

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Funkční ověření stabilizačních domén pro expresi  
antimikrobiálních peptidů v rostlinách**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: **David Kopečný**  
Studijní program: N1406 Biochemie  
Studijní obor: Biochemie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivo Frébort, CSc. Ph.D.**  
Rok: 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

## Poděkování

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování prof. RNDr. Ivo Frébortovi, CSc. Ph.D. za cenné rady, věcné připomínky a odborné vedení v průběhu vypracování diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat doc. Mgr. Petru Galuszkovi, Ph.D. *in memoriam* za pomoc při návrhu všech konstruktů a návrh experimentů této diplomové práce. Rovněž bych chtěl poděkovat vedoucí Oddělení molekulární biologie Véronique Hélène Bergognoux-Fojtik, Ph.D. za ochotu a čas strávený při konzultacích výsledků. Poděkování patří také Mgr. Alžbětě Mičúchové za pomoc s antimikrobiálními testy, Mgr. Michalu Karady, Ph.D. za pomoc při optimalizaci metody použité pro LC-MS, Siarhei Dabrovolski, MSc za analýzu *N. benthamiana* pomocí epifluorescenčního mikroskopu a celému Oddělení molekulární biologie, CRH za možnost vypracování diplomové práce a jejím zaměstnancům za jejich vstřícnost. V neposlední řadě patří obrovské poděkování mé rodině a snoubence, bez kterých bych tuto práci nemohl dokončit.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	David Kopečný
Název práce	Funkční ověření stabilizačních domén pro produkci antimikrobiálních peptidů v rostlinách
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum
Vedoucí práce	prof. RNDr. Ivo Frébort, CSc. PhD.
Rok obhajoby práce	2020

Abstrakt: Rostoucí rezistence bakteriálních patogenů vyžaduje hledání nových látek, které neindukují bakteriální rezistenci. Antimikrobiální peptidy jsou obvykle kladně nabitě krátké peptidy, které mohou interagovat s bakteriálními membránami a jsou schopné zabít bakterie odlišným mechanismem než antibiotika. Proto představují zajímavou alternativu ke klasickým antibiotikům a mimořádně dobře fungují proti širokému spektru bakterií. Jejich produkce však naráží na řadu překážek, a to především kvůli vysokým nákladům na jejich produkci a času potřebným pro jejich přípravu. Tato práce se zaměřuje na produkci antimikrobiálního peptidu katelicidinu v různých expresních systémech. Pro tento účel byly ke katalicidinu fúzovány různé proteinové značky, jako například DAMP4 spolu s několika místy pro štěpení, aby byla umožněna účinná a nízko nákladová purifikace.

Rekombinantní protein s DAMP4 byl exprimován pod T7 promotorem v *Escherichia coli* v mikrobiálním fermentoru, za účelem optimalizace purifikace a štěpení. Bakteriální proteiny byly precipitovány termální denaturací a fúzní protein odštěpen. Antimikrobiální peptid byl dále analyzován a purifikován pomocí semipreparativní HPLC-MS. Nakonec byla antimikrobiální aktivita katelicidinu potvrzena testováním minimální inhibiční koncentrace.

Rekombinantní proteiny s jinými značkami byly testovány v *Nicotiana benthamiana* transientní expresí. Některé další značky byly také vybrány pro stabilní expresi v *Arabidopsis thaliana* pod promotorem 35S. Práce přináší nové poznatky pro vývoj produkčního systému antibakteriálních peptidů.

Klíčová slova	antimikrobiální peptid, rekombinantní produkce, afinitní purifikace, LC-MS, antimikrobiální aktivita
Počet stran	154
Počet příloh	12
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and David Kopečný  
surname

Title Functional verification of stabilization tags  
for expression of antimicrobial peptides in planta

Type of thesis Diploma

Department Centre of the Region Haná for Biotechnological  
and Agricultural Research

Supervisor prof. RNDr. Ivo Frébort, CSc. PhD.

The year of presentation 2020

Abstract: Growing resistance of bacterial pathogens urges the search for new antimicrobial substances that do not induce bacterial resistance. Antimicrobial peptides are usually positively charged short peptides that can interact with bacterial membranes and are able to kill bacteria by a different mechanism than antibiotics. Therefore, they create as an interesting alternative to classical antibiotic and perform extremely well against broad spectrum of bacteria. Unfortunately, their production presents a major obstacle because of high cost and time consumed for their preparation. This thesis focusses on production of human antimicrobial peptide cathelicidin in different expression systems. For this purpose, various protein tag such as DAMP4 was fused to antimicrobial peptide cathelicidin with several different cleavage sites to allow efficient as well as low-cost purification.

Recombinant protein fused to DAMP4 was expressed under T7 promoter in *Escherichia coli* in the microbial fermentor vessel to optimize both purification and cleavage. Bacterial proteins were precipitated by thermal denaturation, protein tag was cleaved off and antimicrobial peptide further analysed and purified by semi preparative HPLC-MS. Finally, antimicrobial activity of cathelicidin was confirmed by testing minimum inhibitory concentration.

Recombinant proteins with other tags were tested in *Nicotiana benthamiana* by transient expression. Also, some tags were chosen for stable expression in *Arabidopsis thaliana* under 35S promotor. The results bring new knowledge for developing a production system for antimicrobial peptides.

Keywords	antimicrobial peptide, recombinant production, affinity purification, LC-MS, antimicrobial activity
Number of pages	154
Number of appendices	12
Language	Czech

## OBSAH

1 ÚVOD.....	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	3
2.1 Rezistence rostlin vůči patogenům.....	3
2.2 Proteiny související s patogenezí.....	3
2.3 Antimikrobiální peptidy.....	5
2.3.1 Obecné mechanismy účinků antimikrobiálních peptidů.....	6
2.3.1.1 Průchod přes vnější membránu gramnegativní bakterie.....	8
2.3.1.2 Působení na bakteriální buněčnou stěnu.....	8
2.3.1.3 Působení na bakteriální buněčnou membránu.....	9
2.3.1.4 Intracelulární cíle.....	11
2.3.2 Bakteriální rezistence.....	11
2.3.2.1 Proteolytické štěpení antimikrobiálních peptidů.....	11
2.3.2.2 Modifikace povrchového náboje.....	12
2.3.2.3 Aktivní transport.....	12
2.3.2.4 Zachycení pomocí povrchových proteinů a polysacharidů.....	12
2.4 Rostlinné antimikrobiální peptidy.....	13
2.4.1 Thioniny.....	14
2.4.2 Rostlinné defensiny.....	15
2.4.3 Heveinu podobné peptidy.....	15
2.4.4 Knottinové peptidy.....	16
2.4.5 $\alpha$ -vlásenky.....	17
2.4.6 Proteiny přenášející lipidy.....	17
2.4.7 Snakiny.....	18
2.5 Příprava transgenních rostlin.....	18
2.6 Exprese antimikrobiálních peptidů v rostlinách.....	21
2.6.1 Výběr vhodného promotoru.....	21
2.6.1.1 Vlastnosti vhodného promotoru.....	22
2.6.1.2 Cílená exprese za použití specifických promotorů.....	23
2.6.1.3 Promotory reagující na patogen.....	23
2.6.1.4 Další vhodné promotory.....	24
2.6.2 Problémy při expresi antimikrobiálních peptidů v rostlinách.....	24
2.7 Využití rostlin jako bioreaktorů pro produkci antimikrobiálních peptidů.....	25



2.7.1 Lidský katelicidin.....	25
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1 Materiál.....	27
3.1.1 Biologický materiál.....	27
3.1.2 Chemikálie.....	27
3.1.3 Roztoky a média.....	31
3.1.3.1 Antibiotika.....	31
3.1.3.2 LB médium a LB agar.....	31
3.1.3.3 TAE pufr.....	31
3.1.3.4 Složení premixu pro PCR.....	31
3.1.3.5 Složení médií a roztoků pro práci s rostlinami.....	32
3.1.3.6 Složení pufrů pro extrakci a purifikaci.....	32
3.1.3.7 Bis-Tris gely.....	33
3.1.3.8 Barvení na stříbro.....	33
3.1.3.9 Barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250.....	34
3.1.3.10 Přenosový pufr.....	34
3.1.3.11 Složení mobilních fází pro LC-MS.....	34
3.1.4 Programy a software.....	35
3.1.5 Přístroje a pomůcky.....	35
3.1.6 Použité primery.....	38
3.1.7 Použité standardy.....	39
3.2 Metody.....	40
3.2.1 Příprava Petriho misek s LB agarem.....	40
3.2.2 Kultivace bakterií.....	40
3.2.3 Izolace plazmidů pomocí kitu.....	40
3.2.4 Izolace plazmidů metodou alkalické lýze.....	41
3.2.5 Transformace buněk teplotním šokem.....	41
3.2.6 Kultivace bakterií.....	42
3.2.7 Restrikce.....	42
3.2.8 Elektroforéza.....	43
3.2.9 Purifikace fragmentů DNA po elektroforéze.....	43
3.2.10 Ligace.....	44
3.2.11 Elektroporace.....	44
3.2.12 Polymerasová řetězová reakce – „Colony PCR“.....	45

3.2.13	Polymerasová řetězová reakce – Phusion® .....	45
3.2.14	LR rekombinace.....	46
3.2.15	Sekvencování DNA.....	47
3.2.16	Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	47
3.2.17	Selekce transgenních rostlin.....	48
3.2.18	Transientní transformace a extrakce proteinů <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	49
3.2.19	Příprava bakteriální kultury ve fermentoru.....	50
3.2.20	Zpracování bakteriální kultury.....	52
3.2.21	Afinitní purifikace bakteriálního lyzátu.....	53
3.2.22	Štěpení bakteriálních vzorků.....	54
3.2.23	Kvantifikace celkových proteinů.....	54
3.2.24	Příprava polyakrylamidových gelů.....	55
3.2.25	SDS-PAGE elektroforéza.....	55
3.2.26	Barvení gelu – barvení na stříbro.....	56
3.2.27	Barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue.....	56
3.2.28	Western blot.....	57
3.2.29	LC-MS.....	58
3.2.29.1	Analytická kolona.....	58
3.2.29.2	Preparativní kolona.....	59
3.2.30	Testování antimikrobiální aktivity.....	59
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	61
4.1	Přehled konstruktů.....	61
4.2	Popis konstruktů použitých v praktické části.....	62
4.2.1	Konstrukty elastinového typu.....	62
4.2.2	Konstrukty s DAMP4.....	62
4.2.3	Konstrukty s dalšími purifikačními značkami.....	63
4.3	Příprava konstruktů na transformaci.....	64
4.3.1	Modifikace konstruktů rhLL-37_B1 pro expresi ve fermentoru.....	65
4.4	Stabilní transformace <i>A. thaliana</i> .....	65
4.4.1	Selekce jedné inserce a homozygotních jedinců.....	66
4.4.2	Testování purifikace pomocí citrátu.....	66
4.5	Transientní transformace <i>N. benthamiana</i> .....	68
4.6	Expres a purifikace v bakteriálním expresním systému.....	71
4.6.1	Optimalizace podmínek exprese.....	71

4.6.2 Purifikace pomocí LPLC a FPLC.....	73
4.6.3 Optimalizace štěpení pomocí kyseliny trifluoroctové.....	75
4.7 LC-MS analýza.....	76
4.7.1 Vytvoření metody pro detekci.....	76
4.7.2 Měření kalibrační křivky.....	77
4.7.3 Analýza bakteriálního extraktu po termální denaturaci.....	79
4.7.4 Analýza vlivu nastříkovaného objemu.....	80
4.7.5 Kalibrace s novým standardem.....	81
4.7.6 Ověření nastříkovaného množství.....	82
4.7.7 Zapojení preparativní kolony a nastavení sběru frakcí.....	82
4.7.8 Použití preparativní kolony pro purifikaci bakteriálních vzorků po FPLC.....	83
4.8 Antimikrobiální testy.....	85
4.8.1 Optimalizace metody.....	85
4.8.2 Antimikrobiální aktivita rekombinantního proteinu z ječmene.....	87
4.8.3 Antimikrobiální aktivita standardu purifikovaného pomocí LC-MS.....	89
4.9 Další výsledky.....	90
4.9.1 Srovnání různých typů gelů pro SDS-PAGE.....	90
4.9.2 Porovnání přenosu na membránu po SDS-PAGE.....	91
4.9.3 Expres ve fermentoru a srovnání centrifugačních metod.....	92
4.9.4 Porovnání růstových podmínek <i>A. thaliana</i> a <i>N. benthamiana</i> .....	92
5 DISKUZE.....	93
6 ZÁVĚR.....	96
7 LITERATURA.....	98
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	109
9 PŘÍLOHY.....	110
Příloha 1 Sekvence použitých konstruktů.....	110
Příloha 2 Analýza fragmentace standardu.....	121
Příloha 3 LC-MS analýza – kolona Aegis PEPTIDE.....	123
Příloha 4 LC-MS analýza - stabilita standardu.....	125
Příloha 5 LC-MS analýza – měření kalibrační křivky.....	129
Příloha 6 LC-MS analýza – bakteriální extrakt po termální denaturaci a LPLC.....	134
Příloha 7 LC-MS analýza – vliv nastříkovaného objemu na plochu píku.....	137
Příloha 8 LC-MS analýza – kalibrace s novým standardem.....	140
Příloha 9 LC-MS zapojení preparativní kolony a sběru frakcí.....	145

Příloha 10 Porovnání účinnosti LPLC a FPLC afinitní purifikace.....	147
Příloha 11 Purifikace bakteriálních vzorků po FPLC na preparativní koloně.....	153
Příloha 12 Analýza purifikovaných vzorků pomocí semipreparativní kolony.....	154

## Cíle práce

- Literární rešerše na téma imunizace rostlin prostřednictvím proteinu, stabilizace antimikrobiálních peptidů, přehled antimikrobiálních peptidů a mechanismus jejich účinků, lidský katelicidin (LL-37)
- Klonování konstruktů obsahujících LL-37 (katelicidin) s různými typy stabilizačních/purifikačních sekvencí do rostlinného expresního vektoru pGWB 17
- Ověření funkčnosti konstruktů transientní expresí v *Nicotiana benthamiana*
- Stabilní transformace *Arabidopsis thaliana* metodou namáčení květenství do suspenze agrobakterií
- Purifikace proteinových extraktů, SDS-PAGE a sledování exprese pomocí Western blot analýzy
- Optimalizace metody pro HPLC-MS analýzu a purifikace na preparativní koloně
- Testování antimikrobiální aktivity

# 1 ÚVOD

Rostliny žijí v neustále se měnícím prostředí, které je často nepříznivé nebo stresující pro růst a vývoj. Tyto nepříznivé environmentální podmínky zahrnují biotický stres, jako je infekce patogenním organismem a napadení býložravcem, a abiotický stres, jako jsou sucho, teplo, chlad, nedostatek živin, nadbytek soli nebo toxických kovů v půdě (Al, As, Cd). Sucho, zasolení půdy a extrémní teploty představují hlavní environmentální faktory, které ovlivňují geografické rozmístění rostlin v přírodě, negativně ovlivňují produktivitu v zemědělství a ohrožují bezpečnost potravin. Nepříznivé účinky těchto abiotických stresů se zhoršují se změnou klimatu, které vede ke zvýšené frekvenci výskytu extrémního počasí (Fedoroff *et al.*, 2010).

Některé „agresivnější“ druhy rostlin mohou být úspěšnější v získávání zdrojů, a to díky syntéze metabolitů, které potlačují růst a vývoj jiných druhů rostlin. Tyto látky mohou být kořenovým systémem aktivně vylučovány do půdy nebo do vzduchu nadzemními částmi rostliny (listy, stonky a květy). Vysoká odolnost vůči abiotickým stresovým faktorům je pro rostliny klíčová. Mnoho těchto rostlin, zejména obilovin, roste v půdách s vysokým obsahem rozpuštěných solí (Hanin *et al.*, 2016; Radhakrishnan a Baek, 2017).

Vyšší rostliny mají široké spektrum obranných mechanismů, aby mohly čelit fyzikálním, chemickým a biologickým stresům jako je například sucho, chlad, přítomnost těžkých kovů a napadení patogenním organismem. Jako odpověď na infekce různými patogeny rostliny reagují up-regulací sady genů spojených se systémově získanou rezistencí (Stintzi *et al.*, 1993).

V některých případech existuje jen málo, nebo žádné údaje o vlivu biotického stresu na divoce rostoucí rostliny. Tento stres zahrnuje infekci mikroorganismy a poškození škůdci, hlísticemi nebo jinými bezobratlými živočichy. Důvodem nedostatku dat je malý, nebo žádný ekonomický význam těchto rostlin pro zemědělství. Několik výjimek tvoří volně rostoucí rostliny, které jsou příbuzné se zemědělskými plodinami, jako jsou obiloviny, luštěniny a hybridní rostliny. Ty mohou být potenciálně využitelné pro vytvoření nových odrůd s vysokou odolností vůči chorobám. Původci chorob a škůdci, kteří mají negativní ekonomický dopad na pěstování obilovin (pšenice, žito, ječmen, rýže, atd.) jsou ale intenzivně studováni. Na základě těchto výzkumů

byly vyvinuty a optimalizovány metody pro potlačení patogeneze a poškození rostliny patogenním organismem, a to kombinací agrotechnických, chemických, biologických a biochemických přístupů (Stintzi *et al.*, 1993).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Rezistence rostlin vůči patogenům

Rezistence je dosaženo uvolněním sekundárních metabolitů, jako jsou fytoalexiny, taniny a polyfenolické látky, jakožto i produkcí proteinů souvisejících s patogenezí (pathogenesis-related proteins, PR proteins). Proteiny související s patogenezí byly poprvé identifikovány v tabákových listech (*Nicotiana benthamiana*) infikovaných virem tabákové mozaiky a později byly tyto proteiny detekovány v mnoha různých rostlinách (van Loon a van Kammen, 1970). PR proteiny mají specifické biochemické vlastnosti, které jsou důležité pro rostlinu, pokud je napadena patogenem nebo pod nežádoucím stresem (van Loon, 1985).

### 2.2 Proteiny související s patogenezí

Proteiny související s patogenezí jsou jedním z hlavních zdrojů rostlinných alergenů. Exprese těchto proteinů je indukována v rostlině jako systém obranné reakce ve stresových podmínkách, jako je např. mikrobiální nebo hmyzí infekce, rány, expozice chemikáliím a nepříznivé růstové podmínky. Některé rostlinné tkáně, které jsou více vystavené stresu okolními podmínkami (UV záření, napadení hmyzem, nebo houbami), tyto proteiny konstitutivně exprimují. Bylo zjištěno, že mnoho těchto proteinů souvisejících s rostlinnou patogenezí může působit jako potravinové a rostlinné alergeny (Sinha *et al.*, 2014).

Obecně se jedná o proteiny s nízkou molekulovou hmotností v rozmezí 6 až 43 kDa, stabilních při nízkém pH (<3) navíc vykazují odolnost vůči sekretovaným proteasám, takže se mohou vyskytovat i ve vakuolách, buněčné stěně nebo v mezibuněčném prostoru (van Loon, 1985).

Původně bylo identifikováno pět skupin proteinů souvisejících s patogenezí, ale celkem bylo nakonec nalezeno 17 rodin těchto proteinů, které jsou rozčleněny na základě jejich podobnosti aminokyselinových sekvencí, enzymové aktivity, nebo jiných biologických vlastností a očíslovány v pořadí, ve kterém byly objeveny viz. Tab. 1 (Datta a Muthukrishnan, 1999; van Loon a van Strien, 1999; van Loon *et al.*, 2006).



Navzdory společnému názvu (proteiny související s patogenezí), tyto proteiny vykazují vysokou rozmanitost výskytu a mechanismu účinku a neshodují mezi sebou žádné strukturální podobnosti. PR proteiny mají v rostlině více funkcí - většina vykazuje antimykotickou aktivitu, ačkoliv byla také popsána antibakteriální, insekticidní a antivirální aktivita (Hejgaard *et al.*, 1991; Caruso *et al.*, 1996; Edreva, 2005). Některé z PR proteinů jsou enzymy, jako např.  $\beta$ -1,3-glukanasa nebo chitinasa (Heitz *et al.*, 1994), jiné včetně defensinů mají permeabilizační účinek na membránu (Lay a Anderson, 2005). PR proteiny tak mají klíčovou funkci v odolnosti vůči chorobám, klíčení semen a napomáhají adaptaci rostlin na environmentální stres (Sinha *et al.*, 2014).

**Tabulka 1: Přehled rodin proteinů souvisejících s patogenezí (převzato ze Sinha *et al.*, 2014)**

Rodina	Proteiny	Funkce	Alergeny, jejich identifikované zdroje a alergenní symptomy
PR-1	PR-1 a, PR-1 b, PR-1 c	antimykotická	Cuc m 3 (meloun cukrový) – orální alergický syndrom Hev b 2 (latex) – kontaktní dermatitida
PR-2	$\beta$ -1,3-glukanasy	štěpí $\beta$ -1,3-glukany	Ole e 9 (olivovník) – respirační alergie Mus a 5 (banán) orální alergický syndrom
PR-3	Chitinasy typu I, II, IV, V, VI a VII	endochitinasy	Pers a 1 (avokádo) – svědění očí nebo nos, astma, otok, atd. Mus a 2 (banán) potravinový alergie jako je otok rtů, anafylaktická reakce, atd.
PR-4	Chitinasy typu I a II	antimykotické chitinasy	Hev b 6.01, Hev b 6.02 a Hev b 6.03 (latex) – kontaktní dermatitida Jun a 3 (horský cedr), Cry j 1 (japonský cedr) a Cup a 3 (arizonský cypřiš) – rýma, zánět spojivek a astma
PR-5	Thaumatinu podobné proteiny	antimykotická	Pru av 2 (třešeň), Mal d 2 (jablko), Cap a 1 (paprika), Act d 2 (kiwi) a Mus a 4 (banán) – orální alergický syndrom
PR-6	Proteinasy inhibitor I z rajčete	proteinasy inhibitor	–
PR-7	Endoproteinasa P z rajčete	endoproteinasa	–
PR-8	Chitinasa z okurky	chitinasa III	Hevamin (latex) – kontaktní dermatitida Ziz m 1 (cicimek čínský) – orální alergický syndrom Cof a 1 (káva) – podráždění očí a dýchacích cest
PR-9	Peroxidasa vytvářející lignin z tabáku	peroxidasa	–
PR-10	PR-1 z petržele, Bet v 1, Mal d 1, Api g 1 a Dau c 1	podobná ribonuklease	Bet v 1 (pyl z břízy) – alergická rýma a astma Pru av 1 (třešeň), Mal d 1 (jablko), Api g 1 (celer) a Dau c 1 (mrkev) – orální alergický syndrom Gly m 4 (sója), Vig r 1 (fazole), Cor a 1 (lískový oříšek) a Cas s 1 (kaštan) – orální alergický syndrom
PR-11	Chitinasa typu V z tabáku	chitinasa	–
PR-12	Rs-AFP3 z ředkve	defensin	–
PR-13	THI2.1 z <i>Arabidopsis</i>	thionin	–
PR-14	Proteiny přenášející lipidy	shlukování fosfolipidů a mastných kyseliny	Par j 1 (plevel) – rýma a astma Pru p 3 (broskev), Mal d 3 (jablko), Pru av 3 (třešeň), Pru ar 3 (meruňka), Cor a 8 (lískový oříšek) a Zea m 14 (kukuřice) – orální alergický syndrom
PR-15	OxOa z ječmene	oxalát oxidasa	–
PR-16	OxOLP z ječmene	podobná oxalát oxidase	–
PR-17	PRp27 z tabáku	neznámá	–

## 2.3 Antimikrobiální peptidy

V rámci své obranné reakce rostliny produkují velké množství toxických molekul, včetně skupiny antimikrobiálních peptidů, které zabíjí patogeny interakcí s fosfolipidy a permeabilizací membrány. Druhá skupina zahrnuje peptidy penetrující buňky (cell-penetrating peptides), které jsou schopny zavádět do buňky celou řadu sloučenin, a to bez účasti specifických receptorů, pouze za pomoci interakce s membránovými fosfolipidy. Tyto dva druhy peptidů jsou aktivní proti různým typům mikroorganismů a představují jednu ze součástí nescifického obranného systému (Eudes a Chugh, 2008; Rivas *et al.*, 2010; Barbosa Pelegrini *et al.*, 2011).

Většina přírodních antimikrobiálních peptidů má délku 10-50 aminokyselin, velikost od 2 do 9 kDa, kladný náboj a obsahuje velké množství hydrofobních aminokyselin. Antimikrobiální peptidy jsou kódovány geny, které jsou buď konstitutivně exprimované nebo indukované po interakci rostliny s mikroorganismy a jejich metabolity, nebo buněčnými sloučeninami jako jsou butyrát nebo vitamíny (Schauber *et al.*, 2006; Lai a Gallo, 2009). Tyto peptidy jsou rozděleny do odlišných rodin hlavně podle aminokyselinové sekvence a počtu cysteinových zbytků. Na základě náboje se rostlinné antimikrobiální peptidy dělí na kationické a anionické (Lay a Anderson, 2005; Barbosa Pelegrini *et al.*, 2011).

Obranné peptidy spolu s antimikrobiálními peptidy představují základní složku vrozené rostlinné imunity a vyskytují se u všech popsaných kvetoucích rostlin. Četné výzkumné práce věnované antimikrobiálním proteinům a peptidům z nahosemenných rostlin prokázaly tzv. evoluční posloupnost těchto obranných molekul (Cheng a Cheng, 2015; Shah *et al.*, 2016).

I když je známo, že antimikrobiální peptidy obsahují pozitivně nabitě a hydrofobní aminokyselinové zbytky, korelace peptidové sekvence s biologickou aktivitou nebyla dlouho objasněna. Teprve poznání, že krátké syntetické antimikrobiální peptidy vyžadují rovnoměrné rozdělení kladných nábojů (aminokyseliny R a K) a hydrofobicity (aminokyseliny I, V, F, Y, W) umožnilo sestavení predikčního modelu s téměř 98% úspěšností (Mikut *et al.*, 2016). Nedávný pokrok v této oblasti umožnil i *de novo* navrhování analog antimikrobiálních peptidů. Výroba těchto analogů může být méně nákladná a současně tato analoga nemusí tak snadno podléhat

biologické inaktivaci nebo degradaci jako přirozeně se vyskytující peptidy (Beckloff *et al.*, 2007; Laursen *et al.*, 2015).

### **2.3.1 Obecné mechanismy účinků antimikrobiálních peptidů**

Souhrnný přehled mechanismu účinků antimikrobiálních peptidů je zobrazen na Obr. 1. Jedná se o různé typy/modely permeabilizace membrány (A-D) a další známé mechanismy (E-I):

A) kobercový model

B) prstencový model

C) model sudové skruže

D) agregační model

E) inhibice syntézy DNA bez destabilizace membrány (např. antimikrobiální peptidy buforin II, pleurocidin a dermaseptin)

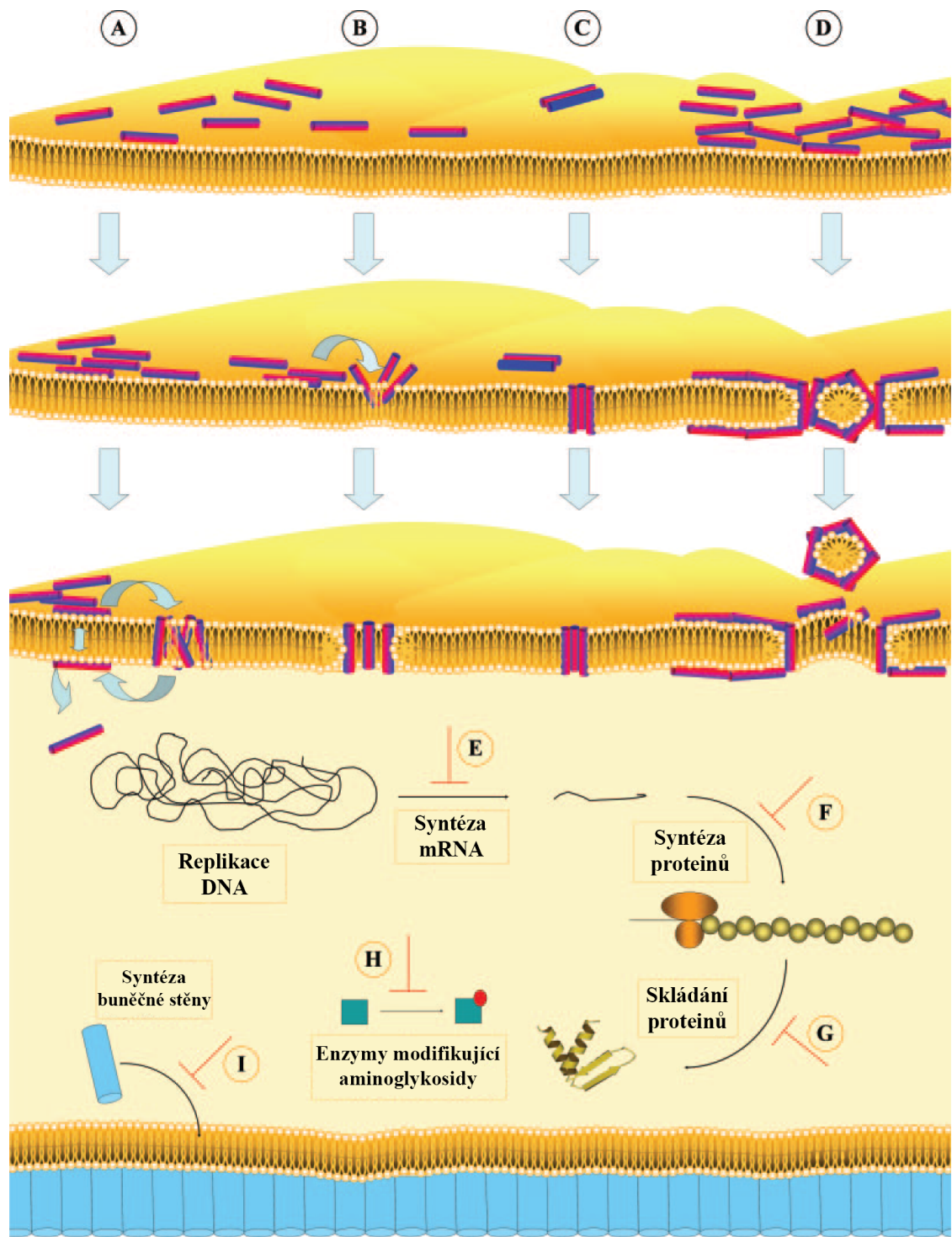
F) snížení rychlosti syntézy makromolekul (DNA/RNA/proteinů), interakce  $\text{Ca}^{2+}$  s calmodulinem (např. indolicidin a PR-39)

G) působení na jiné intracelulární procesy, například skládání proteinů

H) inhibice enzymů podílejících se na modifikaci aminoglykosidů

I) lantibiotika jako je např. nisin a mersacidin se mohou vázat na lipid II, který je nezbytný pro syntézu peptidoglykanu, a tím inhibovat jeho transglykosylaci

Jednotlivé mechanismy působení a typy interakcí jsou dále diskutovány.



Obrázek 1: Mechanismus účinků antimikrobiálních peptidů (převzato z Jenssen et al., 2006)

### **2.3.1.1 Průchod přes vnější membránu gramnegativní bakterie**

Kationický náboj peptidů vede k několikanásobně zvýšené akumulaci blízko negativně nabitých povrchů vnější membrány gramnegativní nebo buněčné stěny grampozitivní bakterie, které představují velice odlišné povrchy. Buněčná stěna grampozitivních bakterií je tvořena porézní 40-80 nm sítí, kterou antimikrobiální peptidy lehce prostupují (Malanovic a Lohner, 2016).

Naproti tomu, u gramnegativních bakterií mohou některé antimikrobiální peptidy rychle procházet přes vnější membránu mechanismem výměny náboje, kdy kationické peptidy soutěží s  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  ionty vázanými na lipopolysacharid. Tento mechanismus je případně posílen vazbou na vnější membránové proteiny (hypotéza self-promoted uptake). Peptidy pak mají přístup k buněčné stěně gramnegativních bakterií, jakož i k buněčné membráně a intracelulárním cílům (Anunthawan *et al.*, 2015).

### **2.3.1.2 Působení na bakteriální buněčnou stěnu**

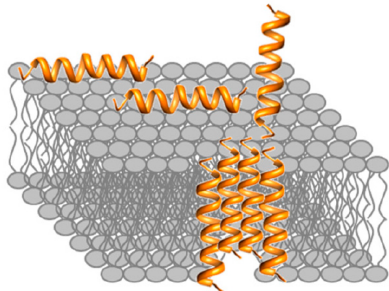
Nedávné experimenty s použitím fluorescenčně značených prób odhalily, že antimikrobiální peptidy nejsou distribuovány po celém povrchu buňky, ale jejich lokalizace je spíše omezena na místa spojená s buněčným dělením, přestavbou buněčné stěny nebo jejich sekrecí (Rashid *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2016). Tím mohou zasahovat do těchto procesů, nebo způsobit bakteriální lýzi. Například antimikrobiální peptid GL13K, který byl kovalentně imobilizován na povrchu titanu, způsobuje poškození buněčné stěny, které připomíná autolýzu u grampozitivní bakterie *Streptococcus gordonii* vyskytující se v dutině ústní (Chen *et al.*, 2014). Ačkoli krátké imobilizované peptidy pravděpodobně neproniknou přes buněčnou membránu, ani neprocházejí do buňky, ale umožňují studovat interakce, ke kterým dochází na povrchu buňky. Jak bylo zjištěno, především záporně nabitě složky buněčné stěny (včetně kyseliny teichoové a kyseliny lipoteichoové) představují vhodné cíle pro působení antimikrobiálních peptidů (Jenssen *et al.*, 2006).

### 2.3.1.3 Působení na bakteriální buněčnou membránu

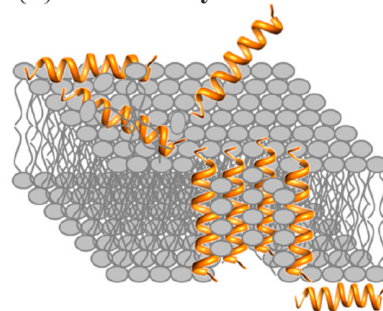
Jakmile antimikrobiální peptidy proniknou přes vnější bariéru (vnější membránu a buněčnou stěnu) může následovat interakce s plazmatickou membránou nebo cílí uvnitř buňky (Koprivnjak a Peschel, 2011; Malanovic a Lohner, 2016). V sekvenci kationických antimikrobiálních peptidů se obvykle vyskytuje strukturní korelace mezi pozitivně nabitými a hydrofobními aminokyselinovými zbytky, které jim dovolí zaujmout amfipatickou konformaci. Ta zajistí zvýšenou interakci se záporně nabitými povrchy, nebo dochází k vmezeření do bakteriální membrány. Vyšší záporný transmembránový potenciál uvnitř bakterie tyto elektrostatické interakce dále zesiluje. Na rozdíl od bakteriálních membrán je vnější vrstva eukaryotických membrán tvořena amfoterními lipidy, což částečně vysvětluje selektivitu antimikrobiálních peptidů k prokaryotickým buňkám (Wakabayashi *et al.*, 2017).

S interakcí antimikrobiálních peptidů s membránou jsou typicky spojené čtyři modely, a to prstencový, kobercový, agregační a model sudové skruže viz. Obr. 2. Každý z těchto modelů označuje jiný typ meziprojektu, který může vést k jednomu ze čtyř typů událostí – vytvoření přechodného kanálu, micelarizaci, rozpuštění membrány, nebo translokace přes membránu. Ve výsledku může peptid buď permeabilizovat membránu, nebo přes ni procházet do cytoplazmy bez jejího významného narušení. Působení antimikrobiálních peptidů tedy může být obecně kategorizováno jako membránové nebo nemembránové. Většina kationických antimikrobiálních peptidů, které byly dosud studované, byla charakterizována jako permeabilizující membránu. Je třeba ale poznamenat, že prakticky každý kationický amfifilní peptid způsobí porušení membrány v modelovém systému, pokud je použita dostatečně vysoká koncentrace (Zhang *et al.*, 2001; Patrzykat *et al.*, 2002).

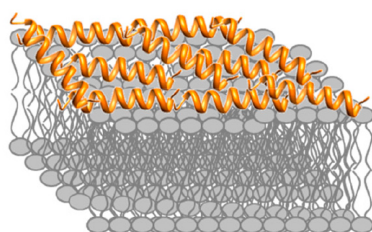
(a) Model sudové skruže



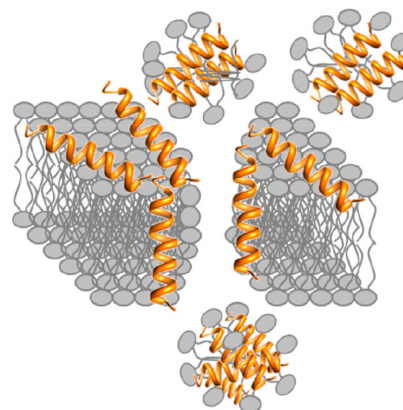
(b) Prstencový model



(c) Kobercový model



(d) Agregáčnı model



Obrázek 2: Mechanismy interakce antimikrobiálních peptidů s membránou (převzato z Kumar *et al.* 2018)

Několik různých modelů vysvětluje, jak po prvotním navázání antimikrobiálních peptidů dojde k průniku do bakteriální membrány a následné tvorbě transmembránových pórů, které způsobí permeabilizaci membrány. Amfipatická povaha antimikrobiálních peptidů představuje klíčovou vlastnost pro tento proces, protože hydrofobní oblasti jsou nezbytné pro přímou interakci s lipidovými složkami bakteriální membrány. Hydrofobní oblasti pak buď interagují s fosfolipidovými zbytky, nebo jsou otočeny do lumenu póru. Obecně lze říci, že tyto modely mohou vysvětlit tvorbu pórů antimikrobiálními peptidy s helikální strukturou, nicméně mechanismy využívané peptidy se strukturou beta skládaného listu, jako jsou defensiny, nebyly tak dobře prostudovány (Jenssen *et al.*, 2006).

#### **2.3.1.4 Intracelulární cíle**

Stále více studií poukazuje na to, že kromě interakce s buněčnou stěnou nebo buněčnou membránou mohou antimikrobiální peptidy působit intracelulárně např. inhibovat skládání proteinů, aktivitu některých enzymů, nebo působit na mitochondrie, syntézu proteinů a DNA/RNA) (Scocchi *et al.*, 2015). Nedávná analýza proteomu identifikovala celou řadu potenciálních intracelulárních proteinových cílů pro jednotlivé antimikrobiální peptidy. Schopnost jednotlivých peptidů interagovat s více cíli, nebo schopnost více peptidů interagovat s jedním cílem proto může omezit vznik bakteriální rezistence (Zhou *et al.*, 2015).

#### **2.3.2 Bakteriální rezistence**

Přestože se předpokládalo, že antimikrobiální peptidy nebudou iniciovat bakteriální rezistenci, díky své specifické interakci s bakteriální buněčnou stěnou, působení na specifické proteinové cíle přece jen otevírá možnost genetických mutací a následný vznik bakteriální rezistence. Je známo, že bakterie, které osídlují hostitelský organismus a některé patogenní bakterie mají schopnost koexistovat nebo překonat antimikrobiální peptidy hostitelského organismu. Některé obranné bakteriální mechanismy mohou také bránit před léčbou antimikrobiálními peptidy (Koprivnjak a Peschel, 2011). Mezi tyto mechanismy patří proteolytické štěpení antimikrobiálních peptidů, modifikace povrchového náboje, aktivní transport a zachycení pomocí povrchových proteinů a polysacharidů.

##### **2.3.2.1 Proteolytické štěpení antimikrobiálních peptidů**

Proteolytické štěpení může být snadno provedeno mnoha proteasami, které bakterie sekretují. Nahrazení některých nebo všech aminokyselin antimikrobiálního peptidu D-aminokyselinami bylo použito pro zvýšení odolnosti vůči proteolytické degradaci (De La Fuente-Núñez *et al.*, 2015). D-aminokyseliny se obvykle považují za zrcadlové obrazy L-enantiomerů. Tento předpoklad je však v rozporu s nedávnými simulacemi pentapeptidů, které odhalily, že isoleucin a tyrosin, které obsahují chirální uhlík na postranním řetězci, mohou mít několik konformací v závislosti na tom, zda je postranní řetězec ve stejné D-, nebo L- formě jako aminokyselina (Towse *et al.*, 2014).



### **2.3.2.2 Modifikace povrchového náboje**

Kationické antimikrobiální peptidy jsou přitahovány k záporně nabitě vnější membráně nebo bakteriální membráně. Ty, ale mohou snížit povrchový náboj a zvýšit hustotu pro omezení adheze peptidů. Bylo prokázáno, že v případě grampozitivních bakterií lze D-alanylací postranních zbytků kyseliny teichoové a lipoteichoové, které se nachází na povrchu buněčné stěny, snížit celkový záporný náboj a poskytnout tak relativní ochranu vůči antimikrobiálním peptidům (Koprivnjak a Peschel, 2011; Simanski *et al.*, 2013; Malanovic a Lohner, 2016). Gramnegativní bakterie mohou obdobně regulovat celkový náboj na svém povrchu modifikací lipopolysacharidů, které jsou součástí vnější membrány, a to sníženou fosforylací, substitucí sacharidu, nebo navázáním další molekuly lipidu (Jain a Darveau, 2010).

### **2.3.2.3 Aktivní transport**

Antimikrobiální peptidy, které působí intracelulárně, jsou náchylné k aktivnímu transportu, který je podobný transportu, jenž způsobuje bakteriální rezistenci u tradičních antibiotik (Koprivnjak a Peschel, 2011; Cole a Nizet, 2016). Imobilizované antimikrobiální peptidy, lze využít pro studium povrchově aktivních peptidů, které nepodléhají aktivnímu transportu pomocí pump (Chen *et al.*, 2014). To umožňuje navrhnout antimikrobiální peptidy odolné vůči bakteriálnímu effluxu, kdy jsou studované peptidy imobilizovány na nanočásticích/mikročástečkách (Reinhardt a Neundorf, 2016).

### **2.3.2.4 Zachycení pomocí povrchových proteinů a polysacharidů**

Bakterie typicky obklopuje biofilm, který se skládá z polysacharidů a omezuje tak přístup antimikrobiálních peptidů na buněčný povrch. Tento polymerní biofilm může způsobit elektrostatické odpuzování kationických peptidů a tím jim zabránit interakci s bakteriemi. Protože biofilmy je obtížné odstranit jakmile jsou bakterií vytvořeny, zaměřily se nedávné studie na peptidy specificky navržené tak, aby zabránily tvorbě biofilmu nebo eliminovaly stávající biofilm. Tyto peptidy specificky narušují buněčné mechanismy využívané bakteriemi pro tvorbu biofilmu, a tak napomáhají snížit bakteriální rezistenci (Daep *et al.*, 2010; De La Fuente-Núñez *et al.*, 2016).

## 2.4 Rostlinné antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy se vyskytují v různých formách, ačkoliv většina z nich jsou lineární peptidy z hmyzu, živočichů a rostlin. Nicméně, některé bakterie produkují polycyklické peptidy jako jsou antibiotika a některé cyklické peptidy mohou být také produkovány jak bakteriemi (bakteriociny), tak i rostlinami (cyklotidy) a živočichy (theta-defensiny). Většina rostlinných antimikrobiálních peptidů je bohatá na cystein což umožňuje tvorbu více disulfidových vazeb (obvykle dvou až šesti), které přispívají ke kompaktní struktuře a odolnosti vůči chemické a proteolytické degradaci (Tam *et al.*, 2015).

Rostlinné antimikrobiální peptidy sdílí několik společných vlastností s antimikrobiálními peptidy z mikroorganismů, hmyzu a živočichů. Mezi tyto vlastnosti patří prostorová struktura, kladný náboj a amfipatická povaha. Všechny tyto vlastnosti jsou spojeny s jejich obrannou rolí u rostlin a všechny, mimo vysokého výskytu cysteinu v aminokyselinové sekvenci, představují klíčové vlastnosti dvou rostlinných rodin antimikrobiálních peptidů - thioninů a rostlinných defensinů. Ostatní rodiny rostlinných antimikrobiálních peptidů působí na patogeny odlišným mechanismem (Tam *et al.*, 2015).

Klasifikace rostlinných rodin antimikrobiálních peptidů je do značné míry založena na jejich cysteinových motivech, které představují charakteristický vzorec s definovaným počtem zbytků aminokyselin, mimo cysteinu, mezi dvěma sousedními cysteiny. V současné době počet známých rostlinných antimikrobiálních peptidů již přesahuje tisíc a je předpoklad, že se toto číslo bude v budoucnu zvyšovat. Sekvenční analýza a genomický data mining za použití cysteinových motivů odhalily, že počet nových peptidů bohatých na cystein (označovaných jako CRP/cystein rich peptides) s charakteristikou antimikrobiálních peptidů se může dále zvyšovat (Silverstein *et al.*, 2007).

V modelových rostlinách jako je rýže nebo *Arabidopsis* mohou CRP představovat až 3 % z celkových exprimovaných proteinů. Podobně jako živočišné antimikrobiální peptidy, jsou antimikrobiální peptidy v rostlinách exprimovány buď konstitutivně, nebo indukovaně a velice často tkáňově specificky. Rostlinné antimikrobiální peptidy se navíc mohou vyvíjet s velmi variabilními sekvencemi. Tím vznikne rodina,

kteřá je v menší míře analogická s molekulární rozmanitostí podobná imunitnímu systému na bázi imunoglobulinu u obratlovců (Tam *et al.*, 2015).

Rostlinné antimikrobiální peptidy se dělí do rodin na základě podobnosti aminokyselinové sekvence, cysteinových motivů a výrazných vzorců disulfidových vazeb, které určují jejich terciární strukturu. Na základě těchto kritérií se rostlinné antimikrobiální peptidy dělí na thioniny, defensiny, heveinu podobné peptidy, knottinové peptidy, lineární a cyklické, proteiny přenášející lipidy,  $\alpha$ -vlásenky, snakiny, a další nezařazené peptidy bohaté na cystein (Tam *et al.*, 2015).

### 2.4.1 Thioniny

$\alpha$ - a  $\beta$ - thioniny představují jednu z rodin rostlinných antimikrobiálních peptidů, jedná se o kationické peptidy, o velikosti 45-48 aminokyselin, se třemi nebo čtyřmi disulfidovými vazbami (García-Olmedo *et al.*, 1998). Z počátku byly známé jako rostlinné toxiny, a to kvůli své toxicitě vůči bakteriím, houbám, rostlinným a živočišným buňkám, jakož i k larvám hmyzu (Kramer *et al.*, 1979; Evans *et al.*, 1989; Ebrahim-Nesbat *et al.*, 1989). První z rodiny thioninů  $\alpha$ -purothionin byl izolován z endospermu pšenice (Fernandez de Caleyá *et al.*, 1972).

Thioniny byly identifikovány u jednoděložných i dvouděložných rostlin a jsou exprimovány v různých tkáních jako jsou semena, listy a kořen. Expres thioninů může být indukována infekcí různými mikroorganismy a bylo prokázáno, že souvisí s uvolňováním hormonu methyljasmonátu po poranění rostliny nebo infekci (Andresen *et al.*, 1992; Epple *et al.*, 1995; Penninckx *et al.*, 1996). Thioniny jsou hydrofobní povahy a pravděpodobně vyvolávají toxicitu prostřednictvím membránových interakcí svými hydrofobními zbytky nebo pomocí kladně nabitého povrchu. Navrhovaný mechanismus toxicity je připisován lýzi buněčných membrán a je stále předmětem dalšího výzkumu (Florack a Stiekema, 1994; Hughes *et al.*, 2000). Stec a kolektiv navrhli strukturní model interakce thioninu s fosfolipidem, která vysvětluje solubilizaci a lýzi buněčných membrán (Stec *et al.*, 2004). Je ale také známo, že thioniny přímo interagují s membránovými lipidy a vytvářejí v nich kanálky (Richard *et al.*, 2005).

## 2.4.2 Rostlinné defensiny

Rostlinné defensiny jsou nejznámější a nejvíce zastoupenou skupinou antimikrobiálních peptidů. Jsou to kationické peptidy s velikostí 45-54 aminokyselin a obsahují čtyři až pět disulfidových vazeb (Pelegriani a Franco, 2005). Rostlinné defensiny mají různé biologické funkce, mezi něž patří antimykotická, antibakteriální a také inhibice  $\alpha$ -amylasy a trypsinu. Kromě antibakteriálních účinků se defensiny podílí také na odpovědi na biotický stres v průběhu růstu a vývoje rostlin (Gao *et al.*, 2000; Fujimura *et al.*, 2003). Do této rodiny patří více než 100 proteinů z různých rostlin včetně pšenice, ječmene, tabáku, ředkvičky, hořčice, *Arabidopsis*, bramboru, sóji, špenátu atd. (Padovan *et al.*, 2010). Defensiny byly identifikovány v celé řadě rostlinných orgánů - hlízách, listech, luscích a květech, přičemž většina byla identifikována v semenech a kořenech (Sharma a Lönneborg, 1996).

Mechanismus působení defensinů je spojen s jejich strukturou, kladným nábojem a amfipatickou povahou. Rostlinné defensiny se mohou navázat na mikrobiální membránu prostřednictvím interakcí se specifickým místem („receptorem“) jako např. defensin Rs-AFP2, Dm-AMP1 (Thevissen *et al.*, 2000; Thevissen *et al.*, 2004; Lay a Anderson, 2005). Jejich vazba vede k přítoku nebo odtoku kladně nabitých iontů, jako jsou  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{K}^+$  (Thevissen *et al.*, 1996; Thevissen *et al.*, 1999). Také defensin NaD1 nezpůsobuje permeabilizaci prostřednictvím nespécifické inzerce do membrán, ale pravděpodobně interaguje s buněčnou stěnou přes specifický receptor (Van Der Weerden *et al.*, 2010).

## 2.4.3 Heveinu podobné peptidy

Jedná se o záporně nabité peptidy o velikosti 29-45 aminokyselin se třemi až pěti disulfidovými vazbami. Aminokyselinová sekvence je bohatá na glycin a obsahuje konzervované aromatické zbytky, které se nachází v heveinové doméně lektinů. Heveinové domény se váží na chitin, který představuje jejich primární cíl (Beintema, 1994; Jiménez-Barbero *et al.*, 2006; Kini *et al.*, 2015). Hevein, který byl poprvé identifikován jako nejhojněji vyskytující se protein v latexu kaučukovníku brazilského (*Hevea brasiliensis*), vykazuje silnou antimykotickou aktivitu *in vitro* (Archer, 1960; Van Parijs *et al.*, 1991). Hevein a jemu podobné peptidy inhibují růst hub, které obsahují chitin a chrání tak rostliny před napadením celé řady

houbových patogenů (Beintema, 1994; Gidrol *et al.*, 1994). Jako doména vázající se na chitin se heveinová doména také nachází v několika rostlinných lektinech, přírodních analozích heveinu (pseudohevein, aglutinin z pšeničných klíčků) a dalších antimikrobiálních peptidech (Peumans a Van Damme, 1998; Asensio *et al.*, 2000).

Hevein, který obsahuje doménu schopnou vázat se na chitin, představuje vynikající model pro studie interakcí peptidů se sacharidy. Tyto interakce jsou pravděpodobně zprostředkované vodíkovými vazbami a van der Waalsovými silami, kdy dochází k interakci mezi hydrofobními C-H skupinami sacharidů s elektronovými systémy aromatických aminokyselin heveinu (Trp21, Trp23 a Tyr30). Právě aromatické aminokyseliny hrají klíčovou roli ve vazbě na chitin, což bylo pozorováno jejich mutagenézí (Muraki, 2005; Chávez *et al.*, 2005).

#### **2.4.4 Knottinové peptidy**

Knottiny patří do skupiny rostlinných antimikrobiálních peptidů, které mají velikost okolo 30 aminokyselin. Řadí se mezi ně inhibitory  $\alpha$ -amylasy, trypsinu, karboxypeptidas a cyklotidů. Obecně patří mezi nejmenší antimikrobiální peptidy bohaté na cystein a mají široké spektrum funkcí. Typicky obsahují 6 cysteinů s konzervovanými disulfidovými vazbami (Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 a Cys3-Cys6), které tvoří cysteinový uzel, ale cysteinové motivy se liší mezi různými podtřídami. Defensiny i heveiny také obsahují motiv cysteinových uzlů, ale liší se v rozestupech mezi cysteiny. Pro tuto rodinu je typická velmi široká škála bioaktivních účinků, vykazují např. funkce podobné hormonům, inhibují různé enzymy, mají cytotoxickou, antimikrobiální a insekticidní aktivitu (Pallaghy *et al.*, 1994).

Knottinové peptidy byly objeveny jako inhibitory proteas, které měly společné cysteinové uzly, podle kterých byly pojmenovány (Rees a Lipscomb, 1982). Jako rodina představují největší skupinu rostlinných peptidů, které jsou spojeny s antimikrobiální aktivitou. Překonávají defensiny jak v počtu forem, tak i sekvenční rozmanitostí. Obecně jsou knottinové peptidy s funkcí lýze membrán amfipatické povahy, stejně jako ostatní antimikrobiální peptidy, což představuje nezbytnou vlastnost pro membránovou interakci. Naproti tomu u silně kationických peptidů jako např. rostlinných defensinů a thioninů velice pravděpodobně nedochází

k silné elektrostatické interakci s membránami, protože se běžně vyskytují při fyziologickém pH jako neutrální nebo jen slabě nabitě (Henriques a Craik, 2010).

### 2.4.5 $\alpha$ -vlásenky

Rodina  $\alpha$ -vlásenek se skládá z rostlinných obranných peptidů bohatých na lysin a arginin. Pro  $\alpha$ -vlásenky je typický motiv C1XXXC2-(X)<sub>n</sub>-C3XXXC4, který se vyskytuje v jejich primární sekvenci. Sekundární struktura představuje motivy helix-otočka-helix nebo  $\alpha$ 1-otočka- $\alpha$ 2, které mají oba alfa helixy orientované antiparalelně a jsou navíc stabilizovány dvěma disulfidovými vazbami v terciární struktuře. Tato struktura alfa vlásenek je velice neobvyklá u rostlinných antimikrobiálních peptidů a strukturně se odlišuje od thioninů, defensinů a knottinů. Dosud bylo objeveno pouze omezené množství antimikrobiálních peptidů z rodiny  $\alpha$ -vlásenek jako např. MBP-1, peptidy MiAMP2, Ec-AMP1, VhT1, BWI-2c a peptidy Tk-AMP-X (Tam *et al.*, 2015).

MBP-1 je 33 aminokyselin velký peptid, který byl izolován z kukuřičných jader a inhibuje klíčení spor a prodlužování hyf u několika patogenních hub a bakterií *in vitro* (Duvick *et al.*, 1992). Peptidy MiAMP2 byly izolovány z jader ořechů *Macadamia integrifolia* a inhibují různé rostlinné patogenní houby *in vitro* (Utkina *et al.*, 2013).

### 2.4.6 Proteiny přenášející lipidy

Rostlinné proteiny přenášející lipidy (LTP - lipid transfer proteins) spolu se snakinou představují dvě rodiny antimikrobiálních peptidů bohatých na cystein s molekulovou hmotností nad 7 kDa. LTP jsou kationické peptidy o velikosti přibližně 70-90 aminokyselin s osmi cysteiny. Od ostatních peptidů této skupiny se liší svou aktivitou, která spočívá v přenosu širokého spektra lipidů, a to včetně mastných kyselin (C10-C14), fosfolipidů, prostaglandinu B a acyl-CoA. LTP mohou inhibovat růst plísní některých bakteriálních patogenů a jsou zapojeny do ochranného mechanismu rostlin (Kader, 1996; Carvalho a Gomes, 2007; Sels *et al.*, 2008).

Z počátku se vědci domnívali, že LTP usnadňují přenos lipidů mezi membránami vezikul nebo organel *in vivo* (Kader, 1975; Kader *et al.*, 1984). Pozdější objevy však ukázaly, že LTP jsou extracelulární proteiny nacházející se na povrchu buněčné stěny, což dělá z intracelulárního přenosu lipidů nepravděpodobný mechanismus (Thoma *et al.*, 1993; Pyee *et al.*, 1994). LTP proteiny tak způsobují spíše permeabilizaci membrány v patogenech a nikoli v hostitelských buňkách (Cammue *et al.*, 1995; Regente *et al.*, 2005). I když studie struktury těchto proteinů zjistily, že LTP mohou uzavřít lipidové molekuly do své hydrofobní dutiny, detailní mechanismus antimikrobiální aktivity, která je zprostředkována transportem lipidů, zůstává zatím neobjasněn (Yeats a Rose, 2008).

#### **2.4.7 Snakiny**

Snakin-1 (63 aa) a snakin-2 (66 aa) jsou proteiny s 12 cysteiny, které byly izolovány z hlíz brambor (*Solanum tuberosum*). Bylo zjištěno, že jsou účinné proti houbovým a bakteriálním patogenům při koncentraci 1-20  $\mu\text{M}$ . Snakiny indukují agregaci jak grampozitivních, tak gramnegativních bakterií a proto patří mezi konstitutivní i indukovatelné mechanismy ochrany rostlin (Porto a Franco, 2013).

### **2.5 Příprava transgenních rostlin**

Pochopení přirozených imunitních reakcí rostlin v kontextu genetického inženýrství představuje užitečný přístup pro vývoj nových odrůd plodin se zvýšenou odolností vůči škůdcům a patogenům, jakož i nových léčiv, která jsou produkována rostlinami (Jenssen *et al.*, 2006). To vytváří nové možnosti pro kvantitativní a kvalitativní zvýšení zemědělské produkce a zlepšení zdraví populace (Hancock a Sahl, 2006). Použitím vyhledávacích strategií založených na modelech sekvenčních motivů pro různé rostlinné peptidy bylo identifikováno přibližně 13 000 rostlinných genů, které kódují peptidy se společnými rysy v genomech jednoděložných a dvouděložných rostlin. Mezi identifikované geny patří výše popsané rostlinné antimikrobiální peptidy, které představují až 3 % celkových genů každého rostlinného druhu (Silverstein *et al.*, 2007).

Antimikrobiální peptidy jsou díky širokému spektru antimikrobiální aktivity a nízké toxicitě vůči savcím buňkám považovány za novou generaci účinných léčiv, která dokáže řešit stále rostoucí problém rezistence vůči antibiotikům,

případně tradiční antibiotika nahradit. Převážná většina výzkumů antimikrobiálních peptidů se zaměřila na aktivitu těchto peptidů vůči rezistentním kmenům patogenů. Data, která byla získána při těchto studiích vyvolala velký zájem po rozšíření aplikace antimikrobiálních peptidů do oblasti imunizace rostlin a vytvoření nových odolných transgenních rostlin (Yevtushenko a Misra, 2012).

Rekombinantní exprese antimikrobiálních peptidů v baktériích a kvasinkách je spojena s mnoha omezeními, mezi něž patří inhibice růstu hostitele, nestabilita a neschopnost provést správné posttranslační modifikace (Chahardoli *et al.*, 2018). Použití fúzních proteinů do jisté míry představuje řešení těchto problémů a vyvolalo v posledním desetiletí velký zájem ve výzkumu. Transgeny jsou vloženy do genomu organismu pomocí molekulárních technik – např. transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Transgenní rostliny jsou následně analyzovány na rezistenci vůči zkoumanému patogennímu organismu (Yevtushenko a Misra, 2012). Použití vyšších rostlin je výhodnější z důvodu nižších nákladů na produkci, snadnější manipulaci a rychlejší rozšíření, tzv. „scale-up“ produkce (Yevtushenko a Misra, 2012; Chahardoli *et al.*, 2018).

Rostlina tabáku (*Nicotiana tabacum*) je nejvíce používaná pro transientní expresi proteinů. Důležitou výhodou představuje velké množství biomasy, která může být rychle vyprodukována relativně jednoduchou metodou transformace (Yevtushenko a Misra, 2012). Další expresní systémy zahrnují zeleninu (brambory, rajčata, zelí), ovoce (např. citrusové plody, banány) a obiloviny (např. pšenice, rýže, ječmen) (Sinha a Shukla, 2018).

Antimikrobiální peptidy, které byly exprimovány v transgenních rostlinách, vykazovaly vysokou antimikrobiální aktivitu a byla dále zkoumána jejich schopnost napomáhat rostlině odolávat vůči bakteriálním a houbovým chorobám. Přehled je zobrazen v Tab. 2.

Transgenní exprese rostlinného defensinového genu z *Jatropha curcas* (JcDef) zvýšila rezistenci tabáku vůči *Rhizoctonia solani* (Wang *et al.*, 2017). Podobně overexprese antimikrobiálního proteinu PscAFP v transgenním tabáku výrazně zvýšila odolnost této rostliny vůči chorobám, včetně úplné tolerance vůči *Ralstonia solanacearum* a *Alternaria alternata* u některých transgenních linií (Luo *et al.*, 2017).



*Tabulka 2: Přehled antimikrobiálních peptidů exprimovaných v rostlinách (převzato z Sinha a Shukla 2019)*

Antimikrobiální peptid	Původ	Transgenční expresní systém	Funkce transgenční linie, nebo antimikrobiálního peptidu
Defensin z květů	<i>Petunia hybrida</i>	<i>Mussa</i> spp. (banán)	transgenční linie vykazovaly statisticky významnou odolnost vůči infekci vláknité houby <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i>
Snakin-2 (SN2)	–	<i>Solanum lycopersicum</i> (rajče)	transgenční linie vykazovaly zvýšenou toleranci k <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Cmm)
Lactoferricin B	skot	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabák)	transgenční rostliny vykazovaly zvýšenou rezistenci vůči bakteriálním a houbovým onemocněním
PmAMP1	<i>Pinus monticola</i> (borovice)	<i>Brassica napus</i> (řepka)	Expres v rostlinách zapříčinila zvýšenou ochranu proti <i>Alternata brassicae</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i> a <i>Sclerotinia sclerotium</i>
katelicidin (hCAP18/LL-37)	člověk	<i>Brassica rapa</i> (čínské zelí)	transgenční rostliny vykazovaly různý stupeň rezistence vůči bakteriálním a houbovým patogenům
Antimikrobiální peptid SN1	<i>Solanum tuberosum</i> (brambor)	<i>Triticum aestivum</i> (pšenice)	transgenční pšenice vykazovala zvýšenou rezistenci vůči <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>
Thanatin(S)	<i>Podisus maculiventris</i> (hmyz)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	transgenční rostliny získaly rezistenci vůči fytopatogenním houbám a bakteriím
SP1-1	syntéza <i>de-novo</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>	antimikrobiální aktivita rekombinantně produkovaného SP1-1 byla jen mírně vyšší oproti syntetickému peptidu
Protegrin 1 (PG-1)	prasečí leukocyty	<i>Nicotiana tabacum</i> s nízkým obsahem alkaloidů	inhibice růstu několika lidských bakteriálních a houbových patogenů
Cecropin A	syntetický peptid	<i>Oryza sativa</i> (rýže)	transgenční semena s cecropinem A vykazovaly rezistenci vůči houbovým a bakteriálním patogenům
antimikrobiální peptid z pro-SmAMP2 genu	ptačinec prostřední	<i>Solanum tuberosum</i>	antimikrobiální aktivita prokázána zvýšenou rezistencí vůči fytopatogenům
D2A21	syntetický peptid	<i>Carrizo citrange</i> (citrusové ovoce)	transgenční rostliny exprimující D2A21 vykazovaly statisticky významné zvýšení rezistence vůči infekci bakterií rodu <i>Xanthomonas</i>
Lfchimera	tur domácí	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabák)	extrakt celkových proteinů vykazoval inhibici růstu fytopatogenních bakterií
LL-37	člověk	<i>Hordeum vulgare</i> L. (ječmen)	potvrzena antimikrobiální aktivita rekombinantního katelicidinu

U bramboru (*Solanum tuberosum*) vědci zjistili, že transgenní rostliny exprimující *msrA3* nejenže vykazují odolnost vůči patogenu *Fusarium solani*, ale exprese také zpomalila vývoj květních pupenů a prodloužila tak vegetativní fázi této rostliny (Goyal *et al.*, 2013). Rostliny exprimující protein *msrA3* vykazovaly také odolnost vůči dalším houbovým a bakteriálním patogenům (Osusky *et al.*, 2004).

## 2.6 Exprese antimikrobiálních peptidů v rostlinách

Důležitou strategií pro zvýšení odolnosti rostlin vůči chorobám je exprese genů kódujících antimikrobiální proteiny v rostlinách, které jsou rozpoznávány rostlinným obranným systémem a vyvolávají účinnou imunitní odpověď proti patogenním mikroorganismům (známé jako elicitory). Příkladem dobře prostudovaného elicitoru jsou PAMP, avirulentní efekторы, proteiny Hrp (Salomon a Sessa, 2012).

Zřejmou výhodou při použití antimikrobiálních peptidů je jejich *in situ* produkce za použití molekulární biotechnologie. Overexprese transgenů, které kódují rostlinné antimikrobiální proteiny, se ukázaly jako úspěšný přístup pro ochranu rostlin před chorobami způsobenými mikroorganismy (Carmona *et al.*, 1993; Molina a García-Olmedo, 1997; Gao *et al.*, 2000). K dnešnímu dni byla analyzována struktura a vlastnosti řady antimikrobiálních peptidů. U většiny z nich byl studován efekt heterologní exprese na rezistenci rostlin vůči bakteriálním a houbovým fytopatogenům.

### 2.6.1 Výběr vhodného promotoru

Většina pokusů o zvýšení odolnosti rostlin konstitutivní expresí genů, souvisejících s geny spojenými s rostlinnou imunitou, měla ale za následek negativní ovlivnění růstu a vývoje rostlin, což se projevilo i sníženým výnosem. Tato skutečnost se dá připisat rozsáhlému energetickému vyčerpání rostliny kvůli overexpresi obranných genů (Eulgem *et al.*, 1999). Proto je zásadní přísně kontrolovat načasování a lokalizaci exprese transgenů, aby se snížily škodlivé vedlejší účinky na růst a výnos rostlin. Použití promotorů reagujících na patogen k řízení exprese transgenů představuje slibnou strategii pro omezení nežádoucích účinků konstitutivní exprese na rostlinu.

Je známo jen několik patogenem indukovaných promotorů, které byly použity pro obranu vůči bakteriálním a plísňovým chorobám (Gurr a Rushton, 2005), a to i přes to, že exprese pod těmito promotory pro zvýšení odolnosti rostlin vůči chorobám byla navržena již na počátku 90. let minulého století (de Wit, 1992).

### **2.6.1.1 Vlastnosti vhodného promotoru**

Výše popsané problémy s velkou pravděpodobností souvisí s mnoha důležitými vlastnostmi, kterými by měl promotor reagující na napadení patogenem disponovat:

(Salomon a Sessa, 2012).

- 1) rychlá indukce exprese po detekci patogenu pro zahájení obranného mechanismu před rozšířením patogenu do sousedních tkání a objevení příznaků infekce
- 2) minimální konstitutivní transkripční aktivita v nepřítomnosti patogenu, pro zajištění exprese pouze během napadení patogenem
- 3) schopnost reagovat na různé potenciální patogeny pro dosažení rezistence vůči širokému spektru patogenů
- 4) musí být inertní vůči procesům, které jsou aktivovány transgenem, aby se zabránilo nekontrolovatelnému šíření obranné reakce v rostlině
- 5) musí být inertní vůči jiným stresovým podmínkám než napadení patogenem pro zajištění specifity biologických podnětů

Předpokládá se, že i když je k dispozici velmi málo promotorů, které splňují tyto požadavky, studie genové exprese a další genomické přístupy povedou k odhalení vhodných promotorů specificky reagujících na daný patogen (Salomon a Sessa, 2012). Alternativou pro omezení energetických nákladů rostliny pro konstitutivní expresi transgenů je použití promotorů, které řídí expresi do specifických pletiv nebo stádií životního cyklu rostlin, které jsou více náchylné na infekci patogenem (Kovalchuk *et al.*, 2010).

### **2.6.1.2 Cílená exprese za použití specifických promotorů**

Cílenou expresi ve specifických tkáních je možné dále kombinovat s indukcí exprese patogenem. Na základě rozsáhlých znalostí mechanismů šíření patogenů v zemědělských rostlinách by mělo být v ideálním případě možné cílit expresi transgenu pouze na pletiva, která přichází přímo do kontaktu s patogenem v počátečních stádiích infekce. Taková strategie by rostlině měla umožnit zastavit šíření patogenu z místa infekce. Zatím ale jiná pletiva, která nejsou pod přímým útokem patogenu, fungují dále bez overexprese transgenu, která by rostlinu jinak vyčerpávala. Další novou možností exprese transgenu je exprese ve specifickém stádiu vývoje rostliny, ve kterém je rostlina nejvíce náchylná vůči infekci patogenem. To by umožnilo rostlině odolávat infekci dokud nevzniknou endogenní bariéry, aniž by bylo nutné energeticky vyčerpávat rostlinu po celou dobu jejího života (Gurr a Rushton, 2005).

Důležitou alternativou k nativním promotorům jsou syntetické promotory, které jsou předmětem současného výzkumu. Kombinace různých regulací mohou rostlině poskytovat lepší kontrolu nad přechodnou expresí transgenu, tkáňovou specifitou a odolností vůči širšímu spektru patogenů (bakteriálních nebo houbových) (Rushton *et al.*, 2002).

### **2.6.1.3 Promotory reagující na patogen**

Promotory reagující na patogen představují užitečný nástroj pro řízení exprese transgenů, a to jak lokalizací, tak i časově. Tyto promotory byly během desítek let charakterizovány a studováno jejich možné využití pro vývoj nových kultivarů rostlin odolných vůči chorobám. Mezi nimi je rýžový promotor genu PBZ1, který kóduje intracelulární PR protein (Midoh a Iwata, 1996). Protein PBZ1 se účastní systémových reakcí, které jsou aktivovány v rýži, chemickým činidlem probenazolem, který je široce používán v zemědělství pro ochranu rostlin proti houbě *Magnaporthe grisea* a bakteriálnímu patogenu *Xanthomonas oryzae* (Midoh a Iwata, 1996; Kang *et al.*, 2010). Sledováním akumulace mRNA a PBZ1 bylo zjištěno, že promotor genu PBZ1 je indukován infikováním rostliny houbou nebo ošetření různými sloučeninami, které vyvolávají systémovou rezistenci, ale nesouvisí s poraněním rostlinných tkání (Midoh a Iwata, 1996).

Dalším dobře charakterizovaným patogenem indukovaným promotorem je Pgst1, který řídí expresi PR genu v *Solanum tuberosum*. Tento promotor je aktivován v raných stádiích bramborové infekce plísní *Phytophthora infestans*, ale není aktivní při reakcích na abiotický stres (Martini *et al.*, 1993). Tento promotor byl také charakterizován u jabloně, kde se ukázalo, že udržuje schopnost rostliny reagovat na patogen, i když vykazuje v rostlině nízké hladiny exprese po infekci houbou *Venturia inaequalis* a bakterií *Erwinia amylovora* (Malnoy *et al.*, 2006).

V nedávné studii byl navržen promotor GER4c patřící do genového kladru kódujícího germin-like protein jako možný biotechnologický nástroj pro navržení specificky lokalizovaných, patogenem regulovaných rezistencí v transgenních obilovinách. Tento promotor zprostředkovává expresi v epidermálních pletivech a je aktivován několika různými patogeny v ječmeni (Himmelbach *et al.*, 2010).

#### **2.6.1.4 Další vhodné promotory**

Mezi další orgánově specifické a stresem indukované promotory patří defensinové proteiny z rýže a pšenice. Jejich specifická prostorová a časová indukce exprese ve vyvíjejících zrnech a klíčících semenech z těchto promotorů dělá vhodné kandidáty pro cílenou expresi transgenů v obilninách (Kovalchuk *et al.*, 2010).

#### **2.6.2 Problémy při expresi antimikrobiálních peptidů v rostlinách**

Jedním z problémů při transgenní expresi peptidů je jejich nízká stabilita, která je způsobená především jejich malou velikostí a náchylností k proteolytické degradaci. U některých studií, ve kterých nebyl potvrzen ochranný účinek peptidů, může problém spočívat v různé rychlosti degradace antimikrobiálních peptidů endogenními peptidasami (Owens a Heutte, 1997).

Rozdíly ve stabilitě jsou zřejmě způsobeny rozdíly v peptidové struktuře a druhem rostliny, ve které je peptid exprimován. Proto je zapotřebí optimalizovat strategie produkce za účelem zvýšení stability antimikrobiálních peptidů. Modelování struktury peptidů a vhodný návrh konstruktů patří mezi efektivní metody používané pro zvýšení stability bez negativního ovlivnění aktivity těchto peptidů. Další alternativou je zacílení peptidu do specifického místa, ve kterém se předpokládá, že bude aktivita proteas nízká.

Zajímavým přístupem je také napodobení rostlinných systémů pro transport nízkomolekulárních peptidů (Osusky *et al.*, 2000; Osusky *et al.*, 2004; Osusky *et al.*, 2005).

## **2.7 Využití rostlin jako bioreaktorů pro produkci antimikrobiálních peptidů**

Produkce antimikrobiálních peptidů v rostlinách se využívá především pro dva hlavní účely, a to ochrana rostlin a molekulární farmažení. Různé rostlinné expresní platformy od kultury buněk nebo tkání až po transgenní rostliny nabízí rozličné možnosti produkce. Transgenní rostliny poskytují nízkou nákladovou a efektivní platformu pro produkci rekombinantních proteinů a produkci lze snadno několikanásobně zvýšit. Tyto systémy jsou velmi nadějně, protože nesdílí nevýhody jiných systémů pro expresi proteinů. Mezi hlavní výhodu rostlinných systémů bezpochyby patří vysoké výtěžky, kvalita a homogenita rekombinantního proteinu. Navíc v rostlinném expresním systému lze dosáhnout správné skládání proteinů, glykosylace a schopnost tvořit disulfidové můstky, které jsou klíčové pro aktivitu antimikrobiálních peptidů (Holásková *et al.*, 2015).

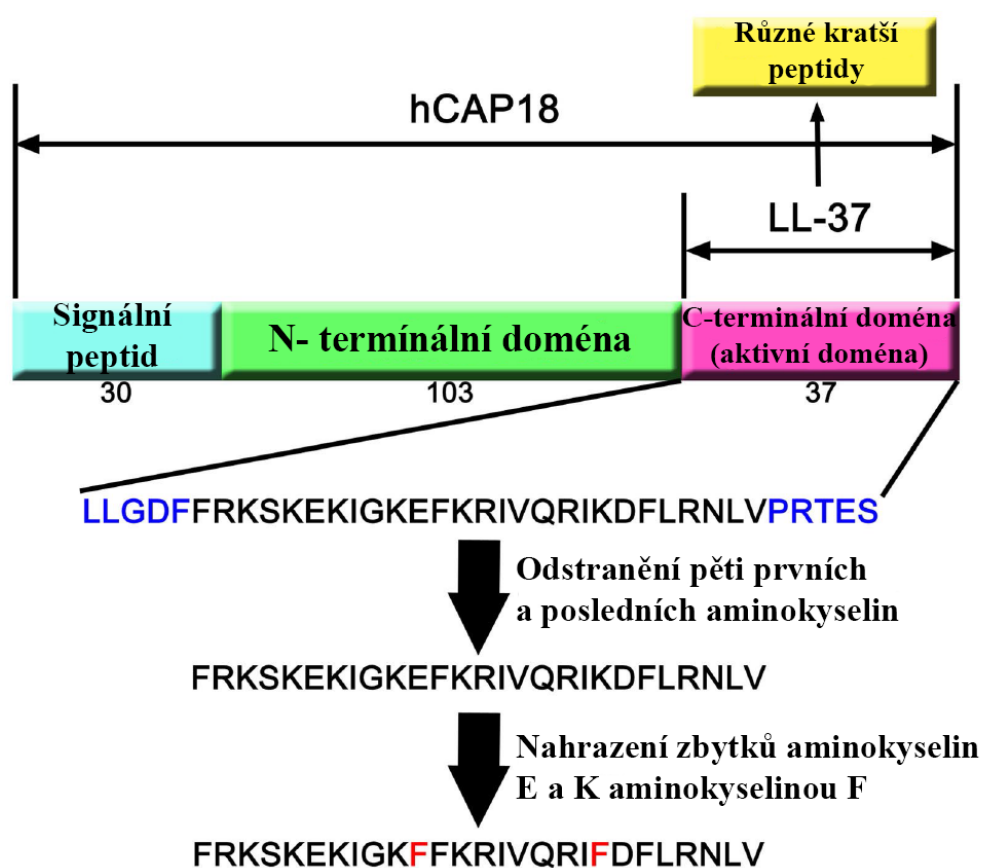
### **2.7.1 Lidský katelicidin**

Lidský katelicidin, který je součástí vrozeného imunitního systému je jedním ze slibných kandidátů pro nové léčivo. Zejména vývoj nízkonákladové metody pro produkci je klíčovým problémem, který je nutno adresovat před jeho použitím v medicíně. V nové studii Mgr. Holáskové, Ph.D. a kol. byl popsán slibný postup pro produkci rekombinantního katelicidinu fúzovaného s různými proteinovými značkami pro akumulaci a následnou purifikaci katelicidinu v endospermu ječmene (Holásková *et al.*, 2018)

V lidské cDNA myeloidní kostní dřeni byl nalezen pouze jeden katelicidin, který byl později izolován z neutrofilů (Agerberth *et al.*, 1995). Lidský katelicidin vzniká jako 18 kDa pre-protein, který je také označován jako hCAP18 (Cowland *et al.*, 1995; Larrick *et al.*, 1996). Pre-protein hCAP18 se skládá ze signálního aminopeptidu (30 aminokyselin), N-terminální (103 aminokyselin) a C-terminální domény (37 aminokyselin). C-terminální doména vykazuje antimikrobiální aktivitu

a tato aktivní doména se nazývá LL-37, podle toho, že obsahuje sekvenci 37 aminokyselin, začínající dvěma leuciny. Schéma složení LL-37 viz. Obr. 3. Řada studií odhalila, že kratší peptidy, které vzniknou odstraněním několika aminokyselin, vykazují také antimikrobiální aktivitu. Navíc, nahrazení některých aminokyselinových zbytků, může tuto aktivitu značně zvýšit (Kuroda *et al.*, 2015).

LL-37 má kladný náboj při fyziologickém pH, hydrofobní N-terminální doménu a zaujímá strukturu alfa-helixu, která je nejvýraznější v přítomnosti negativně nabitých lipidů. LL-37 je vytvořen z C-terminální domény prekursoru hCAP18 proteolytickým štěpením. Tento prekursor ze specifických neutrofilových buněk je štěpen pomocí serinových proteas, a to zejména proteinasou 3 (Johansson *et al.*, 1998). Serinové proteasy enzym SCTE a SCCE jsou zodpovědné za aktivaci prekursoru na povrchu kůže a ovlivňují další zpracování na menší peptidy s alternativní biologickou aktivitou (Yamasaki *et al.*, 2006).



Obrázek 3: Schéma složení pre-proteinu hCAP18 a jeho štěpení. Převzato z Kuroda *et al.*, 2015

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Biologický materiál**

Chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* TOP 10

Elektrokompetentní buňky *Escherichia coli* TOP 10

Expresní buňky *Escherichia coli* BL21 STAR-DE3

Elektrokompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* GV 3101

Semena *Nicotiana benthamiana*

Semena *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Col-0*

#### **3.1.2 Chemikálie**

Acetonitril LC-MS grade HiPerSolv Chromanorm® (VWR™)

Acetosyringon (Sigma-Aldrich)

Agar (Himedia)

Agarosa (Sigma-Aldrich)

Akrylamid (Sigma-Aldrich)

Albumin Standard (Thermo Scientific)

Alkalická fosfatasa (Thermo Scientific)

APS (Fluka)

Autoradiografický film Lumi-Film (Roche)

Bis-Tris 4-12% protein gel NuPAGE™ (Thermo Scientific)

Bis-Tris BioXtra (Sigma-Aldrich)

Chloroform:isoamylalkohol (Sigma-Aldrich)

Citronan sodný (LachNer)

cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva)

Defoamer (Sartorius)

Deionizovaná voda

Dusičnan stříbrný (LachNer)

EDTA (Roche)



Elektrodový pufr pro SDS-PAGE MES 20x NuPAGE™ (Thermo Scientific)  
Enterokinasa (NEB)  
Ethanol (LachNer)  
Ethidium bromid (NeoLab)  
Formaldehyd (LachNer)  
Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme Mix (Thermo Scientific)  
Gentamicin (Duchefa)  
Glycerol (LachNer)  
HisPur™ Cobalt Superflow Agarose (Thermo Scientific)  
HisPur™ Ni-NTA Superflow Agarose (Thermo Scientific)  
Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich)  
Hydrogenuhlíčan amonný (Merck)  
Hydroxid sodný (Penta)  
Hygromycin B (Sigma-Aldrich)  
Chemiluminiscenční substrát Clarity Western ECL(Bio-Rad)  
Chlorid hořečnatý (LachNer)  
Chlorid nikelnatý (LachNer)  
Chlorid sodný (LachNer)  
Chlorid Vápenatý bezvodý (Penta)  
Chlornan sodný 12% roztok (Merck)  
Imidazol (Roth)  
IPTG (Duchefa)  
Isopropanol (LachNer)  
Kalibrační roztoky pro pH metr (Hamilton)  
Kanamycin monosulfát (Duchefa)  
Kit pro izolaci DNA QIAprep Spin Minniprep Kit (QIAGEN)  
Kvasničný extrakt (Sigma-Aldrich)  
Kyselina citronová (LachNer)  
Kyselina chlorovodíková (LachNer)  
Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich)  
Kyselina mravenčí LC-MS grade HiPerSolv Chromanorm® (VWR™)  
Kyselina octová (LachNer)

Kyselina tricfluoroctová (Sigma-Aldrich)  
MES (Duchefa)  
Methanol (LachNer)  
Milli-Q voda  
Murashige and Skoog medium s vitamíny (Duchefa)  
*N, N'*-metylenbis(akrylamid) (Sigma-Aldrich)  
NTA Agarose (QIAGEN)  
Phytigel™ (Sigma-Aldrich)  
Plazmidy a vektory: pENTR 3C, pGWB 17 (Thermo Scientific)  
PMSF – Phenylnmethylsulfonyl fluoride (Roche)  
Polymerasa GoTaq® G2 (Promega)  
Polymerasový pufr GoTaq® (Promega)  
Povrchově aktivní činidlo Silwet L-77 (Lehle Seeds)  
Primární protilátka proti LL-37 – myší, monoklonální (Santa Cruz Biotechnology)  
Proofreading DNA polymerasa Phusion® DNA polymerase a 5x reakční pufr (NEB)  
Regenerační SOC medium (NEB)  
Restrikční enzymy (NEB)  
Restrikční pufr 1.1, 2.1, 3.1, Cut Smart (NEB)  
Rifampicin (Duchefa)  
Roztok na měření koncentrace proteinů - Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad)  
Roztoky na purifikaci DNA NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)  
Roztoky pro imunoblot iBind™ Solution Kit (Thermo Scientific)  
Roztoky pro izolaci DNA P1, P2, P3  
Sacharosa (LachNer)  
SDS – dodecylsírán sodný (LachNer)  
Sekundární protilátka m-IgGκ BP-HRP: sc-516102 (Santa Cruz Biotechnology)  
Sekundární protilátka Rabbit anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)  
Sírán sodný dekahydrát (Lachema)  
Standard pro ELFO 100bp (Thermo Scientific)  
Standard pro ELFO 1kb (Thermo Scientific)  
Standard pro LC-MS analýzu LL-37(human) trifluoroacetát (Sigma-Aldrich)

Standard pro SDS-PAGE Novex™ Sharp Pre-stained Protein Standard (Thermo Scientific)

SyproRuby™ (Thermo Scientific)

T4 DNA ligasa (NEB)

TEMED (Sigma-Aldrich)

Thiosíran sodný pro foto (Lachema)

Tris (Duchefa)

Triton® X-100 (Sigma-Aldrich)

Trypton (Duchefa)

Tween® 20 (Sigma-Aldrich)

Voda bez nukleas (QIAGEN)

Volné nukleotidy pro PCR - dNTPs (Bio-Rad)

Vývojka a fixační roztok KODAK (Sigma-Aldrich)

Vzorkovací pufr pro ELFO 6x (Thermo Scientific)

Vzorkovací pufr pro SDS-PAGE LDS 4x NuPAGE™ (Thermo Scientific)

Redukční činidlo pro SDS-PAGE 10x NuPAGE™ (Thermo Scientific)

### **3.1.3 Roztoky a média**

#### **3.1.3.1 Antibiotika**

Příslušné množství antibiotik na přípravu jednoho mililitru zásobního roztoku bylo odváženo na analytických vahách a rozpuštěno ve sterilní Milli-Q vodě. Roztok byl sterilizován pomocí injekční stříkačky přes 0,22 $\mu$ m membránový filtr do označené sterilní mikrozskumavky. Zásobní roztok antibiotik byl vždy 1 000-násobek pracovní koncentrace: kanamycin – 50 mg/ml, ampicilin – 100 mg/ml, gentamicin – 10 mg/ml, rifampicin – 25 mg/ml (rozpuštěno v DMSO). Pozn. hygromycin B byl dodán výrobcem jako sterilní vodný roztok o koncentraci 50 mg/ml.

#### **3.1.3.2 LB médium a LB agar**

V kádince s 950 ml Milli-Q vody bylo rozpuštěno 10 g chloridu sodného, 10 g tryptonu a 5 g kvasničného extraktu. Po rozpuštění bylo pH upraveno pomocí hydroxidu sodného na hodnotu 7,0 a objem doplněn na jeden litr. Poté bylo LB médium autoklávováno 30 minut při 121 °C. V případě LB agaru bylo po upravení pH přidáno 15 g agaru.

#### **3.1.3.3 TAE pufr**

Zásobní roztok byl připraven jako 50x koncentrovaný. V 800 ml Milli-Q vody bylo rozpuštěno 242 g Tris a 18,61 g Na<sub>2</sub>EDTA. Poté bylo pomalu přidáváno 54,12 ml ledové kyseliny octové a pH upraveno pomocí Tris nebo kyseliny octové na hodnotu 8,0. Nakonec byl objem doplněn Milli-Q vodou do jednoho litru.

#### **3.1.3.4 Složení premixu pro PCR**

**Premix pro polymerasovou řetězovou reakci:** 5  $\mu$ l Green GoTaq<sup>®</sup> reakčního pufru, 1,5  $\mu$ l 25mM chloridu hořečnatého, 0,5  $\mu$ l 10mM dNTPs, 0,5  $\mu$ l 10 $\mu$ M forward primeru, 0,5  $\mu$ l 10 $\mu$ M reverse primeru, 0,125  $\mu$ l GoTaq<sup>®</sup> G2 DNA polymerasy

**Premix pro proofreading polymerasu:** 10  $\mu$ l 5x Phusion<sup>®</sup> reakčního pufru, 1  $\mu$ l 10mM dNTPs, 2,5  $\mu$ l 10 $\mu$ M forward primeru, 2,5  $\mu$ l 10mM reverse primeru, 1  $\mu$ l DMSO, 0,5  $\mu$ l Phusion<sup>®</sup> polymerasy

### 3.1.3.5 Složení médií a roztoků pro práci s rostlinami

Všechny roztoky byly po přípravě přefiltrovány pomocí 0,22µm membránového filtru.

**Infiltrační roztok pro *Arabidopsis thaliana*:** 5 % sacharosa (w/v), 0,05 % povrchově aktivního činidla Silwet L-77 (v/v)

**MS médium:** 3,44 g Murashige and Skoog média s vitamíny, 0,8 g MES, 8 g sacharosy rozpuštěno v 750 ml Milli-Q vody. pH upraveno pomocí KOH na hodnotu pH=5,7 a poté objem doplněn Milli-Q vodou na 800 ml. Nakonec bylo přidáno 2 g Phytagelu™ a médium autoklávováno (121 °C 30 minut).

**Sterilizační roztok:** 500 µl 12% roztoku chlornanu sodného, 100 µl 70% ethanolu a 400 µl sterilní vody

**Roztok pro izolaci gDNA:** 200 mM Tris-HCl (pH=8,0), 250 mM chlorid sodný, 20 mM EDTA, 0,5 % SDS (w/v)

**TE pufr:** 10 mM Tris-HCl (pH=8,00), 1 mM EDTA

**Infiltrační roztok pro *Nicotiana benthamiana*:** 10 mM MES (pH=5,60), 150 µM acetosyringon, 10 mM chlorid hořečnatý

### 3.1.3.6 Složení pufrů pro extrakci a purifikaci

Všechny roztoky byly po přípravě přefiltrovány pomocí 0,22µm membránového filtru.

**Lyzační pufr – bakterie:** 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 300 mM chlorid sodný, 20 mM imidazol, 5% glycerol (v/v)

**Extrakční pufr pro *A. thaliana*:** 100 mM Tris-HCl (pH=8,0), 50 mM chlorid sodný, 4% glycerol (v/v), 0,3% Triton X-100 (v/v)

**Extrakční pufr ječmen:** 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 300 mM chlorid sodný, 0,3% Triton X-100 (v/v), 5% glycerol (v/v), inhibitor proteas (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail) 1 tableta na 100 ml pufru

**Vzorkový pufr 1x:** 250 µl vzorkovacího pufru pro SDS-PAGE, 100 µl redukčního činidla pro SDS-PAGE, do 1 ml objem doplněn Milli-Q vodou

**Ekvilibrační pufr:** 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 300 mM chlorid sodný, 20 mM imidazol, 1% glycerol (v/v)

**Promývací pufr:** 50 mM Tris-HCl (pH=8,0), 300 mM chlorid sodný, 50 mM imidazol, 1% glycerol (v/v)

**Eluční pufr:** 50mM Tris-HCl (pH=8,0), 300 mM chlorid sodný, 300 mM imidazol, 1% glycerol (v/v)

**Pufr pro regeneraci:** 20 mM MES (pH=5,0), 100 mM chlorid sodný

**Roztok pro uložení kolony:** 20% ethanol z 96% zásobního roztoku (v/v)

**Pufr pro štěpení enterokinasou:** 20 mM Tris-HCl (pH=8,0), 50 mM chlorid sodný, 2 mM chlorid vápenatý

**Pufr pro LC-MS:** 5 mM hydrogenuhličitan amonný (pH=8,0)

### 3.1.3.7 Bis-Tris gely

**Pufr pro přípravu gelů:** 892,5 mM Bis-Tris (pH=6,5), pH upraveno přidavkem kyseliny chlorovodíkové

**Roztok akrylamid-bisakrylamid:**

73,05 g akrylamidu a 1,95 g *N,N'*-methylenbis(akrylamid) rozpuštěno ve 150 ml Milli-Q vody, objem doplněn Milli-Q vodou na 250 ml

**Dělicí gel (10%):** 4,25 ml roztoku akrylamid-bisakrylamid, 5 ml pufru pro přípravu gelů, 3,14 ml sterilní Milli-Q vody. Polymerace iniciována přidavkem 30  $\mu$ l TEMEDu a 80  $\mu$ l 10% roztoku APS (w/v).

**Zaostřovací gel (4%):** 0,55 ml roztoku akrylamid-bisakrylamid, 1,6 ml pufru pro přípravu gelů, 1,8 ml sterilní Milli-Q vody. Polymerace iniciována přidavkem 15  $\mu$ l TEMEDu a 25  $\mu$ l 10% roztoku APS (w/v).

### 3.1.3.8 Barvení na stříbro

**Fixační roztok:** 11,2 ml 90% kyseliny octové, 50 ml 96% ethanolu, objem doplněn do 100 ml Milli-Q vodou

**Roztok thiosíranu:** 0,032 g thiosíranu sodného (bezvodého) rozpuštěno ve 250 ml Milli-Q vody

**Roztok dusičnanu stříbrného:** 0,1 g dusičnanu stříbrného, 37,5  $\mu$ l 37% formaldehydu rozpuštěno v 50 ml Milli-Q vody

**Vývolávací roztok:** 6 g uhličitanu sodného, 2 ml roztoku thiosíranu a 50  $\mu$ l 37% formaldehydu rozpuštěno ve 100 ml Milli-Q vody

**Fixační roztok II:** 14 ml 90% kyseliny octové, do 100 ml Milli-Q voda

### **3.1.3.9 Barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue G-250**

**Barvicí roztok:** 500 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 rozpuštěno ve 250 ml methanolu, poté přidáno 55 ml 90% kyseliny octové, do 500 ml objem doplněn Milli-Q vodou

**Odbarvovací roztok:** 200 ml methanolu bylo smícháno spolu s 200 ml Milli-Q vody, dále přidáno 55 ml 90% kyseliny octové, do 500 ml objem doplněn Milli-Q vodou

### **3.1.3.10 Přenosový pufr**

Nejprve byl připraven zásobní roztok 10x TB - 30 g Tris bylo spolu se 144 g glycinu rozpuštěno v jednom litru Milli-Q vody. Z připraveného zásobního roztoku bylo odebráno 120 ml, přidáno 120 ml methanolu a objem doplněn do 1,2 l deionizovanou vodou.

### **3.1.3.11 Složení mobilních fází pro LC-MS**

**Mobilní fáze A:** Milli-Q voda + 0,1% kyselina mravenčí

**Mobilní fáze B:** Acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí

**Oplach jehly:** Milli-Q voda + acetonitril 75:25 (v/v) + 0,1% kyselina mravenčí

### **3.1.4 Programy a software**

Agilent Lab Advisor

Agilent OpenLab CDS for ChemStation Users

BioLogic™ Software

BioPAT® MFCS

Image Lab™ 6.0

LP Data View Software for Biologic LP System

SnapGene® 5.0

### **3.1.5 Přístroje a pomůcky**

Analytické váhy 5034/120 (Auxilab)

Analytické váhy Pioneer (Ohaus)

Autokláv MLS-302OU-PE (SANYO)

Automatické pipety Research plus (Eppendorf)

Box laminární SCS II (Merci)

Cela pro koncentrování proteinů Amicon® Stirred Cell (Merck)

Centrifuga Heraeus Megafuge 40 (Thermo Scientific)

Centrifuga Megafuge 40R (Thermo Scientific)

Centrifuga Multifuge X3 (Thermo Scientific)

Centrifuga ROTANTA 460R (Hettich)

Centrifugační koncentrátor SpeedVac™ SPD111V (Thermo Fisher Scientific)

Digestoř M 1800 (Merci)

Dokumentační systém ChemiDoc™ MP (Bio-Rad)

Elektroforetická komůrka pro PAGE Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad)

Elektroforetická komůrka s příslušenstvím Biometra Compact Multi-Wide (Biometra®)

Elektrofotografický systém EDURO™ Gel XL (LabNet)

Elektroporátor ECM 399 (BTX)

Falkona pro ultrafiltraci Vivaspin 20, 10.000 MWCO Hydrosart (Sartorius)

Falkona pro ultrafiltraci Vivaspin 20, 2.000 MWCO Hydrosart (Sartorius)

Falkona pro ultrafiltraci Vivaspin 20, 5.000 MWCO Hydrosart (Sartorius)

Fermentor Biostat® C+ (Sartorius)

Frakční kolektor BioLogic BioFrac Fraction Collector (Bio-Rad)



French Pressure Cell Press FA-032 (Thermo Spectronic)  
Fytokomora E-41L2 (CLF-PlantClimatics)  
Fytokomora Fitotron® (Weiss Gallenkamp)  
Fytotron Fitotron® (Weiss Gallenkamp)  
Chlazená centrifuga 5417R (Eppendorf)  
Chlazená centrifuga 5427R (Eppendorf)  
Chlazená centrifuga 5810 R (Eppendorf)  
Chromatografický systém BioLogic DuoFlow (Bio-Rad)  
Chromatografický systém BioLogic LP (Bio-Rad)  
Inkubátor COOL-Hotter Dry (Alex Red)  
Inkubátor INB 400 (Mettler)  
Inkubátor INCO 153 (Mettler)  
Kolona pro FPLC Bio-Scale™ High-resolution empty column (Bio-Rad)  
Kolony pro LC-MS  
    Aeris PEPTIDE 5 µm 250x4,6 mm  
    Agilent Prep-C18 5 µm 50x10 mm  
    Poroshell 300SB-C18 Analytical 5 µm 75x2,1 mm  
    Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD 1,8 µm 50x2,1 mm  
Kompresor s expanzní nádobou C330/100 (Gentlin)  
Laboratorní předvážky Scout SPX1202 (Ohaus)  
Laboratorní předvážky Traveller TA302 (Ohaus)  
Laminární box Faster Comfort Plus SCS Evo 2-6 (Ferra)  
Lyofylizátor CoolSafe basic (Trigon Plus)  
Magnetická míchačka AccuPlate™ (LabNet)  
Magnetická míchačka MSH-420 (BOECO)  
Magnetická míchačka RH basic 2 (IKA)  
Membrána Millipore® PVDF pro Western blot (Merck)  
Mikrovlnná trouba SMW 18178K (Sencor)  
Minicentrifuga s vortexem Combi-Spin FVL-2400N (BioSan)  
NanoDrop One Microvolume (Thermo Scientific)  
Orbitální třepačka Orbit 1000 (LabNet)  
Peristaltická pumpa ACPU 222 (Spectrum)

pH metr EDGE™ pH/ORP (HANNA)  
pH metr pHenomenal 1100L (VWR™)  
Průtoková centrifuga LE (Cepa)  
Příslušenství pro imunoblot iBind™ Cards (Thermo Scientific)  
Příslušenství pro přípravu polyakrylamidových gelů SureCast™ (Thermo Scientific)  
Semipreparativní LC-MS Infinity II (Agilent)  
    Prep Autosampler G7157A  
    1260 Prep Bin Pump G7151A  
    1260 Column Organizer G9328A  
    MS Flow Modulator G7170B  
    1260 VWD G7114A  
    1260 Quat Pump VL G7111A  
    LC/MSD G6125B  
    MS 40+ Vacuum Pump  
    1260 FC-PS G1364E  
Spektrofotometr Agilent 8453 UV-visible (Agilent)  
Spektrofotometr WPA Lightwave II (Biochrom)  
Sterilní filtr Ophthalsart – 0,22 µm (Sartorius)  
Stolní centrifuga Spectrafuge™ 16M (LabNet)  
Stolní chlazená centrifuga 1730 R (ScanSpeed)  
Stolní pikofuga Mini Microcentrifuge (LabNet)  
Stolní třepačka MAXQ 4450 (Thermo Scientific)  
Systém pro dokumentaci Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad)  
Systém pro dokumentaci ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad)  
Systém pro imunoblot iBind™ Western System (Thermo Scientific)  
Termoblok ThermoMixer® Comfort (Eppendorf)  
Termocykler gradientový Prime 96x0,2 ml (Fisher Scientific)  
Termocykler gradientový TGradient (Biometra®)  
Termocykler gradientový TProfesional (Biometra®)  
Termocykler gradientový Veriti™ 96 Well (Applied Biosystems)  
Termocykler Tpersonal (Biometra®)  
Transiluminátor UVT-20S (Herolab)

Třepačka inkubovaná Incu-Shaker MINI (Benchmark)  
 Třepačka inkubovaná INFORS HT (Schoeller)  
 Třepačka inkubovaná SI600C (Stuart®)  
 Třepačka vyhřívaná TS-100C (Biosan)  
 Ultracentrifuga CS 150NX (Hitachi)  
 Ultrafiltrační disky 1 kDa NMW, 5 kDa NMW a 10 kDa NMW (Merck)  
 Vakuová pumpa RZ 6 (Vacuubrand)  
 Vodní lázeň KISS® 208B (Huber)  
 Vortex MS 3 digital (IKA)  
 Vortex stolní G560E (Scientific Industries)  
 Vymrazovací lapač RVT400 (Thermo)  
 Zařízení na úpravu vody Smart2Pure™ Barnstead™ (Thermo Scientific)  
 Zdroj pro elektroforézu P25 (Biometra®)  
 Zdroj pro PAGE Enduro™ 250V (LabNet)  
 Zdroj pro PAGE MP-300V (Major Science)

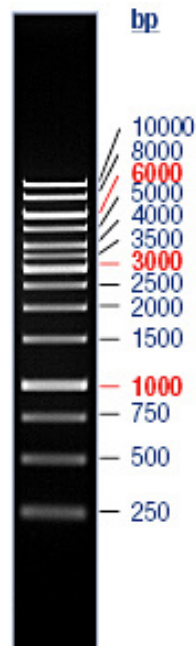
### 3.1.6 Použité primery

*Tabulka 3: Přehled použitých primerů*

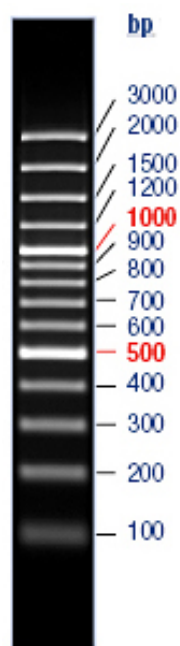
Název primeru	Sekvence 5' → 3'
pGWB_17_sekvenace_fw	AAGATCGGCAAGGAGTTCAA
pGWB_17_sekvenace_inner_fw	CGGAGAAGGCAGACCTCTGA
pGWB_17_sekvenace_rev	GCCTGGCAGGTCAACACC
pGWB_17_genotyping_fw	AAGATCGGCAAGGAGTTCAA
pGWB_17_genotyping_rev	GACACGAAGCCGTTGGTAAT
DAMP_His_fw	TTTTCTAGAATGCATCATCATCACCATCACC ACCACCACGGAGGTGGAGGTTCTGAGCCGTCCA TGAAGCAGCTCGCC
DAMP_His_rev	GGCAGCAGCCAACTCAGCTTCCTTTCG
pET28b+_sekvenace_fw	TAATACGACTCACTATAGGG
pET28b+_sekvenace_rev	AGCCAACTCAGCTTCCTTTC

### 3.1.7 Použité standardy

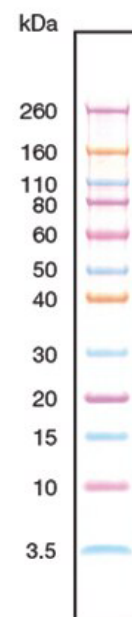
Pro agarosovou elektroforézu byly použity standardy od firmy Thermo Scientific (Obr. 4 a 5), pro SDS-PAGE barevný standard od firmy Thermo Scientific (Obr. 6). Pro Western blot a LC-MS analýzu byl použit standard lidského katelicidinu dodaný firmou Sigma-Aldrich ve formě soli kyseliny trifluoroctové.



Obrázek 4:  
Standard pro  
agarosovou  
elektroforézu  
1kb



Obrázek 5:  
Standard pro  
agarosovou  
elektroforézu  
100 bp



Obrázek 6:  
Standard pro SDS-  
PAGE

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Příprava Petriho misek s LB agarem**

Do flowboxu byly přemístěny sterilní Petriho misky, automatické pipety, sterilní zkumavky, špičky a membránové filtry s injekční stříkačkou. Flowbox byl spolu se všemi pomůckami sterilizován UV lampou po dobu deseti minut. Připravené selekční antibiotikum (1 000x) bylo sterilizováno pomocí 0,22 $\mu$ m membránového filtru do sterilní mikrozkušavky. Autoklávovaný LB agar (1 000 ml) byl vytažen z inkubátoru (65 °C) a ponechán ve flowboxu zchladnout na teplotu přibližně 50 °C. Následně bylo k LB agaru pipetováno 1 000  $\mu$ l selekčního antibiotika a směs důkladně promíchána. Poté byl roztok LB agaru nalit na Petriho misky (přibližně 20 ml na každou misku). Po ztuhnutí byly misky uskladněny v chladničce (4 °C).

### **3.2.2 Kultivace bakterií**

Ze zásobní bakteriální kultury v glycerolu bylo odebráno 10  $\mu$ l a inokulováno do 10 ml LB média s příslušným antibiotikem v označené sterilní 50ml falkoně. Falkony byly inkubovány přes noc při 37 °C na orbitální třepačce při 150 rpm.

### **3.2.3 Izolace plazmidů pomocí kitu**

Bakteriální kultura byla v 50ml falkonách centrifugována 5 minut při 11 000  $xg$ . Supernatant byl odlit do nádoby s GMO odpadem. K peletu bylo pipetováno 200  $\mu$ l roztoku P1 a pelet byl suspendován pomocí vortexu. Následně byla směs přenesena do 2ml mikrozkušavky. Ke směsi bylo pipetováno 200  $\mu$ l roztoku P2 a směs promíchána převrácením (5x). Směs byla ponechána inkubovat 4,5 minuty a poté bylo pipetováno 350  $\mu$ l roztoku N3 a ihned promícháno převrácením (5x). Směs byla následně centrifugována při 11 000  $xg$  po dobu 10 minut.

Supernatant byl odpipetován do mikrozkušavky s filtrem, avšak tak, aby nedošlo k přenesení peletu. Mikrozkušavky byly centrifugovány při 11 000  $xg$  po dobu 30 sekund a tekutina, která protekla filtrem, byla odlita. Na filtr bylo pipetováno 500  $\mu$ l roztoku PB a provedena centrifugace 30 s při 11 000  $xg$ . Tekutina, která protekla filtrem, byla opět odstraněna a promytí filtru opakováno se 700  $\mu$ l roztoku PE. Zbytky PE roztoku byly odstraněny centrifugací při 11 000  $xg$  po dobu 1,5 minuty.

Filtry byly poté přemístěny do nové označené mikrozkušavky a ponechány inkubovat po dobu 5 minut v inkubátoru na 70 °C pro úplné odpaření ethanolu.

Poté byly zkušavky ponechány zchladnout na laboratorní teplotu a do středu filtru pipetováno 20 µl elučního pufru EB. Zkušavky byly centrifugovány 2 minuty při 50 xg, aby se eluční pufr dostal do celého prostoru filtru. Poté byly mikrozkušavky s filtrem centrifugovány při 11 000 xg po dobu 1 minuty, filtry odstraněny a změřena koncentrace DNA pomocí NanoDropu.

### **3.2.4 Izolace plazmidů metodou alkalické lýze**

Bakteriální kultura byla centrifugována v 50ml falkonách při 8 000 xg po dobu 5 minut. Supernatant byl odlit do nádoby s GMO odpadem a pelet suspendován v 0,3 ml roztoku P1. Směs byla kvantitativně přemístěna do 2ml mikrozkušavky a ke směsi pipetováno 0,3 ml roztoku P2. Směs byla ihned promíchána opatrným převrácením (5x) a ponechána inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Poté bylo pipetováno ke směsi 0,3 ml roztoku P3, promíchána opatrným převrácením (5x) a inkubována 5 minut na ledu. Mikrozkušavky byly centrifugovány při 11 000 xg po dobu 10 minut a supernatant kvantitativně pipetován do nové mikrozkušavky.

Následně bylo do mikrozkušavky pipetováno 0,6 ml isopropanolu, směs promíchána opatrným převrácením (5x) a mikrozkušavky centrifugovány při 11 000 xg po dobu 10 minut. Supernatant byl odstraněn a pelet promyt 0,5 ml 70% ethanolu, který byl předem vychlazen na -20 °C. Po centrifugaci (5 minut při 11 000 xg) byl ethanol odstraněn a zbytky ethanolu odpařeny v inkubátoru při 70 °C (zpravidla 5 minut). Po zchladnutí na laboratorní teplotu byl pelet suspendován ve 20 µl pufru EB a koncentrace plazmidové DNA změřena pomocí NanoDropu.

### **3.2.5 Transformace buněk teplotním šokem**

Alikvoty chemicky kompetentních buněk *Escherichia coli* byly nejprve inkubovány na ledu po dobu 10 minut, následně byl k buňkám pipetován 1 µl plazmidové DNA a směs promíchána krouživým pohybem špičky. Směs byla ponechána inkubovat 15 minut na ledu, poté byl proveden tepelný šok umístěním do termobloku na 42 °C po dobu 1 minuty. Směs byla poté ponechána 1 minutu na ledu a dále do mikrozkušavky pipetováno 200 µl regeneračního SOC média.

Mikrozkumavky s buňkami byly inkubovány při 180 rpm a 37 °C po dobu 30 minut. Nakonec byl obsah každé mikrozkumavky rozdělen na dva alikvoty (20 µl a 200 µl) a ty rozetřeny na LB agar s příslušným selekčním antibiotikem.

### **3.2.6 Kultivace bakterií**

Nejprve bylo do sterilních skleněných zkumavek pipetováno 5 ml LB média a přidáno příslušné selekční antibiotikum. Z Petriho misky byly vybrány kolonie, které byly inokulovány do připravené zkumavky. Poté byly bakterie kultivovány v rotačním inkubátoru při 180 rpm a 37 °C přes noc.

### **3.2.7 Restrikce**

Pro restrikci bylo vždy použito 2 000 ng plazmidové DNA. Pokud byl potřebný objem větší než 17,6 µl, byly nastaveny paralelně dvě restrikční reakce a před dalším použitím smíchány dohromady. Do mikrozkumavky byly pipetovány 2 µl příslušného pufru pro restrikci (kompatibilní s použitými enzymy), plazmidová DNA a objem byl doplněn do 19,6 µl sterilní vodou. K reakci bylo na závěr pipetováno 0,4 µl restrikčního enzymu (v případě použití dvou restrikčních enzymů bylo pipetováno 0,2 µl od každého). Směs byla promíchána pipetováním a poté stočena krátce na pikofuze. Následně byla umístěna do termobloku vyhřátého na 37 °C a restrikční reakce ponechána inkubovat 3 hodiny. Poté byla restrikce inaktivována inkubací při 80 °C po dobu 10 minut.

Po zchlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byl k vektoru pipetován 1 µl alkalické fosfatasy. Mikrozkumavka byla krátce vortexována, stočena na pikofuze a umístěna do termobloku vyhřátého na 37 °C. Reakce ponechána inkubovat 45 minut a poté inaktivována inkubací při 80 °C po dobu 10 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo k reakční směsi pipetováno příslušné množství vzorkovacího pufru pro ELFO a směs vortexována.

### 3.2.8 Elektroforéza

Do Erlemayerovy baňky byl odvážen 1 g agarosy, přidány 2 ml 50x TAE pufru a objem doplněn do 100 ml Milli-Q vodou. Směs byla rozehráta v mikrovlnné troubě do doby, než došlo k úplnému rozpuštění agarosy. Směs byla ponechána chladnout na přibližně 50 °C. Agarosa byla nalita do elektroforetické vany a k ní pipetováno 7,5 µl ethidiumbromidu na 50 ml agarosy. Směs byla důkladně promíchána špičkou, umístěn hřebínek a agarosa ponechána tuhnout.

Hřebínek byl vytažen, gel umístěn do elektroforetické komůrky a nalit 1x TAE pufr tak, aby byly všechny jamky ponořeny. Ze vzorku byly nanесeny na gel tři čtvrtiny objemu (jedna čtvrtina byla ponechána jako rezerva). Nakonec byly na gel pipetovány 3 µl standardu pro ELFO (1 kb DNA Plus). Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V (restrikce nebo PCR), nebo při 60 V (klonování), a to minimálně 30 minut (do doby, než bylo dosaženo optimálního dělení fragmentů DNA). Gel byl následně dokumentován pomocí systému pro dokumentaci Gel Doc™ EZ Imager a vyhodnocen v programu Image Lab™ 6.0.

### 3.2.9 Purifikace fragmentů DNA po elektroforéze

Po vyhodnocení byl gel přemístěn na transiluminátor a pomocí špičky pro řezání fragmentů z gelu vyříznut fragment odpovídající velikosti. Při vyřezávání byl transiluminátor zapnut pouze krátce, aby nedošlo k poškození DNA. Vyříznutý fragment byl zvážen na analytických vahách a do mikrozkuhavky byl pipetován 2,5-násobek hmotnosti fragmentu (v µl) NTI pufru. Fragment byl následně inkubován spolu s NTI pufrém za občasného vortexování při 50 °C po dobu 10 minut, a to do doby, než došlo k úplnému rozpuštění gelu.

Směs byla následně nanесena na filtr v mikrozkuhavce a provedena 30s centrifugace při 11 000 xg. Filtrát byl odlit a filtr promyt dvakrát 750 µl pufru NT3. Mezi každým promytím byly mikrozkuhavky centrifugovány (30 s, 11 000 xg) a filtrát opět odstraněn. Následně byla mikrozkuhavka s filtrem centrifugována 1,5 minut při 11 000 xg, aby došlo k odstranění zbytků pufru.



Filtr byl přemístěn do nové 1,5ml mikrozkušavky s odstříženým víčkem a inkubován při 70 °C 5 minut pro úplné odpaření ethanolu. Poté bylo do středu filtru pipetováno 15 µl elučního EB pufru a mikrozkušavka ponechána s pufrem inkubovat 2 minuty při laboratorní teplotě. Nakonec byla mikrozkušavka centrifugována 1 minutu při 11 000 xg a filtr odstraněn.

### 3.2.10 Ligace

Do mikrozkušavky bylo pipetováno celkem 8 µl plazmidové DNA (purifikovaného vektoru a insertu), a to v molárním poměru 1:4 (vektor:insert). Poměr byl odhadnut z intenzity signálů dokumentovaných po agarosové elektroforéze. K plazmidové DNA byl následně pipetován 1 µl pufru pro T4 DNA ligasu (10x koncentrovaný). Směs byla poté vortexována a stočena na pikofuze.

Na závěr byl pipetován 1 µl T4 DNA ligasy (5 U/µl) a směs promíchána pipetováním. Ligační reakce byla ponechána inkubovat 16 hodin při 16 °C. Nakonec byla ligační reakce inhibována inkubací při 70 °C po dobu 10 minut.

### 3.2.11 Elektroporace

Nejprve byly alikvoty elektrokompetentních buněk *Escherichia coli* nebo *Agrobacterium tumefaciens* inkubovány na ledu po dobu 10 minut, následně byl k buňkám pipetován 1 µl plazmidové DNA/ligační směsi a směs promíchána krouživým pohybem špičky. Směs byla ponechána inkubovat 15 minut na ledu, poté pipetována do vychlazené elektroporační kyvety a proveden pulz 1800 V. Pokud se čas pulzu pohyboval v rozmezí 3-5 ms bylo do kyvety ihned pipetováno 200 µl regeneračního SOC média (v případě kratšího času byl celý postup elektroporace opakován s novou alikvotou elektrokompetentních buněk). Mikrozkušavky s buňkami byly následně inkubovány při 180 rpm a 37 °C po dobu 30 minut (v případě *Agrobacterium tumefaciens* byly mikrozkušavky inkubovány 3 hodiny při 28 °C). Nakonec byl obsah každé mikrozkušavky rozdělen na dva alikvoty (20 µl a 200 µl) a ty rozetřeny na LB agar s příslušným selekčním antibiotikem. Petriho misky byly poté inkubovány při 37 °C přes noc (v případě *Agrobacterium tumefaciens* inkubace při 28 °C 3 dny).

### 3.2.12 Polymerasová řetězová reakce – „Colony PCR“

Do PCR stripů bylo pipetováno 17  $\mu$ l sterilní Milli-Q vody. Stripy byly popsány a na Petriho misku nakreslena mřížka. Baktérie po transformaci byly vypíchnuty sterilní špičkou, pomocí pipety několikrát pipetována Milli-Q voda ve stripu a nakonec baktérie inokulována na Petriho misku do pozice na mřížce odpovídající pozici ve stripu.

Dále byl připraven premix pro polymerasovou řetězovou reakci s příslušnými primery, kdy jako poslední komponent byla přidávána polymerasa, po přidavku byl premix promíchán zlehka pipetováním. Z premixu bylo do stripů pipetováno 8,1  $\mu$ l, kdy jedna reakce byla vždy nastavena pouze s Milli-Q vodou (negativní kontrola) a pokud možno jedna reakce nastavena s pozitivní kontrolou (plazmidem). Stripy byly uzavřeny víčkem a krátce vortexovány, poté stočeny na pikofuze. Nakonec byly přemístěny do termocyklieru.

Počáteční denaturace byla nastavena na 2 minuty při 95 °C, denaturace probíhala 30 sekund při 95 °C, nasedání primerů při teplotě  $T_m - 3$  °C po dobu 30 sekund a elongace při teplotě 72 °C 1 minutu na každých 1 000 bp. Finální elongace byla provedena při 72 °C po dobu 5 minut. Teplota nasedání primeru byla vypočtena z nižší hodnoty  $T_m$  primerů a PCR měla standardně 33 cyklů. Po proběhnutí PCR reakce byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu a nanášeny na 1% agarosový gel (viz. kapitola 3.2.8).

### 3.2.13 Polymerasová řetězová reakce – Phusion®

Do 0,2ml mikrozkušavky byl pipetován roztok s obsahem 10 ng plazmidu a poté premix pro proofreading polymerasu (při jeho přípravě byla jako poslední komponent přidána Phusion® polymerasa a premix promíchán pipetováním). Objem reakční směsi byl doplněn sterilní Milli-Q vodou na 50  $\mu$ l a směs promíchána pipetováním. Mikrozkušavky byly krátce stočeny na pikofuze a přemístěny do termocyklieru.

Počáteční denaturace byla nastavena na 98 °C po dobu 30 sekund. Denaturace probíhala při 98 °C 10 sekund, nasedání primerů při teplotě  $T_M - 3$  °C po dobu 30 sekund a elongace při 72 °C 30 sekund na každých 1 000 bp. Finální elongace byla 5 minut při 72 °C. Teplota nasedání primerů byla vypočtena z nižší hodnoty  $T_m$  obou primerů a PCR měla 28 cyklů.

Po proběhnutí PCR byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu a templát byl štěpen přidavkem enzymu *DpnI*. Do každé mikrozkušavky byl pipetován 1  $\mu$ l tohoto enzymu, směs promíchána pipetováním a mikrozkušavky krátce stočeny na pikofuze. Mikrozkušavky byly umístěny do termobloku na 37 °C po dobu 1 hodiny a poté enzym inaktivován 20 minut při 80 °C. Nakonec byla provedena elektroporace *Escherichia coli* TOP 10 (viz. kapitola 3.2.11). Do 0,2ml mikrozkušavky bylo pipetováno roztok s obsahem 10 ng plazmidu a poté premix pro proofreading polymerasu (při jeho přípravě byla jako poslední komponent přidána Phusion® polymerasa a premix promíchán pipetováním). Objem reakční směsi byl doplněn sterilní Milli-Q vodou na 50  $\mu$ l a směs promíchána pipetováním. Mikrozkušavky byly krátce stočeny na pikofuze a přemístěny do termocykleru.

Počáteční denaturace byla nastavena na 98 °C po dobu 30 sekund. Denaturace probíhala při 98 °C 10 sekund, nasedání primerů při teplotě  $T_M - 3$  °C po dobu 30 sekund a elongace při 72 °C 30 sekund na každých 1 000 bp. Finální elongace byla 5 minut při 72 °C. Teplota nasedání primerů byla vypočtena z nižší hodnoty  $T_m$  obou primerů a PCR měla 28 cyklů.

Po proběhnutí PCR byly vzorky ochlazeny na laboratorní teplotu a templát byl štěpen přidavkem enzymu *DpnI*. Do každé mikrozkušavky byl pipetován 1  $\mu$ l tohoto enzymu, směs promíchána pipetováním a mikrozkušavky krátce stočeny na pikofuze. Mikrozkušavky byly umístěny do termobloku na 37 °C po dobu 1 hodiny a poté enzym inaktivován 20 minut při 80 °C. Nakonec byla provedena elektroporace *Escherichia coli* TOP 10 (viz. kapitola 3.2.11).

### **3.2.14 LR rekombinace**

Plazmidy byly izolovány pomocí kitu (viz. kapitola 3.2.3), kdy pro eluci byl použit EB pufr pH=8,0. Do mikrozkušavky bylo pipetováno 150 ng vektoru pGWB 17 a 150 ng daného konstruktů ve vektoru pENTR 3C (při nastavení reakcí byla zahrnuta pozitivní kontrola od výrobce pENTR::GUS a jako negativní kontrola byl do reakce pipetován pouze vektor pGWB 17). Směs byla doplněna pufrem EB (pH=8,0) na objem 8  $\mu$ l. Mikrozkušavky byly přemístěny do inkubátoru 45 °C po dobu 5 minut. Poté byla směs ponechána zchladnout na laboratorní teplotu a pipetovány 2  $\mu$ l premixu Gateway™ LR Clonase™. Směs byla promíchána

pipetováním a ponechána inkubovat přes noc při 25 °C. Následující den byl do každé mikrozkušavky pipetován 1 µl Proteinasy K, směs promíchána pipetováním a inkubována 30 minut při 30 °C. Následně bylo 5 µl z každé mikrozkušavky transformováno chemickou transformací do *E. coli* TOP 10 (viz. kapitola 3.2.5).

### **3.2.15 Sekvencování DNA**

Plazmidy byly izolovány pomocí kitu (kapitola 3.2.3) a koncentrace DNA měřena pomocí NanoDropu. V případě, že čistota DNA zobrazená jako podíl  $A_{260}:A_{280}$  byla pod 1,50; byla provedena nová izolace. Do mikrozkušavky bylo poté pipetováno 500 ng plazmidové DNA (maximálně však 7,5 µl) a 2,5 µl primeru. Nakonec byl celkový objem doplněn vodou bez nukleas do 10 µl. Pro potvrzení identity byly vytvořené DNA konstrukty sekvencovány na zakázku u firmy SEQme a výsledky byly vyhodnoceny v programu SnapGene®.

### **3.2.16 Transformace *Arabidopsis thaliana***

Nejprve byla semena *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0 vysazena do květináčů. Po vyklíčení byly rostliny rozsazeny po pěti do nových květináčů (jeden květináč na každý následný experiment pro každý konstrukt) a přemístěny do fytotronu, kde byly rostliny ponechány růst při konstantních podmínkách 21 °C, relativní vzdušné vlhkosti 70 % a fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy.

Poté, co se u většiny rostlin objevil květ, byly konstrukty v *Agrobacterium tumefaciens* inokulovány do LB média (viz. kapitola 3.2.2) při 28 °C. Po dvoudenní inkubaci bylo 500 µl z prekultury pipetováno do 250ml Erlenmayerovy baňky s 50 ml LB média a příslušným selekčním antibiotikem. Celkem bylo inokulováno pět baněk na každý konstrukt a baňky ponechány inkubovat při 28 °C a 150 rpm přes noc (16 hodin). Následující den byly buňky centrifugovány při 8 000 xg a 22 °C po dobu 10 minut. Médium bylo odlito do GMO odpadu, pelet suspendován v infiltračním médiu pro *A. thaliana* a následně buněčná suspenze ředěna infiltračním médiem na  $OD_{600} = 0,8$ . Buňky byly ponechány na orbitální třepačce 2 hodiny při 50 rpm a 22 °C.

Poté byla suspenze přelita do 100ml kádinky a kvetoucí rostliny *A. thaliana* namočeny do suspenze tak, aby všechny květy byly ponořeny. Kádinka s rostlinami byla umístěna do vakuové komůrky připojené ke zdroji vakua. Infiltrace probíhala 5 minut za sníženého tlaku, aby byla zajištěna vysoká účinnost infiltrace. Následně byly rostliny přemístěny zpět do fytotronu a ponechány dále růst. Semena byla sklizena a ponechána vysychat minimálně 14 dní v papírových sáčcích.

### **3.2.17 Selekcce transgenních rostlin**

Přibližně 100 až 200 semen bylo přemístěno do 1,5ml mikrozkušavky, ve flowboxu bylo do mikrozkušavek pipetováno 1 ml 70% ethanolu a obsah mikrozkušavek promíchán převrácením. Po 3 minutách byl supernatant odpipetován a k semínkům přidáno 500  $\mu$ l sterilizačního roztoku. Mikrozkušavky byly přemístěny na orbitální třepačku, kde byly ponechány 10 minut při 200 rpm. Poté byl sterilizační roztok ve flowboxu odstraněn a semena promyta 5x 1 ml sterilní vody za důkladného protřepání mikrozkušavek mezi každým promytím.

Na závěr sterilizace bylo pipetováno 100  $\mu$ l sterilní vody a mikrozkušavky ponechány tři dny v chladu (4 °C) pro sjednocení klíčení. Poté byla semena vyseta pomocí sterilní špičky na Petriho misky s MS médiem s přidavkem 20  $\mu$ g/ml hygromycinu B jako selekčního antibiotika. Petriho misky byly přemístěny do fytotronu (22 °C, 70% relativní vzdušné vlhkosti s fotoperiodou 16 hodin světlo, 8 hodin tma). Po čtrnácti dnech byly rezistentní rostliny přesazeny do zeminy a ponechány růst další tři týdny.

Jeden pravý list z každé rostliny byl umístěn do 1,5ml mikrozkušavky s wolframovou kuličkou. Do každé mikrozkušavky bylo pipetováno 300  $\mu$ l gDNA extrakčního pufru a v digestoři pipetováno 120  $\mu$ l roztoku chloroform:isoamylalkohol 24:1 (v/v). Mikrozkušavky byly umístěny do kulového oscilačního mlýnku, kde byly vzorky homogenizovány 2 minuty při 25 Hz. Následovala centrifugace 5 minut při 16 °C a 20 000  $\times$ g. Supernatant byl pipetován do nové 1,5ml mikrozkušavky a přidáno 712  $\mu$ l 96% ethanolu. Směs byla promíchána otáčením a poté ponechána na laboratorním stole 10 minut. Mikrozkušavky byly opět centrifugovány 10 minut při 16 °C a 20 000  $\times$ g. Supernatant byl odstraněn a pelet genomické DNA promyt 80  $\mu$ l 70% ethanolu. Mikrozkušavky byly centrifugovány

1 minutu při 16 °C a 20 000 xg, supernatant odstraněn a reziduální ethanol odpařen inkubací 10 minut při 70 °C. Genomická DNA byla poté rozpuštěna v 50 µl v TE pufru.

Do 0,2ml mikrozkušavek bylo pipetováno 15,88 µl sterilní vody a 1 µl genomické DNA. Následně bylo do mikrozkušavek pipetováno 8,1 µl premixu pro polymerasovou řetězovou reakci. Mikrozkušavky byly krátce vortexovány a stočeny na pikofuze. Následovala PCR, kdy parametry byly nastaveny dle kapitoly 3.2.12. Poté byly vzorky nanесeny na 1% agarosový gel (kapitola 3.2.8).

Rostliny, které byly pozitivní po genotypizaci byly ponechány růst, ostatní vyhozeny od GMO odpadu. Semena byla sklizena a ponechána vysychat minimálně 14 dní v papírových sáčcích.

### **3.2.18 Transientní transformace a extrakce proteinů *Nicotiana benthamiana***

Semena *Nicotiana benthamiana* byla vysazena do květináčů. Po vyklíčení byly rostliny rozsazeny po jedné a ponechány růst ve fytokomoře při konstantních podmínkách 25 °C, relativní vzdušné vlhkosti 70 % a fotoperiodě 8 hodin světlo, 16 hodin tma. Po dosažení dostatečné plochy listu, avšak před kvetením byly rostliny transformovány.

Konstrukty v *Agrobacterium tumefaciens* byly inokulovány do LB média (viz. kapitola 3.2.2) a kultivovány při 28 °C. Po dvoudenní inkubaci bylo 500 µl z prekultury pipetováno do 250ml Erlenmayerovy baňky s 50 ml LB média a příslušným selekčním antibiotikem. Celkem byly inokulovány tři baňky na každý experiment s daným konstruktem a ty ponechány inkubovat při 28 °C 150 rpm přes noc (16 hodin). Následující den byly buňky 10 minut centrifugovány při 8 000 xg a 22 °C.

Mezi tím byly rostliny *N. benthamiana* umístěny do plastových sáčků a řádně zality, aby došlo k otevření průduchů. Použité LB médium bylo odlito do GMO odpadu a pelet resuspendován v infiltračním médiu pro *N. benthamiana*. Buněčná suspenze byla následně ředěna infiltračním médiem na OD<sub>600</sub>=0,35. Buňky byly ponechány na orbitální třepačce 1 hodinu při 50 rpm při laboratorní teplotě.

Všechny pravé listy použité rostliny byly transformovány infiltrací pomocí injekční stříkačky, kdy byla suspenze vstříkována pod tlakem do spodní strany listu.

Vzorky infiltrovaných listů byly sbírány druhý, třetí a čtvrtý den po infiltraci a homogenizovány ve třecí misce s tekutým dusíkem. Vzorky byly následně ponechány lyofilizovat do dalšího dne. Z každého vzorku bylo do mikrozkušavky odebráno 50 mg a pipetováno 150  $\mu$ l připraveného vzorkového pufru. Vzorky byly krátce vortexovány a stočeny na pikofuze. Poté byly mikrozkušavky přemístěny do inkubátoru 70 °C po dobu 10 minut. Vzorky byly poté ponechány chladnout na laboratorní teplotu, stočeny při 22 °C na 15 000  $\times$ g po dobu 5 minut a supernatant pipetován do nových mikrozkušavek. Následně bylo 30  $\mu$ l supernatantu nanášeno na polyakrylamidový gel a provedena SDS-PAGE a Western blot (viz. kapitoly 3.2.25 a 3.2.28).

### **3.2.19 Příprava bakteriální kultury ve fermentoru**

Nejprve bylo připraveno 5 ml LB média s kanamycinem, do kterého bylo inokulováno 10  $\mu$ l bakterie *Escherichia coli* BL 21 STAR DE 3 s vloženým expresním plazmidem pET28b+::rhLL-37\_B1 His ze zásobní kultury uložené v glycerolu. Zkušavka byla kultivována v inkubátoru při 180 rpm, 37 °C přes noc. Stejný den byly autoklávovány jednolitrové dávkovací lahve, SACOVA adaptér (Safety Connection Valve System) spolu s 1 litrem 50% glycerolu.

Z připravené „prekultury“ ve skleněných zkušavkách bylo následující den odebráno 500  $\mu$ l do 250ml Erlenmayerovy baňky s 50 ml LB média a kanamycinem. Baktérie byly kultivovány opět do dalšího dne. Celkem byly pro kultivaci ve fermentoru připraveny čtyři Erlenmayerovy baňky.

Fermentor byl zapnut a otevřen hlavní přívod vody. Kompresor s expanzní nádobou byl zapnut a ponechán natlakovat. Do 5-litrové kádiny bylo mezi tím do 2,5 litru deionizované vody připraveno koncentrované LB médium v množství na celkový objem 20 litrů (byla potřeba dlouhá doba rozpouštění jednotlivých komponent). pH elektroda byla připojena k fermentoru a kalibrována pomocí kalibračních roztoků pH 4,0; 7,0 a pH 10,0. Poté byla pH elektroda spolu s Clarkovou kyslíkovou elektrodou umístěny do příslušných vstupů na fermentoru. V kádince s LB médiem byl objem upraven deionizovanou vodou na 5 litrů a přidány 2 ml Defoameru. Celý objem byl přelit do fermentoru a přidáno 15 litrů deionizované vody. SACOVA adaptér byl našroubován na fermentor a zapnuto míchání na 400 rpm.

Před sterilizací byla provedena vizuální zkouška vzduchovadla, kdy na řídicí jednotce byla nastavena hodnota aerace na 0,4 vvm (jednotka udávající počet litrů vzduchu procházející jedním litrem média za jednu minutu). Vzduchovadlo bylo umístěno do polohy pro sterilizaci a vypnut přívod vody do chladiče. Ventil pro topné těleso byl odvzdušněn a tlak v topném tělese nastaven na 0,2 bar. Následně byly zkontrolovány a lehce dotaženy všechny kabely, próby a čepy a zkontrolován pojistný ventil. Po finální vizuální inspekci všech částí fermentoru byla zahájena sterilizace: 121 °C po dobu 30 minut. Po celou dobu sterilizace byl neustále monitorován tlak uvnitř fermentoru a tlak v topném tělese. V případě překročení bezpečné hodnoty 3 bar v topném tělese nebo 1 bar uvnitř fermentoru byl opatrně tlak manuálně regulován pomocí ventilů pro dosažení bezpečných hodnot.

Po dokončení sterilizace byla nastavena teplota 37 °C a zahájena aerace média (0,4 vvm). Přívod vody do chladiče byl zapnut, SACOVA adaptér otevřen a připojen na peristaltické pumpy. K jedné hadičce byla připojena sterilní dávkovací láhev s 5 M roztokem hydroxidu draselného. Poté bylo zahájena úprava pH na hodnotu 7,0 pomocí řídicího a dávkovacího systému fermentoru. Po dokončení byla kalibrována Clarkova kyslíková elektroda a provedena sterilizace výpustí pomocí vyvíječe přehřáté páry (130 °C). Nakonec byl odebrán vzorek (blank) do sterilní 50ml falkony a výpust' opět sterilizována.

Bakteriální kultura byla přelita ve flowboxu do jedné sterilní dávkovací lahve a do druhé přelit sterilní 50% glycerol. Bakteriální kultura byla inokulována do fermentoru (pomocí SACOVA adaptéru a peristaltické pumpy) a poté kontinuálně přidáván 50% glycerol rychlostí 3,5 ml za minutu, a to až do přidání celého objemu (cca 5 hodin). V průběhu následujících 2-3 hodin byl monitorován růst  $OD_{600}$ . Po dosažení  $OD_{600}=1,0$  byla teplota ve fermentoru snížena na 30 °C.

Mezi tím bylo odváženo příslušné množství IPTG tak, aby výsledná koncentrace IPTG ve fermentoru byla 1 mM. Odvážené množství IPTG bylo rozpuštěno ve 200 ml deionizované vody a následně sterilizováno přes 0,22 $\mu$ m membránový filtr. Po ochlazení fermentoru na 30 °C (obvykle 10 minut) byla indukována exprese pomocí IPTG. Po 6 hodinách exprese byla bakteriální kultura sklizena do připravených plastových 5-litrových kádín a kultura stáčena na průtokové centrifuze.



Do fermentoru bylo nalito 20 litrů deionizované vody, promíchávání zvýšeno na 800 rpm a aerace zvýšena na 10 vvm za účelem odstranění zbytků média na stěnách fermentoru a případných usazenin. Po deseti minutách byl odpojen SACOVA adaptér a sterilizovány výpusti. Následně byla provedena dekontaminace podle stejného postupu jako sterilizace. Po dokončení dekontaminace byla teplota nastavena na 60 °C a po dosažení této teploty byl obsah fermentoru vypuštěn do odpadu. Elektrody byly vyjmuty, opláchnuty deionizovanou vodou a umístěny do příslušných roztoků pro uchování a elektrodové vstupy uzavřeny čepy.

Následně bylo do fermentoru nalito 20 litrů deionizované vody a nasypáno 5 g kyseliny citronové. Roztok byl ponechán za stálého míchání 400 rpm ve fermentoru 30 minut, poté byl celý obsah fermentoru vypuštěn do odpadu a fermentor propláchnut deionizovanou vodou pro odstranění zbytků kyseliny citronové.

Na závěr byl vypnut kompresor a vypuštěn vzduch z expanzní nádoby. Hlavní uzávěr vody byl uzavřen a vypnuta hlavní jednotka. Jeden uzavírací čep z víka byl vyšroubován, aby se nesrážela ve fermentoru voda a všechny použité dávkovací lahve a SACOVA adaptér dekontaminovány 2% roztokem Inciduru.

### **3.2.20 Zpracování bakteriální kultury**

Nejprve bylo do vodní lázně nasypáno značné množství ledu a na oběhové čerpadlo připojeny hadice pro chlazení průtokové centrifugy. Rotor průtokové centrifugy byl sestaven dle návodu výrobce za řádného promazání všech spojů vazelinou. Rotor byl našroubován do průtokové centrifugy a po ochlazení pláště centrifugy pod 4 °C byla průtoková centrifuga zapnuta.

Centrifugace probíhala při 30 000  $xg$  za konstantního průtoku 0,5 litru za minutu. Celkem byla bakteriální kultura centrifugována 2x. Poté byl získaný buněčný pelet přenesen pomocí špachtle do nerezové misky umístěné na ledu. Všechny části přístroje, které přišly do styku s bakteriální kulturou (GMO), byly dekontaminovány pomocí 2% roztoku Inciduru a následně umyty. Použité médium bylo po částech autoklávováno po dobu 30 minut na 121 °C a poté vylito do odpadu.

Po centrifugaci byl bakteriální pelet suspendován ve 400 ml lyzačního pufru. Cela French pressu byla umyta a vychlazena na ledu, po jejím vychlazení sestavena a zapojena do French pressu. Před zahájením lýze buněk byly všechny šrouby znova dotaženy a zkontrolována kolmice desky French pressu s lyzační celou. Poté byl French press promyt 2x 70% ethanolem a 2x deionizovanou vodou. Následně byl pomocí šroubu nastaven a udržován tlak v průběhu lýze v rozmezí 20 000-22 000 psi. Celý lyzační postup byl opakován 3x.

Dále byl lyzát zahříván po dobu 30 minut ve vodní lázni předehřáté na 90 °C (čas počítán od doby kdy teplota lyzátu dosáhla 85 °C). Poté byl lyzát ponechán ochladit na laboratorní teplotu a centrifugován při 12 000  $xg$  po dobu 10 minut. Část takto připraveného vzorku byla štěpena pomocí kyseliny trifluoroctové, část purifikována pomocí afinitní chromatografie.

### **3.2.21 Afinitní purifikace bakteriálního lyzátu**

Nejprve bylo 5 ml matrice HisPur™ postupně naplněno do kolony pro FPLC Bio-Scale™, přičemž byly odstraněny všechny bubliny, které během plnění vznikly. Následně byly primovány oba kanály FPLC systému ekvilibračním pufrem. Hodnota absorbance při 205 nm byla nastavena na nulu a poté byla do systému zapojena naplněná kolona, která byla následně promývána lyzačním pufrem pro bakterie rychlostí 2 ml/min.

Po poklesu hodnoty absorbance pod 0,01 byl průtok zvýšen na 2,5 ml/min a pomocí injekční stříkačky s jehlou naplněna 10ml dávkovací smyčka vzorkem bakteriálního lyzátu. Vzorek byl poté nanesen na kolonu a frakce jímána do kádinky. Při poklesu absorbance pod 0,5 byla opět naplněna dávkovací smyčka a postup opakován. Celkem bylo takto na kolonu nanášeno 50 ml lyzátu. Poté bylo zastaveno jímání frakce (Flow-through) a kolona ponechána promývat ekvilibračním pufrem do doby, než absorbance poklesla pod 0,05. Poté byl průtok snížen na 2 ml/min a kolona promývána 50 ml promývacího pufru.

Protein byl eluován za použití elučního pufru, kdy byl za detektor zapojen frakční kolektor pro sběr frakcí (frakce sbírány po 5 ml do skleněných zkumavek). Po eluci byla pomocí programu BioLogic™ vyhodnocena absorbance při 205 nm, tj. ve kterých frakcích se nachází eluovaný protein a zbylé frakce byly vyhozeny.

Kolona byla promyta 100 ml regeneračního pufru a poté převedena do roztoku pro uložení kolony. FPLC systém byl promyt deionizovanou vodou a poté roztokem pro uložení kolony.

### **3.2.22 Štěpení bakteriálních vzorků**

Vzorky byly koncentrovány centrifugací ve falkonách pro ultrafiltraci za použití 5 kDa filtru při 4 °C a 5 000 *xg* a použití úhlového rotoru. Až objem vzorku poklesl pod 500 µl, bylo ke vzorku přilito 10 ml pufru pro LC-MS a centrifugace opakována. Promývání probíhalo do doby, než celková koncentrace soli poklesla pod 1 mM.

V případě většího objemu vzorku byl vzorek koncentrován a promýván na cele pro koncentrování proteinů rovněž s 5 kDa filtry. Ultrafiltrace v tomto případě probíhala za stálého míchání pomocí magnetické míchačky a dusíku jako hnacího plynu. Promývání opět probíhalo do doby, než celková koncentrace soli poklesla pod 1 mM.

V obou případech byl nakonec vzorek koncentrován na objem přibližně 2 ml. Vzorek byl následně alikvotován po 500 µl do 1,5ml mikrozkuavek, přidáno příslušné množství kyseliny trifluoroctové (specifikováno ve vyhodnocení) a vzorky ponechány štěpit v termobloku 24 hodin při 60 °C.

### **3.2.23 Kvantifikace celkových proteinů**

Celkové proteiny byly kvantifikovány metodou dle Bradforda (Bradford, 1976). Nejprve bylo činidlo ředěno deionizovanou vodou 1:4 (v/v). Do 1,5ml mikrozkuavek bylo pipetováno 1 ml ředěného činidla. Kalibrační řada byla pipetována ze zásobního roztoku komerčního standardu BSA a ze vzorku 0,5-10 µl tak, aby měl roztok slabě modré zbarvení. Následně byly mikrozkuavky krátce vortexovány a pomocí NanoDropu měřena koncentrace proteinů. Nejprve byla proměřena kalibrační řada a poté vzorky. Jako blank bylo použito ředěné reakční činidlo.

### 3.2.24 Příprava polyakrylamidových gelů

Skla byla opláchnuta deionizovanou vodou a vysušena papírovým ubrouskem s přídavkem 70% ethanolu. Mezi skla byl umístěn 1mm plastový spacer a skla byla poté umístěna do systému SureCast™. Do 50ml falkony byly postupně pipetovány roztoky pro přípravu dělicího gelu (udaná množství jsou pro přípravu dvou gelů), poté směs promíchána opatrným převrácením a pipetována mezi skla po rysku. Dělicí gel byl převrstven 500  $\mu$ l isopropanolu a gel ponechán tuhnout 15 minut.

Poté byl isopropanol odsát filtračním papírem, prostor mezi skly propláchnut deionizovanou vodou ze stříčky a zbylá voda vysušena filtračním papírem. Do 15ml falkony byly smíchány roztoky pro přípravu zaostřovacího gelu, směs promíchána opatrným převrácením a pipetována mezi skla. Následně byl mezi skla vložen plastový hřebínek a gel ponechán tuhnout minimálně 30 minut. Poté byl gel vyjmut ze systému SureCast™ a použit pro SDS-PAGE, nebo obalen papírovými ubrousky navlhčenými deionizovanou vodou a uchován v lednici pro pozdější použití.

### 3.2.25 SDS-PAGE elektroforéza

Do mikrozkušavky bylo pipetováno 7,5  $\mu$ l vzorkovacího pufru pro SDS-PAGE a 3  $\mu$ l redukčního činidla pro SDS-PAGE. Ze vzorku bylo pipetováno maximálně 19,5  $\mu$ l (celkový objem byl případně doplněn do 30  $\mu$ l Milli-Q vodou). Takto připravené vzorky byly krátce vortexovány a stočeny na pikofuze. Následně byly zahřáty 10 minut v termobloku při 70 °C. Poté byly vzorky ponechány chladnout na laboratorní teplotu.

Mezitím byl připraven elektrodový pufr – 20 ml koncentrovaného elektrodového pufru bylo smícháno s 380 ml deionizované vody a celá směs opatrně promíchána tak, aby nedošlo ke vzniku bublin. Gel byl umístěn do elektroforetické komůrky (v případě precast gelů byla odstraněna ochranná páska), vyjmut hřebínek a nalit připravený elektrodový pufr. Jamky byly propláchnuty pipetováním a na gel nanoseny vzorky spolu se standardem pro SDS-PAGE, případně pozitivní kontrolou (syntetickým LL-37). Elektroforetická komůrka byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného napětí. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 150 V po dobu 40 až 45 minut.

Po proběhnutí elektroforézy byl gel vyjmut ze skel (v případě precast gelů z plastů), opláchnut v deionizované vodě, odříznuty hřebínky a spodní část gelů, nakonec označen levý horní roh.

### **3.2.26 Barvení gelu – barvení na stříbro**

Gel byl přemístěn do plastové vaničky a promyt 3x deionizovanou vodou. Do vaničky byl nalit fixační roztok a gel ponechán na orbitální třepačce při 40 rpm po dobu 30 minut. Poté byl promývací roztok ředěn deionizovanou vodou v poměru 1:9 (v/v) a gel ponechán dalších 30 minut třepat. Následně byl ředěný promývací roztok odlit a gel promyt 3x deionizovanou vodou. Do vaničky byl nalit na 1 minutu roztok thiosíranu a poté gel opět promyt 2x deionizovanou vodou. Dále byl do vaničky nalit roztok dusičnanu stříbrného, který byl ponechán 20 minut při 40 rpm na orbitální třepačce.

Roztok dusičnanu stříbrného byl odlit a gel propláchnut velkým objemem deionizované vody, maximálně však 20 sekund. Gel byl následně přemístěn do plastové vaničky s vyvolávacím roztokem a za stálého třepání byly postupně vizualizovány separované proteiny. Po dosažení dostatečného obarvení proteinových bandů byl gel přemístěn do fixačního roztoku II, kde byl ponechán minimálně 5 minut.

Nakonec byl gel dokumentován pomocí systému pro dokumentaci Gel Doc™ EZ Imager a vyhodnocen v programu Image Lab™ 6.0.

### **3.2.27 Barvení gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue**

Gel byl přemístěn do plastové vaničky, přelit barvicím roztokem a inkubován na orbitální třepačce 2 hodiny při 40 rpm. Poté byl barvicí roztok odlit do odpadní nádoby a gel propláchnut velkým množstvím deionizované vody. Do vaničky byl poté nalit odbarvovací roztok a vanička ponechána na orbitální třepačce minimálně dalších 30 minut. Pokud po 30 minutách nedošlo k dostatečnému odbarvení, byl odbarvovací roztok vyměněn za nový. Po odbarvení gelu byl gel dokumentován pomocí systému pro dokumentaci Gel Doc™ EZ Imager a vyhodnocen v programu Image Lab™ 6.0.

### 3.2.28 Western blot

Gel byl po proběhnutí SDS-PAGE přemístěn do vaničky s přenosovým pufrem a ponechán na orbitální třepačce minimálně 10 minut při 40 rpm. Mezitím byla ustřižena membrána podle šablony tak, aby přesahovala přibližně 1 mm velikost gelu. Hydrofobicita membrány byla snížena ponořením membrány na 30 sekund do methanolu, poté propláchnuta 2x deionizovanou vodou a ponechána ve vaničce s přenosovým pufrem na orbitální třepačce minimálně 5 minut.

Z filtračního papíru byly vystřiženy čtyři obdélníky podle velikosti vložky ze savého porézního materiálu. Následně byl sestaven „sandwich“, a to v následujícím pořadí: vložka ze savého porézního materiálu, dva filtrační papíry, gel, membrána, dva filtrační papíry a vložka ze savého porézního materiálu. Při sestavování byla použita pinzeta a po sestavení byly odstraněny bubliny pomocí válečku.

„Sandwich“ byl umístěn do elektroforetické komůrky ve správné orientaci tak, aby proteiny mohly přecházet z gelu na membránu. Nakonec byla do elektroforetické komůrky umístěna chladicí kostka, komůrka uzavřena víkem a připojena na zdroj stejnosměrného napětí. Přenos probíhal 60 minut při konstantním napětí 100 V a poté bylo napětí sníženo na 20 V a přenos ponechán přes noc v chladu (4 °C).

Další den byl nejprve ředěn roztok pro imunoblot – 6 ml 5x iBind™ pufru bylo pipetováno do 50ml falkony spolu s 300 µl iBind™ aditiva. Objem byl doplněn na 30 ml deionizovanou vodou a směs promíchána opatrným převrácením. „Sandwich“ byl vyjmut z elektroforetické komůrky, gel barven pomocí Coomassie Brilliant Blue (viz. kapitola 3.2.27) a na membráně zlehka tužkou označen standard. Membrána byla poté přemístěna do vaničky s 5 ml připraveného roztoku pro imunoblot tak, aby strana membrány s přenesenými proteiny směřovala dolů.

Primární a sekundární protilátka byly ředěny dle doporučení výrobce do 2 ml připraveného roztoku pro imunoblot. Primární protilátka byla ředěna 1:400 (v/v) a sekundární protilátka 1:1 000 (v/v). Mikrozkušavky s ředěnými protilátkami byly promíchány opatrným převrácením.

Savá podložka (iBind™ Card) byla vložena do systému pro imunoblot iBind™ a celá plocha navlhčena 5 ml připraveného roztoku pro imunoblot. Poté byl pipetován 1 ml tohoto roztoku do středu savé podložky a umístěna membrána tak, aby byly proteiny v kontaktu se savou podložkou. Bubliny byly odstraněny válečkem a systém uzavřen. Do jednotlivých jamek byly postupně pipetovány roztoky v následujícím pořadí: 1) 2 ml ředěné primární protilátky, 2) 2 ml připraveného roztoku pro imunoblot, 3) 2 ml ředěné sekundární protilátky, 4) 8 ml připraveného roztoku pro imunoblot.

Po 3-3,5 hodinách inkubace byla zkontrolována poslední jamka systému pro imunoblot. V případě, že došlo k úplnému spotřebování všech roztoků, byla membrána přemístěna mezi dvě průhledné plastové folie a připraven detekční roztok. Pro detekci bylo do mikrozkušavky pomocí špiček s filtrem pipetováno 500 µl obou roztoků chemiluminiscenčního substrátu. Mikrozkušavka byla promíchána převrácením a směs pipetována na membránu. Přebytečné množství bylo odsáto pomocí papírového ubrousku a membrána dokumentována pomocí dokumentačního systému ChemiDoc XRS+.

V případě nízkého signálu byl na membránu pipetován nový roztok připraveného chemiluminiscenčního substrátu a membrána přiložena v temné místnosti na autoradiografický film, přičemž pro práci v temné místnosti bylo použito červené světlo. Další den byl autoradiografický film přemístěn do vaničky s vývojkou a po dostatečné vizualizaci byl opláchnut deionizovanou vodou a následně přemístěn do vaničky s fixačním roztokem. Nakonec byl film opět opláchnut deionizovanou vodou a ponechán uschnout na laboratorním stole.

### **3.2.29 LC-MS**

#### **3.2.29.1 Analytická kolona**

V případě použití analytické kolony byla kolona zapojena s přímým nástřikem do hmotnostního spektrometru s jednoduchým kvadrupólem. Před zahájením práce byly oba kanály preparativní pumpy primovány alespoň 5 minut za průtoku 5 ml/min. Kolona byla poté zapojena a ponechána promývat směsí mobilních fází 5:95 (A:B; v/v) a převedena dvacetiminutovým gradientem z uchovávacího solventu do výchozího poměru gradientu (stejný průtok jako metoda použitá pro analýzu).

Po ustálení tlaku byly měřeny vzorky – mezi každou analýzou byl přítom zařazen blank (prázdný nástřík).

Nástřík byl proveden nasátím vzorku rychlostí 900  $\mu\text{l}/\text{min}$ , poté byla jehla oplachována ve flush portu 60 sekund. Samotný nástřík byl proveden rychlostí 3 000  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Pro ionizaci byl použit elektrosprej v pozitivním modu. Teplota sušícího plynu byla nastavena na 350 °C, použitým sušícím plynem byl dusík průtok 12,0 l/min. Tlak nebulizéru byl nastaven na 35 psig. Napětí na kapiláře bylo 3 000 V. V případě detekce se selektivním záznamem pro více hmot byl poměr času sběru signálu pro jednotlivé hmoty rozdělen rovným dílem mezi všechny hmoty.

Po dokončení analýzy byla kolona převedena zpět do směsi 5:95 (A:B; v/v) dvacetiminutovým gradientem.

### **3.2.29.2 Preparativní kolona**

V případě použití preparativní kolony byla kapilára z kolony zapojena na splitování, které bylo nastaveno na 1:100. Kvarterní pumpou byla do splitu přiváděna mobilní fáze 70:30 (A:B; v/v) rychlostí 0,300 ml/min (ředící faktor 1:15). Detekce hmotnostním spektrometrem probíhala při stejných podmínkách jako v případě použití analytické kolony se selektivním záznamem iontů hmot  $m/z$  749,60. Sběr pomocí frakčního kolektoru byl nastaven na sběr frakcí v přesně definovaných časových úsecích.

### **3.2.30 Testování antimikrobiální aktivity**

V případě, že se jednalo o vzorky po štěpení kyselinou trifluoroctovou, bylo ke vzorkům přidáno 10 ml pufru pro LC-MS a vzorky koncentrovány centrifugací ve falkonách pro ultrafiltraci za použití 2 kDa filtru při 4 °C a 5 000  $\times g$  za použití úhlového rotoru. Jakmile objem vzorku poklesl pod 500  $\mu\text{l}$ , bylo ve vzorcích měřeno pH. Pokud bylo  $\text{pH} < 7,9$  bylo ke vzorku přilito dalších 10 ml pufru pro LC-MS a centrifugace opakována.

Pro antimikrobiální test byla využita bakterie *Escherichia coli* kmen TOP 10, která byla nejprve inokulována do LB média bez přídavku selekčních antibiotik dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2. Následující den bylo do 10 ml LB média v 50ml falkoně inokulováno 25, 100, 250 a 750  $\mu\text{l}$  bakteriální prekultury. Poté byly falkony umístěny do rotačního inkubátoru na 37 °C a 150 rpm.



Po třech hodinách bylo měřeno  $OD_{600}$  v jednotlivých falkonách pomocí NanoDropu, a to do doby, než bylo dosaženo exponenciální fáze růstu bakterií. Falkona byla poté centrifugována při 6 000  $xg$ , 22 °C 5 minut a použité LB médium odlito do GMO odpadu. Bakteriální pelet byl suspendován v malém objemu pufru pro LC-MS, poté byla bakteriální suspenze dále ředěna pufrům pro LC-MS na  $OD_{600}=0,577$ . Z takto připravené suspenze bakterií bylo pipetováno 100  $\mu l$  do mikrozkušavky s 900  $\mu l$  pufru pro LC-MS.

Do 0,2ml mikrozkušavek bylo pipetováno 19  $\mu l$  vzorku/pozitivní kontroly (syntetického LL-37) a poté 1  $\mu l$  ředěné bakteriální suspenze. Mikrozkušavky byly krátce vortexovány a stočeny na pikofuze. Následně byly mikrozkušavky inkubovány 60 minut při 800 rpm při 37/22 °C (specifikováno ve vyhodnocení). Mezi tím byly označeny Petriho misky s LB agarem a pro každý vzorek vytvořena sada třech mikrozkušavek. Do první pipetováno 990  $\mu l$ , do zbylých dvou po 900  $\mu l$  pufru pro LC-MS.

Po inkubaci byly mikrozkušavky se vzorky umístěny na led. Vzorek bakterií byl nejprve promíchán pipetováním, následně pipetováno 10  $\mu l$  směsi do mikrozkušavky s 990  $\mu l$  pufru (ředění  $10^2$ ). Poté byla mikrozkušavka řádně protřepána a dále pipetováno 100  $\mu l$  z první mikrozkušavky do druhé (ředění  $10^3$ ). Mikrozkušavka opět řádně protřepána a do poslední mikrozkušavky pipetováno 100  $\mu l$  z druhé mikrozkušavky (ředění  $10^4$ ). Takto byla vytvořena ředící řada a z každého ředění po opětovném protřepání rozetřeno 100  $\mu l$  na Petriho misku s LB agarem. Baktérie byly poté kultivovány v inkubátoru při 37 °C přes noc. Následující den byly na všech miskách spočteny kolonie a vypočtena hodnota CFU (pro výpočet CFU bylo použito ředění s počtem kolonií v rozmezí 30-300, hodnoty pro výpočet jsou ve vyhodnocení značeny tučně).

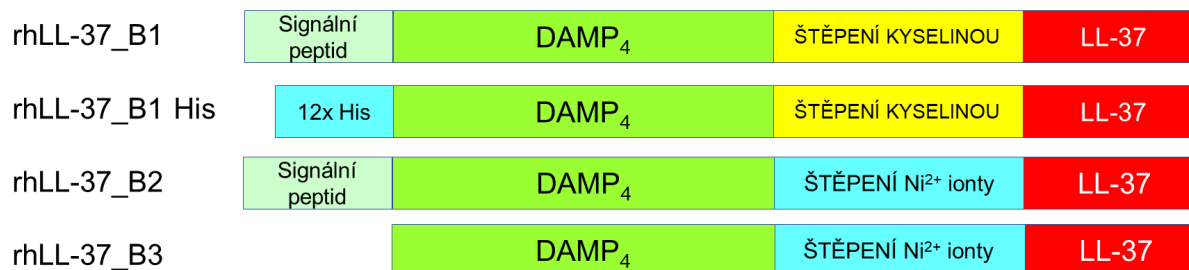
## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Přehled konstruktů

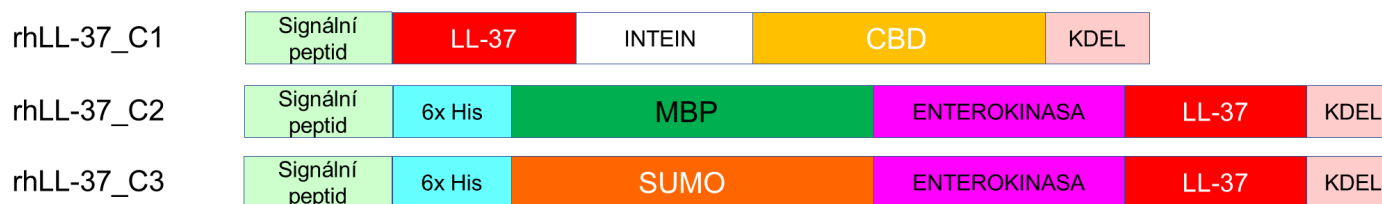
#### Konstrukty elastinového typu



#### Konstrukty s DAMP<sub>4</sub>



#### Konstrukty s dalšími purifikačními značkami



## **4.2 Popis konstruktů použitých v praktické části**

### **4.2.1 Konstrukty elastinového typu**

#### **rhLL-37\_A1**

Konstrukt obsahuje signální sekvenci, která je určená pro expresi v ječmeni (12S seed storage globulin). Za touto signální sekvencí je sekvence kódující antimikrobiální peptid LL-37, následuje linker, za kterým je zařazen intein pro snadné odštěpení značky v redukujícím prostředí. Následuje další linker a zbytek CBD, do které bylo klonováno v rámci bakalářské práce 60 ELP motivů (pomocí nich je možné částečně purifikovat tento konstrukt reverzibilní precipitací). Na konci tohoto konstruktu je sekvence čtyř aminokyselin KDEL (sekvence pro návrat do endoplazmatického retikula).

#### **rhLL-37\_A2**

Konstrukt je totožný s rhLL-37\_A1 s rozdílem počtu ELP motivů → 120. Tento konstrukt byl taktéž klonován v rámci bakalářské práce.

### **4.2.2 Konstrukty s DAMP4**

#### **rhLL-37\_B1**

Konstrukt obsahuje signální sekvenci pro expresi v ječmeni (12S seed storage globulin), za kterou následuje helikální protein DAMP4, který se skládá ze čtyř šroubovic a zvyšuje stabilitu rekombinantního proteinu při termální denaturaci a precipitaci solí. Následuje sekvence aminokyselin DPS, která umožňuje štěpení značky od antimikrobiálního peptidu LL-37, který se nachází na C-terminálním konci. Pro štěpení aminokyselin DPS je použito kyselé prostředí za zvýšené teploty. Štěpení probíhá mezi aminokyselinami D a P, proto po štěpení zůstávají na rekombinantním antimikrobiálním peptidu LL-37 navázané aminokyseliny P a S (PS-LL-37).

#### **rhLL-37\_B1 His**

Tento konstrukt obsahuje za START kodonem His-12 pro afinitní purifikaci, následuje helikální protein DAMP4, štěpící místo DPS a sekvenci kódující antimikrobiální peptid LL-37. Tento konstrukt byl připraven pro testování afinitní purifikace v bakteriálním expresním systému.

### **rhLL-37\_B2**

Konstrukt je stejný jako rhLL-37\_B1 s rozdílem štěpícího místa, které bylo navrženo pro štěpení v přítomnosti nikelnatých iontů za zvýšené teploty.

### **rhLL-37\_B3**

Konstrukt je stejný jako rhLL-37\_B2, ale neobsahuje signální sekvenci pro 12S seed storage globulin.

## **4.2.3 Konstrukty s dalšími purifikačními značkami**

### **rhLL-37\_C1**

Konstrukt obsahuje signální sekvenci (12S seed storage globulin), za kterou je sekvence kódující antimikrobiální peptid LL-37. Následuje linker, za kterým je zařazen intein pro snadné odštěpení značky v redukujícím prostředí. Následuje další linker a CBD pro afinitní purifikaci. Na konci tohoto konstruktu je KDEL sekvence.

### **rhLL-37\_C2**

Konstrukt obsahuje signální sekvenci (ZmCKX1), za kterou je His-6 pro afinitní purifikaci. Následuje MBP, která umožňuje taktéž afinitní purifikaci. Za touto doménou následuje linker a štěpící místo pro enterokinasu. Na konci konstruktu je sekvence kódující antimikrobiální peptid LL-37 a KDEL sekvence. Tento konstrukt byl obdržen od Mgr. Edity Holáskové, Ph.D. ve vektoru pENTR 3C. Doktorka Holásková tento konstrukt připravila a použila v rámci své dizertační práce pro expresi v *H. vulgare*.

### **rhLL-37\_C3**

Tento konstrukt je totožný s rhLL-37\_C2, kdy namísto MBP je použit small ubiquitin-like modifier (SUMO) pro zvýšení rozpustnosti rekombinantního proteinu. Konstrukt byl rovněž obdržen od Mgr. Edity Holáskové, Ph.D. ve vektoru pENTR 3C.

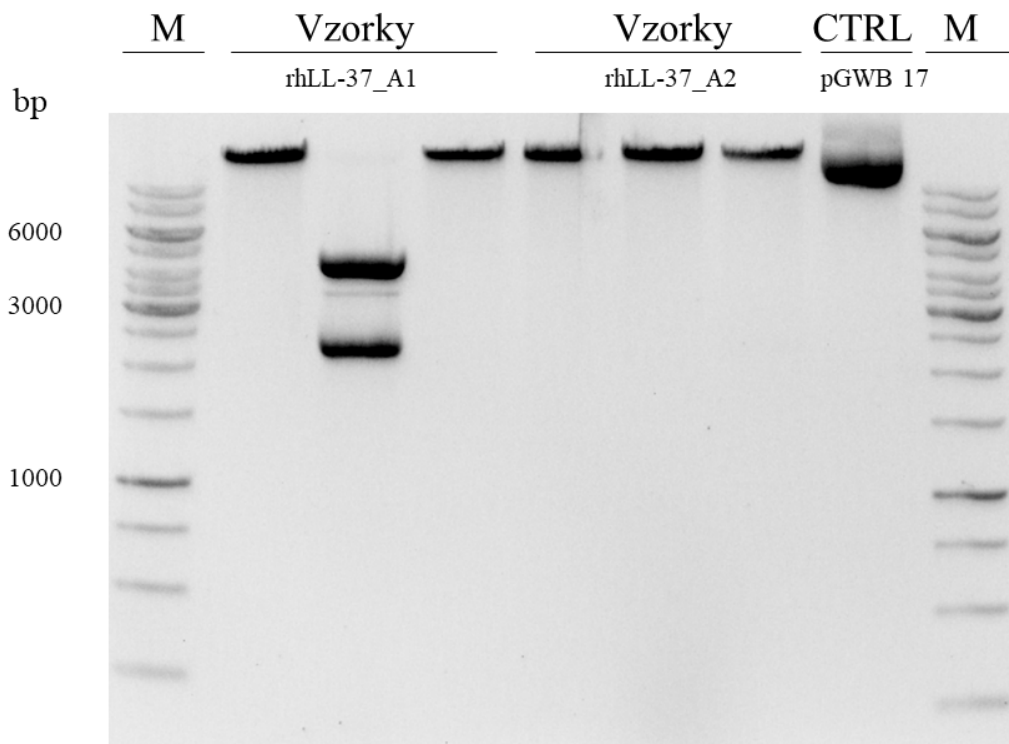
Sekvence konstruktů jsou umístěny v Příloze 1. Obrázky sekvencí převzaty z bakalářské práce (Kopečný, 2018).

### 4.3 Příprava konstruktů na transformaci

Konstrukty elastinového typu byly klonovány do vektoru pENTR 3C pomocí restrikčních enzymů *Bam*HI a *Xho*I. Poté byla izolována plazmidová DNA, která byla zaslána na sekvenaci.

Konstrukty s DAMP4 byly připraveny v rámci bakalářské práce klonováním do bakteriálního expresního vektoru pET 28b+. Nejprve byly všechny tyto konstrukty klonovány do konstruktu pENTR 3C::rhLL-37\_C1 pomocí restrikčních enzymů *Nco*I a *Xho*I. Poté byla izolována plazmidová DNA, která byla zaslána na sekvenaci. Pro testování funkčnosti signální sekvence byl konstrukt rhLL-37\_B2 klonován do vektoru pomocí restrikčních enzymů *Bam*HI a *Xho*I, aby byl finální konstrukt ve vektoru pGWB 17 bez signální sekvence (konstrukt rhLL-37\_B3).

Všechny konstrukty ve vektoru pENTR 3C byly následně klonovány do vektoru pGWB 17 pomocí LR rekombinace viz. kapitola 3.2.14. Následně byly izolovány plazmidy ze třech náhodných kolonií a provedena restrikce pro rozlišení původního a destinačního vektoru pGWB 17. Reprezentativní výsledek je uveden na Obr. 7. Nakonec byly všechny klonované konstrukty ověřeny sekvenací.



Obrázek 7: Reprezentativní výsledek pro rozlišení destinačního a původního vektoru (štěpeno enzymem *Xho*I → jedno restrikční místo). M – marker; CTRL – štěpený prázdný vektor pGWB 17

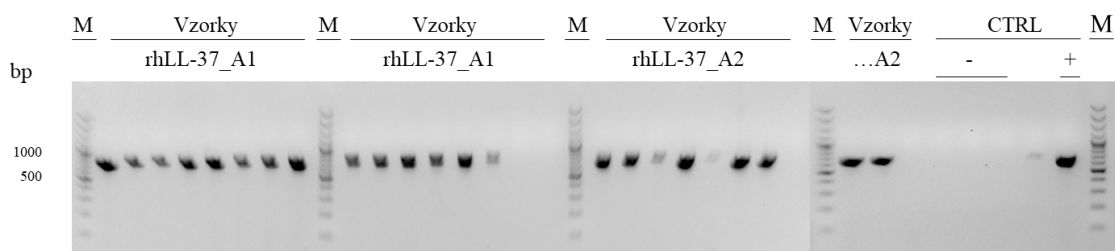
### 4.3.1 Modifikace konstruktů rhLL-37\_B1 pro expresi ve fermentoru

Konstrukt pET 28b+::rhLL-37\_B1 byl modifikován pomocí primerů, a to tak, aby před start kodonem bylo 12x His pro umožnění afinitní purifikace. Plazmidová DNA byla štěpena pomocí restrikčního enzymu *NcoI*, fragment purifikován a provedeno pět reakcí Phusion PCR s primery DAMP\_His\_fw a DAMP\_His\_rev. Reakce poté byly smíchány a templát štěpen přidavkem restrikčního enzymu *DpnI*.

Poté byl enzym inaktivován a fragment purifikován. Následovalo štěpení pomocí restrikčního enzymu *NcoI*, aby došlo ke vzniku lepivých konců. Poté byla reakce opět inaktivována a fragment purifikován. Nakonec byla provedena ligace a elektroporace do *E. coli* TOP 10. Následovala colony PCR a plazmidy ze dvou pozitivních kolonií byly zaslány na sekvenaci. Takto připravený konstrukt (dále rhLL-37\_B1\_His) byl transformován do expresních buněk *E. coli* BL21 STAR DE3. Expresní buňky byly použity pro expresi katelicidinu ve fermentoru.

### 4.4 Stabilní transformace *A. thaliana*

Pro stabilní transformaci byly vybrány konstrukty rhLL-37\_A1 a rhLL-37\_A2, které byly neúspěšně testovány v rámci bakalářské práce v bakteriálním expresním systému. Tyto konstrukty byly nejprve klonovány do expresního vektoru pGWB 17 viz. kapitola 4.3 a transformace probíhala dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.16. Následně byla provedena genotypizace dle kapitoly 3.2.17. Reprezentativní výsledek genotypizace je na Obr. 8 (velikost PCR produktu 665 bp).



Obrázek 8: Reprezentativní výsledek genotypizace. M – marker, CTRL (-) – reakce bez templátu, CTRL (+) – jako templát použita plazmidová DNA

#### 4.4.1 Selekcce jedné inzerce a homozygotních jedinců

V následující generaci byly selektovány linie s jednou inzercí pomocí selekce na MS médiu s přidavkem hygromycinu B (20 µg/ml). V případě, že poměr mezi rezistentními a senzitivními rostlinami vůči přidanému antibiotiku byl 3:1 (rezistentní:senzitivní), byly rostliny dané linie označeny jako rostliny s jednou T-DNA inzercí. Senzitivní rostliny byly odlišeny dle rozdílného fenotypového projevu – kratší kořen a pomalejší růst nadzemní části, kdy po čase docházelo také ke žloutnutí listů a postupnému odumírání celé rostliny.

Dle Mendelových zákonů dědičnosti je při jedné inzerci jedna čtvrtina rostlin dané linie homozygotní, dvě čtvrtiny heterozygotní a jedna čtvrtina bez inzerce. Z toho plyne, že při jedné inzerci by měl být poměr mezi rezistentními a senzitivními rostlinami právě 3:1. V případě, že byl tento poměr nižší, docházelo pravděpodobně k umlčení daného genu a s danou linií nebylo dále pracováno. V případě, že tento poměr je vyšší než 3:1, je pravděpodobné, že došlo k více než jedné T-DNA inzerci a s těmito liniemi nebylo taktéž dále pracováno.

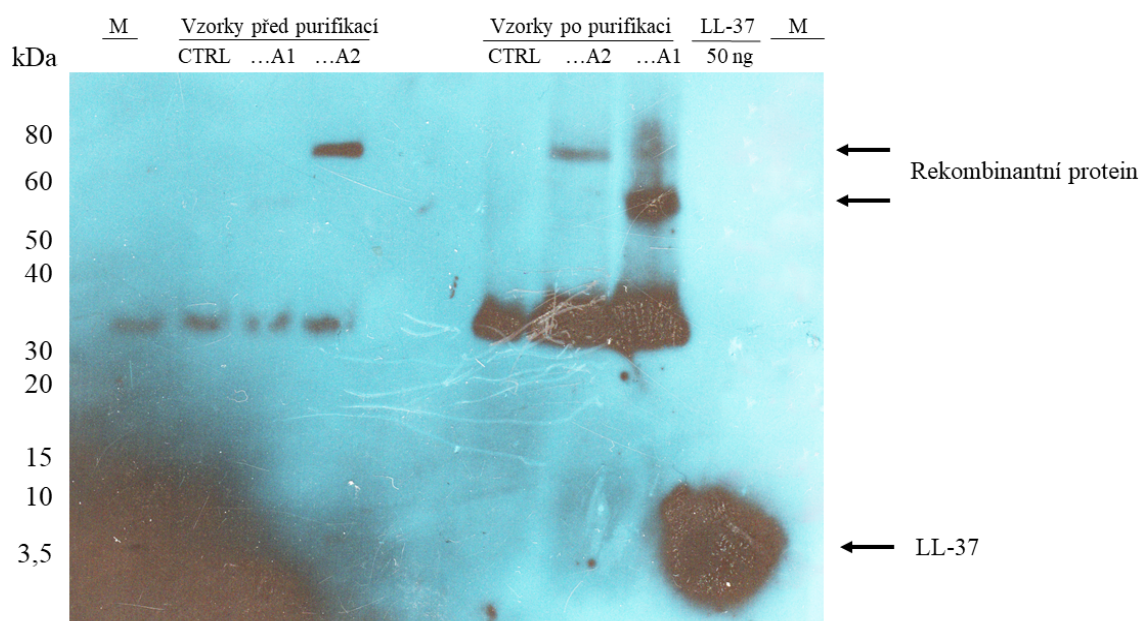
V následující generaci byli selektováni homozygotní jedinci dané linie, a to opět pomocí selekce na MS médiu s přidavkem hygromycinu B (15 µg/ml). Semena jednotlivých rostlin dané linie byla vysazena na MS médium s hygromycinem B a v případě, že byla téměř všechna semena dané rostliny rezistentní, jednalo se o homozygota. V případě, že poměr mezi rezistentními a senzitivními rostlinami byl 3:1, byla daná rostlina označena jako heterozygotní a pokud byla všechna semena dané rostliny senzitivní, jednalo se o rostliny bez inzerce.

#### 4.4.2 Testování purifikace pomocí citrátu

Selektované homozygotní linie byly vysazeny do zeminy a pěstovány do doby, než rostliny začaly nasazovat na květ. Poté byly všechny rostliny homogenizovány ve třecí misce s tekutým dusíkem. Vzorky byly následně ponechány lyofilizovat do dalšího dne. Z každého vzorku bylo do mikrozkuhavky odebrán 1 gram a provedena extrakce do vychlazeného extrakčního pufru pro *A. thaliana* v poměru 1:4 (w/v). Extrakce probíhala jednu hodinu na ledu za občasného promíchání převrácením. Poté byly vzorky centrifugovány při 15 000 xg 4 °C po dobu 10 minut.

Následně byl supernatant přemístěn do nové falkony a rekombinantní protein srážen 0,3 M citrátem sodným (inkubace 10 minut při 45 °C). Poté byla falkona centrifugována při 45 °C 15 000 xg 10 minut. Supernatant byl odlit a pelet suspendován ve 100 µl vychlazeného extrakčního pufru pro *A. thaliana*.

Tímto postupem lze reverzibilně precipitovat konstrukty rhLL-37\_A1 a rhLL-37\_A2, které obsahují elastinový motiv a tím je částečně purifikovat a koncentrovat. Následně byla s extraktem před a po reverzibilní precipitaci provedena SDS-PAGE a Western blot. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 9. Z výsledků je patrné, že došlo ke koncentrování rekombinantních proteinů a po měření obsahu proteinů v jednotlivých vzorcích bylo zjištěno, že došlo k poklesu koncentrace celkových proteinů přibližně na polovinu. Celý postup reverzibilní precipitace lze však několikrát opakovat a značně tak zvýšit čistotu rekombinantních proteinů.

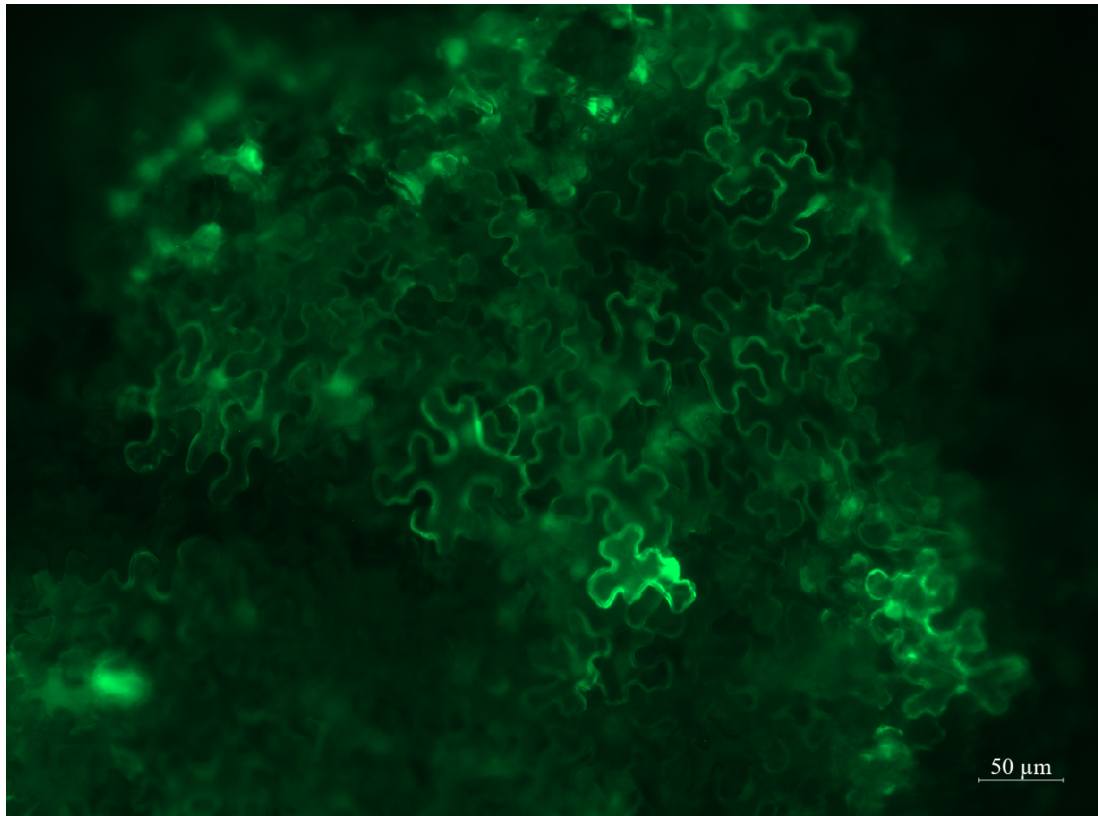


Obrázek 9: Purifikace konstruktů s ELP motivem pomocí reverzibilní precipitace citrátem (Western blot)

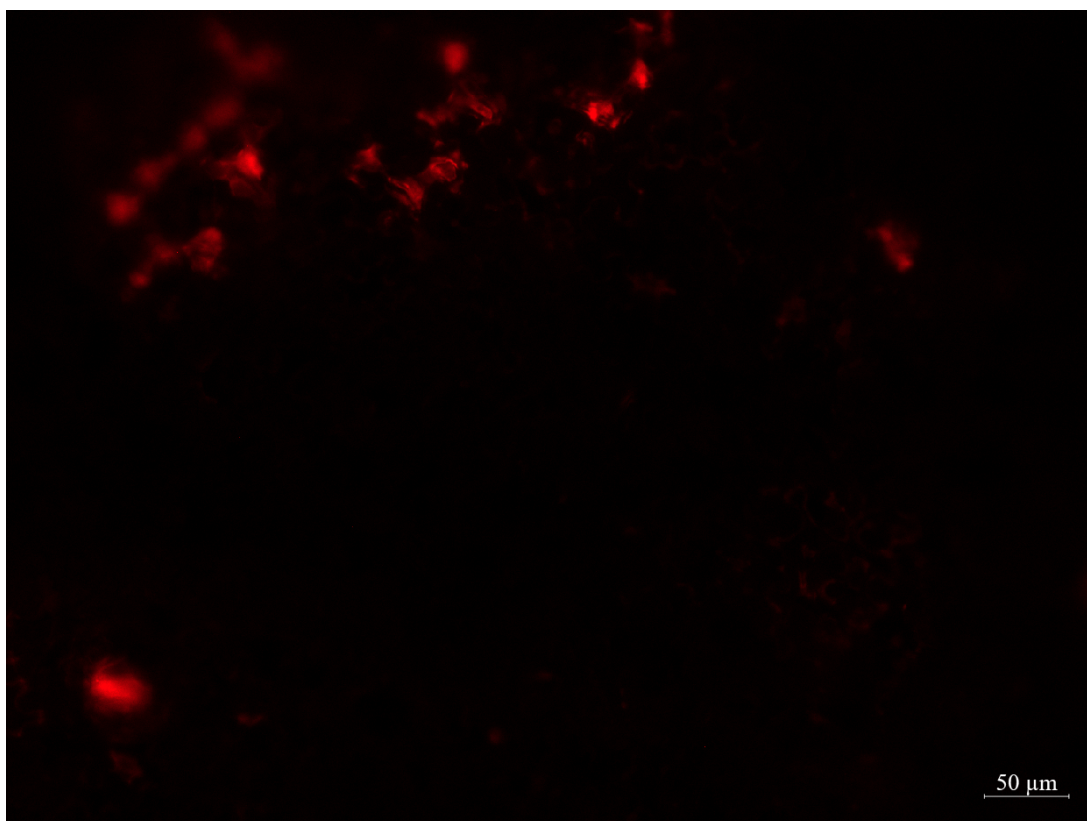


#### 4.5 Transientní transformace *N. benthamiana*

Konstrukty pGWB 17::rhLL-37\_A1, A2, B1, B2, B3, C1, C2, C3 byly dále testovány pomocí transientní transformace v *N. benthamiana*. Rostliny byly transformovány dle kapitoly 3.2.18, kdy transformovány byly vždy tři rostliny na konstrukt a jako pozitivní kontrola použit konstrukt pGWB 17::GFP. Jako negativní kontrola, označená jako WT, byly použity buňky elektrokompetentního *A. tumefaciens*, které neobsahovaly žádný konstrukt. Pro sběr listů byl vybrán 2., 3. a 4. den po infiltraci a daný den byl vždy sesbírán rostlinný materiál z jedné rostliny. Čas pro sběr listů byl určen sledováním exprese pozitivního konstruktů pomocí epifluorescenčního mikroskopu (provedeno ve spolupráci se Sjarhei Dabrovolski, MSc). Reprezentativní výsledky pro třetí den po infiltraci jsou na Obr. 10 pro GFP a na Obr. 11 pro RFP.



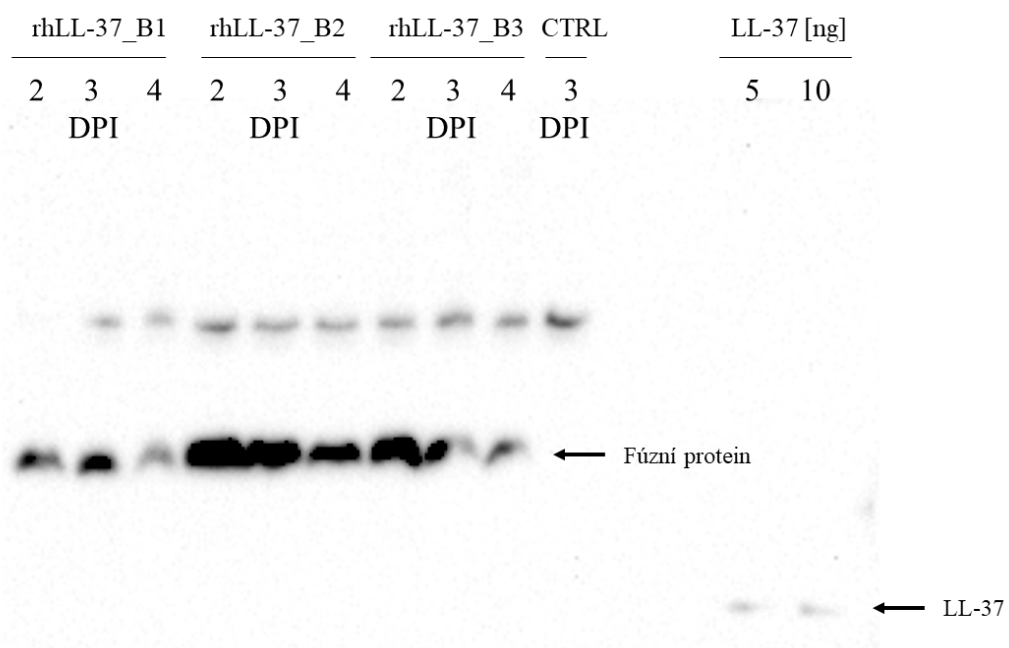
Obrázek 10: Sledování exprese kontrolního konstruktů pGWB 17::GFP pomocí epifluorescenčního mikroskopu.



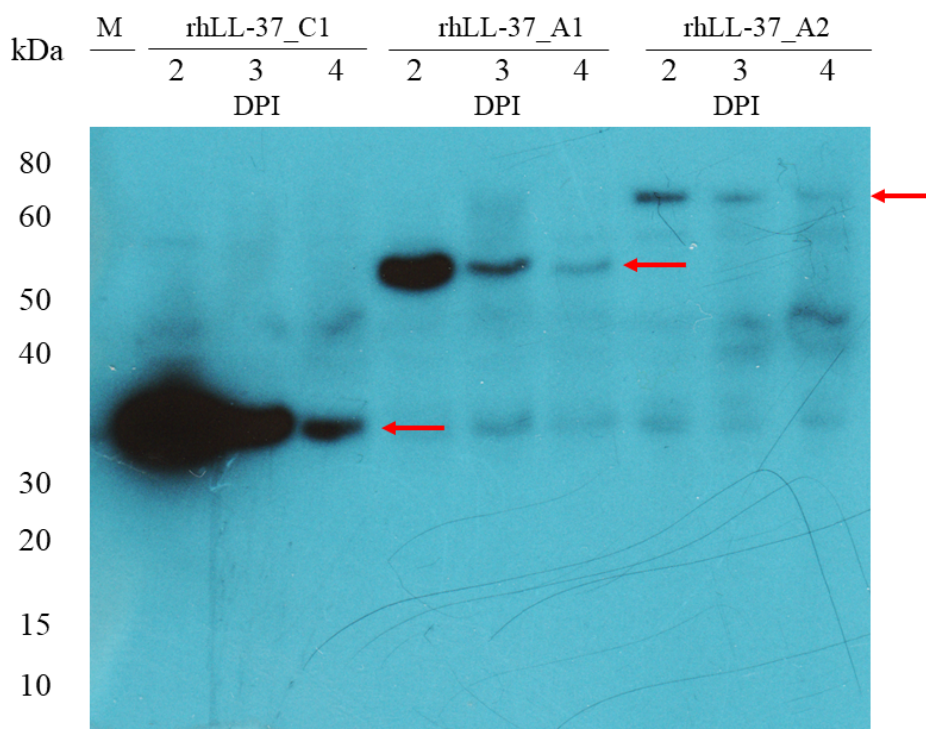
Obrázek 11: Sledování exprese kontrolního konstruktů pGWB 17::GFP pomocí epifluorescenčního mikroskopu

Výsledky Western blotu po transformaci jsou na Obr. 12, 13 a 14. Z výsledků je patrné, že exprese dosahovala maximum druhý den po infiltraci u téměř všech konstruktů, kromě rhLL-37\_C3, který se nepodařilo v *N. benthamiana* exprimovat.

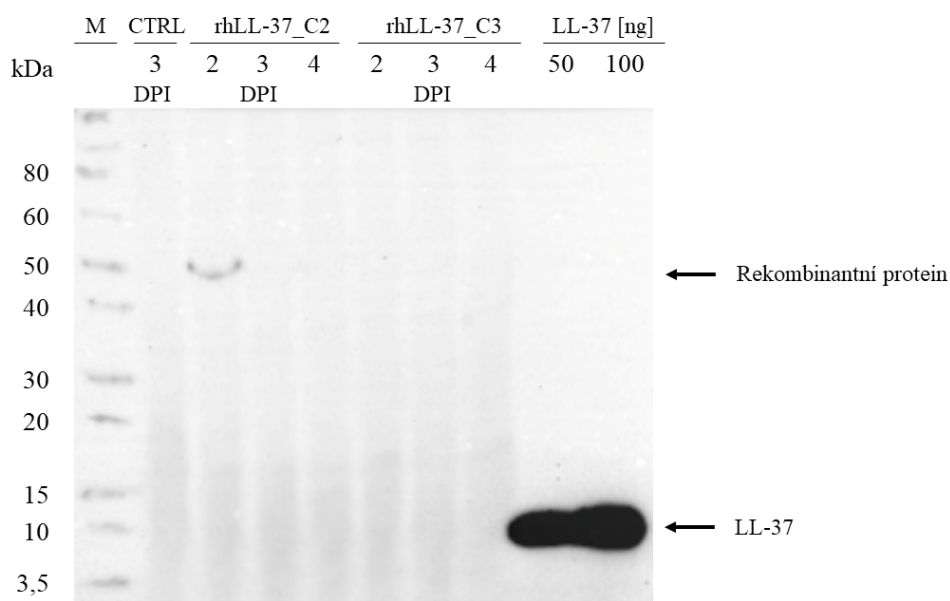
Bohužel odhad produkce rekombinantního proteinu na základě porovnání intenzity signálů pozitivní kontroly s intenzitou signálu jednotlivých rekombinantních proteinů ukázal, že výtěžek se u konstruktů pGWB 17::rhLL-37\_B2 (nejvyšší exprese ze všech konstruktů) pohyboval přibližně na 5 μg/g lyofilizovaných listů, což po přepočtu na gram čerstvé hmoty odpovídá přibližně 0,5 μg/g čerstvých listů. Z důvodu nízkého výtěžku a malého množství rostlinného materiálu však nemohly být rekombinantní proteiny dále purifikovány.



Obrázek 12: Výsledky exprese rekombinantních proteinů (Western blot). CTRL – rostliny transformované *A. tumefaciens* bez konstruktů, LL-37 – syntetický katelicidin



Obrázek 13: Výsledky exprese rekombinantních proteinů (Western blot). M – marker, šipky označují rekombinantní protein odpovídající velikosti



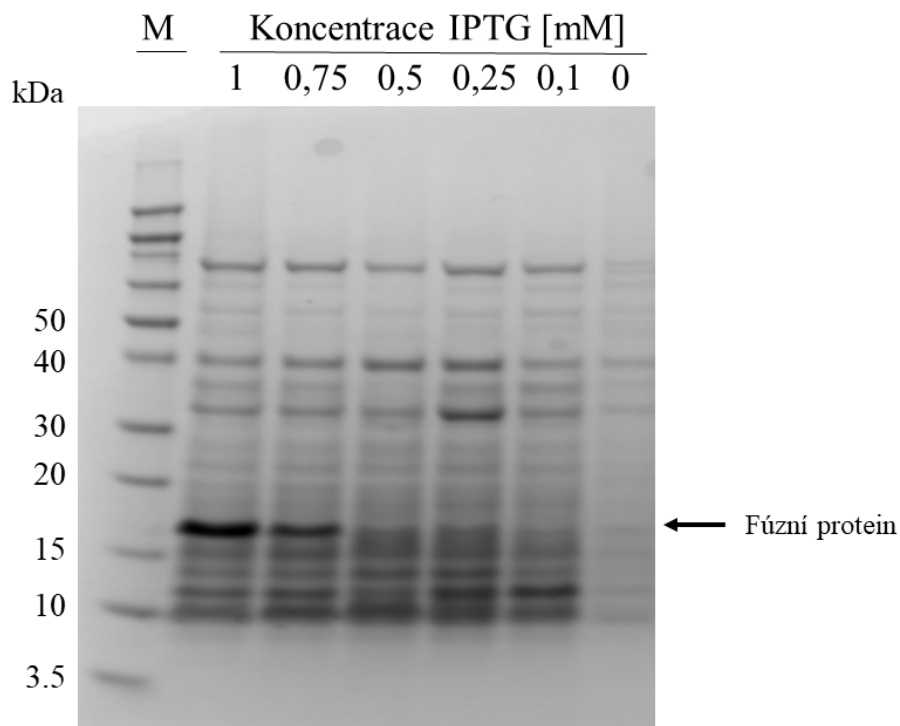
Obrázek 14: Výsledky exprese rekombinantních proteinů (Western blot). M – marker; CTRL – rostliny transformované *A. tumefaciens* neobsahující konstrukt, LL-37 – syntetický katelicidin

## 4.6 Exprese a purifikace v bakteriálním expresním systému

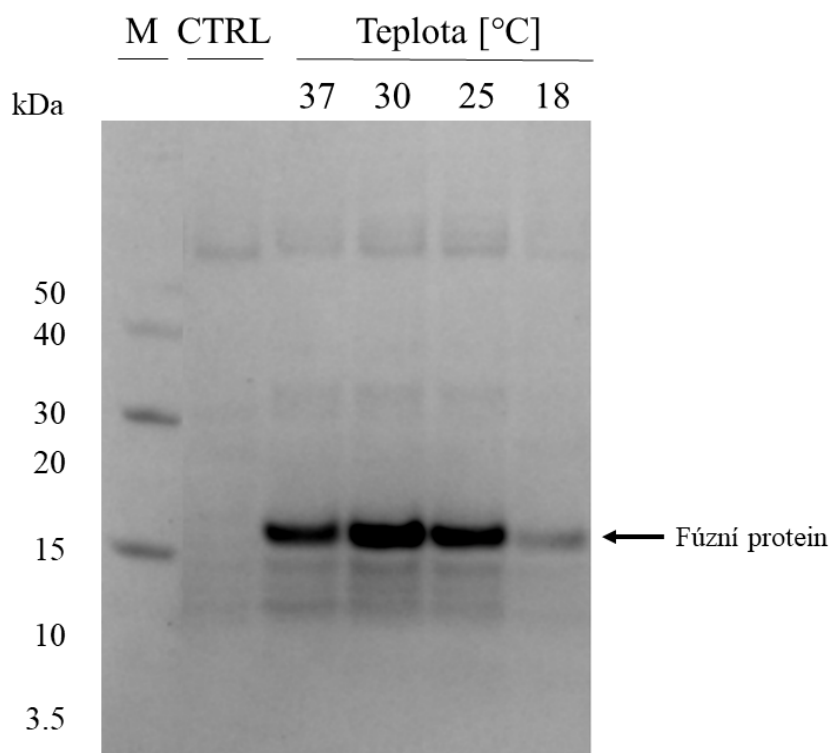
### 4.6.1 Optimalizace podmínek exprese

U konstruktu pET28b+::rhLL-37\_B1 byla nejprve provedena optimalizace exprese v 50 ml LB média v Erlenmayerových baňkách. Optimalizovány byly následující podmínky: koncentrace IPTG pro indukci exprese (0,1-1,0 mM), teplota exprese (37, 30, 25, 18 °C) a čas exprese (1, 2, 4, 6 a 16 hodin). Výsledky optimalizace jsou na Obr. 15 (koncentrace IPTG), 16 (teplota), 17 (čas exprese).

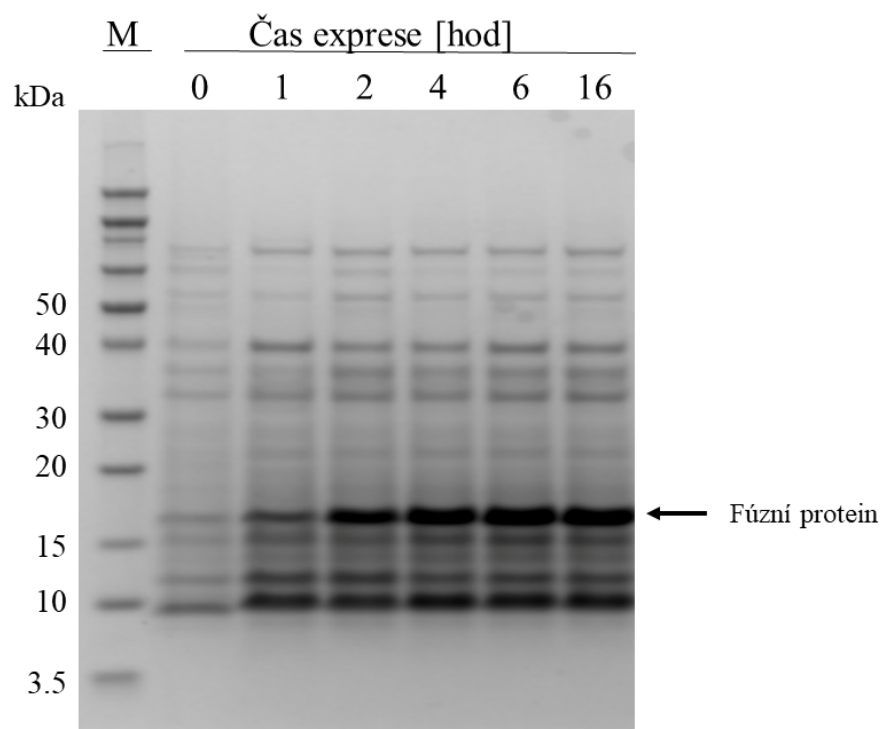
Z těchto výsledků byly postupně vybrány nejvhodnější podmínky exprese koncentrace IPTG 1 mM, exprese při 30 °C po dobu 6 hodin. Následně byly provedeny dvě testovací exprese ve fermentoru (5 l) s konstruktem pET28b+::rhLL-37\_B1 His a po vyhodnocení výtěžku pomocí Western blotu bylo zjištěno, že je možné teoreticky získat až 45 mg rekombinantního PS-LL-37 z 20 litrů média ve fermentoru před purifikací a po parciální purifikaci (termální denaturací kontaminujících proteinů) a afinitní purifikaci FPLC je očekávaný výtěžek 35 mg. Poté byla provedena exprese ve 20 litrech LB média a bakteriální extrakt zpracován dle kapitoly 3.2.20.



Obrázek 15: Optimalizace koncentrace IPTG pro indukci exprese, inkubace při 25 °C, 6 hodin (gel barvený na stříbro). M – marker, 0 – kultura bez indukce IPTG



Obrázek 16: Optimalizace teploty použité pro expresi, inkubace s 1 mM IPTG 6 hodin (gel barvený na stříbro). M – marker, CTRL – kultura před indukci

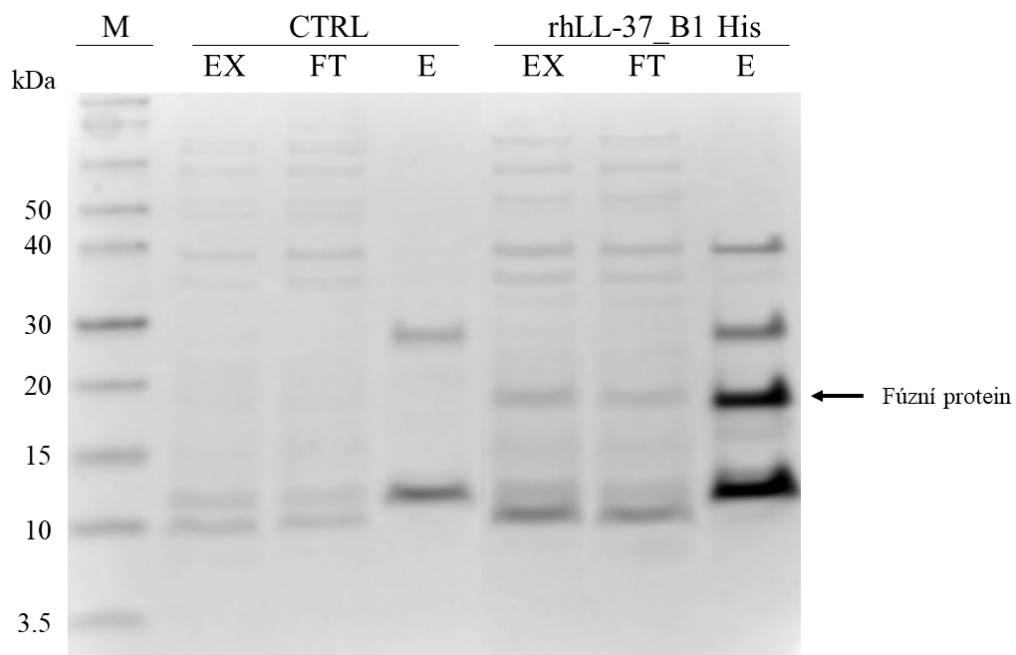


Obrázek 17: Optimalizace času exprese, inkubace při 30 °C s 1 mM IPTG (gel barven na stříbro). M – marker, čas 0 – kultura před indukci

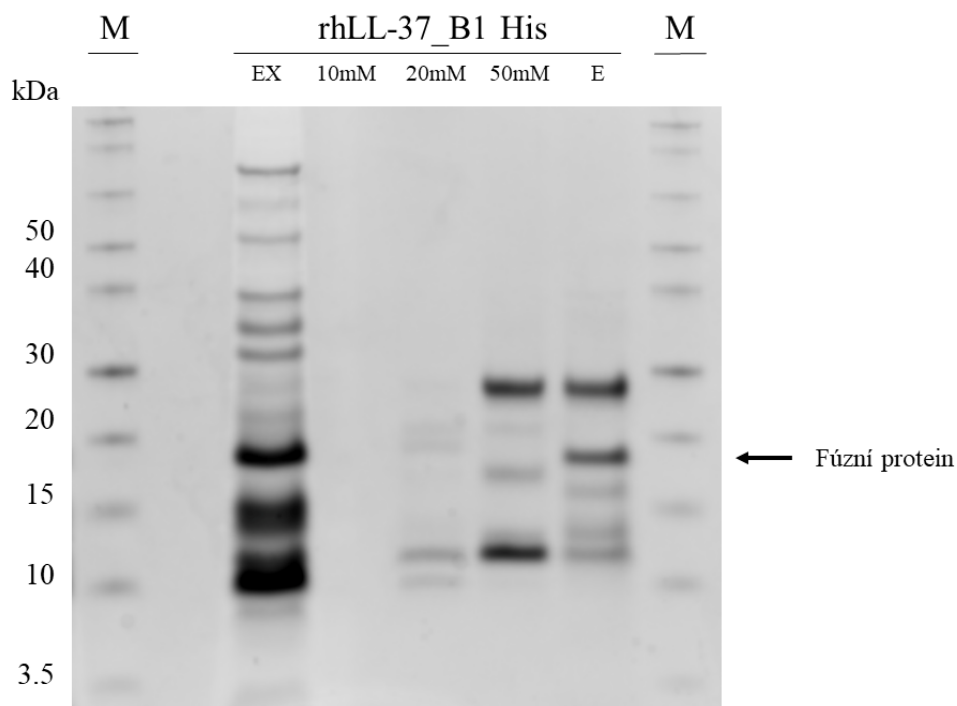
#### 4.6.2 Purifikace pomocí LPLC a FPLC

Purifikace bakteriálního extraktu probíhala dle návodu 3.2.21, nejprve byla schopnost proteinu vázat se na matici (ověření funkčnosti 12x His) testována za použití LPLC purifikačního systému s maticí NTA Agarosa od firmy QIAGEN s rozdílem použitého průtoku, který byl po celou dobu konstantní 0,5 ml/min. Po purifikaci byly vzorky koncentrovány centrifugací ve falkonách pro ultrafiltraci za použití 5 kDa „cut-off“. Až objem vzorku poklesl na 500  $\mu$ l, byly vzorky odebrány a provedena SDS-PAGE s barvením na Coomassie Brilliant Blue. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 18.

Následně byly vzorky purifikovány pomocí FPLC a po purifikaci vzorky opět koncentrovány centrifugací ve falkonách pro ultrafiltraci a provedena SDS-PAGE s barvením na Coomassie Brilliant Blue. Výsledky purifikace jsou zobrazeny na Obr. 19. Z výsledků purifikace pomocí afinitní FPLC je patrné, že při použití promývacího pufru nedochází k eluci rekombinantního proteinu. Navíc porovnáním výsledků purifikace pomocí LPLC a FPLC je patrné, že FPLC purifikace je účinnější. To zřejmě souvisí s použitou maticí, která byla u FPLC odlišná (HisPur™ Ni-NTA Superflow Agarose).



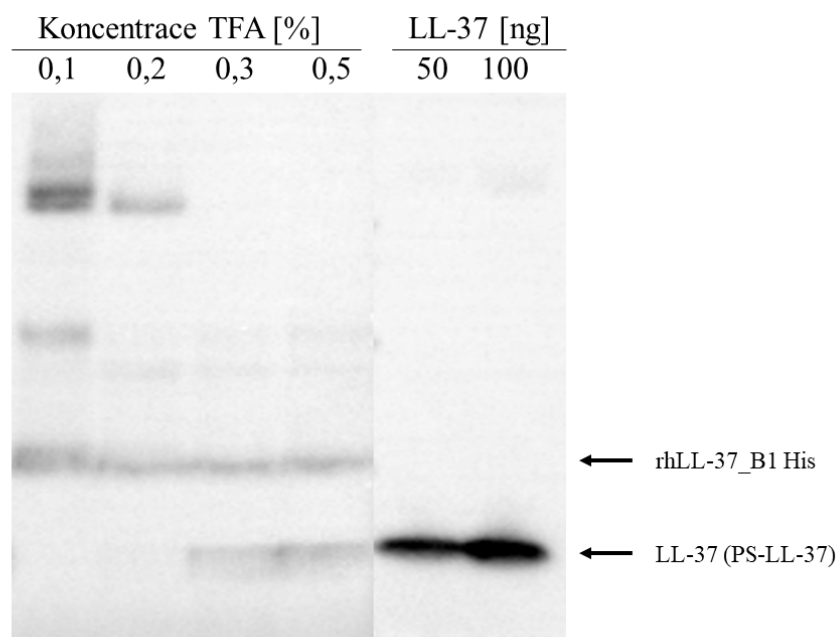
Obrázek 18: Výsledky purifikace pomocí afinitní chromatografie s využitím LPLC (gel barven na Coomassie). M – marker, EX – extrakt po termální denaturaci, FT – flow-through, E – eluovaná frakce



Obrázek 19: Výsledky purifikace pomocí afinitní chromatografie s využitím FPLC (gel barven na Coomassie). M – marker, EX – extrakt, 10-50 mM – koncentrace imidazolu v pufru, E – eluovaná frakce

### 4.6.3 Optimalizace štěpení pomocí kyseliny trifluoroctové

Pro štěpení byly použity vzorky z exprese ve fermentoru před a po afinitní purifikaci pomocí LPLC, postup štěpení je uveden v kapitole 3.2.22. Nejprve bylo provedeno testování štěpení pomocí různé procentuální koncentrace (v/v) kyseliny trifluoroctové. Výsledky jsou uvedeny na Obr. 20. Z výsledků Western blotu je patrné, že dochází k téměř úplnému štěpení fúzního proteinu pET 28b+::rhLL-37\_B1 His při použití procentuální koncentrace 0,5 (v/v). Proto byla při dalším štěpení používána koncentrace 0,5 % (v/v) (testovány byly i vyšší koncentrace, při kterých docházelo k degradaci proteinu, vzhledem k vysoké aciditě použité kyseliny). V případě použití vzorků pro LC-MS byly vzorky po štěpení filtrovány přes 0,22 $\mu$ m membránový filtr a poté ihned analyzovány, nebo zmrazeny (-80 °C).



Obrázek 20: Optimalizace podmínek štěpení rekombinantního proteinu pomocí TFA (Western blot). LL-37 – syntetický katelicidin



## 4.7 LC-MS analýza

### 4.7.1 Vytvoření metody pro detekci

Metoda pro separaci a analýzu syntetického lidského katelicidinu byla vytvořena Mgr. Michalem Karady, Ph.D. na UHPLC-MS/MS (Waters Acquity-Waters Quattro Micro API) v rámci projektu „Ověření purifikačního postupu pro izolaci rekombinantního produktu LL-37 ve větším měřítku“ (Frébort *et al.*, 2019).

Tato metoda byla nejprve přenesena na semipreparativní LC-MS, kdy byl systém zapojen s přímým nástřikem do hmotnostního spektrometru a na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 provedena analýza fragmentace standardu (viz. Příloha 2). Z detekce hmotnostním spektrometrem ve SCANu byly vybrány hmoty  $m/z$  642,0 a 749,6.

V následujícím nástřiku byl blank zařazen za standard. Bylo zjištěno, že při nástřiku standardu (v přepočtu na absolutní množství 100 ng), byla v následující analýze při použití Milli-Q vody jako blanku detekovaný pík 30 % (data nejsou zobrazena). Celá analýza byla zopakována se stejným výsledkem, proto byla kolona vyměněna za kolonu Aeris PEPTIDE 5  $\mu$ m 250x4,6 mm, u které se tento problém vyskytoval v menší míře (cca. 5 %). Pro separaci byl použit průtok 1 ml/min a gradient uvedený v Tab. 4. Chromatogramy jsou umístěny v Příloze 3.

Bohužel pík standardu značně chvostoval, a to i po optimalizaci gradientu. Proto byla následně testována a pro další analýzy použita kolona Poroshell 300SB-C18, u které se podobný problém již nevyskytoval a carry-over při nástřiku 1 000 ng se pohyboval v rozmezí 0,2-0,3 % viz. kapitola 4.8.2.

*Tabulka 4: Gradient použitý pro kolonu Aeris PEPTIDE*

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Průtok [ml/min]
0,00	75,00	25,00	1,00
19,00	20,00	80,00	---
21,00	25,00	75,00	---
25,00	75,00	25,00	---

## 4.7.2 Měření kalibrační křivky

Dále bylo provedeno měření kalibrační křivky pro standard, při kterém byl pozorován pokles plochy signálu při opakovaném nástřiku z jedné vialky (naměřená data nejsou zobrazena). To vedlo k domněnce, že standard není příliš stabilní v Milli-Q vodě při dlouhodobějším ponechání při laboratorní teplotě (autosampler nedisponuje v základní konfiguraci možností chlazení vzorku). Z tohoto důvodu byl zásobní roztok standardu ředěn různými roztoky a ponechán přes víkend v autosampleru při laboratorní teplotě (22 °C). Z každého roztoku bylo nastříknuto 20 µl odpovídající absolutnímu množství 1 000 ng původního standardu.

Vzhledem k použití většího množství standardu analýza probíhala za prodloužení gradientu v metodě, dle Tab. 5 za konstantního průtoku 0,63 ml/min. Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tab. 6 a příslušné chromatogramy v Příloze 4. Z výsledků analýzy stability v různých roztocích byla vybrána 20 mM kyselina chlorovodíková, kterou byl následně standard vždy ředěn. Kyselina chlorovodíková byla vybrána kvůli větší kompatibilitě s analýzou Western blotem.

*Tabulka 5: Gradient použitý pro měření stability standardu*

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Průtok [ml/min]
0,00	80,00	20,00	0,63
20,00	10,00	90,00	---
23,00	80,00	20,00	---
27,00	80,00	20,00	---

*Tabulka 6: Výsledky testování stability standardu v jednotlivých rozpouštědlech*

Použité rozpouštědlo	Plocha píku
0,1% FA	44 057 060
10% ACN	23 754 322
10% ACN + 0,1% FA	51 452 572
50% ACN	29 212 916
50% ACN + 0,1% FA	63 869 992
20mM HCl	56 756 500

Poté byla optimalizována metoda pro detekci – nejprve bylo upraveno nastavení fragmentoru u hmotnostního spektrometru pro dosažení nejvyšší hodnoty plochy píku při nástřiku stejného absolutního množství standardu, dále byl upraven průtok a gradient preparativní pumpy pro dosažení optimální šířky základny píku a minimalizace chvostování píku. Následně byl změněn roztok pro oplach jehly pro minimalizaci carry-overu.

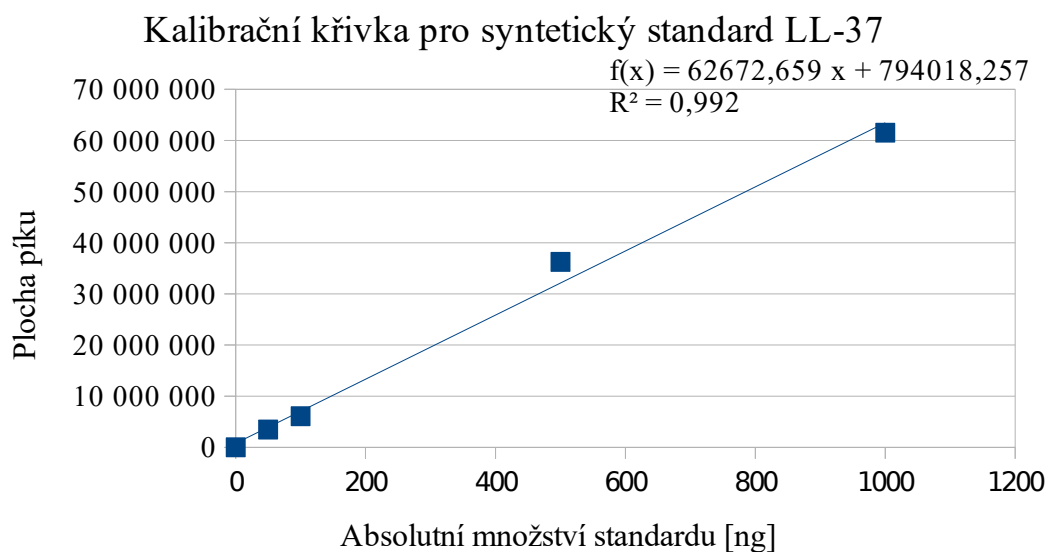
Pro měření kalibrační křivky byl zásobní roztok standardu ředěn postupným ředěním na koncentrace 800, 100 a 10 ng/μl. Kalibrační křivka byla měřena s blankem mezi každou analýzou standardu za použití metody vytvořené pro analýzu. Tato metoda byla použita u všech dalších analýz. Analýza probíhala při konstantním průtoku 0,6 ml/min a gradientu dle Tab. 7. Výsledky analýzy jsou zobrazeny v Tab. 8 a příslušná kalibrační křivka v grafu na Obr. 21. Chromatogramy jsou umístěny v Příloze 5.

*Tabulka 7: Gradient použitý pro detekci pomocí analytické kolony*

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Průtok [ml/min]
0,00	75,00	25,00	0,60
6,00	20,00	80,00	---
8,00	25,00	75,00	---
9,00	75,00	25,00	---
14,00	75,00	25,00	---

*Tabulka 8: Výsledky měření kalibrační křivky  
(\* není zahrnuto v rámci kalibrační křivky)*

Absolutní množství STD [ng]	Plocha píku
0	23 392,9
1	65 609*
50	3 481 259,0
100	6 090 126,0
500	36 267 828,0
1 000	61 517 372,0



Obrázek 21: Graf kalibrační křivky pro syntetický standard

Za měření kalibrační křivky byla zařazena analýza standardu ředěného 20 mM kyselinou chlorovodíkovou, kdy standard byl ponechán 7 týdnů při laboratorní teplotě (22 °C). Nástřik představoval 500 ng absolutního množství standardu. Plocha píku (37 270 160) se velmi blížila ploše píku standardu analyzovaného v rámci kalibrační křivky (36 267 828), pokles 2,68 %. Tím byla potvrzena hypotéza, že je standard v roztoku 20 mM HCl stabilní. Chromatogram je umístěn v Příloze 5.

### 4.7.3 Analýza bakteriálního extraktu po termální denaturaci

Vzorky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.20 za použití termální denaturace. Vzorek byl nejprve analyzován v rozmezí m/z 400-1 000. Pro detekci hmotnostním spektrometrem se selektivním záznamem iontu byla vybrána hmota 749,70. Chromatogramy jsou umístěny v Příloze 6.

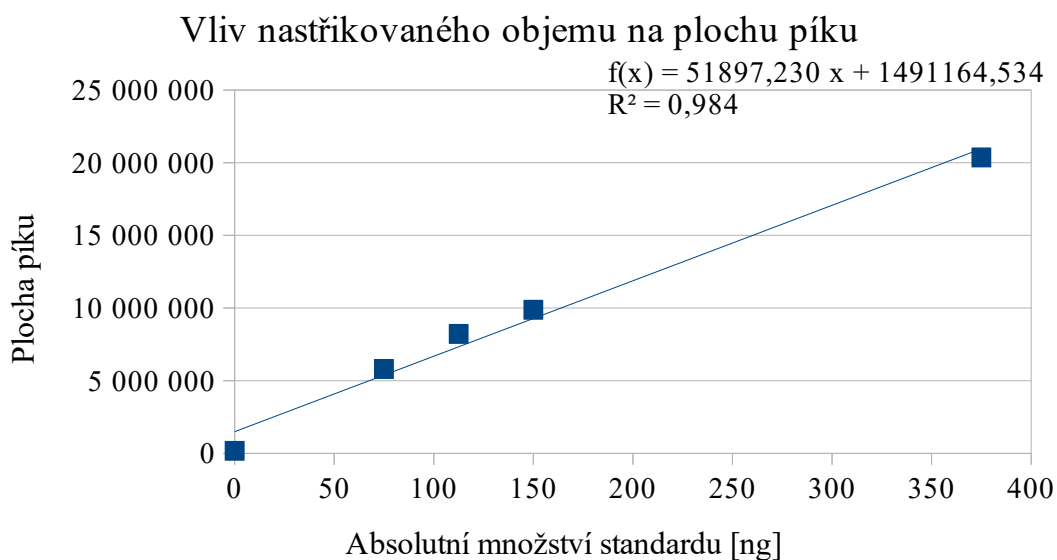
Z výsledků je patrné, že parciální purifikace termální denaturací není příliš účinná. Z tohoto důvodu byl vzorek purifikován pomocí LPLC a následně štěpen dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.3. Po štěpení ve vzorku byl patrný zákal, proto byl vzorek před LC-MS analýzou filtrován přes 0,22 $\mu$ m membránový filtr. Výsledky analýzy jsou zobrazeny v Příloze 6. Porovnáním Obr. 59 a Obr. 60 je patrné, že došlo ke značnému zvýšení čistoty rekombinantního proteinu, čemuž odpovídá i pokles koncentrace celkových proteinů měřených ve vzorcích při stejné koncentraci rekombinantního proteinu.

#### 4.7.4 Analýza vlivu nastříkovaného objemu

Protože dodaný systém je určen pro použití s preparativní kolonou, dávkovací smyčka má objem 1 ml. Z tohoto důvodu byl analyzován vliv nastříkovaného objemu na symetrii a plochu píku. Z jedné vialky s koncentrací standardu 15 ng/μl bylo nastříknuto postupně 5; 7,5; 10 a 25 μl a analyzována plocha píku při hmotě m/z 749,60. Z výsledků uvedených v Tab. 9 a grafu na Obr. 22 plyne, že pro nástřík je možné použít objem od 5 do 25 μl bez zásadního vlivu na změnu symetrie píku nebo jeho plochy. Chromatogramy jsou umístěny v Příloze 7 (pozn. na těchto a některých následujících chromatogramech je změna sběru dat hmotnostním spektrometrem - pouze od 4,0 do 10 minuty).

Tabulka 9: Výsledky měření vlivu nastříkovaného objemu na plochu píku

Absolutní množství STD [ng]	Objem nástříku [μl]	Plocha píku
0	50	171 823,8
75	5	5 803 164,5
112,5	7,5	8 217 051,0
150	10	9 879 684,0
375	25	20 360 876,0



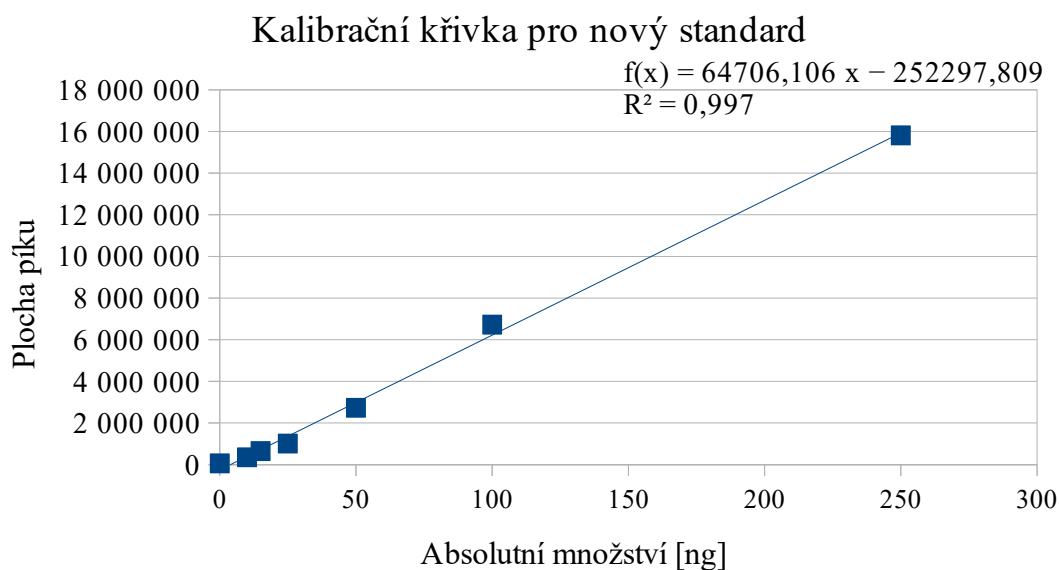
Obrázek 22: Graf vlivu nastříkovaného objemu na plochu píku

## 4.7.5 Kalibrace s novým standardem

Vzhledem k provedení značného množství analýz byly alikvoty zásobního roztoku standardu (uchovávaných při -80 °C) spotřebovány. Nový standard byl ředěn puforem pro LC-MS s přidavkem 0,1% hovězího sérového albuminu (w/v). Přídavek BSA byl za účelem zvýšení stability katelicidinu při mrazení a opětovnému rozmrazování (testováno pomocí Western blotu, data nejsou zobrazena). Standard byl ředěn na zásobní koncentraci 1 mg/ml a alikvotován po 10 µl (aliquoty byly uchovávány při -80 °C). Následně byla měřena kalibrační křivka pro nově připravený standard dle metody uvedené v kapitole 4.3.2 Tab. 7. Přehled výsledků je uveden v Tab. 10, kalibrační křivka na Obr. 23 a chromatogramy jsou umístěny v Příloze 8.

Tabulka 10: Výsledky měření kalibrační křivky s novým standardem

Absolutní množství STD [ng]	Plocha píku
0	63 013,5
10	353 818,8
15	651 239,8
25	1 014 429,5
50	2 729 874,5
100	6 727 255,0
250	15 812 032,0



Obrázek 23: Graf kalibrační křivky pro nový standard

#### 4.7.6 Ověření nastříkovaného množství

Z důvodu ověření přesnosti nastříkovaného množství bylo z vialky se standardem o koncentraci 10 ng/μl nastříknuto ihned po kalibraci s novým standardem dvakrát 5 μl (absolutní množství 50 ng), kdy mezi každou analýzou byly zařazené blanky. Analýza probíhala dle kapitoly 4.3.2 Tab.7. Z výsledků uvedených v Tab. 11 je patrné, že nedochází k nepřesnostem vlivem malého nastříkovaného objemu. Chromatogramy jsou umístěny v Příloze 8.

#### 4.7.7 Zapojení preparativní kolony a nastavení sběru frakcí

Preparativní kolona byla zapojena dle kapitoly 3.2.29.2 a provedena analýza při použití gradientu a průtoků uvedených v Tab. 12. Chromatogram je uveden v Příloze 9. Gradient byl poté modifikován pro dosažení optimální šířky základny píku. Upravené podmínky separace jsou uvedeny v Tab. 13.

Pomocí upravené metody bylo na preparativní kolonu nastříknuto 45 μg standardu (použitá koncentrace 1 mg/ml). Pomocí frakčního kolektoru byla sbírána frakce odpovídající retenčnímu času standardu (5,0-6,0 minut). Frakce byla následně odpařena pomocí centrifugačního koncentrátoru a odparek suspendován ve 450 μl pufru pro LC-MS. Následně byl nastaven antimikrobiální test. Výsledek antimikrobiálního testu je v kapitole 4.8.3.

*Tabulka 11: Ověření nastříkovaného množství*

Absolutní množství STD [ng]	Plocha píku
0	88 597,7
50 (z kalibrační křivky)	2 729 874,5
50 (1. nástřik)	2 982 601,2
50 (2. nástřik)	2 983 664,2

*Tabulka 12: Pilotní gradient použitý s preparativní kolonou*

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Průtok [ml/min]
0,00	75,00	25,00	3,00
18,00	20,00	80,00	---
24,00	25,00	75,00	---
27,00	75,00	25,00	---
30,00	75,00	25,00	---

*Tabulka 13: Gradient použitý pro preparativní kolonu*

Čas [min]	Mobilní fáze A [%]	Mobilní fáze B [%]	Průtok [ml/min]
0,00	90,00	10,00	3,00
6,00	25,00	75,00	4,00
8,00	5,00	95,00	---
9,00	5,00	95,00	---
11,00	90,00	10,00	---
11,25	90,00	10,00	3,00
11,50	90,00	10,00	3,00

#### **4.7.8 Použití preparativní kolony pro purifikaci bakteriálních vzorků po FPLC**

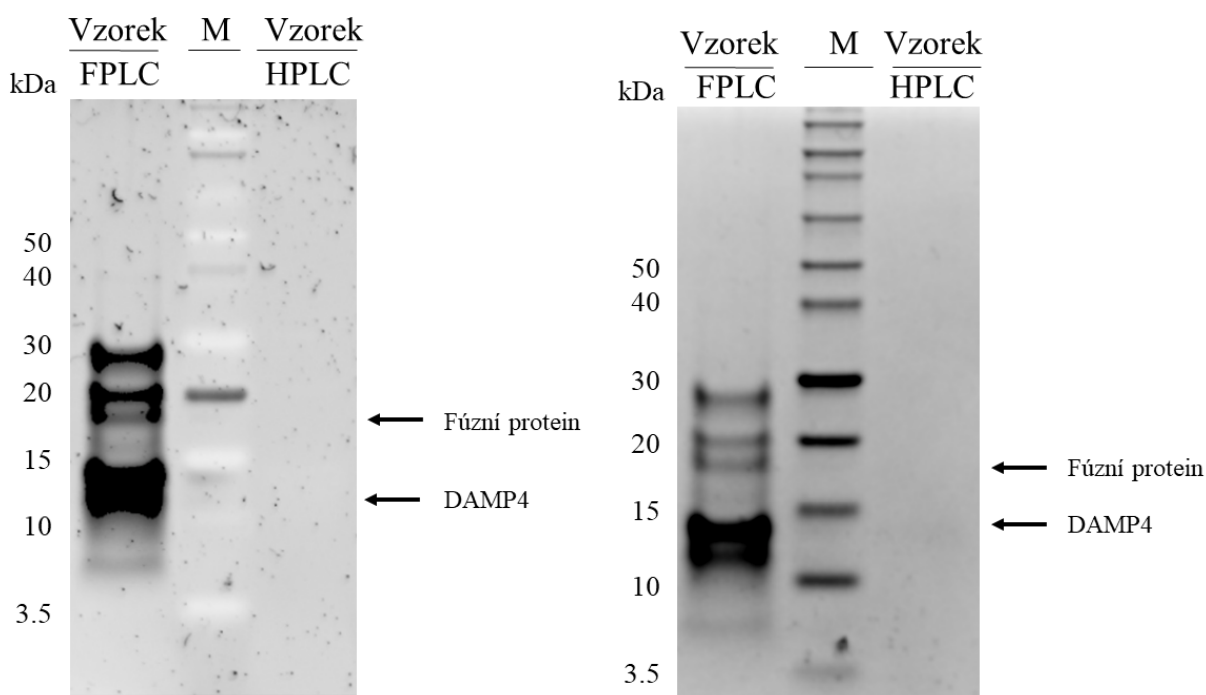
Vzorek bakteriálního extraktu po purifikaci pomocí teplotní denaturace a afinitní FPLC byl analyzován spolu s extraktem purifikovaným afinitní LPLC pomocí analytické kolony s přímým zapojením do hmotnostního spektrometru. Podmínky separace byly stejné jako při měření kalibračních křivek. Pro detekci byly vybrány hmoty  $m/z$  708,00; 749,60, 799,90; 853,20. Výsledky jsou umístěny v Příloze 10. Porovnáním výsledků purifikace pomocí LPLC a FPLC ukázalo rozdíly v čistotě rekombinantního proteinu, nejvíce jsou rozdíly patrné u hmoty  $m/z$  799,90 Obr. 88 a Obr. 89.

Následně byl vzorek po afinitní FPLC purifikován pomocí preparativní kolony se sběrem frakce obsahující rekombinantní PS-LL-37. Chromatogram je umístěn v Příloze 11. Frakce byla odpařena pomocí centrifugačního koncentrátoru, odparek suspendován v 40  $\mu$  pufru pro LC-MS a 10  $\mu$ l analyzováno na analytické koloně. Chromatogram je umístěn v příloze 12.

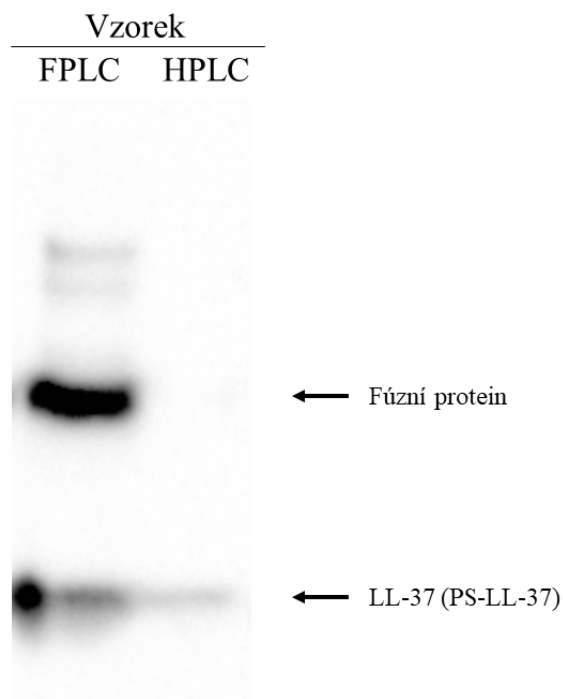
Dalších 20  $\mu$ l bylo nanášeno spolu s původním purifikovaným extraktem z FPLC na SDS-PAGE (dva gely, na každý 10  $\mu$ l) a jeden gel barven pomocí SyproRuby<sup>TM</sup> (dle doporučení výrobce – basic protocol) a druhý gel pomocí Coomassie Brilliant Blue. Dokumentované gely jsou na Obr. 24 a Obr. 25. Následně byl se zbývajících 10  $\mu$ l suspendovaného odparu a 20  $\mu$ l purifikovaného extraktu z FPLC proveden Western Blot. Výsledek Western blotu je na Obr. 26.



Z výsledků je patrné, že purifikaci pomocí LC-MS s využitím preparativní kolony byl rekombinantní protein získán s vysokou čistotou. Porovnáním barvení gelů pomocí Coomassie Brilliant Blue a SyproRuby™ nebyly zjištěny rozdíly, ačkoli je SyproRuby™ podle dostupných informací od výrobce značně citlivější oproti Coomassie Brilliant Blue. Western blot odhalil, že štěpení pomocí TFA nebylo příliš účinné, ačkoli byla použita optimální koncentrace (viz. kapitola 4.6.3). Je možné, že tento výsledek souvisí s vyšší koncentrací purifikovaného rekombinantního proteinu použitého pro štěpení (100x). Nicméně, po přepočtu intenzity signálu PS-LL-37 bylo zjištěno, že při přípravě vzorků po FPLC a analýze pomocí LC-MS dochází ke ztrátám okolo 10 %.



Obrázek 24: Srovnání účinnosti purifikace FPLC a HPLC (gel barven pomocí SyproRuby™) M – HPLC (gel barve na Coomassie). M - marker



Obrázek 26: Srovnání účinnosti purifikace FPLC a HPLC (Western blot)

## 4.8 Antimikrobiální testy

### 4.8.1 Optimalizace metody

Pro optimalizaci metody bylo vycházeno z postupu publikovaného v článku „Molecular farming in barley: development of a novel production platform to produce human antimicrobial peptide LL-37“ (Holásková *et al.*, 2018). Nejprve byla metoda testována se standardem, avšak při zahrnutí šesti technických replikátů pro LB médium a standard v LB médiu (1 000 ng) bylo dosaženo značně nehomogenních výsledků (výsledky jsou umístěny v Tab. 14). Z tohoto důvodu byla bakteriální kultura spolu se vzorky inkubována pouze v pufru pro LC-MS a teplota inkubace snížena na 22 °C. Tato změna měla za následek snížení variability mezi technickými replikáty a zároveň snížení množství syntetického katelicidinu potřebné pro dosažení úplné inhibice růstu. Výsledky pro LC-MS pufr jsou umístěny v Tab. 15.

Tabulka 14: Výsledky testování antimikrobiálního testu – inkubace v LB médiu

Vzorek	Počet kolonií		CFU·ml <sup>-1</sup>
	Ředění 10 <sup>3</sup>	Ředění 10 <sup>4</sup>	
CTRL (1)	-	<b>187</b>	935 000 000
CTRL (2)	-	<b>269</b>	1 345 000 000
CTRL (3)	-	<b>415</b>	2 075 000 000
CTRL (4)	-	<b>194</b>	970 000 000
CTRL (5)	-	<b>399</b>	1 995 000 000
CTRL (6)	-	<b>235</b>	1 175 000 000
LL-37 1 000 ng (1)	404	<b>35</b>	175 000 000
LL-37 1 000 ng (2)	521	<b>49</b>	245 000 000
LL-37 1 000 ng (3)	365	<b>29</b>	145 000 000
LL-37 1 000 ng (4)	673	<b>66</b>	330 000 000
LL-37 1 000 ng (5)	530	<b>58</b>	290 000 000
LL-37 1 000 ng (6)	489	<b>47</b>	235 000 000

Tabulka 15: Výsledky antimikrobiálních testů - inkubace v LC-MS pufru při 22 °C

Vzorek	Počet kolonií		CFU·ml <sup>-1</sup>
	Ředění 10 <sup>3</sup>	Ředění 10 <sup>4</sup>	
CTRL (1)	387	<b>37</b>	185 000 000
CTRL (2)	281	<b>30</b>	150 000 000
CTRL (3)	394	<b>34</b>	170 000 000
CTRL (4)	354	<b>32</b>	160 000 000
CTRL (5)	380	<b>40</b>	200 000 000
CTRL (6)	336	<b>37</b>	185 000 000
LL-37 400 ng (1)	<b>30</b>	1	15 000 000
LL-37 400 ng (2)	<b>36</b>	2	18 000 000
LL-37 400 ng (3)	<b>32</b>	2	16 000 000
LL-37 400 ng (4)	<b>40</b>	1	20 000 000
LL-37 400 ng (5)	<b>31</b>	3	15 500 000
LL-37 400 ng (6)	<b>30</b>	2	15 000 000

## 4.8.2 Antimikrobiální aktivita rekombinantního proteinu z ječmene

Pro test antimikrobiální aktivity s rekombinantním proteinem byl vzhledem k nízkým výtěžkům transienční exprese v *N. benthamiana* použit rostlinný materiál připravený Mgr. Editou Holáskovou, Ph.D. v rámci doktorského studia (Holásková *et al.*, 2018). Aminokyselinová sekvence tohoto rekombinantního proteinu odpovídá konstruktu rhLL-37\_C2.

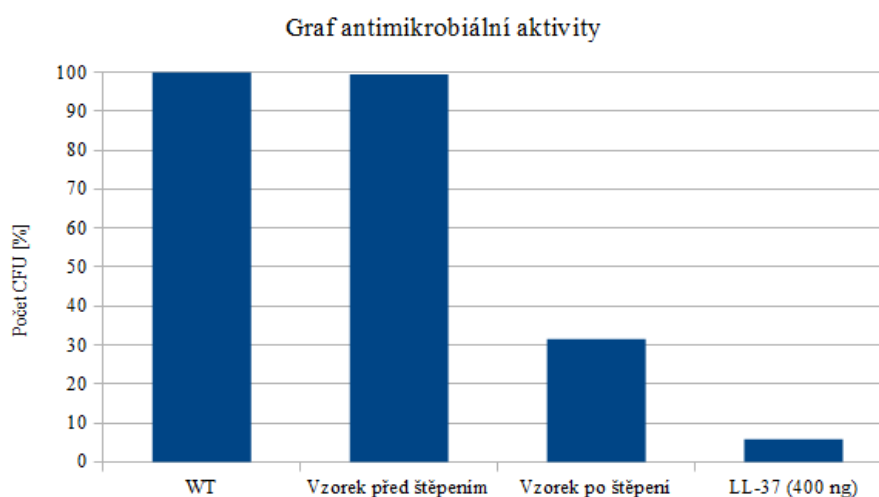
Nejprve bylo 50 g zrn, sbíraných ve stádiu mléčné zralosti, homogenizováno v tekutém dusíku. Následně byla provedena extrakce celkových proteinů s extrakčním pufrem pro ječmen 1:2 (w/v). Proteiny byly extrahovány jednu hodinu na ledu za občasného míchání převrácením. Následně byla směs centrifugována při 15 000 xg při 4 °C po dobu 15 minut. Poté byl odebrán supernatant a provedena afinitní purifikace pomocí FPLC dle kapitoly 3.2.21. Po eluci byl ve vzorku změněn pufr pomocí centrifugace ve falkonách pro ultrafiltraci (5 kDa „cut-off“) na pufr pro štěpení enterokinasou viz. kapitola 3.2.30. Stejným způsobem byly připraveny i vzorky označené jako WT, kdy pro extrakci byla použita zrna netransgenního ječmene *Hordeum vulgare* kultivar Golden Promise.

Vzorky byly štěpeny přidavkem enterokinasou a po štěpení pufr ve vzorku změněn pomocí centrifugace ve falkonách pro ultrafiltraci (2 kDa „cut-off“) za pufr pro LC-MS. Dále bylo postupováno dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.30 (kultivace při 22 °C 1 hodinu), kdy antimikrobiální aktivita byla nastavena vždy ve třech technických a dvou biologických replikátech. Výsledky antimikrobiální aktivity jsou zobrazeny v Tab. 16.

Z grafu na Obr. 27 je patrné, že došlo k částečné inhibici růstu bakterií, avšak antimikrobiální aktivita byla pravděpodobně snížena přítomností balastních proteinů, které se při afinitní purifikaci nepodařilo ze vzorku zcela odstranit.

Tabulka 16: Výsledek antimikrobiálního testu s rekombinantním proteinem

Vzorek	Počet kolonií		CFU·ml <sup>-1</sup>
	Ředění 10 <sup>3</sup>	Ředění 10 <sup>4</sup>	
WT (1)	643	<b>61</b>	305 000 000
WT (2)	574	<b>59</b>	295 000 000
WT (3)	652	<b>64</b>	320 000 000
WT (1')	618	<b>65</b>	325 000 000
WT (2')	597	<b>61</b>	305 000 000
WT (3')	602	<b>57</b>	285 000 000
Vzorek štěpeno (1)	<b>195</b>	24	97 500 000
Vzorek štěpeno (2)	<b>200</b>	10	100 000 000
Vzorek štěpeno (3)	<b>188</b>	4	94 000 000
Vzorek štěpeno (1')	<b>193</b>	27	96 500 000
Vzorek štěpeno (2')	<b>167</b>	8	83 500 000
Vzorek štěpeno (3')	<b>212</b>	13	106 000 000
Vzorek neštěpeno (1)	646	<b>63</b>	315 000 000
Vzorek neštěpeno (2)	582	<b>60</b>	300 000 000
Vzorek neštěpeno (3)	599	<b>58</b>	290 000 000
Vzorek neštěpeno (1')	671	<b>64</b>	320 000 000
Vzorek neštěpeno (2')	628	<b>58</b>	290 000 000
Vzorek neštěpeno (3')	684	<b>62</b>	310 000 000
LL-37 400 ng (1)	<b>34</b>	2	17 000 000
LL-37 400 ng (2)	<b>31</b>	1	15 500 000
LL-37 400 ng (3)	<b>35</b>	3	17 500 000
LL-37 400 ng (4)	<b>42</b>	2	21 000 000
LL-37 400 ng (5)	<b>32</b>	2	16 000 000
LL-37 400 ng (6)	<b>37</b>	3	18 500 000



Obrázek 27: Graf inhibice růstu bakterií pro jednotlivé testované vzorky. LL-37 – syntetický katelicidin

### 4.8.3 Antimikrobiální aktivita standardu purifikovaného pomocí LC-MS

Standard byl nejprve purifikován dle kapitoly 4.7.7, antimikrobiální test byl nastaven v technických triplikátech, inkubace probíhala při 22 °C po dobu 1 hodiny. Výsledky antimikrobiálního testu jsou uvedeny v Tab. 17. Výsledky naznačují, že pravděpodobně nedošlo k úplnému odpaření kyseliny mravenčí (použité v mobilní fázi při LC-MS), což mělo za následek inhibici růstu bakterií, a to jak u kontroly, tak u standardu (jako kontrola sloužil LC-MS pufr, který byl purifikován pomocí LC-MS a dále zpracován stejným způsobem jako standard). Z časových důvodů však antimikrobiální testy nebyly opakovány (druhý biologický replikát, technický hexaplikát) a výše uvedená hypotéza nebyla ověřena.

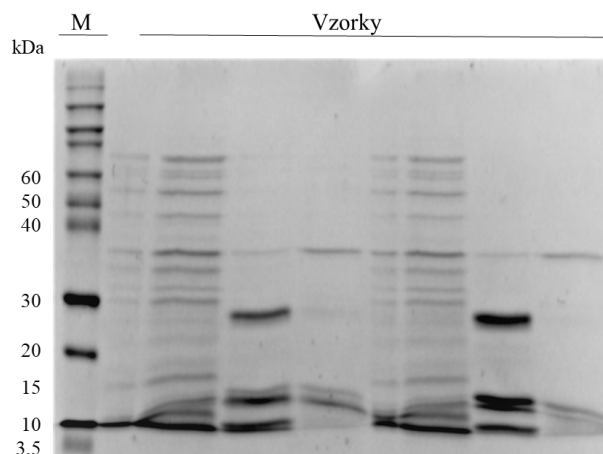
*Tabulka 17: Výsledky antimikrobiálních testů pro vzorky purifikované pomocí HPLC*

Vzorek	Počet kolonií		CFU·ml <sup>-1</sup>
	Ředění 10 <sup>3</sup>	Ředění 10 <sup>4</sup>	
CTRL (1)	<b>240</b>	25	120 000 000
CTRL (2)	<b>220</b>	23	110 000 000
CTRL (3)	<b>235</b>	24	117 500 000
LL-37 400 ng (1)	<b>42</b>	3	21 000 000
LL-37 400 ng (2)	<b>38</b>	4	19 000 000
LL-37 400 ng (3)	<b>39</b>	3	19 500 000
HPLC 200 ng (1)	<b>84</b>	8	42 000 000
HPLC 200 ng (2)	<b>79</b>	7	39 500 000
HPLC 200 ng (3)	<b>81</b>	6	40 500 000

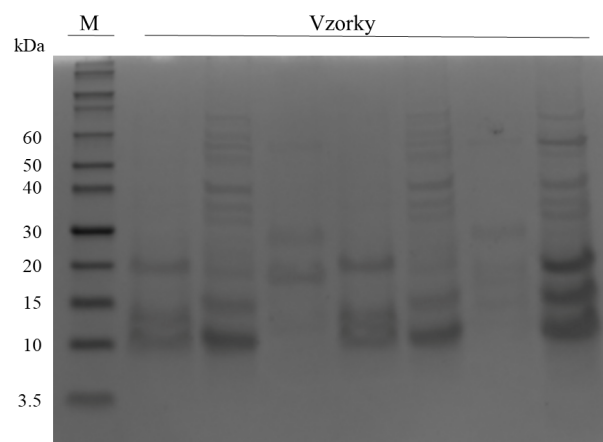
## 4.9 Další výsledky

### 4.9.1 Srovnání různých typů gelů pro SDS-PAGE

Pro rutinní analýzu vzorků pomocí SDS-PAGE byly testovány gely Tris-Glycinové a Tris-Tricinové. Bohužel v případě Tris-Glycinových gelů nebylo dosaženo optimálního dělení proteinů v rozmezí 3,5-10 kDa, což mělo za následek horší kvalitu výsledků při přenosu na membránu a následném Western blotu. V případě gelů Tris-Tricinových bylo sice dosaženo dostatečné separace, avšak elektroforéza probíhala při konstantních 150 V 3-3,5 hodin. Z tohoto důvodu byla zakoupena chemikálie Bis-Tris a příslušenství pro přípravu gelů SureCast™. Následně byl optimalizován postup pro „home-made“ přípravu Bis-Tris gelů. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 28 a 29.



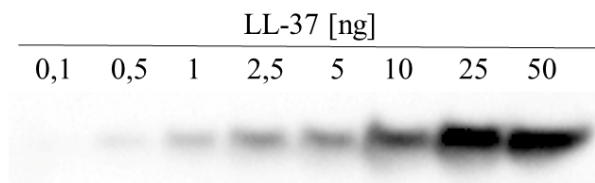
Obrázek 28: Separace proteinů v Tris-Glycinovém gelu (barveno na stříbro). M – marker



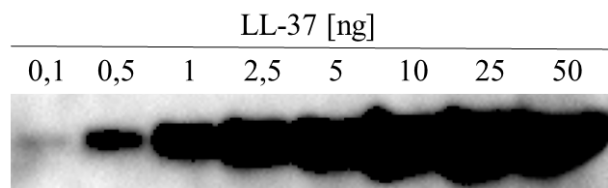
Obrázek 29: Separace proteinů v Bis-Tris gelu (barveno na stříbro). M – marker

#### 4.9.2 Porovnání přenosu na membránu po SDS-PAGE

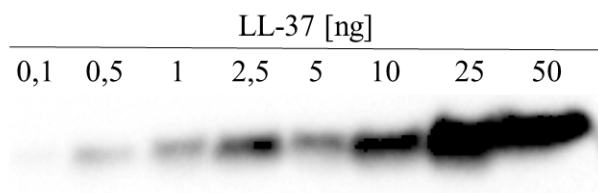
Pro úsporu času byl v závěru práce testován různý přenos na membránu po SDS-PAGE. Vzhledem k malé velikosti proteinů se doporučuje přenos přes noc, avšak při testování byly výsledky přenosu pouze při 100 V po dobu jedné hodiny dostačující pro přenos pozitivní kontroly. Výsledky přenosu přes noc jsou na Obr. 30 a 31 a výsledky přenosu po dobu jedné hodiny na Obr. 32 a 33. Porovnáním obou metod přenosu je patrné, že nedochází ke snížení citlivosti detekce vlivem kratšího přenosu.



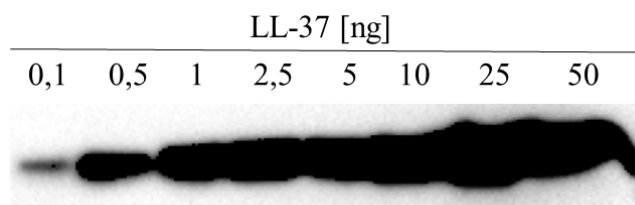
Obrázek 30: Přenos na membránu přes noc (Western blot), detekce 7 sec. LL-37 – syntetický katelicidin



Obrázek 31: Přenos na membránu přes noc (Western blot), detekce 120 sec. LL-37 – syntetický katelicidin



Obrázek 32: Přenos na membránu 1 hodina (Western blot), detekce 7 sec. LL-37 – syntetický katelicidin



Obrázek 33: Přenos na membránu přes noc (Western blot), detekce 120 sec. LL-37 – syntetický katelicidin



### 4.9.3 Exprese ve fermentoru a srovnání centrifugačních metod

Při pilotní expresi ve fermentoru konstruktu pET 28b+::rhLL-37\_B1 byl výtěžek v přepočtu 32 mg na 20 litrů média. Při expresi v Erlenmayerových baňkách byl výtěžek však v přepočtu pouze 20 mg na 20 litrů média. Tyto rozdílné výtěžky mohou být způsobeny lepší aerací média ve fermentoru a kontinuálním přidavkem glycerolu, který bakterie může využít jako zdroj energie. Navíc přidavek glycerolu nemá negativní vliv na expresi, na rozdíl od roztoku glukosy. Tato hypotéza byla podpořena zvýšenou turbiditou měřenou při stáčení kultury (v Erlenmayerových baňkách  $OD_{600}=1,0-1,25$ ; při expresi ve fermentoru  $OD_{600}=4,5-5,0$ ).

Z tohoto důvodu byla indukce exprese ve fermentoru posunuta při  $OD_{600}=1,0$  (při pilotní expresi ve fermentoru indukce provedena při  $OD_{600}=0,5$ ). Celkový výtěžek rekombinantního proteinu se zvýšil na 45 mg na 20 litrů média (při opakování exprese byl výtěžek 46 mg na 20 litrů média).

Při pilotní expresi ve fermentoru byly testovány tři možnosti centrifugace bakteriální kultury. Kultura byla nejprve stáčena ve 200ml nádobách při 4 800 xg, avšak bakteriální buňky nebylo možné po 30 minutách efektivně stočit. Při měření turbidity bylo zjištěno, že v supernatantu zůstává ještě přibližně 15 % buněk. Proto byly nádoby zaměněny za 50ml falkony. U těch byla separace buněk od média efektivní už po 15 minutách, avšak tato metoda je příliš časově náročná vzhledem k nutnosti vyvážit jednotlivé falkony na předvážkách. V případě použití průtokové centrifugy došlo k dostatečné separaci buněk (v médiu zůstalo 3-5 % buněk) a jedna centrifugace celého objemu (20 l) trvala necelých 45 minut.

### 4.9.4 Porovnání růstových podmínek *A. thaliana* a *N. benthamiana*

Při pěstování *A. thaliana* a *N. benthamiana* byla zvolena rozdílná fotoperioda. V případě *A. thaliana* byla fotoperioda 16 hodin světla, 8 hodin tma. To mělo za následek urychlení růstu rostliny a kratší čas potřebný pro dosažení další generace. V případě *N. benthamiana* byla použita fotoperioda 8 hodin světla a 16 hodin tma, což sice značně zpomalilo růst rostliny, ale značně zvýšilo listovou plochu, kterou bylo možné použít pro infiltraci.

## 5 DISKUZE

Konstrukt rhLL-37\_B1 byl designován dle článku „A simple and low-cost platform technology for producing pexiganan antimicrobial peptide in *E. coli*“ (Zhao *et al.*, 2015). Na rozdíl od pexigananu byl použit lidský antimikrobiální peptid katelicidin. Už v rámci bakalářské práce bylo potvrzeno, že nový helikální protein DAMP4 umožňuje expresi v bakteriálním systému. V diplomové práci byla optimalizována produkce a v porovnání s publikací Sun *et al.*, 2018 bylo dosaženo přibližně stejného výtěžku rekombinantního proteinu ve větším objemu, ačkoli byl exprimován jiný antimikrobiální peptid (40 mg na 20 litrů kultivačního média v případě pexigananu a 45 mg na 20 l výtěžek v rámci diplomové práce s katelicidinem). Antimikrobiální peptid navázaný na helikální protein DAMP4 navíc nevykazuje antimikrobiální aktivitu až do jeho odštěpení, což otevírá řadu možností pro expresi dalších antimikrobiálních peptidů a peptidů jinak toxických pro *E. coli*.

V rámci praktické práce byl taktéž modifikován postup pro parciální purifikaci rekombinantního proteinu. Zhao *et al.*, 2015 využívá pro precipitaci síran sodný v koncentraci až 0,8 M a současnou termální denaturaci balastních proteinů. Tato metoda je účinnější, avšak následné odstranění síranu sodného představuje značný problém. V rámci diplomové práce byla testována dialýza i ultrafiltrace, ale tyto metody jsou časově náročné a může při nich docházet ke ztrátám rekombinantního proteinu. Zhao *et al.*, 2015 tento problém řeší precipitací fúze DAMP4 s pexigananem v kyselém prostředí (HCl), v článku Sun *et al.*, 2018 fúzi reverzibilně precipitují přidávkem 2 M síranu sodného. Obě tyto metody byly v rámci diplomové práce neúspěšně testovány, v případě precipitace v kyselém prostředí nebyl pozorován žádný zákal a v případě reverzibilní precipitace 2 M síranem sodným bylo možné precipitovaný rekombinantní protein centrifugovat pouze pomocí ultracentrifugy, což by vzhledem ke značnému objemu lyzátu získaného fermentací bylo taktéž velmi časově náročné. Proto byl konstrukt rhLL-37\_B1 modifikován tak, aby byla umožněna afinitní purifikace a výše popsany problém eliminován.

Štěpení fúze DAMP4 a antimikrobiálního peptidu bylo změněno oproti postupu uvedeném v bakalářské práci (Kopečný, 2018). Pro štěpení byla využita kyselina trifluoroctová, která je kompatibilní s další LC-MS analýzou. Pokud by byla použita 50% kyselina mravenčí, bylo by nutné kyselinu před analýzou odpařit, nebo ředit,

jinak by mohlo docházet ke snížení citlivosti detekce hmotnostním spektrometrem. Navíc by mohlo docházet k nežádoucí formylaci aminokyselin serinu a threoninu, což by mohlo negativně ovlivnit antimikrobiální funkci katelicidinu, a to vzhledem k vyšší koncentraci použité kyseliny (50 %) a zvýšené teploty při štěpení (60 °C). Zhao *et al.*, 2015 využívají pro štěpení kyselinu chlorovodíkovou, avšak štěpení fúze DAMP4 a katelicidinu nebylo příliš účinné (přibližně 30 % po 24 hodinách).

Antimikrobiální aktivita byla měřena po normalizování na McFarlandův standard turbidity č. 0,5. Dle literatury (Cockerill *et al.*, 2012) odpovídá použité ředění bakterie *Escherichia coli* právě tomuto standardu, což v přepočtu na CFU/ml je přibližně  $1,5 \cdot 10^8$ . Tento počet kolonií se blížil pozorovanému počtu v rámci diplomové práce (viz. Tab. 15). Proto bylo posléze možné výsledky reprodukovat bez větších odchylek. V rámci publikace Mgr. Holáskové a kol. (Holásková *et al.*, 2018) byla pozorována silná inhibice (72 %) při použití 2 500 ng syntetického katelicidinu, zatímco v této diplomové práci bylo pro dosažení 96% inhibice zapotřebí pouze 400 ng syntetického katelicidinu. To pravděpodobně souvisí s použitým ředěním *E. coli* pro antimikrobiální testy. Variabilitu mezi jednotlivými technickými replikáty se taktéž podařilo snížit, a to záměnou LC-MS pufru za LB médium a snížením inkubační teploty na 22 °C.

V případě HPLC analýzy byla v rámci článku Zhao *et al.*, 2018 měřena absorbance fúzovaného pexigananu při 214 nm. Bohužel se v rámci diplomové práce při této vlnové délce nepodařilo fúzní protein s katelicidinem ani odštěpený DAMP4 protein detekovat. To pravděpodobně souvisí s množstvím proteinu, které bylo pro analýzu použito a dalšími podmínkami separace. Byla tedy optimalizována detekce pomocí hmotnostního spektrometru, kterou ale nelze sledovat množství fúze DAMP4 a katelicidinu, a to z důvodu nedostupnosti komerčního standardu. V případě měření kalibrační křivky nebylo dále možné měřit kalibrační křivku v rozsahu několika řádů, kvůli překročení kapacity kolony při nástřiku absolutního množství většího než 1 500 ng a měření množství <10 ng nebylo možné kvůli carry-over efektu. Tento efekt je pravděpodobně způsoben vazbou katelicidinu na kovové části kolony, kapiláry nebo na reverzní fázi.

V rámci diplomové práce se podařilo exprimovat katelicidin transientní expresí v *N. benthamiana*, avšak s velmi nízkým výtěžkem. Mgr. Holásková a kol. (Holásková *et al.*, 2018) pracovali taktéž s konstruktem rhLL-37\_C2 a transformací ječmene vyprodukovali 0,107 mg rekombinantního proteinu z jednoho kilogramu zrn. Ačkoli byl v rámci diplomové práce použit vektor pGWB 17, který obsahuje velice silný konstitutivní promotor pro expresi v rostlinách, tak výtěžky nebyly srovnatelné. To může být způsobeno optimalizací všech použitých konstruktů pro ječmen (*Hordeum vulgare*). V rámci práce byla taktéž analyzována důležitost signální sekvence při transientní transformaci *N. benthamiana*. Výsledky však nepotvrdily, že je signální sekvence pro expresi v tabáku důležitá.

## 6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce v rámci teoretické části shrnuje poznatky o obranných mechanismech rostlin při reakci na patogenní mikroorganismy. Dále popisuje mechanismy působení antimikrobiálních peptidů a možnosti bakteriální rezistence vůči těmto peptidům. V dalších kapitolách jsou přehledně rozděleny rostlinné antimikrobiální peptidy do jednotlivých rodin. V posledních kapitolách teoretické části práce je popsána exprese antimikrobiálních peptidů v rostlinách se zaměřením na výběr vhodného promotoru pro expresi a na závěr popis antimikrobiálního peptidu katelicidinu, který byl exprimován v rámci praktické části této práce.

Náplní praktické části bylo ověřit funkčnost konstruktů, které byly připraveny a neúspěšně testovány v rámci bakalářské práce, a to pomocí stabilní transformace *A. thaliana*. U obou konstruktů s elastinovým motivem byla detekována exprese rekombinantních proteinů a pomocí parciální purifikace ověřena funkce ELP.

Všechny konstrukty byly také testovány agroinfiltrací *N. benthamiana*, kdy se podařilo u všech konstruktů kromě rhLL-37\_C3 (SUMO) detekovat expresi. Bohužel výtěžky exprese nebyly dostatečné pro testování purifikace pomocí jednotlivých afinitních značek/parciální purifikace.

Dále byl modifikován konstrukt s DAMP4, který byl použit v rámci bakalářské práce. Klonováním byl konstrukt doplněn o 12x His, který umožnil další stupeň purifikace. Exprese v bakteriálním systému byla optimalizována pro dosažení vysokého výtěžku, ověřena možnost parciální a afinitní purifikace. Optimalizováno bylo rovněž štěpení pomocí kyseliny trifluoroctové, která byla upřednostněna oproti štěpení 50% kyselinou mravenčí (použitá v rámci bakalářské práce), pro lepší kompatibilitu s LC-MS analýzou a purifikací.

Následně byla optimalizována metoda pro LC-MS analýzu a detekci, a to jak pro syntetický standard, tak pro reálné vzorky. V poslední části byla provedena optimalizace metody pro testování antimikrobiální aktivity a následně provedeno testování s reálnými vzorky z transgenního ječmene.

Tato práce bude dále využita při návrhu konstruktů, kterými bude transformován *H. vulgare* v rámci projektu „Rozvoj předaplikačního výzkumu v oblasti nano- a biotechnologií“ (CZ.02.1.01/0.0/0.0/17\_048/0007323). Zároveň budou využity optimalizované metody pro detekci a purifikaci pomocí LC-MS a testování antimikrobiální aktivity u transgenních linií ječmene, u kterých jsou v současné době prováděny polní pokusy.

## 7 LITERATURA

- Agerberth B., Gunne H., Odeberg J., Kogner P., Boman H. G., Gudmundsson G. H. (1995): FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **92**(1):195–159.
- Andresen I., Becker W., Schlüter K., Burges J., Parthier B., Apel K. (1992): The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant molecular biology* **19**, 193–204.
- Anunthawan T., De La Fuente-Núñez C., Hancock R. E. W., Klaynongsruang S. (2015): Cationic amphipathic peptides KT2 and RT2 are taken up into bacterial cells and kill planktonic and biofilm bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1848**, 1352–1358.
- Archer B. L. (1960): The proteins of *Hevea brasiliensis* Latex. 4. Isolation and characterization of crystalline hevein. *The Biochemical journal* **75**, 236–240.
- Asensio J. L., Siebert H. C., von der Lieth C. W., Laynez J., Bruix M., Soedjanaamadja U. M., Beintema J. J., Cañada F. J., Gabius H. J., Jiménez-Barbero J. (2000): NMR investigations of protein-carbohydrate interactions: Studies on the relevance of Trp/Tyr variations in lectin binding sites as deduced from titration microcalorimetry and NMR studies on hevein domains. Determination of the NMR structure of the complex between pseudohevein and N,N',N''-triacylchitotriose. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **40**, 218–236.
- Barbosa Pelegrini P., Del Sarto R. P., Silva O. N., Franco O. L., Grossi-De-Sa M. F. (2011): Antibacterial peptides from plants: What they are and how they probably work. *Biochemistry Research International* **2011**, 250349.
- Beckloff N., Laube D., Castro T., Furgang D., Park S., Perlin D., Clements D., Tang H., Scott R. W., Tew G. N., Diamond G. (2007): Activity of an antimicrobial peptide mimetic against planktonic and biofilm cultures of oral pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**, 4125–4132.
- Beintema J. J. (1994): Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Letters* **350**, 159–163.
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **7**, 248-254
- Cammue B. P. A., Thevissen K., Hendriks M., Eggermont K., Goderis I. J., Proost P., Van Damme J., Osborn R. W., Guerbet F., Kader J. C., Broekaert W. F. (1995): A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology* **109**, 445–455.
- Carmona M. J., Molina A., Fernández J. A., López-Fando J. J., García-Olmedo F. (1993): Expression of the alpha-thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **3**, 457–462.

- Caruso C., Caporale C., Chilosi G., Vacca F., Bertini L., Magro P., Poerio E., Buonocore V. (1996): Structural and antifungal properties of a pathogenesis-related protein from wheat kernel. *Protein Journal* **15**, 35–44.
- Carvalho A. de O., Gomes V. M. (2007): Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-a concise review. *Peptides* **28**, 1144–1153.
- Chahardoli M., Fazeli A., Niazi A., Ghabooli M. (2018): Recombinant expression of LFchimera antimicrobial peptide in a plant-based expression system and its antimicrobial activity against clinical and phytopathogenic bacteria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **32**, 714–723.
- Chávez M. I., Andreu C., Vidal P., Aboitiz N., Freire F., Groves P., Asensio J. L., Asensio G., Muraki M., Cañada F. J., Jiménez-Barbero J. (2005): On the importance of carbohydrate-aromatic interactions for the molecular recognition of oligosaccharides by proteins: NMR studies of the structure and binding affinity of AcAMP2-like peptides with non-natural naphthyl and fluoroaromatic residues. *Chemistry*. **23** 7060–7074.
- Chen X., Hirt H., Li Y., Gorr S. U., Aparicio C. (2014): Antimicrobial GL13K peptide coatings killed and ruptured the wall of streptococcus gordonii and prevented formation and growth of biofilms. *PLoS ONE* **9**.
- Cheng F., Cheng Z. (2015): Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science* **6** 1020.
- Choi H., Rangarajan N., Weisshaar J. C. (2016): Lights, Camera, Action! Antimicrobial peptide mechanisms imaged in space and time. *Trends in Microbiology* **24**, 111–122.
- Cockerrill F. R., (2012): Agar dilution procedure in Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA, 13-16.
- Cole J. N., Nizet V. (2016): Bacterial evasion of host antimicrobial peptide defenses. *Microbiology spectrum* **4** 1.
- Cowland J. B., Johnsen A. H., Borregaard N. (1995): hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Letters* **368**(1),173–176.
- Daep C. A., Novak E. A., Lamont R. J., Demuth D. R. (2010): Selective substitution of amino acids limits proteolytic cleavage and improves the bioactivity of an anti-biofilm peptide that targets the periodontal pathogen, Porphyromonas gingivalis. *Peptides* **31**, 2173–2178.
- Datta S. K., Muthukrishnan S. (1999): *Pathogenesis-related proteins in plants*. CRC Press, Washington, 288.
- Duvick J. P., Rood T., Rao A. G., Marshak D. R. (1992): Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from maize (*Zea mays L.*) kernels. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 18814–18820.



- Ebrahim-Nesbat F., Behnke S., Kleinhofs A., Apel K. (1989): Cultivar-related differences in the distribution of cell-wall-bound thionins in compatible and incompatible interactions between barley and powdery mildew. *Planta* **179**, 203–210.
- Edreva A. (2005): Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Plant physiology* **31**, 1-2.
- Epple P., Apel K., Bohlmann H. (1995): An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* **109**, 813–820.
- Eudes F., Chugh A. (2008): Cell-penetrating peptides: From mammalian to plant cells. *Plant Signaling and Behavior* **3**, 549–550.
- Eulgem T., Rushton P. J., Schmelzer E., Hahlbrock K., Somssich I. E. (1999): Early nuclear events in plant defence signalling: Rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO Journal* **18**, 4689–4699.
- Evans J., Wang Y. D., Shaw K. P., Vernon L. P. (1989): Cellular responses to *Pyricularia* thionin are mediated by Ca<sup>2+</sup> influx and phospholipase A2 activation and are inhibited by thionin tyrosine iodination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 5849–5853.
- Fedoroff N. V., Battisti D. S., Beachy R. N., Cooper P. J. M., Fischhoff D. A., Hodges C. N., Knauf V. C., Lobell D., Mazur B. J., Molden D., Reynolds M. P., Ronald P. C., Rosegrant M. W., Sanchez P. A., Vonshak A., Zhu J. K. (2010): Radically rethinking agriculture for the 21st century. *Science* **327**, 833–834.
- Fernandez de Caleyá R., Gonzalez-Pascual B., García-Olmedo F., Carbonero P. (1972): Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro. *Applied Microbiology* **23**, 998–1000.
- Florack D. E., Stiekema W. J. (1994): Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Molecular Biology* **26**, 25–37.
- Frébort I., Kopečný D., Mičúchová A. (2019): Ověření antimikrobiální aktivity izolovaného rekombinantního produktu katelicidinu.
- Frébort I., Kopečný D., Mičúchová A. (2019): Ověření purifikačního postupu pro izolaci rekombinantního produktu LL-37 ve větším měřítku.
- Fujimura M., Minami Y., Watanabe K., Tadera K. (2003): Purification, characterization, and sequencing of a novel type of antimicrobial peptides, fa-amp1 and fa-amp2, from seeds of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* moench.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **67**, 1636–1642.
- Gao A. G., Hakimi S. M., Mittanck C. A., Wu Y., Woerner B. M., Stark D. M., Shah D. M., Liang J., Rommens C. M. T. (2000): Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nature Biotechnology* **18**, 1307–1310.

- García-Olmedo F., Molina A., Alamillo J. M., Rodríguez-Palenzuela P. (1998): Plant defense peptides. *Biopolymers* **47**, 479–491.
- Gidrol X., Chrestin H., Tan H. L., Kush A. (1994): Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 9278–9283.
- Goyal R. K., Hancock R. E. W., Mattoo A. K., Misra S. (2013): Expression of an engineered heterologous antimicrobial peptide in potato alters plant development and mitigates normal abiotic and biotic responses. *PLoS ONE* **8**, e77505.
- Gurr S. J., Rushton P. J. (2005): Engineering plants with increased disease resistance: How are we going to express it? *Trends in Biotechnology* **23**, 283–290.
- Hancock R. E. W., Sahl H. G. (2006): Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* **24**, 1551–1557.
- Hanin M., Ebel C., Ngom M., Laplaze L., Masmoudi K. (2016): New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1787.
- Heitz T., Segond S., Kauffmann S., Geoffroy P., Prasad V., Brunner F., Fritig B., Legrand M. (1994): Molecular characterization of a novel tobacco pathogenesis-related (PR) protein: a new plant chitinase/lysozyme. *MGG - Molecular & General Genetics* **245**, 246–254.
- Hejgaard J., Jacobsen S., Svendsen I. (1991): Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain. *FEBS Letters* **291**, 127–131.
- Henriques S. T., Craik D. J. (2010): Cyclotides as templates in drug design. *Drug Discovery Today* **15**, 57–64.
- Himmelbach A., Liu L., Zierold U., Altschmied L., Maucher H., Beier F., Müller D., Hensel G., Heise A., Schützendübel A., Kumlehn J., Schweizera P. (2010): Promoters of the barley germin-like GER4 gene cluster enable strong transgene expression in response to pathogen attack. *Plant Cell* **22**, 937–952.
- Holásková E., Galuszka P., Frébort I., Öz M. T. (2015): Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology Advances* **33**, 1005–1023.
- Holásková E., Galuszka P., Šebela M., Öz M. T., Frébort I. (2018): Molecular farming in barley: Development of a novel production platform to produce human antimicrobial peptide LL-37. *Biotechnology Journal* **13**, 6, e1700628.
- Hughes P., Dennis E., Whitecross M., Llewellyn D., Gage P. (2000): The cytotoxic plant protein,  $\beta$ -purothionin, forms ion channels in lipid membranes. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 823–827.
- Jain S., Darveau R. P. (2010): Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontology 2000* **54**, 53–70.
- Jenssen H., Hamill P., Hancock R. E. W. (2006): Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 491–511.

- Jiménez-Barbero J., Javier Cañada F., Asensio J. L., Aboitiz N., Vidal P., Canales A., Groves P., Gabius H. J., Siebert H. C. (2006): Hevein domains: an attractive model to study carbohydrate-protein interactions at atomic resolution. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **60**, 303–354.
- Johansson J., Gudmundsson G. H., Rottenberg M. E., Berndt K. D., Agerberth B. (1998): Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *Journal of Biological Chemistry* **273**(6), 3718–3724.
- Kader J. -C, Julienne M., Vergnolle C. (1984): Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. *European Journal of Biochemistry* **139**, 411–416.
- Kader J. C. (1996): Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 627–654.
- Kader J. C. (1975): Proteins and the intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. *Biochimica et Biophysica Acta* **380**, 31–44.
- Kang S., Chen S., Dai S. (2010): Proteomics characteristics of rice leaves in response to environmental factors. *Frontiers of Biology in China* **5**, 246–254.
- Kini S. G., Nguyen P. Q. T., Weissbach S., Mallagaray A., Shin J., Yoon H. S., Tam J. P. (2015): Studies on the chitin binding property of novel cysteine-rich peptides from *Alternanthera sessilis*. *Biochemistry* **54**, 6639–6649.
- Kopečný D. (2018): *Produkce antimikrobiálních peptidů s pomocí nových typů stabilizačních sekvencí*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého Olomouc, Česká Republika.
- Koprivnjak T., Peschel A. (2011): Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 2243–2254.
- Kovalchuk N., Li M., Wittek F., Reid N., Singh R., Shirley N., Ismagul A., Eliby S., Johnson A., Milligan A. S., Hrmova M., Langridge P., Lopato S. (2010): Defensin promoters as potential tools for engineering disease resistance in cereal grains. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 47–64.
- Kramer K. J., Klassen L. W., Jones B. L., Speirs R. D., Kammer A. E. (1979): Toxicity of purothionin and its homologues to the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera:Sphingidae). *Toxicology and applied pharmacology* **48**, 179–83.
- Kumar P., Kizhakkedathu J., N., Straus S., K. (2018): Antimicrobial peptides: Diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules* **8**(1), 4.
- Kuroda K., Okamura K., Isogai H., Isogai E. (2015): The human antimicrobial peptide LL-37 and mimics are potential anticancer drugs. *Frontiers in Oncology* **5**, 144–148.
- De La Fuente-Núñez C., Cardoso M. H., De Souza Cândido E., Franco O. L., Hancock R. E. W. (2016): Synthetic antibiofilm peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1858**, 1061–1069.

- De La Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Mansour S. C., Reckseidler-Zenteno S. L., Hernández D., Brackman G., Coenye T., Hancock R. E. W. (2015): D-Enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chemistry and Biology* **22**, 196–205.
- Lai Y., Gallo R. L. (2009): AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in Immunology* **30**, 131–141.
- Larrick J. W., Lee J., Ma S., Li X., Francke U., Wright S. C. (1995): Structural, functional analysis and localization of the human CAP18 gene. *FEBS Letters* **398**(1), 74–80.
- Laursen J. S., Engel-Andreasen J., Olsen C. A. (2015):  $\beta$ -peptoid foldamers at last. *Accounts of Chemical Research* **48**, 2696–2704.
- Lay F., Anderson M. (2005): Defensins - Components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science* **6**, 85–101.
- van Loon L. C. (1985): Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* **4**, 111–116.
- van Loon L. C., van Kammen A. (1970): Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. „Samsun” and „Samsun NN”. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 199–211.
- van Loon L. C., Rep M., Pieterse C. M. J. (2006): Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 135–162.
- van Loon L. C., van Strien E. A. (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 85–97.
- Luo X. M., Xie C. J., Wang D., Wei Y. M., Cai J., Cheng S. S., Yang X. Y., Sui A. P. (2017): Psc-AFP from *Psoralea corylifolia* L. overexpressed in *Pichia pastoris* increases antimicrobial activity and enhances disease resistance of transgenic tobacco. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**, 1073–1084.
- Malanovic N., Lohner K. (2016): Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1858**, 936–946.
- Malnoy M., Reynoird J. P., Borejsza-Wysocka E. E., Aldwinckle H. S. (2006): Activation of the pathogen-inducible Gst1 promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus x domestica*). *Transgenic Research* **15**, 83–93.
- Martini N., Egen M., Rüntz I., Strittmatter G. (1993): Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *MGG - Molecular & General Genetics* **236**, 179–186.
- Midoh N., Iwata M. (1996): Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant and Cell Physiology* **37**, 9–18.

- Mikut R., Ruden S., Reischl M., Breitling F., Volkmer R., Hilpert K. (2016): Improving short antimicrobial peptides despite elusive rules for activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1858**, 1024–1033.
- Molina A., García-Olmedo F. (1997): Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *The Plant journal* **12**, 669–75.
- Muraki M. (2005): The Importance of Ch/ $\pi$  interactions to the function of carbohydrate binding proteins. *Protein & Peptide Letters* **9**, 195–209.
- Osusky M., Osuska L., Hancock R. E., Kay W. W., Misra S. (2004): Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Research* **13**, 181–190.
- Osusky M., Osuska L., Kay W., Misra S. (2005): Genetic modification of potato against microbial diseases: In vitro and in planta activity of a dermaseptin B1 derivative, MsrA2. *Theoretical and Applied Genetics* **111**, 711–722.
- Osusky M., Zhou G., Osuska L., Hancock R. E., Kay W. W., Misra S. (2000): Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology* **18**, 1162–1166.
- Owens L. D., Heutte T. M. (1997): A single amino acid substitution in the antimicrobial defense protein cecropin B is associated with diminished degradation by leaf intercellular fluid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 525–528.
- Padovan L., Scocchi M., Tossi A. (2010): Structural aspects of plant antimicrobial peptides. *Current Protein & Peptide Science* **11**, 210–219.
- Pallaghy P. K., Norton R. S., Nielsen K. J., Craik D. J. (1994): A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded  $\beta$ -sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Science* **3**, 1833–1839.
- Van Parijs J., Broekaert W. F., Goldstein I. J., Peumans W. J. (1991): Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta* **183**, 258–264.
- Patrzykat A., Friedrich C. L., Zhang L., Mendoza V., Hancock R. E. W. (2002): Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 605–614.
- Pelegrini P. B., Franco O. L. (2005): Plant  $\gamma$ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **37**, 2239–2253.
- Penninckx I. A. M. A., Eggermont K., Terras F. R. G., Thomma B. P. H. J., De Samblanx G. W., Buchala A., Métraux J. P., Manners J. M., Broekaert W. F. (1996): Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309–2323.

- Peumans W. J., Van Damme E. J. (1998): Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 209–58.
- Porto W. F., Franco O. L. (2013): Theoretical structural insights into the snakin/GASA family. *Peptides* **44**, 163–167.
- Pyee J., Yu H., Kolattukudy P. E. (1994): Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **311**, 460–468.
- Radhakrishnan R., Baek K. H. (2017): Physiological and biochemical perspectives of non-salt tolerant plants during bacterial interaction against soil salinity. *Plant Physiology and Biochemistry* **116**, 116–126.
- Rashid R., Veleba M., Kline K. A. (2016): Focal targeting of the bacterial envelope by antimicrobial peptides. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **4**, 55.
- Rees D. C., Lipscomb W. N. (1982): Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **160**, 475–498.
- Regente M. C., Giudici A. M., Villalaín J., De La Canal L. (2005): The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Letters in Applied Microbiology* **40**, 183–189.
- Reinhardt A., Neundorf I. (2016): Design and application of antimicrobial peptide conjugates. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 701.
- Richard J. A., Kelly I., Marion D., Auger M., Pézolet M. (2005): Structure of  $\beta$ -purothionin in membranes: A two-dimensional infrared correlation spectroscopy study. *Biochemistry* **44**, 52–61.
- Rivas L., Luque-Ortega J. R., Fernández-Reyes M., Andreu D. (2010): Membrane-active peptides as anti-infectious agents. *Journal of Applied Biomedicine* **8**, 159–167.
- Rushton P. J., Reinstädler A., Lipka V., Lippok B., Somssich I. E. (2002): Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell* **14**, 749–762.
- Salomon D., Sessa G. (2012): Biotechnological strategies for engineering plants with durable resistance to fungal and bacterial pathogens. *Plant Biotechnology and Agriculture*. **2012**, 329–342.
- Schauber J., Dorschner R. A., Yamasaki K., Brouha B., Gallo R. L. (2006): Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology* **118**, 509–519.
- Scocchi M., Mardirossian M., Runti G., Benincasa M. (2015): Non-membrane permeabilizing modes of action of antimicrobial peptides on bacteria. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **16**, 76–88.

- Sels J., Mathys J., De Coninck B. M. A., Cammue B. P. A., De Bolle M. F. C. (2008): Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 941–950.
- Shah A. N., Iqbal J., Ullah A., Yang G., Yousaf M., Fahad S., Tanveer M., Hassan W., Tung S. A., Wang L., Khan A., Wu Y. (2016): Allelopathic potential of oil seed crops in production of crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research* **23**, 14854–14867.
- Sharma P., Lönneborg A. (1996): Isolation and characterization of a cDNA encoding a plant defensin-like protein from roots of Norway spruce. *Plant molecular biology* **31**, 707–12.
- Silverstein K. A. T., Moskal W. A., Wu H. C., Underwood B. A., Graham M. A., Town C. D., VandenBosch K. A. (2007): Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *Plant Journal* **51**, 262–280.
- Simanski M., Gläser R., Köten B., Meyer-Hoffert U., Wanner S., Weidenmaier C., Peschel A., Harder J. (2013): *Staphylococcus aureus* subverts cutaneous defense by d-alanylation of teichoic acids. *Experimental Dermatology* **22**, 294–296.
- Sinha M., Singh R. P., Kushwaha G. S., Iqbal N., Singh A., Kaushik S., Kaur P., Sharma S., Singh T. P. (2014): Current overview of allergens of plant pathogenesis related protein families. *The Scientific World Journal* **2014**.
- Sinha R., Shukla P. (2018): Antimicrobial peptides: recent insights on biotechnological interventions and future perspectives. *Protein & Peptide Letters* **26**, 79–87.
- Stec B., Markman O., Rao U., Heffront G., Henderson S., Vernon L. P., Brumfeld V., Teeter M. M. (2004): Proposal for molecular mechanism of thionins deduced from physicochemical studies of plant toxins. *Journal of Peptide Research* **64**, 210–224.
- Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B. (1993): Plant „pathogenesis-related“ proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* **75**, 687–706.
- Sun B., Wibowo D., Middelberg A. P. J., Zhao C. X. (2018): Cost-effective downstream processing of recombinantly produced pexiganan peptide and its antimicrobial activity. *AMB Express* **8**, published online.
- Tam J. P., Wang S., Wong K. H., Tan W. L. (2015): Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals* **8**, 711–757.
- Thevissen K., Ghazi A., De Samblanx G. W., Brownlee C., Osborn R. W., Broekaert W. F. (1996): Fungal membrane responses induced by plant defensins and thionins. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 15018–15025.
- Thevissen K., Osborn R. W., Acland D. P., Broekaert W. F. (2000): Specific binding sites for an antifungal plant defensin from dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 54–61.

- Thevissen K., Terras F. R. G., Broekaert W. F. (1999): Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 5451–5458.
- Thevissen K., Warnecke D. C., François I. E. J. A., Leipelt M., Heinz E., Ott C., Zähringer U., Thomma B. P. H. J., Ferket K. K. A., Cammue B. P. A. (2004): Defensins from insects and plants interact with fungal glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 3900–3905.
- Thoma S., Kaneko Y., Somerville C. (1993): A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *The Plant journal* **3**, 427–36.
- Towse C. L., Hopping G., Vulovic I., Daggett V., Fersht A. (2014): Nature versus design: The conformational propensities of D-amino acids and the importance of side chain chirality. *Protein Engineering, Design and Selection* **27**, 447–455.
- Utkina L. L., Andreev Y. A., Rogozhin E. A., Korostyleva T. V., Slavokhotova A. A., Oparin P. B., Vassilevski A. A., Grishin E. V., Egorov T. A., Odintsova T. I. (2013): Genes encoding 4-Cys antimicrobial peptides in wheat *Triticum kiharae* Dorof. et Migush.: Multimodular structural organization, intraspecific variability, distribution and role in defence. *FEBS Journal* **280**, 3594–3608.
- Wakabayashi N., Yano Y., Kawano K., Matsuzaki K. (2017): A pH-dependent charge reversal peptide for cancer targeting. *European Biophysics Journal* **46**, 121–127.
- Wang Q., Zhu S., Liu Y., Li R., Tan S., Wang S., Tang L., Chen F. (2017): Overexpression of *Jatropha curcas* defensin (*JcDef*) enhances sheath blight disease resistance in tobacco. *Journal of Phytopathology* **165**, 15–21.
- Van Der Weerden N. L., Hancock R. E. W., Anderson M. A. (2010): Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin NaD1 occurs through a cell wall-dependent process. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 37513–37520.
- de Wit P. J. G. M. (1992): Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **30**, 391–418.
- Yamasaki K., Schaubert J., Coda A., Lin H., Dorschner R. A., Schechter N. M. (2006): Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *The FASEB Journal* **20**(12), 2068–2080.
- Yeats T. H., Rose J. K. C. (2008): The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science* **17**, 191–198.
- Yevtushenko D. P., Misra S. (2012): Transgenic expression of antimicrobial peptides in plants: Strategies for enhanced disease resistance, improved productivity, and production of therapeutics. *ACS Symposium Series* **1095** 445–458.
- Zhang L., Rozek A., Hancock R. E. W. (2001): Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 35714–35722.



Zhao C. X., Dwyer M. D., Yu A. L., Wu Y., Fang S., Middelberg A. P. (2015): A simple and low-cost platform technology for producing pexiganan antimicrobial peptide. *Biotechnology and Bioengineering* **112**, 957-964.

Zhou A., Kang T. M., Yuan J., Beppler C., Nguyen C., Mao Z., Nguyen M. Q., Yeh P., Miller J. H. (2015): Synergistic interactions of vancomycin with different antibiotics against *Escherichia coli*: Trimethoprim and nitrofurantoin display strong synergies with vancomycin against wild-type *E. coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**, 276–281.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

*A. thaliana* – *Arabidopsis thaliana*

*A. tumefaciens* – *Agrobacterium tumefaciens*

carry-over – nežádoucí přenos analytu do následující analýzy

CBD - chitin vazebná doména

DAMP4 – umělý biosurfaktantní protein (designer amphipathic peptide)

*E. coli* – *Escherichia coli*

ELP - elastinový polypeptid

FA – kyselina mravenčí (formic acid)

His-12 - 12x histidin

His-6 – 6x histidin

LL-37 – lidský katelicidin

MBP - maltosa vazebný protein

MS-SCAN (SCAN) – detekce hmotnostním spektrometrem, detekce hmot v daném rozsahu (SCAN je v případě tohoto MS ekvivalentem Fullscan-u)

MS-SIM (SIM) – detekce hmotnostním spektrometrem, selektivní záznam iontu

*N. benthamiana* – *Nicotiana benthamiana*

PR proteiny – proteiny související s patogenezí

PS-LL-37 – rekombinantní lidský katelicidin, který obsahuje navíc na začátku aminokyseliny P a S.

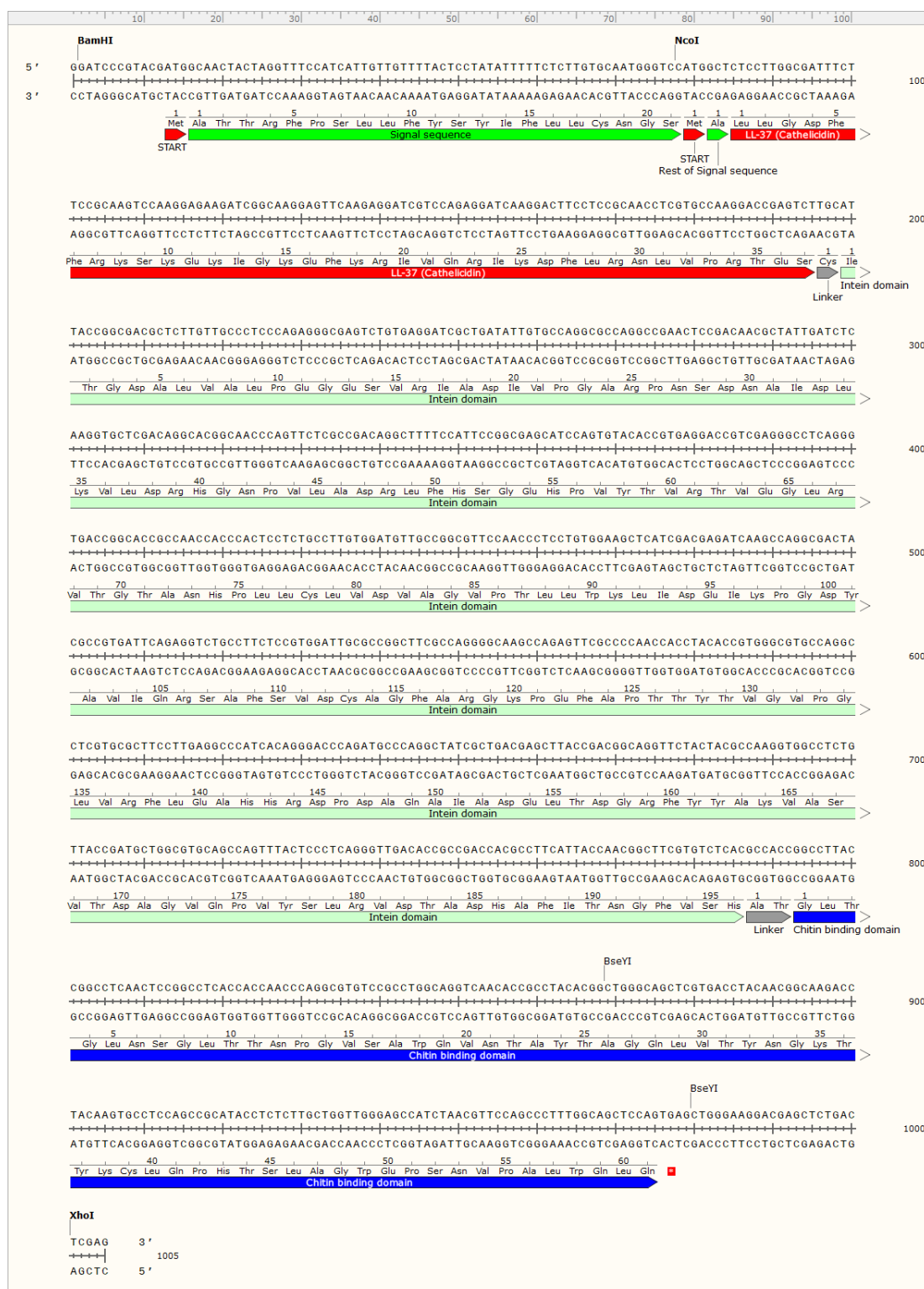
rhLL-37 – rekombinantní lidský katelicidin

SUMO - „small ubiquitin-like modifier“

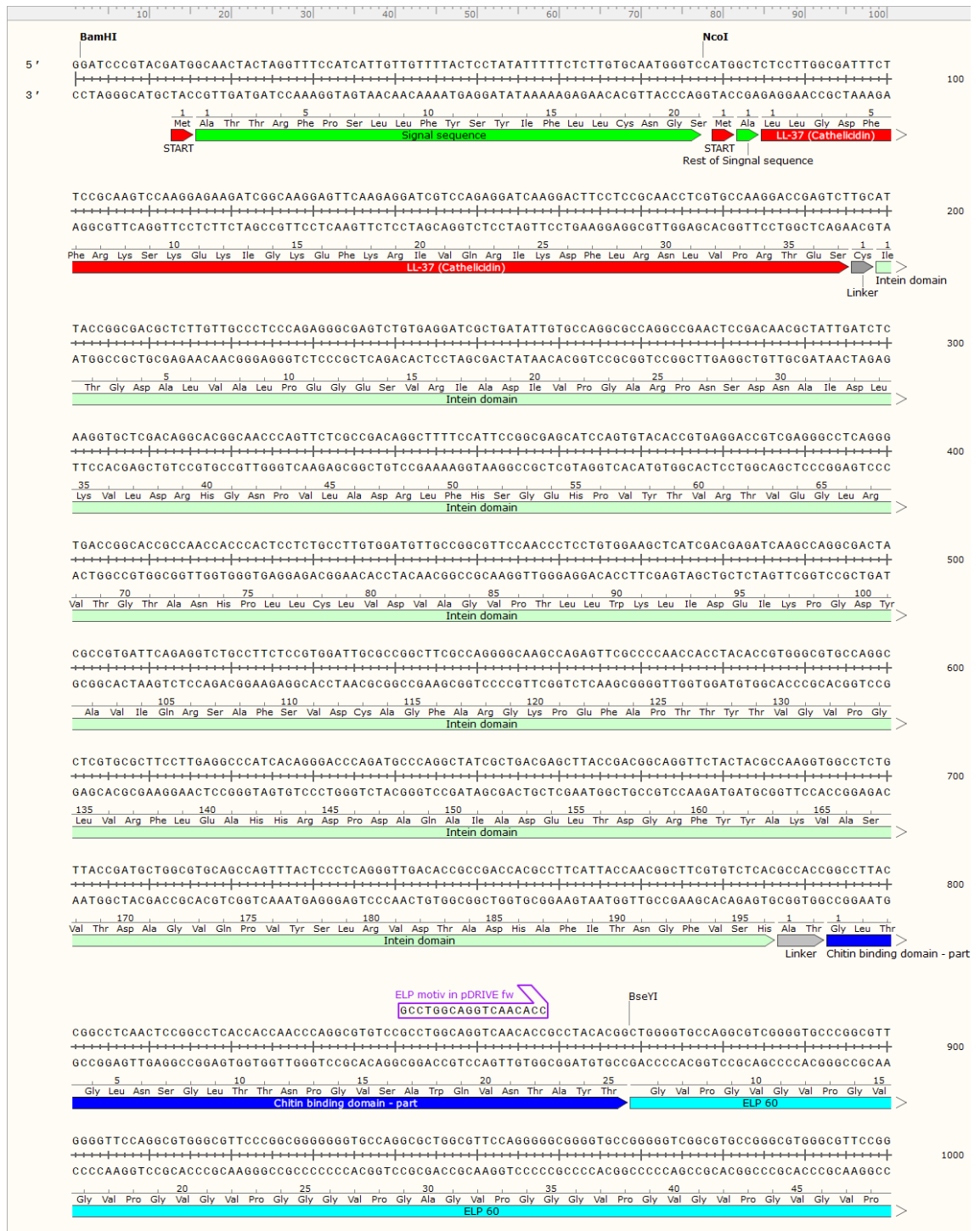
TFA – kyselina trifluoroctová

# 9 PŘÍLOHY

## Příloha 1 Sekvence použitých konstruktů

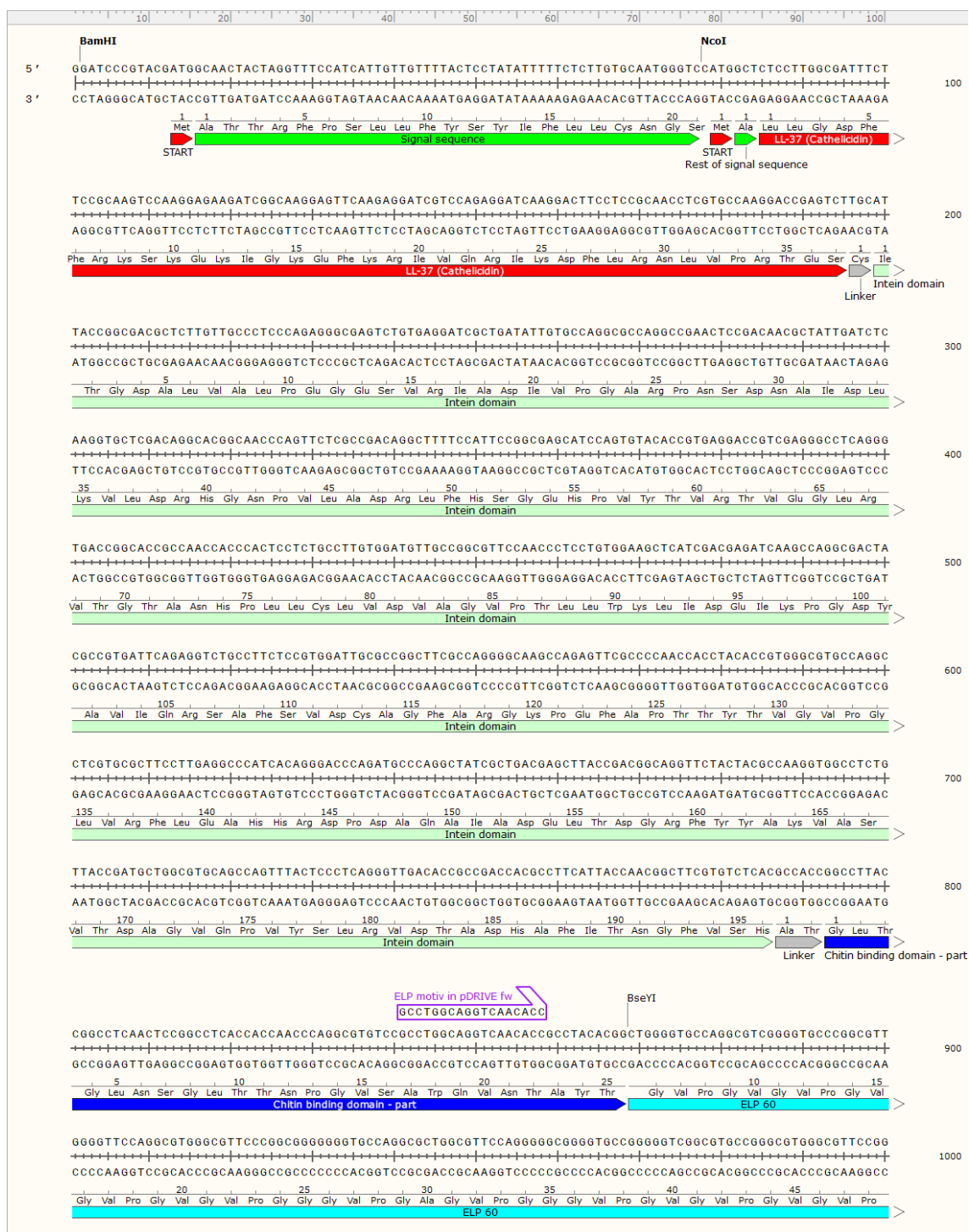


*Sekvence rhLL-37\_C1*



Sekvence rhLL-37\_A1 (1. část)





Sekvence *rhLL-37\_A2* (1. část)

1000  
 GGGGTTCCAGGCGTGGGCGTTCCCGGCGGGGGGGTGCAGGCGCTGGCGTTCCAGGGGGCGGGGTGCCGGGGTCCGGCGTGCCGGGCGTGGGCGTTCCGG  
 CCCCAGGTTCCGACCCGCAAGGGCGGCCCCACGGTCCGGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGACCCCGCAAGGCC  
 Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro  
 ELP 60

1100  
 GGGGCGGCGTTCCCGGGGCTGGCGTGCCAGGGGTTGGCGTTCCCGGCGTGGGCGTCCAGGCGTCCGCGTGCCGGGGGGGGGCGTGCAGGGGCTGGGCGT  
 CCCCAGGTTCCGACCCGCAAGGGCGGCCCCACGGTCCGGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGACCCCGCAAGGCC  
 Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ala Gly Val  
 ELP 60

1200  
 CCGGGCGGCGGCGTTCCAGGCGTGGGCGTTCCAGGCGTGGGCGTCCAGGGGGGGGGTCCCGGCGTGGGCGTGCCGGGCGTGGGCGTCCCGGGGTC  
 GGGCGGCGGCGCAAGGTCCGACCCGCAAGGGCGGCCCCACGGTCCGGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGACCCCGCAAGGCC  
 Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val  
 ELP 60

1300  
 GGGGTTCCAGGCGTGGGCGTTCCCGGCGTGGGCGTCCAGGGGGGGGGTCCCGGCGTGGGCGTGCCGGGCGTGGGCGTGGGCGTGGGCGTGGGCGT  
 CCGCAGGGGCGCAACCCGACGGCCCGGCCCCAGGGTCCGGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGACCCCGCAAGGCC  
 Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro  
 ELP 60

1400  
 GCGGGGGGTTCCAGGGGCTGGCGTGCCGGGGGTTGGGGTCCCAAGGCGTTGGCGTGCCGGGCGTGGGCGTCCCGGGGGGGGGTCCGGGGGCTGGGCGT  
 CGCGCCCGCAAGGTCCCGACCGCACGGCCCGCCCCAGGGTCCGGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGACCCCGCAAGGCC  
 Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ala Gly Val  
 ELP 60

1500  
 TCCGGGGGGGGGCGTGCCGGGCGTTGGGGTCCCAAGGGGTCGGGGTGCAGGGCGGGGGGCGTCCAGGCGTGGGCGTGCCGGGCGTGGGCGTGGGCGTGGGCGT  
 AGGCCCCCGCGCAGGGCGCAACCCGACGGTCCCGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGACCCCGCAAGGCC  
 Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val  
 ELP 60

1600  
 GGGGTTCCAGGCGTGGGCGTTCCAGGCGTGGGCGTTCCCGGCGTGGGCGTCCAGGGGGGGGCGTCCAGGCGTGGGCGTGGGCGTGGGCGTGGGCGTGGGCGT  
 CCGCAGGGGCGCAACCCGACGGTCCCGGACCGCACGGCCCGCCCCAGGGTCCGGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGACCCCGCAAGGCC  
 Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro  
 ELP 60

1700  
 GCGGGGGGTTCCCGGCGTGGGCGTCCCAAGGCGTTGGGGTCCCAAGGGGTTGGGGTCCCGGGGTTGGGCGTCCCGGGGGGGGGTCCAGGGGCTGGGCGT  
 CGCCCCCGCAAGGGCGGACCGCACGGTCCCGCAACCCGACGGTCCCGGACCGCAAGGTCCCGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGCA  
 Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ala Gly Val  
 ELP 60

1800  
 GCGGGGGGTTCCCGGCGTGGGCGTCCCAAGGCGTTGGGGTCCCAAGGGGTTGGGGTCCCGGGGTTGGGCGTCCCGGGGGGGGGTCCAGGGGCTGGGCGT  
 CGCCCCCGCAAGGGCGGACCGCACGGTCCCGCAACCCGACGGTCCCGGACCGCAAGGTCCCGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGCA  
 Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro  
 ELP 60

1900  
 GGGGTTCCAGGCGTGGGCGTTCCCGGCGTGGGCGTCCAGGGGGGGGCGTCCCGGGGTTGGGCGTCCCGGGGTTGGGCGTCCCGGGGGGGGGTCCAGGGGCTGGGCGT  
 CCCCAGGTTCCGACCCGCAAGGGCGGCCCCACGGTCCGGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGACCCCGCAAGGCC  
 Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro  
 ELP 60

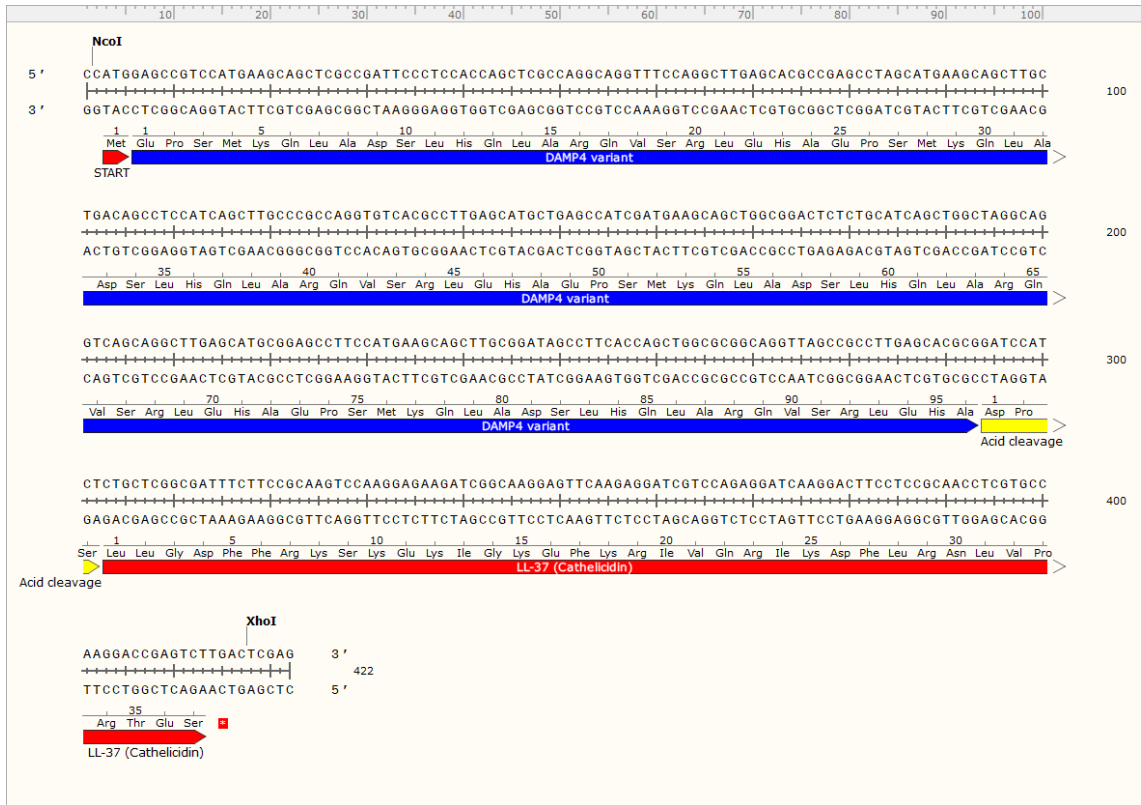
2000  
 GGGGCGGCGTTCCCGGGGCTGGCGTGCCAGGGGTTGGCGTTCCCGGCGTGGGCGTCCAGGCGTCCGCGTGCCGGGGGGGGGCGTGCAGGGGCTGGGCGT  
 CCCCAGGTTCCGACCCGCAAGGGCGGCCCCACGGTCCGGGACCGCAAGGTCCCGCCCCAGGGCCCCAGCCGACGGCCCGACCCCGCAAGGCC  
 Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Val Pro Gly Ala Gly Val  
 ELP 60

Sekvence rhLL-37\_A2 (2. část)



Sekvence rhLL-37\_A2 (3. část)





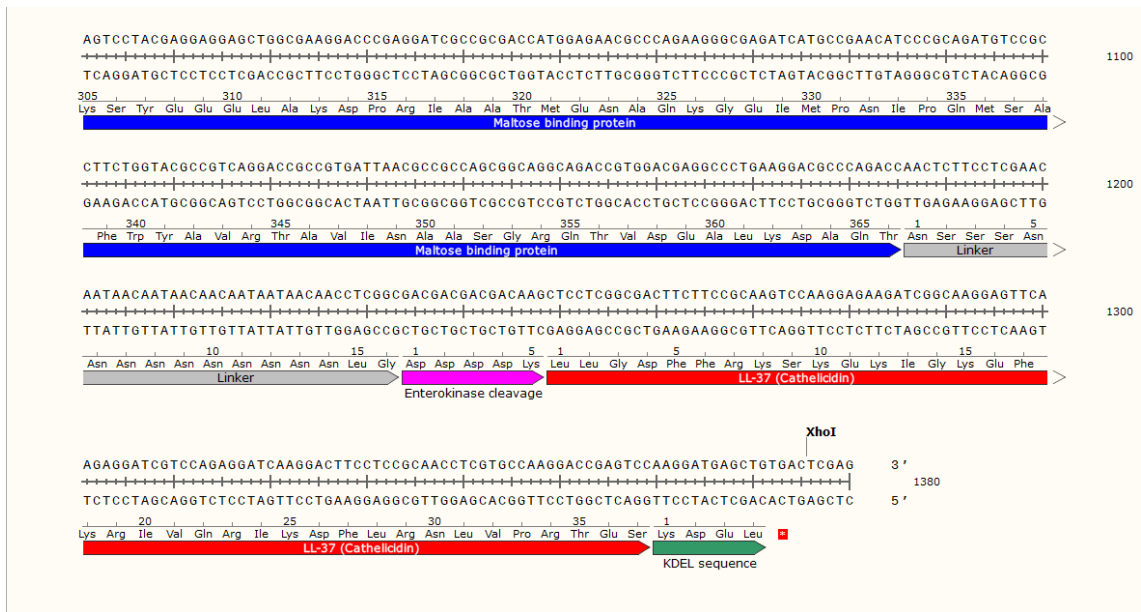
*Sekvence rhLL-37\_B1*



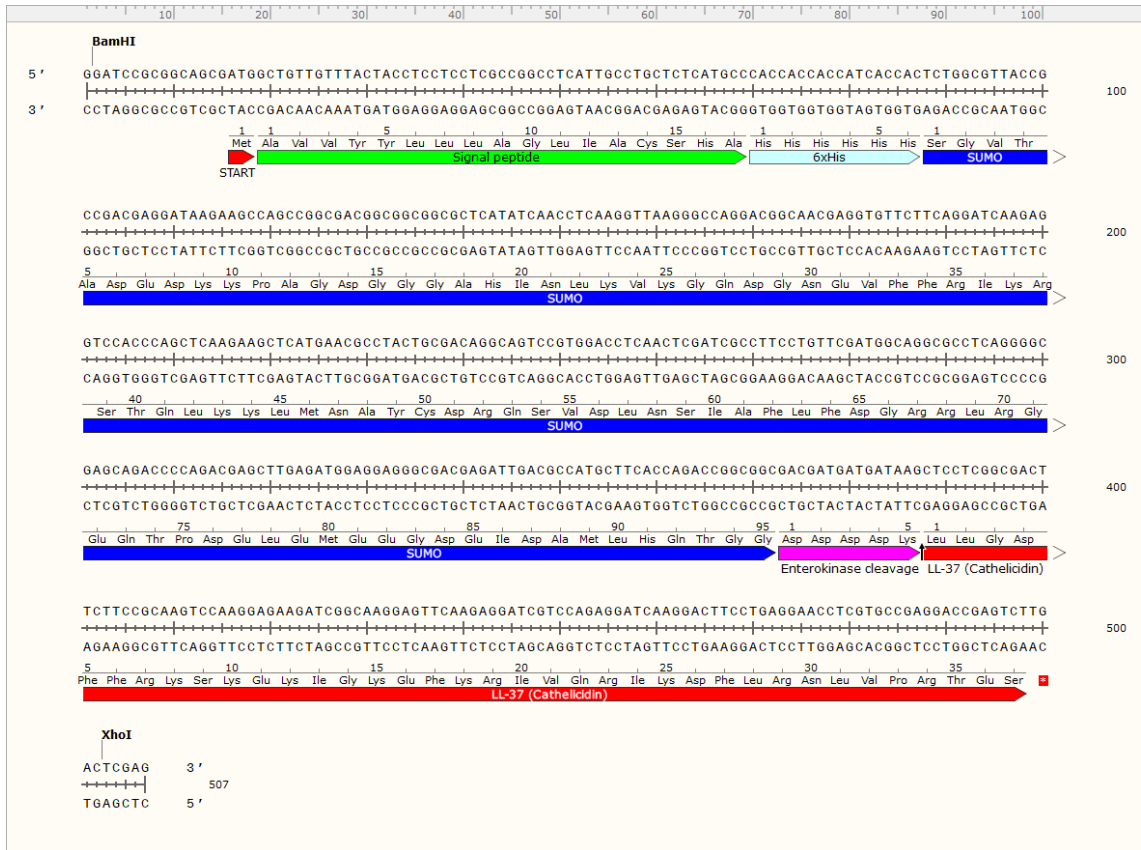
Sekvence rhLL-37\_B3



Sekvence rhLL-37\_C2 (1. část)

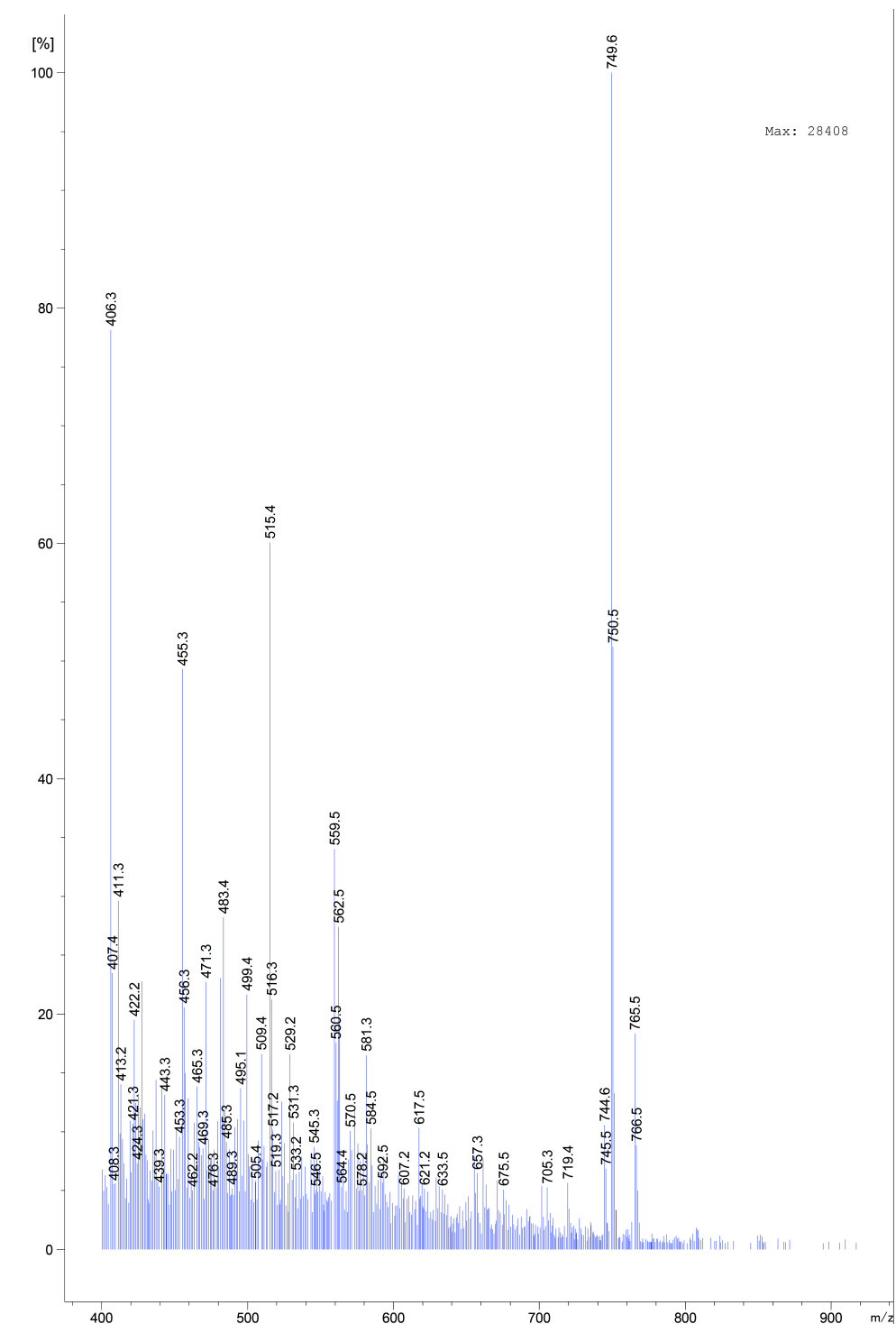


Sekvence rhLL-37\_C2 (2. část)

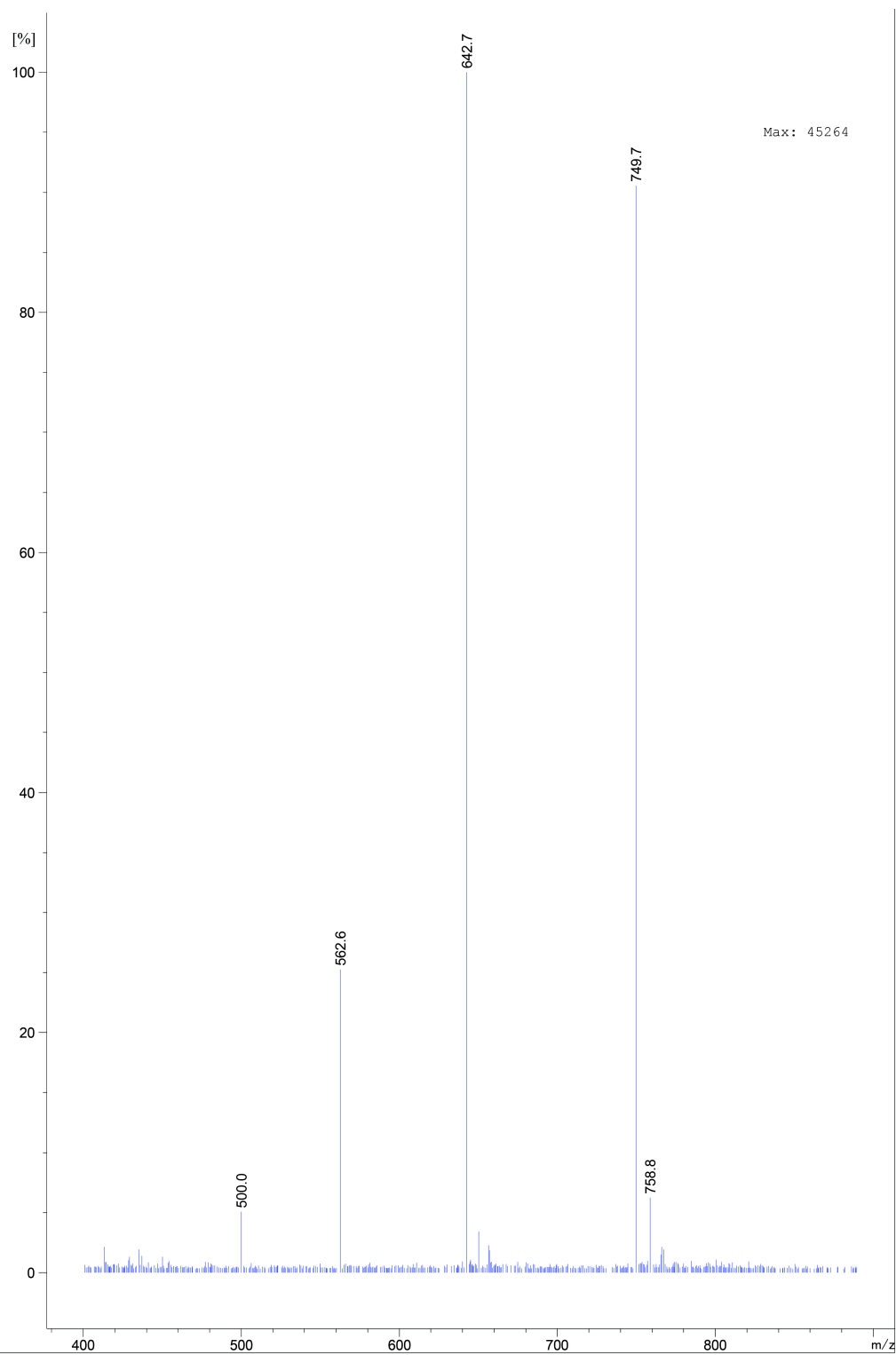


Sequence rhLL-37\_C3

## Příloha 2 Analýza fragmentace standardu

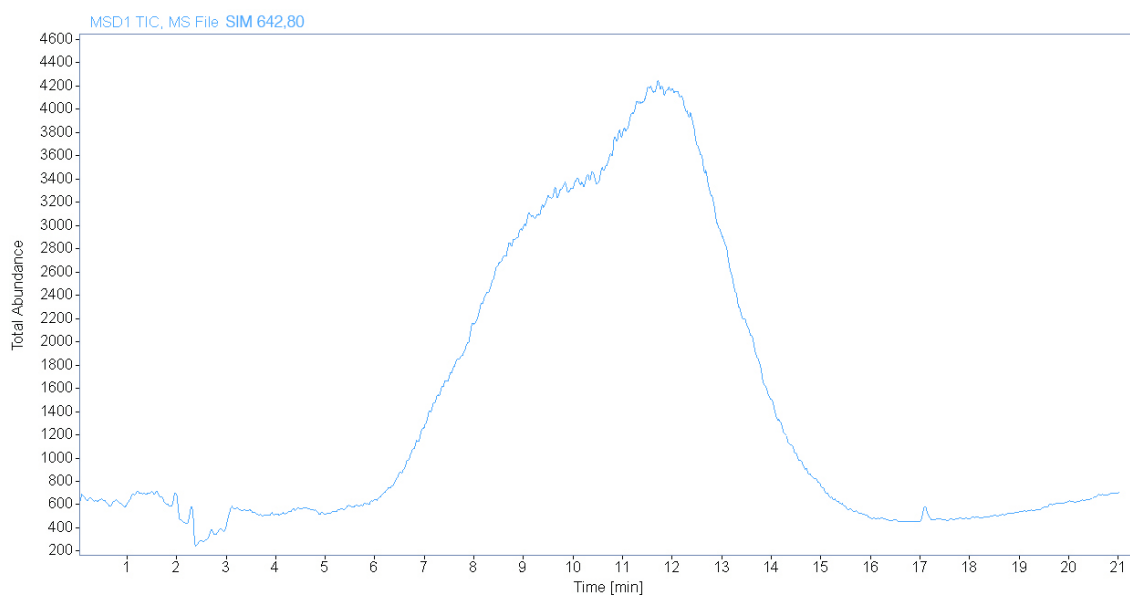


Obrázek 34: MS spektrum pro blank

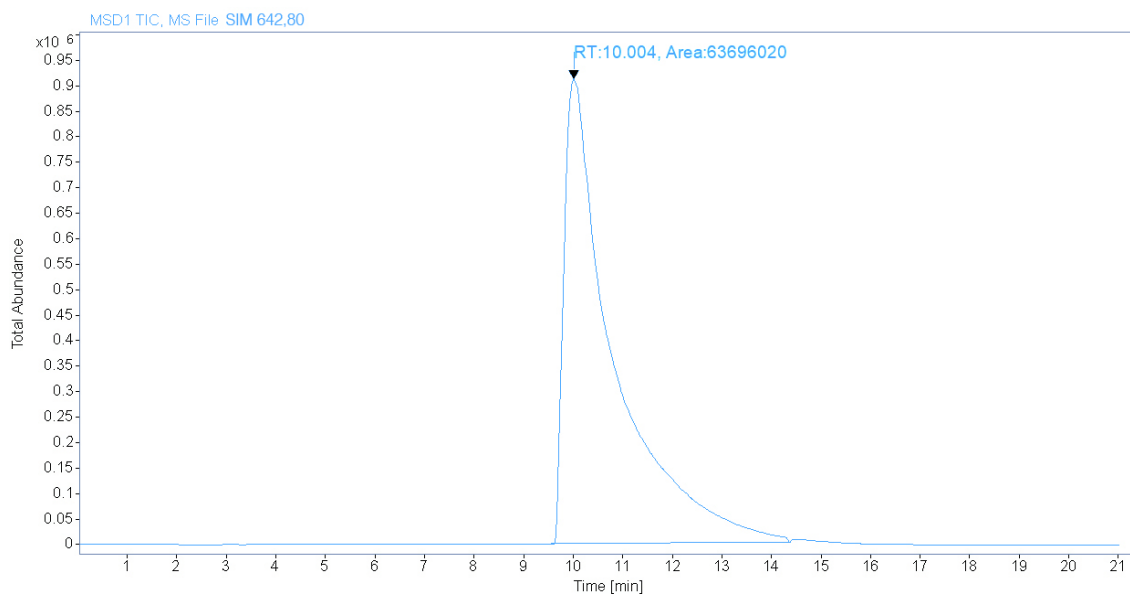


Obrázek 35: MS spektrum pro syntetický LL-37

### Příloha 3 LC-MS analýza – kolona Aegis PEPTIDE

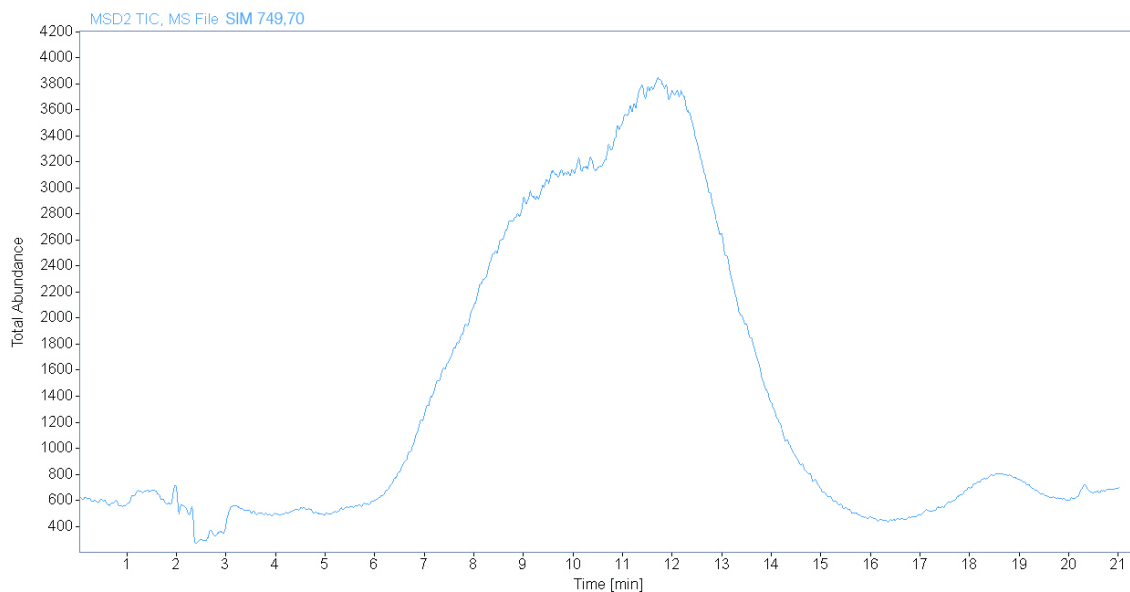


Obrázek 36: Chromatogram pro kolonu Aegis PEPTIDE: Blank SIM m/z 642,80

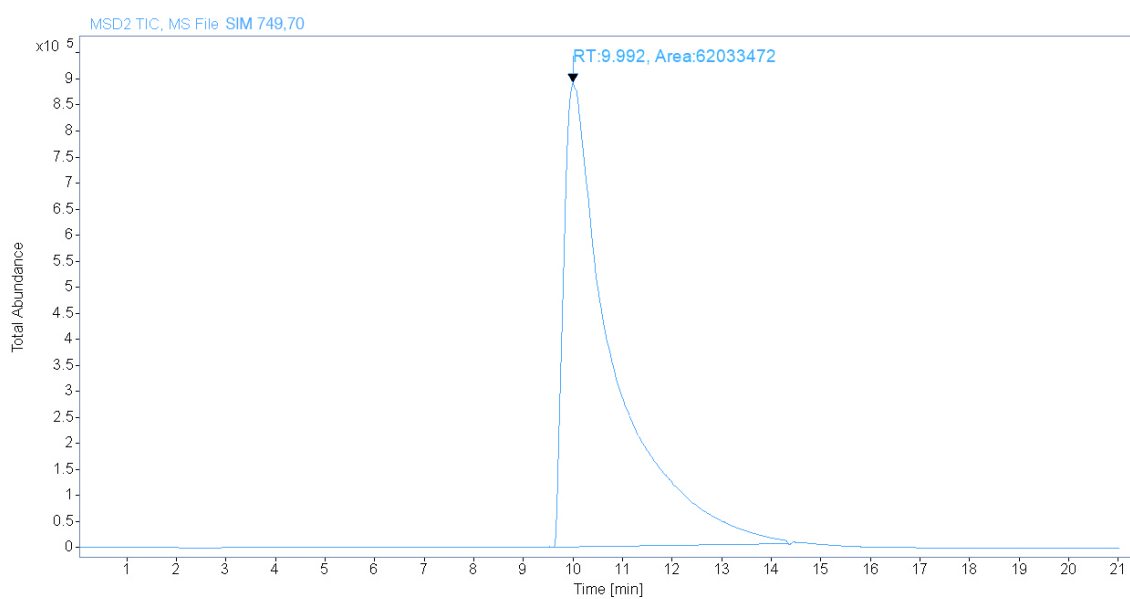


Obrázek 37: Chromatogram pro kolonu Argis PEPTIDE: STD (100 ng) SIM m/z 642,80



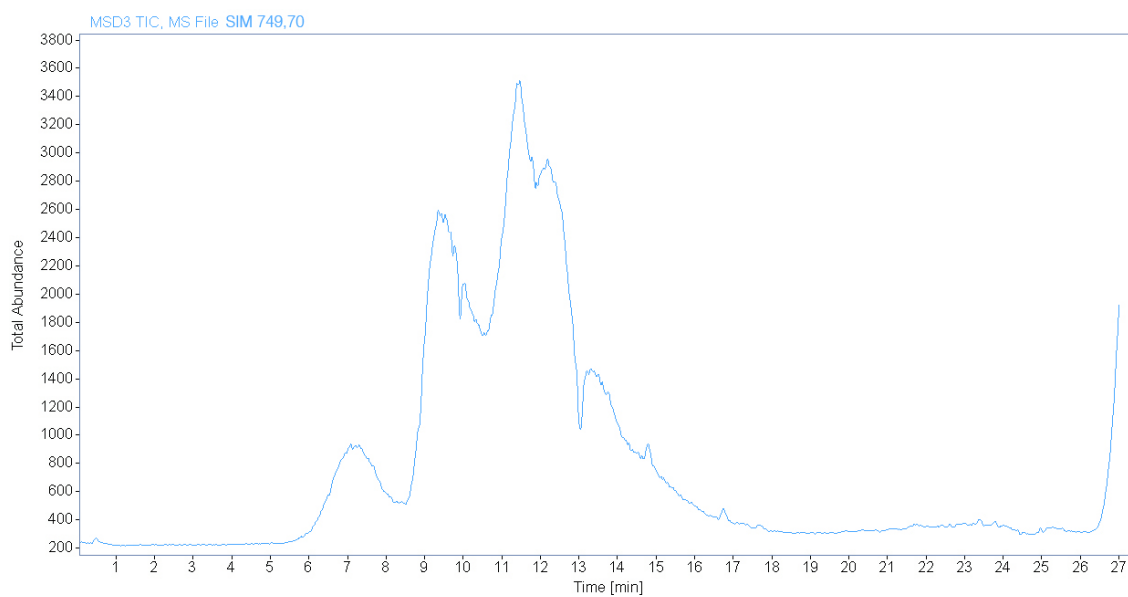


Obrázek 38: Chromatogram pro kolonu Aegis PEPTIDE: Blank SIM m/z 749,70

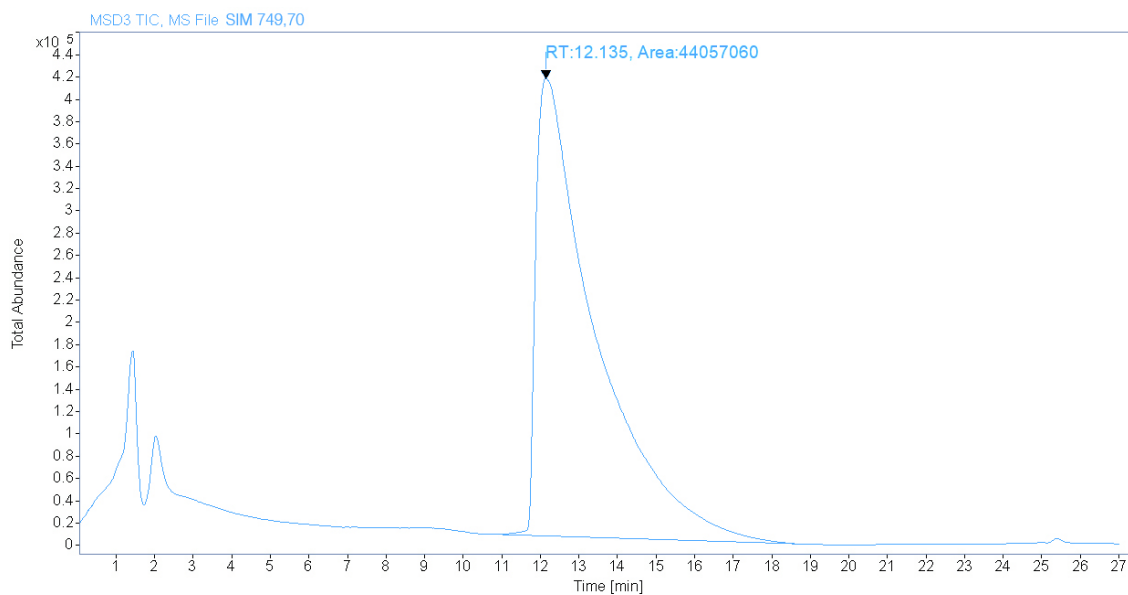


Obrázek 39: Chromatogram pro kolonu Aegis PEPTIDE: STD (100 ng) SIM m/z 749,70

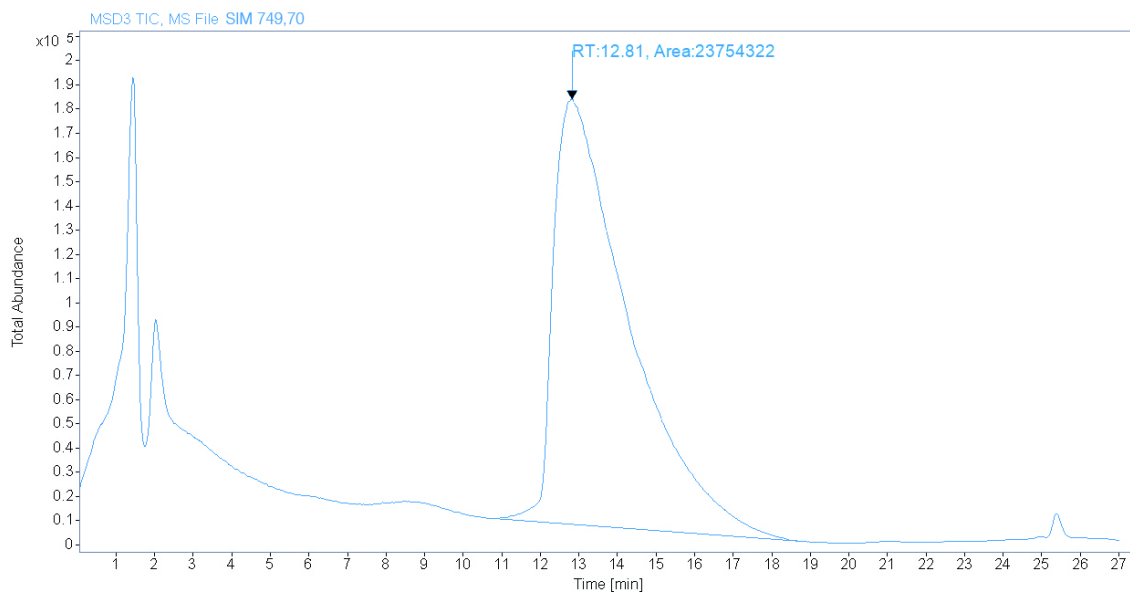
## Příloha 4 LC-MS analýza - stabilita standardu



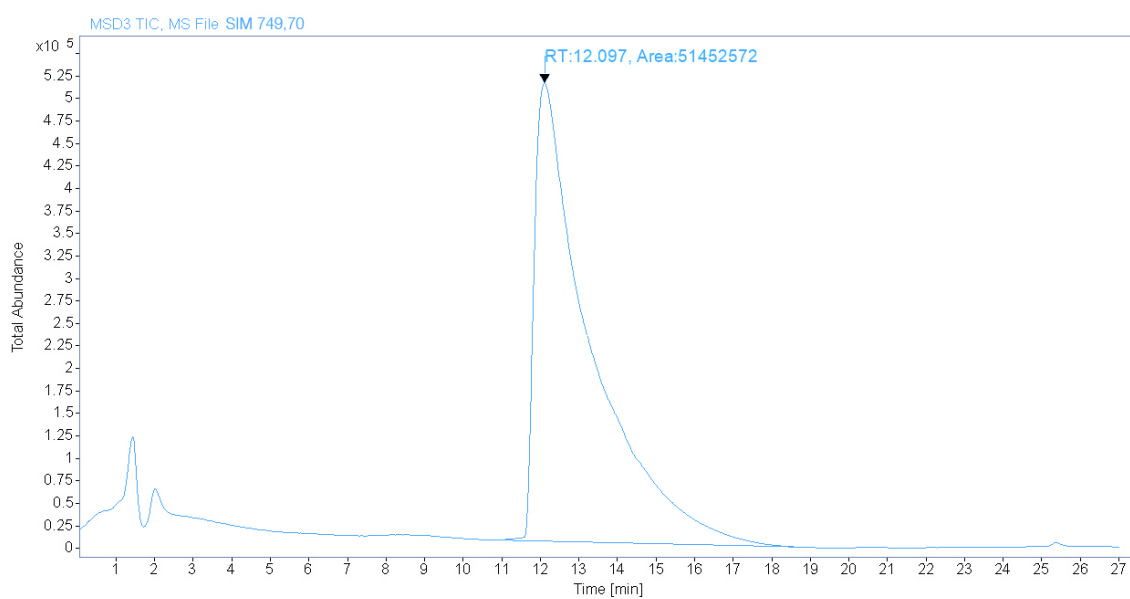
Obrázek 40: Chromatogram pro testování stability: Blank SIM m/z 749,70



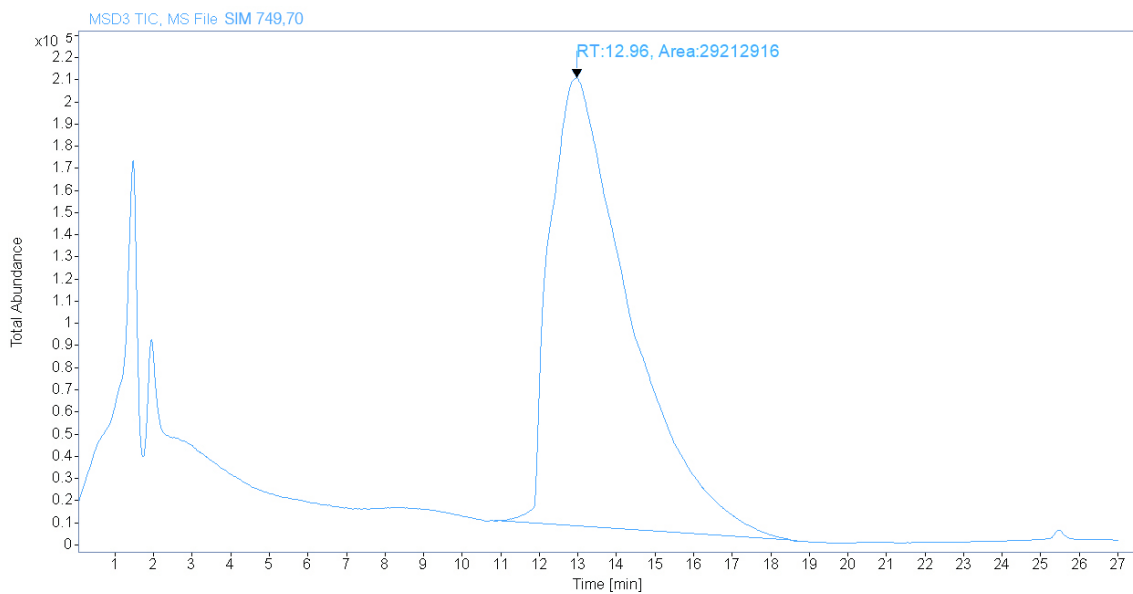
Obrázek 41: Chromatogram pro testování stability: 0,1% kyselina mravenčí SIM m/z 749,70



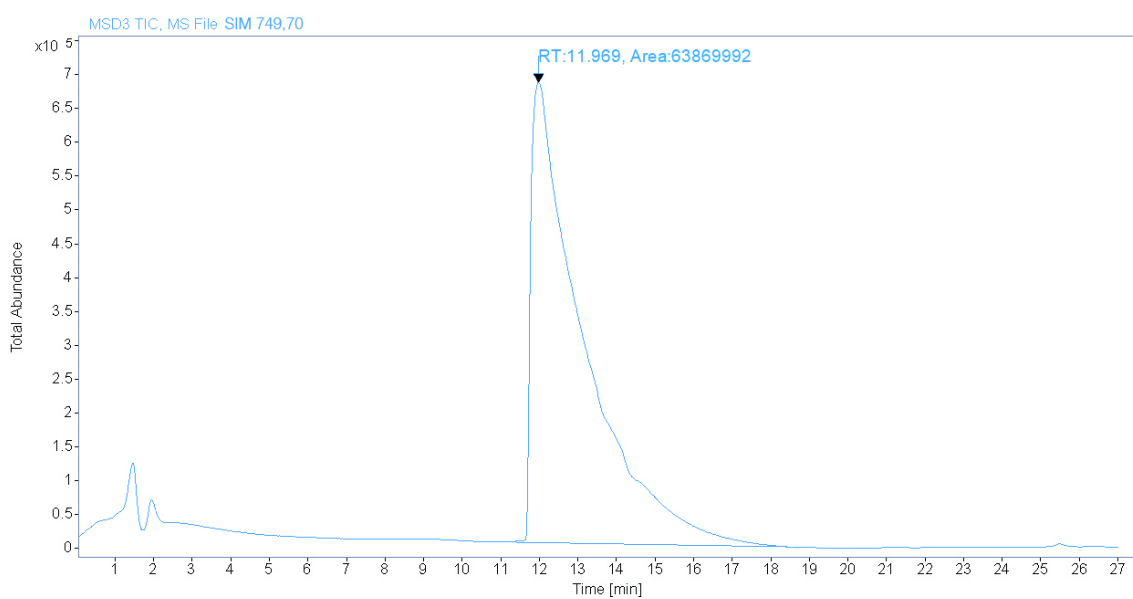
Obrázek 42: Chromatogram pro testování stability: 10% acetonitril SIM m/z 749,70



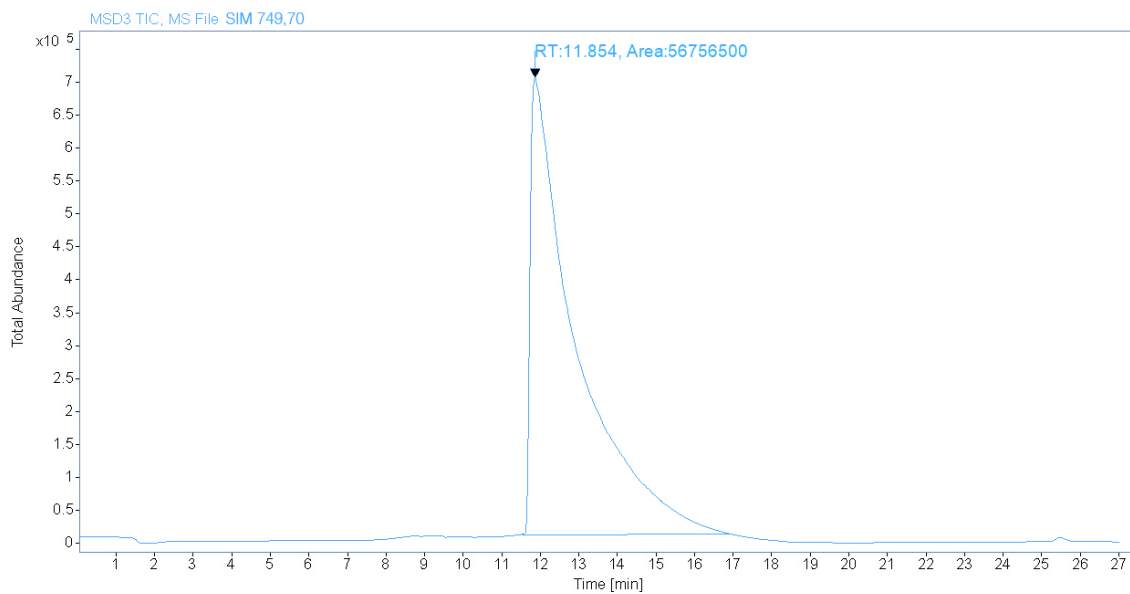
Obrázek 43: Chromatogram pro testování stability: 10% acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí SIM m/z 749,70



Obrázek 44: Chromatogram pro testování stability: 50% acetonitril SIM m/z 749,70

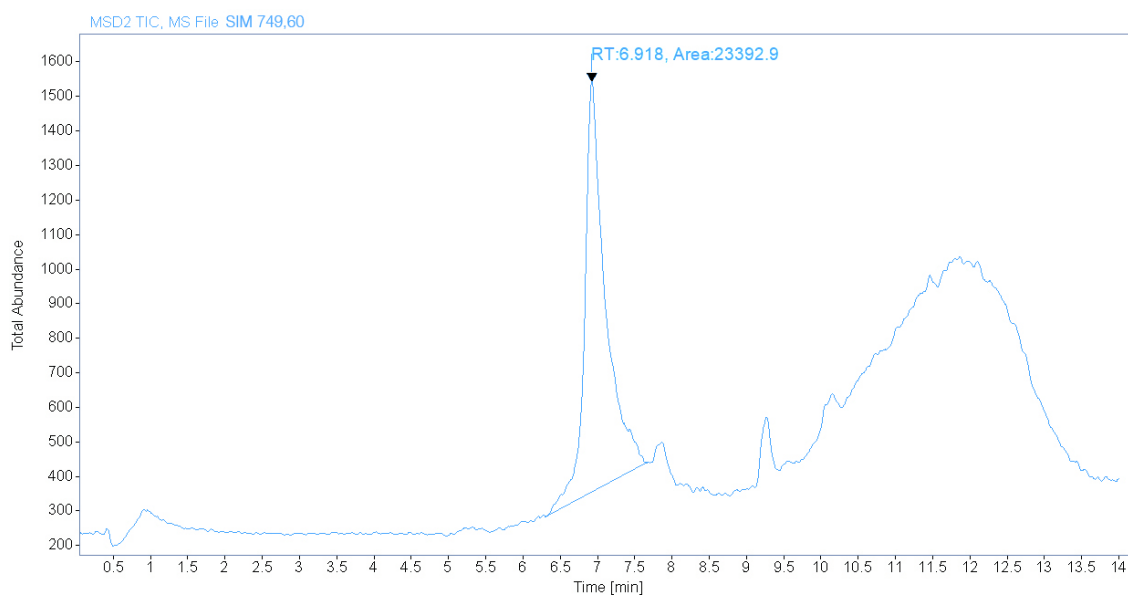


Obrázek 45: Chromatogram pro testování stability: 50% acetonitril + 0,1% kyselina mravenčí SIM m/z 749,70

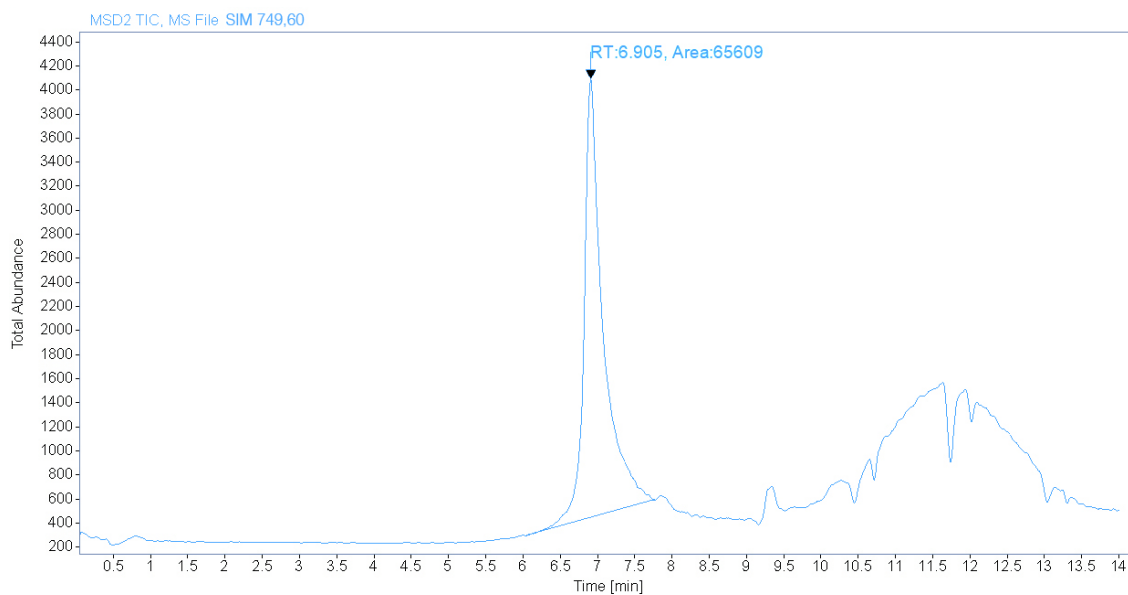


Obrázek 46: Chromatogram pro testování stability: 20mM kyselina chlorovodíková SIM m/z 749,70

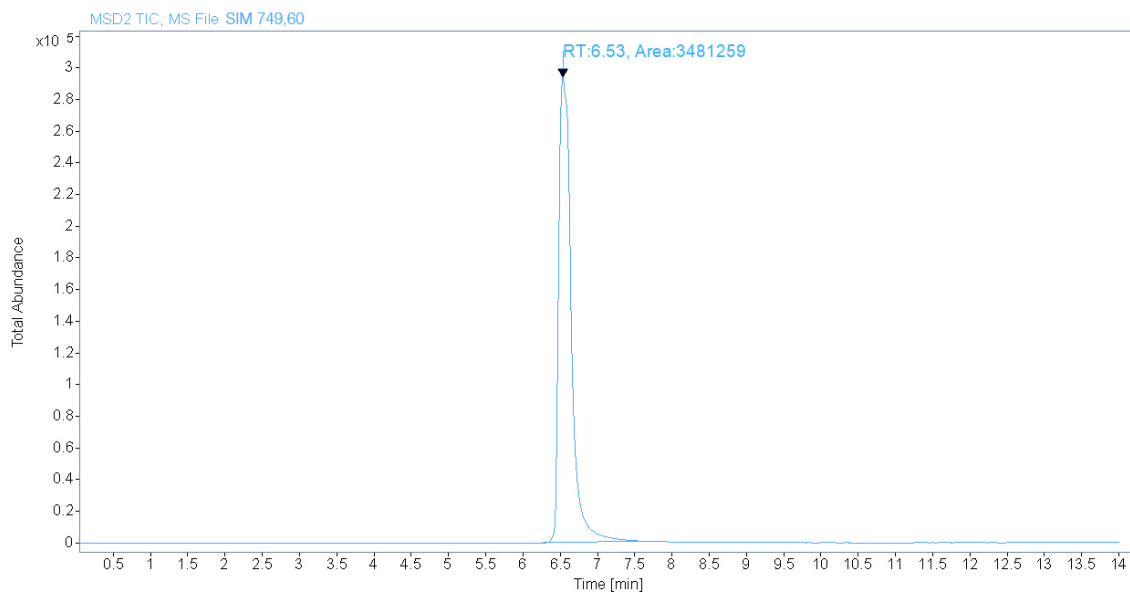
## Příloha 5 LC-MS analýza – měření kalibrační křivky



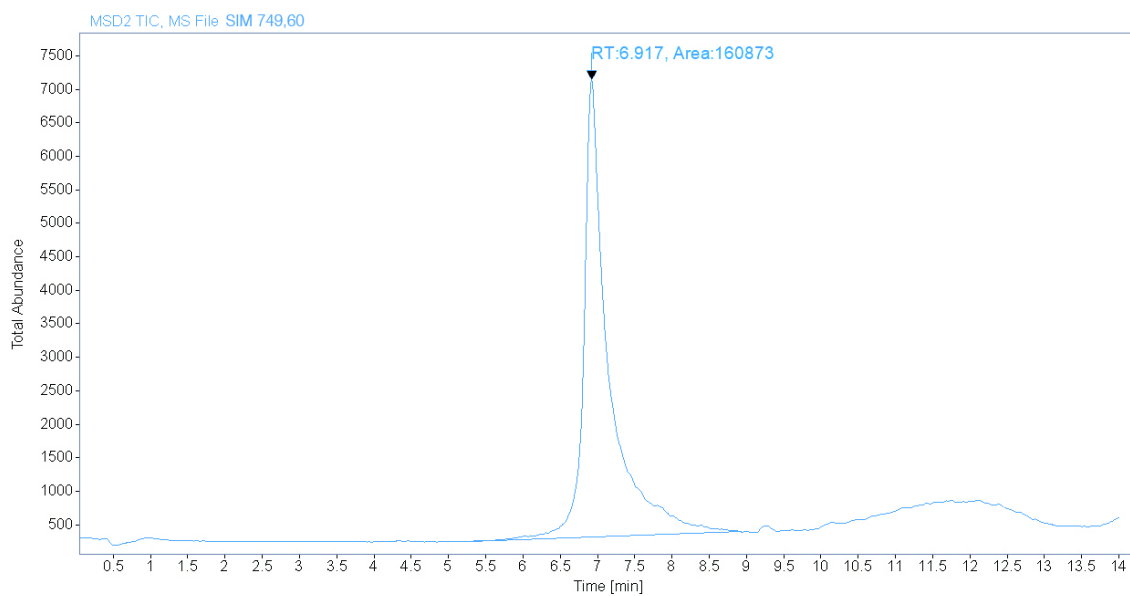
Obrázek 47: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: Blank SIM m/z 749,60



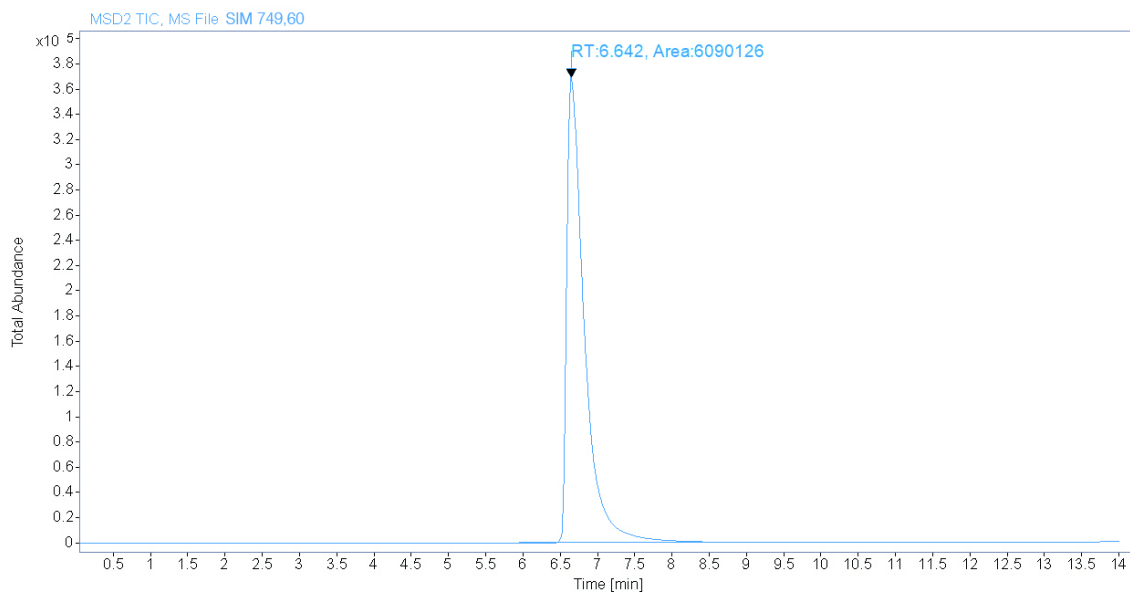
Obrázek 48: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: STD (1 ng) SIM m/z 749,60



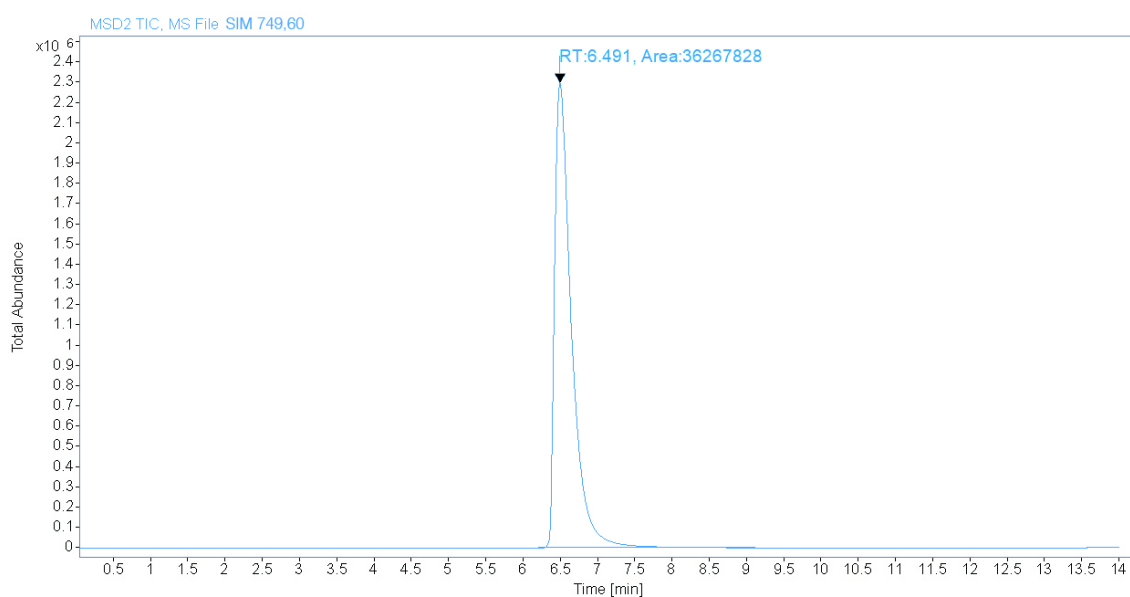
Obrázek 49: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: STD (50 ng) SIM m/z 749,60



Obrázek 50: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: Blank (carry-over) SIM m/z 749,60

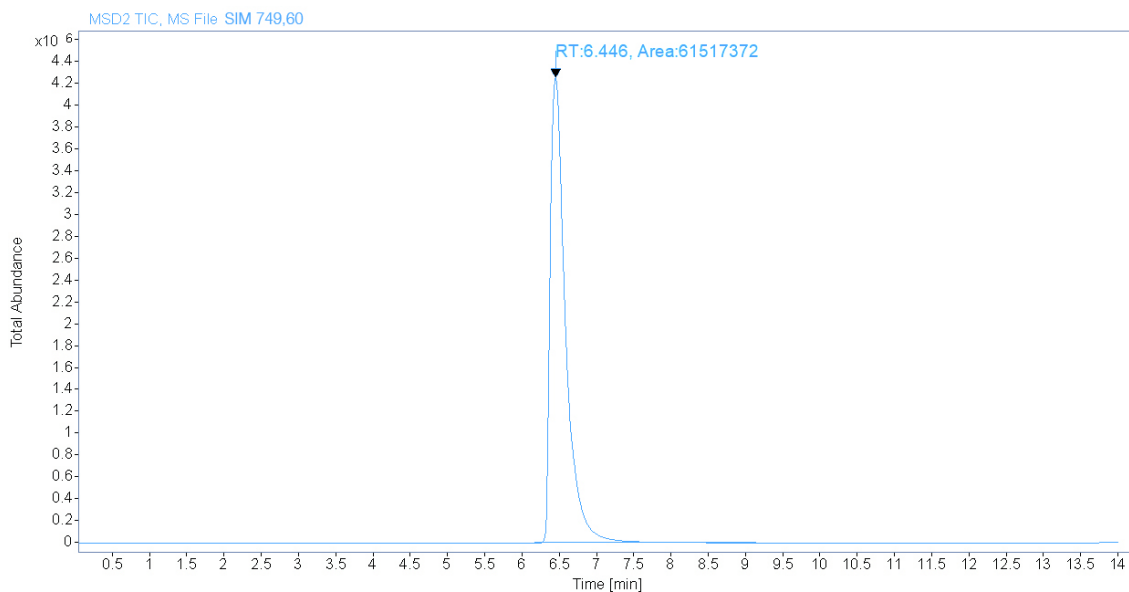


Obrázek 51: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: STD (100 ng) SIM m/z 749,60

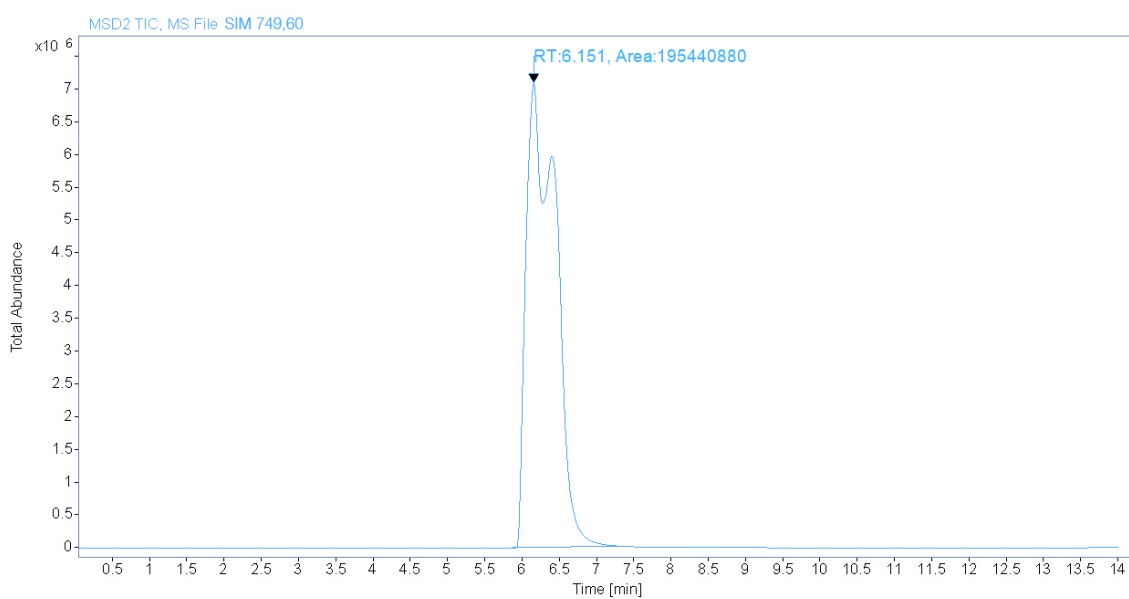


Obrázek 52: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: STD (500 ng) SIM m/z 749,60

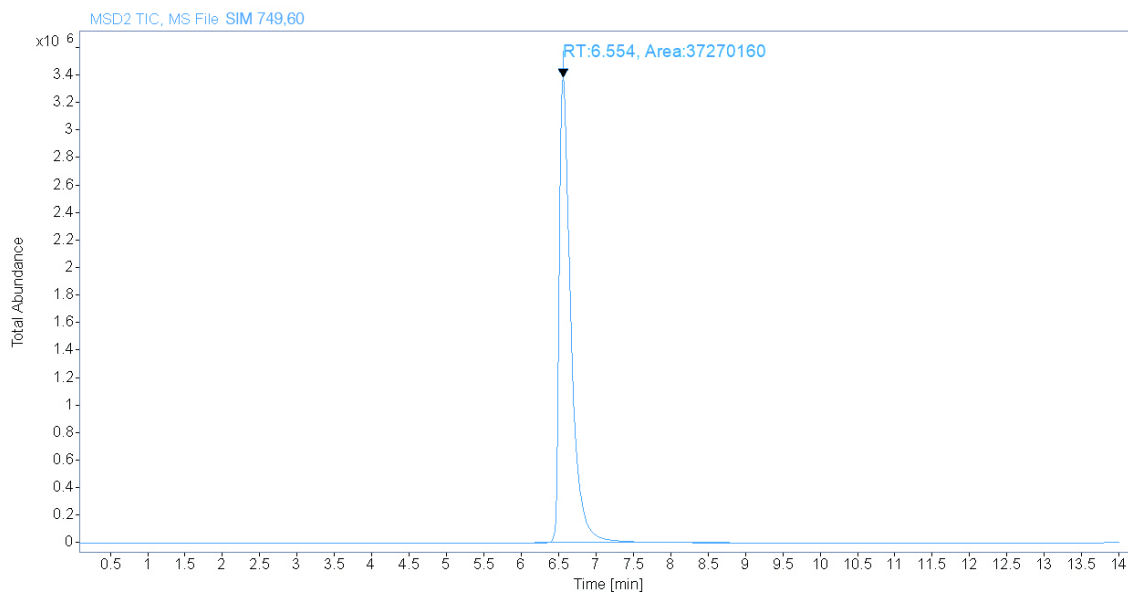




Obrázek 53: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: STD (1 000 ng) SIM m/z 749,60

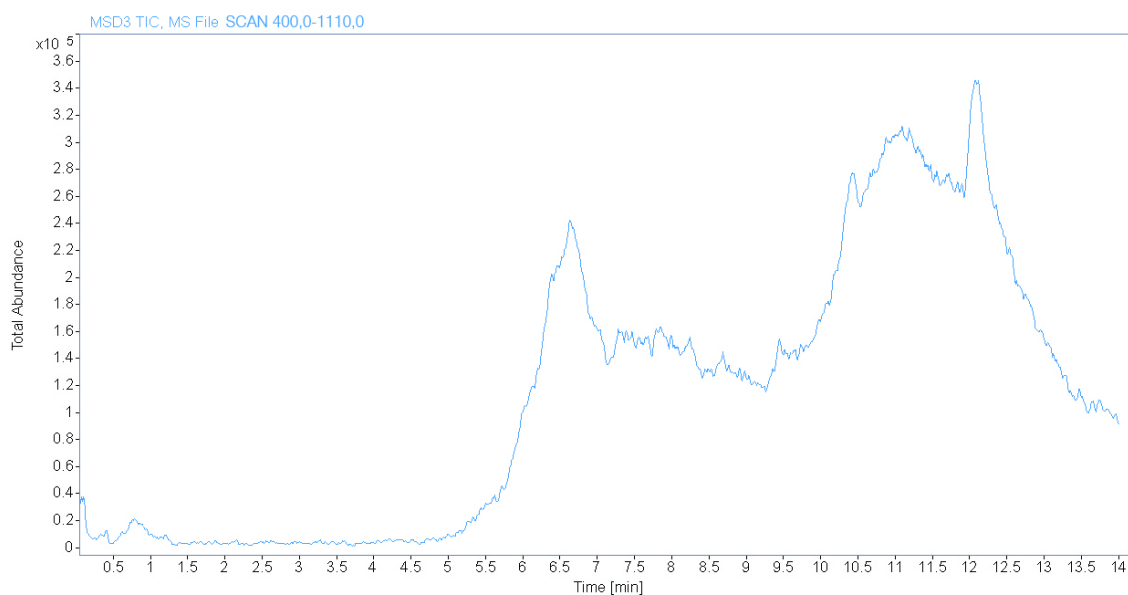


Obrázek 54: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: STD (4 000 ng) SIM m/z 749,60

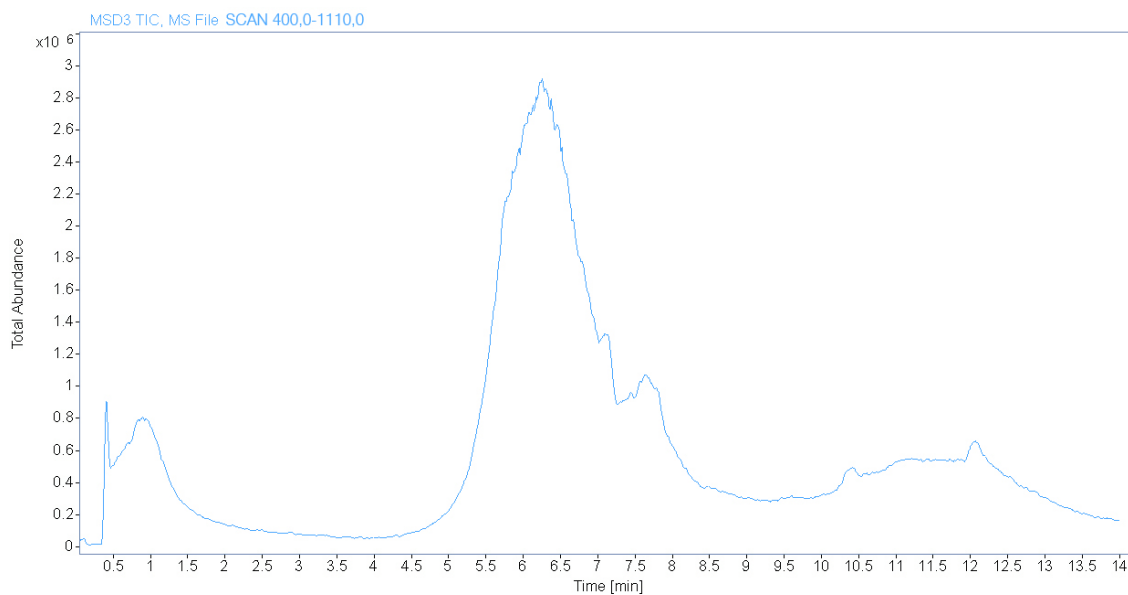


Obrázek 55: Chromatogram pro testování stability: 50 ng ve 20 mM kyselině mravenčí (7 týdnů)  
SIM m/z 749,70

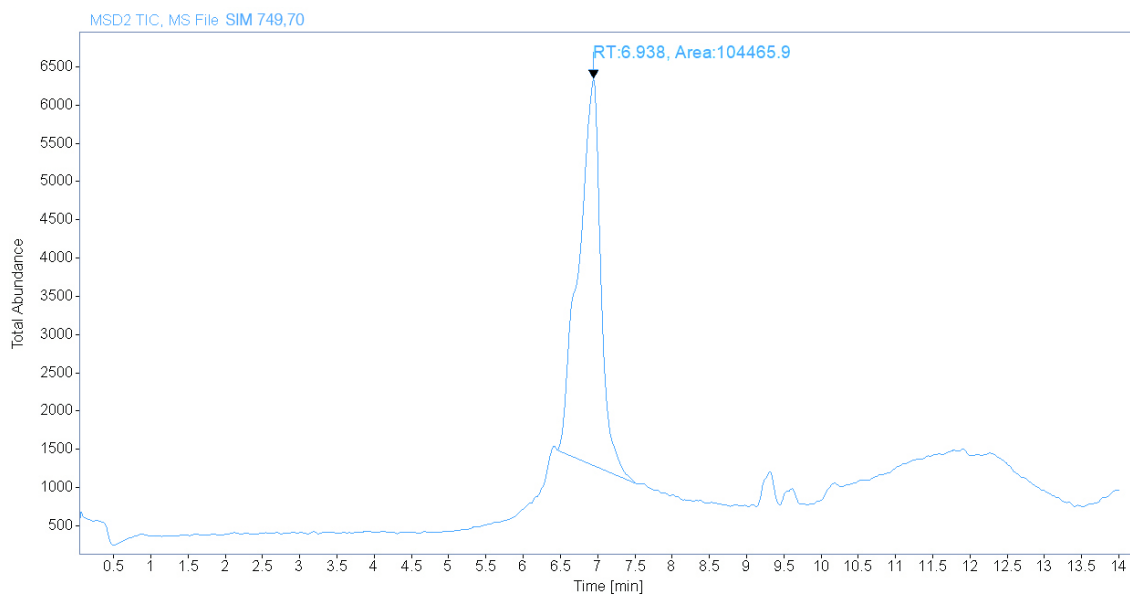
## Příloha 6 LC-MS analýza – bakteriální extrakt po termální denaturaci a LPLC



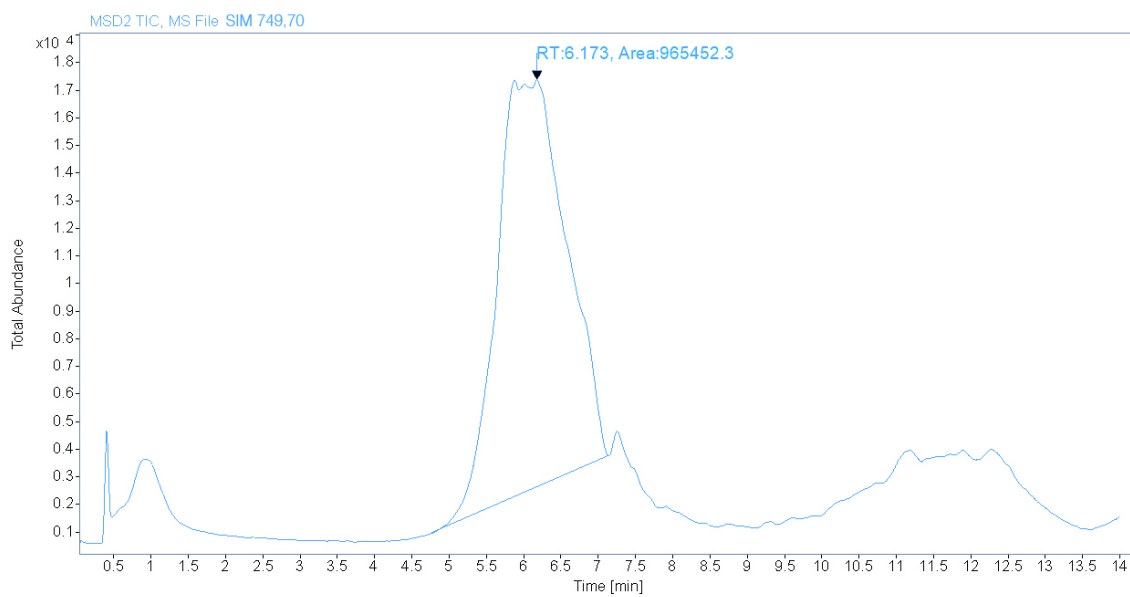
Obrázek 56: Chromatogram pro analýzu bakteriálního extraktu: Blank SCAN 400,0-1110,0



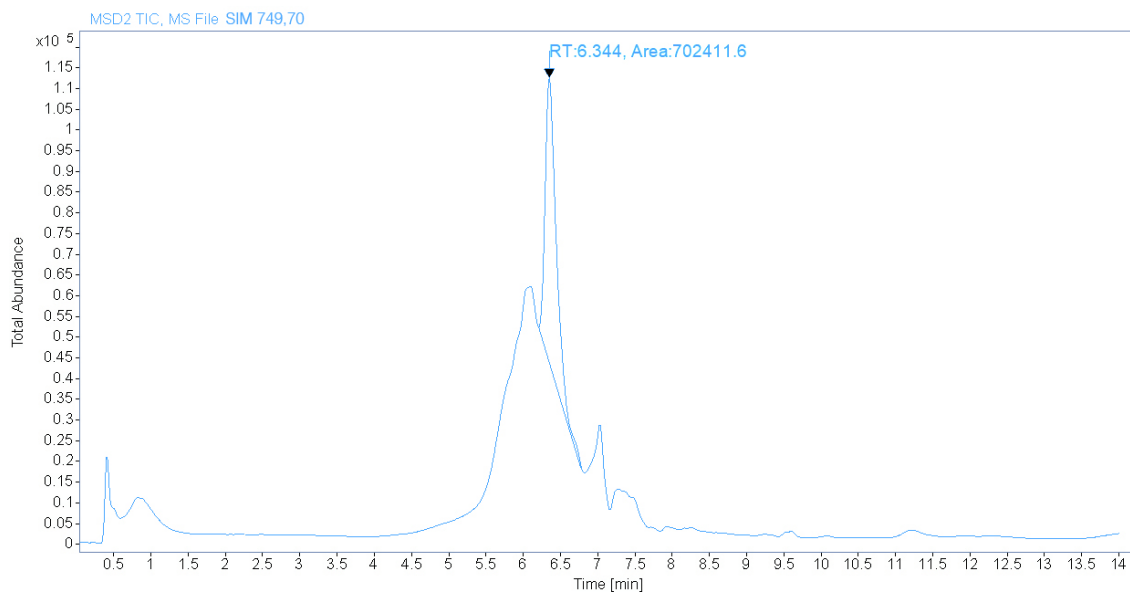
Obrázek 57: Chromatogram pro analýzu bakteriálního extraktu: Termální denaturace SCAN 400,0-1110,0



Obrázek 58: Chromatogram pro analýzu bakteriálního extraktu: Blank SIM m/z 749,70

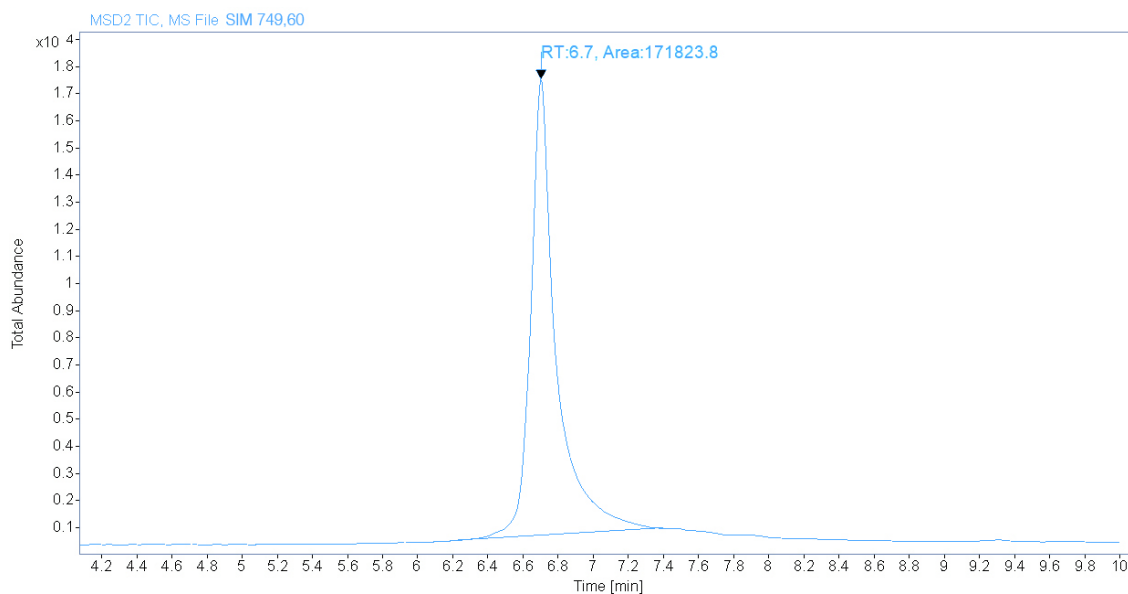


Obrázek 59: Chromatogram pro analýzu bakteriálního extraktu: Termální denaturace SIM m/z 749,70

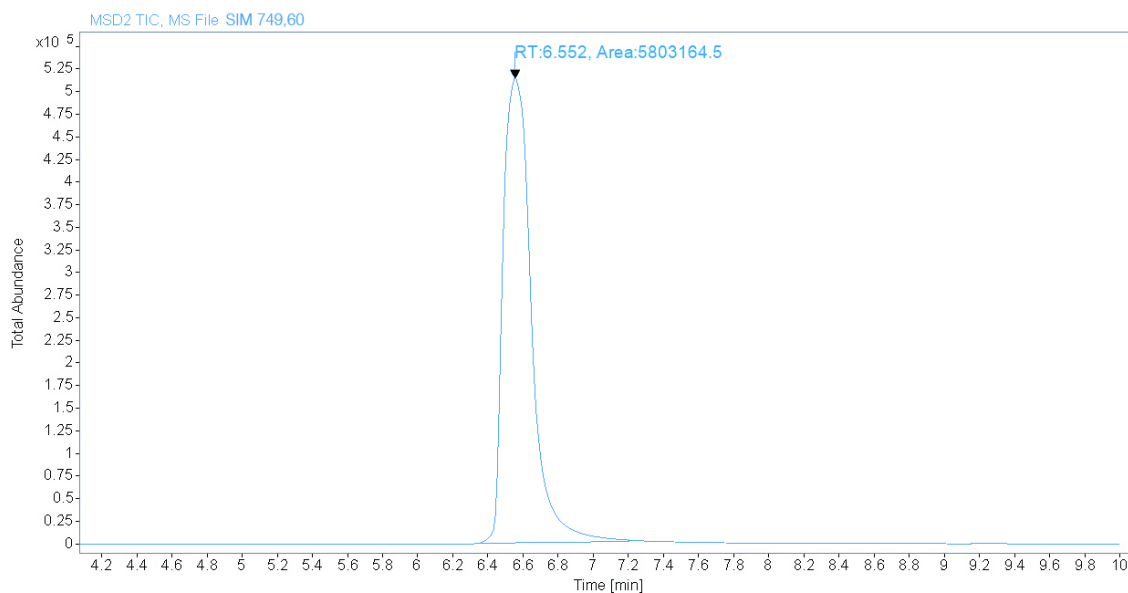


Obrázek 60: Chromatogram pro analýzu bakteriálního extraktu: LPLC afinitní puřifikace SIM  $m/z$  749,70

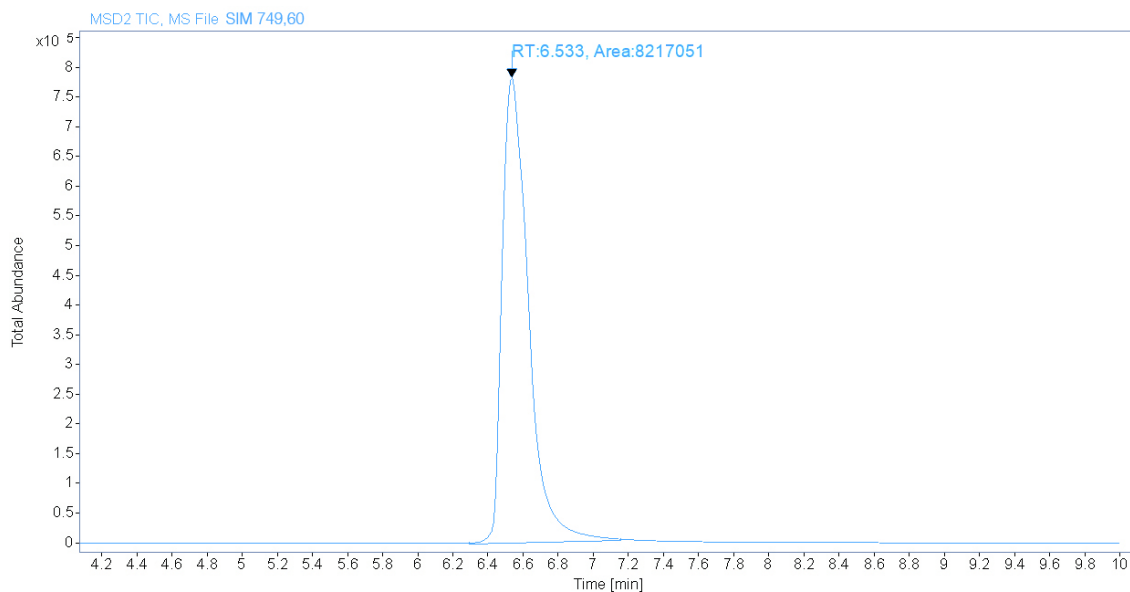
## Příloha 7 LC-MS analýza – vliv nastříkovaného objemu na plochu píku



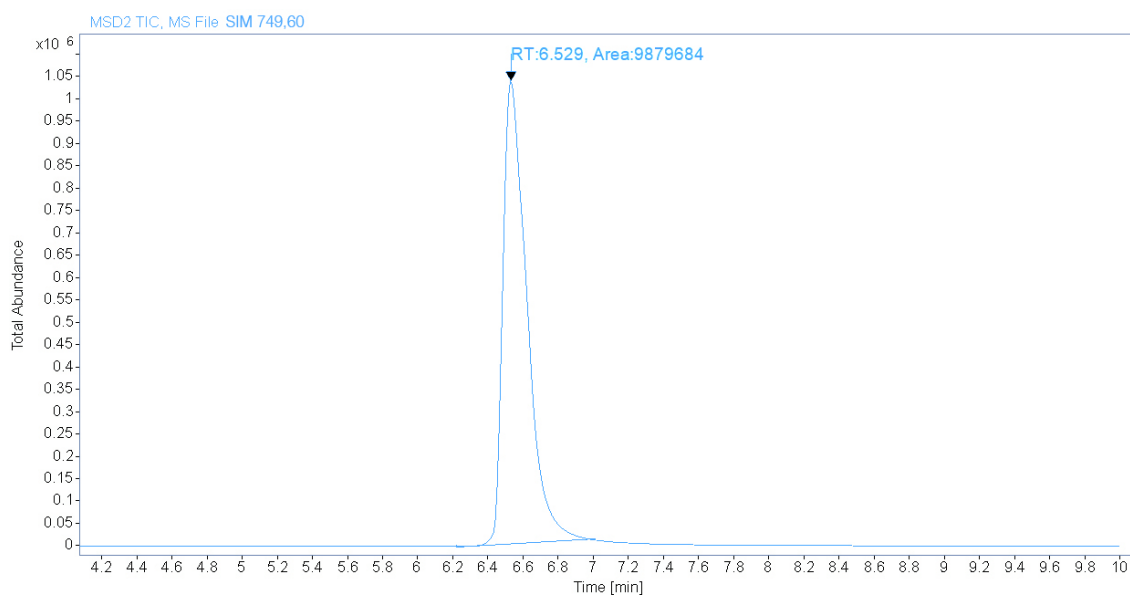
Obrázek 61: Chromatogram pro analýzu vlivu nastříkovaného objemu: Blank SIM m/z 749,60



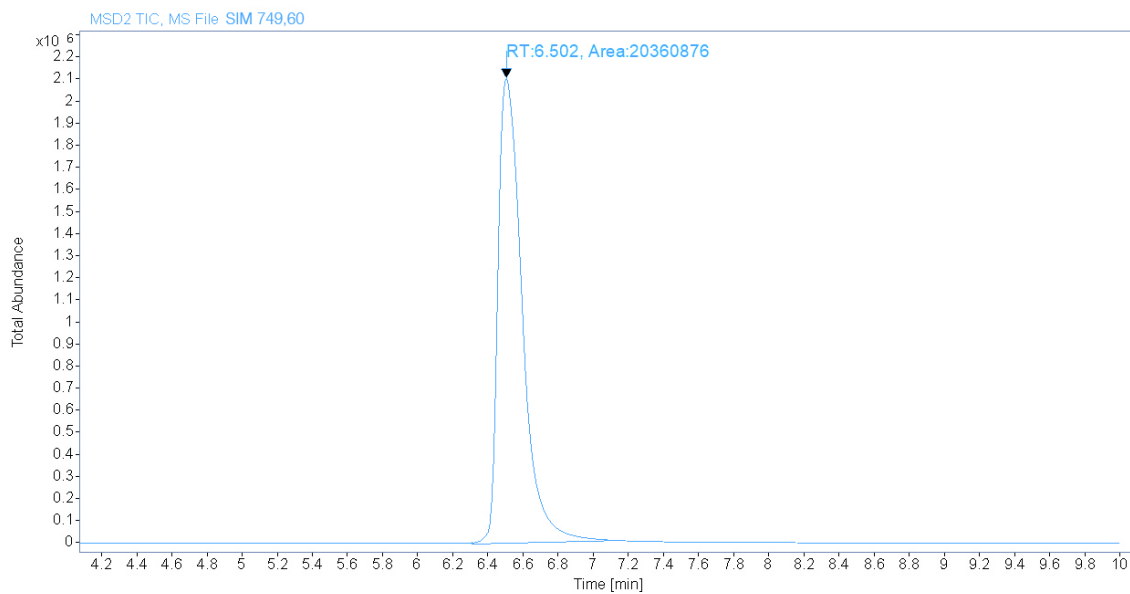
Obrázek 62: Chromatogram pro analýzu vlivu nastříkovaného objemu: STD 5  $\mu$ l (75 ng) SIM m/z 749,60



Obrázek 63: Chromatogram pro analýzu vlivu nastříkovaného objemu: STD 7,5  $\mu$ l (112,5 ng) SIM m/z 749,60



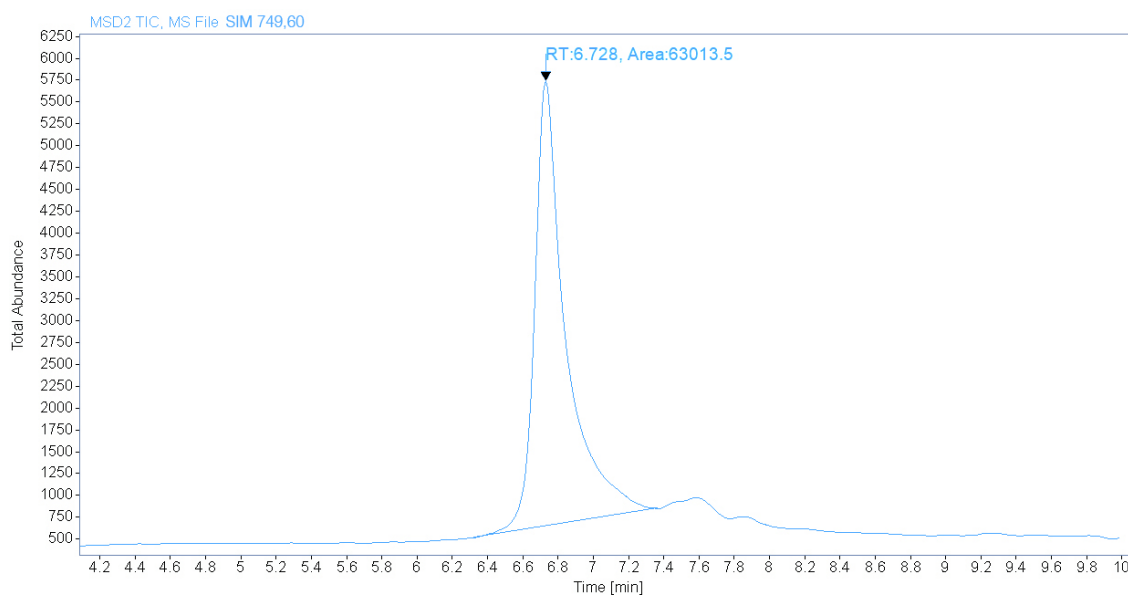
Obrázek 64: Chromatogram pro analýzu vlivu nastříkovaného objemu: STD 10  $\mu$ l (150 ng) SIM m/z 749,60



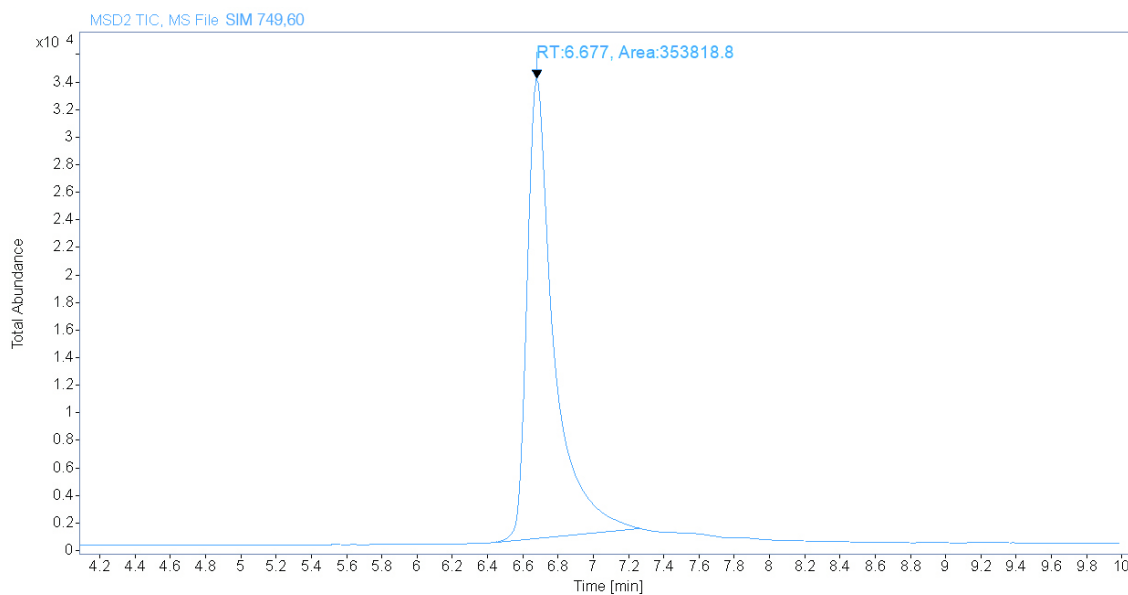
Obrázek 65: Chromatogram pro analýzu vlivu nastříkovaného objemu: STD 25  $\mu$ l (375 ng) SIM m/z 749,60



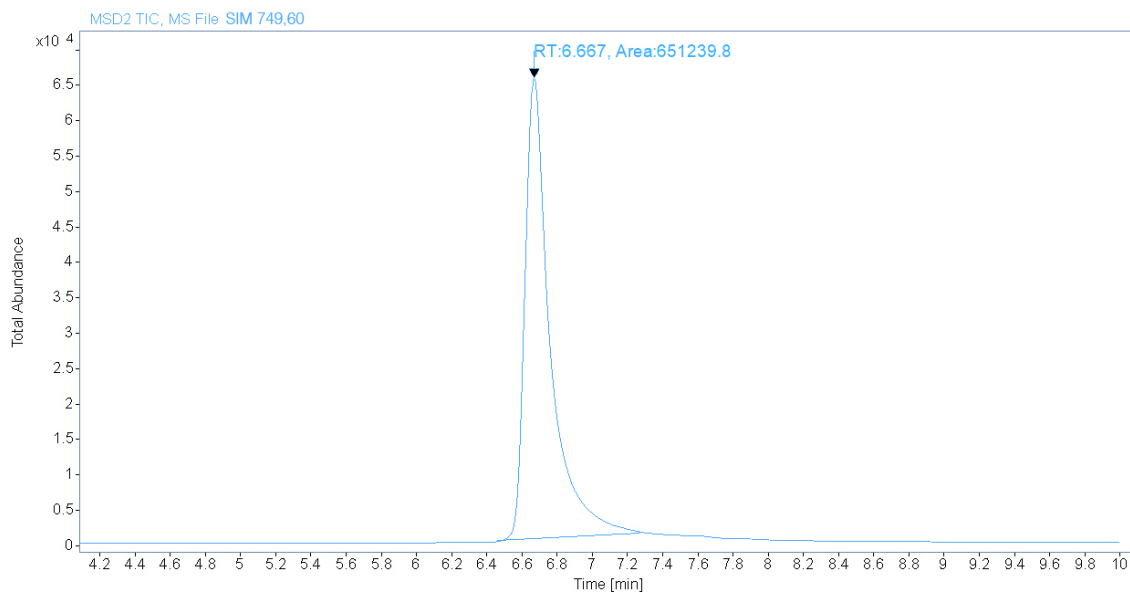
## Příloha 8 LC-MS analýza – kalibrace s novým standardem



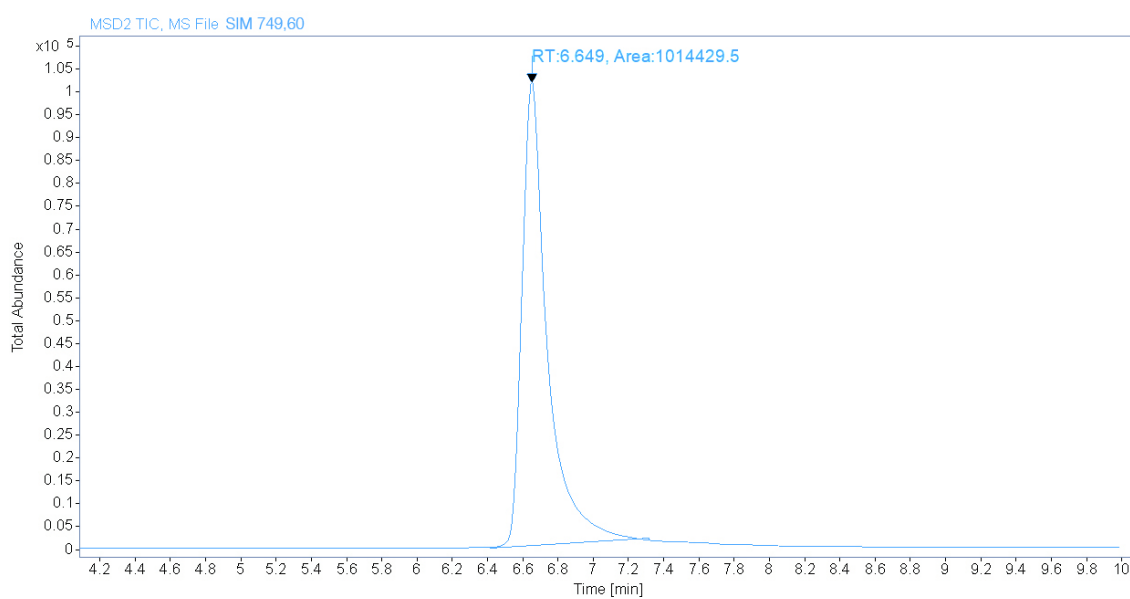
Obrázek 66: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: Blank SIM m/z 749,60



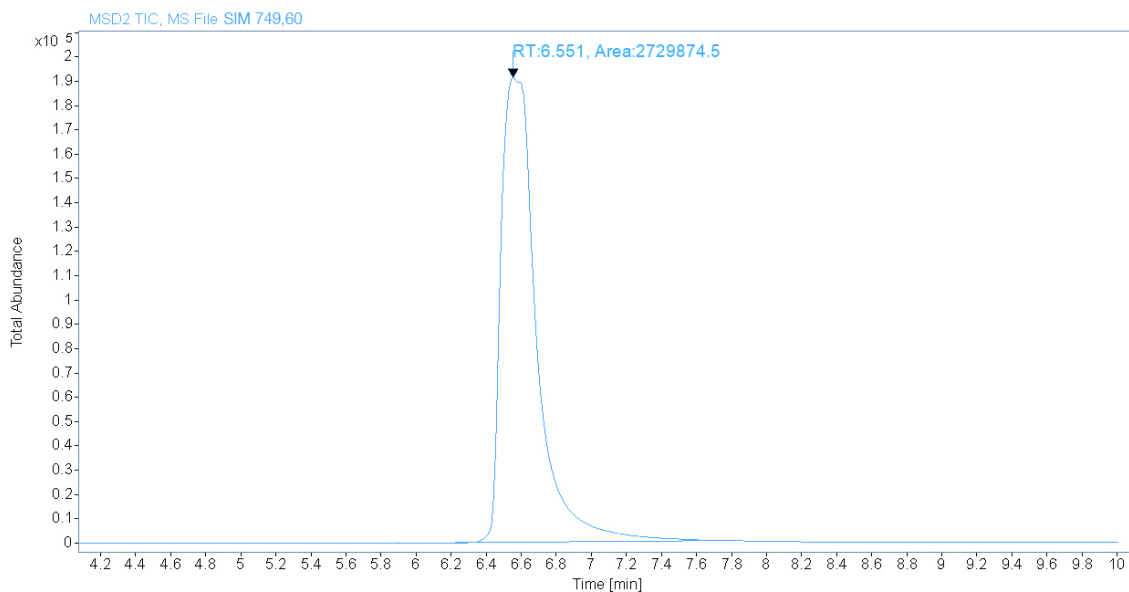
Obrázek 67: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: Nový STD (10 ng) SIM m/z 749,60



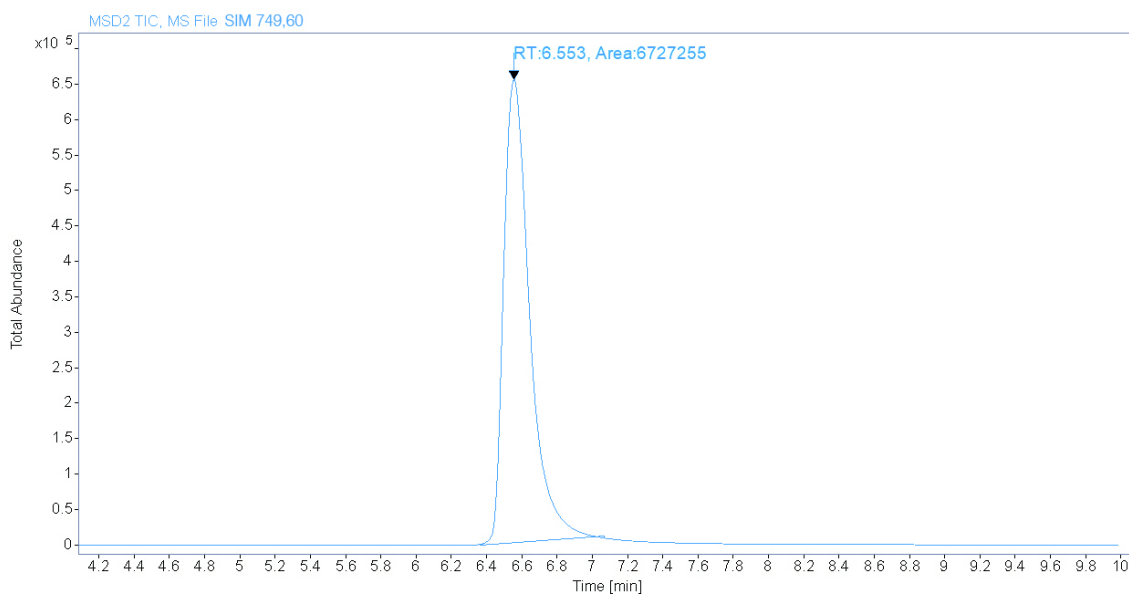
Obrázek 68: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: Nový STD (15 ng) SIM m/z 749,60



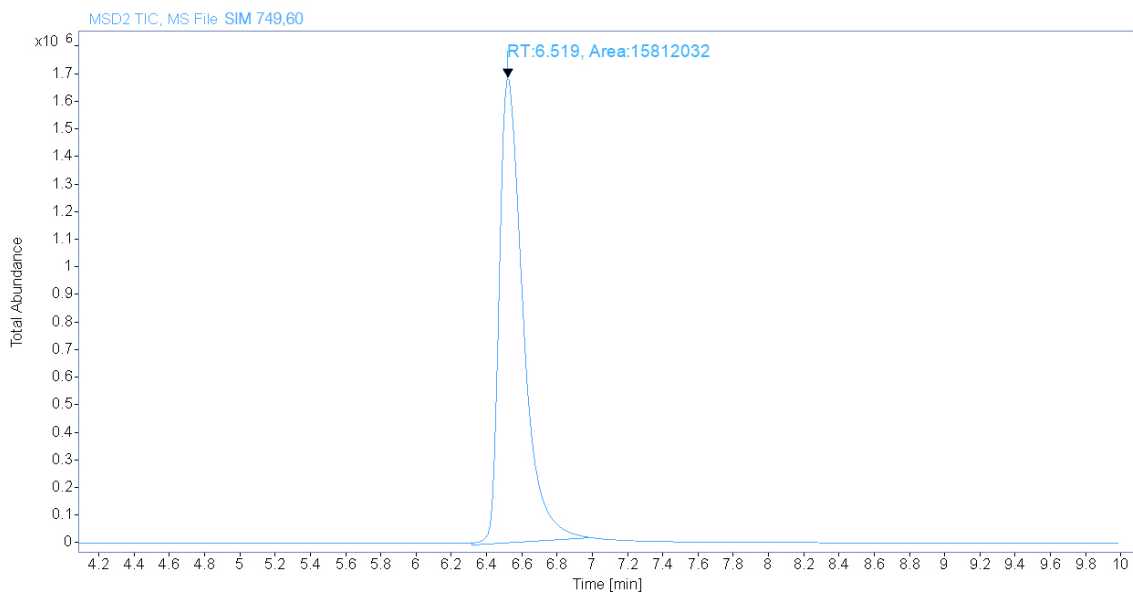
Obrázek 69: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: Nový STD (25 ng) SIM m/z 749,60



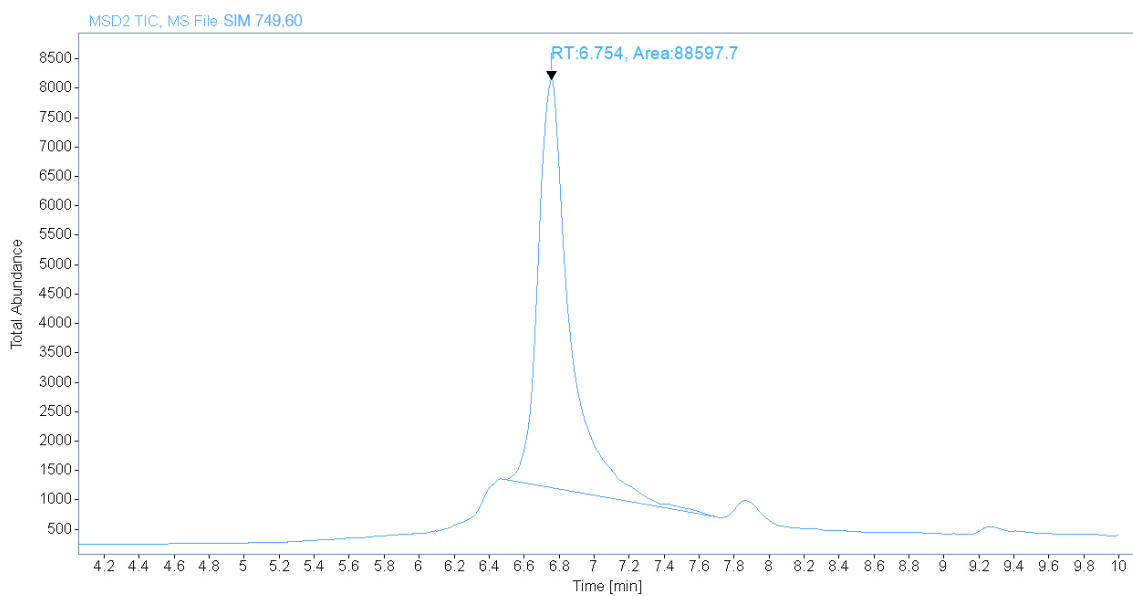
Obrázek 70: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: Nový STD (50 ng) SIM m/z 749,60



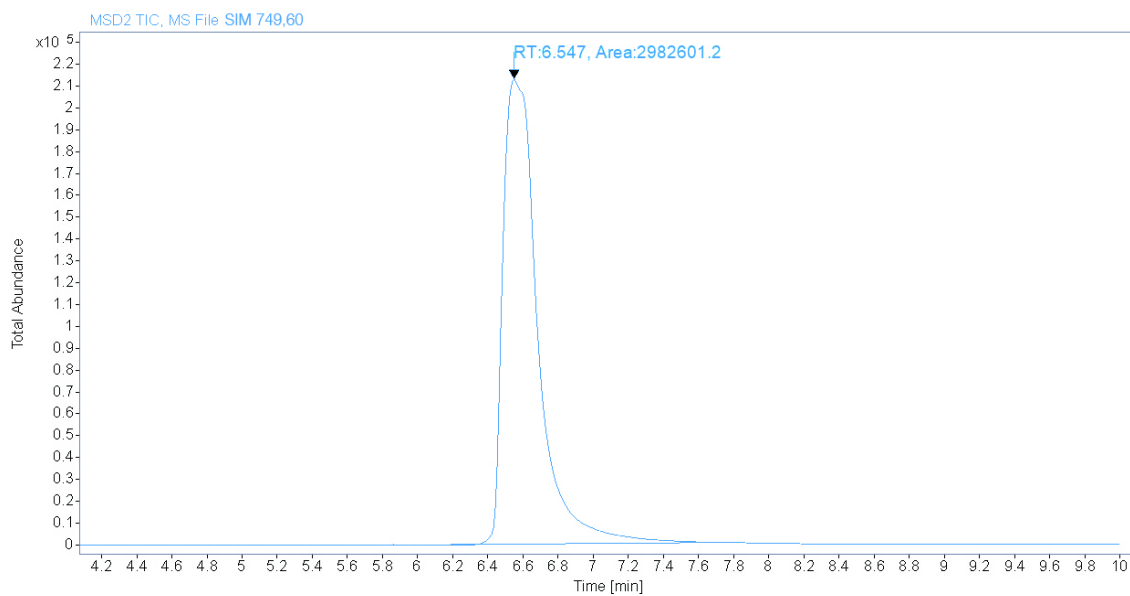
Obrázek 71: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: Nový STD (100 ng) SIM m/z 749,60



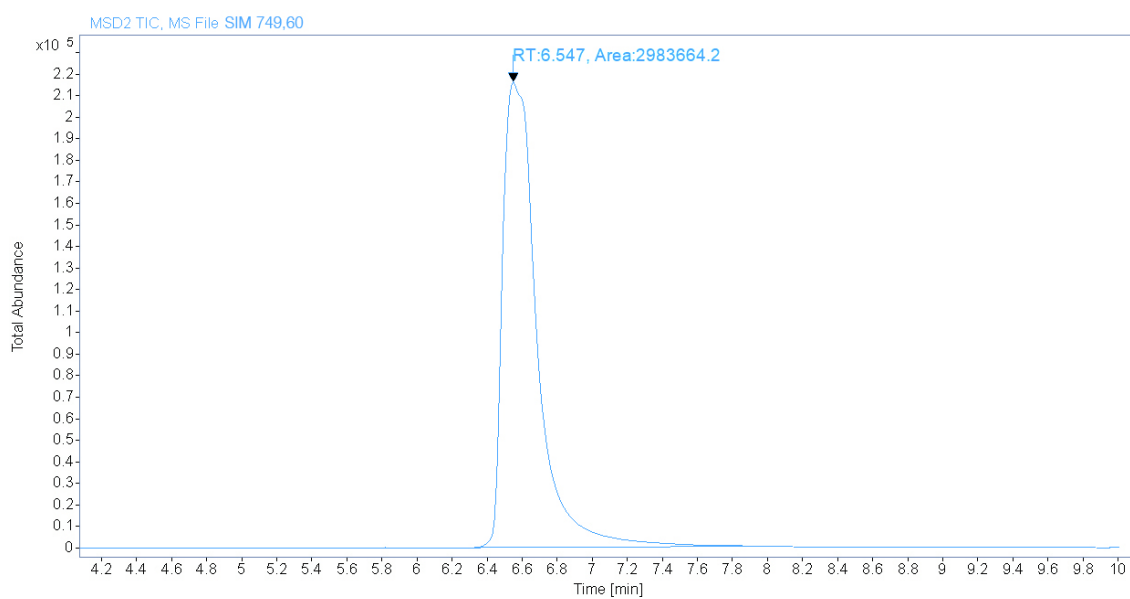
Obrázek 72: Chromatogram pro měření kalibrační křivky: Nový STD (250 ng) SIM m/z 749,60



Obrázek 73: Chromatogram pro ověření nastříkovaného množství: Blank SIM m/z 749,60

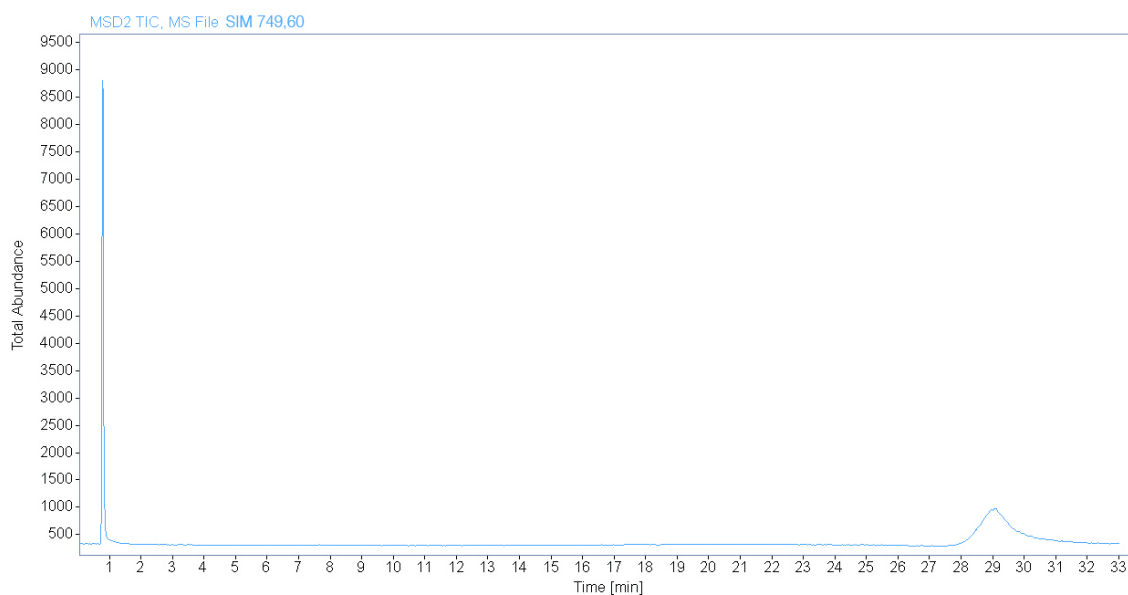


Obrázek 74: Chromatogram pro ověření nastříkovaného množství: Nový STD (50 ng) SIM m/z 749,60

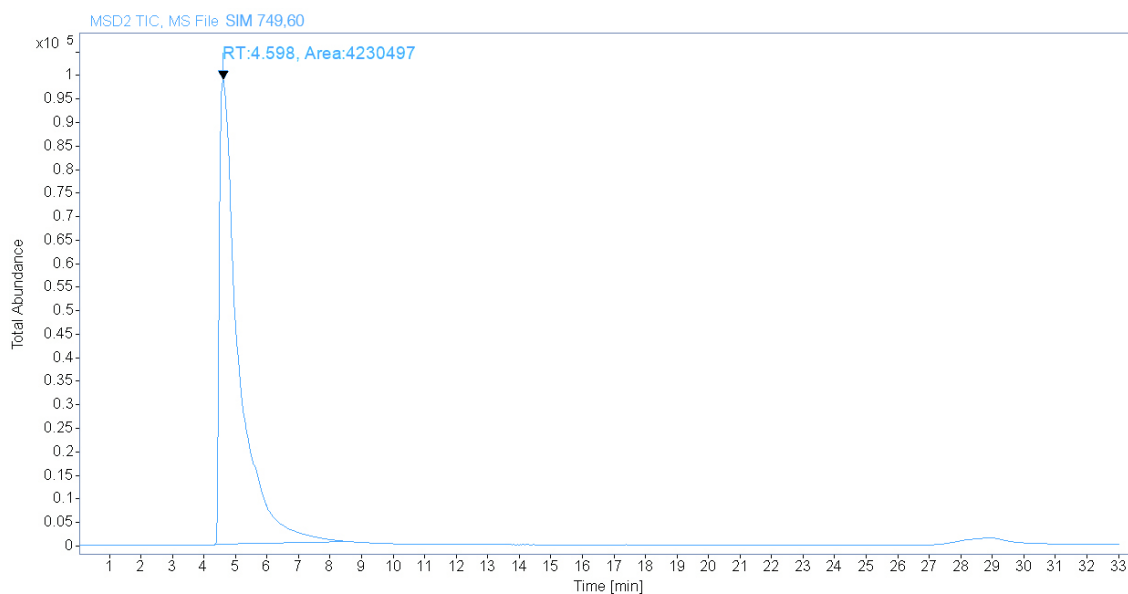


Obrázek 75: Chromatogram pro ověření nastříkovaného množství: Nový STD (50 ng 2. nástřik) SIM m/z 749,60

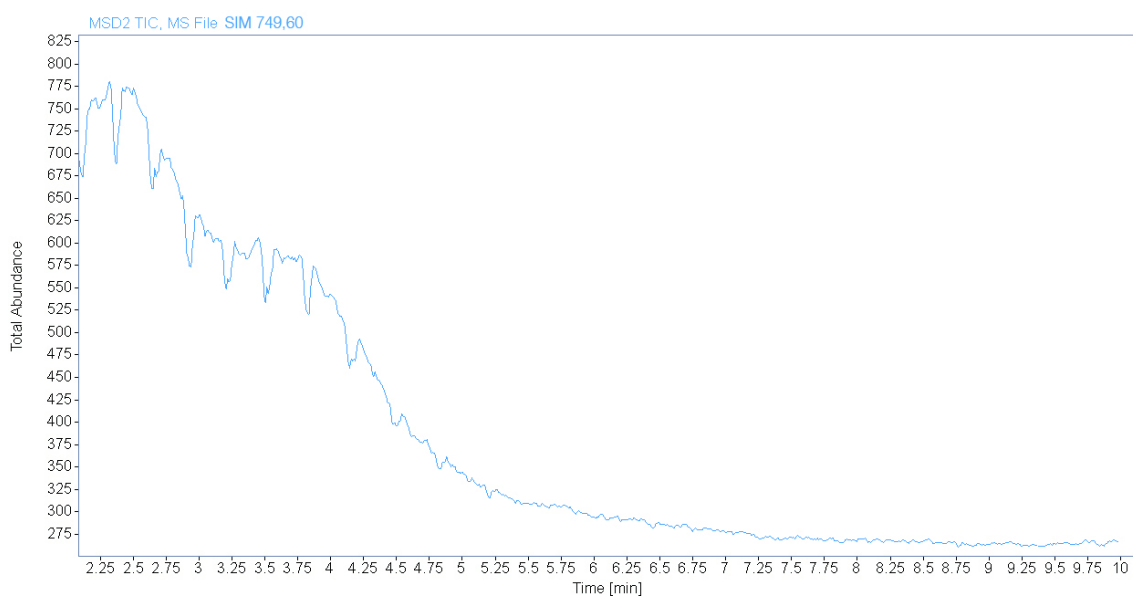
## Příloha 9 LC-MS zapojení preparativní kolony a sběru frakcí



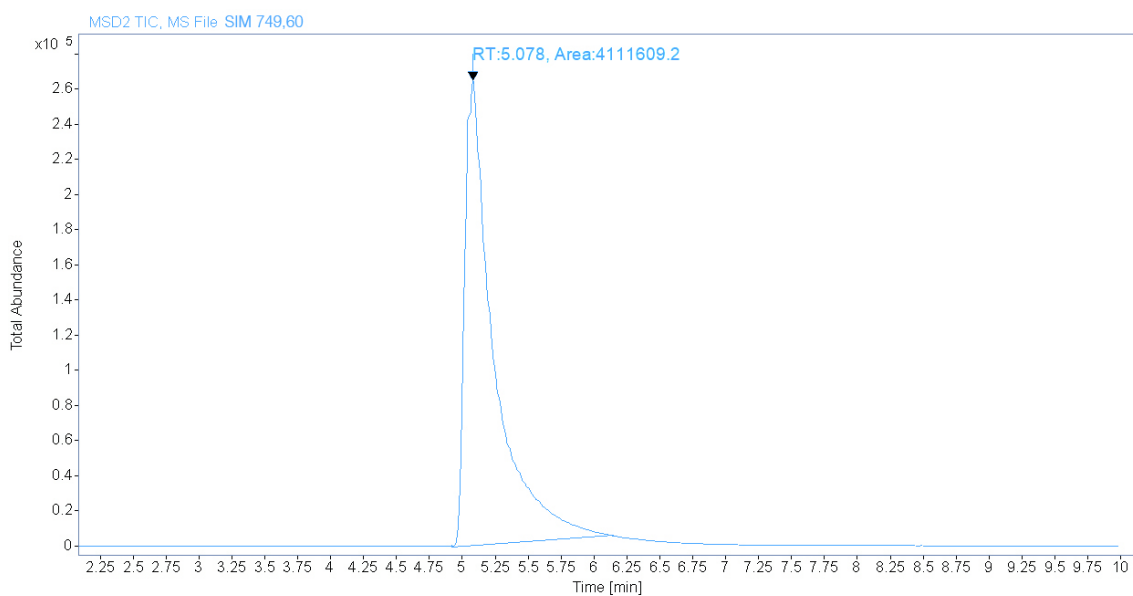
Obrázek 76: Chromatogram pro pilotní analýzu pomocí preparativní kolony: Blank SIM m/z 749,60



Obrázek 77: Chromatogram pro pilotní analýzu pomocí preparativní kolony: STD (8 000 ng) SIM m/z 749,60

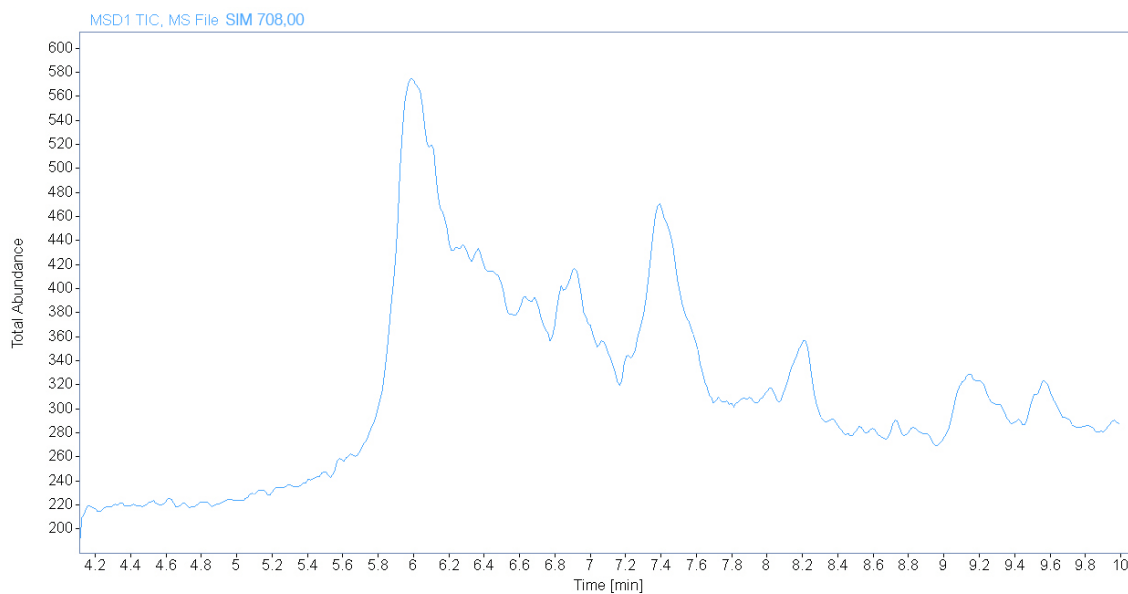


Obrázek 78: Chromatogram pro purifikaci pomocí preparaticí kolony: Blank SIM  $m/z$  749,60

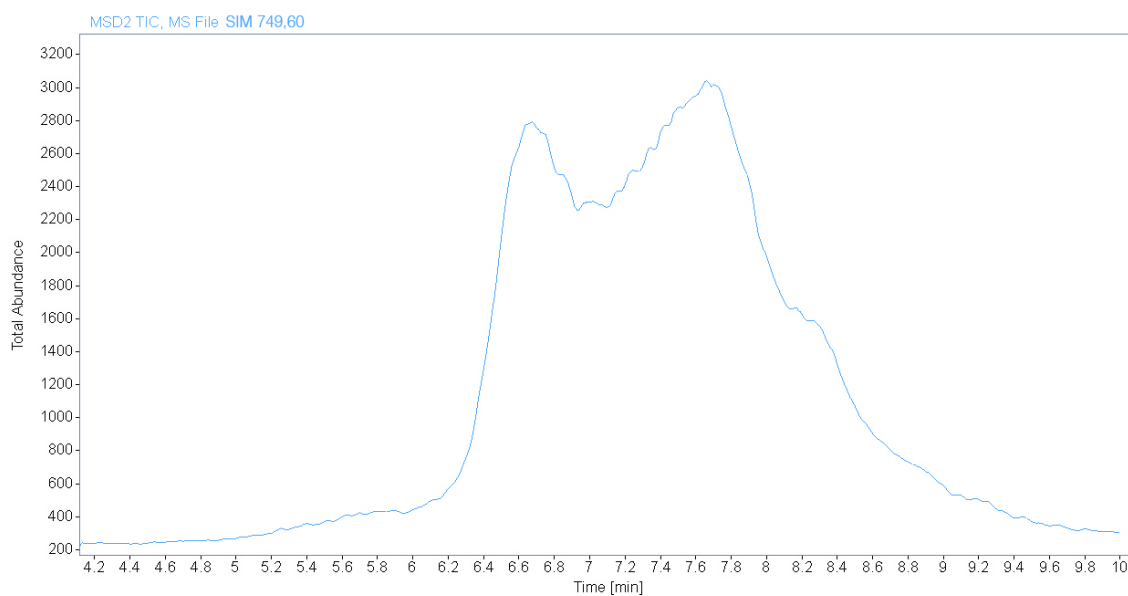


Obrázek 79: Chromatogram pro purifikaci pomocí preparaticí kolony: STD (4 000 ng) SIM  $m/z$  749,60

## Příloha 10 Porovnání účinnosti LPLC a FPLC afinitní purifikace

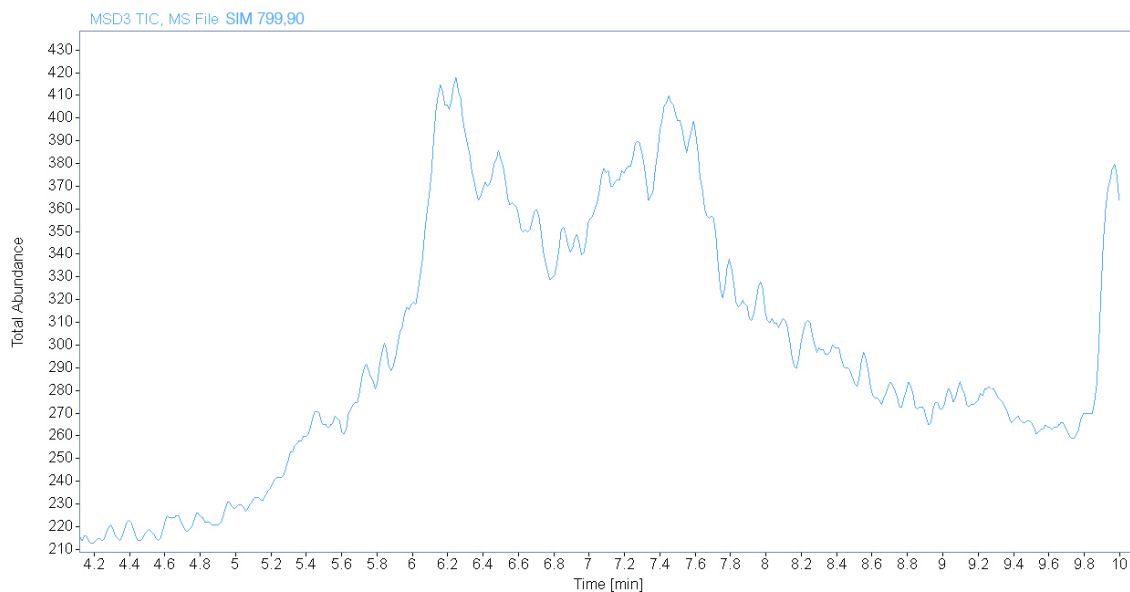


Obrázek 80: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Blank SIM m/z 708,00

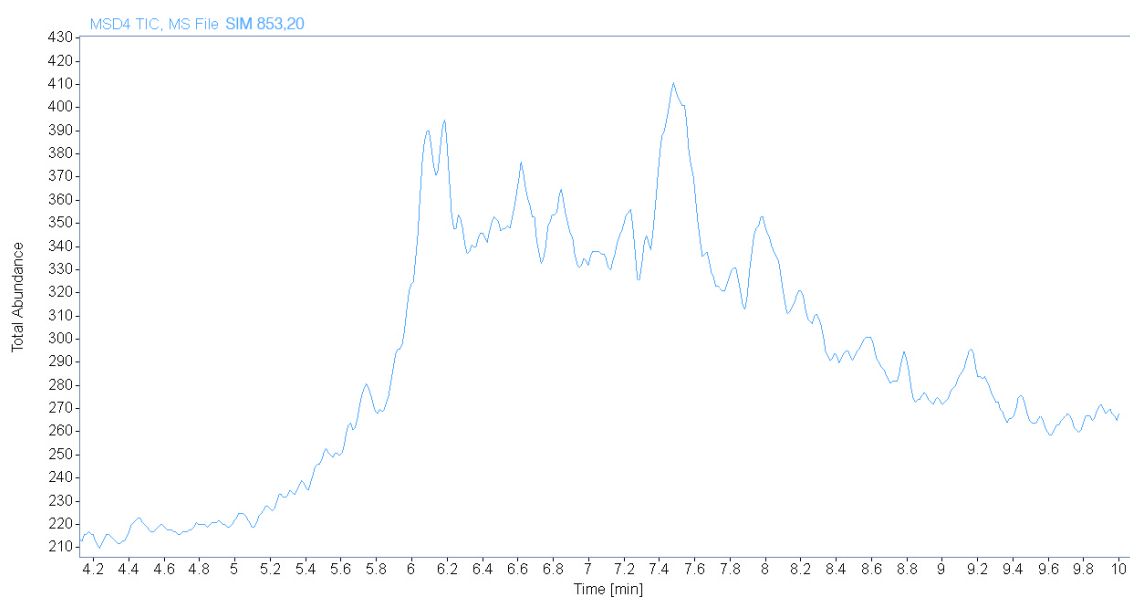


Obrázek 81: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Blank SIM m/z 749,60

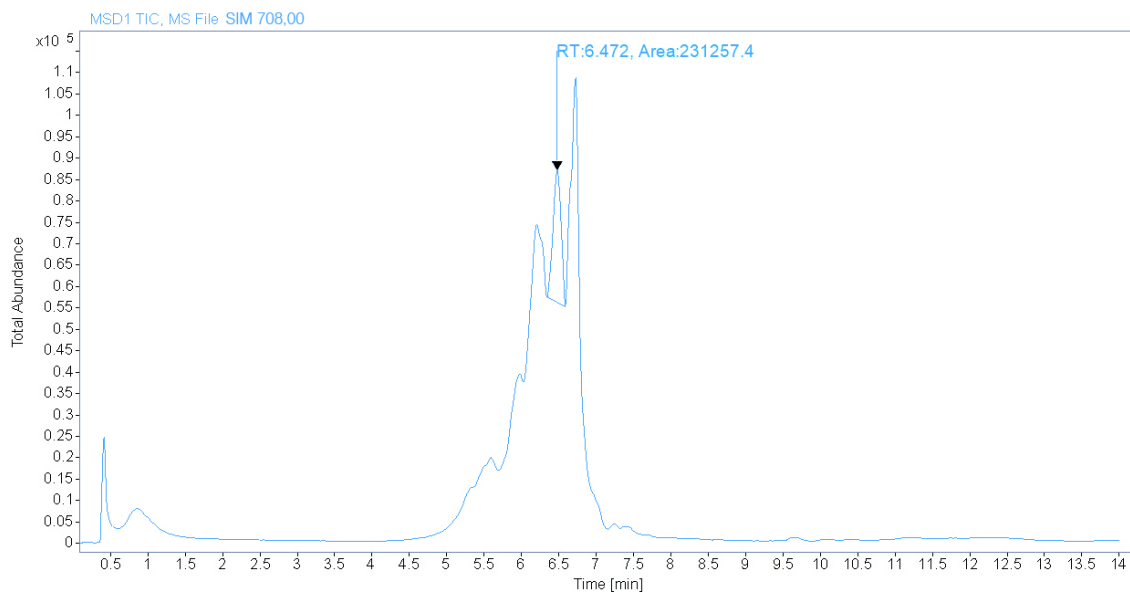




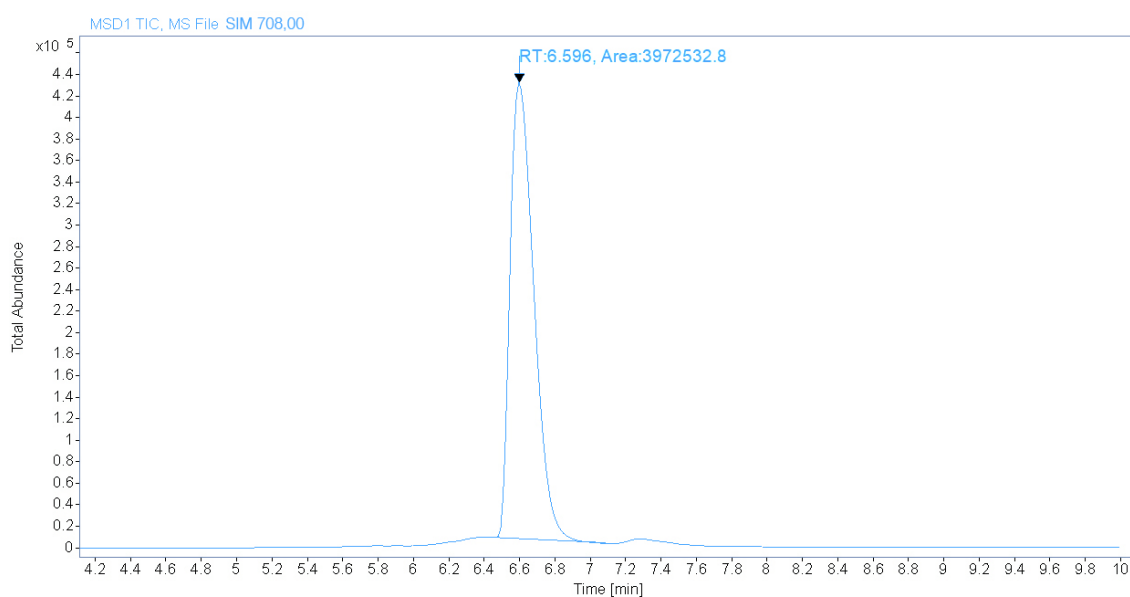
Obrázek 82: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Blank SIM m/z 799,90



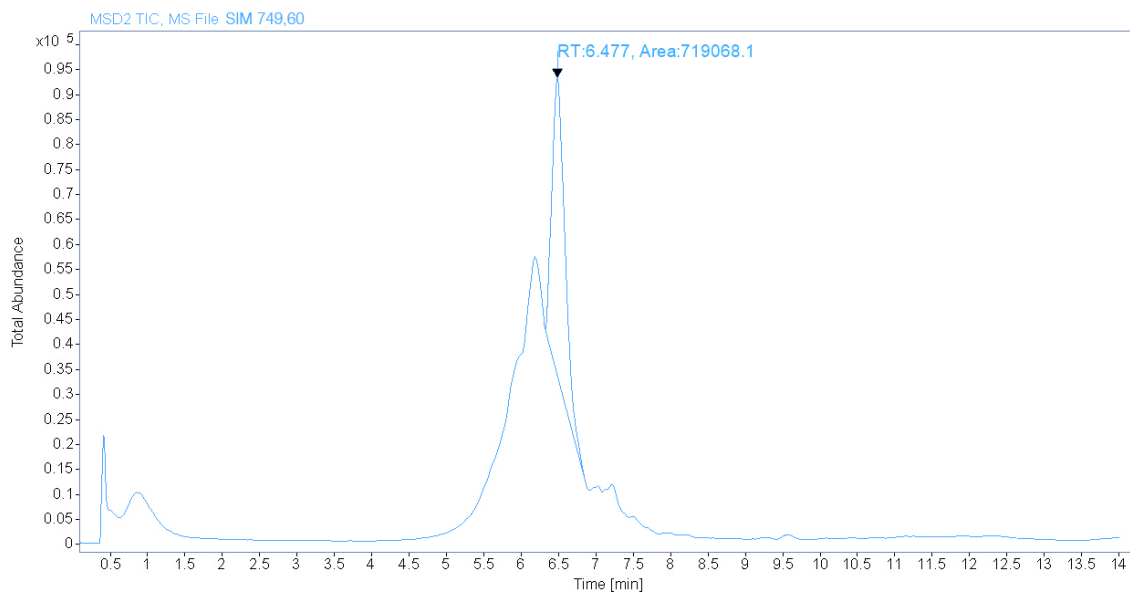
Obrázek 83: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Blank SIM m/z 853,20



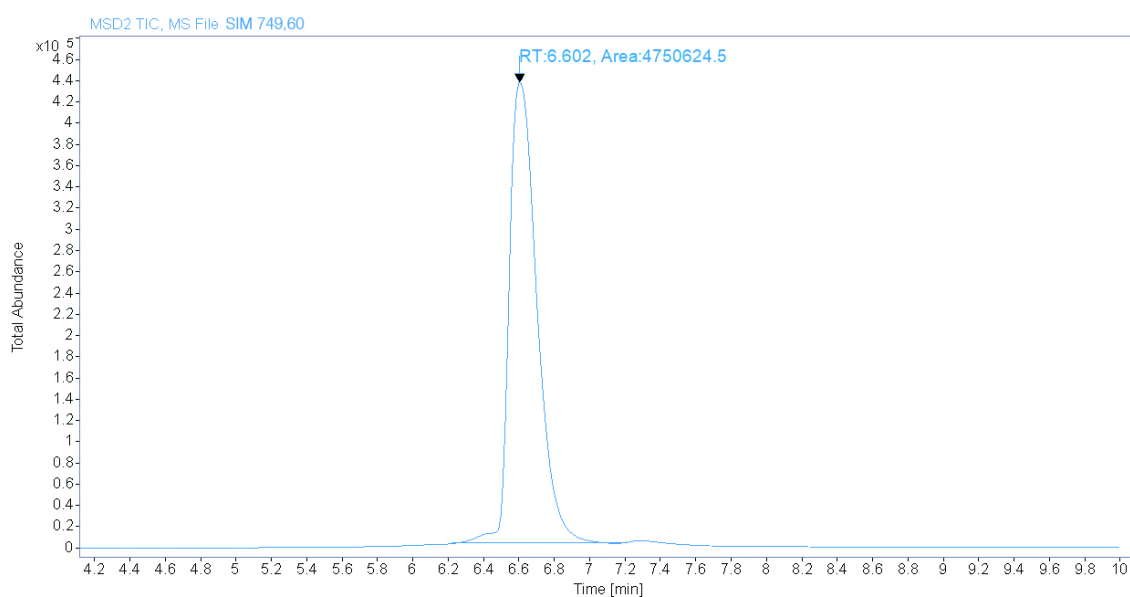
Obrázek 84: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Afinitní purifikace LPLC SIM m/z 708,00



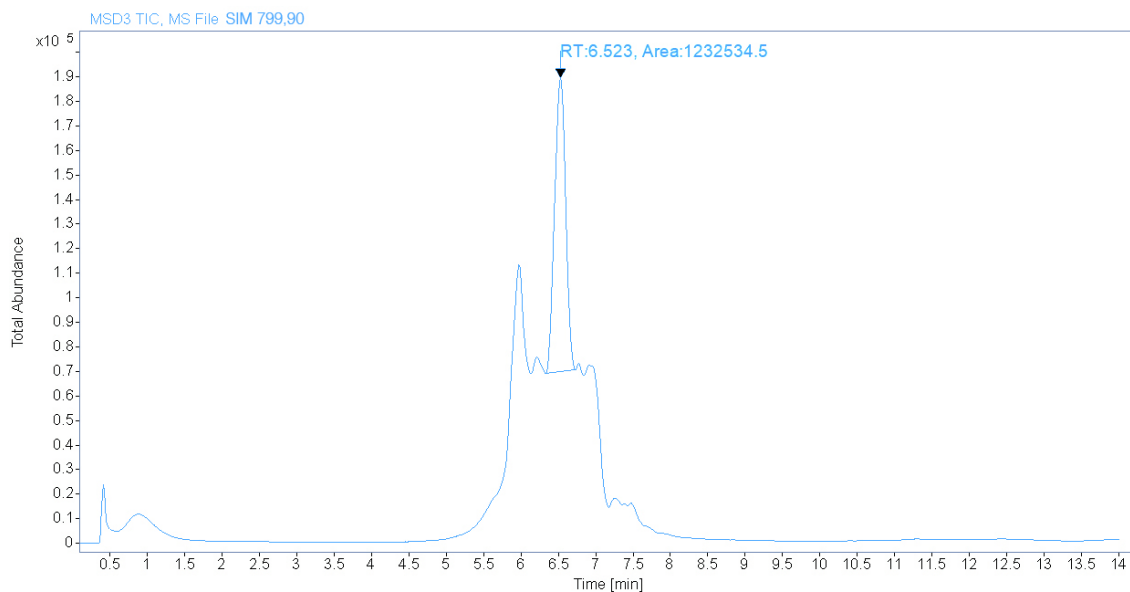
Obrázek 85: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Afinitní purifikace FPLC SIM m/z 708,00



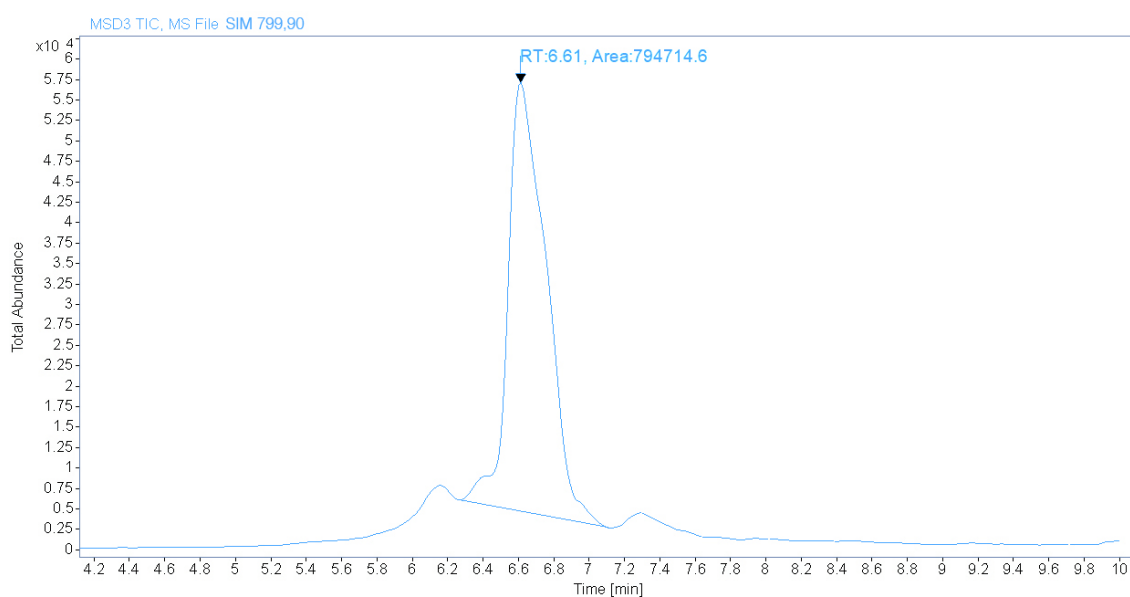
Obrázek 86: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Afinitní purifikace **LPLC** SIM m/z 749,60



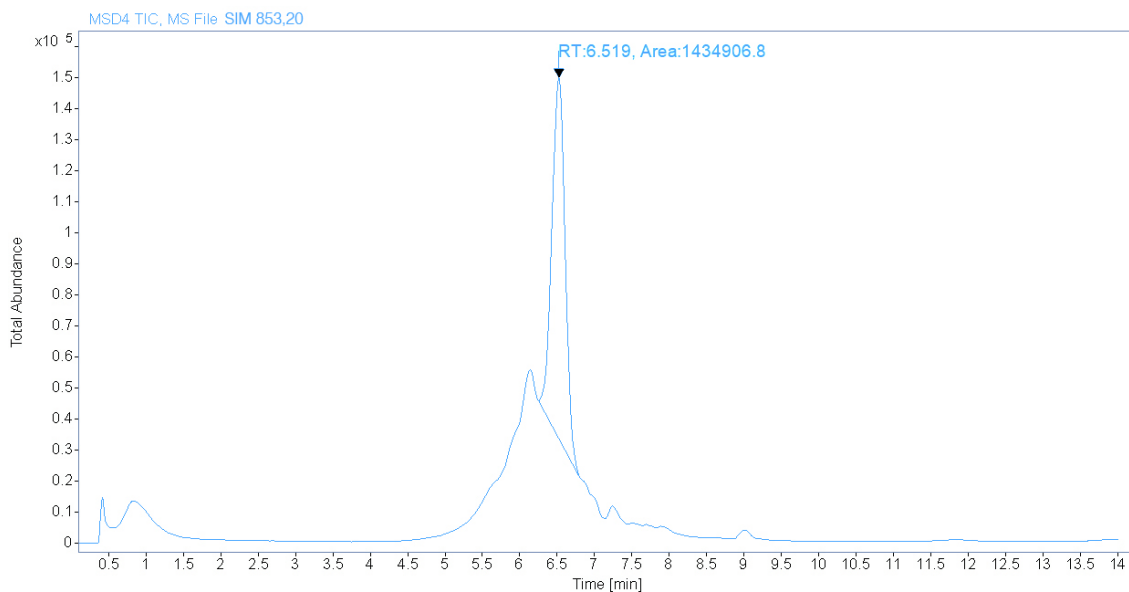
Obrázek 87: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Afinitní purifikace **FPLC** SIM m/z 749,60



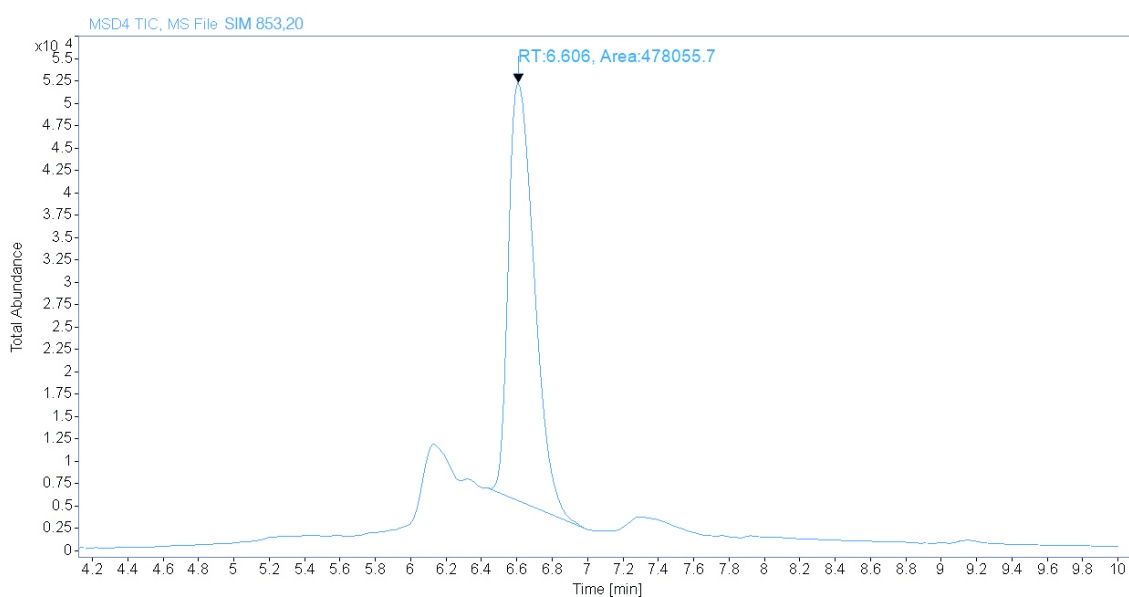
Obrázek 88: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Afinitní purifikace LPLC SIM m/z 799,90



Obrázek 89: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Afinitní purifikace FPLC SIM m/z 799,90

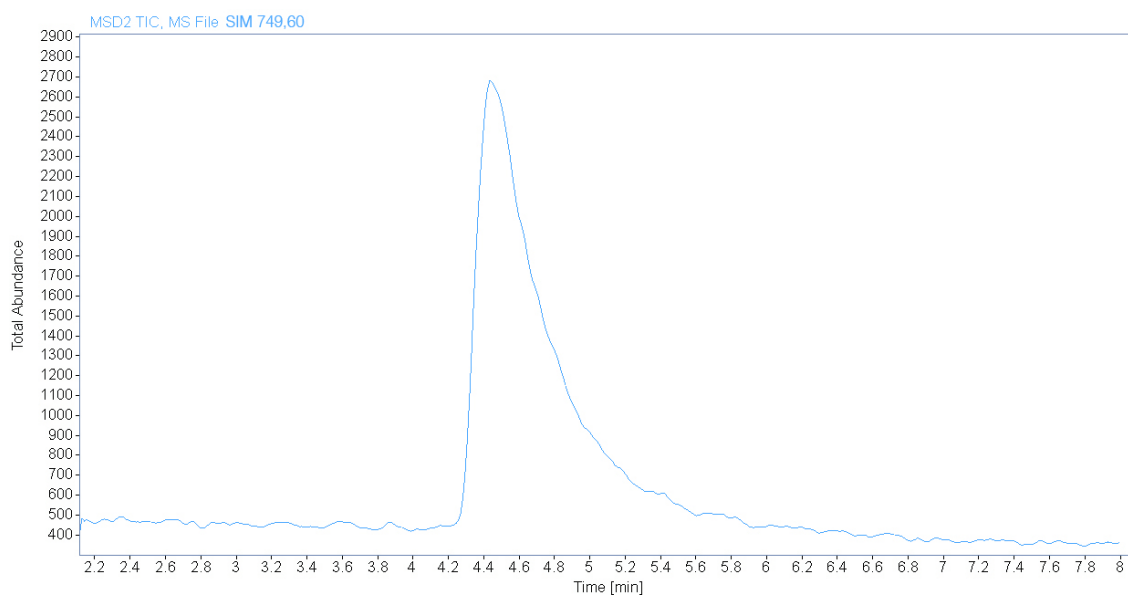


Obrázek 90: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Afinitní purifikace LPLC SIM m/z 853,20

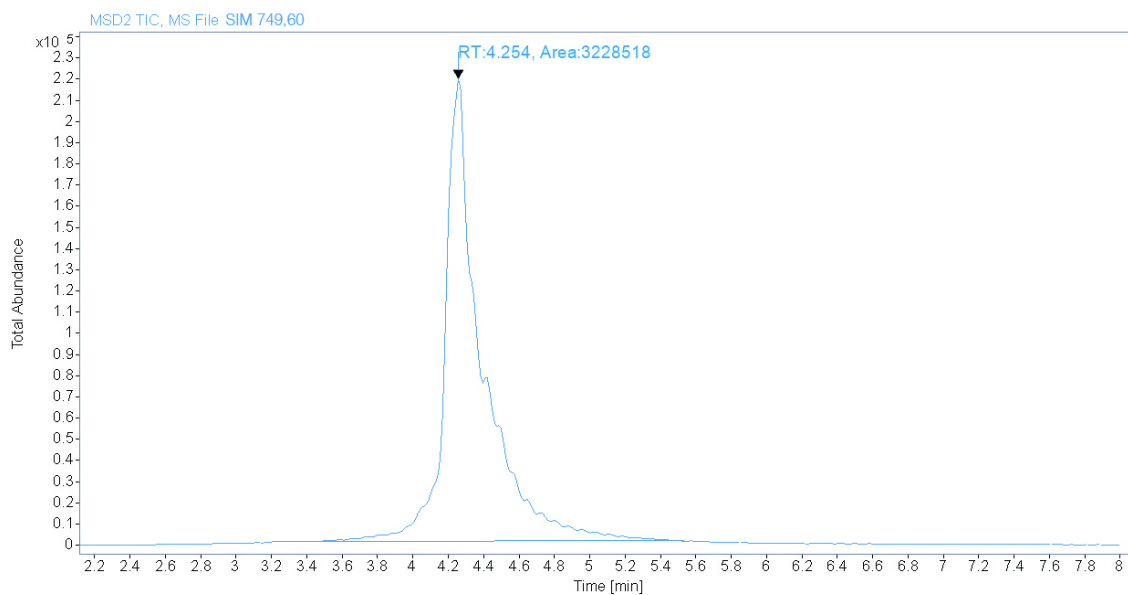


Obrázek 91: Porovnání účinnosti LPLC a FPLC: Afinitní purifikace FPLC SIM m/z 853,20

## Příloha 11 Purifikace bakteriálních vzorků po FPLC na preparativní koloně

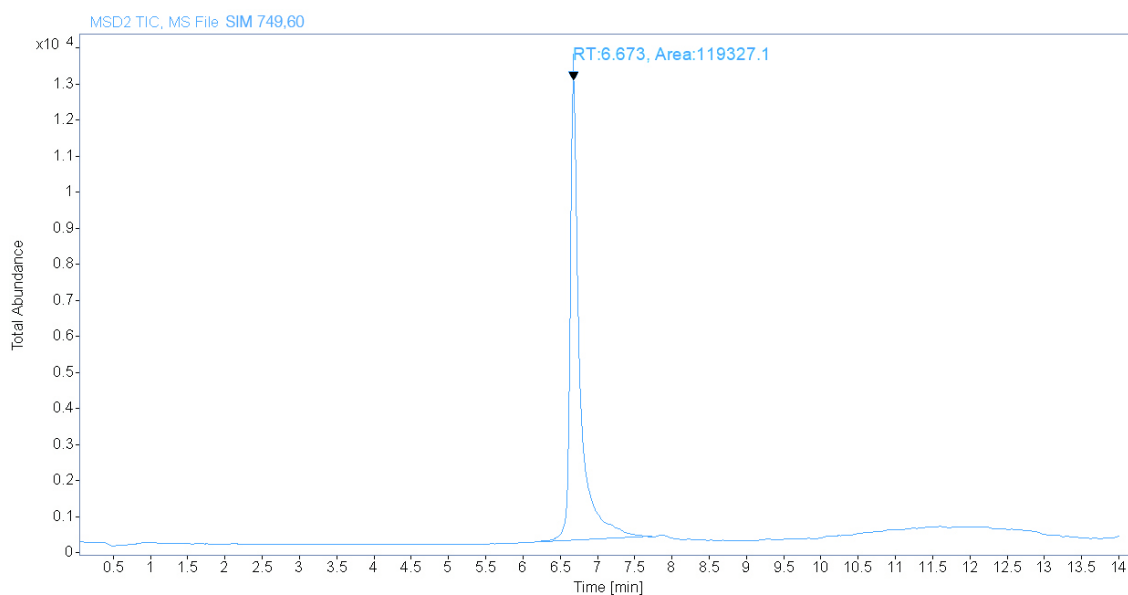


Obrázek 92: Purifikace vzorků z FPLC preparativní kolonou: Blank SIM m/z 749,60

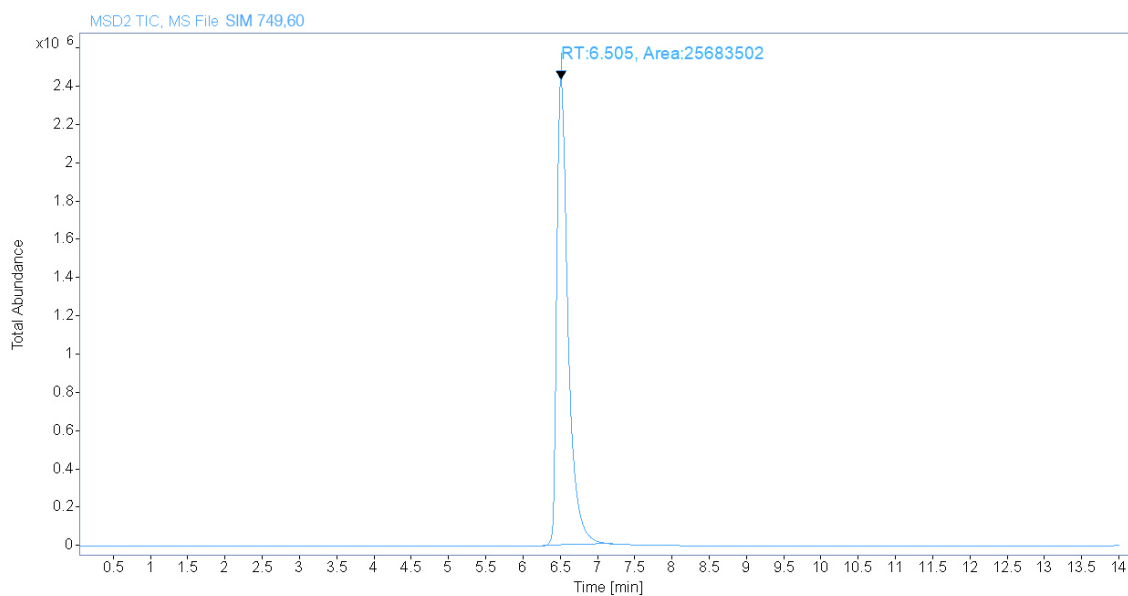


Obrázek 93: Purifikace vzorků z FPLC preparativní kolonou: PS-LL-37 SIM m/z 749,60

## Příloha 12 Analýza purifikovaných vzorků pomocí semipreparativní kolony



Obrázek 94: Analýza vzorků po purifikaci preparativní kolonou pomocí analytické kolony: Blank SIM m/z 749,60



Obrázek 95: Analýza vzorků po purifikaci preparativní kolonou pomocí analytické kolony: PS-LL-37 SIM m/z 749,60