

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Využitie bioenkapsulácie pre produkciu katelicidínu LL-37 v endosperme jačmeňa

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Veronika Kábrtová
Študijný program:	B1406 Biochemie
Študijný odbor:	Biochemie
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok:	2020

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

V Olomouci dňa

Chcela by som sa veľmi pekne poďakovať vedúcemu práce RNDr. Ondřejovi Plíhalovi, Ph.D. za odbornú pomoc pri práci a jeho rady a pripomienky nielen pri experimentálnej časti tejto diplomovej práce, ale aj pri samotnom spisovaní práce. Okrem toho by som sa chcela poďakovať Mgr. Davidovi Zalabákovi, Ph.D., ktorý mi poskytol veľmi cenné rady pri klonovacej časti diplomovej práce.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Veronika Kábrtová
Názov práce	Využitie bioenkapsulácie pre produkciu katelucidínu LL-37 v endosperme jačmeňa
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Oddelenie molekulárnej biológie
Vedúci práce	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt

Teoretická časť diplomovej práce obsahuje literárnu rešerš na tému antimikrobiálne peptidy a ich diverzitu, mechanizmus účinku a bakteriálnu rezistenciu s následným zameraním na ľudský antimikrobiálny peptid katelucidín LL-37. Okrem toho sú v teoretickej časti popísané štruktúry, ktoré môžeme nájsť v endosperme jačmeňa, ako sú napríklad vakuoly skladujúce proteíny alebo proteínové telieska. V poslednej časti sú popísané rôzne rastlinné heterológne expresné systémy na báze listov a semien, so zameraním na ich výhody a nevýhody použitia a purifikačné stratégie rôznych rekombinantných proteínov využívajúce afinitné značky alebo nechromatografické metódy.

V experimentálnej časti diplomovej práce bola najprv overená funkčnosť signálneho peptidu legumínu B4 vo fúzii s GFP sekvenciou pomocou tranzientnej expzie v listoch tabaku a ich následným pozorovaním pod fluorescenčným a konfokálnym mikroskopom. Okrem toho boli dva konštrukty obsahujúce ľudský katelucidín LL-37 spolu s ďalšími fúznymi značkami klonované najprv do vstupného vektora pENTR1A_Hana a následne pomocou GATEWAY rekombinantnej technológie do expresného vektora pBract209, vhodného na expresiu v endosperme jačmeňa. V rámci testovania a overovania expzie a možnosti purifikácie katelucidinových proteínových fúzií bol vybraný konštrukt PMK-RQ:LL-37 S8 a s týmto bola uskutočnená tranzientná expresia v listoch tabaku. Nakoniec bola táto stratégia zatransformovaná pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens* do listov tabaku a následne purifikovaná využitím fúzných značiek DAMP4 a γ -zeín. Optimalizovaný bol krok extrakcie a následný purifikačný krok pomocou teplotného alebo etanolového zrážania proteínov. Purifikačné kroky boli v tejto práci vyhodnocované pomocou metódy Western blot za použitia anti-LL-37 protilátky.

Kľúčové slová	LL-37, GFP, tabak, jačmeň, DAMP4, γ -zeín, LeB4
Počet strán	85
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Veronika Kábrtová
Title	Use of bioencapsulation for the production of cathelicidin LL-37 in barley endosperm
Type of thesis	Diploma
Department	Department of molecular biology
Supervisor	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
The year of presentation	2020

Abstract

The theoretical part of the diploma thesis contains a review of existing literature on the topic of antimicrobial peptides and their diversity, mechanism of action, and bacterial resistance with a subsequent focus on the human antimicrobial peptide cathelicidin LL-37. Also, the theoretical part describes the structures that can be found in the barley endosperm, such as protein storage vacuoles or protein bodies. The last part describes various plant heterologous expression systems based on leaves and seeds, focusing on their advantages and disadvantages of use and purification strategies of various recombinant proteins using affinity tags or non-chromatographic methods.

In the experimental part of the diploma thesis, the functionality of the signal peptide legumin B4 fused with the GFP sequence was first verified by transient expression in tobacco leaves and their subsequent observation under fluorescence and confocal microscope. Besides, two constructs containing human cathelicidin LL-37 together with other fusion tags were first cloned into the entry vector pENTR1A_Hana and then using GATEWAY recombinant technology into the expression vector pBract209, suitable for expression in barley endosperm. As a part of testing and verification of expression and purification possibilities of cathelicidin protein fusions, the construct PMK-RQ:LL-37 S8 was chosen and with this construct transient expression was performed in tobacco leaves. Finally, this strategy was transformed into tobacco leaves using *Agrobacterium tumefaciens* and subsequently purified using the DAMP4 and γ -zein fusion proteins. The extraction step and the subsequent purification step by thermal or ethanol protein precipitations were optimized. All purification steps were evaluated by means of Western blotting using anti-LL-37 antibody.

Keywords	LL-37, GFP, tobacco, barley, DAMP4, γ -zein, LeB4
Number of pages	85
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Súčasný stav riešenej problematiky.....	10
2.1	Antimikrobiálne peptidy viacbunkových organizmov	10
2.1.1	Diverzita antimikrobiálnych peptidov	11
2.1.2	Mechanizmus účinku antimikrobiálnych peptidov.....	11
2.1.3	Bakteriálna rezistencia	14
2.2	Katelucidíny	15
2.2.1	Diverzita katelucidínov.....	16
2.2.2	Ľudský katelucidín LL-37.....	17
2.3	Jačmeň a jeho endosperm.....	20
2.3.1	Lokalizácia zásobných proteínov v bunke	21
2.3.2	Vakuoly skladujúce proteíny (PSV)	22
2.3.3	γ -Zein a proteínové telieska	23
2.4	Produkcia rekombinantných proteínov v rastlinných systémoch.....	25
2.4.1	Produkčné systémy na báze semien.....	25
2.4.2	Produkčné systémy na báze listov	26
2.5	Purifikácia rekombinantných proteínov z rastlinných systémov	28
2.5.1	Zachytávanie a čistenie rekombinantného proteínu	29
2.5.2	Využitie afinitných značiek pre purifikáciu.....	30
2.5.3	Nechromatografické purifikačné metódy.....	30
3	Experimentálna časť	33
3.1	Materiály	33
3.1.1	Chemikálie	33
3.1.2	Komerčné gély.....	34
3.1.3	Roztoky	34
3.1.4	Protilátky	36
3.1.5	Štandardy molekulovej hmotnosti.....	36
3.1.6	Biologický materiál	36
3.1.7	DNA vektory	37
3.1.8	Primery.....	38
3.1.9	Konštrukty	39
3.1.10	Restričné endonukleázy	40
3.1.11	Rastové médiá	40
3.1.12	Komerčné sústavy a kity	40

3.1.13	Prístroje	40
3.2	Metódy	42
3.2.1	Klonovanie	42
3.2.1.1	Transformácia metódou tepelného šoku	42
3.2.1.2	Transformácia metódou elektroporácie	42
3.2.1.3	Polymerázová reťazová reakcia (PCR).....	42
3.2.1.4	Testovanie pomocou „Colony PCR“	43
3.2.1.5	Izolácia plazmidovej DNA pomocou QIAprep Spin Miniprep kitu	44
3.2.1.6	Izolácia plazmidovej DNA pomocou NucleoBond Xtra Maxi kitu ..	45
3.2.1.7	Gélová elektroforéza.....	46
3.2.1.8	Restriкция	46
3.2.1.9	Purifikácia DNA.....	47
3.2.1.10	Ligácia	47
3.2.1.11	LR reakcia	48
3.2.1.12	Sekvenácia	48
3.2.2	Transformácia listov tabaku pomocou baktérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 48	
3.2.3	SDS-PAGE.....	49
3.2.4	Western blot	50
3.2.5	Fluorescenčná a konfokálna mikroskopia.....	50
3.2.6	Stanovanie celkových proteínov metódou Bradford	51
3.2.7	Purifikácia rekombinantného proteínu z listov tabaku	51
4	Výsledky	54
4.1	Klonovanie konštruktov pMK-RQ:LL-37 S8 a pMK-RQ:LL-37 S9 do expresného vektora pBract209	54
4.2	Transformácia baktérie <i>Agrobacterium tumefaciens</i> konštruktom obsahujúcim sekvenciu GFP-LeB4 v expresnom vektore pMDC32	58
4.3	Tranzientná transformácia listov tabaku a overenie expresie GFP-LeB4 fluorescenčným a konfokálnym mikroskopom	59
4.4	Transformácia listov tabaku konštruktom LL-37 S8 a optimalizácia základných purifikačných krokov	61
5	Diskusia.....	69
6	Záver	73
7	Literatúra	74
8	Zoznam použitých symbolov a skratiek	85

Ciele diplomovej práce:

- 1) Vypracovanie literárnej rešerše na tému antimikrobiálne peptidy a produkčné stratégie pre prípravu rekombinantných proteínov v endosperme jačmeňa.
- 2) Klonovanie konštruktov pre expresiu ľudského katelicidínu LL-37 v tabaku a v jačmeni.
- 3) Testovanie pripravených konštruktov pomocou tranzientnej expresie v listoch tabaku; optimalizácia purifikačnej stratégie rekombinantného produktu a následné testovanie antimikrobiálnej aktivity.
- 4) Testovanie signálnych sekvencií použitých v katelicidinových konštruktoch pomocou fúzie s GFP proteínom a lokalizácia v rastlinách tabaku a jačmeňa.
- 5) Transformácia embryí jačmeňa katelicidinovými konštruktmi.

1 Úvod

Ľudský katalicidín LL-37 patrí k antimikrobiálnym peptidom, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu v obrane proti patogénnym mikroorganizmom. Jeho veľkou výhodou je účinnosť proti gram-negatívnym ako aj proti gram-pozitívnym baktériám a jeho schopnosť pôsobiť aj na baktérie, ktoré si už vytvorili rezistenciu na komerčne dostupné syntetické antibiotiká. Vďaka jeho silnej antibakteriálnej aktivite a imunomodulačným vlastnostiam je tento peptid výborným kandidátom pre farmaceutický priemysel pri klinickej liečbe infekcií a chorôb kože. Okrem toho u neho zatiaľ neboli dokázané žiadne negatívne účinky, keďže je ľudskému telu vlastný. Problémom pri jeho veľkoformátovej produkcii je však vysoká cena syntetického peptidu (10-20 tisíc Kč/mg látky). Riešením by mohla byť jeho veľkoformátová produkcia v endosperme jačmeňa, ako stabilnej produkčnej platforme.

Cieľom tejto diplomovej práce bolo pripraviť konštrukty obsahujúce dve rôzne stratégie s ľudským katalicidínom a ďalšími fúznymi značkami do vstupného vektora pENTR1A_Hana (s B-hordeinovým promotórom) a následne pomocou GATEWAY technológie do expresného vektora pBract209, ktorý je vhodný k samotnej transformácii jačmeňa, pod kontrolou hordeinového promotóru. Okrem toho bola testovaná funkčnosť signálneho peptidu legumínu B4 pomocou fúzie so sekvenciou GFP. Pripravený konštrukt v expresnom vektore pMDC32 bol zatransformovaný do baktérie *Agrobacterium tumefaciens* a následne bola funkčnosť konštraktu overená tranzientnou expresiou v listoch tabaku, ktoré boli pozorované pod fluorescenčným a konfokálnym mikroskopom. Nakoniec bola jedna stratégia s preukázane vysokou expresiou (pripravená v expresnom vektore pMDC32, vhodným k transformácii tabaku pod kontrolou konštitutívneho 35S promotóra) zatransformovaná do baktérie *Agrobacterium tumefaciens* a následne prebehla tranzientná expresia v listoch *Nicotiana benthamiana*. Listy boli zhomogenizované a rekombinantný proteín bol extrahovaný do vhodného extrakčného pufru. Po extrakcii bol proteín purifikovaný pomocou metód vhodných pre príslušné fúzne značky obsiahnuté v pripravenom konštrukte a samotná purifikácia bola vyhodnotená pomocou metódy Western blot.

2 Súčasný stav riešenej problematiky

2.1 Antimikrobiálne peptidy viacbunkových organizmov

Antimikrobiálne peptidy (AMP) sú bohatou a rozmanitou skupinou molekúl, ktoré sú produkované mnohými typmi tkanív a buniek u rôznych druhov bezstavovcov, rastlín a zvierat (Brogden, 2005). Konkrétne ide o oligopeptidy s rozdielnym počtom (od 5 do viac ako 100) aminokyselín. Majú široké spektrum cieľových organizmov od vírusov, baktérií a húb, až po parazity. Historicky boli tiež antimikrobiálne peptidy označované ako kationové hostiteľské obranné peptidy (Brown a Hancock, 2006), aniónové antimikrobiálne peptidy/proteíny (Harris *et al.*, 2009), kationové amfipatické peptidy (Groenink *et al.*, 1999) alebo α -helikálne antimikrobiálne peptidy (Huang *et al.*, 2010).

U zvierat sa antimikrobiálne peptidy väčšinou nachádzajú v tkanivách a orgánoch, ktoré sú vystavené patogénom vo vzduchu a sú považované za prvú líniu vrodenej imunitnej obrany (Zaslouff, 2002; Schaubert a Gallo, 2008). Hrajú teda dôležitú úlohu pri zastavení väčšiny infekcií predtým, ako spôsobia akékoľvek príznaky. Väčšina AMP je produkovaná špecifickými bunkami po celú dobu, zatiaľ čo produkcia niektorých musí byť indukovaná (Conlon a Sonnevend, 2010; Ma *et al.*, 2010).

Na produkcii AMP sa podieľa niekoľko typov eukaryotických buniek. Patria sem lymfatické bunky, epitelové bunky v gastrointestinálnom a močopohlavnom systéme (Niyonsaba *et al.*, 2002; Ganz, 2003), fagocyty (Hancock a Scott, 2000) a lymfocyty imunitného systému (Oppenheim *et al.*, 2003; Radek a Gallo, 2007). Okrem priamej účasti na vrodenej imunite sa zistilo, že AMP ovplyvňujú zápalové reakcie hostiteľa počas infekcie (Scott *et al.*, 2000; Nijnik *et al.*, 2012; Kindrachuk *et al.*, 2013). Je známe, že molekuly lipopolysacharidov uvoľňované baktériami v dôsledku antibiotickej liečby alebo hostiteľovej imunity, môžu indukovať tvorbu AMP u cicavcov (Hancock a Scott, 2000).

Niektoré AMP (CAP18 (Larrick *et al.*, 1995), CAP35 (Brackett *et al.*, 1997) a derivát laktoferínu (Zhang *et al.*, 1999) môžu tiež blokovať lipopolysacharidmi indukované uvoľňovanie cytokínov makrofágmi. Tieto AMP môžu teda znížiť zápalovú reakciu. Antibiotiká nemajú tento typ regulácie zápalových reakcií imunitného systému hostiteľa a sekrécia lipopolysacharidov po liečbe antibiotikami môže spôsobiť nadmernú reakciu

imunitného systému hostiteľa. V niektorých extrémnych prípadoch táto reakcia môže dokonca viesť k sepsy (Loppnow *et al.*, 1990; Hancock a Scott, 2000).

2.1.1 Diverzita antimikrobiálnych peptidov

Diverzita antimikrobiálnych peptidov je taká veľká, že je ťažké ich kategorizovať s výnimkou ich sekundárnej štruktúry. Základným štruktúrnym princípom všetkých tried je schopnosť molekuly prijať tvar, v ktorom sú zhluky hydrofóbných a kationových aminokyselín priestorovo organizované v diskretných sektoroch molekuly ("amfipatický" dizajn) (Zasloff, 2002).

Všetky antimikrobiálne peptidy sú odvodené z väčších prekurzorov, vrátane signálnej sekvencie. Posttranslačné modifikácie zahŕňajú proteolytické spracovanie a v niektorých prípadoch glykozyzáciu (Bulet *et al.*, 1993), karboxy-terminálnu amidáciu, izomerizáciu aminokyselín (Simmaco *et al.*, 1998) a halogenáciu (Shinnar *et al.*, 1996). Rozmanitosť sekvencií je taká, že rovnaká peptidová sekvencia sa zriedka nachádza u dvoch rôznych druhov zvierat, dokonca aj tých, ktoré sú úzko príbuzné, či už ide o hmyz, žaby alebo cicavce (Zasloff, 2002).

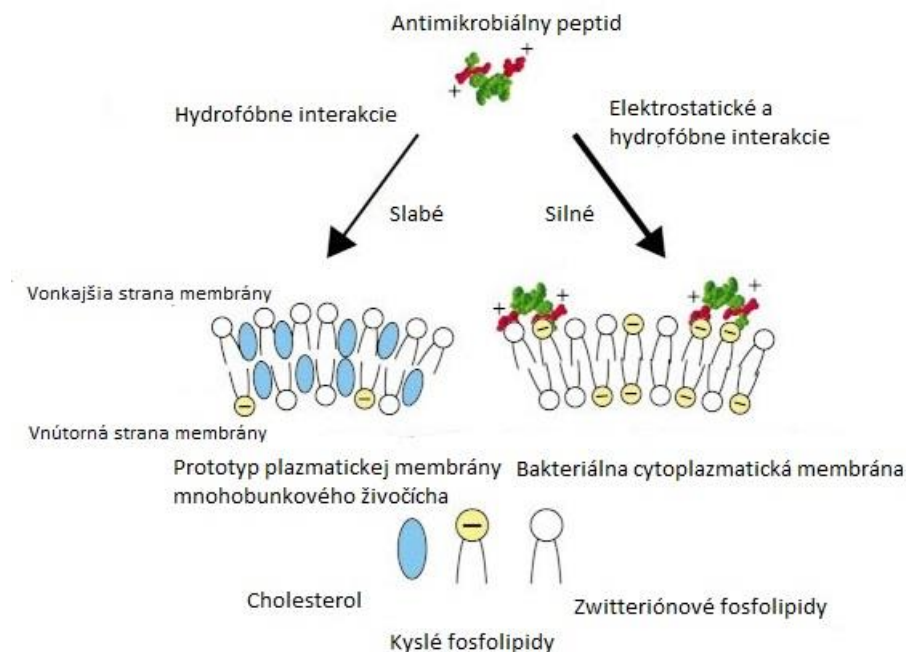
Samotná diverzita vzniká vďaka jednotlivým mutáciám, ktoré môžu dramaticky zmeniť biologickú aktivitu každého peptidu. Odráža adaptáciu druhu na jedinečné mikrobiálne prostredie, ktoré charakterizuje obývané útočisko, vrátane mikróbov spojených s prijateľnými zdrojmi potravy (Simmaco *et al.*, 1998; Boman, 2000). V prípade, že by sa jednotliviec ocitol v prostredí plnom mikróbov, proti ktorým sú peptidy jeho druhu neúčinné, by samotný jedinec mohol zahynúť, avšak jeho druh by mohol prežiť vďaka vzniku jedincov, u ktorých došlo k prospešným mutáciám. Adaptívna imunita prostredníctvom svojej tvárnosti teda dovoľuje, aby druh umožňoval jednotlivcom skúmať nové prostredie a využívať nové zdroje potravy (Boman, 2000).

2.1.2 Mechanizmus účinku antimikrobiálnych peptidov

Antimikrobiálne peptidy sú zamerané na prekvapivý, ale zásadný rozdiel v dizajne membrán mnohobunkových živočíchov a mikróbov, pričom najlepšie to je pochopené pre bakteriálne ciele. Bakteriálne membrány sú totiž organizované takým spôsobom, že najvzdialenejší list dvojvrstvy, povrch vystavený vonkajšiemu svetu, je silne osídlený záporne nabitými fosfolipidmi (Matsuzaki, 1999).

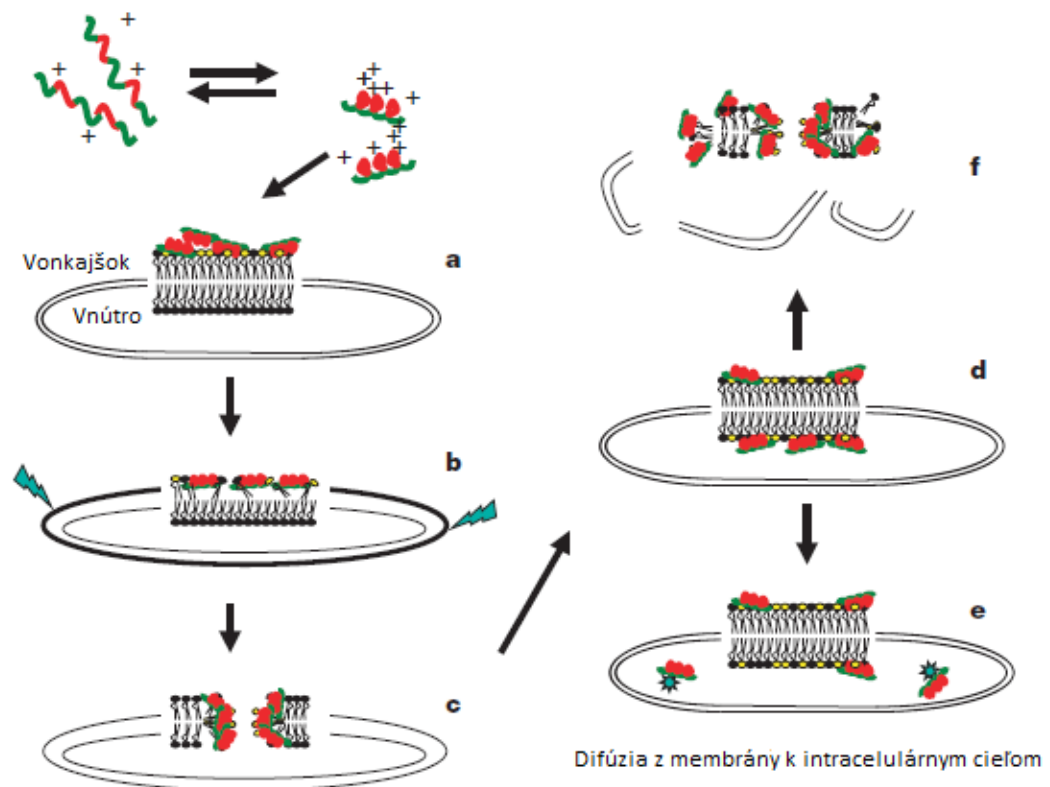
Na rozdiel od bakteriálnej membrány je vonkajší list membrán rastlín a živočíchov zložený hlavne z lipidov bez náboja. Väčšina záporne nabitých fosfolipidov sa nachádza na vnútornej strane fosfolipidovej dvojvrstvy a čelí cytoplazme (Obr. 1) (Matsuzaki, 1999).

Model, ktorý vysvetľuje aktivitu väčšiny antimikrobiálnych peptidov je model Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) (Obr.2) (Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Yang *et al.*, 2000), ktorý popisuje interakciu peptidu s membránou a následne vytesnenie lipidov, zmenu membránovej štruktúry a v určitých prípadoch vstup peptidu do vnútra cieľovej bunky. Prítomnosť cholesterolu v membráne všeobecne znižuje aktivitu antimikrobiálnych peptidov v dôsledku stabilizácie lipidovej dvojvrstvy alebo interakcií medzi cholesterolom a peptidom (Matsuzaki, 1999). Taktiež sa predpokladá, že zvyšujúca sa iónová sila, ktorá vo všeobecnosti znižuje aktivitu väčšiny antimikrobiálnych peptidov, to čiastočne robí tým, že oslabuje vzájomné pôsobenie elektrostatického náboja potrebného pre počiatočnú interakciu. Peptidy pôsobiace SMH mechanizmom zabíjajú mikróby pri mikromolárnych koncentráciách (Zaslhoff, 2002).



Obr.1 Membránový cieľ antimikrobiálnych peptidov mnohobunkových organizmov a základ pre ich špecifickosť (prevzaté a upravené z Matsuzaki, 1999).

Boli predstavené mnohé hypotézy, ako antimikrobiálne peptidy zabíjajú mikróby a medzi hlavné patria najmä: smrteľná depolarizácia bakteriálnej membrány (Westerhoff *et al.*, 1989), vytvorenie fyzických dier, ktoré spôsobujú únik bunkového obsahu (Yang *et al.*, 2000), aktivácia smrtiacich procesov, ako je indukcia hydroláz, ktoré degradujú bunkovú stenu (Bierbaum a Sahl, 1985) a miešanie normálne distribuovaných lipidov medzi listami dvojvrstvy, čo vedie k narušeniu membránových funkcií (Matsuzaki, 1999).



Obr. 2 Shai-Matsuzaki-Huang model mechanizmu účinku antimikrobiálneho peptidu. Znáznomený je α -helikálny peptid. Lipidy so žltými hlavičkami sú kyslé alebo negatívne nabité. Lipidy s čiernymi hlavičkami nemajú žiaden náboj. a) Povrchová vrstva vonkajšieho listu dvojvrstvy s peptidmi. b) Integrácia peptidu do membrány a stenčenie vonkajšieho listu dvojvrstvy. Povrchová plocha vonkajšieho listu sa zväčšuje vzhľadom k vnútornému listu, čo vedie k namáhaniu v dvojvrstve (zúbkované šípky). c) V tomto štádiu dochádza k fázovému prechodu a formovaniu prechodných pórov. d) Transport lipidov a peptidov do vnútorného listu dvojvrstvy. e) Difúzia peptidov k intracelulárnym cieľom (v niektorých prípadoch). f) Kolaps membrány na fragmenty a fyzické narušenie membrány cieľovej bunky. (Prevzaté a upravené z Matsuzaki, 1999; Shai, 1999; Yang *et al.*, 2000).

2.1.3 Bakteriálna rezistencia

Na rozdiel od tradičných antibiotík, ako je penicilín a mnoho ďalších, ktoré mikroby ľahko obchádzajú, je získanie rezistencie citlivými mikrobiálnymi kmeňmi proti antimikrobiálnym peptidom prekvapivo nepravdepodobné. Niektoré rezistentné druhy využívajú expresiu vonkajšej membrány, ktorá nemá vhodnú hustotu kyslých lipidov, aby boli vytvorené miesta schopné viazať antimikrobiálny peptid. Iné druhy môžu vylučovať tráviace proteázy, ktoré peptidy ničia. Štúdie, ktoré publikovali o „získanej rezistencii“ proti antimikrobiálnym peptidom identifikovali gény, ktoré po rozbití robia citlivé organizmy náchylnejšie na konkrétny antimikrobiálny peptid. Tieto gény majú zvyčajne úlohu pri virulencii. Základ pre rôzne citlivosti bakteriálnych a plesňových druhov proti určitým peptidom zostáva nevysvetlený (Zasloff, 2002).

Gramnegatívne baktérie majú vonkajšiu membránu zloženú z lipopolysacharidu (LPS), ktorý je držaný spolu horčíkovými a vápenatými iónmi, ktoré premostujú záporne nabitú fosforylovanú sacharidovú časť. Pridanie kationových peptidov následne vedie k vytesneniu kovu, poškodeniu vonkajšej membrány a uľahčuje vstup ďalších molekúl z vonkajšieho prostredia. Peptidy, ktoré získali prístup do periplazmatického priestoru sa môžu integrovať do cytoplazmatickej membrány (Hancock *et al.*, 1995).

Prečo ale neboli mikroby úspešnejšie pri odolávaní antimikrobiálnym peptidom vzhľadom na časové rozpätie, počas ktorého sa tieto mechanizmy mohli vyvinúť? Pretože cieľom peptidov je bakteriálna membrána a mikróby by museli prepracovať svoju membránu, zmeniť zloženie alebo organizáciu svojich lipidov, čo predstavuje energeticky náročné riešenie pre väčšinu mikrobiálnych druhov (Zasloff, 2002). Samotné zničenie antimikrobiálneho peptidu predstavuje niekoľko problémov. Väčšina antimikrobiálnych peptidov je vytvorená z nešpecifických sekvencií aminokyselín, ktorým chýbajú jedinečné epitopy, ktoré by mohli slúžiť ako rozpoznávacie miesto pre proteázy potrebné k selektívnej deštrukcii antibiotika v prítomnosti bunkových proteínových zložiek. Okrem toho mnohobunkové organizmy napádajú mikroby s viacerými peptidmi rôznych štruktúrnych tried, takže deštrukcia jedného peptidu nemusí byť schopná odvrátiť smrteľný útok. Je možné, že virulentné gény, ku ktorým dochádza v baktériách a pomocou ktorých je ovplyvnená citlivosť voči antimikrobiálnym peptidom, predstavujú najlepšiu obranu, ktorú väčšina mikróbov môže vytvoriť bez straty životaschopnosti (Zasloff, 2002).

2.2 Katelucidíny

Katelucidíny sú rodinou kationových peptidov, ktoré vykazujú vo fyziologických koncentráciách antimikrobiálnu aktivitu a sú považované za dôležitú súčasť imunitnej obrany hostiteľa. Tieto génovo kódované ribozomálne syntetizované antibiotiká sa produkujú ako prepropeptidy obsahujúce vysoko konzervovanú doménu podobnú katelínu, od ktorej je odvodené ich meno. Proteolytickým odštiepením signálneho peptidu a prosekvenie sa získa heterogénny zrelý peptid (Zanetti *et al.*, 1995). Zrelé peptidy typicky vykazujú amfipatické a kationové vlastnosti, ktoré napomáhajú pri narušení membrány bakteriálnych buniek (Chang *et al.*, 2006).

Pôvodne boli katelucidíny identifikované v hovädzích neutrofiloch na začiatku 90tych rokov, následne boli nájdené u rôznych cicavcov (Zanetti, 2005). Kedysi sa predpokladalo, že katelucidíny sú peptidy špecifické pre cicavce, no odvtedy boli gény kódujúce tieto peptidy charakterizované napríklad aj u sliznatky morskej (Uzzell *et al.*, 2003), pstruha dúhového (Chang *et al.*, 2005), kurčiat (Xiao *et al.*, 2006), atlantického lososa (Chang *et al.*, 2006) a ďalších rôznych druhov rýb (Maier *et al.*, 2008a; Maier *et al.*, 2008b; Scocchi *et al.*, 2009) a plazov (Wang *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008). Rozsiahle *in vitro* štúdie uskutočňované s použitím cicavčích katelucidínov preukázali, že majú široké antimikrobiálne účinky, ktoré umožňujú obranu proti množstvu gramnegatívnych a grampozitívnych baktérií, húb, parazitov a vírusov (Ramanathan *et al.*, 2002). Okrem toho štúdie *in vivo* demonštrujú dôležitosť katelucidínov v obranných mechanizmoch cicavcov. Napríklad nedostatok myšacieho katelucidínu (CRAMP) u myši s knockoutovaným génom CRAMP zvyšuje ich náchylnosť na streptokokové infekcie skupiny A (Nizet *et al.*, 2001). Podobne sa preukázalo, že ľudský katelucidín LL-37 má ochrannú funkciu proti niekoľkým invazívnym bakteriálnym infekciám kože (Dorschner *et al.*, 2001; Ong *et al.*, 2002).

Okrem ich prevládajúcej antimikrobiálnej role majú katelucidíny cicavcov niekoľko ďalších biologických aktivít, vrátane schopnosti chemoatrakovať neutrofile, monocyty a T bunky (Agerberth *et al.*, 2000) a propagovať angiogézu a hojenie rán (Carretero *et al.*, 2007; Bucki *et al.*, 2010). Silná antibakteriálna aktivita, dokonca aj proti kmeňom rezistentným voči viacerým liečivám, a imunomodulačné vlastnosti katelucidínov z nich robia populárneho kandidáta pre klinickú liečbu infekcií a chorôb (Bucki *et al.*, 2010).

Hoci sa expresia katelicidínov zvyčajne považuje za prospešnú, môže tiež prispievať k patofyziológii chorôb. Napríklad expresia katelicidínu LL-37 je zvýšená u pacientov so psoriázou a rosaceou, ale u pacientov s atopickou dermatitídou je expresia naopak znížená. Pri rosacei spôsobuje nadmerná expresia zápal a abnormálny rast krvných ciev aktiváciou príslušných buniek (Yamasaki *et al.*, 2007). Pri psoriáze sa predpokladá, že vlastná RNA alebo DNA tvoria komplexy s LL-37, ktoré riadia auto zápalové reakcie spojené s ochorením (Ong *et al.*, 2002; Ganguly *et al.*, 2009). Podobne nízke hladiny LL-37 v slinách sú spojené s periodontálnym ochorením (Pütsep *et al.*, 2002).

2.2.1 Diverzita katelicidínov

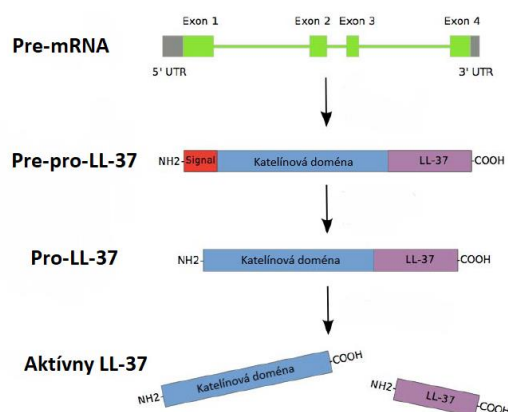
U cicavcov bolo identifikovaných celkovo asi 30 členov rodiny katelicidínov. Zatiaľ čo u väčšiny ich bolo nájdených v organizme niekoľko, u ľudí, opíc rézus, myši, potkanov a morčiat bol objavený iba jediný katelicidín. Tieto katelicidíny sa nazývajú LL-37, RL-37, mCRAMP, rCRAMP a CAP11 (Gallo *et al.*, 1997; Nagaoka *et al.*, 1997; Bals *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2001; Nagaoka *et al.*, 2002; Di Nardo *et al.*, 2003; Termén *et al.*, 2003; Tomasinsig a Zanetti, 2005; Zanetti, 2005; Dürr *et al.*, 2006). U koní boli identifikované 3 katelicidíny eCATH1, -2 a -3 (Scocchi *et al.*, 1999). Okrem toho boli peptidy podobné katelicidínom popísané u ošípaných (PMAP37, 36 a 23, PG1 – PG5, PR39 a PF-1, -2) (Lenarcic *et al.*, 1993; Storici *et al.*, 1994; Zanetti *et al.*, 1994; Gudmundsson *et al.*, 1995; Strukelj *et al.*, 1995; Tossi *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1995; Fahrner *et al.*, 1996), u hovädzieho dobytku (BMAP27, 28 a 34, Bac5 a 7, indolicidín a bakteneccín-1) (Selsted *et al.*, 1992; Skerlavaj *et al.*, 1996; Storici *et al.*, 1996; Scocchi *et al.*, 1997), u buvola (katelicidín-4 buvola domáceho a myeoloidný katelicidín) (Das *et al.*, 2006), jeleňa (katelicidín jeleňa iberského, bakteneccín) (Fernández de Mera *et al.*, 2008), oviec (SMAP29 a 34, OaBac5, 6, 7,5, 11) (Bagella *et al.*, 1995; Mahoney *et al.*, 1995; Huttner *et al.*, 1998), kôz (BAC5, BAC7.5, MAP34A a B, MAP28, ChBac3.4) (Shamova *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2004), u kurčiat (CATHL1, 2 / CMAP27, 3 a katelicidín-B1) (Xiao *et al.*, 2006), u lososa atlantického (asCath1 a 2) (Chang *et al.*, 2006) a pstruha dúhového (rtCath1 a 2) (Chang *et al.*, 2006). Genóm sliznatky morskej obsahuje tri sekvencie, ktoré sú podobné katelicidínu (HFIAP-1, -2 a -3) (Uzzell *et al.*, 2003). Okrem toho dva ovčie gény nazývané OaDodeA a OaDodeB kodovali identické dodekapeptidy s názvom katelicidín-1 (Huttner *et al.*, 1998).

Katelicidíny sa skladujú v neutrofilných granulách ako neaktívne prekurzory (prepropeptidy). Po štiepení neutrofilnou elastázou sa uvoľňujú ako zrelé peptidy (Treffers *et al.*, 2005). N-terminálna signálna sekvencia a proregión (kathelín) sú medzi druhmi a rôznymi peptidmi vysoko konzervované, zatiaľ čo C-terminálna doména kódujúca zrelý peptid vykazuje podstatnú heterogenitu (Zanetti *et al.*, 1995; Zanetti, 2005). C-terminálne domény v niektorých peptidoch katelicidínu sú α -helikálne, v iných majú tvar β -vlákna a v niektorých peptidoch sú bohaté na prolín/arginín. Rodina katelicidínov pozostáva z piatich rôznych skupín peptidov (Zanetti, 2005). Obsahujú: (1) cyklické dodekapeptidy s jednou disulfidovou väzbou, (2) prasačie protegríny s dvoma disulfidovými väzbami, (3) peptidy s α -helikálnou štruktúrou, ako je napríklad hovädzí BMAP-27, -28 a -34, ľudský hCAP18 a tri známe konské katelicidíny, (4) peptidy obsahujúce vysoký počet zvyškov tryptofánu, ako je indolicidín, a peptidy obsahujúce vysoký počet zvyškov prolínu a arginínu, a (5) krátke molekuly usporiadané v tandemových opakovaníach, ako sú napríklad baktencíny (napríklad hovädzí Bac5 a 7) (Tossi *et al.*, 2000; Tomasinsig a Zanetti, 2005; Zanetti, 2005).

Všetky katelicidíny sú kódované génmi pozostávajúcimi zo štyroch exónov. Prvý exón pokrýva sekvenciu kódujúcu signálny peptid (časť pre-) s veľkosťou zvyškov 29 až 30 aminokyselín, zatiaľ čo exóny 2 a 3 kódujú kathelínovú doménu (časť pro) 99 až 114 aminokyselín. Exón 4 kóduje zrelý peptid s antimikrobiálnou doménou pozostávajúcou z 12 až 100 aminokyselín (Kościuczuk *et al.*, 2012). Doteraz sa zistilo, že na chromozómoch oviec, kráv, ošípaných a kurčiat všetky gény katelicidínu tvoria zhľuky (Zaiou a Gallo, 2002; Zanetti, 2004; Xiao *et al.*, 2006). Gény katelicidínu boli lokalizované na chromozóme 13 u ošípaných, chromozóme 19 u oviec (8 génov) a u kurčiat na chromozóme 2p na proximálnom konci ako hustý zhľuk do 7,5 kb (3 gény) (Gudmundsson *et al.*, 1995; Huttner *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2006). U hovädzieho dobytku sa na chromozóme 22q24 nachádzalo v tej istej oblasti viac ako 10 génov katelicidínu (Scocchi *et al.*, 1997). V ľudských a myšacích genómoch boli katelicidínové gény lokalizované na chromozómoch 3, respektíve 9 (Gudmundsson *et al.*, 1995).

2.2.2 Ľudský katelicidín LL-37

U človeka existuje niekoľko génov kódujúcich defenzíny, napr. α a β -defenzíny, no doteraz bol u neho nájdený iba jediný gén kódujúci katelicidín označený ako katelicidínový antimikrobiálny peptid (CAMP) (Tomasinsig a Zanetti, 2005; Zanetti,



Obr. 3 Schématické znázornenie CAMP génu a procesu formácie katelicidínu LL-37. (Prevzaté a upravené zo Zasloff, 1987).

2005). Rovnako ako mnoho AMP génov, CAMP kóduje propeptid, ktorý je zložený z N-terminálnej katelínovej domény a C-terminálneho peptidu s antimikrobiálnou aktivitou (Obr. 3) (Di Nardo *et al.*, 2003). Prvým identifikovaným aktívnym katelicidínom bol LL-37 (leucín-leucín-37). Ide o 37 aminokyselín dlhý peptid so širokou antimikrobiálnou aktivitou. LL-37 tvorí α -helix vo vodnom roztoku, ktorý mu tak umožňuje narušiť bakteriálne membrány a vírusové obaly (Kokryakov *et al.*, 1993). Dokonca bola zistená aktivita aj proti plesniam pri infekciách spôsobených kvasinkou *Candida* (Storici *et al.*, 1994; Zanetti *et al.*, 1994; Nagaoka *et al.*, 2002).

Na povrchu kože sú aktívne katelicidínové peptidy, ako je LL-37, štiepené z neaktívneho prekurzora serínovými proteázami z rodiny kalikreínov (Tossi *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2001; Termén *et al.*, 2003). V koži je LL-37 syntetizovaný epitelovými bunkami, ale môže byť tiež poskytovaný infiltráciou imunitných buniek, ako sú neutrofily, ktoré transportujú LL-37 na infikovanú alebo zranenú kožu. V prípade zdravej kože je v keratinocytoch expresia katelicidínu sotva detekovateľná. Naopak, v priebehu infekcie alebo poškodenia je produkcia katelicidínu v týchto bunkách silne indukovaná (Dürr *et al.*, 2006).

Okrem antimikrobiálnej aktivity má LL-37 ďalšie funkcie v aktivácii a kontrole imunitných reakcií: LL-37 zvyšuje uvoľňovanie cytokínov a chemokínov z lokálnych buniek a leukocytov a má chemotaktické účinky na veľký počet imunitných buniek (Gennaro *et al.*, 1989). Uvoľňovanie chemokínov a cytokínov je navyše vyvolané LL-37 v žírnych bunkách alebo keratinocytoch (Gudmundsson *et al.*, 1995). V spolupráci s cytokínmi LL-37 zvyšuje vrodené imunitné reakcie viacerými cestami (Gennaro *et al.*,

1989; Lenarcic *et al.*, 1993). Okrem toho LL-37 zvyšuje proliferáciu endotelových buniek a ovplyvňuje angiogézu (Strukelj *et al.*, 1995). Tieto atribúty dopĺňajú antimikrobiálne funkcie LL-37 a viedli k vnímaniu LL-37 ako nielen antimikrobiálneho, ale aj „alarminového“ peptidu (Zhao *et al.*, 1995).

Na molekulárnej úrovni sprostredkuje LL-37 svoje „poplašné“ funkcie na imunitných bunkách ligand-receptor sprostredkovaným alebo na receptore nezávislým spôsobom, čo vedie k zvýšeným reakciám hostiteľa (Fahrner *et al.*, 1996). Pritom LL-37 ovplyvňuje signalizáciu adenzíntrifosfátového receptora P2X7 a Toll-like receptora (TLR) v imunitných bunkách, transaktiváciu receptora epidermálneho rastového faktora alebo intracelulárnu mobilizáciu Ca²⁺ (Selsted *et al.*, 1992; Gudmundsson *et al.*, 1995; Storic *et al.*, 1996; Scocchi *et al.*, 1997).

Dvojaká úloha katelicidínu - antimikrobiálna a poplašná funkcia - svedčí o ústrednej úlohe tohto peptidu pri vrodenej kožnej imunite. V dôsledku toho by dysfunkcia „alarminovej“ funkcie katelicidínu LL-37 mohla hrať úlohu v patogenéze zápalového ochorenia kože v rovnakom rozsahu ako zhoršená antimikrobiálna aktivita (Kościuczuk *et al.*, 2012).

2.3 Jačmeň a jeho endosperm

Cereálny endosperm je vysoko diferencované tkanivo obsahujúce špecializované organely na akumuláciu zásobných proteínov. Endosperm jačmeňa obsahuje hordeíny a iné proteíny, ktoré sa nakoniec ukladajú do vakuol skladujúcich proteíny (PSV). Po diferenciacii môže plne vyvinutý endosperm predstavovať až 75% hmotnosti semien a fungovať ako zásobné tkanivo, ktoré akumuluje škrob a zásobné proteíny. Tie poskytujú živiny potrebné na klíčenie a rast semenáčov, kým nie je možná autotrofia (Olsen, 2004).

Endosperm obsahuje štyri hlavné typy buniek: vonkajšie aleuronové bunky podobné tým v pokožke, centrálné škrobové endospermové bunky, transferové bunky a bunky vrstvy obklopujúcej embryá (Olsen, 2001). Jačmeň má tri vrstvy aleurónových buniek (Olsen, 2004), ktoré podporujú klíčenie mobilizáciou škrobových rezerv a zásobných proteínov v škrobovom endosperme uvoľňovaním hydrolytických enzýmov (Olsen, 2004). Škrobový endosperm obsahuje subaleurón a centrálné škrobové endospermové bunky. Subaleurón sa nachádza tesne pod aleurónom a obsahuje veľké množstvo zásobných proteínov, ale iba niekoľko malých škrobových granúl, zatiaľ čo centrálny škrobový endosperm obsahuje veľké a bohaté škrobové granule a pomerne málo bielkovín (Bechtel a Pomeranz, 1978).

Semená produkujú tri hlavné triedy úložných proteínov: prolamíny, albumíny a globulíny (Shewry *et al.*, 1995; Galili, 2004). Prolamíny sú hlavnou proteínovou zložkou väčšiny semien obilnín a nadrodina prolamínov *Triticeae* je rozdelená do troch skupín: prolamíny bohaté na síru, chudé na síru a vysokomolekulárne (HMW). Podobne sa v ryži a kukurici nachádzajú tri skupiny prolamínov, aj keď v týchto druhoch sa opisujú ako α , β , γ a δ zeiny (Woo *et al.*, 2001). Jačmenné prolamíny zahŕňajú na síru bohaté B a γ hordeíny, na síru chudobný C hordeín a vysokomolekulárny D hordeín, ktorý je homológny s vysokomolekulárnymi gluténinmi pšenice (Kreis a Shewry, 1989).

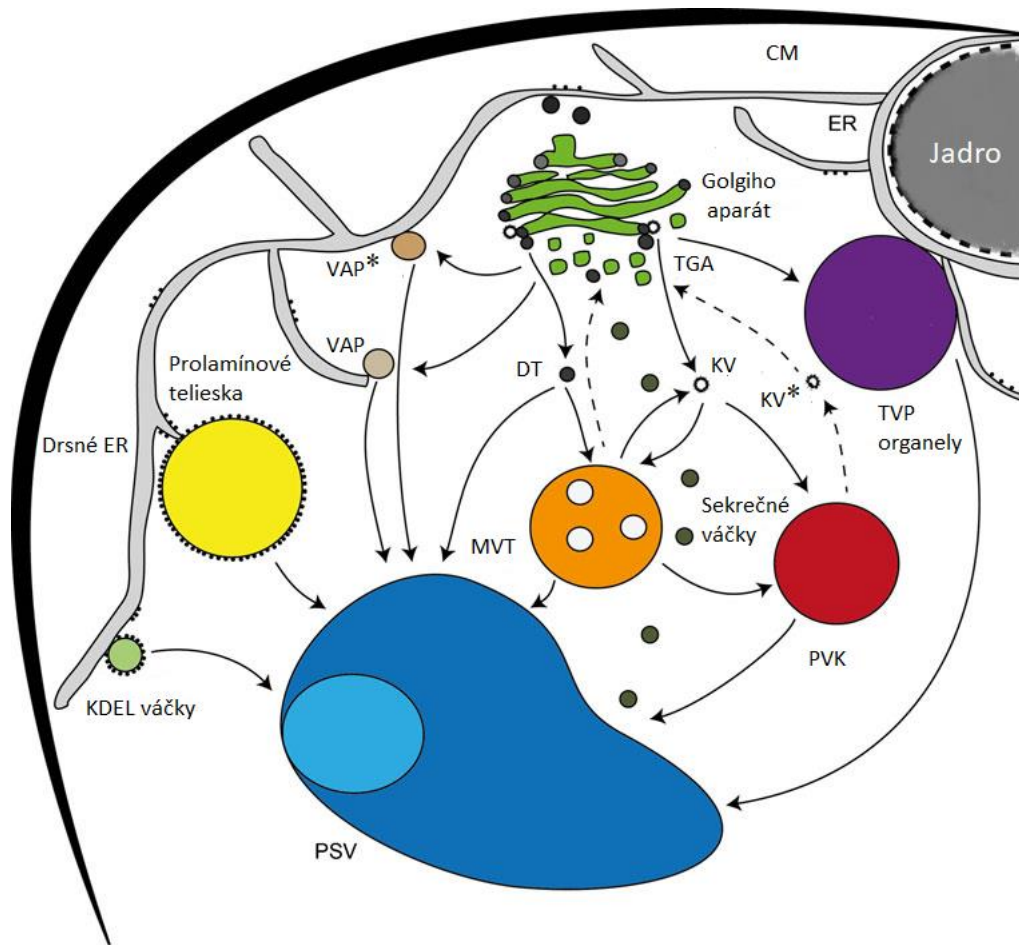
Prolamíny a rozpustné albumíny a globulíny putujú rôznymi subcelulárnymi cestami. Zatiaľ čo albumíny a globulíny typicky prechádzajú cez Golgiho aparát a hromadia sa vo vakuole skladujúcej proteíny (PSV), väčšina prolamínov sa agreguje v endoplazmatickom retikule (ER) a spočiatku sa ukladajú do proteínových teliesok odvodených od ER, ktoré sa môžu tiež začleniť do PSV u niektorých druhov obilnín (Shewry *et al.*, 1995; Galili, 2004; Tosi *et al.*, 2009). Prekurzorové polypeptidy hordeínov sú kotranslačne vložené do lumenu ER a nakoniec sú uložené do vakuoly (Cameron-Mills

a Wettstein, 1980; Rechinger *et al.*, 1993). Hoci neexistujú žiadne priame dôkazy o ich transporte cez Golgiho aparát, túto cestu nemožno vylúčiť, aspoň pre časť hordeínového obsahu v semene. Hordeínové polypeptidy môžu alternatívne vychádzať priamo z ER a môžu byť absorbované pomocou PSV v procese podobnom autofágii, ako to bolo naznačené u pšeničných prolamínov (Levanony *et al.*, 1992).

2.3.1 Lokalizácia zásobných proteínov v bunke

Rastliny ukladajú aminokyseliny vo forme semmených zásobných proteínov (SZP), ktoré sú ukladané do špecializovaných membránových zásobných organel, ktoré zabraňujú ich degradácii (Muntz, 1998). Zásobné proteíny sa akumulujú primárne v proteínových skladovacích vakuolách (PSV) a v proteínových telieskach (PB) odvodených z endoplazmatického retikula (ER). Niekoľko faktorov pomáha určiť bunkový kompartment, v ktorom sa SZP akumulujú a to vrátane signálnych sekvencií, membránovej asociácie a agregácie (Muntz, 1998).

Všetky SZP obsahujú signálny peptid na N-konci, ktorý sprostredkováva translokáciu cez membránu ER do lumenu počas proteínovej syntézy na membránovo naviazaných polyzómoch. Signálny peptid je odštiepený, SZP je glykozylovaný a jeho skladanie je podrobené kontrole kvality pomocou chaperónov a nakoniec je transportovaný do príslušnej skladovacej organely. Dynamické a pleomorfné ER možno považovať za „bránu k sekrečnej ceste“ (Sparkes *et al.*, 2009). ER má kľúčovú úlohu pri skladaní a zhromažďovaní svojich rezidentných proteínov, ako aj proteínov určených pre iné lokácie (Vitale a Denecke, 1999). SZP sa môžu buď štiepiť z ER a tvoriť proteínové telieska, alebo môžu putovať jednou z niekoľkých trás k PSV. Niektoré proteíny putujú cestou cez Golgiho aparát do PSV, zatiaľ čo iné sú balené do vezikúl odvodených od ER a obchádzajú Golgiho systém. (Hara-Nishimura *et al.*, 1998) (Obr. 4).



Obr. 4 Schématické zhrnutie predstavujúce rôzne skladovacie organely nájdené v embryonálnych alebo endospermových semenných tkanivách rôznych druhov rastlín a rôznych vývojových štádií a možné cesty, po ktorých skladovacie proteíny putujú. ER endoplazmatické retikulum, TGA trans Golgiho aparát, PVK prevakuolárny kompartment, TVP tmavé vnútorné proteínové organely, KV klatrinové váčky, KV* vezikuly podobné klatrinovým váčkom, DT denzné telieska, MVT multivezikulárne telieska, VAP vezikuly akumulujúce prekursor, VAP* vezikuly podobné vezikulám akumulujúcim prekursor, KDEL váčky akumulujúce cysteín proteinázu naviazanú na KDEL koniec, PSV vakuola skladujúca proteíny. (Prevzaté a upravené z Ibl a Stoger, 2011).

2.3.2 Vakuoly skladujúce proteíny (PSV)

Rastlinné vakuoly sa klasifikujú buď ako lytické vakuoly (LV) alebo skladovacie vakuoly (PSV) (Bassham a Raikhel, 2000). V súlade s tým boli popísané rozličné transportné vezikuly pre obidve organely a ich membrány sa vyznačujú prítomnosťou rôznych tonoplastových vnútorných proteínov (TIP), ktoré fungujú ako transmembránové kanály pre vodu a rôzne nízkomolekulárne látky (Jiang *et al.*, 2001; Wudick *et al.*, 2009; Gattolin *et al.*, 2010).

Tri rôzne izoformy TIP, ktoré boli fúzované so žltým fluorescenčným proteínom sa však všetky lokalizovali v tonoplaste vakuol skladujúcich proteíny v embryách, ktoré pochádzali z vyvíjajúcich sa, zrelých a klíčiacych semien *Arabidopsis* (Hunter *et al.*,

2007). Okrem toho boli tri izoformy TIP počas vývoja rôzne exprimované, čo sponchybnuje ich použitie ako markerov na identifikáciu koexistujúcich vakuol v jednotlivých typoch buniek (Hunter *et al.*, 2007).

Je zaujímavé zvážiť príležitostné spolunažívanie rôznych typov vakuol v tej istej bunke a tiež otázku, ako sa jeden druh vakuolárneho kompartmentu v priebehu vývoja nahradí iným. Aj keď je ontogenéza vakuol stále predmetom diskusie, v kľúčnych listoch semien hrachu sa ukázalo, že LV sú nahradené PSV v jasnom vývojovom slede. Na krátku dobu v obidvoch bunkách koexistujú obidva typy vakuol. Zdá sa, že PSV sa vytvára de novo ako tubulárna štruktúra, ktorá pohlcuje existujúce LV v procese podobnom autofágii (Hohl *et al.*, 1995). Podobné pozorovania sa uskutočnili v prípade embryí *Arabidopsis* a *Medicago truncatula* (Frigerio *et al.*, 2008).

Je zaujímavé, že inverzný prechod, tzn. z PSV na LV, nezahŕňa súčasnú prítomnosť dvoch typov vakuol, ale zahŕňa transformačný jav, ktorý zahŕňa prechodný stav obsahujúci ako markérové proteíny PSV, tak aj LV (Olbrich *et al.*, 2007). Transformácia z PSV na LV bola podrobne opísaná v nedávnych štúdiách o biogenéze vakuol v bunkách koreňových špičiek semenáča tabaku. Výsledky naznačujú, že LV nachádzajúce sa v bunkách koreňových špičiek sú odvodené od PSV prostredníctvom súborov transformačných udalostí špecifických pre daný bunkový typ (Zheng a Staehelin, 2011), ktoré zahŕňajú fúziu PSV, degradáciu zásobného proteínu a postupnú náhradu α -TIP markerového proteínu pochádzajúceho z PSV za γ -TIP markerového proteínu pochádzajúceho z LV. Tieto a ďalšie štúdie prezrádzajú, že vakuolárne štruktúry sa môžu počas bunkového cyklu (Segui-Simarro a Staehelin, 2006) a vývoja (Oda *et al.*, 2009) rýchlo meniť, odhaľujúc, že vakuoly sú dynamické organely regulované dráhami špecifickými pre daný typ bunky. Preto môže mechanizmus triedenia LV a PSV zdieľať určité podobnosti a môže rozpoznávať zaciľovací signál na konkrétnych semenných proteínoch (Watanabe *et al.*, 2004).

2.3.3 γ -Zein a proteínové telieska

Zein je zásobný proteín prolamínového typu, ktorý pochádza zo semien kukurice a vo veľkej miere sa používa na účely zapuzdrenia, pretože je biologicky kompatibilný, rozložiteľný (Luo a Wang, 2014) a v roku 1985 mu bol priznaný charakter GRAS (všeobecne považovaný za bezpečný) na perorálne použitie Správou potravín a liečiv v USA (Zhang *et al.*, 2015). Existuje niekoľko spôsobov, vďaka ktorým môže byť zein

použitý na účely enkapsulácie. Väčšina štúdií použila *in vitro* metódy, ako sú napríklad separácia fáz, sprejové sušenie, technika využívajúca superkritickú tekutinu, odparovanie rozpúšťadla alebo chemické zosieťovacie techniky (Zhang *et al.*, 2016). Väčšina *in vitro* enkapsulačných štúdií s použitím zeínu sa zamerala na inkorporáciu vo vode slabo rozpustných, neproteínových zlúčenín, ako je kurkumín (Patel *et al.*, 2010), aceklofenak (Karthikeyan, *et al.*, 2014), kvercetin (Penalva *et al.*, 2017) alebo α -tokoferol (Luo *et al.*, 2011), tieto metódy sa však použili tiež na zapuzdrenie lyzozýmu (Zhong & Jin, 2009) a antioxidantné proteíny katalázu a superoxid-dismutázu (Lee *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2016).

Alternatívne môžu byť poskytnuté bioenkapsulačné stratégie pre orálne rekombinantné liečivá pomocou zein-obsahujúcich organel skladujúcich proteíny, takzvaných zeinových proteínových teliesok (PB), ktoré môžeme nájsť v bunkách endospermu kukurice (Lending a Larkins, 1989). Tento predpoklad bol opodstatnený pomocou experimentov so semenami ryže, ktoré ukazujú, že sekvestrácia rekombinantných proteínov v endogénnych skladovacích organelách, ktoré obsahujú prolamíny ryže, poskytuje ochranu pred tráviacou proteolýzou po perorálnom podaní na zvieracom modeli (Nochi *et al.*, 2007).

Rýchlejšia a univerzálnejšia metóda na zapuzdrenie proteínov do ochranného prostredia zeinových mikro / nanonosičov je vytvorenie fúzneho proteínu, v ktorom je požadovaný proteín fúzovaný s čiastočnou sekvenciou zeínu. Expressia takéhoto fúzneho proteínu vedie k *in vivo* bioenkapsulácii u rôznych produkčných hostiteľov v rámci novo indukovaných zásobných organel. Medzi rôznymi triedami zeínov: α (19 a 22 kDa), β (15 kDa), γ (16, 27 a 50 kDa), δ (10 kDa; Woo *et al.*, 2001) - 27 kDa γ -zeín bol identifikovaný ako kľúčový prvok, ktorý indukuje tvorbu endogénnych aj rekombinantných PB. Okrem toho bolo zistené, že 93 N-terminálnych aminokyselín 27 kDa γ -zeínu (skrátene gz93) je dostatočná na produkciu PB v iných rastlinách, a dokonca aj v heterológnych expresných systémoch, ako sú bunky húb, hmyzu a cicavcov (Torrent *et al.*, 2009; LlopTous *et al.*, 2010).

Rôzne proteíny s rôznymi vlastnosťami z hľadiska molekulovej hmotnosti a funkcie, vrátane rastových faktorov (Torrent *et al.*, 2009), proteínov, ktoré sú kandidátmi na vírusové vakcíny (Whitehead *et al.*, 2014; Mbewana *et al.*, 2015; Hofbauer *et al.*, 2016) a enzýmov (Llopé-Tous *et al.*, 2011) boli úspešne začlenené do novo indukovaných PB v rastlinách ako je *Nicotiana benthamiana*, potom čo boli fúzované s gz93.

2.4 Produkcia rekombinantných proteínov v rastlinných systémoch

Rastliny boli využívané ako zdroj prírodných produktov naskrz celou históriou a to vďaka početným a rôznym priemyselným aplikáciám rastlinných produktov, ktoré sa neustále rozširujú vývojom nových technológií bioprocesu a molekulárnej biológie rastlín. Jednou z takýchto technológií bol vývoj transformácie rastlín, ktorý viedol k použitiu rôznych rastlinných hostiteľov na expresiu humánnych terapeutík (Giddings *et al.*, 2000; Stöger *et al.*, 2005), nutraceutík (Adkins a Lönnnerdal, 2004), protilátok (Stöger *et al.*, 2002a, 2002b; Arntzen *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2009; Nikolov *et al.*, 2009; De Muynck *et al.*, 2010), priemyselných enzýmov (Hood *et al.*, 2007; Howard *et al.*, 2011), vakcinačných antigénov (Sala *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2010) a biopolymérov (Mooney, 2009; Sharma a Sharma, 2009).

Platformám rastlinnej výroby spočiatku dominovali poľnohospodárske plodiny so zavedenou výrobnou infraštruktúrou, ako je kukurica, ryža a tabak (Fox, 2006; Spök a Karner, 2008), pričom kukurica a tabak sú typickými predstaviteľmi proteínových expresných systémov na báze semien a listov. Prvým komerčným produktom vytvoreným v týchto platformách bol avidín a trypsin pochádzajúci z kukurice (Hood *et al.*, 1997; Woodard *et al.*, 2003) a sekrečný IgA pochádzajúci z tabaku (Ma *et al.*, 1998).

Aj keď sú transgénne rastliny účinnými producentmi proteínov, schopné posttranslačných modifikácií a bez ľudských patogénov, ako nevýhody sa pôvodne uvádzali čas produkcie transgénnych rastlín (Twyman, 2004) spolu s regulačnou neistotou (Doran, 2000) a purifikačnými výzvami. Za posledných 5 až 10 rokov sa niektoré problémy riešili. Príkladom jedného z problémov, ktoré sa za posledných 5 až 10 rokov riešili je použitie prechodnej expresie, čím sa drasticky znížil čas potrebný na produkciu gramových množstiev z viac ako 24 mesiacov na 14 až 20 dní (Hiatt a Pauly, 2006).

2.4.1 Produkčné systémy na báze semien

Platforma na báze semien pre produkciu rekombinantných proteínov sa prirodzene vyvinula z technológií expresie a transformácie, ktoré boli prvýkrát vyvinuté pre vznik plodín s novými vloženými vlastnosťami (Davies, 2005). Rekombinantné proteíny úspešne exprimované v semenách rastlín zahŕňajú cytokíny (Zhu *et al.*, 1994), proteíny bunkovej kultúry (Huang *et al.*, 2002; Nandi *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005), terapeutické

protilátky (Stöger *et al.*, 2000), vakcínové antigény (Streatfield a Howard, 2003; Nochi *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007) a priemyselné enzýmy (Hood *et al.*, 2007).

Semenné plodiny ponúkajú mnoho výhod oproti mikrobiálnym fermentáciám, bunkovým kultúram cicavcov a transgénym zvieratám, vrátane rozsiahlej vedomostnej základne týkajúcej sa ich kultivácie, zberu, skladovania a spracovania (Kusnadi *et al.*, 1997; Nikolov a Hammes, 2002). Semená boli spočiatku preferovanou hosťiteľskou voľbou pre rekombinantné proteíny, pretože exprimované proteíny sa akumulujú v prirodzene vysychajúcich zásobných organelách (Nikolov a Hammes, 2002), ktorým chýba proteáza a ďalšie enzymatické aktivity (Fischer *et al.*, 2009). Endogénne proteázové inhibítory zaisťujú stabilitu rekombinantného proteínu počas extrakcie a purifikácie (Menkhaus *et al.*, 2004a).

Stabilita proteínov exprimovaných v semenách umožňuje oddeliť upstream a downstream spracovanie (Boothe *et al.*, 2010), takže umiestnenie príslušenstva na downstream spracovanie môže byť oddelene od pestovateľských polí a zariadení na skladovanie semien. V špecifických prípadoch, ako sú orálne vakcíny, nutraceutiká a priemyselné enzýmy, použitie semenných plodín všeobecne považovaných za bezpečné (GRAS) (napr. ryža a kukurica) minimalizuje požiadavky na spracovanie a purifikáciu (Nandi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2008; Hood and Howard, 2009).

V porovnaní s listovými plodinami majú semenné plodiny nižšie výnosy biomasy na jednotku plochy, ale ak sú plodiny pestované na otvorených poliach, náklady na taký rozsah, zavedené poľnohospodárske postupy a stabilita proteínov prevažujú nad nevýhodou výnosu biomasy (Nikolov a Hammes, 2002; Schillberg *et al.*, 2005). Medzi vnímané nevýhody semenných systémov patrí strach z potenciálnej krížovej kontaminácie, neúmyselné zmiešanie transgénneho a netransgénneho zrna a averzia verejného a potravinárskeho priemyslu k výrobe biofarmaceutík v krmivách alebo potravinách (Wilken a Nikolov, 2012).

2.4.2 Produkčné systémy na báze listov

Medzi výhody listových plodín, ako sú lucerna siata a tabak, patrí vysoký výnos biomasy, možnosť viacerých rastových cyklov ročne a vybudovaná poľnohospodárska infraštruktúra, ako je to u semenných systémov, ale s menším rizikom šírenia peľu (je možné zabrániť kvitnutiu). Tabak je vedúca platforma na báze listov pre komerčnú

produkcii rekombinantných proteínov (Twyman *et al.*, 2003), od prvej správy o tabaku exprimujúcom monoklonálne protilátky (Hiatt *et al.*, 1989).

Výhody a nevýhody použitia platforiem tabaku a lucerny na výrobu terapeutických a diagnostických protilátok nedávno preskúmal (Fischer *et al.*, 2009). Významné pokroky sa dosiahli použitím prechodnej expresie v listových plodinách a aplikovali sa konkrétne na expresiu monoklonálnych protilátok (mAbs), vakcín a ďalších terapeutických produktov v tabaku (*Nicotiana benthamiana*) (D'Aoust *et al.*, 2010; Joensuu *et al.*, 2010; Conley *et al.*, 2011). Pre tabak pestovaný v skleníku predstavuje prechodná expresia listových tkanív jednoznačnú výhodu v porovnaní s inými rastlinnými systémami, keď je vyžadovaná rýchla výroba pandemických vakcín (D'Aoust *et al.*, 2010).

Hlavnou nevýhodou listových tkanív je vysoký obsah vody, stabilita uskladnenej zozbieranej biomasy a s ňou spojená stabilita rekombinantného proteínu, ktorá neumožňuje oddelenie upstream a downstream spracovania. Ľahkosť proteínovej extrakcie z listnatých rastlín sa niekedy považuje za výhodu oproti extrakcii zo semenného materiálu, ktorá môže vyžadovať ďalšie jednotkové operácie, ako je mletie semien, ich namáčanie alebo zbavovanie semien oleja (Schillberg *et al.*, 2005). Táto vnímaná výhoda listových systémov je kompenzovaná potenciálnou nestabilitou exprimovaných proteínov v metabolicky aktívnych tkanivách a ich extraktoch (Doran, 2006; De Muynck *et al.*, 2010).

V listových extraktoch prebieha proteolytická aktivita a obsahujú fenolické zlúčeniny a pigmenty odvodené od chlorofylu, ktoré by mohli spôsobiť ťažkosti pri následnom spracovaní listových systémov (Yu *et al.*, 2008; Woodard *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2011). Hladina fenolových zlúčenín uvoľňovaných počas extrakcie sa líši v závislosti od typu tkaniva (listy, korene, semená) a druhov rastlín. Bunková membrána a zvyšky chloroplastov dispergované v homogenáte listov by mohli byť počas čistenia extraktu nepríjemnosťou. Všetky tieto charakteristiky extraktu by mohli mať za následok ťažké, viacstupňové purifikačné procesy, ktoré ovplyvňujú kvalitu aj kvantitu (výťažok) purifikovaných proteínov. Napriek výhodám vzťahnutých na náklady výroby osiva a listových plodín na otvorenom poli, expresia biofarmaceutík sa posunula smerom k výrobe v obmedzenom prostredí, ako sú napríklad skleníky a systémy založené na bioreaktoroch (Spök a Karner, 2008).

2.5 Purifikácia rekombinantných proteínov z rastlinných systémov

Ako sa platforma transgénnych rastlín naďalej rozvíja, záujmy o výskum a vývoj sa pravdepodobne presunú z upstream na downstream spracovanie s cieľom zlepšiť celkovú produktivitu (Gottschalk, 2008). V závislosti od typu produktu a jeho použitia môže downstream spracovanie predstavovať významnú časť celkových prevádzkových nákladov na výrobu produktu. Preto je nevyhnutný pre priaznivú ekonomiku čo najskorší vývoj účinných a selektívnych procesov extrakcie a purifikácie (Basaran a Rodriguez-Cerezo, 2008).

Purifikačná fáza obvykle začína zachytávacím krokom, aby došlo k zakoncentrovaniu rekombinantného proteínu a čo je najdôležitejšie, odstráneniu závažných rastlinných nečistôt, ktoré by boli škodlivé pre výťažok proteínu, kvalitu a / alebo účinnosť purifikácie (Menkhaus a Glatz, 2005; Holler a Zhang, 2008; Platis *et al.*, 2008; Woodard *et al.*, 2009; Wilken a Nikolov, 2010). Pre aplikácie s vysokou formou čistoty (terapeutické, diagnostické) sú zvyčajne potrebné ďalšie kroky čistenia na odstránenie zvyškových nečistôt hostiteľských buniek a na zabezpečenie vysokej kvality produktu. Purifikácia proteínov pochádzajúcich z rastlín závisí od proteínových vlastností a nečistôt hostiteľských buniek a využíva podobné stratégie pre rozvoj purifikácie ako iné heterológne expresné systémy. Po predbežných úpravách sa pri purifikačných postupoch používajú podobné techniky, ktoré už boli vyvinuté pre biofarmaceutické výrobky, ako napríklad monoklonálne protilátky (mAb), fragmenty mAb, vakcíny, cytokíny a hormóny (Menkhaus *et al.*, 2004a; Nikolov a Woodard, 2004; Chen, 2008).

Existuje len veľmi málo štúdií, ktoré opisujú procesy purifikácie rekombinantných proteínov pochádzajúcich z rastlín, ktoré dosiahli na klinické skúšky alebo boli rozšírené na komerčnú výrobu. Dôvod je dvojaký. Po prvé, relatívne málo spoločností dosiahlo neskoršie štádiá klinických skúšok (fázy II a III), aby zaviedli robustné downstream procesy vo veľkom meradle a po druhé, novo vyvinuté procesy sú často považované za patentované (Boothe *et al.*, 2010). Napriek tomu značné množstvo vedeckých publikácií od roku 2004 riešilo osobitné výzvy vo vývoji downstream spracovania, ako je napríklad nízka hladina expresie, zložitosť rastlinných extraktov a ich vplyv na účinnosť purifikácie, stabilita produktu počas spracovania a metódy odstraňovania závažných nečistôt (Wilken a Nikolov, 2012).

2.5.1 Zachytávanie a čistenie rekombinantného proteínu

Zachytávacie chromatografické živice majú dve primárne funkcie, zakoncentrovanie a čiastočné čistenie, a mali by byť lacné, odolné voči chemikáliám potrebným na regeneráciu živice a mali by byť schopné zachovať kapacitu a selektivitu počas viacerých cyklov. Selektia živice je určená vlastnosťami rekombinantného proteínu, ako je náboj, hydrofóbnosť a biošpecificita. Výber živice na základe najjedinečnejšej vlastnosti pre rekombinantný proteín v porovnaní s hosťiteľským systémom môže zlepšiť účinnosť purifikácie zvýšením väzbovej kapacity a / alebo čistoty produktu. Keď sa stanoví vhodná chromatografická funkčná živica (katexová / aniónová výmenná, afinitná, hydrofóbná) je potrebné preveriť rôzne živice s rôznymi veľkosťami častíc, povrchovou plochou a kostru živice spolu s väzobnými podmienkami, ako je pH a iónová sila (Wilken a Nikolov, 2012).

Ako sa očakávalo, kyslé proteíny, ako je β -glukuronidáza (Robic *et al.*, 2006; Holler a Zhang, 2008), chymosín (Van Rooijen *et al.*, 2008) a ľudský sérový albumín (Huang *et al.*, 2005) boli zachytené anión-výmennou adsorpciou a bázické proteíny aprotinín, ľudský lyzozým, ľudský laktoferín, ako aj niekoľko IgG pomocou kationovej výmeny (Nandi *et al.*, 2005; Wilken a Nikolov, 2006; Zhong *et al.*, 2007; Platis *et al.*, 2008; Ramessar *et al.*, 2008; Wilken a Nikolov, 2010). V niekoľkých prípadoch sa zakoncentrovanie produktu a čiastočné čistenie dosiahli použitím soli (Lai *et al.*, 2010) alebo polymérnym zrážaním (Holler *et al.*, 2007; Holler a Zhang, 2008) pred ďalším purifikačným krokom. Kvôli relatívne nízkej obnove výnosu v porovnaní s afinitnými a ionomeničovými živcami sa hydrofóbná interakčná chromatografia zvyčajne nezohľadňuje pri zachytávaní produktu, pokiaľ predúprava extraktu nevyžaduje použitie vysokých koncentrácií solí (Peckham *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007, 2011).

Platis *et al.*, (2008), Ramessar *et al.*, (2008) a Platis a Labrou (2009); implementovali dvojfázový priebeh delenia tabakových a kukuričných extraktov ako krok predúpravy, ktorý im umožnil účinne zachytiť rekombinantné monoklonálne protilátky (anti-HIV IgG) na silnej katexovej živici. Nasledujúci krok čistenia bol rovnaký pre oba hosťiteľské extrakty. Vyššia čistota produktu (2G12) bola dosiahnutá z tabaku ako z kukuričného extraktu pravdepodobne kvôli degradácii a agregácii 2G12 kukuričného pôvodu (Ramessar *et al.*, 2008). Čistota a výtazok iného IgG proteínu (4E10) bola 96%, respektíve 36%. Tabakom exprimovaný 2G12 a 4E10 sa líšil iba vo variabilných

oblastiach, ale 4E10 zjavne interagoval odlišne s imobilizovanou kovovou afinitnou živnicou, čo malo za následok nižší výťažok.

V niektorých prípadoch, keď záchytná chromatografia nevedla k uspokojivému odstráneniu nečistôt (zvyšková DNA, endotoxín alebo vylúhovaný afinitný ligand), sa nasledujúci krok čistenia často uskutočňuje v prietokovom režime, aby sa hlavné kontaminanty viazali a cieľový proteín sa zhromažďoval v mobilnej fázi/prúde (Bendandi *et al.*, 2010; Lai *et al.*, 2010).

2.5.2 Využitie afinitných značiek pre purifikáciu

V roku 2008 Chen preskúmal použitie rôznych biošpecifických (afinitných) značiek na čistenie proteínov z rastlinných extraktov (Chen, 2008). Afinitné značky sú vhodné na „bench-top“ purifikáciu a následnú charakterizáciu rekombinantného proteínu, ale nemusia byť ekonomické vo výrobnom meradle, pretože odstránenie takej značky (požadované pre biofarmaceutiká) enzymatickým alebo chemickým štiepením nie je účinné a znižuje výťažok cieľového proteínu. Jednou z aplikácií, pri ktorých sa zdá, že je fúzia proteínov prospešná, je expresia v plastidoch. Fúzni partneri stabilizujú a chránia cieľové proteíny exprimované chloroplastmi pred nadmernou proteolytickou degradáciou a uľahčujú purifikáciu fúznych proteínov. Fúzie, ktoré sa akumulujú pri hladinách vyšších ako 10% TSP (celkový rozpustný proteín), však tvoria inklúzne telieska, ktoré sú podobné inklúznym telieskam baktérie *Escherichia coli*. Tie pred čistením vyžadujú rozpustenie a opätovné zloženie. Napriek významným pokrokom v transformácii plastidov a expresii proteínov, iba málo štúdií uvádza vývoj v oblasti purifikácie (Chen, 2008).

Nasledujúci príklad demonštruje dvojitú úlohu fúzneho partnera: akumuláciu proteínu a zjednodušené čistenie. Leelavathi a Reddy (2003) purifikovali fúzny proteín GUS-interferón (INF) (6% TSP) slabou anión-meničovou chromatografiou nasledovanou chromatografiou IMAC-Ni. Prítomnosť His-značeného GUS vo fúzii zvýšila expresiu 60 krát a zjednodušila čistenie. INF sa štiepil z fúzneho proteínu faktorom Xa s 58% účinnosťou a následne bol prečistený pomocou katexovej chromatografie.

2.5.3 Nechromatografické purifikačné metódy

Jednou z prvých nechromatografických metód, ktorá sa objavila v literatúre, bolo zachytenie a čiastočná purifikácia oleozínových fúznych proteínov pomocou centrifugácie (Van Rooijen a Moloney, 1995). Tieto fúzie obsahujú oleozínové proteíny

ako N-terminálnych fúzných partnerov, ktoré umožňujú *in vivo* zacielenie a / alebo zachytávanie cieľového proteínu po extrakcii na povrch olejových teliesok. Purifikácia olejových teliesok s naviazanými fúziami sa uskutočňuje niekoľkými krokmi premývania vo vodných roztokoch pomocou centrifugácie. Naviazaný rekombinantný proteín môže byť uvoľňovaný z olejových teliesok proteolytickým štiepením väzby medzi oleozínom a cieľovým proteínom alebo elúciou v prípade afinitne viazaných proteínov (Boothe *et al.*, 2010).

Ako príklad prístupu s afinitnou väzbou môžu byť nedávno vyvinuté konštrukty, ktoré ako fúzneho partnera obsahujú N-koncovú anti-oleozínovú jednoreťazcovú protilátku (scFv). Po elúcii týchto konštruktov z olejových teliesok sa fúzie môžu štiepiť buď chemicky (napríklad kyslým štiepením) alebo enzymaticky, aby došlo k uvoľneniu rekombinantného proteínu. Potenciálnou nevýhodou týchto dvoch stratégií je potreba odštiepiť rekombinantný proteín od fúzneho partnera oleozínu alebo scFv. Presnosť a účinnosť štiepenia, či už chemická alebo enzymatická, je typicky menšia ako 70% a vedie k zníženému výťažku produktu. Následné čistenie uvoľnených rekombinantných proteínov z príslušných fúzií sa vykonáva pomocou štandardnej adsorpčnej chromatografie (Boothe *et al.*, 2010; Nykiforuk *et al.*, 2011).

Ďalším príkladom nechromatografických purifikačných metód je využívanie jedinečných proteínových vlastností (hydrofóbnosť, stabilita alebo veľkosť) a vlastnosti hostiteľského systému na dosiahnutie zvýšenej účinnosti separácie. Lee a Forciniti (2010) preskúmali použitie dvojfázového rozdelenia na vodnej báze (PEG / soľ) ako jediného spôsobu regenerácie a purifikácie neglykozylovanej mAb exprimovanej v semenách kukurice. Manipuláciou systémového zloženia, pH a iónovej sily sa im podarilo čiastočne očistiť protilátku trojstupňovým procesom. Prvé dva stupne boli typické dvojfázové rozdelenia s koncentráciou cieľového proteínu obohatenou v dolnej (vodná soľná fáza) a nečistotami hostiteľa v hornej (PEG) fázi. Tieto dva extrakčné protokoly viedli k skôr skromnej purifikácii mAb a to 1,3-násobne a 1,4-násobne. Tretí stupeň pozostával z precipitácie mAb na dvojfázovom rozhraní a výsledkom bolo takmer desaťnásobné prečistenie. Celkovo tieto trojstupňové postupy poskytli 72% čistej mAb so 49% výťažkom. Pre biofarmaceutické aplikácie by bolo potrebné ďalšie prečistenie protilátky adsorpčným krokom a to s najväčšou pravdepodobnosťou pomocou afinitnej chromatografie.

Hoci bol za posledné roky uskutočnený veľký pokrok v downstream spracovaní, stále si vyžaduje veľkú pozornosť a technologické objavy, aby sa splnil dlho očakávaný cieľ nízkych výrobných nákladov na tvorbu rekombinantných proteínov v rastlinách. Vylepšenia však v downstream spracovaní nebudú stačiť; sú tiež potrebné vysoké hladiny proteínovej expzie a zaručená vernosť produktu (Wilken a Nikolov, 2012).

3 Experimentálna časť

3.1 Materiály

3.1.1 Chemikálie

2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina (MES), (Duchefa, Holandsko)
2-amino-2-hydroxymetylpropán-1,3-diol (Tris) – Duchefa Biochemie (Holandsko)
3',5'-dimetoxy-4'-hydroxyacetofenón (acetosyringón) – Sigma-Aldrich (USA)
6x Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, USA)
agar (HiMedia, India)
agaróza (Amesco, USA)
akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
amidočern 10 B (Merck, Nemecko)
Antarctic Phosphatase + pufor (NEB, USA)
 β -merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
BSA (Sigma-Aldrich, USA)
deoxyribonukleozidtrifosfáty dNTPs (Sigma-Aldrich, USA)
dodecylsírán sodný (SDS), (Penta, Česká republika)
dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, USA)
etanol (Lachner, Česká republika)
etyléndiaminotetraoctová kyselina (EDTA) (Penta, Česká republika)
ethídium bromid (NeoLab, Nemecko)
Gateway LR Clonase II enzyme mix (Thermo Fisher Scientific, USA)
gentamicín sulfát (Duchefa, Holandsko)
glycín (Lachner, Česká republika)
GoTaq G2 Flexi Polymeráza + pufor (Promega, USA)
hydroxid sodný (Penta, Česká republika)
isopropanol (Lachner, Česká republika)
chlorid horečnatý (Promega, USA)
kanamycín monosulfát (Duchefa, Holandsko)

kyselina boritá (Neolab, Nemecko)
kyselina chlorovodíková (HCl) (Lachema, Česká republika)
LB Broth (Sigma-Aldrich, USA)
metanol (Lachner, Česká republika)
miliQ voda (destilovaná, demineralizovaná)
N, N'-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
nuclease free voda (Qiagen, Nemecko)
Phusion HF DNA polymeráza (Thermo Fisher Scientific, USA)
persíran amónny (APS), (Sigma-Aldrich, USA)
PMSF (Sigma-Aldrich, USA)
proteinase K (Thermo Fisher Scientific, USA)
rifampicín (Duchefa, Holandsko)
sušené mlieko Laktino (Artifex, Česká republika)
T4 DNA ligáza + pufor (NEB, USA)
tetracyklín hydrochlorid (Sigma-Aldrich, USA)
tetramethyldiamin (TEMED), (Sigma-Aldrich, USA)
Triton X 100 (Sigma-Aldrich, USA)
Tween 20 (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2 Komerčné gély

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

3.1.3 Roztoky

Agarózový gél 1% (w/v)

10 g agaru v 1 litri TAE pufru

50x TAE pufor

242 g Tris, 18.61 g EDTA, 57.1 g kyselina octová, destilovaná voda do 800 ml

Extrakčný pufor 1

100mM Tris, 300mM NaCl, 0,03% Triton X 100, 100mM PMSF, Milli-Q voda do 500ml, pH 8

Extrakčný pufor 2

12,5 mM borát sodný, 1% SDS, 2% 2-merkaptoetanol, Milli-Q voda do 200 ml, pH 10

Extrakčný pufor 3

12,5 mM borát sodný, 1% SDS, 1% 2-merkaptoetanol, Milli-Q voda do 200 ml, pH 10

Extrakčný pufor 4

12,5 mM borát sodný, 1% SDS, 0,5% 2-merkaptoetanol, Milli-Q voda do 200 ml, pH 10

Extrakčný pufor 5

12,5 mM borát sodný, 1% SDS, 1mM DTT, Milli-Q voda do 200 ml, pH 10

Extrakčný pufor 6

12,5 mM borát sodný, 1% SDS, 2mM DTT, Milli-Q voda do 200 ml, pH 10

4x SDS vzorkovací pufor pre SDS-PAGE

2,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6.8, 0,5 ml of Milli-Q vody, 1 g SDS, 0,8 ml 0.1% brómfenolovej modrej, 4 ml 100% glycerol, 2 ml 14,3 M β -mercaptoethanol

Prenosový pufor pre Western blot

3,6 g Tris a 17,28 g glycínu rozpustených v 120 ml destilovanej vody, 120 ml 100% metanolu, destilovaná voda do celkových 1200 ml

TBS pufor

2,42 g Tris a 29,22 g NaCl v 1 litri, pH 7,5

TBS-T pufor

2,42 g Tris, 29,22 g NaCl, 0,5 ml Tween 20 v 1 litri milli-Q vody, pH 7,5

5% mlieko v TBS-T pufri (blokovací pufo)

5 g sušeného mlieka v 100 ml TBS-T pufri

1% mlieko v TBS-T pufri

10 ml 5% mlieka a 40 ml TBS-T pufri

Infiltračné médium na transformáciu listov *Nicotiana benthamiana*

0,426 g MES, 0,407 g MgCl₂, 200 µl zo 150µM roztoku acetosyringónu, Milli-Q voda do 200 ml, pH 5,6

3.1.4 Protilátky

Primárna protilátka: Anti-LL-37 Antibody (D-5) mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology USA), riedenie 1:400

Sekundárna protilátka: mouse anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology USA), riedenie 1:5000

3.1.5 Štandardy molekulovej hmotnosti

1 kb plus GeneRuler DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

100 bp plus GeneRuler DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

Novex Sharp Pre-stained Protein Standard (Thermo Fisher Scientific, USA)

PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

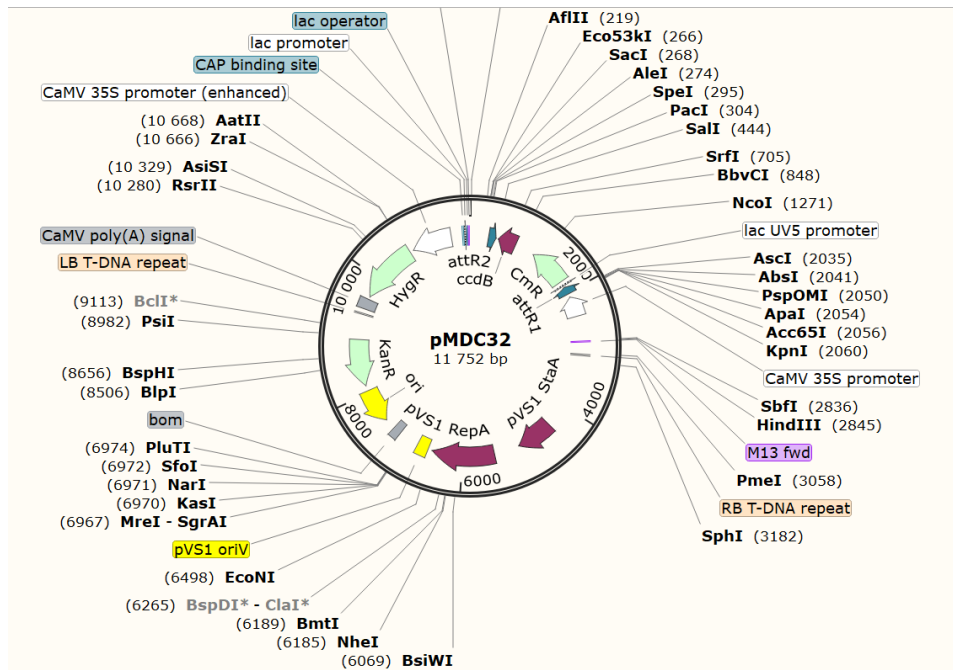
3.1.6 Biologický materiál

Chemokompetentné baktérie *Escherichia coli* TOP10

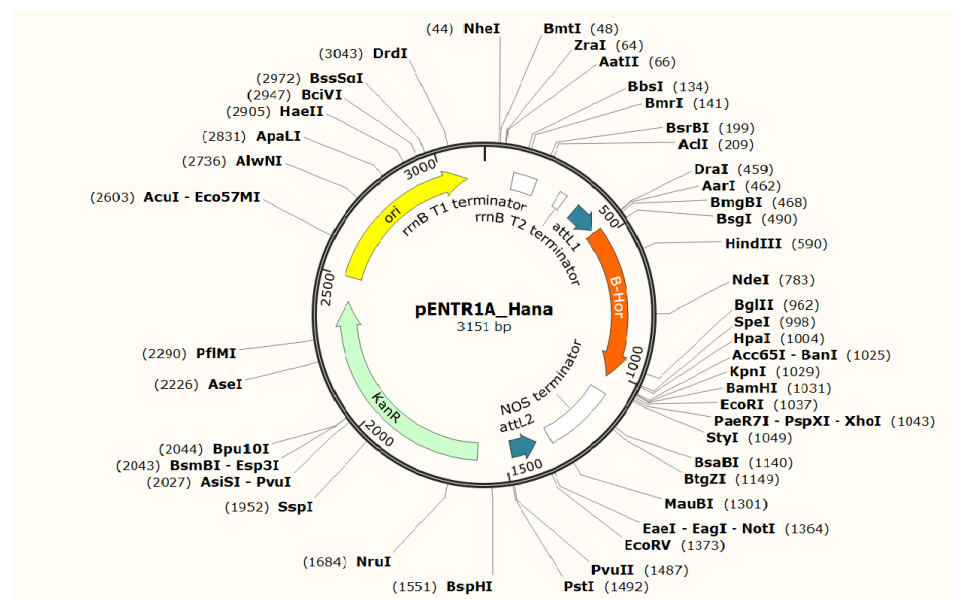
Elektrokompetentné baktérie *Agrobacterium tumefaciens* C58C1

Semená *Nicotiana benthamiana*

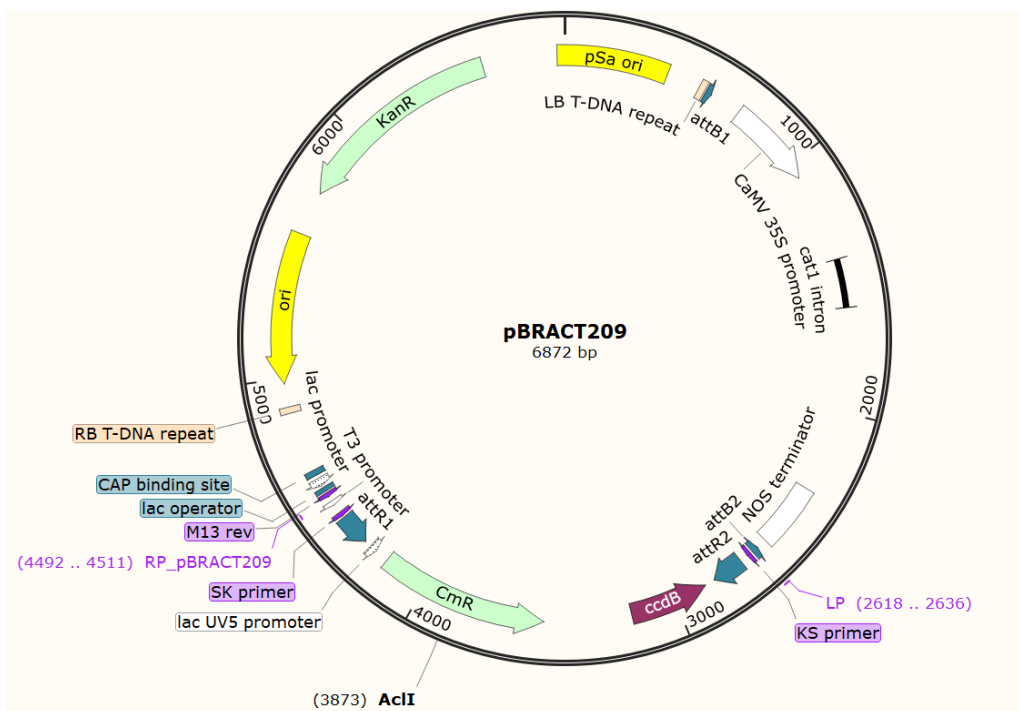
3.1.7 DNA vektory



Obr. 5 Mapa expresného vektora pMDC32 zobrazeného v programe SnapGene.



Obr. 6 Mapa vstupného vektora pENTR1A_Hana s B-hordeinovým promotórom zobrazeným v programe SnapGene.



Obr. 7 Mapa expresného vektora pBract209 zobrazeného v programe SnapGene.

3.1.8 Primery

Lyofilizované primery boli rozpustené vo vode podľa pokynov na mikroskúmavke na zásobnú koncentráciu $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a následne nariedené na pracovnú koncentráciu $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tab.1 Zoznam všetkých použitých primerov

Primer	Sekvencia 5' - 3'
Vk-SEQ-REV	CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGC
M13-20	TGTAACGACGGCCAGTG
pENTR-FW	CTACAACTCTTCCTGTTAGTTAG
pDONR-RE	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
CATSEQ_RE01	CCT TGC CGA TCT TTT CCT TG
RP_pBRACT209	ACCATGATTACGCCAAGCTC
eGFPSalI_FW02	TTAGTCGACTGATGTCCAAACCTTTTCTATCTT TGCTTTCACCTTTCCTTGCTTCTCTTTACAAGCA CAT GTTTAGCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
eGFPXhoI_RE01	ATAAATCTCGAGTGTTACTTGTACAGCTCGTCC ATGCCG

3.1.9 Konštrukty

V tejto diplomovej práci sme pracovali s dvoma navrhnutými konštruktami, ktoré boli pripravené synteticky a dodané formou plazmidovej DNA, kde navrhnutá kazeta bola vklonovaná do klonovacieho vektora pMK-RQ (Thermo Fisher Scientific, USA). Oba konštrukty obsahovali sekvenciu ľudského katelicidínu LL-37 a rôzne purifikačné značky (Obr. 8 a 9). Každý z konštruktov pozostával z jednej navrhutej stratégie, ktoré boli pomenované ako Stratégia 8 (PMK-RQ:LL-37 S8) a Stratégia 9 (PMK-RQ:LL-37 S9). 5 µg lyofilizovaného DNA konštrukt bolo rozpustených v 50 µl nuclease free vody.



Obr. 8 Schématické zobrazenie Stratégie 8 (syntetický konštrukt dodala firma Thermo Fisher Scientific, USA).



Obr. 9 Schématické zobrazenie Stratégie 9 (syntetický konštrukt dodala firma Thermo Fisher Scientific, USA).

LL-37 označuje ľudský antimikrobiálny peptid katelicidín. Ni-site je samoštiepiaca sa značka, ktorá funguje po pridaní iónov niklu ako samoštiepacie miesto. Faktor Xa a enterokináza je označenie zásahových miest, ktoré rozpoznávajú rovnako sa nazývajúce proteázy, ktoré sú začlenené do sekvencie fúzných proteínov z dôvodu možnosti odštiepenia afinitných značiek, ktoré je potrebné odstrániť, aby sme získali čistý LL-37. DAMP4 je surfaktantný peptid, ktorý slúži na purifikáciu rekombinantného proteínu vďaka jeho schopnosti znášať vysoké teploty, keďže je schopný udržať sa aj pri pôsobení vysokých teplôt (95°C) v supernatante a nedochádza k jeho vyzrážaniu a denaturácii. LeB4 (propeptid legumínu B4) je označenie signálnej sekvencie, ktorá zacielfuje proteíny do endoplazmatického retikula. Sekvencia HDEL bola použitá v konštrukte spolu so sekvenciou LeB4 z dôvodu jej spätného vychytávania proteínov na membráne endoplazmatického retikula. γ-zein je kukuričný skladovací proteín, ktorý dokáže ochrániť rekombinantný proteín pred jeho degradáciou, vďaka jeho schopnosti zapuzdrovania.

Okrem katelicidínových konštruktov sme v tejto práci používali konštrukt vytvorený počas bakalárskej práce. Ide o sekvenciu GFP vo fúzii so signálnou sekvenciou legumínu B4 (ďalej označovaná ako GFP-LeB4) v expresnom vektore pMDC32. Konštrukt bol vytvorený na overenie funkčnosti tejto signálnej sekvencie (zacielenie proteínov do

endoplazmatického retikula) pomocou tranzientnej expresie v listoch tabaku. Na kontrolu bol využitý konštrukt obsahujúci sekvenciu eGFP vo vektore pMDC32 pod kontrolou konštitutívneho promotóru CaMV 35S (transformovaný do baktérie *Agrobacterium tumefaciens*), ktorý bol dodaný oddelením molekulárnej biológie.

3.1.10 Restričné endonukleázy

V práci boli použité tieto restričné endonukleázy – XhoI, BamHI-HF, BglII, PvuI (všetky NEB, USA).

3.1.11 Rastové médiá

Luria-Bertani (LB) médium: 12,5 g LB Broth v 0,5 litri milli-Q vody

LB médium + agar: 500 ml LB média so 7,5 g agaru

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

3.1.12 Komerčné sústavy a kity

Clarity Western ECL Substrate (BioRad, USA)

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

QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Holandsko)

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

NucleoBond Xtra Plasmid DNA Purification (Macherey-Nagel, Nemecko)

Quick Start™ Bradford Protein Assay (BioRad, USA)

3.1.13 Prístroje

analytické váhy 5034/120 (Nahita, Španielsko)

automatické pipety (Eppendorf, Nemecko)

centrifuga 5427R (Eppendorf, Nemecko)

centrifuga model 16K (BioRad, USA)

digestor 1800/900M (Merci, Česká republika)

elektroporátor ECM 399 (BTX, USA)

elektromagnetická miešačka (Boeco, Nemecko)

elektroforetická komôrka pre horizontálnu elektroforézu (Labnet, USA)
epifluorescenčný mikroskop Axio Imager A1 (Zeiss, Nemecko)
fytotron (Weiss Technik, UK)
Gel Doc EZ image (BioRad, USA)
ChemiDoc XRS+ (BioRad, USA)
Inkubátor Incubat 85 (Melag, Nemecko)
inkubátor 37°C (Medline Scientific, Nemecko)
inkubátor Incu Shaker Mini (Benchmark, USA)
inkubátor Cool-Hotter Dry (Alex Red, Izrael)
inkubovaná orbitálna trepačka SI600C (Stuart, UK)
konfokálny mikroskop LSM 710 (Zeiss, Nemecko)
Minicentrifúga CombiSpin FVL-2400N (Biosan, Lotyšsko)
nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, USA)
orbitálna trepačka (Labnet, USA)
pH meter EDGE (Hanna Instruments, USA)
predvážky Scout SKX 621 (OHAUS, USA)
predvážky Scout SPX 6201 (OHAUS, USA)
termocycler T-gradient (Biometra, Nemecko)
termocycler Prime Full Size (Techne, UK)
termocycler Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA)
termomixér (Eppendorf, Nemecko)
ultracentrifuga CS150NX (Himac, Japonsko)
vortex (Labnet, USA)
UV/VIS spektrofotometer WPA Lightwave II (Biochrom, USA)
zdroj napätia MP-300V pre SDS-PAGE (Major Science, USA)
zdroj napätia Enduro 250V (Labnet, USA)

3.2 Metódy

3.2.1 Klonovanie

3.2.1.1 Transformácia metódou tepelného šoku

Chemokompetentné baktérie *Escherichia coli* TOP10 boli vybraté z mrazničky na -80°C a vložené do ľadu, aby pomaly rozmrzli. Po rozmrznutí bolo k bunkám pridaných $7\ \mu\text{l}$ ligačnej zmesi alebo $2\ \mu\text{l}$ plazmidovej DNA a takto pripravené vzorky boli inkubované v ľade po dobu 20-30 minút. Počas inkubačnej doby bolo z mrazničky na -20°C vybraté SOC médium, aby rozmrzlo a následne mohlo byť použité na regeneráciu buniek. Po skončení inkubácie boli vzorky vložené do inkubátora na 55 sekúnd pri teplote 42°C a potom hneď vložené naspäť do ľadu po dobu 2 minút. Nakoniec bolo k vzorkám pridaných $500\ \mu\text{l}$ SOC média a zmes bola inkubovaná 1 hodinu pri 37°C pri súčasnom trepaní na 400 rpm. Po uplynutí doby na regeneráciu buniek bola zmes scentrifugovaná na 3 minúty na 3000 rpm a po odliatí väčšiny supernatantu bol pelet rozsuspendovaný a natretý na LB platne obsahujúce príslušné antibiotikum, ktoré boli ponechané v inkubátore cez noc na 37°C .

3.2.1.2 Transformácia metódou elektroporácie

Elektrokompetentné baktérie *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 boli vybraté z mrazničky na -80°C a vložené do ľadu, aby pomaly rozmrzli. Po rozmrznutí bol k bunkám pridaný $1\ \mu\text{l}$ plazmidovej DNA a vzorky boli prepipetované do studenej elektroporačnej kyvety, kde bola zmes inkubovaná 3-5 minút. Po inkubácii bola každá kyveta vysušená, opatrne vložená do elektroporátora a bol aplikovaný 1800 V elektrický impulz, ktorý trval 4-5 ms. Po impulze bolo k zmesi v kyvetách pridaných $500\ \mu\text{l}$ SOC média a obsah kyviet bol prenesený do nových 1,5 ml mikroskúmaviiek. Nasledovala inkubácia pri 28°C po dobu 4 hodín za súčasného trepania pri 400 rpm. Nakoniec bola bakteriálna zmes scentrifugovaná na 3 minúty na 3000 rpm a po odliatí väčšiny supernatantu bol pelet rozsuspendovaný a natretý na LB platne obsahujúce príslušné antibiotiká, ktoré boli ponechané v inkubátore cez noc na 28°C .

3.2.1.3 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

PCR bolo v tejto práci použité pri tvorbe amplikónov zo stratégií PMK-RQ:LL-37 S8 a PMK-RQ:LL-37 S9 pomocou špecifických primerov V_k-SEQ-REV a M13-20, ktoré boli

následne naštípené restričnými endonukleázami BamHI a XhoI a použité na ligáciu do vstupného vektora pENTR1A_Hana. Ako enzým bola použitá Phusion HF polymeráza, kvôli jej „proof reding“ aktivite. Podrobné podmienky reakcie sú popísané v Tab. 2 a zloženie PCR zmesi je popísané v Tab. 3.

Tab. 2 Podmienky PCR reakcie pre Phusion HF polymerázu

PCR krok	Teplota v °C	Čas	Počet cyklov
<i>Začiatková denaturácia</i>	98	2 min.	1
<i>Denaturácia</i>	98	20 s	31
<i>Nasadenie primerov</i>	57°C	20 s	
<i>Syntéza DNA</i>	72°C	1 min.	
<i>Koncová syntéza DNA</i>	72°C	5 min.	1

Tab. 3 Zloženie PCR zmesi

Zložky PCR zmesi	Množstvo
<i>5x Phusion HF pufor</i>	4 µl
<i>dNTP's (10 mmol·l⁻¹)</i>	0,4 µl
<i>Forward primer (5µM)</i>	1 µl
<i>Reverse primer (5µM)</i>	1 µl
<i>DNA templát</i>	10 ng
<i>Phusion HF polymeráza</i>	0,2 µl
<i>Voda</i>	do 15 µl

3.2.1.4 Testovanie pomocou „Colony PCR“

Najprv boli jednotlivé vybrané kolónie z agarových platní zaočkované a rozsuspendované pomocou špičky do 15µl vody. Následne bolo z 15 µl vody použitých 7,3 µl pre PCR reakciu. Zbytok bol neskôr použitý na zaočkovanie pozitívnej kolónie do tekutého média alebo vytvoreniu „replica plate“. V tabuľke č.4 bolo popísané zloženie PCR zmesi a v tabuľke č.5 podmienky PCR reakcie.

Tab. 4 Zloženie zmesi pre Colony PCR

Zložky PCR zmesi	Množstvo
<i>5x GreenTaq pufor</i>	3 μ l
<i>MgCl₂ (25mM)</i>	1,5 μ l
<i>dNTP's (10 mmol·l⁻¹)</i>	0,15 μ l
<i>Forward primer (5μM)</i>	1,5 μ l
<i>Reverse primer (5μM)</i>	1,5 μ l
<i>DNA templát</i>	7,3 μ l
<i>Taq DNA polymeráza</i>	0,05 μ l

Tab. 5 Podmienky Colony PCR reakcie pre Taq polymerázu

PCR krok	Teplota v °C	Čas	Počet cyklov
<i>Začiatková denaturácia</i>	95	2 min.	1
<i>Denaturácia</i>	95	30 s	26
<i>Nasadenie primerov</i>	55	30 s	
<i>Syntéza DNA</i>	72	2 min.	
<i>Koncová syntéza DNA</i>	72	5 min.	1

3.2.1.5 Izolácia plazmidovej DNA pomocou QIAprep Spin Miniprep kitu

Plazmidová DNA bola izolovaná z bakteriálnych buniek pomocou kitu QIAprep Spin Miniprep Kit. Najprv boli 2 ml bakteriálnej kultúry napipetované do 2 ml mikroskúmavky a scentrifugované po dobu 3 minút na 5000 g. Supernatant bol odliaty do odpadnej nádoby a k peletu boli napipetované ďalšie 2 ml danej kultúry pre získanie vyššej koncentrácie plazmidu. Znova prebehla centrifugácia a supernatant bol znova odliaty do odpadnej nádoby. K získanému peletu bolo pridaných 250 μ l puforu P1, v ktorom bol pelet rozsuspendovaný. Následne bolo pridaných 250 μ l puforu P2, kedy došlo k zmiešaniu roztokov P1 a P2 pomalým otáčaním skúmavky v ruke a zmes bola inkubovaná po dobu 4 minút. Po uplynutí inkubácie bolo pridaných 350 μ l neutralizačného roztoku N3 a skúmavka bola opäť pomaly otáčaná v ruke, aby došlo k premiešaniu roztokov. Po vzniknutí bielej zrazeniny bola zmes v skúmavke scentrifugovaná na 13000 g po dobu 10

minút, 800 µl supernatantu bolo nanosených na kolónku vlozenej do novej mikroskúmavky a opäť scentrifugovaných na 11000 g po dobu 2 minút. Eluát bol odliaty do odpadnej kadičky a na kolónku bolo nanosených 750 µl premývacieho pufru PE. Mikroskúmavka obsahujúca kolónku bola scentrifugovaná 2 krát na 11000 g po dobu 2 minút a po každom stočení bol eluát odstránený, aby došlo k úplnému vysušeniu kolóny. Nakoniec bola kolónka prenesená do novej 1,5 ml mikroskúmavky a na ňu bolo pridaných 35 µl elučného pufru EB. Po 1 minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote bola skúmavka scentrifugovaná po dobu 2 minút na 11000 g a získaný eluát obsahoval plazmidovú DNA.

3.2.1.6 Izolácia plazmidovej DNA pomocou NucleoBond Xtra Maxi kitu

Plazmidová DNA bola izolovaná z bakteriálnych buniek pomocou kitu NucleoBond Xtra Maxi, vďaka čomu bola dosiahnutá vysoká koncentrácia vyizolovaného plazmidu. Vybratá kolónia bola zaočkovaná do 2 ml LB média s príslušným antibiotikom a kultivovaná cez noc pri 37°C. Na druhý deň boli 2 ml narastenej kultúry preočkované do 200 ml LB média s príslušným antibiotikom a opäť inkubované cez noc pri 37°C. Po inkubácii bola narastená kultúra scentrifugovaná v 50 ml falkonách na 6000 g po dobu 10 minút pri 4°C. Supernatant bol odstránený a pelet bol rozsuspendovaný v 8 ml pufru RES. Následne bolo pridaných 8 ml pufru LYS a 50 ml skúmavky boli pomaly otáčané v rukách aby došlo k úplnému premiešaniu pufrov. Zmes bola inkubovaná pri laboratórnej teplote po dobu 5 minút. V priebehu inkubácie bola zatiaľ s pomocou 12 ml pufru EQU navlhčená celá kolóna a kolónový filter, ktoré boli upevnené v stojane a ponechané odkvapkať do odpadnej kadičky. Po skončení 5 minútovej inkubácie bolo ku vzorkám pridaných 8 ml neutralizačného pufru NEU a lyzát bol opatrne premiešaný prevracaním skúmaviek. Lyzát bol pomaly nanášaný na kolónový filter a pretekal pomocou gravitačného spádu do odpadnej kadičky. Pomalým postupným krúživým pohybom pipety po okraji kolónového filtra bola kolóna premytá 5 ml pufru EQU. Po pretečení pufru EQU bol kolónový filter odstránený a prebehlo ďalšie premytie, tentokrát už samotnej kolóny pomocou 8 ml premývacieho pufru WASH. Plazmidová DNA bola eluovaná do 50 ml falkony pomocou 5 ml elučného pufru ELU. K eluovanej plazmidovej DNA bolo pridaných 3,5 ml isopropanolu, zmes bola zvortexovaná a centrifugovaná na 5000 g po dobu 15 minút pri laboratórnej teplote. Supernatant bol odstránený a k peletu bolo pridaných 2 ml 70% etanolu. Nasledovala centrifugácia na 8000 g po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote. Etanol bol odstránený pipetou a pelet bol ponechaný na vzduchu

približne 30 minút, aby úplne vyschol. Pelet bol nakoniec rozsuspendovaný v 80 ul vody a koncentrácia plazmidovej DNA bola odmeraná na Nanodrope.

3.2.1.7 Gélová elektroforéza

Pripravené PCR amplikóny a naštiepená plazmidová DNA restriknými enzýmami boli overované počas klonovacích krokov pomocou agarózovej gélovej elektroforézy. Gél obsahoval 1% agarózu v TAE pufri spolu s etídium bromidom kvôli detekcii. 1 ul vzorky s naštiepenou plazmidovou DNA bol zmiešaný s 9 ul vody a 2 ul 6xLoading Dye a následne bola nanosená na gél ponorený v pufri, zatiaľ čo vzorky obsahujúce PCR amplikóny obsahovali priamo v reakcii 5x GreenTaq Buffer a mohli byť rovno nanosené na agarózový gél. Na záver bol nanosený Gene Ruler 1kb+ DNA Ladder alebo Gene Ruler 100bp+ DNA Ladder (5 ul, Invitrogen) podľa očakávanej veľkosti DNA. Elektroforéza prebiehala 30 minút pri napätí 100 V a po jej ukončení bol gél vybratý z elektroforetickej komôrky, položený na UV-transiluminátor a odfotený pomocou softvéru ImageLab 5.1.

3.2.1.8 RestriKCia

Vstupný vektor pENTR1A_Hana a PCR amplikóny LL-37 S8 a LL-37 S9 boli naštiepené restriknými endonukleázami z dôvodu ich následného použitia na nastavenie ligačnej reakcie. Všetky reakcie prebiehali v prítomnosti špecifického pufru, ktorý zaručoval 100% aktivitu všetkých použitých enzýmov. Samotná restriKCia prebiehala pri 37°C v inkubátore buď po dobu 3-5 hodín alebo cez noc. Všeobecné zloženie reakčnej zmesi je popísané v Tab. 6. Okrem toho boli samotné vektory a pripravené konštrukty podrobené kontrolnej restrikcnej analýze, aby mohli byť overené ich správne veľkosti (podrobné zloženie reakčnej zmesi je popísané v Tab. 7).

Tab. 6 Zloženie restrikcnej zmesi

Zložky restrikcnej zmesi	Množstvo
<i>Pufor</i>	5 μ l
<i>Enzým 1</i>	1 μ l
<i>Enzým 2</i>	1 μ l
<i>DNA templát</i>	3 μ g
<i>voda</i>	do 50 μ l

Tab. 7 Zloženie kontrolnej restriktčnej zmesi

Zložky kontrolnej restriktčnej zmesi	Množstvo
<i>Pufor</i>	1 μ l
<i>Enzým 1</i>	0,2 μ l
<i>Enzým 2</i>	0,2 μ l
<i>DNA templát</i>	1 μ l
<i>voda</i>	do 10 μ l

3.2.1.9 Purifikácia DNA

Amplikóny vzniknuté PCR reakciou alebo naštiepená DNA po restrikcii boli purifikované pomocou kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up. Najprv bola DNA nariadená do 100-200 μ l vody a k tomu bolo pridaných 200-400 μ l NTI pufru podľa návodu. Obsah skúmavky bol nanosený na kolónku, ktorá bola umiestnená v 2ml mikroskúmavke. Vzorky boli následne scentrifugované po dobu 2 minút na 11000 g, eluát bol odliaty do odpadnej kadičky a na kolónku bolo pridaných 700 μ l NT3 pufru. Nasledovali dve centrifugácie na 1,5 minúty pri 11000 g, kde bola DNA na kolónke pri prvej centrifugácii najprv premytá a v druhom kroku vysušená od NT3 pufru. Nakoniec bola kolónka prenesená do novej 1,5 ml eppendorfky a na ňu bolo nanosených 20-50 μ l elučného pufru NE podľa návodu. Vzorky boli minútu inkubované pri laboratórnej teplote a následne scentrifugované na 11000 g po dobu 2 minút. Získaný eluát obsahoval purifikovanú DNA, ktorej koncentrácia bola zameraná na Nanodrope.

3.2.1.10 Ligácia

Naštípený vektor pENTR1A_Hana bol najprv ošetrený 0,5 μ l alkalickej fosfatázy a inkubovaný na 37°C 20 minút. Defosforylovaný vektor a naštiepené DNA amplikóny boli následne purifikované pomocou kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up podľa postupu dodaného od výrobcu. Samotná ligačná reakcia prebiehala 90 minút pri laboratórnej teplote a jej zloženie je popísané v Tab. 8.

Tab. 8 Zloženie ligačnej zmesi

Zložky ligačnej zmesi	Množstvo
<i>10x ligačný pufo</i>	1 μ l
<i>DNA inzert</i>	do 10 μ l
<i>Vektor</i>	200 ng
<i>T4 DNA ligáza</i>	0,75 μ l

3.2.1.11 LR reakcia

V LR rekombinačnej reakcii bolo zmiešaných 150 ng DNA expresného vektora pBract209 spolu so 150 ng DNA (oboch stratégií LL-37 S8 a LL-37 S9) entry klonu pENTR1A_Hana. K reakcii boli pridané 2 µl enzýmu LR Clonase Mix II a pufor TE, pH 8 do 10 µl. Reakcia prebiehala pri 25°C po dobu 3 hodín. Následne bol k reakcii pridaný 1 µl proteinázy K a reakčná zmes bola inkubovaná po dobu 10 minút pri 37°C.

3.2.1.12 Sekvenácia

Vzorky boli pripravené zmiešaním 2,5 µl primeru v koncentrácii 10 µmol/l, 500 ng plazmidovej DNA vyizolovanej pomocou kitu QIAprep Spin Miniprep Kit a vody, ktorou bol doplnený celkový objem reakcie na 10 µl. Po pripravení sekvenáčnej zmesi boli do systému seqme.eu vyplnené všetky parametre (názov vzoriek, primery a veľkosť konštruktu) a vzorky mohli byť poslané na sekvenáciu.

3.2.2 Transformácia listov tabaku pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens obsahujúce plazmid nášho záujmu bolo zaočkované do 100 ml LB média s príslušnými antibiotikami do Erlenmayerovej banky a ponechané kultivovať na 28°C cez noc v inkubátore za stáleho trepania. Ďalší deň bola zmeraná optická hustota pri 600 nm na spektrofotometri, kde ako blank slúžilo čisté LB médium. Následne bolo pomocou vzorca č.1 vypočítané množstvo, ktoré je potrebné napipetovať do 2 ml mikroskúmavky tak, aby po jeho nariedení do 2 ml bola optická hustota kultúry 0,5 ($OD_{600} = 0,5$).

Vzorec č.1 Výpočet množstva (v µl) potrebných pre vznik kultúry s optickou hustotu 0,5 po nariedení do 2 ml

$$x \mu l = \frac{2 \times 0,5}{\text{Nameraná Abs}}$$

Vypočítané množstvo bolo napipetované do čistej 2 ml mikroskúmavky a scentrifugované po dobu 10 minút, pri 4°C na 2000g. Vzniknutý pelet bol následne rozsuspendovaný v 2 ml pripraveného média, ktoré obsahovalo 10mM MES (pH 5,6), 150 µM acetosyringón a 10mM MgCl₂. Pripravená suspenzia bola inkubovaná v tme po dobu 2 hodín za stáleho trepania pri izbovej teplote. Po začatí dvojhodinovej inkubácie

boli rastlinky tabaku staré 7 týždňov poliate a vložené do veľkého igelitového sáčku, aby došlo k ich zavlhčeniu a otvoreniu prieduchov. Po skončení inkubácie boli tabaky prenesené z fytotronu do laboratória a kvetináče boli označené podľa konštruktu, ktorým boli infikované dané rastliny. Bakteriálna suspenzia bola do listov vnesená pomocou 1 ml injekčnej striekačky zo spodnej (prieduchovej) strany. Infikované rastliny boli umiestnené do fytotronu po dobu 3-6 dní pri 16/8 (deň/noc) režime a následne buď zozbierané a zmrazené na -80°C pre ďalšiu analýzu alebo ihneď vyhodnotené pomocou mikroskopu.

3.2.3 SDS-PAGE

Na SDS-PAGE elektroforézu boli buď použité komerčné 4-12% NuPage Bis-Tris precast gély od firmy Invitrogen alebo 12% gély pripravené klasickým spôsobom podľa Tab. 9 a Tab. 10. Oba typy gélov boli najprv vložené do aparatury pre SDS-PAGE a následne bol do aparatury priliaty elektroforetický pufo. Na záver boli do jamiek gélov nanesené vzorky v objeme od 10-30 μ l, ktoré boli pripravené pridaním 2x SDS pufru v pomere 1:1 k proteínovej vzorke a následne povarené na 95°C na 10 minút. Spolu so vzorkami bol nanesený aj marker Novex Sharp Pre-stained Protein Standard (8 μ l) alebo Unstained Protein Standard (6 μ l). Samotná elektroforéza prebiehala najprv 15 minút na 70V a potom bolo napätie zvýšené na 150 V po dobu približne 45 min. tak, aby čelo elektroforézy nevyputovalo z gélu.

Tab. 9 Zloženie 12% rozdeľovacieho gélu

Zložky 12% rozdeľovacieho gélu	Množstvo na 2 gély
<i>Voda</i>	3,2 mL
<i>10% SDS</i>	100 μ l
<i>10% APS</i>	100 μ l
<i>TEMED</i>	10 μ l
<i>0,5 M Pufo Tris-HCl pH 8,8</i>	2,6 mL
<i>30% Akrylamid/N,N'metylénbisakrylamid</i>	4 mL

Tab. 10 Zloženie 4% zaostrovacieho gélu

Zložky 4% zaostrovacieho gélu	Mnosžvto na 4 gély
<i>Voda</i>	5,86 mL
<i>10% SDS</i>	100 μ l
<i>10% APS</i>	100 μ l
<i>TEMED</i>	10 μ l
<i>0,5 M Pufo Tris-HCL pH 6,8</i>	2,6 mL
<i>30% Akrylamid/N,N'metylénbisakrylamid</i>	1,34 mL

3.2.4 Western blot

PVDF membrána bola vystrihnutá na veľkosť 8 x 7 cm a vložená do plastovej nádoby obsahujúcej metanol, aby došlo k jej aktivácii. Okrem toho bol nachystaný transférový pufor, ktorý bol pripravený zmiešaním 3,6 g Tris, 17,28 g glycínu, ktoré boli rozmiešané v 120 ml vody. Roztok bol naliaty do 2 litrového odmerného valca a k nemu bolo pridaných 120 ml metanolu a objem bol doplnený vodou do 1200 ml. Transférový pufor bol naliaty do veľkej plastovej nádoby, v ktorej bol následne zložený „sendvič“. Na anódovú (čiernu) stranu kazety boli najprv nanesené dve špongie namočené do transférového pufra. Na nich boli položené dva namočené filtračné papiere a pomocou valčeka boli odstránené prípadné vzniklé bubliny. Na filtračný papier bol následne nanesený SDS gél a na neho bola položená PVDF membrána. Na membránu boli položené ďalšie dva namočené filtračné papiere a pomocou valčeka boli opäť odstránené prípadné bublinky. Nakoniec boli na filtračný papier nanesené namočené špongie a takto pripravená kazeta bola zatvorená a vložená do blotovacieho tanku, ktorý bol naplnený dostatočným množstvom prenosového pufra a taktiež do neho bolo vložené chladítko z mraziaceho boxu. Samotný transfér prebiehal cez noc pri 20 V a druhý deň ráno bolo napätie nastavené na 100 V po dobu jednej hodiny. Po ukončení transféru bola membrána prenesená do plastovej nádoby, ofarbená pomocou Amidočerni a na membráne boli pomocou ceruzky vyznačené bandy určujúce proteínový marker. Membrána bola následne odfarbovaná v TBS-T pufri po dobu 15 minút na rotačnej trepačke. Následne bola membrána blokovaná po dobu 1 hodiny v 5% mlieku v TBS-T pufri a po blokovaní bola inkubovaná s 2 ml primárnej protilátky, ktorá bola pripravená nariedením 5 μ l protilátky do 2 ml 1% mlieka v TBS-T pufri. Membrána bola potom premytá 1x po dobu 5 minút v TBS-T pufri a 2x po dobu 5 minút v TBS pufri. Po premytí bola membrána inkubovaná s 10 ml sekundárnej protilátky po dobu 1 hodiny, ktorá bola pripravená nariedením 4 μ l protilátky do 20 ml 1% mlieka v TBS-T pufri. Nakoniec bola membrána opäť premytá po dobu 10 minút v TBS-T pufri a potom 10 minút v TBS pufri. Po premytí bol na detekciu použitý kit Clarity Western ECL Substrate podľa návodu a membrána bola analyzovaná pomocou systému ChemiDoc XRS+.

3.2.5 Fluorescenčná a konfokálna mikroskopia

Tabakové listy, ktoré boli infikované pomocou *Agrobacterium tumefaciens* boli odstrihnuté 3 dni po transformácii u fluorescenčnej mikroskopie a 4 dni u konfokálnej mikroskopie. Zo spodnej strany listov bol pomocou skalpela vyrezaný štvorec (miesto

bolo vybrané hneď vedľa miesta vpichu tak, aby preparát neobsahoval samotné miesto infiltrácie) o veľkosti približne 1 cm x 1 cm. Kúsok listu bol položený na podložné sklo, zakvapnutý vodou a prekrytý krycím sklíčkom, ktoré bolo opatrne položené na lepiace pásky nachádzajúce sa po stranách podložného sklíčka. Expressia konštruktov obsahujúcich GFP bola pozorovaná pod modrým svetlom (488 nm excitácia, 509 nm emisia) a vyhodnotená pomocou programu Zeiss Zen blue/black. Na epifluorescenčnú mikroskopiu bol použitý epifluorescenčný mikroskop Axio Imager A1 (Zeiss, Nemecko) (objektív s 10x a 20x zväčšením) a na konfokálnu mikroskopiu konfokálny mikroskop LSM 710 (Zeiss, Nemecko) (objektív s 40x zväčšením).

3.2.6 Stanovanie celkových proteínov metódou Bradford

Množstvo celkových proteínov obsiahnutých vo vzorke bolo stanovené pomocou metódy Bradford. Ako prvý bol na spektrofotometri zmeraný blank pri 595nm (800 µl vody + 200 µl Bradfordovho činidla) a následne bola vytvorená kalibračná krivka zmeraním rôznych koncentrácií BSA pripravených podľa tabuľky č.11. Nakoniec boli zmerané vzorky, ktoré boli pripravené zmiešaním 10 µl vzorky proteínu, 790 µl vody a 200 µl Bradfordovho činidla. Po vytvorení kalibračnej krivky v programe Excel bola z rovnice $y = a \cdot x \pm b$ vypočítaná celková koncentrácia proteínov v jednotkách mg/mL.

Tab. 11 Použité množstvo a koncentrácie BSA pre tvorbu kalibračnej krivky

Koncentrácia (µg/ml)	BSA (2mg/ml)	voda
2	1 µl	799 µl
4	2 µl	798 µl
6	3 µl	797 µl
8	4 µl	796 µl
10	5 µl	795 µl

3.2.7 Purifikácia rekombinantného proteínu z listov tabaku

Postup č.1: Boli odvážené 3 g zmrazených tabakových listov, ktoré boli následne rozdrvené na prášok v trecej miske za neustáleho chladenia tekutým dusíkom. Do štyroch 15 ml skúmaviek bolo odvážených vždy 750 mg tabakového prášku a k nemu bolo pridaných 750 µl extrakčného pufru (Tris-HCl, NaCl, Triton-X a PMFS). Proteíny boli takto extrahované na ľade po dobu dvoch hodín. Po ukončení inkubácie bola zmes

z každej skúmavky prepipetovaná do novej 2 ml eppendorfky a scentrifugovaná na 12000 g, pri 4°C po dobu 10 minút. 100 mg peletu bolo odobraného pre ďalšiu analýzu do 2 ml eppendorfky a k nemu bolo pridaných 100 µl 2x SDS pufru. Zmes bola povarená pri 95°C po dobu 10 minút a zamrazená na -20°C. Supernatant bol rozdelený po 3 x 800 µl do 2 ml skúmaviek a zároveň bolo odobraných 100 µl pre analýzu celkového množstva proteínu vo vzorke. Tri skúmavky obsahujúce 800 µl supernatantu boli povarené na 90°C po dobu 5min. /10min. /15min. a nakoniec ultrascentrifugované po dobu 30 min. pri 25000 g. Po ultracentrifugácii bolo odobraných 20 mg peletu zo vzorky povarenej po dobu 15 min. pre ďalšiu analýzu a pelet bol opäť zmiešaný s 20 µl 2x SDS, povarený pri 95°C po dobu 10 min. a použitý pre ďalšiu analýzu. Z každého supernatantu (povarenie na 5 /10 /15 min.) bolo odobraných 100 µl pre stanovenie celkového proteínu vo vzorke a zbytok bol použitý na ďalšiu analýzu pomocou metódy Western blot.

Postup č.2: Bolo odvážených 6 g zmrazených tabakových listov, ktoré boli následne rozdrvené na prášok v trecej miske za neustáleho chladenia tekutým dusíkom. Do šiestich 15ml skúmaviek bol odvážený vždy 1 g tabakového prášku a k nemu bol pridaný extrakčný pufr podľa Tab. 12. Proteíny bolo extrahované pri laboratórnej teplote po dobu dvoch hodín. Po ukončení inkubácie bola zmes z každej skúmavky prepipetovaná do 2 ml eppendorfky a scentrifugovaná na 12000 g po dobu 15 minút pri laboratórnej teplote. Z každej vzorky bolo odobraných 100 mg peletu, ktorý bol zmiešaný so 100 µl 2x SDS pufru. Zmes bola povarená na 95°C 10 minút a následne použitá pre ďalšiu analýzu. Supernatant bol taktiež použitý na ďalšiu analýzu pomocou metódy Western blot.

Po analýze pomocou metódy Western blot bola znova uskutočnená extrakcia 1 g tabakových listov v pufrach 3. a 6. z dôvodu overenia výsledkov. Opäť bol odvážený 1 g tabakových listov, ktorý bol rozdrvený na prášok v trecej miske za stáleho chladenia tekutým dusíkom. Do dvoch 15 ml skúmaviek bol pridaný 1 g tabakového prášku a do jednotlivých skúmaviek bol priliaty extrakčný pufr 3. alebo 6. podľa Tab. 12. Extrakcia prebiehala pri laboratórnej teplote po dobu 2 hodín. Následne bola zmes prepipetovaná do 2 ml Eppendorf skúmavky a scentrifugovaná po dobu 15 minút pri 12000 g. Z každej vzorky bolo odobraných 100 mg peletu, ktorý bol rozpustený v 100 µl 2x SDS pufru. Zmes bola povarená na 95°C po dobu 10 minút a následne použitá pre ďalšiu analýzu. 1

ml z oboch extrahovaných supernatantov bol taktiež odobraný a uschovaný pre ďalšiu analýzu.

Tab. 12 Typ a množstvo extrakčného pufu pridaného k jednotlivkej vzorke tabaku

Typ extrakčného pufu	Množstvo použitého pufu
<i>1. 12,5mM borát sodný pH 10, 1%SDS, 0,5% 2-merkaptóetanol</i>	3 mL
<i>2. 12,5mM borát sodný pH 10, 1%SDS, 1% 2-merkaptóetanol</i>	3 mL
<i>3. 12,5mM borát sodný pH 10, 1%SDS, 2% 2-merkaptóetanol</i>	3 mL
<i>4. 12,5mM borát sodný pH 10, 1%SDS, 1mM DTT</i>	3 mL
<i>5. 12,5mM borát sodný pH 10, 1%SDS, 2mM DTT</i>	3 mL
<i>6. 12,5mM borát sodný pH 10, 1%SDS, 2% 2-merkaptóetanol</i>	10 mL

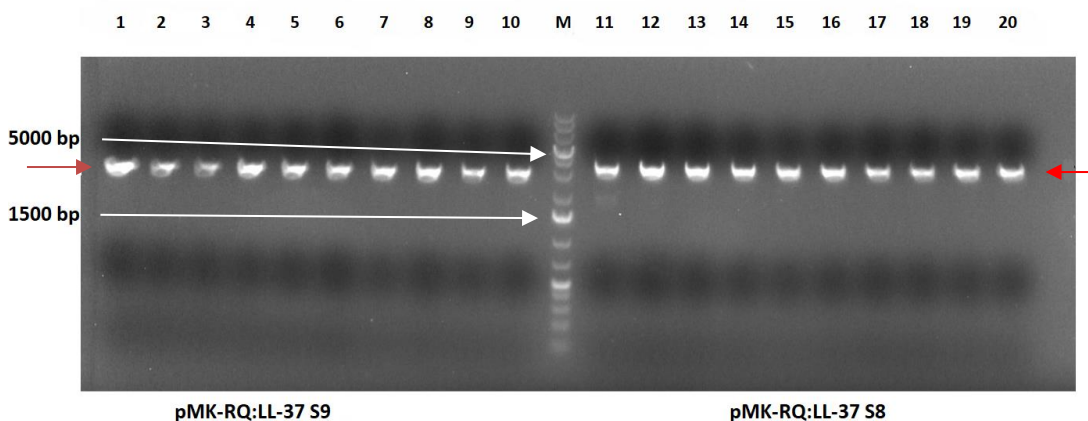
Okrem toho bol odobraný ešte 1 ml z oboch extrahovaných supernatantov, ktorý bol povarený po dobu 10 minút pri 95°C a scentrifugovaný po dobu 15 minút pri 12000 g. Tieto supernatanty boli taktiež uschované a použité pre ďalšiu analýzu.

Na záver bol odobraný z pôvodných dvoch extrahovaných supernatantov ešte 1 ml, ktorý bol nariedený 0,729 µl 96% etanolom a takto inkubovaný po dobu 30 minút pri laboratórnej teplote. Po inkubácii boli obe zmesi scentrifugované po dobu 15 minút pri 12000 g. Supernatant bol prepipetovaný do novej eppendorfky, ponechaný v inkubátore 3 hodiny pri 78°C, aby došlo k vypareniu etanolu a následne použitý k ďalej analýze. Zo získaného peletu bolo odvážených 50 µg a k nemu bolo pridaných 50 µl 2x SDS pufu. Vzorky boli povarené po dobu 10 minút pri 95°C a použité pre ďalšiu analýzu.

4 Výsledky

4.1 Klonovanie konštruktov pMK-RQ:LL-37 S8 a pMK-RQ:LL-37 S9 do expresného vektora pBract209

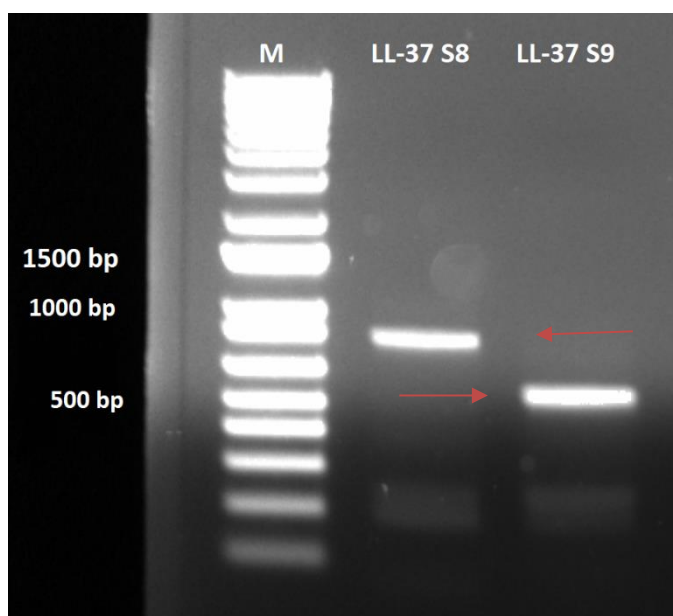
Pri príprave konštruktov vhodných pre stabilnú transformáciu jačmeňa boli obdržané syntetické konštrukty pMK-RQ:LL-37 S8 a pMK-RQ:LL-37 S9 vo vektore pMK-RQ (Thermo Fischer Scientific, USA), obsahujúce sekvenciu ľudského katelicidínu LL-37 spolu s ďalšími purifikačnými značkami (viz. kapitola 3.1.9). Tieto konštrukty boli zatransformované do chemokompetentných baktérií *E. coli* TOP10, bunky boli natreté na misky so selekčným antibiotikom a 10 vybraných kolónií bolo zaočkovaných do tekutého LB média. Z tekutých kultúr bola vyizolovaná plazmidová DNA, ktorej správna veľkosť bola overená kontrolnou restrikciou s enzýmom XhoI, ktorý štiepi vektor pMK-RQ len na jednom mieste a dochádza k jeho linearizácii (Obr. 10). Výsledok elektroforézy potvrdil správnu veľkosť vyizolovaného plazmidu u oboch použitých stratégií (pMK-RQ:LL-37 S8 – teoretická veľkosť plazmidu 3288bp; pMK-RQ:LL-37 S9 – teoretická veľkosť plazmidu 3018 bp).



Obr. 10 Elektroforeogram kontrolnej restriktívnej analýzy (enzýmom XhoI) plazmidovej DNA vyizolovanej z tekutých kultúr *E. coli* TOP10, ktorá vznikla ich transformáciou konštruktami pMK-RQ:LL-37 S8 a pMK-RQ:LL-37 S9. M – štandard molekulej veľkosti 1 kB Plus DNA Ladder, vzorka 1-10 pMK-RQ:LL-37 S9, vzorka 11-20 pMK-RQ:LL-37 S8. Do jamky bolo nanesených buď 5 μ l štandardu alebo 12 μ l vzorky. Červené šípky označujú pozitívne kolónie.

Takto pripravené plazmidy boli použité pre PCR amplifikáciu (viz. kapitola 3.2.1.3) pomocou špecifických primerov Vk-SEQ-REV a M13-20, ktorá bola potrebná pre vznik sekvencie obsahujúcej oblasť nášho záujmu (LL-37 S8 a LL-37 S9) spolu s restriktívnymi miestami BamHI a XhoI z dôvodu odstránenia kostry plazmidu pMK-RQ, keďže je

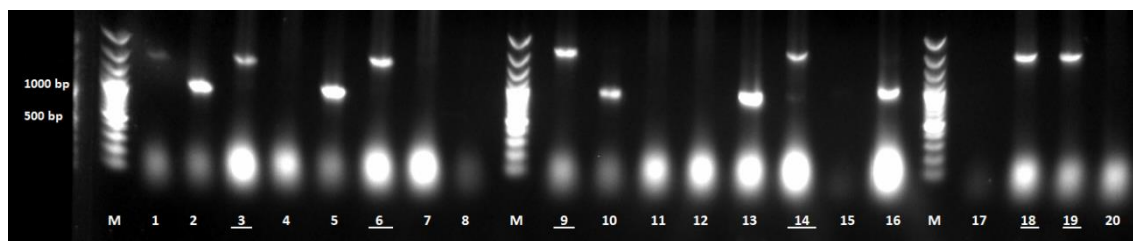
plazmid rezistentný voči kanamycinu rovnako ako vstupný vektor pENTR1A_Hana, do ktorého mala prebiehať ligácia. Veľkosť PCR amplikónov bola overená pomocou gélovej elektroforézy a následne boli amplikóny naštípené enzýmami BamHI a XhoI cez noc pri 37°C. Po restrikcii boli naštípené amplikóny purifikované na kolónke a znova skontrolované pomocou analytickej gélovej elektroforézy (Obr. 11). Výsledok potvrdil úspešnú amplifikáciu a restrikciu oboch stratégií (LL-37 S8 – teoretická veľkosť amplikónu po naštípení 798 bp, LL-37 S9 – teoretická veľkosť amplikónu po naštípení 534 bp).



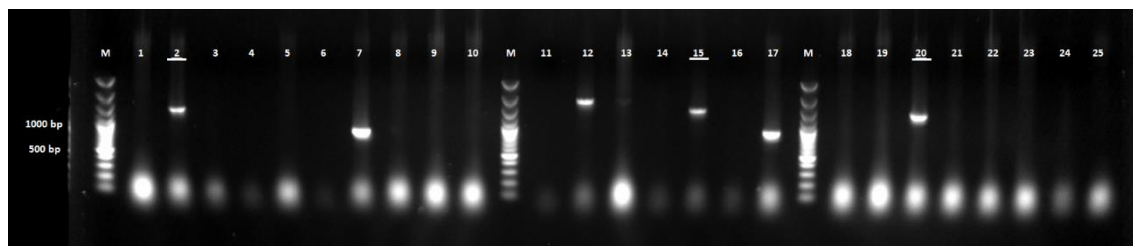
Obr. 11 Elektroforeogram po amplifikácii a následnej restrikcii (enzýmami BamHI a XhoI) oboch stratégií (LL-37 S8 a LL-37 S9). M – štandard molekulovej veľkosti 1 kB Plus DNA Ladder. Do jamky bolo nanesených 5 μ l štandardu alebo 1 μ l vzorky, ktorá bola Milli-Q vodou nariedená do celkového objemu 10 μ l. Červené šípky označujú veľkostne správne amplikóny LL-37 S8 a LL-37 S9.

Vstupný vektor pENTR1A_Hana (obdržaný od vedúceho práce), ktorý obsahoval B-hordeinový promotór vhodný pre stabilnú expresiu v endosperme jačmeňa a ktorý je templátom pre uskutočnenie posledného kroku klonovania do finálneho vektora pBract209, bol najprv naštípený enzýmom BamHI cez noc pri 37°C, druhý deň purifikovaný a následne štiepený ďalšie 4 hodiny enzýmom XhoI pri 37°C. Po druhej restrikcii bol vektor defosforylovaný a opäť purifikovaný a bola nastavená jeho ligácia spolu s amplifikovanými a naštípenými LL-37 S8 a LL-37 S9 (viz. kapitola 3.2.1.10). 6 μ l ligačnej zmesi bolo zatransformovaných do chemokompetentných buniek *E.coli* TOP10. Z LB misiek s kanamycinom bolo pre PCR analýzu bakteriálnych kolónií „Colony PCR“ použitých 20 kolónií pre pENTR1A:LL-37 S8 a 25 kolónií pre

pENTR1A:LL-37 S9 za použitia primerov pENTR-FW a pDONR-RE. Výsledok z tejto Colony PCR je ukázaný na Obr. 12 pre pENTR1A:LL-37 S8 a Obr. 13 pre pENTR1A:LL-37 S9 a vidíme tu prítomnosť očakávaných DNA amplikónov o teoretickej veľkosti 1997 bp pre pENTR1A:LL-37 S8 a 1733 bp pre pENTR1A:LL-37 S9.



Obr. 12 Elektroforeogram kontrolnej Colony PCR vzniknutých kolónií po transformácii *E.coli* TOP10 ligačnou zmesou obsahujúcou pENTR1A:LL-37 S8. Domnelé pozitívne kolónie sú podčiarknuté. M – štandard molekulovej veľkosti 100 bp Plus DNA Ladder. Do jamky bolo nanesených 5 μ l štandardu alebo 10 μ l vzorky.

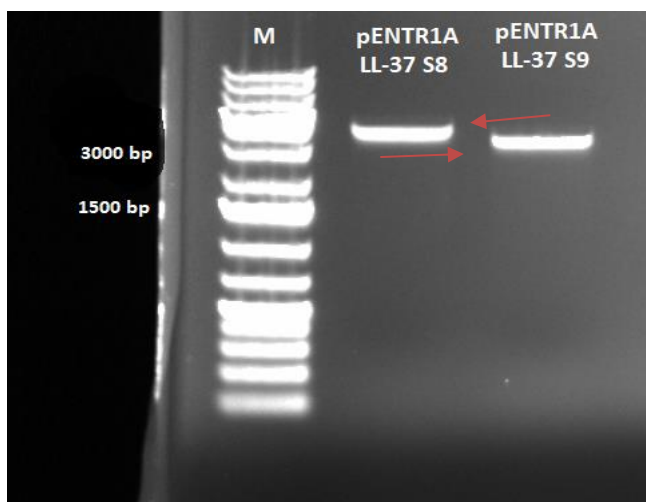


Obr. 13 Elektroforeogram kontrolnej Colony PCR vzniknutých kolónií po transformácii *E.coli* TOP10 ligačnou zmesou obsahujúcou pENTR1A:LL-37 S9. Domnelé pozitívne kolónie sú podčiarknuté. M – štandard molekulovej veľkosti 100 bp Plus DNA Ladder. Do jamky bolo nanesených 5 μ l štandardu alebo 10 μ l vzorky.

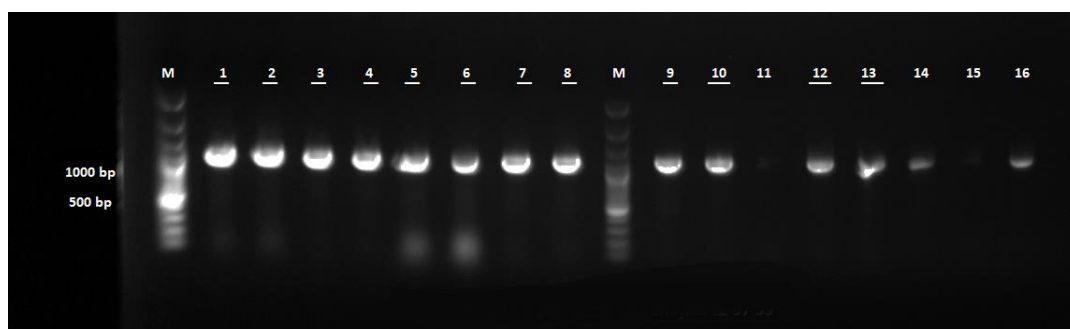
Kolónie obsahujúce PCR produkt o správnej veľkosti boli zaočkované do tekutého média obsahujúceho kanamycin a následne z nich bola vyizolovaná plazmidová DNA. Táto DNA bola najprv poslaná na sekvenáciu, ktorá potvrdila úspešnosť klonovania a prítomnosť nezmutovaných sekvencií PMK-RQ:LL-37 S8 alebo S9 vo vektore pENTR1A_Hana. Následne bola plazmidová DNA u oboch stratégií vo vektore pENTR1A_Hana naštiepená enzýmom PvuI cez noc pri 37°C v mieste kanamycinovej rezistencie, pretože expresný vektor pBract209 obsahoval rovnaký gén rezistencie. Úspešnosť restrikcie bola overená pomocou gélovej elektroforézy (Obr. 14). Výsledok opäť potvrdil úspešnosť restrikcie (pENTR1A:LL-37 S8 – veľkosť 3937 bp, pENTR1A:LL-37 S9 – veľkosť 3673 bp).

Po restrikcii bola plazmidová DNA purifikovaná na kolónke a po zmeraní jej koncentrácie bola použitá na LR reakciu. LR reakcia naštiepeného vstupného vektora pENTR1A_Hana, ktorý obsahoval inzert LL-37 S8 alebo S9 spolu s expresným vektorom

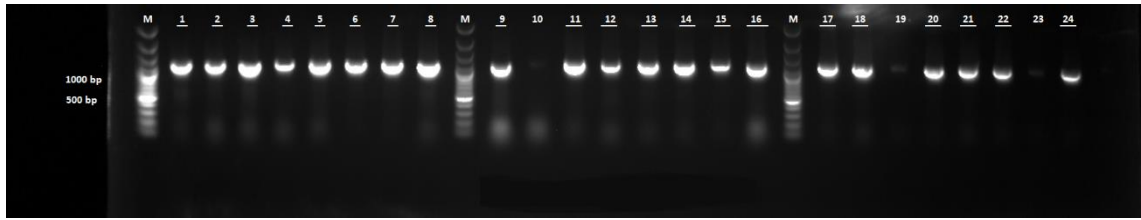
pBract209 prebehla podľa postupu popísaného v kapitole 3.2.1.11. 6 μ l LR reakčnej zmesi bolo zatransformovaných do chemokompetentných *E.coli* TOP10 a z narastených kolónií na LB miskách s kanamycinom bolo vybratých na Colony PCR 16 kolónií pre pBract209:LL-37 S8 a 24 kolónií pre pBract209:LL-37 S9 za použitia primerov CATSEQ_RE01 a RP_pBRACT209. PCR bakteriálnych kolónií bola overená pomocou gélovej elektroforézy (Obr. 15 pre pBract209:LL-37 S8 a Obr. 16 pre pBract209:LL-37 S9). Výsledok ukázal viacero pozitívnych kolónií u oboch stratégií, s očakávanou veľkosťou (pBract209:LL-37 S8 - veľkosť PCR amplikónu 1229 bp, pBract209:LL-37 S9 – veľkosť PCR amplikónu 1199 bp). Z pozitívnych kolónií bola vyizolovaná plazmidová DNA, ktorá bola poslaná na sekvenáciu. Sekvenácia potvrdila úspešnosť klonovania a prítomnosť nezmutovaných sekvencií pBract209:LL-37 S8 alebo S9.



Obr. 14 Elektroforeogram po restrikcii vektora pENTR1A_Hana obsahujúcom inzert LL-37 S8 alebo LL-37 S9 enzýmom PvuI v mieste kanamycinovej rezistencie. M – štandard molekulovej veľkosti 1 kb Plus DNA Ladder. Do jamky bolo nanesených 5 μ l štandardu alebo 1 μ l vzorky, ktorá bola Milli-Q vodou nariedená do celkového objemu 10 μ l. Červené šípky označujú veľkostne správne linearizované plazmidy pENTR1A:LL-37 S8 a pENTR1A:LL-37 S9.



Obr. 15 Elektroforeogram kontrolnej Colony PCR vzniknutých kolónií po transformácii *E.coli* TOP10 LR reakčnou zmesou obsahujúcou pBract209:LL-37 S8. Domnelé pozitívne kolónie sú podčiarknuté. M – štandard molekulovej veľkosti 100 bp Plus DNA Ladder. Do jamky bolo nanesených 5 μ l štandardu alebo 10 μ l vzorky.

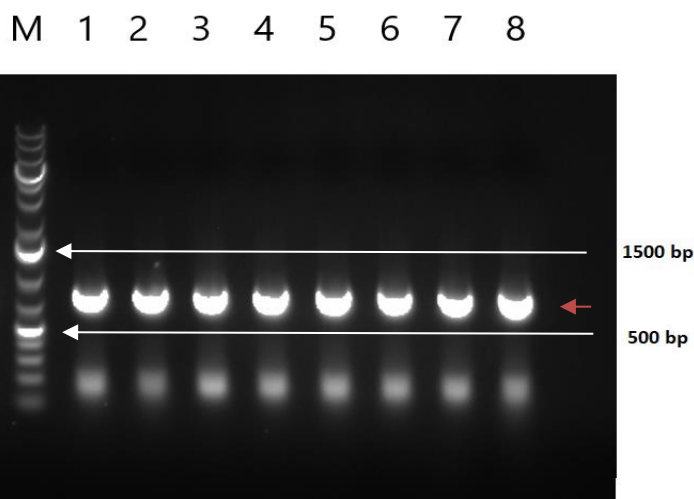


Obr. 16 Elektroforeogram kontrolnej Colony PCR vzniknutých kolónií po transformácii *E.coli* TOP10 LR reakčnou zmesou obsahujúcou pBract209:LL-37 S9. Domnelé pozitívne kolónie sú podčiarknuté. M – štandard molekulovej veľkosti 100 bp Plus DNA Ladder. Do jamky bolo nanesených 5 μ l štandardu alebo 10 μ l vzorky.

4.2 Transformácia baktérie *Agrobacterium tumefaciens* konštruktom obsahujúcim sekvenciu GFP-LeB4 v expresnom vektore pMDC32

V rámci mojej bakalárskej práce bol pripravený konštrukt obsahujúci sekvenciu GFP-LeB4 v expresnom vektore pMDC32 pod kontrolou 35S konštitutívneho promotóra vhodného k tranzientnej expresii v listoch tabaku. Konštrukt bol pripravený z dôvodu overenia funkčnosti signálnej sekvencie propeptidu legumínu B4, ktorá má zacielať proteíny do endoplazmatického retikula.

Takto pripravený konštrukt vo forme plazmidovej DNA bol najprv poslaný na sekvenáciu. Po overení úspešnosti klonovania a prítomnosti nezmutovanej sekvencie GFP-LeB4 vo vektore pMDC32 bola uskutočnená transformácia elektrokompetentnej baktérie *Agrobacterium tumefaciens* C58C1. Z narastených kolónií bolo vybratých 8 pre kontrolnú Colony PCR, ktorá bola vyhodnotená pomocou gélovej elektroforézy (Obr. 17). Výsledok ukázal, že všetky vybraté kolónie boli pozitívne (pMDC32:GFP-LeB4 - teoretická veľkosť PCR amplikónu 805 bp).

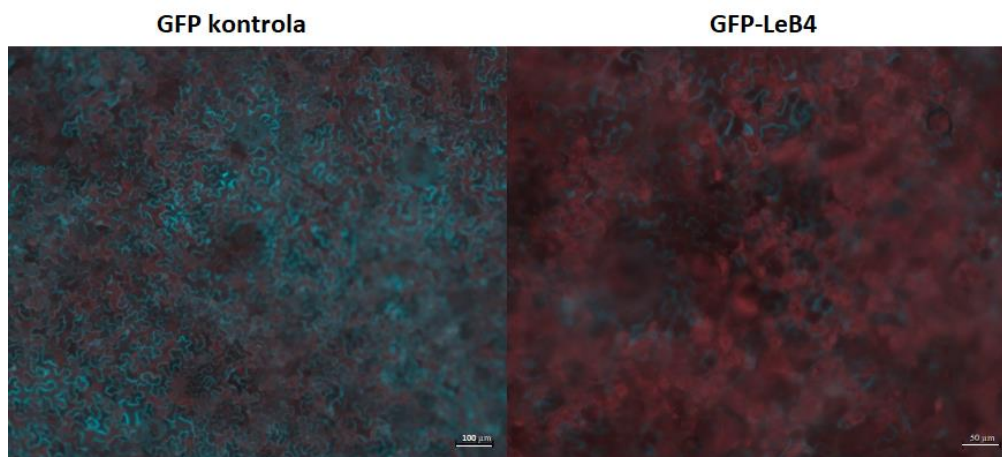


Obr. 17 Elektroforeogram kontrolnej Colony PCR narastených kolónií po transformácii elektrokompetentných *A. tumefaciens* C58C1 plazmidom pMDC32:GFP-LeB4. M – štandard molekulovej veľkosti 1 kb Plus DNA Ladder. Do jamky bolo nanesených 5 μ l štandardu alebo 10 μ l vzorky. Červená šípka označuje pozitívne kolónie.

4.3 Tranzientná transformácia listov tabaku a overenie expresie GFP-LeB4 fluorescenčným a konfokálnym mikroskopom

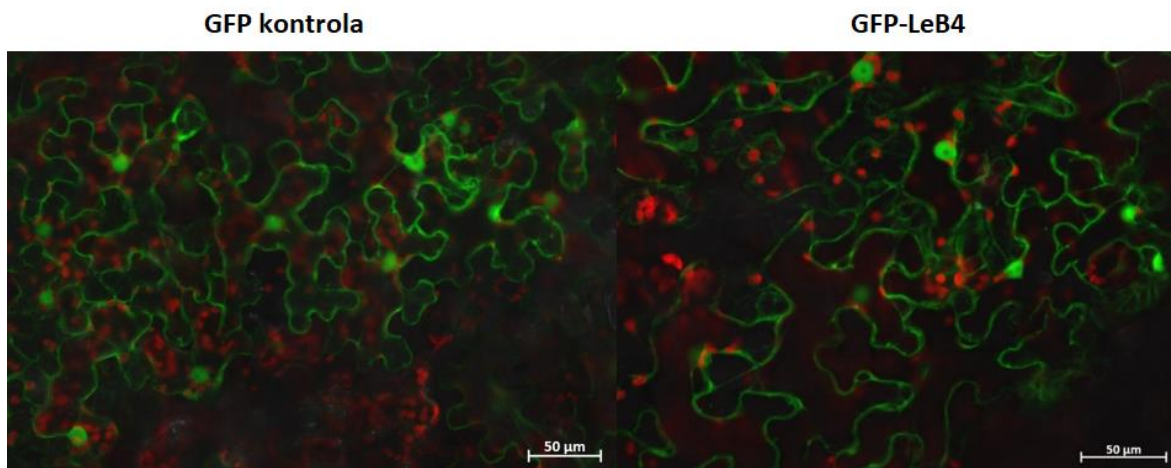
Jedna z pozitívnych kolónií po analýze pomocou Colony PCR (Obr. 18) bola naočkovaná do tekutého média a nasledovala transformácia tabakových listov starých 7 týždňov podľa postupu popísaného v kapitole 3.2.2. Tabakové listy boli transformované ako baktériami *A. tumefaciens* C58C1, ktoré obsahovali pMDC32:GFP-LeB4 tak aj *A. tumefaciens* obsahujúca iba sekvenciu eGFP taktiež pod kontrolou silného konštitutívneho promotóra (konštrukt obdržaný oddelením molekulárnej biológie), ktorá slúžila ako pozitívna kontrola. Po troch dňoch boli listy zozbierané a tranzientná expresia bola vyhodnotená pomocou epifluorescenčného mikroskopu. Výsledok mikroskopovania preukázal úspešnú transformáciu tabakových listov ako u konštraktu GFP-LeB4, tak u pozitívnej kontroly eGFP. U oboch konštruktov bola zaznamenaná silná expresia zeleného fluorescenčného signálu GFP.

Potom ako bola potvrdená expresia konštraktu GFP-LeB4 pomocou fluorescenčnej mikroskopie, boli 4 deň po infiltrácii zozbierané nové listy obsahujúce eGFP a GFP-LeB4, ktoré boli vyhodnotené pomocou laserovej skenovacej konfokálnej mikroskopie. Vďaka tejto metóde bola znovu potvrdená expresia oboch konštruktov, kontrolného GFP aj GFP s propeptidom legumínu B4 (Obr. 19). a zároveň bola vyhodnotená funkčnosť signálnej sekvencie LeB4 (Obr. 20), ktorá bola v práci používaná v katelicidínovom konštrukte s kazetou LL-37 S9.

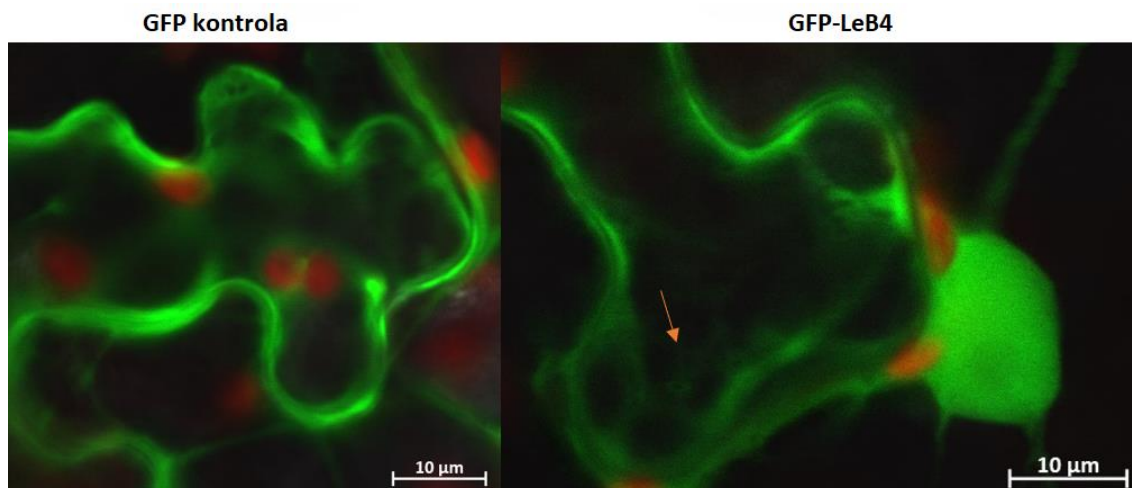


Obr. 18 Fotky z fluorescenčného mikroskopu zobrazujúce tranzientnú expresiu konštruktu eGFP ako pozitívnej kontroly a GFP-LeB4 v 7 týždňov starých listoch tabaku, vyhodnotených 3 dni po ich infiltrácii. Mierka – 100 µm u eGFP kontroly a 50 µm u pMDC32:GFP-LeB4. Modrozelená farba zobrazuje signál GFP hlavne v cytoplazme a jadre a červená farba zobrazuje autofluorescenciu chloroplastov.

Výsledok preukázal expresiu zeleného fluorescenčného signálu kontrolnej eGFP sekvencie hlavne v jadre a v cytoplazme, kde boli viditeľné aj charakteristické cytoplazmatické vlákna. V prípade sekvencie GFP-LeB4 bol zelený fluorescenčný signál zaznamenaný na rovnakých miestach ako u pozitívnej kontroly, z dôvodu veľmi malej veľkosti samotného GFP proteínu, ktorý je schopný prejsť aj veľmi malými bunkovými pórami a tak sa dostane ľahko napríklad aj do jadra. V prípade sekvencie GFP-LeB4 boli však zaznamenané taktiež guľovité útvary, ktoré boli pozorované v cytosole mezofylovaých buniek (v Obr. 20 označené červenou šípkou), ktoré by mohli značiť prítomnosť GFP proteínu v niektorých typoch štruktúr endoplazmatického retikula (ER), čím by mohli potvrdiť funkčnosť tejto signálnej sekvencie. LeB4 sekvencia by teda čiastočne zaciľovala GFP proteín do ER, ktoré by však následne posielalo proteín vo forme vačkov do iných častí bunky.



Obr. 19 Fotky z konfokálneho mikroskopu zobrazujúce tranzientnú expresiu konštruktu eGFP ako pozitívnej kontroly a GFP-LeB4 v 7 týždňov starých listoch tabaku, vyhodnotených 4 dni po ich infiltrácii. Mierka – 50 μm u eGFP kontroly aj GFP-LeB4. Zelená farba zobrazuje signál GFP hlavne v cytoplazme a jadre a červená farba zobrazuje autofluorescenciu chloroplastov.



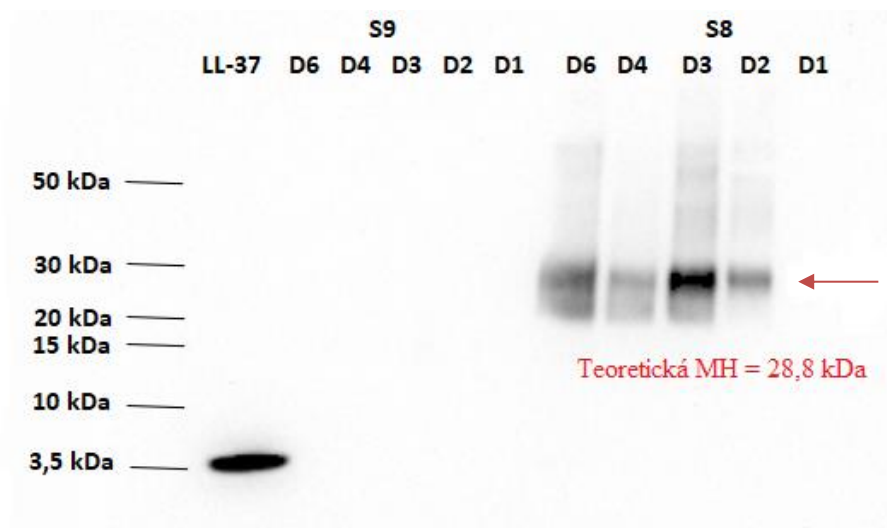
Obr. 20 Fotky z konfokálneho mikroskopu zobrazujúce porovnanie zacielenia GFP proteínu v bunkách tabaku pomocou signálnej sekvencie LeB4 a zacielenie kontroly eGFP bez signálnej sekvencie v 7 týždňov starých listoch tabaku, vyhodnotených 4 dni po ich infiltrácii. Mierka – 10 μm u eGFP kontroly aj GFP-LeB4. Šípka poukazuje na guľovité útvary, ktoré by mohli dokazovať prítomnosť GFP proteínu vo vačkoch odvođených od endoplazmatického retikula. Zelená farba zobrazuje signál GFP hlavne v cytoplazme a jadre a červená farba zobrazuje autofluorescenciu chloroplastov.

4.4 Transformácia listov tabaku konštruktom LL-37 S8 a optimalizácia základných purifikačných krokov

V rámci bakalárskej práce bol pripravený konštrukty obsahujúce kazety LL-37 S8 a LL-37 v expresnom vektore pMDC32 (ďalej pMDC32:LL-37 S8 a pMDC32:LL-37 S9) pod kontrolou CAMV 35S konštitutívneho promotóra. U oboch konštruktov bola zaznamenaná expresia vďaka metóde Western blot, avšak pMDC32:LL-37 S9 vykazoval veľmi nízku úroveň expresie, keďže zachytený signál bol viditeľný až po niekoľkých

minútach detekcie a zároveň bola veľkosť konštruktú menšia ako očakávaná čo značilo jeho pravdepodobnú čiastočnú degradáciu. Expresia konštruktú pMDC32:LL-37 S8 bola však v listoch tabaku veľmi vysoká, keďže signál bol zachytený už po 10 sekundách detekcie a veľkosť produktu presne odpovedala navrhnutému konštruktú. Z toho dôvodu sme sa rozhodli pokračovať detailným testovaním konštruktú pMDC32:LL-37 S8 v rámci diplomovej práce a optimalizovať základné purifikačné kroky, ktoré by následne mohli byť použité aj pri veľkoformátovej produkcii v jačmeni, k čomu budú slúžiť konštruktú vo vektore pBract209.

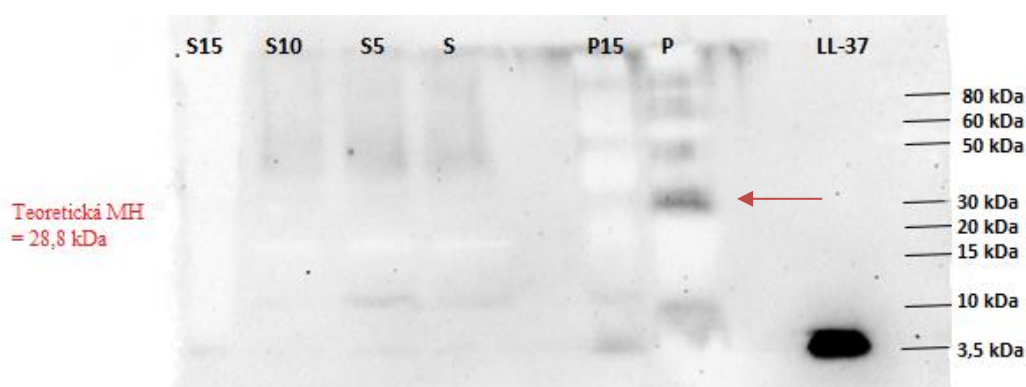
Prvým krokom bola expresia v 7 týždňov starých listoch tabaku, ktoré boli transformované baktériou *A.tumefaciens* obsahujúcou konštruktú pMDC32:LL-37 S8 a pMDC32:LL-37 S9 (viz. kapitola 3.2.2). Transformovaných bolo vždy 5 rastlín pre každú stratégiu z toho dôvodu, že bol najprv uskutočnený 5 dňový zber, pre vyhodnotenie dňa s najvyššou expresiou každého z konštruktú. Listy boli následne zozbierané pre analýzu pomocou metódy Western blot v 1,2,3,4 a 6 deň – rastlinný materiál zmrazený na -80°C bol postupne podľa potreby vybratý, rozdrvený na prášok v prítomnosti tekutého dusíka a 200 mg takto zhomogenizovaných listov bolo zmiešaných s 200 μ l 2xSDS pufri. Zmes bola inkubovaná na ľade po dobu 20 minút a nasledovala 2x centrifugácia pri 13000 g po dobu 5 minút. Supernatant bol potom povarený na 95°C po dobu 10 minút a na gél bolo nanosených do každej jamky 15 μ l extraktu LL-37 S9 a 1,5 μ l LL-37 S8 nariadených do 15 μ l v 1x SDS pufri. Okrem toho bol na gél nanosený čistý syntetický LL-37 ako pozitívna kontrola s koncentráciou 7 ng v objeme 7,5 μ l nariadených do 15 μ l 2x SDS pufrom. Na detekciu bola použitá myšacia monoklonálna protilátka proti LL-37 nariadená 1:400. Výsledkom bolo jednoznačné určenie dňa s najväčšou expresiou u pMDC32:LL-37 S8 (teoretická veľkosť fúzneho proteínu 28,8 kDa), kde najsilnejší signál bol zachytený v 3 deň po infiltrácii listov tabaku (Obr. 21), zatiaľ čo u pMDC32:LL-37 S9 (teoretická veľkosť fúzneho proteínu 19,4 kDa) nebol zachytený žiaden signál odpovedajúci rekombinantnému produktu ani po niekoľkých minútach expozície. Z toho dôvodu sme sa rozhodli pokračovať v purifikačných krokoch výlučne s konštruktú pMDC32:LL-37 S8. Po overení dňa s najvyššou expresiou bolo do listov 20tich rastlín tabaku infiltrovaná *A.tumefaciens* obsahujúca pMDC32:LL-37 S8 (viz. kapitola 3.2.2). Listy boli 3 dni po infiltrácii zozbierané a zamrazené v tekutom dusíku na -80°C pre ďalšiu analýzu.



Obr. 21 Výsledok z Western blot analýzy zobrazujúci tranzientnú expresiu konštruktov pMDC32:LL-37 S8 a pMDC32:LL-37 S9 v listoch tabaku po 1,2,3,4, a 6 dňoch od infiltrácie – fotka po 48s expozícii s použitím myšacej monoklonálnej protilátky, riedenie 1:400. Marker - Novex Sharp Pre-stained Protein Standard. S8 D1-D6: vzorky obsahujúce proteínový extrakt z tabakových listov infiltrovaných konštruktom PMK-RQ:LL-37 S8 vo vektore pMDC32, zozbieraných po 1,2,3,4 a 6 dňoch (D1-D6), s použitím 1,5 μ l proteínového extraktu. S9 D1-D6: vzorky obsahujúce proteínový extrakt z tabakových listov infiltrovaných konštruktom PMK-RQ:LL-37 S9 vo vektore pMDC32, zozbieraných po 1,2,3,4 a 6 dňoch (D1-D6), s použitím 15 μ l proteínového extraktu. LL-37 – syntetický katelicidín o koncentrácii 7 ng v celkovom objeme 15 μ l. Červená šípka označuje veľkostne správne bandy, ktoré odpovedajú konštruktu LL-37 S8.

Ďalším krokom bola extrakcia rekombinantného proteínu pomocou jednoduchého extrakčného pufru (Tris-HCl, NaCl, Triton-X a PMFS). Extrakcia a následné zrážanie supernatantov vysokou teplotou 95°C prebiehalo ako je to popísané v kapitole 3.2.7 (postup č.1). Samotné zrážanie supernatantu vysokou teplotou (95°C) po dobu 5/10/15 minút bolo uskutočnené z dôvodu otestovania purifikačného kroku využívajúceho značku peptidového surfaktantu DAMP4 obsiahnutú v konštrukte s kazetou LL-37 S8, ktorej úlohou je schopnosť udržať rekombinantný proteín v roztoku aj v prítomnosti vysokých teplôt, zatiaľ čo u ostatných proteínov by použitie tak vysokej teploty malo spôsobiť ich denaturáciu a následné vyzrážanie. Po extrakcii a zrážaní boli pripravené vzorky peletov (pred zrážaním a po zrážaní po dobu 15 minút pri 95°C) zmiešaním 5 μ l už pripraveného extraktu v 2x SDS pufru s 5 μ l 1x SDS pufru (celkový objem 10 μ l). Supernatant pred zrážaním bol pripravený zmiešaním 6,9 μ l extraktu (odpovedá koncentrácii 20 μ g celkového proteínu zmeraného metódou Bradford) s 6,9 μ l 2x SDS pufru. Supernatanty po povarení obsahovali veľmi nízku koncentráciu proteínov (všetky okolo 0,5 mg/ml celkového proteínu), takže bolo na gél nanesených 20 μ l spolu s 10 μ l 4x SDS pufru. Okrem toho bol na gél nanesený čistý syntetický katelicidín LL-37 o koncentrácii 7 ng (7,5 μ l LL-37 nariedeného vo vode spolu s 7,5 μ l 2x SDS pufru). Takto pripravené vzorky

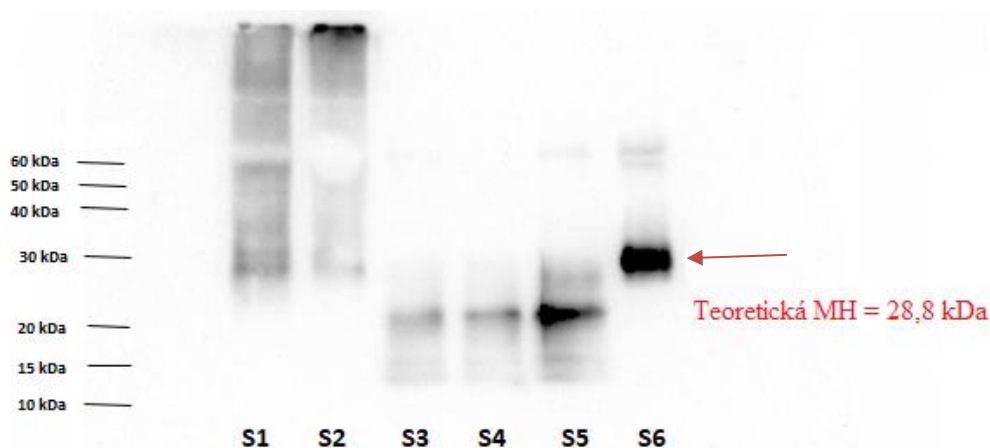
boli povarené v SDS pufri po dobu 10 minút na 95°C a nanosené na gél. Výsledok poukázal na veľmi slabú extrakciu rekombinantného fúzneho proteínu o očakávanej veľkosti 28,8kDa (Obr. 22), kde najvyššia koncentrácia bola prítomná v nerozpustnej frakcii (v pelete) pred teplotným zrážaním supernatantov (Obr. 22 línia P). V prípade supernatantov (po extrakcii, po 5 a 10 minútach zrážania) boli zaznamenané veľmi slabé signály a veľkosť proteínu neodpovedala, čo značí že proteín bol degradovaný (Obr. 22 línia S, S5, S10). Približne rovnako ako u supernatantov vyzeral výsledok aj v pelete po 15 minútovom teplotnom zrážaní (Obr. 22 línia P15). V prípade supernatantu po 15 minútovom teplotnom zrážaní nebol detekovaný žiaden signál (Obr.22 línia S15).



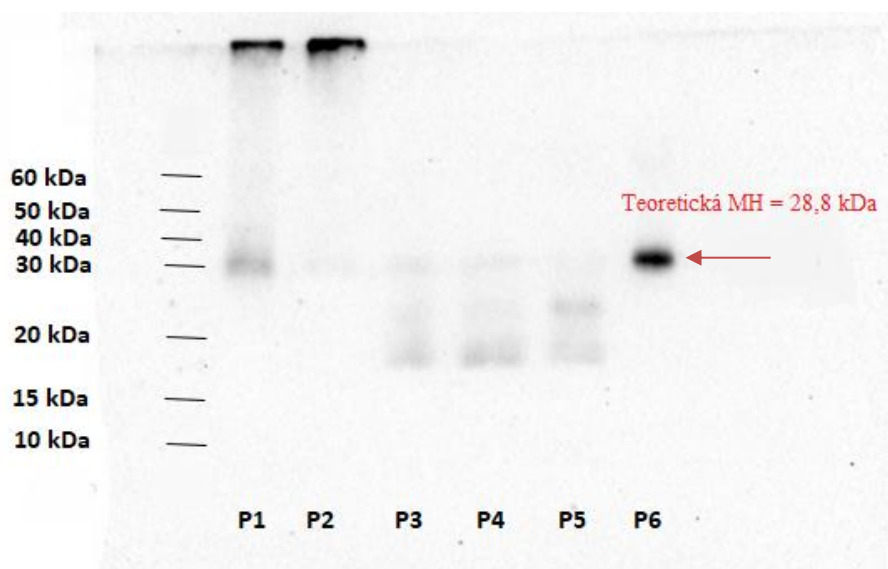
Obr. 22 Výsledok z Western blot analýzy zobrazujúci extrakciu a purifikáciu (teplotným zrážaním) LL-37 S8 z listov tabaku 3 dni po ich infiltrácii - fotka po 514s expozícii s použitím myšacej monoklonálnej protilátky, riedenie 1:400. Marker - Novex Sharp Pre-stained Protein Standard. P- pelet po extrakcii, P15- pelet po 15 minútovom zrážaní extrahovaného supernatantu teplotou 95°C, S- supernatant po extrakcii, S5- supernatant po 5 minútovom zrážaní teplotou 95°C, S10- supernatant po 10 minútovom zrážaní teplotou 95°C, S15- supernatant po 15 minútovom zrážaní teplotou 95°C. LL-37 – syntetický katelicidín o koncentrácii 7 ng v celkovom objeme 15 μ l. Červená šípka označuje veľkostne správne bandy, ktoré odpovedajú konštruktu LL-37 S8.

Na základe tohto negatívneho výsledku bolo navrhnutých 5 nových extrakčných pufrov (viz. tab. 12), ktoré obsahovali redukčné činidlá ako 2-merkaptóetanol alebo DTT a taktiež bol testovaný vplyv zásaditého pH. Tieto extrakčné pufre boli navrhnuté z dôvodu prítomnosti zapuzdrovacieho polyméru γ -zeinu vo fúznom proteíne, čo mohlo spôsobiť jeho veľmi zlú extrakciu do prvotne zvoleného extrakčného pufru. Druhá extrakcia prebiehala podľa postupu č.2 podrobne popísaného v kapitole 3.2.7. Vzorky peletov pre SDS-PAGE boli pripravené zmiešaním 5 μ l už pripraveného extraktu v 2x SDS pufri s 5 μ l 1x SDS pufru (celkový objem 10 μ l). Vzorky supernatantov boli pripravené zmiešaním 15 μ l proteínového extraktu s 15 μ l 2x SDS pufru. Takto pripravené vzorky boli povarené na 95°C po dobu 10 minút a nanosené na gél. Výsledok ukázal úspešnú extrakciu rekombinantného proteínu hlavne do supernatantov, kde bol

zachytený silný signál (Obr. 23), zatiaľ čo v peletoch bol detekovaný iba veľmi slabý signál (okrem peletu získaného extrakciou v pufrí č.6, viz. tabuľka 12) (Obr. 24). Hoci extrakcia do supernatantov novými extrakčnými puframi bola úspešná, najsilnejší signál bol zachytený v pufrí č.3 a č.6 (viz. Tab. 12).



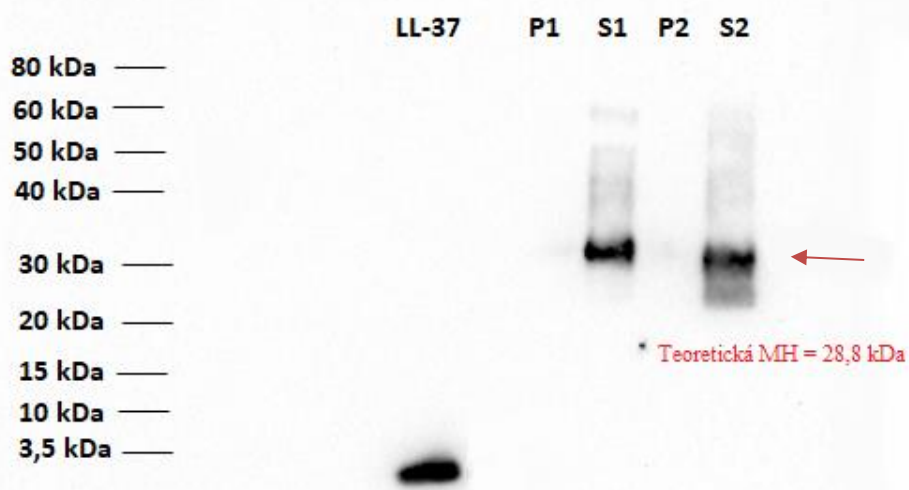
Obr. 23 Výsledok z Western blot analýzy zobrazujúci extrakciu LL-37 S8 z listov tabaku 6 rôznymi puframi (viz. tabuľka 12) 3 dni po ich infiltrácii - fotka po 43s expozícii s použitím myšacej monoklonálnej protilátky, riedenie 1:400. Marker - PageRuler™ Unstained Protein Ladder. S1- supernatant získaný extrakciou v pufrí č.5, S2- supernatant získaný extrakciou v pufrí č.4, S3- supernatant získaný extrakciou v pufrí č.1, S4- supernatant získaný extrakciou v pufrí č. 2, S5- supernatant získaný extrakciou v pufrí č.3, S6- supernatant získaný extrakciou v pufrí č.6. Červená šípka označuje veľkostne správne bandy, ktoré odpovedajú konštruktu LL-37 S8.



Obr. 24 Výsledok z Western blot analýzy zobrazujúci extrakciu LL-37 S8 z listov tabaku 6 rôznymi puframi (viz. tabuľka 12) 3 dni po ich infiltrácii - fotka po 100s expozícii s použitím myšacej monoklonálnej protilátky, riedenie 1:400. Marker - PageRuler™ Unstained Protein Ladder. P1- pelet získaný extrakciou v pufrí č.5, P2- pelet získaný extrakciou v pufrí č.4, P3- pelet získaný extrakciou v pufrí č.1, P4- pelet získaný extrakciou v pufrí č. 2, P5- pelet získaný extrakciou v pufrí č.3, P6- pelet získaný extrakciou v pufrí č.6. Červená šípka označuje veľkostne správne bandy, ktoré odpovedajú konštruktu LL-37 S8.

V ostatných pufroch bol zachytený nielen slabší signál, no fragment o očakávanej veľkosti 28,8 kDa bol výrazný len v pufri č.6 (Obr. 23 línia S6). V ostatných pufroch dochádzalo buď k čiastočnej degradácii fúzneho proteínu (Obr.23 línia S3, S4, S5) alebo v prípade pufrov obsahujúcich DTT k agregácii proteínov (Obr. 23 línia S1 a S2). Na základe tohto výsledku boli pre ďalšie purifikačné kroky použité len pufre č.3 a č.6.

Pre overenie výsledku a následné stanovenie približnej koncentrácie LL-37 S8 v získanom extrakte detekovaného metódou Western blot bola extrakcia fúzneho proteínu z listov tabaku uskutočnená ešte raz, avšak len za použitia pufrov č.3 a č.6, ktoré vykazovali najväčší signál rekombinantného produktu. Postup extrakcie bol rovnaký ako to bolo zmienené vyššie (viz. kapitola 3.2.7, postup č.2) s rozdielom použitia iba dvoch zmienených pufrov. Vzorky peletu na gél boli pripravené zmiešaním 5 μ l už pripraveného extraktu v 2x SDS s 5 μ l 1x SDS pufri (celkový objem 10 μ l). Vzorky supernatantu boli pripravené zmiešaním 5 μ l proteínového extraktu s 5 μ l 2x SDS pufri. Takto pripravené vzorky boli povarené na 95°C po dobu 10 minút a nanosené na gél. Výsledok potvrdil úspešnosť extrakcie do supernatantu v pufri č.3 aj č.6 (Obr. 25), zatiaľ čo prítomnosť rekombinantného proteínu v pelete bola zaznamenaná len veľmi slabým signálom a až po niekoľkých minútach expozície.



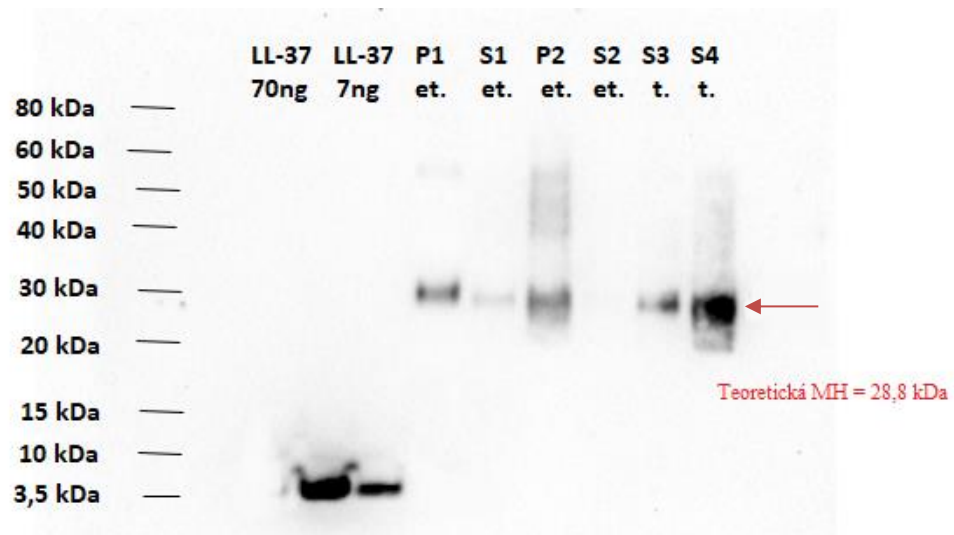
Obr. 25 Výsledok z Western blot analýzy zobrazujúci extrakciu LL-37 S8 z listov tabaku pufriami č.3 a č.6 (viz. tabuľka 12) 3 dni po ich infiltrácii - fotka po 50s expozícii s použitím myšacej monoklonálnej protilátky, riedenie 1:400. Marker - Novex Sharp Pre-stained Protein Standard. P1- pelet získaný extrakciou listov v pufri č.6, S1- supernatant získaný extrakciou listov v pufri č.6, P2- pelet získaný extrakciou listov v pufri č.3, S2- supernatant získaný extrakciou listov v pufri č. 3. LL-37 – syntetický katelicidín o koncentrácii 70 ng v celkovom objeme 15 μ l. Červená šípka označuje veľkostne správne bandy, ktoré odpovedajú konštruktu LL-37 S8.

Zároveň opakovanie extrakcie v týchto pufroch ukázalo, že v pufri č.6 zostáva veľkosť fúzneho proteínu zachovaná, zatiaľ čo v pufri č.3 dochádza k jeho čiastočnej (Obr. 25) alebo úplnej (Obr. 23) degradácii. Koncentrácia fúzneho proteínu zaznamenaná na géle a vyhodnotená pomocou softwaru Image Lab 6.1 je spracovaná v Tab. 13.

Tab. 13 Relatívna koncentrácia extrahovaných supernatantov v pufri č.3 a č.6 a peletov so supernatantami, po ich zrážaní etanolom, alebo vysokou teplotou.

Vzorka	Koncentrácia $\mu\text{g/ml}$
<i>Supernatant, extrakcia v pufri č.6</i>	10,22
<i>Supernatant, extrakcia v pufri č.3</i>	7,14
<i>Pelet, zrážanie etanolom, pufor č.6</i>	3,92
<i>Supernatant, zrážanie etanolom, pufor č.6</i>	0,70
<i>Pelet, zrážanie etanolom, pufor č.3</i>	5,74
<i>Supernatant, zrážanie etanolom, pufor č.3</i>	0,00
<i>Supernatant, zrážanie teplom, pufor č.6</i>	4,06
<i>Supernatant, zrážanie teplom, pufor č.3</i>	13,86

Posledným uskutočneným krokom bola purifikácia fúzneho proteínu z extraktov obsahujúcich pufre č.3 a č.6 pomocou teplotného zrážania (využívajúc značku DAMP4) a zrážania etanolom (využívajúc zapuzdrovací polymér γ -zein). Presný postup je popísaný v kapitole 3.2.7 (postup č.2). Výsledkom bolo zistenie, že v prípade zrážania s použitím vysokej teploty ostáva najvyššia koncentrácia LL-37 S8 v supernatante získaného extrakciou pufrom č.3, zatiaľ čo u pufri č.6 došlo k zníženiu signálu, ktorý už nebol tak výrazný (Obr. 26). U vzoriek po zrážaní etanolom bolo zistené, že fúzny proteín ostáva hlavne v pelete a v supernatante už nevykazuje skoro žiaden signál. Z toho vyplýva, že najlepším extrakčným pufrom pri použití konštruktu pMDC32:LL-37 S8 v tabakových listoch je jednoznačne pufor č.6 u ktorého nedochádza k žiadnej degradácii fúzneho proteínu, no pri purifikácii sa lepšie ukázal pufor č.3, ktorý po teplotnom zrážaní zachoval veľkosť proteínu a taktiež došlo k zvýšeniu signálu a teda zakoncentrovaniu rekombinantného proteínu. Koncentrácia purifikovaného fúzneho proteínu zaznamenaná na géle a vyhodnotená pomocou softwaru Image Lab 6.1 je spracovaná v Tab. 13.



Obr. 26 Výsledok z Western blot analýzy zobrazujúci purifikáciu (teplotným zrážaním a zrážaním etanolom) LL-37 S8 z listov tabaku 3 dni po ich infiltrácii - fotka po 90s expozícii s použitím myšacej monoklonálnej protilátky, riedenie 1:400. Marker - Novex Sharp Pre-stained Protein Standard. P1 et.- pelet po zrážaní supernatantu v pufri č.6 etanolom, S1 et.- supernatant v pufri č.6 po zrážaní etanolom, P2 et.- pelet po zrážaní supernatantu v pufri č.3 etanolom, S2 et.- supernatant v pufri č.3 po zrážaní etanolom, S3 t.- supernatant v pufri č.6 po 10 minútovom zrážaní teplotou 95°C, S4 t.- supernatant v pufri č.3 po 10 minútovom zrážaní teplotou 95°C. LL-37 70 ng – syntetický katelicidín o koncentrácii 70ng v celkovom objeme 15 μ l. LL-37 7 ng – syntetický katelicidín o koncentrácii 7 ng v celkovom objeme 15 μ l. Červená šípka označuje veľkostne správne bandy, ktoré odpovedajú konštruktu LL-37 S8.

5 Diskusia

Navrhnutými experimentálnymi cieľmi diplomovej práce bolo klonovanie konštruktov pre expresiu ľudského katelicidínu LL-37 v tabaku a jačmeni, testovanie týchto konštruktov a následne transformácia jačmenných embryí. Ďalším cieľom bolo testovanie signálnych sekvencií použitých v katelicidinových konštruktoch pomocou fúzie s GFP proteínom a lokalizácia v rastlinách tabaku a jačmeňa. Hlavným cieľom bolo testovanie pripravených konštruktov pomocou tranzientnej expresie v listoch tabaku a následná optimalizácia purifikačnej stratégie rekombinantného produktu spojená s testovaním antimikrobiálnej aktivity.

Čo sa týka klonovania konštruktov pre expresiu v tabaku, tá bola uskutočnená už v rámci bakalárskej práce a v diplomovej práci sme na ňu nadviazali (vďaka overenej funkčnosti v listoch tabaku) tým, že sa nám podarilo vklonovať oba konštrukty LL-37 S8 aj LL-37 S9 do expresného vektora pBract209 pod kontrolou B-hordeínového promotóra, ktorý je vhodný práve pre expresiu v endosperme jačmeňa (Knudsen a Müller 1991; Sorensen *et al.* 1996). Z časových dôvodov sme bohužiaľ nemali možnosť postúpiť až do fázy transformácií jačmenných embryí. Prvým problémom bola rovnaká rezistencia na kanamycin u oboch používaných vektorov (pENTR1A_Hana, pBract209) s pôvodným pMK-RQ, v ktorom boli dodané obidve inzerčné kazety (LL-37 S8 alebo LL-37 S9). Tento problém bol riešený naštiepením génu kanamycinovej rezistencie restriktívnymi endonukleázami – pre klonovanie do vektora pENTR1A_Hana to bol enzým BglII a pre klonovanie do vektora pBract209 enzým PvuI. V prípade klonovania do vektora pENTR1A_Hana ani tento krok nepomohol a hoci už nedochádzalo k opätovnej ligácii pôvodného vektora samého do seba a nenarastal na platni s kanamycinom, stále nevznikali kolónie, ktoré by vo vektore pENTR1A_Hana obsahovali náš inzert. Problémom boli nakoniec samotné restriktívne miesta vo vstupnom vektore pENTR1A_Hana, ktoré sa nachádzali veľmi blízko pri sebe (12bp) a teda pri jeho štiepení enzýmami BamHI a XhoI, ktoré prebiehalo oboma enzýmami naraz v jednej reakcii, pravdepodobne jeden enzým zabránil svojou veľkosťou nasadnúť druhému enzýmu a nedochádzalo k úplnému naštiepeniu. Problémom pri overení tohto naštiepenia a dôvodom prečo sme neobjavili tento problém skôr bola práve príliš malá veľkosť vyštiepenej časti vektora na géle, ktorú nebolo možné gélovou elektroforézou zachytiť. Preto sme tento problém vyriešili postupným štiepením vstupného vektora, aby došlo k jeho úplnému naštiepeniu a taktiež sme vektor pMK-RQ (obsahujúci LL-37 S8 alebo

S9) namiesto štiepenia s enzýmom BgiIII (v mieste rezistencie na kanamycin) amplifikovali pomocou PCR so špecifickými primermi, čím sme sa zbavili kostry vektora (ktorá obsahovala kanamycinovú rezistenciu) a následne už len naštiepili vzniknutý amplicón a mohli nastaviť ligáciu, ktorá bola po týchto krokoch úspešná. Finálnym krokom klonovania oboch katelicidinových konštruktov potom bola LR rekombinantná reakcia, kedy sa bez ďalších komplikácií podarilo obe kazety preniesť do jačmenného expresného vektora pBract209. Samotná transformácia jačmenných embryí a odvodenie transgénnych rastlín je časovo veľmi náročné (1-2 roky) a bude záležitosťou ďalšieho výskumu.

Pri testovaní signálnych sekvencií použitých v katelicidinových konštruktoch pomocou fúzie s GFP proteínom a ich lokalizácia v rastlinách tabaku a jačmeňa bola otestovaná funkčnosť konštruktov a jeho lokalizácia iba v rastlinách tabaku (v jačmeni neexistuje funkčný tranzientný expresný systém), v ktorom bolo odhalených niekoľko nedostatkov navrhnutého konštruktov, ktoré bude potrebné pred budúcim testovaním v jačmeni optimalizovať. Hoci sa nám podarilo úspešne potvrdiť funkčnosť konštruktov obsahujúceho signálny peptid legumín B4 vo fúzii s GFP pomocou fluorescenčnej a konfokálnej mikroskopie, samotná lokalizácia neposkytla jednoznačné výsledky. Prvým problémom bola veľkosť fúzneho proteínu. Vzhľadom na veľmi malú veľkosť GFP proteínu bol signál zaznamenaný v rôznych častiach bunky (jadro, cytoplazma), keďže tento proteín je schopný preniknúť aj veľmi malými bunkovými pórami. Preto by pre ďalšie testovanie bolo vhodné nepoužívať iba čistý GFP proteín so signálnou sekvenciou, ale použiť nejakú fúznú značku, ktorá by spôsobila nárast veľkosti rekombinantného proteínu a nebol by možný jeho prienik do rôznych bunkových organel. Ďalšou vecou na ktorú sme narazili, bola detekcia GFP-LeB4 v guľovitých útvaroch uprostred bunky, ktoré by mohli značiť čiastočnú lokalizáciu na štruktúrach ER. Ukazuje sa, že použitie tejto signálnej sekvencie je vhodné kombinovať vo fúznom proteíne taktiež so sekvenciou HDEL, ktorá je taktiež súčasťou katelicidinových konštruktov a ktorá by spätne vychytávala GFP do endoplazmatického retikula a teda by sme mohli zachytiť aj silnejší signál práve v tejto organeli (Sparkes *et al.*, 2006). Kombinovaným použitím týchto prístupov by šlo dosiahnuť jednoznačnej odpovede na otázku funkčnosti použitého signálneho peptidu v konštrukte pMK-RQ:LL-37 S9.

Na záver bolo uskutočnené testovanie pripravených konštruktov pomocou tranzientnej expresie v listoch tabaku a následná optimalizácia purifikačnej stratégie rekombinantného produktu. Purifikácia prebiehala len s pMDC32:LL-37 S8 z toho dôvodu, že vykazovala veľmi vysoký stupeň expresie (silný signál za veľmi krátky čas expozície aj pri veľmi malom množstve). Expresia sa ukázala byť najsilnejšia 3 dni po infiltrácii a teda sme pracovali s týmito vzorkami. V rámci purifikácie bolo najprv potrebné nájsť vhodný extrakčný pufo. Bežný 100 mM Tris-HCl sa prejavil ako nevhodný, keďže nielenže samotná extrakcia bola dosť neúčinná, no konštrukt ostával hlavne v pelete. Preto boli navrhnuté nové extrakčné pufre, ktoré boli odvodené od pufrov už skôr publikovaných v literatúre, zaoberajúcich sa extrakciou zapuzdrovacieho polyméru γ -zeinu (Landry a Moureaux 1970, Wallace *et al.*, 1989). Ako najvhodnejším sa jednoznačne prejavil pufo použitý v (Wallace *et al.*, 1989), ktorý obsahoval 12,5mM borát sodný pH 10, 1%SDS a 2% 2-merkaptóetanol. Zaujímavé bolo to, že v prípade použitia úplne rovnakého pufru, ktorý bol akurát inak nariadený vzhľadom na hmotnosť listov (1:3 alebo 1:10), pri použití menšieho objemu a teda nariadeniu len 1:3 dochádzalo k čiastočnej alebo úplnej degradácii fúzneho proteínu, ktorého veľkosť potom na géle už úplne neodpovedala. V prípade použitia väčšieho objemu a teda nariadenia 1:10 tento problém nenastal ani pri opakovanom testovaní tohto javu. Optimalizáciou podmienok extrakcie sa zvlášť pre tento konštrukt javí ako kritická a bude nutné ju precízne optimalizovať pre každý expresný systém.

Pri samotnej purifikácii bolo však zaujímavé zistenie to, že hoci zrážanie etanolom, ktoré sa bežne používa ako purifikačný krok pre proteíny vo fúzii s γ -zeinom alebo samotný γ -zein, by malo fúzny proteín prečistiť od ostatných proteínov vo vzorke tým, že ho udrží v supernatante a ostatné vyzráža (Esen, 1986) . V našom prípade dochádzalo skôr k tomu, že bol detekovaný hlavne v pelete a supernatant vykazoval iba veľmi slabý signál. Namiesto toho sa prejavila značka DAMP4, ktorá konštrukt udržala ako v supernatante, tak sila signálu sa výrazne nemenila, takže nedochádzalo k významným stratám. V purifikácii sa teda prejavila aktivita oboch fúznych purifikačných značiek DAMP4 aj γ -zein. Tieto informácie boli potvrdené zmeranou koncentráciou pomocou softwaru Image Lab 6.1, ktorá jednoznačne dokázala, že supernatant získaný extrakciou v pufri č.6 obsahoval vyššiu koncentráciu fúzneho proteínu (10,22 μ g/ml) ako supernatant získaný extrakciou v pufri č.3 (7,14 μ g/ml). Vďaka Tab. 13 môžeme tiež vidieť, že väčšina fúzneho proteínu, ktorého prítomnosť bola očakávaná po zrážaní

v etanole hlavne v supernatante, sa nachádzala v pelete (koncentrácia fúzneho proteínu v pelete po extrakcii v pufri č.6 s následným zrážaním etanolom bola 3,92 $\mu\text{g/ml}$ a v pufri č.3 5,74 $\mu\text{g/ml}$) a samotné supernatanty obsahovali nulové alebo skoro nulové koncentrácie. Poslednou takto potvrdenou informáciou bola účinnosť peptidového surfaktantu DAMP4, ktorý dokázal udržať fúzny proteín v supernatante aj po zrážaní za vysokej teploty (95°C) čo môžeme vidieť aj na koncentrácii supernatantu získaného extrakciou v pufri č.3, kde došlo k zakoncentrovaniu fúzneho proteínu (13,86 $\mu\text{g/ml}$). V prípade supernatantu získaného extrakciou v pufri č.6 po teplotnom zrážaní bola koncentrácia fúzneho proteínu len 4,06 $\mu\text{g/ml}$. Tým bolo dokázané, že extrakcia v pufri č.6 je síce v prvom kroku úspešnejšia, no po prvom purifikačnom kroku teplotným zrážaním sa lepšie javí extrakcia v pufri č.3, kde dochádza k zakoncentrovaniu proteínov. Ďalšími krokmi v budúcom výskume bude odštiepenie fúznych značiek pomocou enterokinázy a faktoru Xa a následne bude podľa získanej čistoty proteín finálne purifikovaný pomocou HPLC.

Vzhľadom na to, že zatiaľ nebola publikovaná žiadna práca, ktorá by obsahovala vo fúzii s rekombinantným proteínom purifikačnú značku DAMP4 a zapuzdrovací polymér γ -zein, by celková optimalizácia purifikačných krokov mohla byť zaujímavá pre ďalší výskum, keďže γ -zein je schopný rekombinantný proteín ochrániť pred denaturačnými podmienkami a DAMP4 poskytuje jednoduchý purifikačný krok, ktorý zahŕňa teplotné zrážania (95°C) a následnú centrifugáciu.

6 Záver

V teoretickej časti tejto diplomovej práce bola rozobraná problematika antimikrobiálnych peptidov, ich diverzita, mechanizmus účinku a na záver ich účinnosť proti baktériám s vyvinutou rezistenciou. Ďalšia časť bola zameraná na katelicidíny, ktoré taktiež patria do rodiny antimikrobiálnych peptidov, na ich diverzitu a nakoniec na samotný ľudský katelicidín LL-37, ktorý bol súčasťou aj oboch stratégií použitých v tejto práci (PMK-RQ:LL-37 S8 a PMK-RQ:LL-37 S9). V ďalšej kapitole boli spracované informácie o jačmeni ako produkčnej platforme so zameraním na jeho endosperm a zásobné organely, kam by malo dochádzať k akumulácii nami navrhnutých dvoch stratégií, v prípade transformácie jačmenných embryí. Posledná kapitola popisuje produkciu rekombinantných proteínov v rastlinných systémoch a to hlavne na báze semien a listov s následným postupom purifikácie, či už s použitím purifikačných značiek alebo nechromatografických metód.

V experimentálnej časti som sa zaoberala klonovaním dvoch navrhnutých stratégií (PMK-RQ:LL-37 S8 a PMK-RQ:LL-37 S9) najprv do vstupného vektora pENTR1A_Hana pod kontrolou B-hordeínového promotóra a následne do expresného vektora pBract209, ktorý je vhodný na stabilnú transformáciu jačmenných embryí. Ďalšia časť bola zameraná na transformáciu baktérie *A.tumefaciens* konštruktom GFP-LeB4 v expresnom vektore pMDC32, ktorou boli infiltrované listy tabaku, po 3 dňoch bola expresia vyhodnotená pomocou fluorescenčného mikroskopu a po 4 dňoch pomocou konfokálneho mikroskopu, kde bola zároveň vyhodnotená funkčnosť signálneho peptidu legumínu B4 (vo fúzii s GFP), ktorý má zacielať rekombinantné proteíny do endoplazmatického retikula. Posledná časť bola zameraná na transformáciu listov tabaku baktériou *A.tumefaciens*, do ktorej bol predtým zatransformovaný expresný vektor pMDC32 s inzertom LL-37 S8 alebo LL-37 S9. Z listov tabaku bol nakoniec fúzny proteín LL-37 S8 extrahovaný do rôznych pufrov z dôvodu optimalizácie extrakčných podmienok a purifikovaný využitím zrážania za vysokej teploty (95°C), čo bolo možné vďaka fúznej značke DAMP4 alebo pomocou zrážania s etanolom, vďaka fúznej značke γ -zein, ktorá je schopná udržať fúzny proteín v supernatante.

7 Literatúra

- Adkins Y.B., Lönnerdal B. (2004): Proteins and peptides. In: *Biotechnology for performance foods, functional foods, and nutraceuticals*. (Neeser J.R., German B.J., eds.), Marcel Dekker, Inc, New York, NY, 167–96.
- Agerberth B., Charo J., Werr J., Olsson B., Idali F., et al. (2000): The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* **96**, 3086–3093.
- Anderson R.C., Hancock R.E., Yu P.L. (2004): Antimicrobial activity and bacterial membrane interaction of ovine-derived cathelicidins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 673–676.
- Arntzen C., Plotkin S., Dodet B., (2005): Plant-derived vaccines and antibodies: potential and limitations. *Vaccine* **23**, 1753–6.
- Bagella L., Scocchi M., Zanetti M. (1995): cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins. *FEBS Letters* **376**, 225–228.
- Bals R., Lang C., Weiner D.J., Vogelmeier C., Welsch U., Wilson J.M. (2001): Rhesus monkey (*Macaca mulatta*) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules. *Clinical and Vaccine Immunology* **8**, 370–375.
- Barros G.O.F., Woodard S.L., Nikolov Z.L. (2011): Phenolics removal from transgenic *Lemna minor* extracts expressing mAb and impact on mAb production cost. *Biotechnology Progress* **27**, 410–8.
- Basaran P., Rodriguez-Cerezo E. (2008): Plant molecular farming: opportunities and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology* **28**, 153–72.
- Bassham D.C., Raikhel N.V. (2000): Unique features of the plant vacuolar sorting machinery. *Current Opinion in Cell Biology* **12**(4), 491–495.
- Bechtel D.B., Pomeranz Y. (1978): Ultrastructure of mature ungerminated rice (*Oryza sativa*) caryopsis–starchy endosperm. *American Journal of Botany* **65**, 684–691.
- Bendandi M., Marillonnet S., Kandzia R., Thieme F., Nickstadt A., Herz S., et al. (2010): Rapid, highyield production in plants of individualized idiotypic vaccines for non Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology* **21**, 2420–7.
- Bierbaum G., Sahl H.-G. (1985): Induction of autolysis of Staphylococci by the basic peptide antibiotics pep5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes. *Archives of Microbiology* **141**, 249–254.
- Boman H. G. (2000): Innate immunity and the normal microflora. *Immunological Reviews* **173**, 5–16.
- Boothe J., Nykiforuk C., Shen Y., Zaplachinski S., Szarka S., Kuhlman P., et al. (2010): Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnology* **8**, 588–606.
- Brackett D.J., Lerner M.R., Lacquement M.A., He R., Pereira H.A. (1997): A synthetic lipopolysaccharide-binding peptide based on the neutrophil-derived protein cap37 prevents endotoxin-induced responses in conscious rats. *Infection and Immunity* **65**, 2803–2811.
- Brogden K. (2005): Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 239–250.
- Brown K.L., Hancock R.E. (2006): Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology* **18**, 24–30.
- Bucki R., Leszczynska K., Namiot A., Sokolowski W. (2010): Cathelicidin LL-37: A Multitask Antimicrobial Peptide. *Archivum Immunologiae Therapiae Experimentalis* **58**, 15–25.
- Bulet P., Dimarcq J.L., Hetru C., Lagueux M., Charlet M., Hegy G., Dorselaer A., Hoffmann J. (1993). A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O glycosylated substitution. *The Journal of biological chemistry* **268**, 14893–7.
- Cameron-Mills V., von Wettstein D. (1980): Protein body formation in the developing barley endosperm. *Carlsberg Research Communications* **45**, 577–594.
- Carretero M., Escamez M. J., Garcia M., Duarte B., Holguin A., et al. (2007): In vitro and In vivo Wound Healing-Promoting Activities of Human Cathelicidin LL-37. *Journal of Investigative Dermatology* **128**, 223–236.

- Conley A.J., Zhu H., Le L.C., Jevnikar A.M., Lee B.H., Brandle J.E., *et al.* (2011): Recombinant protein production in a variety of *Nicotiana* hosts: a comparative analysis. *Plant Biotechnology* **9**, 419–33.
- Conlon J.M., Sonnevend A. (2010): Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods in Molecular Biology* **618**, 3–14.
- D'Aoust M.A., Couture M.M.J., Charland N., Trepanier S., Landry N., Ors F., *et al.* (2010): The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnology* **8**, 607–19.
- Das H., Sharma B., Kumar A. (2006): Cloning and characterization of novel cathelicidin cDNA sequence of *Bubalus bubalis* homologous to *Bos taurus* cathelicidin-4. *DNA Sequence* **17**, 407–414.
- Davies H.M. (2005): Plant-made pharmaceuticals: an overview and update. In: *Agricultural biotechnology: beyond food and energy to health and the environment*. (Eaglesham A., Bessin R., Trigiano R., Hardy R.W.F., eds.), National Agricultural Biotechnology Council Report 17, Ithaca, NY, 59–70.
- De Muynck B., Navarre C., Boutry M. (2010): Production of antibodies in plants: status after twenty years. *Plant Biotechnology* **8**, 529–63.
- Di Nardo A., Vitiello A., Gallo R.L. (2003): Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *Journal of Immunology* **170**, 2274–2278.
- Doran P.M. (2000): Foreign protein production in plant tissue cultures. *Current Opinion in Biotechnology* **11**, 199–204.
- Doran P.M. (2006): Foreign protein degradation and instability in plants and plant tissue cultures. *Trends in Biotechnology* **24**, 426–32.
- Dorschner R. A., Pestonjamas V. K., Tamakuwala S., Ohtake T., Rudisill J., *et al.* (2001): Cutaneous Injury Induces the Release of Cathelicidin Anti-Microbial Peptides Active Against Group A *Streptococcus*. **117**, 91–97.
- Dürr U.H., Sudheendra U.S., Ramamoorthy A. (2006): LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1758**, 1408–1425.
- Esen A. (1986): Separation of alcohol-soluble proteins (zeins) from maize into three fractions by differential solubility. *Plant Physiology* **80**, 623–627.
- Fahrner R.L., Dieckmann T., Harwig S.S., Lehrer R.I., Eisenberg D., Feigon J. (1996): Solution structure of protegrin-1, a broadspectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chemistry & Biology* **3**, 543–550.
- Fernández de Mera I.G., Pérez de la Lastra J.M., Ayoubi P., Naranjo V., Kocan K.M., Gortazar C., de la Fuente J. (2008): Differential expression of inflammatory and immune response genes in mesenteric lymph nodes of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Developmental & Comparative Immunology* **32**, 85–91.
- Fischer R., Schillberg S., Twyman R.M. (2009): Molecular farming of antibodies in plants. In: *Recent advances in plant biotechnology*. (Kirakosyan A., Kaufman P.B., eds.), Springer, New York, 35–63.
- Fox J.L. (2006): Turning plants into protein factories. *Nature Biotechnology* **24**, 1191–3.
- Frigerio L., Hinz G., Robinson D.G. (2008): Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? *Traffic* **9**(10), 1564–1570.
- Galili G. (2004): ER-derived compartments are formed by highly regulated processes and have special functions in plants. *Plant Physiology* **136**, 3411–3413.
- Gallo R.L., Kim K.J., Bernfield M., Kozak C.A., Zanetti M., Merluzzi L., Gennaro R. (1997): Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 13088–13093.
- Ganguly D., Chamilos G., Lande R., Gregorio J., Meller S., *et al.* (2009): Self-RNA antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *The Journal of Experimental Medicine* **206**, 1983–1994.
- Ganz T. (2003): The role of antimicrobial peptides in innate immunity. *Integrative and Comparative Biology* **43**, 300–304.

- Gattolin S., Sorieul M., Frigerio L. (2010): Mapping of tonoplast intrinsic proteins in maturing and germinating Arabidopsis seeds reveals dual localization of embryonic TIPs to the tonoplast and plasma membrane. *Molecular Plant* **4**(1), 180–189.
- Gennaro R., Skerlavaj B., Romeo D. (1989): Purification, composition, and activity of two bacterenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infection and Immunity* **5**, 3142–3146.
- Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A. (2000): Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* **18**, 1151–5.
- Gottschalk U. (2008): Bioseparation in antibody manufacturing: the good, the bad and the ugly. *Biotechnology Progress* **24**, 496–503.
- Groenink J., Walgreen-Weterings E., van't Hof W., Veerman E.C., Nieuw Amerongen A.V. (1999): Cationic amphipathic peptides, derived from bovine and human lactoferrins, with antimicrobial activity against oral pathogens. *FEMS Microbiology Letters* **179**, 217–222.
- Gudmundsson G.H., Magnusson K.P., Chowdhary B.P., Johansson M., Andersson L., Boman H.G. (1995): Structure of the gene for porcine peptide antibiotic PR-39, a cathelin gene family member: comparative mapping of the locus for the human peptide antibiotic FALL-39. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 7085–7089.
- Hancock R. E., Falla T., Brown M. (1995): Cationic bactericidal peptides. *Advances in Microbial Physiology* **37**, 135–175.
- Hancock R.E., Scott M.G. (2000): The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 8856–8861.
- Hara-Nishimura I.I., Shimada T., Hatano K., Takeuchi Y., Nishimura M. (1998): Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor accumulating vesicles. *Plant Cell* **10**(5), 825–836.
- Harris F., Dennison S.R., Phoenix, D.A. (2009): Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein & Peptide Science* **10**, 585–606.
- Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. (1989): Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**, 76–8.
- Hiatt A., Pauly M. (2006): Monoclonal antibodies from plants: a new speed record. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 14645–6.
- Hofbauer A., Melnik S., Tschofen M., Arcalis E., Phan H. T., Gresch U., Stoger E. (2016): The encapsulation of hemagglutinin in protein bodies achieves a stronger immune response in mice than the soluble antigen. *Frontiers in Plant Science* **7**, 142.
- Hohl B., Hinz G., Jeong B.K., Robinson D.G. (1995): Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. *Journal of Cell Science* **108**, 299–310.
- Holler C., Vaughan D., Zhang C. (2007): Polyethyleneimine precipitation versus anion Exchange chromatography in fractionating recombinant β -glucuronidase from transgenic tobacco extract. *Journal of Chromatography A* **1142**, 98–105.
- Holler C., Zhang C. (2008): Purification of an acidic recombinant protein from transgenic tobacco. *Biotechnology and Bioengineering* **99**, 902–9.
- Hood E.E., Howard J.A. (2009): Over-expression of novel proteins in maize. In: *Molecular genetic approaches to maize improvement*. (Kriz A.L., Larkins B.A., eds.), Springer, Berlin Heidelberg, 91–105.
- Hood E.E., Love R., Lane J., Bray J., Clough R., Pappu K., *et al.* (2007): Subcellular targeting is a key condition for high-level accumulation of cellulase protein in transgenic maize seed. *Plant Biotechnology* **5**, 709–19.
- Hood E.E., Witcher D.R., Maddock S., Meyer T., Baszczyński C., Bailey M., *et al.* (1997): Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding* **3**, 291–306.
- Howard J.A., Nikolov Z.L., Hood E.E. (2011): Enzyme production systems for biomass conversion. In: *Plant biomass conversion*. (Hood E.E., Nelson P., Powell R., eds.), John Wiley & Sons Inc, Ames, IA, 219–45.
- Huang J.M., Wu L.Y., Yalda D., Adkins Y., Kelleher S.L., Crane M., *et al.* (2002): Expression of functional recombinant human lysozyme in transgenic rice cell culture. *Transgenic Research* **11**, 229–39.

- Huang L.F., Liu Y.K., Lu C.A., Hsieh S.L., Yu S.M. (2005): Production of human serum albumin by sugar starvation induced promoter and rice cell culture. *Transgenic Research* **14**, 569–81.
- Huang Y.B., Huang J.F., Chen Y.X. (2010): Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein Cell* **1**, 143–152.
- Hunter P.R., Craddock C.P., Di Benedetto S., Roberts L.M., Frigerio L. (2007): Fluorescent reporter proteins for the tonoplast and the vacuolar lumen identify a single vacuolar compartment in Arabidopsis cells. *Plant Physiology* **145**(4), 1371–1382.
- Huttner K.M., Lambeth M.R., Burkin H.R., Burkin D.J., Broad T.E. (1998): Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes. *Gene* **206**, 85–91.
- Chang C., Pleguezuelos O., Zhang Y., Zou J., Secombes C. (2005): Identification of a Novel Cathelicidin Gene in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Infection and Immunity* **73**, 5053–5064.
- Chang C., Zhang Y., Zou J., Nie P., Secombes C. (2006): Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**, 185–195.
- Chen Q. (2008): Expression and purification of pharmaceutical proteins in plants. *Journal of Biological Engineering* **2**, 291–321.
- Ibl V., Stoger E. (2011): The formation, function and fate of protein storage compartments in seeds. *Protoplasma* **249**, 379–92.
- Jiang L., Phillips T.E., Hamm C.A., Drozdowicz Y.M., Rea P.A., Maeshima M., Rogers S.W., Rogers J.C. (2001): The protein storage vacuole: a unique compound organelle. *Journal of Cell Biology* **155**(6), 991–1002.
- Joensuu J.J., Conley A.J., Lienemann M., Brandle J.E., Linder M.B., Menassa R. (2010): Hydrophobin fusions for high-level transient protein expression and purification in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology* **152**, 622–33.
- Karthikeyan K., Vijayalakshmi E., Korrapati P. S. (2014): Selective Interactions of zein microspheres with different class of drugs: An in vitro and in silico analysis. *AAPS PharmSciTech* **15**(5), 1172–1180.
- Kindrachuk J., Jansen H., Elliott M., Nijnik A., Magrangeas-Janot L., Pasupuleti M., Thorson L., Ma S., Easton D.M., Bains M., *et al.* (2013): Manipulation of innate immunity by a bacterial secreted peptide: Lantibiotic nisin Z is selectively immunomodulatory. *Innate immune system* **19**, 315–327.
- Knudsen S., MuKller M. (1991): Transformation of the developing barley endosperm by particle bombardment. *Planta* **185**, 330–336.
- Kokryakov V.N., Harwig S.S., Panyutich E.A., Shevchenko A.A., Aleshina G.M., Shamova O.V., Korneva H.A., Lehrer R.I. (1993): Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Letters* **327**, 231–236.
- Kościuczuk E. M., Lisowski P., Jarczak J., Strzałkowska N., Józwick A., Horbańczuk J., Krzyżewski J., Zwierzchowski L., Bagnicka E. (2012): Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Molecular biology reports* **39**(12), 10957–10970.
- Kreis M., Shewry P.R. (1989): Unusual features of cereal seed protein structure and evolution. *BioEssays* **10**, 201–207.
- Kusnadi A.R., Nikolov Z.L., Howard J.A. (1997): Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering* **56**, 473–84.
- Lai H., Engle M., Fuchs A., Keller T., Johnson S., Gorlatov S., *et al.* (2010): Monoclonal antibody produced in plants efficiently treats West Nile virus infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 2419–24.
- Landry J., Moureaux T. (1970): Heterogeneity des glutelines du grain de maïs: extraction selective et composition en acides amines des trois fractions isolees. *Bull Soc Chim Biol* **52**, 1021–1037.
- 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.
- Lee J.W., Forciniti D. (2010): Purification of human antibodies from transgenic corn using aqueous two-phase systems. *Biotechnology Progress* **26**, 159–67.

- Lee S., Alwahab N. S. A., Moazzam Z. M. (2013): Zein-based oral drug delivery system targeting activated macrophages. *International Journal of Pharmaceutics* **454**(1), 388-393.
- Lee S., Kim Y.-C., Park J.-H. (2016): Zein-alginate based oral drug delivery systems: Protection and release of therapeutic proteins. *International Journal of Pharmaceutics* **515**(1-2), 300-306.
- Leelavathi S., Reddy V.S. (2003): Chloroplast expression of His-tagged GUS-fusions: a general strategy to overproduce and purify foreign proteins using transplastomic plants as bioreactors. *Molecular Breeding* **11**, 49-58.
- Lenarcic B., Ritonja A., Dolenc I., Stoka V., Berbic S., Pungercar J., Strukelj B., Turk V. (1993): Pig leukocyte cysteine proteinase inhibitor (PLCPI), a new member of the stefin family. *FEBS Letters* **336**, 289-292.
- Lending C. R., Larkins B. A. (1989): Changes in the zein composition of protein bodies during maize endosperm development. *The Plant Cell* **1**(10), 1011-1023.
- Levanony H., Rubin R., Altschuler Y., Galili G. (1992): Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *Journal of Cell Biology* **119**, 1117-1128.
- Ling H.Y., Pelosi A., Walmsley A.M. (2010): Current status of plant-made vaccines for veterinary purposes. *Expert Review of Vaccines* **9**, 971-82.
- Llop-Tous I., Madurga S., Giralt E., Marzabal P., Torrent M., Ludevid, M. D. (2010): Relevant elements of a maize γ -zein domain involved in protein body biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **285**(46), 35633-35644.
- Llop-Tous I., Ortiz M., Torrent M., Ludevid M. D. (2011): The expression of a xylanase targeted to ER-protein bodies provides a simple strategy to produce active insoluble enzyme polymers in tobacco plants. *PLoS one* **6**(4), e19474.
- Loppnow H., Libby P., Freudenberg M., Krauss J.H., Weckesser J., Mayer H. (1990): Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS. *Infection and Immunity* **58**, 3743-3750.
- Luo Y., Wang Q., Luo Y. (2014): Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: A review. *Journal of Applied Polymer Science* **131**(16), 1-12.
- Luo Y., Zhang B., Whent M., Yu L. L., Wang Q. (2011): Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of α -tocopherol, and its in vitro controlled release study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **85**(2), 145-152.
- Ma J.K.C., Hikmat B.Y., Wycoff K., Vine N.D., Chargelegue D., Yu L., *et al.* (1998): Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nature Medicine* **4**, 601-6.
- Ma Y.F., Liu C.B., Liu X.H., Wu J., Yang H.L., Wang Y.P., Li J.X., Yu H.N., Lai R. (2010): Peptidomics and genomics analysis of novel antimicrobial peptides from the frog, *Rana nigrovittata*. *Genomics* **95**, 66-71.
- Mahoney M.M., Lee A.Y., Brezinski-Caliguri D.J., Huttner K.M. (1995): Molecular analysis of the sheep cathelin family reveals a novel antimicrobial peptide. *FEBS Letters* **377**, 519-522.
- Maier V. H., Dorn K. V., Gudmundsdottir B. K., Gudmundsson G. H. (2008a): Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Molecular Immunology* **45**, 3723-3730.
- Maier V. H., Schmitt C., Gudmundsdottir S., Gudmundsson G. (2008b): Bacterial DNA indicated as an important inducer of fish cathelicidins. *Molecular Immunology* **45**, 2352-2358.
- Matsuzaki K. (1999): Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1462**, 1-10.
- Mbewana S., Mortimer E., Pêra F. F. P. G., Hitzeroth I. I., Rybicki E. P. (2015): Production of H5N1 influenza virus matrix protein 2 ectodomain protein bodies in tobacco plants and in insect cells as a candidate universal influenza vaccine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **3**, 197.
- Menkhous T.J., Glatz C.E. (2005): Antibody capture from corn endosperm extracts by packed bed and expanded bed adsorption. *Biotechnology Progress* **21**, 473-85.
- Menkhous T.J., Bai Y., Zhang C.M., Nikolov Z.L., Glatz C.E. (2004a): Considerations for the recovery of recombinant proteins from plants. *Biotechnology Progress* **20**, 1001-14.
- Mooney B.P. (2009): The second green revolution? Production of plant-based biodegradable plastics. *Biochemical Journal* **418**, 219-32.

- Muntz K. (1998): Deposition of storage proteins. *Plant Molecular Biology* **38**(1–2), 77–99.
- Nagaoka I., Hirota S., Niyonsaba F., Hirata M., Adachi Y., Tamura H., Tanaka S., Heumann D. (2002): Augmentation of the lipopolysaccharide- neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. *Clinical and Vaccine Immunology* **9**, 972–982.
- Nagaoka I., Tsutsumi-Ishii Y., Yomogida S., Yamashita T. (1997): Isolation of cDNA encoding guinea pig neutrophil cationic antibacterial polypeptide of 11 kDa (CAP11) and evaluation of CAP11 mRNA expression during neutrophil maturation. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 22742–22750.
- Nandi S., Suzuki Y.A., Huang J.M., Yalda D., Pham P., Wu L.Y., *et al.* Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Science* **163**, 713–22.
- Nandi S., Yalda D., Lu S., Nikolov Z., Misaki R., Fujiyama K., *et al.* (2005): Process development and economic evaluation of recombinant human lactoferrin expressed in rice grain. *Transgenic Research* **14**, 237–49.
- Nijnik A., Pistolc J., Filewod N.C., Hancock R.E. (2012): Signaling pathways mediating chemokine induction in keratinocytes by cathelicidin ll-37 and flagellin. *Journal of Innate Immunity* **4**, 377–386.
- Nikolov Z.L., Hammes D. (2002): Production of recombinant proteins from transgenic crops. In: *Plant as factories for protein production*. (Hood E.E., Howard J.A., eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 159–74.
- Nikolov Z.L., Regan J.R., Dickey L.F., Woodard S.L. (2009): Purification of antibodies from transgenic plants. In: *Process scale purification of antibodies*. (Gottschalk U., eds.), Wiley-VCH, 387–406.
- Nikolov Z.L., Woodard S.L. (2004): Downstream processing of recombinant proteins from transgenic feedstock. *Current Opinion in Biotechnology* **15**, 479–86.
- Niyonsaba F., Iwabuchi K., Matsuda H., Ogawa H., Nagaoka I. (2002): Epithelial cell derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertusis toxin-sensitive and phospholipase c-dependent pathway. *International Immunology* **14**, 421–426.
- Nizet V., Ohtake T., Lauth X., Trowbridge J., Rudisill J., *et al.* (2001): Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**, 454–457.
- Nochi T., Takagi H., Yuki Y., Yang L., Masumura T., Mejima M., Kiyono H. (2007): Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain and needle-free vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(26), 10986–10991.
- Nykiforuk C.L., Shen Y., Murray E.W., Boothe J.G., Busseuil D., Rhéaume E., *et al.* (2011): Expression and recovery of biologically active recombinant Apolipoprotein AIMilano from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds. *Plant Biotechnology* **9**, 250–63.
- Oda Y., Higaki T., Hasezawa S., Kutsuna N. (2009): Chapter 3. New insights into plant vacuolar structure and dynamics. *International Review of Cell and Molecular Biology* **277**, 103–135.
- Olbrich A., Hillmer S., Hinz G., Olviusson P., Robinson D.G. (2007): Newly formed vacuoles in root meristems of barley and pea seedlings have characteristics of both protein storage and lytic vacuoles. *Plant Physiology* **145**(4), 1383–1394.
- Olsen O.A. (2001): ENDOSPERM DEVELOPMENT: cellularization and cellfate specification. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 233–267.
- Olsen O.A. (2004): Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **16 Suppl**, 214–227.
- Ong P.Y., Ohtake T., Brandt C., Strickland I., Boguniewicz M., *et al.* (2002): Endogenous Antimicrobial Peptides and Skin Infections in Atopic Dermatitis. *New England Journal of Medicine* **347**, 1151–1160.
- Oppenheim J.J., Biragyn A., Kwak L.W., Yang D. (2003): Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Annals of the Rheumatic Diseases* **62**, ii17–ii21.
- Patel A., Hu Y., Tiwari J. K., Velikov K. P. (2010): Synthesis and characterisation of zein–curcumin colloidal particles. *Soft Matter* **6**(24), 6192.

- Peckham G.D., Bugos R.C., Su W.W. (2006): Purification of GFP fusion proteins from transgenic plant cell cultures. *Protein Expression and Purification* **49**, 183–9.
- Penalva R., González-Navarro C. J., Gamazo C., Esparza I., Irache J. M. (2017): Zein nanoparticles for oral delivery of quercetin: Pharmacokinetic studies and preventive anti inflammatory effects in a mouse model of endotoxemia. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **13**(1), 103–110.
- Platis D., Drossard J., Fischer R., Ma J.K.C., Labrou N.E. (2008): New downstream processing strategy for the purification of monoclonal antibodies from transgenic tobacco plants. *Journal of Chromatography A* **1211**, 80–9.
- Platis D., Labrou N.E. (2009): Application of a PEG/salt aqueous two-phase partition system for the recovery of monoclonal antibodies from unclarified transgenic tobacco extract. *Biotechnology Journal* **4**, 1320–7.
- Pütsep K., Carlsson G., Boman H., Andersson M. (2002): Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *The Lancet* **360**, 1144–1149.
- Radek K., Gallo R. (2007): Antimicrobial peptides: Natural effectors of the innate immune system. *Seminars in Immunopathology* **29**, 27–43.
- Ramanathan B., Davis E. G., Ross C. R., Blecha F. (2002): Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes and Infection* **4**, 361–372.
- Ramessar K., Rademacher T., Sack M., Stadlmann J., Platis D., Stiegler G., *et al.* (2008): Cost-effective production of a vaginal protein microbicide to prevent HIV transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3727–32.
- Rechinger K.B., Simpson D.J., Svendsen I., Cameron-Mills V. (1993): A role for gamma 3 hordein in the transport and targeting of prolamin polypeptides to the vacuole of developing barley endosperm. *The Plant Journal* **4**, 841–853.
- Robic G., Farinas C.S., Rech E.L., Bueno S.M.A., Miranda E.A. (2006): Downstream process engineering evaluation of transgenic soybean seeds as host for recombinant protein production. *Biochemical Engineering Journal* **32**, 7–12.
- Sala F., Manuela Rigano M., Barbante A., Basso B., Walmsley A.M., Castiglione S. (2003): Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* **21**, 803–8.
- Scocchi M., Bontempo D., Boscolo S., Tomasinsig L., Giulotto E., Zanetti M. (1999): Novel cathelicidins in horse leukocytes. *FEBS Letters* **457**, 459–464.
- Scocchi M., Pallavicini A., Salgaro R., Bociek K., Gennaro R. (2009): The salmonid cathelicidins: A gene family with highly varied C-terminal antimicrobial domains. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **152**, 376–381.
- Scocchi M., Wang S., Zanetti M. (1997): Structural organization of the bovine cathelicidin gene family and identification of a novel member. *FEBS Letters* **417**, 311–315.
- Scott M.G., Rosenberger C.M., Gold M.R., Finlay B.B., Hancock R.E. (2000): An alpha helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage responses to lipopolysaccharide and directly alters macrophage gene expression. *Journal of Immunology* **165**, 3358–3365.
- Segui-Simarro J.M., Staehelin L.A. (2006): Cell cycle-dependent changes in Golgi stacks, vacuoles, clathrin-coated vesicles and multivesicular bodies in meristematic cells of *Arabidopsis thaliana*: a quantitative and spatial analysis. *Planta* **223**(2), 223–236.
- Selsted M.E., Novotny M.J., Morris W.L., Tang Y.Q., Smith W., Cullor J.S. (1992): Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptid amide from neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 4292–4295.
- Shai Y. (1999): Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by a-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1462**, 55–70.
- Shamova O., Brogden K.A., Zhao C., Nguyen T., Kokryakov V.N., Lehrer R.I. (1999): Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. *Infection and Immunity* **67**, 4106–4111.
- Sharma A.K., Sharma M.K. (2009): Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* **27**, 811–32.

- Shewry P.R., Napier J.A., Tatham A.S. (1995): Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, 945–956.
- Shinnar A. E., Uzzell T., Rao M. N., Spooner E., Lane W. S., Zasloff, M. A. (1996): Proc 14th American Peptide Symposium. *Peptides; Chemistry and Biology*, 189–191.
- Schauber J., Gallo R.L. (2008): Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **122**, 261–266.
- Schillberg S., Twyman R.M., Fischer R. (2005): Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants — technology assessment. *Vaccine* **23**, 1764–9.
- Simmaco M., Mignogna G., Barra D. (1998): Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* **47**, 435–450.
- Skerlavaj B., Gennaro R., Bagella L., Merluzzi L., Risso A., Zanetti M. (1996): Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 28375–28381.
- Sorensen M.B., MuKller M., Skerritt J., Simpson D. (1996): Hordein promoter methylation and transcriptional activity in wildtype and mutant barley endosperm. *Molecular Genetics and Genomics* **250**, 750–760.
- Sparkes I.A., Frigerio L., Tolley N., Hawes C. (2009): The plant endoplasmic reticulum: a cell-wide web. *Biochemical Journal* **423**(2), 145–155.
- Sparkes I.A., Runions J., Kearns A., Hawes C. (2006): Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocols* **1**(4), 2019–2025.
- Spök A., Karner S. (2008): Plant molecular farming: opportunities and challenges. In: *European Commission: The Institute for Prospective Technological Studies* (Stein A.J., eds.), Seville.
- Stöger E., Ma J.K.C., Fischer R., Christou P. (2005): Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Current Opinion in Biotechnology* **16**, 167–73.
- Stöger E., Sack M., Fischer R., Christou P. (2002a): Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 161–6.
- Stöger E., Sack M., Perrin Y., Vaquero C., Torres E., Twyman R.M., *et al.* (2002b): Practical considerations for pharmaceutical antibody production in different crop systems. *Molecular Breeding* **9**, 149–58.
- Stöger E., Vaquero C., Torres E., Sack M., Nicholson L., Drossard J., *et al.* (2000): Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology* **42**, 583–90.
- Storici P., Scocchi M., Tossi A., Gennaroc R., Zanettia M. (1994): Chemical synthesis and biological activity of a novel antibacterial peptide deduced from a pig myeloid cDNA. *FEBS Letters* **337**, 303–307.
- Storici P., Tossi A., Lenarcic B., Romeo D. (1996): Purification and structural characterization of bovine cathelicidins, precursors of antimicrobial peptides. *European Journal of Biochemistry* **238**, 769–776.
- Streatfield S.J., Howard J.A. (2003): Plant-based vaccines. *International Journal for Parasitology* **33**, 479–93.
- Strukelj B., Pungercar J., Kopitar G., Renko M., Lenarcic B., Berbic' S., Turk V. (1995): Molecular cloning and identification of a novel porcine cathelin-like antibacterial peptide precursor. *Biological Chemistry Hoppe Seyler* **376**, 507–510.
- Termén S., Tollin M., Olsson B., Svenberg T., Agerberth B., Gudmundsson G.H. (2003): Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 536–549.
- Tomasinsig L., Zanetti M. (2005): The cathelicidins-structure, function and evolution. *Current Protein & Peptide Science* **6**, 23–34.
- Torrent M., Llopart B., Lasserre-Ramassamy S., Llop-Tous I., Bastida M., Marzabal P., Ludevik M. D. (2009): Eukaryotic protein production in designed storage organelles. *BMC Biology* **7**(1), 5.

- Tosi P., Parker M., Gritsch C.S., Carzaniga R., Martin B., Shewry P.R. (2009): Trafficking of storage proteins in developing grain of wheat. *Journal of Experimental Botany* **60**, 979–991.
- Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. (2000): Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4–30.
- Tossi A., Scocchi M., Zanetti M., Storici P., Gennaro R. (1995): PMAP-37, a novel antibacterial peptide from pig myeloid cells. cDNA cloning, chemical synthesis and activity. *European Journal of Biochemistry* **228**, 941–946.
- Treffers C., Chen L., Anderson R.C., Yu P.L. (2005): Isolation and characterisation of antimicrobial peptides from deer neutrophils. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 165–169.
- Twyman R.M. (2004): Host plants, systems and expression strategies for molecular farming. In: *Molecular farming: plant-made pharmaceuticals and technical proteins*. (Fischer R., Schillberg S., eds.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 191–216.
- Twyman R.M., Stöger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R. (2003): Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* **21**, 570–8.
- Uzzell T., Stolzenberg E.D., Shinnar A.E., Zasloff M. (2003): Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides* **24**, 1655–1667.
- Van Rooijen G., Glenn K.R., Shen Y., Boothe J. (SemBioSys Genetics Inc., assignee): *Commercial production of chymosin in plants*. United States patent 7390936, 2008.
- Van Rooijen G.J.H., Moloney M.M. (1995): Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins. *Bioresource Technology* **13**, 72–7.
- Vitale A., Denecke J. (1999): The endoplasmic reticulum-gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* **11**(4), 615–628.
- Wallace J.C., Lopes M.A., Paiva E., Larkins B.A. (1990): New Methods for Extraction and Quantitation of Zeins Reveal a High Content of gamma-Zein in Modified opaque-2 Maize. *Plant Physiology* **92**(1), 191-196.
- Wang Y., Hong J., Liu X., Yang H., Liu R., et al. (2008): Snake Cathelicidin from *Bungarus fasciatus* Is a Potent Peptide Antibiotics. *PLoS ONE* **3**, e3217.
- Watanabe E., Shimada T., Tamura K., Matsushima R., Koumoto Y., Nishimura M., Hara Nishimura I. (2004): An ER-localized form of PV72, a seed-specific vacuolar sorting receptor, interferes the transport of an NPIR-containing proteinase in Arabidopsis leaves. *Plant and Cell Physiology* **45**(1), 9–17.
- Westerhoff H. V., Juretic D., Hendler R. W., Zasloff M. (1989): Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**, 6597-6601.
- Whitehead M., Öhlschläger P., Almajhdi F. N., Alloza L., Marzábal P., Meyers A. E., Rybicki, E. P. (2014): Human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein bodies cause tumour regression in mice. *BMC Cancer* **14**(1), 367.
- Wilken L.R., Nikolov Z.L. (2006): Factors influencing recombinant human lysozyme extraction and cation exchange adsorption. *Biotechnology Progress* **22**, 745–52.
- Wilken L.R., Nikolov Z.L. (2010): Evaluation of alternatives for human lysozyme purification from transgenic rice: impact of phytic acid and buffer. *Biotechnology Progress* **26**, 1303–11.
- Wilken L.R., Nikolov Z.L. (2012): Recovery and purification of plant-made recombinant proteins. *Biotechnology Advances* **30**(2), 419-433.
- Woo Y.M., Hu D.W., Larkins B.A., Jung R. (2001): Genomics analysis of genes expressed in maize endosperm identifies novel seed proteins and clarifies patterns of zein gene expression. *The Plant Cell* **13**, 2297–2317.
- Woodard S.L., Mayor J.M., Bailey M.R., Barker D.K., Love R.T., Lane J.R., et al. (2003): Maize (*Zea mays*)- derived bovine trypsin: characterization of the first large-scale, commercial protein product from transgenic plants. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **38**, 123–30.
- Woodard S.L., Wilken L.R., Barros G.O.F., White S.G., Nikolov Z.L. (2009): Evaluation of monoclonal antibody and phenolic extraction from transgenic *Lemna* for purification process development. *Biotechnology and Bioengineering* **104**, 562–71.

- Wu J., Yu L., Li L., Hu J., Zhou J., Zhou X. (2007): Oral immunization with transgenic rice seeds expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus induces protective immune responses in chickens. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 570–8.
- Wudick M.M., Luu D.T., Maurel C. (2009): A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist* **184**(2), 289–302.
- Xiao Y., Cai Y., Bommineni Y., Fernando S., Prakash O., et al. (2006): Identification and Functional Characterization of Three Chicken Cathelicidins with Potent Antimicrobial Activity. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 2858–2867.
- Xu J., Ge X., Dolan M.C. (2011): Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnology Advances* **29**, 278–99.
- Xu J.F., Tan L., Goodrum K.J., Kieliszewski M.J. (2007): High-yields and extended serum half-life of human interferon $\alpha 2b$ expressed in tobacco cells as arabinogalactan protein fusions. *Biotechnology and Bioengineering* **97**, 997–1008.
- Yamasaki K., Di Nardo A., Bardan A., Murakami M., Ohtake T., et al. (2007): Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nature Medicine* **13**, 975–980.
- Yang L., Weiss T. M., Lehrer R. I., Huang H. W. (2000): Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophysical Journal* **79**, 2002–2009.
- Yang L.J., Wakasa Y., Takaiwa F. (2008): Biopharming to increase bioactive peptides in rice seed. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* **91**, 957–64.
- Yu D., McLean M.D., Hall J.C., Ghosh R. (2008): Purification of a human immunoglobulin G1 monoclonal antibody from transgenic tobacco using membrane chromatographic processes. *Journal of Chromatography A* **1187**, 128–37.
- Zaiou M., Gallo R.L. (2002): Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *Journal of Molecular Medicine* **80**, 549–561.
- Zanetti M. (2004): Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology* **75**, 39–48.
- Zanetti M. (2005): The Role of Cathelicidins in the Innate Host Defenses of Mammals. *Current Issues in Molecular Biology* **7**, 179–196.
- Zanetti M., Gennaro R., Romeo D. (1995): Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Letters* **374**, 1–5.
- Zanetti M., Storici P., Tossi A., Scocchi M., Gennaro R. (1994): Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 7855–7858.
- Zasloff M. (1987): Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 5449–5453.
- Zasloff M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389–395.
- Zhang G.H., Mann D.M., Tsai C.M. (1999): Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by a human lactoferrin-derived peptide. *Infection and Immunity* **67**, 1353–1358.
- Zhang Y., Cui L., Che X., Zhang H., Shi N., Li C., Kong W. (2015): Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. *Journal of Controlled Release* **206**(2699), 206–219.
- Zhang Y., Cui L., Li F., Shi N., Li C., Yu X., Kong W. (2016): Design, fabrication and biomedical applications of zein-based nano/microcarrier systems. *International Journal of Pharmaceutics* **513**(1–2), 191–210.
- Zhao C., Ganz T., Lehrer R.I. (1995): Structures of genes for two cathelin-associated antimicrobial peptides: prophenin-2 and PR-39. *FEBS Letters* **376**, 130–134.
- Zhao C., Nguyen T., Boo L.M., Hong T., Espiritu C., Orlov D., Wang W., Waring A., Lehrer R.I. (2001): RL-37, an alpha-helical antimicrobial peptide of the rhesus monkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 2695–2702.
- Zhao H., Gan T., Liu X., Jin Y., Lee W., et al. (2008): Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes. *Peptides* **29**, 1685–1691.

- Zheng H.Q., Staehelin A. (2011): Protein storage vacuoles are transformed into lytic vacuoles in root meristematic cells of germinating seedlings by multiple, cell type specific mechanisms. *Plant Physiology* **155**(4), 2023–2035.
- Zhong Q., Jin M. (2009): Nanoscalar structures of spray-dried zein microcapsules and in vitro release kinetics of the encapsulated lysozyme as affected by formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(9), 3886–3894.
- Zhong Q., Xu L., Zhang C., Glatz C. (2007): Purification of recombinant aprotinin from transgenic corn germ fraction using ion exchange and hydrophobic interaction chromatography. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**, 607–13.
- Zhu Z., Hughes K.W., Huang L., Sun B.L., Liu C.M., Li Y., *et al.* (1994): Expression of human α -interferon cDNA in transgenic rice plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **36**, 197–204.

8 Zoznam použitých symbolov a skratiek

AMP – antimikrobiálne peptidy

ER – endoplazmatické retikulum

GFP – z angličtiny „green fluorescent proteín“

GRAS – z angličtiny „generally recognized as safe“

gz93 – 27 kDa γ -zein

hCAP18 – z angličtiny „human cathelicidin antimicrobial peptide 18“

HMW – z angličtiny „high molecular weight“

IgA – imunoglobulín A

IgG – imunoglobulín G

IMAC-Ni – afinitná chromatografia s imobilizovaným kovom niklu

INT - interferón

Leb4 – Legumín B4

LL-37 – ľudský katelicidín („leucín-leucín 37“)

LPS - lipopolysacharid

LV – lytické vakuoly

mAbs – monoklonálne protilátky („monoclonal antibodies“)

PB – proteínové telieska („protein bodies“)

PCR – polymerázová reťazová reakcia

PEG - polyetylénglykol

PSV – vakuoly skladujúce proteíny

SMH – Shai-Matsuzaki-Huang model aktivity antimikrobiálnych peptidov

SZP – semenné zásobné proteíny

TIP – tonoplastové vnútorné proteíny

TLR – Toll-like receptor