

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Katedra:

Rostlinné výroby a agroekologie

Studijní obor:

Zemědělské biotechnologie

Téma bakalářské práce:

**ROSTLINNÉ PEPTIDY A PROTEINY S ANTIMIKROBIÁLNÍ
AKTIVITOU A MOŽNOSTI JEJICH VYUŽITÍ**

Autor bakalářské práce:

František Lorenc

Vedoucí práce:

doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

2011

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **František LORENC**
Osobní číslo: **Z08441**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Rostlinné peptidy a proteiny s antimikrobiální aktivitou
a možnosti jejich využití**
Zadávací katedra: **Katedra rostlinné výroby a agroekologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Bakalářská práce bude zpracována formou literárního přehledu na téma "Rostlinné peptidy a proteiny s antimikrobiální aktivitou a možnosti jejich využití". V první fázi řešení práce bude úlohou autora shromáždit dostupné informace na dané téma prostřednictvím přístupných literárních zdrojů - např. knihovní fond ČR, mezinárodní elektronické databáze vědeckých publikací (Web of Science, Scopus aj.), on-line vědecké časopisy s volným přístupem atd. V dalších fázích budou získané informace o rostlinných peptidech a proteinech s antimikrobiální aktivitou utříděny a zpracovány do vlastního textu, který čtenáři poskytne přehled:

- 1) o základním členění či klasifikaci těchto peptidů či proteinů;
- 2) o jejich chemické struktuře a biosyntéze (expresi) v rostlinách;
- 3) o aktuálním stavu jejich výzkumu či vývoje;
- 4) o jejich teoretickém, praktickém či uvažovaném využití v biotechnologických, farmaceutických, potravinářských či jiných aplikacích.

V závěru práce bude prezentováno vlastní hodnocení a názory autora na stav problematiky výzkumu uvedených látek a perspektivu možností jejich využití. Práce bude doplněna kompletním seznamem použitých literárních zdrojů.

Rozsah grafických prací: 10 stran
Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- Bárta J., Čurn V. (2004): Bílkoviny hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* L.) - klasifikace, charakteristika, význam. Chemické listy 98: 373-378
Heřmanová V., Bárta J., Čurn V. (2006): Antifungální proteiny rostlin - klasifikace, charakteristika, možnosti využití. Chem. Listy 100: 495-500
Neubauerová T., Macková M., Macek T., Koutek B. (2009): Kationické antimikrobiální peptidy. Chem. Listy 103: 460-468
Mehta A., Brasileiro A. C. M., Souza D. S. L., Romano E., Campos M. A., Grossi-de-Sá M. F., Silva M. S., Franco O. L., Fragoso R. R., Bevitori R., Rocha T. L. (2008): Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? FEBS Journal 275: 3731-3746
Castro M. S., Fontes W. (2005): Plant Defense and Antimicrobial Peptides. Protein and Peptide Letters, 12: 11-16
Databáze Web of Science, Scopus a další dostupné databázové zdroje.

Vedoucí bakalářské práce: doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Konzultant bakalářské práce: Ing. Veronika Bártová, Ph.D.
Katedra rostlinné výroby a agroekologie
Datum zadání bakalářské práce: 25. února 2010
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2011

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Milošlav Šoch, CSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 25. února 2010

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury, uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

11. dubna 2011

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Janu Bártovi, Ph.D. za rady a doporučení při psaní této práce.

Abstrakt

Tato práce pojednává o rostlinných antimikrobiálních peptidech a proteinech. Antimikrobiální peptidy tvoří jednu ze součástí nespecifické imunity většiny eukaryotických i prokaryotických organismů. Jejich hlavní funkcí je eliminovat útoky mikrobiálních patogenů, kterým jsou cílové organismy vystavovány. Obvykle se jedná o proteiny s nízkou molekulovou hmotností. Většina rostlinných antimikrobiálních peptidů spadá do skupiny PR proteinů, nebo-li proteinů spojených s patogenezí. Díky svým antimikrobiálním účinkům mají velký potenciál ve farmaceutickém průmyslu, lékařství a biotechnologiích nebo v ochraně proti rostlinným chorobám a další využití. Cílem této práce je popsat základní rozdělení rostlinných antimikrobiálních peptidů a proteinů, mechanismy jejich antimikrobiálního působení a nastínit charakteristiku základních skupin PR proteinů. V závěru práce je popsán výzkum a využití těchto látek v současnosti a možnosti jejich využití v budoucnosti.

Klíčová slova: peptidy, antimikrobiální peptidy, antimikrobiální proteiny, PR-proteiny

Abstract

This work deals with antimicrobial peptides and proteins in plants. Antimicrobial peptides form one part of non-specific immunity most eukaryotic and prokaryotic organisms. Their primary function is to eliminate the attacks of microbial pathogens, by which are the target organisms exposed. These proteins have low molecular weight. Most of them form a group of PR (Pathogenesis-related) proteins. Thanks to their antimicrobial effects have the antimicrobial peptides and proteins a great potential in pharmaceutical industry, medicine and biotechnology or in protection against plant diseases and also in other applications. The aim of this work is to describe the primary fission of plant antimicrobial peptides and proteins, the mechanisms of their antimicrobial action and characteristics of the main groups of PR-proteins. In the end of this work is described the current research and applications and potential uses in the future.

Key words: peptides, antimicrobial peptides, antimicrobial proteins, PR-proteins

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. PEPTIDY A PROTEINY	11
2.1 Struktura polypeptidů a proteinů.....	12
2.2 Biosyntéza proteinů.....	12
2.2.1 Replikace.....	12
2.2.2 Transkripce.....	13
2.2.3 Translace	13
3. ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY A PROTEINY	15
3.1 Výskyt antimikrobiálních peptidů.....	15
3.1.1 Výskyt u prokaryot.....	16
3.1.2 Výskyt u eukaryot	16
3.1.3 Výskyt u hub	16
3.1.4 Výskyt u živočichů.....	17
3.1.5 Výskyt u rostlin	18
3.2 Rozdělení antimikrobiálních peptidů	18
3.2.1 Kationické antimikrobiální peptidy	18
3.2.2 Anionické antimikrobiální peptidy	19
3.3 Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů.....	19
3.3.1 Antibakteriální působení	19
3.3.2 Antivirové působení	22
3.3.3 Antifungální působení.....	23
4. ROSTLINNÉ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY A PROTEINY	24
4.1 PR proteiny	24
4.1.1 PR-1 proteiny	25
4.1.2 PR-2 proteiny (β -glukanasy)	26
4.1.3 PR-3 proteiny (chitinasy)	26
4.1.4 PR-4 proteiny (chitinasy)	27
4.1.5 PR-5 proteiny (proteiny podobné thaumatinu)	27
4.1.6 PR-6 proteiny (inhibitory proteas)	28
4.1.7 PR-9 proteiny (rostlinné peroxidasy a peroxidasam podobné proteiny).....	28

4.1.8 PR-10 proteiny (proteiny podobné ribonukleasam).....	29
4.1.9 PR-13 proteiny (thioniny)	29
4.1.10 γ - Thioniny	30
4.1.11 PR-12 proteiny (defensiny).....	30
4.1.12 Proteiny podobné cyklofilinu	31
4.1.13 PR-14 proteiny (proteiny přenosu lipidů)	31
4.1.14 PR-15 proteiny (germinům podobné proteiny)	32
4.2 Ostatní antimikrobiální peptidy a proteiny	32
4.2.1 Proteiny inaktivující ribozomy.....	32
5. VÝZKUM A VYUŽITÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ A PROTEINŮ	34
5.1 Využití antimikrobiálních peptidů a proteinů v lékařství a farmacii	34
5.1.1 Využití defensinů a γ -thioninů	35
5.1.2 Využití proteinů inaktivující ribozomy	36
5.2 Využití antimikrobiálních peptidů v zemědělství a biotechnologiích	36
5.2.1 Využití defensinů a γ -thioninů	36
5.2.2 Syntetické peptidy	38
5.3 Ostatní využití rostlinných antimikrobiálních peptidů a proteinů.....	38
6. DISKUZE A ZÁVĚR.....	40
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42

1. ÚVOD

První zmínky o antimikrobiálních látkách pochází již z konce 19. století. Přestože lidé v té době nemohli analyzovat tyto konkrétní látky, díky prostému pozorování zjistili jejich přítomnost. První výrazný posun na poli výzkumu antimikrobiálních látek byl proveden v roce 1921, kdy sir Alexander Fleming objevil enzym lysozym, který se vyskytuje například v krvi nebo mateřském mléce, a u kterého se prokázaly silné antibakteriální účinky (Johnson and Larson, 2005). Jeho úspěch pokračoval v roce 1929, kdy zveřejnil objev prvního antibiotika – penicilinu (Neubauerová *et al.*, 2009). Výzkum antimikrobiálních peptidů (zkr. AMPs) se naplno začal rozvíjet až v druhé polovině 20. století. Do dnešního dne byly objeveny a zařazeny již stovky antimikrobiálních peptidů a proteinů a stále jsou objevovány nové. Základní údaje, klasifikace a počty antimikrobiálních peptidů shromažďuje například Databáze antimikrobiálních peptidů (anglicky Antimicrobial peptide database, zkr. APD). Antimikrobiální peptidy a proteiny představují většinou látky s nízkou molekulární hmotností a jsou součástí nespecifické imunity organismu. Jsou aktivní proti všem skupinám mikrobiálních patogenů a výjimečně například také proti hád'átkům nebo hmyzu.

Většina rostlinných antimikrobiálních peptidů a proteinů tvoří velký celek nazývaný *Pathogenesis-related proteins*, (v češtině proteiny spojené s patogenezí) složený z jednotlivých skupin, které se dále často dělí do podskupin zahrnující jednotlivé zástupce. Každá skupina se od sebe liší buď rozdílnou strukturou, mechanismem působení nebo svojí specificitou k určitému patogenu. Část těchto proteinů se vyznačuje cytotoxicitou, a proto se za normálního stavu vyskytují v mezibuněčných prostorech. Kromě PR proteinů se mezi rostlinné antimikrobiální proteiny řadí například významná skupina proteinů inaktivující ribozomy.

Rostlinné antimikrobiální peptidy a proteiny se díky svým antimikrobiálním vlastnostem využívají v oblastech, jako je například farmaceutický průmysl, lékařství, biotechnologie nebo zemědělství. Protože se jedná o poměrně nově objevenou skupinu peptidů a rozvoj technologií a molekulárně-biologických metod probíhá velice intenzivně, předpokládá se široké využití těchto látek v budoucnosti, a to zejména v oblasti lékařství a výrobě léků, kde je například velká potřeba hledat alternativy k antibiotikům z důvodu nárůstu bakteriální rezistence. Z těchto důvodů

se jeví skupina antimikrobiálních peptidů jako velice perspektivní v mnoha oblastech technologií a průmyslu.

2. PEPTIDY A PROTEINY

Peptidy a z nich tvořené proteiny jsou základní stavební složkou buněk všech organismů. Představují kolem 15 % nativní hmotnosti buněk. Po vodě jsou nejvíce zastoupenou složkou živých organismů. Molekuly vody tvoří 70 % celkové hmotnosti živých buněk. Proteiny jsou hlavní složkou nejen z hlediska hmotnosti, ale také hrají ve všech buňkách řadu životně důležitých úloh (Snustad a Simons, 2009).

Funkce proteinů se dají rozdělit do 4 základních kategorií. Kromě funkce strukturní se jedná o funkce regulační, kdy proteiny regulují například průběh transkripce, enzymatické, kde enzymy působí jako katalyzátory řady biochemických reakcí a jsou nedílnou součástí metabolických drah všech organismů a transportní, kdy proteiny slouží jako přenašeči různých látek (Clark, 2005).

2.1 Struktura polypeptidů a proteinů

Proteiny se skládají z polypeptidů, které jsou kódované geny, a vznikají pomocí procesu proteosyntézy. Jednotlivé polypeptidy jsou tvořené z dlouhých řetězců aminokyselin, které jsou vzájemně spojeny kovalentní vazbou, která se také nazývá peptidová nebo peptidická. Délka proteinů kolísá od 51 aminokyselin u inzulínu do více než 1000 aminokyselin u fibroinu hedvábní (Snustad & Simons, 2009).

V polypeptidech se běžně nachází 20 různých aminokyselin, tudíž počet sekvencí aminokyselin, které z nich mohou být vytvořeny je obrovský. Například u polypeptidu obsahujícího 50 aminokyselin by to bylo 20^{50} možných sekvencí.

Všechny aminokyseliny s výjimkou prolinu obsahují volnou aminoskupinu a volnou karboxylovou skupinu. Liší se od sebe postranními skupiny označovanými jako Radikál. Tyto postranní řetězce se rozdělují do 4 skupin:

1. hydrofobní, nepolární skupiny
2. hydrofilní, polární skupiny
3. kyselé, negativně nabitě skupiny
4. bazické, pozitivně nabitě skupiny

Různé postranní skupiny a jejich chemická odlišnost odpovídají za obrovskou strukturní a funkční variabilitu proteinů (Snustad & Simons, 2009).

Struktura proteinů se rozděluje do čtyř úrovní organizace. Jedná se o strukturu primární, sekundární, terciální a kvartérní. Primární struktura vyjadřuje seřazení neboli sekvenci aminokyselin v polypeptidickém řetězci. Sekundární struktura určuje vzájemný prostorový vztah sousedních nebo blízkých aminokyselin. Terciální struktura odpovídá trojrozměrnému uspořádání peptidů. Kvartérní struktura se skládá ze dvou nebo více polypeptidů s mnoha podjednotkami (Clark, 2005).

Proteiny jsou také schopny měnit svoji konformaci za určitým účelem a opět poté zaujmout svoji původní. Například se tak děje při denaturaci, kdy proteiny často koagulují a po její působení opět zaujmají svoji původní konformaci. Po trvalé denaturaci však mění proteiny nevratně svoji strukturu a nejsou nadále schopné plnit svůj účel.

2.2 Biosyntéza proteinů

Proces tvorby peptidů a proteinů, tj. proteosyntéza je jedinečný a složitý proces probíhající podle genetického kódu a zahrnuje podle „centrálního dogmatu“ tři základní kroky. Jedná se o procesy replikace, transkripce a translace.

2.2.1 Replikace

Při replikaci dochází k vytváření a namnožování kopií nukleových kyselin. Tedy z DNA (deoxyribonukleová kyselina) vzniká nová DNA, případně z RNA (ribonukleová kyselina) vzniká nová RNA. Replikace DNA probíhá v jádře buňky během S fáze mitotického dělení. Má semikonzervativní průběh, to znamená, že podle jednoho původního vlákna DNA vzniká vlákno nové, které je k původnímu vláknu komplementární. Replikace probíhá tak, že enzym DNA helikáza rozplétá původní dvoušrobovici na dvě vlákna DNA, z nichž jedno se nazývá vedoucí a druhé opožděné. Na vedoucím vláknu se syntetizuje přímo nové vlákno DNA pomocí enzymu DNA polymerázy delta. Na vláknech opožděném se vytváří pomocí DNA polymerázy alfa tzv. Okazakiho fragmenty, což jsou krátké úseky nově replikované

DNA, a tyto úseky jsou následně pospojovány pomocí enzymu DNA ligázy. Výsledkem replikace jsou tedy dvě nové dvoušroubovice DNA (Rosypal, 1997).

2.2.2 Transkripce

Proces transkripce spočívá v přenosu genetické informace z DNA do RNA, která vzniká právě podle DNA. V buněčném jádře nebo v cytoplazmě vznikají podle jednoho řetězce DNA molekuly mRNA. Transkripce probíhá ve třech základních krocích, jedná se o tyto kroky:

1. Iniclace – dochází k rozvinutí dvoušroubovice DNA, RNA polymeráza se naváže na promotor DNA a začne vytvářet řetězec RNA
2. Elongace – v této fázi se prodlužuje řetězec RNA
3. Terminace – probíhá ukončení transkripce, u prokaryot se uvolňuje hotová RNA a u eukaryot se tvoří primární transkript. Po této fázi probíhají u eukaryot posttranskripční úpravy.

Postranskripční úpravy probíhají pouze u eukaryot. Jedná se o přidání čepičky, kdy je na 5' konec přidán 7-methylguanosa, dalším krokem je polyadenylace, kdy dochází k přidání poly-A-konce tím způsobem, že se na 3' konci nahradí část řetězce přibližně dvěma sty adeninovými zbytky. A sestřih je proces, kdy jsou z řetězce pre-mRNA odstraněny introny, což jsou nekódující sekvence nukleotidů a exony, které představují kódující sekvence, jsou následně spojeny do kontinuálního řetězce. Po dokončení postranskripčních úprav vzniká finální podoba mRNA, která je připravena účastnit se procesu translace (Alberts *et al.*, 1998).

2.2.3 Translace

Translace je proces, při kterém se podle genetického kódu přenáší genetická informace z molekul mRNA do sekvencí aminokyselin v polypeptidech. Translace probíhá v ribozomech, což jsou organely skládající se z tří až pěti molekul rRNA a 50-90 různých proteinů. Po proběhnutí translaci se dělí na dvě části, na malou a velkou část a při iniciaci translace se opět tyto části spojí. Součástí ribozomů je také

40-60 molekul tRNA, které mají za úkol přenášet a zařazovat správné aminokyseliny podle kodonu v mRNA (Snustad & Simons, 2009).

Kodon je trojice za sebou jdoucích bazí v mRNA, která při translaci určuje zabudování určité aminokyseliny do polypeptidického řetězce. Počet kodonů je 64 a každý z nich, s výjimkou tří stop-kodonů kóduje jednu aminokyselinu. Ke každému kodonu existuje komplementární antikodon umístěný na molekule tRNA, který se skládá ze tří nukleotidů a páruje se s příslušným kodonem. Proces translace začíná vytvořením iniciačního kodonu AUG na ribozomu, který kóduje aminokyselinu metionin. U prokaryot konkrétně N-formylmethionin.

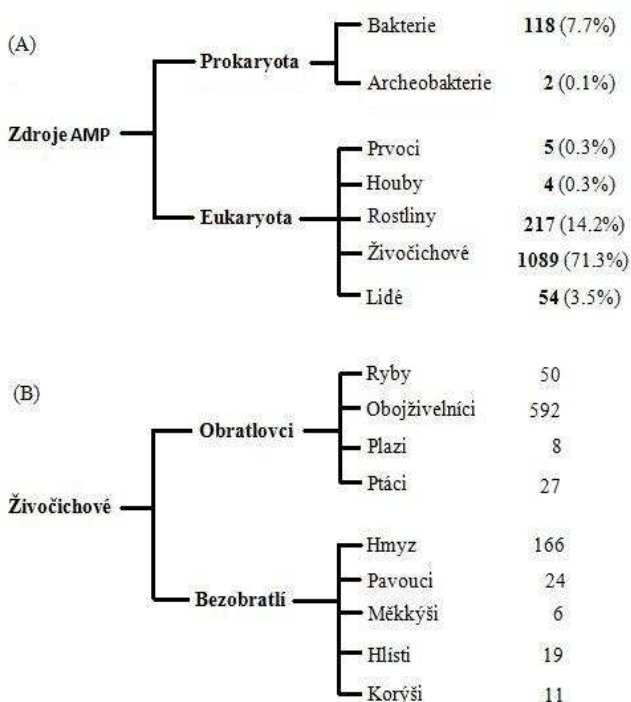
Translace je ukončena vytvořením jednoho z terminačních kodonů neboli stop-kodonů. Jedná se o kodony UAA, UAG a UGA, které nekódují žádnou aminokyselinu. Po translaci vzniká primární struktura peptidu, po které následují jednotlivé posttranslační úpravy proteinů (Řehout *et al.*, 2000).

Po posttranslačních úpravách vznikají hotové peptidy, mezi které se zařazuje i velmi důležitá skupina antimikrobiálních peptidů a proteinů.

3. ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY A PROTEINY

3.1 Výskyt antimikrobiálních peptidů

Antimikrobiální peptidy (AMPs) a proteiny jsou důležitou součástí nespecifické imunity a obranných mechanismů proti patogenům u mnoha organismů. Proto je jejich výskyt v buněčných a mezibuněčných prostorách poměrně běžný. AMPs se vyskytují u eukaryotických i prokaryotických organismů. Podle internetové Databáze antimikrobiálních peptidů (APD) bylo ke dni 10. října 2008 uznáno a zařazeno celkem 1228 antimikrobiálních peptidů, z nichž 65 má antikarcinogenní účinky, 75 antivirální účinky, 327 peptidů je antifungálních a 944 antibakteriálních (Wang *et al.*, 2008). V únoru roku 2010 bylo podle této databáze objeveno a zařazeno již 1528 antimikrobiálních peptidů a proteinů, jejichž výskyt v jednotlivých skupinách organismů je uveden na obrázku č. 1 (Wang, 2010).



Obr. 1: Výskyt antimikrobiálních peptidů a proteinů u jednotlivých taxonomických skupin organismů podle databáze APD z února roku 2010. Z obrázku je patrné, že z celkového počtu 1528 AMPs bylo více jak 71% objeveno u živočichů. U rostlin je počet objevených AMPs přibližně 14.2%. Druhá část obrázku vyjadřuje počty objevených AMPs u jednotlivých skupin živočichů (upraveno podle Wang, 2010).

3.1.1 Výskyt u prokaryot

AMPs jsou velmi významným činitelem imunitního systému u mnoha bakterií. Jsou nazývány bakteriociny a vykazují inhibiční aktivitu vůči bakteriím, které jsou blíže příbuzné s bakteriemi, které tyto látky produkují (Ogunbanwo, 2003). Na rozdíl od širokospektrých antibiotik mají schopnost likvidovat pouze úzký okruh patogenů. Bylo zjištěno, že téměř všechny druhy bakterií jsou schopny produkovat bakteriociny a 99% z nich produkují alespoň jeden bakteriocin (Shand & Leyva, 2008).

První bakteriociny byly objeveny u bakterie *Escherichia coli* v roce 1925 Gratiem. V roce 1946 nazval s Fredericqem tuto skupinu koliciny (Cascales, 2007).

Antimikrobiální peptidy a proteiny nejsou obsaženy u *Protozoa* pouze v bakteriích ale také u zástupců z říše Archea. Tyto antimikrobiální peptidy se podle nich nazývají archaeociny. Vytvářejí je zástupci archeobakterií z dvou fylogenetických skupin. Jedná se o třídu Haloarchaea, které produkují archeociny nazývané halociny a druhou skupinou je rod *Sulfolobus* produkující sulfolobiciny. Archeociny stejně jako bakteriociny působí na organismy, kteří jsou podobní nebo stejní jako jejich původci (Shand & Leyva, 2008).

3.1.2 Výskyt u eukaryot

U mnohobuněčných organismů se antimikrobiální peptidy nazývají eukaryociny. Stejně jako všechny ostatní peptidy jsou velmi specifické svým působením. Jsou to často malé, kationtické i nekationtické peptidy, které jsou odolné vůči vysokým teplotám. Svoji aktivitou narušují membrány cílových buněk. Eukaryociny byly objeveny prakticky u každého mnohobuněčného organismu (Shand & Leyva, 2008).

3.1.3 Výskyt u hub

Výskyt antimikrobiálních peptidů u hub je poměrně vzácný. Ke dni 29. dubna 2010 jich bylo podle databáze CAMP (*Collection of Anti-microbial Peptides*) zařazeno pouze 16.

3.1.4 Výskyt u živočichů

Živočichové jsou denně vystaveni působení milionů potenciálních patogenů. Mohou být nakaženi přímým kontaktem, přijímáním potravy nebo inhalací. Jejich schopnost vyhnout se infekci záleží na vrozených mechanismech imunitní obrany. Jedním z těchto mechanismů je také působení antimikrobiálních peptidů (Hancock & Scott, 2000).

U bezobratlých živočichů je nejvíce prostudovaný výskyt antimikrobiálních peptidů u hmyzu, konkrétně u modelového organismu octomilky (*Drosophila melanogaster*). První AMP byl u ní objeven v roce 1970 týmem vědců na mikrobiologickém oddělení na univerzitě v Umee ve Švédsku (Strominger, 2009). Později bylo zjištěno, že genom octomilky kóduje nejméně 34 antimikrobiálních peptidů, mezi něž patří například cecropiny se širokospektrým působením, které jsou účinné proti gramnegativním bakteriím a houbám, dále to jsou AMPs se specifickým účinkem, jako například attaciny, které ničí gramnegativní bakterie a drosomycin účinný proti houbám. (Neubauerová *et al.*, 2009). Seznam některých důležitých AMPs u vybraných živočichů je uveden v následující tabulce.

Tab. 1: Vybraní zástupci eukaryocinů (upraveno podle Andreu a Rivas, 1998)

Název peptidu	Výskyt
Andropin	octomilka (<i>Drosophila melanogaster</i>)
Bombolitin	čmelák (<i>Megabombus pensilvanicus</i>)
Cecropin P1	prase (<i>Sus scrofa</i>)
CRAMP	myš (<i>Mus musculus</i>)
FALL-39	člověk (<i>Homo sapiens</i>)
Misgurin	piskoř (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)
Seminalplasmin	skot (<i>Bos taurus</i>)
Prophenin	prase (<i>Sus scrofa</i>)
Lebocin 1	bourec (<i>Bombyx mori</i>)
Esculentin	skokan (<i>Rana esculenta</i>)
Thanatin	ploštice (<i>Podisus maculiventris</i>)
Styelin	sumka (<i>Styela clava</i>)
Magainin 1	drápatka (<i>Xenopus laevis</i>)

3.1.5 Výskyt u rostlin

Vzhledem k tématu této práce se budu zabývat výskytem antimikrobiálních peptidů a proteinů u rostlin podrobně v dalších kapitolách.

3.2 Rozdělení antimikrobiálních peptidů

Antimikrobiální peptidy jsou stejně jako všechny peptidy poměrně různorodé látky, které se liší jak svým výskytem, tak svým působením a složením. Antimikrobiální peptidy můžeme rozdělit podle několika kritérií. Jedná se například o rozdělení podle jejich výskytu. Vyskytují se v buněčných strukturách jak u prokaryot, tak i u eukaryot. Podrobněji se této problematice věnuji v kapitole o výskytu antimikrobiálních peptidů.

Antimikrobiální peptidy můžeme rozdělit také podle jejich struktury. AMPs podle struktury dělíme do čtyř základních skupin, z nichž nejvýznamnější jsou první dvě skupiny (Neubauerová, 2009) :

1. Kationické antimikrobiální peptidy
2. Anionické AMPs
3. Aromatické dipeptidy
4. Deriváty proteinů vazající kyslík

3.2.1 Kationické antimikrobiální peptidy

Kationické AMPs jsou nejpočetnější skupinou antimikrobiálních peptidů, čítající více než 700 zástupců a zároveň je to skupina vykazující několikanásobně vyšší aktivitu než ostatní skupiny antimikrobiálních peptidů. Obsahují obvykle méně než 50 aminokyselin. Rozdělujeme je do čtyř základních skupin:

1. Antimikrobiální proteiny
2. Antimikrobiální peptidy s alfa-helikálními doménami
3. Lineární peptidy se zvýšeným obsahem dané aminokyseliny
4. Cyklické peptidy obsahující disulfidické vazby

Později byly pro klasifikaci bakteriálních AMPs a nově objevených AMPs přidány další tři třídy: peptidy bez disulfidických můstků, peptidy s cyklickou strukturou a kovalentně vázané dimery (Neubauerová, 2009).

3.2.2 Anionické antimikrobiální peptidy

Objev anionických AMPs byl poprvé ohlášen na začátku 80. let minulého století a společně s kationickými antimikrobiálními peptidy byly uznány jako důležitá součást vrozené imunity jak rostlin, tak obratlovců i bezobratlých živočichů. Jsou aktivní jak proti houbám, bakteriím a virům ale také proti škůdcům, zejména hmyzu. Některé mechanismy působení anionických AMPs jsou v současnosti ještě nejasné a jsou předmětem výzkumu. Předpokládá se, že anionické AMPs budou mít ale stejně jako ostatní typy AMPs v budoucnosti využití v biotechnologických aplikacích a oblastech humání a veterinární medicíny, protože se prokázala schopnost zabíjet rychle a účinně patogeny, kteří jsou odolní vůči konvenčním antibiotikům (Harris *et al.*, 2009).

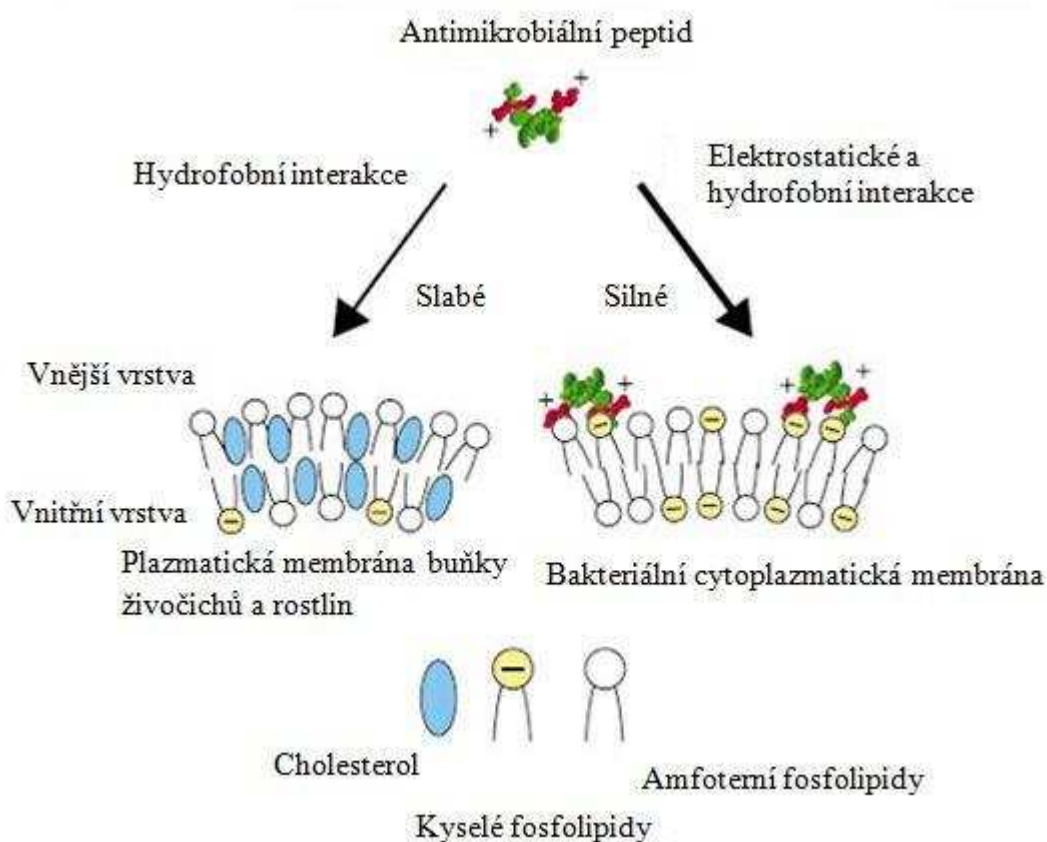
3.3 Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů

3.3.1 Antibakteriální působení

Působení většiny antimikrobiálních peptidů má v podstatě stejný základ. Aby mohl antimikrobiální peptid zničit cílového patogena, musí poškodit jeho buněčnou membránu, respektive buněčnou stěnu. Antimikrobiální peptidy mají schopnost rozeznat eukaryotické a prokaryotické buněčné membrány díky rozdílnému složení lipidové dvojvrstvy, konkrétně díky rozdílné koncentraci a náboji fosfolipidů ve vnější vrstvě dvojvrstvy. Právě díky specifickým vlastnostem buněčné membrány bakterií jsou AMPs za pomoci elektrostatických a hydrofobních interakcí schopni s membránou interagovat. Je více mechanismů, pomocí kterých působí AMPs na buněčnou membránu patogena. Někdy dochází k interakci s membránou bakterií a proběhne celková depolarizace buněčné membrány. Další hypotéza mluví o vytvoření fyzických děr a následné ztrátě buněčného obsahu. Nebo dochází

k zahájení destrukčních procesů způsobených aktivací enzymů hydrolas a následně postupné degradaci buněčné stěny. Některé AMPs také způsobují změnu uspořádání lipidů v lipidové dvojvrstvě buněčné stěny a následný průnik peptidů přímo do buňky (Zaslhoff, 2002).

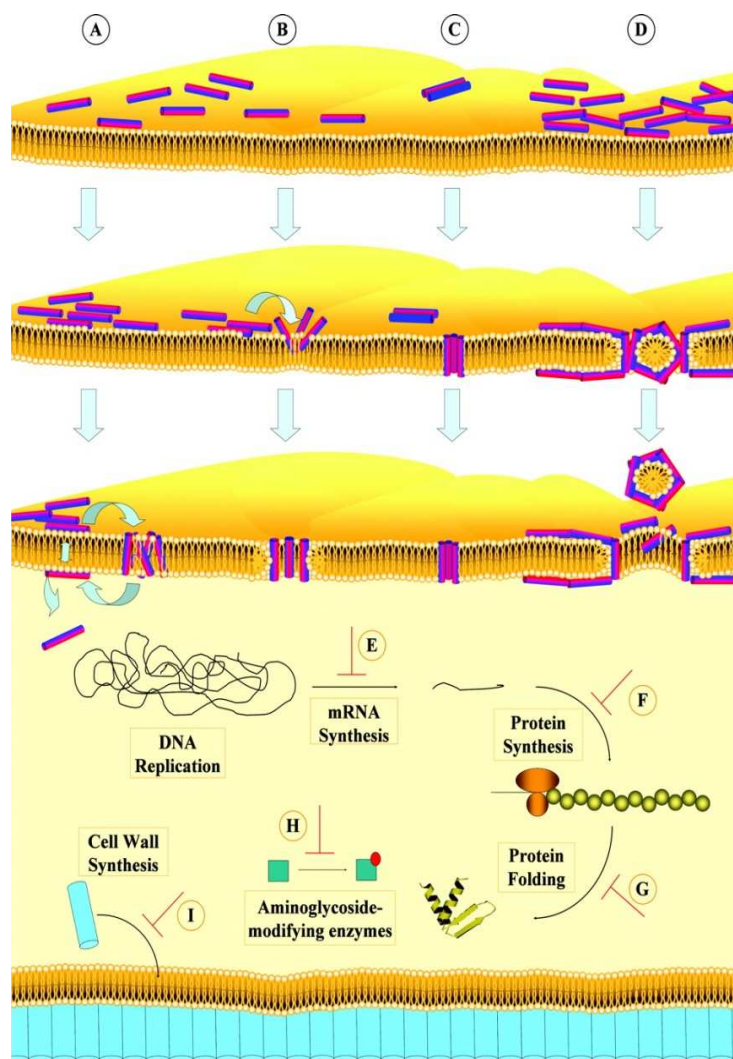
Obr. 2: Schopnost AMPs specificky rozpoznat vlastnosti eukaryotické a prokaryotické buněčné membrány. Vnější vrstva eukaryotické buněčné membrány je tvořena amfoterními fosfolipidy a cholesterolem a proto na ní nepůsobí elektrostatické interakce. U prokaryot tvoří vnější vrstvu záporně nabitě fosfolipidy, na které působí silné elektrostatické a hydrofobní interakce (upraveno podle Zaslhoff, 2002).



Antimikrobiální peptidy mají ve většině případů více mechanismů působení nebo mají výše popsané mechanismy upravené podle konkrétního složení lipidů nebo poměru lipidů a bílkovin v membráně. (Chou *et al.*, 2010).

U agregačního modelu se včleňují antimikrobiální peptidy paralelně mezi dvě lipidové vrstvy a následně se agregují další peptidy. U torodiálních pórů se včleňují antimikrobiální peptidy kolmo k lipidovým dvojvrstvám a vytvářejí se tak póry

v buňčné stěně. U modelu sudové skruže se také peptidy včleňují mezi lipidové vrstvy kolmo a vytvářejí „skruže“ respektive otvory, díky kterým dochází ke ztrátě iontů, proteinů a dalších molekul. Kobercový model je založený na pokrytí vnější lipidové vrstvy antimikrobiálními peptidy, které při vysoké koncentraci působí jako detergent a následně poškozují membránu micelizací nebo vytvářením pórů (Jenssen *et al.*, 2006).



Obr. 3: Mechanismy působení antimikrobiálních peptidů (převzato z Jenssen *et al.*, 2006)

A – D: mechanismy průniku AMPs do buněk
 A – agregační model
 B – model toroidního póru
 C – model sudové skruže
 D – kobercový model

E – I: mechanismy působení AMPs uvnitř buněk
 E – syntéza mRNA
 F – proteosyntéza
 G – skládání proteinů
 H – modifikace aminoglykosidických enzymů
 I – syntéza buněčné stěny

Dlouho se předpokládalo, že neexistují mechanismy, díky kterým by byly bakterie schopné se bránit působení antimikrobiálních peptidů a proteinů. Přesto bylo nedávno prokázáno, že bakterie dokážou měnit přítomnost a koncentraci některých látek ve svém buněčném obalu. Jsou to zejména anionické látky jako peptidoglykeny, lipidy A, fosfolipidy a kyselina teichoová (Monroc, 2007). Byly

objevy tyto mechanismy resistance ke kationickým antimikrobiálním peptidům (Monroc, 2007; Malangon, 2010):

1. Proteolytická degradace – bakterie tvoří enzymy peptidasy a proteasy, které rozkládají antimikrobiální peptidy a proteiny pomocí různých mechanismů. Tyto enzymy jsou však aktivní pouze proti specifickým strukturám peptidů.
2. Navázání a vytlačení – tento mechanismus spočívá v rozpoznání a obsazení AMPs a jejich vytlačení z buňky pomocí buněčné stěny. Bakterie produkují exoproteiny, které se navážou na AMPs a inaktivují je a poté je pomohou vytlačit z buňky ven.
3. Změna náboje povrchu bakteriální membrány – jedná se o nejméně specifický způsob rezistence. Povrch membrány se změní na negativní, a proto AMPs hůře reagují s membránou. Tento mechanismus rezistence je však účinný pouze při menších koncentracích AMPs.

3.3.2 Antivirové působení

Přestože donedávna byly studovány zejména antibakteriální a antifungální mechanismy působení AMPs, u některých antimikrobiálních peptidů se také prokázala antivirová aktivita. Například lactoferrin, antimikrobiální glykoprotein obsažený v mléce dokáže inhibovat známý virus HIV-1, rotaviry nebo viry HSV-1 a HSV-2 způsobující opary (Carriel-Gomes *et al.*, 2007).

Z rostliny líčidlo (lat. *Phytolacca americana*) byl v druhé polovině 20. století izolován významný antivirový protein PAP (*Pokeweed Antiviral Protein*) o velikosti 29 kDa, který je schopen inhibovat přenos a replikaci některých rostlinných a živočišných RNA virů. Tento protein odstraňuje adeninové zbytky z 28S rRNA, což je důležitá oblast eukaryotického ribozomu (Hur *et al.* 1995). U PAP se prokázala účinnost jak proti virům živočišným, například HIV, poliovirům a virům způsobujících chřipku, tak proti rostlinným virům, například virus mozaiky tabáku, virus mozaiky okurky a některé sobemoviry. Je obsažený především v listech a vyskytuje se v mezibuněčných prostorách, protože tento protein působí uvnitř buňky jako toxin. S tím souvisí také mechanismus účinku. Až poté co virus infikuje buňku, proniká PAP do této infikované buňky, kde inaktivuje ribozomy, tím naruší

proteosyntézu a zahubí buňku. Tímto mechanismem zabrání replikaci viru (Bonness *et al.*, 1994).

PAP protein patří do skupiny antimikrobiálních proteinů nazývaných jako ribosome-inactivating proteins (RIPs) neboli proteiny inaktivující ribozomy. Všechny tyto toxiny jsou schopné inaktivovat živočišné ribozomy, ale jen některé jsou schopné inaktivovat ribozomy rostlinné, bakteriální a hub (Bonnes *et al.*, 1994).

3.3.3 Antifungální působení

Antifungální proteiny tvoří nejrozšířenější skupinu AMPs. Tyto proteiny mohou být klasifikovány na základě struktury, enzymových vlastností, podobnosti s jinými proteiny a peptidy, molekulové hmotnosti, sérologických vlastností a mechanismů účinku. V současnosti jsou antifungální proteiny děleny do pěti základních skupin, PR-1 až PR-5. Tyto skupiny se pak dále mohou dělit na dvě podskupiny podle isoelektrického bodu. Bylo zjištěno, že kyselé antifungální proteiny se nachází v extracelulárním prostoru a bazické ve vakuolách buňky (Heřmanová *et al.*, 2006).

Antifungální působení antimikrobiálních peptidů a proteinů sestává z řady mechanismů. Liší se zejména podle skupin antifungálních proteinů. Velká část těchto skupin používá mechanismu hydrolýzy polysacharidů, které jsou hlavní složkou buněčné stěny hub. U PR-1 se předpokládá, že působí na přenos iontů iontovými kanály. Rostlinné defensiny a γ -thioniny způsobují zpomalení růstu hyf a jejich deformaci. Většina z nich působí na široké spektrum hub, včetně patogenních. Bylo zjištěno, že antifungální působení rostlinných defensinů klesá při zvyšování kationické aktivity. Tento znak se projevuje hlavně u malých antimikrobiálních peptidů, jako jsou právě defensiny a thioniny (Thomma *et al.*, 2002).

Přestože není jejich antifungální působení zcela objasněno, je všeobecně přijímáno, že působí na plazmatickou membránu hub. Jednou z možností je, že se váží na glykolipidy na povrchu membrány hub. Látka, která spouští obrannou reakci v buňkách se nazývá elicitor, což je specifický metabolit identifikovaný receptorem rostliny. Většina obranných mechanismů je závislá na aktivaci určitých genů (Heřmanová *et al.*, 2006). Mechanismy antimikrobiálního a antibakteriálního působení dalších skupin jsou v této práci popsány u jednotlivých tříd PR proteinů.

4. ROSTLINNÉ ANTIMIKROBIÁLNÍ PEPTIDY A PROTEINY

Rostliny jsou stejně jako živočichové často vystavovány působení velkého množství patogenů. Proto jejich schopnost přežít závisí na rychlé imunitní odpovědi, která také zahrnuje rychlé působení obranných látek a syntézu obranných antimikrobiálních peptidů a proteinů. Antimikrobiální peptidy a proteiny byly nalezeny v těch částech rostliny, které jsou často vystavovány působení patogenů. Jedná se zejména o listy, květy, semena a hlízy. Rostlinné antimikrobiální peptidy můžeme rozdělit do více skupin, z nichž hlavní a nejvíce studované jsou 3 skupiny. Jsou to thioniny, rostlinné defensiny a proteiny přenášející lipidy (Malangon, 2010; Castro a Fontes, 2005)

4.1 PR proteiny

Většina rostlinných antimikrobiálních peptidů a proteinů, včetně tří, výše jmenovaných skupin se řadí do skupiny PR proteinů. Poprvé byly tyto antimikrobiální proteiny, konkrétně ze skupiny PR-1, objeveny v roce 1970 Van Loonem a Van Kammenem a současně také kolektivem pod vedením Gianiazziho v listech tabáku (*Nicotiana tabacum*) po infekci viru žluté mozaiky tabáku. Později byly nalezeny u mnoha jiných rostlinných druhů (Niderman *et al.*, 1995). Jedná se o látky s nízkou molekulovou hmotností (6-43 kDa). Jejich struktura je tvořená čtyřmi alfa-šroubovicemi, mezi kterými jsou paralelně uspořádaná čtyři beta-vlákna. V buňkách jsou obsaženy v apoplastech a vakuolách. Tyto proteiny dokážou díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem, jako je například stabilně nízké pH (<3) a termostabilita, odolávat vysokým teplotám a pH, proteolytickému štěpení a mohou se proto vyskytovat i v „nehostinném“ prostředí. (Edreva, 2005).

Tab. 2: Vybrané skupiny PR-proteinů (Van Loon & Van Strien, 1999)

Skupina	Zástupce	Vlastnosti
PR-1	tabák PR-1a	neznámé
PR-2	tabák PR-2	β -1,3-glukanasa
PR-3	tabák P, Q	chitinasa typu I,II, IV, V, VI, VII
PR-4	tabák "R"	chitinasa typu I, II
PR-5	tabák S	thaumatinu-podobné
PR-6	rajčatový inhibitor I	inhibitor proteasy
PR-7	rajče P _{6g}	Endoproteinasa
PR-8	okurková chitinasa	chitinasa typu III
PR-9	tabáková „lignin tvořící“ peroxidasa	Peroxidasa
PR-10	petržel PR-1	ribonuklease-podobné
PR-11	tabáková chitinasa třídy V	chitinasa typu I
PR-12	ředkvička Rs-AFP3	Defensin
PR-13	huseníček THI2.1	Thionin
PR-14	ječmen LTP4	protein přenášející lipidy

4.1.1 PR-1 proteiny

Jedná se o první objevenou skupinu PR proteinů (viz výše). Přesto mechanismus účinku PR-1 proteinů není ještě zcela jasný a o biologické aktivitě toho víme velmi málo. Nepřímý důkaz o antifungálním působení těchto proteinů byl v roce 1993 prokázán Alexanderem, kdy transgenní rostliny tabáku s vysokým obsahem PR-1a a PR-1b proteinů vykazovaly významné snížení výskytu symptomů způsobených infekcí dvěma houbovými patogeny z oddělení Oomycota: *Peronospora tabacina* a *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*.

PR-1 proteiny mají velikost 15-17 kDa. Většina PR-1 proteinů obsahuje 6 cysteinových zbytků tvořící disulfidické vazby. Tato pevná struktura jim zajišťuje vysokou odolnost proti mnoha proteasám (Van Loon & Van Strien, 1999).

4.1.2 PR-2 proteiny (β -glukanasy)

Jsou to proteiny, které působí endoglukanasovou aktivitou *in vitro*. Dělíme je do tří skupin podle sekvencí aminokyselin: První skupina proteinů má bazický charakter a velikost kolem 33 kDa. Druhá a třetí skupina zahrnuje kyselé proteiny obsažené v extracelulárních prostorech o velikosti 36 kDa. PR-2 proteiny byly nalezeny v celé řadě rostlin včetně tabáku, hrachu, obilí a různém ovoci. V *in vitro* podmínkách působí proti velkému množství hub, rostlinným i lidským patogenům. Mechanismus antifungálního účinku spočívá v hydrolyze 1,3- β -glukanů v buněčných stěnách hub, které se následně ztenčují a poškozují. Dochází tak k buněčné lyzi a následně buněčné smrti (Selitrennikoff, 2001).

4.1.3 PR-3 proteiny (chitinasy)

Chitinasy reprezentují velkou a rozličnou skupinu enzymů. Jsou to proteiny s nízkou molekulovou hmotností, odolné proti proteasám. Vyskytují se v extracelulárních prostorech rostlin. Byly izolovány z různých rostlinných částí mnoha druhů rostlin, zahrnující embrya, děložní lístky, listy, kořeny, květy. Byly objeveny také v tkáňových kulturách (pletivech) a v kulturách buněčných suspenzí. Rostlinné chitinasy mají obvykle velikost v rozpětí 25 až 36 kDa (Punja & Zhang, 1993). Vyskytují se však i chitinasy s větší či menší molekulovou hmotností.

Chitinasy můžeme rozdělit do dvou základních skupin. Do první skupiny se řadí exochitinasy, které vykazují aktivitu jen k neredukujícím koncům chitinového řetězce. Do druhé skupiny řadíme endochitinasy, které hydrolyzují vnitřní β -1,4-glykosidické vazby. Podle sekvencí aminokyselin, je můžeme rozdělit do čtyř skupin. Některé endochitinasy, zejména ty s vysokým isoelektrickým bodem, vykazují také stejný nebo podobný efekt jako lysozym. Základní působení chitinas spočívá v rozkladu chitinu, což je polysacharid představující důležitou složku buněčných stěn hub. Hydrolyzou chitinu dochází k degradaci buněčné stěny hyf. Chitinasy využívají dva rozdílné, hydrolytické mechanismy působení. V rámci *in vitro* testů se však zjistilo, že některé chitinasy neslouží jen k obraně proti patogenům, protože nevykazovaly žádnou antifungální aktivitu (Kasprzewska, 2003).

Kromě rostlin byly chitinasy izolovány také z mnoha mikroorganismů, zejména aktinomycet, a také hub (Doumbou *et al.*, 2002; Shubakov & Kucheryavykh, 2004) .

4.1.4 PR-4 proteiny (chitinasy)

Ze všech skupin PR proteinů jsou proteiny PR-4 jednou z nejméně prostudovaných PR skupinou. První PR-4 proteiny byly izolovány z brambor. Tyto proteiny byly pojmenovány win-1 a win-2. Později byly popsány PR-4 proteiny u následujících rostlin: rajčata, tabák, huseníček, batáty, zelí a z obilnin, například kukuřice a ječmen. Všechny PR-4 proteiny mají C-terminální Barwinovu doménu. Tento název je odvozený od proteinu obsaženého v semenech ječmene, který se váže na chitin. PR-4 proteiny jsou klasifikované jako endochitinasy, přestože některé na chitin mají jen slabý účinek. PR-4 proteiny se dělí do dvou podskupin, přičemž první skupina obsahuje N-terminální doménu bohatou na cystein, která odpovídá doméně heveinu, což je protein izolovaný z kaučukovníku (Guevara-Morato, 2010).

Druhé skupině chybí doména vázající chitin. Mechanismus účinku u skupiny I spočívá v narušení polarity buněk N-terminální doménou a následné inhibici jejich růstu. U druhé skupiny, kde doména chybí, nebyl mechanismus účinku objasněn. PR-4 proteiny mají velikost 13-14,5 kDa. Kromě rostlin byly izolovány z bakterií, hmyzu a koryšů (Selitrennikoff, 2001).

4.1.5 PR-5 proteiny (proteiny podobné thaumatinu)

Nazývají se proteiny podobné thaumatinu (TLP) z důvodu jejich podobností se sladce chutnajícím proteinem thaumatinem izolovaným z afrického keře *Thaumatococcus daniellii*. TLP byly izolovány z mnoha rostlinných druhů, často ve formě více izoform, obzvláště u plodin jako *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* a *Avena sativa*. Byly nalezeny v různých rostlinných orgánech, například v semenech, plodech, listech a pletivech. U TLP proteinů se prokázala antifungální činnost a schopnost degradace buněčných stěn hub. Kromě antifungálních účinků bylo zjištěno také alergenní působení a nemrznoucí účinky těchto proteinů (Piggott *et al.*, 2004).

Většina PR-5 proteinů má velikost 24-25 kDa, přesto existuje podskupina těchto proteinů, jejíž zástupci byli izolováni z některých jednoděložných rostlin a

jejichž velikost je podstatně menší než u většiny TLP proteinů a pohybuje se okolo 17,5 kDa. Tyto proteiny postrádají 6 cysteinových zbytků z obvyklého počtu 16-ti cysteinových zbytků, vyskytujících se u většiny TLP proteinů. I u těchto menších PR-5 proteinů byla prokázána antifungální aktivita (Hu & Reddy, 1997).

4.1.6 PR-6 proteiny (inhibitory proteas)

Jsou to proteiny, které mají už podle názvu schopnost inhibovat aktivitu enzymů proteas, což jsou enzymy štěpící proteiny. Tyto inhibující proteiny byly nalezeny v mikroorganismech, živočiších a rostlinách. U rostlin jsou to převážně malé proteiny, které byly nalezeny v různých částech rostlin, například semenech a hlízách, ale i nadzemních částech (Habib a Fazili, 2007).

Tyto proteiny neplní však jen úlohu inhibitorů proteas, ale byla u nich navíc prokázána antifungální a baktericidní aktivita (Heřmanová *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2009; Habib & Fazili, 2007). Rostlinné inhibitory proteas, jsou také významné z hlediska obrany proti hmyzím škůdcům. Tyto proteiny inhibují některé významné trávicí enzymy, například trypsin a chymotrypsin (Azzouz *et al.*, 2005). Díky těmto schopnostem bychom mohli označit tyto proteiny jako multifunkční.

Přestože není mechanismus účinku proti mikroorganismům přesně znám, předpokládá se, že díky inhibici některých důležitých enzymů dochází k takzvanému „antifeedent“ efektu, ke zpomalení růstu a vývoje těchto organismů.

4.1.7 PR-9 proteiny (rostlinné peroxidasy a peroxidasam podobné proteiny)

Jsou to proteiny, které mají podle názvu podobnou strukturu jako enzymy peroxidasy a mají za úkol chránit organismy před oxidativním poškozením způsobeným peroxidy. Patří sem zejména glutationy (Holland *et al.*, 1994). Zjistilo se, že rostlinné peroxidasy vykazují nepřímou antimikrobiální aktivitu. Katalyzují takzvané oxidativní síťování proteinů a fenolických látek v buněčných stěnách a tím chrání stěny před degradací způsobenou hydrolytickými enzymy patogenů (Fritig *et al.*, 1998).

4.1.8 PR-10 proteiny (proteiny podobné ribonukleasám)

Jedná se o velkou skupinu PR proteinů, bylo objeveno více jak 100 těchto proteinů. Název dostaly podle podobnosti aminokyselinových sekvencí s ribonukleasami. Byly u nich zjištěné antimikrobiální a antifungální účinky, ale také schopnost bránit rostlinu před abiotickými stresy. Přesto však u většiny nebyla zjištěna molekulární podstata působení. U některých se však zjistilo, že jejich působení spočívá v hydrolyze RNA a jsou tedy velmi účinné proti RNA virům. U těchto proteinů byla také zjištěna schopnost vázat rostlinné hormony cytokininy a některé hydrofobní ligandy, například mastné kyseliny, flavonoidy a steroidy (Zubini *et al.*, 2009). Jsou to malé proteiny s velikostí kolem 16-18 kDa (Walter *et al.*, 1996). Byly objeveny v mnoha rostlinných druzích. Jsou schopné odolávat některým stresovým faktorům, například vysoké salinitě (Kav *et al.*, 2004).

4.1.9 PR-13 proteiny (thioniny)

Thioniny je skupina malých peptidů, či proteinů s nízkou molekulovou hmotností, bohatá na sirné aminokyseliny. Bylo identifikováno kolem 100 individuálních sekvencí ve více než 15-ti rostlinných druzích (Stec, 2006). Tyto látky si jsou podobné a účinkují proti bakteriím a houbám. Zmínka o prvních antimikrobiálních látkách pochází z roku 1895, kdy byla objevena letální látka v pšeničné mouce působící na chlebové kvasinky. Tato antimikrobiální substance byla později v roce 1942 izolována Ballsem a pojmenována jako purothionin. Jednalo se o proteomickou látku s nízkou molekulární hmotností a s vysokým obsahem síry. Později byly podobné látky izolovány také z ječmene (α a β -hordothioniny), ovesa (α a β -avenothioniny) a žita (secalethioniny). α a β -thioniny byly objeveny u všech rodů řádu *Triticum* a *Aegilops* (Castro & Fontes, 2005)

Thioniny můžeme rozdělit na α a β -thioniny a na γ -thioniny. Ačkoli γ -thioniny spadají podle názvu mezi thioniny a mají pravděpodobně i stejný původ, liší se svojí strukturou a měly by být spíše zařazeny mezi defensiny (Stec, 2006).

α a β thioniny dělíme do pěti základních skupin: I, II, III, IV a V. Thioniny typu I se vyskytují v endospermu obilovin, jsou vysoce bazické, tvoří je 45 aminokyselin, z nichž 8 představuje cystein. Typ II byl izolován z listů a ořechu parazitické rostliny

Pyricularia pubera. Tyto thioniny jsou méně bazické než thioniny první skupiny, skládají se ze 45-46 aminokyselin a mají stejně jako první typ 4 disulfidické vazby. Thioniny typu III byly izolovány z listů různých druhů jmelí a mají 45-46 aminokyselin a 3 disulfidické vazby. Typ IV má 3 disulfidické můstky a skládá se ze 46 aminokyselin, má neutrální náboj a byl izolován ze semen *Brassica carista*. Poslední typ V byl objeven u některých druhů obilí, například u pšenice. Bylo prokázáno, že všech pět typů α a β - thioninů mají podobné složení aminokyselin (Stec, 2005).

4.1.10 γ - Thioniny

Přesto, že patří γ - thioniny do skupiny thioninů, mají více společného s jinou skupinou antimikrobiálních peptidů, konkrétně s defensiny. Někteří vědci je klasifikují jako samostatnou skupiny, jiní je řadí přímo mezi defensiny. Jsou to malé, kationické peptidy skládající se z 45 až 47 aminokyselin a 4-8 z nich představují cystein tvořící disulfidické vazby. Jsou účinné proti houbám a bakteriím, případně obojímu. Některé γ - thioniny jsou schopné inhibovat trávicí enzymy.

γ - thioniny byly poprvé popsány v roce 1960, kdy prokázaly schopnost zabíjet patogeny *in vitro* podmínkách. Jsou to první eukaryotické purifikované antimikrobiální peptidy, které prokázaly klíčovou roli v imunitní obraně rostlin. Kromě obrany rostlin proti patogenům vykazují také některé antimikrobiální peptidy i jiné vlastnosti. Například neutrálně nabitý antimikrobiální protein vyskytující se v *Crambe abyssinica*, nevykazuje žádnou antimikrobiální aktivitu ani neinhibuje žádný enzym, ale zjistilo se, že způsobuje nasládlou chuť semen (Pelegriani & Franco, 2005).

γ - thioniny můžeme rozdělit do čtyř skupin, přičemž skupina I a II jsou toxické vůči houbám a bakteriím a skupiny III a IV jsou toxické vůči savčím buňkám.

4.1.11 PR-12 proteiny (defensiny)

První zástupce ze skupiny defensinů byl izolován v roce 1990 Mendezem a jeho spolupracovníky z pšenice a ječmene. Původně byly pojmenovány jako γ - thioniny, protože vykazovaly stejnou velikost a stejný počet disulfidických můstků.

Ale následující analýzy struktury prokázaly, že se liší právě strukturou od α a β -thioninů. Defensiny i γ -thioniny byly izolovány z jednoděložných i dvouděložných rostlin převážně ze semen, kde se hojně vyskytují a byly charakterizovány po stránce molekulární, biochemické a strukturní. Působení rostlinných defensinů *in vivo* však nebylo ještě objasněno. U některých rostlinných defensinů se ukázalo, že neinhibují růst hub, ale spíše inhibují syntézu proteinů a některých enzymů, například α -amylas. V podmínkách *in vitro* inhibují syntézu proteinů γ -hordothioniny. Někteří zástupci defensinů mají schopnost „ucpávat“ iontové kanály. Defensiny jsou antimikrobiální peptidy, které obsahují 45-54 aminokyselin, jsou vysoce bazické a bohaté na cystein (8 molekul) (Thomma *et al.*, 2002; Castro & Fontes, 2005).

Defensiny můžeme rozdělit do dvou základních skupin. U první skupiny je prekurzorový protein složený ze signální sekvence endoplazmatického retikula a defensinové domény. Tyto proteiny ale nemají žádné signály a podněty pro posttranslační modifikace. Druhá třída defensinů je produkována jako větší prekurzory s C-terminálními pro-doménami o velikosti 33 aminokyselin. Do roku 2005 byl tento typ defensinu objeven pouze u čeledi Solanaceae.

4.1.12 Proteiny podobné cyklofilinu

Je to skupina proteinů, které představují intracelulární receptory cyklosporinu. Byly objeveny u rostlin, živočichů, hub ale i bakterií. Protein z této skupiny mungin o velikosti 18 kDa byl také objeven u *Phaseolus mungo*, u kterého se prokázalo antifungální působení. Mechanismus působení tohoto proteinu však zůstal nejasný (Selitrennikoff, 2001).

4.1.14 PR-14 proteiny (proteiny přenosu lipidů)

Jsou to malé proteiny, jejichž součástí je 8 cysteinových zbytků. Trojrozměrná struktura mnoha těchto proteinů je tvořena čtyřmi α -šroubovicemi spojenými disulfidickými můstky. Na povrchu těchto proteinů se vyskytují hydrofilní aminokyseliny. Tyto proteiny prokázaly schopnost přenášet lipidy *in vitro*. Ukázalo se, že molekuly lipidů jsou schopné obsadit hydrofobní kapsy těchto proteinů (Nieuwland *et al.*, 2005).

Proteiny přenosu lipidů můžeme rozdělit do dvou podskupin. První skupina (TLP1s) má relativní molekulovou hmotnost 9 kDa a druhá skupina 7 kDa (TLP2s). Jsou schopny přenášet více skupin lipidů, například fosfatidylcholinu, fosfatidylethanolamin a fosfatidylinositol. Díky této nízké specifitě se označují také jako „nespecifické proteiny přenosu lipidů“. Tyto proteiny hrají důležitou roli v imunitní obraně některých rostlin díky své schopnosti účinně inhibovat růst patogenů, jejich poměrně vysoké koncentraci v rostlinných pletivech a rychlou expresí po infekci. Expresie těchto proteinů u transgeního huseníčku a tabáku prokázala prudké snížení nekrotických účinků způsobených bakterií rodu *Pseudomonas* (Castro & Fontes, 2005).

4.1.13 PR-15 proteiny (germinům podobné proteiny)

Germiny představují homogenní skupinu proteinů, které jsou z více než 90 % identické. První zástupce z této skupiny byl poprvé popsán v roce 1980. Jednalo se o protein izolovaný z pšenice. Později, v roce 1993 byl jiný germinu podobný protein (*germin-like proteins*; GLP) izolován z ječmene, který byl nazván oxalát oxidasa (OxO). Na rozdíl od germinů jsou germinům podobné proteiny velmi heterogenní skupina. Byly objeveny u všech krytosemenných rostlin, u kterých se přítomnost těchto proteinů zjišťovala. Pomocí fylogenetické analýzy byly vytvořeny 4 podskupiny GLP. Proteinův rod by mohl být uvažován jako pátá podskupina (Bernier & Berna, 2001). GLP se vyskytují ve všech hlavních rostlinných pletivech i v pylu rostlin.

4.2 Ostatní antimikrobiální peptidy a proteiny

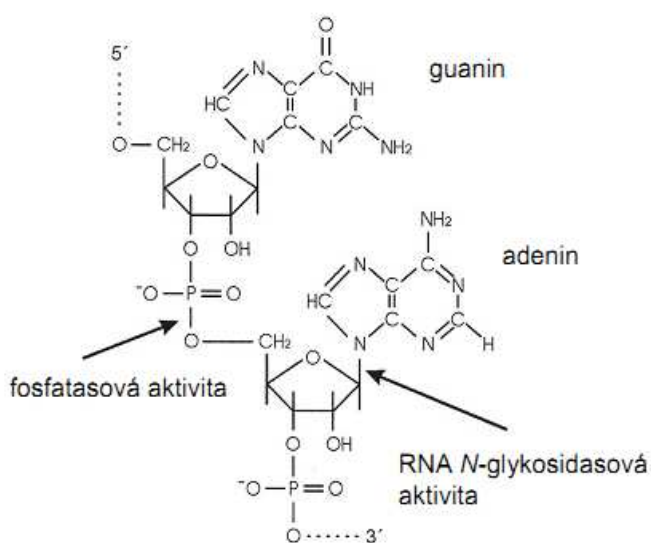
4.2.1 Proteiny inaktivující ribozomy

Tyto proteiny se neřadí přímo do skupiny PR proteinů, ale přesto se jedná o významnou skupinu AMPs. Mají schopnost nevratně poškodit ribozomy a vyznačují se také svojí toxicitou. Dva zástupci této skupiny, ricin a abrin izolované z rostlin *Ricinus communis* a *Abrus precatorius* byly známy více jak století, ale až v roce 1982 byly tyto látky zařazeny do nově vzniklé skupiny RIPS, po zjištění schopnosti

inaktivovat ribozomy. Později bylo objeveno více látek se stejnými mechanismy. Byly objeveny u mnoha rostlinných druhů. Vyskytují se zejména u krytosemenných, jednoděložných i dvouděložných rostlin. U některých rostlin se vyskytují ve všech jejich částech rostlinného těla, zatímco u jiných třeba jen v jedné (Stirpe, 2004).

Proteiny inaktivující ribozomy jsou děleny do tří skupin. První skupinu tvoří jeden peptidický řetězec o velikosti 30 kDa. Druhá skupina nalezená v roce 1973 Olsnesem a Pihlem se skládá ze stejného řetězce jako první skupina a na ní napojený druhý, nepatrně větší řetězec o velikosti 35 kDa, který je schopný vázat sacharidy. Třetí skupina sestává z jednoho kontinuálního peptidického řetězce obsahující prodlouženou C-terminální doménu, jejíž funkce však nebyla objasněna (Stirpe, 2004; Park *et al.*, 2004).

Základní mechanismus účinku popisují v kapitole Mechanismy působení AMPs a spočívá v modifikaci ribozomů infikované buňky, narušení proteosyntézy a buněčné smrti.



Obr. 4: Biochemická podstata působení proteinů inaktivující ribozomy. Proteiny inaktivující ribozomy vykazují fosfatasovou aktivitu narušující fosfodiesterové vazby a zároveň RNA N-glykosidasovou aktivitu, která deadenyluje rRNA (převzato z Heřmanová *et al.*, 2006).

Některé experimenty s transgenními rostlinami však neprokázali přítomnost symptomů spontánní buněčné smrti v důsledku infekce a přesto byly tyto rostliny rezistentní vůči širokému okruhu patogenů (Park *et al.*, 2004).

Existuje mnoho dalších antimikrobiálních peptidů a proteinů, které není možné zařadit do výše uvedených skupin. Tyto proteiny a peptidy jsou prozkoumané jen málo a není ani znám mechanismus jejich působení.

5. VÝZKUM A VYUŽITÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ A PROTEINŮ

5.1 Využití antimikrobiálních peptidů a proteinů v lékařství a farmacii

První přímý důkaz o působení antimikrobiálních látek pochází z roku 1929, kdy byl zveřejněn objev prvního antibiotika – penicilinu sirem Alexanderem Flemिंगem. Ke konci 2. světové války byl zařazen do klinické praxe. V druhé polovině 20. století bylo objeveno mnoho dalších antibiotik účinných proti různým kmenům bakterií (Neubauerová *et al.*, 2009). Později se však s častým a nesprávným nasazováním antibiotik prokázal nárůst rezistence bakterií vůči antibiotikům a v současné době je potřeba hledat stále nová antibiotika, která budou proti bakteriím dostatečně účinná. Příkladem může být známá bakterie *Staphylococcus aureus*, která je již v současnosti rezistentní proti několika druhům antibiotik, například metilcinu (Portieles *et al.*, 2006).

V budoucnosti by narůstající antibiotická rezistence mohla způsobit velké problémy. Zejména v lékařství, kdy nebude čas ani prostředky pro objevování a tvorbu stále nových druhů antibiotik. Stejně tak by mohl tento problém postihnout živočišnou produkci, zejména oblasti aquakultury a chovu drůbeže, kde se antibiotika taktéž využívají a někdy i nadužívají. Antimikrobiální peptidy a proteiny se proto v nedávné době začaly jevit jako vhodná alternativa k širokospektrým antibiotikům.

Problémem však zůstává vyextrahované množství těchto látek, které je v podmínkách *in vivo* tak malé, že nemůže zdaleka pokrýt případnou potřebu pro velkovýrobu léků. Jediným způsobem masového využití antimikrobiálních peptidů a proteinů v této oblasti se proto jeví jejich chemická syntéza. Na přelomu 20. a 21. století se poprvé podařilo uměle syntetizovat antimikrobiální proteiny a peptidy pomocí geneticky modifikovaných organismů. Princip umělé syntézy AMPs spočívá v procesu transgenozy, kdy je vnesen do cílového organismu určitý gen kódující syntézu cílového peptidu. Tyto transgenní organismy jsou poté schopní syntetizovat

daný peptid. Například se prokázalo, že transgenní rostliny tabáku jsou takto schopné syntetizovat savčí AMPs (Marshall & Arenas, 2003).

5.1.1 Využití defensinů a γ -thioninů

V současnosti jsou studovány rostlinné AMPs, které by mohly mít zásadní přínos pro léčbu různých chorob a vývoj nových léků. Rostlinné a živočišné defensiny jsou jednou ze skupin AMPs, která by v budoucnosti mohla nahradit antibiotika nebo alespoň být jejich alternativou. Tyto peptidy mají schopnost přímo interagovat s buněčnou membránou patogena a měnit její vlastnosti. Pro patogena je ale obtížné rychle reagovat na tyto změny a bránit se tak defensinům. Kromě působení na buněčné membrány patogenního organismu mají defensiny schopnost blokovat iontové kanály a vyznačují se sladkou chutí, což také přispívá k jejich využitelnosti ve farmaceutickém průmyslu (Yang & Lyu, 2008).

Využití rostlinných defensinů při léčbě rakoviny a nádorů není významné oproti živočišným defensinům, které mají v této oblasti mnohem větší potenciál. Rostlinné defensiny jsou však perspektivní při léčbě houbových infekcí. Z rostlin *Dahlia merckii* a *Heuchera sanguinea* byly izolovány peptidy s aktivitou proti lidskému patogenu *Candida albicans*, způsobujícímu kvasinkovou infekci nazývanou kandidóza. Na tohoto patogena působí již ve velmi malých koncentracích, což umožňuje jejich potenciální využití pro vývoj nových léků (Portielas *et al.*, 2006). Pro svůj antifungální účinek se také zvažuje využití kukuřičného proteinu zeamatinu, taktéž k léčbě kandidózy (Heřmanová *et al.*, 2006).

Rostlinné α -thioniny se rovněž ukázaly jako vhodnou alternativou k antibiotikům. Jejich antifungální působení může být využito k léčbě dermatofytózy. Baktericidní účinek pomáhá při léčbě pulmonálních a nosokomiálních infekcí. Pro jejich schopnost inhibovat růst savčích buněk se uvažuje o budoucím využití při vývoji nových antikarcinogenních léků. Díky své specifitě mohou také pravděpodobně omezit vedlejší účinky běžné při léčbě těchto onemocnění (Pelegriani & Franco, 2005).

5.1.2 Využití proteinů inaktivujících ribozomy

Další významnou skupinou s potencionálním využitím v lékařství a farmacii jsou zejména proteiny inaktivující ribozomy, u kterých se prokázaly zajímavé a účinné mechanismy působení proti rostlinným i živočišným virům. Jedná se například o protein PAP, o kterém se podrobněji zmiňuji výše v kapitole 3.3.2.

Mimoto se u těchto proteinů prokázala rozdílná toxicita vůči normálním a nádorovým buňkám člověka a také schopnost imunosuprese. Proto se začalo uvažovat o využití těchto látek při přípravě antikarcinogenních léků, imunotoxinů a imunosupresiv. S proteiny inaktivujícími ribozomy byla provedena řada klinických experimentů, při kterých byla většina z nich využita k léčbě rakoviny, zejména leukémie. Některé byly použity pro léčbu cukrovky. Přestože byly výsledky těchto experimentů povzbudivé, stále se vyskytují překážky pro využití těchto látek v širším měřítku. Hlavním problémem je, že při dlouhodobém působení oslabují imunitní systém člověka. Avšak tento problém při léčbě by mohlo zmírnit vylepšení imunosupresivní léčby nebo použití specifických protilátek a rekombinantních enzymů (Stirpe, 2004).

5.2 Využití antimikrobiálních peptidů v biotechnologiích a zemědělství

5.2.1 Využití defensinů a γ -thioninů

S rozvojem biotechnologií a diagnostiky rostlinných chorob se začalo v nedávné době uvažovat o využití antimikrobiálních peptidů a proteinů v oblasti ochrany rostlin před jejich chorobami. Jednou z možností jak tuto ochranu zvýšit je přenos genů odpovědných za syntézu specifických antimikrobiálních peptidů do cílových rostlin a jejich exprese v nich. Tyto transgenní rostliny se vyznačují zvýšenou rezistencí vůči chorobám. Nejčastěji se využívá přenosu genů kódující defensiny, ale zvýšená odolnost byla prokázána například i u rostlin tabáku proti patogenu *Alternaria alternata* po vnesení genů z rýže kódující syntézu proteinů podobné thaumatinu nebo u pšenice proti *Fusarium graminearum* po vnesení genů kódujících syntézu chitinas, β -glukanas a proteinů přenášejících lipidy

(Heřmanová *et al.*, 2006). Nejčastější výskyt defensinů v transgenních rostlinách je uveden v následující tabulce.

Tab. 3: Příklady využití transgenozy rostlinných AMPs (upraveno podle Lay & Anderson, 2005).

Transgeny	Zdrojová rostlina	Cílená rostlina	Promotor	Rezistence k patogenům
<i>Rs-AFP2</i>	ředkvička	tabák	CaMV 35S	<i>Alternaria longipes</i>
<i>Rs-AFP2</i>	ředkvička	rajče, řepka olejka	CaMV 35S	<i>Alternaria solani</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Verticillium dahliae</i>
<i>AlfAFP</i>	vojtěška	brambory	FiMV 35S	<i>Verticillium dahliae</i>
<i>Spil</i>	smrk	tabák, embryonální kultury smrku	CaMV 35S	<i>Erwinia carotovora</i> , <i>Heterobasidion annosum</i>
<i>DRR230-a</i>	hrách	jarní řepka	CaMV 35S	<i>Leptosphaeria maculans</i>
<i>DRR230-a</i> <i>DRR230-c</i>	hrách	tabák	Duplikovaný CaMV 35S	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Ascochyta pinodes</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Ascochyta lentis</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i> , <i>Ascochyta pisi</i> , <i>Alternaria alternata</i>
<i>BSD1</i>	čínské zelí	tabák	CaMV 35S	<i>Phytophthora parasitica</i>
<i>WT1</i>	Wasabi	rýže	Kukuřičný Ubiquitin-1	<i>Magnaporthe grisea</i>

Expresí vložených genů rostlinných defensinů a následná biosyntéza antimikrobiálních peptidů zvyšuje odolnost vegetativních orgánů rostlin proti napadení. Předpokládá se, že aktivita antimikrobiálních peptidů *in vivo* by se mohla zlepšit díky interakci s dalšími složkami přirozené imunity. Některé antimikrobiální peptidy mohou být také vylepšovány nebo mohou měnit svoji aktivitu. Například u antifungálního peptidu heliomicinu, vyskytujícího se u hmyzu, se prokázalo, že nahrazením dvou molekul aminokyseliny leucinu na konci α -šroubovice získává tento peptid antibakteriální aktivitu, aniž by ztratil aktivitu antifungální (Thomma *et al.*, 2002).

Pro ochranu rostlin pomocí transgenozy jsou kromě defensinů a ostatních AMPs využívány také γ -thioniny, které jsou defensinům podobné. Transgenické rostliny obsahující geny kódující γ -thioniny zvyšují rezistenci vůči mikrobiálním patogenům a tím redukuje ztráty a nutnost použití pesticidů. Například geny z ovsa byly přeneseny do rostlin rýže pro zvýšení odolnosti vůči bakteriím. Geny ječmene kódující α -hordothioniny pomohli zvýšit odolnost tabáku vůči významné bakterii *Pseudomonas syringae*. Kromě zvýšení rezistence vůči patogenům se α -thioniny využívají také ke zvýšení odolnosti vůči chladnému počasí (Pelegriani & Franco, 2005).

5.2.2 Syntetické peptidy

Kromě přírodních AMPs se v obraně proti patogenům využívají také uměle syntetizované peptidy. Využívá se zejména syntéza antimikrobiálních peptidů odvozených od přirozených bakteriálních, živočišných i rostlinných peptidů. Z rostlinných AMPs se využívá například peptid Rs-AFP2, který byl odvozen od defensinu izolovaného z ředkvičky, a který inhibuje růst některých hub. Peptid D32R je podobný thioninu z rostliny *Pyrularia Pubera* a je aktivní proti fytopatogenním houbám, například *Fusarium oxysporum*, *Plectosphaerella cucumerina* a *Botrytis cinerea* také proti bakteriím *Xanthomonas campestris* nebo *Claviceps michiganensis*. Kromě odvozených antimikrobiálních peptidů byly vytvořeny také nové, kompletně syntetické peptidy v rámci kombinatoriální chemie. Tyto peptidy jsou aktivní proti mnoha zástupcům hub a bakterií (Montesinos, 2007).

Pro masové využití antimikrobiálních peptidů v ochraně zemědělských plodin je třeba se snažit zvyšovat stabilitu těchto peptidů a zároveň snižovat cytotoxicitu.

5.3 Ostatní využití rostlinných antimikrobiálních peptidů a proteinů

Kromě výše zmiňovaných aplikací AMPs se objevily také další možnosti využití těchto proteinů a peptidů.

Jak již bylo řečeno, proteiny inaktivující ribozomy se kromě svého antimikrobiálního působení vyznačují také vysokou cytotoxicitou. Proto je třeba zacházet s těmito látkami velmi opatrně. Jeden z těchto proteinů, ricin, který byl

izolován z rostliny *Ricinus communis*, byl patentován jako biologická zbraň. Díky této skutečnosti by tak mohl být použitelný při vývoji nových zbraní nebo terorismu. Znepokojující je také fakt, že ricin se dá snadno aplikovat rozprášením ve vzduchu ve formě aerosolu a inhalací intoxikovat organismus. Laboratorní pokusy na zvířatech prokázaly, že ricin postihuje zejména dýchací soustavu, způsobuje plicní edém, poškození alveolů a následné poruchy dýchání, které mohou přivodit smrt. Ochranu před intoxikací by mohla poskytnout vakcinace nebo podání protilátky. Byly také vyvinuty biosenzory, které dokážou rychle odhalit přítomnost ricinu i ostatních toxinů (Stirpe, 2004).

Kromě výše zmiňovaných způsobů se dají antimikrobiální peptidy a proteiny využít také v potravinářství. Využívají se zejména antimikrobiální peptidy produkované bakteriemi, tedy bakteriociny, například bakteriociny produkované bakteriemi mléčného kvašení nebo antimikrobiální proteiny obalené liposomy. Znamý je zejména protein nisin produkovaný bakteriemi rodu *Lactococcus*, který se již v potravinářství běžně používá. Antimikrobiální proteiny slouží k ochraně potravin před degradací způsobených různými mikrobiálními patogeny a ke konzervaci, snižují také pH (Malheiros, 2010). Tyto biokonzervanty mají velkou perspektivu a do budoucna se předpokládá jejich široké využití v potravinářství.

6. DISKUZE A ZÁVĚR

Jak již bylo uvedeno, antimikrobiální peptidy a proteiny jsou velice důležitou součástí nespecifické imunity většiny organismů a díky jejich objevení se nám podařilo objasnit některé, dříve nevysvětlitelné mechanismy působení imunitního systému. Přestože v mnoha případech není oblast antimikrobiálních peptidů a proteinů zcela prozkoumaná, díky svým vlastnostem a účinkům se některé skupiny využívají v určitých oblastech již v současnosti. Podle mého názoru je nutné pokračovat ve výzkumu a využití těchto látek zejména v oblasti farmaceutického průmyslu. Narůstající bakteriální rezistence je hrozbou, kterou není možné ignorovat, a proto je třeba hledat nové alternativy k širokospektrým antibiotikům. Rostlinné i živočišné AMPs se jeví právě jako jedna z nejvhodnějších alternativ. Proto je podle mého názoru nezbytné soustředit se na vývoj a výzkum těchto látek primárně v této oblasti ať už se jedná o látky získané přirozenou cestou nebo umělou syntézou. Tyto proteiny by poté mohly přispět k výrobě nových léků, které by mohly nahradit nebo alespoň doplnit léčbu za pomoci antibiotik. Proteiny inaktivující ribozomy a stejně tak γ -thioniny se prokázaly svými antikarcinogenními účinky díky toxicitě k nádorovým buňkám. Proto by bylo dobré soustředit se na výzkum těchto proteinů zejména v této oblasti a případně je využít při nových metodách léčby rakovinných onemocnění nebo přípravě antikarcinogenních léků. V součinnosti s různými antioxidanty by mohly podle mého názoru pomoci zastavit průběh rakovinotvorného bujení.

Rostlinné antimikrobiální peptidy a proteiny se také využívají při cílené ochraně před rostlinnými chorobami pomocí procesu transgenozy. Se zdokonalováním metod genetického inženýrství budou podle mého názoru stále více využívány antimikrobiální peptidy ke zvyšování ochrany před rostlinnými chorobami. Využívání těchto peptidů by také přispělo k omezení používání pesticidů a podobných přípravků a navíc by snížilo sklizňové ztráty. Problémem v budoucnosti by však mohl být narůstající odpor a protesty některých ekologických organizací a skupin, které nepodporují či odmítají využívání genových manipulací a geneticky modifikovaných organismů. I přes tuto kontroverzi považuji využití antimikrobiálních peptidů a proteinů k ochraně zemědělských plodin proti rostlinným chorobám za perspektivní a je třeba nadále věnovat této problematice pozornost.

V oblasti potravinářství by kromě živočišných a bakteriálních antimikrobiálních peptidů mohly i rostlinné přispět k tvorbě nových preparátů, které zvyšují trvanlivost potravin, případně jejich přímé využití jako biokonzervantů. V této oblasti se však v současnosti preferuje zejména využití antimikrobiálních peptidů produkovaných laktobakteriemi, například nisin, jehož využití se osvědčilo a je poměrně rozšířené. Možná aplikace rostlinných peptidů v potravinářství je proto nyní spíše otázkou teorie a je třeba nadále studovat vlastnosti rostlinných AMPs, které by se v tomto směru daly v širším měřítku využít.

Jak jsem již uvedl, antimikrobiální peptidy a proteiny jsou velice širokou a ne zcela popsanou skupinou a denně jsou objevováni noví zástupci. Potenciál využití rostlinných antimikrobiálních peptidů je podle mého názoru velký ať už jde o lékařství, zemědělství či jiné oblasti lidské činnosti. Je proto potřeba i nadále objevovat nové a spolu s již objevenými studovat jejich vlastnosti a působení a také vytvářet prostor k jejich možnému využití.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Alberts, B. (1998): Essential cell biology: an introduction to the molecular biology of the cell. Garland, New York, USA.

Andreu, D. and Rivas, L. (1998): Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47: 415-433.

Azzouz, H., Cherqui, A., Campan, E. D. M., Rahbé, Y., Duport, G., Jouanin, L., Kaiser, L. and Giordanengo, P. (2005): Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). *Journal of Insect Physiology* 51: 75-86.

Bernier, F. and Berna, A. (2001): Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 545-554.

Bonness, M. S., Ready, M. P., Irvin, J. D. and Mabry T. J. (1994): Pokeweed antiviral protein inactivates pokeweed ribosomes; implications for the antiviral mechanism. *The Plant Journal* 5: 173-183.

Carriel-Gomes, M. C., Kratz, J. M., Barracco, M. A., Bachére, E., Barardi, C. R. M. and Simões, C. M. O. (2007): In vitro activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 469-472.

Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Llobès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. and Cavard, D. (2007): Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 158-229.

Castro, M. S. and Fontes W. (2005): Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein and Peptide Letters* 12: 11-16.

Clark, D. P. (2005): Molecular biology: understanding of the genetic revolution. Elsevier Science, Amsterdam.

Doumbou, C. L., Salove, M. K. H., Crawford, D. L. and Beaulieu, C. (2002): Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82: 85-102.

Edreva, A. (2005): Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *General and Applied Plant Physiology* 31: 105-124.

Fritig, B., Heitz, T. and Legrand, M. (1998): Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology* 10: 16-22.

Guevara-Morato, M. A., de Lacoba, M. G., García-Luque, I. and Serra, M. T. (2010): Characterization of a pathogenesis-related protein 4 (PR-4) induced *Capsicum chinense* L³ plants with dual RNase DNase activities. *Journal of Experimental Botany* 61: 3259-3271.

Habib, H. and Fazili K. M. (2007): Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2: 68-85.

Hancock, R. E. W. and Scott, M. G. (2000): The role of cationic antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 8856-8861.

Harris, F., Dennison, S. R. and Phoenix, D. A. (2009): Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Current Protein and Peptide Science* 10: 586-606.

Heřmanová, V., Bárta, J. a Čurn, V. (2006): Antifungální proteiny rostlin - klasifikace, charakteristika, možnosti využití. *Chemické Listy* 100: 495-500.

Holland, D., Faltin, Z., Perl, A., Ben-Hayyim, G. and Ehdar, Y. (1994): A novel plant glutathione peroxidase-like protein provides tolerance to oxygen radicals generated by paraquat in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 337: 52-55.

Hu, X. and Reddy, A. S. N. (1997): Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Molecular Biology* 34: 949-959.

Hur, Y., Hwang, D. J., Zoubenko, O., Coetzer, C., Uckun F. M. and Tumer, N. E. (1995): Isolation and characterization of pokeweed antiviral protein mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of residues important to toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 8448-8452.

Chou, H. T., Wen, H. W., Kuo, T. Y., Lin, C. C. and Chen, W. J. (2010): Interaction of cationic antimicrobial peptides with phospholipid vesicles nad their antibacterial activity. *Peptides* 31: 1811-1820.

Jenssen, H., Hamill, P. and Hancock, R. E. W. (2006): Peptide Antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 19: 491-511.

Johnson, E. A. and Larson, A. E. (2005): Lysozyme. In **Davidson, P. M., Sofos, J. N. and Branen A. L. (eds.)** *Antimicrobials in Food*. CRC Press. pp. 361-378.

Kasprzewska, A. (2003): Plant chitinases – regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters* 8: 809-824.

Kav, N. N. V., Srivastava, S., Goonewardene, L. and Blade, S. F. (2004): Proteome-level changes in the roots of *Pisum sativum* in response to salinity. *Annals of Applied Biology* 145: 217-230.

Lay, F. T. and Anderson, M. A. (2005): Defensins – components of the innate immune system in plants. *Current Protein and Peptide Science* 6: 85-101.

Malangon, R. F. (2010): Design and synthesis of short antimicrobial peptides for plant protection. Study of their mode of action: *dissertation*. Girona: Universitat de Girona. p. 138.

Malheiros, P. S., Micheletto, Y. M. S., da Silveria, N. P. and Brandelli, A. (2010): Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International* 45: 1198-1203.

Marshall, S. H. and Arenas, G. (2003): Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and potential for applied biotechnology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 233-243.

Monroc, S. M. C. (2007): Synthesis and evaluation of cyclic cationic peptides as antimicrobial agents for use in plant protection: *dissertation*. Girona: Universitat de Girona. p. 107.

Montesinos, E. (2007): Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters* 270: 1-11.

Neubauerová, T., Macková, M., Macek, T. a Koutek, B. (2009): Kationické antimikrobiální peptidy. *Chemické Listy* 103: 460-468.

Nieuwland, J., Feron, R., Huisman, B. A. H., Fasolino, A., Hilbers, C. W., Derksen, J. and Mariani, C. (2005): Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in Tobacco. *The Plant Cell* 17: 2009-2019.

Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I., Onilude, A. A. (2003): Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology* 2: 219-227

Park, S. W., Vepachedu, R., Sharma, N. and Vivanco, J. M. (2004): Ribosome-inactivating proteins in plant biology. *Planta* 219: 1093-1096.

Pelegriani, P. B. and Franco, O. L. (2005): Plant γ -thionins: novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 2239-2253.

Piggot, N., Ekramoddoullah A. K. M., Liu, J. J. and Yu, X. (2004): Gene cloning and expression of a thaumatin-like protein of western white pine (*Pinus monticola* D. Don) *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64: 1-8.

Portieles, R., Ayra, C. and Borrás, O. (2006): Basic insight of plant defensins. *Biotechnología Aplicada* 23: 75-78.

Punja, Z. K. and Zhang Y. Y. (1993): Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology* 25: 526-540.

Rosypal, S. (1997): Úvod do molekulární biologie – První díl. Grafex, Brno.

Selitrennikoff, C. P. (2001): Antifungal proteins. *Applied and environmental microbiology* 67: 2883-2894.

Shand, R. F. and Leyva, K. J. (2008): Archaeal Antimicrobials: An Undiscovered Country. In **Blum, P.** (ed.). *Archaea: new models for prokaryotic biology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK. pp. 233-245.

Shubakov, A. A., Kucheryavykh, P. S. (2004): Chitinolytic activity of filamentous fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40: 445-447.

Snustad, D. P., Simmons M. J. 2009: *Genetika*. Nakladatelství Masarykovy univerzity, Brno

Stec, B. (2006): Plant thionins – the structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 1370-1385.

Stirpe, F. (2004): Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44: 371-383.

Strominger, J. L. (2010): Animal antimicrobial peptides: ancient players in innate immunity. *The Journal of Immunology* 182: 6633-6634.

Thomma, B. P. H. J. and Cammue B. P. A. (2002): Plant defensins. *Planta* 216: 193-202.

Van Loon, L. C. and 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.

Walter, M. H., Liu, J. W., Wünn, J. and Hess, D. (1996): Bean ribonuclease-like pathogenesis-related protein genes (*Ypr10*) display complex patterns of developmental, dark-induced and exogenous-stimulus-dependent expression. *European Journal of Biochemistry* 239: 281-293.

Wang, G., Li, X. and Wang, Z. (2008): APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research* 37: 933-937.

Wang, G., Li, X., Zasloff, M. (2010): A database view of naturally occurring antimicrobial peptides: nomenclature, classification and amino acid sequence analysis. In **Wang, G.** (ed.). *Antimicrobial Peptides: Discovery, Design, and Novel Therapeutic Strategies*. CABI, Cambridge, USA. pp. 1-21.

Yang, Y. F. and Lyu P. C. (2008): The proteins of plant defensin family and their application beyond plant disease control. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 2: 214-218.

Zasloff, M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

Zubini, P., Zambelli, B., Musiani, F., Ciurli, S., Bertolini, P. and Baraldi, E. (2009): The RNA hydrolysis and the cytokinin binding activities of PR-10 proteins are differently performed by two isoforms of the Pru p 1 peach major allergen and are possibly functionally related. *Plant Physiology* 150: 1235-1247.

Ostatní zdroje:

CAMP (*Collection of Anti-microbial Peptides*)

URL: <http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial/stat.php> (15.11. 2010)