

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Príprava a testovanie konštruktov na expresiu rekombinantného katelicidínu v endosperme jačmeňa

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Veronika Kábrtová
Študijný program:	B1406 Biochemie
Študijný odbor:	Biochemie
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok:	2018

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

V Olomouci dňa 10. 5. 2018

.....

Týmto by som chcela veľmi pekne poďakovať RNDr. Ondřejovi Plíhalovi, Ph.D. za veľkú ochotu, cenné rady, informácie a odbornú pomoc ako v laboratóriu, tak aj pri spisovaní samotnej bakalárskej práce. Okrem toho by som chcela poďakovať Mgr. Davidovi Zalabákovi, Ph.D. za cenné rady a pripomienky pri laboratórnej práci.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Veronika Kábrtová
Názov práce	Príprava a testovanie konštruktov na expresiu rekombinantného katelicidínu v endosperme jačmeňa
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Oddelenie molekulárnej biológie
Vedúci práce	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Antimikrobiálne peptidy sú látky, ktoré sú súčasťou prirodzenej imunity a slúžia ako obrana organizmu proti infekciám, spôsobených patogénnymi mikroorganizmami. Medzi tieto látky patrí aj ľudský katelicidín LL-37, ktorý účinkuje ako proti gram-pozitívnym, tak aj proti gram-negatívnym baktériám.

Molekulárne farmárčenie je v súčasnosti zamerané predovšetkým na produkciu veľkého množstva farmaceutických látok, ako sú protilátky a vakcíny, ktoré využívajú rastliny ako produkčné platformy. K týmto platformám patrí aj jačmeň alebo tabak, ktoré svojimi výhodami vynikajú v niektorých prípadoch nad už zavedenými bakteriálnymi produkčnými systémami.

Cieľom tejto práce bola príprava konštruktov obsahujúcich ľudský katelicidín LL-37, spoločne s vybranými proteínovými značkami pre stabilizáciu a purifikáciu fúzneho proteínu. DNA inzerty boli najprv vklonované do binárneho vektora pMDC32 a následne zatransformované do baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, pre tranzientnú expresiu v listoch tabaku. Listy boli následne zhomogenizované a vyhodnocované pomocou metódy Western blot.

Kľúčová slová	jačmeň, transformácia, katelicidín, tabak, γ -zein, DAMP4, LEB4
Počet strán	53
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Veronika Kábrtová
Title	Preparation and testing of constructs for expression of recombinant cathelicidin in the barley endosperm
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of molecular biology
Supervisor	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Antimicrobial peptides are part of natural immunity of many species and protect the organism against infections caused by pathogenic microorganisms. One of these is human cathelicidin LL-37, which targets both gram-positive and gram-negative bacteria.

Nowadays, molecular farming is oriented on the production of a large number of pharmaceutical agents, such as antibodies and vaccines. Plants are becoming more and more popular choice for a cheap and highly efficient production platform, and several plant species, such as barley or tobacco, already proved to be more advantageous in large-scale productions of some compounds compared to established bacterial production systems.

The aim of this work was to prepare expression constructs for human cathelicidin LL-37 fused with protein stabilization and protein purification tags. The inserts were first cloned into the plant binary vector pMDC32 and subsequently transformed into the bacterium *Agrobacterium tumefaciens* for transient expression in tobacco leaves. The leaves were then homogenized and evaluated by means of Western blotting.

Keywords	barley, transformation, cathelicidin, tobacco, γ -zein, DAMP4, LEB4
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Súčasný stav riešenej problematiky	10
2.1	Antimikrobiálne peptidy.....	10
2.1.1	Katelicidíny	11
2.2	Molekulárne farmárčenie.....	13
2.2.1	Semená a ich skladovacie pletivá.....	14
2.2.2	Smerovanie proteínov do skladovacích organel	15
2.2.3	Proteínové telieska a vakuoly skladujúce proteíny u obilnín.....	15
2.2.4	Jačmeň ako produkčná platforma.....	17
2.2.5	Tabak ako produkčná platforma	18
2.2.5.1	Tranzientný typ transformácie tabaku	19
2.2.6	Transformácia rastlín pomocou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
2.3	Návrh konštruktov pre heterológnu proteínovú expresiu v rastlinách	21
2.3.1	Promótory.....	21
2.3.2	HDEL/KDEL ako signálne sekvencie	21
2.3.3	Zein ako stabilizačná značka.....	22
2.3.4	DAMP4 ako purifikačná značka	23
2.3.5	Odstránenie afinitných značiek z rekombinantného produktu.....	24
3	Experimentálna časť.....	26
3.1	Materiál	26
3.1.1	Chemikálie	26
3.1.2	DNA plazmidy	27
3.1.3	Biologický materiál.....	27
3.1.4	Primery	27
3.1.5	Konštrukty.....	28
3.1.6	Restrikčné endonukleázy	29
3.1.7	Rastové médiá	29
3.1.8	Komerčné sústavy a kity	29
3.1.9	Prístroje	29
3.2	Metódy.....	30
3.2.1	Klonovanie	30
3.2.1.1	Polymerázová reťazová reakcia (PCR).....	32
3.2.1.2	Colony PCR	32
3.2.1.3	Gélová elektroforéza.....	33

3.2.1.4	Restriktcia	34
3.2.1.5	Purifikácia DNA	34
3.2.1.6	Ligácia	35
3.2.1.7	LR reakcia.....	35
3.2.1.8	Transformácia metódou heatshock	35
3.2.1.9	Transformácia metódou elektroporácie	36
3.2.1.10	Izolácia plazmidov	36
3.2.1.11	Sekvenácia	37
3.2.2	Transformácia listov tabaku baktériou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
3.2.3	SDS-PAGE elektroforéza.....	37
3.2.4	Western blot	37
4	Výsledky	39
4.1	Príprava a overenie DNA materiálu	39
4.2	Ligácia GFP-ctrl a GFP–LeB4 do vektora pENTR2B Dual	40
4.3	LR reakcia do cieľového vektora pMDC32	41
4.4	Transformácia do baktérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
4.5	Transformácia tabakových listov a Western blotting.....	43
5	Diskusia.....	45
6	Záver	47
7	Literatúra	48

Ciele bakalárskej práce:

- 1) Vypracovanie literárnej rešerše na tému antimikrobiálne peptidy a využitie rastlín ako produkčnej platformy pre prípravu rekombinantných proteínov.
- 2) Klonovanie konštruktov pre expresiu ľudského katelicidínu LL-37 v rastlinách.
- 3) Testovanie pripravených konštruktov pomocou tranzientnej expzie v listoch tabaku.
- 4) Spracovanie výsledkov a spísanie experimentálnej časti bakalárskej práce.

1 Úvod

Antimikrobiálne peptidy sú látky patriace k vrodenej imunite, ktorá chráni viacbunkové organizmy pred infekciami spôsobenými patogénnymi mikroorganizmami. Zároveň sú tieto peptidy schopné bojovať proti baktériám, ktoré si už stihli vyvinúť rezistenciu proti tradičným antibiotikám. Jedným z týchto peptidov je aj ľudský katelicidín LL-37. Účinkuje proti gram-pozitívnym aj gram-negatívnym baktériám a indukujú ho zápalové a infekčné podnety.

Molekulárne farmárčenie je metódou, v ktorej sú cudzorodé gény integrované do rastlinných platforiem, ako je napríklad tabak alebo jačmeň. Tieto cudzorodé gény kódujú rekombinantné proteíny, ktoré môžeme následne extrahovať a používať ich v čistej forme. Metóda molekulárneho farmárčenia má obrovský význam hlavne pre farmaceutický priemysel, vďaka jej schopnosti vyprodukovať veľké množstvo farmaceutických látok, ako sú napríklad vakcíny alebo protilátky.

V teoretickej časti tejto bakalárskej práce popisujem antimikrobiálne peptidy a molekulárne farmárčenie zamerané hlavne na jačmeň a tabak, ako produkčné platformy vhodné pre transformáciu pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens*. V experimentálnej časti sa zaoberám prípravou a testovaním dvoch typov stratégií navrhnutých pre transformáciu jačmeňa. Najprv som dva konštrukty obsahujúce ľudský katelicidín LL-37 vklonovala do binárneho vektora pMDC32 pod kontrolou silného konštitutívneho promotora 35S – tieto konštrukty boli určené pre tranzientnú expresiu v listoch tabaku. Zároveň som pracovala so sekvenciou GFP predĺženou o signálny peptid legumínu B4, ktorú som najprv vložila do vektora pENTR 2B a následne do cieľového vektora pMDC32. Takto pripravené konštrukty boli vložené do baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, pomocou ktorej boli následne transformované listy *Nicotiana benthamiana*. Listy boli na záver zhomogenizované a expresia našich konštruktov overená v hrubých proteínových extraktoch pomocou metódy SDS-PAGE a Western blotu.

2 Súčasný stav riešenej problematiky

2.1 Antimikrobiálne peptidy

Viacbunkové organizmy sú trvalo vystavené tisícim potenciálnym patogénnym mikroorganizmom. Prirodzená imunita patrí medzi prvú líniu obrany proti infekciám týmito mikroorganizmami. Dôležitou súčasťou vrodenej imunity je skupina peptidov s antimikrobiálnou aktivitou.

Vzhľadom na rastúcu odolnosť baktérií a húb na bežne používané antibiotiká, rastie záujem o peptidové antibiotiká, poháňaný uvedomením si potenciálnych terapeutických aplikácií týchto peptidov alebo ich syntetických analógov (Reddy *et al.*, 2004).

Všetky tieto peptidy disponujú širokým spektrom biologických vlastností. Okrem antifungálnych a antimikrobiálnych aktivít, môžu tiež vplývať antivírusovými a protirakovinovými vlastnosťami. Niektoré tiež pôsobia na zápal, proliferáciu, hojenie rán, uvoľňovanie cytokínov, homeostázu, chemotaxiu alebo udržanie rovnováhy medzi proteázami a ich inhibítormi (Bals, 2000).

Peptidové antibiotiká sa dosť líšia v biochemických vlastnostiach (v zložení aminokyselín, dĺžke a sekundárnej štruktúre). Všetky ale zohrávajú dôležitú úlohu v obrane proti nešpecifickému hostiteľovi a to pomocou ich schopnosti rozpoznať potenciálne patogény a tak predchádzať infekcii, alebo ju aspoň obmedziť (De Smet a Contreras, 2005).

Väčšina peptidov má svoje účinky založené na interakcii a destabilizácii mikrobiálnej membrány, čo následne spôsobuje bunkovú smrť. Mala časť však disponuje schopnosťami ako je napríklad inhibícia syntézy špecifických membránových proteínov (Engstrom *et al.*, 1984, Axen *et al.*, 1997), zastavenie syntézy DNA (Boman *et al.*, 1993), zlomenie jednovláknového reťazca DNA (Bateman *et al.*, 1991), interakcie s DNA (Park *et al.*, 1998) a produkciou peroxidu vodíka (Leem *et al.*, 1996). Tiež môžu spúšťať apoptózu v eukaryotických bunkách (Velasco *et al.*, 1997; Yoo *et al.*, 1997) alebo autolýzu v bakteriálnych bunkách (Chitnis *et al.*, 1993).

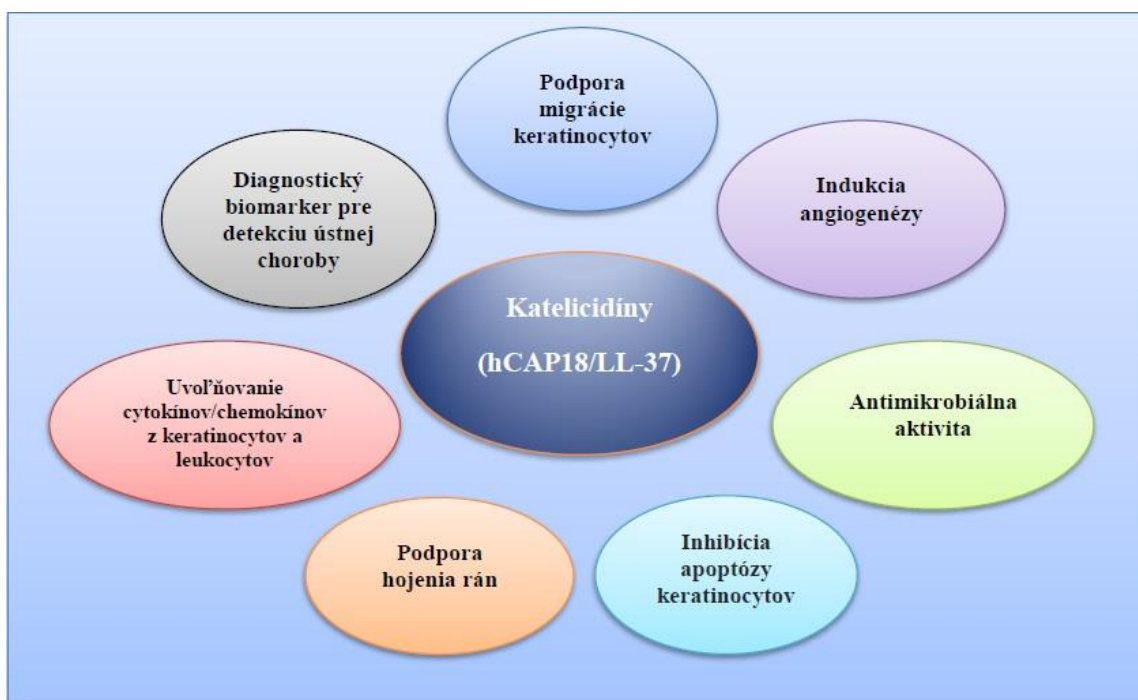
Antimikrobiálne peptidy majú ako jednu zo spoločných fyzikálne – chemických vlastností schopnosť tvoriť kladný náboj a to vďaka vysokému obsahu arginínu a lyzínu ako zásaditých aminokyselín. Vďaka tomu sú schopné rozlíšiť prokaryotickú bunkovú

membránu od eukaryotickej, keďže bakteriálne membrány obsahujú fosfolipidy ako fosfatidylserín, fosfatidylglycerol alebo kardiolipín, ktoré sú záporne nabité. Na rozdiel od bakteriálnych membrán, eukaryotické sú tvorené hlavne pomocou fosfatidylcholínu, sfingomyelínu, cholesterolu a fosfatidyletanolamínu, ktoré sú neutrálne nabité. Interakcia medzi prokaryotickými membránami a antimikrobiálnymi peptidmi teda spočíva v elektrostatickom priťahovaní, čo spôsobuje rozrušenie membrán a vyliatie bunkového obsahu. Druhou možnosťou pôsobenia antimikrobiálnych peptidov, ktorá však nieje spojená s porušením celistvosti membrán, je ich translokácia cez membrány, čo spôsobí zablokovanie dôležitých metabolických dráh (Brogden, 2005; Wimley, 2010).

2.1.1 Katelidíny

Katelidíny sú antimikrobiálne peptidy, ktoré sú zaradené do kationovej amfipatickej skupiny nachádzajúcej sa ako v cicavcoch (králiky, hovädzí dobytok, kone, ošípané, potkany a kopytníky) tak aj u iných druhov (losos, sliepky) (Lehrer a Ganz, 2002; Uzzell *et al.*, 2003; Gennaro *et al.*, 1989; Tomasinsig a Zanetti, 2005).

Katelidíny zohrávajú v ľudskom organizme veľa rôznych funkcií, ktoré sú zobrazené na Obr. 1.



Obr. 1 Funkcie katelididinových peptidov LL-37 v ľudskom tele (Hilchie *et al.*, 2013).

U ľudí bol charakterizovaný len jeden katelicidín – označuje sa ako LL-37 (leucín-leucín 37) (Johansson, 1998). Tento peptid je odvodený proteolýzou od C-terminálneho konca ľudského proteínu CAP18 (hCAP18) (Gudmundsson *et al.*, 1996) a je exprimovaný v leukocytoch, ako sú neutrofilny, monocyty, NK bunky, T bunky a B bunky a v epiteliálnych bunkách semeníkov, kože, gastrointestinálnom a dýchacom trakte (Cowland *et al.* 1995; Gudmundsson *et al.*, 1996; Frohm *et al.*, 1997; Bals *et al.*, 1998; Agerberth *et al.* 2000). Preto pomáhajú katelicidíny v prvej línii obrany a patria medzi prvé obranné peptidy prichádzajúce do kontaktu s cudzími patogénmi (Kurshid *et al.*, 2017).

LL-37 je indukovaný zápalovými a infekčnými podnetmi (Frohm *et al.*, 1997) a má antimikrobiálnu aktivitu voči gram-pozitívnym a gram-negatívnym baktériám (Turner *et al.*, 1998). Peptid je zložený z 37 aminokyselinových zvyškov a má lineárnu štruktúru, pretože neobsahuje cysteín. V hydrofilnom prostredí nadobúda náhodnú konformáciu v tvare špirály a v hydrofóbnom α -helikálnu štruktúru (Turner *et al.*, 1998).

Katelicidíny a ich prekurzorové molekuly sa syntetizujú po proteolytickom štiepení (Agier *et al.*, 2015). Tieto peptidy sú charakterizované na základe ich štruktúry a rozdielnej molekulovej hmotnosti a môžeme ich nájsť v rôznych druhoch. Konkrétny gén, ktorý je zodpovedný za syntézu katelicidínov u cicavcov je zložený zo štyroch exónov a troch intrónov. Okrem neho existujú ďalšie štyri gény (CATH1, CATH2, CATH3 a CATH-B1), ktoré boli nájdené u vtákov so štruktúrou podobnou cicavčím peptidom (Cheng *et al.*, 2015).

Gén kódujúci LL-37 u ľudí môžeme nájsť na chromozóme číslo tri a je vytváraný odštiepením C-konca od hCAP18 (prekurzorový proteín ľudského kationového antimikrobiálneho peptidu 18) (Kurshid *et al.*, 2017). Aktívny produkt aj prekurzorový proteín sa vyskytujú v množstve ľudských buniek a telesných tekutín (sliny, semenná plazma, tekutina z ľudských rán, plodový maz, gingiválna tekutina, tracheálny aspirát) (Murakami *et al.*, 2002; Mansour *et al.*, 2014; Davidopoulou *et al.*, 2013).

Regulácia produkcie katelicidínov prebieha pomocou rastových faktorov, premenlivého počtu cytokínov a aktivovaným vitamínom D, ktoré vytvárajú endogénne produkty (Vandamme *et al.*, 2012).

2.2 Molekulárne farmárčenie

Molekulárne farmárčenie predstavuje formu produkcie cenného rekombinantného proteínu v rastlinách a ich bunkách, kde je cieľom produkt extrahovať a následne ho použiť v čistej forme alebo len v čiastočne spracovanom rastlinnom pletive (Schillberg *et al.*, 2003). V porovnaní s už zavedenými platformami, ktoré sú založené na mikróboch a eukaryotických bunkách, rastliny poskytujú mnoho výhod, pretože sú nenákladné na rast, sú dlhodobo škálovateľné a veľa druhov je všeobecne považovaných za bezpečné (G.R.A.S.) (Khan *et al.*, 2012).

Na rozdiel od baktérií, rastliny neprodukujú endotoxíny a taktiež nepodporujú replikáciu ľudských vírusov (na rozdiel od buniek cicavcov), ale vykonávajú eukaryotické posttranslačné modifikácie (Khan *et al.*, 2012).

Veľa rozličných rastlinných druhov je považovaných za možnú produkčnú platformu (zelenina, ovocie, riasy, vodné rastliny, machy, olejniny, semená strukovín, listové plodiny a semená obilnín) (Twyman *et al.*, 2003).

Systémy, ktoré sú založené na semenách zahŕňajú cieľnú expresiu rekombinantného proteínu v semenách a sú považované za unikátne, vďaka ich špecifickým aplikáciám a výhodám (Ramessar *et al.*, 2008; Stoger *et al.*, 2005a; Stoger *et al.*, 2005b). Obzvlášť semená obilnín ponúkajú využitie ako „bioreaktory“ na produkciu rekombinantných proteínov pre priemyselné a lekárske aplikácie (Boothe *et al.*, 2010). Tieto semená sú totiž prirodzene prispôsobené na uskladňovanie bielkovín v stabilnej a prístupnej forme, čo môže byť využívané práve na akumuláciu rekombinantných proteínov (Peters a Stoger, 2011). Bolo dokázané, že u exprimovaných rekombinantných proteínov v dospelých semenách sa neprejavila žiadna detekovateľná zmena v aktivite pri teplote okolia a to aj v prípade skladovania po dobu niekoľkých rokov (Stoger *et al.*, 2000, Nochi *et al.*, 2007) a bez špecifického subcelulárneho zacielenia proteínov (Boothe *et al.*, 2010).

Faktory ovplyvňujúce stabilitu a expresiu proteínov v semenách zahŕňajú zygotitu, počet kópií transgénu, výber genotypu, dizajn konštruktu a cielenie proteínov do miesta určenia, či už v bunke alebo mimo nej (Stoger *et al.*, 2000; Nochi *et al.*, 2007).

Pre molekulárne farmárčenie je výhodná hlavne štruktúra osiva, vďaka jeho malej a homogénnej veľkosti, čím sa koncentrujú proteíny a je uľahčené ich samotné

spracovanie (Ramessar *et al.*, 2008). Zároveň bolo preskúmaných alebo vyvinutých veľa rôznych druhov semien ako produkčných platforiem a to napríklad pšenica (Stoger *et al.*, 2000), jačmeň (Erlendsson *et al.*, 2010), ryža (Takaiwa *et al.*, 2007), *Arabidopsis* (Downing *et al.*, 2006), sója (Cunha *et al.*, 2011) a hrach (Zimmermann *et al.*, 2009).

2.2.1 Semená a ich skladovacie pletivá

Semeno sa vyvíja z vajíčka po oplodnení a je zložené z troch hlavných častí: z embrya, endospermu a semenného plášťa. Plášť poskytuje mechanickú ochranu celému semenu, vrátane embrya, ktoré predstavuje nasledujúcu generáciu rastlín a je uzavreté v endosperme, ktoré mu dodáva potrebné živiny.

Rôzne druhy semien skladujú rozdielne druhy zásobných látok. Semená olejníň skladujú lipidy vo forme triacylglycerolov v sférických subcelulárnych olejových telieskach, zatiaľ čo semená obilnín obsahujú hlavne škrobové zrná a proteínové telieska (Borisjuk *et al.*, 2004).

Podľa štruktúry by sme semená mohli rozdeliť do troch kategórií a to na jednoklíčnolistové (obilniny), endospermické dvojklíčnolistové (tabak) a neendospermické dvojklíčnolistové (fazuľa). U endospermických dvojklíčnolistových semien je embryo obklopené niekoľkými vrstvami endospermu, pričom endospermové bunky spolu s bunkami klíčnych listov majú spoločnú skladovacu úlohu. Na rozdiel od endospermických, neendospermické dvojklíčnolistové semená majú endosperm úplne reabsorbovaný už v čase, kedy je vývoj semena dokončený a skladovacu funkciu plnia len bunky klíčnych listov, ktoré ukladajú látky potrebné pre klíčenie (Olsen, 2007).

Obilniny, patriace k jednoklíčnolistovým rastlinám majú semená obalené tenkou vrstvou plášťa a pod ňou sa nachádza niekoľko vrstiev aleurónových buniek, kde ich množstvo závisí od druhu rastliny (Olsen, 2007). Endosperm často zaberá väčšinu priestoru semena, zatiaľ čo embryo je v tomto prípade malé. Preto je endosperm dôležitou potravinovou zložkou väčšiny obilnín. Obsahuje 70% škrobu v sušine, pozostávajúceho z α -glukánových polymérov amyulózy a amylopektínu, ktoré sú zabalené do semikryštalických granúlátov v amyloplastoch (James *et al.*, 2003).

2.2.2 Smerovanie proteínov do skladovacích organel

Pre rekombinantné proteíny je veľmi dôležitá subcelulárna lokalizácia a to nielen preto, že silno ovplyvňuje ich stabilitu, akumuláciu a výnos, ale hraje kľúčovú rolu v posttranslačných modifikáciách (Conrad a Fiedler, 1998).

Medzi najpodstatnejšie posttranslačné modifikácie pre molekulárne farmárčenie patrí hlavne glykozylácia, pretože práve glykánové reťazce môžu ovplyvňovať bielkovinovú štruktúru, imunogenicitu a biologickú funkciu. Príkladom môžu byť konkrétne sacharidové štruktúry, kde sacharidové štruktúry pridané v endoplazmatickom retikulu ďalej prechádzajú do Golgiho aparátu a tam dochádza k ich finálnemu spracovaniu (Twyman *et al.*, 2005; Stoger *et al.*, 2005a).

Ak by sme sa však zamerali konkrétne na semená rastlín, ich skladovacie pletivá sú vysoko špecializované a majú zložitejší a väčší endomembránový systém, na rozdiel od vegetatívnych buniek, ktorými proteíny iba prechádzajú, kým nedosiahnu svoje cieľové destinácie. Tento systém obsahuje proteínové telieska odvodené od endoplazmatického retikula, rôzne typy vakuol a veľké endoplazmatické retikulum, ktoré pripomína sekrečné bunky zvierat. Vďaka tomu v semenách môžeme nájsť viacero alternatívnych subcelulárnych destinácií vhodných pre rekombinantné proteíny a to vrátane proteínových teliesok, škrobových granúl, vakuol skladujúcich proteíny a povrchu olejových teliesok (Khan *et al.*, 2012).

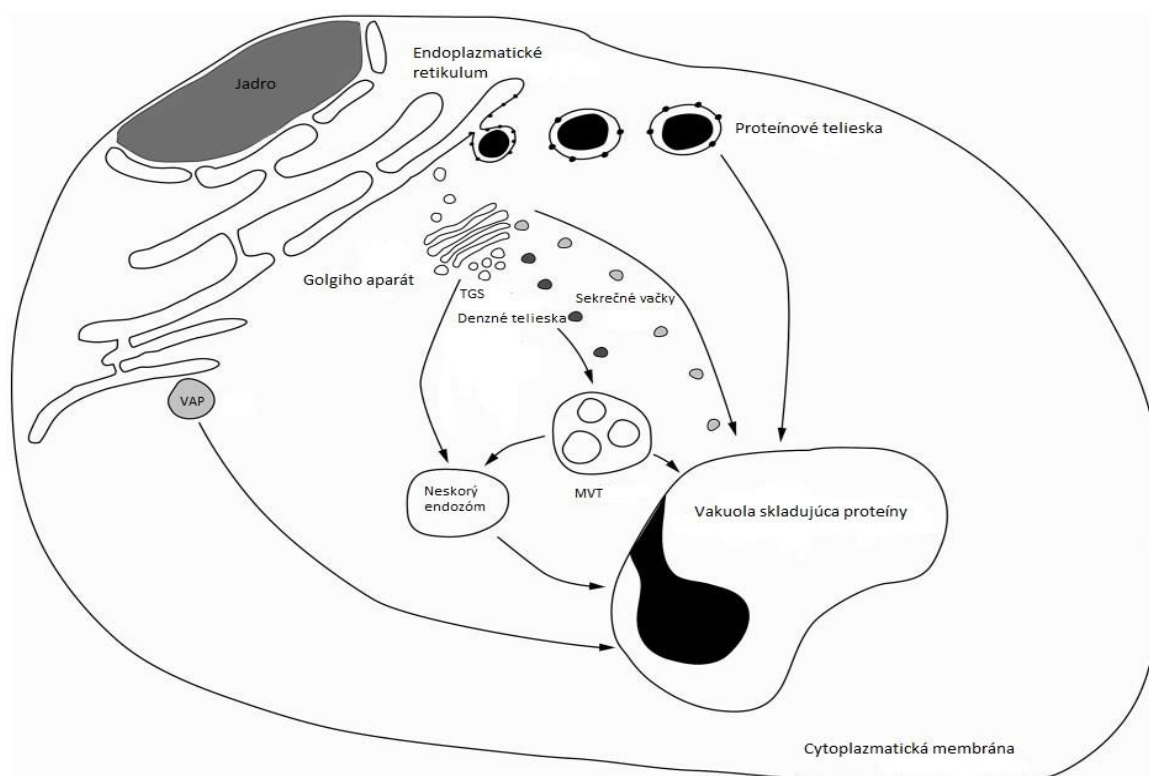
Nanešťastie, neexistuje žiaden ideálny spôsob lokalizácie rekombinantných proteínov do konkrétnych organel, pretože majú rozmanité štruktúry a vlastnosti (Conrad a Fiedler, 1998).

2.2.3 Proteínové telieska a vakuoly skladujúce proteíny u obilnín

Endosperm obilnín obsahuje dva druhy organel, do ktorých ukladá proteíny a to proteínové telieska (PB) a vakuoly skladujúce proteíny (PSV) (Shewry a Halford, 2002; Jiang *et al.*, 2001; Herman a Larkins, 1999). Kým proteínové telieska sú odvodené od endoplazmatického retikula, vakuoly skladujúce proteíny sa tvoria v bunke ako nové organely. Každá z týchto organel skladuje inú triedu proteínov. PSV slúžia ako cieľové organely pre akumuláciu globulínov a albumínov, zatiaľ čo PB skladujú prolamíny vyskytujúce sa hlavne u obilnín (Shewry a Halford, 2002; Shewry *et al.*, 1995).

Proteínové telieska sa tvoria priamo v hrubom endoplazmatickom retikulu a pri dosiahnutí dostatočnej veľkosti sa od neho odštiepia ako samostatné organely, ktoré buď ostanú v cytosole alebo môžu byť pohltené vakuolou skladujúcou proteíny pomocou autofágie (Levanony *et al.*, 1992; Herman a Larkins, 1999).

Samotná cesta prirodzených proteínov cez endomembránu do proteínových teliesok alebo vakuol, niekedy prechádzajúc cez Golgiho aparát a v iných prípadoch ho obchádzajúc, je veľmi spletitá a líši sa medzi rastlinnými druhmi a typmi proteínov (Obr. 2) a je relevantná pre molekulárne farmárčenie, pretože nasmerovanie rekombinantných proteínov do konkrétnych organel môže byť veľmi zložité a ťažko ovládateľné (Shewry a Halford, 2002; Jiang *et al.*, 2001; Levanony *et al.*, 1992; Ibl a Stoger, 2012).



Obr. 2 Schematický prehľad možných dráh proteínov do skladujúcich organel v semenách. Hlavnými cieľovými organelami pre akumuláciu endogénnych a rekombinantných proteínov v bunke sú proteínové telieska a vakuoly skladujúce proteíny, ktoré môžu byť dosiahnuté rozdielnymi dráhami v pletive embrya alebo endosperme rôznych rastlinných druhov. TGS *trans*-Golgiho sieť, MVT multivezikulárne telieska, VAP vezikuly akumulujúce proteíny (Khan *et al.*, 2012).

Globulíny obilnín sa dostávajú do PSV cez Golgiho aparát, kým prolamíny môžu byť akumulované v PB dvoma spôsobmi. V jednom sa hromadia a tvoria agregáty, ktoré sa odštiepujú od endoplazmatického retikula, no neskôr sú autofágiou pohltené vakuolou skladujúcou proteíny a neprechádzajú cez Golgiho aparát (Levanony *et al.*, 1992; Galili *et al.*, 1993). Druhý spôsob spočíva v ich akumulácii v proteínových telieskach nachádzajúcich sa v dutine drsného endoplazmatického retikula, kde sú chránené pred vysušením a degradáciou, kým niesú potrebné pri klíčení (Muntz a Shutov, 2002). To je podstatné pre akumuláciu rekombinantných proteínov, ktoré sú touto formou v PB chránené, ak sú náchylné pri vylučovaní z endoplazmatického retikula na proteolýzu a zároveň ich zadržiavanie vnútri častíc oddelených od endoplazmatického retikula eliminuje potenciál komplexnej koncovej glykolyzácie (Torrent *et al.*, 2009a).

2.2.4 Jačmeň ako produkčná platforma

Jačmeň je veľmi atraktívnou produkčnou platformou na produkciu rekombinantných proteínov, pretože je relatívne ľahko transformovateľným diploidným druhom plodiny, v ktorej môžu byť jednoducho vytvárané dvojité haploidy. Veľké množstvo proteínov je prirodzene akumulované v zrnách, ale optimálne endospermovo-spezifické promótory ešte musia byť zdokonalené (Hensel *et al.*, 2015).

Medzi špecifické výhody jeho zrn patrí ich prostredie, v ktorom sú proteíny dlhodobo stabilné a to dokonca bez potreby chladenia alebo aseptických podmienok. Zároveň je jačmeň schopný tolerovať širokú škálu podmienok okolitého prostredia. Ďalšou výhodou je napríklad jeho prevažne autogamný režim reprodukcie, jeho G.R.A.S. (všeobecne uznávaný ako bezpečný) status, dobre zavedená agronómia a jednoduchá genetická transformácia (Hensel *et al.*, 2015).

Veľa konvenčných programov na šľachtenie jačmeňa využíva technológiu dvojitého haploidu na riadenie homozygotity v elitnom zárodku (Kumlehn, 2014) a vďaka kombinácii tejto metodiky s genetickou transformáciou, poskytuje veľmi vhodné prostriedky pre fixáciu transgénu (Floss *et al.*, 2009).

Hlavné skladovacie proteíny v zrnách jačmeňa sú hordeíny, ktoré sú najprv dopravené do endoplazmatického retikula a nakoniec sú uložené do PSV. V jačmeni je až 50% skladovacích proteínov tvorených hordeínmi. Preto sa gény, kódujúce tieto

proteíny stali primárnymi cieľmi pre charakterizáciu promótorov špecifických pre endosperm (Vickers *et al.*, 2006).

2.2.5 Tabak ako produkčná platforma

Tabak je všeobecne považovaný za jednu z najvhodnejších produkčných platforiem, pretože má veľa unikátnych výhod oproti iným druhom rastlín pri výrobe farmaceuticky významných proteínov (Abiri *et al.*, 2015).

Medzi jeho hlavné výhody patrí schopnosť produkovať biomasu až do 100 ton/ha a dobre zavedený systém pre transformáciu tabaku, ktorý vyúsťuje v existenciu vysokej úrovne rozpustnosti proteínu. Ďalšími výhodami sú možnosti využitia rôznych stratégií pre expresiu rekombinantného proteínu v stabilnom alebo prechodnom stave a tiež použitie metód založených na genóme chloroplastov sprostredkovanými prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens* alebo vírusovej indukcie (Karg a Kallio, 2009). Okrem toho môže tabak produkovať širokú škálu terapeutických imunomodulátorov ako sú vakcíny, cytokíny a protilátky (Tremblay *et al.*, 2010).

Nevýhodou tejto rastliny pre molekulárne farmárčenie je vysoká koncentrácia alkaloidov a nikotínu v niektorých druhoch a taktiež nestabilita jej produktov, ktorá môže byť alternatívne riešená okamžitým spracovaním na farmách, alebo vysušením a zmrazením listov pred ich transportom do zariadení, kde sú ďalej spracovávané (Kamenarova *et al.*, 2005).

Tabak, ako jedna z transplastomických rastlín je novou alternatívou k jadrovým transgénnym rastlinám, ktoré sú vytvorené zavedením rekombinantnej DNA do genómu chloroplastov, namiesto ich zavádzania do jadrového genómu pomocou génového dela. Avšak, keďže v plastidoch neprebíha glykozylácia, nemôže byť chloroplast použitý na výrobu ľudských glykoproteínov. Príkladom niektorých najdôležitejších dostupných produktov, ktoré boli vyrobené v chloroplaste tabaku je fragment toxínu tetanu, sérový albumín a ľudský rastový hormón (Ma *et al.*, 2003).

Ďalšou výhodou tejto modelovej rastliny je dostupnosť rôznych expresných systémov. Vhodná metóda pre dosiahnutie dlhodobej produkcie glykoproteínov, ako sú napríklad protilátky, je jadrová transformácia. Na výrobu veľkých množstiev bielkovín, ktoré vyžadujú určité druhy posttranslačného spracovania, sú vhodné expresné systémy na báze chloroplastov. U produktu, ktorý vyžaduje rýchlu modifikáciu sa využíva

tranzientná modifikácia, pretože pri nej môžeme očakávať, že dosiahneme správne množstvo požadovaného proteínu za krátky čas (Tremblay *et al.*, 2010).

2.2.5.1 Tranzientný typ transformácie tabaku

Tranzientná transformácia je vhodná metóda k dosiahnutiu rýchlej výroby prírodných proteínov v tabaku. Vďaka tejto metóde môžeme dosiahnuť pomocou infekcie obrovské množstvo rekombinantného proteínu už za menej ako päť dní. Táto metóda je vhodná hlavne pre výrobu farmaceutických materiálov za použitia baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, pretože ponúka najvyššiu úroveň expresie za použitia najnižšej investície (Gleba *et al.*, 2005).

Agro-infiltračná metóda (Dillen *et al.*, 1997) je technikou spadajúcou pod prechodnú expresiu. Zahrňuje infiltráciu suspenzie rekombinantného *Agrobacterium tumefaciens* do pletív tabakových listov, ktorá uľahčuje prenos T-DNA do veľkého percenta buniek. Tento druh metódy pozitívne ovplyvňuje intenzitu prechodnej expresie v transgénnych plodinách (Pogue *et al.*, 2010; Vézina *et al.*, 2009).

Všeobecne má prechodný typ expresie dve hlavné nevýhody. Prvou sú vysoké technické požiadavky na indukciu a vysoké riziko náhodného šírenia infekcie na voľne žijúce druhy. Okrem toho je táto metóda obmedzená na kontrolované podmienky, ako sú napríklad laboratória alebo skleníky, čo ale eliminuje riziko vzájomného oplodnenia, ak by transgénne rastliny boli pestované na otvorených poliach. V súčasnej dobe je ale skúmané meradlo pre maximalizáciu výťažku proteínu, zatiaľ čo budú znížené vstupné náklady, vyúsťujú v odhadovanú cenu 1 USD/kg surového proteínu alebo 50 USD/kg čistého proteínu (Abiri *et al.*, 2015).

2.2.6 Transformácia rastlín pomocou *Agrobacterium tumefaciens*

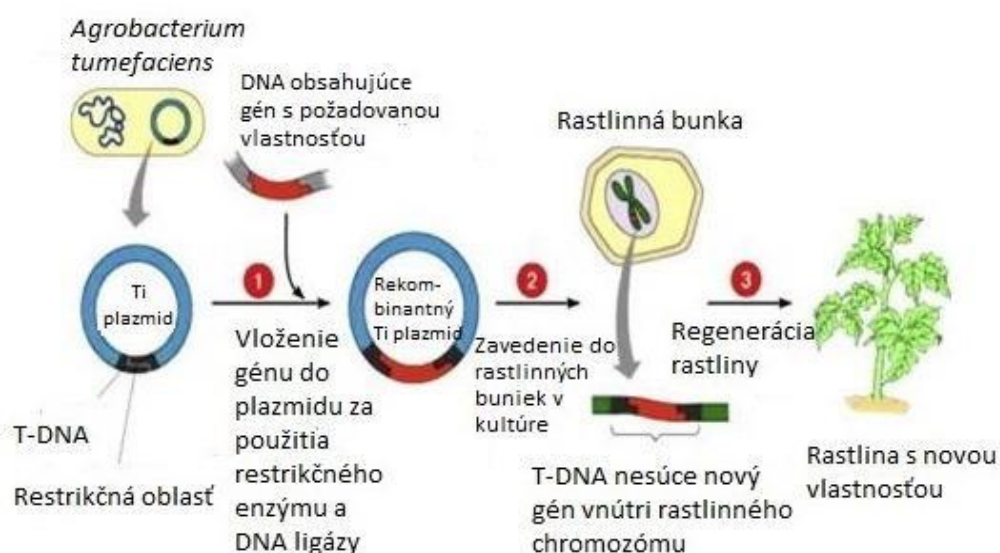
Agrobacterium tumefaciens je významný rastlinný patogén, ktorý spôsobuje bakteriálnu nádorovitost' koreňov na viacerých poľnohospodársky významných druhoch, vrátane viniča hroznotodého, orechových stromov a kôstkovíc a taktiež je široko používaný na genetickú transformáciu rastlín (Obr. 3), vďaka svojej prirodzenej schopnosti prenášať cudziu DNA do genómu hostiteľskej rastliny (DeCleene a DeLey, 1976). Okrem toho, je táto baktéria prinajmenšom za laboratórnych podmienok schopná transformovať iné eukaryotické druhy, a to od kvasiniek, cez huby, až po ľudské bunky, čo má veľký

prísľub pre budúcnosť biotechnológií zameraných na iné druhy ako rastlinné (Lacroix *et al.*, 2006).

V prírode nesie transferová DNA (T-DNA) sadu onkogénov a génov pre syntézu opínov (Gaudin *et al.*, 1994), ktorých expresia v rastlinných bunkách vedie k neoplastickému rastu transformovaných pletív a produkcii opínov, aminokyselinových derivátov využívaných baktériami takmer výlučne ako zdroj dusíka (Draper *et al.*, 1988).

Potom, ako táto baktéria infikuje hostiteľskú rastlinu, preniesie do jej bunky niekoľko proteínov virulencie (Vir) a segment DNA (nazývaný prenosová DNA alebo T-DNA) z jeho Ti (tumor indukujúceho) plazmidu. Za pomoci proteínov Vir sa T-DNA dostane do jadra hostiteľskej bunky a integruje sa do hostiteľského genómu, kde vyvolá nádorovitú koreňov, pretože onkogény prítomné vo vnútri T-DNA riadia nekontrolovateľnú proliferáciu buniek (Gelvin, 2003).

Pri samotnej transformácii musíme brať ohľad na faktory, ktoré ovplyvňujú účinnosť tejto metódy. Medzi hlavné faktory by sme mohli zaradiť indukciu génu vir, genotyp, kmene a vektory *Agrobacterium tumefaciens*, aktívne rozdelenie buniek v cieľových pletivách, prídanie acetosyringónu, zloženie média a podmienky pri kultivácii, ako napríklad kultivačná teplota (Cheng *et al.*, 2004).



Obr. 3 Proces transformácie rastliny prostredníctvom *Agrobacterium tumefaciens* (Ivanović *et al.*, 2016).

2.3 Návrh konštruktov pre heterológnu proteínovú expresiu v rastlinách

2.3.1 Promótory

Ako popredné prvky génov, promótory hrajú významnú rolu v génovej expresii. Obsahujú totiž miesta s jadrovými sekvenciami, na ktoré sa viažu RNA polymeráza a transkripčné faktory. Hoci konštitutívne promótory, ako je vírus mozaiky karfiolu 35S (CaMV35S) a kukuričný ubiquitin-1 promótor, boli použité v dvojkľúčolistových a jednokľúčolistových rastlinách, jednotlivé tkanivovo špecifické a indukovateľné promótory poskytujú lepšiu kontrolu génovej expresie (Ko *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2004). Indukovateľné promótory môžu byť nabádané k indukcii génovej expresie vrámci vybraných miest a časov prostredníctvom pridania vhodných chemikálií. Údajne môže pridanie týchto látok zabrániť výskytu nežiaducich účinkov génovej expresie na rôzne fáze rastlinného rastu alebo vývoja (Stöger *et al.*, 2000). Ďalší veľký pokrok v oblasti rastlinnej genetickej transformácie bola identifikácia pletivovo špecifických promótorov. Tieto promótory riadia génovú expresiu pomocou jeho obmedzenia do niektorých pletív, čo znižuje rozsah rozmanitých účinkov transformácie na rast a vývoj hostiteľskej rastliny (Stahl *et al.*, 2002).

Legumín B4 pochádza z génov kódujúcich globulíny 11S z *Vicia faba* a obsahuje promótor o ktorom je známe, že riadi semenovo špecifickú génovú expresiu (Zakharov *et al.*, 2004). Tento gén je najprv exprimovaný v skorej vonkajšej obalovej vrstve, po ktorej postupne nasleduje embryo, suspensor a nakoniec endosperm (Panitz *et al.*, 1997). Okrem toho signálny peptid LeB4 umožňuje translokáciu fúzneho proteínu do endoplazmatického retikula (Lin *et al.*, 2006).

2.3.2 HDEL/KDEL ako signálne sekvencie

Proteíny sa kotranslačne presunú do endoplazmatického retikula (ER) a potom sú buď zadržované alebo prepravované do rôznych intracelulárnych alebo extracelulárnych priestorov. Signály HDEL a KDEL, ktoré sa bežne používajú na zadržiavanie bielkovín v ER kvasiniek a zvierat, boli tiež popísané na C-terminálnom konci rozpustných, upravujúcich enzýmov ER v rastlinách (Gomord *et al.*, 1997).

Väčšina luminálnych, rezidentných proteínov je v ER zachovaná vďaka prítomnosti špecifického C-terminálneho signálu, konkrétne HDEL, KDEL alebo príbuzných

sekvencií. Tieto proteíny sú spätne vychytávané skrz interakciu HDEL/KDEL s receptorom ERD2 a dopravené pomocou COPI včiekov naspäť do endoplazmatického retikula. Avšak, pre niekoľko rezidentných proteínov je zachovávanie nezávislé na signále. To je prípad niektorých obilných prolaminových zásobných proteínov, ktoré sa priamo akumulujú v lumene ER, kde sú zostavené do proteínových teliesok (Galili *et al.*, 1998).

2.3.3 Zein ako stabilizačná značka

Zein je polymér na báze bielkovín, nachádzajúci sa v semenách kukurice, ktorý sa používa ako nosič, vďaka jeho priaznivým vlastnostiam ako sú biokompatibilita, nerozpustnosť a nízka spotreba vody, chemická a mechanická stabilita a jeho sklon vytvárať povlaky a mikročastice (Liu *et al.*, 2005; Lai a Guo, 2011; Wang *et al.*, 2011; Lau *et al.*, 2013). Zároveň je považovaný za bezpečný (G.R.A.S.) pri použití v potravinárskom priemysle a odoláva tráveniu, čo ho robí zvlášť vhodným ako zapuzdrovací polymér pre orálne podávané lieky (Hurtado-Lopez a Murdan, 2006b; Gong *et al.*, 2011; Lau *et al.*, 2013; Zou a Gu, 2013; Ahmed *et al.*, 2015). Okrem toho, môžu mikročastice na báze zeinu poskytovať adjuvantné účinky, ak sú použité ako nosiče vakcín (Hurtado-Lopez a Murdan, 2006a).

Metódy *in vitro* napúšťania častíc na báze zeinu spolu s liečivami zahŕňajú lyofilizáciu alebo disperzné metódy typu kvapalina – kvapalina. Avšak tieto technické procesy sú drahé a môžu ovplyvňovať činnosť zapuzdreného činidla, napríklad vysoké teploty nutné na sušenie rozprašovaním sú nezlučiteľné s mnohými farmaceutickými proteínmi (Zhong a Jin, 2009; Podaralla a Perumal, 2010; Podaralla *et al.*, 2012; Zou a Gu, 2013). Preto je lákavé využívať rastliny na dosiahnutie mikrozapuzdrovania *in vivo* pomocou priameho začleňovania rekombinantných proteínov do prirodzene sa vyskytujúcich organel skladujúcich proteínov, ako sú zeinové telieska (Hofbauer a Stoger, 2013).

V produkčných platformách zameraných na semená obilnín je rekombinantný proteín často nasmerovaný do skladovacích organel obsahujúcich prolamíny, ktoré mu poskytujú bezpečné životné prostredie a dokonca ho čiastočne dokážu chrániť pred proteolytickým štiepením v simulovaných žalúdočných šťavách (Takaiwa *et al.*, 2015).

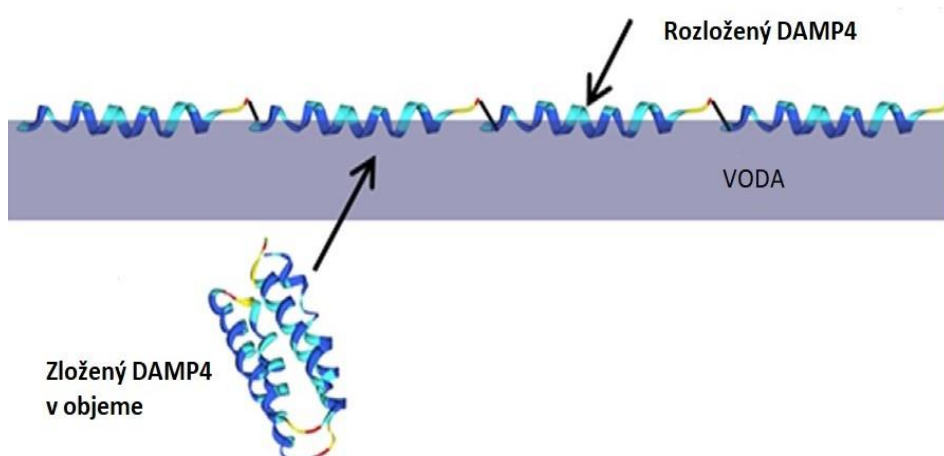
Namiesto použitia prírodných prolaminových teliesok, ktoré sa vytvárajú v ryži, kukurici, pšenici a endosperme jačmeňa, je možné, aby sa rekombinantný proteín spojil

so sekvenciami, ktoré indukujú tvorbu podobných štruktúr v pletivách ako sú listy, ktorým zvyčajne chýbajú organely skladujúce proteíny. Táto technológia vynecháva dlhšiu generačnú dobu potrebnú k produkcii obilninových semien a zároveň stále ponúka výhody prírodnej bioenkapsulácie (Floss *et al.*, 2008; Conley *et al.*, 2009; Torrent *et al.*, 2009b; Gutierrez *et al.*, 2013; Shigemitsu *et al.*, 2013).

2.3.4 DAMP4 ako purifikačná značka

Prvým neprirodzene sa vyskytujúcim navrhnutým proteínovým surfaktantom je DAMP4. Obsahuje opakujúcu sa sekvenciu štyroch AM1 peptidových modulov a môže byť použitý buď ako samotný biosurfaktant (Middelberg and Dwyer, 2011) alebo môže byť štiepený kyselinou na jednotlivé peptidy (Dwyer *et al.*, 2013).

DAMP4 má helikálnu sekundárnu štruktúru, pozostávajúcu zo štyroch α -helixov zložených do zväzku. Takéto štruktúry sú známe svojou dobrou stabilitou po expresii (Akiva *et al.*, 2008; Hecht *et al.*, 1990) a vďaka tomu bol DAMP4 úspešne exprimovaný aj bez použitia fúzneho partnera (Middelberg a Dwyer, 2011). Tento proteín formuje monovrstvu na rozhraní vzduch - voda o hrúbke asi 10-14 Å (Dwyer *et al.*, 2013), čo je v súlade s monovrstvou α -helixov (Middelberg *et al.*, 2008). To naznačuje, že zväzok štyroch helixov sa rozkladá na rozhraní vzduch – voda, aby sformoval monovrstvu (Obr. 4). Toto rozvinutie je poháňané amfipatickou povahou α -helixov, ktoré majú hydrofóbnu časť orientovanú smerom k jadru zväzku a hydrofilnú časť orientovanú k vodnému roztoku (Middelberg a Dwyer, 2011).



Obr. 4 Znáznornenie rozloženého DAMP4 na rozhraní vzduch – voda, kde sa jeho konformácia mení zo 4 - helixového zväzku na α - helixovú monovrstvu (Dwyer *et al.*, 2014).

Bolo dokázané, že štruktúra zväzku helixu zostáva stabilná a rozpustná za podmienok vysokej teploty a vysokej koncentrácie soli, ktoré narušujú bunky a zrážajú bunkové proteíny. Toto zistenie otvára sled procesov, ktoré zahŕňajú zahrievanie buniek vo fermentačnom médiu na vysokú teplotu (napríklad 95°C), čo vedie k uvoľneniu rozpustnej biologickej povrchovo aktívnej látky, za súčasného zrážania kontaminantov. Tento proces umožňuje regeneráciu čisteného biosurfaktantu pomocou jednoduchého tepelného spracovania, po ktorom nasleduje oddelenie pevných látok a kvapaliny pomocou centrifugácie alebo filtrácie (Dwyer *et al.*, 2014).

2.3.5 Odstránenie afinitných značiek z rekombinantného produktu

Afinitné značky sa stali základnými nástrojmi na produkciu rekombinantných proteínov v širokej škále možností od základného výskumu, po vysoko výkonnú štruktúrnú biológiu. Nielen, že uľahčujú detekciu a purifikáciu svojich fúznych partnerov, ako to bolo pôvodne zamýšľané, ale môžu mať tiež priaznivý vplyv na výťažok rekombinantných proteínov a v niektorých prípadoch zvyšujú ich rozpustnosť a dokonca podporujú ich správne skladanie. (Waugh, 2005; Arnau *et al.*, 2006).

Napriek týmto dôležitým výhodám, hlavnou nevýhodou stratégie afinitných značiek stále zostáva ich odstraňovanie. Zatiaľ čo mnohé značené proteíny si zachovávajú svoju biologickú aktivitu a štruktúrnú integritu, iné jasne dokazujú, že to u nich tak nieje. Preto vždy keď je to možné, je rozumné tieto značky z rekombinantných proteínov odstrániť. Na štiepenie fúznych proteínov v navrhnutých miestach majú najlepšiu špecifickosť spomedzi chemických a enzymatických metód hlavne proteolytické enzýmy (Waugh, 2011).

Príkladom bežne používaných proteolytických enzýmov používaných v laboratórnej praxi sú napríklad serínové proteázy ako je aktivovaný faktor koagulácie X (faktor Xa), enterokináza (ďalej označovaná ako jej vhodnejšia prezývka enteropeptidáza) a α -trombín (Waugh, 2011). Vzhľadom k tomu, že cena týchto komerčných rekombinantne produkovaných enzýmov je pomerne vysoká, môže byť pre priemyselné aplikácie vhodné nahradiť proteolytické enzýmy inými, menej nákladnými spôsobmi štiepenia produkovaných rekombinantných proteínov. Príkladom, použitým v tejto bakalárskej práci, môže byť napríklad sekvencia Ni-site, ktorá je založená na princípe použitia peptidových afinitných značiek, ktoré sú fúzované s požadovaným proteínom

a používajú sa na urýchlenie purifikácie proteínov pomocou afinitnej chromatografie (Bornhorst a Falke, 2000).

Široko používaná metóda využíva afinitnú chromatografiu s imobilizovaným kovom (IMAC) na čistenie rekombinantných proteínov obsahujúcich krátku afinitnú kotvu pozostávajúcu z polyhistidínových zvyškov. IMAC je založený na interakciách medzi iónom prechodného kovu (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) imobilizovaným na matrici a špecifických postranných reťazcoch aminokyselín. Histidín je aminokyselina, ktorá vykazuje najsilnejšiu interakciu s imobilizovanými kovovými iónovými matricami, pretože skupiny donorov elektrónov na imidazolovom kruhu histidínu ľahko tvoria koordinačné väzby s imobilizovaným prechodným kovom. Peptidy obsahujúce sekvencie po sebe idúcich histidínových zvyškov sú účinne zachované na matrici kolóny IMAC. Po premytí matricového materiálu sa môžu peptidy obsahujúce polyhistidínové sekvencie ľahko eluovať buď úpravou pH kolónového tlmivého roztoku, alebo pridaním voľného imidazolu do kolónového tlmivého roztoku (Bornhorst a Falke, 2000).

3 Experimentálna časť

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina (MES), (Duchefa, Holandsko)

6x Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, USA)

acetosyringón (Sigma-Aldrich, USA)

agar (HiMedia, India)

agaróza (Amesco, USA)

akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

amidočern 10 B (Merck, Nemecko)

Antarctic Phosphatase + pufr (NEB, USA)

β -merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)

dNTPs (Fermentas, Kanada)

dodecylsírán sodný (SDS), (Penta, ČR)

etanol (Penta, ČR)

ethídium bromid (NeoLab, Nemecko)

gentamicin sulfát (Sigma-Aldrich, USA)

GoTaq G2 Flexi Polymerase + pufor (Promega, USA)

hydroxid sodný (Penta, ČR)

chlorid horečnatý (Promega, USA)

kanamycin monosulfát (Duchefa, Holandsko)

LB Broth (Sigma-Aldrich, USA)

MiliQ voda (destilovaná, demineralizovaná)

N, N'-metylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

NuPage 4-12 % Bis-Tris precast gél (Thermo Fisher Scientific, USA)

persírán amónny (APS), (Sigma-Aldrich, USA)

Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, USA)

RNase free voda (Qiagen, Nemecko)

sušené mlieko Laktino (Protein Mléko Laktóza, ČR)

T4 DNA ligáza + pufor (NEB, USA)

tetramethylendiamin (TEMED), (Sigma-Aldrich, USA)

Tween 20 (NeoLab, Nemecko)

Na imunodetekciu boli použité špecifické protilátky pre LL-37 S8 a 9 (monoklonálna anti-LL37 myšacia, zriedená 1:500) a pre GFP-ctrl a GFP-LeB4 (polyklonálna anti-GFP králičia, zriedená 1:1000).

3.1.2 DNA plazmidy

Vektor pMDC32 (Marks Gateway TM Vectors site, <http://www.botinst.uzh.ch/en/research/development/grossnik/vectors/MarkdGatewayVectors.html>)

Vektor pENTR 2B Dual (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.1.3 Biologický materiál

Elektrokompetentné *Escherichia coli* TOP 10 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Chemokompetentné *Escherichia coli* TOP 10 (NEB, USA)

Elektrokompetentné MEGA X DH10B+1 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Elektrokompetentné *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Rastlina *Nicotiana benthamiana*

Rastliny boli pestované vo fytotrone pri laboratórnej teplote s 16/8 hodinovým deň/noc cyklom.

3.1.4 Primery

Obdržané lyofilizované primery boli vždy zriedené vo vode na pracovnú koncentráciu $5\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab.1 Zoznam všetkých použitých primerov

Primer	Sekvencia 5' - 3'
GWATTL1FW	TTG TAC AAA AAA GCA GGC
GWATTL2RE	TTT GTA CAA GAA AGC TGG G
GFPSall_FW01	TTA GTC GAC TGA TGG TGA GCA AGG GCG AGG AG
GFPSall_FW02	TTA GTC GAC TGA TGT CCA AAC CTT TTC TAT CTT TGC TTT CAC TTT CCT TGC TTC TCT TTA CAA GCA CAT GTT TAG CAA TGG TGA GCA AGG GCG AGG AGC
GFPXhoI_RE01	ATA AAT CTC GAG TGT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG CCG
pENTR_FW	GCG AGA GTA GGG AAC TGC
pENTR_RE	AAC ATC AGA GAT TTT GAG ACA C

3.1.5 Konštrukty

V tejto práci sme pracovali so sekvenciami GFP-ctrl, ktorá obsahovala kompletnú kódujúcu sekvenciu GFP a so sekvenciou označenou ako GFP-LeB4, ktorá taktiež obsahovala sekvenciu GFP predĺženú o propeptid z legumínu B4, obsahujúcu signálnu sekvenciu zaciľujúcu proteíny do endoplazmatického retikula.

Zároveň sme pracovali s dvoma navrhnutými stratégiami, ktoré sme pomenovali Stratégia 8 (LL-37 S8) a Stratégia 9 (LL-37 S9), pričom obe obsahovali katelicidínovú sekvenciu (ľudský katelicidín LL-37), no líšili sa purifikačnými značkami (Obr. 5 a 6). Konštrukty boli dodané firmou Thermo Fisher Scientific ako plazmidová DNA zaklonovaná do plazmidu pMK-RQ.

Obr. 5 Schéma Stratégie 8 (syntetický konštrukt, GeneArt Gene Synthesis, Thermo Fisher Scientific).



Obr. 6 Schéma Stratégie 9 (syntetický konštrukt, GeneArt Gene Synthesis, Thermo Fisher Scientific).



Enterokináza a Faktor Xa sú proteázy, ktoré sa využívajú na enzymatické štiepenie afinitných značiek, ktoré by mohli ovplyvňovať vlastnosti rekombinantného proteínu. Ni-site bola pridané do sekvencie ako samoštiepne miesto po pridaní iónov niklu. LL-37 je skratka ľudského peptidu katelicidínu. DAMP4 označuje sekvenciu tohto surfaktantného proteínu, ktorý je určený pre purifikáciu fúzneho proteínu. γ-zein je zapuzdrovací polymér, ktorý chráni rekombinantný proteín pred degradáciou a zároveň slúži ako nosič pre farmaceutické látky. LeB4 je skratka pre propeptid legumínu B4 obsahujúci signálnu sekvenciu, ktorá zaciľuje proteíny do endoplazmatického retikula. Sekvencia HDEL sa používa spolu s LeB4, pretože je to sekvencia určená pre spätné vychytávanie fúzneho proteínu na membráne ER.

Obdržané lyofilizované DNA plazmidy LL-37 S8 a S9 obsahovali 5 µg plazmidovej DNA, ktorá bola rozpustená v 50µl vody.

3.1.6 Restričné endonukleázy

Boli použité tieto restričné endonukleázy – SallI-HF, XhoI, BsiWI, BamHI-HF, BglII, PvuI (všetky NEB, USA).

3.1.7 Rastové médiá

Luria-Bertani (LB) médium: 1,55% (w/v) LB Broth; 0,95% (w/v) NaCl; pH 7,2

LB médium + 1,5% agar

SOC médium: 2% (w/v) tryptón; 0,5% (w/v) extrakt z kvasníc; 0,05% (w/v) NaCl; 0,01 mol·l⁻¹ MgCl₂; 0,01 mol·l⁻¹ MgSO₄; 0,0025 mol·l⁻¹ KCl; 0,02 mol·l⁻¹ glukóza

3.1.8 Komerčné sústavy a kity

Clarity Western ECL Substrate (BioRad, USA)

Gateway LR Clonase Enzyme Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Nemecko)

QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Holandsko)

3.1.9 Prístroje

analytické váhy 5034/120 (Nahita, Španielsko)

automatické pipety (Eppendorf, Nemecko)

centrifuga 5427R (Eppendorf, Nemecko)

elektroporátor ECM 399 (BTX, USA)

elektromagnetická miešačka (Boeco, Nemecko)

elektroforetická komôrka pre horizontálnu elektroforézu (Labnet, USA)

Gel Doc EZ image (BioRad, USA)

inkubátor 28°C (Lovibond, Nemecko)

inkubátor 37°C (Medline Scientific, Nemecko)

inkubátor Cool-Hotter Dry (Alex Red, Izrael)

termocycler T-gradient (Biometra, Nemecko)

termomixér (Eppendorf, Nemecko)

vortex (Labnet, USA)

UV/VIS spektrofotometer Agilent 8453 (Agilent, USA)

3.2 Metódy

3.2.1 Klonovanie

Jednotlivé kroky všetkých postupov sú popísané podrobne v podkapitolách nižšie.

Dva DNA plazmidy (nazvané LL-37 S8 a S9) obsahujúce katelicidínovú sekvenciu spolu s purifikačnými značkami boli obdržané od firmy Thermo Fisher Scientific. Tieto plazmidy boli metódou heatshock zatransformované do chemokompetentných buniek *E.coli* TOP 10. Transformačná zmes bola natretá na platne s LB agarom obsahujúcim antibiotikum kanamycin a po inkubácii na 37°C boli vypichnuté pozitívne kolónie do tekutého LB média. Nasledovala izolácia plazmidovej DNA pomocou kitu QIAprep Spin Miniprep Kit a kontrolná restričná analýza pre overenie prítomnosti inzertu v plazmide pomocou enzýmov BamHI-HF a XhoI, ktorá bola vyhodnotená pomocou gélovej elektroforézy. Pre uskutočnenie LR reakcie bolo ďalej nutné tieto plazmidy naštiepiť enzýmom BglII v mieste génu rezistencie na kanamycín, pretože zvolený cieľový vektor obsahoval zhodný gén rezistencie. Naštípená DNA bola purifikovaná na kolónke pomocou kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up. Pripravené vstupné klony boli podrobené LR rekombinačnej reakcii s cieľovým vektorom pMDC32. Zmes bola pripravená zmiešaním 150ng DNA LL-37 S8 alebo LL-37 S9 so 150 ng vektora pMDC32 za prítomnosti 1µl pufru TE a 2µl enzýmu LR Clonase Mix II. LR reakčná zmes bola inkubovaná cez noc na 25°C a na druhý deň elektroporačne zatransformovaná do elektrokompetentných *E.coli* TOP 10, ktoré boli kultivované cez noc a po vypichnutí pozitívnych kolónií do LB média nasledovala izolácia plazmidov. Plazmidy boli naštiepené pomocou restričného enzýmu BsiWI a vyhodnotené gélovou elektroforézou. Vybrané pozitívne klony boli poslané na kontrolnú sekvenáciu. Po overení sekvencie pomocou sekvenčných reakcií boli pripravené konštrukty elektroporačne zatransformované do baktérie *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101 a transformačná zmes bola natretá na misky s LB agarom obsahujúcim antibiotiká kanamycin a gentamicin. Nasledovala kontrolná colony PCR reakcia pomocou špecifických primerov, ktorá bola vyhodnotená gélovou elektroforézou. Po potvrdení prítomnosti nášho inzertu v plazmide, boli pozitívne kolónie preočkované do tekutého média, inkubované na 28°C cez noc a na druhý deň stočené na centrifuge. K bakteriálnemu peletu bolo pridané 10mM MES médium, 150µM acetosyringónu a 10mM MgCl₂. Takto pripravená zmes bola pomocou injekčnej striekačky aplikovaná

do listov tabaku a tie boli inkubované po dobu troch dní za štandardných kultivačných podmienok.

Pri príprave konštruktov GFP s kontrolnou sekvenciou a GFP so sekvenciou predĺženou o propeptid LeB4 (použitý v LL-37 S9) pre kontrolu funkčnosti tohto signálneho peptidu pomocou live cell mikroskopie, boli tieto sekvencie amplifikované pomocou PCR reakcie, po ktorej nasledovala kontrolná gélová elektroforéza. PCR produkty boli naštiepené restriktívnymi enzýmami Sall-HF a XhoI a purifikované pomocou kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up. Tak isto naštiepený bol aj vektor pENTR2B Dual, ktorý bol defosforylovaný, aby sme zamedzili nožnej ligácii nekohezívnych koncov prázdneho vektora. Po prečistení vektora bola nastavená ligácia cez noc. Ligačná zmes bola zatransformovaná elektroporáciou do elektrokompetentných buniek MEGA X DH10B+1, kolónie boli skontrolované metódou colony PCR pomocou špecifických primerov a vyhodnotené gélovou elektroforézou. Pozitívne kolónie boli zaočkované do tekutého LB média, ktoré obsahovalo antibiotikum kanamycín. Pomocou kitu QIAprep Spin Miniprep Kit boli vyizolované plazmidy z tekutých kultúr, naštiepené restriktívnymi enzýmami Sall-HF a XhoI a vyhodnotené gélovou elektroforézou. Vybrané pozitívne klony boli poslané na sekvenáciu pre kontrolu prítomnosti nezmutovanej sekvencie GFP-ctrl a GFP-LeB4 vo vektore pENTR2B Dual. Následne bolo nutné plazmid naštiepiť enzýmom PvuI v mieste génu rezistencie na kanamycín, pretože zvolený cieľový vektor obsahoval zhodný gén rezistencie. Naštípená DNA bola purifikovaná na kolónke pomocou kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up. Pripravený vstupný klon bol podrobený LR rekombinačnej reakcii s cieľovým vektorom pMDC32. Zmes bola pripravená zmiešaním 150ng DNA GFP-ctrl alebo GFP-LeB4 so 150 ng vektora pMDC32 za prítomnosti 1μl pufru TE a 2μl enzýmu LR Clonase Mix II. LR reakčná zmes bola inkubovaná cez noc na 25°C a na druhý deň zatransformovaná do chemokompetentných *E.coli* TOP 10 pomocou techniky heatshock a vybrané narastené kolónie boli zaočkované do tekutého LB média s kanamycínom. Z tekutých kultúr boli vyizolované plazmidy, naštiepené enzýmom XhoI a vyhodnotené gélovou elektroforézou, ktorá potvrdila prítomnosť GFP-ctrl a LeB4-GFP sekvencií v cieľovom vektore pMDC32. Takto pripravené konštrukty budú vyhodnocované metódou live cell mikroskopie pre potvrdenie funkčnosti propeptidu legumínu B4, ktorý obsahuje signálnu sekvenciu zaciľujúcu proteíny do endoplazmatického retikula. Zároveň boli takto pripravené konštrukty elektroporačne zatransformované do baktérie

Agrobacterium tumefaciens GV 3101 a transformačná zmes bola natretá na misky s LB agarom obsahujúcim antibiotiká kanamycin a gentamicin. Vybrané kolónie boli preočkované do tekutého média, inkubované na 28°C cez noc a na druhý deň stočené na centrifuge. K bakteriálnemu peletu bolo pridané 10mM MES médium, 150µM acetosyringónu a 10mM MgCl₂. Takto pripravená zmes bola pomocou injekčnej striekačky aplikovaná do listov tabaku a tie boli inkubované po dobu troch dní za štandardných kultivačných podmienok.

3.2.1.1 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

Na PCR reakciu bola použitá Phusion HF polymeráza (Thermo Fisher Scientific) s „proof reading“ aktivitou. Zloženie reakčnej zmesi je popísané v Tab. 2 a podmienky pre reakciu v Tab. 3.

Tab. 2 Zloženie PCR zmesi pre Phusion HF polymerázu

Zložka PCR zmesi	Množstvo
DNA templát	50 ng
Phusion HF polymeráza	0,3 µl
5x Phusion HF pufor	4 µl
dNTP's (10 mmol·l ⁻¹)	0,4 µl
Forward primer (5 µM)	2 µl
Reverse primer (5 µM)	2 µl
Voda	Do 20 µl

Tab. 3 Podmienky pre PCR reakciu za použitia Phusion HF polymerázy

PCR krok	Teplota v °C	Čas	Počet cyklov
Začiatková denaturácia	98	30 s	1
Denaturácia	98	10 s	30
Nasadenie primerov	62	30 s	
Syntéza DNA	72	20 s	
Koncová syntéza DNA	72	10 min.	1

3.2.1.2 Colony PCR

Pre PCR reakciu bola použitá Go Taq polymeráza a ako DNA templát boli použité bakteriálne kolónie rozsuspendované v 20 µl vody z ktorých 12,2 µl bolo použitých na

samotnú reakciu. Zloženie reakčnej zmesi bolo popísané v Tab. 4 a podmienky pre reakciu v Tab. 5.

Tab. 4 Zloženie PCR zmesi pre Taq polymerázu

Zložka PCR zmesi	Množstvo
DNA templát	12,2 μ l
Go Taq polymeráza	0,2 μ l
5x GreenTaq pufo	5 μ l
dNTP's (10 mmol·l ⁻¹)	0,5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1,5 μ l
Forward primer (5 μ M)	2,5 μ l
Reverse primer (5 μ M)	2,5 μ l
Voda	Do 25 μ l

Tab. 5: Podmienky pre colony PCR za použitia Go Taq polymerázy

PCR krok	Teplota v °C	Čas	Počet cyklov
Začiatková denaturácia	95	2 min.	1
Denaturácia	95	30 s	26
Nasadanie primerov	55	30 s	
Syntéza DNA	72	1 min.	
Koncová syntéza DNA	72	7 min.	1

3.2.1.3 Gélová elektroforéza

Agarózová gélová elektroforéza bola využívaná pre separáciu pripravených PCR produktov alebo ako kontrola klonovacích krokov, kedy boli plazmidové DNA naštiepené pomocou restričných endonukleáz. Analýza prebiehala vždy v 1% agarózovom géle v prítomnosti TAE pufru (0,01 EDTA a 0,4M tris pH 8). Do gélu bol kvôli detekcii vždy pridaný etídium bromid. Vzorky boli pripravované zmiešaním s 6xLoading Dye (0,03% bromfenolová modrá, 60% glycerol, 60mM EDTA a 0,03% xylencyanol FF) a po následnom nanosení na hotový gél ponorený v pufri, bol nakoniec pridaný Gene Ruler 1kb+ DNA Ladder (5 ul, Fermentas). Agarózová elektroforéza bežala po dobu 30 minút pri napätí 100V a po jej skončení bol gél prenesený na UV-transiluminátor a odfotený pomocou softwaru AlphaDigi Doc.

3.2.1.4 Restriktcia

Vektor pENTR2B Dual a pripravené PCR amplikóny museli byť najprv naštiepené restriktčnými endonukleázami, aby mohli byť následne podrobené ligácii (všeobecné zloženie reakčnej zmesi je popísané v Tab. 6). K zvoleným enzýmom musel byť vždy vybraný špecifický pufor, v ktorom mali oba enzýmy 100% aktivitu. Pomocou restriktčnej analýzy sme zároveň určovali prítomnosť správnych veľkostí pripravených konštruktov (všeobecné zloženie reakčnej zmesi je popísané v Tab. 7). Reakcia prebiehala v inkubátore pri 37°C cez noc.

Tab. 6 Všeobecné zloženie zmesi pre restriktciu

Zložky restriktčnej zmesi	Množstvo
DNA templát	3 µg
Enzým I	0,5 µl
Enzým II	0,5 µl
Pufor	5 µl
Voda	do 50 µl

Tab. 7 Všeobecné zloženie zmesi pre kontrolnú restriktčnú analýzu

Zložky restriktčnej zmesi	Množstvo
DNA templát	3 µl
Enzým I	0,2 µl
Enzým II	0,2 µl
Pufor	1 µl
Voda	do 10 µl

3.2.1.5 Purifikácia DNA

Purifikácia DNA po PCR alebo restriktcii prebiehala pomocou kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up podľa návodu. Najprv bol objem vzorky nariadený do 100 µl vodou a k nemu bolo pridaných 200 µl pufru NTI. Takto pripravená vzorka bola nanosená na kolónku, ktorá bola vložená do 2 ml mikroskúmavky. Mikroskúmavka bola centrifugovaná po dobu 30 sekúnd pri 11000 g a eluát bol odliaty do odpadu. Na kolónku bolo následne pridaných 700 µl pufru NT3 a vzorky boli centrifugované 30 sekúnd pri 11000 g. Po odstránení eluátu nasledovala opätovná centrifugácia pre úplné odstránenie pufru NT3. Na záver bola kolónka presunutá do novej 1,5 ml

mikroskúmvavky, na ňu bolo pridaných 30 µl pufru NE a po 1 minútovej inkubácii a centrifugácii na 12000g bol získaný eluát, ktorý obsahoval purifikovanú DNA.

3.2.1.6 Ligácia

K vektoru, ktorý bol linearizovaný boli pridané 2 µl alkalické fosfatázy po dobu 1 hodiny na 37°C. Následne bol enzým inaktívovaný zahriatím na 75°C na 15 minút a purifikovaný zároveň s PCR amplikónmi pomocou kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up podľa inštrukcií výrobcu. Nakoniec bola nastavená ligačná reakcia cez noc pri 16°C. Zloženie ligačnej zmesi je popísané v Tab. 8. Množstvo PCR produktu v reakcii bolo určené zo

$$\text{vzorca: } PCR \text{ produkt (ng)} = \frac{50 \text{ ng} \times \text{veľkosť PCR produktu v bp} \times 5}{\text{veľkosť vektora v bp}}$$

Tab. 8 Zloženie ligačnej zmesi

Zložky ligačnej zmesi	Množstvo
DNA inzert	Podľa vzorca vyššie
Vektor	50 ng
Pufor pre T4 DNA ligázu	1 µl
T4 DNA ligáza	1 µl
Voda	do 10 µl

3.2.1.7 LR reakcia

LR rekombinačná reakcia prebehla ako so sekvenciami LL-37 S8 a S9 v plazmide transformovaných *E.coli*, tak aj so sekvenciami GFP-ctrl a GFP-LeB4 zaligovaných do vektora pENTR2B Dual spolu s cieľovým vektorom pMDC32. Zmes bola pripravená zmiešaním 150 ng DNA (oboch stratégií a oboch GFP sekvencií) spolu so 150 ng vektora pMDC32. Reakcia prebehla za prítomnosti 1 µl pufru TE a 2 µl enzýmu LR Clonase Mix II. Takto pripravená zmes bola inkubovaná cez noc pri 25°C. Nasledujúci deň bol k reakčnej zmesi pridaný 1 µl proteinázy K (z kitu výrobcu) pre zastavenie reakcie a vzorky boli inkubované 15 minút na 37°C.

3.2.1.8 Transformácia metódou heatshock

Pre metódu heatshock boli vybrané chemokompetentné *E.coli* TOP10, ktoré boli vybrané z mrazničky na -80°C a ponechané rozmraziť na ľade. Zároveň bolo z mrazničky na -20°C vybrané SOC médium a taktiež ponechané rozmraziť za laboratórnej teploty. Ku kompetentným bunkám bolo pridaných 7 µl ligačnej zmesi alebo plazmidovej DNA a zmes bola inkubovaná na ľade po dobu 30 minút. Následne bola zmes

v mikroskúmavke vložená do inkubátora na 50 sekúnd pri 42°C a po ukončení inkubácie bola opäť ponechaná na ľade na 2 minúty. Po uplynutí 2 minút bolo k transformovaným bunkám pridaných 500 µl SOC média a nasledovala inkubácia pri 37°C po dobu 1 hodiny. Na záver bola bakteriálna zmes natretá na LB misky s príslušným antibiotikom a ponechaná v inkubátore na 37°C cez noc.

3.2.1.9 Transformácia metódou elektroporácie

Pre metódu elektroporácie boli vybraté elektrokompetentné *E.coli* TOP10, MEGA X a *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, ktoré boli vybraté z mrazničky na -80°C a ponechané rozmraziť na ľade. Zároveň bolo z mrazničky na -20°C vybraté SOC médium a taktiež ponechané rozmraziť za laboratórnej teploty. K rozmrazeným bunkám bol pridaný 1 µl ligačnej zmesi alebo plazmidovej DNA a zmes bol prepipetovaná do vychladenej elektroporačnej kyvety, v ktorej sa vzorky inkubovali po dobu 3 minút. Následne bola kyveta vysušená, vložená do elektroporátora a prebehol impulz pri 1800V po dobu 5 ms. Hneď po impulze bolo do kyvety pridaných 500 µl SOC média a zmes, ktorá bola presunutá do 1,5 ml mikroskúmavky bola inkubovaná na 37°C (28°C pre *Agrobacterium tumefaciens*) za stáleho trepania po dobu 1 hodiny (4 hodiny pre *Agrobacterium tumefaciens*). Po inkubácii bola bakteriálna zmes natretá na LB misky s odpovedajúcim antibiotikom a ponechaná v inkubátore cez noc na 37°C/28°C.

3.2.1.10 Izolácia plazmidov

Izolácia plazmidov prebiehala pomocou kitu QIAprep Spin Miniprep Kit podľa návodu. Prvým krokom bola centrifugácia 2 ml bakteriálnej kultúry po dobu 3 minút pri 5000 g. Bakteriálny pelet bol rozsuspendovaný v 250 µl pufru P1, následne bolo hneď pridaných 250 µl pufru P2, kedy bola mikroskúmavka v ruke opatrne otáčaná a inkubovaná 4 minúty. Po pridaní 350µl pufru N3 bola mikroskúmavka opäť opatrne otáčaná a následne hneď centrifugovaná po dobu 10 minút na 13000 g. 800 µl supernatantu bolo nanosených na kolónku v novej mikroskúmavke a opäť stočených po dobu 1 minúty na 11000 g. Eluát bol odliaty do odpadu a na kolónku bolo nanosených 750 µl pufru PE, po ktorom nasledovala centrifugácia po dobu 1 minúty na 13000 g. Po opätovnom odliatí eluátu bola mikroskúmavka opäť sцентрифugovaná pre úplné odstránenie pufru PE. Nakoniec bola kolónka prenesená do novej mikroskúmavky

o objeme 1,5 ml a na kolónku bolo nanosených 50 μ l vody. Po scentrifugovaní po dobu 1 minúty pri 12000 g sme získali plazmidovú DNA.

3.2.1.11 Sekvenácia

Vzorky na sekvenáciu obsahovali 500 ng plazmidovej DNA, ktorá bola vyizolovaná pomocou kitu QIAprep Spin Miniprep Kit, a 5 μ l špecifického primeru o koncentrácii 5 μ mol/l. Celkový objem pozostával z 10 μ l a takto pripravená zmes bola odoslaná na sekvenáciu.

3.2.2 Transformácia listov tabaku baktériou *Agrobacterium tumefaciens*

Bakteriálne kolónie, ktoré obsahovali konštrukty LL-37 S8 a LL-37 S9 boli zaočkované do tekutého LB média, obsahujúceho antibiotiká kanamycin a gentamicin a inkubované na niekoľko hodín na 28°C za stáleho trepania, kým nebola dosiahnutá OD₆₀₀ (optická hustota pri 600 nm) medzi 0,2-0,3. Po overení hustoty pomocou spektrofotometra boli kolónie centrifugované 2x pri 2000g a následne bol odstránený supernatant. Bakteriálny pelet bol rozsuspendovaný v 2 ml pufru o pH 5,6 obsahujúcom 10mM MES, 150 μ M acetosyringón a 10mM MgCl₂. Takto pripravená zmes bola inkubovaná 2 hodiny pri laboratórnej teplote. Po inkubácii bola zmes natiahnutá do 1ml injekčnej striekačky, pomocou ktorej boli infiltrované listy tabaku z prieduchovej strany (spodnej). Do každého miesta infiltrácie bolo pridaných približne 200 μ l bakteriálnej suspenzie. Po agroinfiltrácii boli listy inkubované po dobu troch dní vo fytotrone pri 16/8 (deň/noc) režime.

3.2.3 SDS-PAGE elektroforéza

Do aparatúry pre SDS-PAGE elektroforézu bol vložený komerčne dostupný NuPage 4-12 % Bis-Tris precast gél od firmy Thermo Fisher Scientific. Následne bol priliaty komerčný Bis-Tris pufo a do jamiek v géle boli nanosené vzorky (30 μ l), ktoré boli vopred pripravené. Do jednej jamky bol nanosený aj marker Novex Sharp Pre-stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific). Elektroforéza bežala pri 150V po dobu 30-40 minút, tak aby čelo elektroforézy nevyputovalo z gélu.

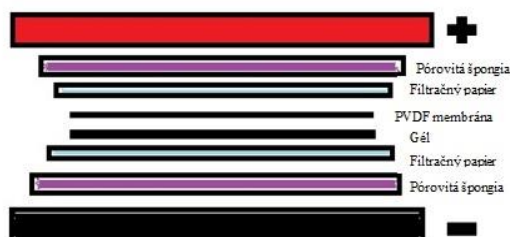
3.2.4 Western blot

PVDF membrána bola vystrihnutá na presnú veľkosť gélu a aktivovaná v metanole. Dva hrubé filtračné papiere a dve pórovité špongie boli namočené do blotovacieho

pufra. Následne bol zostavený sendvič (Obr. 7) obsahujúci pórovitú špongiu na ktorú bol položený namočený filtračný papier, gél a PVDF membrána, ktorá bola zakrytá opäť filtračným papierom a pórovitou špongiou. Všetky bublinky boli odstránené pomocou veľkej plastovej špachtle, ktorou bol prejdený vrch membrány. Takto pripravený sendvič bol následne vložený do blotovacej aparatury a zaliaty blotovacím pufrom. Hotová aparátúra bola vložená do chladničky a prenos prebiehal pri 100V 1 hodinu a následne cez noc pri 30V.

Pre potvrdenie úspešného prenosu bola membrána zafarbená amidočernou 10B a pre lepšiu orientáciu bol marker a jamky označené ceruzkou. Membrána bola následne premytá destilovanou vodou, kým sa všetky bandy neodfarbili. Nasledovalo blokovanie membrány 5% sušeným mliekom v TBS-T pufri po dobu jednej hodiny a potom inkubácia s 2 ml 1% sušeného mlieka rozpusteného v TBS-T pufri, ktoré obsahovalo primárnu protilátku taktiež po dobu 1 hodiny. Po skončení inkubácie bola membrána premytá 5 minút v TBS-T pufri a 2x5 minút v TBS pufri. Membrána bola následne inkubovaná po dobu 1 hodiny v 20 ml 1% sušeného mlieka v TBS-T pufri, ktoré obsahovalo sekundárnu protilátku. Na záver bola membrána posledný krát premytá 1x5 minút v TBS-T pufri a 2x5 minút v TBS pufri. Všetky inkubácie prebiehali na orbitálnej trepačke za stáleho pretrepávania.

Analýza membrány prebiehala pomocou chemiluminiscenčnej reakcie po zmiešaní 10 ml peroxidasy s 10 ml príslušného pufra (1:1). Takto pripravený roztok bol naliaty na membránu a tá bola ihneď analyzovaná pomocou systému ChemiDoc MP.

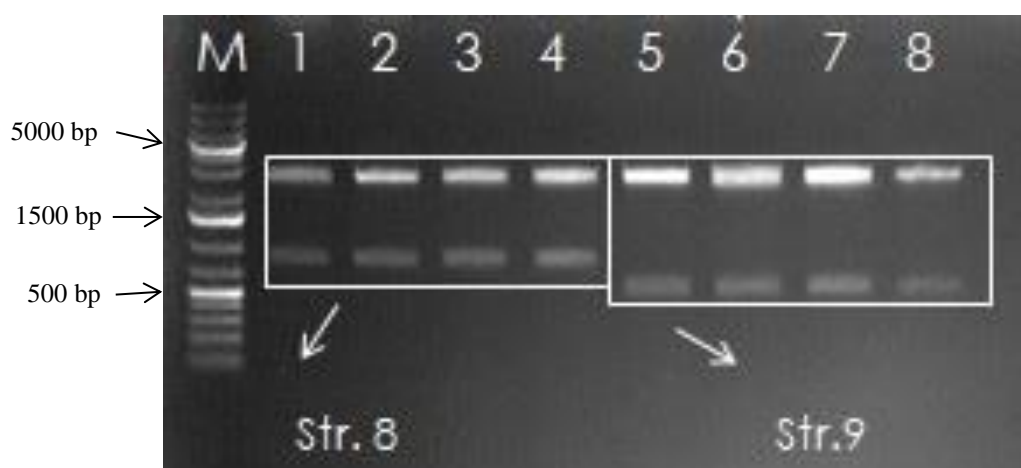


Obr. 7 Schéma usporiadania vrstiev v sendviči pre elektroblotting.

4 Výsledky

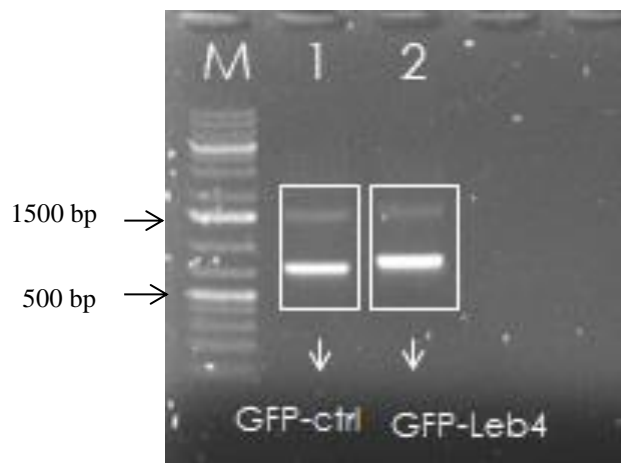
4.1 Príprava a overenie DNA materiálu

Pre prípravu katelicidínových konštruktov vhodných pre transformáciu tabakových listov boli použité syntetické konštrukty (navrhnuté ako „entry klony“ kompatibilné s Gateway technológiou) of firmy Thermo Fisher Scientific vo vektore pMK-RQ (LL-37 S8 a LL-37 S9 – viz. kapitola 3.1.5). Týmto boli zatransformované chemokompetentné bunky *E.coli* TOP 10 a následne z nich bola vyizolovaná plazmidová DNA pomocou minipreparatívnej izolácie. Pre kontrolu prítomnosti inzertu v plazmide bola uskutočnená restričná analýza enzýmami BamHI-HF a XhoI, ktorá bola vyhodnotená gélovou elektroforézou (Obr. 8). Výsledok potvrdil prítomnosť našej sekvencie v plazmide *E.coli* o očakávanej veľkosti (LL-37 S9 – očakávaná veľkosť inzertu 534 bp, LL-37 S8 – očakávaná veľkosť inzertu 798 bp).



Obr. 8 Elektroforeogram – kontrolná restričná analýza miniprepovej DNA katelicidínových konštruktov v plazmide pMK-RQ (LL-37 S8 a S9) enzýmami BamHI a XhoI. M - Gene Ruler 1kb+ DNA Ladder.

Pre prípravu GFP konštruktov bolo nutné tieto sekvencie najprv amplifikovať PCR reakciou pomocou špecifických primerov (GFPSall_FW01, GFPSall_FW02 a GFPXhoI_RE01), vďaka ktorým PCR produkty obsahovali restričné miesta pre enzýmy SallI a XhoI. Týmto enzýmami boli následne naštiepené oba amplikóny GFP-ctrl (745 bp) a GFP-LeB4 (811 bp). DNA bola prečistená na kolónke pomocou kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up a rozpustená v objeme 30 μ l elučného pufru NE. Úspešnosť bola overená gélovou elektroforézou (Obr. 9), ktorá potvrdila správne veľkosti oboch GFP sekvencií.



Obr. 9 Elektroforeogram – kontrolná analýza po restrikcii amplikónov GFP-ctrl a GFP-LeB4 po PCR reakcii pomocou enzýmov Sall a XhoI. Na gél boli nanesené 3 μ l vzorky z celkového objemu 30 μ l. M - Gene Ruler 1kb+ DNA Ladder.

4.2 Ligácia GFP-ctrl a GFP–LeB4 do vektora pENTR2B Dual

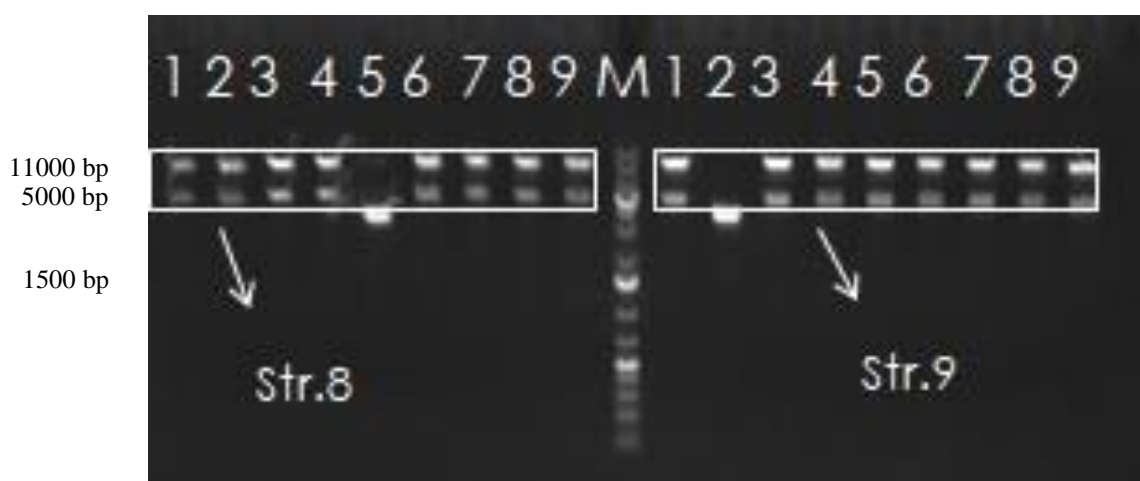
Po naštípení amplikónov GFP-ctrl a GFP-LeB4 enzýmami Sall-HF a XhoI, bolo nutné tak isto naštípiť aj vektor pENTR2B Dual, ktorý bol následne ešte defosforylovaný. Ligácia prebiehala podľa postupu, ktorý je podrobne popísaný v kapitole 3.2.1.6. Ligačná zmes bola potom zatransformovaná do elektrokompetetných buniek MEGA X DH10B+1. Na miskách narástlo približne 50 kolónií, z ktorých bolo zaočkované pre minipreparatívnu izoláciu DNA. Úspešnosť transformácie bola overená restrikčnou analýzou opäť s pomocou enzýmov Sall-HF a XhoI a vyhodnotená gélovou elektroforézou (Obr. 10), ktorá potvrdila prítomnosť inzertu v plazmide v dvoch prípadoch pre GFP-ctrl a takisto v dvoch prípadoch pre GFP-LeB4 (veľkosť pENTR2B Dual – 3755bp).



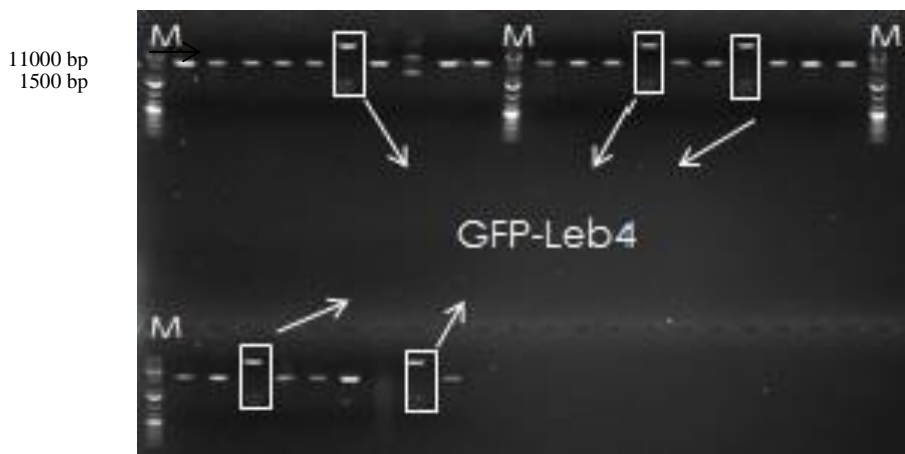
Obr. 10 Elektroforeogram – kontrolná restrikčná analýza plazmidu pENTR2B Dual enzýmami Sall a XhoI so zaligovanými sekvenciami GFP-ctrl a GFP-LeB4. M - Gene Ruler 1kb+ DNA Ladder.

4.3 LR reakcia do cieľového vektora pMDC32

Pripravené vstupné klony LL-37 S8 a S9 (v plazmide pMK-RQ), pENTR2B Dual s GFP-ctrl a pENTR2B Dual s GFP-LeB4 boli podrobené LR rekombinačnej reakcii s cieľovým vektorom pMDC32, ktorý umožňuje silnú konštitutívnu expresiu pod kontrolou promotóru 35S. LR rekombinačná reakcia prebiehala podľa postupu podrobne popísaného v kapitole 3.2.1.7. LR reakčná zmes bola v prípade LL-37 S8 a S9 zatransformovaná do elektrokompetentných *E.coli* TOP 10 a v prípade pENTR2B Dual do chemokompetentných *E.coli* TOP 10. Na miskách narástlo radovo pár desiatok kolónií, z ktorých bolo zaočkované pre minipreparatívnu izoláciu plazmidovej DNA, ktorá bola následne pre kontrolu naštiepená restriktčnými enzýmami (BsiWI pre LL-37 S8 a S9, XhoI pre GFP-ctrl a GFP-LeB4) a vyhodnotená gélovou elektroforézou (Obr. 11 a Obr. 12). Pozitívne kolónie boli následne poslané na sekvenáciu, ktorá potvrdila prítomnosť nezmutovaných sekvencií v cieľovom vektore pMDC32 (veľkosť plazmidu 11752bp).



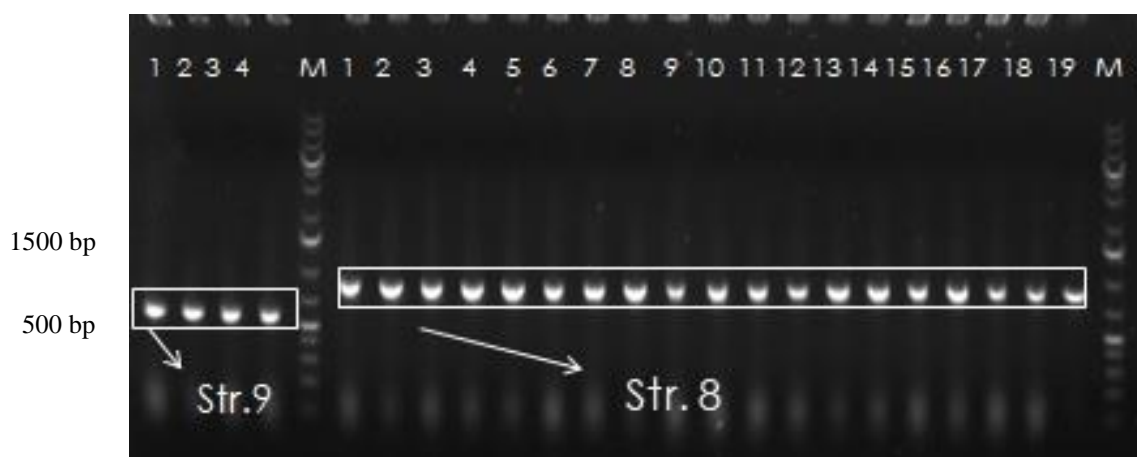
Obr. 11 Elektroforeogram – kontrolná restriktčná analýza po rekombinácii katelicidínových konštruktov (LL-37 S8 a S9) do cieľového vektora pMDC32 enzýmom BsiWI. 8 pozitívnych klonov pre LL-37 S8 a 8 pozitívnych klonov pre LL-37 S9 (označené rámečkom). M - Gene Ruler 1kb+ DNA Ladder.



Obr. 12 Elektroforeogram – kontrolná restričná analýza po rekombinácii GFP konštruktov (GFP-ctrl a GFP-LeB4) do cieľového vektora pMDC32 enzýmom XhoI. Veľkosť plazmidu pMDC32 je 11752 bp. Pozitívne kolónie sú označené rámčekom. M - Gene Ruler 1kb+ DNA Ladder.

4.4 Transformácia do baktérie *Agrobacterium tumefaciens*

Pripravené katelicidínové konštrukty v cieľovom vektore pMDC32 boli elektroporáciou zatransformované do baktérie *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101. Narastené kolónie na miskách s rezistenciou na kanamycin a gentamicin boli preskúvané pomocou colony PCR za použitia primerov špecifických pre attL oblasti (GWATTL1FW, GWATTL2RE) plazmidu pMDC32 a vyhodnotené gélovou elektroforézou (Obr. 13). Výsledok elektroforézy potvrdil prítomnosť katelicidínových fúzií (LL-37 S9 – očakávaná veľkosť PCR produktu 579 bp, LL-37 S8 – očakávaná veľkosť PCR produktu 849 bp) v baktérii *Agrobacterium tumefaciens*.



Obr. 13 Elektroforeogram – kontrolná colony PCR reakcia narastených kolónií baktérie *Agrobacterium tumefaciens* s prítomnosťou katelicidínových fúzií. Pozitívne kolónie sú označené rámčekom. M - Gene Ruler 1kb+ DNA Ladder.

4.5 Transformácia tabakových listov a Western blotting

Prítomnosť katelicidínových fúzií v transformovaných listoch tabaku metódou tranzientnej expresie pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens* bola dokázaná metódou Western blottingu. Ako vstupný materiál slúžili listy tabaku 3 dni po transformácii baktériou *Agrobacterium tumefaciens*, ktorá niesla plazmidy pre LL-37 S8 alebo LL-37 S9 v plazmide pMDC32 (podrobne popísané v kapitole 3.2.2). Vzorky boli pripravené zmiešaním 200 mg zhomogenizovaných listov po rozdrvení v tekutom dusíku spolu s 200 μ l 2x SDS pufri. Vzorky boli najprv 25 minút inkubované na ľade a potom 5 minút povarené pri 95°C. Nasledovala centrifugácia 2x 5 minút pri 14000g a pripravený supernatant bol znovu nariadený v 1x SDS pufri: 5 μ l, 3 μ l alebo 1 μ l hrubého proteínového extraktu v SDS pufri bolo nariadených do celkového objemu 30 μ l 1x SDS pufri a nanosených na gél. Ako negatívna kontrola slúžili WT listy tabaku extrahované za rovnakých podmienok ako u LL-37 S8 a LL-37 S9 (5 μ l hrubého proteínového extraktu bolo nariadených do 30 μ l 1xSDS pufri a nanosených na gél).

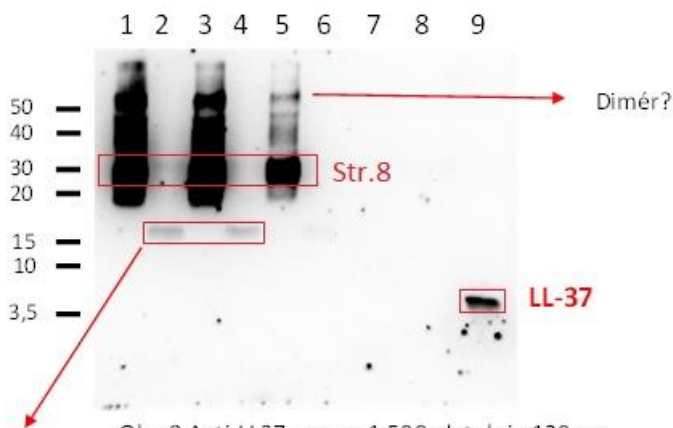
Pomocou tejto metódy sme testovali obe navrhnuté stratégie (S8 a S9) za využitia monoklonálnej protilátky proti LL-37 a oba GFP konštrukty pomocou polyklonálnej protilátky proti GFP. Zatiaľ čo expresie GFP sa nám v prvom experimente overiť nepodarilo a bude potrebné ďalej optimalizovať riedenie protilátky, v prípade LL-37 S8 a S9 sme získali jednoznačné výsledky (Obr. 14 a 15). LL-37 S8 (teoretická veľkosť fúzneho proteínu 28.8 kDa) vykazovala silný signál pri vyhodnotení luminiscencie už po 10 sekundách detekcie a to aj pri nanosení veľmi malých množstiev vzorky (1 μ l hrubého proteínového extraktu). LL-37 S9 (teoretická veľkosť fúzneho proteínu 19.4 kDa) bola taktiež exprimovaná, no v porovnaní so LL-37 S8 iba slabo a jej veľkosť bola trochu nižšia ako očakávaná, čo môže vypovedať o čiastočnej degradácii proteínu. Túto fúznu formu sa podarilo zaznamenať až po 120 sekundovej detekcii.

V prípade GFP-ctrl a GFP-LeB4 sa nepodarilo detekovať signál ani pri 5 minútovej detekcii.



Obr. 7 Anti-LL37 mouse 1:500, detekcia 10 sec

Obr. 14 Testovanie LL-37 S8 a LL-37 S9 pomocou metódy Western blot – tranzientná expresia v listoch tabaku, 3 dni po transformácii – po 10 sekundovej expozícii. Použitý Marker - Novex Sharp Pre-stained Protein Standard. 1-6: - hrubé proteínové extrakty z listov tabaku po transformácii konštruktmi LL-37 S8 a S9 v plazmide pMDC32: 1 – LL-37 S8 s použitím 5µl proteínového extraktu, 2 – LL-37 S9 s použitím 5µl extraktu, 3 – LL-37 S8 s použitím 3µl extraktu, 4- LL-37 S9 s použitím 3µl extraktu, 5 – LL-37 S8 s použitím 1µl extraktu, 6 – LL-37 S9 s použitím 1 µl extraktu, 7 a 8 – negatívna kontrola (5ul extraktu z WT tabakových listov), 9 – pozitívna kontrola čistého LL-37 (komerčne dodaný syntetický peptid o veľkosti 4,5 kDa). Použitá primárna protilátka 1:500 anti-LL37 myšacia.



Obr. 8 Anti-LL37 mouse 1:500, detekcia 120 sec

Fragment Str. 9?

Obr. 15 Testovanie LL-37 S8 a LL-37 S9 pomocou metódy Western blot – tranzientná expresia v listoch tabaku, 3 dni po transformácii – po 120 sekundovej expozícii. Použitý Marker - Novex Sharp Pre-stained Protein Standard. 1-6: - hrubé proteínové extrakty z listov tabaku po transformácii konštruktmi LL-37 S8 a S9 v plazmide pMDC32: 1 – LL-37 S8 s použitím 5µl proteínového extraktu, 2 – LL-37 S9 s použitím 5µl extraktu, 3 – LL-37 S8 s použitím 3µl extraktu, 4- LL-37 S9 s použitím 3µl extraktu, 5 – LL-37 S8 s použitím 1µl extraktu, 6 – LL-37 S9 s použitím 1 µl extraktu, 7 a 8 – negatívna kontrola (5ul extraktu z WT tabakových listov), 9 – pozitívna kontrola čistého LL-37 (komerčne dodaný syntetický peptid o veľkosti 4,5 kDa). Použitá primárna protilátka 1:500 anti-LL37 myšacia.

5 Diskusia

Experimentálnymi cieľmi tejto práce bolo klonovanie konštruktov pre expresiu ľudského katelicidínu LL-37, GFP konštruktov pre kontrolu funkčnosti propeptidu LeB4 v rastlinách a následne testovanie pripravených konštruktov pomocou tranzientnej expresie v listoch tabaku. Vytýčené ciele sa nám z väčšej časti podarilo splniť, pretože všetky použité DNA sekvencie, či už LL-37 S8 a LL-37 S9 alebo GFP-ctrl a GFP-LeB4 sa nám podarilo úspešne vklonovať do cieľového vektora pMDC32 (Obr. 11 a 12) a následne aj do baktérie *Agrobacterium tumefaciens* (Obr. 13). Elektroforeogram GFP-ctrl v cieľovom vektore pMDC32 nebol v bakalárskej práci uverejnený, pretože restričná analýza spoľahlivo nepotvrdila prítomnosť inzertu, ale sekvenčná reakcia jednoznačne ukázala prítomnosť správneho inzertu v cieľovom vektore pMDC32. Nepresvedčivosť elektroforeogramu bola spôsobená manipuláciou s elektroforetickou komôrkou z dôvodu poruchy v čase kedy boli vzorky už uprostred separácie.

Bohužiaľ sa nám nepodarilo dokázať úspešnosť exprimácie GFP sekvencií v listoch tabaku, pretože výsledok metódy Western blot bol v oboch prípadoch negatívny. Tento problém nastal pravdepodobne kvôli použitiu protilátok, ktoré neboli funkčné, ale bolo zvolené príliš veľké riedenie protilátky. Každopádne budú tieto dva kontrolné konštrukty využité pre pozorovanie pomocou live cell mikroskopie, aby bola overená účinnosť propeptidu legumínu B4 vo forme fúzneho konštruktú s GFP sekvenciou, či naozaj zacielfuje proteíny do endoplazmatického retikula. V prípade GFP-ctrl by sme teda mali zaznamenať GFP signál v jadre, zatiaľ čo u GFP-LeB4 by sa tento signál mal nachádzať v endoplazmatickom retikule.

Na rozdiel od GFP sekvencií sa nám podarilo otestovať funkčnosť oboch navrhnutých stratégií (konštrukty LL-37 S8 a S9 v cieľovom vektore pMDC32) pomocou tranzientnej expresie v listoch *Nicotiana benthamiana*, kedy výsledky potvrdili, že obe tieto stratégie sú funkčné. Ich stupeň exprimácie však nebol rovnaký. Kým LL-37 S8 vykazovala silný stupeň signálu už po 10 sekundovej detekcii a fragmenty boli o očakávanej veľkosti (28,8 kDa) (Obr. 14), čo svedčí o silnej úrovni proteínovej expresie v listoch tabaku a dá sa očakávať, že podobné výsledky by mohli byť dosiahnuté aj po prenesení tejto stratégie do endospermu jačmeňa, LL-37 S9 bola detekovaná až po 120 sekundách, jej signál bol omnoho slabší a zároveň jej fragmenty vykazovali menšiu veľkosť aká bola očakávaná (19,4 kDa) (Obr.15), čo mohlo byť spôsobené čiastočnou degradáciou tohto proteínu.

Výsledkom z Western blotu sme dokázali, že obe tieto stratégie sú exprimované v tabaku ako testovacej platforme a sú teda vhodné pre budúcu transformáciu jačmeňa. Môžeme očakávať, že LL-37 S8 môže byť v budúcnosti úspešnejšia, ale po prenose oboch stratégií do jačmeňa môžeme pozorovať určité odchýlky od modelovej rastliny *Nicotiana benthamiana* a z tohto dôvodu budeme ďalej testovať v jačmeni obe navrhnuté stratégie.

Pozitívny výsledok je pre tento výskum veľkým prínosom, pretože zatiaľ už overené pozitívne stratégie, ktoré sa podarilo zatransformovať do endospermu jačmeňa neprejavili vysoký stupeň exprimácie. Kvôli tomu sa pokračuje v testovaní ďalších navrhnutých stratégií, ktoré by potenciálne mohli zvýšiť výtazok katelicidínu za súčasného zníženia nákladov na jeho produkciu v jačmeni. Vďaka úspešnej exprimácii Stratégie 8, ktorá prejavila vysokú úroveň signálu aj za použitia veľmi malého množstva vzorky (1 μ l) a to už po 10 sekundovej detekcii sa môžeme domnievať, že by práve táto stratégia mohla byť tou správnou pre veľkoformátovú produkciu katelicidínu v jačmeni ako produkčnej platforme.

6 Záver

V bakalárskej práci bola teoretická časť zameraná na všeobecný popis antimikrobiálnych peptidov, ktoré boli ďalej sústredené na ľudský katelicidín LL-37. V ďalšej časti bolo vysvetlené, čo je to molekulárne farmárčenie, aké výhody majú rastlinné produkčné platformy, kde a ako sa v semenách rastlín akumulujú proteíny a prečo sú jačmeň a tabak vhodnými platformami pre túto formu produkcie významných farmaceutických látok. Následne bolo objasnené čím je významná baktéria *Agrobacterium tumefaciens* a ako prebieha transformácia rastlín pomocou tejto baktérie. Na záver bolo v teoretickej časti vysvetlené aké rôzne látky môžeme využívať na prípravu konštruktov pre heterológnu proteínovú expresiu v rastlinách.

Experimentálna časť bola najprv zameraná na klonovanie sekvencií GFP-ctrl, GFP-LeB4, LL-37 S8 a S9 do cieľového vektora pMDC32, ktorý je vhodný pre tranzientnú expresiu v listoch tabaku. Tento vektor bol následne vložený do baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, pomocou ktorej boli následne transformované listy tabaku. Tieto listy boli zhomogenizované a prítomnosť katelicidínových fúzií a GFP sekvencií bola overená metódou Western blot, ktorá potvrdila úspešnú proteínovú expresiu oboch navrhnutých stratégií (8 aj 9), no zároveň vykazovala negatívny výsledok pre obe GFP sekvencie, kde musí byť otestovaná funkčnosť protilátky a zároveň optimalizované jej nariadenie.

7 Literatúra

- Abiri R., Valdiani A., Maziah M., Shaharuddin N.A., Sahebi M., Yusof Z.Y., Atabaki N., Talei D.A. (2015): Critical review of the concept of transgenic plants: Insights into pharmaceutical biotechnology and molecular farming. *Current Issues in Molecular Biology* **18**, 21–42.
- Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., Lindbom L., Kiessling R., Jornvall H., Wigzell H., Gudmundsson G.H. (2000): The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood Journal* **96**, 3086-3093.
- Agier J., Efenberger M., Brzezińska-Błaszczuk E. (2015): Cathelicidin impact on inflammatory cells. *Central European Journal of Immunology* **40**, 225–235.
- Ahmed O.A., Hosny K.M., Al-Sawahli M.M., Fahmy U.A. (2015): Optimization of caseinate-coated simvastatin-zein nanoparticles: improved bioavailability and modified release characteristics. *Drug Design, Development and Therapy* **9**, 655–662.
- Akiva E., Itzhaki Z., Margalit H. (2008): Built-in loops allow versatility in domain–domain interactions: Lessons from self-interacting domains. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **105**, 13292–13297.
- Arnau J., Lauritzen C., Petersen G.E., Pedersen J. (2006): Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* **48**, 1–13.
- Axen A., Carlsson A., Engstrom A., Bennich H. (1997): Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora* pupae. *European Journal of Biochemistry* **247**, 614- 619.
- Bals R., Wang X., Zasloff M., Wilson J.M. (1998): The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9541-9546.
- Bals R. (2000): Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respiratory Research* **1**, 141-150.
- Bateman A., Singh A., Congote L.F., Solomon S. (1991): The effect of HP-1 and related neutrophil granule peptides on DNA synthesis in HL60 cells. *Regulatory Peptides* **35**, 135-143.
- Boman H. G., Agerberth B., Boman A. (1993): Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infecton and Immunity* **61**, 2978-2984.
- Boothe J., Nykiforuk C., Shen Y., Zaplachinski S. *et al.* (2010): Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 588–606.
- Borisjuk L., Rolletschek H., Radchuk R., Weschke W. *et al.* (2004): Seed development and differentiation: A role for metabolic regulation. *Plant Biology* **6**, 375–386.
- Bornhorst J. A., Falke J. J. (2000): [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods in Enzymology* **326**, 245–254.
- Brogden K. A., (2005): Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**, 238–250.
- Conley A.J., Joensuu J.J., Menassa R., Brandle J.E. (2009): Induction of protein body formation in plant leaves by elastin-like polypeptide fusions. *BMC Biology* **7**, 48.
- Conrad U., Fiedler U. (1998): Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant Molecular Biology* **38**, 101–109.
- Cowland J.B., Johnsen A.H., Borregaard N. (1995): hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Letters* **368**, 173-176.
- Cunha N., Murad A., Ramos G., Maranhao A. Q. *et al.* (2011): Accumulation of functional recombinant human coagulation factor IX in transgenic soybean seeds. *Transgenic Research* **20**, 841–855.

- Davidopoulou S., Diza E., Sakellari D., Menexes G., Kalfas S. (2013): Salivary concentration of free LL-37 in edentulism, chronic periodontitis and healthy periodontium. *Archives of Oral Biology* **58**, 930–934.
- DeCLEENE M., DeLEY J. (1976): The host range of crown gall. *The Botanical Review* **42**, 389-466.
- De Smet K., Contreras R. (2005): Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters* **27**, 1337-1347.
- Dillen W., Clercq J., Kapila J., Zambre M., Montagu M., Angenon G. (1997): The effect of temperature on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to plants. *The Plant Journal* **12**, 1459-1463.
- Downing W. L., Galpin J. D., Clemens S., Lauzon S. M. *et al.* (2006): Synthesis of enzymatically active human α -1-iduronidase in *Arabidopsis* cgl (complex glycan-deficient) seeds. *Plant Biotechnology Journal* **4**, 169–181.
- Draper J., Scott R., Armitage P., Walden R. (1988): *Plant Genetic Transformation and Gene Expression, A Laboratory Manual*. Blackwell Scientific Publications Ltd, London, 366 strán.
- Dwyer D. M., He L., James M., Nelson A., Middelberg A.P.J. (2013): Insights into the role of protein molecule size and structure on interfacial properties using designed sequences. *Journal of the Royal Society Interface* **10**, 80.
- Dwyer D. M., Brech M., Yu L., Middelberg A. (2014): Intensified expression and purification of a recombinant biosurfactant protein. *Chemical Engineering Science* **105**, 12–21.
- Engstrom P., Carlsson A., Engstrom A, Tao Z.J., Bennich H. (1984): The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal* **3**, 3347-3351.
- Erlendsson L. S., Muench M. O., Hellman U., Hrafnkelsdóttir S. M. *et al.* (2010): Barley as a green factory for the production of functional Flt3 ligand. *Biotechnology Journal* **5**, 163–171.
- Floss D.M., Sack M., Stadlmann J., Rademacher T., Scheller J., Stoger E., *et al.* (2008): Biochemical and functional characterization of anti-HIV antibody-ELP fusion proteins from transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal* **6**, 379–391.
- Floss D.M., Sack M., Arcalis E., Stadlmann J., Quendler H., Rademacher T., *et al.* (2009): Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus neutralizing antibody. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 899–913.
- Frohm M., Agerberth B., Ahangari G., Stahle-Backdahl M., Liden S., Wigzell H., Gudmundsson G.H. (1997): The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 15258-15263.
- Gallili G., Altschuler Y., Levanony H. (1993): Assembly and transport of seed storage proteins. *Trends in Cell Biology* **3**, 437–442.
- Gallili G., Sengupta-Gopalan C., Ceriotti A. (1998): The endoplasmic reticulum of plants and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. *Plant Molecular Biology* **38**, 1–29.
- Gaudin V., Vrain T., Jouanin L. (1994): Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **32**, 11-29.
- Gelvin S.B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the ‘gene jockeying’ tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 16-37.
- Gennaro R., Skerlavaj B., Romeo D.(1989): Purification, composition, and activity of two bacterenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infection and Immunity* **57**, 3142–3146.
- Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. (2005): Magniflection-a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine* **23**, 2042-2048.
- Gomord C., Denmat L.A., FitchetteLaine A.C., Satiat-Jeunemaitre B., Hawes C., Faye L. (1997): The C-terminal HDEL sequence is sufficient for retention of secretory proteins in the endoplasmic reticulum (ER) but promotes vacuolar targeting of proteins that escape the ER. *The Plant Journal* **11**, 313-325.

- Gong S.J., Sun S.X., Sun Q.S., Wang J.Y., Liu X.M., Liu G.Y. (2011): Tablets based on compressed zein microspheres for sustained oral administration: design, pharmacokinetics, and clinical study. *Journal of Biomaterials Applications* **26**, 195–208.
- Gudmundsson G.H., Agerberth B., Odeberg J., Bergman T., Olsson B., Salcedo R. (1996): The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *European Journal of Biochemistry* **238**, 325-332.
- Gutierrez S.P., Saberianfar R., Kohalmi S.E., Menassa R. (2013): Protein body formation in stable transgenic tobacco expressing elastin-like polypeptide and hydrophobin fusion proteins. *BMC Biotechnology* **13**, 40.
- Hecht M.H., Richardson J.S., Richardson D.C., Ogden R.C. (1990): De novo design, expression, and characterisation of Felix — a 4-helix bundle protein of native-like sequence. *Science* **249**, 884–891.
- Hensel G., Floss D M , Arcalis E , Sack M , Melnik S , Altmann F., *et al.*, (2015): Transgenic Production of an Anti HIV Antibody in the Barley Endosperm. *PLoS ONE* **10(10)**: e0140476
- Herman E. M., Larkins B. A. (1999): Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* **11**, 601–614.
- Hilchie A.L., Wuerth K., Hancock R.E.W. (2013): Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Nature Chemical Biology* **9**, 761–768.
- Hofbauer A., Stoger E. (2013): Subcellular accumulation and modification of pharmaceutical proteins in different plant tissues. *Current Pharmaceutical Design* **19**, 5495–5502.
- Hurtado-Lopez P., Murdan S. (2006a): Zein microspheres as drug/antigen carriers: a study of their degradation and erosion, in the presence and absence of enzymes. *Journal of Microencapsulation* **23**, 303–314.
- Hurtado-Lopez P., Murdan S. (2006b): An investigation into the adjuvanticity and immunogenicity of zein microspheres being researched as drug and vaccine carriers. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **58**, 769–774.
- Cheng M., Lowe B.A., Spencer T.M., Ye X., Armstrong CH.L. (2004): Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* **40(1)**, 31-45.
- Cheng Y., Prickett M.D., Gutowska W., Kuo R., Belov K., Burt D.W. (2015): Evolution of the avian - defensin and cathelicidin genes. *BMC Evolutionary Biology* **15**, 188.
- Chitnis S.N., Kameswari D.B., Prasad K.S. (1993): Induction of autolysis in starved *Escherichia coli* cells by seminalplasmin, an antimicrobial protein from bovine seminal plasma. *FEMS Microbiology Letters* **112**, 147-150.
- Ibl V., Stoger E. (2012): The formation, function and fate of protein storage compartments in seeds. *Protoplasma* **249(2)**, 379-392.
- Ivanović L., Milašević I., Durović D., Topalović A., Knežević M., Mugoša B., Vrvčić M.M. (2016): Application of plant biotechnology techniques in antioxidant production. *Agriculture & Forestry* **62(1)**, 325-342.
- James M. G., Denyer K., Myers A. M. (2003): Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 215–222.
- Jiang L., Phillips T. E., Hamm C. A., Drozdowicz Y. M. *et al.* (2001): The protein storage vacuole: A unique compound organelle. *The Journal of Cell Biology* **155**, 991–1002.
- Johansson J., Gudmundsson G.H., Rottenberg M.E., Berndt K.D., Agerberth B. (1998): Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 3718–3724.
- Kamenarova K., Abumhadi N., Gecheff K., Atanassov A. (2005): Molecular farming in plants: an approach of agricultural biotechnology. *Journal of Cell and Molecular Biology* **4**, 77-86.
- Karg S.R., Kallio, P.T. (2009): The production of biopharmaceuticals in plant systems. *Biotechnology Advances* **27**, 879-894.
- Khan I., Twyman M.R., Arcalis E., Stoger E. (2012): Using storage organelles for the accumulation and encapsulation of recombinant proteins. *Biotechnology Journal* **7**, 1099-1108.

- Khurshid Z., Naseem M., Asiri F. Y., Mali M., Khan R. S., Sahibzada H.A., Zafar M.S., Moin S.F., Khan E. (2017): Significance and Diagnostic Role of Antimicrobial Cathelicidins (LL-37) Peptides in Oral Health. *Biomolecules* **7**(4), 80.
- Ko K., Steplewski Z., Glogowska M., Koprowski H. (2005): Inhibition of tumor growth by plant-derived mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7026-7030.
- Kumlehn J. (2014): Haploid technology. In: *Biotechnological approaches to barley improvement*. 69, *Biotechnology in agriculture and forestry*. (Kumlehn J., Stein N. ed.), Springer, Berlin, 379–392.
- Lacroix B., Li J., Tzfira T., Citovsky V. (2006): Will you let me use your nucleus? How Agrobacterium gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **84**, 333–345.
- Lai L.F., Guo H.X. (2011): Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. *International Journal of Pharmaceutics* **404**, 317–323.
- Lau E.T., Giddings S.J., Mohammed S.G., Dubois P., Johnson S.K., Stanley R. A., *et al.* (2013): Encapsulation of hydrocortisone and mesalazine in zein microparticles. *Pharmaceutics* **5**, 277–293.
- Leem J.Y., Nishimura C., Kurata S., Shimada I., Kobayashi A., Natori S. (1996): Purification and characterization of N-betaalanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 13573-13577.
- Lehrer R.I., Ganz T. (2002): Cathelicidins: A family of endogenous antimicrobial peptides. *Current Opinion in Hematology* **9**, 18–22.
- Levanony H., Rubin R., Altschuler Y., Galili G. (1992): Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *The Journal of Cell Biology* **119**, 1117–1128.
- Lin M., Rose-John S., Grötzinger J., Conrad U., Scheller J. (2006): Functional expression of a biologically active fragment of soluble gp130 as an ELP-fusion protein in transgenic plants: purification via inverse transition cycling. *Biochemical Journal* **398**, 577–583.
- Liu X., Sun Q., Wang H., Zhang L., Wang J.Y. (2005): Microspheres of corn protein, zein, for an ivermectin drug delivery system. *Biomaterials* **26**, 109–115.
- Ma J., KC Drake P.M., Christou, P. (2003): The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics* **4**, 794-805.
- Mansour S.C., Pena O.M., Hancock R.E.W. (2014): Host defense peptides: Front-line immunomodulators. *Trends in Immunology* **35**, 443–450.
- Middelberg A.P.J., He L., Dexter A.F., Shen H.H., Holt S.A., Thomas R.K. (2008): The interfacial structure and Young's modulus of peptide films having switchable mechanical properties. *Journal of the Royal Society Interface* **5**, 47–54.
- Middelberg A.P.J., Dimitrijevic-Dwyer M. (2011): A designed biosurfactant protein for switchable foam control. *Chemphyschem* **12**, 1426–1429.
- Muntz K., Shutov, A. D. (2002): Legumains and their functions in plants. *Trends in Plant Science* **7**, 340–344.
- Murakami M., Ohtake T., Dorschner R.A., Gallo R.L. (2002): Cathelicidin Antimicrobial Peptides are Expressed in Salivary Glands and Saliva. *Journal of Dental Research* **81**, 845–850.
- Nguyen H.T., Leelavathi S., Reddy V.S. (2004): Bacteriophage T7 RNA polymerase-directed, inducible and tissue-specific over-expression of foreign genes in transgenic plants. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 301-310.
- Nochi T., Takagi H., Yuki Y., Yang L. *et al.* (2007): Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 10986–10991.
- Olsen, O.-A. (2007): *Endosperm*, 1st ed., Springer, Berlin, 248 strán.
- Panitz R., Manteuffel R., Bxumlein H., Wobus U. (1997): Biphasic Expression of a *Vicia faba* Legumin B Gene in Developing Seeds of Transgenic Tobacco. *Plant Physiology* **150**, 115-126.

- Park C.B., Kim H.S., Kim S.C. (1998): Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **244**, 253-257.
- Peters J., Stoger E. (2011): Transgenic crops for the production of recombinant vaccines and anti-microbial antibodies. *Human Vaccines* **7**, 367–374.
- Podaralla S., Perumal O. (2010): Preparation of zein nanoparticles by pH controlled nanoprecipitation. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **6**, 312–317.
- Podaralla S., Averineni R., Alqahtani M., Perumal O. (2012): .Synthesis of novel biodegradable methoxy poly(ethyleneglycol)-zein micelles for effective delivery of curcumin. *Molecular Pharmaceutics* **9**, 2778–2786.
- Pogue G.P., Vojdani F., Palmer K.E., Hiatt E., Hume S., Phelps J., Long L., Bohorova N., Kim D., Pauly M. (2010): Production of pharmaceutical-grade recombinant aprotinin and a monoclonal antibody product using plantbased transient expression systems. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 638-654.
- Ramessar K., Capell T., Christou P. (2008): Molecular pharming in cereal crops. *Phytochemistry Reviews* **7**, 579–592.
- Reddy K.V., Yedery R.D., Aranha C. (2004): Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* **24**, 536-547.
- Shewry P. R., Napier J. A., Tatham A. S. (1995): Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 945–956.
- Shewry P. R., Halford N. G. (2002): Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* **53**, 947–958.
- Shigemitsu T., Masumura T., Morita S., Satoh S. (2013): Accumulation of rice prolamin-GFP fusion proteins induces ER-derived protein bodies in transgenic rice calli. *Plant Cell Reports* **32**, 389–399.
- Schillberg S., Fischer R., Emans N. (2003): Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 433–445.
- Stahl R., Horvath H., Van Fleet J., Voetz M., von Wettstein D., Wolf N. (2002): T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2146-2151.
- Stoger E., Vaquero C., Torres E., Sack M. *et al.* (2000): Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology* **42**, 583–590.
- Stoger E., Ma J. K. C., Fischer R., Christou P. (2005a): Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 167–173.
- Stoger E., Sack M., Nicholson L., Fischer R., Christou P. (2005b): Recent progress in plantibody technology. *Current Pharmaceutical Design* **11**, 2439–2457.
- Takaiwa F., Takagi H., Hirose S., Wakasa Y. (2007): Endosperm tissue is a good production platform for artificial recombinant proteins in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 84–92.
- Takaiwa F., Wakasa Y., Takagi H., Hiroi T. (2015): Rice seed for delivery of vaccines to gut mucosal immune tissues. *Plant Biotechnology Journal* **13**, 1041–1055.
- Tomasinsig L., Zanetti M. (2005): The cathelicidins - Structure, function and evolution. *Current Protein & Peptide Science* **6**, 23–34.
- Torrent M., Llopart B., Lasserre-Ramassamy S., Llop-Tous I. *et al.* (2009a): Eukaryotic protein production in designed storage organelles. *BMC Biology* **7**, 5.
- Torrent M., Llop-Tous I., Ludevid M.D. (2009b): Protein body induction: a new tool to produce and recover recombinant proteins in plants. *Methods in Molecular Biology* **483**, 193–208.
- Tremblay R., Wang D., Jevnikar A.M., Ma S. (2010): Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances* **28**, 214-221.
- Turner J., Cho Y., Dinh N.N., Waring A.J., Lehrer R.I. (1998): Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 2206-2214.
- Twyman R. M., Schillberg S., Fischer R. (2005): Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **10**, 185–218.

- Twyman R. M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R. (2003): Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* **21**, 570–578.
- Uzzell T., Stolzenberg E.D., Shinnar A.E., Zasloff M. (2003): Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides* **24**, 1655–1667.
- Vandamme D., Landuyt B., Luyten W., Schoofs L. (2012): A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cellular Immunology* **280**, 22–35.
- Velasco M., Diaz-Guerra M.J., Diaz-Achirica P., Andreu D., Rivas L., Bosca L. (1997): Macrophage triggering with cecropin A and melittin-derived peptides induces type II nitric oxide synthase expression. *The Journal of Immunology* **158**, 4437–4443.
- Vézina L.-P., Faye L., Lerouge P., D’Aoust M.-A., Marquet-Blouin E., Burel C., Lavoie P.-O., Bardor M., Gomord V. (2009): Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 442–455.
- Vickers C.E., Xue G., Gresshoff P.M. (2006): A novel cis-acting element, ESP, contributes to high level endosperm-specific expression in an oat globulin promoter. *Plant Molecular Biology* **62**, 195–214.
- Wang R., Tian Z., Chen L. (2011): Nano-encapsulations liberated from barley protein microparticles for oral delivery of bioactive compounds. *International Journal of Pharmaceutics* **406**, 153–162.
- Waugh D.S. (2005): Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology* **23**, 316–320.
- Waugh D.S. (2011): An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags. *Protein Expression and Purification* **80**, 283–293.
- Wimley W.C. (2010): Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS Chemical Biology* **5**, 905–917.
- Yoo Y.C., Watanabe R., Koike Y., Mitobe M., Shimazaki K., Watanabe S., Azuma I. (1997): Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **237**, 624–628.
- Zakharov A., Giersberg M., Hosein F., Melzer M., Müntz K., Saalbach I. (2004): Seed-specific promoters direct gene expression in non-seed tissue. *Journal of Experimental Botany* **55**(402), 1463–1471.
- Zhong Q., Jin M. (2009): Nanoscale structures of spray-dried zein microcapsules and in vitro release kinetics of the encapsulated lysozyme as affected by formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 3886–3894.
- Zimmermann J., Saalbach I., Jahn D., Giersberg M. *et al.* (2009): Antibody expressing pea seeds as fodder for prevention of gastrointestinal parasitic infections in chickens. *BMC Biotechnology* **9**, 79.
- Zou T., Gu L. (2013): TPGS emulsified zein nanoparticles enhanced oral bioavailability of daidzin: in vitro characteristics and in vivo performance. *Molecular Pharmaceutics* **10**, 2062–2070.