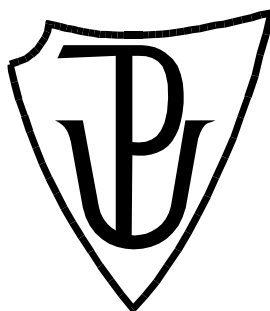


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Katedra biochémie



Využitie rastlinného expresného systému pre produkciu biologicky aktívneho antimikrobiálneho peptidu.

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor:	Bc. Veronika Janechová
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný obor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	Mgr. Alžbeta Mičúchová
Rok:	2018

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

V Olomouci dňa

.....

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala vedúcej mojej diplomovej práce Mgr. Alžbete Mičúchovej a Mgr. Edite Holáskovej za ich cenné rady a pripomienky. Rovnako by som rada poďakovala všetkým zamestnancom CRH – Oddelenie molekulárnej biológie za ich vrelý a priateľský prístup.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKÁCIA

Meno a priezvisko autora	Bc. Veronika Janechová
Názov práce	Využitie rastlinného expresného systému pre produkciu biologicky aktívneho antimikrobiálneho peptidu.
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Alžbeta Mičúchová
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Súčasný tlak súvisiaci s nárastom bakteriálnej rezistencie voči antibiotikám vedie výskum k hľadaniu nových možností liečby bakteriálnych ochorení. Ako jednou z možností riešenia tohto problému sa javí využitie antimikrobiálnych peptidov, ktoré sú známe vďaka svojmu širokospektrálnemu pôsobeniu voči celej rade bakteriálnych kmeňov. Navyše, metódy rastlinnej biotechnológie s využitím obilnín, ako expresných systémov, umožňujú produkciu antimikrobiálnych peptidov vo veľkom meradle a s možnosťou jeho dlhodobého uskladnenia v biologicky aktívnej forme v inertnom prostredí endospermu obilných zŕn. V experimentálnej časti diplomovej práce bola analyzovaná T1 a T2 generácia transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) exprimujúcich rekombinantný antimikrobiálny peptid LL-37 zo skupiny katelicidínov. U transgénnych rastlín bol sledovaný vplyv expresie rekombinantného peptidu na fenotyp. Prítomnosť transgénu v genóme rastlín T2 generácie bol potvrdený pomocou metódy konvenčnej PCR. Následne bol rekombinantný peptid detegovaný vo vegetatívnych orgánoch a v zrnách transgénnych rastlín T1 a T2 generácie na proteínovej úrovni pomocou metódy Western blot. Zároveň bolo overené uskladnenie rekombinantného peptidu LL-37 v rámci endospermu zreých zŕn metódou imunolokalizácie. Taktiež bola overená biologická aktivita rekombinantného katelicidínu voči baktériam *Escherichia coli* TOP10 a *Micrococcus luteus*. V neposlednom rade bola vykonaná dvojkroková purifikácia rekombinantného produktu extahovaného zo zŕn transgénnych rastlín jačmeňa založenej na metalo-chelátovej afinitnej chromatografii.

Kľúčové slová	antimikrobiálna rezistencia, antimikrobiálne peptidy, katelicidín LL-37, transgénny jačmeň
Počet strán	97
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname	Bc. Veronika Janechová
Title	Using of plant expression system for the production of biologically active antimicrobial peptide.
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Alžbeta Mičúchová
The year of presentation	2018

Abstract

The current pressure associated with the increase of bacterial resistance against antibiotics leads to research to find new ways of treating bacterial diseases. One of the possibilities of solving this problem is the use of antimicrobial peptides well known for their broad-spectrum activity against a various bacterial strain. In addition, methods of plant biotechnology using cereals, as expression systems, allow the production of antimicrobial peptides in large scale. Also, targeting and production of antimicrobial peptides in the inert environment of the grain endosperm allows its long-term storage in a biologically active form. In experimental part of this diploma thesis, T1 and T2 generations of transgenic barley plants (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) expressing recombinant antimicrobial peptide LL-37 from the group of cathelicidins were analysed. At first, effect of recombinant product expression on phenotype of transgenic barley was studied. Presence of transgene in plant's genome of T2 plants was confirmed by conventional PCR. Subsequently, the recombinant peptide was detected in the vegetative organs and in the grains of the T1 and T2 transgenic plants at the protein level using the Western blot method. Furthermore, the storage of the recombinant peptide LL-37 within the mature grains endosperm was confirmed by the immunolocalization. The biological activity of recombinant peptide against *Escherichia coli* TOP10 and *Micrococcus luteus* was also verified. Finally, two step purification of the recombinant product extracted from transgenic barley grains was purified by two-step purification process based on metal-affinity chromatography.

Keywords	antimicrobial resistance, antimicrobial peptides, cathelicidin LL-37, transgenic barley
Number of pages	97
Number of appendices	0
Language	Slovak

OBSAH

1	ÚVOD	12
2	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	13
2.1	Antibiotiká a bakteriálna rezistencia voči nim	13
2.1.1	Prirodzená antibiotická rezistencia	15
2.1.2	Získaná antibiotická rezistencia	17
2.2	Náhrada súčasných antibiotík v liečbe bakteriálnych infekcií	18
2.2.1	Bakteriofágy editované systémom CRISPR-Cas	20
2.2.2	Nanočastice kovov	21
2.2.3	Predátorské baktérie	22
2.2.4	Kombinácia antibiotík alebo inovácia pôvodných antibiotík	24
2.2.5	Antimikrobiálne peptidy	25
2.3	Subcelulárna lokalizácia rekombinantného proteínu v obilnom zrne	28
2.3.1	Vakuoly pre uskladnenie proteínov (PSV)	29
2.3.2	Endoplazmatické retikulum (ER)	30
2.3.3	Proteínové telieska (PBs)	31
2.3.4	Škrobové zrná	33
2.3.5	Olejové telieska	33
2.3.6	Chloroplasty	34
2.3.7	Mitochondrie	35
2.3.8	Cytozol a apoplast	35
2.4	Metódy testovania antimikrobiálnej aktivity	36
2.4.1	Difúzne metódy	37
2.4.1.1	Metóda diskov	37
2.4.1.2	Gradientová metóda	37
2.4.1.3	Jamková metóda	38
2.4.1.4	Metóda agarovej zátky	38
2.4.1.5	Krížová metóda	38
2.4.1.6	Metóda otráveného jedla	40
2.4.2	Metódy založené na chromatografii na tenkej vrstve	40
2.4.2.1	Priama bioautografia	40
2.4.2.2	Metóda prekrytia agarom	40
2.4.3	Riediace metódy	40
2.4.3.1	Riediaci metóda s použitím tekutého média	41
2.4.3.2	Agarová riediaci metóda	41
2.4.4	Ostatné používané metódy	41

3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	43
3.1	Materiál	43
3.1.1	Biologický materiál	43
3.1.2	Chemikálie, kity a gély	43
3.1.3	Prístroje a vybavenie	45
3.1.4	Iné	46
3.1.5	Počítačové programy	46
3.1.6	Použité roztoky a média	47
3.2	Metódy	50
3.2.1	Analýza a selekcia transgénnych rastlín jačmeňa	50
3.2.1.1	Izolácia genómovej DNA (Edwards <i>et al.</i> , 1991)	50
3.2.1.2	PCR	50
3.2.1.3	Agarózová elektroforéza	51
3.2.2	Analýza hladiny expresie transgénu	52
3.2.2.1	Izolácia RNA	52
3.2.2.2	Odstránenie DNA kontaminácie z vyizolovanej RNA	52
3.2.2.3	Prečistenie RNA pomocou Agencourt RNAClean XP	52
3.2.2.4	Meranie koncentrácie RNA	53
3.2.2.5	Syntéza cDNA	53
3.2.2.6	Semikvantitatívna RT-PCR	53
3.2.3	Imunodetekcia rekombinantného peptidu metódou Western blot	55
3.2.3.1	Izolácia proteínov uložených v proteínových telieskach	55
3.2.3.2	Izolácia proteínov uložených v proteínových telieskach získaných zo zrelých zŕn	55
3.2.3.3	Extrakcia proteínov zo zŕn jačmeňa (získanie hrubého proteínového extraktu)	55
3.2.3.4	Purifikácia proteínového extraktu pomocou metalo-chelátová afinitnej chromatografie	56
3.2.3.5	Purifikácia rekombinantného produktu pomocou afinitnej chromatografie na amylózovej matrici	56
3.2.3.6	Zakoncentrovanie proteínového eluátu	57
3.2.3.7	Štiepenie rekombinantného produktu enterokinázou	57
3.2.3.8	Precipitácia proteínov	57
3.2.3.9	Denaturačná polyakrylamidová gélová elektroforéza (SDS-PAGE)	57
3.2.3.10	Prenesenie proteínov na polyvinylidén fluoridovú membránu	58
3.2.3.11	Imunodetekcia rekombinantného peptidu LL-37	58
3.2.4	Testovanie antimikrobiálnej aktivity peptidu LL-37	59
3.2.4.1	Kultivácia bakteriálneho kmeňa <i>Escherichia coli</i> TOP10	59

3.2.4.2	Kultivácia bakteriálneho kmeňa <i>Micrococcus Luteus</i>	59
3.2.4.3	Testovanie antimikrobiálnej aktivity	59
3.2.5	<i>In situ</i> imunolokalizácia rekombinantného peptidu LL-37	60
3.2.6	Dvojkroková purifikácia proteínového extraktu s cieľom získania čistého rekombinantného produktu	61
3.2.6.1	Farbenie striebrom	62
4	VÝSLEDKY	63
4.1	Analýza T1 generácie transgénnych línií jačmeňa siateho (<i>Hordeum vulgare</i> L., cv. Golden promise)	63
4.1.1	Fenotypizácia	63
4.1.2	Analýza transgénnych línií jačmeňa na proteínovej úrovni	64
4.1.3	Analýza transgénnych rastlín T1 generácie s integrovaným transgénom <i>UBI1p::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL</i> na RNA úrovni	65
4.1.4	Imunolokalizácia rekombinantného peptidu LL-37 v zreých zrnách T1 generácie transgénnych línií jačmeňa	67
4.1.5	Testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantného peptidu LL-37 voči baktérii <i>Escherichia coli</i> TOP 10	68
4.1.6	Testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantného peptidu voči baktérii <i>Micrococcus Luteus</i>	69
4.2	Analýza T2 generácie transgénnych línií jačmeňa siateho (<i>Hordeum vulgare</i> L., cv. Golden promise)	70
4.2.1	Genotypizácia transgénnych rastlín	70
4.2.2	Fenotypizácia transgénnych línií T2 generácie	71
4.2.3	Analýza transgénnych rastlín jačmeňa T2 generácie na proteínovej úrovni	73
4.2.3.1	Analýza proteínového extraktu purifikovaného pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie	73
4.2.3.2	Analýza proteínov izolovaných z proteínových teliesok	76
4.2.4	Kvantifikovanie výťažkov rekombinantného peptidu LL-37	77
4.2.5	Imunolokalizácia rekombinantného peptidu LL-37 v zreých zrnách T2 generácie transgénnych línií jačmeňa	78
4.3	Dvojkroková purifikácia rekombinantného peptidu LL-37 z hrubého proteínového extraktu pomocou afinitnej chromatografie s cieľom získania čistého produktu	79
5	DISKUSIA	82
6	ZÁVER	87
7	LITERATÚRA	90
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	97

CIELE PRÁCE

Teoretická časť:

- Vypracovať literárnu rešerš na tému antibiotickej rezistencie baktérií, možnosti jej riešenia so zameraním na rekombinantne pripravené antimikrobiálne peptidy
- Vypracovať literárnu rešerš na tému subcelulárneho zacielenia rekombinantných látok, testovania antimikrobiálnej aktivity biologicky aktívnych látok a ich purifikácie z jednotlivých subcelulárnych organel

Experimentálna časť:

- Fenotypová a genotypová analýza transgénnych rastlín jačmeňa
- Izolácia antimikrobiálneho peptidu v rôznych vývojových štádiách rastliny a jeho imunodetekcia
- Imunolokalizácia rekombinantného peptidu
- Optimalizácia parametrov pre robustnú a účinnú purifikáciu rekombinantného peptidu zo zrn transgénneho jačmeňa
- Testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantného peptidu voči gram-pozitívnej a gram-negatívnej baktérií

1 ÚVOD

Antibiotická rezistencia baktérií predstavuje v súčasnosti celosvetový problém ohrozujúci ľudské zdravie v stále väčšej miere. Hoci antibiotiká od svojho objavu v 20. storočí zachránili mnoho ľudských životov a predstavovali významný míľnik v oblasti medicíny, v súčasnosti je vznik bakteriálnej rezistencie voči nim urýchlený hlavne vďaka ich nadmernému používaniu, čím vzniká riziko šírenia rezistentných kmeňov baktérií v populácií. Z toho dôvodu, je neustále viac žiaduce hľadať vhodné náhrady antibiotickej liečby, ktoré by boli voči rezistentným kmeňom baktérií účinné. Antimikrobiálne peptidy predstavujú jedno z možných riešení. Ide o evolučne vysoko konzervované oligopeptidy, ktoré sa ako súčasť imunitného systému vyskytujú takmer u všetkých druhoch živých organizmov, od prokaryot až po človeka (Hancock, 2000). Okrem toho sa vyznačujú vysoko selektívnou aktivitou proti širokému spektru mikroorganizmov, prevažne kvôli ich relatívne silnej elektrostatickej interakcii s negatívne nabitými bakteriálnymi membránami (Nguyen *et al.*, 2011). Od roku 1922, kedy bol objavený prvý ľudský antimikrobiálny peptid lyzozým, bolo identifikovaných viac než 2500 antimikrobiálnych peptidov v jednobunkových organizmoch, v rastlinách, v hmyze a živočíchoch (Zhang a Gallo, 2016). Avšak aplikácia antimikrobiálnych peptidov vo farmaceutickom priemysle, aj napriek ich rozsiahlemu výskytu, je obmedzená predovšetkým z dôvodu ich finančne náročnej produkcie. Využitie rastlinných expresných systémov pre produkciu terapeuticky významných látok, tzv. molekulárne farmárčenie, sa javí ako možné riešenie produkcie antimikrobiálnych peptidov. Ideálny rastlinný expresný systém je totiž schopný jednoduchej, rýchlej, robustnej a ekonomicky nenáročnej produkcie rekombinantného peptidu dokonca v jeho biologicky aktívnej forme. Taktiež je pre následné terapeutické účely potrebné získať pomerne čistý produkt bez prípadnej kontaminácie ľudskými alebo zvieracími patogénmi (Demain a Vaishnav, 2009). Mnoho z týchto požiadaviek spĺňa práve obilné zrno. Významná je predovšetkým možnosť zacielenia produkcie rekombinantných peptidov do chemicky stabilného prostredia endospermu obilných zrn, ktoré teoreticky umožňuje jeho dlhodobé uskladnenie. Na základe uvedených výhod sa v súčasnosti obilniny stávajú populárnou produkčnou platformou mnohých terapeutických látok.

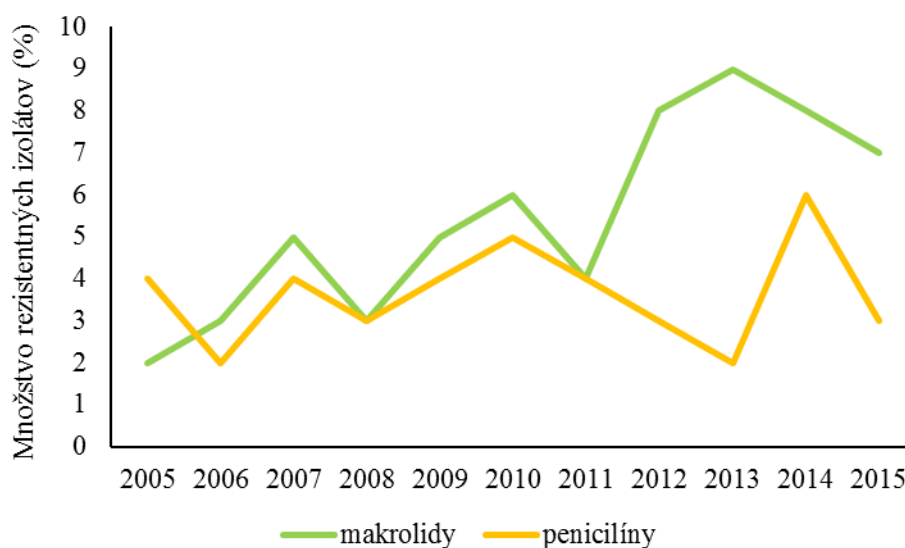
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Antibiotiká a bakteriálna rezistencia voči nim

Pojem antibiotikum bol po prvýkrát použitý v roku 1941 Selmanom Waksmanom pre popis malej molekuly, ktorá je produkovaná mikróbom a spôsobuje inhibíciu rastu iných mikróbov. V súčasnosti sú antibiotiká definované ako typ antimikrobiálnych látok používaných k liečbe a prevencii bakteriálnych infekcií. Tieto látky inhibujú bakteriálny rast, zabraňujú ich reprodukcii alebo ich priamo usmrcujú. Niektoré tiež vykazujú antiprotozoálnu aktivitu, teda aktivitu voči jednobunkovým živočíchom ako napríklad metronidazol, daktylarín, sulfonamidy, trimethoprim (<https://www.britanica.com/science/antiprotozoal-drug>, <http://www.antibioticsinfo.org/metronidazole.html> stiahnuté 20.4.2018; Kettner *et al.*, 1973). V súčasnej dobe je známych niekoľko stoviek antibiotík, ktoré sa delia na základe chemickej štruktúry, mechanizmu pôsobenia voči baktériam, spektra antibakteriálnej aktivity alebo na základe zdroja, z ktorého pochádzajú. V rokoch 1945 sa začala tzv. „zlatá éra“ antibiotík, ktorá sa spája s menom Paula Ehrlicha. Ten sa zaslúžil o prípravu syntetickej antibakteriálnej látky na liečbu syfilisu. Napriek mnohým negatívnym účinkom bola látka uvedená na trh firmou Hoechst pod názvom Salvarsan (neskôr pod názvom Neosalvarsan), až kým ich nenahradil penicilín objavený Sirom Alexandrom Flemingom (Mahoney *et al.*, 1943). Postupne boli objavené penicilíny, tetracyklíny a ďalšie účinné typy antibiotík so širokou škálou účinnosti. Už v tej dobe sa však predpokladal vývoj bakteriálnej rezistencie. Svetová zdravotnícka organizácia (World Health Organisation, WHO; Ženeva, Švajčiarsko) definuje antimikrobiálnu rezistenciu ako odolnosť mikroorganizmu voči antimikrobiálnej látke, ktorá bola pôvodne úspešne použitá na liečbu infekcie spôsobenej daným mikroorganizmom (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>, stiahnuté 20.1.2018). Bakteriálna rezistencia je predovšetkým prirodzený proces, ku ktorému dochádzalo už dlhú dobu pred objavom moderných antibiotík. D'Costa *et al.* v roku 2011 publikovali prácu, kde identifikovali gény rezistencie k β -laktámovým, tetracyklínovým a glykopeptidovým antibiotikám u vzoriek DNA z 30 000 rokov starého permafrostového sedimentu (D'Costa *et al.*, 2011). Taktiež na základe rôznorodosti aminokyselinových sekvencií β -laktamáz sa dá predpokladať veľké množstvo génov kódujúcich enzým degradujúci β -laktámové antibiotiká, a preto je vysoko nepravdepodobné, že takáto veľká genetická diverzita je dôsledkom používania penicilínu (Massova a Mobashery, 1998; Hall a Barlow, 2003). Fajardo *et al.* v roku 2008

uviedli, že mnoho testovaných mutantov *Pseudomonas aeruginosa* malo zmenenú citlivosť súčasne na rôzny typy antibiotík, ktoré zahŕňali polymixíny, fluorochinolóny, tetracyklíny, karbapény, cefalosporíny a aminocyklitoly. Rezistencia teda nie je substrátovo špecifická a to naznačuje, že nie je dôsledkom klinického používania antibiotík. Vývoj antibiotickej rezistencie baktérií je teda len v súčasnosti urýchlený nesprávnym a nadmerným užívaním antibiotických prípravkov či už v klinickej praxi alebo poľnohospodárstve, čo vytvára intenzívny selektívny tlak na bakteriálnu populáciu.

Podľa výročnej správy Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) z roku 2014 patrí bakteriálna rezistencia k antibiotikám medzi najzávažnejšie problémy ohrozujúce verejné zdravie. Ročne zomrie v Európskej únii v dôsledku bakteriálnej rezistencie približne 25 000 ľudí, celosvetovo mortalita dosahuje asi 750 000 ľudí a pri súčasnom trende bude v roku 2050 častejšou príčinou úmrtia ako rakovina (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf, https://ec.europa.eu/health/amr/antimicrobial-resistance_en, stiahnuté 20.1.2018).



Obr. 1 Percento rezistentných izolátov baktérie *Streptococcus pneumoniae* na území Českej republiky k makrolidom a penicilínom naprieč jednotlivými rokmi (prevzaté a upravené podľa <https://resistancemap.cddep.org/CountryPage.php?countryId=8&country=Czech+Republic>, 17.4.2018).

Výskyt antibiotickej rezistencie v jednotlivých častiach sveta veľmi prehľadne zhrňuje projekt ResistanceMap (Obr. 1, <https://resistancemap.cddep.org/>, stiahnuté 20.1.2018). Problém antibiotickej rezistencie nespočíva len vo vyššej mortalite a morbidite. Taktiež zaťažuje ekonomiku štátu v dôsledku vyšších nákladov na lekársku starostlivosť o pacientov a ich dlhší pobyt v nemocnici. Dochádza k šíreniu rezistentných kmeňov baktérií medzi populáciou, a tým sa komplikujú aj chirurgické zákroky, ako napríklad transplantácia orgánov, výmena bedrových kĺbov alebo rutinný cisársky rez. Vo veľkom ohrození sa nachádzajú aj dlhodobí chorí pacienti s oslabenou imunitou napríklad pacienti napadnutí vírusom HIV alebo pacienti oslabení chemoterapiou pri liečbe rakoviny.

2.1.1 Prirodzená antibiotická rezistencia

Prirodzenú rezistenciu baktérií zabezpečujú gény rezistencie, ktorých výskyt a expresia nie je podmienená predchádzajúcim antibiotickým tlakom alebo horizontálnym génovým transferom a primárne kódujú nemennú vlastnosť daného bakteriálneho rodu. Takýto typ rezistencie je napríklad štandardne zodpovedný za MDR (multi-drug resistance) fenotyp u gram-negatívnych baktérií, ktoré sú rezistentné k antibiotikám účinným na gram-pozitívne baktérie. Podstata takejto rezistencie spočíva v rozdielnom zložení vonkajšej membrány gram-negatívnych baktérií, ktorá bráni prieniku antibiotika a tiež v prítomnosti MDR-efluxných púmp, ktoré minimalizujú intracelulárnu koncentráciu antibiotika. Rozsiahle genetické analýzy dokazujú, že prirodzená rezistencia je komplikovaný proces, ktorého súčasťou sú gény zapojené do širokého radu životných procesov bunky, vrátane základného bunkového metabolizmu (Fajardo *et al.*, 2008). Za rezistenciu sú zodpovedné gény, ktoré môžeme zaradiť do troch hlavných skupín: 1) gény kódujúce syntézu a lokalizáciu cieľovej štruktúry bunky atakovanej antibiotikom, 2) gény brániace prístupu antibiotika k cieľovej štruktúre, napríklad gén zabezpečujúci modifikáciu lipopolysacharidu bunkovej steny, čím sa bráni prieniku antibiotika do organizmu, 3) gény zabezpečujúce ochranu cieľovej štruktúry bunky (Tab. 1). Napríklad rod *Enterococcus* má zabezpečenú rezistenciu voči cefalosporínom, založenú na neprítomnosti génov, kódujúcich peptidoglykán viažuci proteín, ktorý cefalosporíny prirodzene atakujú. Prirodzenú antibiotickú rezistenciu si baktérie zabezpečili aj nepriepustnou vonkajšou bakteriálnou membránou vďaka nízkemu zastúpeniu porínov, ktorých funkcia a kapacita môže byť do istej miery obmedzená. Takéto baktérie sú rezistentné k mnohým druhom hydrofilných antibiotík, pretože sa u nich nedosiahne

Tab. 1 Príklady prirodzenej antibiotickej rezistencie a príčiny jej vzniku (prevzaté a upravené podľa Forbes *et al.*, 1998; Giguere *et al.*, 2006).

Organizmus	Rezistencia k liečivu	Príčina
anaeróbne baktérie	aminoglykozidy	nedostatočný metabolizmus pre absorbciu liečiva
aeróbne baktérie	metronidazol	neschopnosť redukovať liečivo na jeho aktívnu formu
gram-pozitívne baktérie	aztreonam (β -laktámové ATB)	nedostatok proteínov viažúcich penicilín (PBP), na ktoré sa naväzuje liečivo a následne ich inhibuje
gram-negatívne baktérie	vankomycín	neschopnosť vankomycínu preniknúť vonkajšiou membránou
<i>Klebsiella</i> spp.	ampicilín (β -laktámové ATB)	produkcia enzýmov β -laktamáz, ktoré štiepia liečivo pred dosiahnutím cieľa (PBP)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	imipeném (β -laktámové ATB)	produkcia enzýmov β -laktamáz, ktoré štiepia liečivo pred dosiahnutím cieľa (PBP)
laktobacily a <i>Leuconostoc</i>	vankomycín	nedostatok prekursorov bunkovej steny (BS), na kt. sa liečivo naväzuje a následne inhibuje tvorbu BS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	sulfonamidy, trimethoprim, tetracyklín, chlórámfenikol	nedostatočný metabolizmus pre absorbciu liečiva, nemožnosť dosiahnuť efektívnu intracelulárnu koncentráciu
enterokoky	aminoglykozidy cefalosporíny	nedostatočný metabolizmus pre absorbciu liečiva nedostatok PBP

potrebná koncentrácia pre usmrtenie bakteriálnej bunky bez ohrozenia liečeného pacienta. Pomerne častým problémom býva aj kooperatívny spôsob ochrany rozdielnych bakteriálnych druhov voči pôsobeniu antibiotík. Weimer *et al.* (2011) vo svojej štúdií preukázali rezistenciu baktérie *S. pneumoniae* k β -laktámovým antibiotikám vďaka prítomnosti baktérie *Haemophilus influenzae* (NTHi). Tá svojou schopnosťou

produkovať β -laktamázy štiepi dané antibiotikum a navyše vytvára odolný biofilm, čím poskytuje pasívnu ochranu *S. pneumoniae* (Weimer *et al.*, 2011).

Vnútrotná rezistencia baktérií a jej vnútrotný rezistóm sa stávajú zaujímavým a sľubným cieľom v boji s bakteriálnou rezistenciou. Lin *et al.* v roku 2014 pripravili mutantov *Serratia marcescens*, ktoré mali inaktivované gény *arnB* a *arnC* - súčasť operónu *arnBCADTEF* zabezpečujúceho modifikáciu lipopolysacharidu A pomocou aminoarabinózy, čo sa prejavilo citlivosťou na polymyxíny. V tomto prípade došlo k zníženiu hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) antibiotika z 2048 na 2 mg.l^{-1} v porovnaní s prirodzeným kmeňom *S. marcescens*. Typ polymyxínovej rezistencie nie je súčasťou len prirodzenej rezistencie. U baktérií *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* je tento typ rezistencie spôsobený zmenami génovej expície regulačného systému modifikácie lipopolysacharidu (LPS) a to konkrétne v operónoch *PmrAB* a *PhoPQ*, ktoré tvoria dvojzložkový regulačný systém modifikácie LPS, pričom najčastejšou príčinou je bodová mutácia (Olaitan *et al.*, 2014).

2.1.2 Získaná antibiotická rezistencia

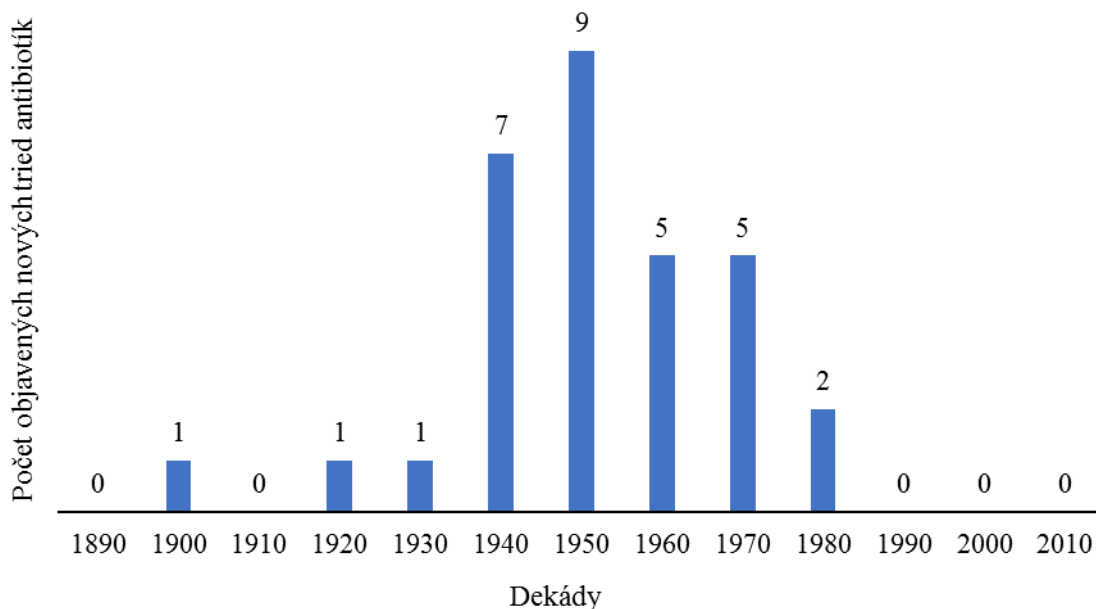
Získaná rezistencia je vlastnosťou konkrétnej baktérie, ktorú môže nadobudnúť genetickou zmenou v génoch, ktorých expresia ovplyvňuje fyziologický metabolizmus alebo bunkové štruktúry (de novo mutácia), ďalej integráciou cudzej DNA do chromozómu, horizontálnym génovým transferom mobilných bakteriálnych genetických elementov alebo kooperáciou uvedených mechanizmov. Jedna mutácia zvyčajne pre úplnú rezistenciu nestačí, avšak vďaka prvotnému prežitiu, baktéria získa čas na vznik ďalšej mutácie alebo prenosu genetickej informácie, ktorá už vedie k úplnej rezistencii. Napriek tomu Aubry-Damon *et al.* v roku 1998 preukázali, že jednoduchá mutácia v géne *rpoB*, ktorý kóduje β podjednotku bakteriálnej RNA polymerázy vedie k rezistencii *S. aureusa* na rifampicín. Mutáciou dôjde k zmene štruktúry a k zníženiu afinity enzýmu k antibiotiku. Miera rezistencie závisí od konkrétnej pozície, kde došlo k mutácii a od aminokyseliny, ktorá je na základe tejto zmeny kódovaná (Aubry-Damon *et al.*, 1998). Naopak v prípade rezistencie *Mycobacterium tuberculosis* na izoniazid ide o komplikovanejší proces. Rezistencia je výsledkom zmeny expície niekoľkých génov: *katG* gén, ktorý kóduje katalázu, *inhA* gén, ktorého produkt je cieľovou štruktúrou izoniazidu a gény *oxyR* a *aphC* a ich intergenetický región. Získaná bakteriálna rezistencia bola prvýkrát pozorovaná v roku 1959, keď boli prirodzene sa vyskytujúce

gény kmeňa *Shigella* detegované u *E. coli* (Hawkey, 1998). Základné spôsoby transferu DNA sú konjugácia (plasmidy, konjugatívne transpozóny), transdukcia (prostredníctvom bakteriofágov) a transformácia. Mobilné bakteriálne elementy, medzi ktoré patria plasmidy a konjugatívne transpozóny, sú schopné medzibunkového prenosu génov, zatiaľ čo transpozóny, integróny, génové kazety a ISCR atypické inzerčné sekvencie (v súčasnosti najviac skúmané elementy zabezpečujúce šírenie antibiotickej rezistencie a veľmi silný mobilizačný systém génov schopný formovať skupinu mobilných génov) - umožňujú génovú mobilizáciu len v rámci jednej bunky. Napríklad v prípade najznámejšej rezistentnej baktérie metilín-rezistentného zlatého stafylokoka (MRSA) je gén rezistencie *mecA* šírený pomocou konjugatívnej transpozície (Hawkey, 1998). Ďalej je známy transpozón Tn10 z *E. coli*, ktorý kóduje tetracyklínovú rezistenciu a Tn5 transpozón zabezpečujúci rezistenciu na kanamycín, bleomycín a streptomycín. Zhao *et al.* vo svojej štúdií z roku 2001 uvádzajú, že jednotlivé kmene *E. coli* produkujúcej Shiga toxín (STEC) sú schopné medzi sebou transferovať integróny prostredníctvom konjugácie. U baktérie *Staphylococcus* je najčastejšou cestou šírenia génov rezistencie bakteriofág. Šírenie antibiotickej rezistencie pomocou bakteriofágov je známe pomerne dlhú dobu, avšak je stále otáznou do akej miery toto šírenie ovplyvňujú. Shousha *et al.* v roku 2015 poukázali na transdukciu pomocou bakteriofágov ako na jeden z hlavných spôsobov, ako sa antibiotická rezistencia šíri medzi prostredím a *E. coli*. Zo vzoriek kuracieho mäsa izolovali náhodne 243 bakteriofágov, pričom 24,7 % z nich bolo schopných transdukovať gény rezistencie voči kanamycínu, chloramfenikolu, tetracyklínu, ampicilínu a betalaktámovým antibiotikám. Získané poznatky sú veľmi dôležité pre zdravie človeka a hospodárskych zvierat, pretože rezistencia získaná týmto spôsobom sa môže šíriť nielen medzi baktériami jedného druhu, ale aj medzi jednotlivými druhmi baktérií (Shousha *et al.*, 2015). Naopak Enault *et al.* (2017) na základe bioinformatickej analýzy vírusových metagenómov tvrdia, že výskyt génov kódujúcich antibiotickú rezistenciu (ARG) v bakteriofágoch bol nadhodnotený v dôsledku nízkej homológie očakávaných sekvencií ARG so sekvenciami, ktoré boli vo vírusoch skutočne detekované, a teda takéto šírenie génov antibiotickej rezistencie prostredníctvom bakteriofágov je len zriedkavé.

2.2 Náhrada súčasných antibiotík v liečbe bakteriálnych infekcií

Pre zabezpečenie úspešnej liečby ochorení spôsobených súčasnými rezistentnými mikroorganizmami, je potrebné zaujať nový prístup využívajúci inovatívny mechanizmus

pôsobenia. Takýto výskum je však nesmierne časovo a finančne náročný a z toho dôvodu je nových antibiotík na trhu stále menej (Obr. 2). Až po intenzívnej snahe významných organizácií o zviditeľnenie problému antibiotickej rezistencie ako je Svetová zdravotnícka organizácia (WHO), Európske centrum pre prevenciu a kontrolu chorôb (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) alebo Európska komisia (European Commission), prichádzajú výskumné skupiny s novými typmi antibiotík a súčasná dekáda by mohla priniesť účinné riešenia. Vedci z Rutgers University (New Jersey, USA) a biotechnologická spoločnosť NAICONs Srl. (Saronno, Taliansko) prišli s novým antibiotikom účinným voči rezistentným baktériám, ktoré je prirodzene produkované pôdnymi baktériami, nájdenými vo vzorkách pôdy z Talianska. Antibiotikum pseudouridimycín funguje ako kompetitívny inhibítor bakteriálnej RNA polymerázy, teda bráni v naviazaní nukleosidtrifosfátu (NTP). Hoci bakteriálna a ľudská RNA polymeráza majú podobnú štruktúru, pseudouridimycín je selektívny, svojím vedľajším reťazcom sa viaže na ďalšie miesto RNA polymerázy typické len pre bakteriálnu RNA polymerázu, mimo väzobného miesta pre NTP, čím je väzba selektívnejšia a pevnejšia. Po naviazaní pseudouridimycínu dochádza k zmene štruktúry



Obr. 2 Vývoj objavov nových tried antibiotík v rokoch 1890 – 2010 zobrazených po jednotlivých dekádoch na celom svete (prevzaté a upravené podľa <https://www.statista.com/statistics/662130/discovery-of-new-antibiotics-in-us/>, 3.1.2018).

bakteriálnej RNA polymerázy, čo vedie k jej deaktivácii, a tým dôjde priamo k usmrteniu daného mikroorganizmu. Je to potencionalny nástupca rifampínu, ktorý sa aktuálne používa na inhibíciu RNA polymerázy. Pseudouridimycín bol úspešne testovaný voči desiatkam gram-pozitívnych aj gram-negatívnych baktérií (Maffioli *et al.*, 2017). Spoločnosť NAICONS Srl. má taktiež zásluhu na vytvorení vysoko selektívneho semi-syntetického thiopeptidu proti *Propionibacterium acnes*, tzv. NAI-Acne, ktorý je v súčasnosti v druhej fáze klinických testov. Taktiež majú vo svojom portfóliu semi-syntetický derivát ramoplanínu NAI-603 alebo lantibiotikum NAI-107, ktoré sú aktívne voči aeróbnym a anaeróbnym gram-pozitívnym baktériám vrátane meticilín-rezistentného zlatého stafylokoka (MRSA) a vankomycín-rezistentných enterokokov (VRE). Ďalej je testovaných aj niekoľko ďalších antibiotík napríklad paramagnetické quinóny izolované z aktinomycét rodu *Actinoallomurus* (Iorio *et al.*, 2017), lantibiotikum NAI-802 z *Actinoplanes* sp. (Simone *et al.*, 2013) alebo ortoformimycín – selektívny inhibítor bakteriálnej proteosyntézy zo *Streptomyces* (Maffioli *et al.*, 2013). Nedávno objavený klostioamid predstavuje novú triedu prirodzených polythioamidových antibiotík inhibujúcich bakteriálnu DNA gyrázu s pozitívnymi výsledkami *in vitro* testovania voči rezistentnej baktérii *Neisseria gonorrhoeae* (Miari *et al.*, 2017). Ďalej budú popísané jednotlivé možnosti, ako v boji proti rezistentným baktériám nahradiť liečbu pomocou už neúčinných antibiotík.

2.2.1 Bakteriofágy editované systémom CRISPR-Cas

Fágová terapia je v liečbe bakteriálnych infekcií známa už pomerne dlhú dobu, ale až jej spojenie s metódou editácie genómu pomocou CRISPR-Cas priniesla prelom v boji s antibiotickou rezistenciou (Gomaa *et al.*, 2014). Bikard *et al.* v roku 2014 publikovali prácu, kde popísali prípravu sekvenčne špecifickej RNA-riadenej Cas9 nukleázy, ktorá je do bunky doručená pomocou bakteriofága a následne pomáha v boji s antibiotickou rezistenciou. V prípade, že je nukleáza sekvenčne špecifická na gény antibiotickej rezistencie, dôjde k zničeniu plasmidu, ktorý tieto gény obsahuje, a usmrtí tak rezistentnú baktériu. Tento model CRISPR-Cas9 bol úspešne testovaný na modeli koži myši *in vivo* proti baktérii *Staphylococcus aureus*, čo môže mať veľký význam hlavne v boji s problémovým MRSA (Bikard *et al.*, 2014). Rovnakú metódu preprogramovania Cas nukleázy použili aj Citorik *et al.* (2014) k usmrteniu baktérii enterohemoragickej *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7, ktorou boli kŕmené larvy *Galleria mellonella*. Popredná výhoda spočíva hlavne v skutočnosti, že baktérie bez plazmidu rezistencie,

teda prospešné baktérie *E. coli*, ktoré prirodzene osídľujú ľudské črevo, ostávajú intaktné, čo je žiaduce pre zachovanie prirodzeného osídlenia pacienta prospešnými baktériami. Odlišnú stratégiu použili Yosef *et al.* (2015), ale v tomto prípade nebolo cieľom usmrtenie rezistentných baktérií, ale ich opätovná resenzibilizácia na antibiotiká. V súčasnej dobe má na systémoch CRISPR-Cas založený svoj výskum niekoľko biotechnologických spoločností, napr. Locus Bioscience (Morrisville, USA; <http://www.locus-bio.com/#about>, stiahnuté 5.4.2018), Eligo Bioscience (Paríž, Francúzsko; <http://eligo.bio/technology/>, stiahnuté 5.4.2018) a Synthetic Genomics (San Diego, USA; <https://www.syntheticgenomics.com/core-technology/>, stiahnuté 5.4.2018).

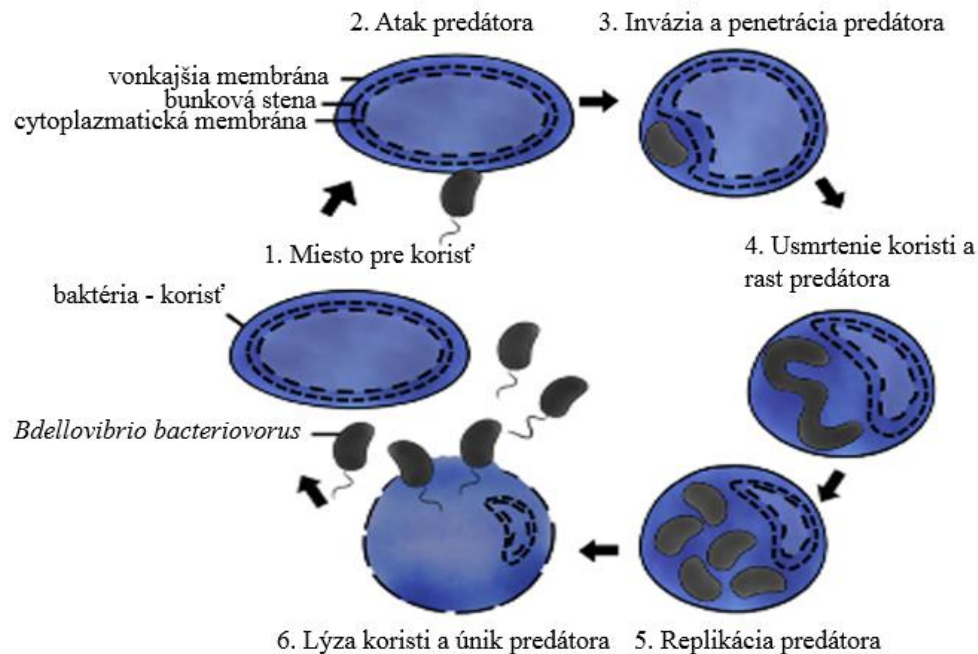
2.2.2 Nanočastice kovov

Používanie rôznych kovov v medicíne má dlhú tradíciu, hlavne v prípade striebra, ktorého rôzne zlúčeniny sa používali na liečbu bakteriálnych infekcií (Feng *et al.*, 2000; Matsumura *et al.*, 2003). Nanomateriály však zaznamenávajú v boji s antibiotickou rezistenciou úspech, a to hlavne vďaka ich unikátnym chemickým a štruktúrnym vlastnostiam, pričom aktivita nanočastíc je závislá od ich veľkosti a tvaru (Pal *et al.*, 2007; Morones *et al.*, 2005; Panacek *et al.*, 2006). Sondi a Salopek-Sondi (2004) testovali antimikrobiálnu aktivitu nanočastíc striebra voči *E. coli*, častice sa akumulovali v cytoplazmatickej membráne, čo viedlo k rapidnému zvýšeniu priepustnosti membrány a usmrteniu baktérie. Panacek *et al.* v roku 2006 predstavili protokol pre syntézu strieborných koloidných nanočastíc s antimikrobiálnym účinkom voči gram-pozitívnym aj gram-negatívnym baktériam vrátane *S. aureusa* rezistentného na meticilín už pri koncentrácií 1,69 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V niektorých prípadoch bola v prítomnosti nanočastíc striebra preukázaná zvýšená účinnosť antibiotík. Shahverdi *et al.* (2007) pozorovali najvyššiu synergickú aktivitu v spojení s erytromycínom voči baktérií *S. aureus*. Jednou z možností je tiež využitie nanočastíc ako nosičov antibiotík pre ich lepšiu biodostupnosť do jednotlivých miest infekcie (Radovic-Moreno *et al.*, 2012). Použitie nanočastíc kovov však môže viesť aj k poškodeniu okolitých buniek, čomu sa dá vyhnúť metódou svetlom excitovateľných nanočastíc - kvantových bodiek, schopných usmrtiť napríklad aj meticilín rezistentného *S. aureusa*, karbapén rezistentnú *E. coli* a β -laktám produkujúcich *K. pneumoniae* a *S. typhimurium* (Courtney *et al.*, 2016). Okrem striebra sú účinné aj nanočastice zlata proti uropatogénnym rezistentným baktériam, s nízkou

toxicitou voči bunkám cicavcov (Li *et al.*, 2014) a tiež nanočastice paládia vykazujú vysokú antimikrobiálnu aktivitu voči baktérii *S. aureus* (Adams *et al.*, 2014).

2.2.3 Predátorské baktérie

V boji proti antibiotickej rezistencii pomocou predátorských baktérií je v súčasnosti intenzívne skúmaná baktéria *Bdellovibrio bacteriovorus*, ktorá napáda mnoho gram-negatívnych baktérií, vrátane rezistentných kmeňov ako *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. Je to hlavne vďaka jeho špecifickému životnému cyklu (Obr. 3), čo sa javí ako sľubné riešenie, vzhľadom k tomu, že väčšina antibioticky rezistentných baktérií patrí medzi gram-negatívne a liečba takýchto infekcií je všeobecne náročnejšia. *B. bacteriovorus* sa prirodzene vyskytuje vo vode, v pôde a dokonca aj v intestinálnom trakte zdravých ľudí, čo svedčí o bezpečnosti jej použitia pre terapeutické účely (Iebaa *et al.*, 2013). Je známe, že *B. bacteriovorus* účinne ničí biofilmy, ktoré vytvárajú gram-negatívne baktérie, vďaka čomu sú rezistentné na antibiotiká. Avšak v roku 2014 Monnappa *et al.* publikovali štúdiu, v ktorej preukázali, že *B. bacteriovorus* dokáže oslabiť biofilmy vyformované aj gram-pozitívnymi baktériami, napr. *S. aureus* a napomáhať tak účinku antibiotík (Monnappa *et al.*, 2014). Willis *et al.* pozorovali po aplikácii predátorskej baktérie *B. bacteriovorus* zníženie populácie patogénneho kmeňa baktérie *Shigella* M90T V experimente *in vivo* v larvách ryby *Danio rerio*, prežilo 60 % populácie lariev ošetrovaných kmeňom *Bdellovibrio*, zatiaľ čo početnosť lariev kontrolnej skupiny (neošetrovaných kmeňom *Bdellovibrio*) klesla na tretí deň infekcie na 25 %. Štúdia tiež preukázala spoluprácu *B. bacteriovorus* s imunitným systémom ryby a pri podaní tejto baktérie do tela ryby neboli pozorované žiadne vedľajšie účinky ani pri vysokých dávkach a tiež neatakovala cicavčie bunky (Willis *et al.*, 2016). Získané poznatky sú dôležité najmä pre liečbu ochorení spôsobených ľudským patogénom *Shigella flexneri* spôsobujúcim klasické príznaky otravy jedlom, napr. hnačku. V súčasnej dobe je liečba ochorenia pomerne obmedzená, keďže medicínska možnosť prevencie neexistuje a antibiotiká sú vo väčšine prípadov neúčinné.



Obr. 3 Životný cyklus baktérie *Bdellovibrio bacteriovorus* (prevzaté a upravené podľa Willis *et al.*, 2016).

Tím vedcov z Národného inštitútu vedy a technológií v Južnej Kórey testoval vplyv indolu na predátorskú baktériu. Indol je metabolitom produkovaným mnohými baktériami, medzi ktoré patrí aj *E. coli* a rod *Salmonella*. Testy predátorskej aktivity *B. bacteriovorus* v prítomnosti indolu voči týmto baktériám preukázali, že *B. bacteriovorus* potrebuje v prítomnosti indolu dlhší čas na napadnutie patogéna a pri vysokých koncentráciách je atak predátorskej baktérie blokovaný (Dwidar *et al.*, 2015). Vedci z Inštitútu vedy a technológií Univerzity v Okinawe nielen, že využili predátorskú *B. bacteriovorus*, ale aj genetickú manipuláciu génu *fliA*, ktorý kóduje flagelárny sigma faktor. Touto manipuláciou ovplyvnili predátorské správanie baktérie, čo viedlo k oveľa rýchlejšiemu usmrteniu patogénnej *E. coli*. Jednou z možností je teda nielen použitie predátorských baktérií, ale aj preprogramovanie viacerých parametrov predátorského správania (Dwidar a Yokobayashi, 2017). Tieto poznatky sú potrebné pre ochranu baktérií, ktoré sú pre ľudské osídlenie prospešné a ich usmrtenie by mohlo viesť ku zdravotným komplikáciám pacienta a pomalšej rekonvalescencii.

V roku 2017 spoločnosť Vedanta Biosciences začala prvú fázu klinických testov liečiva VE303, terapeutického produktu pozostávajúceho z baktérií pre liečbu infekcie *Clostridium difficile* (<https://www.vedantabio.com/pipeline>, stiahnuté 11.2.2018).

Predátorská aktivita bola pozorovaná aj u iných baktérií. Terapeutický potenciál má napr. aj baktéria *Micavibrio aeruginosavorus*, ktorá aktívne zabíja patogénnu *P. aeruginosa* z očných izolátov, nepreukázala tiež toxický efekt na eukaryotické (HCLE) bunky a po testovaní *in vivo* v červoch *G. mellonella* po injekčnej aplikácii, bola životnosť červov napadnutých *P. aeruginosa* viac ako 90% (Shanks *et al.*, 2013). Dashiff *et al.* (2010) po aplikácii baktérie *M. aeruginosavorus* tiež preukázali výraznú redukciu životaschopnosti u baktérií z rodu *Burkholderia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Shigella* a priemernú redukciu u rodov *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Proteus* a *Yersinia*.

2.2.4 Kombinácia antibiotík alebo inovácia pôvodných antibiotík

Použitie starších antibiotík v boji s multirezistentnými bakteriálnymi kmeňmi je jednou z alternatív v boji s antibiotickou rezistenciou. V minulosti totiž tieto látky neboli podrobené súčasným postupom vývoja liekov a ich charakteristika farmakokinetiky a toxicity limituje ich klinické použitie. Preto sú potrebné dodatočné štúdie o ich účinnosti, dávkovaní a bezpečnosti. Klasickým príkladom je použitie polymyxínu B a polymixínu E (kolistínu), ktoré boli v minulosti pri lokálnej aplikácii využívané na liečbu mnohých gram-negatívnych baktérií. Ich parenterálna aplikácia (podanie mimo tráviaci trakt, napr. injekčne) bola zakázaná v dôsledku nefrotoxicity a neurotoxicity. Dnešné štúdie parenterálnej aplikácie pri liečbe *P. aeruginosa* a *A. baumannii* preukazujú značnú účinnosť a výrazne menšiu toxicitu (Jiménez-Mejías *et al.*, 2002; Linden *et al.*, 2003).

Jednou z možností je tiež kombinovaná terapia, kedy sa pre liečbu infekcie spôsobenej rezistentným patogénom používa kombinácia dvoch alebo viacerých antibiotík, poprípade antibiotika s aditívami. Kombinovaná terapia sa v medicíne už dlhšiu dobu využíva pre liečbu rakoviny, HIV alebo malárie. Čo sa týka infekcií spôsobených rezistentnými mikroorganizmami, tak v prípade *Mycobacterium tuberculosis* sa využíva kombinácia štyroch typických antibiotík, a to izoniazid, rifampicín, pyrazínamid a ethambutol alebo streptomycín, čím dochádza k inhibícii cieľovej štruktúry rôznymi metabolickými dráhami (Jindani *et al.*, 2004). Ďalej kombinácia sulfametoxazolu a trimetoprimu (diaminopyrimidínu) používaná pri liečbe infekcií močového ústrojenstva inhibuje rôzne ciele v metabolickej dráhe syntézy kyseliny listovej (Burman, 1986).

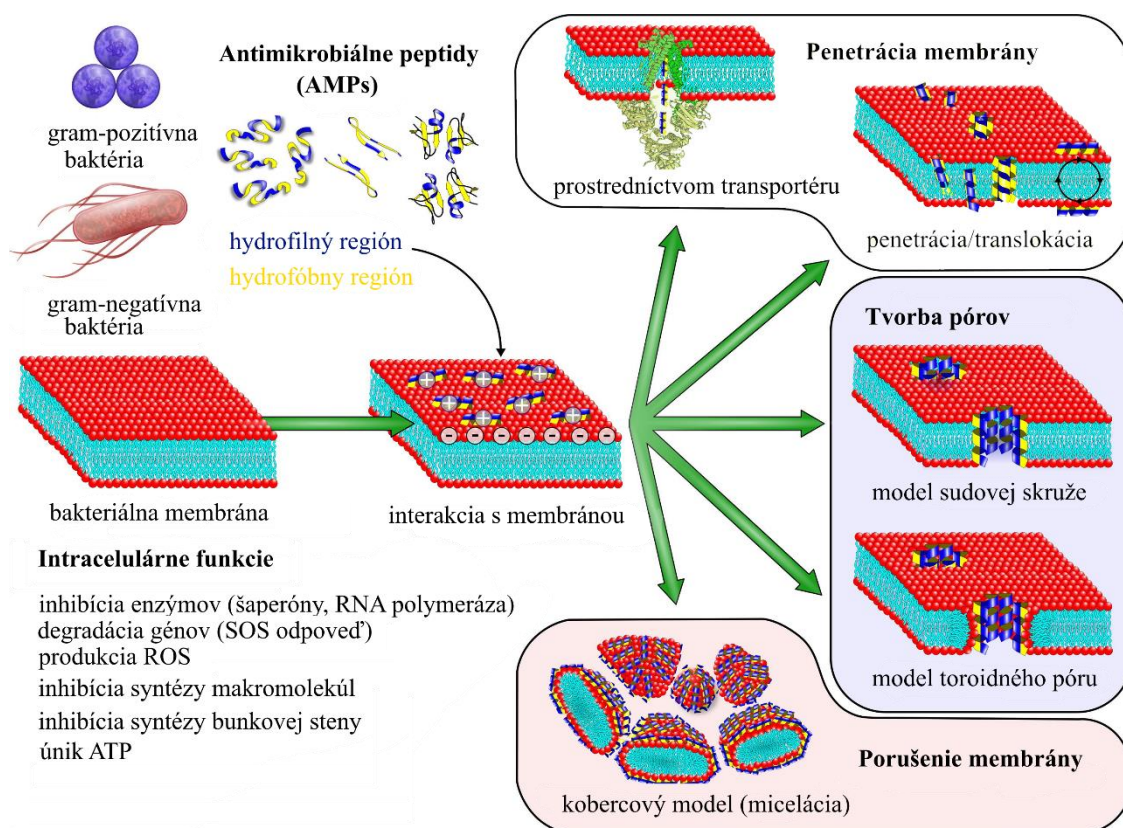
Kombinácia antibiotika s aditívami nemusí mať priamo antimikrobiálny účinok, ale v správnej kombinácii dokáže blokovaním mechanizmu rezistencie zvýšiť aktivitu

antibiotika. Augmentin, ktorý spája β -laktámové antibiotikum amoxicilín s inhibítorom β -laktamáz kyselinou klavulanovou, dokáže *in vivo* inhibovať aktivitu β -laktamázy, ktorá antibiotikum štiepi, a tak je amoxicilín schopný inhibovať biosyntézu bunkovej steny v rezistentnej baktérii (Ball P., 2007). V súčasnosti je známych už množstvo rôznych inhibítorov nielen β -laktamáz, ktoré zabraňujú štiepeniu antibiotika, ale aj inhibítory efluxných púmp, ktoré pomáhajú znižovať koncentráciu antibiotika v bunke. Lomovskaya *et al.* (2001) identifikovali inhibítory MC-207, MC-110, ktoré inhibujú tri dôležité pumpy v baktérii *Pseudomonas aeruginosa* zabezpečujúce fluorochinolónovú rezistenciu a podobné pumpy v ďalších rezistentných gram-negatívnych baktériách.

2.2.5 Antimikrobiálne peptidy

Antimikrobiálne peptidy sú evolučne pomerne staré látky, vyskytujúce sa v takmer všetkých živých organizmoch ako súčasť nešpecifického imunitného systému. V oblasti medicíny sa predpokladá ich využitie na liečbu najrôznejších ochorení vrátane malárie, rakoviny alebo HIV a okrem ich antibakteriálnej aktivity vykazujú aj antifungálnu, antivírusovú alebo antiparazitickú aktivitu. Ich využitie v liečbe antibioticky rezistentných kmeňov baktérií má veľký potenciál vzhľadom k ich selektivite a rýchlosti účinku už v mikromolárnych koncentráciách. Ďalej ich značnou výhodou je prirodzená širokospektrálna aktivita voči celej rade gram-pozitívnych aj gram-negatívnych baktérií a schopnosti niektorých peptidov inhibovať tvorbu biofilmov. Zhang *et al.* (2005) demonštrovali schopnosť antimikrobiálnych peptidov HBCM2, HBCM3, HBCP α -2 a HB71 inhibovať rezistentnú baktériu *P. aeruginosa* zodpovednú za väčšinu pľúcnych infekcií u pacientov s cystickou fibrózou. Syntetický antimikrobiálny peptid DRGN-1 vytvorený na základe prirodzeného peptidu objaveného v tele varana komodského (*Varanus komodoensis*) vykazoval silnú inhibíciu tvorby biofilmov u baktérií *P. aeruginosa* a *S. aureus* (Chung *et al.*, 2016). Prirodzených peptidov so schopnosťou inhibovať tvorbu biofilmov je známych už niekoľko, a v databáze antimikrobiálnych peptidov sú zoradené v samostatnej kategórii (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, stiahnuté 19.2.2018). Táto skupina látok ponúka veľa možností, keďže každým rokom sa objavujú v najrôznejších zdrojoch nové antimikrobiálne peptidy s inými vlastnosťami a taktiež pre ich GRAS status (generally recognized as safe) udelený Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (Food and Drug Administration, FDA; USA). Rovnako riziko vytvorenia rezistencie baktérií voči nim je veľmi malé, vzhľadom k ich nešpecifickému účinku a schopnosti vyhnúť sa bežným mechanizmom rezistencie. Pri napádaní a zabíjaní

patogénov využívajú viaceré mechanizmy súčasne, čím sa schopnosť prežitia mikroorganizmov znižuje, a tým aj šanca na vytvorenie rezistencie (Obr. 4). Napríklad umelo pripravený antimikrobiálny peptid nizín pôsobí na baktérie zároveň štyrmi mechanizmami, a to inhibíciou syntézy bunkovej steny, zvýšenou tvorbou pórov v bakteriálnej membráne, aktiváciou autolytických enzýmov bunkovej steny a inhibíciou germinácie bakteriálnych spór (Pag a Sahl, 2002). Alternatívny mechanizmus zahŕňa aj imunomodulačné vlastnosti antimikrobiálnych peptidov. Ide totiž o efektorové molekuly, ktoré dokážu modullovať imunitnú odpoveď napadnutého organizmu v prirodzenom boji s patogénnym mikroorganizmom. Napríklad pri kŕmení odstavených prasiat stravou s prídavkom syntetických antimikrobiálnych peptidov dochádzalo k zvýšeniu množstva T buniek, k ich proliferácii, ďalej k zníženiu množstva apoptických buniek a celková bunková imunita jedincov bola zlepšená (Ren *et al.*, 2015). Antimikrobiálne peptidy dokonca vykazujú synergické posobenie s niektorými antibiotikami. Táto skutočnosť by mohla viesť k používaniu výrazne nižších koncentrácií



Obr. 4 Rôzne mechanizmy pôsobenia antimikrobiálnych peptidov (prevzaté a upravené podľa Ageitos *et al.*, 2017).

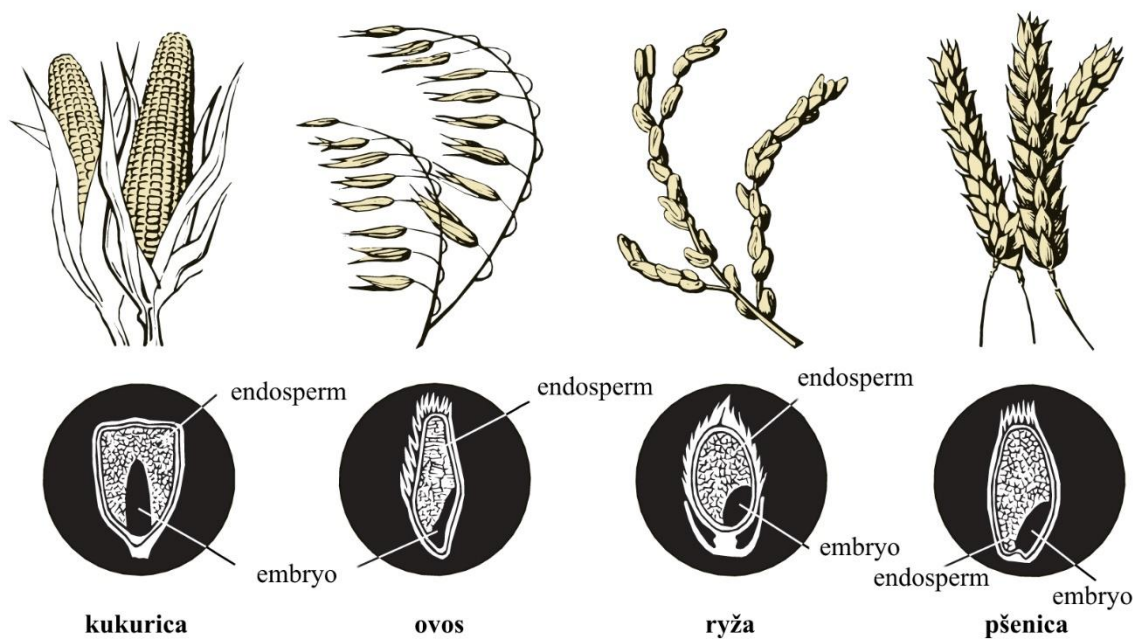
antibiotík, ktoré majú často negatívny vplyv na pacienta a tiež k zníženiu nákladov liečby, vzhľadom k potrebe menšieho množstva antimikrobiálneho peptidu. LeBel *et al.* v roku 2013 publikovali štúdiu, v ktorej preukázali výrazný synergický efekt antimikrobiálneho peptidu nizinu a antibiotika streptomycínu, tetracyklínu, penicilínu a ceftiofuru (FICI < 0,5) v prípade infekcie *S. suis* MGGUS2, ktorý je zodpovedný za ťažké infekcie spôsobujúce meningitídu, artritídu, pneumóniu a septikémiu u ľudí. Naghmouchi *et al.* (2012) zas pozorovali synergický efekt antimikrobiálneho peptidu pediocínu a antibiotika rifampicínu pri liečbe penicilín-rezistentného kmeňa *P. fluorescens*. Hoci je v súčasnej dobe dostupných na trhu niekoľko antimikrobiálnych peptidov na liečbu bakteriálnych infekcií ako napríklad daptomycín produkovaný firmou Cubist Pharmaceuticals (Massachusetts, USA) a predávaný pod obchodným názvom Cubicin® (<http://www.merck.com/product/home.html>, stiahnuté 20.2.2018), teikoplanín s obchodným názvom Targocid predávaný spoločnosťou Sanofi-Aventis (Gentilly, Francúzsko) pre liečbu infekcií spôsobených meticilín-rezistentným *S. aureusom* alebo *E. faecalis* (<https://www.sanofi.com/en/science-and-innovation/clinical-trials-and-results/our-disclosure-commitments/pharma/letter-t/>, 20.2.2018), dôvodov prečo doteraz nenahradili klasické antibiotiká je niekoľko. Nevýhodou je ich nízka koncentrácia v prirodzených zdrojoch, proteolytická degradácia, častá toxicita k eukaryotickým bunkám, vysoké náklady na ich syntézu a nedostatočné informácie o ich farmakokinetike a farmakodynamike. Čiastočné riešenie prinášajú až technológie génového inžinierstva pre produkciu rekombinantných antimikrobiálnych peptidov s využitím najrôznejších organizmov, a to od baktérií, kvasiniek, hmyzích buniek, rastlín až po cicavčie bunky. Každá z produkčných platforiem má svoje výhody aj nevýhody a závisí od konkrétneho peptidu a jeho vlastností, ktorá z nich predstavuje ideálnu voľbu pre jeho produkciu. Pre klinické použitie rekombinantne produkovaných antimikrobiálnych peptidov pomocou uvedených produkčných platforiem je predovšetkým dôležité, aby peptid nebol toxický voči eukaryotickým bunkám a bol vysoko selektívny len na bakteriálne bunky. Výťažky by mali byť vysoké a je dôležité získať dokonale čistý peptid, čo často zahŕňa nákladný a komplikovaný proces purifikácie. Rekombinantný antimikrobiálny peptid ďalej nesmie vyvolávať alergickú reakciu a je potrebné získať ho v biologicky aktívnej forme, ktorá však nezávisí len od jeho správneho zloženia, a teda sekundárnej štruktúry, ale aj od dĺžky peptidu, jeho náboja, helicity, hydrofóbnosti, amfipaticity alebo rozpustnosti (Tossi *et al.*, 2000).

V poslednej dobe sa dostáva do popredia produkcia najrôznejších terapeutík

v rastlinách nazývaná rastlinné molekulárne farmárčenie. Predovšetkým obilniny sú v posledných rokoch považované za ideálne produkčné platformy. Ich pestovanie je zvyčajne nenáročné na podmienky, ekonomicky výhodné, dokážu produkovať pomerne vysoké množstvá rekombinantných peptidov a produkcia v rastlinnej bunke zabezpečuje minimálne riziko kontaminácie rekombinantného produktu endotoxínmi ľudskými patogénmi. Ako ideálne prostredie pre produkciu rekombinantných antimikrobiálnych peptidov sa javí zrna obilnín, pretože umožňuje dlhodobé uchovanie peptidu, resp. proteínu, a to predovšetkým vďaka prítomnosti veľkého množstva inhibítorov proteáz v dozretom zrne. Značnou výhodou inertného prostredia dozretého zrna pre produkciu terapeuticky využiteľných proteínov, resp. peptidov, je aj zabezpečenie ich správneho zloženia do biologicky aktívnej formy. Okrem toho v zrne obilnín je nízka koncentrácia sekundárnych metabolitov akými sú kyselina oxalová, fenolické látky alebo alkaloidy, ktoré môžu skomplikovať následné procesy izolácie rekombinantných antimikrobiálnych peptidov. Navyše produkcia rekombinantného produktu v zrne neovplyvňuje rast a vývin rastliny.

2.3 Subcelulárna lokalizácia rekombinantného proteínu v obilnom zrne

Subcelulárna lokalizácia rekombinantného proteínu v rámci obilného zrna je významná z niekoľkých dôvodov. Podmienky cieľového uskladnenia proteínu v rámci bunky ovplyvňujú jeho stabilitu, ktorá má vo výsledku vplyv na výťažok produktu. Taktiež ovplyvňujú správne zloženie proteínu, jeho posttranslačnú modifikáciu, a s tým spojenú stratégiu následnej izolácie a purifikácie, ktoré sú nesmierne dôležité najmä pre produkciu rekombinantných proteínov s potenciálnym využitím vo farmaceutickom priemysle na liečbu infekčných ochorení. Napríklad glykoproteíny musia byť zacielené do štruktúr sekrécnej dráhy, pretože glykány sú pridávané na proteín v endoplazmatickom retikule a Golgiho aparáte (Horvath *et al.*, 2000). V neposlednom rade má zacielenie rekombinantného proteínu vplyv na vývin transgéennej rastliny. Zatiaľ čo proteín produkovaný v cytozole môže byť pre rastlinu toxický, akumulácia rovnakého proteínu vo vakuole alebo chloroplaste je často bezproblémová, nakoľko neovplyvňuje vnútorný metabolizmus. V rámci zrna môže byť rekombinantný proteín zacielený buď do endospermu alebo do embrya. Avšak vzhľadom k tomu, že u obilnín je embryo pomerne malá štruktúra, využíva sa pre zacielenie rekombinantných proteínov predovšetkým endosperm, ktorý tvorí väčšiu časť zrna (Obr. 5). Na bunkovej úrovni je možné využiť zacielenie rekombinantného proteínu do bunkových kompartment akými



Obr. 5 Stručný prehľad niektorých obilnín a stavby ich zrna (prevzaté a upravené podľa <https://kids.britannica.com/students/assembly/view/167175>, 17.4.2018).

sú chloroplast, mitochondria, endoplazmatické retikulum (ER), od neho odvodené dva typy proteínových teliesok (PBs), vakuoly na skladovanie proteínov (PSV), škrobové telieska, olejové telieska a apoplast, kde zvyčajne proteín vykazuje väčšiu stabilitu (Conrad a Fiedler, 1998).

2.3.1 Vakuoly pre uskladnenie proteínov (PSV)

Vakuoly pre uskladňovanie proteínov (PSV) vyskytujúce sa len u rastlín, sú unikátne štruktúry s obsahom zásobných proteínov, u obilnín hlavne globulínov a albumínov. Vakuoly sú formované *de novo* a obsahujú tri morfológicky rôzne regióny: 1) matrix, ktorá obsahuje rozpustné zásobné proteíny, 2) kryštaloidnú oblasť zloženú z proteínov usporiadaných do mriežky, 3) globoidnú oblasť s obsahom oxalátových kryštálov a kyseliny fytoovej. Proces uloženia zásobných proteínov do PSV je zložitý a závisí od typu skladovaného proteínu a druhu rastliny. Z toho dôvodu je pomerne náročné kontrolovať zacielenie rekombinantného proteínu, ktorý putuje cez zložitý endomembránový systém prostredníctvom vezikúl. Globulíny vo väčšine rastlín vrátane obilnín sú transportované z lumenu endoplazmatického retikula cez Golgiho aparát do PSV, zatiaľ čo putovanie prolamínov sa líši v jednotlivých rastlinných druhoch. Napríklad v ryži a kukurici sa prolamíny združujú v PBs v lumene drsného

endoplazmatického retikula, ktoré poskytuje ideálne prostredie pre proteíny citlivé k proteolytickej degradácii. V prípade pšenice a ovsu vznikajú agregáty týchto proteínov z ER, ale neskôr sú absorbované PSV, pričom neprechádzajú cez Golgiho aparát.

Pre zacielenie rekombinantného proteínu do vakuol uskladňujúcich proteíny sa v minulosti často využívala fúzia so zásobným proteínom, ktorý bol v organele majoritný. Vandekerckhove *et al.* (1989) pripravili chimérny proteín, ktorý pozostával z aminokyselinovej sekvencie kódujúcej 2S albumín z rastliny arábkovka thalova (*Arabidopsis thaliana*), pričom jeho časť bola nahradená sekvenciou pre neuropeptid leu-enkefalin ohraničený sekvenciami pre tryptické štiepenie. Po úspešnej transformácii repky olejnej (*Brassica napus*) boli vedci schopní získať až 200 nmol peptidu na gram zrna. Neskôr boli charakterizované tri typy tzv. determinantov vakuolárneho triedenia (VSD), ktoré vedú proteín do PSV. Sekvenčne špecifické VSD sa môžu vyskytovať uprostred alebo na oboch koncoch peptidu a sú rozpoznávané pomocou vakuolárnych triediacich receptorov (VSR), ako napríklad 2S albumín alebo ricín. Ďalej C-koncové VSD musia mať dĺžku minimálne 4 aminokyselínových reziduí, napríklad sekvencia FAEAI a LVAE z jačmenného lektínu. Posledným typom sú VSD závislé na štruktúre proteínu, napr. legumín. Bez prítomnosti akéhokoľvek typu VSD sú totiž proteíny sekretované na povrch bunky. Napríklad fúziou rekombinantného proteínu s transmembránovou doménou BP-80 (TMD) a cytoplazmatickým chvostom (CT) alfa-TIP, ktorý slúži ako membránová kotva, je proteín zacielený do kryštaloidnej oblasti PSV a dochádza k jeho stabilnej akumulácii. Špecifické membránové sekvencie sú schopné zacieliť proteín do PSV rôznymi dráhami, aj mimo GA, čím je možné zabrániť nežiadúcej rastlinnej glykozylácii proteínu, najmä v prípadoch jeho následného využitia v klinickej praxi. Okrem fúzie rekombinantného proteínu so zásobným proteínom alebo s VSD prišli niektoré štúdie s teóriou, že vysoký tok zásobných proteínov do vakuol môže so sebou strhnúť rekombinantný proteín aj bez špecifického signálu. Arcalis *et al.* (2004) pozorovali takéto netypické zacielenie rekombinantných proteínov v endosperme pšenice. Rekombinantná fytáza, ktorej výskyt bol pôvodne očakávaný v apoplaste, sa objavila v agregátoch prolaminov v PSV spolu s glutelínmi, pričom obsahovala vzor glykozylácie typický pre Golgiho aparát.

2.3.2 Endoplazmatické retikulum (ER)

Endoplazmatické retikulum je ako prvá organela sekrečnej dráhy často využívaná pre zacielenie rekombinantných proteínov. Rovnako ako PSV plní ER dôležitú úlohu

počas klíčenia zrna. Obsahuje množstvo šaperónov, ktoré napomáhajú správne skladaniu proteínov, dochádza tu k posttranslačným modifikáciám proteínu a v porovnaní s cytozolom obsahuje oveľa menšie množstvo proteáz, ktoré by mohli produkt štiepiť. Mnoho štúdií preukázalo výrazné zvýšenie výťažkov rekombinantného proteínu pri jeho zacielení do endoplazmatického retikula. Napríklad Moravec *et al.* (2007) produkovali B podjednotku tepelne labilného enterotoxínu z *E. coli* (LTB) v zrnách sóje. Proteín LTB bol produkován pod zrno-špecifickým promótorom a do endoplazmatického retikula bol zacielený na základe prítomnosti C-koncovej KDEL sekvencie. Výsledkom uvedenej stratégie bola stabilná akumulácia rekombinantného proteínu v zreých zrnách sóje, pričom tvoril 2,4% podiel zo všetkých proteínov zrna. Taktiež Stöger *et al.* (2000) demonštrovali výrazne vyššie výťažky rekombinantne produkovanej jednoreťazcovej Fv protilátky (ScFvT84.66) s retenciou na endoplazmatické retikulum v zrnách ryže a pšenice oproti akumulácii protilátky v apoplaste. Naopak proteíny bez signálnej sekvencie sa zvyčajne akumulovali v cytozole a ich výťažky sa pohybovali okolo 0,1 % celkových rozpustných proteínov zrna (Conrad a Fiedler, 1998).

Pre retenciu do lumenu endoplazmatického retikula je využívaný celý rad signálnych peptidov. Ide napríklad o najznámejší C-koncový tetrapeptid HDEL, resp. KDEL, ďalej transmembránový peptid KKXX (X = ľubovoľná aminokyselina) a B podjednotka génu toxínu cholery (CTB) alebo γ -zeín na N/C konci (Mainieri *et al.*, 2004). Nevýhodou zacielenia proteínu do endoplazmatického retikula je však existencia dráhy, ktorá translokuje nesprávne zložený proteín do cytozolu, kde dochádza k jeho degradácii prostredníctvom proteazómu, ako v prípade terapeutickú IgG protilátky produkovanej v rastlinách tabaku (De Muynck *et al.*, 2009) alebo aktivátoru plazminogénu alpha1 rovnako produkovaneého v rastlinách tabaku (Schiermeyer *et al.*, 2005).

2.3.3 Proteínové telieska (PBs)

Proteínové telieska (PBs) slúžia pre uskladnenie zásobných proteínov, hlavne prolamínov vyskytujúcich sa vo veľkej miere u obilnín a na rozdiel od PSV sú formované v lumene drsného endoplazmatického retikula. Po dosiahnutí vhodnej veľkosti sa oddelia ako samostatné organely alebo môžu byť autofagickým procesom pohltené zásobnými vakuolami, napr. v pšenici a v jačmeni. Transport proteínov do PBs je rovnako komplikovaný ako do PSV v dôsledku existencie rôznych dráh líšiacich sa u jednotlivých rastlinných druhov aj v závislosti od daného typu transportovaných proteínov.

Proteínové telieska sa od seba líšia štruktúrou a obsahom zásobných proteínov. V ryži boli charakterizované PBs-I s lamelárnou štruktúrou a obsahom prolamínov a PBs-II bez lamelárnej štruktúry s obsahom glutelínov a globulínov (Tanaka *et al.*, 1980). Možnosť zacielenia rekombinantných proteínov do proteínových teliesok bola po prvýkrát zdokumentovaná vedeckým tímom doktorky Sengupta-Gopalana (1985). Stabilnou transformáciou tabaku pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens*, dosiahli produkciu zásobného glykolyzovaného proteínu fazeolínu v proteínových telieskach.

Jednou z ideálnych stratégií zacielenia rekombinantného proteínu do proteínových teliesok je jeho fúzia so zásobnými proteínmi, ktoré sa v nich už prirodzene akumulujú. Takéto vlastnosti spĺňa napríklad 2S albumín z arábkovky thalovej (*A. thaliana*) a repky olejnej (*B. napus*). Fúziou génu kódujúceho 2S albumín z *A. thaliana* a génu kódujúceho pentapeptid Leu-enkefalin vznikol rekombinantný produkt, ktorý sa akumuloval v proteínových telieskach v množstve až 206 nmol na gram zrna. Leu-enkefalin bez 2S albumínu bol následne získaný jeho odštiepením a následne pomocou karboxypeptidázy bol odstránený aj presahujúci lyzín (Vandekerckhove *et al.*, 1989).

Ďalšou významnou stratégiou je fúzia cieľového proteínu s rastlinnými zeínmi, čo sú proteíny zo skupiny zásobných prolamínov v kukurici, ryži a pšenici. Použitie zeínov ako fúzných partnerov totiž vedie k akumuláciám v PBs, ktoré môžu byť vytvorené v rôznych subcelulárnych oblastiach, čím je ovplyvnená nielen morfológia PBs, ale aj rozpustnosť zásobných proteínov, ktoré sú v nich obsiahnuté. Fúzia 27 kDa γ -zeínu s fluorescenčným proteínom a pridaním sekvencie pre zacielenie do plastidov, viedla k sformovaniu PBs v stróme chloroplastov. Tiež N-terminálna doména γ -zeínu bohatá na prolín, obsahujúca sekvenciu (PPPVHL)₈ a P-X (X = ľubovoľná aminokyselina okrem prolínu) nazvaná Zera® (Vytvorená spoločnosťou ERA Biotech, Španielsko, Barcelona) je schopná indukovať tvorbu ektopických PBs aj v iných tkanivách ako v zrne, kde sa tieto organely zvyčajne nenachádzajú a zvyšovať tak nielen stabilitu ale aj výťažky, čo je spôsobené pravdepodobne formovaním disulfidových väzieb. Zeín sa tak stáva multifunkčným fúznym proteínom ponúkajúcim unikátne možnosti akumulácie v rôznych kompartmentoch bunky (Hofbauer *et al.*, 2014). Zacielenie rekombinantných proteínov do PBs je výhodné aj z dôvodu výrazného uľahčenia procesu izolácie a purifikácie. PBs sú z rastlinných buniek získané na základe jednoduchej diferenciálnej centrifugácie v gradiente sacharózy, pričom rekombinantný produkt sa z nich získava narušením membránovej štruktúry PBs, napríklad močovinou pri zvýšenej teplote.

Týmto spôsobom je možné zbaviť sa väčšiny nežiadúcich proteínov obsiahnutých v rastlinnej bunke, ktoré znečisťujú a znehodnocujú rekombinantný produkt.

2.3.4 Škrobové zrná

Úlohou škrobových zŕn je skladovanie najdôležitejšieho zásobného polysacharidu vo všetkých rastlinách – škrobu. Škrobové zrná sa nachádzajú v amyloplastoch ako typ A a B líšiacich sa morfológiou a chemickým zložením.

Stratégia zacielenia rekombinantných proteínov do škrobových zŕn spočíva najčastejšie vo fúzií s C-terminálnou doménou viažucou sa na škrob (SBDs) o dĺžke približne 100 aminokyselín. Táto doména je vysoko konzervovaná a pôvodne sa nachádza ako súčasť enzýmov štiepiacich škrob. Ji *et al.* (2003) produkovali touto metódou tranzitný peptid zo škrobovej syntázy I (GBSS I) vyskytujúcej sa v zemiakoch, ktorý zabezpečuje jej vstup do amyloplasty. Gén kódujúci tento peptid bol zfúzaný s regiónom kódujúcim škrob-viažucu doménu (SBD) cyklodextrín-glykozyltransferázy z baktérie *Bacillus circulans* a následne bol exprimovaný v hl'uzách rôznych kultivarov zemiakov. Rekombinantný produkt sa akumuloval vo vnútri škrobových zŕn a najväčší získaný výťažok bol približne 1,6 % z celkovej suchej váhy hl'úz.

2.3.5 Olejové telieska

Olejové telieska sa v najväčšej miere vyskytujú v zrnách olejnatých rastlín, ako napríklad repka olejná (*Brassica napus*), slnečnica (*Helianthus annuus*) alebo horčica (*Sinapis alba*). Ich úlohou je skladovanie triacylglycerolov, ktoré sú obklopené vrstvou fosfolipidov a membránovými proteínmi, hlavne oleozínmi, kaleozínmi a steroleozínmi. Oleozíny sú relatívne malé proteíny s veľkosťou 15-25 kDa, vyskytujú sa v 2-4 izoformách a slúžia ako rozpoznávajúci signál pre lipázu, ktorá v prípade potreby triacylglyceroly štiepi. Na zacielenie rekombinantného proteínu na okraj olejových teliesok sa využíva práve fúzia s N/C-koncom oleozínov. Oba konce sú amfipatické, a tak sú hydrofílné domény lokalizované na povrchu olejového telieska, zatiaľ čo centrálna hydrofóbna doména preniká cez vrstvu fosfolipidov dovnútra telieska. Táto skutočnosť predstavuje veľkú výhodu v následnej purifikačnej stratégii, pretože telieska sa nezgrupujú a získanie olejovej frakcie je nenáročné a nenákladné pomocou jednoduchej extrakcie. Finálne odštiepenie rekombinantného proteínu od oleozínu môže byť uskutočnené pomocou endoproteáz. Výťažky rekombinantných produktov pri produkcii pomocou fúzie s oleozínmi sú pomerne veľké, keďže oleozíny sami o sebe tvoria 2-8 % zo všetkých proteínov zrna. Úspešne produkovaný bol aj prekurzor ľudského inzulínu

sfúzovaný s oleozínom v rastline *A. thaliana*. Po odštiepení pomocou trypsínu tvoril produkt 0,13 % z celkových proteínov obsiahnutých v semene a bol rozpoznávaný svojím prirodzeným receptorom (Nykiforuk *et al.*, 2006). Pre zacielenie rekombinantného proteínu do olejových teliesok sa využívajú aj afinitné značky, ligandy, ktoré majú afinitu k olejovým telieskam alebo k samotnému oleosínu. Takýmto ligandom môže byť napríklad protilátka proti olejovému teliesku. Takýmto spôsobom bol produkovaný napríklad apolipoproteín Al Milano (ApoAl_{Milano}) v zrnách požltu farbiarskeho (*Carthamus tinctorius*), ktorý bol sfúzovaný s jednoreťazcovou protilátkou proti 18 kDa oleosínu z *A. thaliana*. Hladiny expzie zodpovedali výťažkom až 7 g na kilogram zrna (Nykiforuk *et al.*, 2011).

2.3.6 Chloroplasty

Jednou z novších stratégií pre produkciu rekombinantných proteínov v rastlinách je ich zacielenie do chloroplastov, ktoré poskytujú množstvo výhod, napríklad možnosť priamej organelárnej transformácie. V dôsledku veľkého množstva chloroplastov v rastlinnej bunke a ich veľkému objemu sú výťažky rekombinantného produktu pomerne vysoké. Vidi *et al.* (2007) publikovali štúdiu, v ktorej popísali úspešnú produkciu žltého fluorescenčného proteínu sfúzovaného s plastoglobulínom 34 (PGL34) v chloroplastoch listov tabaku (*Nicotiana benthamiana*), konkrétne v subchloroplastových lipoproteínových časticiach plastoglobúl. Využitím tejto stratégie sa výrazne znížili náklady na purifikáciu produktu, ktorá spočíva v tomto prípade len vo flotačnej centrifugácii. Napriek tomu, že chloroplasty sú miestom fotosyntetických reakcií, biosyntézy lipidov a metabolizmu škrobu či aminokyselín, životnosť rastliny nebola ovplyvnená zacielením produktu do týchto organel. Do chloroplastov rastlín tabaku (*N. benthamiana*) a šalátu (*Lactuca sativa*) bol úspešne zacielený aj fúzny produkt B podjednotky toxínu cholery a ľudského proinzulínu (CTB-Pins) s potenciálnym významom pre liečbu diabetu. V prípade tabaku boli výnosy približne 16 % TSP a u šalátu približne 2,5 % (Ruhlman *et al.*, 2008).

Pre zacielenie rekombinantného proteínu do chloroplastov sa využíva fúzia génov kódujúcich požadovaný proteín a génov jadrového genómu, ktoré kódujú produkty prirodzene sa vyskytujúce v chloroplastoch, vrátane domény kódujúcej signálnu sekvenciu peptidu, a vďaka ktorej vstupuje rekombinantný produkt priamo do chloroplastu. Hoppmann *et al.* (2002) úspešne využili tranzitnú sekvenciu zo zemiakovej syntázy škrobových teliesok (gbss), zabezpečujúcej akumuláciu v stróme

chloroplastu, ktorú sfúzovali s N-koncom GFP alebo enzýmom striktozidín syntáza (Str1) z katarantu ružového (*Catharanthus roseus*). Oba fúzne produkty boli úspešne exprimované *in vivo* vo vysokých množstvách.

Inou alternatívou je priama transformácia plastidového genómu, ktorá zabezpečuje jednotnú a pomerne vysokú mieru expresie a malú pravdepodobnosť umlčania génu. Vďaka tejto metóde transformácie sú úspešne produkované antigény, ako napríklad vysoko imunogénny epitop z proteínu VP1 vírusu FMDV spôsobujúceho slintačku a krívačku zvierat. Pre zvýšenie výnosov bol epitop sfúzovaný s reportérovým *uidA* génom. Výsledný produkt predstavoval až 51 % TSP v zreých listoch transgéneho tabaku (Lentz *et al.*, 2010). Napriek mnohým výhodám, akou je napríklad nízky obsah proteáz, chloroplasty nie sú schopné zabezpečiť komplexnú posttranslačnú modifikáciu proteínov (napr. glykozyláciu) a správne zloženie proteínu a jeho podjednotiek.

2.3.7 Mitochondrie

Využitie mitochondrií ako cieľovej destinácie pre akumuláciu rekombinantných proteínov má rovnaké výhody ako zacielenie do chloroplastov, vrátane možnosti priamej transformácie týchto organel. Narozdiel od chloroplastov je však transformácia mitochondrií viac náročná, najmä kvôli komplikovanejšej inkorporácii transgénu do mitochondriálnej DNA. Okrem toho chýba vhodný selekčný marker pre detekciu transformovaných mitochondrií.

Pre zacielenie proteínu do matrix mitochondrie sa využívajú takzvané matrix-cielené signály (MTSs), ktoré sa skladajú z 20 až 60 aminokyselín, nachádzajú sa na N konci, pozostávajú z hydrofóbných a pozitívne nabitých aminokyselín, čím vytvárajú amfipatickú štruktúru. Tieto signály sú súčasťou preproteínu, z ktorého sú následne po zacielení samovoľne odštiepené. Pre zacielenie do iných častí mitochondrie, napr. do medzimembránového priestoru, na vonkajšiu alebo vnútornú membránu sa využívajú špecifické sekvencie, ktoré sú rozpoznávané dôležitými mitochondriálnymi membránovými translokázami TOM a TIM23 (Waagemann a Popov-Čeleketić, 2015).

2.3.8 Cytozol a apoplast

Akumulácia rekombinantného proteínu v cytozole zvyčajne nie je veľmi efektívna vzhľadom k veľkému množstvu proteáz, ktoré rekombinantný produkt štiepia. Okrem toho dochádza tu k neželaným modifikáciám produkovaného proteínu, ktoré môžu zmeniť jeho štruktúru a nesprávne zložený proteín je potom proteolyticky degradovaný v proteazóme. V prípade protilátok sa výtázky pohybujú len okolo

0,1% TSP - total soluble proteins (Conrad a Fielder, 1998). V niektorých prípadoch dochádza k interferencii medzi procesmi akumulácie proteínu v cytozole s vnútorným metabolizmom samotnej rastlinej bunky a produkt tak na rastlinu pôsobí toxicky. Na rozdiel od zacielenia rekombinantných proteínov do cytozolu, ponúka apoplast (priestor medzi bunkovou stenou a cytoplazmatickou membránou) stabilnejšie prostredie, ktoré chráni proteín pred enzymatickou degradáciou. Rekombinantný produkt je zacielený do apoplastu v prípade, že neobsahuje prídavnú cieľovú sekvenciu, ktorá by ho smerovala napríklad na ER. Purifikácia z tohoto kompartmentu je výrazne jednoduchšia a rekombinantný proteín sa akumuluje až v stonásobne väčšom množstve ako v cytozole. Pri produkcii TMV-špecifickej protilátky rAb29 (protilátka proti mozaikovému vírusu tabaku) zacielenej v jednom prípade do apoplastu a v druhom do cytozolu listov transgénnych rastlín tabaku boli dosiahnuté výnosy v apoplaste až 8,5 µg na gram listov. V prípade expisie proteínu v cytozole bolo množstvo na hranici detekčného limitu (Schillberg *et al.*, 1999).

2.4 Metódy testovania antimikrobiálnej aktivity

Ako bolo v úvode práce spomenuté, výskyt nových infekčných chorôb a nárast bakteriálnej rezistencie vytvorili potrebu nových štúdií zameraných na výskum antimikrobiálnych látok. Vzhľadom na to, že dostupné antimikrobiálne látky pri liečbe infekcií zlyhávajú, pozornosť sa upriamila na skúmanie prírodných produktov ako zdroja nových bioaktívnych molekúl (Silver a Bostian, 1993). Rastliny obsahujú množstvo látok, ktoré sú skúmané za účelom ich antimikrobiálneho pôsobenia. Ide o rastlinné extrakty, esenciálne oleje, sekundárne metabolity alebo nové molekuly produkované v rastlinách rekombinantne. Pre potenciálne využitie týchto látok na liečbu ochorení je nutné presné stanovovanie ich antimikrobiálnej aktivity, čo je jednou z najdôležitejších procedúr vykonaných v klinických mikrobiálnych laboratóriách.

V súčasnosti je známych viacero odlišných metód pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti založených buď na difúzií alebo riedení. Pochopenie týchto metód dovoľuje správnu interpretáciu výsledkov testovania citlivosti. Všeobecne platí, že metódy testovania antimikrobiálnej citlivosti používané klinickými laboratóriami by mali poskytnúť rýchlu a presnú informáciu, mali by byť relatívne lacné a jednoduché na vykonanie (Hadacek a Greger, 2000). Obvyklými metódami testovania antimikrobiálnej citlivosti sú fenotypové *in vitro* testy, ktoré poskytujú priame meranie antimikrobiálnej aktivity. Tieto techniky merajú aktivitu špecifickej antimikrobiálnej

látky na základe posúdenia bakteriálneho rastu v prítomnosti tejto látky. Väčšina testov citlivosti na antimikrobiálne látky vykonaných v klinických laboratóriách sa opiera o konvenčné protokoly, ktoré zahŕňajú popis prípravy a množstva inokula, ďalej popis inkubačných podmienok, zloženie rastového média a ďalších dôležitých parametrov, ktoré vedú k získaniu presných a reprodukovateľných výsledkov (<https://www.uptodate.com/contents/overview-of-antibacterial-susceptibility-testing>, stiahnuté 20.4.2018).

2.4.1 Difúzne metódy

2.4.1.1 Metóda diskov

Metóda spočíva v inokulácii agarových misiek vopred štandardizovaným inokulom testovaného mikroorganizmu. Na povrch agarového média sa položí disk z filtračného papiera o vhodnej veľkosti obsahujúci testovanú látku o určitej známej koncentrácii. Po inkubácii sa meria veľkosť inhibičnej zóny, ktorá vzniká v dôsledku difúzie testovanej látky do agaru spôsobujúcej inhibíciu rastu testovaného mikroorganizmu (Heatley, 1944). Výhody tejto metódy spočívajú hlavne v jej jednoduchosti, rýchlosti, ekonomickej nenáročnosti a schopnosti otestovať široké spektrum účinných látok voči mnohým druhom baktérií. Na druhej strane však metóda nedokáže rozlíšiť bakteriostatický a bakteriocídny efekt alebo presne stanoviť minimálnu inhibičnú koncentráciu (MIC). Pre niektoré mikroorganizmy je možné na základe veľkosti inhibičnej zóny určiť aspoň približnú hodnotu MIC, a to na základe dostupných algoritmov (Nijs *et al.*, 2003). V súčasnej dobe je použitie tejto metódy rozšírené v mnohých klinických laboratóriách a štandardizované protokoly pre jednotlivé mikroorganizmy vydáva Inštitút klinických a laboratórnych štandardov - CLSI (<https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/>, stiahnuté 26.3.2018).

2.4.1.2 Gradientová metóda

Gradientová metóda testovania antimikrobiálnej aktivity je v základe podobná metóde diskov, avšak v tomto prípade sa používa strip, ktorý je impregnovaný vzrastajúcou koncentráciou testovanej látky (Obr. 6). Metóda je používaná na stanovenie MIC alebo synergie/antagonizmu dvoch antimikrobiálnych látok na základe hodnoty indexu frakčnej inhibičnej koncentrácie (FICI). Komerčná verzia tejto metódy je dostupná pod názvom Etest® od firmy BioMérieux (<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/etest>, stiahnuté 26.3.2018).



Obr. 6 Reálne zobrazenie prevedenia gradientovej metódy pomocou komerčného Etestu® (prevzaté od <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-antibacterial-susceptibility-testing>, 20.4.2018).

2.4.1.3 Jamková metóda

Jamková metóda testovania antimikrobiálnej aktivity je založená na vytvorení jamky s priemerom 6-8 mm v agarovej platni, do ktorej sa aplikuje presne stanovený objem antimikrobiálnej látky (20 - 100 μ l) o známej koncentrácii. Následne sa pre vyhodnotenie antimikrobiálnej aktivity stanovuje veľkosť inhibičnej zóny (Magaldi *et al.*, 2004).

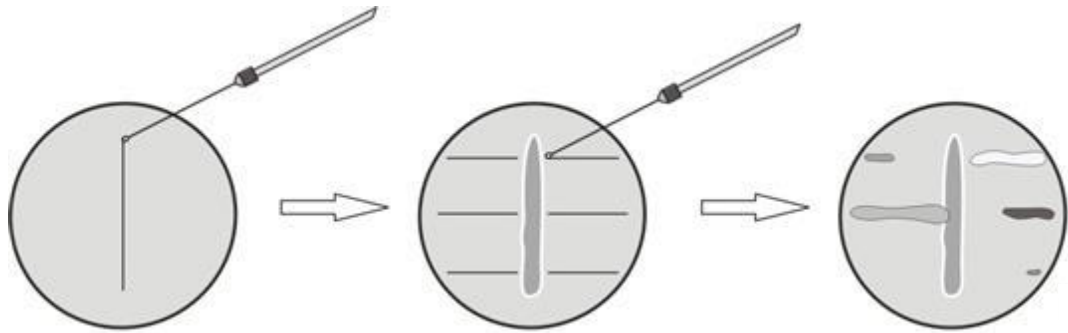
2.4.1.4 Metóda agarovej zátky

Pri tejto metóde sa napovrch kultivačného média naniesie kultúra mikroorganizmu, ktorá počas svojho rastu vylučuje molekuly prenikajúce do agarového média. Následne sa za aseptických podmienok vyreže z tejto platne tzv. zátka, ktorá sa preniesie na druhú agarovú platňu s testovaným mikroorganizmom. Molekuly, ktoré difundovali do agarovej zátky môžu následne pôsobiť na rast testovaného mikroorganizmu za vzniku inhibičnej zóny. Metóda sa využíva hlavne pre zobrazenie antagonizmu medzi mikroorganizmami (Jiménez-Esquilín a Roane, 2005), poprípade látok produkovaných v mikroorganizmoch (Elleuch *et al.*, 2010).

2.4.1.5 Krížová metóda

Na agarovú platňu sa v jednej čiare rozotrie mikroorganizmus nášho záujmu. Po danej inkubačnej dobe sa kolmo na prvý rozter v jeho strede naniesie čiara testovaného mikroorganizmu a následne sa meria veľkosť vzniknutej inhibičnej zóny (Obr. 7). Krížová metóda je jednoduchá a relatívne rýchla metóda pre testovanie kultúr pri hľadaní nových antibiotík a pre zistenie spektra inhibičných vlastností baktérií či plesní. Používa sa predovšetkým na zistenie antagonizmu medzi mikroorganizmami

(Lertcanawanichakul a Sawangnop, 2008). Hlavnou nevýhodou krížovej metódy je však získanie nepresných kvantitatívnych údajov, pretože inhibičné zóny sú často rozmazané a nejednoznačné (Williston *et al.*, 1947).



Obr. 7 Schématické znázornenie metódy krížového rozteru (prevzaté a upravené podľa Tóth *et al.*, 2013).

2.4.1.6 Metóda otráveného jedla

Metóda sa používa hlavne pre testovanie antifungálnych účinkov. Látka s týmto účinkom je priamo zamiešaná do agarového média v známej konečnej koncentrácii. Po preinkubácii počas noci sa misky inokulujú mycéliom danej plesne o veľkosti 2 – 5 mm v strede misky. Nasleduje ďalšia inkubácia a vo výsledku sa porovnáva rast mycélia v testovanej a kontrolnej vzorke.

2.4.2 Metódy založené na chromatografii na tenkej vrstve

2.4.2.1 Priama bioautografia

Z metód testovania biologickej aktivity spojených s chromatografiou na tenkej vrstve (TLC) ide o najpoužívanejšiu metódu. Vyvinutá TLC doska s testovanými antimikrobiálnymi látkami sa nastrieka suspenziou testovaného mikroorganizmu a následne sa inkubuje po dobu 48 hodín pri teplote 25°C vo vlhkom prostredí. Pre vizualizáciu mikrobiálneho rastu sa používajú tetrazóliové soli, ktoré reakciou s dehydrogenázami prítomnými v živých bunkách vytvárajú intenzívne sfarbený formazán (od tmavomodrej až po bordovú). Metóda je vhodná pre testovanie húb alebo baktérií, napr. *E. coli*, *B. subtilis* a *S. aureus* (Hamburger a Cordell, 1987).

2.4.2.2 Metóda prekrytia agarom

Druhá veľmi rozšírená metóda je založená na podobnom princípe ako v prípade priamej bioautografie, s tým rozdielom, že vyvinutá TLC doska sa pokryje naočkovaným roztaveným agarom s cieľom zabezpečiť lepšiu difúziu do agaru. Po inkubácii pri vhodných podmienkach sa pre vizualizáciu používajú taktiež tetrazóliové soli. Výhody metódy prekrytia agarom spočívajú v jej jednoduchosť, nízkych nákladoch na techniku, robustnosti a rýchlosti.

2.4.3 Riediace metódy

Tento typ metód patrí medzi naspôhlivejšie, čo sa týka stanovenia MIC, či už v prevedení s tekutým alebo tuhým médiom a vo veľkom sa používa pre stanovenie *in vitro* antimikrobiálnej aktivity voči hubám a baktériam. V prípade použitia tekutého média sú možné dva typy prevedenia, a to makroriedenie, najčastejšie v 2 ml skúmavke alebo mikroriedenie, pre ktoré sa používajú 96 jamkové titračné dosky. Hlavné výhody mikroriedenia v porovnaní s makroriedením spočívajú v menšej spotrebe testovanej antimikrobiálnej látky a testovaného mikroorganizmu a lepšej reprodukovateľnosti danej metódy. Vzhľadom k rozšírenosti riediacich metód medzi laboratóriami sú pravidelne

vydávané štandardizované protokoly pre prevedenie týchto metód Inštitútom klinických a laboratórnych štandardov (CLSI) a Európskou komisiou pre testovanie citlivosti na antimikrobiálne látky (EUCAST).

2.4.3.1 Riediaca metóda s použitím tekutého média

Táto metóda je založená na príprave riediacej rady (zvyčajne dvojnásobné riedenie) skúmanej antimikrobiálnej látky v tekutom médiu, a to buď v makroriedení alebo mikroriedení. Následne sa ku každej vzorke pridá suspenzia mikroorganizmu, nariadená tekutým médiom na 0,5 McFarlandovej stupnice. Po zmiešaní a následnej inkubácii mikroorganizmu s testovanou látkou sa pre vizualizáciu používajú kolorimetrické metódy, napríklad tetrazóliové soli. Pri prevedení riediacej metódy s použitím tekutého média je potrebné dodržiavať vydané protokoly za účelom zachovania reprodukovateľnosti a možnosti porovnania s výsledkami iných inštitúcií, keďže aj malá zmena, napríklad v inkubačnom čase, dokáže výrazne ovplyvniť MIC.

2.4.3.2 Agarová riediaca metóda

Princíp metódy je podobný ako pri použití tekutého média. Antimikrobiálne činidlo sa riedi do roztaveného agaru a inokulácia mikroorganizmu prebieha na povrchu agarovej platne. Táto metóda sa používa pre testovanie nielen baktérií ale aj húb, pričom vykazuje výbornú koreláciu s Etestom® a často je pre testovanie antimikrobiálneho účinku uprednostňovaná pred riediacou metódou s použitím tekutého média (<http://demo.nextlab.ir/getattachment/096a51d4-1530-4f81-92c0-f5477c584b9b/CLSI-M26-A.aspx>, stiahnuté 26. 3.2018).

2.4.4 Ostatné používané metódy

Jednou z ďalších používaných metód pre určenie antimikrobiálneho účinku danej látky je test usmrtenia mikroorganizmu v závislosti na čase, vhodný pre stanovenie baktericídneho alebo fungicídneho efektu. V tomto prípade sa pripraví tri skúmavky s presne definovaným obsahom bakteriálnej suspenzie, prvá a druhá skúmavka obsahujú antimikrobiálnu látku v rôznom, ale presne definovanom množstve, tretia slúži ako kontrola. Test sa môže pripraviť v dvoch prevedeniach a to tak, že skúma buď časovú závislosť, a teda to ako miera usmrtenia rastie s časom, pokiaľ je koncentrácia účinnej látky vyššia ako MIC alebo koncentračnú závislosť t.j. či sa miera usmrčovania zvyšuje so zvyšujúcimi sa koncentraciami antimikrobiálnej látky (Pfaller *et al.*, 2004). V závere sa stanoví závislosť CFU na objeme (CFU/ml) v jednotlivých vzorkách

v porovnaní s kontrolou (<http://demo.nextlab.ir/getattachment/096a51d4-1530-4f81-92c0-f5477c584b9b/CLSI-M26-A.aspx>, stiahnuté 26.3.2018). Metóda môže byť použitá aj pre stanovenie synergizmu alebo antagonizmu medzi viacerými účinnými látkami (White *et al.*, 1996).

Ďalšia metóda je založená na schopnosti merať koncentráciu adenózintrifosfátu (ATP), ktorý je prirodzene prítomný v živých bunkách a jeho kvantifikácia je používaná pre stanovenie mikrobiálnej populácie vo vzorke. Princíp stanovenia spočíva v reakcii ATP s chemickou látkou D-luciferín za katalýzy pomocou enzýmu luciferázy, pričom dochádza k vzniku adenylluciferínu. Ten je následnou oxidáciou premenený na oxyluciferín, reakcia je sprevádzaná uvoľnením svetla. Svetlo je merané luminometrom a medzi životnosťou buniek a luminiscenciou je lineárny vzťah. Metóda má široké využitie, môže byť napríklad použitá pre testovanie *in vivo* alebo *in situ* (Vojtek *et al.*, 2014), pre testy cytotoxicity (Crouch *et al.*, 1993) s výhodami, medzi ktoré patrí jej rýchlosť a poskytovanie kvantitatívnych výsledkov.

V neposlednej rade sa v zriedkavých prípadoch stretávame aj s využitím prietokovej cytometrie pre testovanie antimikrobiálnych aktivít. Avšak nevýhodou tejto metódy je jej finančná náročnosť (potreba vhodných DNA farbív pre zobrazenie poškodených buniek, napríklad propidium jodid) a potrebné laboratórne vybavenie (prietoková cytometria). Metóda však dokáže rozdeliť testované bunky mikroorganizmu na životaschopné, mŕtve a poškodené, čo je žiaduce predovšetkým v potravinárskom priemysle (Paparella *et al.*, 2008). Je schopná detekovať rezistenciu, stanoviť vplyv testovanej látky na životnosť buniek a poskytuje veľmi rýchle výsledky v porovnaní s akoukoľvek inou metódou testovania antimikrobiálnej aktivity, a to už za 2-6 hodín (Ramani *et al.*, 2000).

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál

V praktickej časti diplomovej práce boli analyzované transgénne rastliny jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise), a to dve línie, ktoré obsahovali gén kódujúci sekrečnú signálnu sekvenciu cytokinín oxidáza/dehydrogenázy (*CKX1*) pôvodom z kukurice siatej (*Zea mays*). Obe línie obsahovali gény kódujúce histidínovú kotvu (*6x His-tag*) a maltózu viažuci proteín (*MBP*) sfúzované s génom kódujúcim ľudský antimikrobiálny peptid LL-37. Obe línie tiež obsahovali gén kódujúci signálnu KDEL sekvenciu zabezpečujúcu retenciu chimérneho peptidu do endoplazmatického retikula. Expresia transgénov bola riadená v jednom prípade jačmenným endogénnym zrnovo-špecifickým B-hordeínovým promótorom (*B-HORp*) a v druhom prípade konštitutívnym ubiquitínovým promótorom (*UBIp*). Ako negatívna kontrola boli pre experimenty použité línie jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise), ktoré prešli rovnakým procesom regenerácie z pletivových kultúr ako línie transgénne, ale neboli infikované pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens* a ich regenerácia prebiehala na médiu bez obsahu antibiotík. Transgénne línie jačmeňa boli pripravené a dodané Mgr. Editou Holáskovou.

- *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*
- *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*

Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantných produktov z jačmeňa boli použité baktérie *Escherichia coli* TOP10 a *Micrococcus luteus*.

3.1.2 Chemikálie, kity a gély

Chemikálie boli dodané nasledujúcimi firmami:

- Acros Organics (USA): BSA
- Amresco (USA): agaróza
- Duchefa Biochemie (Holandsko): tris
- Lachema (ČR): dihydrogénfosforečnan sodný, thiosíran sodný pentahydrát
- Lach-Ner (ČR): chlorid sodný, sacharóza, metanol, glycín, glycerol, etanol, formaldehyd, dusičnan strieborný, uhličitan sodný, kyselina octová, maltóza
- Penta (ČR): hydrogénfosforečnan disodný, SDS, chlorid vápenatý

- Roche (Švajčiarsko): EDTA
- Carl Roth (Nemecko): imidazol
- Sigma-Aldrich (USA): Triton X-100, Tween-20, PMSF, hydrogénuhličitan amónny

Pre PCR reakciu bol použitý enzým GoTaQ polymeráza (Promega, USA), 10 x GoTaQ Flexi pufor (Promega, USA), 25 mmol.l⁻¹chlorid horečnatý (Promega, USA), zmes nukleotidov o koncentrácii 10 mmol.l⁻¹ (Fermentas, Kanada) a nuclease-free voda (Qiagen, Nemecko). V prípade agarózovej elektroforézy gDNA bol použitý marker molekulovej hmotnosti 1 kb Plus GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA). Na izoláciu RNA z rastlinného materiálu bol použitý RNAqueous kit (Ambion, USA). Z vyizolovanej RNA bola odstránená prípadná kontaminácia molekulami DNA pomocou enzýmu Turbo DNase s príslušným 10x Turbo DNase pufrom (Thermo Fisher Scientific, USA). Následne bola RNA prečistená pomocou Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter, USA). Purifikovaná RNA bola použitá pre prepis do komplementárnej DNA (cDNA) použitím enzýmu RevertAid H Minus Reverse Transcriptase a 5 x reakčného pufu (Thermo Fisher Scientific, USA). Pri agarózovej elektroforéze cDNA bol použitý marker molekulovej hmotnosti 100 bp GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA). Pre real-time PCR bol použitý gb Elite PCR Master Mix (Generi Biotech, ČR).

Pre inhibíciu aktivity proteáz v proteínových extraktoch bol použitý Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Švajčiarsko) a koncentrácia proteínov bola zmeraná metódou Bradfordovej, pričom bolo použité činidlo Protein Assay Dye Reagent Concentrate (BIO-RAD, Nemecko) a ako štandard pre vytvorenie kalibračnej krivky použitý hovädzí sérový albumín BSE (Sigma-Aldrich, USA). Purifikácia rekombinantného proteínu z hrubého proteínového extraktu bola vykonaná s použitím matrice Iminodiacetic Acid Sepharose® (Sigma-Aldrich, Švédsko) s naviazanými iónmi kobaltu, resp. s použitím amylozovej matrice (New England Biolab, Anglicko). Pri gélovej SDS-PAGE elektroforéze boli proteínové vzorky zmiešané s nanášacím pufrom 4 x Bolt™ LDS Sample Buffer (Life Technologies, USA) a redukčným činidlom 10 x Sample Reducing Agent (Life Technologies, USA). Ako štandard molekulovej hmotnosti bol použitý Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen, USA) a ako pozitívna kontrola syntetický peptid LL-37 o koncentrácií 35 ng. µl⁻¹ (Peptide Institute Inc., Japonsko). Proteínové vzorky boli

elektroforeticky delené na komerčne dostupnom polyakrylamidovom géli NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel (Life Technologies, USA), ako elektroforetický pufor bol použitý 20 x NuPAGE® Running Buffer (Life Technologies, USA). Polyvinylidén fluoridová membrána s proteínmi získaná metódou Western blot bola blokována roztokmi iBind™ Solution Kit (Life Technologies, USA). Pre detekciu chimérneho peptidu bola použitá primárna protilátka anti-LL-37 mouse monoclonal IgG (sc166770; Santa Cruz Biotechnology, USA), resp. anti-MBP antiserum (New England Biolab, Anglicko) a ako sekundárna protilátka bola použitá rabbit anti-mouse IgG-HRP (sc3589; Santa Cruz Biotechnology, USA), resp. goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, USA) Na chemiluminiscenčnú detekciu LL-37 boli použité komerčné roztoky kitu Clarity™ Western ECL Substrate (BIO-RAD, USA). Pre imunolokalizáciu rekombinantného LL-37 bola použitá primárna protilátka mouse monoclonal anti LL-37 IgG (sc166770; Santa Cruz Biotechnology, USA) a sekundárna protilátka rabbit anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, USA) značená alkalickou fosfatázou. Následne bol aplikovaný substrát alkalickéj fosfatázy NBT/BCIP solution (Sigma-Aldrich, USA).

Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity boli z chimérneho peptidu LL-37 proteolyticky odštiepené fúzne kotvy pomocou enterokinázy Enterokinase light chain (číslo produktu P8070S; New England Biolabs, Anglicko).

3.1.3 Prístroje a vybavenie

Analytické váhy 5034/120 Nahita (AUXILAB, Španielsko)

Box laminárny (MERCİ, Taliansko)

Centrifúga 5417 R (Eppendorf, Nemecko)

Centrifúga veľká chladená 5810 R (Eppendorf, Nemecko)

Digestor M 1200 (MERCİ, Taliansko)

Digitálne váhy (Bel Engineering, Taliansko)

Digitálny fotoaparát Lumix DMC-TZ6 (Panasonic, Japonsko)

Elektroforetická komôrka (Biometra, Nemecko)

Elektroforetická komôrka OWL B2 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Elektroforetická komôrka pre SDS-PAGE Mini Gel Tank (Thermo Fisher Scientific, USA).

Elektromagnetická miešačka RH basic (IKA, Nemecko)

Fytotron (Weiss Technik, Anglicko)

Komôrka Mini Trans-Blot™ Cell and Critetion™ Blotter (Bio-Rad, USA).

Magnetický stojan (Alpaqua, USA)
Minicentrifúga s vortexom (Biosan, EÚ)
Nanodrop spektrofotometer (Thermo Fisher Scientific, ČR)
Oscilačný mlyn Mixer Mill MM 400 s (Retsch, Holandsko)
pH meter (Thermo Fisher Scientific, USA)
Rotátor (Labnet International, USA)
Spektrofotometer 8453 (Agilent Technologies, USA)
Systém pre dokumentáciu GelDoc™ EZ Imager (BIO-RAD, USA)
Termoblok (BIOER, Čína)
Termocyklér PCR-TP (Biometra, Nemecko)
Termocyklér StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Singapur)
Termomixér (Eppendorf, Nemecko)
Trepáčka inkubovacia (Biosan, EÚ)
Vákuová komôrka Visiprep™ SPE Vacuum Manifold (Sigma-Aldrich, USA).
Vizualizačný systém ChemiDoc™ MP Imaging System (BIO-RAD, USA)
Vyvolávacia kazeta iBind™ Western Device (Life Technologies, Izrael)
Zdroj napätia pre elektroforézu (Labnet International, Taiwan)

3.1.4 Iné

Centrifugačné kolóny Amicon® Ultra (Merck Milipore, USA)
Magnetické guľičky (Beckman Coulter, USA)
Polypropylénové chromatografické kolóny (Bio-Rad, USA)
PVDF membrána Immobilon®-P (Merck Milipore, USA)
Substrát Gramoflor (Gramoflor GmbH & Co. KG, Nemecko).
Vyvolávacia podložka iBind™ Cards (Life Technologies, Izrael)

3.1.5 Počítačové programy

Pre vyhodnotenie kvantitatívnej PCR bol použitý program StepOne Software 2.3 (Life Technologies, ČR). Pre detekciu a relatívnu kvantifikáciu množstva peptidu LL-37 bol použitý program Image Lab™ Software (BIO-RAD, ČR).

3.1.6 Použité roztoky a média

• Izolácia genómovej DNA z rastlinného materiálu:

Extrakčný pufo:

200 mmol.l⁻¹ Tris, 250 mmol.l⁻¹ chlorid sodný, 25 mmol.l⁻¹ EDTA, 0,5% (w/v) SDS, pH = 7,50.

1x TE pufo:

10 mmol.l⁻¹ Tris, 1 mmol.l⁻¹ EDTA, pH = 8,00.

• Agarózová elektroforéza:

1x TAE pufo:

40 mmol.l⁻¹ Tris-acetát, 1 mmol.l⁻¹ EDTA, pH = 8,00.

1% (w/v) agarózový gél:

10 g agarózy na 1000 ml 1x TAE pufru.

3% (w/v) agarózový gél:

30 g agarózy na 1000 ml 1x TAE pufru.

• Extrakcia rekombinantného peptidu z rastlinného materiálu:

Extrakčný pufo pre prípravu proteínového extraktu:

100 mmol.l⁻¹ Tris, 300 mmol.l⁻¹ chlorid sodný, 10 mmol.l⁻¹ imidazol, 0,3% Triton X-100, 4% (v/v) glycerol, 1 mmol.l⁻¹ PMSF, pH = 8,00.

Fosfátový pufo pre izoláciu proteínových teliesok:

10 mmol.l⁻¹ fosfátový pufo, pH = 7,50, pripravený zmiešaním roztoku 0,2 mol.l⁻¹ hydrogénfosforečnanu disodného s roztokom 0,2 mol.l⁻¹ dihydrogénfosforečnanu sodného, s obsahom 0,6 mmol.l⁻¹ sacharózy. Bol pridaný aj 1 mmol.l⁻¹ PMSF.

• Purifikácia rekombinantného peptidu s využitím afinitnej chromatografie:

Ekvilibračný pufo matrice Co²⁺-IDA Sepharose:

100 mmol.l⁻¹ Tris, 300 mmol.l⁻¹ chlorid sodný, 10 mmol.l⁻¹ imidazol, 0,3% Triton X-100, 4% glycerol, pH = 8,00.

Premývací pufoer matrice Co²⁺-IDA Sepharose:

100 mmol.l⁻¹ Tris, 300 mmol.l⁻¹ chlorid sodný, 10 mmol.l⁻¹ imidazol, 4% (v/v) glycerol, pH = 8,00.

Elučný pufoer matrice Co²⁺-IDA Sepharose:

100 mmol.l⁻¹ Tris, 300 mmol.l⁻¹ chlorid sodný, 400 mmol.l⁻¹ imidazol, 4% (v/v) glycerol, pH = 8,00.

Ekvilibračný pufoer (resp. premývací pufoer) amylozovej matrice:

20 mmol.l⁻¹ Tris, 0,2 mmol.l⁻¹ chlorid sodný, 1 mmol.l⁻¹ EDTA, pH = 7,40.

Elučný pufoer amylozovej matrice:

20 mmol.l⁻¹ Tris, 0,2 mmol.l⁻¹ chlorid sodný, 1 mmol.l⁻¹ EDTA, 10 mmol.l⁻¹ maltóza, pH = 7,40.

• Analýza Western blot:

10x transferový pufoer:

0,247 mol.l⁻¹ Tris, 1,92 mol.l⁻¹ glycín.

Blotovací pufoer:

10% (v/v) transferový pufoer, 15% (v/v) metanol.

• Vizualizácia proteínov pomocou farbenia striebrom:

Fixačný roztok (roztok č.1):

50% (v/v) etanol, 10% (v/v) kyselina octová.

Roztok thiosíranu:

0,81 mmol.l⁻¹ thiosíran sodný pentahydrát.

Roztok striebra:

23,5 mmol.l⁻¹ dusičnan strieborný, 750 ul.l⁻¹ 37% (v/v) formaldehyd.

Vyvíjací roztok:

566 mmol.l⁻¹ uhličitan sodný, 0,5 ml.l⁻¹ 37% (v/v) formaldehyd, 0,81 mmol.l⁻¹ thiosíran sodný pentahydrát.

• Stripovanie PVDF membrány kyslým pH:

Stripovací roztok:

0,025 mol.l⁻¹ glycín, 1% (w/v) SDS, pH = 2,00.

Pufor PBS:

0,01 mmol.l⁻¹ hydrogénfosforečnan disodný, 0,9% (w/v) chlorid sodný, pH = 7,2.

• Testovanie biologickej aktivity:

Pufor pre enterokinázu:

20 mmol.l⁻¹ Tris, 50 mmol.l⁻¹ chlorid sodný, 2 mmol.l⁻¹ chlorid vápenatý, pH = 8,00.

Pufor pre zvýšenie aktivity peptidu LL-37:

5 mmol.l⁻¹ hydrogénuhličitan amónny, pH = 8,00.

• In situ imunolokalizácia:

Tris pufor:

125 mmol.l⁻¹ Tris, 2% (w/v) SDS, pH = 6,80.

TBS:

10 mmol.l⁻¹ Tris, 500 mmol.l⁻¹ chlorid sodný, pH = 7,50.

TBS-T:

10 mmol.l⁻¹ Tris, 500 mmol.l⁻¹ chlorid sodný, 0,1% (v/v) Tween 20, pH = 7,50.

5% (w/v) BSA v TBS:

5 mg hovädzieho sérového albumínu na 0,1 ml roztoku TBS.

2,5% (w/v) BSA v TBS:

2,5 mg hovädzieho sérového albumínu na 0,1 ml roztoku TBS.

3.2 Metódy

3.2.1 Analýza a selekcia transgénnych rastlín jačmeňa

3.2.1.1 Izolácia genómovej DNA (Edwards *et al.*, 1991)

Pre izoláciu genómovej DNA bolo použitých približne 200 mg listov z 1 mesiac starých rastlín jačmeňa (vývojové štádium 13, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) T2 generácie. Rastlinný materiál bol homogenizovaný pomocou oscilačného mlynu pri frekvencii 25 Hz po dobu 1 minúty za stáleho chladenia tekutým dusíkom. K zhomogenizovanému rastlinnému materiálu bolo pridaných 400 μ l extrakčného pufri s obsahom 1 μ l RNázy (New England Biolab, Anglicko) a vzorky boli premiešané pomocou vortexu po dobu 10 sekúnd. Po 1 hodinovej inkubácii pri laboratórnej teplote boli vzorky centrifugované pri 20 000 x g po dobu 5 minút. Následne bolo odoberatých 300 μ l supernatantu, ku ktorým bol pridaný rovnaký objem 100% (v/v) izopropanolu. Vzorky boli premiešané opakovaným otočením skúmaviek a po 2 minútovej inkubácii pri laboratórnej teplote boli centrifugované pri 20 000 x g po dobu 5 minút. Po odstránení supernatantu bol získaný pelet zbavený zostatkového izopropanolu 5 minútovou inkubáciou na vzduchu a následne bolo k peletu pridaných 100 μ l 1 x TE pufri. Následnou inkubáciou vzoriek cez noc pri teplote 4 °C došlo k uvoľneniu genómovej DNA do 1 x TE pufri, ktorý bol na druhý deň odobraný a uschovaný.

3.2.1.2 PCR

Pre PCR reakciu bola použitá reakčná zmes, ktorá obsahovala približne 100 ng templátovej genómovej DNA, 0,75 μ l 25 mmol.l⁻¹ chloridu horečnatého, 0,25 μ l 10 μ mol.l⁻¹ forward primeru, 0,25 μ l 10 μ mol.l⁻¹ reverse primeru (Tab. 2), 0,25 μ l 10 mmol.l⁻¹ zmesi dNTPs, 2,5 μ l 5x GoTaQ Flexi pufri, 0,07 μ l GoTaQ polymerázy a zmes bola doplnená nuclease-free vodou do objemu 12,5 μ l. Ako negatívna kontrola PCR reakcie slúžila nuclease-free voda. Teplotný priebeh reakcií sumarizuje tabuľka 3 a 4.

Tab. 2 Sekvencia forward a reverse primerov použitých pre detekciu transgénu u rásln jačmeňa. *hyg* – gén kódujúci hygromycín fosfotransferázu, *CATH* – gén kódujúci peptid LL-37 (katelicidín), *B-HORp* – gén kódujúci B-hordeínový promótor, *Ubi* – gén kódujúci ubiquitínový promótor.

Primer		Sekvencia 5' → 3'
Forward	<i>SP_hyg</i>	CGAAAAGTTCGACAGCGTC
Reverse	<i>ASP_hyg</i>	GGTGTCGTCCATCACAGTTTG
Forward	<i>B-HORp</i>	TCCATTCTTGTTCAGGCTAAC
Reverse	<i>CATH</i>	GCCGATCTTCTCCTTGGACTT
Forward	<i>Ubi1</i>	TGCTCACCCCTGTTGTTTGGTGTTAC

Tab. 3 Teplotný priebeh PCR reakcie pre detekciu *hpt* génu s použitím primerov *SP_hyg* a *ASP_hyg*.

Krok	1.	2.	3.	4.	5.
	Počiatočná denaturácia	Denaturácia	Hybridizácia	Elongácia	Záverečná elongácia
Teplota (°C)	95	95	55	72	72
Čas (s)	120	30	30	30	300
Počet opakovaní	1 x		35 x (krok 2-4)		1 x

Tab. 4 Teplotný priebeh PCR reakcie s použitím sekvenčne špecifických primerov *Ubi1* a *B-HORp* v kombinácii s *CATH*.

Krok	1.	2.	3.	4.	5.
	Počiatočná denaturácia	Denaturácia	Hybridizácia	Elongácia	Záverečná elongácia
Teplota (°C)	95	95	55	72	72
Čas (s)	120	30	102	30	420
Počet opakovaní	1 x		35 x (krok 2-4)		1 x

Pozn. Pre každú PCR reakciu bola teplota hybridizácie určená na základe hodnôt T_m danej sady primerov a čas potrebný na elongáciu nového reťazca bol určený na základe veľkosti vznikajúceho amplicónu pri použití uvedenej sady primerov.

3.2.1.3 Agarózová elektroforéza

Amplicóny z PCR boli rozdelené na 1% (w/v) agarózovom géli s prídavkom 0,5% (v/v) etídium bromidu. Agarózový gél bol umiestnený do elektroforetickej komôrky naplnenej 1x TAE pufrom. Elektroforetické delenie prebiehalo približne 30 minút pri 120 V. Následne na vizualizáciu separovaných fragmentov DNA bol použitý systém GelDoc™ EZ Imager.

3.2.2 Analýza hladiny exprese transgénu

3.2.2.1 Izolácia RNA

Pre izoláciu RNA bol použitý komerčný RNAqueous kit od firmy Ambion (Foster City, USA). Zmrazené jačmenné zrná vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) T1 generácie transgénnych línií jačmeňa, resp. zmrazené korene či listy odobrané z rovnako starých rastlín, boli zhomogenizované pomocou trecej misky. Následne bolo k 50 mg nadržvených jačmenných zŕn pridaných 600 μ l Lysis/Binding Solution s prídavkom 50 μ l Plant RNA Isolation Aid, resp. k 100 mg nadržvených koreňov či listov bolo pridaných 1000 μ l Lysis/Binding Solution. Vzorky boli ďalej premiešané pomocou vortexu a inkubované pri laboratórnej teplote po dobu 5 minút. Po centrifugácii pri 16 000 x g, 4°C, 5 minút bol získaný supernatant prenesený do čistej 2 ml mikroskúmavky. K supernatantu bol následne pridaný 1 ml 64% (v/v) etanolu, vzorky boli premiešané a z každej bolo 700 μ l nanesených na kolónku s filtrom. Vzorky boli centrifugované pri 10 000 x g, 4°C, pokiaľ filtrom nepretiekol celý objem aplikovanej vzorky. Premytie jednotlivých kolóniek obsahujúcich zachytené molekuly RNA bolo vykonané nanesením roztoku Wash Solution 1 v objeme 700 μ l a vzorky boli centrifugované pri podmienkach 10 000 x g, 4°C, 30 sekúnd. Následne bol aplikovaný roztok Wash Solution 2 v objeme 500 μ l a vzorky boli centrifugované pri rovnakých podmienkach ako v predchádzajúcom kroku. Premytie roztokom Wash Solution 2 bolo ešte raz zopakované a na záver, za účelom odstránenia zvyškov použitých roztokov, boli kolónky naprázdno centrifugované pri 10 000 x g, 4°C, 30 sekúnd. RNA bola z filtrov kolóniek eluovaná pomocou 100 μ l roztoku Elution Solution vopred zahriateho na 80°C s následnou centrifugáciou pri 10 000 x g, 30 sekúnd a laboratórnej teplote.

3.2.2.2 Odstránenie DNA kontaminácie z vyizolovanej RNA

K 40 μ l vyizolovanej RNA bolo pridaných 5 μ l 10 x reakčného pufru pre DNázu a 3 μ l Turbo DNázy. Vzorky boli premiešané pomocou vortexu a inkubované pri teplote 37°C po dobu 45 minút. Následne bol krok zopakovaný s prídavkom 2 μ l Turbo DNázy a vzorky inkubované pri rovnakých podmienkach.

3.2.2.3 Prečistenie RNA pomocou Agencourt RNAClean XP

Ku vzorkám RNA ošetrenej Turbo DNázou bolo pridaných 25 μ l magnetických guličiek, na ktoré sa RNA zachytáva, a 20 μ l 100% (v/v) izopropanolu (nuclease-free). Vzorky boli

premiešané, inkubované pri laboratórnej teplote po dobu 10 minút a následne umiestnené na magnetický stojan po dobu 5 minút. Po ustálení magnetických guľičiek s naviazanou RNA na stenách skúmaviek bola odstránená kvapalná fáza. Následne boli skúmavky zložené z magnetického stojanu a magnetické guľičky s naviazanou RNA boli prečistené prídavkom 200 μl 70% (v/v) etanolu (nuclease-free), ktorý bol po minútovej inkubácii opäť na magnetickom stojane odstránený. Prečistenie pomocou 70% (v/v) etanolu bolo 2-krát zopakované za rovnakých podmienok. Zvyšky etanolu boli zo vzoriek odstránené ich 5 minútovou inkubáciou na vzduchu. Na záver bolo k magnetickým guľičkám s naviazanou RNA pridaných 20 μl RNase free vody a vzorky boli inkubované 10 minút pri laboratórnej teplote. Následne boli umiestnené na magnetický stojan a po 5 minútovej inkubácii bola voda obsahujúca prečistenú RNA odobraná do čistej mikroskúmavky.

3.2.2.4 Meranie koncentrácie RNA

Koncentrácia vyizolovanej a prečistenej RNA bola zmeraná pomocou nanodrop spektrofotometru. Pre meranie koncentrácie bol použitý 1 μl vzorky, ako blank bola použitá RNase free voda.

3.2.2.5 Syntéza cDNA

Pre syntézu cDNA bolo na reakciu použitých približne 2500 ng vyizolovanej a prečistenej RNA v objeme 12 μl , ktorý bol v prípade potreby doplnený nuclease-free vodou. V prvom kroku bol k RNA pridaný 1 μl oligodT o koncentrácií 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a vzorky boli zahriate v termocykléri na 65°C po dobu 5 minút. Následne boli do vzoriek pridané 2 μl zmesi nukleotidov o koncentrácií 10 mmol.l^{-1} , 4 μl 5x koncentrovaného reakčného pufru pre transkriptázu a 1 μl transkriptázy. Vzorky boli umiestnené do termocykléru na 42°C po dobu 60 minút a následne na 70°C po dobu 10 minút.

3.2.2.6 Semikvantitatívna RT-PCR

Pred samotnou analýzou boli vzorky pripravenej cDNA nariedené nuclease-free vodou v pomere 1:2. Pre analýzu expresie transgénu bola použitá chémia TaqMan a gb Elite PCR Master Mix. Reakcia bola nastavená v celkovom objeme 10 μl a obsahovala: 1 μl ROX Reference Dye, 4 μl gb Elite pufru, 2,5 μl zmesi, ktorá obsahovala próbu (vo výslednej koncentrácií 0,25 $\mu\text{mol}.\mu\text{l}^{-1}$), forward a reverse primery (vo výslednej koncentrácií 0,3 $\mu\text{mol}.\mu\text{l}^{-1}$) a 2,5 μl vzorky cDNA. Každá vzorka bola nastavená v troch technických replikátoch. Expressia transgénu bola sledovaná na základe detekcie génu kódujúceho maltózu viažúci proteín (*MBP*) a ako endogénne kontroly boli použité gény

kódujúce jačmenný endogénny proteín aktín (*HvAct*), a cyklofilín (*HvCyklo*). Sekvenciu použitých primerov a prôb sumarizuje tabuľka 5 a teplotný priebeh reakcie tabuľka 6. Vzorky analyzované pomocou RT-PCR boli elektroforeticky rozdelené na 3% (w/v) agarózovom géli s obsahom 0,5% (v/v) etídium bromidu pre vizualizáciu DNA. 8 µl každej vzorky amplikónov po RT-PCR bolo zmiešaných s 1,4 µl 6x koncentrovaného nanášacieho pufru (6x DNA Loading Dye) a takto pripravené vzorky boli nanosené na agarózový gél, ktorý bol umiestnený do elektroforetickej komôrky naplnenej 1x TAE pufrom. Ako štandard molekulovej hmotnosti bol použitý 100 bp GeneRuler DNA Ladder (4 µl). Elektroforéza prebiehala pri 70 V po dobu 1 hodiny. Následne bol na vizualizáciu separovaných fragmentov cDNA použitý systém GelDoc™ EZ Imager.

Tab. 5 Sekvencie použitých forward a reverse primerov pre real-time PCR.

Primer		Sekvencia 5' → 3'
Forward	<i>fw_MBP</i>	AGGCCCTCTCCCTGATCTACA
Reverse	<i>rev_MBP</i>	AGTACGGCTCCTGGAGGTTGA
Próba	<i>MBP_probe</i>	AAGGACCTCCTCCCGAACCCGC
Forward	<i>HvACTtaq_fw</i>	TGTTGACCTCAAAGGAAGCTATT
Reverse	<i>HvACTtaq_rev</i>	GGTGCAAGACCTGCTGTTGA
Próba	<i>HvACT_probe</i>	TGTAGTATTCAGCTGGTTGGTGGCACAGC
Forward	<i>HvCYKLO_fw</i>	TGTCTATGGATTTGACACCACTCTTT
Reverse	<i>HvCYKLO_rev</i>	GAAGCCTGCCCCGAAGCA
Próba	<i>HvCYKLO_probe</i>	TGACCTGTTTTCTTCGCACACCAGCC

Tab. 6 Teplotný priebeh real-time PCR reakcie.

Krok	1.	2.	3.	4.
	Aktivácia	Aktivácia	Denaturácia	Hybridizácia/Elongácia
Teplota (°C)	50	95	95	60
Čas (s)	120	300	15	60
Počet opakovaní	1 x	1 x	40 x (krok 3-4)	

3.2.3 Imunodetekcia rekombinantného peptidu metódou Western blot

3.2.3.1 Izolácia proteínov uložených v proteínových telieskach

Pre izoláciu proteínov z proteínových teliesok bolo vždy z jednotlivých nezávislých transgénnych línií T2 generácie jačmeňa náhodne vybraných 15 zŕn vývojového štádia mliečnej zrelosti (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH; približne 0,35 g po zbavení obalových štruktúr), v prípade koreňov a listov bolo z rovnako starých transgénnych rastlín odobraných približne 0,7 g materiálu. Zrná boli zbavené obalových štruktúr a následne boli zhomogenizované pomocou tĺčika a trecej misky v 3 ml fosfátového pufru s obsahom $0,6 \text{ mmol.l}^{-1}$ sacharózy. Počas homogenizácie bola miska chladená na ľade. Po následnej centrifugácii za podmienok $200 \times \text{g}$, 4°C , 5 minút bol supernatant prenesený do novej mikroskúmavky a centrifugácia vzoriek bola zopakovaná. Pre získanie peletu obsahujúceho proteínové telieska boli vzorky centrifugované pri $2000 \times \text{g}$, 4°C , 20 minút. Narušenie štruktúry proteínových teliesok v pelete bolo dosiahnuté ich rozsuspendovaním v $70 \mu\text{l}$ 8 mol.l^{-1} močoviny s následným 10 minútovým zahriatím vzoriek pri teplote 90°C . Na záver boli vzorky centrifugované pri $20\,000 \times \text{g}$, 4°C , 15 minút, čím bol získaný supernatant obsahujúci proteíny z proteínových teliesok.

3.2.3.2 Izolácia proteínov uložených v proteínových telieskach získaných zo zrelých zŕn

Postup izolácie proteínových teliesok zo zŕn v štádiu dormancie (vývojové štádium 99, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) bol rovnaký ako v kapitole 3.2.3.1 s výnimkou toho, že zrelé zrná boli v prvom kroku zbavené obalových štruktúr, ďalej boli prevedené longitudiálne rezy zrnom a zrná boli namočené vo fosfátovom pufri približne na 12 hodín. Následne boli zhomogenizované použitím chladeného tĺčika a trecej misky s prídavkom 4 ml fosfátového pufru. V závere postupu bol pelet obsahujúci proteínové telieska rozsuspendovaný v $70 \mu\text{l}$ 8 mmol.l^{-1} močoviny a inkubovaný 20 minút pri teplote 30°C .

3.2.3.3 Extrakcia proteínov zo zŕn jačmeňa (získanie hrubého proteínového extraktu)

Pre extrakciu proteínov bolo použitých 12,5 g zhomogenizovaných zŕn vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) u T1 generácie, resp. T2 generácie transgénnych línií

jačmeňa. Z týchto rastlín boli v tom istom čase odobrané aj vzorky koreňov a listov. Odobraný rastlinný materiál bol homogenizovaný pomocou oscilačného mlynu pri frekvencii 26 Hz po dobu 2 minút za stáleho chladenia tekutým dusíkom. Následne bol k zhomogenizovanému materiálu pridaný extrakčný pufor v objeme 20 ml a podobu 2 hodín boli vzorky premiešavané na rotátore pri teplote 4°C. Po centrifugácii pri 12 000 x g, 4°C, 30 minút bol supernatant obsahujúci vyextrahované proteíny uschovaný, pričom bola vykonaná reextrakcia 20 ml čerstvého extrakčného pufru podľa vyššie popísaného postupu. Oba získané extrakty boli spojené a následne purifikované.

3.2.3.4 Purifikácia proteínového extraktu pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie

Jednotlivé kroky purifikácie získaných proteínových extraktov boli vykonané s použitím komôrky VisiprepTM SPE Vacuum Manifold. V prvom kroku boli polypropylénové chromatografické kolónky naplnené matricou IDA-Sepharose. Na dno chromatografickej kolónky bola nanosená matrica, a to v objeme 0,6 ml. Následne bola trikrát premytá 10 ml destilovanej vody s použitím vákua. Naviazanie iónov kobaltu bolo vykonané premytím matrice 6 ml 0,1 mol.l⁻¹ roztoku hexahydrátu chloridu kobaltnatého bez vákua. Nasledovalo opätovné premytie matrice Co²⁺-IDA-Sepharose, a to trikrát 10 ml destilovanej vody bez spusteného vákua. Na záver bola matrica s naviazanými iónmi kobaltu trikrát premytá 10 ml ekvilibračného pufru.

Celý objem hrubého proteínového extraktu bol nanosený na naekvilibrovanú matricu postupne po 10 ml pri teplote 4°C, a to bez pôsobenia vákua. Následne bola matrica s naviazaným rekombinantným produktom trikrát premytá 10 ml premývacieho pufru voľným prietokom. Po premytí bol rekombinantný produkt vyeluovaný dvojnásobným premytím matrice Co²⁺-IDA-Sepharose 10 ml elučného pufru, a to za pomoci vákua.

3.2.3.5 Purifikácia rekombinantného produktu pomocou afinitnej chromatografie na amylózovej matrici

Počas celého postupu purifikácie bola použitá vákuová komorka VisiprepTM SPE Vacuum Manifold. Na filter polypropylénových chromatografických kolóniek bolo nanosených približne 0,5 ml amylózovej matrice, ktorá bola následne trikrát premytá 10 ml destilovanej vody za podmienok posobenia vákua a pri laboratórnej teplote. Ekvilibrácia matrice bola vykonaná jej trojnásobným premytím 10 ml ekvilibračného pufru za podmienok vákua. Proteínové extrakty pripravené v ekvilibračnom pufri boli

pomaly, bez vákua, nanesené na naekvilibrovanú amylózovú maticu pri 4 °C. Po nanesení bola amylózová matica s naviazaným rekombinantným produktom trikrát premytá 10 ml premývacieho pufru bez pôsobenia vákua pri laboratórnej teplote. Na záver bol rekombinantný produkt vyeluovaný dvojnásobným premytím amylózovej matrice 10 ml elučného pufru, a to za podmienok vákua a laboratórnej teploty.

3.2.3.6 Zakoncentrovanie proteínového eluátu

Proteínový eluát po purifikácii proteínového extraktu pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie bol nariedený destilovanou vodou v pomere 1:3, a to z dôvodu nekompatibility filtrov centrifugačných kolón Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit s vysokou koncentráciou imidazolu v elučnom pufri (400 mmol.l⁻¹). V prípade purifikácie proteínového extraktu na amylózovej matici nebolo potrebné eluát riediť. Proteínové vzorky získané purifikáciou boli zakoncentrované na kolónach s filtrom 3 000 MWCO (molecular weight cut off), a to s využitím výkyvného rotoru centrifúgy. Pre dosiahnutie želaného objemu (približne 200 µl) boli vzorky opakovane centrifugované pri 3200 x g, 4°C, 20 minút.

3.2.3.7 Štiepenie rekombinantného produktu enterokinázou

Proteínové vzorky po predchádzajúcom prečistení (3.2.3.4 a 3.2.3.5) a zahustení (3.2.3.6) na objem približne 500 µl boli nariedené 2 ml pufru pre enterokinázu a vzorky boli opätovne zakoncentrované na objem 200 µl. Ku 100 µl proteínovej vzorky (v pufri pre enterokinázu) boli pridané 3 µl enterokinázy a štiepenie prebiehalo po dobu 12 hodín pri teplote 23°C.

3.2.3.8 Precipitácia proteínov

Proteíny boli z roztoku precipitované prídavkom schladeného 100% (v/v) acetónu pri teplote -20°C, a to vo výslednej koncentrácii 85 % (v/v). Proteínové vzorky s pridaným acetónom boli následne inkubované približne 16 hodín pri teplote -20°C. Po inkubácii a centrifugovaní pri 20 470 x g, 4°C, 60 minút bol získaný proteínový pelet rozsuspendovaný v 19,5 µl sterilnej vody.

3.2.3.9 Denaturačná polyakrylamidová gélová elektroforéza

(SDS-PAGE)

K 19,5 µl proteínovej vzorky bolo pridaných 7,5 µl nanášacieho pufru 4 x Bolt™ LDS Sample Buffer a 3 µl redukčného činidla 10 x Sample Reducing Agent. Zmes bola

premiešaná pomocou vortexu a inkubovaná pri teplote 70°C po dobu 10 minút.

Pre samotnú SDS-PAGE bola elektroforetická komôrka naplnená pufrom 1x NuPage Running Buffer, pričom bol do komôrky vložený komerčne dostupný polyakrylamidový gél NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel. Pripravené proteínové vzorky boli nanesené do jednotlivých jamiek gélu. Ako pozitívna kontrola bolo použitých 7 ng syntetického peptidu LL-37 a ako štandard molekulových hmotností proteínov bol použitý Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard. Elektroforetické delenie proteínov prebiehalo približne 30 minút pri 150 V.

3.2.3.10 Prenesenie proteínov na polyvinylidén fluoridovú membránu

V prvom kroku bola polyvinylidén fluoridová membrána aktivovaná 30 sekundovou inkubáciou v 100 % (v/v) metanole, následne opláchnutá v destilovanej vode a uložená v blotovacom puffri. Pre samotný prenos proteínov z gélu po SDS-PAGE na PVDF membránu bola pripravená blotovacia kazeta typu „sendvič“, zložená zo základnej plastovej podložky, penovej podložky, 2 kusov filtračného papiera, ďalej z polyakrylamidového gélu s rozdelenými proteínmi po SDS-PAGE, vopred aktivovanej PVDF membrány, 2 kusov filtračného papiera a na záver penovej podložky. Zložená blotovacia kazeta bola následne vložená do blotovacej komôrky Mini Trans-Blot® Cell and Criterion™ Blotter, ktorá bola naplnená blotovacím pufrom. Samotné prenesenie proteínov na membránu prebiehalo pri 100 V, 1 hodinu a pri teplote 4 °C a následne pri 20 V približne počas 12 hodín a teplote 4°C.

3.2.3.11 Imunodetekcia rekombinantného peptidu LL-37

Pre imunodetekciu peptidu LL-37 bola použitá vyvolávacia kazeta iBind™ Western Device, do ktorej bola umiestnená iBind™ podložka, následne navlhčená 6 ml roztoku iBind™ Solution. PVDF membrána po Western blote bola umiestnená stranou obsahujúcou prenesené proteíny na navlhčenú podložku. Následne bola vyvolávajúca kazeta iBind™ Western Device uzavretá a do jednotlivých jamiek bola v danom poradí nanesená primárna protilátka proti peptidu LL-37 (riedenie 1:285), resp. primárna protilátka proti MBP (riedenie 1:5000), ďalej 2 ml premývacieho roztoku iBind™ Solution, potom sekundárna protilátka Goat anti-rabbit (riedenie 1:1000) a na záver 7 ml premývacieho iBind™ Solution. Po 4 hodinovej inkubácii bola na membránu aplikovaná zmes detekčných roztokov Clarity™ Western ECL Substrate zmiešaných v pomere 1:1. Po 5 minútovej inkubácii membrány s detekčnými roztokmi

pri laboratórnej teplote bola membrána snímaná pomocou vizualizačného systému ChemiDoc™ MP Imaging system.

3.2.4 Testovanie antimikrobiálnej aktivity peptidu LL-37

3.2.4.1 Kultivácia bakteriálneho kmeňa *Escherichia coli* TOP10

Antimikrobiálna aktivita rekombinantného peptidu LL-37 bola testovaná voči gram-negatívnej baktérii *E. coli* TOP10 (dodaná Mgr. Editou Holáskovou). Prvotným krokom bolo naočkovanie 7 ml LB média s 300 μ l bakteriálnej kultúry. Bakteriálna suspenzia bola kultivovaná pri teplote 37°C a 180 rpm. Po dosiahnutí bakteriálnej hustoty 10^9 CFU.ml⁻¹ bola bakteriálna kultúra *E. coli* TOP10 nariedená v pomere 1:2 tekutým LB médiom (finálna bakteriálna koncentrácia bola 10^7 CFU.ml⁻¹).

3.2.4.2 Kultivácia bakteriálneho kmeňa *Micrococcus Luteus*

Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity LL-37 bola použitá aj gram-pozitívna baktéria *M. luteus* (dodaná Mgr. Editou Holáskovou). Príprava bakteriálnej kultúry *M. luteus* bola takmer totožná s prípravou kultúry gram-negatívnej *E. coli* TOP10, s rozdielom optimálnej teploty kultivácie, ktorá mala v tomto prípade hodnotu 30°C.

3.2.4.3 Testovanie antimikrobiálnej aktivity

Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantného peptidu LL-37 bol získaný hrubý proteínový extrakt zo zŕn vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) u T1, resp. T2, generácie transgénnych rastlín jačmeňa. Pre extrakciu bolo použitých 28 g nadrvených zŕn. Extrakcia proteínov bola vykonaná podľa postupu popísanom v kapitole 3.2.3.3. Hrubý proteínový extrakt (celkový objem približne 80 ml) bol pre purifikáciu na matici Co²⁺-IDA Sepharose rozdelený medzi tri chromatografické kolónky. Proces purifikácie bol vykonaný podľa postupu v kapitole 3.2.3.4 a 3.2.3.5. Eluát získaný zo všetkých troch chromatografických kolóniek bol spojený a zakoncentrovaný (3.2.3.6). Z každej zakoncentrovanej vzorky bolo odobraných 100 μ l, ktoré boli použité na štiepenie pomocou enterokinázy (3.2.3.7) Následne po štiepnej reakcii boli vzorky obsahujúce rekombinantný peptid LL-37_KDEL nariedené 5 mmol.l⁻¹ uhličitanom amónnym v pomere 1:4 a opäť zakoncentrované pomocou Amicon Ultra-0,5 Centrifugal Filter Unit (3000 MWCO) na konečný objem 40 μ l.

Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity bolo použitých 10 μ l zahustenej vzorky obsahujúcej štiepny produkt LL-37_KDEL, ktoré boli naočkované 0,5 μ l pripravenej

bakteriálnej kultúry *E. coli* TOP10 (3.2.4.1), resp. *M. luteus* (3.2.4.2). Ako pozitívna kontrola slúžil syntetický peptid LL-37 nariadený v 10 μl proteínovej vzorky z netransgénnych rastlín jačmeňa (vzorky z netransgénnych rastlín jačmeňa boli pripravené rovnakým postupom ako u transgénnych línií jačmeňa) a to v koncentráciách 0,025 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 0,5 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Následne boli vzorky premiešané pomocou vortexu, stočené na pikofúge a inkubované v termobloku pri teplote 37°C, 1000 rpm, 4 hodiny. Po inkubácii bolo pripravené desiatkové riedenie vzoriek v sterilnom LB médiu. Zo vzoriek nariadených 10⁵-krát bolo odobraných 100 μl , ktoré boli rozotrené na povrch tuhého LB média. Po následnej inkubácii pri teplote 37°C po dobu 18 hodín, boli na miskách spočítané jednotlivé kolónie a zo získaných výsledkov bola určená hodnota CFU.ml⁻¹. Celkovo bola antimikrobiálna aktivita rekombinantného peptidu LL-37_KDEL testovaná v 3 biologických replikátoch a každý z nich bol použitý v 2 technických replikátoch.

3.2.5 *In situ* imunolokalizácia rekombinantného peptidu LL-37

Pre *in situ* imunolokalizáciu boli použité zrná v štádiu dormancie (vývojové štádium 99, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) z T2 generácie, resp. T1 generácie, nezávislých transgénnych línií jačmeňa. Zrná boli inkubované v sterilnej vode pri teplote 4°C po dobu 12 hodín. Následne boli longitudiálne prerezané skalpelom a rastlinné pletivo bolo fixované v 100% (v/v) acetóne, a to po dobu 20 sekúnd. Následne boli zrná premyté trikrát sterilnou vodou po 1 minúte. Po premytí bol na 30 minút aplikovaný Tris pufor, potom roztok TBS-T na 15 minút a trikrát po 5 minútach roztok TBS. Nešpecifické väzbové oblasti proteínov boli blokovanie v 5% (w/v) BSA v roztoku TBS počas 4 hodín pri teplote 4°C. Následne boli zrná inkubované s primárnou protilátkou anti-LL-37 IgG mouse monoclonal, ktorá bola nariadená roztokom TBS s obsahom 2,5% (w/v) BSA v pomere 1:40. Zrná boli s primárnou protilátkou inkubované po dobu 12 hodín pri teplote 4°C. Po opätovnom premytí zrn roztokom TBS-T po dobu 15 minút a trikrát po 5 minútach roztokom TBS, bola aplikovaná sekundárna protilátka rabbit anti-mouse IgG značená alkalickou fosfatázou, ktorá bola nariadená roztokom TBS v pomere 1:2500. Inkubácia zrn so sekundárnou protilátkou prebiehala počas 4 hodín a teplote 4°C. Po záverečnom premytí roztokom TBS-T po dobu 10 minút a trikrát po 5 minút roztokom TBS, boli zrná 20 minút inkubované v 80 μl substrátu pre alkalickú fosfatázu BCIP/NBT. Následne boli vzorky uchovávané v sterilnej vode po celú dobu pozorovania.

3.2.6 Dvojkroková purifikácia proteínového extraktu s cieľom získania čistého rekombinantného produktu

Pre purifikáciu proteínového extraktu bola použitá metóda afinitnej chromatografie. Konkrétne išlo o využitie afinity histidínovej kotvy (His-tag) rekombinantného produktu k matrici Co^{2+} -IDA-Sepharose s následným využitím afinity maltózu viažuceho proteínu (MBP) rekombinantného produktu k amylózovej matrici.

Z približne 28 g zrn vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) T2 generácie transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise), resp. T2 generácie netransgénnych rastlín jačmeňa (kontrola), bolo pripravených približne 80 ml hrubého proteínového extraktu (kapitola 3.2.3.3). Z hrubého proteínového extraktu bolo odobraných 200 μl , ktoré boli použité na precipitáciu proteínov pomocou 100% (v/v) acetónu (kapitola 3.2.3.8). Zvyšný hrubý proteínový extrakt bol prvotne prečistený pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie na Co^{2+} -IDA-Sepharose (kapitola 3.2.3.4), pričom v prvom kroku bol celý eluát (80 ml) rozdelený a nanesený na tri chromatografické kolónky naplnené Co^{2+} -IDA-Sepharose matricou pre získanie čo najväčšieho množstva rekombinantného produktu zachyteného na matrici. Eluát po prečistení bol následne zahustený na troch centrifugačných kolónach Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit s filtrom 10 000 MWCO (molecular weight cut off; kapitola 3.2.3.6). Po zahutnení eluátu na objem približne 200 μl , bol eluát nariadený 10 ml ekvilibračného pufru pre amylózovú matricu. Nariadené proteínové vzorky boli ďalej purifikované pomocou afinitnej chromatografie na amylózovej matrici (kapitola 3.2.3.5). Počas purifikácie boli odoberané nasledujúce frakcie: 1) pretečená frakcia proteínovej vzorky po jej nanesení na amylózovú matricu, 2) pretečená frakcia po premytí amylózovej matrice s naviazaným rekombinantným produktom, 3) eluát obsahujúci uvoľnený rekombinantný produkt. Následne po prečistení na amylózovej matrici boli jednotlivé odobrané frakcie zakoncentrované opäť na centrifugačných kolónach Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit s filtrom 10 000 MWCO (molecular weight cut off; kapitola 3.2.3.6) na konečný objem približne 200 μl . Zakoncentrované vzorky boli ďalej precipitované cez noc pomocou 100% (v/v) acetónu (kapitola 3.2.3.8), pričom proteínový precipitát (aj v prípade vzorky z hrubého proteínového extraktu) bol rozpustený v 29 μl nuclease-free vody. Následne došlo k rozdeleniu získaných proteínových vzoriek na dve polovice o objeme 19,5 μl , pričom jedna polovica vzoriek bola použitá na

SDS-PAGE (kapitola 3.2.3.9) s následnou Western blot analýzou (3.2.3.11) a imunodetekciou peptidu LL-37, resp. imunodetekciou MBP. Druhá polovica vzoriek bola rovnako použitá na SDS-PAGE (kapitola 3.2.3.9) ale s následným farbením proteínov v polyakrylamidovom géli pomocou striebra (kapitola 3.2.6.1).

3.2.6.1 Farbenie striebrom

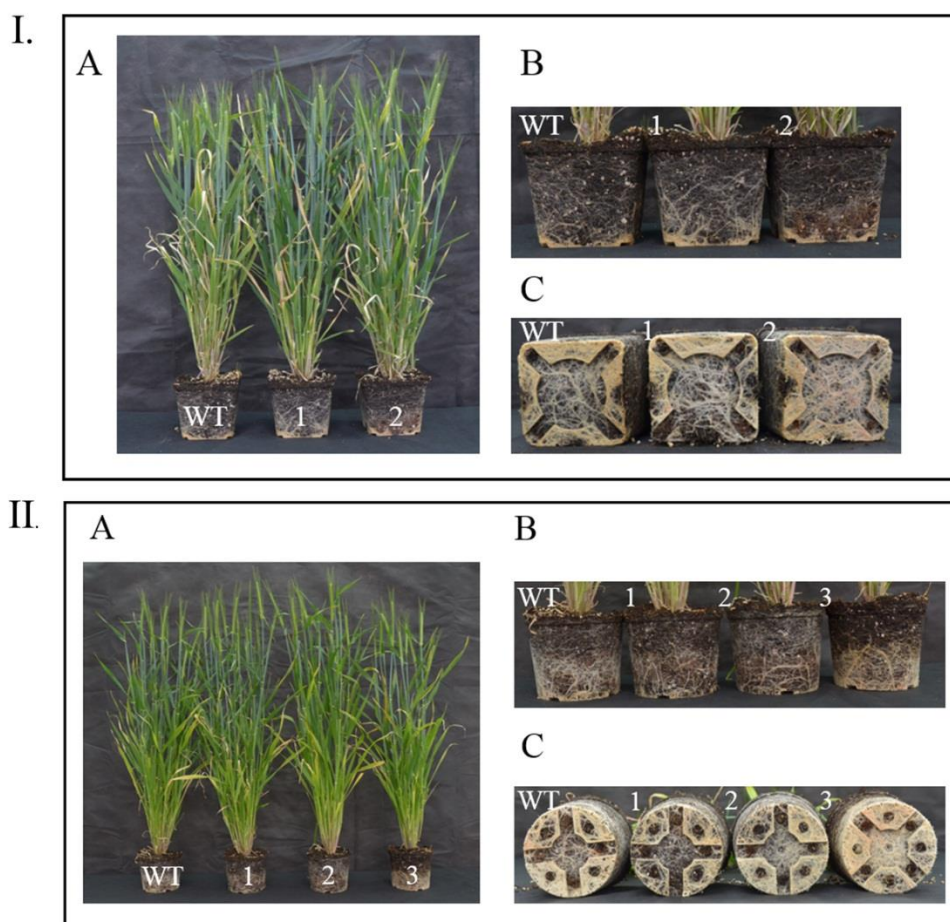
Proteíny rozdelené v polyakrylamidovom géli počas SDS-PAGE boli zafixované inkubáciou vo fixačnom roztoku po dobu 30 minút, následne bol gél premývaný v 10-krát nariadenom fixačnom roztoku po dobu 15 minút a potom trikrát premytý destilovanou vodou po dobu 5 minút. Po premytí v čerstvo pripravenom „roztoku thiosíranu“ presne po dobu 1 minúty, bol gél opäť premývaný trikrát destilovanou vodou po dobu 30 sekúnd. Následne bol aplikovaný „roztok striebra“ po dobu 20 minút, ktorý bol až do doby použitia uchovaný v tme pri 4°C. Po dvojnásobnom premytí gélu destilovanou vodou po dobu 20 sekúnd bol gél premiestnený do čistej nádoby a bol aplikovaný vyvíjací roztok. Vývoj sfarbenia gélu bol sledovaný optometricky a po dostatočnej vizualizácii proteínov bolo vyvíjanie sfarbenia zastavené použitím 5% roztoku kyseliny octovej. Následne bol gél zdokumentovaný pomocou GelDoc™ EZ Imager.

4 VÝSLEDKY

4.1 Analýza T1 generácie transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden promise)

4.1.1 Fenotypizácia

V priebehu vývoja T1 generácie nezávislých transgénnych línií jačmeňa exprimujúcich rekombinantný katelicidín pod konštitutívnym promótorom *UBIp* respektíve pod zrnovo-špecifickým *B-HORp* promótorom, bol sledovaný fenotyp nadzemnej časti (Obr. 8 A) a koreňového systému (Obr. 8 B, 8 C). Expresia chimérneho peptidu LL-37 u T1 generácie transgénnych línií jačmeňa v porovnaní s kontrolnými rastlinami nespôsobila významnú zmenu ich fenotypu, pričom sa transgénne rastliny vyvíjali približne rovnakou rýchlosťou ako kontrolné rastliny.

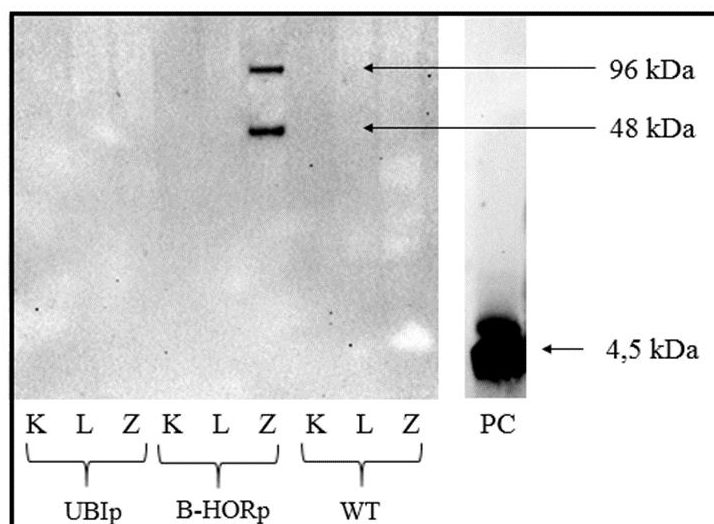


Obr. 8 Fenotyp nadzemnej časti (A) a koreňového systému (B, C) T1 generácie nezávislých transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) so stabilne integrovaným transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* (I.) alebo s transgénom *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* (II.) približne 4 mesiace od vysiatia. WT – kontrolná netransformovaná rastlina; 1, 2, 3 – nezávislé transgénne línie jačmeňa.

4.1.2 Analýza transgénnych línií jačmeňa na proteínovej úrovni

Za účelom detekcie rekombinantného peptidu LL-37 v zrnách (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH), koreňoch a listoch T1 generácie transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden promise) so stabilne integrovaným transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, resp. *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, boli pripravené proteínové extrakty z 12,5 g rastlinného materiálu odobraného spolu zo 6 náhodne vybraných transgénnych línií (kapitola 3.2.3.3). Proteínové extrakty boli purifikované na základe fúzie peptidu LL-37 so 6xHis-tag kotvou pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie (kapitola 3.2.3.4).

Rekombinantným produktom transgénnych rastlín jačmeňa je 6xHis_MBP_LL-37_KDEL, nakoľko po subcelulárnom zacielení produktu do ER je signálna sekvencia cytokinín oxidázy/dehydrogenázy (ZmCKX1) samovoľne odštiepená. Predpokladaná teoretická veľkosť rekombinantného produktu 6xHis_MBP_LL-37_KDEL bola približne 48 kDa. Veľkosť syntetického peptidu, použitého ako pozitívna kontrola, bola 4,5 kDa. Ako negatívna kontrola boli použité proteínové vzorky extrahované z koreňov, listov a zrn z kontrolných netransgénnych rastlín. Na základe imunodetekcie bol v prípade proteínových vzoriek transgénnych rastlín s integrovaným transgénom pod kontrolou zrno-špecifického B-hordeínového promótoru (*B-HORp*) pozorovaný signál veľkostne zodpovedajúci rekombinantnému produktu 6xHis_MBP_LL-37_KDEL (48 kDa) len v prípade proteínov extrahovaných z jačmenných zrn. Okrem toho bol u danej vzorky pozorovaný aj signál o veľkosti približne 96 kDa, ktorý veľkostne zodpovedá dimérnej forme rekombinantného produktu (Obr. 9). Podľa očakávania, v prípade proteínových vzoriek získaných z koreňov a listov u týchto rastlín nebol sledovaný žiadny signál. Naopak v prípade proteínových vzoriek extrahovaných z rastlín s integrovaným transgénom pod kontrolou konštitutívneho ubiquitínového promótoru (*Ubip*), signál indikujúci prítomnosť rekombinantného produktu nebol detegovaný, aj napriek tomu, že u týchto vzoriek bol daný signál bol očakávaný.

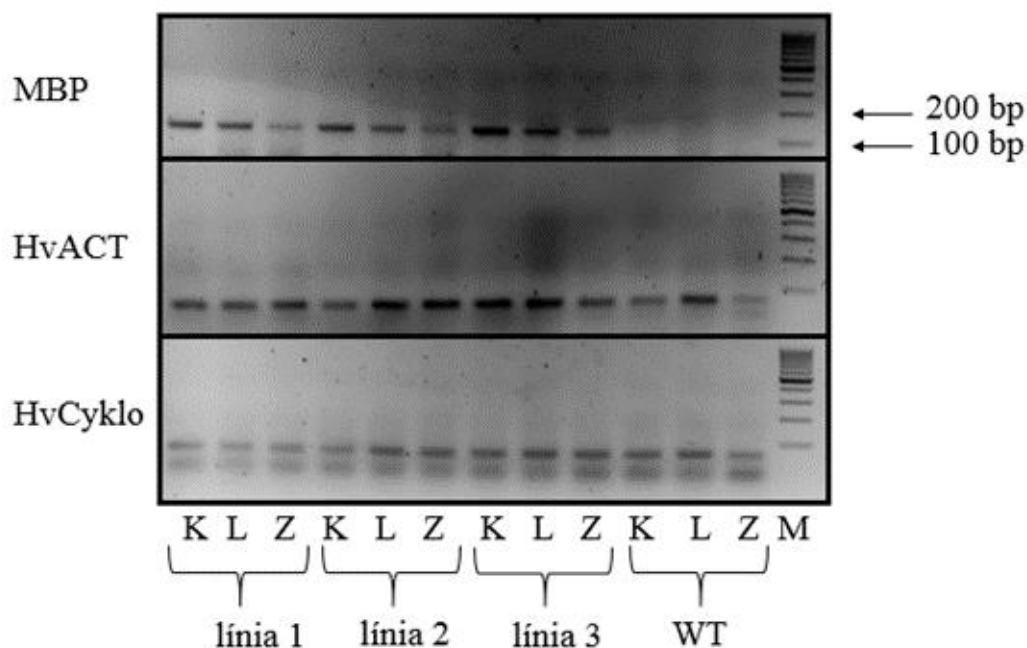


Obr. 9 Western blot analýza rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) T1 generácie. B-HORp – proteínový extrakt z rastlinného materiálu zmiešaného spolu zo 6 náhodne vybraných nezávislých transgénnych línií obsahujúcich v genóme transgén *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, UBIP – proteínový extrakt z rastlinného materiálu zmiešaného spolu zo 6 náhodne vybraných nezávislých transgénnych línií obsahujúcich v genóme transgén *UBIP::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, WT – proteínový extrakt z rastlinného materiálu zmiešaného spolu zo 6 náhodne vybraných kontrolných netransgénnych rastlín, K – proteínový extrakt z koreňov rastlín jačmeňa, L – proteínový extrakt z listov rastlín jačmeňa, Z – proteínový extrakt zo zŕn rastlín jačmeňa, PC – syntetický peptid LL-37 (7 ng).

4.1.3 Analýza transgénnych rastlín T1 generácie s integrovaným transgénom *UBIP::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* na RNA úrovni

Analýza na úrovni RNA bola vykonávaná za účelom overenia expresie transgénu *UBIP::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* v zrnách, listoch a v koreňoch transgénnych rastlín jačmeňa T1 generácie na základe negatívneho výsledku analýzy týchto rastlín na proteínovej úrovni (4.1.2). Pre analýzu expresie transgénu bola vyzolovaná RNA z rastlinného materiálu (kapitola 3.2.2.1), ktorá bola následne prečistená (kapitola 3.2.2.2 a 3.2.2.3) a prepísaná do cDNA (kapitola 3.2.2.5). RT-PCR analýza každej vzorky cDNA bola vykonaná v troch technických replikátoch s využitím TaqMan chémie a s primermi detegujúcimi gén kódujúci maltózu viažuci proteín (*MBP*, veľkosť amplicónu 135 bp), ktorý bol súčasťou transformačných konštruktov. Ako endogénna kontrola boli použité konštitutívne, tzv. „housekeeping“, gény kódujúce jačmenný proteín aktín (*HvAct*, veľkosť amplicónu 75 bp) a cyklofilín (*HvCyklo*, veľkosť amplicónu 71 bp). Po RT-PCR analýze boli amplicóny elektroforeticky rozdelené v 3 % agarózovom géli s prídavkom 0,5 % (v/v) etídium

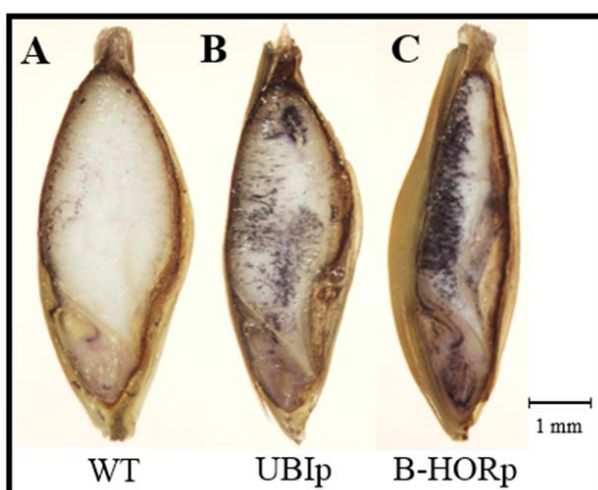
bromidu. Ako marker molekulovej hmotnosti bol použitý GeneRuler 100 bp DNA. Výsledky po elektroforetickom delení naznačujú, že transgén *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* je na RNA úrovni exprimovaný, ako v koreni, tak aj v liste a zrne troch nezávislých transgénnych línií jačmeňa T1 generácie (Obr. 10). Výsledky naznačujú, že negatívny výsledok detekcie rekombinantného produktu u daných transgénnych rastlín jačmeňa metódou WB mohol byť spôsobený degradáciou rekombinantného produktu alebo jeho nesprávne prevedenou stratégiou izolácie a purifikácie, pri ktorých došlo k výrazným stratám produktu.



Obr. 10 Reprezentatívny elektroforeogram semikvantitatívnej RT-PCR analýzy cDNA troch náhodne vybraných nezávislých transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) T1 generácie so stabilne integrovaným transgénom *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*. MBP – analýza za účelom detekcie génu pre maltózu viažuci proteín (MBP), veľkosť amplicónu 135 bp, HvAct – analýza za účelom detekcie endogénneho génu kódujúceho jačmenný proteín aktín, veľkosť amplicónu 75 bp, HvCyklo – analýza za účelom detekcie endogénneho génu kódujúceho jačmenný proteín cyklofilín, veľkosť amplicónu 71 bp, línia 1, 2, 3 – nezávislé línie transgénneho jačmeňa so stabilne integrovaným transgénom *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, WT - kontrolná netransgénna rastlina jačmeňa, K – vzorka cDNA získaná z koreňov rastlín jačmeňa, L – vzorka cDNA získaná z listov rastlín jačmeňa, Z – vzorka cDNA získaná zo zrna rastlín jačmeňa, M – marker molekulovej hmotnosti GeneRuler 100 bp DNA Ladder.

4.1.4 Imunolokalizácia rekombinantného peptidu LL-37 v zreých zrnách T1 generácie transgénnych línií jačmeňa

Prítomnosť rekombinantného peptidu LL-37 bola pomocou imunolokalizácie sledovaná v zreých zrnách (vývojové štádium 99, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) T1 generácie transgénnych rastlín jačmeňa obsahujúcich vo svojom genóme stabilne integrovaný transgén *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, resp. *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, ako kontrola boli použité zrelé zrná netransgénnej rastliny jačmeňa (kapitola 3.2.5). Pre detekciu rekombinantného peptidu bola použitá primárna protilátka proti LL-37 a následne sekundárna protilátka značená alkalickou fosfatázou. Chemickou interakciou alkalického fosfatázy a jej substrátu NBT/BCIP dochádza k vzniku zlúčeniny s typickým modrofialovým zafarbením, indikujúcej prítomnosť a lokalizáciu rekombinantného peptidu LL-37 v rámci jačmenného zrna. Najvýraznejšie sfarbenie bolo detegované v endosperme zrn transgénnej rastliny so stabilne integrovaným *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom (Obr. 11 C), v prípade zrn transgénnej rastliny so stabilne integrovaným *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom (Obr. 11 B) bola intenzita zafarbenia endospermu menej výrazná. V endosperme zrn kontrolnej netransgénnej rastliny jačmeňa (WT) nebolo pozorované žiadne sfarbenie (Obr. 11 A).



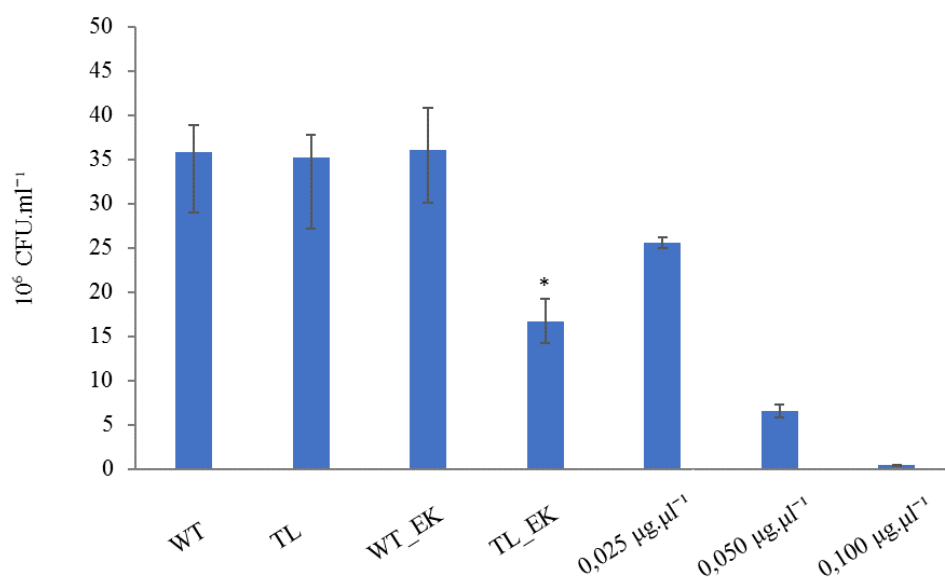
Obr. 11 Imunolokalizácia rekombinantného peptidu LL-37 v zreých zrnách (vývojové štádium 99, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) T1 generácie transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise). A – zrnó kontrolnej netransgénnej rastliny jačmeňa, B – zrnó transgénnej rastliny jačmeňa so stabilne integrovaným *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom, C – zrnó transgénnej rastliny jačmeňa so stabilne integrovaným *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom.

4.1.5 Testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantného peptidu LL-37 voči baktérií *Escherichia coli* TOP 10

Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantného produktu boli použité transgénne rastliny jačmeňa T1 generácie transformované transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, a to predovšetkým z dôvodu akumulácie vyššieho množstva rekombinantného produktu v zrnách ako v prípade rastlín jačmeňa s integrovaným *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom. Okrem toho, daný transformačný konštrukt obsahuje sekvenciu kódujúcu štiepne miesto enterokinázy (peptid DDDDK), ktoré umožňuje odstránenie fúzných proteínov a vznik rekombinantného peptidu LL-37 s C-koncovou KDEL sekvenciou (LL-37_KDEL).

Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity boli pripravené proteínové extrakty zo zrn transgénnych rastlín vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) a ako kontrola boli použité extrakty zo zrn netransgénnych rastlín (kapitola 3.2.3.3), ktoré boli následne purifikované pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie (kapitola 3.2.3.4). Časť pripravených proteínových extraktov bola ošetrená enzýmom enterokinázou (kapitola 3.2.3.7) a samotný experiment testovania antimikrobiálnej aktivity bol prevedený podľa postupu popísanom v kapitole 3.2.4.

Antimikrobiálna aktivita rekombinantného peptidu LL-37_KDEL bola celkovo testovaná na 3 biologických replikátoch a každý z nich bol použitý v 2 technických replikátoch. Na základe stanovenia hodnoty CFU.ml⁻¹ pre proteínové extrakty pripravené zo zrn transgénnych rastlín jačmeňa, bez ošetrenia enterokinázou (obsahujúce rekombinantný produkt 6xHis_MBP_LL-37_KDEL), nevykazovali v porovnaní s extraktami zo zrn netransgénnych rastlín žiadnu značnú antimikrobiálnu aktivitu. Výrazná inhibícia bakteriálneho rastu *E. coli* TOP10 bola pozorovaná až v prípade, kedy boli vzorky proteínového extraktu zo zrn transgénnych rastlín ošetrené enterokinázou, a teda obsahovali štiepny produkt enterokinázy - peptid LL-37_KDEL. V porovnaní s netransgénnymi proteínovými extraktmi ošetrenými rovnakým spôsobom bola u vzoriek obsahujúcich peptid LL-37_KDEL pozorovaná štatisticky významná inhibícia bakteriálneho rastu, ktorá dosahovala takmer 56 %. Výrazná inhibícia bakteriálneho rastu bola pozorovaná aj v prípade vzoriek obsahujúcich syntetický peptid LL-37 (Obr. 12).



Obr. 12 Zobrazenie antimikrobiálnej aktivity chimérneho peptidu LL-37 získaného z proteínových extraktov zrn T1 generácie transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) s integrovaným transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*. WT – proteínová vzorka zo zrn netransgénnych rastlín jačmeňa, WT_EK – proteínová vzorka z netransgénnych rastlín jačmeňa ošetrovaná enterokinázou, TL – proteínová vzorka z transgénnych línií jačmeňa obsahujúca rekombinantný produkt 6xHis_MBP_LL-37_KDEL, TL_EK – proteínová vzorka z transgénnych línií jačmeňa ošetrovaná enterokinázou, a teda obsahujúca štiepny produkt LL-37_KDEL. V prípade vzorky obsahujúcej peptid LL-37_KDEL bola pozorovaná približne 56% inhibícia bakteriálneho rastu. Antimikrobiálna aktivita bola sledovaná aj v prípade syntetického peptidu v koncentráciách 0,025 µg.µl⁻¹, 0,05 µg.µl⁻¹ a 0,1 µg.µl⁻¹, pri ktorej bola pozorovaná takmer 100% inhibícia bakteriálneho rastu. Chybové úsečky predstavujú hodnotu SD (standard deviation). Znak * vyjadruje štatisticky významný rozdiel na hladine významnosti $\alpha = 0,5$ zistený analýzou pomocou T-testu.

4.1.6 Testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantného peptidu voči baktérii *Micrococcus Luteus*

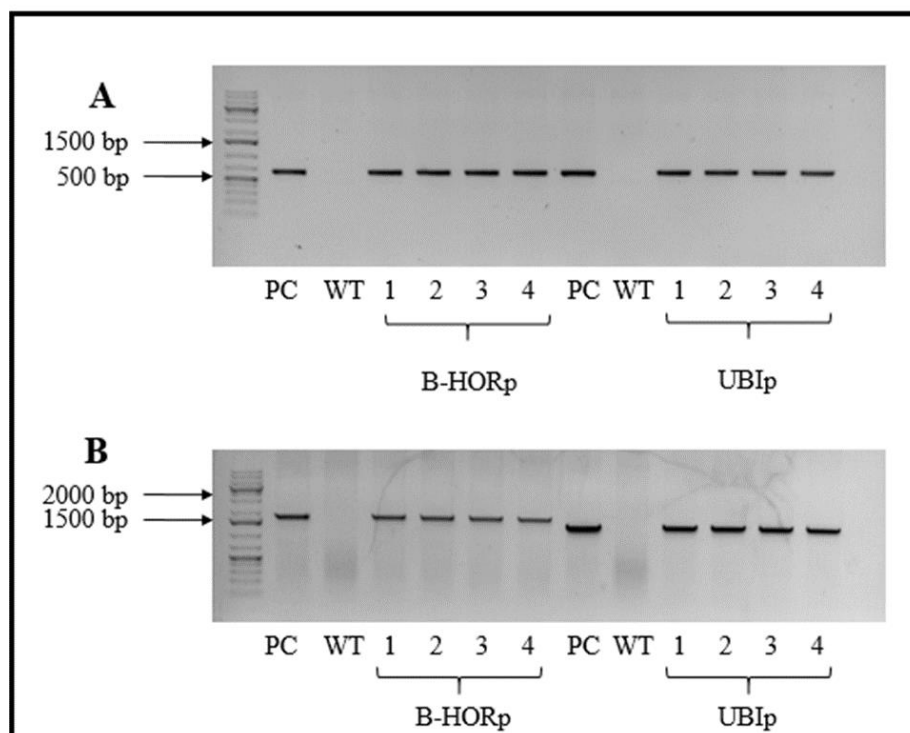
Pre testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantného produktu boli použité transgénne rastliny jačmeňa T1 generácie transformované transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*. Rovnako, ako v prípade testovania antimikrobiálnej aktivity rekombinantného produktu voči *E. coli* TOP10, boli pripravené purifikované proteínové extrakty (kapitola 3.2.3.3 a 3.2.3.4). Avšak pre samotný experiment testovania antimikrobiálnej aktivity (kapitola 3.2.4) boli v tomto prípade použité len vzorky ošetrované enterokinázou (kapitola 3.2.3.7) pre vznik štiepného produktu LL-37_KDEL, ktorý sa v prípade jeho testovania na gram-negatívnej baktérii *E. coli* TOP10 prejavil ako účinný. Experiment však nepriniesol očakávané výsledky. Inhibícia

bakteriálneho rastu gram-pozitívnej baktérie *M. luteus* nebola pozorovaná a správanie tejto baktérie bolo v porovnaní s gram-negatívnou baktériou *E. coli* TOP 10 výrazne odlišné (údaje nepriložené). Pre získanie spoľahlivých výsledkov je potrebné v budúcnosti experiment pre danú baktériu optimalizovať.

4.2 Analýza T2 generácie transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden promise)

4.2.1 Genotypizácia transgénnych rastlín

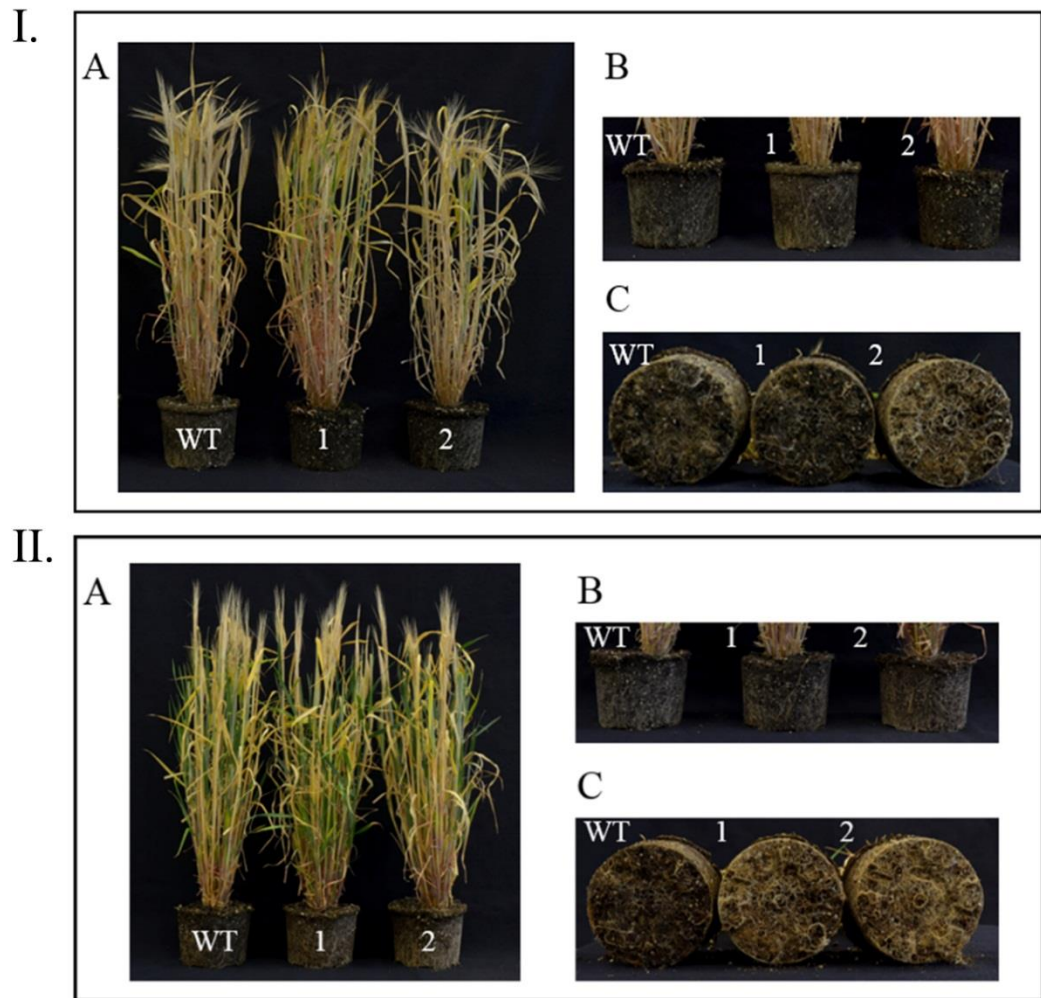
Za účelom overenia prítomnosti transgénu v genóme T2 generácie transgénnych rastlín jačmeňa pomocou konvenčnej PCR boli použité sady génovo špecifických primerov pre detekciu zrnovo-špecifického B-hordeínového promótoru (*B-HORp*), resp. konštitučného ubiquitínového promótoru (*Ubip*) so sekvenciou kódujúcou rekombinantný peptid LL-37 (katelicidín; *CATH*). Zároveň bola detegovaná aj prítomnosť *hpt* génu kódujúceho hygromycínfosfotransferázu, ktorý bol súčasne s transformačnými konštruktami včlenený do rastlinného genómu počas samotného procesu transformácie rastlín jačmeňa. Očakávaná veľkosť PCR amplicónov pri detekcii *hpt* génu bola v prípade oboch transgénov 649 bp, pri použití sady primerov detegujúcej gény *Ubip* a *CATH* bola veľkosť amplicónov 1379 bp a v prípade sady primerov detegujúcich *B-HORp* a *CATH* bola veľkosť 1681 bp (Obr. 13). Výsledkom analýzy bolo úspešné overenie transgenity rastlín T2 generácie jačmeňa nesúcich transgén *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* alebo transgén *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*.



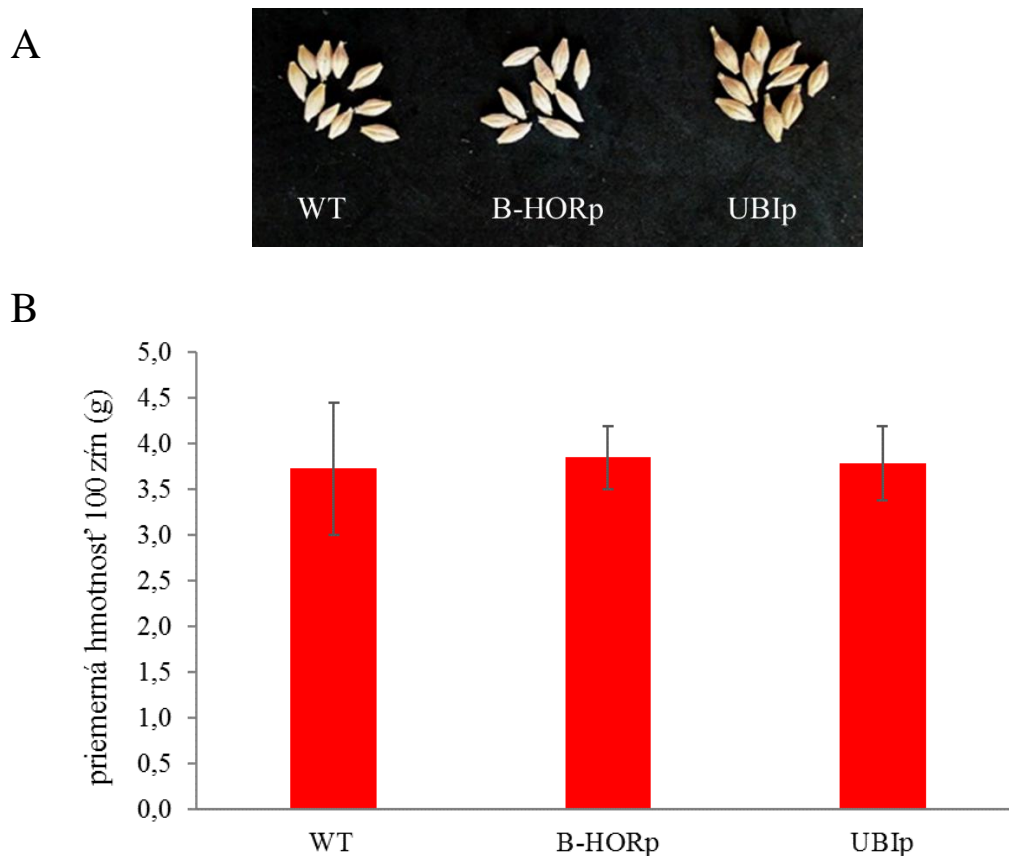
Obr. 13 Reprezentatívny elektroforeogram PCR analýzy gDNA vybraných transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) T2 generácie. A – analýza gDNA za účelom detekcie *hpt* génu. Veľkosť amplicónu pri použití sady primerov SP_hyg/ASP_hyg bola 649 bp, B – analýza gDNA za účelom detekcie *B-HORp*, *Ubi1* a *LL-37* génov. Veľkosť amplicónu pri použití sady primerov *Ubi1/CATH* bola 1379 bp a pre sadu primerov *B-HORp/CATH* bola 1681 bp. Ako marker molekulovej hmotnosti bol použitý 1 kb Plus GeneRuler DNA Ladder. Ako pozitívna kontrola (PC) bol použitý binárny vektor pBRACT214 nesúci transformačný gén *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, resp. binárny vektor pBRACT209 nesúci transformačný gén *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*. Ako negatívna kontrola slúžila gDNA netransgénnych rastlín jačmeňa (WT).

4.2.2 Fenotypizácia transgénnych línií T2 generácie

U T2 generácie transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) bol pozorovaný fenotyp nadzemnej časti (Obr. 14 A) a koreňového systému (Obr. 14 B, 14 C). Pri porovnaní fenotypu transgénnych rastlín exprimujúcich rekombinantný produkt s fenotypom netransgénnych kontrolných rastlín jačmeňa nebola pozorovaná žiadna výrazná zmena. Expresia chimérneho peptidu LL-37 pod kontrolou zrnovo-špecifického B-hordeínového promótoru, resp. pod kontrolou konštitutívneho ubiquitínového promótoru, nemala vplyv na fenotyp a celkový vývoj týchto rastlín. Rovnako tak nebola ovplyvnená ani morfológia a hmotnosť transgénnych zrelých zŕn (vývojové štádium 99, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH, Obr. 15).



Obr. 14 Fenotyp nadzemnej časti (A) a koreňového systému (B, C) T2 generácie nezávislých transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) so stabilne integrovaným transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* (I.) alebo s transgénom *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* (II.) približne 5 mesiacov od vysiatia. WT – kontrolná netransformovaná rastlina; 1, 2, 3 – nezávislé transgénne línie jačmeňa.



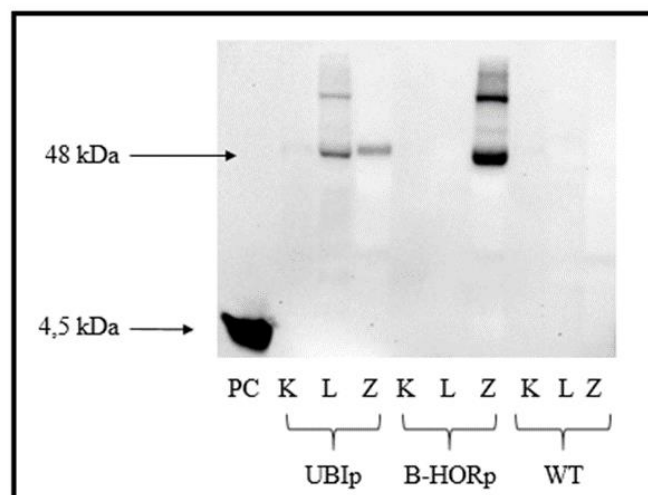
Obr. 15 Porovnanie morfológie (A) a hmotnosti (B) zreých zrn T2 generácie transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise). Hmotnosť zrn bola porovnaná na základe vyhodnotenia hmotnosti 100 ks náhodne vybraných zreých zrn z 8 rastlín jednej transgéennej línie jačmeňa. B-HORp – zrná transgénnych línií jačmeňa s integrovaným *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom, UB1p – zrná transgénnych línií jačmeňa s integrovaným *UB1p::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom, WT – zrná netransgénnych rastlín jačmeňa. Chybové úsečky predstavujú hodnoty SD (standard deviation). Na základe t-testu na hladine $\alpha=0,5$ nebol zistený žiadny štatisticky významný rozdiel.

4.2.3 Analýza transgénnych rastlín jačmeňa T2 generácie na proteínovej úrovni

4.2.3.1 Analýza proteínového extraktu purifikovaného pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie

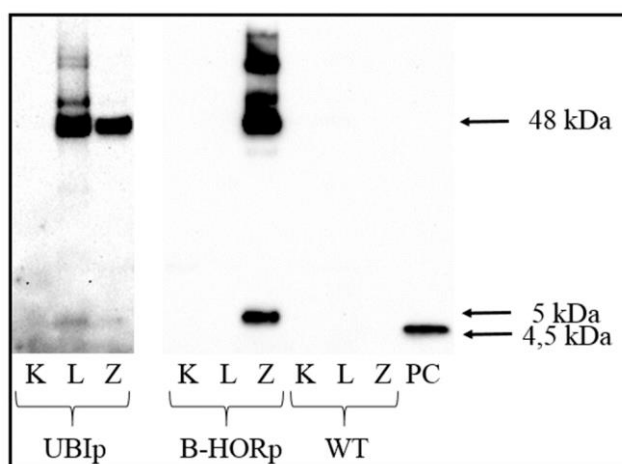
Za účelom detekcie rekombinantného peptidu LL-37 v zrnách, koreňoch a listoch transgénnych línií jačmeňa T2 generácie obsahujúcich vo svojom genóme transgén *UB1p::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, resp. *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, boli použité purifikované proteínové extrakty z rastlinného materiálu 6 náhodne vybraných transgénnych línií (v prípade zrn išlo o vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH, materiál z listov a koreňov bol odobraný v rovnakom vývojovom štádiu rastlín).

Očakávaná teoretická veľkosť rekombinantného produktu 6xHis_MBP_LL-37_KDEL bola 48 kDa. Ako pozitívna kontrola bol použitý syntetický peptid LL-37 s veľkosťou 4,5 kDa. Analýzou bola zistená prítomnosť chimérneho peptidu LL-37 v zrnách transgénnych rastlín s integrovaným *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom, čím bola overená účinnosť B-hordeínového promótoru. Súčasne bola detegovaná aj pravdepodobne dimérna forma rekombinantného produktu o veľkosti približne 96 kDa. V prípade transgénnych rastlín jačmeňa transformovaných transgénom *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* bol chimérny peptid LL-37 detegovaný jednoznačne v zrnách a listoch, pričom v koreňoch bol signál na hranici detegovateľnosti, čo značí, že v tomto rastlinnom orgáne dochádza k nízkej akumulácii rekombinantného peptidu. Na základe intenzity signálov indikujúcich chimérny peptid LL-37 sa dá usúdiť, že expresia rekombinantného produktu pod kontrolou B-hordeínového promótoru viedla k jeho zvýšenej akumulácii v zrnách rastlín (Obr. 16).



Obr. 16 Western blot analýza purifikovaných proteínových extraktov rastlinného materiálu transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., vc. Golden Promise) T2 generácie purifikovaných pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie. UBIp – proteínový extrakt rastlinného materiálu zo 6 náhodne vybraných transgénnych línií jačmeňa transformovaných transgénom *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, B-HORp – proteínový extrakt z rastlinného materiálu zo 6 náhodne vybraných transgénnych línií jačmeňa transformovaných konštruktom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, WT – proteínový extrakt rastlinného materiálu zo 6 náhodne vybraných kontrolných netransgénnych rastlín jačmeňa, K - proteínový extrakt z koreňov rastlín jačmeňa, L – proteínový extrakt z listov rastlín jačmeňa, Z - proteínový extrakt zo zrn rastlín jačmeňa, PC – syntetický peptid LL-37 (7 ng), M - marker molekulevej hmotnosti Novex Sharp Pre-stain Protein Standard LC 5800.

Rekombinantný produkt 6xHis_MBP_LL-37_KDEL získaný z hrubého proteínového extraktu rastlinného materiálu transgénnych línií jačmeňa T2 generácie a purifikovaného pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie bol štiepený pomocou enterokinázy. Štiepenie enterokinázou umožnilo vznik dvoch štiepných produktov, z ktorých jeden obsahoval rekombinantný peptid LL-37 s C-terminálnou KDEL sekvenciou. Veľkosť peptidu LL-37_KDEL bola približne 5 kDa. Výsledok analýzy preukázal prítomnosť signálu veľkostne zodpovedajúceho štiepnemu produktu LL-37_KDEL v proteínovej vzorke získanej zo zrn transgénneho jačmeňa so stabilne integrovaným *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom. Taktiež bola detegovaná aj prítomnosť nenaštiepeného produktu 6xHis_MBP_LL-37_KDEL o veľkosti približne 48 kDa a jeho dimérnej formy o veľkosti približne 96 kDa, a to pravdepodobne z dôvodu nízkej účinnosti štiepnej reakcie. V prípade analýzy rastlín transformovaných transgénom *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* bola preukázaná prítomnosť ako pôvodného produktu 6xHis_MBP_LL-37_KDEL, tak aj štiepného produktu, peptidu LL-37_KDEL, avšak vo výrazne malom množstve. Aj v tomto prípade, rekombinantný proteín u proteínovej vzorky z koreňa nebol detegovaný (Obr. 17).



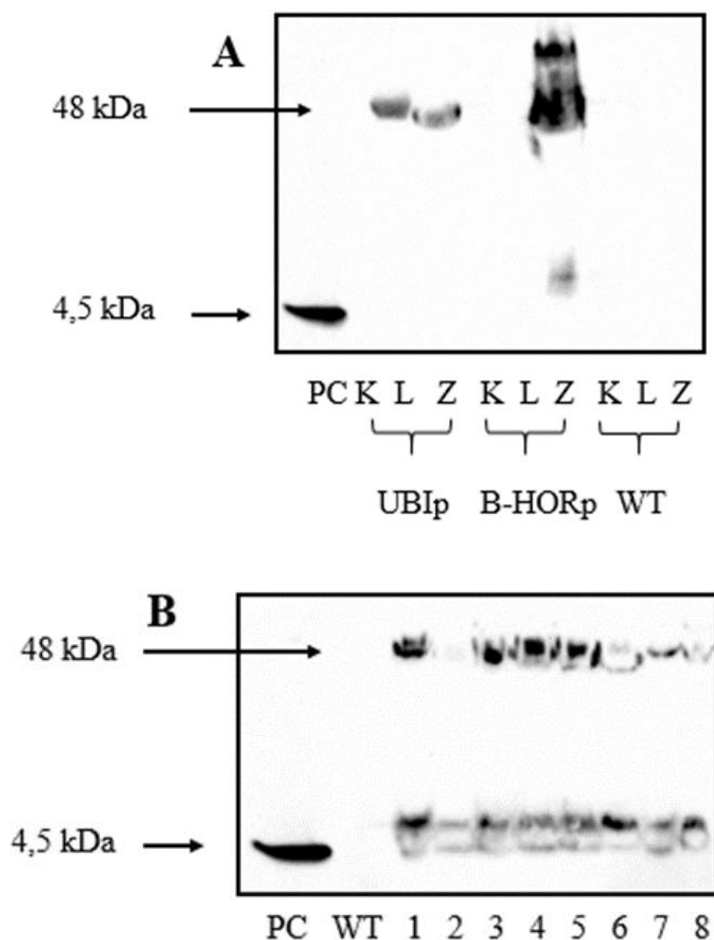
Obr. 17 Western blot analýza purifikovaných proteínových extraktov rastlinného materiálu transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) T2 generácie purifikovaných pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie a po ošetrení enterokinázou. UBIP - proteínový extrakt z rastlinného materiálu zo 6 náhodne vybraných transgénnych línií jačmeňa transformovaných transgénom *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, B-HORp - proteínový extrakt z rastlinného materiálu zo 6 náhodne vybraných transgénnych línií jačmeňa transformovaných transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, WT - proteínový extrakt z rastlinného materiálu zo 6 náhodne vybraných kontrolných netransgénnych rastlín jačmeňa, K - proteínový extrakt z koreňov jačmeňa, L - proteínový extrakt z listov jačmeňa, Z - proteínový extrakt z jačmenných zrn, PC - syntetický peptid LL-37 (7 ng), M - marker molekulovej hmotnosti Novex Sharp Pre-stain Protein Standard LC 5800.

4.2.3.2 Analýza proteínov izolovaných z proteínových teliesok

Za účelom detekcie rekombinantného peptidu LL-37 bol použitý aj prístup izolácie proteínov obsiahnutých v proteínových telieskach, do ktorých je rekombinantný produkt pravdepodobne zacielený a uložený vďaka prítomnosti N-terminálnej ZmCKX1sp signálnej sekvencie a C-terminálnej sekvencie KDEL. Kombinácia týchto sekvencií zabezpečuje retenciu rekombinantného produktu do ER s jeho následným uložením do proteínových teliesok. Pre analýzu rekombinantného peptidu LL-37 bola použitá frakcia proteínových teliesok získaných z rastlinného materiálu T2 generácie transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) so stabilne integrovaným transgénom *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, resp. transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*.

Na základe analýzy proteínov izolovaných z proteínových teliesok obsiahnutých v zrnách vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) a v koreňoch a listoch transgénnych rastlín, bola potvrdená prítomnosť rekombinantného produktu v týchto zásobných organelách. V prípade transgénnych rastlín exprimujúcich rekombinantný produkt pod kontrolou zrno-špecifického promótoru *B-HORp* bol rekombinantný peptid LL-37 detegovaný len v zrnách, zatiaľ čo v prípade transgénnych rastlín exprimujúcich rekombinantný produkt pod kontrolou konštitutívneho promótoru *Ubip* bol peptid LL-37 detegovaný nielen v zrnách, ale aj v listoch transgénnych rastlín (veľkosť rekombinantného produktu v oboch prípadoch bola približne 48 kDa). U kontrolných netransgénnych rastlín nebol pozorovaný žiadny signál indikujúci prítomnosť rekombinantného produktu v rastlinnom materiáli (Obr. 18 A). Ako pozitívna kontrola bolo použitých 7 ng syntetického peptidu LL-37 o veľkosti približne 4,5 kDa.

Rekombinantný peptid LL-37 bol následne detegovaný aj v zreých zrnách (vývojové štádium 99, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) T2 generácie transgénnych rastlín jačmeňa so stabilne integrovaným transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*. Táto analýza bola vykonaná za účelom overenia, či v zreých zrnách nedochádza k stratám rekombinantného produktu jeho degradáciou, a teda či je inertné prostredie endospermu zreých zrn vhodné na jeho uskladnenie. Výsledok analýzy preukázal prítomnosť rekombinantného peptidu LL-37 vo všetkých testovaných nezávislých transgénnych líniách jačmeňa (Obr. 18 B).



Obr. 18 Western blot analýza proteínov izolovaných z proteínových teliesok rastlinného materiálu T2 generácie transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., vc. Golden Promise) (A) analýza proteínov izolovaných z proteínových teliesok zrelých zŕn nezávislých transgénnych línií (1-8) transformovaných transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* (B): UB1p – proteínový extrakt z rastlinného materiálu získaného spolu zo 6 náhodne vybraných transgénnych línií jačmeňa transformovaných transgénom *UB1p::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, B-HORp – proteínový extrakt z rastlinného materiálu získaného spolu zo 6 náhodne vybraných transgénnych línií jačmeňa transformovaných konštruktom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, WT – proteínový extrakt z rastlinného materiálu odobraného spolu zo 6 náhodne vybraných kontrolných netransgénnych línií jačmeňa, K – proteínový extrakt z koreňov jačmeňa, L – proteínový extrakt z listov jačmeňa, Z – proteínový extrakt z jačmenných zŕn, PC – syntetický peptid LL-37 (7 ng), M – marker molekulovej hmotnosti Novex Sharp Pre-stain Protein Standard LC 5800.

4.2.4 Kvantifikovanie výt'azkov rekombinantného peptidu LL-37

Výt'azok rekombinantného peptidu LL-37 bol stanovený zo zŕn vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) u T2 generácie transgénnych rastlín jačmeňa na základe výsledkov z imunodetekcie rekombinantného produktu. Pomocou programu Image Lab™ Software bola vytvorená kalibračná krivka závislosti intenzity signálu, získanej na základe

Tab. 7 Množstvo rekombinantného peptidu LL-37 u transgénnych rastlín T2 generácie s integrovaným *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom získané s využitím rôznych spôsobov extrakcie.

Rastlinný orgán	Proteínové telieska (pmol/g)	IMAC (pmol/g)
zrno	122,693 ± 28,258	0,334 ± 0,077

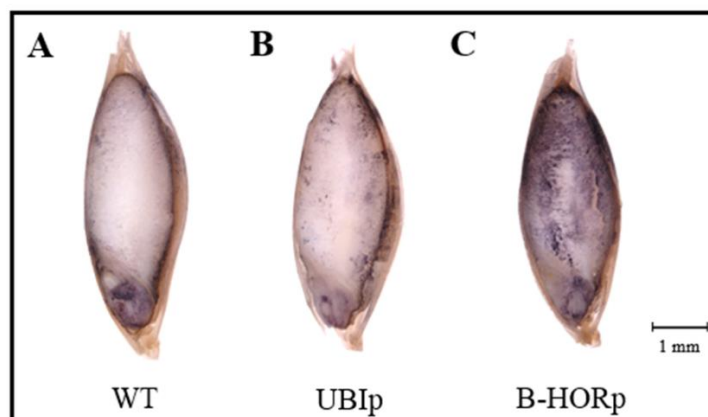
Tab. 8 Množstvo rekombinantného peptidu LL-37 u transgénnych rastlín T2 generácie s integrovaným *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom získané s využitím rôznych spôsobov extrakcie.

Rastlinný orgán	Proteínové telieska (pmol/g)	IMAC (pmol/g)
koreň	x	x
list	36,315 ± 8,364	0,058 ± 0,013
zrno	42,527 ± 9,794	0,040 ± 0,009

imunodetekcie a koncentrácie syntetického peptidu LL-37. Pomocou vytvorenej kalibračnej krivky bol následne stanovený výťažok rekombinantného peptidu LL-37 (Tab. 7, 8). Z výsledkov je zrejmé, že všeobecne izoláciou rekombinantného produktu z proteínových teliesok bolo získané rádovo väčšie množstvo rekombinantného peptidu LL-37 ako v prípade jeho izolácie z hrubého proteínového extraktu s následnou purifikáciou. Okrem toho cielená produkcia peptidu LL-37 len do zrn transgénnych rastlín viedla k takmer trojnásobne vyššej akumulácii rekombinantného peptidu, ako tomu bolo v prípade produkcie peptidu pod kontrolou konštitutívneho promotóru.

4.2.5 Imunolokalizácia rekombinantného peptidu LL-37 v zreých zrnách T2 generácie transgénnych línií jačmeňa

Chimérny peptid LL-37 bol imunolokalizovaný v zreých zrnách (vývojové štádium 99, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) transgénnych rastlín jačmeňa sateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) obsahujúcich stabilne integrovaný transgén *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, resp. transgén *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* vo svojom genóme. Rovnako ako v prípade imunolokalizácie peptidu LL-37 u T1 generácie transgénnych rastlín, tak aj v prípade T2 generácie transgénnych rastlín, bolo pozorované modrofialové zafarbenie indikujúce prítomnosť chimérneho peptidu, predovšetkým v endosperme zrn. Najvýraznejšie zafarbenie bolo pozorované v endosperme zreých zrn s expresiou rekombinantného peptidu LL-37 pod kontrolou zrno-špecifického B-hordeínového promotóru (Obr. 19 C). Naopak, intenzita zafarbenia endospermu zrn, v ktorých došlo



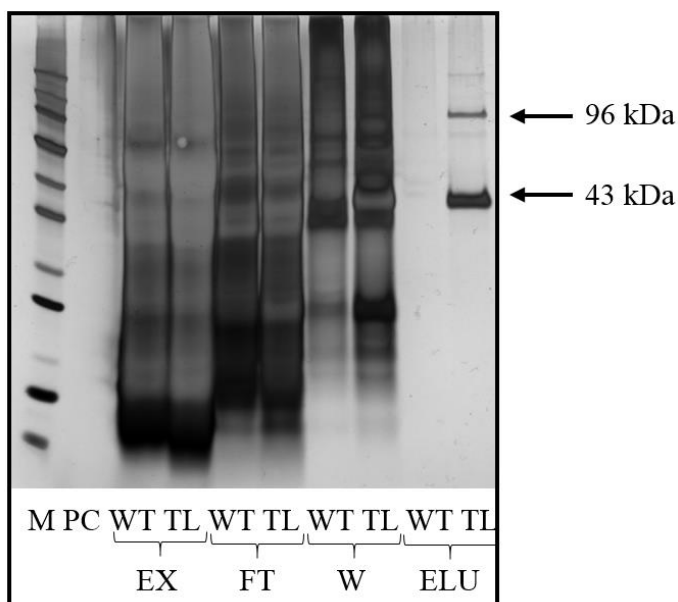
Obr. 19 Imunolokalizácia chimérneho peptidu LL-37 v endosperme zreých zŕn (vývojové štádium 99, podľa stupnice BBCH) T2 generácie transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise). A – zrno kontrolnej netransgéennej rastliny jačmeňa, B – zrno transgéennej rastliny jačmeňa so stabilne integrovaným *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom, C – zrno transgéennej rastliny jačmeňa so stabilne integrovaným *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom.

k expresii chimérneho peptidu pod kontrolou ubiquitínového promótoru, bola výrazne menšia (Obr. 19 B). Endosperm zreých zŕn netransgéennej rastliny nevykazoval žiadne zafarbenie (Obr. 19 A).

4.3 Dvojkroková purifikácia rekombinantného peptidu LL-37 z hrubého proteínového extraktu pomocou afinitnej chromatografie s cieľom získania čistého produktu

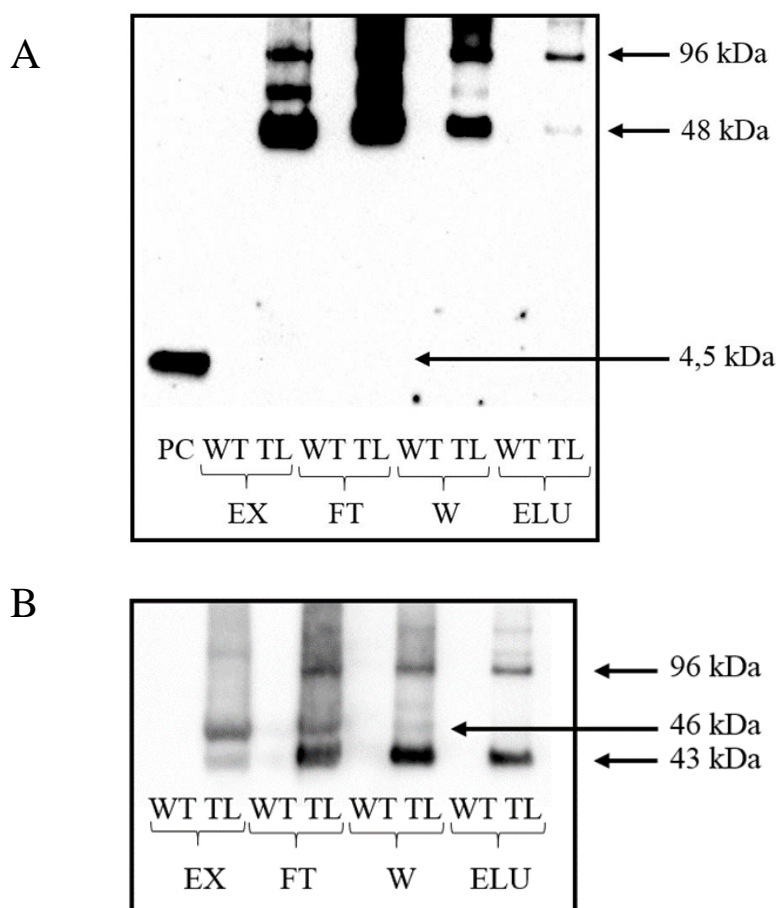
Pre purifikáciu rekombinantného peptidu LL-37 z proteínového extraktu boli použité zrná v štádiu mliečnej zrelosti (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) transgénnych rastlín jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) transformované transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, a to predovšetkým z dôvodu preukázaného vyššieho obsahu rekombinantného peptidu v transgénnych zrnách týchto rastlín v porovnaní s obsahom rekombinantného peptidu v jačmenných zrnách rastlín s integrovaným *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom. Dvojkroková purifikácia rekombinantného produktu spočívala vo využití metalo-chelátovej afinitnej chromatografie na základe interakcie His-tag kotvy a Co^{2+} iónov naviazaných na maticu IDA-Sepharose a následne vo využití afinitnej chromatografie na základe interakcie medzi maltózu viažúcim proteínom (MBP) a amylozovej matrice. Purifikované proteínové vzorky boli následne elektroforeticky rozdelené pomocou SDS-PAGE.

Vizualizáciou rozdelených proteínov v polyakrylamidovom géli pomocou farbenia striebrom boli v prípade eluátu po dvojkrokovej purifikácii sledované dva dominantné signály indikujúce proteíny, a teda metóda purifikácie bola do značnej miery úspešná. Avšak detegované proteíny svojou veľkosťou nezodpovedali očakávanej veľkosti rekombinantného produktu His-tag_MBP_LL-37_KDEL (48 kDa). Veľkosti pozorovaných proteínov bola približne 43 kDa a približne 96 kDa (Obr. 20). Z toho dôvodu, za účelom overenia prítomnosti rekombinantného produktu His-tag_MBP_LL-37_KDEL v eluáte po dvojkrokovej purifikácii proteínového extraktu, bola vykonaná imunodetekcia rekombinantného peptidu LL-37 (išlo o rovnaké proteínové vzorky, ktoré boli použité pre SDS-PAGE) s následným farbením striebrom popísaným vyššie.



Obr. 20 Polyakrylamidový gél s rozdelenými proteínmi jednotlivých frakcií odoberaných počas purifikácie s využitím afinitnej chromatografie na amylozovej matrici. Proteíny boli vizualizované pomocou striebra. Prvotný proteínový extrakt bol pripravený zo zrn vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti (vývojové štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH) T2 generácie transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) M – marker molekulovej hmotnosti Novex Sharp Pre-stain Protein Standard LC 5800, PC – syntetický peptid LL-37 (7 ng), WT – kontrolne netransgénne rastliny jačmeňa, TL -transgénne rastliny jačmeňa, EX – hrubý proteínový extrakt získaný zo zrn jačmeňa, FT - odpadová frakcia po nanesení proteínovej vzorky na amylozovú matricu, W – odpadová frakcia získaná po premytí amylozovej matrice, ELU – eluát získaný v závere dvojkrokovej purifikácie.

Imunodetekcia peptidu LL-37 preukázala, že rekombinantný produkt His-tag_MBP_LL-37_KDEL (veľkosť 48 kDa) bol v eluáte prítomný, dokonca bola pozorovaná aj jeho dimérna forma (veľkosť 96 kDa). Avšak z analýzy tiež vyplýva, že pri nanášaní proteínovej vzorky na amylozovú maticu a pri jej následnom premytí dochádza k výrazným stratám rekombinantného produktu (Obr. 21 A).



Obr. 21 Western blot analýza jednotlivých frakcií odobratých počas druhého purifikačného kroku proteínového extraktu na amylozovej matici. Proteínový extrakt bol pripravený zo zrn vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti (štádium 73, podľa makrofenologickej stupnice pre obilniny BBCH), odobratých z T2 generácie transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise). Na PVDF membráne s prenesenými proteínmi po metóde Western blot bol imunodetegovaný peptid LL-37 (A) s následnou imunodetekciou proteínu MBP (B), WT – kontrolne netransgénne rastliny jačmeňa, TL – transgénne rastliny jačmeňa, PC - syntetický peptid LL-37 (7 ng), EX – hrubý proteínový extrakt získaný zo zrn jačmeňa, FT - odpadová frakcia po nanosení proteínovej vzorky na amylozovú maticu, W – odpadová frakcia získaná po premytí amylozovej matrice, ELU – eluát získaný v závere dvojkrokovej purifikácie.

Následne bola PVDF membrána po imunodetekcii peptidu LL-37 stripovaná a bola vykonaná imunodetekcia maltózu viažuceho proteínu (MBP). Výsledky analýzy preukázali prítomnosť troch hlavných signálov indikujúcich: 1) dimérnu formu rekombinantného produktu His-tag_MBP_LL-37_KDEL (veľkosť 96 kDa) vo všetkých frakciách transgénnych línií odobratých počas purifikácie na amylozovej matrici, 2) rekombinantný produkt His-tag_MBP_LL-37_KDEL (veľkosť 48 kDa) pozorovaný predovšetkým vo frakcii proteínového extraktu a v pretečenej frakcii extraktu po nanosení na amylozovú matricu, 3) proteínový fragment (veľkosť 43 kDa) veľkostne zodpovedajúci chimérnemu proteínu His-tag_MBP, ktorý vzniká odštiepením peptidu LL-37_KDEL, a to vo všetkých frakciách odobratých počas purifikácie pomocou amylozovej matrice (Obr. 21 B). Výsledky analýzy poukazujú na teóriu, že počas purifikačného procesu dochádza pravdepodobne k štiepeniu rekombinantného produktu His-tag_MBP_LL-37_KDEL a to na dva produkty His-tag_MBP a LL-37_KDEL.

5 DISKUSIA

V praktickej časti diplomovej práce bol hodnotený fenotyp transgénnych línií jačmeňa siateho (*Hordeum vulgare* L., cv. Golden Promise) exprimujúcich rekombinantný ľudský antimikrobiálny peptid katelicidín LL-37. Je známe, že dizajn transformačných konštruktov a s tým spojená stratégia expresie rekombinantného proteínu môže ovplyvniť fenotyp transgénnych rastlín. Ako uvádza Jung *et al.* (2012) vo svojej štúdií, v ktorej sa zamerali na produkciu antimikrobiálneho peptidu LL-37 v rastlinách kapusty čínskej (*Brassica rapa*) pod kontrolou konštitutívneho 35S promótoru s extracelulárnym zacielením peptidu LL-37, v niektorých prípadoch mali transgénne rastliny abnormálny fenotyp. Podobný výsledok bol pozorovaný aj v štúdií vedeckej skupiny Coca *et al.* (2006), ktorá pripravila transgénne rastliny ryže exprimujúce antimikrobiálny peptid cekropín A pod kontrolou konštitutívneho ubiquitínového protótoru, pričom zacielenie tohto peptidu do apoplastu rastlinných buniek viedlo k vzniku nefertilných rastlín. Naopak u transgénnych rastlín, ktoré expimovali peptid cekropín A v ER (zacielenie na základe prítomnosti C-terminálnej KDEL sekvencie) nebola pozorovaná žiadna zmena fenotypu ani fertility rastlín. Rovnako, v predloženej práci, produkcia rekombinantného peptidu LL-37 v rastlinách jačmeňa so zacielením do ER, resp. do úložných proteínových teliesok, nemala vplyv na vývoj, fenotyp a fertilitu týchto rastlín.

U transgénnych rastlín jačmeňa bola následne spoľahlivo preukázaná prítomnosť transgénu na génomovej úrovni v T1 aj T2 generácií rastlín, a teda nedošlo k jeho strate alebo umlčaniu epigenetickými faktormi, ako napr. v prípade transgénnych rastlín tabaku (*Nicotiana benthamiana*) nesúcich gén *csr1-1* zabezpečujúci odolnosť k herbicídu chlórsulfurónu (Brandle *et al.*, 1995) alebo u transgénnych rastlín ryže obsahujúcich gén pre neomycín fosfotransferázu (Lynch *et al.*, 1995). Transgén *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, resp. *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*, bol preto stabilne integrovaný do rastlinného genómu a dedený v nasledujúcich generáciách. Analýza na proteínovej úrovni rovnako preukázala prítomnosť rekombinantného proteínu u rastlín jačmeňa T1 aj T2 generácie.

Pre využitie terapeutických proteínov produkovaných prostredníctvom rastlinných expresných systémov je najdôležitejšia správna konformácia a posttranslačné modifikácie daného proteínu, s ktorými úzko súvisí aj ich biologická aktivita. Preto bola aj v rámci predloženej práce overená a potvrdená biologická aktivita rekombinantného peptidu LL-37 voči baktérii *E. coli* TOP10. Antimikrobiálny peptid LL-37 je biologicky

aktívny len vo svojej sekundárnej štruktúre alfa-helix, ktorú vytvára bezprostredne pri interakcii so záporne nabitou bakteriálnou membránou (Zhang *et al.*, 2010). Z toho dôvodu bol na testovanie biologickej aktivity rekombinantného peptidu použitý aj štiepny produkt LL-37_KDEL, nakoľko prítomnosť fúzneho proteínu MBP, by mohla zabrániť vytvoreniu biologicky aktívnej štruktúry peptidu LL-37, a taktiež by mohla brániť jeho prístupu k bakteriálnej membráne. Testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantného peptidu preukázalo 56% inhibíciu bakteriálneho rastu v prípade použitia štiepneho produktu, peptidu LL-37_KDEL. Pričom zachovaná C-koncová KDEL sekvencia na biologickú aktivitu rekombinantného katelicidínu nemala negatívny vplyv. Rovnaký výsledok dosiahli vo svojej štúdií Bundó *et al.* (2014), ktorí pozorovali biologickú aktivitu antimikrobiálneho peptidu cekropínu A s naviazanou KDEL sekvenciou na jeho C-konci produkovaného v endospere ryžového zrna. Avšak je známych niekoľko štúdií, u ktorých bola pozorovaná biologická aktivita antimikrobiálnych peptidov aj bez potreby odštiepenia špecifických fúzných kotiev, napríklad u rekombinantného peptidu Pg-AMP1 s C-terminálnou histidínovou kotvou pôvodne z plodu stromu *Psidium guajava* produkovaného bakteriálnou kultúrou *E. coli* (Tavares *et al.*, 2012) alebo u peptidu odvodeného z vicilínu s naviazanou histidínovou kotvou a produkovaného rovnako bakteriálnou kultúrou *E. coli* (Marcus *et al.*, 2008).

Antimikrobiálny peptid LL-37 je popísaný ako peptid so schopnosťou interagovať so záporne nabitou membránou nielen gram-negatívnych baktérií, akou je aj *E. coli*, ale aj so záporne nabitou membránou gram-pozitívnych baktérií (Johansson *et al.*, 1998). Jung *et al.* (2013) napríklad úspešne preukázali antimikrobiálnu aktivitu peptidu LL-37 získaného z listov transgénnych paradajok (*Solanum lycopersicum*) voči gram-negatívnym baktériám *Pectobacterium carotovorum* a *Xanthomonas campestris* a v roku 1998 bola popísaná aktivita peptidu LL-37 voči Gram-pozitívnym baktériám *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis* (Dürr *et al.*, 2006). V predloženej práci bola testovaná aj antimikrobiálna aktivita peptidu LL-37_KDEL voči gram-pozitívnej baktérii *M. luteus*, avšak bez pozitívneho výsledku. Baktéria *M. luteus* už v prípravných experimentoch so syntetickým peptidom preukázala výrazne odlišné správanie ako baktéria *E. coli*. Kondejewski *et al.* (1996) vo svojej práci popisujú, že biologická aktivita antimikrobiálneho peptidu voči rôznym druhom baktérií môže byť výrazne závislá na type použitej metódy. Napríklad Kim *et al.* (2009) úspešne použili na testovanie antimikrobiálnej aktivity rekombinantného proteínu hCAP18/LL-37 voči baktérií

M. luteus, *Staphylococcus aureus* a *Salmonella gastroenteritis* difúznú metódu na agarových platniach pomocou diskov. Rovnakú metódu testovania úspešne použili aj Hong *et al.* (2007). Preto na základe týchto poznatkov je do budúca nutné buď optimalizovať použitú metódu testovania rekombinantného peptidu LL-37 voči baktérii *M. luteus*, alebo zaviesť novú metódu testovania, napríklad vyššie spomínanú difúznú metódu na agarových platniach. Získanie čistého rekombinantného produktu z rastlinného materiálu je kľúčové pre jeho potenciálne použitie vo farmaceutickom priemysle. Vo všeobecnosti platí, že purifikácia pomocou afinitnej chromatografie poskytuje dobré výsledky, pretože je založená na špecifickej interakcii medzi proteínom záujmu a imobilizovanej matrici. Napriek tomu, Sharma a Sharma (2009) uvádzajú, že v prípade purifikácie rekombinantného proteínu z rastlinného materiálu pomocou metalo-chelátovej afinitnej chromatografie s využitím His-tag kotvy, je čistota pomerne nízka. Výsledný purifikovaný produkt je znečistený mnohými kontaminujúcimi látkami, a to predovšetkým dôsledkom vysokého množstva proteínov s histidínovými reziduami prirodzene sa vyskytujúcimi v rastlinnom pletive. Okrem toho aminokyseliny tryptofan a cysteín môžu vytvárať pri neutrálnom pH komplexy s kovovými iónmi, napríklad Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} a Fe^{2+} (Otter, 2003; Giles *et al.*, 2003), a tým zvyšovať pravdepodobnosť nešpecifických väzieb proteínov z rastlinného materiálu na matricu (Schmitt *et al.*, 1993). Na základe týchto informácií a predošlých experimentov bola v predloženej diplomovej práci zvolená dvojkroková purifikácia, ktorá okrem metalo-chelátovej afinitnej chromatografie pomocou histidínovej kotvy, zahrnula aj krok purifikácie na amylózovej matrici s využitím maltózu viažuceho proteínu. Napriek tomu, že sa pomocou dvojkrokovej purifikácie získala pomerne čistá frakcia proteínu, následná imunodetekcia peptidu LL-37 a MBP poukázala na fakt, že šlo pravdepodobne do značnej miery len o štiepny produkt His-tag_MBP (43 kDa), ktorý vznikol rozštiepením rekombinantného proteínu His-tag_MBP_LL-37_KDEL (48 kDa) (druhým štiepnym produktom bol pravdepodobne peptid LL-37_KDEL, o veľkosti približne 5 kDa). K rozštiepeniu rekombinantného proteínu pritom došlo už počas prvého kroku purifikácie, a to počas prípravy proteínového extraktu.

Ďalej bolo zistené, že počas celého procesu dvojkrokovej purifikácie dochádza k výrazným stratám rekombinantného proteínu. Pri metalo-chelátovej afinitnej chromatografii sa využíva imobilizácia rôznych kovových iónov na matricu, najčastejšie Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} a Co^{2+} , pričom každý z nich poskytuje inú afinitu a špecificitu k histidínovej kotve. Napríklad kobaltnatý ión použitý aj v predloženej práci, poskytuje

pomerne vysokú špecifitu, ale nízku afinitu k His-tagu. Pravdepodobne aj z toho dôvodu bolo v odpadovej frakcii po pretečení proteínového extraktu cez matricu Co^{2+} -IDA-Sepharose, detegované značné množstvo rekombinantného proteínu, ktorý sa na matricu nenaviazal. Naopak štandardne používaný nikelnatý ión u metalo-chelátovej afinitnej chromatografie, ktorý poskytuje ideálny kompromis medzi afinitou a špecifitou k His-tagu, je však pre purifikáciu terapeuticky významných látok nežiaduci vzhľadom k jeho vysokej toxicite (Bal *et al.*, 2000). Výrazné straty rekombinantného proteínu boli pozorované aj v druhom kroku purifikácie založenej na afinite MBP k amylózovej matrici, čo mohlo byť spôsobené interakciou amylózovej matrice a maltózy, ktorá následne bránila naviazaniu rekombinantného proteínu. Maltóza je produktom enzymatickej degradácie škrobu, ktorý má v obilných zrnách majoritné zastúpenie a mohlo k nemu dôjsť pri spracovaní zrn jačmeňa (Marck *et al.*, 1983). Určitým riešením ako znížiť straty rekombinantného produktu počas procesu purifikácie by mohlo byť v prvom kroku metalo-chelátovej afinitnej chromatografie využitie iónov medi, ktoré poskytujú vysokú afinitu k His-tag (ale s rizikom častejších nešpecifických väzieb). V druhom kroku purifikácie by afinitu rekombinantného proteínu k amylózovej matrici mohlo zvýšiť prvotné odstránenie škrobu z proteínových vzoriek, napríklad využitím postupu pre izoláciu proteínových teliesok. Avšak v postupe izolácie proteínov z proteínových teliesok je problematické použitie denaturačného činidla (napr. močovina) pre rozrušenie štruktúry proteínových teliesok. Maltózu viažuci proteín totiž vyžaduje vzhľadom k jeho veľkosti (približne 42,5 kDa) správnu konformáciu pre naviazanie na amylózovú matricu.

6 ZÁVER

V teoretickej časti diplomovej práce bola popísaná súčasná problematika antibiotickej rezistencie baktérií s uvedením rôznych možností jej riešenia zameraných okrem iného na využitie rekombinantne pripravených antimikrobiálnych peptidov. Ďalej boli objasnené stratégie subcelulárneho zacielenia rekombinantných proteínov produkovaných rastlinnými bunkami a súčasne boli popísané aj možnosti purifikácie rekombinantných proteínov z jednotlivých subcelulárnych organel. Značná časť teoretickej práce bola venovaná aj metódam testovania antimikrobiálnej aktivity látok.

V praktickej časti diplomovej práce bola vykonaná fenotypová analýza transgénnych rastlín jačmeňa siateho T1 aj T2 generácie, pričom sa fenotyp týchto rastlín nijak nelíšil od kontrolných netransgénnych rastlín. Rekombinantný produkt 6xHis_MBP_LL-37_KDEL nepôsobil na transgénne rastliny fyto toxicky.

Následne bola vykonaná analýza transgénnych rastlín na proteínovej úrovni metódou Western blot, pričom bola preukázaná prítomnosť rekombinantného peptidu LL-37 v zrnách vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti u rastlín T1 generácie so stabilne integrovaným transgénom *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL*. Napriek tomu, že v prípade T1 generácie transgénnych rastlín jačmeňa so stabilne integrovaným transgénom *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* nebola na proteínovej úrovni preukázaná prítomnosť rekombinantného produktu v žiadnom z testovaných rastlinných orgánoch, následná analýza na úrovni RNA preukázala expresiu rekombinantného produktu v koreni, liste aj zrne týchto rastlín.

Rekombinantný peptid LL-37 bol špecificky detegovaný aj pomocou imunolokalizácie v zrnách vo vývojovom štádiu dormancie z T1 resp. T2 generácie, transgénnych rastlín, pričom v jačmennom zrne so stabilne integrovaným *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom bolo pozorované najvýraznejšie zafarbenie endospermu zrn indikujúce prítomnosť rekombinantného peptidu LL-37.

Ďalej bola otestovaná a potvrdená antimikrobiálna aktivita rekombinantného peptidu voči gram-negatívnej baktérii *E. coli* TOP10. V prípade štiepneho produktu, peptidu LL-37_KDEL, bola preukázaná 56% inhibícia bakteriálneho rastu, zatiaľ čo v prípade testovania aktivity rekombinantného produktu 6xHis_MBP_LL-37_KDEL nebola pozorovaná žiadna významná zmena. Testovanie antimikrobiálnej aktivity

voči gram-pozitívnej baktérii *M. luteus* prinieslo negatívne výsledky s potrebou optimalizácie testovacej metódy.

Prítomnosť transgénu u T2 generácie rastlín jačmeňa bola potvrdená na základe analýzy gDNA. Následne bola potvrdená funkčnosť znovo-špecifického B-hordeínového promótoru, nakoľko analýza na proteínovej úrovni potvrdila prítomnosť chimérneho peptidu LL-37 len v zrne rastlín jačmeňa so stabilne integrovaným *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom. Rovnako bola overená aj funkčnosť konštitutívneho ubiquitínového promótoru, keďže chimérny peptid LL-37 bol detegovaný v zrnách a listoch rastlín jačmeňa so stabilne integrovaným *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom. Rovnaký výsledok bol dosiahnutý aj v prípade detekcie rekombinantného peptidu LL-37 získaného izoláciou z proteínových teliesok, pričom bol rekombinantný peptid detegovaný aj u zrn vo vývojovom štádiu zrelosti. Následne bola potvrdená aj funkčnosť štiepneho miesta pre enterokinázu zahrnutého v sekvencii rekombinantného proteínu *6xHis_MBP_LL-37_KDEL*. Na základe kvantifikácie z predošlých analýz vyplynula skutočnosť, že metóda izolácie rekombinantného produktu obsiahnutého v proteínových telieskach poskytla všeobecne vyššie výťažky rekombinantného peptidu LL-37. V prípade zrn exprimujúcich rekombinantný peptid pod kontrolou znovo-špecifického B-hordeínového promótoru bol získaný výťažok približne 122 pmol.g^{-1} a v prípade zrn exprimujúcich rekombinantný peptid po kontrolou konštitutívneho ubiquitínového promótoru išlo o výťažok približne 43 pmol.g^{-1} . Je zrejmé, že pri purifikácii chimérneho peptidu LL-37 pomocou afinitnej chromatografie došlo k jeho značným stratám. Zrná vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti T2 generácie transgénnych rastlín jačmeňa so stabilne integrovaným *B-HORp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom obsahovali približne 3-krát väčšie množstvo rekombinantného peptidu LL-37 ako zrná transgénnych rastlín so stabilne integrovaným *UBIp::ZmCKX1sp_6xHis_MBP_LL-37_KDEL* transgénom. Na základe kvantifikácie a predošlých výsledkov je pre účely produkcie terapeuticky významných látok s využitím rastlín jačmeňa ako expresného systému vhodnejší znovo-špecifický B-hordeínový promótor.

Záverom práce bola zo zrn vo vývojovom štádiu mliečnej zrelosti získaná pomerne čistá proteínová frakcia pomocou dvojkrokovej purifikácie využívajúcej princíp afinitnej chromatografie. Počas procesu purifikácie došlo k výrazným stratám rekombinantného produktu a taktiež dochádza pravdepodobne k štiepeniu rekombinantného proteínu

His-tag_MBP_LL-37_KDEL (48 kDa) na dva produkty, a to: His-tag_MBP (43 kDa) a LL-37_KDEL (5 kDa). Vo výslednom eluáte bol pôvodný proteín His-tag_MBP_LL-37_KDEL imunodetegovaný s použitím primárnej protilátky na peptid LL-37 len v malom množstve, pričom imunodetekcia s použitím protilátky na MBP, potvrdila prítomnosť štiepneho produktu His-tag_MBP vo výrazne väčšom množstve. Na základe výsledkov purifikácie rekombinanntého produktu bude v budúcnosti nutné experiment zopakovať a podľa potreby modifikovať.

7 LITERATURA

- Adams C.P., Walker K.A., Obare S.O., Docherty K.M. (2014): Size-dependent antimicrobials effects of novel palladium nanoparticles. *PloS ONE* **9** <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085981>.
- Ageitos J.M., Sánchez-Pérez A., Calo-Mata P., Villa T.G. (2017): Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochemical Pharmacology* **133**, 117-138.
- Antimicrobial Peptide Database: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (19.2.2018).
- Arcalis E., Marcel S., Altmann F., Kolarich D., Drakakaki G., Fischer R., Christou P., Stoger E. (2004): Unexpected deposition patterns of recombinant proteins in post-endoplasmatic reticulum compartments of wheat endosperm. *Plant Physiology* **136**, 3457-3466.
- Aubry-Damon H., Soussy C.J., Courvalin P. (1998): Characterization of mutations in the *rpoB* gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 2590-2594.
- Bal W., Kozłowski H., Kasprzak K.S. (2000): Molecular models in nickel carcinogenesis. *Journal of inorganic biochemistry* **79**, 213-218.
- Ball P. (2007): The clinical development and launch of amoxicillin/clavulanate for the treatment of a range of community-acquired infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **30**, 113-117.
- Bikard D., Euler Ch.W., Jiang W., Nussenzweig P.M., Goldberg G.W., Duportet X., Fischetti V.A., Marraffini L.A. (2014): Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nature Biotechnology* **32**, 1146-1150.
- Biomérieux: <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/etest> (26.3.2018).
- Brandle J.E., McHugh S.G., James L., Labbé H., Miki B.L. (1995): Instability of transgene expression in field grown tobacco carrying the *csr1-1* gene for sulfonylurea herbicide resistance. *Nature Biotechnology* **13**, 994-998.
- Britannica: <https://kids.britannica.com/students/assembly/view/167175> (17.4.2018).
- Britannica: <https://www.britannica.com/science/antiprotozoal-drug> (20.4.2018).
- Bundó M., Montesinos L., Izquierdo E., Campo S., Mieulet D., Guiderdoni E., Rossignol M., Badosa E., Montesinos E., Segundo B.S., Coca M. (2014): production of cecropin A antimicrobial peptide in rice seed endosperm. *BMC Plant Biology* **14:102**, <http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-14-102>.
- Burman L.G. (1986): The antimicrobial activities of trimethoprim and sulfonamides. *Scandinavian Journal of infectious diseases* **18**, 3-13.
- Citorik R.J., Mimee M., Lu T.K. (2014): Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature Biotechnology* **32**, 1141-1145.
- CLSI: <http://demo.nextlab.ir/getattachment/096a51d4-1530-4f81-92c0-f5477c584b9b/CLSI-M26-A.aspx> (26.3.2018).
- CLSI: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/> (26.3.2018).
- Coca M., Peñas G., Gómez J., Campo S., Bortolotti C., Messequer J., Segundo B.S. (2006): Enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* conferred by expression of a cecropin A gene in transgenic rice. *Planta* **223**, 392-406.
- Conrad U., Fiedler U. (1998): Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant molecular biology* **38**, 101-109.
- Courtney C.M., Goodman S.M., McDaniel J.A., Madinger N.E., Chatterjee A., Nagpal P. (2016): Photoexcited quantum dots for killing multidrug-resistant bacteria. *Nature Materials* **15**, 529-534.
- Crouch S.P.M., Kozłowski R., Slater K.J., Fletcher J. (1993): The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods* **160**, 81-88.

- D'Costa V.M., King C.E., Kalan L. Morar M., Sung W.W., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debruyne R., Golding G.B., Poinar H.N., Wright G.D. (2011): Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **477**, 457-461.
- Dashiff A., Junka R.A., Libera M., Kadouri D.E. (2010): Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Applied Microbiology* **110**, 431-444.
- De Muynck B., Navarre C., Nizet Y., Stadlmann J., Boutry M. (2009): Different subcellular localization and glycosylation for a functional antibody expressed in *Nicotiana tabacum* plants and suspension cells. *Transgenic Research* **18**, 467-482.
- Demain A.L., Vaishnav P. (2009): Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* **27**, 297-306.
- Dürr U.H., Sudheendra U.S., Ramamoorthy A. (2006): LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta - Biomembranes* **1758**, 1408-1425.
- Dwidar M., Nam D., Mitchell R.J. (2015): Indole negatively impacts predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* and its release from bdelloplast. *Environmental Microbiology* **17**, 1009-1022.
- Dwidar M., Yokobayashi Y. (2017): Controlling *Bdellovibrio bacteriovorus* gene expression and predation using synthetic riboswitches. *ACS Synthetic Biology* **6**, 2035-2041.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research* **19**, 1349-1355.
- Eligo Bioscience: <http://eligo.bio/technology/> (5.4.2018).
- Elleuch L., Shaaban M., Smaoui S., Mellouli L., Karray-Rebai I., Fguira L.F.B., Shaaban K.A., Laatsch H. (2010): Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **162**, 579-593.
- Enault F., Briet A., Bouteille L., Roux S., Sullivan M.B., Petit M.A. (2017): Phages rarely encode antibiotic resistance h' genes: a cautionary tale for virome analysis. *The ISME Journal* **11**, 237-247.
- European Commission: https://ec.europa.eu/health/amr/antimicrobial-resistance_en (20.1.2018).
- Fajardo A., Martínez-Martín N., Mercadillo M., Galán J.C., Ghysels B., Matthijs S., Cornelis P., Wiehlmann L., Tümmler B., Baquero F., Martínez J.L. (2008): The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS ONE*, **3** <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001619>.
- Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O. (2000): A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research* **52**, 662-668.
- Forbes B.A., Sahn D.F., Weissfeld A.S. (1998): *Bailey and Scott's diagnostic microbiology*. 10th ed., Mosby-Year Book, Missouri, USA, 1074 strán.
- Giguère S., Prescott J.F., Baggot J.D., Walker R.D., Dowling P.M. (2006): *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 4th ed., Blackwell Publishing, Iowa, USA, 626 strán.
- Giles N.M., Watts A.B., Giles G.I., Fry F.H., Littlechild J.A., Jacob C. (2003): Metal and redox modulation of cysteine protein function. *Chemistry and Biology* **10**, 677-693.
- Gomaa A.A., Klumpe H.E., Luo M.L., Selle K., Barrangou R., Beisel Ch.L. (2014): Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. *mBio* **5**, <http://mbio.asm.org/content/5/1/e00928-13>.
- Hadacek F., Greger H. (2000): Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis* **11**, 137-147.
- Hall B.G., Barlow M. (2003): Structure-based phylogenies of the serine beta-lactamases. *Journal of molecular evolution* **57**, 255-260.
- Hamburger M.O., Cordell G.A. (1987): A direct bioautographic tlc assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of natural products* **50**, 19-22.
- Hancock R.E. (2000): Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert opinion on investigational drugs* **9**, 1723-1729.
- Hawkey P.M. (1998): The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *The BMJ Journal* **317**, 657-660.
- Heatley N.G. (1944): A method for the assay of penicillin. *Biochemical Journal* **38**, 61-65.

- Hofbauer A., Peters J., Arcalis E., Rademacher T., Lampel J., Eudes F., Vitale A., Stoger E. (2014): The induction of recombinant protein bodies in different subcellular compartments reveals a cryptic plastid-targeting signal in the 27-kDa γ -zein sequence. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2**:67, <http://doi.org/10.3389/fbioe.2014.00067>.
- Hong I.P., Lee S.J., Kim Y.S., Choi S.G. (2007): Recombinant expression of human cathelicidin (hCAP18/LL-37) in *Pichia pastoris*. *Biotechnology letters* **29**, 73-78.
- Hoppmann V., Di Fiore S., Zimmermann S., Emans N., Rademacher T., Fischer R., Schillberg S. (2002): The potato granule bound starch synthase chloroplast transit peptide directs recombinant proteins to plastids. *Journal of Plant Physiology* **159**, 1061-1067.
- Horvath H., Huang J., Wong O., Kohl E., Okita T., Kannangara C.G., von Wettstein D. (2000): The production of recombinant proteins in transgenic barley grains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 1914-1919.
- Chung E.M.C., Dean S.N., Propst C.N., Bishop B.M., van Hoek M.L. (2016): Komodo dragon-inspired synthetic peptide DRGN-1 promotes wound-healing of a mixed-biofilm infected wound. *NPJ biofilms and Microbiomes* **3**, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28649410>.
- Iebba V., Santangelo F., Totino V., Nicoletti M., Gagliardi A., De Biase R.V., Cucchiara S., Nencioni L., Conte M.P., Schippa S. (2013): Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PLoS One* **8**, <https://doi.org/10.1371/annotation/b08ddcc9-dfdb-4fc1-b2ac-5a4af3051a91>.
- Iorio M., Cruz J., Simone M., Bernasconi A., Brunati C., Sosio M., Donadio S., Maffioli S.I. (2017): Antibacterial paramagnetic quinones from *Actinoballomurus*. *Journal of Natural Products* **80**, 819-827.
- Ji Q., Vincken J.P., Suurs L.C., Visse R.G. (2003): Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis. *Plant molecular biology* **51**, 789-801.
- Jiménez-Esquilín A.E., Roane T.M. (2005): Antifungal activities of actinomycete strains associated with high-altitude sagebrush rhizosphere. *Journal of industrial microbiology and biotechnology* **32**, 378-381.
- Jiménez-Mejías M.E., Pichardo-Guerrero C., Márquez-Rivas F.J., Martín-Lozano D., Prados T., Pachón J. (2002): Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters of intravenously administered colistin in a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **21**, 212-214.
- Jindani A., Nunn A.J., Enarson D.A. (2004): Two 8-month regimens of chemotherapy for treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis: international multicentre randomised trial. *The Lancet* **364**, 1244-1251.
- Johansson J., Gudmundsson G.H., Rottenberg M.E., Berndt K.D., Agerberth B. (1998): Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 3718-3724.
- Jung Y.J. (2013): Enhanced resistance to bacterial pathogen in transgenic tomato plants expressing cathelicidin antimicrobial peptide. *Biotechnology and Bioprocess engineering* **18**, 615-624.
- Jung Y.J., Lee S.Y., Moon Y.S., Kang K.K. (2012): Enhanced resistance to bacterial and fungal pathogens by overexpression of a human cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL37) in Chinese cabbage. *Plant Biotechnology Reports* **6**, 39-46.
- Kettner M., Nemeč P., Kováč S., Balanová J. (1973): Dactylarin, a new antiprotozoal antibiotic from *Dactylaria lutea*. *The Journal of Antibiotics* **26**, 692-696.
- Kim S.J., Quan R., Lee S.J., Lee H.K., Choi J.K. (2009): Antibacterial activity of recombinant hCAP18/LL37 protein secreted from *Pichia pastoris*. *Journal of Microbiology* **47**, 358-362.
- Kondejewski L.H., Farmer S.W., Wishart D.S., Hancock R.E.W., Hodges R.S. (1996): Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Chemical Biology & Drug Design* **47**, 460-466.
- LeBel G., Piché F., Frenette M., Gottschalk M., Greiner D. (2013): Antimicrobial activity of nisin against the swine pathogen *Streptococcus suis* and its synergistic interaction with antibiotics. *Peptides* **50**, 19-23.

- Lentz E.M., Segretin M.E., Morgenfeld M.M., Wirth S.A., Dus Santos M.J., Mozgovej M.V., Wigdorovitz A., Bravo-Almonacid F.F. (2010): High expression level of a foot and mouth disease virus epitope in tobacco transplastomic plants. *Planta* **231**, <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1058-4>.
- Lertcanawanichakul M., Sawangnop S. (2008): A comparison of two methods used for measuring the antagonistic activity of *Bacillus* species. *Walailak Journal of Science and Technology* **5**, 161-171.
- Li X., Robinson S.M., Gupta A., Saha K., Jiang Z., Moyano D.F., Sahar A., Riley M.A., Rotello V.M. (2014): Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS Nano* **8**, 10682-10686.
- Lin Q.Y., Tsai Y.L., Liu M.C., Lin W.C., Hsueh P.R., Liaw S.J. (2014): *Serratia marcescens* arn, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 5181-5190.
- Linden P.K., Kusne S., Coley K., Fontes P., Kramer D.J., Paterson D. (2003): Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* **37**, 154-160.
- Locus Biosciences: <http://www.locus-bio.com/#about> (5.4.2018).
- Lomovskaya O., Warren M.S., Lee A., Galazzo J., Fronko R., Lee M., Blais J., Cho D., Chamberland S., Renau T., Leger R., Hecker S., Watkins W., Hoshino K., Ishida H., Lee V.J. (2001): Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 105-116.
- Lynch P.T., Jones J., Blackhall N.W., Davey M.R., Power J.B., Cocking E.C., Nelson M.R., Bigelow D.M., Orum T.V., Orth C.E., Schuh W. (1995): The phenotypic characterisation of R₂ generation transgenic rice plants under field and glasshouse conditions. *Euphytica* **85**, 395-401.
- Maffioli S.I., Fabbretti A., Brandi L., Savelsbergh A., Monciardini P., Abbondi M., Rossi R., Donadio S., Gualerzi C.O. (2013): Orthoformimycin, a selective inhibitor of bacterial translation elongation from *Streptomyces* containing an unusual orthoformate. *ACS Chemical Biology* **8**, 1939-1946.
- Maffioli S.I., Zhang Y., Degen D., Carzaniga T., Del Gatto G., Serina S., Monciardini P., Mazzetti C., Guglierame P., Candiani G., Chiriac A.I., Facchetti G., Kaltofen P., Sahl H.G., Dehò G., Donadio S., Ebright R.H. (2017): Antibacterial nucleoside-analog inhibitor of bacterial RNA polymerase. *Cell* **169**, 1240-1248.
- Magaldi S., Mata-Essayag S., Hartung de Capriles C., Perez C., Colella M.T., Olaizola C., Ontiveros Y. (2004): Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases* **8**, 39-45.
- Mahoney J.F., Arnold R.C., Harris A. (1943): Penicillin treatment of early syphilis. *American Journal of Public Health and The Nation's health* **33**, 1387-1391.
- Mainieri D., Rossi M., Archinti M., Bellucci M., De Marchis F., Vavassori S., Pompa A., Arcioni S., Vitale A. (2004): Zeolin. A new recombinant storage protein constructed using maize γ -zein and bean phaseolin. *Plant Physiology* **136**, 3447-3456.
- Marck A., Engasser J.M., Moll M., Flayeux R. (1983): A kinetic model of starch hydrolysis by α - and β -amylase during mashing. *Biotechnology and Bioengineering* **25**, 481-496.
- Marcus J.P., Goulter K.C., Manners J.M. (2008): Peptide fragments from plant vicilins expressed in *Escherichia coli* exhibit antimicrobial activity *in vitro*. *Plant Molecular Biology Reporter* **26**, 75-87.
- Massova I., Mobashery S. (1998): Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding and beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 1-17.
- Matsumura Y., Yoshikata K., Kunisaki S., Tsuchido T. (2003): Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4278-4281.
- Merck: <http://www.merck.com/product/home.html> (20.2.2018).

- Miari V.F., Solanki P., Hleba Y., Stabler R.A., Heap J.T. (2017): *In vitro* susceptibility to clostioamide among clinical and reference strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28784667>.
- Monnappa A.K., Dwidar M., Seo J.K., Hur J.H., Mitchell R.J (2014): *Bdellovibrio bacteriovorus* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and invasion into human epithelial cells. *Scientific Reports* **4**, <https://www.nature.com/articles/srep03811>.
- Moravec T., Schmidt M.A., Herman E.M., Woodford-Thomas T. (2007): Production of *Escherichia coli* heat labile toxin (LT) B subunit in soybean seed and analysis of its immunogenicity as an oral vaccine. *Vaccine* **25**, 1647-1657.
- Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., Yacaman M.J. (2005): The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346-2353.
- Naghmouchi K., LeLay Ch., Baah J., Drider D. (2012): Antibiotic and antimicrobial peptide combinations: synergistic inhibition of *Pseudomonas fluorescens* and antibiotic-resistant variants. *Research in Microbiology* **163**, 101-108.
- National Information Program on Antibiotics: <http://www.antibiotics-info.org/metronidazole.html> (20.4.2018).
- Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J. (2011): The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology* **29**, 464-472.
- Nijs A., Cartuyvels R., Mewis A., Peeters V., Rummens J.L., Magerman K. (2003): Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3627-3630.
- Nykiforuk C.L., Boothe J.G., Murray E.W., Keon R.G., Goren J., Markley N.A., Moloney M.M. (2006): Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Biotechnology Journal* **4**, 77-85.
- Nykiforuk C.L., Shen Y., Murray E.W., Boothe J.G., Busseuil D., Rhéaume E., Tardif J.C., Reid A., Moloney M.M. (2011): Expression and recovery of biologically active recombinant Apolipoprotein AI_{Milano} from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds. *Plant Biotechnology Journal* **9**, 250-263.
- Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M. (2014): Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology* **5**, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4244539/>.
- Otter D. (2003): Protein. Determination and Characterization. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd ed., (Trugo L., Caballero B. eds.), Academic Press, USA, 4824-4830.
- Pag U., Sahl H.G. (2002): Multiple activities in lantibiotics – models for the design of novel antibiotics? *Current Pharmaceuticals Design* **8**, 815-833.
- Pal S., Tak Y.K., Song J.M. (2007): Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **27**, 1712-1720.
- Panacek A., Kvítek L., Prucek R., Kolar M., Vecerova R., Pizúrova N., Sharma V.K., Nevecna T., Zboril R. (2006): Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The journal of physical chemistry* **110**, 16248-16253.
- Paparella A., Taccogna L., Aguzzi I., Chaves-López C., Serio A., Marsilio F., Suzzi G. (2008): Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* **19**, 1174-1182.
- Pfaller M.A., Sheehan D.J., Rex J.H. (2004): Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical Microbiology Reviews* **17**, 268-280.
- Radovic-Moreno A.F., Lu T.K., Puscasu V.A., Yoon Ch.J., Langer R., Farokhzad O.C. (2012): Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. *ACS Nano* **6**, 4279-4287.
- Ramani R., Chaturvedi V. (2000): Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 2752-2758.

- Ren Z.H., Yuan W., Deng H.D., Deng J.L., Dan Q.X., Jin H.T., Tian C.L., Peng X., Liang Z., Gao S., Xu S.H., Li G., Hu Y. (2015): Effects of antibacterial peptide on cellular immunity in weaned piglets. *Journal of animal science* **93**, 127-134.
- ResistanceMap: <https://resistancemap.cddep.org/> (20.1.2018).
- Ruhlman T., Ahangari R., Devine A., Samsam M., Daniell H. (2008): Expression of cholera toxin B-proinsulin fusion protein in lettuce and tobacco chloroplasts – oral administration protects against development of insulinitis in non-obese diabetic mice. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 495-510.
- Sanofi: <https://www.sanofi.com/en/science-and-innovation/clinical-trials-and-results/our-disclosure-commitments/pharma/letter-t/> (20.2.2018).
- Sengupta-Gopalan C., Reichert N.A., Barker R.F., Hall T.C., Kemp J.D. (1985): Developmentally regulated expression of the bean β -phaseolin gene in tobacco seed. *Proceedings of the National Academy of Sciences Of the United States of America* **82**, 2230-3324.
- Shahverdi A.R., Fakhimi A., Shahverdi H.R., Minaian S. (2007): Sythesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine* **3**, 168-171.
- Shanks R.M.Q., Davra V.R., Romanowski E.G., Brothers K.M., Stella N.A., Godbole D., Kadouri D.E. (2013): An eye to a kill: Using predatory bacteria to control gram-negative pathogens associated with ocular infections. *PLoS One* **8**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066723>.
- Sharma A.K., Sharma M.K. (2009): Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances* **27**, 811-832.
- Shousha A., Awaiwanont N., Sofka D., Smulders F.J.M., Paulsen P., Szostak M.P., Humphrey T., Hilbert F. (2015): Bacteriophages isolated from chickens meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. *Applied and environmental microbiology* **81**, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25934615>.
- Schiermeyer A., Schinkel H., Apel S., Fischer R., Schillberg S. (2005): Production of *Desmodus rotundus* salivary plasminogen activator alpha1 (DSPAalpha1) in tobacco is hampered by proteolysis. *Biotechnology and bioengineering* **89**, 848-858.
- Schillberg S., Zimmermann S., Voss A., Fischer R. (1999): Apoplastic and cytosolic expression of full-size antibodies and antibody fragments in *Nicotiana tabacum*. *Transgenic Research* **8**, 255-263.
- Schmitt J., Hess H., Stunnenberg H.G. (1993): Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Molecular Biology Reports* **18**, 223-230.
- Silver L.L., Bostian K.A. (1993): Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 377-383.
- Simone M., Monciardini P., Gaspari E., Donadio S., Maffioli S.I. (2013): Isolation and characterization of NAI-802, a new lantibiotic produced by two different *Actinoplanes* strains. *The Journal of Antibiotics* **66**, 73-78.
- Sondi I., Salopek-Sondi B. (2004): Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science* **275**, 177-182.
- Statista: <https://www.statista.com/statistics/662130/discovery-of-new-antibiotics-in-us/> (3.1.2018).
- Stöger E., Vaquero C., Torres E., Sack M., Nicholson L., Drossard J., Williams S., Keen D., Perrin Y., Christou P., Fischer R. (2000): Cereal crops as viable and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology* **42**, 583-590.
- Synthetic Genomics: <https://www.syntheticgenomics.com/core-technology/> (5.4.2018).
- Tanaka K., Sugimoto T., Ogawa M., Kasai Z. (1980): Isolation and characterization of two types of protein bodies in the rice endosperm. *Agricultural and Biological chemistry* **44**, 1633-1639.
- Tavares L.S., Rettore J.V., Freitas R.M., Porto W.F., Duque A.P., Singulani L., Silva O.N., Detoni L., Vasconcelos E.G., Dias S.C., Franco O.L., Santos O. (2012): Antimicrobial activity of recombinant Pg-AMP1, a glycine-rich peptide from guava seeds. *Peptides* **37**, 294-300.

- Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. (2000): Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4-30.
- Tóth E.M., Borsodi A.K., Felföldi T., Vajna B., Sipos R., Márialigeti K. (2013): Strain culture and cultivation-based techniques. In: *Practical Microbiology*. (Tóth E.M., Márialigeti K. eds.), Eötvös Loránd University, Mađarsko, 36-103.
- UpToDate: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-antibacterial-susceptibility-testing> (20.4.2018).
- Vandekerckhove J., Van Damme J., Van Lijsebettens M., Botterman J., De Block M., Vandewiele M., De Clercq A., Leemans J., Van Montagu M., Krebbers E. (1989): Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. *Biotechnology* **7**, 929-932.
- Vedanta Biosciences: <https://www.vedantabio.com/pipeline> (11.2.2018).
- Vidi P.A., Kessler F., Bréhélin C. (2007): Plastoglobules: a new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast. *BMC Biotechnology* **7:4**, <http://doi.org/10.1186/1472-6750-7-4>.
- Vojtek L., Dobeš P., Büyüküzél E., Atosuo J., Hyršl P. (2014): Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. *European Journal of Entomology* **111**, 335-340.
- Waegemann K., Popov-Čeleketić D., Neupert W., Azem A., Mokranjac D. (2015): Cooperation of TOM and TIM23 complexes during translocation of proteins into mitochondria. *Journal of Molecular Biology* **427**, 1075-1084.
- Weimer K.E.D., Juneau R.A., Murrah K.A., Pang B., Armbruster Ch.E., Richardson S.H., Swords W.E. (2011): Divergent mechanisms for passive pneumococcal resistance to β -lactam antibiotics in the presence of *Haemophilus influenzae*. *The Journal of Infectious Diseases* **203**, 549-555.
- White R.L., Burgess D.S., Manduru M., Bosso J.A. (1996): Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkboard and E test. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* **40**, 1914-1918.
- Willis A.R., Moore Ch., Mazon-Moya M., Krokowski S., Lambert C., Till R., Mostowy S., Sockett R.E. (2016): Injections of predatory bacteria work alongside host immune cells to treat *Shigella* infection in Zebrafish larvae. *Current Biology* **26**, 3343-3351.
- Williston E.H., Zia-Walrath P., Youmans G.P. (1947): Plate methods for testing antibiotic activity of Actinomycetes against virulent human type Tubercle Bacilli. *Journal of Bacteriology* **54**, 563-568.
- World Health Organisation: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> (20.1.2018).
- World Health Organisation: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=9CF5FFABC39078C10F40CE922498E2EF?sequence=1 (20.1.2018).
- Yosef I., Manor M., Kiro R., Qimron U. (2015): Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 7267-7272.
- Zhang L., Parente J., Harris S.M., Woods D.E., Hancock R.E.W., Falla T.J. (2005): Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**, 2921-2927.
- Zhang L.J., Gallo R.L. (2016): Antimicrobial peptides. *Current Biology* **26**, 14-19.
- Zhang X., Oqlecka K., Sandgren S., Belting M., Esbjörnen E.K., Nordén B., Gräslund A. (2010): Dual functions of the human antimicrobial peptide LL-37-target membrane perturbation and host cell cargo delivery. *Biochimica et biophysica acta* **1798**, 2201-2208.
- Zhao S., White D.G., Ge B., Ayers S., Friedman S., English L., Wagner D., Gaines S., Meng J. (2001): Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance among shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1558-1564.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

AMP	antimikrobiálny peptid
ATB	antibiotikum
BBCH	stupnica pre klasifikáciu vývojových štádií obilnín
<i>B-HORp</i>	B-hordeínový promótor
bp	pár bází
cDNA	komplementárna DNA
<i>CKX1</i>	gén kódujúci cytokinín oxidáza/dehydrogenáza
cv.	kultivar
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	European Food Safety Authority
FDA	Food and Drug Administration
FICI	index frakčnej inhibičnej koncentrácie
fw	forward primer
gDNA	genómová DNA
GRAS	generally recognized as safe
<i>hpt</i>	gén kódujúci hygromycínfosfotransferázu
MIC	minimálna inhibičná koncentrácia
NTP	nukleozidtrifosfát
PCR	polymerázová reťazová reakcia
qRT-PCR	kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase
rev	reverse primer
SDS	dodecylsulfát sodný
T1	druhá generácia transgénnych rastlín
T2	tretia generácia transgénnych rastlín
<i>UBI_{1p}</i>	ubiquitínový promótor
WHO	World Health Organisation