

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 308 137

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*C12N 15/70* (2006.01)  
*C12N 15/84* (2006.01)  
*C12N 15/83* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01)  
*C12P 21/00* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-764**  
(22) Přihlášeno: **30.10.2015**  
(40) Zveřejněno: **31.05.2017**  
**(Věstník č. 22/2017)**  
(47) Uděleno: **11.12.2019**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **22.01.2020**  
**(Věstník č. 4/2020)**

(56) Relevantní dokumenty:

Sarrion-Perdigones A., et al.: GoldenBraid 2.0: a comprehensive DNA assembly framework for plant synthetic biology 2013 Plant Physiol.162(3):1618-31; JAMES C. CARRINGTON\* AND DEON D. FREED: Cap-Independent Enhancement of Translation by a Plant Potyvirus 5' Nontranslated Region 1990 JOURNAL OF VIROLOGY 64,1590-1597; Odon Thiébeauld et al: Alternative translation strategies in plant viruses 2007 Plant Viruses 1 – 20; Theo W. Dreher and W. Allen Miller: Translational control in positive strand RNA plant viruses Virology. 2006 344(1): 185–197.

(73) Majitel patentu:

Ústav experimentální botaniky AV ČR, v. v. i.,  
Praha 6, Lysolaje, CZ

(72) Původce:

Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D., Praha 6, Bubeneč, CZ  
RNDr. Oldřich Navrátil, CSc., Praha 2, CZ  
doc. RNDr. Noemi Čeřovská, CSc., Praha 6,  
Ruzyně, CZ  
Dr. rer. nat. Ing. Helena Plchová, Praha 6, CZ  
RNDr. Petr Vaculík, Ph.D., Otrokovice, CZ  
Mgr. Jana Okleštková, Ph.D., Olomouc, CZ

(74) Zástupce:

HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,  
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:

**Expresní systém a způsob exprese proteinů  
v rostlinách**

(57) Anotace:

Expresní systém pro biologicky bezpečnou expresi alespoň jednoho rekombinovaného proteinu v rostlinách, který obsahuje  
a) expresní kazetu pro produkci RNA dependentní RNA polymerázu tobamoviru, přičemž kódující oblast genu RdRp není ohraničena autentickými 5' a 3' NTR oblastmi pocházejícími ze stejného viru jako RdRp, ale NTR oblastmi z jiného viru nebo rostlinného genu;  
b) expresní kazetu pro produkci represoru genového silencingu P19 z tobamoviru; a  
c) alespoň jednu produkční kazetu pro produkci mRNA obsahující následující elementy v uvedeném pořadí; 5'NTR tobamoviru, subgenomový promotor obalového proteinu tobamoviru, alespoň jeden gen kódující rekombinantní protein, který má být v rostlině exprimován, 3'NTR tobamoviru a ribozym pro správné sestřížení mRNA na konci 3'NTR tobamoviru.  
Způsob získávání proteinů v rostlinách expresí s použitím tohoto expresního systému.

## Expresní systém a způsob exprese proteinů v rostlinách

### Oblast techniky

5

Předložený vynález se týká expresního systému, vektorů a způsobu pro biologicky bezpečnou expresi rekombinantních proteinů v rostlinách.

### 10 Dosavadní stav techniky

Expresní vektory založené na rostlinných virech se dnes velmi často používají pro expresi rekombinantních proteinů s vysokou přidanou hodnotou v rostlinách, a to jak v laboratorním měřítku, tak stále častěji i v poloprovozním či komerčním měřítku. Výhodou použití replikujících se virových vektorů je zejména vysoký výtěžek exprimovaného proteinu a poměrně vysoká rychlost, s jakou lze produkovaný protein z rostliny izolovat, která se pohybuje v řádu od několika málo dní do několika týdnů. Současné metody však mají řadu nedostatků. Mezi ně patří například nutnost infikovat rostlinu buď kompletním rekombinantním rostlinným virem, nebo pomocí virové RNA. V poslední době je populární využití binárního plazmidu vloženého do *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* se poté infiltruje do listu, kořene nebo suspenzní buněčné kultury a z přepsané RNA se iniciuje virová infekce. Výhodou použití *A. tumefaciens* pro iniciaci virové infekce je to, že lze snadno použít i viry nebo virové vektory, které netvoří kompletní virové částice. Takové vektory se v rostlině vyskytují, případně šíří, pouze jako volná RNA a nejsou tudíž snadno přenosné ani mechanicky, ani přirozeným vektorem. Tím je zajištěna biologická bezpečnost.

Replikující se virové vektory však mají i některé nevýhody, mezi které patří nestabilita vložených úseků DNA/RNA, která omezuje velikost exprimovaného genu na přibližně 1,5 kb. Dalším velkým omezením je nemožnost použít replikující se virový vektor k současné expresi více proteinů v jedné rostlinné buňce. V neposlední řadě je v některých případech i technicky náročné do binárního vektoru obsahujícího kompletní infekční cDNA rostlinného viru vložit další DNA sekvence, zajišťující expresi požadovaného rekombinantního proteinu.

### 35 Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je expresní systém pro biologicky bezpečnou expresi alespoň jednoho rekombinantního proteinu v rostlinách, který obsahuje

- 40 a) expresní kazetu produkující RNA dependentní RNA polymerázu (RdRp) tobamoviru, přičemž kódující oblast genu RdRp není ohraničena autentickými 5' a 3' NTR oblastmi pocházejícími ze stejného viru jako RdRp, ale NTR oblastmi z jiného viru nebo rostlinného genu;
- b) expresní kazetu produkující represor genového silencingu P19 z tombusviru; a
- 45 c) alespoň jednu produkční kazetu, která produkuje mRNA obsahující následující elementy v uvedeném pořadí: 5'NTR tobamoviru, subgenomový promotor obalového proteinu tobamoviru, alespoň jeden gen kódující rekombinantní protein, který má být v rostlině exprimován, 3'NTR tobamoviru a ribozym pro správné sestřížení mRNA na konci 3'NTR tobamoviru.

50

Ve výhodném provedení jsou tyto expresní a produkční kazety umístěny v T-DNA oblastech binárních vektorů schopných replikace v *E.coli* a *Agrobacterium* sp. S výhodou jsou obě konstantní expresní kazety umístěny v T-DNA jediného binárního plazmidu. Alternativně však mohou být umístěny každá v samostatném binárním plazmidu. S výhodou je ve vynálezu gen, který má být v rostlině exprimován, vložen do malého produkčního plazmidu, aniž by bylo nutné

55

zasahovat do podpůrných funkcí nutných pro dosažení vysoké míry exprese, tj do virové replikázy a supresoru genového silencingu.

5 Pro vytvoření plazmidu nesoucích expresní kazety lze použít způsob klonování založený na GoldenGate technice.

Výhodou vynálezu je, že je založen na replikačním mechanismu tobamoviru. Vynález využívá skutečnosti, že virová RnRp je schopna specificky rozeznat RNA struktury nacházející se na 5' a 3' koncích virové RNA a rozpoznanou RNA obsahující tyto struktury replikovat. Gen pro replikázu lze tedy umístit na samostatný genový konstrukt, přičemž je tento konstrukt upraven tak, aby mRNA pro RdRp polymerázu neobsahovala koncové struktury rozeznávané touto polymerázou, a současně v rostlinné buňce exprimovat další mRNA z jiného samostatného plazmidu, která na svých koncích obsahuje struktury rozpoznávané virovou RdRp a je tak zesilována aktivitou RdRp enzymu. Vzhledem k tomu, že žádný z genových konstruktů neobsahuje gen pro virový obalový protein ani strukturu RNA potřebnou pro enkapsidaci virových částic, není taková RNA schopna se v rostlině šířit systémově, ani ji není možno mechanicky přenést na jinou rostlinu.

20 S výhodou jsou jako vektory použity plazmidy schopné replikace jak v bakteriích *E.coli*, tak i v bakteriích *Agrobacterium sp* (například *A.tumefaciens* nebo *A. rhizogenes*).

Dále plazmid může obsahovat geny usnadňující selekci v bakteriích a/nebo v rostlinném hostiteli, jako jsou například geny pro rezistenci na antibiotika, herbicidy a další odborníkům známé geny.

25 Ve výhodném provedení je tobamovirem virus mozaiky tabáku (TMV). TMV je rostlinný virus s pozitivním ssRNA genomem o velikost 6,5 kb vytvářející tyčinkovité částice o délce 300 nm a průměru 18 nm.

30 S výhodou obsahuje kazeta produkující RNA dependentní RNA polymerázu (RdRp) 5' NTR sekvenci viru leptané mozaiky tabáku (TEV).

Výhodné vektory podle tohoto vynálezu umožňují výrazně snadnější klonování genových konstruktů pro expresi, protože většina genů a funkcí nezbytných pro dosažení vysoké míry exprese se nachází na konstantním pomocném plazmidu, který není nutno mezi experimenty nijakým způsobem měnit nebo upravovat. Veškeré nutné změny probíhají na menším binárním plazmidu, jehož velikost nepřesahuje 4,1 kB (bez započítání velikosti vloženého genu určeného pro expresi v rostlinách). Díky malé velikosti vektoru i odvozené RNA lze vektory podle vynálezu použít i pro expresi větších genů, než je možné s vektorem založeným na replikující se úplné virové RNA. Rovněž bylo překvapivě pozorováno, že vektory podle vynálezu umožňují 40 simultánní expresi více proteinů v téže rostlinné buňce.

45 Ve výhodném provedení vynález dále popisuje pomocný konstantní plazmid, který obsahuje dvě expresní kazety. První kazeta obsahuje gen RNA dependentní RNA polymerázy z tobamoviru, ve výhodném provedení se jedná o RdRp Viru mozaiky tabáku.

S výhodou jsou jedna nebo obě konstantní expresní kazety vloženy do plazmidu pod kontrolou vhodných regulačních sekvencí, které umožní produkci mRNA v rostlinné buňce, jako jsou například promotory CaMV35S, aktinu, ubikvitinu a NOS terminátor.

50 RdRp může s výhodou obsahovat jeden nebo více intronů, které zlepšují stabilitu plazmidu v *E.coli* a transport RdRp mRNA z jádra buňky do cytoplasmy (Marillonnet, et al. "Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants." *Nature biotechnology* 23.6 (2005): strana 718 až 723.).

Dále se předkládaný vynález týká způsobu získávání proteinů v rostlinách expresí s použitím expresního systému podle vynálezu, kdy se do rostlinné buňky vnesou:

- a) expresní kazeta produkující RNA dependentní RNA polymerázu (RdRp) tobamoviru, přičemž kódující oblast genu RdRp není ohraničena autentickými 5' a 3' NTR oblastmi pocházejícími ze stejného viru jako RdRp, ale NTR oblastmi z jiného viru nebo rostlinného genu;
  - b) expresní kazeta produkující represor genového silencingu P19 z tombusviru; a
  - c) alespoň jedna produkční kazeta, která produkuje mRNA obsahující následující elementy v uvedeném pořadí: 5'NTR tobamoviru, subgenomový promotor obalového proteinu tobamoviru, alespoň jeden gen kódující rekombinantní protein, který má být v rostlině exprimován, 3'NTR tobamoviru a ribozym pro správné sestřížení mRNA na konci 3'NTR tobamoviru.
- Expresní a produkční kazety lze do rostliny vnést libovolným známým způsobem, například infekcí *in-vitro* transkribovanou RNA, mechanicky pomocí plazmidové DNA nebo virovými částicemi, biolisticky nebo agroinfiltrací.

Pokud je použita agroinfiltrace, je výhodné vybrat takové rostliny, ve kterých je dosahováno vysoké účinnosti agroinfiltrace, například rostliny *Nicotiana benthamiana*.

V infiltrovaných rostlinách dochází k replikaci pouze RNA odpovídající variabilnímu produkčnímu genovému konstrukt, ve kterém není žádný gen pro obalový protein ani signál pro enkapsidaci RNA. Tyto sekvence neobsahují ani pomocný konstantní genový konstrukt. RNA tudíž není schopna se v těchto rostlinách systémově šířit a je rovněž zabráněno jejímu přenosu mechanicky nebo přirozeným vektorem například hmyzem v případě současné neúmyslné infekce kompletním virem divokého typu.

Po expresi proteinu se vytvořené rekombinantní proteiny mohou získat z rostliny například extrakcí.

Vynález je dále popsán s pomocí připojených příkladů, které však nijak neomezují nárokovaný rozsah.

35

#### Objasnění výkresů

Obrázek 1: Na obrázku je schematicky znázorněna struktura genomu viru tabákové mozaiky, typového zástupce rodu Tobamovirus. Genom sestává z těchto částí: 5' nepřekládané oblasti (5'NTR), genu pro RNA dependentní RNA polymerázu (126/183 kDa protein), která se translatuje ve dvou formách pomocí suprese stop-kodónu, genu pro virový movement protein (MP), genu pro obalový protein viru (CP) a 3' nepřekládané oblasti (3'NTR). Virová RNA má strukturu čepičky na 5' konci a neobsahuje poly-A 3'-konec. Na obrázku jsou znázorněny subgenomové promotory MP a CP.

45

Obrázek 2: Na obrázku jsou schematicky znázorněny dva plazmidy pro expresi proteinů v rostlinách podle vynálezu. Konstantní plazmid obsahuje expresní kazetu produkující RNA dependentní RNA polymerázu (RdRp) tobamoviru pod silným promotorem. ORF pro RdRp není ohraničena NTR oblastmi z tobamoviru, ale obsahuje heterologní 5' a 3' NTR oblasti. Druhá expresní kazeta produkuje represor genového silencingu P19 z tombusviru. Druhý variabilní produkční plazmid obsahuje expresní kazetu produkující mRNA zahrnující tyto části: 5'NTR tobamoviru, subgenomový promotor obalového proteinu tobamoviru, protein kódující oblast genu, který má být v rostlině exprimován (GOI), 3'NTR tobamoviru a ribozym.

50

Obrázek 3: Na obrázku je znázorněna mapa binárního plazmidu pro expresi RdRp tobamoviru v rostlinách pDB1a1:35S–Rep. Plazmid obsahuje silný promotor 35S z Viru mozaiky kvěťáku (CaMV), 5'–zesilovač translace z viru leptané mozaiky tabáku, gen pro RdRp z Viru mozaiky tabáku ve, kterém je vložen intron z kyselého peroxidázy tabáku a Nos terminátor transkripce.

5 Vektor nese kanamycinový rezistenční marker pro selekci v *E.coli* a *A. tumefaciens* a replikační počátky pro oba tyto mikroorganismy.

Obrázek 4: Na obrázku je znázorněna mapa konstantního pomocného binárního vektoru pDB1021:Rep–P19. Kromě expresní kazety pro expresi RdRp tobamoviru, která je identická s tou ve vektoru pDB1a1:35S–Rep znázorněném na obrázku 3, ještě dále obsahuje kazetu pro expresi supresoru genového silencingu P19 z tomboviru. Tato kazeta obsahuje promotor 35S z CaMV, gen supresoru P19 a Nos terminátor.

10

Obrázek 5: Na obrázku je znázorněna mapa variabilního produkčního plazmidu pDB1a1:VV–GFP, ve kterém je expresní kazeta pro expresi zeleného fluorescenčního proteinu. Plazmid obsahuje tyto funkční části promotor 35S z Viru mozaiky kvěťáku, 5' NTR oblast z viru mozaiky tabáku (TMV), subgenomový promotor obalového proteinu TMV, gen pro zelený fluorescenční protein, 3' NTR oblast TMV, ribozym umožňující roztěpení vznikající mRNA v místě konce 3'NTR TMV a Nos terminátor. Vektor nese kanamycinový rezistenční marker pro selekci v *E.coli* a *A. tumefaciens* a replikační počátky pro oba tyto mikroorganismy.

15

20

#### Příklady uskutečnění vynálezu

##### 25 Příklad 1: Příprava konstantního binárního plazmidu

Konstantní binární plazmid se připraví za pomoci postupů rekombinantní DNA, které jsou odborníkům dobře známy z oblastí techniky. Vektor má podobu plazmidu obsahujícího cDNA kopii RdRp rostlinného viru zrodu Tobamovirus. Ve výhodném provedení obsahuje produkční plazmid cDNA kopii RdRp viru tabákové mozaiky TMV. Pro použití dle vynálezu je důležité, že kódující oblast genu RdRp není ohraničena autentickými 5' a 3' NTR oblastmi pocházejícími ze stejného viru jako RdRp, ale NTR oblastmi z jiného viru nebo rostlinného genu. Dále tento plazmid obsahuje druhou expresní kazetu, produkující supresor genového silencingu P19 z Tombusviru. Obě genové kazety jsou pod transkripční kontrolou vhodných regulačních sekvencí, jako jsou například promotory CaMV35S, aktinu, ubikvitinu, a terminátory transkripce jako je Nos terminátor pocházející z *A. tumefaciens* a podobně. Tyto dvě expresní kazety mohou být výhodně umístěny v T–DNA stejného plazmidu, nebo mohou být do rostlinné buňky dopraveny na dvou izolovaných plazmidech. Plazmidy jsou schopny replikace jak v bakteriích *E.coli*, tak i v bakteriích *Agrobacterium sp* (například *A. tumefaciens* nebo *A. rhizogenes*). Dále takový plazmid může obsahovat geny usnadňující selekci v bakteriích a/nebo v rostlinném hostiteli, jako jsou například geny pro rezistenci na antibiotika či herbicidy.

30

35

40

V tomto příkladu byl jako výchozí vektor použit plazmid pGR2i–dCP:GFP, GenBank: KF981446.1. V tomto plazmidu je vložena infekční cDNA kopie TMV pod kontrolou CaMV35S promotoru a na 3' konci virové cDNA se nachází ribozym a transkripční terminátor NOS. V genu pro replikázu je vložen intron z kyselého peroxidázy tabáku, který zvýší stabilitu genu v *E.coli* a usnadní translokaci mRNA z jádra do cytoplazmy rostlinné buňky. Celá tato kazeta je umístěna na T–DNA, pro selekci v bakteriích lze použít antibiotikum kanamycin. Gen pro RdRp TMV byl z plazmidu amplifikován pomocí primerů

45

50

RdRp1F: GCGCCGTCTCGCTCGAATGATGGCATAACACACAGACAGC

RdRp1R: GCGCCGTCTCGCTCGAAGCTTAACAACACTAGAGCCGTCTATAAA

55 K amplifikaci bylo použito Phusion Taq Polymerázy, (Thermo) a následujícího programu:

	počáteční denaturace	98 °C	30 vteřin
	30 cyklů	98 °C	15 vteřin
		60 °C	15 vteřin
5		72 °C	2,5 minuty

Amplifikaci vzniká PCR produkt o velikosti 4,9 kb, který se přečistí pomocí kolonky QIAquick PCR cleanup (Qiagen) a restriktivně ligační reakcí se vloží do domestikačního plazmidu pUPD1 (viz Sarrion-Perdigones, et al. "GoldenBraid 2.0: A Comprehensive DNA Assembly Framework for Plant Synthetic Biology", Plant Physiology (2013)). Do reakce se vloží 75 ng PCR produktu, 75 ng plazmidu pUPD1, 1 µl 10 x ligačního pufru Promega, 1 µl T4 ligázy Promega, 1 µl enzymu BsmBI (LifeTechnologies) a voda do 10 µl. Reakce se nechá probíhat 25 cyklů při následujícím programu.

	25 cyklů	37 °C	2 minuty
15		16 °C	5 minut

Po ukončení cyklování se přidají následující kroky:

		37 °C	5 minut
20		65 °C	15 minut

Vzniklý rekombinantní plazmid se transformuje do kompetentních buněk *E.coli* TOP10 a vyseje na LB plotny s obsahem 100 µg/ml karbenicilinu a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosidu (X-gal). Po 18 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C se vyberou bílé kolonie a použijí pro izolaci plazmidové DNA, správné rekombinantní klony se ověří restriktivním štěpením a sekvenací.

Celá expresní kazeta se poté spojí do binárního vektoru pDB1a1f (Sarrion-Perdigones et al. (2013)) spolu s promotorem CaMV35S a NOS terminátorem pomocí restriktivně ligační reakce a enzymu

BsaI. Stručně do 0,2 ml mikrozkušavky se vloží 75 ng každého z plazmidu, 1 µl 10 x ligačního pufru Promega, 1 µl T4 ligázy Promega, 1 µl enzymu BsaI (LifeTechnologies) a voda do 10 µl. Reakce se nechá probíhat 25 cyklů při následujícím programu.

35	25 cyklů	37 °C	2 minuty
		16 °C	5 minut

Po ukončení cyklování přidají následující kroky

40		37 °C	5 minut
		65 °C	15 minut

Vzniklý rekombinantní plazmid se transformuje do kompetentních buněk *E.coli* TOP 10 a vyseje na LB plotny s obsahem 100 µg/ml kanamycinu a 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosidu (X-gal). Po 18 hodinové inkubaci při teplotě 37 °C se vyberou bílé kolonie a použijí pro izolaci plazmidové DNA, správné rekombinantní klony se ověří restriktivním štěpením a sekvenací. Mapa výsledného plazmidu nazvaného pDB1a1: 35S-Rep je znázorněna na obrázku 3. Kazeta pro expresi supresoru genového silencingu P19 tombusviru se připraví podobným způsobem za vzniku plazmidu nazvaného nazvaný pDB1a2: 35S-P19, nebo lze použít již připravenou kazetu (GB0108, databáze <https://gbcloining.upv.es/>). Vzniklé plasmidy lze zkombinovat pomocí restriktivně-ligační reakce s enzymem BsmBI do jednoho vektoru nazvaného pDB102:Rep-P19, který je znázorněn na obrázku 4.

## Příklad 2: Příprava variabilního binárního expresního vektoru pro expresi GFP

Podobným způsobem jako při přípravě konstantního binárního expresního vektoru se bude postupovat i při přípravě variabilní části. Nejprve je třeba z vektoru pGR2idCP–GFP, GenBank: KF981446.1, PCR amplifikací získat a) oblast promoru a 5'NTR viru mozaiky tabáku a b) oblast 3'NTR, ribozymu a Nos–Terminátoru. K tomu se použijí následující primery:

GB2–35S–F: GCGCCGTCTCGCTCGGGAGACACGCTTGTCTACTCCAAAA

10 GB2–OmegaR GCGCCGTCTCGCTCGCATTGGTGATGTAATTGTAAATAGTAATTG

Vzniká amplikon o velikosti 507 bp

a s primery

15

GB2–3'NTR–F: GCGCCGTCTCGCTCGGCTTTGACCTCTGGTCCTGCAACT

GB2–NOS–R: GCGCCGTCTCGCTCGAGCGATCAGGCGCCATTCGCCATT

20 vzniká amplikon o velikosti 890 bp. PCR produkty se přečistí na kolonce a restriktivně ligační reakcí s enzymem BsmBI se stejným způsobem jako v příkladu 1 vloží do výchozího plazmidu pUPD1 za vzniku plazmidů, pUPD1:35S–5'NTR a pUPD1:3'NTR–NosT. Správné rekombinantní plazmidy se ověří restriktivním štěpením a sekvenací. Variabilní expresní kazeta pro použití v rostlinách se poté složí restriktivně ligační reakcí s enzymem BsaI. Do 0,2 ml mikrozkušavky se vlož

25 vloží 75 ng každého z plazmidu (pDB1a2, pUPD1:35S–5'NTR, pUPD1:3'NTR–NosT a pUPD1:GFP (GB0059), 1 µl 10 x ligačního pufru Promega, 1 µl T4 ligázy Promega, 1 µl enzymu BsaI (LifeTechnologies) a voda do 10 µl. Reakce se nechá probíhat 25 cyklů při následujícím programu.

30	25 cyklů	37 °C	2 minuty
		16 °C	5 minut

Po ukončení cyklování přidají následující kroky

35		37 °C	5 minut
		65 °C	15 minut

40 Bakterie se poté selektují na LB plotnách s kanamycinem a X–gal, správné rekombinantní klony se ověří restriktivním štěpením a sekvenací. Mapa výsledného plazmidu nazvaného pDB1a1:W–GFP je na obrázku 5.

Příklad 3: Transientní exprese modelového proteinu GFP v rostlinách *N. benthamiana*

45 Ověřenými rekombinantními plazmidy podle Příkladů 1 a 2 se transformují kompetentní buňky *A. tumefaciens* kmene GV3101 způsobem podle Hofgena a Willimitzera (Hofgen, R. & Willimitzer, L. (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic acids research* 16, 9877).

50 Z izolovaných kanamycin–rezistentních kolonií se připraví zásobní glycerinové kultury, které se uchovávají při –78 °C. 5 ml LB media se selektivním antibiotikem se naočkuje *A. tumefaciens* ze zásobní kultury nesoucí produkční variabilní plazmid a současně se další 5 ml LB média naočkuje *A. tumefaciens* s pomocným konstantním plazmidem. Kultury se inkubují na třepačce při 28 °C po dobu 36 hodin. Poté se použité médium odstraní centrifugací 10 minut při 5000x g a bakteriální peleta se resuspenduje v infiltračním médiu (10mM MgCl<sub>2</sub>; 10mM MES a 100µM acetosyringon, (viz Bazzini, A. A., Mongelli, V. C, Hopp, H. E., del Vas, M. & Asurmendi, S.

(2007), A practical approach to the understanding and teaching of RNA silencing in plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 10, 179–190) tak, aby byla výsledná optická hustota  $OD_{600}=0,3$ . Bakteriální suspenze se ponechají stát další 2 až 4 hodiny při pokojové teplotě. Vlastní infiltrace se provádí aplikací bakteriální suspenze pomocí 1 ml injekční stříkačky bez jehly na spodní stranu listů asi 3–4 týdny starých rostlin *N. benthamiana*. Průběh infekce lze sledovat pozorováním šíření GFP v infikovaných rostlinách pomocí přenosné UV–lampy a žlutého filtru. Množství produkovaného rekombinantního proteinu lze měřit nějakým vhodným způsobem dobře známým odborníkům v oboru, například testem ELISA, imunoblotem nebo v případě GFP přímým měřením fluorescence pomocí fluorometru. V tabulce 1 jsou uvedeny výsledky experimentu, při kterém byly rostliny inokulovány nejprve každým z virových vektorů samostatně a poté i jejich kombinací. Pouze v případě, kdy se v rostlinné buňce exprimují současně virová replikáza, P19 supresor genového silencingu a variabilní expresní kazeta ohraničená NTR oblastmi tobamoviru dochází k silné expresi genu GFP.

15 Tabulka 1 : Hodnoty fluorescence rostlinných extraktů z příkladu 3

Agrobacterium použité pro infiltraci	Fluorescence GFP (RFI) $\pm$ SEM (460/10 nm exc, 530/20 em)
žádné	2532 $\pm$ 650
prázdný vektor	4523 $\pm$ 721
pDB1O2: 35S-Rep; 35S-P19	4361 $\pm$ 675
pDB1a1:VV-GFP	12326 $\pm$ 1020
pDB1O2: 35S-Rep; 35S-P19 +pDB1a1:VV-GFP	41550 $\pm$ 2530

Příklad 4: Současná transientní exprese dvou proteinů v rostlinách *N. benthamiana*

20 Pro ověření simultánní exprese dvou virových vektorů v téže buňce lze využít současnou exprese dvou fluorescenčních proteinů s různými emisními charakteristikami. Lze například současně použít gen pro zelený fluorescenční protein (excitace 480 nm, emise 525 nm) a gen pro protein mCherry (excitace 587 nm, emise 610 nm). Postupem obdobným tomu, který byl popsán v příkladu 2 byl vytvořen variabilní binární expresní vektor pDB1a1:VV–mCherry. Sekvenací ověřený plazmid se použije pro transformaci *A. tumefaciens* GV3101. V tomto příkladu se listy rostlin *N. benthamiana* infiltrují současně třemi kulturami *A. tumefaciens* – první kultura nese pomocný konstantní konstrukt pDB1O2: 35S–Rep:P19 s kazetami pro RdRp a pro supresorem P19, druhá nese variabilní expresní plazmid pDB1a1:VV–GFP a třetí pak pDB1a1:VV–mCherry. 5 dní po infiltraci byly z infiltrovaných listů připraveny protoplasty, postupem popsáním v práci Giritch et al. "Rapid high–yield expression of full–size IgG antibodies in plants coinfecting with noncompeting viral vectors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.40 (2006): 14701–14706. Listy byly žiletkou nařezány na cca 1 mm silné proužky a poté byly přes noc macerovány v 0,4% roztoku celulózy Onozuka R–10 a 0,4% macerozomu R–10 (obojí Duchefa). Uvolněné protoplasty byly přefiltrovány přes jemnou nylonovou tkaninu a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem (Leica) vybaveným příslušnými filtry. V buňkách z listů infiltrovaných všemi třemi konstrukty byl pozorován signál obou fluorescenčních proteinů.



## Příklad 5: Mechanický přenos vektoru podle vynálezu

Pro biologickou bezpečnost vektorů založených na rostlinných virech je důležitá jejich schopnost se šířit i mimo rostliny určené k expresi rekombinantního proteinu. Je výhodné, pokud je schopnost těchto vektorů šířit se mimo požadovanou rostlinu snížena, nebo je jí zcela zamezeno, a to i v případě, že dojde ke kontaminaci experimentálních rostlin příbuzným virem divokého typu.

Rostliny *N. benthamiana* byly ko-infiltrovány *A. tumefaciens* s těmito vektory pDB102: 35S-Rep:35S-P19 a pDB1a1:W-GFP stejným způsobem jako v příkladu 3.

5 dní po infiltraci byla pozorována GFP fluorescence v inokulovaných listech. Listy byly poté mechanicky inokulovány 20 µl virové suspenze, která obsahovala 10 µg/ml viru tabákové mozaiky divokého typu (wt TMV) v 20mM fosfátovém pufru, pH 7,5. Po dalších 4 dnech byly na listech jasně patrné příznaky virové infekce, žloutnutí listů, počínající nekrózy vodivých pletiv, sklánění růstového vrcholu. Sektory vykazující GFP fluorescenci byly z listu vyříznuty korkovrtem a homogenizovány v 20mM fosfátovém pufru, pH 7,5. Zbytky rostlinných pletiv byly odstraněny centrifugací a čirý extrakt byl použit jako inokulum (v ředění 1/100) pro mechanický přenos na listy *N. benthamiana*. Tři dny po sekundárním přenosu byly listy pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem a byly hledány buňky vykazující GFP fluorescenci. Jako druhá nezávislá metoda pro určení potenciálu neúmyslného šíření virového vektoru byla použita qPCR. Čirý extrakt z infikovaných listů byl ponechán při pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Během této doby je většina cytoplasmatických mRNA částečně nebo zcela degradována. RNA, která je skrytá uvnitř virových částic však zůstane nedotčena. Po dvou hodinách byla z extraktu pomocí činidla RNazol (MRC, Ohio, USA) izolována RNA postupem doporučeným výrobcem. Pro syntézu cDNA byl použit primer 3NTR-TMV, který je komplementární jak k virové RNA, tak i k RNA odvozené od virového vektoru pDB1a1:VV-GFP. Přepsaná cDNA byla ředěna 1:20 a poté analyzována pomocí qPCR na přístroji Light Cycler 2.0 (Roche) s použitím kitu DyNAmo™ Capillary SYBR® Green qPCR Kit (Thermo) dle doporučení výrobce. Zatímco detekce obalového proteinu (CP-TMV), který se vyskytuje pouze genomové RNA wt viru byla úspěšná již v 19 cyklu +/- 1 cyklus, detekce pomocí primerů specifických pro GFP byla na úrovni pozadí (*N. benthamiana* infikovaná pouze virem wt TMV, bez vektoru pDB1a1:W-GFP) tj. 33. cyklus +/- 2 cykly. Oba nezávislé způsoby naznačují, že RNA odvozená od variabilního produkčního plazmidu podle vynálezu není účinně chráněna obalovým proteinem viru ve virových částicích, což významným způsobem snižuje riziko jejího náhodného přenosu na necílovou rostlinu.

Tabulka 2: Primery použité pro qPCR detekci GFP/CP-TMV ve virových částicích

Název	Sekvence
3NTR-TMV	gcaccacgtgtgattacggacacaatc
qGFP-S	TTTCTGTCAGTGGAGAGGGT
qGFP-AS	CGTGTCTTGTAGTTCCCGTC
qCPTMV-S	CACTACTCCATCTCAGTTCGT
qCPTMV-AS	AACAGTTACTTGTGGTGAAGG

40

45

## PATENTOVÉ NÁROKY

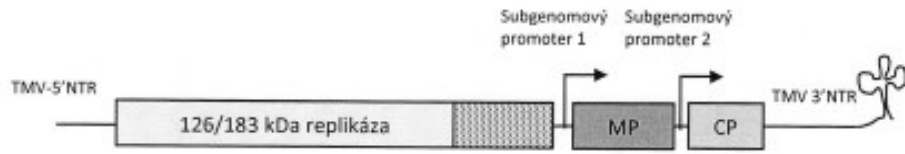
- 5 1. Expresní systém pro biologicky bezpečnou expresi alespoň jednoho rekombinantního proteinu v rostlinách, **vyznačený tím**, že obsahuje
- 10 a) expresní kazetu pro produkci RNA dependentní RNA polymerázu tobamoviru, přičemž kódující oblast genu RdRp není ohraničena autentickými 5' a 3' NTR oblastmi pocházejícími ze stejného viru jako RdRp, ale NTR oblastmi z jiného viru nebo rostlinného genu;
- 15 b) expresní kazetu pro produkci represoru genového silencingu P19 z tombusviru; a
- c) alespoň jednu produkční kazetu pro produkci mRNA obsahující následující elementy v uvedeném pořadí: 5'NTR tobamoviru, subgenomový promotor obalového proteinu tobamoviru, alespoň jeden gen kódující rekombinantní protein, který má být v rostlině exprimován, 3'NTR tobamoviru a ribozym pro správné sestřížení mRNA na konci 3'NTR tobamoviru.
- 20 2. Expresní systém podle nároku 1, **vyznačený tím**, že obsahuje plazmidy nesoucí expresní a/nebo produkční kazety podle nároku 1, přičemž expresní a/nebo produkční kazety jsou umístěny v T-DNA oblastech binárních vektorů.
3. Expresní systém podle nároku 2, **vyznačený tím**, že obě expresní kazety jsou umístěny v T-DNA jediného binárního plazmidu a produkční kazeta je umístěna v T-DNA dalšího plazmidu.
- 25 4. Expresní systém podle nároku 2 nebo 3, **vyznačený tím**, že plazmidy obsahují geny pro selekci v bakteriích a/nebo v rostlinném hostiteli, s výhodou vybrané z genů pro rezistenci na antibiotika a herbicidy.
5. Expresní systém podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že tobamovirem je virus mozaiky tabáku, a s výhodou obsahuje kazeta pro produkci RNA dependentní RNA polymerázy 5' NTR sekvenci viru leptané mozaiky tabáku.
- 30 6. Expresní systém podle kteréhokoliv z nároků 2 až 5, **vyznačený tím**, že jedna nebo obě expresní kazety jsou umístěny v plazmidu pod kontrolou regulačních sekvencí vybraných z promotorů CaMV35S, aktinu, ubikvitinu a NOS terminátoru.
- 35 7. Expresní systém podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že kazeta pro produkci RNA dependentní RNA polymerázy obsahuje jeden nebo více intronů zlepšujících stabilitu plazmidu v *E.coli* a transport RdRp mRNA z jádra buňky do cytoplasmy.
- 40 8. Způsob získávání proteinů v rostlinách expresí s použitím expresního systému podle kteréhokoliv z předcházejících nároků, **vyznačený tím**, že se do rostlinné buňky vnesou:
- 45 a) expresní kazeta produkující RNA dependentní RNA polymerázu (RdRp) tobamoviru, přičemž kódující oblast genu RdRp není ohraničena autentickými 5' a 3' NTR oblastmi pocházejícími ze stejného viru jako RdRp, ale NTR oblastmi z jiného viru nebo rostlinného genu;
- b) expresní kazeta produkující represor genového silencingu P19 z tombusviru; a
- 50 c) alespoň jedna produkční kazeta, která produkuje mRNA obsahující následující elementy v uvedeném pořadí: 5' NTR tobamoviru, subgenomový promotor obalového proteinu tobamoviru, alespoň jeden gen kódující rekombinantní protein, který má být v rostlině exprimován, 3'NTR tobamoviru a ribozym pro správné sestřížení mRNA na konci 3'NTR tobamoviru.

9. Způsob podle nároku 8, **vyznačený tím**, že se kazety vnesou do rostlinné buňky metodou vybranou z infekce *in-vitro* transkribovanou RNA, mechanicky pomocí plazmidové DNA nebo virovými částicemi, biolisticky nebo agroinfiltrace.
- 5 10. Způsob podle nároku 8 nebo 9, **vyznačený tím**, že rostlinami jsou rostliny *Nicotiana benthamiana*.

4 výkresy

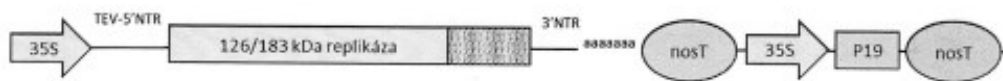
**Genomová RNA viru TMV**

6,5 kb ssRNA+

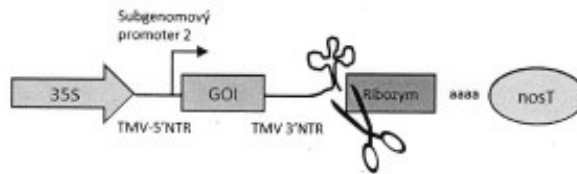


Obr. 1

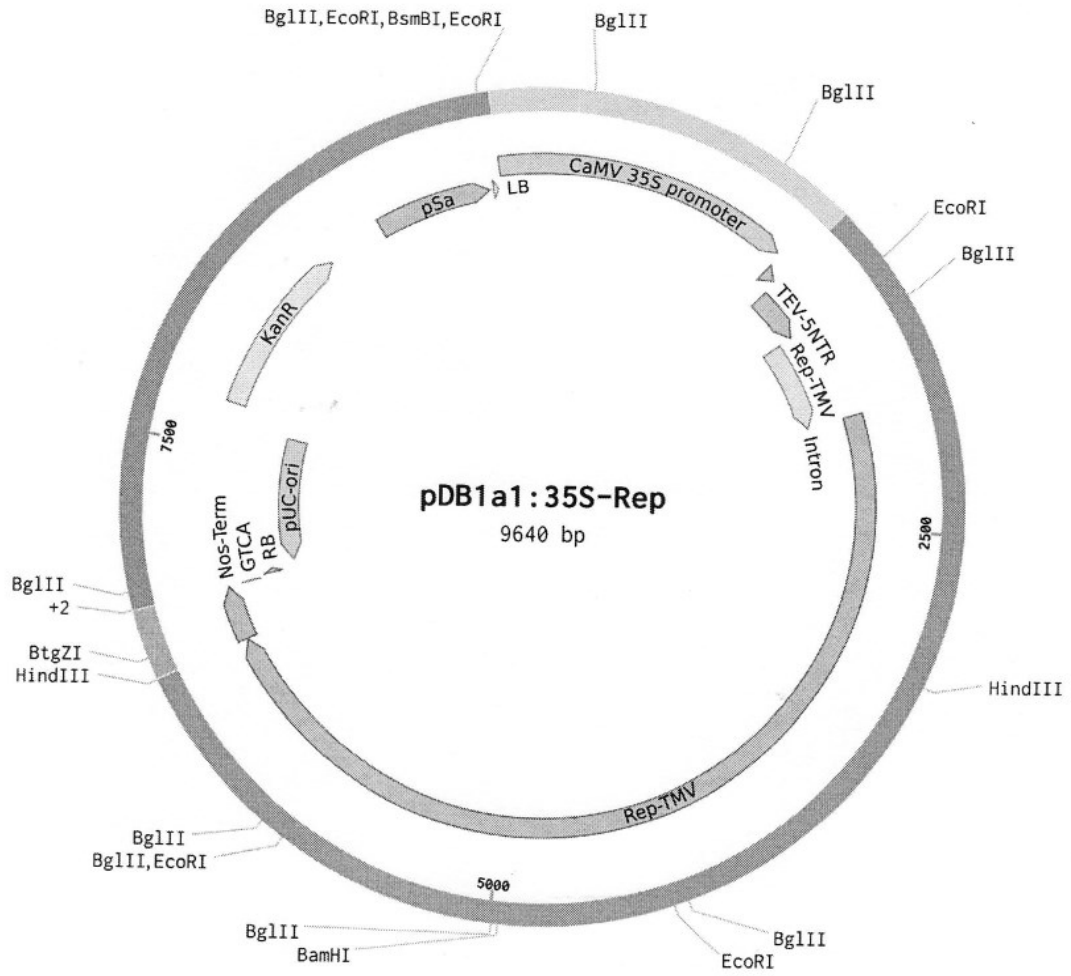
**Konstatní pomocný plazmid**



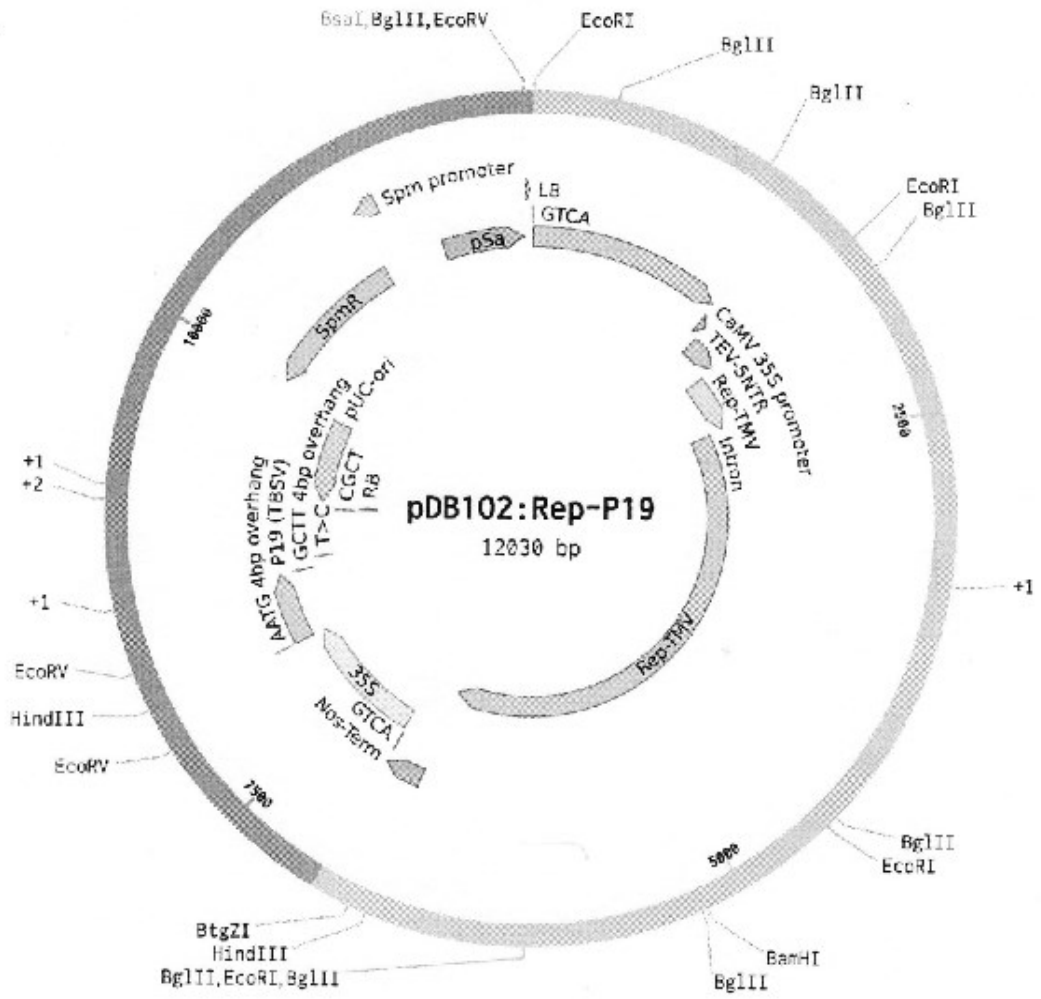
**Variabilní produkční plazmid**



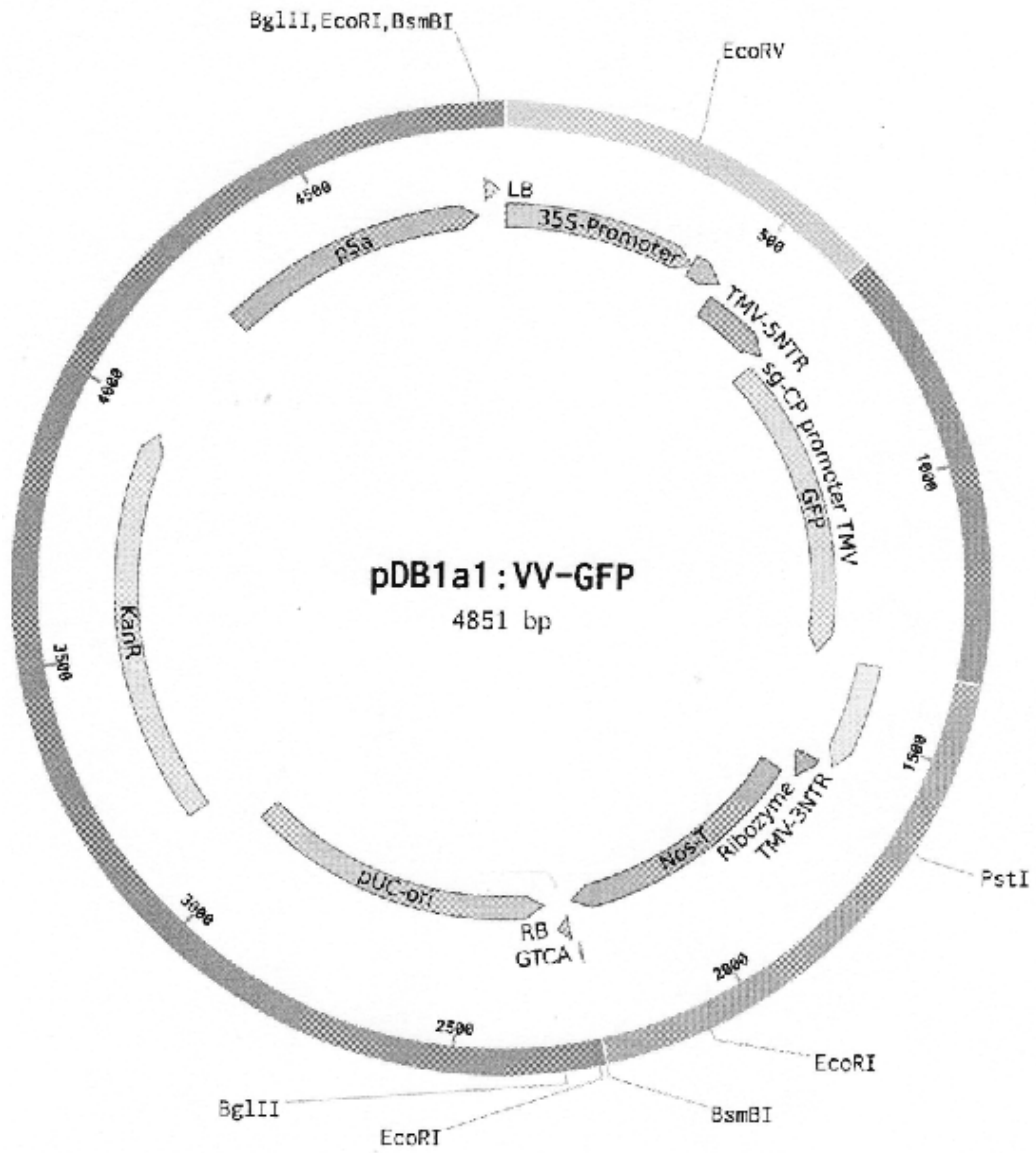
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5