

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Molekulárne farmárčenie:

využitie rastlinnej biotechnológie pre heterológnu expresiu LL-37.

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Alžbeta Mičúchová
Štúdijný program:	B1406 Biochémia
Štúdijný odbor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Edita Holásková
Rok:	2015

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

V Olomouci dňa*podpis bakalára*

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce Mgr. Edite Holáskovej za možnosť spolupráce. V neposlednom rade za jej ochotu, pomoc, priateľský prístup a cenné rady pri vypracovaní riešenej problematiky. Taktiež by som chcela poďakovať celému kolektívu Oddelenia molekulárnej biológie, CRH v Olomouci za priateľský prístup a ochotu pomôcť a poradiť.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKÁCIA

Meno a priezvisko autora	Alžbeta Mičúchová
Názov práce	Molekulárne farmárčenie: využitie rastlinnej biotechnológie pre heterológnu expresiu LL-37.
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Oddelenie molekulárnej biológie, CRH
Vedúca práce	Mgr. Edita Holásková
Rok obhajoby práce	2015

Abstrakt

Molekulárne farmárčenie (biofarmárčenie) predstavuje nový smer pre produkciu terapeuticky významných látok s využitím rastlinných expresných systémov. Jednou z hlavných výhod použitia rastlinných expresných systémov je možnosť zníženia nákladov spojených s bioprodukciou liečiv a prispenia tak k zvýšeniu dostupnosti nových účinných liekov na trhu. Značný potenciál terapeutického využitia majú prirodzene sa vyskytujúce antimikrobiálne peptidy, ktoré sú dôležitou zložkou vrodenej imunitnej odpovede takmer všetkých živých organizmov. Táto bakalárska práca je zameraná na stabilnú transformáciu nezrelých embryí rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise) prostredníctvom baktérie *A. tumefaciens* nesúcej vždy príslušný binárny vektor pBRACT209 s rôzne navrhnutými génmi kódujúcimi ľudský antimikrobiálny peptid zo skupiny katelicidínov LL-37. Prostredníctvom PCR analýzy na genómovej úrovni boli selektované samostatné transgénne línie T0 generácie rastlín jačmeňa. U rastlín bola vykonaná analýza fenotypu a následne bola na základe relatívnej kvantifikácie expresie transgénu LL-37 v zrnách, koreňoch a listoch vybraných zástupcov T0 generácie transgénnych rastlín jačmeňa overená funkčnosť aj zrnová špecifickosť B-hordeínového promótoru.

Kľúčové slová	molekulárne farmárčenie, <i>Hordeum vulgare</i> L., katelicidín LL-37, <i>B-HORp</i> promótor, stabilná transformácia, génová expresia
Počet strán	58
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Alžbeta Mičúchová
Title	Molecular pharming: the use of plant biotechnology for heterologous expression of LL-37.
Type of thesis	Bachelor
Department	Division of molecular biology, CRH
Supervisor	Mgr. Edita Holásková
The year of presentation	2015

Abstract

Molecular pharming (biopharming) represent a new technology for the production of compounds displaying therapeutic potential with the use of plant expression systems. One of the major advantage of molecular pharming in plants include lower production costs compared to other production systems, which may in turn positively affect availability of new pharmaceutical products. Naturally occurring antimicrobial peptides represent important components of the innate immune response of almost all living organisms, which have been shown to have considerable potential as a novel therapeutic agents. The present study is focused on stable transformation of the immature barley embryos (*Hordeum vulgare* L. cv. Golden Promise) by *A. tumefaciens* carrying binary vector pBRACT209 with defferentially designed sequences coding for human cathelicidin LL-37. Independently transformed transgenic barley T0 lines were selected according to the PCR analysis at the genome level. Phenotypic analysis was performed on transgenic barley plants and funnctionality and grain specificity of the B hordein promoter were verified based on the relative quantification of transgenic RNA in grains, leaves and roots of selected T0 plants.

Keywords	molecular pharming, <i>Hordeum vulgare</i> L., cathelicidin LL-37, B-HORp promoter, stable transformation, gene expression
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	3
2.1. Historické medzníky pre rozvoj molekulárneho farmárčenia	3
2.2 Výhody a nevýhody transgénnych rastlín ako bioreaktorov pre produkciu rekombinantných proteínov	4
2.2.1 Finančné aspekty produkcie proteínov v rastlinných expresných systémoch.....	5
2.2.2 Glykozylácia proteínov v rastlinných systémoch	6
2.2.3. Izolácia a purifikácia rekombinantných proteínov.....	8
2.2.4 Verejný postoj voči GMO	9
2.3 Legislatívne opatrenia	11
2.4 Spoločnosti pre výrobu farmaceutík prostredníctvom rastlinnej biotechnológie	11
2.5 Antimikrobiálne peptidy	13
2.5.1 Kationické antimikrobiálne peptidy.....	13
2.5.1.1 Mechanizmus účinku kationických antimikrobiálnych peptidov	14
2.5.1.1.1 Peptidy narušujúce štruktúru membrány.....	15
2.5.1.1.2 Peptidy inhibujúce bunkové procesy	16
2.5.2 Anionické antimikrobiálne peptidy.....	17
2.6 Ľudské antimikrobiálne peptidy.....	18
2.6.1 Defenzíny	18
2.6.2 Histatíny	19
2.6.3 Katelicidíny	20
2.6.3.1 Terapeutické využitie LL-37.....	22
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.1 Materiál	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.1.1 Biologický materiál.....	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.1.2 Chemikálie a kity	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.1.3 Prístroje a zariadenia	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.1.4 Ostatné	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.1.5 Roztoky, médiá, pufry a gély	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.1.6 Počítačový software:	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2 Metódy	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.1 Príprava transgénnych rastlín jačmeňa	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.1.1 Príprava kultúry baktérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.1.2 Sterilizácia zrn jačmeňa	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.1.3 Transformácia embryí jačmeňa.....	Chyba! Záložka nie je definovaná.

3.2.2	Analýza a selekcia transgénnych rastlín jačmeňa	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.2.1	Izolácia gDNA	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.2.2	Meranie koncentrácie nukleových kyselín...	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.2.3	PCR analýza na genómovej úrovni	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.2.4	Agarózová elektroforéza	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.3	Analýza expresie transgénov.....	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.3.1	Izolácia RNA.....	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.3.2	Odstránenie kontaminujúcej frakcie DNA zo vzoriek RNA.	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.3.3	Prečistenie RNA magnetickými guľôčkami Agencourt RNAClean XP....	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.3.4	Prepis RNA do cDNA.....	Chyba! Záložka nie je definovaná.
3.2.3.5	Kvantitatívna RT-PCR.....	Chyba! Záložka nie je definovaná.
4	VÝSLEDKY	Chyba! Záložka nie je definovaná.
4.1	Transformácia embryí jačmeňa a regenerácia transgénnych T0 rastlín.....	Chyba! Záložka nie je definovaná.
4.2	Analýza T0 transgénnych rastlín jačmeňa na úrovni gDNA ..	Chyba! Záložka nie je definovaná.
4.3	Analýza T0 transgénnych rastlín jačmeňa na úrovni RNA.....	Chyba! Záložka nie je definovaná.
4.3.1	Relatívna kvantifikácia expresie transgénov v zrnách transgénnych T0 rastlín	Chyba! Záložka nie je definovaná.
4.3.2	Relatívna kvantifikácia expresie transgénov v koreňoch, listoch a zrnách u vybraných transgénnych T0 rastlín.....	Chyba! Záložka nie je definovaná.
5	DISKUSIA	Chyba! Záložka nie je definovaná.
6	ZÁVER	Chyba! Záložka nie je definovaná.
7	LITERATÚRA.....	47
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	57

CIELE PRÁCE

Teoretická časť :

- Popis molekulárneho farmárčenia so zameraním na výhody a nevýhody tohto biotechnologického postupu, legislatívu a popis firiem využívajúcich rastlinné expresné systémy pre produkciu bioaktívnych substancií.
- Vypracovanie literárnej rešerše súvisiacej s tematikou antimikrobiálnych peptidov prirodzene sa vyskytujúcich v ľudskom organizme so zameraním na ľudský katelicidín LL-37 a jeho terapeutické využitie.

Praktická časť:

- Stabilná transformácia jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L.) génom kódujúcim antimikrobiálny peptid LL-37 pod kontrolou zrnovo špecifického promótoru.
- Selekcia transgénnych línií, ich fenotypová analýza a analýza na genómovej úrovni.
- Potvrdenie expresie transgénu metódou qRT-PCR v zrnách transgénnych rastlín a overenie funkčnosti a zrnovej špecifickosti promótoru prostredníctvom porovnania relatívneho množstva transgénnej RNA v koreňoch, listoch a v zrnách jačmeňa.
- Interpretácia získaných výsledkov.

1 ÚVOD

Molekulárne farmárčenie (biofarmárčenie) je termín predstavujúci produkciu biologicky aktívnych terapeutík a priemyselných proteínov s využitím rastlinných expresných systémov a metód génového inžinierstva (Obembe *et al.*, 2010). Táto technológia má v súčasnosti sľubný potenciál nielen v oblasti produkcie rekombinantných biofarmaceutík, akými sú napr. vakcíny, antigénne protilátky, či enzýmy, ale aj priemyslových proteínov (Obembe *et al.*, 2010). Rastliny predstavujú vhodnú produkčnú platformu, pretože sú ľahko transformovateľné a poskytujú v mnohých prípadoch nenákladný systém produkcie vo veľkom meradle (Twyman *et al.*, 2003).

Rastliny je možné transformovať buď stabilne (Jones a Sparks, 2009), kedy dochádza k integrácii transgénu priamo do rastlinného genómu alebo prostredníctvom prechodnej transformácie (Voinnet *et al.*, 2003), kedy k integrácii génu do rastlinného genómu nedochádza. Výhodou stabilnej transformácie je zachovanie zmeny genómu rastliny aj v ďalších generáciách, zatiaľ čo u tranzientnej transformácie je to dosiahnutie maximálnej hladiny expície v krátkom čase, avšak transgén nie je prenesený do následných generácií (Sparkles *et al.*, 2006).

Vo výrobnom procese produkcie rekombinantných proteínov je možné využiť rôzne rastlinné expresné systémy, ktoré zahŕňajú ako bunečné kultúry a nižšie rastliny kultivované pomocou bioreaktorov (napr. machy, riasy, žaburinka menšia), tak aj vyššie rastliny pestované v uzavretých (skleník, fytotrón) či otvorených (pole) priestoroch (napr. tabak, kukurica, ryža, pšenica, jačmeň; JRC/IPTS, 2008). V rámci vyšších rastlín môže byť produkt exprimovaný vo všetkých častiach rastliny alebo môže byť produkcia zacielená do určitých rastlinných kompartmentov, akými sú napríklad zrná. Práve tieto zásobné orgány sú vhodnou alternatívou pre cieľnú produkciu rekombinantných proteínov, pretože na rozdiel od iných rastlinných kompartmentov obsahujú prostredie s nízkym obsahom vody, sekundárnych metabolitov a proteáz, čo umožňuje uskladnenie rekombinantného produktu po dobu niekoľkých rokov bez rizika jeho degradácie. Biochemicky inertné prostredie zrn by navyše malo uľahčiť proces izolácie a purifikácie produktu, a tým by sa mali výrazne znížiť náklady spojené s bioprodukciami (Moravec a Čeřovská, 2014).

Antimikrobiálne peptidy (AMPs) sú oligopeptidy prirodzene sa vyskytujúce takmer vo všetkých živých organizmoch (Bahar a Ren, 2013). AMPs sa vyznačujú významným

terapeutickým potenciálom využiteľným vo farmaceutickom priemysle pre výrobu nových liečiv, a to najmä v prípadoch, kedy súčasná terapia už nie je účinná (Stempel *et al.*, 2015). Hlavným dôvodom, prečo antimikrobiálne peptidy zatiaľ nie sú využívané v klinickej praxi, je predovšetkým finančná náročnosť ich výroby (chemická syntéza, fermentory, priama izolácia z organizmu). Využitie rastlín pre produkciu AMPs by mohlo byť sľubným riešením vyššie uvedených problémov.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1. Historické medzníky pre rozvoj molekulárneho farmárčenia

Po prvýkrát bol úspešne exprimovaný proteín prostredníctvom rastlinných expresných systémov až v 80. rokoch 20. storočia. Rastliny boli transformované rôznymi génmi prinášajúcimi rastlinám nové vlastnosti, ako napríklad rezistenciu voči škodcom a toleranciu k herbicidom (Fischer *et al.*, 2014). Získané poznatky o možnosti heterológnej produkcie funkčného rekombinantného proteínu v rastlinách priviedli výskumné skupiny k rozvoju novej oblasti biotechnológie označenej ako „molekulárne farmárčenie“ (Ma *et al.*, 2003).

V 90. rokoch došlo k výraznému rozvoju výskumu v oblasti produkcie terapeutických proteínov, antigénnych vakcín a protilátok v rastlinných systémoch, ktoré mali priniesť nízko nákladový a bezpečný spôsob výroby (Thomas *et al.*, 2011). Avšak nové poznatky so sebou priniesli aj mnoho otázok a pochybností, najmä čo sa týkalo regulácie pestovania transgénnych rastlín. Tieto pochybnosti sa prehĺbili o to viac, keď vypukla „StarLink“ aféra, počas ktorej došlo ku kontaminácii kukurice určenej pre ľudskú spotrebu geneticky modifikovanou formou kukurice (Bucchini a Goldman, 2002). Následkom aféry bolo vytvorenie nových zabezpečovacích techník pre pestovanie transgénnych rastlín v izolovaných priestoroch a produkcia samčích sterilných rastlín (Levi, 2000; Daniell *et al.*, 2009), čím sa malo zabrániť nechcenému rozšíreniu transgénnych rastlín.

Optimalizácia postupov pre transformáciu a podmienok pre pestovanie transgénnych rastlín viedlo k prvým úspešne vyprodukovaným rekombinantným produktom. V roku 2006 bola prijatá prvá licencovaná vakcína proti Newcastlej chorobe hydiny produkovaná spoločnosťou Dow AgroSciences LLC (<http://www.dowagro.com/>) prostredníctvom bunečnej kultúry tabaku. Ďalšími úspešnými produktmi rastlinných expresných systémov boli protilátky. Spoločnosť Planet Biotechnology Inc. (<http://www.planetbiotechnology.com/index.html>) vyprodukovala prvú klinicky testovanú protilátku CaroRx™, ktorá bráni adhézii baktérie *Streptococcus mutans* na zubnú sklovinu, čím chráni zuby pred kazom. V súčasnosti táto látka dosiahla druhú fázu klinických testov (Thomas *et al.*, 2011). Medzi ďalšie terapeuticky významné proteíny vyprodukované v rastlinách patria napríklad rastový hormón (Staub *et al.*, 2000), náhrada kolagénu (Ruggiero *et al.*, 2000), látky pre liečbu pečenej cirhózy (Kusnadi *et al.*, 1997), cystickej fibrózy, hypertenzie, HIV (Giddings *et al.*, 2000)

a ďalšie. V roku 2012 americký Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (Food and Drugs Administration, FDA) povolil využitie prvého terapeutického produktu Elelyso (taligluceráza alfa) pre liečbu Gaucherového ochorenia prvého typu. Produkt Elelyso obsahuje glukocerebrozidázu, enzým, ktorého produkcia nie je postačujúca u pacientov trpiacich Gaucherovým ochorením. Nedostatočné množstvo glukocerebrozidázy vedie k hromadeniu glykolipidov v pečeni, slezine či obličkách, čo má za následok poškodenie týchto tkanív (<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm302549.htm>). Produkt Elelyso je vyrábaný spoločnosťou Pfizer Inc. pod licenciou Protalix BioTherapeutics Inc., ktorá pre produkciu enzýmu glukocerebrozidázy využíva kultúru transgénnych buniek mrkvy (Thomas *et al.*, 2011).

2.2 Výhody a nevýhody transgénnych rastlín ako bioreaktorov pre produkciu rekombinantných proteínov

Pre produkciu rekombinantných proteínov sa v súčasnosti používa veľká diverzita expresných systémov, vrátane bakteriálnych, kvasinkových, rastlinných či cicavčích buniek (Chen, 2012; Nasser *et al.*, 2003; Rigano a Walmsley, 2005; Hopkins *et al.*, 2012). Každý zo spomínaných systémov má v určitých ohľadoch svoje výhody, ale aj nevýhody (Tab. 1).

Tab. 1 Porovnanie vlastností systémov pre produkciu rekombinantných terapeutických látok (prevzaté a upravené od Goldstein a Thomas, 2004; Ma *et al.*, 2003).

Porovnaný faktor	Baktérie	Kvasinky	Rastlinná bunčná kultúra	Transgénne rastliny	Živočíšna bunčná kultúra	Transgénne zvieratá
Celkové náklady spojené s produkciou	Nízke	Stredné	Stredné	Veľmi nízke	Vysoké	Vysoké
Časová náročnosť produkcie	Nízka	Stredná	Stredná	Vysoká	Vysoká	Veľmi vysoká
Kvalita produktu	Nízka	Stredná	Vysoká	Vysoká	Veľmi vysoká	Veľmi vysoká
Riziko kontaminácie produktu	Vysoké	Nízke	Nízke	Nízke	Vysoké	Vysoké
Cena skladovania	Stredná	Stredná	Stredná	Nízka	Vysoká	Vysoká

Rastlinné bioreaktory sú považované za vhodnú platformu pre produkciu biologicky aktívnych zlúčenín predovšetkým vďaka možnosti produkcie danej zlúčeniny vo veľkom meradle, a to za relatívne nízkych finančných nákladov spojených s produkciou rekombinantných látok (Merlin *et al.*, 2014). Ďalšou výhodnou vlastnosťou týchto bioreaktorov je nízke riziko kontaminácie terapeutických proteínov ľudskými patogénmi a endotoxínmi (Daniell *et al.*, 2001) či schopnosť rastlín eukaryotických posttranslačných modifikácií, a teda aj možnosť vyprodukovať proteín v bioreaktívnej funkčnej podobe (Webster a Thomas, 2012).

Nakoľko využitie transgénnych rastlín predstavuje z ekonomického hľadiska veľmi sľubnú technológiu produkcie biologicky významných proteínov či peptidov, je potrebné zvážiť aj nevýhody tejto metódy, medzi ktoré radíme predovšetkým posttranslačnú glykozyláciu proteínov, ktorá môže viesť k naviazaniu sacharidových reziduí špecifických pre rastlinnú ríšu (Bosch *et al.*, 2013). Ďalej je nutné zvážiť fakt, že náklady spojené s výrobou nezávisí len na samotnej produkcii biomasy, ale aj na následnej extrakcii a purifikácii produktu. Až 85 % výdavkov pre výrobu rekombinantných proteínov predstavuje následné spracovanie daného proteínu (Twyman *et al.*, 2003). Preto je zavedenie vhodnej extrakčnej a purifikačnej metódy značne dôležitým aspektom. Taktiež je dôležité zmieniť, že molekulárne farmárčenie je limitované celkovým prístupom verejnosti ku geneticky modifikovaným organizmom (GMO; Marris, 2001) a autorizačnými procesmi vydávanými miestnymi legislatívnymi orgánmi, ktoré sa snažia zabrániť riziku kontaminácie životného prostredia a plodín určených pre spotrebu obyvateľstva v oblastiach, v ktorých je zavedené pestovanie transgénnych rastlín na otvorených poliach (Tuteja *et al.*, 2012).

2.2.1 Finančné aspekty produkcie proteínov v rastlinných expresných systémoch

Celkové náklady spojené s produkciou rekombinantných proteínov prostredníctvom najrôznejších expresných systémov predstavuje kľúčový faktor, ktorý určuje možnosť využitia týchto látok pre komerčné účely (Nandi a McDonald, 2014). Transgénne rastliny v tomto ohľade predstavujú veľmi sľubné produkčné platformy, pretože poskytujú možnosť pomerne veľkých výťažkov rekombinantných produktov, a to za relatívne nízku cenu (Hood, 2004). Napríklad pri produkcii rekombinantného avidínu prostredníctvom transgéennej kukurice došlo k redukcii nákladov spojených s produkciou na 0.5 % vzhľadom k priamej izolácii avidínu zo slepačích vajec, ktoré sú jeho prirodzeným zdrojom (Hood, 2004). Napriek tomu,

že v mnohých prípadoch produkcia proteínov v rastlinách dosahuje výnosy v rozmedzí 0.1 – 1 % celkového rozpustného proteínu, je toto množstvo produkované stále v porovnaní s ostatnými systémami ekonomicky výhodné (Hood *et al.*, 2002).

Všeobecne sa odhaduje, že celkové náklady spojené s bioprodukciou najrôznejších substancií prostredníctvom transgénnych rastlín zodpovedajú približne 2 – 10 % nákladov spojených s produkciou ekvivalentných proteínov prostredníctvom živočíšnych systémov (Giddings, 2001). Napríklad doktor Richard McCloskey zo spoločnosti Janssen Biotech (<http://www.janssenbiotech.com/>) uvádza, že celkové náklady pre produkciu 300 kg protilátky IgA zodpovedajú v prípade použitia rastlinných expresných systémov 0.5 – 2.0 miliónov eur, zatiaľ čo s využitím živočíšnych systémov je táto suma približne 8-krát vyššia (Gerlach, 2010).

Okrem iného rastlinné expresné systémy poskytujú ďalšie výhody v procese produkcie terapeutík za relatívne nízke náklady, a to vďaka možnosti orálneho podania jedlých častí rastliny obsahujúcich exprimované terapeutiká (jedlé vakcíny). Touto možnosťou sa tak dá vyhnúť potrebe purifikácie produktu, ktorá predstavuje značnú časť celkových nákladov produkcie (Daniell *et al.*, 2001).

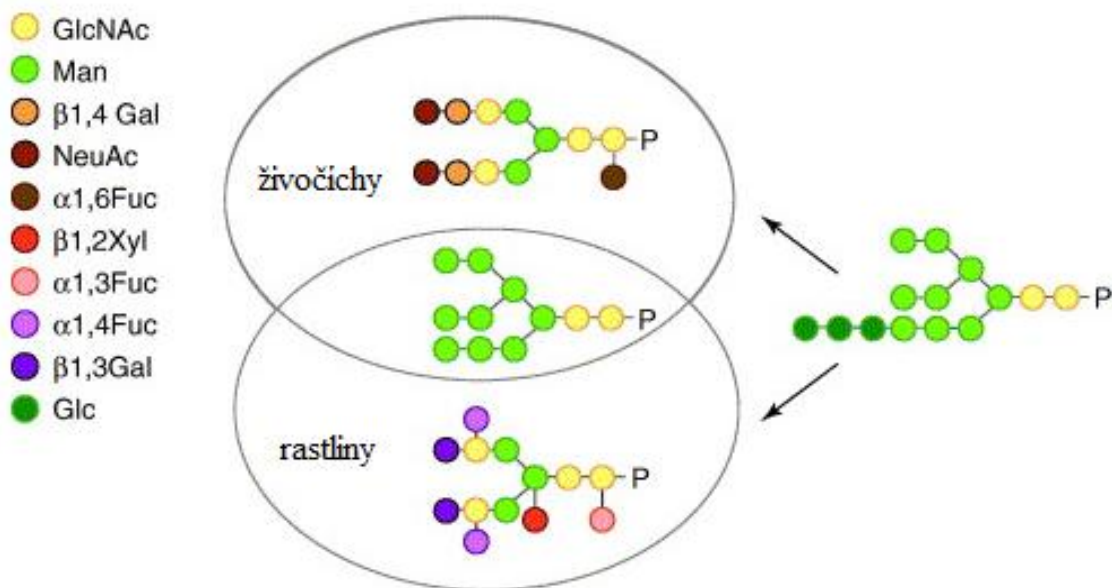
2.2.2 Glykozylácia proteínov v rastlinných systémoch

Glykozyláciou sa rozumie modifikácia proteínov, pri ktorej dochádza za enzymatickej katalýzy k naviazaniu sacharidových rezíduí na proteínovú kosť. Glykoproteíny majú značné pole pôsobenia. Uplatňujú sa ako receptorové molekuly na povrchu bunčných membrán, ako enzýmy, hormóny či transportné a štrukturálne biomakromolekuly (Caltabiano *et al.*, 2008; Chung, 1984; Kehler *et al.*, 1998; Lampert *et al.*, 2011; Reid *et al.*, 2002).

V rastlinných bunkách sú glykoproteíny štruktúrou a mechanizmom vzniku veľmi podobné až takmer identické so živočíšnymi. Pri N-glykozylácii dochádza k naviazaniu oligosacharidového prekursoru ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{N-acetylglukózamin}_2$) na asparagín špecifických sekvencií (Asn-X-Ser/Thr) proteínu (Gomord, 2004). Rastlinné N-glykoproteíny prirodzene obsahujú β -1,2-xylozu naviazanú na β -manóze, na ktorej dochádza k vetveniu sacharidového reťazca a α -1,3-fukózu naviazanú na oligosacharidový prekursor (Cabanes-Macheteau *et al.*, 1999; Bardor *et al.*, 2003; Samyn-Petit *et al.*, 2003). Uvedené sacharidové rezíduá s príslušnými väzbami sa u živočíšnych N-glykoproteínoch nenachádzajú. Na obrázku (Obr. 1) sú znázornené

štruktúry hlavných 2 tried glykánov viažucích s N-glykozidickou väzbou na proteíny rastlín a cicavcov.

Glykozylácia je veľmi dôležitá z hľadiska molekulárneho farmárčenia, pretože prítomnosť glykánov na molekule proteínu má vplyv na jeho stabilitu, subcelulárne zacielenie, farmakokinetické vlastnosti a biologickú aktivitu. Taktiež bolo zistené, že špecifická štruktúra N-glykoproteínov u rastlín v niektorých prípadoch vyvoláva imunitnú odpoveď živočíšneho organizmu (Ghiasi *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2006). Napríklad v roku 2002 sa Bardor *et al.* zaoberali otázkou imunogenicity rastlinných N-glykoproteínov u hlodavcov. Zistili, že modelový glykoproteín, chrenová peroxidáza, vyvoláva tvorbu monoklonálnych protilátok špecifických pre fukózové a xylózové epitopy. Dôkazy o imunogenicite však nezabránia využitiu N-glykoproteínov ako terapeuticky významných látok, ale prinášajú rozšírenie a spresnenie testovacích požiadaviek vo výrobnom procese (Gomord *et al.*, 2005).



Obr. 1 Porovnanie rastlinnej a cicavčej N-glykozylácie proteínov. U rastlín a živočíchov môžu byť k proteínom pripojené dve triedy N-glykánov. Jedna skupina obsahujúca vysoký počet manóz (5 – 9) a má rovnakú štruktúru ako v rastlinných, tak aj v živočíšnych glykoproteínoch a obsahuje dva N-acetylglukózamíny. Druhá skupina N-glykánov je viac špecifická vzhľadom k danému organizmu, a teda dochádza k vzniku štruktúrnych rozdielov medzi N-glykánmi rastlín a živočíchov (prevzaté a upravené od Gomord *et al.*, 2005).

2.2.3. Izolácia a purifikácia rekombinantných proteínov

Náklady spojené s izoláciou a purifikáciou rekombinantných proteínov sú značne závislé na účele, za ktorým je daný proteín produkovaný. Je zrejmé, že u terapeutík sú požiadavky na čistotu produktu omnoho vyššie, než je tomu v prípade priemyslovo využiteľných proteínov. Nezávisle na charaktere expresného systému použitého pre produkciu rekombinantného proteínu, resp. peptidu, je väčšina metód purifikácie zhodná.

Pomerne často sú pre purifikáciu proteínov využívané najrôznejšie druhy chromatografických metód vrátane afinitnej chromatografie na imobilizovaných iónoch kovu umožňujúcich zachytenie proteínov, ktoré sú na svojom N- či C- konci translačne sfúzované so špecifickou kotvou. Medzi najčastejšie používané tagy patrí glutatión S-transferáza (GST), maltózu viažuci proteín (MBP), streptavidinová a najmä histidínová kotva (Nallamsetty *et al.*, 2007; Westra *et al.*, 2001). Hexahistidínová kotva vykazuje vysokú afinitu ku kovovým iónom ako sú nikel a zinok (Porath *et al.*, 1975) ukotvených na stacionárnej fáze, čím zabezpečuje oddelenie rekombinantného proteínu od rastlinného proteínového extraktu vo vysokej čistote (Bornhorst a Falke, 2000). Avšak pre väčšinu aplikácií je následne potrebné afinitnú kotvu z výsledného produktu odstrániť, a to najmä v prípadoch, kedy je prítomnosť kotvy na rekombinantnom proteíne nežiadúca najmä z dôvodu zachovania biologického účinku (Arnau *et al.*, 2005). Predovšetkým v súvislosti s antimikrobiálnymi peptidmi, u ktorých môžu aj minimálne zmeny v štruktúre viesť k radikálnym zmenám antimikrobiálnej aktivity (Quadri *et al.*, 1997). Negatívny dopad na antimikrobiálnu aktivitu môže mať aj jedna extra aminokyselina na N- či C- konci, čo je dané tým, že AMPs sú samé o sebe peptidy o nízkej molekulovej hmotnosti. Problémy spojené s odstránením kotvy prostredníctvom špecifických proteáz či uvoľňovaním toxických iontov kovu počas separácie môžu viesť k zvýšeniu celkových nákladov s produkciou rekombinantných proteínov (Gaberc-Porekar *et al.*, 2001). Z toho dôvodu sa v posledných rokoch rozvíjajú nové metódy pre purifikáciu rekombinantných proteínov (Joensuu *et al.*, 2010) s cieľom nahradenia používanej vysoko nákladovej chromatografie.

Veľkou výhodou rastlín je možnosť produkcie terapeutík v rastlinných orgánoch, ktoré sú pre človeka či zvieratá jedlé (zrná, čiastočne listy a plody), bez potreby následného spracovania a purifikácie produktu, čo vedie k celkovému zníženiu nákladov (Twyman *et al.*, 2003). Najmä semená sú vhodné pre produkciu

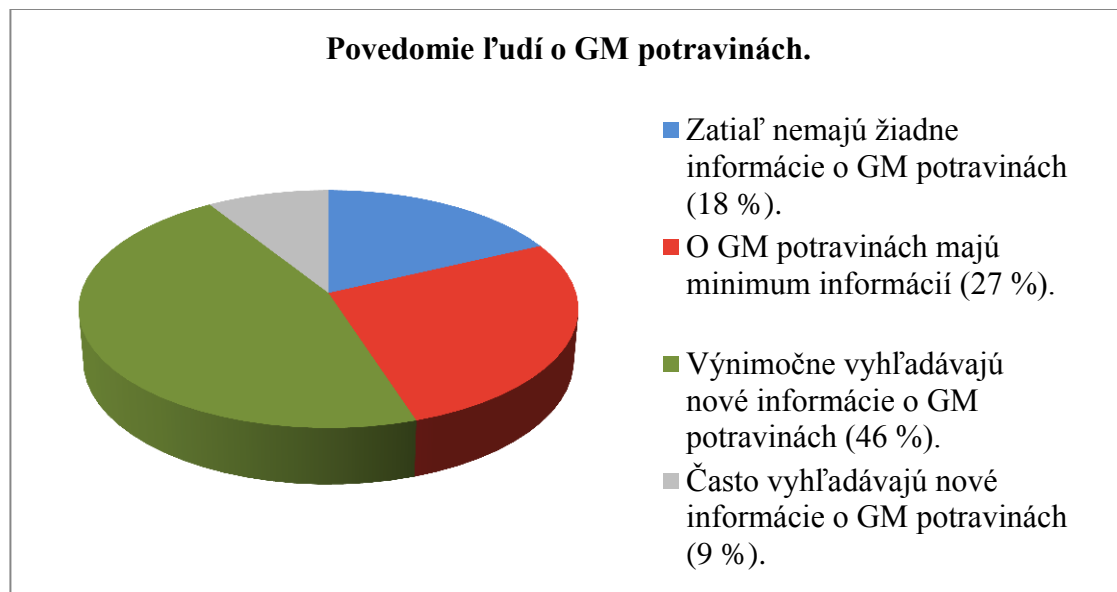
rekombinantných proteínov vďaka schopnosti prechodu do štádia dormancie, čím je umožnené stabilné uskladnenie rekombinantného produktu (Kawakatsu a Takaiwa, 2010). Okrem toho, rastlinné semená sú pre človeka ťažšie stráviteľné, čím je zabezpečené pomalšie vstrebávanie, ktoré vedie k intenzívnejšiemu pôsobeniu vakcín na efektorové imunitné bunky (Hofbauer a Stoger, 2013).

2.2.4 Verejný postoj voči GMO

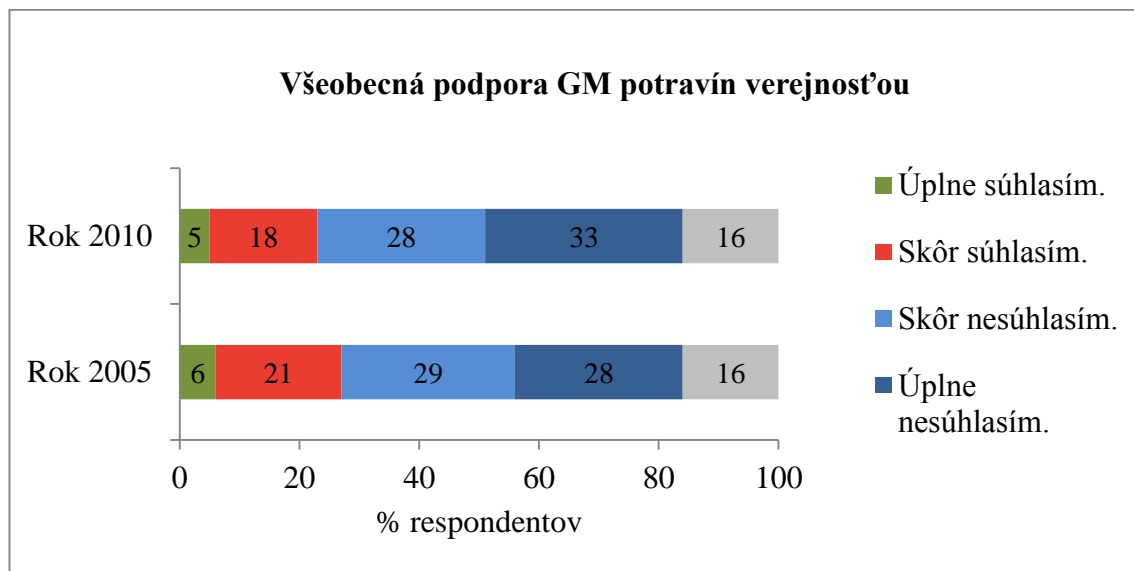
Téma GMO plodín a ich využitie pre komerčné účely je značne kontroverzná v rôznych krajinách po celom svete vrátane európskych štátov. V roku 2010 prebehol prieskum, ktorého témou bolo vnímanie biotechnológií a geneticky modifikovaných potravín verejnosťou. Z prieskumu, ktorý bol zadaný sekciou Analýz verejnej mienky Európskej komisie všeobecne vyplýva, že väčšina respondentov je s používaním GM potravín oboznámená. Ďalej je zrejmé, že ľudia z európskych štátov majú o nové poznatky z oblasti používania GM potravín záujem, pričom 49 % opýtaných si už o danej téme vyhľadávalo nové informácie, aj keď len výnimočne, a 9 % si vyhľadáva informácie často a pravidelne (Obr. 2; EC/ERA, 2010). V ďalšej časti prieskumu bola respondentom predložená otázka v súvislosti podpory produkcie GM potravín. Výsledky boli porovnané s informáciami z roku 2005. Je zrejmé, že v priebehu piatich rokov mierne stúpol počet ľudí, ktorí s používaním GM potravín nesúhlasia (Obr. 3; EC/ERA, 2010).

Z prieskumu ďalej vyplýva, že obyvatelia Európy označujú GM potraviny ako nebezpečné, neprirodzené a znepokojujúce bez značných výhod. Tento názor je však spojený so strachom z možných rizík spojených s pestovaním GM plodín, ktorých sa verejnosť obáva, čo je dôsledkom nedostatočnej informovanosti verejnosti (Laros a Steenkamp, 2004). Dôležitým problémom taktiež zostáva, že je väčšina obyvateľov členských štátov EÚ (najmä v krajinách severnej Európy) ovplyvňovaná názormi spotrebiteľov, názormi organizácií pre ochranu životného prostredia (Greenpeace) a rôznych anti-GMO aktivistov (Zechendorf, 1998), ktoré biotechnológie prezentujú v značne negatívnom svetle. Tento negatívny postoj má potom dopad na celú radu vedeckých projektov. Nie len z etických dôvodov, ale aj z dôvodov obáv pred náhodnou kontamináciou potravného reťazca genetickým materiálom nie je vôbec možné v celej rade členských štátov Európskej únie získať povolenie k poľným experimentom s GMO plodinami. V ostatných štátoch EÚ potom často dochádza k deštrukcii pokusných polí anti-GMO aktivistami (Kuntz, 2012). Česká republika však

patrí k benevolentnejším štátom EÚ, čo sa týka možnosti získať povolenie k poľným experimentom, ktoré tu prebiehajú už od konca 90. rokov 20. storočia (Bioinstitút o.p.s., 2008).



Obr. 2 Povedomie obyvateľov členských štátov EÚ v oblasti GM potravín (prevzaté a upravené od EC/ERA, 2010).



Obr. 3 Vývoj názoru obyvateľov členských štátov EÚ v súvislosti podpory GM potravín (prevzaté a upravené od EC/ERA, 2010).

2.3 Legislatívne opatrenia

Pri sledovaní otázok týkajúcich sa výroby liečiv prostredníctvom rastlinných systémov, je vhodné rozdeliť tento proces do základných zložiek, a to pestovanie transgénnych rastlín, extrakcia a konečná purifikácia produktu. Funkčné aspekty jednotlivých zložiek výrobného procesu sú prísne regulované na základe rozsiahleho právneho rámca vytvoreného Európskym parlamentom a Radou už na začiatku 90. rokov 20. storočia. Hlavnými právnymi dokumentmi určujúcimi európsku legislatívu o GMO je smernica 2001/18/ES Európskeho parlamentu a Rady o zámernom uvoľnení geneticky modifikovaných organizmov do životného prostredia a nariadenie (ES) č. 1829/2003 Európskeho parlamentu a Rady o geneticky modifikovaných potravinách a krmivách, ktoré sú doplnené o nariadenie (ES) č.1830/2003 Európskeho parlamentu a Rady o sledovateľnosti a označovaní geneticky modifikovaných organizmov a sledovateľnosti potravín a krmív vyrobených z geneticky modifikovaných organizmov (http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/index_en.htm). Cieľom legislatívy EÚ o GMO je zabezpečiť ochranu zdravia občanov, životného prostredia, zabezpečiť voľný pohyb autorizovaným GM produktom v rámci celej zóny EÚ (riziká posudzuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín) a zabezpečiť zreteľné označenie produktov vyrobených z GMO. Nariadenia EÚ sú pre jej členské štáty záväzné.

Okrem funkčných aspektov musia byť jednotlivé zložky výrobného procesu posudzované aj v kontexte regulačných požiadaviek na výrobu liečiv. Európske a americké regulačné orgány nedávno zverejnili dokumenty s pokynmi pre produkciu terapeutických proteínov s využitím rastlinných systémov (FDA, 2002; EMEA, 2008). Tieto dokumenty pokrývajú všetky aspekty procesu od prípravy a regenerácie transgénnych rastlín cez ich rozmnožovanie a konečnú purifikáciu produktu. Dôležité je, že požiadavky pre konečnú kvalitu produktu sú rovnaké ako tie pre konvenčné produkčné systémy a jednotlivé firmy využívajú spoločný súbor pokynov (napr. pokyny ICH) popisujúci podrobnosti o požiadavkách na kvalitu produktu (Boothe *et al.*, 2010).

2.4 Spoločnosti pre výrobu farmaceutík prostredníctvom rastlinnej biotechnológie

V súčasnosti existuje niekoľko spoločností, ktoré sa svojou činnosťou zameriavajú na produkciu dôležitých biofarmaceutík a vakcín produkovaných rastlinnými expresnými systémami pre následné komerčné využitie. Značné množstvo týchto

spoločností sa sústreďuje v Severnej Amerike, zatiaľ čo v Európe sa najviac spoločností nachádza najmä v Nemecku a vo Francúzku.

Jednotlivé spoločnosti rozvíjajú vlastné technologické postupy zahrňujúce výber rastlinného druhu a expresného systému ako základné východisko pre produkciu biofarmaceutík. Pestovanie na poliach predstavuje veľmi výhodnú stratégiu z hľadiska produkčnej kapacity a ceny produktu (Merlin *et al.*, 2014). Avšak farmaceutické spoločnosti využívajúce rastlinnú biotechnológiu musia čeliť striktným reguláciám o nakladaní s GMO plodinami pestovanými na poli. Využitie samoprašných rastlín a dôsledná geografická separácia transgénnych rastlín od ostatných poľnohospodárskych polí predstavuje riešenie ako zabrániť nechcenému zmiešaniu genetického materiálu s potravinovým reťazcom v dôsledku krížového opeľovania či horizontálneho transféru génov. (Messeguer *et al.*, 2001; Marvier, 2007). Napríklad Venteria Bioscience (USA) využíva pre expresiu ľudského laktoferínu, lyzozýmu a sérového albumínu zrná samoprašnej ryže (<http://www.ventria.com>).

Ďalšou možnosťou je pestovanie GMO rastlín či rastlinných bunkových suspenzií v uzavretom priestore, čo je výhodné z hľadiska legislatívnych nariadení, avšak súčasne rastú náklady spojené s produkciou v dôsledku zvýšenej spotreby energetických zdrojov. Napríklad firma Synthron (<http://synthron.com/corporate>) kultivuje vodnú rastlinu žaburinku menšiu s vysokou regeneračnou schopnosťou (*Lemna minor*) v špeciálnych vakoch naplnených jednoduchým rastovým médiom nenáročným na živiny. Táto technológia (takzvaný LEX systém) produkcie farmaceuticky uplatniteľných látok vedie k výraznému zníženiu nákladov spojených bioprodukciou liečiv. Ďalším príkladom firmy využívajúcej bunkové kultúry rastlín je vyššie zmienená spoločnosť Protalix BioTherapeutics Inc. (Izrael; <http://www.protalix.com>).

V roku 2013 bolo autorizované použitie vakcíny proti vtáčej chrípke H5N1 v núdzových prípadoch, ktorej produkciu prostredníctvom tabáku ako expresnej platformy dosiahla firma Medicago (Kanada; <http://www.medicago.com/>). Spoločnosti Bayer (Nemecko) a Ion Genetics (Nemecko) sa zameriavajú na produkciu protilátky a vakcíny proti Non-Hodgkinovmu lymfómu s využitím rastlín tabáku, výskum oboch spoločností dosiahol v rokoch 2013 a 2014 prvotnej fázy klinických testov (<http://www.molecularfarming.com/PMPs-and-PMIPs.html>).

Väčšina spoločností môže vykonávať svoju činnosť len na základe verejných finančných prostriedkov a vysokých počiatkových kapitálov. Z toho dôvodu, predovšetkým menšie spoločnosti nie sú schopné z dosiahnutého zisku vrátiť

investorom výšku počiatočného kapitálu alebo nie sú schopné zabezpečiť ďalšie finančné prostriedky pre svoju činnosť a sú nútené svoj výskum ukončiť (napr. Biolex Inc. (USA), ProdiGene (USA), SemBioSys Genetics (Kanada); JRC/IPTS *et al.*, 2008).

2.5 Antimikrobiálne peptidy

Antimikrobiálne peptidy (AMPs) sú nízkomolekulárne látky obsahujúce vo svojej štruktúre od 2 do približne 100 aminokyselín. Tieto peptidy sa vyskytujú ako prirodzená zložka imunitného systému ako prokaryotických (Rea *et al.*, 2011), tak aj eukaryotických organizmov (Stotz *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2015). Väčšina AMPs je génovo kódovaná, zatiaľ čo niektoré predstavujú produkty sekundárneho metabolizmu alebo sú syntetizované prostredníctvom neribozomálnych peptid-syntetáz (Giessen a Marahiel, 2012). Na základe štruktúrnych vlastností delíme AMPs do štyroch základných skupín, a to na kationické, anionické, aromatické dipeptidy a kyslík viažuce proteínové deriváty (Neubauerová *et al.*, 2009). Peptidy sa môžu adaptovať po interakcii s bakteriálnymi membránami do rôznych sekundárnych štruktúr, akými sú α -helikálna štruktúra, β -skladaný list, rozvoľnená štruktúra či neusporiadaná slučka (Powers *et al.*, 2003). Rôzne druhy antimikrobiálnych peptidov sa vyznačujú svojím pôsobením voči rozsiahlej diverzite patogénov, vrátane Gram-pozitívnych a Gram-negatívnych baktérií, húb či vírusov. Bolo zistené, že AMPs dokážu stimulovať imunitný systém, angiogénu a proces hojenia rán. Dokonca bol preukázaný cytotoxický účinok niektorých kationických AMPs voči rakovinovým bunkám (Powers *et al.*, 2003). Vďaka svojim vlastnostiam sú AMPs považované za látky s významným terapeutickým potenciálom, pretože by mohli predstavovať napríklad alternatívu pre liečbu ochorení spôsobených rezistentnými kmeňmi mikroorganizmov a nahradiť tak klasické antibiotiká (Peters *et al.*, 2010). Napriek tomu, že v súčasnosti už celá rada AMPs prešla klinickými testami (Fjell *et al.*, 2012; Fox, 2013), americký Úrad pre kontrolu potravín a liečiv (Food and Drug Administration, FDA) doteraz neschválil žiaden z antimikrobiálnych peptidov pre komerčné využitie.

2.5.1 Kationické antimikrobiálne peptidy

Kationické antimikrobiálne peptidy (CAMPs) tvoria majoritnú, dobre preskúmanú skupinu zo všetkých doteraz známych antimikrobiálnych peptidov. CAMPs sú štruktúrne bohaté na aminokyseliny s kladným nábojom, akými sú lyzín, arginín a histidín. Väčšina z CAMPs má celkový náboj peptidu v rozsahu od +2 až do +9

(Hancock *et al.*, 2006), pričom hodnota celkového náboja peptidu významne ovplyvňuje antimikrobiálnu aktivitu daného proteínu. V roku 2001 bola sledovaná zmena aktivity magainínu, antimikrobiálneho peptidu pazúrnatky vodnej (*Xenopus laevis*), pri navýšení celkového náboja peptidu z ideálnych +3 na hodnotu vyššiu ako +5. Táto zmena viedla k zvýšeniu hemolytickej aktivity peptidu voči hostiteľským bunkám a k strate antimikrobiálnej selektivity (Danthe *et al.*, 2001).

Funkcia CAMPs je významne závislá aj na ich sekundárnej štruktúre, ktorej zmena môže viesť k rapídному poklesu aktivity daného peptidu voči patogénom. Napríklad tachyplesin, kationický antimikrobiálny peptid obsahujúci štruktúru antiparalelného β -skládaného listu stabilizovaného dvoma disulfidovými väzbami, má za normálnych podmienok vysokú afinitu k lipopolysacharidom. Vyvoláva preskupenie fosfolipidov membrány s následnou translokáciou do cytoplazmy (Zhang *et al.*, 2001), kde sa viaže na miesto malého žliabku DNA (Yonezawa *et al.*, 1992). Avšak po zmene štruktúry tachyplesinu na lineárnu formu bola pozorovaná jeho znížená antimikrobiálna a antivirálna aktivita (Tamamura *et al.*, 1993). Lineárna forma peptidu bola menej účinná v procese permeabilizácie membrány a úplne chýbala schopnosť translokácie cez bunkovú membránu. (Matsuzaki *et al.*, 1997).

2.5.1.1 Mechanizmus účinku kationických antimikrobiálnych peptidov

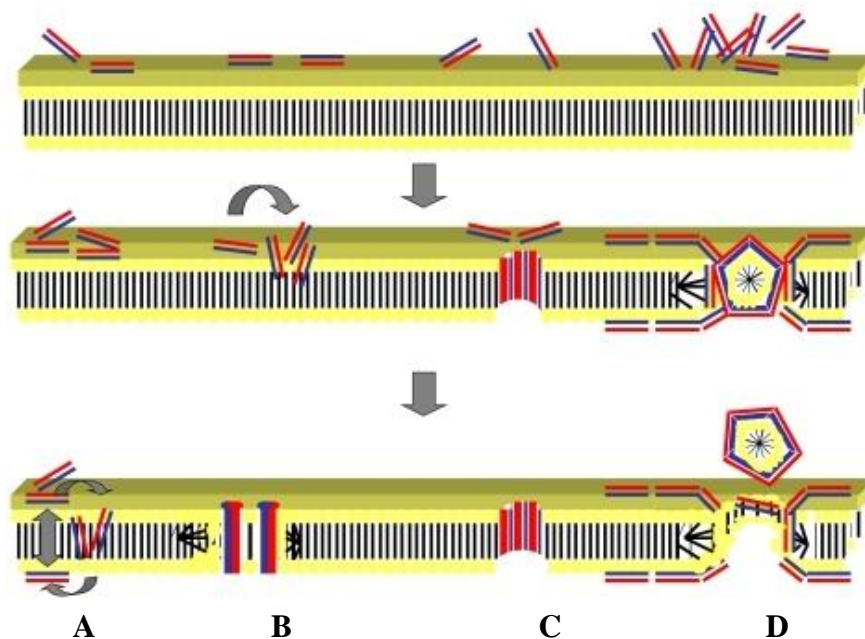
Najlepšie je preštudovaný a popísaný mechanizmus pôsobenia kationických antimikrobiálnych peptidov s bakteriálnymi patogénmi. Všetky biologické membrány sú tvorené prevažne molekulami fosfolipidov, ktoré sa vyznačujú amfifilickými vlastnosťami. Bakteriálne membrány sú charakteristické prítomnosťou fosfatidylglycerolu, fosfatidylserínu a kardiolípu, ktoré na povrchu membrány vytvárajú negatívny náboj. U vyšších živočíchov sa vo fosfolipidovej dvojvrstve vyskytujú prevažne molekuly fosfatidyletanolamínu, fosfatidylcholínu, sfingomyelínu a cholesterolu, ktoré zabezpečujú neutrálny náboj. Na základe rozdielnych vlastností membrán prokaryotických a eukaryotických organizmov, akými sú membránový potenciál a elektrostatické pôsobenie (Yeaman a Yount, 2003), dochádza k rozpoznaní a následnej interakcii AMPs s povrchom bakteriálnej membrány. Kationické AMPs sa vyznačujú vyššou afinitou k povrchovej membráne baktérií než prirodzene sa nachádzajúce dvojmocné katióny Ca^{2+} a Mg^{2+} , čím dochádza k ich vytesňovaniu a k destabilizácii membrány (Powers *et al.*, 2003). Bola postulovaná celá rada hypotéz popisujúcich akým spôsobom môže dôjsť k usmrteniu patogénnych mikroorganizmov,

a síce: 1) fatálnou depolarizáciou plazmatickej membrány, 2) vytvorením otvorov v biologických membránach a následným vyliatím bunkového obsahu, 3) aktiváciou letálnych biologických procesov, ktoré sú zodpovedné napríklad za degradáciu bunkovej membrány, 4) zmenou usporiadania lipidov v lipidovej dvojvrstve vedúcou k narušeniu funkcií membrán, 5) inhibíciou či narušením funkcie intracelulárnych molekúl esenciálnych pre život mikroorganizmu (Zasloff, 2002).

2.5.1.1.1 Peptidy narušujúce štruktúru membrány

Medzi AMPs, ktoré narušujú integritu bakteriálnej membrány, je obecně radená väčšina peptidov s α -helikálnou štruktúrou. Pre vysvetlenie mechanizmu pôsobenia antimikrobiálneho peptidu na integritu bakteriálnej membrány boli zavedené 3 modely.

Model „sudovej skruže“ je založený na integrácii niekoľkých amfipatických molekúl antimikrobiálneho peptidu medzi fosfolipidovú dvojvrstvu (Laver, 1994), pričom dochádza k reorientácii antimikrobiálneho peptidu: hydrofóbne postranné reťazce aminokyselín smerujú do vnútra fosfolipidovej dvojvrstvy a hydrofilné reťazce sú orientované uprostred vzniknutých transmembránových pórov (Ehrenstain a Lecar, 1977; Yang *et al.*, 2001) schopných prepúšťať cytoplazmatické komponenty a narušiť tak membránový potenciál bunky (Obr. 4C).



Obr. 4 Mechanizmus interakcie antimikrobiálnych peptidov s bunkovou membránou mikroorganizmov. A – agregáčny model, B – toroidný pór, C – model sudovej skruže, D – kobercový model (prevzaté od Laverty *et al.*, 2011).

V prípade, že počas inzercie α -helikálnej štruktúry peptidu do membrány dochádza k ohnutiu monovrstvy fosfolipidov kontinuálne k póru tak, že voda prechádzajúca pórmi je lemovaná hydrofilnými reťazcami vložených peptidových jednotiek a hydrofilnými časťami fosfolipidov, hovoríme o „toroidnom póre“. (Matsuzaki *et al.*, 1996; Obr. 4B). Typickým príkladom antimikrobiálneho peptidu interagujúceho týmto spôsobom s bakteriálnou membránou je magainin (Ludke *et al.*, 1996) a taktiež ľudský katelicidín LL-37 (Henzler Wildman *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2011).

Mnohé AMPs sú schopné včleniť sa do membránového rozhrania, pričom dochádza k vzniku rôzne veľkých agregáčnych komplexov asociovaných s molekulami vody (model „micelárnych agregátov“), ktoré destabilizujú a rozpínajú membránu, čím umožňujú voľný prechod menších aj väčších vo vode rozpustných molekúl. Tieto agregáty sa líšia ako svojou veľkosťou, tak aj životnosťou. Po disociácii agregátov na monoméne jednotky môže dôjsť k translokácii AMPs do cytoplazmy bakteriálnej bunky a k následnej väzbe na kľúčové biomolekuly, akými sú nukleové kyseliny (Hancock a Chapple, 1999; Obr. 4A).

V prípade „kobercového“ mechanizmu nedochádza k začleneniu AMPs medzi dvojvrstvu fosfolipidov, ale k paralelnému naviazaniu na negatívne nabitý povrch membrány. Orientácia AMPs spôsobuje na lokálnych miestach oslabenie integrácie membrány, čím dochádza k vzniku trhlín, micelárnych útvarov, k uvoľňovaniu cytoplazmy a k zmene membránového potenciálu bunky (Obr. 4D). Uvedený mechanizmus antimikrobiálnej aktivity popísaný napríklad u peptidu s antimikrobiálnou aktivitou aureinu 1.2 (Fernandez *et al.*, 2012).

2.5.1.1.2 Peptidy inhibujúce bunkové procesy

V určitých prípadoch sú antimikrobiálne peptidy translokované priamo do cytoplazmy, kde môžu inhibovať biosyntézu proteínov bunkovej steny. Napríklad nisín a mersacidín, ribozomálne produkované AMPs zo skupiny lantibiotikov, sa viažu na lipid II, významný prekursor biosyntézy peptidoglykánov bunkovej steny Gram-pozitívnych baktérií (Brötz *et al.*, 1998; Wiedemann *et al.*, 2001). Tým dochádza k inhibícii tejto biosyntetickej dráhy a k bunkovej apoptóze. Podobný mechanizmus účinku využívajú aj neribozomálne syntetizované peptidy, ako vankomicín, telavancín a niektoré defenzíny produkované eukaryotickými bunkami (Nishi *et al.*, 2004; Varney *et al.*, 2013).

Antimikrobiálne peptidy voľne prechádzajúce bakteriálnou membránou môžu atakovať aj nukleové kyseliny, a tak brániť procesom replikácie, translácie

a transkripcie. Napríklad buforín II, lineárny kationický antimikrobiálny peptid izolovaný zo žalúdka ázijskej ropuchy *Bufo bufo gargarizans*, má za podmienok *in vitro* vysokú afinitu k nukleovým kyselinám (Park *et al.*, 1998), a to vďaka homológnej sekvencii s N-terminálnou oblasťou histónu H2A (Cho *et al.*, 2009). V roku 2013 bola sledovaná aktivita buforínu II na rast buniek hepatocelulárneho karcinómu (HepG2), pričom sa u týchto buniek zvýšila apoptóza, čo môže v budúcnosti viesť k potenciálnemu využitiu buforínu II v protinádorovej terapii (Wang *et al.*, 2013).

2.5.2 Anionické antimikrobiálne peptidy

Anionické antimikrobiálne peptidy (AAMPs) vo svojej štruktúre často obsahujú kyselinu glutámovú a asparágovú, ktoré im dodávajú celkový náboj -1 až -7 (Harris *et al.*, 2009). Prítomnosť AAMPs bola zistená u značnej diverzity organizmov. Známe sú napríklad peptid maximin-H5 izolovaný z pokožky kanky veľkej (*Bombina maxima*; Lai *et al.*, 2002), daptomycín produkovaný *Streptomyces roseosporus*; Miao *et al.*, 2005), kappacíny nachádzajúce sa v mlieku dobytka (Malkovski *et al.*, 2001), cykloviolacín-H4 a Vh1-2 produkované fialkou roľnou (*Viola hederaceae*; Chen *et al.*, 2005), dermcidin DCD-1L izolovaný zo slín človeka (Schitteck *et al.*, 2001) a ďalšie. Anionické antimikrobiálne peptidy sa vyskytujú menej často než kationické. Mechanizmus pôsobenia voči patogénom nie je tak dobre preskúmaný ako je tomu v prípade CAMPs a v mnohých prípadoch zatiaľ nebol vôbec objasnený. Spravidla sa predpokladá, že AAMPs môžu interagovať s intracelulárnymi molekulami (napr. DNA) a inhibovať tak biologické procesy esenciálne pre život patogénnych mikroorganizmov, či narušovať integritu bunkovej steny alebo cytoplazmatickej membrány prostredníctvom interakcie s molekulami lipidov (Prabhu *et al.*, 2013). V roku 2012 bola vykonaná štúdia zameraná na mechanizmus pôsobenia DCD-1L, anionického antimikrobiálneho peptidu prítomného v ľudskom pote, kedy bolo zistené, že DCD-1L interaguje so záporne nabitou fosfolipidovou dvojvrstvou v podobe oligomérnych komplexov, ktoré sú stabilizované pomocou Zn^{2+} . Po interakcii s lipidovou dvojvrstvou je tento derivát dermicidínu schopný tvoriť iónové kanály v bakteriálnej membráne (Paulmann *et al.*, 2012). Zinočnaté ióny teda pravdepodobne zohrávajú kľúčovú úlohu v mechanizme pôsobenia AAMPs, pretože predstavujú kationický soľný mostík medzi AAMPs a záporne nabitou fosfolipidovou dvojvrstvou a napomáhajú tak translokácii AAMPs do cytoplazmy (Brogden *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 2009)

2.6 Ľudské antimikrobiálne peptidy

V roku 1922 Alexander Fleming objavil v ľudských slinách lyzozým, látku nachádzajúcu sa v ľudskom organizme, u ktorej bola ako u prvej v rámci ľudských proteínov/peptidov pozorovaná antimikrobiálna aktivita. V tom období sa však výskumníci o funkciu lyzozýmu a látkam jemu podobným neprikladali veľký význam. K rozsiahlejšiemu výskumu v oblasti antimikrobiálnych peptidov došlo až na začiatku 80. rokov 20. storočia (Wang, 2014). Od tej doby bolo objavených niekoľko zástupcov antimikrobiálnych peptidov v ľudskom organizme, u ktorých bola charakterizovaná primárna štruktúra a funkcia, na základe ktorých boli rozdelené AMPs do 3 základných skupín, a sice defenzínov, histatínov a katelicidínov. V súčasnosti prebieha intenzívny výskum zameraný na problematiku antimikrobiálnych peptidov, a to najmä v súvislosti s ich potenciálnym terapeutickým využitím pri liečbe mnohých závažných ochorení (Shaykhiev *et al.*, 2005; Iacob, 2009).

2.6.1 Defenzíny

Ľudské defenzíny sú kationické, neglykozylované antimikrobiálne peptidy bez naviazaných sacharidových jednotiek s charakteristickou štruktúrou β -skládaného listu. Tieto AMPs obsahujú šesť cystidínových rezíduí zodpovedných za tvorbu troch intramolekulárnych disulfidových mostíkov (Ganz, 2003; Hazlett, 2011). Skupina defenzínov sa delí na dve podskupiny, ktoré sa od seba odlišujú umiestnením disulfidových väzieb. Pre podskupinu α -defenzínov sú charakteristické disulfidové mostíky tvorené medzi 1-6/2-4/3-5, zatiaľ čo v podskupine β -defenzínov sa nachádzajú medzi cysteínmi 1-5/2-4/3-6 (Winter a Wenghoefer, 2012). Prvé α -defenzíny boli objavené v granuloch neutrofilov a boli označené ako HNP1 – HNP4, neskôr boli popísané ďalšie dva, a to v bunkách tvoriacich epitel tenkého čreva, tzv. Panetových bunkách, ktoré boli označené ako HNP5, resp. 6 (Jones a Bevins, 1993; Selsted *et al.*, 1992). Peptidy HNP1 – HNP5 dokážu za *in vitro* podmienok účinne zabíjať celú radu mikroorganizmov, akými sú napr. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* a *Candida albicans* (Ganz *et al.*, 1985; Wilde *et al.*, 1989), jedine u peptidu HNP6 nebol doteraz stanovený jeho antimikrobiálny účinok (Ericksen *et al.*, 2005). Ľudské β -defenzíny sú produkované bunkami epitelu (Ganz, 2003; Lehrer, 2004). Izolované boli zatiaľ štyri (označované ako hBD1 – hBD4; García *et al.*, 2001; Lehrer, 2004), u ktorých bola zistená nielen

antibakteriálna aktivita voči Gram-pozitívnym a Gram-negatívnym baktériám, ale u niektorých aj rozsiahla antivírusová aktivita. Napríklad hBD3 a hBD2 sú schopné interagovať s viriónovými časticami a prostredníctvom chimokinového receptora CXCR4 vykazovať aktivitu proti HIV (human immunodeficient virus; Harder a Schroder, 2002). hBD3 okrem toho účinne inhibuje pôsobenie HSV (herpes simplex virus; Hazrati *et al.*, 2006). Vďaka širokospektrálnemu pôsobeniu voči baktériám a tiež vírusom môžu byť ľudské defenzíny v budúcnosti využité v liečbe akútnych a chronických infekčných ochorení.

2.6.2 Histatíny

Histatíny sú skupina kationických lineárnych antimikrobiálnych peptidov vyskytujúcich sa v ľudských slinách (MacKay *et al.*, 1984), pre ktoré je charakteristický vysoký obsah histidínov. Ich základná funkcia v ľudskom organizme je imunitná ochrana pred infekciami ústnej dutiny. Medzi najdôležitejších zástupcov tejto skupiny patrí histatín 1, 3 a 5, ktoré sú kódované dvoma génmi, a sice *HIS1* a *HIS2*. Histitín 1 a 3 sú priamym produktom expresie týchto génov, zatiaľ čo histatín 5 je produktom ďalších postranlačných úprav histatínov 3. Práve histatín 5 je predmetom mnohých štúdií, pretože sa vyznačuje spomedzi známych histatínov najsilnejšou antimikrobiálnou aktivitou. Bola preukázaná účinnosť tohto AMP napríklad proti ľudským patogénnym hubám, akými sú *Candida albicans* či *Aspergillus fumigatus* (Helmerhorst *et al.*, 1999). Histatín 5 ďalej inhibuje prechod ľudských fibroblastov prítomných v ďasnách do apoptózy, ktorá je indukovaná pôsobením polysacharidu Gram-negatívnej baktérie *Porphyromonas gingivalis* (Imatani *et al.*, 2004). Histatín 5 taktiež inhibuje leukotoxin produkovaný *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Murakami *et al.*, 2002c) a inhibuje aktivitu bakteriálnych či ľudských enzýmov podieľajúcich sa na ochoreniach parodontu (Gusman *et al.*, 2001). V rámci aktivity histatínu 5 bola sledovaná aj aktivita jeho rôzne dlhých fragmentov vrátane tzv. fragmentu P-113, ktorý je považovaný za najmenší fragment (12 aminokyselinových rezíduí), ktorý si zachoval antimikrobiálnu aktivitu pôvodného peptidu (Rothstein *et al.*, 2001). Peptid P-113 prešiel úspešne fázami I, resp. II klinických testov, na základe ktorých je použitie P-113 proti zubnému plaku a zápalu ďasien považované za bezpečné a tolerované u ľudí (<http://www.demegen.com/articles/P-113-Candidiasis-results.htm>).

2.6.3 Katelicidíny

Základnou charakteristickou črtou pre všetky proteíny zo skupiny katelicidínov je prítomnosť vysoko konzervovaného proregiónu (tzv. katelín doména) pozostávajúcej približne zo 100 aminokyselinových rezíduí, ktorá je lemovaná na svojom N-konci signálnou sekvenciou približne 30 aminokyselinových rezíduí. Na C-terminálny koniec katelín domény nadväzuje krátka sekvencia samotného antimikrobiálneho peptidu. Primárny produkt translácie obsahujúci signálnu sekvenciu je označený ako „preproteín“. Potom, čo signálna sekvencia splní svoju funkciu a zacieli katelicidín do zásobných granúl či apoplastu, dôjde k jej odštiepeniu a vytvoreniu 2 disulfidových väzieb za vzniku neaktívneho „proproteínu“ predstavujúceho úložnú jednotku antimikrobiálneho peptidu (Dürr *et al.*, 2006). Po následnom odštiepení C-terminálnej sekvencie antimikrobiálneho peptidu pomocou proteázy dochádza k biologickej aktivácii samotného antimikrobiálneho peptidu, ktorý je uvoľnený na miesto pôsobenia (Yamasaki *et al.*, 2006).

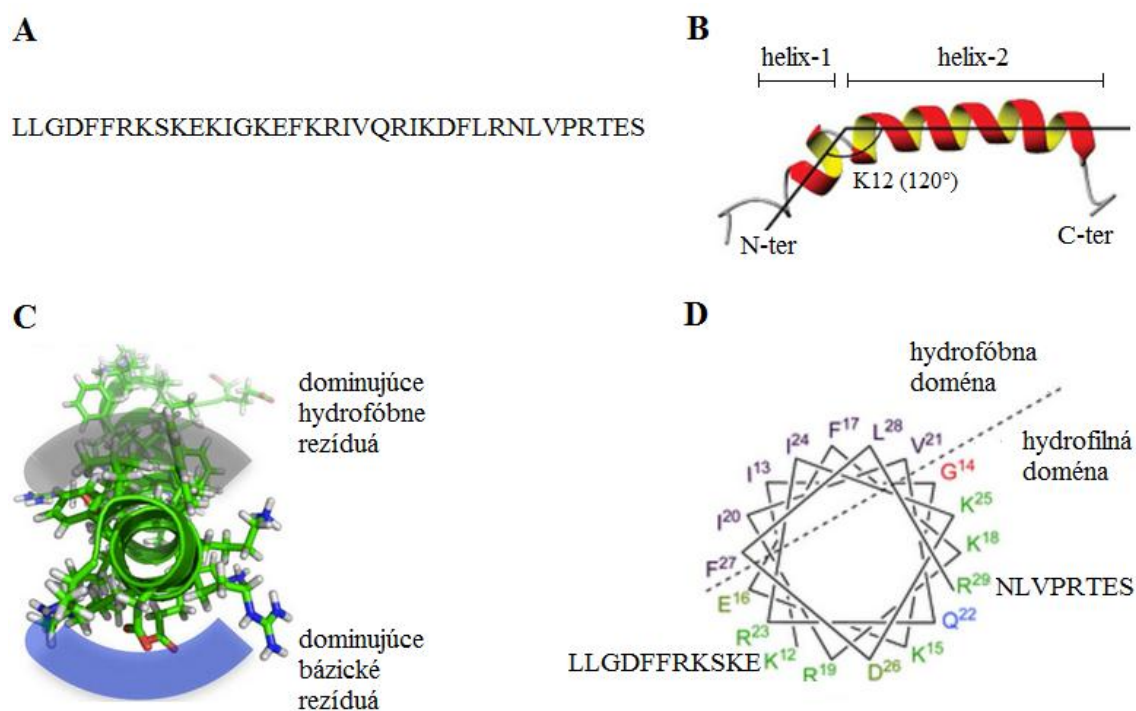
Proteín hCAP-18 je doteraz jediný známy ľudský antimikrobiálny proteín zo skupiny katelicidínov. Tento proteín obsahuje okrem štruktúr β -skládaného listu aj štruktúru α -závitnice a dve disulfidové väzby medzi cysteínmi v polohách C85-C96 a C107-C124 (Tomasinsig a Zanetti, 2005). Na C-terminálnom konci obsahuje sekvenciu 37 aminokyselinových rezíduí, ktorá na svojom začiatku obsahuje pár leucínov, vďaka čomu získal tento ľudský α -helikálny antimikrobiálny peptid názov LL-37 (Obr. 5).

CAMP gén kódujúci antimikrobiálny proteín hCAP-18 sa skladá zo 4 exónov a 3 intrónou. Zatiaľ čo exóny 1 – 3 kódujú signálnu sekvenciu a katelín doménu proteínu, exón 4 kóduje štiepne miesto rozpoznávané proteázou a antimikrobiálny peptid LL-37. *CAMP* gén je lokalizovaný na chromozóme 3. Transkripcia *CAMP* génu sa zvyšuje počas infekcie organizmu spôsobenej baktériami, vírusmi, plesňami či prvokmi, pričom silným induktorom transkripcie katelicidínovej mRNA je 1,25-dihydroxy-vitamín D3 (Gombart *et al.*, 2005). Prvotné štúdie zamerané na gén kódujúci hCAP-18 proteín predpokladali, že aktívnou formou AMP je 39 aminokyselinových rezíduí nachádzajúcich sa na C-terminálnom konci hCAP-18 pričom sekvencia týchto aminokyselín bola označená ako peptid FALL-39 (Agerberth *et al.*, 1995). Krátko na to však Gudmundsson *et al.* s použitím špecifickej protilátky zistili, že hCAP-18 je štiepený za uvoľnenia zrelého peptidu o dve rezíduá kratší než pôvodne uvažovaný FALL-39, ktorý bol označený ako LL-37. V danej štúdii

bolo taktiež zistené, že sa LL-37 sa nachádza v granulocytoch ľudských buniek (Gudmundsson *et al.*, 1996).

S použitím syntetických peptidov LL-37, resp. FALL-37 bolo zistené, že obe formy vykazujú antimikrobiálnu aktivitu (Agerberth *et al.*, 1995; Larrick *et al.*, 1995). V nasledujúcich rokoch bolo zistené, že môže byť hCAP-18 proteín alternatívne štiepený v bunkách reprodukčného systému človeka za vzniku 38 aminokyselín dlhého peptidu ALL-38, ktorý sa od známeho LL-38 odlišuje prítomnosťou jedného extra alanínu (Sørensen *et al.*, 2003).

Murakami *et al.* (2004) sa zaoberali štúdiou LL-37 v ľudskom pote, pričom bolo zistené, že je peptid degradovaný pomocou serínových proteáz na kratšie fragmenty označené ako KR-20, RK-31 a KS-30. Tieto fragmenty sa vyznačujú zvýšenou antimikrobiálnou aktivitou v porovnaní s LL-37. Autori uvádzali, že takéto alternatívne spracovanie hCAP-18 umožňuje organizmu znížiť signalizačnú funkciu LL-37 za súčasného zvýšenia funkcie antimikrobiálnej.



Obr. 5 Štruktúrne vlastnosti peptidu LL-37. A – sekvencia LL-37, B – NMR štruktúra LL-37 zobrazujúca pozíciu zlomu (K12) medzi dvomi helikálnymi doménami, C – pohľad zhora do závitnice zobrazujúci amfipatické vlastnosti LL-37, D – diagram helikálneho kruhu zobrazujúci aminokyseliny v pozíciách 12 – 29 s rozdelením závitnice na doménu hydrofilnú a hydrofóbnu. N- a C-koncové reziduá nie sú štruktúrované (prevzaté a upravené od Duplantier a van Hoek, 2013).

Ako je uvedené v predošlom odstavci proteín hCAP-18 je syntetizovaný v rôznych typoch ľudských buniek. Antimikrobiálny peptid bol prvýkrát objavený a popísaný v leukocytoch (Cowland *et al.*, 1995; Gudmundsson *et al.*, 1996) a semenníkoch (Agerberth *et al.*, 1995) a neskôr aj v rôznych iných bunkách, tkanivách a telesných tekutinách, napríklad na pokožke novorodencov (Marchini *et al.*, 2002), v materskom mlieku (Murakami *et al.*, 2005), v pote (Murakami *et al.*, 2002a), v slinách (Murakami *et al.*, 2002b), v rakovinových bunkách pľúc (Heilborn *et al.*, 2005) či v bunkách tvoriacich pľúcny epitel (Bals *et al.*, 1998).

2.6.3.1 Terapeutické využitie LL-37

Výskum zameraný na terapeutické využitie mnohých antimikrobiálnych peptidov je v súčasnosti stále len v počiatočných štádiách. Ľudský katelicidín LL-37 je považovaný za vhodného kandidáta pre výrobu účinného terapeutika najmä vďaka širokospektrálnemu pôsobeniu predovšetkým voči rôznym druhom baktérií, ale aj vďaka chemotaktickému potenciálu a schopnosťou modulácie imunitného systému (Dürr *et al.*, 2006). Z toho dôvodu je aktivita peptidu LL-37 oproti doteraz používaným syntetickým antibiotikám, ktoré nie sú schopné aktivovať imunitné mechanizmy a pôsobia selektívne, značne výhodná. Okrem iného, v súčasnosti sa čoraz častejšie hovorí o šírení multirezistentných bakteriálnych druhoch voči známym antibiotikám, ktorých mutácie v momente po opakovanej aplikácii antibiotík viedli až k vytvoreniu silnej rezistencie, čím sa do popredia opäť dostávajú už dávno zabudnuté ochorenia (Davies a Davies, 2010). Antibiotickú rezistenciu si mnohé baktérie (*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella*) zabezpečili napríklad vďaka vytvoreniu tzv. biofilmov, útvarov tvorených exopolysacharidovou matrix zoskupujúcich jeden alebo hneď niekoľko rozdielnych bakteriálnych druhov (Whittaker *et al.*, 1996). Baktérie uložené v biofilmoch môžu byť pritom 10 – 100 násobne odolnejšie voči chemickým, fyzikálnym a biologickým antimikrobiálnym látkam (Evans a Holmes, 1987; Prosser *et al.*, 1987) a sú zdrojom nových kategórií chronických infekcií v ľudskom organizme, akými sú napr. pneumónia u pacientov s cystickou fibrózou, chronické rany, chronický zápal stredného ucha a infekcie spojené s implantátmi kĺbov, ktoré môžu viesť až k úmrtiu pacienta (Bjarnsholt, 2013). Podľa nedávnych štúdií sa peptid LL-37 vyznačuje nielen antimikrobiálnou aktivitou, ale aj schopnosťou inhibovať tvorbu bakteriálnych filmov. Mechanizmus, ktorým LL-37 pôsobí proti bakteriálnym biofilmom je v prípade *S. aureus* neznámy, v prípade

P. aeruginosa sa usudzuje o narušení systémov regulácie génovej expresie (Duplantier a van Hoek, 2013). Je však zaujímavé, že LL-37 inhibuje tvorbu bakteriálnych biofilmov za *in vitro* podmienok tvorených či už *S. aureus* alebo *P. aeruginosa* pri koncentráciách približne 30-krát nižších než sú požadované koncentrácie pre usmrtenie alebo inhibíciu rastu samostatných bakteriálnych buniek (Dean *et al.*, 2011). Schopnosť peptidu LL-37 inhibovať vznik bakteriálneho biofilmu môže potenciálne viesť k vývoju novej liečby chronických infekcií a chorôb s nimi spojených (Duplantier a van Hoek, 2013).

Širokospektrálne využitie peptidu LL-37 sa uplatňuje taktiež napríklad v procese hojenia vážnych poranení kože. Pri otvorených ranách dochádza k zvýšeniu koncentrácie peptidu LL-37 na danom mieste, najvyššia koncentrácia AMP je dosiahnutá 48 hodín po poškodení tkaniva, po uzavretí rany potom dochádza k poklesu množstva LL-37 (Heilborn *et al.*, 2003). Zvýšenie koncentrácie katelicidínu v oblasti poranenia je jednak spôsobené jeho intenzívnou proteosyntézou v keratinocytoch a jednak je to dôsledok jeho depozície z granulocytov, ktoré migrujú k miestu poranenia (Dorschner *et al.*, 2001). LL-37 prispieva k hojeniu poškodeného tkaniva predovšetkým indukciou bunecnej proliferácie (Shaykhiev *et al.*, 2005) prostredníctvom fosforylácie epidermálneho rastového faktoru a napomáha k indukcii migrácie keratinocytov, ktoré zabezpečujú uzavretie poranenia (Tokumaru *et al.*, 2005). Kombinácia súčasných poznatkov o pôsobení peptidu LL-37 voči Gram-pozitívnym a Gram-negatívnym baktériám tvoriacich v organizme rozsiahle biofilmy a poznatkov o pozitívnom pôsobení LL-37 v procese hojenia závažných poranení kože človeka môže byť veľmi efektívnym riešením pri liečbe problémov s polymikrobiálnou infekciou otvorených rán. Napríklad u pacientov s ochorením *diabetes mellitus* často trpiacich výskytom chronických vredov na dolných končatinách, ktoré môžu byť infikované niekoľkými biofilmami rôznorodých baktérií by liečba pomocou peptidu LL-37 mohla nájsť vhodné uplatnenie (Duplantier a van Hoek, 2013). V súčasnosti je LL-37 v prvých štádiách klinických testoch pre liečbu pacientov so žilovými vredmi predkolenia (<http://www.pergamum.com/blog/pergamum-announces-final-data-phase-iii-study-ll-37-patients-chronic-leg-ulcers/>).

LL-37 oplýva aj potenciálom zabraňovať vírusovým infekciám v tele človeka, a tak znemožniť rozvinutie mnohých vážnym ochorení, napr. vírusovej bronchiolitídy postihujúcej najmä malé deti, proti ktorej v súčasnosti neexistuje efektívna liečba. V nedávnej štúdií bolo potvrdené, že peptid LL-37 v *in vitro* testoch významne inhibuje

produkcii nových infekčných častíc RVS (respiračný syncytiálny vírus) spôsobujúceho toto ochorenie a zabraňuje tak bunkovej smrti skúmaných epiteliálnych kultúr (Currie *et al.*, 2013). Významnú úlohu by proteín hCAP-18/LL-37 mohol mať aj pri liečbe ďalšieho závažného ochorenia akým je ochorenie AIDS. Proteín hCAP-18/LL-37 totižto v prvých štádiách infekcie chráni črevný epitel počas HIV enteropatii, ktorá je počiatočným krokom pre následný rozvoj HIV ochorenia. V dôsledku infekcie HIV dochádza k zvýšenej črevnej permeabilite spôsobujúcej častý prechod črevných mikroorganizmov do brušnej dutiny, čo má za následok opakované črevné ochorenia, antigénnu stimuláciu a zvýšenie hladiny lipopolysacharidov v krvi u HIV pacientov. Proteín hCAP-18/LL-37 vedie prostredníctvom inaktivácie lipopolysacharidov v gastrointesticiálnej sliznici a prostredníctvom opráv poškodeného tkaniva k značnému zmierneniu týchto počiatočných príznakov a chráni CD4+ T-lymfocyty pred deštrukciou. Použitie hCAP-18/LL-37 na zmiernenie HIV enteropatie by mohlo slúžiť ako podporná liečba infekcie a zároveň peptid chráni sliznice genitálií a dýchacích ciest a znižuje tiež riziko ich infekcie (Iacob, 2009).

Nedávne štúdie ukazujú, že LL-37 slúži ako regulátor pre rast nielen prirodzených buniek organizmu ale aj pre rast a metastázovanie karcinogénnych buniek, pričom môže v závislosti na konkrétnej situácii potlačiť, ale aj podporiť proliferáciu tumorových buniek. Zvýšená expresia génu pre hCAP18/LL-37 bola sledovaná v prípade karcinómu prs, vaječníkov a pľúc (Coffelt *et al.*, 2008; Heilborn *et al.*, 2005; von Haussen *et al.*, 2007) a aplikácia LL-37 viedla k stimulácii bunkového delenia a k invázii rakovinových buniek do okolitých tkanív. LL-37 je bunkami malígneho tumoru produkovaný ako látka pre ich prežitie, hoci presný mechanizmus spôsobujúci procesy delenia a metastázovania nie je známy, predpokladá sa, že dôležitú úlohu zohráva aktivácia špecifických signálnych dráh (Girnita *et al.*, 2011). Doposiaľ zistené informácie o LL-37 a jeho pôsobení na karcinogénne bunky však len poukazujú na zložité a protichodné funkcie peptidu LL-37, ktoré je nutné najmä v spojitosti s jeho využitím ako potenciálneho terapeutika pre liečbu onkologických pacientov, ešte bližšie objasniť.

7 LITERATÚRA

- Agerberth B., Gunne H., Odeberg J., Kogner P., Boman H.G., Gudmundsson G.H. (1995): FALL-37, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **92**, 195-199.
- Ahmand A., Zuraida A. R., Rahiniza K., Zulkifli A. S., Alizah Z., Zamri Z. (2013): Hygromycin as selective marker in Agrobacterium-mediated genetic transformation of indica rice MR210. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* **41**, 71-79.
- Arnau J., Lauritzen C., Petersen G. E., Pedersen J. (2005): Current strategies for use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* **48**, 1-13.
- Bahar A. A., Ren D. (2013): Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* **6**, 1543-1575.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 9541-9546.
- Bardor M., Faveeuw Ch., Fitchette A-C., Gilbert D., Galas L., Trottein F., Faye L., Lerouge P. (2002): Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core $\alpha(1,3)$ -fucose and core xylose. *Glycobiology* **13**, 427-434.
- Bardor M., Loutelier-Bourhis C., Paccalet T., Cosette P., Fitchette A-C., Vézina L-P., Trépenier S., Dargis M., Lemieux R., Lange C., Faye L., Lerouge P. (2003): Monoclonal C5-1 antibody produced in transgenic alfalfa plants exhibits a N-glycosylation that is homogenous and suitable for glyco-engineering into human-compatible structures. *Plant Biotechnology Journal* **1**, 451-461.
- Bioinstitut o.p.s. (2008): Ekologické zemědělství a GMO. Otázky koexistence, Bioinstitut, Grafokon s.r.o., Praha, ČR, 6 strán.
- Bjarnsholt t. (2013): The role of bacterial biofilms in chronic infection. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* **121**, 1-51.
- Boothe J., Nykiforuk C., Shen Y., Zaplachinski S., Szarka S., Kuhlman P., Murray E., Morck D., Moloney M. M. (2010): Seed-based expression systems for plant molecular pharming. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 588-606.
- Bornhorst J. A. a Falke J. J. (2000): Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology* **326**, 245-254.
- Bosch D., Castilho A., Loos A., Schots A., Steinkellner H. (2013): N-Glykosylation of Plant-produced Recombinant Proteins. *Current Pharmaceutical design* **19**, 5503-5512.
- Brogden K.A.; De Lucca, A.J.; Bland, J.; Elliott, S. (1996): Isolation of an ovine pulmonary surfactant-associated anionic peptide bactericidal for *Pasteurella haemolytica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 412-416.
- Brötz H., Bierbaum G., Leopold K., Reynolds P. E., Sahl H.-G. (1998): The Lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan Synthesis by Targeting lipid II. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* **42**, 154-160.
- Bucchini L., Goldman L.R. (2002): Starlink corn: A risk analysis. *Environmental health perspectives* **110**, 5-13.
- Cabanes-Macheteau M., Fitchette-Laine A-C., Loutelier-Bourhis C., Lange C., Vine N. D., Ma J. K., Lerouge P., Faye L. (1999): N-glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants. *Glycobiology* **9**, 365-372.
- Caltabiano G., Campillo M., De Leener A., Smiths G., Vassart G., Costagliola S., Pardo L. (2008): The specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Cellular and molecular life sciences* **65**, 2484-2492.
- Coffelt S. B., Waterman R. S., Florez L., Höner zu Bentrup K., Zvezdaryk K. J., Tomchuck S. L., LaMarca H. L., Danka E. S., Morris C. A., Scandurro A. (2008): Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivative LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion. *International Journal of Cancer* **122**, 1030-1039.
- 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.

- Cubero J., López M. M. (2005): Agrobacterium persistence in plant tissue after transformation. *Methods in molecular biology* **286**, 351-364.
- Currie S. M., Findlay E. G., McHugh B. J., Mackellar A., Man Tian, Macmillan D., Wang H., Fitch P. M., Schwarze J., Davidson D. J. (2013): The human cathelicidin LL-37 has antiviral activity against respiratory syncytial virus. *PLoS One* **8**, 1-10.
- Daniell H., Singh N. D., Mason H., Streatfield S. J. (2009): Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends in plant science* **14**, 669-679.
- Daniell H., Streatfield S. J., Wycoff K. (2001): Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science* **6**, 219-226.
- Danthe M., Nikolenko H., Meyer J., Beyermann M., Bienert M. (2001): Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters* **501**, 146-150.
- Davies J. a Daveis D. (2010): Origin and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Review* **74**, 417-433.
- Dean S. N., Bishop B. M., van Hoek M. L. (2011): Natural and synthetic cathelicidin peptides with anti-microbial and anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* **11**, 1-12.
- Demegen: <http://www.demegen.com/articles/P-113-Candidiasis-results.htm> (2. 5. 2015).
- Dorschner R. A., Pestonjamas V. K., Tamakuwala S., Ohtake T., Rudisill J., Nizet V., Agerberth B., Gudmundsson G. H., Gallo R. L. (2001): Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *The Journal of investigative dermatology* **117**, 91-97.
- Dow AgroScience: <http://www.dowagro.com/> (24.4. 2015).
- Duplantier A. J., van Hoek M., L. (2013): The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potencial treatment for polymicrobial infected wounds. *Frontiers in Immunology* **4**, 1-14.
- Dürr U. H., Sudheendra U. S., Ramamoorthy A. (2006): LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochemica et biophysica acta* **1758**, 1408-1425.
- EC/ERA (2010): Europeans and Biotechnology in 2010 – Winds of change?, European Commission/ European Research Area, Office for official Publication of the European Union, Brusel, Belgicko, 176 strán.
- Ehrenstein G. a Lecar H. (1977): Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Quarterly reviews of biophysics* **10**, 1-34.
- EMA (2008): Guideline on the quality of biological active substances produced by stable transgene expression in higher plants, European Medicines Agency, EMA, Londýn, Anglicko, 11 strán.
- Ericken B., Wu Z., LuW., Lehrer R. I. (2005): Antimicrobial activity and specificity of the six human α -defensins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **49**, 269-275.
- European Commission: http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/index_en.htm (29.4.2015).
- Evans R. C. a Holmes C. J. (1987): Effect of vancomycin hydrochloric on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **31**, 889-894.
- FDA (2002): Guidance for industry: drugs, biologics, and medical devices derived from bioengineered plants for use in humans and animals, Food and Drug Administration, FDA, Rockville, Meryland, U. S. A., 27 strán.
- FDA: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm302549.htm> (24. 4. 2015).
- Fernandez D. I., Le Brun A. P., Whitwell T. C., Sani M. A., James M., Separovic F. (2012): The antimicrobial peptide aurein 1.2 disrupts model membrane via the carpet mechanism. *Physical chemistry, chemical physics* **14**, 15739-15751.
- Fischer R., Buyel J. F., Schillberg S., Twyman R. M. (2014): Molecular Farming in Plants: The Long Road to the Market. In: *Commercial Plant-Produced Recombinant Protein Products*. (Howard J. A., Hood E. E., eds.), Springer-Verlach, Berlín, Nemecko, 22-41.

- Fischer R., Schillberg S., Hellwig S., Twyman R. M., Drossard J. (2012): GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnology Advantages* **30**, 434-439.
- Fjell CH. D., Hiss J. A., Hancock R. E. W., Schneider G. (2012): Designing antimicrobial peptides: from follows function. *Nature Reviews Drug Discovery* **11**, 37-51.
- Fleming, A. (1922): On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proceedings of the Royal Society* **93**, 306-317.
- Fox J. L. (2013): Antimicrobial peptides stage a comeback. *Nature Biotechnology* **31**, 379-382.
- Furtado A., Henry R. J., Pellegrineschi A. (2009): Analysis of promoters in transgenic barley and wheat. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 240-253.
- Furtado A., Henry R. J., Takaiwa F. (2008): Comparison of promoters in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* **6**, 679-693.
- Gaberc-Porekar V., Menart V. (2001): Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of biochemical and biophysical methods* **49**, 335-360.
- Ganz T. (2003): Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **3**, 710-720.
- Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D., Harwing S. S. L., Daher K., Bainton D. F., Lehrer R. L. (1985): Defensins. Natural Peptide Antibiotics of human neutrophils. *The Journal of clinical investigation* **76**, 1427-1435.
- García J.R., Krause A., Schulz S., Rodríguez-Jiménez F. J., Klüver E, Adermann K., Forssmann U., Frimpong-Boateng A., Bals R., Forssmann W. G. (2001): Human beta-defensin 4: A novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *The FASEB Journal* **15**, 1819-1821.
- Gendloff E. H., Bowen B., Buchholz W. G. (1990): Quantitation of chloramphenicol acetyl transferase in transgenic tobacco plants by EI ISA and correlation with gene copy number. *Plant Molecular Biology* **14**, 575-583.
- Gerlach J. Q., Kilcoyne M., McKeown P., Spillane C., Joshi L. (2010): Plant-produced biopharmaceuticals. In: *Transgenic crop plants*. Vol. 2., (Kole C., Michler Ch., Abbott A. G, Hall T. C., eds.), Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 269-299.
- Ghiasi S. M., Salmanian A. H., Chinikar S., Zakeri S. (2011): Mice orally immunized with a transgenic plant expressing the glycoprotein of Crimean-congo hemorrhagic fever virus. *Clinical and vaccine immunology* **18**, 2031-2037.
- Giddings G. (2001): Transgenic plants as protein factories. *Current opinion in biotechnology* **12**, 450-454.
- Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A. (2000): Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* **18**, 1151-1155.
- Giessen T. W., Marahiel M. A. (2012): Ribosome-independent biosynthesis of biologically active peptides: Application of synthetic biology to generate structural diversity. *FEBS Letter* **586**, 2065-2075.
- Girnit A., Zheng H., Grönberg A., Girnit L., Stähle M. (2011): Identification of the cathelicidin peptide LL-37 as agonist for the type I insulin-like growth factor receptor. *Oncogene* **31**, 352-365.
- Goldstein D. A. a Thomas J. A. (2004): Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM* **97**, 705-716.
- Gombart A. F., Borregaard N., Koeffler H. P. (2005): Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *FASEB Journal* **19**, 1067-1077.
- Gomord V., Faye L. (2004): Posttranslation modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 171-181.
- Gomord V., Chamberlain P., Jefferis R., Faye L. (2005): Biopharmaceutical production in plants: problems and opportunities. *Trends in Biotechnology* **23**, 559-565.
- 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.

- Gusman H., Travis J., Helmerhorst E. J., Potempa J., Troxler R. F., Oppenheim F. G. (2001): Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease. *Infection and Immunity* **69**, 1402-1408.
- Hancock R. W. a Chapple D. (1999): Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1317-1323.
- Hancock R. W. a Sahl H.-G. (2006): Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology* **24**, 1551-1557.
- Harder J. a Schroder J. M. (2002): RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 46779–46784.
- Harris F., Dennison S. R., Phoenix D. A. (2009): Anionic Antimicrobial peptides from Eukaryotic Organisms. *Current Protein and Peptide Science* **10**, 585-606.
- Harwood W. A., Barlett J., Alves S., Perry M., Smedley M., Leyland N., Snape J. W. (2009): Barley transformation using Agrobacterium-mediated techniques. In: *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats*, (Huw D., Shewry J., Shewry P. R., eds.), Springer, New York, U.S.A., 137-147.
- Hazlett L., Wu M. (2011): Defensins in innate immunity. *Cell and Tissue Research* **343**, 175–188.
- Hazrati E., Galen B., Lu W., Wang W., Ouyang Y., Keller M. J., Lehrer R. I., Herold B. C. (2006): Human α - and β -defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection. *The Journal of Immunology* **177**, 8658–8666.
- Heilborn J. D., Nilsson M. F., Jimenez C. I., Sandstedt B., Borregaard N., Tham E., Sørensen O. E., Weber G., Ståhle M. (2005): Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *International Journal of Cancer* **114**, 713-719.
- Heilborn J. D., Nilsson M. F., Kratz G., Weber G., Sørensen O., Borregaard N., Ståhle-Bäckdahl M. (2003): The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *The Journal of investigative dermatology* **120**, 379-389.
- Helmerhorst E. J., Reijnders I. M., van't Hof W., Simoons-Smit I., Veerman E. C., Amerongen A. V. (1999): Amphotericin B- and fluconazole-resistant *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, and other newly emerging pathogenic fungi are susceptible to basic antifungal peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 702-704.
- Hensel G., Valkov V., Middlefell-Williams J., Kumlehn J. (2008): Efficient generation of transgenic barley: the way forward to modulate plant-microbe interactions. *Journal of Plant Physiology* **165**, 71–82.
- Henzler Wildman K. A., Lee D. K., Ramamoorthy A. (2003): Mechanism of lipid bilayer disruption by the human antimicrobial peptide, LL-37. *Biochemistry* **42**, 6545-6558.
- Hobbs S. L. A., Kpodar P., DeLong C. M. O. (1990): The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Molecular Biology* **15**, 851-864.
- Hobbs S. L. A., Warkentin T. D., DeLong C. M. O. (1993): Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Molecular Biology* **21**, 17-26.
- Hofbauer A. a Stoger E. (2013): Subcellular accumulation and modification of pharmaceutical proteins in different plant tissues. *Current Pharmaceutical Design* **19**, 5495–5502.
- Hood E. E. (2004): Plants as Enzyme Factories. In: *Handbook of Plant Biotechnology*, (Christou P. a Klee H., eds), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 791-800.
- Hood E. E., Woodard S. L., Horn M. E. (2002): Monoclonal antibody manufacturing in transgenic plants – myths and realities. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 630-635.
- Hopkins R. F., Wall V. E., Esposito D. (2012): Optimizing transient recombinant protein expression in mammalian cells. *Methods in molecular biology* **801**, 251-268.
- Chabaud M., de Carvalho-Niebel F., Barker D. G. (2003): Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant cell reports* **22**, 46-51.

- Chen B., Colgrave M. L., Daly N. L., Rosengren, K. J., Gustafson K. R., Craik D. J. (2005): Isolation and characterization of novel cyclotides from *Viola hederaceae*: solution structure and anti-HIV activity of vhl-1, a leaf-specific expressed cyclotide. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 22395-22405.
- Chen R. (2012): Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. *Biotechnology advances* **30**, 1102-1107.
- Cho J. H., Sung B. H., Kim S. C. (2009): Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochimica et Biophysica Acta* **1788**, 1564–1569.
- Christou P., Stoger E., Twyman R. M. (2006): Monocot Expression Systems for Molecular Farming. In: *Molecular Farming: Plant-made Pharmaceuticals and Technical Proteins*, (Fischer R. a Schillberg S., eds.), Wiley-VCH., New York City, U. S. A., 55-68.
- Chung M. CH.-M. (1984): Structure and function of transferrin. *Biochemical Education* **12**, 146-154.
- Iacob S. A. (2009): Antimicrobial functions of the human cathelicidin hCAP-18. *Medica – a Journal of Clinical Medicine* **4**, 306-312.
- Imatani T. Kato T., Okuda K., Yamashita Y. (2004): Histatin 5 inhibits apoptosis in human gingival fibroblasts induced by porphyromonas gingivalis cell-surface polysaccharide. *European journal of medical research* **9**, 528-532.
- Janssen Biotech: <https://www.janssenbiotech.com/> (26.4.2015).
- Jin C., Bencúrová M., Borth N., Ferko B., Jensen-Jarolim E., Altmann F., Hantusch B. (2006): Immunoglobulin G specifically binding plant N-glycans with high affinity could generated in rabbits but not in mice. *Glycobiology* **16**, 349-357.
- Joensuu J. J., Conley A. J., Lienemann M., Bradle J. E., Linder M. B., Menassa R. (2010): Hydrophobin Fusions for High-Level Transient Protein Expression and Purification in *Nicotiana benthamiana*. *American Society of Plant Biologists* **152**, 622-633.
- Jones D. E. a Bevins C. L. (1993): Defensin-6 mRNA in human Paneth cells: Implication for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel. *FEBS Letters* **315**, 187–192.
- Jones H. D. a Sparks C. A. (2009): Stable transformation of plants. *Methods in molecular biology* **513**, 111-130.
- JRC/IPTS (2008): Plant Molecular Pharming. Opportunities and Challenges, JRC Scientific and Technical Reports, Joint research centre/Institute for Prospective Technological Studies, Brusel, Belgicko, 148 strán.
- Kawakatsu T. a Takaiwa F. (2010): Cereal seed storage protein synthesis: fundamental processes for recombinant protein production in cereal grains. *Plant biotechnology journal* **8**, 939-953.
- Kehler B., Wierwille S., Clemetson K. J., Anders O., Steiner M., Knight C. G., Farndale R. W., Okuma M., Barnes M. J. (1998): Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood* **91**, 491-499.
- Kumar S. a Fladung M. (2001): Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). II. Molecular characterization of variable expression of transgene in wild and hybrid aspen. *Planta* **213**, 731-740.
- Kuntz M. (2012): destruction of public and governmental experiments of GMO in Europe. *GM Crops & Food* **3**, 258-264.
- Kusnadi A. R., Nikolov Z. L., Howard J. A. (1997): Production of recombinant proteins in transgenic plants: Practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering* **56**, 473-484.
- Lai R., Liu H., Lee W. H., Zhang Y. (2002): An anionic antimicrobial peptide from toad *Bombina maxima*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **295**,795-799.
- Lampert D. T. A., Kieliszewski M. J., Chen Y., Cannon M. C. (2011): Role of the Extensin Superfamily in Primary Cell Wall Architecture. *Plant Physiology* **156**, 11-19.
- Laros F. J. M. a Steenkamp J.-B. E. M. (2004): Importance of fear in the case of genetically modified food. *Psychology and Marketing* **21**, 889-908.
- Larrick J. W., Hirata M., Balint R.F., Lee J., Zhong J., Wright S. C. (1995): Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein, *Infection and Immunity*. **63**, 1291-1297.

- Laver D. R. (1994): The barrel-stave model as applied to alamethicin and its analogs reevaluated. *Biophysical journal* **66**, 355-359.
- Lavery G., Gorman S. P., Gilmore B. F. (2011): The Potential of Antimicrobial Peptides as Biocides. *International Journal of Molecular Sciences* **12**, 6566-6596.
- Lee CH.-CH., Sun Y., Qian S., Huang H. W. (2011): Transmembrane Pores Formed by Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biophysical Journal* **100**, 1688-1696.
- Lehrer R. I. (2004): Primate defensins. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 727-738.
- Levi G. (2000): Vaccine cornucopia. Transgenic vaccines in plants: new hope for global vaccination?. *EMBO reports* **1**, 378-380.
- Ludke S. J., He K., Heller W. T., Harroun T. A., Yang L., Huang H. W. (1996): Membrane Pores Induced by Magainin. *Biochemistry* **35**, 13723-13728.
- Ma J. K.-C., Drake P. M. W., Christou P. (2003): Genetic modification: The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics* **4**, 794-805.
- MacKay B. J., Pollock J. J., Iacono V. J., Baum B. J. (1984): Isolation of milligram quantities of a group of histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. *Infection and Immunity* **44**, 688-694.
- Malkovski M., Dashper S. G., O'Brien-Simpson N. M., Talbo G.H., Marcis M., Cross K. J., Reynolds E. C. (2001): Kappacin, a Novel Antibacterial Peptide from Bovine Milk. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 2309-2315.
- Marchini G., Lindow S., Brisman H., Stabi B., Berggren V., Ulfgren A. K., Lonne-Rahm S., Agerberth B., Gudmundsson G. H. (2002): The newborn infant is protected by an innate antimicrobial barrier: peptide antibiotics are present in the skin and vernix caseosa. *The British journal of dermatology* **147**, 1127-1134.
- Marris C. (2001): Public views on GMOs: deconstructing the myths. *EMBO reports* **2**, 545-548.
- Marthe C., Kumlehn J., Hensel G. (2014): Barley (*Hordeum vulgare* L.) Transformation Using Immature Embryos. In: *Agrobacterium Protocols* 1, (Wang K. ed.), Springer New York, U.S.A., 71-83.
- Marvier M. (2007): Pharmaceutical crops have a mixed Outlook in California. *California Agriculture* **61**, 59-66.
- Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K. (1996): An Antimicrobial Peptide, Magainin 2, Induced Rapid Flip-Flop of Phospholipids Coupled with Pore Formation and Peptide Translocation. *Biochemistry* **35**, 11361-11268.
- Matsuzaki K., Yoneyama S., Fujii N., Miyajima K., Yamada K., Kirino Y., Anzai K. (1997): Membrane permeabilization mechanisms of a cyclic antimicrobial peptide, tachyplesin I, and its linear analog. *Biochemistry* **36**, 9799-9806.
- McCullen A. C. a Binns A. N. (2006): *Agrobacterium tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**, 101-127.
- Medicago: <http://www.medicago.com/> (30.4.2015).
- Merlin M., Gecchele E., Capaldi S., Pezzotti M., Avesani L. (2014): Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production in Different Biofactories: The Green Perspective. *BioMed Research International* **2014**, 1-14.
- Messeguer J., Fogher C., Guiderdoni E., Marfa V., Catala M. M., Baldi G., Mele E. (2001): Field assessment of gene flow from transgenic to cultivated rices (*Oryza sativa* L.) using a herbicide resistance genes as tracer marker. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 1151-1159.
- Miao V., Coëffet-Legal M. F., Brian P., Brost R., Penn J., Whiting A., Martin S., Ford R., Parr J., Bouchard M., Silva C. J., Wrigley S. K., Baltz R. H. (2005): Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology* **151**, 1507-1523.
- Molecular pharming: <http://www.molecularfarming.com/PMPs-and-PMIPs.html> (30.4.2015).
- Moravec T., Čerovská N. (2014): The Use of Legume Seed for Expression and Storage of High Value Proteins. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **50**, 69-76.

- Murakami M., Dorschner R. A., Stern L. J., Gallo R. L. (2005): Expression and secretion of cathelicidin antimicrobial peptides in murine mammary glands and human milk. *Pediatric research* **57**, 10-15.
- Murakami M., Lopez-Garcia B., Braff M., Dorschner R. A., Gallo R. L. (2004): Postsecretory processing generates Multiple Cathelicidins for Enhanced Topical Antimicrobial Defense. *The Journal of Immunology* **172**, 3070-3077.
- Murakami M., Ohtake T., Dorschner R. A., Gallo R. L. (2002b): Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. *Journal of dental research* **81**, 845-850.
- Murakami M., Ohtake T., Dorschner R. A., Schitteck B., Garbe C., Gallo R. L. (2002a): Cathelicidin anti-microbial peptide expression in sweat, an innate defense system for the skin. *The Journal of Investigative dermatology* **119**, 1090-1095.
- Murakami Y., Xu T., Helmerhorst E. J., Ori G., Troxler R. F., Lally E. T., Oppenheim F. G. (2002c): Inhibitory effect of synthetic histatin 5 on leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiology and Immunology* **17**, 143-149.
- Murray F., Brettell R., Matthews P., Bishop D, Jacobsen J. (2004): Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Reports* **22**, 397-402.
- Nallamsetty S., Waugh D. S. (2007): Mutation that alter the equilibrium between open and closed conformations of Escherichia coli maltose-binding protein impede its ability to enhance the solubility of passenger proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **364**, 639-644.
- Nandi S. and McDonald K. A. (2014): Expression of Recombinants Proteins in Cell Culture. In: *Plant-derived Pharmaceuticals: Principles and Applications for Developing Countries*. (Heffeton K. L., ed.), CABI Biotechnology Series, Boston, U.S.A., 20-35.
- Nasser M. W., Pooja V., Abdin M. Z. Jain S. K. (2003): Evaluation of Yeast as an Expression System. *Indian Journal of Botechnology* **2**, 477-493.
- Neubauerová T., Macková M., Macek T., Koutek B. (2009): Kationické antimikrobiální peptidy. *Chemické listy* **103**, 460-468.
- Nishi H., Komatsuzawa H., Fujiwara T., McCullum N., Sugai M. (2004): Reduced Content of Lysyl-Phosphatidylglycerol in the Cytoplasmic Membrane Affects Susceptibility to Moenomycin, as Well as Vancomycin, Gentamicin, and Antimicrobial Peptides, in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* **48**, 4800-4807.
- Obembe O.O., Popoola J.O., Leelavathi S., Reddy S.V. (2010): Advances in plant molecular farming. *Biotechnol Advances* **29**, 210-222.
- 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.
- Paulmann M., Arnold T., Linke D., Özdirekcan S., Kopp A., Gutschmann T., Kalbacher H., Wanke I, Schuenemann V. J., Habeck M., Bürck J., Ulrich A. S., Schitteck B. (2012): Structure-activity analysis of the dermcidin-derived peptide DCD-1L, an anionic antimicrobial peptide present in human sweat. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 8434-8443.
- Pergamum: <http://www.pergamum.com/blog/pergamum-announces-final-data-phase-iii-study-ii-37-patients-chronic-leg-ulcers/> (5. 5. 2015).
- Peter J. M., van den Elzen P. J. M., Townsend J., Lee K. Y., Bedbrook J. R. (1985): A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Molecular Biology* **5**, 299-302.
- Peters B. M., Shirtliff M. E., Jabra-Rizk M. (2010): Antimicrobial Peptides: Primeval Molecules or Future Drugs?. *PLOS Pathogens* **6**, 1-4.
- Planet Biotechnology Inc: <http://www.planetbiotechnology.com/index.html>) 24.4.2015
- Porath J. Carlsson J., Olsson I., Belfrage G. (1975): Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-599.
- Powers J.-P. S., Hancock R. E. W. (2003): The relationship between peptide structure and antimicrobial activity. *Peptides* **24**, 1681-1691.

- Prabhu S., Dennison S. R., Lea B., Snape T. J., Nicholl I. D., Radecka I., Harris F. (2013): Anionic Antimicrobial and Anticancer Peptides from Plants. *Critical review in Plant Sciences* **32**, 303-320.
- Prosser B. L., Taylor D., Dix B. A., Cleeland R. (1987): Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **31**, 1502-1506.
- Protalix: <http://www.protalix.com> (30.4.2015).
- Quadri L. E. N., Yan L. Z., Stiles M. E., Vederas J. C. (1997): Effect of amino acid substitutions on the activity of carnobacteriocin B2. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 3384-3388.
- Rashid H., Chaudhry Z., Khan M. H. (2011): Effect of explant plant source and acetosyringone concentration on transformation efficiency of wheat cultivars. *African Journal of Biotechnology* **10**, 8737-8740.
- Rea M. C., Ross P., Cotter P. D., Hill C. (2011): Classification of Bacteriocins from Gram-positive Bacteria. In: *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Gene to Application*, (Drider D., Rebuffat S., eds.), Springer, New York, U.S.A., 29-33.
- Register J.C., Peterson D.J., Bell P.J., Bullock W.P., Evans I.J., Frame B., Greenland A.J., Higgs N.S., Jepson I., Jiao S.P., Lewnau C.J., Sillick J.M., Wilson H.M. (1994): Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Molecular Biology* **25**, 951-961.
- Reid G. E., Stephenson J. L., McLuckey S. A. (2002): Tandem mass Spectrometry of Ribonuclease A and B: N-linked Glycosylation Site Analysis of Whole Protein Ions. *Analytical Chemistry* **74**, 577-583.
- Rigano M. M. a Walmsley A. M. (2005): Special Feature: Plant Derived Vaccines. *Immunology and Cell Biology* **83**, 271-277.
- Rothstein D. M., Spacciapoli P., Tran L. T., Xu T., Roberts F. D., Dalla Serra M., Buxton D. K., Oppenheim F. G., Friden P. (2001): Anticandida activity is retained in P-113, a 12-aminoacid fragment of histatin 5. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1367-1373.
- Ruggiero F., Exposito J. Y., Bournat P., Gruber V., Perret S., Comte J., Olganier B., Garrone R., Theisen M. (2000): Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Letters* **469**, 132-136.
- Samyn-Petit B., Wajdadubos J. P., Chirat F., Coddeville B., Demaizieres G., Farrer S., Slomianny M. C., Theisen M., Delannoy P. (2003): Comparative analysis of the site-specific N-glycosylation of human lactoferrin produced in maize and tobacco plants. *European Journal of Biochemistry* **270**, 3235-3242.
- Selsted M.E., Miller S. I., Henschen A. H., Quелlette A. J. (1992): Enteric defensins: Antibiotic peptide components of intestinal host defense. *The Journal of Cell Biology* **118**, 929-936.
- Sharma V. K., Hänsch R., Mendel R. R., Schulze J. (2005): Seasonal effect on tissue culture response and plant regeneration frequency from non-bombarded and bombarded immature scutella of barley (*Hordeum vulgare*) harvested from controlled environment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **81**, 19-26.
- Shaykhiev R., Beißwenger Ch., Kändler K., Senske J., Püchner A., Damm T., Behr J., Bals R. (2005): Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *Lung Cellular and Molecular Physiology* **289**, 842-848.
- Sheikholeslam S. N. a Weeks D. P. (1987): Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* **8**, 291-298.
- Schittek B., Hipfel R., Sauer B., Bauer J., Kalbacher H., Stevanovic S., Schirle M., Schroeder K., Blin N., Meier F., Rassner G., Garbe C. (2001): Dermicidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands. *Nature Immunology* **2**, 1133-1137.
- Sørensen O.E., Gram L., Johnsen A. H., Andersson E., Bangsbøll S., Tjabringa G. S., Hiemstra P. S., Malm J., Egesten A., Borregaard N. (2003): Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin: A novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 28540-28546.

- Sparkles I. A., Runions J., Kearns A., Hawes CH. (2006): Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocol* **1**, 2019-2025.
- Sreeramanan S., Maziah M., Abdullah M.P., Rosli N. M., Xavier R. (2006): Potential Selectable Marker for Genetic Transformation in Banana. *Biotechnology* **5**, 189-197.
- Staub J. M., Garcia B., Graves J., Hajdukiewicz P. T., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schlittler M., Carroll J. A., Spatola L., Ward D., Ye G., Russell D. A. (2000): High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology* **18**, 333-338.
- Stotz H. U., Waller F., Wang K. (2013): Innate Immunity in Plants: The Role Of Antimicrobial Peptides. In: *Antimicrobial Peptides and Innate Immunity*, (Hiemstra P. S., Zaat S. A. J., eds.), Springer, Basel, Switzerland, 21-59.
- Stempel N., Strehmel J., Overhage J. (2015): Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Current pharmaceutical design* **21**, 67-84.
- Synthon: <http://synthon.com/corporate> (30.4.2015).
- Tamamura H., Ikoma R., Niwa M., Funakoshi S., Murakami T., Fujii N. (1993): Antimicrobial activity and conformation of tachyplesin I and its analogs. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **41**, 978-980.
- Tenea G. a Cucu N. (2006): The influence of T-DNA copy numbers on gene expression in primary transformants *Atropa belladonna* plants. *Roumanian Biotechnological Letters* **11**, 2661-2667.
- Thomas D. R., Penney C. A., Majumder A., Walmsley A. M. (2011): Evolution of Plant-Made pharmaceuticals. *International Journal of Molecular Science* **12**, 3220-3236.
- Tokumar S., Sayama K., Shirakata Y., Komatsuzawa H., Ouhara K., Hanakawa Y., Yahata Y., Dai X., Tohyama M., Nagai H., Yang L., Higashiyama S., Yoshimura A., Sugai M., Hashimoto K. (2005): Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *Journal of Immunology* **175**, 4662-4668.
- Tomasinsig L. a Zanetti M. (2005): The Cathelicidins. Structure, Function and Evolution. *Current Protein and Peptide Science* **6**, 23-34.
- Torregrosa L., G. Lopez G., Bouquee A. (2000): Antibiotic Sensitivity of Grapevine: A Comparison Between the Effect of Hygromycin and Kanamycin on Shoot Development of Transgenic 110 Richter Rootstock (*Vitis Berlandieri* x *Vitis rupestris*). *South African Journal for Enology and Viticulture* **21**, 32-39.
- Tuteja N., Verma S., Sahoo R. K., Raveendar S. (2012): Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and bisafety concern. *Journal of Biosciences* **37**, 167-197.
- 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.
- Uçarli C., Tufan F., Gürel F. (2015): Expression and genomic integration of transgenes after Agrobacterium-mediated transformation of mature barley embryos. *Genetics and molecular research* **14**, 1096-1105.
- Varney K. M., Bonvin A. M. J. J., Pazgier M., Malin J., Yu M., Oasi T., Lu W., Huang J., Diepeveen.de Buin M., Bryant J., Breuklink E., MacKerell Jr. A.D., de Leeuw E. P. H. (2013): Turning Defense into Offense: Defensin Mimetics as Novel Antibiotics Targeting Lipid II. *PLoS Pathogen* **9**, 1-14.
- Ventria Bioscience: <http://www.ventria.com> (30.4.2015).
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. (2003): An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal* **33**, 949-956.
- Von Haussen J., Koczulla R., Shaykhiev R., Herr Ch., Pinkenburg O., Reimer D., Wiewrodt R., Biesterfeld S., Aigner A., Czubyko F., Bals R. (2007): The host defence peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cell. *Lung Cancer* **59**, 12-23.
- Wang G. (2014): Human Antimicrobial peptides and Proteins. *Pharmaceuticals* **7**, 545-594.

- Wang Y., Qu L., Gong L., Sun L., Gong R., Si J. (2013): Targeting and Eradicating Hepatic Cancer Cells with a Cancer-Specific Vector Carrying the Buforin II Gene. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* **28**, 623-630.
- Webster D. E., Thomas M. C. (2012): Post-translational modification of plant-made foreign proteins, glycosylation and beyond. *Biotechnology advances* **30**, 410-418.
- Westra D. F., Welling G. W., Koedijk D. G., Scheffer A. J., The T. H., Welling-Wester S. (2001): Immobilised metal-ion affinity chromatography purification of histidine-tagged recombinant proteins: a wash step with a low concentration of EDTA. *Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications* **760**, 129-136.
- Whittaker C. J., Klier C. M., Kolenbrander P. E. (1996): Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annual review of microbiology* **50**, 513-552.
- Wiedemann I., Breukinks E., van Kraaij C., Kuipers O. P., Bierbaum G., de Kruijff B., Sahl H.-G. (2001): Specific Binding of Nisin to the Peptidoglycan Precursor Lipid II Combines Pore Formation and Inhibition of Cell Wall Biosynthesis for Potent Antibiotic Activity. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 1772-1779.
- Wilde C., Griffith J. E., Marra M., Snable J. L., Scott R. W. (1989): Purification and Characterization of Human neutrophil Peptide 4, a Novel Member of the Defensin Family. *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 11200-11203.
- Winter J. a Wenghoefer M. (2012): human Defensins: Potencial Tools for Clinical Applications. *Polymers* **4**, 691-709.
- Wright K. E., Prior F., Sardana R., Altosaar I., Dudani A. K., Ganz P.R., Tackaberry E. S. (2001): Sorting of glycoprotein B from human cytomegalovirus to protein storage vesicles in seeds of transgenic tabacco. *Transgenic research* **10**, 177-181.
- Yamasaki K., Schaubert J., Coda A., Lin H., Dorschner R. A., Schechter N. M., Bonnart C., Descargues P., Hovnanian A., Gallo R. L. (2006): Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB Journal* **20**, 2068-2080.
- Yang L., Harroun T. A., Weiss T. M., Ding L., Huang W. (2001): Barrel-Stave Model or Toroidal Model? A Case Study on Melittin Pores. *Biophysical Journal* **81**, 1475-1485.
- Yeaman M. R., Yount N. Y. (2003): Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews* **55**, 27-55.
- Yi T., Huang Y., Chen Y. (2015): Prokaryotic expression and antimicrobial mechanism of XPF-St7-derived α -helical peptides. *Journal of Peptides Science* **21**, 46-52.
- Yonezawa A., Kuwahara J., Fujii N., Sugiura Y. (1992): Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action. *Biochemistry* **31**, 2998-3004.
- Zaslhoff M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
- Zechendorf B. (1998): Agricultural biotechnology: Why do Europeans have difficulty accepting it?. *AgBioForum* **1**, 8-13.
- Zentgraf U., Jobst J., Kolb D., Rentsch D. (2004): Senescence-related gene expression profiles of rosette leaves of *Arabidopsis thaliana*: leaf age versus plant age. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **6**, 178-183.
- Zhang L., Rozek A., Hancock R. E. W. (2001): Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 35714-35722.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AAMPs	anionické antimikrobiálne peptidy
ACT	gén kódujúci jačmenný aktín
AMP	antimikrobiálny peptid
AMPs	antimikrobiálne peptidy
ASP	reverse primer
BAP	6-(benzylamino)-purín
<i>B-HORp</i>	B-hordeínový promóter
bp	pár báz
CAMP	gén kódujúci proteín hCAP-18
CAMPs	kationické antimikrobiálne peptidy
cDNA	komplementárna DNA
cv.	kultivar
CXCR4	chimokinový receptor
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
EC	Európska komisia
EMA	Európska agentúra pre lieky
ERA	Európsky výskumný priestor
EU	Európska únia
FDA	americký Úrad pre kontrolu potravín a liečiv
Fw	forward primer
gDNA	genómová DNA
GFP	zelený fluorescenčný proteín
GMO	geneticky modifikovaný organizmus
GST	glutatión S-transferáza
hBD	β -defenzín
hCAP	human cathelicidin antimicrobial peptide
HepG2	bunky hepatocelulárneho karcinómu
<i>HIS</i>	gén kódujúci histatíny
HIV	human imunodeficiency virus
HNP	α -defenzín
<i>hpt</i>	gén kódujúci hygromycíntransferázu
HSV	herpes simplex vírus
Hv	<i>Horedum vulgare</i> L., jačmeň siaty
ICH	Medzinárodnej konferencie o harmonizácii technických požiadaviek na registráciu liekov na humánne použitie
MS	Murrashige and Skoog plant salt base
NMR	nukleárna magnetická rezonancia
OD	optická hustota
Os	<i>Oryza sativa</i> L., ryža siata
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PPM™	Plant Preservative Mixture
RNA	ribonukleová kyselina
RT-PCR	reťazová PCR v reálnom čase
Rv	reverse primer
RVS	respiračný syncyciálny vírus

SDS	dodecylsulfát sodný
SP	forward primer
T0	prvá generácia transgénnych rastlín
TAE	Tris-acetát-EDTA
T-DNA	transferová DNA
TE	Tris-EDTA
Ti-plazmid	tumor indukujúci plazmid
Zm	<i>Zea mays</i> L., kukurica siata
MBP	maltózu viažúci proteín