganismech a buněčných liniích. Každý expresní systém má však své silné i slabé stránky (Burnett & Burnett 2020), které budou rozebrány v další kapitole.

Molekulární farmaření místo mikroorganismů používá domestikované rostliny a zvířata. Hlavní výhodou je možnost pěstování, respektive chovu bez speciálních podmínek (kontrolovaná teplota, sterilita atd.), jako v běžných podmínkách zemědělství (Engelhard 2007, Twyman et al. 2003). Z řad zvířat můžeme jmenovat například kozy produkující v mléku antitrombin, který je uznaný a používaný lék pod značkou ATryn® pro léčbu srážlivosti krve (Adiguzel et al. 2009). Dále bylo publikováno mnoho prací na produkci farmaceutických proteinů ve vejcích, mléce, krevním séru a moči (Müller-Terpitz 2007). Prvním rekombinantním proteinem z rostlin, který byl uznán jako léčivý přípravek byla taliglucérazá- α pod obchodní značkou Elelyso® produkovaná v suspenzní kultuře mrkve. Jedná se o rekombinantní enzym štěpící glukocerebrosidy využívaný při léčbě Gaucherovy choroby I. typu (Fox 2012). Významným se stal lék ZMapp® během epidemie viru eboly v roce 2014-16. Jedná se o směs tří humanizovaných monoklonálních protilátek produkovaných v tabáku (*N. benthamiana* D.), které mají neutralizační aktivitu proti známým kmenům viru (Tran et al. 2016). Jeho přípravu pomocí tranzientní exprese shrnuje Obr. 1. Jak v případě zvířat, tak i rostlin se mnoho biofarmak produkovaných v nich jeví jako slibné a řada z nich se dostala do druhé i třetí fáze klinických testů, nebo podstupuje komercializaci. Cesta uznání nového léku je však

¹Můžeme se také setkat s pojmy „*molecular farming*“ a „*biopharming*“ a jedná se o synonyma. Pojem pharming se také vyskytuje v informatice, kde označuje získávání citlivých informací internetovými podvodníky.

dlouhá a nákladná procedura, navíc je trh často už dostatečně nasycen. Proto se s biofarmaky produkovanými v rostlinách a zvířatech zatím nesetkáváme tak často (Park & Wi 2016).



Obr. 1: Schéma přípravy produkce rekombinantních proteinů pomocí tranzientní exprese. Na počátku je třeba vypěstovat dostatečné množství rostlin a bakterií. Následuje vakuová agroinfiltrace rostlin a jejich inkubace. Během této doby dochází k expresi a produkci žádaného proteinu. Následuje sklizeň biomasy a její homogenizace. Poté mohou být proteiny izolovány a purifikovány. Převzato a upraveno podle Gleba et al. 2007.

Molekulární farmaření nám tak může poskytnout nový, bezpečnější a levný způsob výroby léčiv. Mnoho firem již využívá ekonomických výhod plynoucích z tohoto oboru. Je však stále nutné řešit otázky jako volba vhodného modelového organismu, dopad na životní prostředí, zdravotní nezávadnost vyprodukovaných léčiv, etické otázky a ochotu přijmout nové metody společností. Do budoucna se dá předpokládat, že rozšířením metod molekulárního farmaření (využívání geneticky modifikovaných rostlin a živočichů) může být rychlejší, levnější a více flexibilní než tradiční způsoby výroby terapeutických proteinů. Také může najít uplatnění při vývoji zcela nových léčivých látek (Engelhard 2007). Molekulární farmaření může navíc přinést nové využití rostlin v zemědělství, než je klasická produkce potravin, krmiv, textilních vláken apod. (Park & Wi 2016).

3.2 Rostlina jako fotosyntetická továrna

V laboratořích i ve farmaceutickém průmyslu se dnes se můžeme setkat s řadou expresních systémů. Volba toho nejvhodnějšího pak závisí na množství faktorů. Zásadním hlediskem jsou vlastnosti daného proteinu (velikost, struktura, posttranslační modifikace, targeting). Dále pak konečné využití proteinu (intravenózní terapeutické použití má vyšší nároky na čistotu a kvalitu než průmyslové použití), požadovaný výtěžek apod. Například jedním z nejčastějších systémů je bakterie *E. coli*, která umožňuje rychlou, masivní a levnou produkci proteinů, ale postrádá většinu posttranslačních modifikací běžných u eukaryot a má problém dokonce i s tvorbou disulfidických můstků. Systémy odvozené od savčích a hmyzích buněk tyto modifikace umožňují, ovšem za řádově vyšších nákladů a dosažení nižších výtěžků ve srovnání s *E. coli* (Brondyk 2009). Popis nejběžnějších expresních systémů je shrnut v Tabl.

Produkce rekombinantních proteinů v rostlinách má velký potenciál a poskytuje řadu výhod. Rostliny jsou díky fotosyntéze samostatné, co se týče výživy. Ke kultivaci jim tedy stačí dostatečný prostor, světlo, voda a minerální výživa (Burnett & Burnett 2020). Není třeba dodávat organické sloučeniny, jako třeba u bakterií, kvasinek, a dokonce ani komplexní biologická média jako savčím buňkám. Rostlinné buňky umožňují všechny komplexní eukaryotické posttranslační modifikace proteinů, správný folding (skládání) a kompletizaci více-proteinových struktur, pro produkci složitých a komplexních proteinů se správnou biologickou aktivitou (Russell 2000, Shaaltiel et al. 2007). Další výhodou rostlin je, že se u nich nevyskytují původci virových, prionových či jiných onemocnění, která by mohla být přenesena na člověka či zvířata, což je důležité pro bezpečnost výsledných produktů (Park & Wi 2016). V minulosti představovala problém jednodušší, specificky rostlinná glykosylace. Nevýhodou je zejména výskyt imunogenních sacharidů, jako například fukózy a xylózy. Nicméně dnes již existují transgenní rostliny, které jsou schopné plně lidské glykosylace včetně biosyntézy a připojení kyseliny sialové (Misaki et al. 2006).

Konkrétně u protilátek je glykosylace zodpovědná za efektorovou aktivitu proteinu, výskyt imunogenních sacharidů tak může způsobit změnu efektorových funkcí protilátky, zkrácení poločasu rozpadu v séru a v extrémních případech i silné alergické reakce (Beck et al. 2008). Týmy věnující se proteinovým glykosylacím však vytvořily několik transgenních linií, které pomáhají tento problém překonat. Základem byl genový knock-out enzymů zodpovědných za fykosylaci a xylosylaci a transfer genů, které řídí lidské glykosylační dráhy. Manipulace s rostlinnými glykosylačními drahami neměla vliv na výsledný fenotyp rostlin (Kallolimath & Steinkellner 2015).

Tab.1: Shrnutí nejvýznamnějších expresních systémů. Převzato a upraveno podle Burnett & Burnett 2020, Thermo Fisher Scientific 2022.

Druh expresního systému	Výhody	Nevýhody
Bakteriální - <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i>	- Nízké náklady - Nenáročné na médium a kultivační podmínky - Možnost rozšíření - Dobře popsané a odvozené buněčné linie - Velmi krátká produkční doba - Dobrá manipulace metodami genového inženýrství	- Rozpustnost proteinů - Potřeba specifické optimalizace pro některé proteiny - Proteiny >30 kDa mají problém se skládáním (folding) a exportem (tvorba inkluzních tělísek) - Problém s tvorbou SS můstků - Kultivace ve fermentačních nádržích, nutná sterilita práce - Posttranslační modifikace typické pro eukaryota chybí
Kvasinkový - <i>S. cerevisiae</i> - <i>P. pastoris</i>	- Nízké náklady - Nenáročné na médium a kultivační podmínky - Optimalizované - Možnost rozšíření - Dobře popsané a odvozené buněčné linie - Správný folding a posttranslační modifikace - Krátká produkční doba a stabilní produkce	- Chybí lidské glykosylace - Proteiny obsahují imunogenní sacharidy - Pro vysokou výtěžnost nutná fermentační nádrž - Náročné na sterilitu - Náročná extrakce proteinů z buněk
Savčí buňky - CHO - HEK	- Vysoká úroveň zpracování proteinů - Vysoké výtěžky - Produkce možná pomocí tranzientní i stabilní exprese - Optimalizovaný systém pro rychlou a výtěžnou tranzientní expresi - Tvorba komplexních proteinů - Posttranslační modifikace	- Velké výtěžky možné jen v suspenzních kulturách - Náročné na médium a podmínky - Vysoké riziko výskytu přenosných patogenů - Nestabilní buněčné linie - Náročný na čas a transformaci - Náročné na sterilitu - Složité na rozšíření
Hmyzí buňky	- Vysoká úroveň produkce proteinů - Možnost rozšíření - Možné použití v statických i suspenzních kulturách - Schopnost tvorby komplexních proteinů - Posttranslační modifikace	- Časově náročný na přípravu bakulovirových vektorů - Náročný na médium a kultivační podmínky - Nevytváří lidské glykosylace - Nechtěné posttranslační modifikace
Rostliny - tabák - sója - ječmen - rýže	- Nenáročné na kultivaci - Nízkonákladový a optimalizovaný - Nehrozí riziko kontaminací patogeny přenosných na člověka - Maximální možnosti rozšíření - Kompletní posttranslační modifikace	- Nevytváří lidské glykosylace - Kontroverze ohledně GMO rostlin - Komplikace při izolaci proteinů kvůli sekundárním metabolitům
Zvířata - kozy - ovce - slepice - bourec	- Potenciál pro masivní rozšíření - Správné posttranslační modifikace - Snadný zisk biofarmak (dojení, sběr vajec) - Optimalizované techniky chovu - Nenáročné na finance a čas	- Náročné na čas a přípravu GMO zvířat - Regulační a etické problémy - Málo charakterizovaný systém

Konkrétních druhů rostlin, které lze pro produkci rekombinantních proteinů využít je celá řada. Volba konkrétní rostliny souvisí s účelem, pro který má být protein použit, (například pro komerční účely ve velkém měřítku nebo pro potřeby výzkumu), typu kultivace (otevřená polní, nebo uzavřená ve skleníku a kultivační místnosti), rychlosti zpracování biomasy (semena lze bezpečně a jednoduše uskladnit déle než listí a dužnaté plody). Vhodné jsou například obilniny jako kukuřice, rýže, ječmen a pšenice. Ty poskytují vysoký výtěžek, stabilní uskladnění proteinů v semenech a neobsahují nežádoucí alkaloidy. Problémy jsou však s křížením v otevřených polních podmínkách, které se týká všech takto pěstovaných plodin a obecně složitější transformace jednoděložných rostlin. Výhody vysokých výtěžků a dobré skladovatelnosti poskytují i luštěniny hrách (Ramessar et al. 2008). Stěžejní je sója (Moravec et al. 2007), která je oblíbený modelový organismus, dále např. hrách (Ramessar et al. 2008). Pro rychlé zpracování jsou vhodné plodiny sklizené pro listovou biomasu, jako tabák, salát, špenát a vojtěška. Nevýhodou je však nízká stabilita proteinů v listech a možnost výskytu nežádoucích metabolitů (alkaloidy, chlorofyl), které pak komplikují zpracování a purifikaci proteinů (Ramessar et al. 2008). Zajímavou možnost představují olejniny jako řepka a slunečnice, kde je možné využít fúzi proteinů s oleosinem pro jednodušší postup izolace (Ramessar et al. 2008, Bhatla et al. 2010). V počátečních fázích výzkumu byla pro expresi vakcíny zvažována možnost použít části rostlin, které jsou požitelné přímo, bez tepelné úpravy jako např. plody rajčat, banánů nebo kořen mrkve. Pokud jsou uchovávány v chladu a spotřebovány v krátké době, poskytují stabilní uložení proteinů (Lal et al. 2007, Ramessar et al. 2008). Nevýhodou této přímé konzumace je velmi problematické dávkování, způsobené nestejnou expresí v různých plodech, skladování a nestandardní administrace (Sharma & Sood 2011).

Kromě zemědělských plodin je možné využít i alternativní produkční platformy založené na bioreaktorech. Jde o různé suspenzní buněčné kultury odvozené od modelových rostlin. Nejrozšířenější je suspenzní kultura BY-2 odvozená od kultivaru *N. tabacum* Bright Yellow (Nagata et al. 1992). Známa je například i suspenzní kultura mrkve, která se používá k průmyslové produkci léčiva na Gaucherovu chorobu I. typu (Xu et al. 2011). Nové pojetí produkce proteinů představuje exprese v geneticky modifikovaných řasách, např. rozsivkách (Hemple et al. 2011) a pláštěnkách (Rosales-Mendoza et al. 2012). Zajímavý model je zástupce mechů *Physcomitrella patens* B&S., ve kterém byla také vyprodukována řada rekombinantních proteinů (Rosales-Mendoza et al. 2014). Výhodou mechu *Physcomitrella patens* je, že v něm velmi účinně funguje homologní rekombinace a lze tak transgeny přidávat na vybraná místa v genomu. Tím lze zajistit vysokou a stabilní hladinu exprese (Kamisugi et al. 2006).

3.3 Možnosti exprese rekombinantních proteinů v rostlinách

Pro produkci rekombinantních proteinů v rostlinách lze využít 2 způsobů, a to stabilní transgenezi, nebo dočasnou tranzientní expresi. Oba jsou však založeny na stejném mechanismu, a to vpravení binárních vektorů pomocí *A. tumefaciens*. Transgenní exprese je náročná na čas (v řádech měsíců) a finance, protože po transformaci rostlin je třeba ustálit novou transgenní linii. Také síla exprese cílového proteinu nebývá tak vysoká. Tranzientní exprese je na druhou stranu relativně rychlá (v řádech dnů), dobře optimalizovatelná a poskytuje vysoké výtěžky. Je třeba ovšem zajistit technické zázemí pro kultivaci bakterií a následnou vakuovou agroinfiltraci rostlin (Garabagi et al. 2012).

Při tranzientní expresi zprostředkované agrobakteriemi lze pak využít 2 typů plazmidů. Prvními jsou nereplikující se plazmidy. Při jejich použití dojde k přenosu T-DNA do jádra většiny buněk infiltrovaného pletiva a následně dojde k expresi požadovaných proteinů. Většina vektorů tohoto typu využívá koexpresi některého silného supresoru genového silencingu. Při této metodě musí být v infiltračním roztoku dostatečný počet bakterií, aby se dostaly k co nejvíce buňkám. Mimo infiltrovanou oblast k expresi nedochází. Druhý způsob je založen na použití vektorů odvozených od rostlinných virů, které jsou schopny se autonomně replikovat a šířit rostlinným pletivem (Garabagi et al. 2012). Obdobně jako výše dojde nejprve k přenosu T-DNA obsahující cDNA virového vektoru do jádra buňky. Z ní následně vzniká v jádře primární virový transkript. Pokud se infekční virový transkript dostane v pořádku do cytoplazmy, dojde k iniciaci virové infekce a dále je již virový vektor zcela autonomní a může se dále šířit v závislosti na tom, jaké funkce mu byly ponechány (Chung et al. 2006). Na druhou stranu ne všechny rostliny jsou pro tento způsob vhodné, protože mohou vznikat silné imunitní odpovědi na přítomnost virů (hypersenzitivní reakce a nekrózy) (Garabagi et al. 2012). Nevýhodou je také nestabilita genomu a omezená velikost vkládaného genu, která je nejčastěji kolem 2 kb (Chapman et al. 1992). Genomy některých virů rovněž obsahují skryté introny, které brání přenosu celé virové RNA do cytoplazmy. Dnes již existují i upravené verze virových vektorů, které mají skryté introny odstraněny (Marillonnet et al. 2005).

Pro tranzientní expresi se používají tzv. dekonstruované viry. Z jejich genomu jsou nejčastěji odstraněny geny pro pohybový a/nebo plášťový protein, který je poté nahrazen genem pro rekombinantní protein. Bez této úpravy by nebylo možné do původního viru další gen vložit, protože by ve výsledku nebyl stabilní. Další výhodou je, že dekonstruované viry nejsou schopny tvořit infekční částice a nehrozí tak jejich únik mimo laboratoř. Na druhou stranu se po takové modifikaci virus není schopen šířit rostlinou tak, jako původní WT verze. Řešením pak může být koexprese s konstruktem obsahující gen pro tyto proteiny, či využití transgenních rostlin, které nahradí chybějící funkce viru (Gleba et al. 2004, Lindbo 2007, Garabagi et al. 2012).

Protilátka typu IgG se skládá ze 2 částí (viz kapitola 3.5.1). Obě části není možné zaklonovat do jednoho virového vektoru kvůli jeho omezené velikosti. Lze však využít 2 různých virových vektorů, které jsou schopny koinfikovat rostliny současně a navzájem se neomezují. Nejčastěji se pro tyto účely využívá kombinace virů TMV a PVX. Po agroinfiltraci

mají oba viry schopnost se replikovat v jedné buňce. Díky tomu lze ve výsledku získat plně složené IgG i za použití 2 rozdílných vektorů (Giritch et al. 2006).

3.4 Tabák, nejen jako oblíbený model pro produkci proteinů

Rod tabák (*Nicotiana* L.) obsahuje přes 70 druhů převážně tropických a subtropických rostlin (Knapp et al. 2004). V rámci rodu došlo během evoluce k častým hybridizačním a polyploidizačním událostem. Rod zahrnuje i běžně kultivovaný a ekonomicky významný tabák virginský (*N. tabacum* L.), díky čemuž se tak stal zájmem výzkumu. Obecně tak rod *Nicotiana* poskytuje data pro studium evoluce, cytogenetiky, hybridizace a další (Smith 1968). Kromě výzkumu a produkce tabáku je možné využít některé druhy i jako okrasnou zeleň, např. tabák křídlatý (*N. alata* L&O) (Lay et al. 2003). Rostliny jsou bohatým zdrojem alkaloidů, nejznámějším příkladem je nikotin, který se používá jako insekticid a některé druhy se tak pěstují pro využití při ochraně rostlin, např. tabák sivý (*N. glauca* G.) (Alghamdi 2021).

Jedním z nejpoužívanějších modelů je allotetraploidní druh tabáku *N. benthamiana* D, dále jen *N. benthamiana*. původem z Austrálie. Je hostitelem celé řady virů, které lze využít jako vektory pro tranzientní expresi. Dá se také jednoduše geneticky modifikovat, není náročný na podmínky pěstování a dosahuje dobré sklizně listové biomasy (Goodin et al. 2008, Bally et al. 2018). Linie používaná v laboratořích pochází z populace jedinců, která nese ztrátovou mutaci v genu *Rdr1* (RNA dependentní RNA polymeráza 1), který se podílí na tvorbě iRNA. Díky tomu jsou rostliny náchylné k infekci celou řadou virů, protože postrádají cennou složku obrany vůči nim (Bally et al. 2015). Obecně se dá *N. benthamiana* geneticky transformovat s velmi dobrou účinností, reaguje dobře na agroinfiltraci, poskytuje dobrou expresi rekombinantních proteinů, je nenáročná na kultivaci a je tak ideálním modelovým organismem pro výzkum (Bally et al. 2015, Grosse-Holz et al. 2018).

Dalším používaným druhem je tabák selský (*N. rustica* L., dále jen *N. rustica*). Ten se stal prvním tabákem přivezeným do Evropy po objevení Ameriky a podobně jako tabák virginský je využíván ke kouření. Na rozdíl od něj má ale tabák virginský jemnější chuť (Shaw 1960). Avšak v některých oblastech světa je stále upřednostňován pro jeho odolnost ke klimatickým podmínkám (Sierro et al. 2018). Tabák selský není pro produkci rekombinantních proteinů běžně používán, kvůli jeho nižší produkční schopnosti proteinů (Conley et al. 2011). Srovnání obou druhů je na Obr.9.

3.5 Protilátky

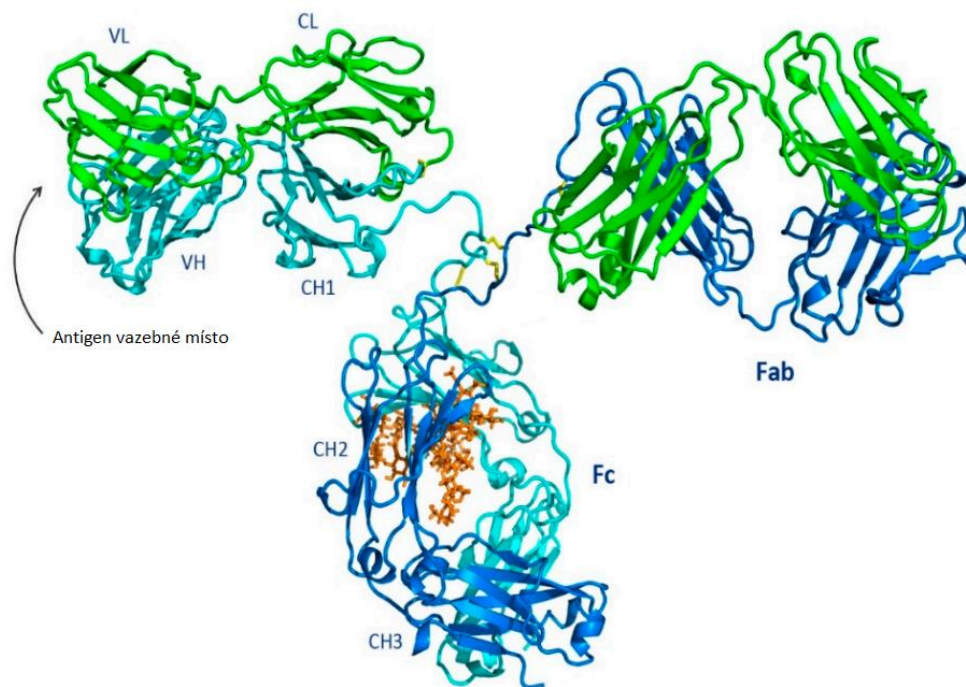
Protilátky jsou typem bílkovin patřící do skupiny imunoglobulinů. Jedná se o rozpustné molekuly produkované plasmocyty, diferencovanými B-lymfocyty. Ty vznikají v kostní dřeni a poté se diferencují v sekundárních lymfatických orgánech (lymfatické uzliny, slezina, a další) v plasmocyty. Na principu B-lymfocytů a jimi produkovaných protilátek je postavena získaná imunita (Hořejší et al. 2013).

Tab.2: Charakteristika běžných typů imunoglobulinů. Upraveno podle Hořejší et al. 2013.

Typ imunoglobulinu	Typ HC Typ Ig	Molekulová hmotnost (kDa)	Lokalizace	Funkce
IgA	α_{1-2} IgA1-2	160-1000	Sérum, slzy, sliny, povrch sliznic, mléko	Ochrana sliznic, opsonizace
IgG	γ_{1-4} IgG1-4	155	Sérum, intersticiální tekutina	Opsonizace, neutralizace, proniká placentou
IgD	δ	180	Sérum, povrch B-lymfocytů	Receptor pro antigen
IgE	ϵ	190	Sérum, intersticiální tekutina	Ochrana proti parazitům
IgM	μ	900	Sérum, povrch B-lymfocytů	Aktivace komponentu, primární odpověď, receptor pro antigen

3.5.1 Struktura a funkce

Typickou výslednou strukturou protilátky typu IgG je tvar písmene Y (Obr.3). Protilátka je pak složena ze dvou těžkých (HC) a dvou lehkých (LC) řetězců spojených disulfidickými můstky. Těžký řetězec se skládá ze 4 (u některých tříd z 5), lehký řetězec pak ze 2 strukturálně podobných domén. Struktura domén připomíná soudek tvořený smyčkami polypeptidového řetězce navzájem stabilizovaných disulfidickými můstky. Jednotlivé domény spojují krátké úseky polypeptidového řetězce. Jeden těžký řetězec se poté páruje s jedním lehkým řetězcem a druhým těžkým (a lehkým) řetězcem, vzniká heterotetramer. Přibližná molekulová hmotnost těžkého řetězce je 50-75 kDa, lehkého pak kolem 25 kDa. N-koncová doména obou řetězců je variabilní (V_L a V_H). Jejich struktura pak vytváří vazebné místo pro antigen. Variabilní doména se liší mezi různými klony B-lymfocytů a může být optimalizována pomocí afinitní maturace. Ostatní domény jsou konstantní. Existují 2 typy lehkých řetězců (λ a κ), které se mohou libovolně párovat s různými typy, respektive subtypy těžkých řetězců (α_{1-2} , γ_{1-4} , δ , ϵ , a μ). Shrnutí jednotlivých typů imunoglobulinů je v Tab.2. V jedné molekule jsou oba LC i HC totožné. Podle typu těžkého řetězce pak rozeznáváme různé formy imunoglobulinů, viz Tab.2 (Hořejší et al. 2013).



Obr.2: Schéma struktury molekuly imunoglobulinu typu G. Zelený řetězec představuje lehký řetězec, modré řetězce těžký, oranžově znázorněna glykosylace, žlutě disulfidické můstky. VL – variabilní doména lehkého řetězce, VH – variabilní doména těžkého řetězce, CL – konstantní doména lehkého řetězce, CH1-3 konstantní domény těžkého řetězce. Fab – fragment tvořený lehkým a VH a CH1 doménou těžkého řetězce, Fc – fragment tvořený CH2 a CH3 doménami těžkých řetězců.

Převzato a upraveno podle Chiu et al. 2019.

3.5.2 Možnosti využití protilátek

Protilátky mají široké uplatnění jak ve výzkumu, tak v klinické praxi, forenzní vědě a v jiných aplikovaných oborech. Metody založené na využívání protilátek lze obecně označit jako imunochemické metody. Základní využití ve výzkumu je pro různé formy kvalitativní, či kvantitativní detekce, kde se využívá specifické vazby protilátek na antigen. Protilátky pak mohou být různě značené ať už fluorescenčně, nebo konjugovány s enzymem, který následně místo označí chemicky. Pomocí protilátek tak můžeme rozlišit specifické typy buněk, jednotlivé buněčné struktury ale také identifikovat konkrétní proteiny. Jedná se o metody jako flotační cytometrie, ELISA, ELISpot, western blot, imunoprecipitace, imunohistochemie, imunofluorescence a další (Campbell et al. 1991).

V medicíně je na přítomnosti konkrétních protilátek v séru založena diagnostika onemocnění, např. virus Epstein-Barrové (Henle et al. 1974), Lidská borelióza (Wilske 2005), HIV (Daar et al. 2001) a další jsou diagnostikovány právě na základě přítomnosti specifických protilátek. Zvýšené množství různých typů protilátek může indikovat poškození orgánů a probíhající chronické onemocnění. Např. zvýšené množství IgA má spojitost s cirhózou způsobenou alkoholem (Sarvan et al. 2020), IgE zase souvisí s napadením parazity a alergickými reakcemi (Gounni et al. 1994). Na protilátkách jsou založené i antigenní testy. Nejznámější příklad může být těhotenský test, kde protilátky reagují s proteinem choriogonadotropinem (hormon produkovaný placentou a vylučovaný močí) (Gelletli & Nielsen 1986) a test na virus SARS-CoV-2 kde reagují s virovými obalovými bílkovinami (Becker et al. 2021).

3.6 Trastuzumab

Trastuzumab je humanizovaná monoklonální protilátka typu IgG specificky rozeznávající lidský receptor pro epidermální růstový faktor (erbB-2) kódovaný genem *ERBB2*². Receptor je transmembránový protein, který funguje jako tyrozinová kináza a řadí se mezi protoonkogeny. Po aktivaci příslušným ligandem (EGF) způsobí fosforylaci tyrozinových zbytků a tím spustí signální dráhy vedoucí k proliferaci buněk. Poruchy ve funkci, nebo overexprese erbB-2 mají za následek řady maligních nádorů (Roy & Perez 2009, Park et al. 2020). Overexprese erbB-2 je např. spojována s původem 20-30 % případů rakoviny prsu (Meric-Bernstam & Hung 2006). Dále je overexprese erbB-2 spojována například s rakovinou vaječníků a plic (Gazdar et al. 1994), žaludku (Lemoine et al. 1991) a řady dalších. Inhibice receptoru a jeho kinázové aktivity pomocí specifických protilátek se tak jeví jako perspektivní forma léčby.

Fendly et al. 1990 vytvořili několik verzí monoklonálních protilátek cílící na erbB-2 pomocí fúze splenocytů z imunizovaných myši s buňkami myších myelomových nádorových buněk. K imunizaci zvolili kombinaci injekcí nádorových buněk a izolovaných erbB-2 proteinů. Následně jednotlivé varianty izolovaných protilátek podrobili charakterizaci. Carter et al. 1992 poté zvolili verzi mumAb4D5, která byla následně humanizována a tím optimalizována pro použití pro terapii u lidí. Po humanizaci zůstala z původní protilátky jen antigen vazebná část variabilní domény cílící na extracelulární doménu erbB2. Zbytek variabilní domény a konstantních domén je totožných lidskému IgG. Bylo vytvořeno 7 humanizovaných variant, z nichž konkrétně humAb4D5-8 vykazovala nejlepší afinitu k erbB-2 receptoru. Dále také měla potenciál zastavit proliferaci SK-BR-3 buněk (nádorových buněk karcinomu prsu overexprimující erbB-2), ale neovlivnila životnost WI-38 buněk (linie fibroblastových kmenových buněk s běžnou expresí ebrB-2) (Carter et al. 1992).

Trastuzumab byl poté podroben několika klinickým studiím, které ověřovali jeho bezpečnost (Vogel et al. 2002, Baselga et al. 2005) až byl nakonec uznán jako oficiální léčivý přípravek (Herceptin, Genentech, Inc., San Francisco, CA). Více detailů o cestě k vývoji Herceptinu a jeho úspěšných aplikacích se lze dočíst na Genentech 2012.

² Můžeme se setkat se synonymním pojmenováním jak genu (*HER2*, *MLN19*, *NEU*, *NGL*) tak receptoru (*MLN19*, *Neu*, *c-ErbB-2*, *HER2*, *p185erbB2* a *CD340*). V mé práci bude uvedeno doporučené pojmenování erbB-2 a *ERBB2* podle databáze UniProt (UniProt 2022).

4 Metodika

4.1 Použité chemikálie

Pufry jsou vyjádřeny k objemu 1 litr. K úpravě pH bylo vždy použito 1M HCl nebo 1M KOH. K doplnění objemu byla použita destilovaná voda.

Základní pracovní pufry

1x TBS (Tris Buffer saline, pH 7,4)

- 20 mM Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol), 150 mM NaCl

1x PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4)

- 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄

Tvorba extraktů

Vzorkový extrakční pufr (pH 7,4)

- 1x PBS, 10 mM EDTA, 20 mg polyvinylpyrrolidon, 0,05 % (v/v) Tween20

Izolační extrakční pufr (pH 7,4)

- 1x TBS, 50 mM Na₂SO₃, 50 mM askorbát sodný, 1 mM PMSF, 0,01% (v/v) Tween20, 10 mM EDTA

*Práce s *A. tumefaciens* a *E. coli**

Infiltrační pufr (pH 5,6)

- 10 mM MES, 10 mM MgCl₂*6 H₂O, 20 g glukóza, 5 mM kyselina askorbová, 30 ul Silwet L-77, 0,2 mM acetosyringon
- Pozn. acetosyringon byl rozpuštěn v DMSO (20 mg/ml) a přidán se Silwet L-77 těsně před agroinfiltrací.

Luria-Bertani (LB) medium (pH 7) (Sigma-Aldrich, USA)

- 10 g trypton, 5 g yeast extract, 5 g NaCl

Selekční antibiotika

- 50 mg/l chloramfenikol pro UPD plazmidy
- 50 mg/l kanamycin pro alfa plazmidy
- 100 mg/l spectinomycin pro omega plazmidy

PTAD ELISA

Karbonátový potahovací pufr (pH 9,6)

- 0.15M Na₂CO₃, 0.035M NaHCO₃

Promývací pufr (pH 7,4)

- 1x TBS, 0,05 % (v/v) Tween20

Roztok primární protilátky (pH 7)

- 1x TBS, 1:500 (v/v) Mouse anti-human IgG (Sigma-Aldrich, USA), 0.02% (w/v) NaN₃

Roztok sekundární konjugované protilátky (pH 7)

- 1x TBS, 1:30 000 (v/v) Sheep anti-mouse IgG-AP (Sigma-Aldrich, USA), 0.02% (w/v) NaN_3

Alkalický substrátový pufr (pH 9,8)

- 100 ml diethanolamin, 1 mg/ml p-nitrofenyl fosfát
- Pozn. p-nitrofenyl fosfát byl přidán těsně před použitím

Afinitní chromatografie

Promývací pufr (pH 7,4)

- 1x TBS

Eluční pufr (pH 3)

- 50 mM glycin

Neutralizační pufr (pH 8)

- 1M Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol), 1,5M NaCl, 1mM EDTA (2,2',2'',2'''-(Ethane-1,2-diyl)dinitrilo)tetraacetic acid)

Skladovací pufr

- 1xTBS, 0,02% (w/v) NaN_3

SDS-PAGE

2x SDS vzorkový pufr (pH 6.8)

- 200 mM Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol), 8% (w/v) sodium dodecyl sulfát, 0.4% (w/v) bromfenolová modř, 40% (v/v) glycerol, 400 mM beta merkptoethanol
- Pozn. beta merkptoethanol přidat až před samotnou přípravou vzorků (50 ul/ml)

SDS elektroforézový pufr (pH 8,3)

- 14,4 g glycin, 3,02 g Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol), 1 g sodium dodecyl sulfát

CBB barvicí roztok

- 1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 1 g CuSO_4 , 200 ml vysokoprocentní kyseliny octové, 250 ml vysokoprocentní methanol
- Pozn. Skladovat ve tmě nebo v tmavé nádobě.

Western blot

Přenosový pufr (pH 8,3)

- 5.8 g Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol), 2.9 g glycin, 0.37 g sodium dodecyl sulfát, 200 mL vysokoprocentní methanol

Promývací pufr (pH 7,4)

- 1x PBS, 0.05% (v/v) Tween 20

Ponceau S barvicí roztok

- 1 g Ponceau S, 50 ml vysokoprocentní kyseliny octové

Blokovací pufr (pH 7,4)

- 1x PBS, 5 % (w/v) sušeného odtučněného mléka, 0.05% (v/v) Tween 20

- Pozn. neskladovat déle než týden.

Roztok primární protilátky (pH 7)

- 1x PBS, 0.05% (v/v) Tween 20, 1:10 000 (w/v) Mouse anti-human IgG (Sigma-Aldrich, USA)

Roztok konjugované sekundární protilátky s alkalickou fosfatázou (pH 7)

- 1x PBS, 0.05% (v/v) Tween 20, 1:30 000 (v/v) Sheep anti-mouse IgG-AP (Sigma-Aldrich, USA)

Alkalický substrátový pufr (pH 9.6)

- 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

4.2 Popis pokusného materiálu

4.2.1 Charakteristika pokusných rostlin

Pro experiment byly použity rostliny typu "Wild Type" (*N. benthamiana* WT a *N. rustica* WT), tedy původní botanické druhy a jeden odlišný genotyp. Jedná se o transgenní linii *N. benthamiana* HcPro. Osivo každé varianty pocházelo ze semenné banky laboratoře Virologie.

Výhody *N. benthamiana* WT byly popsány výše v kap 3.3. Linie HcPro obsahuje navíc vnesený gen pro pomocnou složku proteinázy (Helper Component Proteinase – HCPro) původem z PVA (Potato virus A, Potyvirus). Jedná se o suppressor RNA silencing, který u virů přirozeně funguje jako způsob boje proti hostitelským mechanismům obrany. Podílí se také na pohybu virových částic cévními svazky. Genotyp je vhodný zejména pro použití s virovými vektory, které se v něm snadněji množí a šíří (Savenkov & Valkonen 2001).

4.2.2 Charakteristika pokusných bakterií

Escherichia coli je známý a ověřený modelový organismus v mnoha oborech molekulární biologie. Některé kmeny jako DH5 α jsou schopny vytvořit vysoký počet kopií rekombinantní DNA (tzv. klonovací kmeny). Kromě toho je nenáročná na kultivaci a podmínky (Kostylev et al. 2015).

Agrobacterium tumefaciens, původně půdní bakterie parazitující na kořenech rostlin, je dnes oblíbený nástroj v genovém inženýrství rostlin. Umožňuje rychlou a účinnou transformaci většiny dvouděložných a s omezením i jednoděložných rostlin. EHA105 je hypervirulentní kmen. Zkratka EH pochází od "Elizabeth Hood", která popsala původní verzi kmene EHA101, A je zkratka pro "*Agrobacterium*". Kmen EHA105 se od 101 liší delecí rezistence pro kanamycin v Ti-plazmidu a jeho náhradou za rifampicin. Po delecí genu rezistence byl kmen EHA101 znovu podroben selekci a domestikaci. Nakonec byl vyselektován kmen EHA105, který vykazoval silnější virulenci (Hood et al 1993).

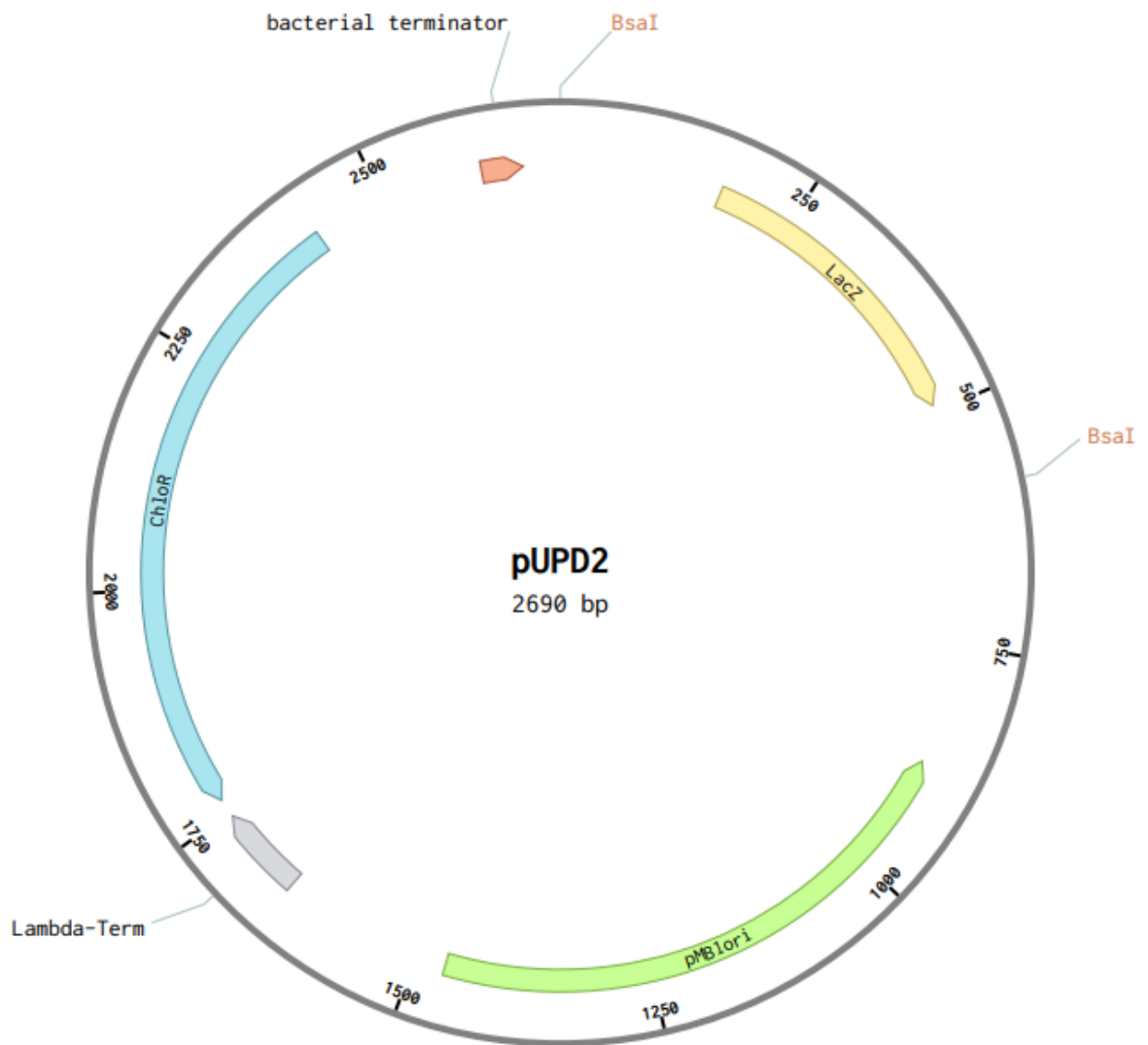
Pro diplomovou práci byly využity kompetentní buňky *A. tumefaciens* kmene EHA105 a *E. coli* kmene DH5 α používané v laboratoři Virologie, kde jsou uskladněny v glycerolových konzervách v hlubokomrazících boxech (-80 °C).

4.2.3 Vektory

V obou případech se používají plazmidy se stejnou kostrou, liší se jen vložená T-DNA. Kostra plazmidu zahrnuje pravou a levou hraniční oblast T-DNA (RB a LB), vir geny, které umožňují přenos T-DNA do jádra rostlinné buňky. Dále počátek replikace pro *E. coli* a pro *A. tumefaciens* a selekční marker uplatňující se v bakteriích. Selekční marker zahrnuje prokaryotní promotor, gen rezistence na selekční antibiotikum a bakteriální terminátor. Mezi LB a RB hranicemi je typicky vložen ještě některý marker usnadňující vizuální identifikaci správnosti klonování, například *LacZ* gen, který umožňuje modrobílou selekci. Jednotlivé plazmidy použité během mé diplomové práce budou popsány níže.

4.3 Molekulární klonování pomocí metody GB 2.0

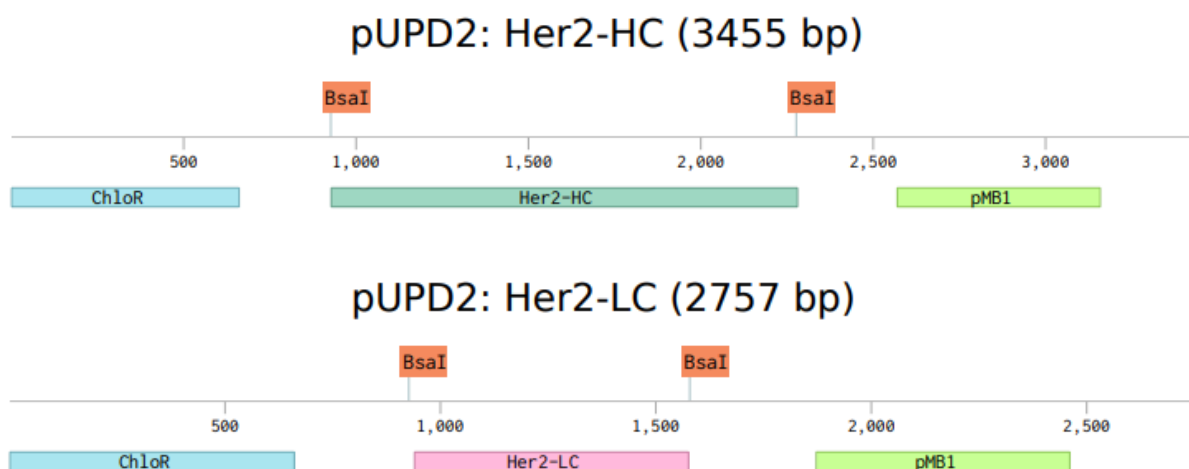
GoldenBraid je jedna z metod molekulárního klonování odvozená od metody GoldenGate (Engler et al. 2008). K sestavování výsledného produktu využívá tzv. modulárního klonování. Jednotlivé části (kazety) jsou předem připraveny (domestikovány) a následně dojde k jejich spojení do většího celku pomocí předem stanovených pravidel. Metoda nabízí několik výhod, jako např. univerzálnost, rychlost, kombinatorické možnosti a nízkou cenu (Ellis et al. 2011). Klonování začíná domestikací DNA sekvence do pUPD plazmidů (Obr.3). Ty mohou být poté sestaveny do binárního plazmidu úrovně alfa. Ten představuje úplnou transkripční jednotku, která obsahuje všechny náležitosti části (Sarrion-Perdigones et al. 2011). Dva alfa plazmidy je poté možné sestavit do plazmidu úrovně omega. Dva plazmidy omega je poté znovu možné vložit do plazmidu alfa, a tak stále dokola. Systém je navržen tak, že se opakovaně střídavě používají enzymy BsmBI a BsaI, přičemž ve správně sestaveném konstruktů právě použité restrikční místo zaniká a vzniká nové, které je použito v dalším cyklu. Počet celkových částí finálního plazmidu je tak omezen pouze stabilitou výsledného produktu (Dusek et al. 2020). Bioinformatická část byla vypracována pomocí volně dostupného software Benchling (Benchling 2022).



Obr.3: Schéma základního vstupního plazmidu pUPD2 použitého pro domestikaci sekvence trastuzumabu. Modrá – rezistence na chloramfenikol, žlutá – LacZ gen, zelená – pMBIori (počátek replikace). BsaI označuje místa restrikce pro vložení požadované DNA sekvence. Vytvořeno pomocí Benchling.

4.3.1 Získání sekvence a její domestikace

Po potřeby mé diplomové práce byla využita již známá aminokyselinová sekvence pro trastuzumab z dostupné databáze (DrugBank, 2022). U jednotlivých řetězců byly CD sestaveny do jednoho a VD do druhého konstruktů. Dále byl pak z HC byl odstraněn stopkodon. Obě úpravy byly provedeny pro možnou budoucí optimalizaci protilátek (možnost zaměňovat jednotlivé díly a fúze protilátky s jinými proteiny přes HC). Sekvence byla poté podrobena kodonové optimalizaci pro *N. benthamiana* a kompatibilitu s GoldenBraid klonovacím systémem pomocí volně dostupného softwaru (GeneArt Gene Synthesis, 2022). Byla odstraněna nežádoucí restrikční místa (BsmBI, BsaI a další) uvnitř sekvencí a poslední aminokyselina v HC byla nahrazena serinem. Na konce sekvencí byla přidána požadovaná restrikční místa s manuálně určenými 4bp konvenčními přesahy. DNA byla nesyntetizována ve specializované laboratoři. Vstupní PCR fragmenty byly následně díky restrikčně-ligační reakci vloženy do univerzálního vstupního plazmidu pUPD2 (Obr.4). Byly použity enzymy T4 ligáza a BsmBI. Obecné podmínky reakce jsou uvedeny v Tab.3-4.



Obr.4: Domestikovaná DNA sekvence trastuzumabu ve vstupních pUPD2 plazmidech. Modrá – rezistence na chloramfenikol, tmavě zelená – těžký řetězec, růžová – lehký řetězec, světle zelená – pMBIori (počátek replikace). BsaI označuje restrikční místa nově vzniklá domestikací reakcí. Místa pro enzym BsmBI použitý v reakci zanikla. Vytvořeno pomocí Benchling.

Tab.3: Obecné složení restriktivně-ligační reakce pro metodu GoldenBraid.

složka restriktivně-ligační směsi	objem
DNA	100 ng plazmidu 80 ng PCR fragmentu
pufř 10x	1 µl
T4 ligáza	1 µl
restriktivní enzym	1 µl
ddH ₂ O	doplněno do 10 µl

Tab.4: Obecné podmínky restriktivně-ligační reakce pro metodu GoldenBraid.

fáze restriktivně-ligační reakce	teplota (°C)	čas (m)	počet cyklů
iniciační fáze	37	15	1
restriktivně-ligační reakce	37	2	15-45
	16	5	
terminační fáze	37	15	1
deaktivace enzymů	80	15	1

4.3.2 Transformace *Escherichia coli* a jejich kultivace

Po domestikační reakci byl vzniklý konstrukt zaklonován do *E. coli* kmene DH5 α . Bakterie pochází ze zásob laboratoře Virologie, kde jsou skladovány v hlubokomrazících boxech při -80 °C. Využita byla metoda teplotního šoku (Van Die et al. 1983). Bylo smícháno 5 µl domestikační reakce se 40 µl kompetentních buněk. Směs byla inkubována 30 min na ledu, vložena do termobloku na 2 min/42 °C a poté opět 2 min na led. Následně bylo přidáno 600 µl sterilního LB média bez selekčních antibiotik. Směs byla poté inkubována za konstantního třepání 30 min/37 °C/250 rpm (Shaking incubator NB-205, USA). Nakonec byla směs centrifugována při 2 min/10 000 g (MIKRO 120 centrifuge, Hettich, Německo). Ze supernatantu bylo odebráno 500 µl a peleta poté resuspendována ve zbylém médiu.

Na Petriho misky s pevným LB médiem bylo vyseto 100 µl transformovaných bakterií a rozetřeno mikrobiologickou hokejkou. Medium obsahovalo patřičné selekční antibiotikum a X-gal substrát. Inkubace proběhla při 37 °C přes noc (Heraeus B6 incubator, Německo). Pozitivní transformanti byly vybráni přes dvojí selekci (antibiotická a modrobílá). Vybrané bílé kolonie byly označeny a část z nich napěstována v 5 ml tekutého LB média s příslušnými antibiotiky za konstantního míchání 37 °C /24 h/250 rpm. Kultury byly vždy nasazeny v duplikátech.

4.3.3 Izolace plazmidové DNA

Z vypěstovaných kolonií v tekutém LB médiu byla následně vyizolována plazmidová DNA. Byl použit komerční kolonkový kit GeneJET (Thermo Fisher Scientific, USA) a postupováno podle návodu. Vyizolovaná DNA byla poté změřena na spektrofotometru (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA) a uskladněna při -20 °C.

4.3.4 Restrikční analýza

K rychlému ověření správnosti transformace lze využít restrikční analýzu. Finální konstrukty jsou navrženy tak, aby ve vkládané DNA nebyla restrikční místa pro použité restrikční enzymy. Díky tomu je úsek plazmidové kostry konstantní. Reakce probíhala při objemu 20 μ l, 37 °C a 3 h. Její obecný předpis je v Tab.5.

Tab.5: Obecný předpis a konkrétní restrikční enzymy podle typu plazmidu pro restrikční analýzu plazmidů. Objem celkové reakce je 20 μ l.

složka reakce	objem
restrikční enzym	0,25 μ l
pufr CutSmart	2 μ l
plazmidová DNA	4 μ l (cca 200 až 500 ng)
ddH ₂ O	13,25 μ l
typ plazmidu	restrikční enzymy
pUPD2	EcoRI + PstI
alfa	HindIII
omega	BamHI

4.3.5 Sekvenování

Po restrikční analýze byly konstrukty ověřeny sekvenací. Tu zajišťuje specializovaná firma (Eurofins). Obecný předpis pro reakční směs je 5 μ l sekvenačního primeru (koncentrace 5 μ mol) a 5 μ l plazmidové DNA (koncentrace 80-100 ng/ μ l). Pro sekvenaci byly využity primery rozeznávající specifické sekvence finálních vektorů (viz Tab.6). Získané údaje byly vyhodnoceny pomocí programu ContigExpress z balíku Vector NTI Advance 11.

Tab.6: Primery navržené dle plazmidové kostry vektorů.

Název primeru	Nukleotidová sekvence 5'-3'	Délka primeru (bp)
pUPD2 plazmid		
pUPD2-Seq-F2	CCCGATCAACTCGAGTGCCA	20
pUPD2-Seq-R2	GAGGAAGCCTGCATAACG	18
Alpha plazmid		
Alfa-Seq-F	GGGCTTCTGGATTTCCGATC	20
Alfa-Seq-R	TTTTGCTCACATGAGATCTC	20
Omega plazmid		
Omega-Seq-F	GCCGTTCTTCCGAATAGCATCG	22
Omega-Seq-R	TACAAATGGACGAACGGATAAA	22

4.3.6 Sestavení finálních vektorů

Domestikovaná a ověřená sekvence protilátky byla následně spojena s dalšími částmi pomocí restrikčně-ligační reakce. Ty pocházely z genové banky laboratoře Virologie. K oběma řetězcům byla přidána sekvence pro signální peptid H7 SP, která nasměruje proteosyntézu do

endoplazmatického retikula. Nachází se na začátku aminokyselinové sekvence a později je odstraněna buněčnými proteázami. K HC byl na konec sekvence dále přidán KDEL signál, aby molekula IgG zůstala v endoplazmatickém retikulu a stopkodon. Vše bylo zaklonováno pod silný konstitutivní promotor 35S z viru CaMV. Exprese genu pro trastuzumab byla dále zesílena 5'UTR a 3'UTR oblastmi z viru CPMV. Také byla přidána druhá kazeta zahrnující represor silencingu P19 pod druhým 35S promotorem.

U virových vektorů byly díky modulární koncepci použity stejné plazmidy kódující signální peptid, lehký a těžký řetězec protilátky a případně C-terminální KDEL signál. Místo 5 UTR oblasti viru CPMV byl však použit modul obsahující větší část infekčního klonu TMV, respektive PVX (5NTR, RdRp polymeráza, MP, respektive TGB a subgenomový promotor CP). Místo 3 UTR oblasti CPMV byly použity zbývající části infekčních klonů virů TMV, respektive PVX (tj. 3 UTR, ribozym, Nos terminátor).

Finální vektory byly opět zaklonovány do *E. coli* a podrobeny antibiotické a modrobílé selekci. Plazmidová DNA byla poté izolována a podrobena restriční analýze a sekvenaci. Virové vektory byly kvůli jejich velikosti sekvenovány jen částečně v oblasti obsahující gen protilátky.

4.4 Práce s *Agrobacterium tumefaciens*

4.4.1 Transformace plazmidů do *A. tumefaciens*

Po amplifikaci vektorů v *E. coli* a jejich izolaci, ověření pomocí sekvenace a restriční analýzy mohlo dojít k jejich transformaci do *A. tumefaciens*. K transformaci byla využita metoda teplotního šoku. Kompetentní buňky *A. tumefaciens* byly odebrány z hlubokomrazících boxů a nechány pozvolna roztát asi 30 min na ledu. Následně byly rozděleny po 40 μ l do 1,5 ml zkumavek a ke každé přidáno 2 μ l plazmidové DNA a řádně promíchány pipetováním. Zkumavky byly vhozeny do tekutého dusíku na 5 minut zmrznout. Poté vloženy do termobloku na 30 s/37 °C roztát. Při přenesení zkumavek z dusíku do termobloku je třeba zajistit víčka lehkým přiložením dlaně, dochází k rapidnímu nárůstu tlaku uvnitř zkumavky a víčko může uletět. Znovu následovalo zmrazení v tekutém dusíku na 30 s a roztátí v termobloku. Bylo přidáno 500 μ l tekutého LB média bez selekčních antibiotik. Buňky byly inkubovány 5 minut na ledu a poté na třepačce 40 min/28 °C/100 rpm. Zkumavky byly centrifugovány 10 minut/3700 \times g (MIKRO 120 centrifuge, Hettich, Německo), odebráno 400 μ l supernatantu a peleta resuspendována ve zbývajícím supernatantu.

Zbylé suspenze byly naočkovány do plastových Petriho misek (\varnothing 9 cm) obsahující pevné LB médium s odpovídajícím selekčním antibiotikem a důkladně rozetřeny po povrchu plotny mikrobiologickou hokejkou. Plotny byly kultivovány v inkubátoru 24 h/28 °C (ON-12G Natural Convection Oven; Lab Companion, USA). Narostlé kolonie byly odebrány z povrchu plotny bílou špičkou, přeneseny do sterilních 15 ml polystyrenových zkumavek (GAMA, Česká republika) s 5 ml tekutého LB média s odpovídajícím selekčním antibiotikem. Zkumavky byly uzavřeny volně kvůli přístupu kyslíku, přeneseny do inkubátoru a kultivovány na třepačce 24 h/28 °C/250 rpm (INR 200 Orbital Incubator; Sanyo Gallenkamp, UK). Takto připravené kultury mohou být použity pro injekční agroinfiltraci, nebo dále kultivovány pro vakuovou agroinfiltraci (viz další odstavec). Pro injekční agroinfiltraci byly narostlé kultury v tekutém LB médiu centrifugovány 10 minut při 3700 \times g (3K30; Sigma, Německo). Supernatant byl slit, přidáno 5 ml infiltračního pufru a pelet byl resuspendován. Kultury byly ponechány 1,5 hodiny při pokojové teplotě v infiltračním roztoku, aby došlo k nastartování mechanismů virulence. Bakteriální suspenze byla změřena na denzitometru (DEN1; Biosan, Lotyšsko) a naředěna na požadovanou optickou denzitu. Následovala agroinfiltrace do předem připravených rostlin.

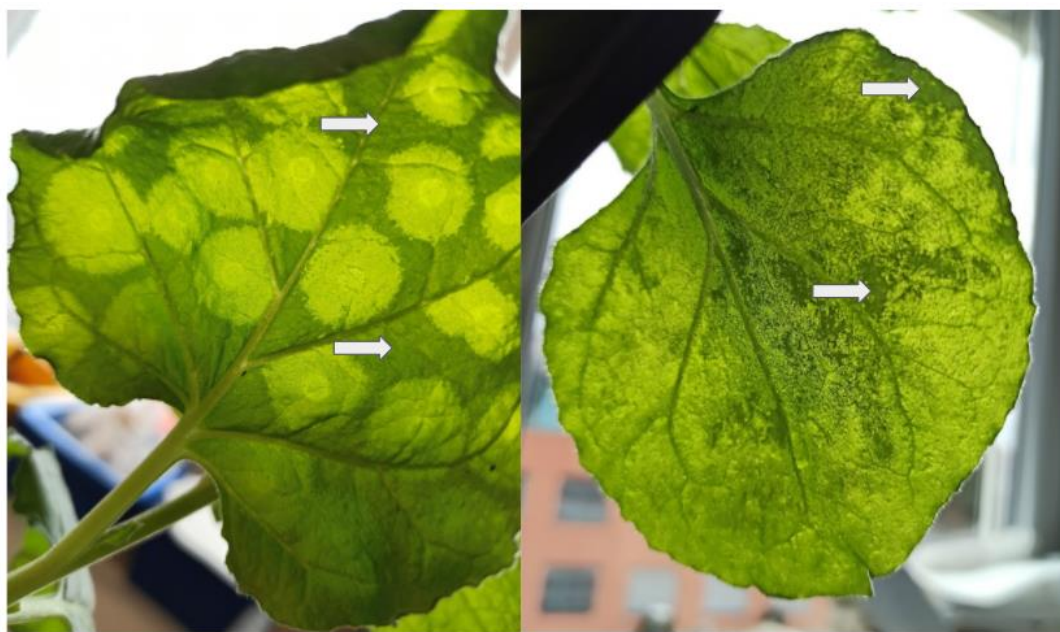
Narostlé kultury byly poté ze zkumavek přelity do 250ml Erlenmayerových baněk s 50 ml tekutého LB média a patričným selekčním antibiotikem. Hrdlo láhve bylo utěsněno zátkou z gázy a následně byly kultivovány na třepačce (INR 200 Orbital Incubator; Sanyo Gallenkamp, UK) při 24 h/28 °C/250 rpm. Poté byly kultury přelity do 50 ml centrifugačních kyvet a centrifugovány na 15 minut/PT/3700 \times g (3K30; Sigma, Německo). Supernatanty byly slity a peleta byla rozpuštěna v 50 ml infiltračního pufru. Kultury byly opět ponechány 1,5 hodiny při pokojové teplotě na třepačce při 50 rpm (KS250 basic; IKA, Německo). Nakonec byla změřena a upravena optická denzita.

4.4.2 Tvorba glycerolových konzerv

Pro dlouhodobé uskladnění transformovaných agrobakterií byly vytvořeny glycerolové konzervy. Ty zároveň slouží jako pojistka pro případ poškození kultur na agarových plotnách. Kultury byly pěstovány v 5 ml tekutého LB média jako výše. Následně byla suspenze bakterií smíchána se sterilním 50% glycerolem v poměru 1:1 pomocí pipety. Glycerolová suspenze byla přepitována do 2 ml popsaných zkumavek se šroubovacím uzávěrem a pinzetou ponořena do tekutého dusíku na 5 minut zmrznout. Následovalo uskladnění v hlubokomrazicím boxu (-80 °C).

4.5 Agroinfiltrace

Aspoň 2 hodiny před agroinfiltrací byly rostliny tabáku převezeny z kultivační místnosti do laboratoře a do podmisek nalita voda. Rostliny byly probrány, odstraněny žluté listy, květy a boční výhony. Následně byly všechny řádně ovlhčeny pomocí rozprašovače (spodní i svrchní strana) a umístěny do plastového pytle. Vysoká vzdušná vlhkost stimuluje otevření průduchů, což usnadňuje pronikání infiltračního roztoku.



Obr.5: Srovnání injekční (vpravo) a vakuové agroinfiltrace (vlevo) na rostlinách *N. benthamiana*. Bílé šipky označují místa, kam nepronikl infiltrační roztok.

4.5.1 Testovací agroinfiltrace

Najít vhodnou optickou denzitu je zásadní hlavně u virových vektorů. Rostliny mají přirozené obranné mechanismy, které mohou ve výsledku skončit hypersenzitivní reakcí a smrtí buněk. Byly tak provedeny testovací infiltrace pomocí 1ml injekčních stříkaček, kdy se ověřovala kompatibilita vytvořených vektorů. Listy tabáků byly označeny, rozděleny na sektory a nainfiltrvány roztoky o různé optické denzité (OD_{600} = 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1). Hodnotily se kvalitativní a kvantitativní parametry exprese a reakce rostlin na dané vektory. Jako kontrola byly použity konstrukty s fluorescenčními proteiny (GFP a dsRed) jako reportéry

namísto sekvence protilátky. Průběžně byl hodnocen zdravotní stav rostlin, a nakonec odebrány vzorky pro analýzu.

Suspenze byla aplikována pomocí 1ml injekčních stříkaček bez jehly. Místo pro aplikaci bylo vybráno mimo žilnatinu. Listy byly opatrně natočeny spodní stranou nahoru, byla přiložena stříkačka a z druhé strany listu byl přiložen prst, aby došlo k utěsnění otvoru stříkačky. Tlak na list nesmí být příliš silný, jinak dojde k protržení a je třeba najít nové místo pro aplikaci. Jemným tlakem na píst stříkačky byla suspenze vpravena do listu, a přitom se vytvářel viditelný edém (mezofyl listu zaplněný infiltračním roztokem). Když se edém přestal šířit, byla aplikace ukončena a pokračovalo se na dalším místě.

4.5.2 Vakuová agroinfiltrace

Vakuová agroinfiltrace byla provedena až po ověření konstruktů a agrobakterií. Metoda umožňuje maximální průnik bakteriální suspenze do mezofylu listu. Srovnání injekční a vakuové infiltrace je na Obr.5. Do skleněného exsíkátoru byly vloženy 3 jednolitrové kádinky a naplněny přibližně 800 ml připraveného infiltračního roztoku. Povrch květináče byl obalen gázou, rostliny byly opatrně zabaleny do plastové sítě, vloženy do kádinky s roztokem a následovalo vytvoření podtlaku. Pomocí vývěvy (Rocker 811; Activair, Česká republika) se nechal v nádobě snížit tlak na 80 kPa. Následně byl podtlak opatrně uvolněn a celý postup zopakován 3x.

Infiltrované rostliny byly přeneseny zpět do kultivační místnosti. Tam byly uspořádány náhodně v šachovnicích. Pokud se jednalo o replikující se virové vektory, byly rostliny umístěny zvlášť do vlastní podmisky a řádně označeny, kvůli potenciálnímu nebezpečí mechanického přenosu virů.



Obr.6: *N. benthamiana* HCPro koexprimující trastuzumab a GFP pro stanovení ideální doby sklizně. Rostlina byla vakuově infiltrována a vyfotografována 7 DPI. Odběr vzorků byl prováděn z míst s viditelnou expresí GFP.

4.6 Kultivace, sklizeň a zpracování rostlin

Rostliny byly celou dobu pěstované v klimatizované kultivační místnosti. Fotoperioda byla nastavena na 16/8 hodin (den/noc), teplota 24 °C. Jednou týdně bylo aplikováno hnojivo formou závlivky 1 g/l (Kristalon Start; AGRO CS, Česká republika). Osvětlení bylo zajištěno pomocí kombinace úsporných zářivek (36W/840 G13 MASTER TL-D; Philips, Nizozemsko) a LED zářivkami (8BEN-120cm-15W-GL-230V-T-G13; Frontier Technologies, Česko) v poměru 1:1.

Semínka byla vyseta do směsi rašeliny a písku v poměru 1:1. Po 2-3 týdnech byly semenáčky přesazeny do směsi rašeliny a perlitu v poměru 3:1 do samostatných plastových květináčů (8x8x10 cm). Průběžně byl kontrolován zdravotní stav a odstraňovány žluté listy. *N. benthamiana* má tendenci dělat několik výhonů a s každým dalším se zmenšuje plocha nových listů. Byl tedy zachován hlavní výhon ostatní byly odstraňovány vylomením (podobně jako u rajčat). Po dalších 2-3 týdnech až rostlinky dorostly požadované velikosti byly podrobeny agroinfiltraci a následné dokultivaci. Po 7 dnech od agroinfiltrace byly rostliny sklizeny. Listy byly zbaveny řapíků, náhodně vyskládány na sebe do alobalu a zváženy. Pro sklizeň nebyly odebrány výrazně žluté listy a listy menší než 1 cm. Následně bylo korkovrtem (0,5 cm) z vrstvy listů náhodně odebráno po cca 100 mg pro přípravu vzorků. Zbytek listů byl zmrazen.

4.7 Příprava extraktů

4.7.1 Extrakce pomocí keramických kuliček

Do 2 ml plastových zkumavek se šroubovacím víčkem bylo přidáno cca 100 mg malých (1,3 mm) a 2 velké (0,5 cm) keramické kuličky. Vzorky byly odebírány korkovrtem (ø 0,5 cm), zváženy, uloženy do zkumavky a vloženy do tekutého dusíku zmrznout na 5 min. Poté byly zkumavky vloženy do homogenizátoru (FastPrep®-24; MP Biomedicals, Francie) a homogenizovány při 4,5 M/s, 2x20 s. Po protřepání na sucho byl přidán vzorkový extrakční pufr (pětinasobné množství navážené hmotnosti) a vzorky znovu homogenizovány při stejném nastavení. Vzorky byly centrifugovány 10 min/10 000 g (MIKRO 120 centrifuge, Hettich, Německo). Výsledný supernatant byl odebrán do nové zkumavky a peleta vyhozena. Výsledné extrakty byly dočasně uchovány v lednici (4 °C), nebo zamrazeny (-18 °C).

4.7.2 Tření v tekutém dusíku

Navážené listy bylo nastříháno na menší kusy, vloženo do třecí misky a zalito tekutým dusíkem. Poté se listy nechalo v dusíku chvíli promrznout a důkladně se rozdrtilo tloučkem na prášek. Při ulpívání prášku na misce a tloučku si lze pomoci kopistkou. Opět se přidalo pětinasobné množství izolačního extrakčního pufru a pokračovalo v drcení. Extrakt byl poté přefiltrován přes nálevku vyloženou gázou a papírovými kapesníky do Erlenmayerovy baňky umístěné na ledu. Díky gáze lze extrakt pořádně vymačkat od zbytku biomasy. Poté byl extrakt přenesen do 40ml centrifugačních kyvet. Ty byly vybalancovány na váze a následně stočeny na

centrifuze 30 minut na 17 500 g při 4 °C (3K30; Sigma, Německo). Supernatant byl odebrán a uschován na ledu, peleta vyhozena.

4.7.3 Příprava extraktu v mixéru

Větší množství listů bylo z mrazáku vloženo do mixéru (0010; Eta, Česká republika) se čtyřnásobným množstvím vychlazeného izolačního extrakčního pufru a mixováno na nejvyšší rychlost 5 minut. Poté byla směs zpracována stejně jako při tření v tekutém dusíku.

4.8 Extrakce trastuzumabu

4.8.1 Izolace precipitací

Po zhodnocení exprese bylo třeba protilátky vyizolovat a vypurifikovat. K tomu byla použita metoda vysrážení (precipitace) pomocí síranu amonného (Perosa et al. 1990) a upravená metodika podle Lai et al. 2010. Byly odebírány vzorky po jednotlivých krocích izolace pro následné zhodnocení účinnosti pomocí SDS-PAGE a western blotu. Pro přípravu vzorků z pelet a zbytků po filtrování bylo jako rozpouštědlo využito SDS elektroforetického pufru kvůli jeho dobré schopnosti rozpouštět proteiny.

Byly vytvořeny extrakty podle kap. 4.6, změřen jejich objem a dále s nimi bylo pracováno na ledu. K výpočtu potřebného množství $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ byla využita online kalkulačka (EnCor Biotechnology Inc, 2022). K extraktu byl za stálého míchání na magnetické míchače pomalu přidán sypký $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Po úplném rozpuštění následovala inkubace 10 min na ledu. Následovalo přelití do centrifugačních kyvet, vybalancování na váze a centrifugace 30 min na 17 000 g při 4 °C (3K30; Sigma, Německo). Supernatant byl slit a peleta odstraněna. Opět byl změřen objem a obdobně jako výše doplněn $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na 50% koncentraci. Následovala 10 min inkubace na ledu po jeho úplném rozpuštění. Extrakty byly znovu centrifugovány na stejné nastavení. Supernatant byl odstraněn. Peleta může být uchována v mrazáku (-18 °C), nebo rozpuštěna v polovičním množství TBS oproti výchozímu extraktu. Při procesu srážení se extrakt po přidání $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zakalí, jedná se však o normální průběh reakce.

Izolát i jednotlivé vzorky obsahující síran amonný byly umístěny do dialyzačních střívek (Visking; P-Lab, Česko), vloženy do 2l kádinky s TBS. Následovala inkubace za stálého míchání na magnetické míchače v chladové místnosti na 100 rpm / 4 °C/12 h.

4.8.2 Purifikace afinitní chromatografií s proteinem G

Afinitní chromatografie je jedna z nejrozšířenějších metod pro purifikaci protilátek. Její výhodou je především vysoká selektivita a rychlost (Ayyar et al. 2012). Pro účely mé práce byla využita agarózová matrix s proteinem G (Protein G Agarose, Fast Flow; Sigma-Aldrich, USA). Jedná se o protein nacházející se v buněčné stěně bakterií streptococcus skupiny G. Podobně jako protein A má silnou schopnost vázat imunoglobuliny, především z řad IgG. Narozdíl od něj ale váže IgG z řady modelových zvířat, k jejichž IgG protein A nevykazuje afinitu, nebo je velice slabá (myš, krysa, ovce, kozy apod.). Obecně má také protein G vyšší afinitu než protein A (Akerström et al. 1985).

Agarózová matrix byla přepipetována po 5 ml do 15ml chromatografické kolony a dále bylo postupováno podle návodu od výrobce. Po celou dobu práce je třeba hlídat, aby matrix byla ponořena v pufru. Byly odebírány vzorky po jednotlivých krocích purifikace pro následné zhodnocení účinnosti pomocí SDS-PAGE a western blotu.

Připravený izolát podle kap. 4.8.1 byl po dialyzaci znovu centrifugován 15 min/10 000 g (3K30; Sigma, Německo). Poté byl supernatant přefiltrován přes filtrační nástavec na injekční stříkačce (velikost pórů 0,45 μm). Peleta byla odstraněna.

Chromatografická kolona byla na začátku promyta 150 ml vychlazeným promývacím pufrem. Následovalo nanesení izolátu tak, aby se usazená matrix nerozvířila. Izolát se nechal pomalu protékat přes matrix (cca 2 ml/min). Následovalo promytí kolony 150 ml promývacího pufru kvůli odstranění nenavázaných proteinů a zbytkových metabolitů. Během promývání kolony bylo do 1,5 ml zkumavek napipetováno po 50 μl neutralizačního pufru. Po pročištění byly nanесeny 4 ml elučního pufru a frakce byly zachyceny po 0,5 ml do připravených zkumavek s neutralizačním pufrem. Následovala druhá eluce stejným způsobem. Zkumavky s vypurifikovanou protilátkou byly lehce zvortexovány kvůli lepší neutralizaci pH roztoku. Po dokončení purifikace byla kolona 1x promyta 8 ml neutralizačního pufru a následně 150 ml promývacího pufru. Nakonec byl přidán uskladňovací pufr a kolona byla uložena do lednice při 4 °C.

4.9 Obrazové záznamy

4.9.1 Fotografická dokumentace

Během diplomové práce byly pořízeny fotografie pomocí digitálního fotoaparátu Olympus E-PL3 s objektivem Zeiss Pancolar (50/1,8). Fluorescence GFP byla vizualizována pomocí UV LED panelů (cca 400 nm) vyrobených svépomocí a LEE 124 DarkGreen filtru (Thomann, Německo).

4.9.2 Fluorescenční mikroskopie

Pomocí korkovrtu byly odebrány listové disky a vytvořen nativní mikroskopický preparát. Pomocí fluorescenčního mikroskopu (DM1000; Leica, Německo) byly následně pořízeny snímky. Byla použita kombinace filtrů GFP, FluoA, N2.1 a I3 (Leica Microsystems, Německo) pro vizualizaci fluorescenčních reportérových proteinů.

4.10 Statistické vyhodnocení

Získaná data byla vyhodnocena pomocí programu Dell Statistica version 13. Grafy byly vytvořeny pomocí nástroje Microsoft Excel. Vyhodnocení normality bylo provedeno pomocí Shapiro-Wilkova testu a K-S & Lillieforsův testu. Závislost sledovaných veličin byla vyhodnocena korelační analýzou. K vyhodnocení rozdílů mezi sledovanými veličinami byla použita jednofaktorová ANOVA a Tukeyův HSD test. Hodnocení bylo stanoveno podle hladiny významnosti $p < 0.05$.

4.11 Metody pro kvalifikaci a kvantifikaci proteinů

4.11.1 Stanovení celkového obsahu rozpustných proteinů

Pro stanovení celkového obsahu rozpustných proteinů bylo použito metody stanovení vůči BSA na základě biuretové reakce (Pierce™ BCA Protein Assay Kit; Thermo Fisher Scientific, USA). Stanovení bylo provedeno pro následnou normalizaci exprimované protilátky na CRP. Bylo postupováno podle návodu od výrobce. Do 96 jamkové číré polystyrenové destičky (Gamma, Česká republika) bylo v duplikátech naneseno 25 μ l připravených standardů pro kalibrační křivku. Standardy na kalibrační řadu byly připraveny ze zásobního roztoku BSA dvojkovým ředěním (2000-31,25 μ g/ml) do vzorkového extrakčního pufru. Poté bylo naneseno 20 μ l vzorkového extrakčního pufru a k nim přidáno v duplikátech 5 μ l vzorků. Nakonec bylo přidáno 200 μ l reakčního pufru. Následovala inkubace 30 min/37 °C v inkubátoru (ON-12G Natural Convection Oven; Lab Companion, USA).

Destička byla vyhodnocena měřením absorbance při 562 nm a počtem 10 záblesků na spektrofotometru (Infinite M Plex; Tecan, Švýcarsko). Každá destička byla změřena 2x kvůli odchylce měření.

4.11.2 Fluorescence GFP

Připravené extrakty byly naneseny po 50 μ l do černé neprůhledné 96 jamkové destičky pro malé objemy. Poté byla rovnou změřena fluorescence na spektrofotometru (Infinite M Plex; Tecan, Švýcarsko). Byla nastavena excitace 485/20 nm, emise 535/25 nm a počet záblesků na 10. Prvně proběhlo automatické kalibrační měření, po kterém následovalo manuální měření s definovanými hodnotami. Každá destička byla změřena 2x kvůli odchylce měření.

4.11.3 ELISA

Kvantifikace exprimovaných protilátek byla vyhodnocena pomocí metody IPTA ELISA (Plate Trapping Antigen Direct Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Využita byla upravená metodika podle Jiang et al. 2019.

Standardy byly připraveny dvojkovým ředěním (200-3,125 μ g/ml) komerčního lidského IgG (Sigma-Aldrich, USA) do extraktu z neošetřených rostlin *N. benthamiana* WT. Ty byly připraveny stejně jako extrakty na vyhodnocení exprese, tedy odvážení určitého množství listů a přidání pětinasobného množství vzorkového extrakčního pufru. Do 96 jamkové číré polystyrenové destičky bylo napipetováno po 100 μ l potahovacího pufru. Následně bylo naneseno po 10 μ l blanku (vzorkový extrakční pufr), standardů, vzorků a negativní kontroly v duplikátech. Destička byla přikryta parafilmem, vložena do plastové krabičky s vlhkým ubrouskem na dně a následovala inkubace v lednici při 12 h/4 °C.

Druhý den byla tekutina z destičky opatrně vyklepána do dřezu a následovalo nanesení 200 μ l promývacího pufru. Ten byl poté opět vyklepán do dřezu, destička osušena buničinou a postup byl zopakován 3x. Po promytí destičky bylo napipetováno 100 μ l roztoku primární

protilátky, destička uzavřena do krabičky s vlhkým ubrouskem a inkubována 2 h/37 °C (ON-12G Natural Convection Oven; Lab Companion, USA). Opět následovalo vyklepání roztoku a promytí jako výše. Bylo přidáno 100 µl roztoku konjugované sekundární protilátky, destička uzavřena do krabičky s vlhkým ubrouskem a inkubována 2 h/37 °C. Opět následovalo vyklepání roztoku a promytí jako výše.

Bylo přidáno 200 µl alkalického substrátového pufru a po 30 min byla změřena absorbance při 405 nm na spektrofotometru nastaveném na 10 záblesků (Infinite M Plex; Tecan, Švýcarsko).

4.11.4 Proteiny denaturující SDS-PAGE

Vertikální proteinová elektroforéza v akrylamidovém gelu byla provedena s použitím kitu (TGX™ FastCast™; Bio-Rad, USA) a elektroforetické aparatury s formami na gel (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad, USA). Gely byly připraveny podle návodu a zhotoveny v duplikátech kvůli porovnání barvení roztokem CBB s western blotem. Poté byly ve sklech upevněny do aparatury a zality SDS elektroforetickým pufrem. Vzorky z předchozích experimentů byly neřaděny na společného jmenovatele, smíchány ve stejném poměru s 2x SDS vzorkovým pufrem, přidán β-merkapt ethanol a inkubovány 10 min/70 °C v termobloku. Poté byly stočeny na centrifuze 5 min/10 000 g (MIKRO 120 centrifuge, Hettich, Německo) pro usazení zbytkových nečistot.

Následovalo nanesení 10 µl markeru (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Thermo Fisher, USA) a 20 µl vzorků do jamek gelu a zapnutí zdroje napětí (PowerPac™ HC High-Current Power Supply; Bio-Rad, USA). Srovnání vzorků běželo v zaostřovacím gelu 30 min při 80 V, poté bylo elektrické napětí zvýšeno na 120 V a aparatura běžela, dokud vzorky nedoputovaly ke spodní hranici gelu. Aparatura byla rozebrána, gely vyjmuty ze skel a horní zaostřovací gel byl odstraněn špachtlí. Poté byly umístěny do destilované vody opláchnout od zbytků SDS elektroforetického pufru. Následovalo barvení v roztoku CBB přes noc, duplicitní gel byl použit pro western blot. Druhý den byly gely odbarveny a vyfoceny (ChemiDoc XRS+; Bio-Rad, USA).

4.11.5 Polosuchý western blot

Blotovací desky (OMNI-BIO, Česká republika) byly předem namočeny v destilované vodě alespoň na 1 h. Spodní deska (katoda) byla položena na plastový táč. Připravené 3 filtrační papíry byly postupně namočeny v přenosovém pufru a skládány na sebe na blotovací desku. Pomocí válečku byly vytlačeny bubliny a deska byla průběžně polévána malým množstvím přenosového pufru. Nebarvený akrylamidový gel byl položen na filtrační papíry, přikryt nitrocelulózovou membránou, polit pufrem a znovu uválen kvůli vytlačení vzduchu. Opět byly položeny 3 filtrační papíry namočené v pufru. Blotovací sandwich byl přikryt druhou deskou (anoda) a zatížen.

Následovalo zapojení zdroje proudu (PowerPac™ HC High-Current Power Supply; Bio-Rad, USA). Hodnota proudu byla vypočítána podle plochy blotovaného gelu (cm) x 0,8 a výsledný proud byl v mA. Blotování běželo 1,5 hodiny. Na konci byla aparatura odpojena a

rozebrána. Membrána byla 3x5 min promyta vodou a obarvena roztokem Ponceau S kvůli kontrole přenosu. Odbarvení proběhlo pomocí 0,1M NaOH a opláchnutí vodou.

Opláchnutá membrána byla vložena do 50 ml kyvety s víčkem a zalita 10 ml roztoku primární protilátky. Kyveta byla umístěna do rotační třepačky (Hybridiser HB-1D; TECHNE, UK) a inkubována přes noc při pokojové teplotě. Druhý den byl roztok s protilátkou slit a uschován. Membrána byla 3x5 min opláchnuta promývacím pufrem v rotační třepačce. Po opláchnutí byla membrána blokována na rotační třepačce 1 h/pokojová teplota/100 rpm v blokovacím pufre. Následovala inkubace s 10 ml roztoku konjugované sekundární protilátky s alkalickou fosfatázou. Inkubace běžela na rotační třepačce 1 h/pokojová teplota/100 rpm a poté byla membrána znovu 3x5 min opláchnuta promývacím pufrem.

Vizualizace proteinů byla provedena umístěním membrány do 10 ml alkalického pufre a přidáním 200 μ l substrátu pro alkalickou fosfatázu (NBT/BCIP Stock Solution; Sigma-Aldrich, USA). Výsledky byly viditelné do 30 min a následovalo zdokumentování membrány (ChemiDoc XRS+; Bio-Rad, USA).

5 Výsledky

5.1 Statistická analýza

Dle tab.7 nemají data normální rozdělení, a i v jednom případě nejsou homogenní rozptyly. Je to dáno menším množstvím dat v hodnoceném souboru. Jednalo se však o laboratorní pokus s minimalizací vlivu vnějších faktorů, díky průběhu experimentu v kultivační místnosti. Dle Lepš & Šmilauer 2016 lze i přes to metodu ANOVA pro vyhodnocení pokusu použít, díky její robustnosti. Pro zobecnění výsledků by bylo potřeba větší množství dat. ANOVA a Tkeyův test pak poskytli následující výsledky, viz tab.8 a další kapitoly.

Tab.7.: Shrnutí všech použitých testů pro určení normality a homogenity dat. Vyhodnoceno pomocí programu Statistica.

Sledovaná veličina	K-S & Lillieforsův test	Shapiro-Wilkův test	Test homogenity rozptylů
N. benthamiana WT IgG:CRP	K-S: $d=,18876$, $p > 0,20$ Lilliefors: $p < 0,10$	$W=0,89635$ $p=0,04965$	$p= 0,018$
N. benthamiana WT biomasa	K-S: $d=0,19783$, $p > 0,20$ Lilliefors: $p < 0,10$	$W=0,87445$ $p=0,02108$	$p=0,520$
N. benthamiana HCPro IgG:CRP	K-S: $d=0,24018$, $p > 0,20$ Lilliefors: $p < 0,01$	$W=0,84689$ $p=0,00757$	$p=0,018$
N. benthamiana HCPro biomasa	K-S: $d=0,29050$, $p < 0,10$ Lilliefors: $p < 0,01$	$W=0,80079$ $p=0,00156$	$p=0,520$
N. rustica biomasa	K-S: $d=0,24890$, $p > 0,20$ Lilliefors: $p < 0,05$	$W=0,85165$ $p=0,01833$	$p=0,520$

Tab.8: Tukeyův test hodnocených parametrů po vyhodnocení dat pomocí metody ANOVA. Jedná se o vliv druhů na expresi trastuzumabu a vliv druhů na sklizenou biomasu

Druhy	Tukeyův HSD test; proměnná: IgG:CRP (%) (Tabulka dat65) Označ. rozdíly jsou významné na hlad. $p < ,05000$		
	{1} M=,53547	{2} M=1,8972	{3} M=0,0000
N. benthamiana WT {1}		0,000126	0,022469
N. benthamiana HCPPro {2}	0,000126		0,000126
N. rustica {3}	0,022469	0,000126	

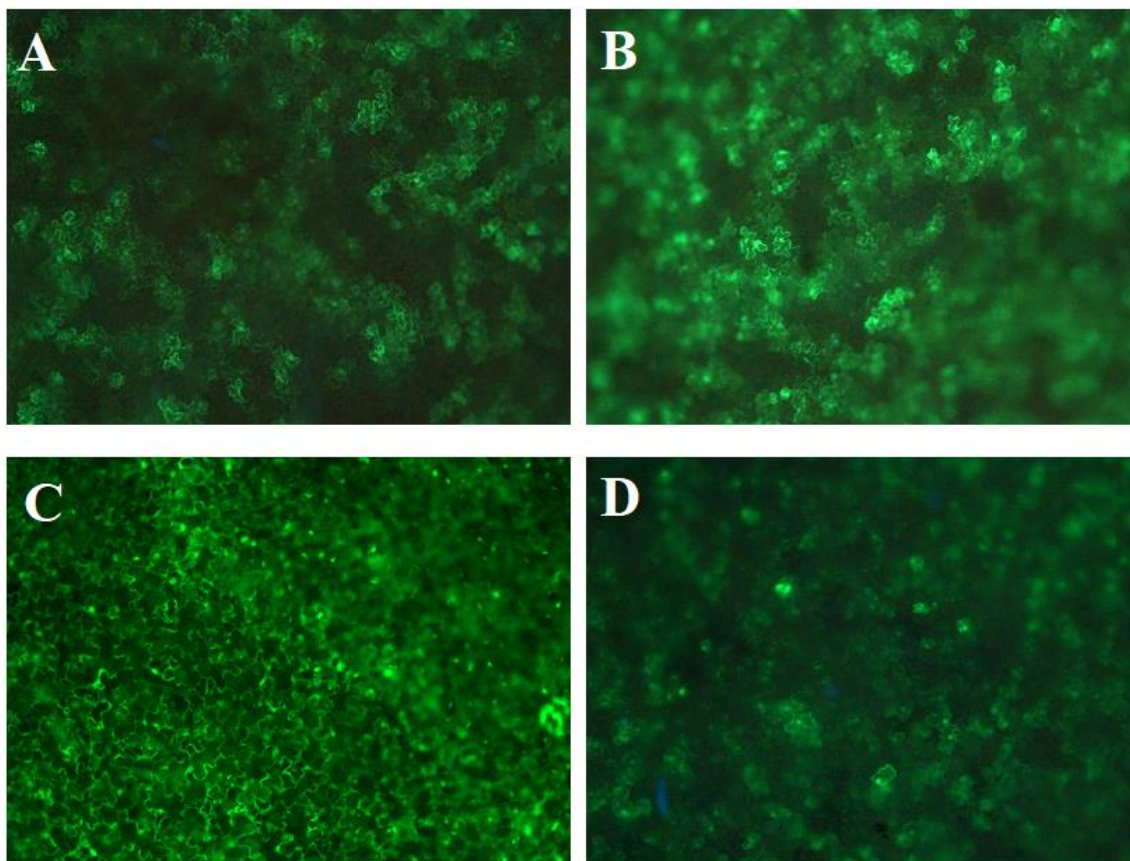
Tukeyův HSD test; proměnná Hmotnost biomasy (g) (Tabulka dat65) Přibližné pravděpodobnosti pro post hoc testy Chyba: meziskup. PČ = 4,4622, SV = 48,000			
Druhy	{1} 8,2493	{2} 9,6670	{3} 26,121
N. benthamiana WT		0,120022	0,000126
N. benthamiana HCPPro	0,120022		0,000126
N. rustica	0,000126	0,000126	

5.2 Testování vzniklých vektorů a stanovení optické denzity

Druhý den po infiltraci bylo na listech možné pozorovat jizvy od injekčních stříkaček. Třetí den se u rostlin *N. rustica* nainfiltrovaných replikujícími se vektory začaly objevovat drobné roztroušené léze. Čtvrtý a pátý den se léze začaly spojovat a vytvářely nekrotické skvrny ve všech místech kde proběhla agroinfiltrace replikujícími se vektory. Čtvrtý až pátý den se obecně na některých místech po agroinfiltraci objevily tmavší kruhy. Infiltrační roztok obsahuje hořčík, který je důležitým prvkem ve výživě rostlin. Tmavé kruhy jsou tak lokální reakcí na jeho přítomnost. Šestý až sedmý den se začaly objevovat kruhy se světlejšími odstíny, hlavně u konstruktů obsahujících fluorescenční proteiny. Jedná se o změnu barvy v důsledku akumulace proteinů. Desátý den se na některých rostlinách obou genotypů *N. benthamiana* s replikujícími se vektory objevili také nekrotické skvrny, ale v řádově menší míře a zastoupení než u *N. rustica*.

Po testovací agroinfiltraci došlo u všech rostlin k expresi fluorescenčních proteinů, viz Obr.7. U virových vektorů se také začaly objevovat symptomy infekce, jako mozaiky, chlorózy, krabaté a deformované listy. I přes to se ale nepotvrdila přítomnost trastuzumabu v infiltrovaných rostlinách. Ani přes opakované pokusy se nepodařilo úspěšně vytvořit virové vektory, které by poskytl expresi protilátky. Nereplikující se vektor projevil silnou expresi jak GFP, tak trastuzumabu.

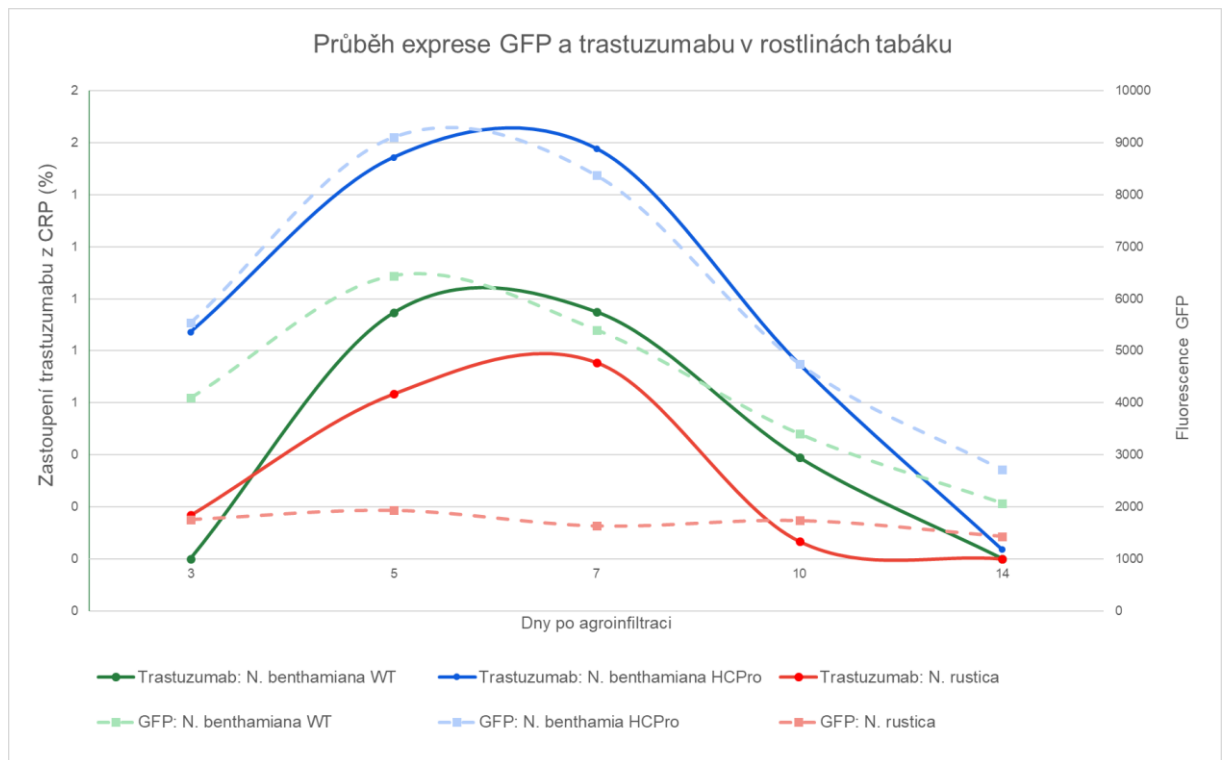
Z výsledku je jasné, že *N. rustica* není kompatibilní s virovými vektory, proti kterým vyvíjí silnou hypersenzitivní reakci. Varianta tak byla tedy z pokusu vyřazena, stejně jako ostatní replikující se vektory, kvůli jejich neschopnosti poskytnout expresi trastuzumabu. Pro ostatní varianty byla zvolena obecně používaná $OD_{600}=1$, kterou použila i řada dřívějších prací zabývajících se touto tematikou.



Obr. 7: Rostlina *N. benthamiana* HCPPro koexprimující GFP a trastuzumab. Je možné pozorovat zelenou fluorescenci GFP a průběh její změny během času. Zvětšeno 100x, A – 3 DPI, B – 5 DPI, C – 7 DPI, D – 10 DPI.

5.3 Stanovení optimální doby sklizně

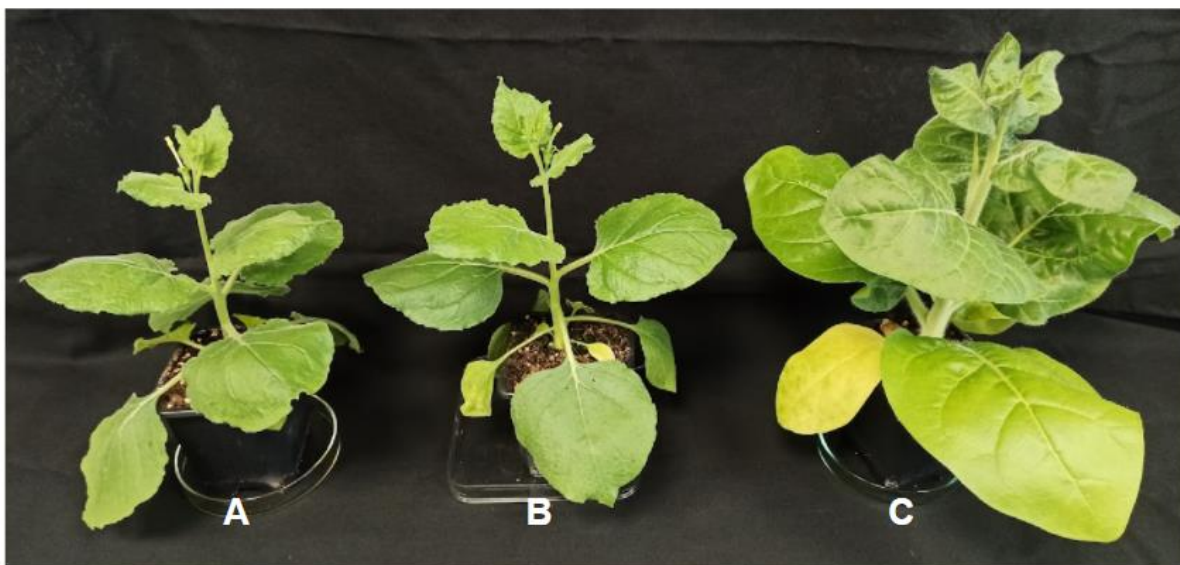
Statisticky byla zjištěna poměrně silná závislost ($R=0,836$) exprese GFP a trastuzumabu. Mezi všemi pokusnými variantami byl také zjištěn rozdíl v expresi obou proteinů. Nejvyšší hodnoty byly 7. DPI u *N. benthamiana* HCPPro (1,58 % z CRP), dále pak u *N. benthamiana* WT (0,95 % z CRP) a nejmenší hodnoty byly u *N. rustica* (0,75 % z CRP). V obou případech měl průběh exprese stejné tendence viz Obr.8. V prvních dnech po infiltraci se množství obou proteinů zvyšuje, po určité době (GFP 5 DPI, trastuzumab 7 DPI) začne množství proteinů klesat. Oba genotypy *N. benthamiana* projevily silnou expresi obou proteinů. *N. rustica* tvořila GFP také, ale exprese byla spíše slabší a relativně stabilní. Exprese trastuzumabu však byla pozorována jen v jedné z testovaných rostlin. Ideální doba sklizně rostlin pro maximální výtěžek trastuzumabu je tak 6-7 DPI u všech testovaných rostlin, 1-2 dny po dosažení maxima exprese GFP, viz Obr.8.



Obr.8: Graf znázorňující průběh koexprese GFP a trastuzumabu. Můžeme pozorovat píky exprese GFP kolem 5. DPI a trastuzumabu mezi 6.-7. DPI.

5.4 Sklizeň biomasy

Jednotlivé druhy, resp. genotypy tabáků se mezi sebou liší morfologicky (různý tvar a velikosti listů, výška apod.), anatomicky (různá tuhost a křehkost listů) i geneticky (rozdílné druhy, vnesený transgen apod.), viz Obr.9. Transgenní linie *N. benthamiana* HCPro měla opožděné klíčení i počáteční růst oproti WT linii. Ve výsledku bylo z jedné rostliny průměrně sklizeno 9,30 g u *N. benthamiana* WT (6,52-11,86 g) a 8,62 g u *N. benthamiana* HCPro (5,23-11,60 g) ale ve sklizené biomase se statisticky nelišily. *N. rustica* měla rychlejší růst a vývoj v porovnání s *N. benthamiana* a ve výsledku měla sklizeň průměrně 26,12 g (23,07-28,23 g). Statisticky se tak výrazně lišila od obou přechozích variant.

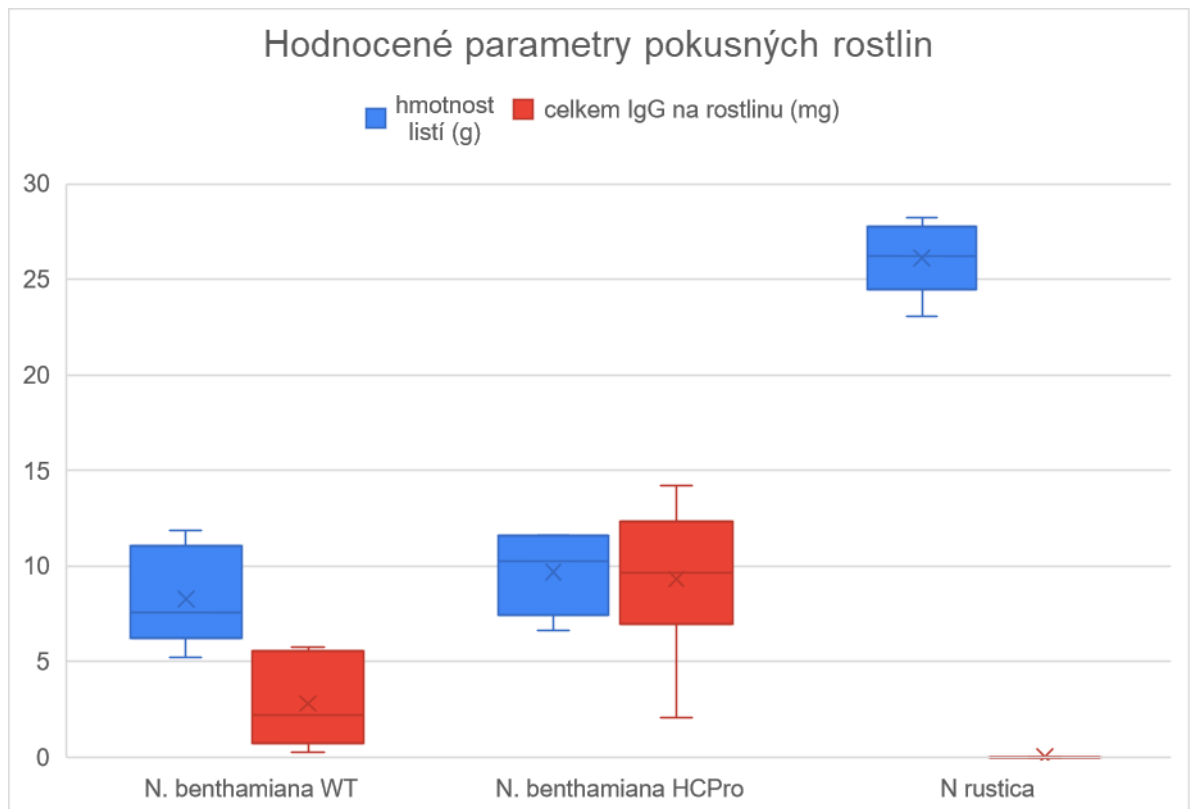


Obr.9: Srovnání jednotlivých pokusných rostlin Všechny rostliny jsou stejně staré (67 dní). Je možné vidět výrazný rozdíl ve velikosti mezi a oběma genotypy *N. benthamiana*. I přes počáteční slabší růst transgenní linie HCPro je ve výsledku srovnatelná s WT linií. A - *N. benthamiana* WT, B - *N. benthamiana* HCPro, C - *N. rustica*.

5.5 Hodnocení celkové exprese

Statisticky se v expresi trastuzumabu mezi sebou liší všechny pokusné varianty. Naměřené hodnoty trastuzumabu byly nejvyšší u *N. benthamiana* HCPro a to průměrně 1,65 % z CRP (0,19-2,64 % z CRP), u *N. benthamiana* WT byl průměr 0,53 % (0,07-1,25 % z CRP) a u *N. rustica* nebyly protilátky přítomny vůbec. Průměrně pak jedna rostlina *N. benthamiana* HCPro může poskytnout 9,296 mg (2,09-14,18 mg) trastuzumabu, *N. benthamiana* WT pak 2,782 mg (0,22-5,75 mg), viz Obr.10.

Byla také pozorována středně silná závislost ($R=0,457$) exprese na celkově sklizené biomase, kdy rostliny *N. benthamiana* s vyšší sklizní biomasy obsahovaly obecně více protilátky. Množství CRP však na sklizené biomase závislé nebylo.



Obr.10: Grafické shrnutí hodnocených parametrů pokusných rostlin. *N. benthamiana* poskytuje průměrně stejný výtěžek biomasy z obou genotypů, linie HCPro má ale statisticky vyšší výtěžek exprimované protilátky. *N. rustica* má výrazně vyšší výtěžek biomasy, ovšem k expresi trastuzumabu nedošlo.

5.6 Hodnocení izolace a purifikace

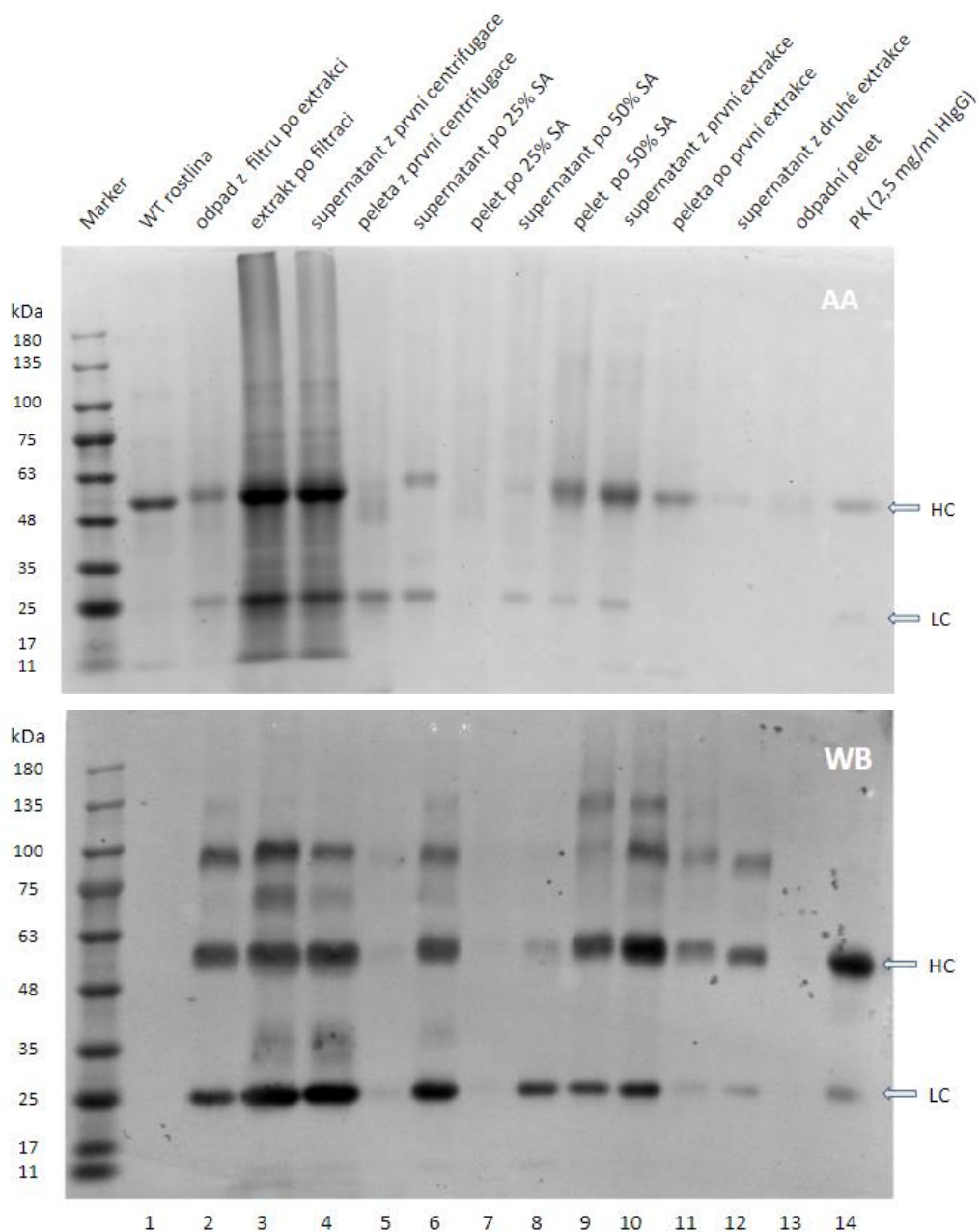
5.6.1 Izolace

Při izolaci a purifikaci protilátky bylo zásadní zhodnotit jednotlivé kroky, kvůli možným ztrátám a případné optimalizaci protokolu. Obr.11 zobrazuje jednotlivé kroky vyhodnocené pomocí SDS PAGE a western blotu. Jako negativní kontrola byla použita rostlina *N. benthamiana* WT (1), která nebyla podrobena žádné infiltraci. Jako pozitivní kontrola sloužilo komerční lidské IgG (Sigma-Aldrich, USA). Díky tomu můžeme potvrdit, že protilátky použité pro western blot se vážou specificky na trastuzumab a netvoří nespecifické interakce s rostlinnými komponenty. Lehký řetězec (LC) má velikost kolem 25 kDa, těžký řetězec (HC) kolem 50 kDa. Na western blotu je možné vidět barevnou reakci i v oblastech kolem 35, 70 a 135 kDa. Nachází se ve frakcích s očekávanou velkou koncentrací trastuzumabu (3, 4, 6, 9 a 10), můžeme tedy předpokládat, že se jedná o různé kombinace lehkých a těžkých řetězců, popřípadě jejich poškozených fragmentů, u kterých nedošlo k úplnému rozštěpení disulfidických můstků β -merkaptoethanolem. V některých odpadních frakcích je možné pozorovat ztráty. Vzorky (5, 7) mají ztráty v podstatě zanedbatelné. Ve vzorku (8) je možné vidět silný signál v oblasti LC, nejspíše se jedná o nespárované lehké řetězce, které samy o sobě

mají jinou rozpustnost než kompletně složená protilátka. Zůstávají tak v supernatantu, protože k jejich vysrážení je zapotřebí vyšší koncentrace SA.

Při přípravě surového extraktu (2-4) zůstává část trastuzumabu ve zbytcích na filtru (2). Nejspíše se jedná o proteiny zachycené ve zbytcích buněčných stěn, které už není možné 100 % extrahovat. Po filtraci (3) i centrifugaci (4) zůstává hlavní podíl protilátek v supernatantu a nedochází k výrazným ztrátám. Ve vzorcích (3) a (4) můžeme vidět silný signál v oblasti HC na AA gelu. Ten je způsobený přítomností velké podjednotky RuBisCO o velikosti 55 kDa, malá podjednotka je v oblasti kolem 13 kDa. RuBisCO a další proteiny jsou však odstraněny po prvním srážení SA. Od vzorku (6) už je signál v oblasti HC menší a mizí i ostatní balastní proteiny. Ani odpadní pelet po centrifugaci (5) neobsahuje výrazné ztráty. Při srážení síranem amonným (SA) je trastuzumab v očekávaných frakcích, tedy supernatant 25% SA (6) a pelet po 50% SA (9). Naopak v odpadních frakcích je signál trastuzumabu minimální, tedy pelet 25% SA (7) a supernatant 50% SA (8).

Rozpuštění pelety po 50% SA (10) a následná centrifugace a opětovné rozpuštění pelety (12) indikuje dobrou rozpustnost protilátky i po srážení. Je však dobré rozpuštění provést 2x, kvůli ztrátám způsobených přítomností zbytkového SA. V peletu po první extrakci je totiž stále množství protilátek (11) Odpadní pelet po druhé extrakci pak nejeví žádné detekovatelné zbytkové protilátky. Obecně je možné pozorovat úbytek protilátky během procesu.

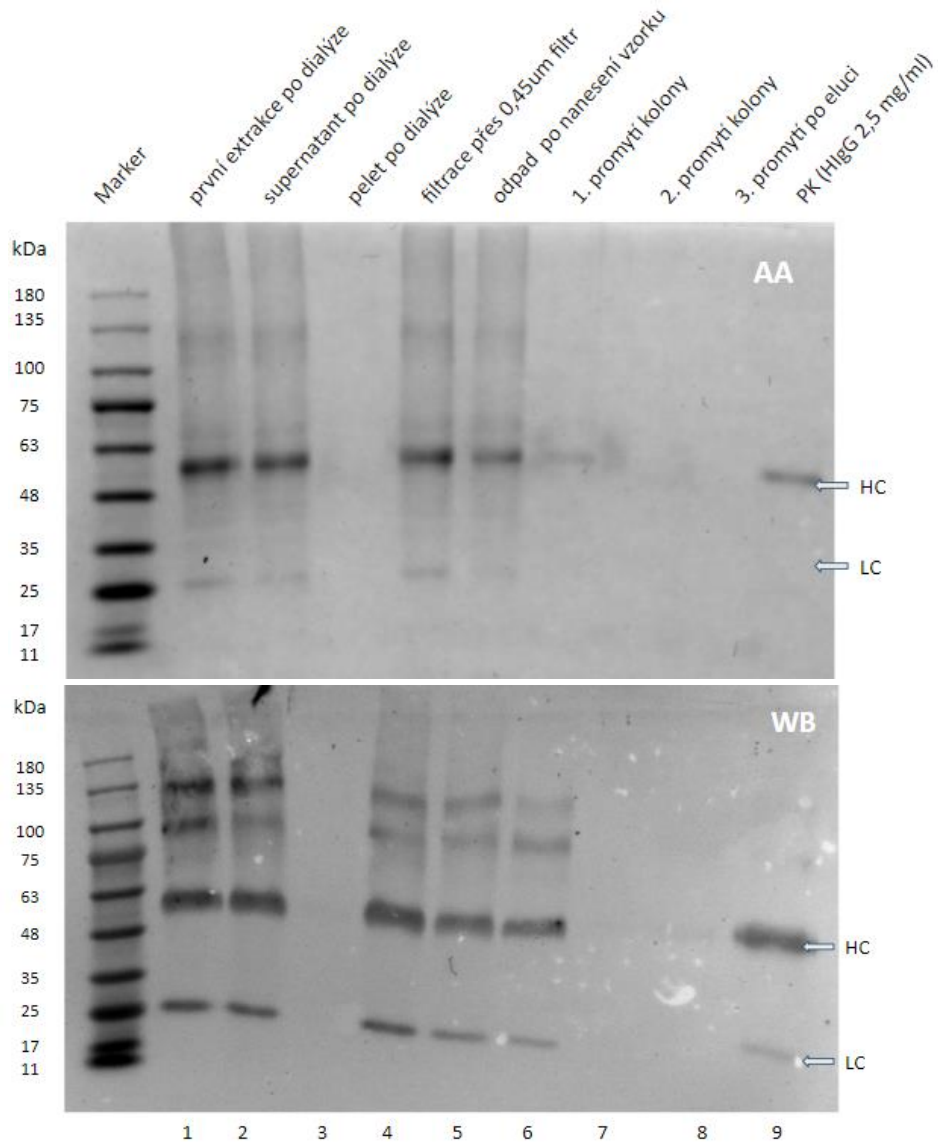


Obr.11: Postup izolace trastuzumabu. AA – akrylamidový gel barvený roztokem CBB, WB – nitrocelulózová membrána hodnocena metodou western blot, LC – lehký řetězec, HC – těžký řetězec.

5.6.2 Purifikace

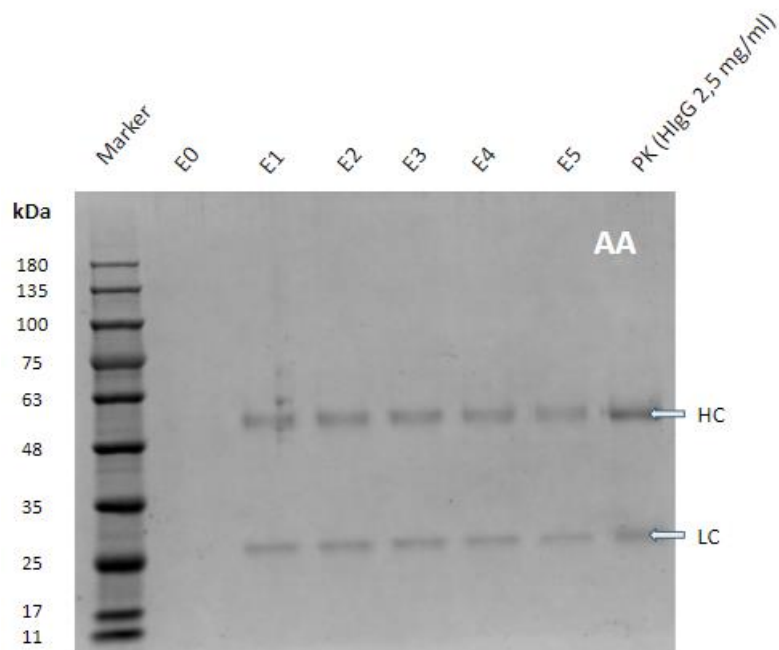
Průběh purifikace pomocí afinitní chromatografie zobrazuje Obr.12. Dialyzační střevo má MWCO 14 kDa, takže umožní i odstranění menších zbytkových proteinů a molekul. Došlo tak k odstranění zbytkového SA, který by mohl způsobovat problémy při purifikaci. Protilátky typu IgG mají celkovou velikost kolem 150 kDa, takže nehrozí jejich ztráta (1, 2). Po dialýze následovala centrifugace pro odstranění nečistot a následné usnadnění filtrace přes 0,45 μm filtr. Jinak se filtry rychle ucpávají a hrozí jejich velká spotřeba. V peletu po centrifugaci (3) dialyzovaného izolátu se protilátky nenachází a krok tak není ztrátový, stejně jako filtrace izolátu (4).

V odpadní frakci (5) po nanesení izolátu a prvním promytí (6) je možné vidět na WB signál protilátek. V izolátu se nacházelo větší množství protilátek, než se očekávalo a byla tak překročena vazebná kapacita matrix tj. 20 mg IgG/ml. Nenavázané protilátky tak protekly skrz. V druhém (7) i třetím promytí (8) se už ale protilátky nenachází.



Obr.12: Postup izolace trastuzumabu. AA – akrylamidový gel barvený roztokem CBB, WB – nitrocelulósová membrána hodnocena metodou western blot, LC – lehký řetězec, HC – těžký řetězec.

Na Obr.13 je možné vidět čistotu jednotlivých frakcí eluce. První odebraný vzorek (E0) žádnou protilátku neobsahuje, protože se jedná o mrtvý objem promývacího pufru před nanesením elučního pufru. Jak již bylo uvedeno výše, agarózová matrix nesmí vyschnout, proto musí být neustále ponořena v pracovních pufrech a mrtvému objemu se tak nedá vyhnout. V dalších elucích (E1-5) vidíme proteiny pouze v oblastech LC a HC. Vzorky jsou tak prosté od proteinových kontaminací, jiné metabolity (fenolické látky, chlorofyl apod.) však nelze vyloučit.



Obr.13: Výsledné eluce po afinitní chromatografii zobrazené pomocí SDS PAGE. Je možné pozorovat čistou protilátku bez proteinových kontaminací. AA – akrylamidový gel barvený roztokem CBB, LC – lehký řetězec, HC – těžký řetězec.

6 Diskuse

6.1 Vytvoření genových vektorů

Úspěšně se podařilo vytvořit nereplikující se vektor poskytující silnou expresi trastuzumabu. Virové replikující se vektory se však i přes opakované pokusy nevytvářely měřitelné množství protilátky. Podobný problém při použití tohoto typu vektorů byl pozorován dříve (Avesani et al. 2007, Chung et al. 2007, Uhde-Holzem et al. 2007). Na viry neustále působí selekční tlak. Jak bylo zmíněno dříve, virové vektory jsou omezeny velikostí rDNA, kterou je do nich možné vložit. Pro správné fungování virů musí mít genom danou velikost, aby mohlo dojít ke vzniku virové částice. Vkládané sekvence tak mohly narušit správné funkce virové genetické informace a došlo k jejich samovolnému vyřazení během exprese již v prvním infekčním cyklu (Avesani et al. 2007). Příčinou můžou být také vyšší chybovost virových RdRp (Lai 1992).

6.2 Určení ideální doby sklizně

Z výsledků vyplývá, že ideální doba sklizně pro maximální výtěžek protilátky je mezi 6. a 7. DPI. Jiné práce ale provádějí sklizeň dříve, např. již po 3 DPI. Autoři ale použili jiný typ vektoru, u kterých může být nejvyšších hodnot dosaženo dříve, ovšem s nižší celkovou expresí. Při kombinaci *N. benthamiana* WT s geminivirovým vektorem bylo dosaženo koncentrace 130 $\mu\text{g/g}$ listové biomasy 3 DPI. To je zhruba 3 \times méně, v porovnání s 334 $\mu\text{g/g}$ listové hmoty z nereplikujícího se vektoru hodnoceným v této práci s rozdílem 3 dnů (Rattanapisit et al. 2020). Při použití nereplikativních vektorů je obecně dosaženo vyšších výtěžků. Represor silencingu P19 navíc prodlužuje životnost vniklé mRNA a brání její degradaci pomocí RNA interference. Jeho použití tak výrazně zvyšuje výtěžek rekombinantních proteinů. Tím může být prodloužena inkubace rostlin a zvýšeno množství protilátky (Voinnet et al. 2003). Lombardi et al. 2012 použili obdobně nereplikující se vektor pro jinou protilátku s koexpresí P19 za výtěžku 480 $\mu\text{g/g}$ listové hmoty v linii s upravenou glykosylací *N. benthamiana* XylT/FucT. Sklizeň byla nejvhodnější 6 DPI, podobně jako v mé práci. Fulton et al. 2015 použil obdobně nereplikující se vektor v *N. benthamiana* WT tentokrát bez P19. Ideální doba sklizně byla v tomto případě 4 DPI se výtěžkem 87,2 $\mu\text{g/g}$ listové hmoty. Zajímavé by mohlo být porovnání virových vektorů rovněž obsahující P19, bohužel se je ale nepodařilo vytvořit.

Zajímavá je korelace mezi fluorescencí GFP a koncentrací trastuzumabu, která byla statisticky potvrzena. Rozdíl mezi maximální hladinou fluorescence a koncentrací protilátky je 1-2 dny. GFP je při procesu precipitace SA odstraněn v 50% supernatantu SA, protože k jeho vysrážení je zapotřebí až více než 60% koncentrace (Jain et al. 2004). GFP tak může být během zpracování odstraněno, což by při jeho konjugaci s protilátkou nešlo. Tím může být jednoduše měřena fluorescence po agroinfiltraci, rostliny sklizené v rozmezí 1-2 dnů po začátku jejího snižování a nehrozí zbytečné ztráty. K hodnocení fluorescence stačila pouze 10% příměs suspenze agrobakterií s konstruktem pro GFP do kultury pro expresi protilátky. Změření fluorescence je výrazně jednodušší a rychlejší metoda, než kvantifikace proteinů pomocí western blotu nebo ELISA.

6.3 Porovnání celkové exprese

Tranzientní exprese poskytuje relativně rychlý způsob produkce proteinů. Přes řadu výhod však i u rostlin najdeme pár nedostatků. Jednou z nich je nerovnoměrná exprese, která se odvíjí od stáří listů/rostlin a zdravotního stavu. Liší se také obsahem celkového proteinu. Mladší listy exprimují daleko více než ty starší. Pro zhodnocení exprese tak bylo třeba odebrat vzorky napříč celou rostlinou.

Z výsledků byla zjištěna slabší závislost exprese trastuzumabu na sklizené biomase. Na tu má hlavní vliv celkový zdravotní stav a agrotechnické zásahy. Podmínky prostředí v tomto případě můžeme vyloučit, díky kontrolovaným podmínkám kultivační místnosti. Celkově je celý proces pro rostliny stresující. Během agroinfiltrace je opakovaně vháněn do listů infiltrační roztok pomocí podtlaku a následně dojde k výrazným změnám v rámci buněk po začlenění a manifestaci vektoru. Hromadící se proteiny pak mohou narušovat normální fyziologické funkce. Zajištění co nejlepšího zdravotního stavu by tak mělo být jednou z priorit pro dosažení maximálního výtěžku rekombinantních proteinů (Jamal et al. 2009).

N. rustica měla během stanovení optimální doby sklizně stabilní hladinu fluorescence GFP. Trastuzumab byl potvrzen jen v jedné z odběrových rostlin. Při hodnocení celkové exprese se však protilátka nevyskytla ani v jednom ze vzorků. Sekvence byla optimalizována pro *N. benthamiana*. Exprese se také odvíjí od konkrétního proteinu. Sekvence protilátky tak nejspíše měla problém s vnitřními mechanismy buňky a nedošlo tak k expresi protilátky. Ačkoliv jsou si oba druhy tabáku blízké příbuzné, rozdíly v kodonové preferenci a vnitřních mechanismech exprese a stability proteinů budou mít větší vliv, než se předpokládalo. Na druhou stranu měla *N. rustica* rychlejší růst, větší habitat a největší výtěžek biomasy. Během procesu agroinfiltrace byla také nejméně náchylná na poškození, protože má krátké a silné řapíky, na rozdíl od dlouhých a tenkých řapíků *N. benthamiana*. Nejlepší výsledky měla *N. benthamiana* HCPro, která se sice statisticky nelišila v množství sklizené biomasy od WT, ale v celkovém výtěžku trastuzumabu se rozdíl projevil. Dřívější práce prokázali lepší expresi proteinů při použití linie HCPro, např. GFP (Tahmasebi & Afsharifar 2017) nebo na epitopy HPV16 (Čeřovská et al. 2008). HCPro zlepšuje expresi na několika úrovních, ať už díky supresi silensingu, usnadnění pohybu RNA mezi buňkami nebo ovlivnění rostlinných transkripčních faktorů (Ala-Poikela et al. 2011). V kombinaci s P19 tak poskytuje prokazatelně vyšší výtěžek trastuzumabu na rostlinu než původní WT linie.

Existují i další možnosti zvýšení exprese rekombinantních proteinů. Dobrých výsledků bylo dosaženo díky koexpresi proteinů teplotního šoku, jako HSP70 a HSP 90 (Aparicio et al. 2005), inhibitorů proteáz (Pillay et al. 2012). Také vyvolání krátkodobého tepelného šoku po agroinfiltraci nebo modifikace složení infiltračního roztoku vedla ke zvýšení exprese proteinů (Norkunas et al. 2018).

6.4 Izolace a purifikace

Protilátku trastuzumab se úspěšně podařilo izolovat z rostlinného materiálu pomocí precipitace síranem amonným. Během procesu došlo k odstranění většiny nežádoucích

proteinů, zbytků rostlinných buněk a sekundárních metabolitů. Obecně se také koncentrace protilátky během procesu snižuje, protože v každém kroku dochází k určitým ztrátám. Výrazné ztráty kvůli chybovosti metody ale nenastaly. Následně byl trastuzumab podroben purifikaci pomocí afinitní chromatografie s proteinem G. Protilátka dle očekávání projevila afinitu k agarózové matrix, následně byla promyta od nežádoucích komponent a úspěšně došlo k její eluci z kolony. Čistota byla ověřena pomocí SDS PAGE.

7 Závěr

Práce shrnuje vliv různých druhů tabáků a genových vektorů na expresi rekombinantní protilátky trastuzumab používaný v biologické léčbě nádorů. Podařilo se vytvořit nereplikující se vektor, který poskytne silnou expresi trastuzumabu. Replikující se vektory odvozené od rostlinných virů se vytvořit nepodařilo. Nejspíše kvůli genetické nestabilitě vektoru. Ze tří porovnávaných rostlin byla exprese nejlepší v transgenní linii *N. benthamiana* *HCP**Pro*, dále pak ve WT linii a poslední sledovaný druh *N. rustica* žádnou expresi neprojevil. Ve sklizené biomase se jednotlivé linie *N. benthamiana* nelišily, za to *N. rustica* měl sklizeň biomasy výrazně vyšší. Pomocí koexprese trastuzumabu s GFP se podařila zjistit korelace mezi fluorescencí GFP a koncentrací protilátky. Z rostlin se nakonec podařilo úspěšně získat purifikovanou protilátku.

Byla tak nastíněna základní možnost produkce rekombinantní protilátky trastuzumab v rostlinách. Tato protilátka je doposud produkovaná v buňkách CHO, které jsou ale jakožto savčí expresní model náročnější na kultivaci, mají omezenou škálovatelnost a jsou extrémně finančně náročné. Do budoucna by bylo možné systém dále optimalizovat, například pomocí koexprese HSP a inhibitorů proteáz pro ještě vyšší výtěžky. Dále je pak zásadní zajištění dobrého zdravotního stavu rostlin, díky čemu budou mít větší zisk biomasy a tím i celkový obsah exprimované protilátky. Můžeme tedy s nadsázkou říct, že je možné, aby tabák léčil rakovinu.

8 Literatura

- Adiguzel C, Iqbal O, Demir M, Fareed J. 2009. European Community and US-FDA Approval of Recombinant Human Antithrombin Produced in Genetically Altered Goats. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* **15**:645–651.
- Akerström B, Brodin TH, Reis K, Björck L. 1985. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. *The Journal of immunology* **135**:2589-2592.
- Ala-Poikela M, Goytia E, Haikonen T, Rajamäki ML, Valkonen JP. 2011. Helper component proteinase of the genus Potyvirus is an interaction partner of translation initiation factors eIF (iso) 4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *Journal of virology* **85**:6784-6794.
- Alghamdi AA. 2021. Impact of the invasive plant species “*Nicotiana glauca*” toxins on the larvae of the invasive insect species “*Rhynchophorus ferrugineus*”: A damaging pest of date palm trees in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* **28**:1154-1157.
- Aparicio F, Thomas CL, Lederer C, Niu Y, Wang D, Maule A J. 2005. Virus induction of heat shock protein 70 reflects a general response to protein accumulation in the plant cytosol. *Plant physiology* **138**:529-536.
- Aronson R. 2012. The role of comfort and discomfort in insulin therapy. *Diabetes technology & therapeutics* **14**:741-747.
- Avesani L, Marconi G, Morandini F, Albertini E, Bruschetta M, Bortesi L, Porceddu A. 2007. Stability of Potato virus X expression vectors is related to insert size: implications for replication models and risk assessment. *Transgenic research* **16**:587-597.
- Ayyar BV, Arora S, Murphy C, O’Kennedy R. 2012. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods* **6**:116-129.
- Bally J et al. 2015. The extremophile *Nicotiana benthamiana* has traded viral defence for early vigour. *Nature plants* **1**:1-6.
- Bally J, Jung H, Mortimer C, Naim F, Philips JG, Hellens R, Bombarley A, Goodin MM, Waterhouse PM. 2018. The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: a plant for all reasons. *Annual review of phytopathology* **56**:405-426.
- Baselga J, Carbonell X, Castañeda-Soto NJ, Clemens M, Green M, Harvey V, Morales S, Barton C, Ghahramani P. 2005. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *Journal of Clinical Oncology* **23**:2162-2171.
- Beck A, Wagner-Rousset E, Bussat MC, Lokteff M, Klinguer-Hamour C, Haeuw JF, Goetsch L, Wurch T, Dorselaer AV, Corvaia N. 2008. Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins. *Current pharmaceutical biotechnology* **9**:482-501.
- Becker, M et al. 2021. Exploring beyond clinical routine SARS-CoV-2 serology using MultiCoV-Ab to evaluate endemic coronavirus cross-reactivity. *Nature communications* **12**: 1-12.
- Benchling. 2022. Benchling: Cloud-Based Informatics Platform for Life Sciences R&D. Available from <https://www.benchling.com/> (accessed March 2022).
- Bhatla SC, Kaushik V, Yadav MK. 2010. Use of oil bodies and oleosins in recombinant protein production and other biotechnological applications. *Biotechnology advances* **28**: 293-300.

- Bhatnagar R. 2007. RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY Introduction to Biotechnology and Recombinant DNATechnology. Centre for Biotechnology, Jawaharlal Nehru University.
- Biologics International Corp. 2018. Recombinant Protein Definition. BiologicsCorp: Custom Protein & Antibody Production Company. Available from <https://www.biologicscorp.com/blog/recombinant-protein-definition/> (accessed March 2022).
- Brondyk WH. 2009. Selecting an Appropriate Method for Expressing a Recombinant Protein. *Methods in Enzymology* **463**:131-147.
- Burnett MJB, Burnett AC. 2020. Therapeutic Recombinant Protein Production in Plants: Challenges and Opportunities. *Plants People Planet* **2**:121–32.
- Campbell AM. 1991. Monoclonal antibody and immunosensor technology: The production and application of rodent and human monoclonal antibodies. Elsevier, Amsterdam.
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. 1992. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:4285–4289.
- Conley AJ, Zhu H, Le LC, Jevnikar AM, Lee BH, Brandle JE, Menassa R. 2011. Recombinant protein production in a variety of Nicotiana hosts: a comparative analysis. *Plant biotechnology journal* **9**:434-444.
- Čeřovská N, Hoffmeisterová H, Pečenková T, Moravec T, Synková H, Plchová H, Velemínský J. 2008. Transient expression of HPV16 E7 peptide (aa 44–60) and HPV16 L2 peptide (aa 108–120) on chimeric potyvirus-like particles using Potato virus X-based vector. *Protein expression and purification* **58**:154-161.
- Daar ES et al. 2001. Diagnosis of primary HIV-1 infection. *Annals of internal medicine* **134**: 25-29.
- Dusek J et al. 2020. Extended set of GoldenBraid compatible vectors for fast assembly of multigenic constructs and their use to create geminiviral expression vectors. *Frontiers in plant science* **11**:1520.
- Ellis T, Adie T, Baldwin GS. 2011. DNA assembly for synthetic biology: from parts to pathways and beyond. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* **3**:109–118.
- EnCor Biotechnology Inc. 2022. Ammonium Sulfate Calculator. EnCor Biotechnology Inc. Available from <https://eurofinsgenomics.eu/> <https://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm> (accessed March 2022).
- Engelhard M. 2007. Pharming – an Introduction. 7-12 in Engelhard M, Hagen K, Thiele F, editors. *Pharming: A New Branch of Biotechnology*. Europäische Akademie, Bad Neuenahr-Ahrweiler.
- Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. 2008. A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLOS ONE* **3**:e3647 DOI: 10.1371/journal.pone.0003647.
- Fendly BM, Winget M, Hudziak RM, Lipari MT, Napier MA, Ullrich A. 1990. Characterization of Murine Monoclonal Antibodies Reactive to Either the Human Epidermal Growth Factor Receptor or HER2/neu Gene Product. *Cancer Research* **50**: 1550–1558.
- Fox JL. 2012. First plant-made biologic approved. *Nature Biotechnology* **30**:472–472.
- Fulton A, Lai H, Chen Q, Zhang C. 2015. Purification of monoclonal antibody against Ebola GPI

- protein expressed in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Chromatography A* **1389**:128-132.
- Garabagi F, McLean MD, Hall JC. 2012. Transient and stable expression of antibodies in *Nicotiana* species. Pages 389-408 in Chames P, Nevoltris D, editors. *Antibody Engineering* Third edition. Humana Press, Totowa, NJ.
- Gazdar AF, Lyerly HK, Peoples GE, Parikh AS, Eberlein TJ. 1994. HER2/neu-derived Peptides Are Shared Antigens among Human Non-Small Cell Lung Cancer and Ovarian Cancer. *Cancer Research* **54**: 3387–3390.
- Gelletlie R & Nielsen JB. 1986. Evaluation and comparison of commercially available pregnancy tests based on monoclonal antibodies to human choriogonadotropin. *Clinical chemistry* **32**:2166-2170.
- Genentech. 2012. Perseverance – The HER2 Journey. *The New York Times*. Available from <https://www.gene.com/stories/her2/?topic=oncology> (accessed March 2022).
- Giritch A, Marillonnet S, Engler C, van Eldik G, Botterman J, Klimyuk V, Gleba Y. 2006. Rapid high-yield expression of full-size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**:14701-14706.
- Gleba Y, Klimyuk V, Marillonnet S. 2007. Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current opinion in biotechnology* **18**:134-141.
- Gleba Y, Marillonnet S, Klimyuk V. 2004. Engineering viral expression vectors for plants: the ‘full virus’ and the ‘deconstructed virus’ strategies. *Current opinion in plant biology* **7**:182-188.
- Goodin MM, Zaitlin D, Naidu RA, Lommel SA. 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant–pathogen interactions. *Molecular plant-microbe interactions* **21**:1015-1026.
- Gounni AS, Lamkhioued B, Delaporte E, Dubost A, Kinet JP, Capron A, Capron M. 1994. The high-affinity IgE receptor on eosinophils: from allergy to parasites or from parasites to allergy? *Journal of allergy and clinical immunology* **94**:1214-1216.
- Grosse-Holz F et al. 2018. Three unrelated protease inhibitors enhance accumulation of pharmaceutical recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana*. *Plant biotechnology journal*, **16**:1797-1810.
- Hempel F, Lau J, Klingl A, Maier UG. 2011. Algae as protein factories: expression of a human antibody and the respective antigen in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PloS one*, **6**:e28424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028424>
- Henle W, Henle GE, Horwitz CA. 1974. Epstein-barr virus specific diagnostic tests in infectious mononucleosis. *Human pathology* **5**:551-565.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A. 1993. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic research* **2**:208-218.
- Hořejší V, Batůňková J, Brdička T, Šípek R. 2013. *Základy imunologie* 5. vydání. Stanislav Juhaňák – TRITON, Praha.
- Chapman S, Hills G, Watts J, Baulcombe D. 1992. Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology* **191**:223–230.
- Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, Gilliland GL. 2019. Antibody structure and function: the basis for engineering therapeutics. *Antibodies* **8**:55.
- Chung BN, Canto T, Palukaitis P. 2007. Stability of recombinant plant viruses containing genes of unrelated plant viruses. *Journal of General Virology* **88**:1347-1355.

- Chung SM, Vaidya M, Tzfira T. 2006. Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria. *Trends in plant science* **11**:1-4.
- Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, Boyer HW. 1977. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* **198**:1056–1063.
- Jain S, Singh R, Gupta MN. 2004. Purification of recombinant green fluorescent protein by three-phase partitioning. *Journal of Chromatography A* **1035**:83-86.
- Jamal A, Ko K, Kim HS, Choo YK, Joung H, Ko K. 2009. Role of genetic factors and environmental conditions in recombinant protein production for molecular farming. *Biotechnology Advances* **27**:914-923.
- Jiang MC, Hu CC, Lin NS, Hsu YH. 2019. Production of human IFN γ protein in *Nicotiana benthamiana* plant through an enhanced expression system based on bamboo mosaic virus. *Viruses* **11**:509-536.
- Kallolimath S, Steinkellner H. 2015. Glycosylation of plant produced human antibodies. *Human antibodies* **23**:45-48.
- Kamisugi Y, Schlink K, Rensing SA, Schween G, von Stackelberg M, Cuming AC, Reski R, Cove DJ. 2006. The mechanism of gene targeting in *Physcomitrella patens*: homologous recombination, concatenation and multiple integration. *Nucleic acids research* **34**:6205-6214.
- Knapp S, Chase MW, Clarkson, JJ. 2004. Nomenclatural changes and a new sectional classification in *Nicotiana* (Solanaceae). *Taxon* **53**:73-82.
- Kostylev M, Otwell AE, Richardson RE, Suzuki Y. 2015. Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5 α -mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. *PLOS One* 10 (e0137466) DOI: 10.1371/journal.pone.0137466.
- Kotrba P, Najmanova J, Macek T, Ruml T, Mackova M. 2009. Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloids soil and sediment pollution. *Biotechnology advances* **27**:799-810.
- Lai H, Engle M, Fuchs A, Keller T, Johnson S, Gorlatov S, Diamond MS, Chen Q. 2010. Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**:2419-2424.
- Lai MM. 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiological reviews* **56**:61-79.
- Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, Sharma R. 2007. Edible vaccines: current status and future. *Indian journal of medical microbiology* **25**:93-102.
- Lay FT, Brugliera F, Anderson MA. 2003. Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant physiology* **131**:1283-1293.
- Lemoine NR, Jain S, Silvestre F, Lopes C, Hughes CM, McLelland E, Gullick WJ, Isabel Filipe M. 1991. Amplification and overexpression of the EGF receptor and c-erbB-2 proto-oncogenes in human stomach cancer. *British Journal of Cancer* **64**:79–83.
- Lepš J, Šmilauer P. 2016. Biostatistika. NATURA, Jihočeská univerzita, České budějovice.
- Lindbo JA. 2007. TRBO: a high-efficiency tobacco mosaic virus RNA-based overexpression vector. *Plant Physiology* **145**:1232–1240.

- Lombardi R, Donini M, Villani ME, Brunetti P, Fujiyama K, Kajiura H, Benvenuto E. 2012. Production of different glycosylation variants of the tumour-targeting mAb H10 in *Nicotiana benthamiana*: influence on expression yield and antibody degradation. *Transgenic research* **21**:1005-1021.
- Ma S. 2012. Molecular farming in plants: an overview. 1-22 in Wang A, Ma S, *Molecular farming in plants: Recent advances and future prospects*. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.
- Marillonnet S, Thoeringer C, Kandzia R, Klimyuk V, Gleba Y. 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature biotechnology* **23**:718-723.
- McConnell AD, Zhang X, Macomber JL, Chau B, Sheffer JC, Rahmanian S, Hare E, Spasojevic V, Horlick RA, King DJ, Bowers PM. 2014. A general approach to antibody thermostabilization. *MAbs* **6**:1274–1282.
- Meric-Bernstam F, Hung MC. 2006. Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. *Clinical Cancer Research* **12**:6326–6330.
- Misaki R, Fujiyama K, Seki T. 2006. Expression of human CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase and CMP-sialic acid transporter in tobacco suspension-cultured cell. *Biochemical and biophysical research communications*. **339**:1184-1189.
- Moon KB, Park JS, Park YI, Song IJ, Lee HJ, Cho HS, Jeon JH, Kim HS. 2019. Development of Systems for the Production of Plant-Derived Biopharmaceuticals. *Plants* **9**:30.
- Moravec T, Schmidt MA, Herman EM, Woodford-Thomas T. 2007. Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine* **25**:1647-1657.
- Müller-Terpitz R. 2007. The Use of Genetically Modified Animals for the Production of Pharmaceuticals – Legal Considerations from an Animal Welfare Perspective. 73-90 in Engelhard M, Hagen K, Thiele F, editors. *Pharming: A New Branch of Biotechnology*. Europäische Akademie, Bad Neuenahr-Ahrweiler.
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S. 1992. Tobacco BY-2 cell line as the “HeLa” cell in the cell biology of higher plants. *International review of cytology* **132**:1-30.
- Norkunas K, Harding R, Dale J, Dugdale B. 2018. Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant methods* **14**:1-14.
- Park KY, Wi SJ. 2016. Potential of plants to produce recombinant protein products. *Journal of Plant Biology* **59**:559–568.
- Park SR, Lee JH, Kim K, Kim TM, Lee SH, Choo YK, Kim KS, Ko K. 2020. Expression and in vitro function of anti-breast cancer llama-based single domain antibody VHH expressed in tobacco plants. *International journal of molecular sciences* **21**:1354-1366
- Perosa F, Carbone R, Ferrone S, Dammacco F. 1990. Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. *Journal of immunological methods* **128**:9-16.
- Pillay P, Kibido T, Du Plessis M, Van der Vyver C, Beyene G, Vorster BJ, Schlüter U. 2012. Use of transgenic oryzacystatin-I-expressing plants enhances recombinant protein production. *Applied biochemistry and biotechnology* **168**:1608-1620.
- Ramessar K, Sabalza M, Capell T, Christou P. 2008. Maize plants: an ideal production platform for

- effective and safe molecular pharming. *Plant Science* **174**:409-419.
- Rattanapisit K, Shanmugaraj B, Manopwisedjaroen S, Purwono PB, Siriwattananon K, Khorattanakulchai N, Phoolcharoen W. 2020. Rapid production of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) and spike specific monoclonal antibody CR3022 in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific reports* **10**:1-11.
- Rosales-Mendoza S, Orellana-Escobedo L, Romero-Maldonado A, Decker EL, Reski R. 2014. The potential of *Physcomitrella patens* as a platform for the production of plant-based vaccines. *Expert review of vaccines* **13**:203-212.
- Rosales-Mendoza S, Paz-Maldonado LMT, Soria-Guerra RE. 2012. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant cell reports* **31**:479-494.
- Roy V, Perez EA. 2009. Beyond Trastuzumab: Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors in HER-2–Positive Breast Cancer. *The Oncologist* **14**:1061–1069
- Russell DA. 2000. Feasibility of antibody production in plants for human therapeutic use. Pages 119-138 in Hammond J, McGarvey P, Yusibov V, editors. *Plant Biotechnology New Products and Applications*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sarrion-Perdigones A, Falconi EE, Zandalinas SI, Juárez P, Fernández-del-Carmen A, Granell A, Orzaez D. 2011. GoldenBraid: An Iterative Cloning System for Standardized Assembly of Reusable Genetic Modules. *PLOS ONE* **6**:e21622 DOI: 10.1371/journal.pone.0021622.
- Sarvan M, Ketin S, Maksimović R, Biočanin R. 2020. Early detection of potential chronic alcoholism by determining the level of IgA, MCV and transferrin. *Acta Medica Medianae* **59**:60-63.
- Savenkov EI & Valkonen JPT. 2001. Potyviral helper-component proteinase expressed in transgenic plants enhances titers of Potato leaf roll virus but does not alleviate its phloem limitation. *Virology* **283**:285-293.
- Shaaltiel Y, et al. 2007. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnology Journal* **5**:579–590
- Sharma M, Sood B. 2011. A banana or a syringe: journey to edible vaccines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**:471-477.
- Shaw T. 1960. Early smoking pipes: in Africa, Europe, and America. *The Journal of the Royal Anthropological Institute of Great Britain and Ireland* **90**:272–305.
- Schillberg S, Twyman RM. 2007. Pharma-Planta: Recombinant pharmaceuticals from plants for human health. 13-30 in Engelhard M, Hagen K, Thiele F, editors. *Pharming: A New Branch of Biotechnology*. Europäische Akademie, Bad Neuenahr-Ahrweiler.
- Schirmacher V. 2019. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment. *International journal of oncology* **54**:407-419.
- Sierro N et al. 2018. The impact of genome evolution on the allotetraploid *Nicotiana rustica* - an intriguing story of enhanced alkaloid production. *BMC Genomics* **19**:1-18.
- Smith HH. 1968. Recent cytogenetic studies in the genus *Nicotiana*. *Advances in genetics* **14**: 1-54.

- Tahmasebi AA, Afsharifar A. 2017. Cap analog and Potato virus A HC-Pro silencing suppressor improve GFP transient expression using an infectious virus vector in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Biology Research Communications* **6**:45.
- Thermo Fisher Scientific. 2022. Overview of Protein Expression Systems. Thermo Fisher Scientific. Available from <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-expression-systems.html#1> (accessed March 2022).
- Tran EEH, Nelson EA, Bonagiri P, Simmons JA, Shoemaker CJ, Schmaljohn CS, Kobinger GP, Zeitlin L, Subramaniam S, White JM. 2016. Mapping of ebola virus neutralization by monoclonal antibodies in the ZMapp cocktail using cryo-electron tomography and studies of cellular entry. *Journal of virology* **90**:7618-7627.
- Twyman RM, Stöger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* **21**:570–578
- Uhde-Holzem K, Fischer R, Commandeur U. 2007. Genetic stability of recombinant potato virus X virus vectors presenting foreign epitopes. *Archives of virology* **152**:805-811.
- UniProt. 2022. Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2. UniProt ConsortiumEuropean Bioinformatics InstituteProtein Information ResourceSIB Swiss Institute of Bioinformatics. Available from <https://www.uniprot.org/uniprot/P04626> (accessed March 2022).
- Vashishth A, Tehri N. 2015. The role of recombinant DNA technology for human welfare. *International Journal of Research in Biological Sciences* **5**:35–39.
- Vogel CL, et al. 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology* **20**:719-726.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D. 2003. Retracted: An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The plant journal* **33**:949-956.
- Wilske B. 2005. Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Annals of medicine* **37**:568-579.
- Xu J, Ge X, Dolan MC. 2011. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology advances* **29**:278-299.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

BY-2 – Bright Yellow-2

CD – constant domain (konstantní doména)

DPI – dny po infiltraci

E. coli – *Escherichia coli*

EGF – endoteliální růstový faktor

HC – heavy chain (těžký řetězec)

HEK – Human embryonic kidney

HPV16 – Human papillomavirus type 16

CHO – Chinese hamster ovary

LC – light chain (lehký řetězec)

N. alata L&O – *Nicotiana alata* Link et Otto

N. benthamiana D. – *Nicotiana benthamiana* Domin

N. glauca G. – *Nicotiana glauca* Graham

N. rustica L. – *Nicotiana rustica* Linné

N. tabacum L. – *Nicotiana tabacum* Linné

Nicotiana L. – *Nicotiana* Linné

NT-1 – *Nicotiana tabacum*-1

Physcomitrella patens B&S – *Physcomitrella paten* Bruch & Schimp

rDNA – rekombinantní DNA

S. cerevisiae – *Saccharomyces cerevisiae*

SA – síran amonný

VD – variable domain (variabilní doména)

10 Samostatné přílohy

Tab.8.: Data získaná po porovnání celkové exprese. Z jednotlivých rostlin byly odebrány vzorky v triplikátech (oddíly A-C) a následně měřeny v duplikátech.

N. benthamiana WT		nr-Her2																							
				hmotnost listů (mg)		hmotnost vzorku (mg)		ELISA IgG (ug/ml)		Průměr (ug/ml)		V 1 g biomasy (mg)		Celkem na rostlinu (mg)		Pierce BCA TSP (mg/ml)		Průměr (ug/ml)		V 1 g biomasy (mg)		Celkem na rostlinu (mg)		IgG:CRP %	
Výsev pikrování infiltrace sklizeň	21.12.2021 18.01.2022 26.02.2022 04.03.2022	1	11885	103	11,80	8,40	10,10	0,10	1,17	7,29	7,06	7173,00	69,64	827,68	0,14										
		2	7075	104	92,60	93,80	93,20	0,90	6,34	7,71	7,99	7854,00	75,52	897,55	1,19										
		4	5226	104	3,9	5,50	4,70	0,05	0,24	3,77	3,65	3705,00	35,63	423,40	0,13										
		4	6524	104	35,20	28,50	31,85	0,31	2,00	8,17	8,69	8427,50	81,03	963,08	0,38										
		5	8061	113	12,90	10,30	11,60	0,10	0,83	5,67	6,00	5834,50	51,63	613,66	0,20										
		6	10725	110	62,50	63,10	62,80	0,57	6,12	7,69	7,90	7792,00	70,84	841,89	0,81										
N. benthamiana HCPnr-Her2																									
Výsev pikrování infiltrace sklizeň	21.12.2021 18.01.2022 26.02.2022 04.03.2022	1	9,231	105	121,8	116,10	118,95	1,13	10,46	5,54	5,44	5489,00	52,28	482,56	2,17										
		2	7,667	106	120,2	113,80	117,00	1,11	10,29	5,12	5,18	5147,50	49,02	452,54	2,27										
		3	6,617	105	19,6	18,70	19,15	0,18	1,68	5,95	6,06	6006,50	57,20	528,06	0,32										
		3	11,556	114	160,00	157,80	158,90	1,51	13,97	6,10	6,69	6394,00	60,90	562,12	2,49										
		5	11,601	105	72,2	78,70	75,45	0,72	6,63	7,20	6,57	6885,00	65,57	605,29	1,10										
		6	11,31	119	143,2	173,70	158,45	1,51	13,93	6,27	6,67	6470,50	61,62	568,85	2,45										
N. rustica		nr-Her2																							
Výsev pikrování infiltrace sklizeň	21.12.2021 18.01.2022 26.02.2022 04.03.2022	1	25,89	103	0	0,00	0,00	0,00	0,00	7,29	7,06	7173,00	69,64	1803,00	0,00										
		2	27,24	107	0	0,00	0,00	0,00	0,00	7,71	7,99	7854,00	73,40	1999,47	0,00										
		3	23,065	104	0	0,00	0,00	0,00	0,00	6,10	6,69	6394,00	61,48	1418,05	0,00										
		4	28,23	105	0	0,00	0,00	0,00	0,00	8,17	8,69	8427,50	80,26	2265,79	0,00										
		5	26,18	106	0	0,00	0,00	0,00	0,00	5,67	6,00	5834,50	55,04	1441,01	0,00										

B												C									
ELISA IgG (ug/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	IgG:CRP %	ELISA IgG (ug/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	IgG:CRP %				
9.00	20.30	14.65	0.14	1.69	4.65	6.66	5655.00	54.90	652.52	0.26	27.00	27.00	27.00	0.26	3.12	6.07	6.02	6040.00	58.64	696.95	0.45
84.80	76.50	80.65	0.78	5.49	5.18	5.19	5186.00	49.87	352.80	1.56	84.40	74.70	79.55	0.76	5.41	8.15	7.59	7870.00	75.67	535.39	1.01
7.2	9.50	8.35	0.08	0.42	7.07	7.26	7164.50	68.89	360.02	0.12	0.3	0.10	0.20	0.00	0.01	7.51	7.61	7561.00	72.70	379.94	0.00
27.10	30.20	28.65	0.28	1.80	7.07	7.26	7164.50	68.89	449.43	0.40	55.80	55.10	55.45	0.53	3.48	7.78	8.02	7895.50	75.92	495.29	0.70
9.50	3.00	6.25	0.06	0.45	4.37	4.72	4544.50	40.22	324.19	0.14	22.80	15.30	19.05	0.17	1.36	7.81	8.08	7941.00	70.27	566.48	0.24
47.60	45.00	46.30	0.42	4.51	4.19	4.21	4197.50	38.16	409.26	1.10	54.30	61.90	58.10	0.53	5.66	6.92	7.12	7020.00	63.82	694.45	0.83

B																					
ELISA IgG (ug/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	IgG:CRP %	ELISA IgG (ug/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	IgG:CRP %				
87.2	92.50	89.85	0.86	7.90	4.65	6.66	5655.00	53.86	497.16	1.59	111.4	108.90	110.15	1.05	9.68	6.66	5.69	6174.50	58.80	542.83	1.78
107.8	93.10	100.45	0.96	8.83	5.18	5.19	5186.00	49.39	455.92	1.94	126.8	114.80	120.80	1.15	10.62	5.40	5.68	5537.50	52.74	486.83	2.18
22.7	30.40	26.55	0.25	2.33	6.33	6.56	6446.50	61.40	566.74	0.41	25.1	25.90	25.50	0.24	2.24	7.21	6.56	6886.50	65.58	605.33	0.37
146.80	178.80	162.80	1.55	14.31	6.33	6.56	6446.50	61.40	566.74	2.53	169.80	154.60	162.20	1.54	14.26	6.49	6.21	6348.00	60.46	558.08	2.56
100	111.70	105.85	1.01	9.31	4.37	4.72	4544.50	43.28	399.53	2.33	106.5	116.90	111.70	1.06	9.82	4.51	4.57	4539.00	43.23	399.04	2.46
119.6	134.20	126.90	1.21	11.16	4.19	4.21	4197.50	39.98	369.02	3.02	116.8	108.70	112.75	1.07	9.91	5.20	5.08	5140.50	48.96	451.92	2.19

B																							
ELISA IgG (ug/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	IgG:CRP %	ELISA IgG (ug/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Prumer (ug/ml)	V 1 g biomasy (mg)	Cekem na rosilinu (mg)	IgG:CRP %						
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.33	6.77	7062.00	68.47	1772.59	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.73	7.18	6453.00	62.65	1622.02	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.35	5.83	6092.00	56.93	1550.90	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.20	6.16	6178.50	57.74	1572.92	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.40	5.41	5403.50	51.96	1198.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.06	6.54	6297.00	60.55	1396.54	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.77	6.06	5913.50	56.32	1589.89	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.17	6.83	6500.50	61.91	1747.71	0.00
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.86	6.68	6768.50	63.85	1671.69	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.23	5.68	5951.00	56.14	1469.78	0.00

Tab.9: Výsledná data z hodnocení optimální doby sklizně. Z jednotlivých rostlin byly odebrány vzorky v triplicátech (oddíly A-C) a následně měřeny v duplikátech.

N. benthamiana WT		A				B			
nr+Her2		ELISA IgG (ug/ml)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Fluorescence GFP	ELISA IgG (ug/ml)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Fluorescence GFP		
3DPI	0	0	1,545	2,184	0	0,598	0,594	3696	
5DPI	26,7	33,3	1,821	1,92	3,5	1,54	1,388	5400	
7DPI	36,1	48,4	2,002	2,113	14	2,371	2,955	6284	
10DPI	22,7	27	2,003	1,967	0	2,027	2,171	2915	
14DPI	0	0	1,777	1,782	0	2,927	3,275	2400	
N. benthamiana HCPro		A				B			
nr+Her2		ELISA IgG (ug/ml)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Fluorescence GFP	ELISA IgG (ug/ml)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Fluorescence GFP		
3DPI	21,7	14	1,496	1,661	20,4	1,238	1,236	7406	
5DPI	36,9	44,3	1,847	2,117	28,1	1,914	2,03	12138	
7DPI	32,2	39,3	1,812	1,839	23,1	2,006	2,114	9445	
10DPI	14,8	22,8	1,642	1,778	10,3	2,928	2,164	4035	
14DPI	2,5	0,9	2,027	2,212	0	1,011	1,142	3465	
N. rustica		A				B			
nr+Her2		ELISA IgG (ug/ml)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Fluorescence GFP	ELISA IgG (ug/ml)	Pierce BCA TSP (mg/ml)	Fluorescence GFP		
3DPI	4	11	0,823	0,821	0	2,293	2,41	961	
5DPI	31,8	33,5	1,2	1,34	0	1,772	1,882	1620	
7DPI	38,9	41,2	1,145	1,254	0	2,124	2,019	1101	
10DPI	4	3	1,414	1,605	0	1,72	2,054	1412	
14DPI	0	0	1,269	2,123	0	1,166	1,413	1574	