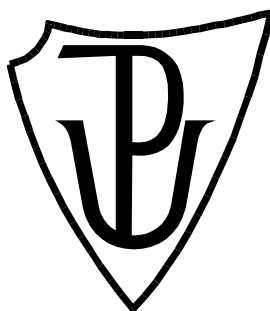


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Izolace antimikrobiálních peptidů s terapeutickým
potenciálem z GMO rostlin ječmene a testování
antimikrobiálního účinku rekombinantních produktů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Veronika Janechová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Edita Holásková
Rok:	2016

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

V Olomouci dne *podpis bakaláře*

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Editě Holáskové za cenné rady a připomínky. Rovněž bych chtěla poděkovat všem zaměstnancům CRH - Oddělení molekulární biologie za vřelý a přátelský přístup.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Veronika Janechová
Název práce	Izolace antimikrobiálních peptidů s terapeutickým potenciálem z GMO rostlin ječmene a testování antimikrobiálního účinku rekombinantních produktů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení molekulární biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Edita Holásková
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	

Klíčové slova	antimikrobiální peptidy, proteinová tělíska, molekulární farmaření, zrnově specifická exprese, cathelicidin LL-37, transgenní ječmen
Počet stran	74
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Veronika Janechová
Title	Isolation of antimicrobial peptides with therapeutic potential from GMO barley plants and testing of antimicrobial activities of the recombinant products
Type of thesis	Bachelor
Department	Division of molecular biology, CRH
Supervisor	Mrg. Edita Holásková
The year of presentation	2016
Abstract	

Keywords	cathelicidin LL-37, transgenic barley, antimicrobial peptides, protein bodies, molecular farming, grain specific expression
Number of pages	74
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	10
2.1	Rostlinné molekulární farmaření.....	10
2.1.1	Stručná historie vzniku rostlinného molekulárního farmaření.....	10
2.1.2	Patentová ochrana produkce vybraných rekombinantních proteinů v rostlinných systémech.....	11
2.1.3	Charakteristika rostlinných produkčních systémů.....	14
2.1.4	Obilniny.....	19
2.1.5	Ječmen.....	21
2.2	Antimikrobiální peptidy.....	29
2.2.1	Molekulární farmaření za účelem produkce antimikrobiálních peptidů v rostlinných systémech.....	32
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
3.1	Materiál.....	35
3.1.1	Biologický materiál.....	35
3.1.2	Chemikálie, kity a gely.....	35
3.1.3	Přístroje a vybavení.....	37
3.1.4	Jiné.....	38
3.1.5	Použité roztoky a média.....	38
3.1.6	Počítačové programy.....	40
3.2	Metody.....	41
3.2.1	Analýza exprese transgenu.....	41
3.2.2	Analýza a selekce transgenních rostlin ječmene.....	42
3.2.3	Testování antimikrobiální aktivity.....	43
3.2.4	Imunodetekce rekombinantního peptidu metodou Western Blot.....	45
3.2.5	Southern blot analýza.....	47
4	VÝSLEDKY.....	50
4.1	Fenotypizace transgenních linií.....	50
4.2	Analýza T0 generace transgenních rostlin na úrovni RNA.....	51
4.1	Genotypizace T1 a T2 generací transgenních rostlin metodou konvenční PCR.....	52
4.2	Zahájení selekce homozygotní linie.....	53
4.3	Western blot analýza T0, T1 a T2 generací transgenních rostlin.....	55

4.3.1	Kvantifikace množství rekombinantního produktu v zrnech T1 a T2 generací transgenních rostlin	56
4.4	Testování antimikrobiální aktivity rekombinantního peptidu vůči bakterii <i>Escherichia coli</i> TOP 10	58
5	DISKUZE	61
6	ZÁVĚR	64
7	LITERATURA	65
8	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	74

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracovat literární rešerši na téma využití obilnin jako bioreaktorů pro produkci ekonomicky významných proteinů a jiných sloučenin se zaměřením na možnosti využití ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a ječmenného zrna
- Provést literární rešerši na téma antimikrobiální peptidy se zaměřením na lidský kathelicidin LL-37

Experimentální část:

- Ověřit expresi transgenu kódujícího rekombinantní antimikrobiální peptid v ječmenném zrna
- Selekcce homozygotních zástupců u vybrané linie ječmene se stabilně fixovaným transgenem
- Izolace antimikrobiálního peptidu v různých vývojových stádiích rostliny a jeho imunodetekce
- Optimalizace parametrů pro robustní a reprodukovatelnou metodu extrakce rekombinantního peptidu z ječmenného zrna
- Testování antimikrobiální aktivity rekombinantního peptidu vůči vybraným druhům bakterií

1 ÚVOD

Molekulární farmaření představuje biotechnologický proces, při kterém dochází nejčastěji k produkci rekombinantních proteinů/peptidů a sekundárních metabolitů v hostitelských organismech, ve kterých se přirozeně geny kódující tyto produkty nevyskytují. Takovéto produkty pak nejčastěji nalézají uplatnění jak ve farmaceutickém průmyslu jakožto léčiva, antigeny či protilátky, tak i v industriálním průmyslu v podobě nejrůznějších industriálních proteinů. Jako expresní systémy jsou využívány nejrůznější organismy od rostlinných virů přes bakterie a kvasinky, až po rostlinné či savčí buňky. Každá z produkčních platforem má své výhody i nevýhody a výběr vhodného bioreaktoru představuje jeden z klíčových parametrů pro úspěšnou produkci dané látky. Ideální expresní systém by měl být schopen produkce dané látky ve funkční podobě za relativně nízkou cenu a poměrně krátký čas, uskladnění a následná distribuce rekombinantního produktu by měla být praktická a snadno proveditelná a riziko kontaminace produktu lidskými či zvířecími patogeny by mělo být minimální (Demain a Vaishnav, 2009). V současné době dochází k neustálému nárůstu poptávky po terapeuticky aktivních látkách. Ačkoli již byla exprimována celá řada proteinů s terapeutickým potenciálem v prokaryotických/eukaryotických mikrobiálních systémech či zvířecích buněčných kulturách, nepředstavují tyto systémy vhodnou volbu pro produkci terapeutik z několika důvodů: provoz bioreaktorů obsahující buněčné kultury je finančně nákladný a s ním roste i cena finálního produktu, mikrobiální systémy navíc nejsou schopny produkce některých proteinů s komplexními strukturními vlastnostmi a hrozí zde riziko kontaminace endotoxiny. Z toho důvodu dochází od devadesátých let k výraznému rozvoji v oblasti genetické modifikace rostlin se zaměřením na využití rostlin jako bioreaktorů v molekulárním farmaření (Ma *et al.*, 2003).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rostlinné molekulární farmaření

2.1.1 Stručná historie vzniku rostlinného molekulárního farmaření

Bevan *et al.* v roce 1983 demonstrovali úspěšnou *in vitro* transformaci rostliny pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. To vedlo k popularizaci této metody na poli molekulární biologie a mimo jiné i v oblasti molekulárního farmaření. Jeden z prvních markerových genů, který byl dříve využíván pro vývoj systémů genetické modifikace rostlin, tzv. *uidA* gen (Jefferson *et al.* 1987), je v současnosti využíván jako produkt molekulárního farmaření (Kusnadi *et al.* 1998; Witcher *et al.* 1998). V roce 1989 Hiatt *et al.* využili metodu transformace tabáku pro produkci protilátek (Hiatt *et al.* 1989). V roce 1990 Sijmons *et al.* produkovali lidský sérový albumin v transgenním tabáku a bramboře. První rekombinantní protein produkovaný pro nefarmaceutické, ale komerční účely byl až protein avidin, který se běžně vyskytuje ve vaječném bílku ptáku, plazů a obojživelníků. Avidin byl produkován v zrně transgenní kukuřice a využívá se především pro diagnostické účely (Hood *et al.* 1997). Kapusta *et al.* v roce 1999 připravili transgenní salát (*Lactuca sativa*) pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která obsahovala plasmid s genem kódujícím povrchový antigen viru hepatitidy typu B (HBsAg). Transgenní salát produkoval antigen v množství od 1-5,5 ng.g⁻¹ čerstvého pletiva. U dobrovolníků se po orální imunizaci transgenním salátem vytvořili HBsAg-specifické IgG protilátky (Kapusta *et al.*, 1999). V roce 2000 Perrin *et al.* publikovali produkci jednořetězcového fragmentu Fv protilátky (scFV) sfúzovaného na svém C-konci s KDEL sekvencí směřující produkt do endoplasmatického retikula, což by mělo mít za následek lepší stabilitu a vyšší výnosy. Jako produkční platforma byl využit transgenní hrášek (*Pisum sativum*), jež byl transformován pomocí *A. tumefaciens* nesoucí vektor s příslušným transgenem, jehož exprese byla pod kontrolou znově specifického promotoru pro hráškový legumin A protein. Produkt by mohl nalézt uplatnění pro *in vitro* imunodetekci a *in vivo* zobrazení rakovinového bujení. Transgenní rostliny produkovali plně funkční rekombinantní protilátku v množství až 9 µg.g⁻¹ čerstvého rostlinného materiálu (Perrin *et al.*, 2000). V roce 2005 vyšla publikace popisující produkci rekombinantní komerčně uplatnitelné monoklonální protilátky (MAb) proti antigenu hepatitidy B (HBsAg), a to v transgenním tabáku

(*Nicotiana benthamiana*; Pujol *et al.*, 2005). Listy transgenního tabáku využívá také společnost Fraunhofer institut, a to pro produkci tumor specifické M12 protilátky. Protilátka byla úspěšně izolována i purifikována a její biologická aktivita byla prokázána specifickou vazbou na buňky adenokarcinomu a může tak být použita v diagnostickém průmyslu (<http://www.ime.fraunhofer.de/content/dam/ime/en/documents/MB/Production%20and%20characterization%20of%20the%20tumourspecific%20antibody%20M12%20in%20plants.pdf>; staženo 25. 4. 2016). Výše zmiňovaná společnost dále publikovala produkci anti GFIV (*Grapevine fanleaf virus*) specifické protilátky opět s využitím listů tabáku, a to za účelem ochrany rostlin, protože neutralizuje GFIV virus již v počátečních stádiích infekce. Zmiňovaný virus napadá vinnou révu a způsobuje tak až 80% ztráty úrod, a proto může být tato rekombinantní protilátka slibným řešením ochrany významných plodin před škůdci (<http://www.ime.fraunhofer.de/content/dam/ime/en/documents/MB/Engineering%20Durable%20Pathogen%20Resistance%20in%20Grapevine.pdf>; staženo 25. 4. 2016).

2.1.2 Patentová ochrana produkce vybraných rekombinantních proteinů v rostlinných systémech

V současnosti existuje několik velkých firem majících patentovanou ochranu způsobu produkce určitého rekombinantního proteinu v konkrétní rostlině jak pro farmaceutické, tak i pro nefarmaceutické účely (Tab. 1). Například Společnost Protalix Biotherapeutics vlastní od roku 2011 patent pro produkci lidského enzymu glukocerebrosidasy s využitím suspenze rostlinných buněk původem z mrkve. Glukocerebrosidasa je membránový enzym, který je zodpovědný za hydrolýzu glukosylceramidu na glukosu a ceramid. Bodovou mutací v glukocerebrosidasovém genu dochází k akumulaci glukosylceramidu v lysozomech makrofágů a vznikají tzv. Gaucherovy buňky, což vede k onemocnění známém jako Gaucherova nemoc. Ta je provázena klinickými příznaky jakými jsou hepatosplenomegalie (abnormální zvětšení jater a sleziny), anemie (chudokrevnost) nebo trombocytopenie (nepoměr mezi tvorbou a zánikem trombocytů). V roce 2012 americká organizace FDA (Food and Drug Administration) schválila injekční použití zmiňovaného rekombinantního enzymu pro dlouhodobou terapii dospělých pacientů s Gaucherovou nemocí typu I. Enzym je komerčně dostupný pod obchodním názvem ELELYSO™ na trhu v Austrálii, Mexiku, Izraeli, Kanadě, Brazílii (<http://protalix.com/products/elelyso-taliglucerase-alfa.asp>; staženo 13.1.2016). Jedná se o vůbec první rekombinantní produkt na světě připravený pomocí rostlinného systému,

který byl schválený FDA pro léčbu lidí, což představuje významný mezník v oblasti molekulárního farmareni. Společnost SemBioSys Genetics Inc. má patentově chráněnou metodu heterologní produkce insulinu v rostlinných systémech. Princip metody spočívá ve fúzi insulinu s jednořetězcovou protilátkou a lze takto získat až více jak 0,1% rekombinantního produktu ze všech proteinů vyskytujících se v buňce (Moloney *et al.*, 2009). Tímto způsobem získaný rekombinantní insulin z rostliny *Carthamus tinctorius* je již komerčně dostupný na trhu. Společnost Arcadia Biosciences Inc. má zapatentovaný způsob produkce kyseliny gama-linolenové v zrnech rostliny *Carthamus tinctorius* za účelem produkce transgenní rostliny s vylepšenými vlastnostmi (Knauf *et al.*, 2007). Tato kyselina patří mezi omega-6 mastné kyseliny a její zdraví prospěšné vlastnosti můžeme porovnat s omega-3 mastnými kyselinami. V budoucnu by mohla být využívána pro výživu kojenců, léčbu atopického ekzému, dermatitidy, vysokého krevního tlaku nebo reumatoidní artritidy (<http://www.arcadiabio.com/technologies/nutritional-oils>, staženo 13.1.2016). Tabulka 1 přehledně shrnuje produkci vybraných patentově chráněných rekombinantních produktů s využitím rostlinných platforem.

Tab. 1 Vybrané patenty zaměřené na produkci ekonomicky uplatnitelných rekombinantních proteinů v rostlinných expresních systémech. TEP = total extracted proteins, TSP = total soluble proteins.

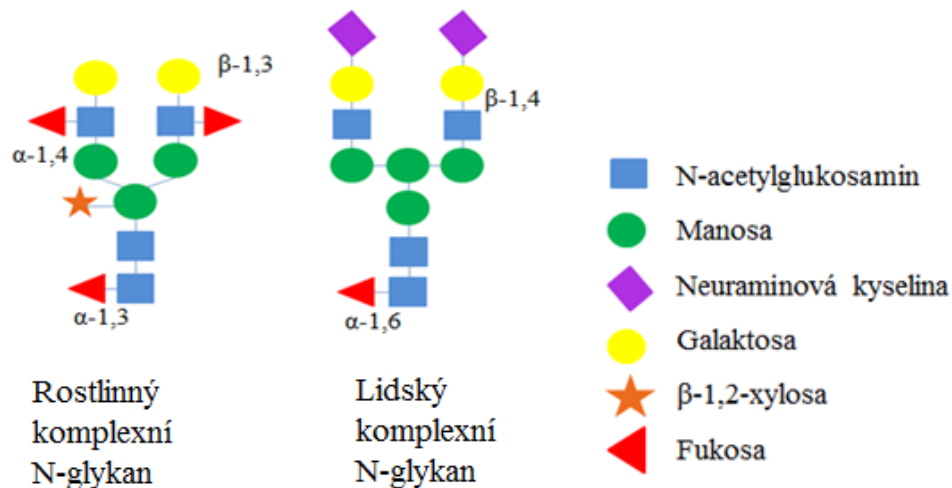
Produkt	Rostlina	Množství	Autoři, postupník patentu	Rok	Odkaz na patent (staženo 25.4.2016)
α -1-antitrypsin	ječmen, rýže	neuveďeno	Sutliff <i>et al.</i> Applied Phytologics Inc.	2000	http://www.google.com/patents/US6127145
Aprotinin	kukuřice	min. 0,1 % TEP	Baszczynski <i>et al.</i>	1998a	http://www.google.com/patents/US5824870
Avidin	kukuřice	min. 0,1 % TEP	Baszczynski <i>et al.</i>	1998b	http://www.google.com/patents/US5767379
Enzymy degradující lignocelulosu	alfa-alfa, tabák	neuveďeno	Austin- Phillips <i>et al.</i> Wisconsin Alumni Research foundation	1999	http://www.google.ch/patents/US5981835
Fytasa	tabák, řepka olejka	neuveďeno	van Ooijen <i>et al.</i>	2000	http://www.google.com/patents/US6022846
Chymosin	řepka olejka	min. 0,5 % proteinů zrna	van Rooijen <i>et al.</i> Sembiosys Genetics Inc.	2008	http://www.google.com/patents/US7390936
Trypsinogen	kanola, kukuřice	0,1 – 1% TSP	Howard a Hood, Prodigene Inc.	2000	http://www.google.com/patents/US6087558
Somatotropin	řepka olejka, tabák	neuveďeno	Moloney <i>et al.</i> Sembiosys Genetics Inc.	2001	http://www.google.com/patents/US6288304
Faktor GM-CSF	rýže	1,3 % TSP	Altosaar <i>et al.</i>	2007	http://www.google.com/patents/US7214862
β -glukuronidasa	kukuřice	min. 0,1 % TSP	Bruce <i>et al.</i> Prodigene Inc.	1998	http://www.google.ch/patents/US5804694

2.1.3 Charakteristika rostlinných produkčních systémů

Rostlinné bioreaktory se využívají pro produkci farmaceutických proteinů (Stahl *et al.*, 2002), protilátek (Stöger *et al.*, 2000), růstových regulátorů (Erlendsson *et al.*, 2010), vakcín (Floss *et al.*, 2009) či industriálních proteinů a enzymů (Horvath *et al.*, 2000; Schünmann *et al.*, 2002; Stahl *et al.*, 2009). Rostliny jsou schopny akumulovat ve svých pletivech proteinové produkty v poměrně velkém měřítku a navíc je jejich pěstování ekonomicky nenáročné a vstupní vklady minimální vzhledem k obrovskému množství biomasy. Při využití samosprašných rostlin je navíc eliminováno riziko úniku transgenu do okolních polí. Navíc nehrozí riziko kontaminace produktu živočišnými patogeny, jakými jsou viry, jež by mohly být škodlivými pro člověka. Purifikace cílového produktu je často jednodušší a levnější než například při využití bakterií (Demain a Vaishnav, 2009). Proces extrakce a purifikace navíc může být zcela obejit v případě přímé konzumace transgenního pletiva, jako je tomu u jedlých vakcín (Daniell *et al.*, 2001). Ty mají budoucnost především v rozvojových zemích, ve kterých lze v současnosti jen těžko zajistit celoplošné očkování obyvatel. Výzkumy zaměřené na přípravu jedlých vakcín využívají jako platformu pro produkci protilátek například banány, salát, rajčata nebo mrkev, neboť jsou vhodné pro přímou konzumaci bez nutnosti jejich předchozí tepelné úpravy. Velice slibnými expresními systémy jsou banány, jelikož ve vývojových zemích zpravidla rostou hojně, navíc jsou chutné a lehce stravitelné, což je ideální pro očkování malých dětí (Kumar *et al.*, 2005). Bramborové hlízy poskytují stabilní prostředí pro expresi, akumulaci a skladování rekombinantního produktu, ovšem před konzumací musí být tepelně upraveny, aby došlo ke zničení endotoxinů, což ale může také vést k nechtěné degradaci termolabilních rekombinantních proteinů (Sparrow *et al.*, 2007). Tabák poskytuje řadu výhod a je používán nejčastěji pro molekulární farmaření ve sklenících či uzavřených prostorech (Tremblay *et al.*, 2010). Jeho nevýhodou je přítomnost velkého množství nikotinu a dalších toxických alkaloidů, které musí být odstraněny během purifikace a není proto vhodný pro přímou konzumaci (Menassa *et al.*, 2001). Mnoho současných výzkumů z oblasti molekulárního farmaření se zaměřuje zejména na obilniny, jakými jsou rýže, kukuřice, ječmen nebo pšenice, a to z důvodu možnosti akumulace produktu v zrně (Schiellberg *et al.*, 2005).

Stejně jako živočichové představují i rostliny mnohobuněčné eukaryotní organismy a proces biosyntézy proteinů je u nich podobný procesu živočišné proteosyntézy, díky

čemuž jsou schopny poskládat protein do finální podoby včetně posttranslačních modifikací, jakými jsou glykosylace, tvorba disulfidových vazeb, fosforylace kinasami nebo odštěpení specifické signální sekvence, které jsou nezbytné pro správnou funkci a stabilitu rekombinantního proteinu (Fischer *et al.*, 2004a). Více jak 50% eukaryotních proteinů představují glykoproteiny (Apweiler *et al.*, 1999) a přibližně jedna třetina schválených biofarmaceutik je tvořena glykoproteiny (Walsh a Jefferis, 2006). Stejně jako u ostatních eukaryot, i v rostlinných buňkách začíná N-glykosylace v endoplasmatickém retikulu prostřednictvím ko- nebo post-translačního transferu oligosacharidového prekurzoru na specifická residua asparaginu. Poté je N-glykoprotein transportován sekreční dráhou, přičemž dochází k odštěpení glukosových a manosových molekul za vzniku manosového typu N-glykanu, popřípadě může dojít k navázání nových cukrových jednotek za vzniku komplexního typu N-glykanu. Zatímco glykoproteiny manosového typu mají stejnou strukturu u rostlin i u savců, rostlinné glykoproteiny komplexního charakteru se strukturně odlišují od živočišných, což má za následek vyvolání imunitní odpovědi u savců (Obr. 1). Aby tomu bylo zabráněno, je potřeba zabezpečit lidský model N-glykosylace proteinů, kdy je k N-konci proteinu připojena α -1,6-fukosa, glukosa a zbytek kyseliny sialové. K tomu již bylo vyvinuto několik různých strategií (Gomord *et al.*, 2010), přičemž jednu z nich představuje využití C-koncové ER specifické H/KDEL sekvence. Proteiny vyskytující se v endoplasmatickém retikulu totiž obsahují glykany manosového typu a tudíž nejsou pro člověka imunogenní.



Obr. 1 Rozdíl mezi rostlinným a lidským N-glykanem komplexního typu (převzato a upraveno podle Véniza *et al.*, 2009).

Takaiwa *et al.* (2007) a Takagi *et al.* (2005) navíc uvádějí, že KDEL sekvence stabilizuje rekombinantní protein a zvyšuje tak jeho výnosy. Druhou úspěšnou taktikou je inaktivace nebo umlčování genů kódujících rostlinné glykosyltransferasy, což vede ke snížení jejich aktivity nebo jejich úplné inhibici. Tyto tzv. „knockout“ strategie zabráňují přidávání nežádoucích cukerných residuí. Tenhle způsob strategie zabezpečení glykosylace lidského typu byl úspěšně proveden u řas rodu *Physcomitrella patens*, a taky u rostlin *Arabidopsis thaliana* (Strasser *et al.*, 2004). V případě *P. patens* se podařilo připravit transgenní linie, které produkovaly lidský vaskulární endotelový růstový faktor VEGF₁₂₁, a to bez navázaných rostlinných cukerných residuí (1,3-fukosy a 1,2-xylosy). Rekombinantní řasa měla totiž knockoutované geny pro α -1,3-fukosyltransferasu a β -1,2-xylosyltransferasu, přičemž její fenotyp se nezměnil (Koprivova *et al.*, 2004). Protilátky produkované s využitím rostlinných expresních systémů ovšem neobsahují pouze rostlinná cukerná residua, ale mohou také obsahovat jeden až dva Lewisovy glykoepitopy (Le^a; Petruccelli *et al.*, 2006), které se nacházejí pouze u přirozeně se vyskytujících extracelulárních glykoproteinů a rekombinantních glykoproteinů obsahujících sekreční signální sekvenci do apoplastu. Tenhle epitop trisacharidů byl původně popsán jako determinant lidského antigenního systému krevních skupin A, B, 0. Přítomnost těchto Le^a-specifických protilátek u farmaceutik produkovaných v rostlině je nežádoucí, jelikož jsou pro člověka imunogenní a mohou

způsobit hemolytickou reakci (Poole a Daniels, 2007). Dalším způsobem je strategie „knockin“. Principem je substituce určité části DNA sekvence požadovaným genem nebo skupinou genů. V případě humanizace rostlinně produkovaných farmaceutik jde hlavně o geny specifických heterologních glykosyltransferas, které jsou zodpovědné za přidávání β -1,4-galaktosy a zbytku kyseliny sialové k N-glykanům. Kyselina sialová má pozitivní vliv na stabilitu vzniklých glykoproteinů, například rekombinantní erythropoetin s navázanou kyselinou sialovou měl poločas rozpadu 5-6 hodin, zatímco jeho varianta bez navázané kyseliny sialové jen 2 minuty (Erbayraktar *et al.*, 2003). Véniza *et al.* demonstrovali úspěšnost této strategie v roce 2009, kdy se jim podařilo v listech tabáku (*N.benthamiana*) vyprodukovat C5-1 protilátku lidského typu N-glykanu, přičemž dosáhli výnosů až 1,5 g na kilogram čerstvého materiálu.

Existuje celá řada rostlinných produkčních platforem a je třeba vždy pečlivě zvážit výběr konkrétního expresního systému a v případě využití celých rostlin také výběr cílového pletiva. Přestože při produkci rekombinantního proteinu ve vegetativních orgánech jako například listech, kořenech či stoncích může dojít k ovlivnění růstu a vývoje rostliny (Obembe *et al.*, 2011), používá se poměrně často UBI-1 promotor získaný z kukuřice, který zabezpečuje expresi daného genu ve všech metabolicky aktivních rostlinných pletivech (Muhitch *et al.*, 1998). Rostliny produkující rekombinantní protein v listech mají obecně problém s udržení jeho stability. Listy musí být ihned po odebrání vysušeny nebo zmrazeny, aby nedošlo k degradaci produktu (Fischer *et al.*, 2004a). Naopak zrnově specifická exprese má zpravidla minimální vliv na růst a vývoj rostliny a také není nutné zamražení nebo vysušení zrna před purifikací produktu, jelikož samo zrno poskytuje ideální prostředí pro skladování rekombinantního proteinu při laboratorní teplotě bez ztráty biologické aktivity (Stöger *et al.*, 2002; Nochi *et al.*, 2007). Krom výběru vhodného pletiva je také důležité vhodné subcelulární zacílení proteinu. Nevhodné subcelulární zacílení může mít negativní dopad na růst a vývoj rostliny. Například akumulace rekombinantního proteinu v cytosolu může negativně ovlivnit růst a vývoj rostliny, nebo dokonce působit toxicky, zatímco akumulace téhož proteinu v chloroplastu nebo v zásobní vakuole nemusí mít žádný vliv na fenotyp téže rostliny (Mavituna *et al.*, 2005).

Jednou ze strategií jak získat velké množství rekombinantního proteinu v rostlině je využití virálních vektorů. V současnosti jsou k dispozici virální vektory první a druhé generace. Virální vektory první generace využívaly celý genom viru a také gen kódující

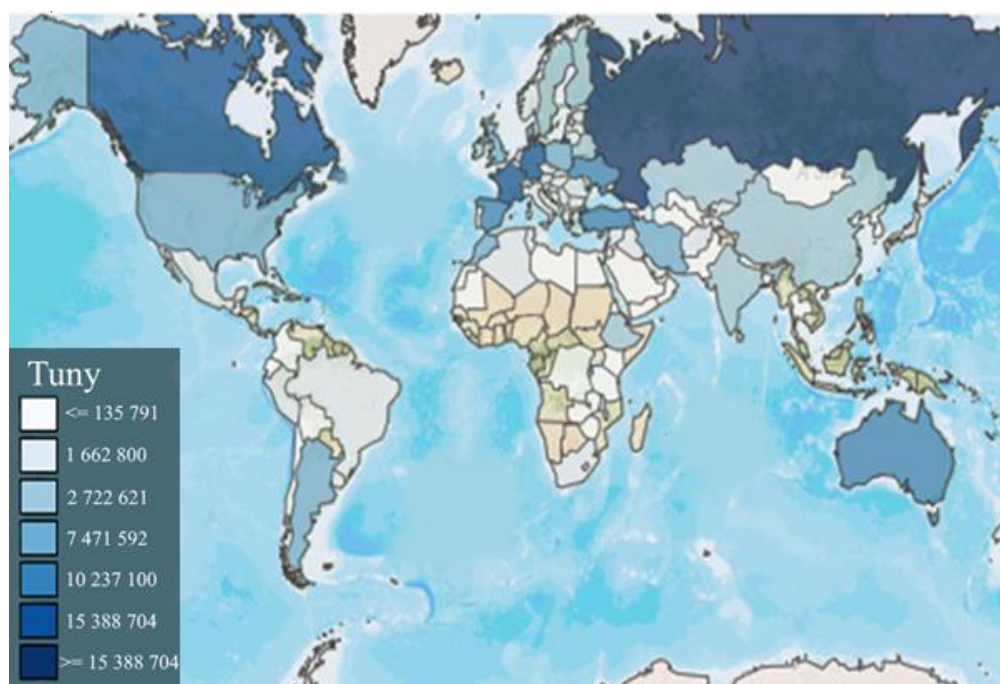
požadovaný protein. Protein byl exprimován pod silným virálním promotorem. Následně byly rostliny ošetřené *A. tumefaciens* nesoucí příslušný virální vektor a přibližně do dvou týdnů byla všechna pletiva rostliny infikována. Jelikož se při této metodě používal geneticky upravený vir, nebyla metoda úplně vhodná pro produkci industriálně a farmaceuticky použitelných látek. Druhá generace virálních vektorů přinesla změnu v podobě využití nekompletního virového genomu, přičemž chybějící části byly nahrazeny nevirovými komponentami (Gleba *et al.*, 2007). Tento způsob produkce rekombinantních proteinů se vyznačuje vysokou účinností, protože je možné získat až miligramy produktu na gram pletiva v poměrně krátkém časovém měřítku.

Pomocí virálních vektorů byl v roce 2000 produkován antimikrobiální peptid WT1 z rodiny defensinů v tabáku. Peptid vykazoval biologickou aktivitu vůči houbě *Magnaporthe grisea* i *Botrytis cinerea* a o něco méně aktivní byl i vůči bakteriálnímu fytopatogenu *Pseudomonas cichorii* (Saitoh *et al.*, 2001). Poměrně novým způsobem doručení genetické informace do rostlin je metoda tzv. magnifekce (Marillonnet *et al.*, 2005), při které se rostliny infikují ponořením listů do bakteriální suspenze *A. tumefaciens*, které je následováno použitím slabého vakua po dobu 10-30 sekund. V současnosti se tato metoda používá pro produkci plně funkčních proteinů a má ji patentově chráněnou společnost Icon Genetics pod komerčním názvem magnICON®. Zmiňovaná společnost deklaruje výnosy až 5 mg rekombinantního proteinu na gram čerstvých listů, nebo také 80% rekombinantního proteinu z celkových rozpustných proteinů (http://www.icongenetics.com/html/tech4_1.htm, staženo 20.4.2016). Touto metodou byl již produkován například lidský růstový hormon somatotropin v množství 1 mg.g⁻¹ čerstvých listů tabáku, který představoval 10% z celkových rozpustných proteinů (Gils *et al.*, 2005). Dále byly tímto způsobem připraveny dva rozličné antigeny (F1 a V) z organismu *Yersinia pestis*, který je původcem moru, nebo například fúzní protein F1-V, a to v množství 1-2 mg na gram čerstvých listů tabáku. Fúzní protein totiž poskytuje vysoký titr a zabezpečuje dlouhotrvající tvorbu protilátek proti moru. Použití těchto antigenů prokázalo v klinických studiích prováděných na pokusných zvířatech slibný potenciál využití v podobě přípravy vakcín (Santi *et al.*, 2006). V roce 2006 byla dále publikována produkce antigenu tuberkulózy Ag85B v množství minimálně 0,8 mg na gram čerstvých listů (Dorokhov *et al.*, 2006). Mnichovský institut rostlinné patologie se zaměřuje na produkci antimikrobiálních peptidů za využití technologie magnICON® (<https://www.helmholtz-muenchen.de/biop/research-groups-units/redox-signalling-and->

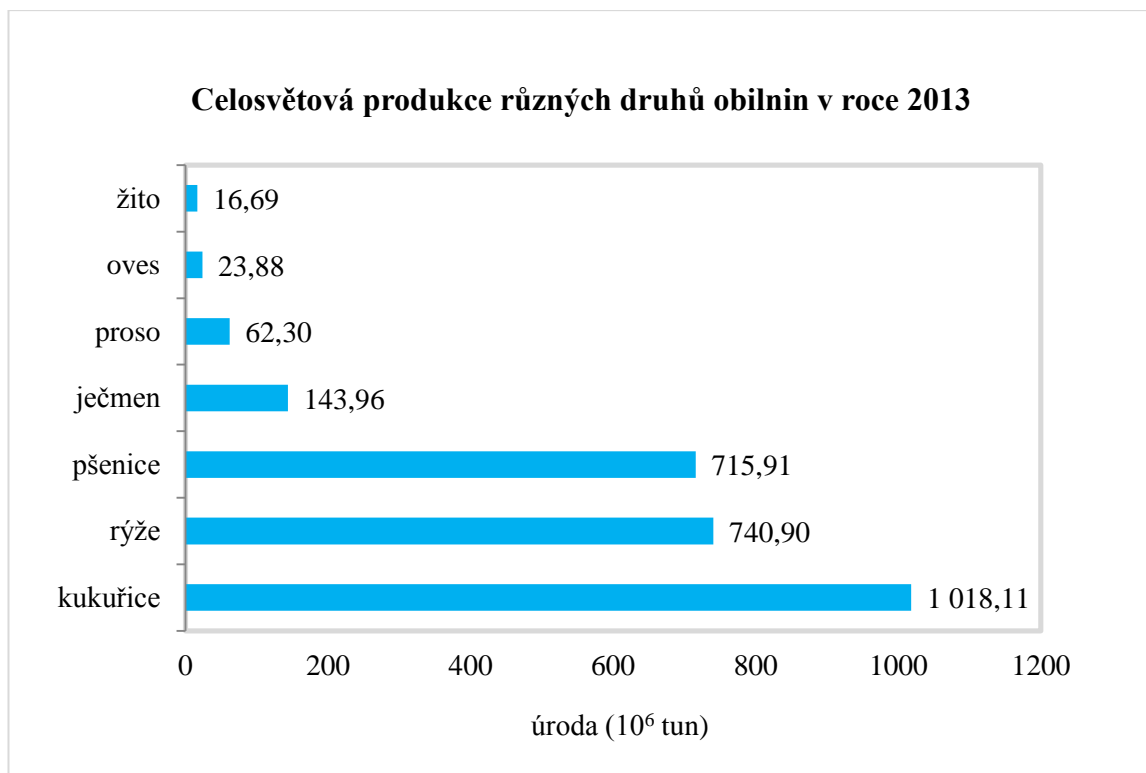
antimicrobial-peptides/antimicrobial-peptides-molecular-farming/index.html, staženo 20.4.2016).

2.1.4 Obilniny

Obilniny představují významné kulturní rostliny pěstované téměř na celém světě. Botanicky se řadí mezi vyšší krytosemenné (angiospermické), jednoděložné (monocotyledonae) rostliny, řádu lipnicotvaré (*poales*), čeleď lipnicovité (*Graminae*), přičemž čeleď lipnicovitých má dále několik podčeledí (Novák a Skalický, 2008). Za nejstarší obiloviny jsou považovány pšenice a ječmen, které dodnes patří mezi velice rozšířené kulturní plodiny pěstované v různých koutech světa (převážně v oblastech mírného pásma), a to kvůli svému zrnu – obilce, které bývá zpracováváno za nejrůznějšími účely, jakými jsou například výroba jídla a krmení, alkoholu nebo steliva (Novák a Skalický, 2008). Jenom v roce 2013 byla celosvětová produkce obilnin dle organizace pro výživu a polnohospodářství – FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) téměř 3 miliardy tůn (<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>, staženo 25.3.2016). Vzhledem k tomu, že se obilniny pěstují téměř po celém světě (Obr. 2), je jejich adaptabilita na nejrůznější klimatické podmínky velice dobrá (Novák a Skalický, 2008). Nejhojněji pěstovanou obilninou v roce 2013 byla kukuřice a mezi prvních pět patřili také rýže, pšenice, ječmen a proso (Obr. 3).



Obr. 2 Celosvětová produkce ječmene v různých oblastech světa (převzato a upraveno podle <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>, 25.3.2016).



Obr. 3 Celosvětová produkce jednotlivých obilnin v roce 2013 (převzato a upraveno podle <http://www.statista.com/statistics/263977/world-grain-production-by-type/>, 25.3.2016).

Obilniny jsou čím dál častěji vyžívány pro účely molekulárního farmaření. Jedním z důvodů je jejich GRAS (generally recognized as safe) status udělený organizací FDA, což značí, že jsou všeobecně považované za bezpečné. Nejvýznamnějšími zástupci z hlediska molekulárního farmaření jsou rýže (*Oryza sativa*), kukuřice (*Zea mays*), ječmen (*Hordeum vulgare*) a pšenice (*Triticum aestivum*). Z krmných plodin poskytuje kukuřice největší výnosy biomasy, je snadno geneticky manipulovatelná, velice snadno roste (Fischer *et al.*, 2004b; Goldstein *et al.*, 2004) a má nejkratší generační čas. I proto byla pravděpodobně zvolena jako expresní systém pro produkci prvního rekombinantního proteinu avidinu (Hood *et al.*, 1997). Pěstování kukuřice je z ekonomického hlediska nenáročné. Její zrna je větší než například zrna ječmene nebo pšenice, z 82% je tvořeno endospermem (Watson, 1987), což je místo, kam je zacílena většina rekombinantních produktů (Twyman *et al.*, 2003). Zrna je chráněna strukem a několika vrstvami listů, čili i při nepříznivějším počasí nedojde k jeho oddělení od klasu a případným ztrátám produktu. Uvedené struktury navíc chrání zrna před působením patogenů (Sparrow *et al.*, 2007). Kukuřice obsahuje jen malé množství toxických látek a je tedy vhodná i pro produkci jedlých vakcín (Ramessar *et al.*, 2008). Kukuřici jako

platformu pro produkci proteinu avidinu a trypsinu využívala firma Prodigene Inc. Kukuřice byla také využita v roce 2011 pro produkci protilátky proti HIV, a to v rámci projektu Pharma-Planta Consortium (<http://www.pharma-planta.net/index.php?pg=50>, staženo 13.1.2016). Nevýhodou kukuřice avšak je, že se jedná o cizosprašnou rostlinu, čili hrozí riziko kontaminace okolních polí. Rýže je na rozdíl od kukuřice samosprašná, a tedy je eliminováno riziko kontaminace okolitých polí a endosperm tvoří více jak 90% váhy zrna (Takaiwa *et al.*, 2007). Popřední výhodou rýže je známá sekvence jejího genomu, což velice usnadňuje genetickou manipulaci (Goff *et al.*, 2002). Jako produkční platformu ji využívá společnost Ventria Bioscience Inc. a na trhu má dostupných již osm rekombinantních produktů pro nefarmaceutické účely, mezi něž patří například laktoferin a lysozym (<http://www.ventria.com/>, staženo 13.1.2016). Pšenice se jako expresní systém pro produkci rekombinantních proteinů nevyužívá v takové míře jako výše zmiňované rostliny. Jedním z důvodů jsou nižší výnosy této obilniny. Doposud bylo produkováno v pšenici jen malé množství proteinů a jejich finální koncentrace v zrně byla velice nízká. Výjimku představuje protein pea legumin (hráškový legumin), který se podařilo akumulovat ve velkém množství. U transgenní linie, která akumulovala protein v nejvyšší míře, bylo detekováno až 500 µg produktu na gram suché váhy, což odpovídalo 1,5 % celkových rozpustných proteinů. Nejvyšší množství rekombinantního leguminu bylo dosaženo v liniích, které exprimovali produkt v endospermu (Stöger *et al.*, 2001). Ječmen se využívá častěji než pšenice a to především díky jeho snadnější genetické manipulovatelnosti. Na rozdíl od hexaploidní pšenice má totiž jednodušší diploidní genom a navíc je, stejně jako pšenice, samosprašný. Pěstování ječmene je poměrně levné a navíc je ječmen schopen akumulovat rekombinantní produkty v zrně v poměrně velké míře (Schünmann *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 2003).

2.1.5 Ječmen

Bylo popsáno 25 planých druhů ječmene a jeden druh kulturní tzv. ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) Ječmen setý patří mezi čtyři nejhojněji pěstované obilniny na světě. V roce 2013 byla jeho celosvětová produkce téměř 1,5 miliardy tun, přičemž největší podíl na jeho produkci měla Ruská federace (<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>, staženo 23.4.2016). Pěstuje se téměř všude na světě, včetně polárního kruhu a nadmořských výškách 4000 metrů. Ječmen se pěstuje

jako jednoletá jarní nebo ozimá obilnina.

Jarní ječmen se využívá zejména pro výrobu sladu, zatímco ozimý ječmen je využíván především pro krmné účely. Nároky ječmene na teplotu a vláhu nejsou velké, je schopen se poměrně dobře adaptovat na různé teploty i nedostatek vody. Důležité je však pH půdy, které by mělo být v rozmezí 6,2 – 7,2 a také kvalita půdy, jelikož jeho kořenový systém dosahuje pouze přibližně 30 cm. Vzhledem ke krátké vegetační době, slabému kořenovému systému a malé ploše listů je ječmen velice náchylný k různým druhům stresu vyvolaných napadením jak viry, tak i bakteriemi či i houbami, které jsou příčinou celé řady onemocnění nechvalně se podepisujících každoročně na úrodách (Novák a Skalický, 2008). Bakteriální nemoci ječmene jsou způsobeny hlavně bakteriemi rodu *Pseudomonas*, které způsobují hnědnutí špiček obilek. Z houbových onemocnění se jedná hlavně o různé typy skvrnitostí způsobených houbami rodu *Erysiphe* (*Blumeria*), *Puccinia*, *Pyrenophora*, *Rhynchosporium* a *Ramularia*. Nejvíce se vyskytující nemocí u jarního ječmene je padlí travní. Existují odrůdy nesoucí gen odolnosti *mlo*, ovšem jednotlivé odrůdy vykazují různé stupně odolnosti a zcela odolná odrůda neexistuje. Na listech ječmene se ke konci vegetačního období mohou vyskytovat výtrusy, které jsou tvořené patogenními houbami. Toto onemocnění je známo jako rez ječná a úplně rezistentní odrůda taky zatím není známa. Výskyt hub rodu *Fusarium* snižuje výnosy a kvalitu zrna. To totiž následně obsahuje vysoké koncentrace mykotoxinu deoxynivalenolu (DON), což je nežádoucí hlavně pro sladovnícky průmysl, jelikož způsobuje vyšší pění piva. Z nemocí virového původu se jedná například o ječmenný mozaikový virus, bromovirus nebo žlutý dwarf virus (<http://uroda.cz/choroby-jarniho-jecmene-a-ochrana-proti-nim/>, staženo 24.4.2016).

V současné době je ochrana proti výše zmiňovaným chorobám založena především na užívání nejrůznějších agrochemikálií včetně klasických antibiotik, fungicidů a pesticidů, jež ale mohou mít negativní dopad na lidské zdraví a životní prostředí. Navíc často dochází ke snížení jejich účinku v důsledku vytvoření rezistentních populací mikroorganismů (Sadashiv a Kaliwal, 2016). Z toho důvodu představují nové technologie založené na genetické manipulaci velice slibnou strategii ochrany rostlin před škůdci, jež by mohla vést k výraznému snížení množství chemikálií užívaných v zemědělství, což by mohlo být oceněno nejen ekology, ale i budoucími uživateli rostlinných produktů. Existuje poměrně účinná technologie stabilní transgenoze ječmene, která je založena na infekci nezralých poraněných embryí pomocí

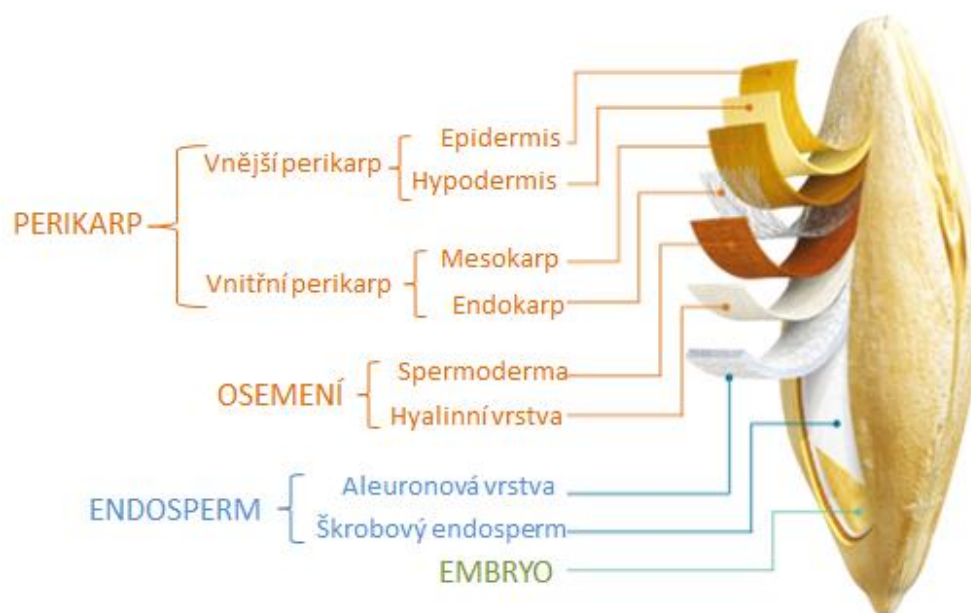
supervirulentních kmenů *A. tumefaciens* nesoucích příslušnou genetickou informaci, jež má být integrována do genomu hostitelské rostliny (Harwood *et al.*, 2009). Byla již publikována celá řada studií zaměřených na transfekci ječmene za účelem zvýšení jeho odolnosti vůči patogenním organismům. Zpravidla se jednalo o produkci proteinu/peptidu vykazujícím určitou antimikrobiální aktivitu vůči cílenému fytopatogenu. Horvath *et al.* připravili v roce 2003 transgenní ječmen nesoucí gen *RPG1* původem z rezistentního kultivaru Morex, který je odolný vůči houbě rodu *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Transgenní rostliny ječmene následně vykazovaly po inokulaci zvýšenou rezistencí vůči této houbě (Horvath *et al.*, 2003). V roce 2009 byl publikován článek, který popisoval produkci transgenního ječmene se zvýšenou rezistencí vůči houbě *Fusarium graminearum*. Transgenní ječmen obsahoval gen pro expresi zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) spojeného s proteinem BAX inhibitor-1, který reguluje buněčnou smrt, a to všechno pod kontrolou silného konstitutivního promotoru. Mladé transgenní rostliny byly méně citlivé vůči infekci houbou *F. graminearum*, nedošlo k ovlivnění růstu kořenů rostlin, jejichž morfologii houba obvykle negativně ovlivňuje a kořeny nezměnily ani barvu v porovnání se zdravou rostlinou, zatímco kořeny netransgenního ječmene byly zbarvené do hněda (Babaeizad *et al.*, 2009). Co se týče virů, typickým virem napadajícím ječmen je ječmenný žlutý mosaikový virus (BaYMV), který je přenášen patogenním organismem *Polymyxa graminis*. Mezi příznaky infekce patří žloutnutí listů a tvorba mozaikových fleků na mladých listech rostlin, co může vést až k jejich nekróze. V roce 2005 Stein *et al.* zjistili, že *Hv-eIF4E* gen kódující eukaryotní translační iniciační faktor E4 hraje důležitou roli v průběhu infekce. Stabilní transformace rezistentního genotypu ječmene pomocí fragmentu nebo celého genu *Hv-eIF4E* odvozeného z nerezentního kultivaru vedla k zvýšení citlivosti vůči danému viru (Stein *et al.*, 2005). Dalším častým cílem genetické modifikace ječmene je zvýšení jeho tolerance vůči abiotickému stresu, který, stejně jako stres biotický, negativně ovlivňuje výnosy a může být zapříčiněn například vysokou salinitou, suchem či příliš vysokou anebo nízkou teplotou. Byly již připraveny transgenní linie ječmene poskytující například vyšší výnosy zrna. V roce 2010 publikoval Zalewski *et al.* produkci transgenního ječmene s umlčeným genem *HvCKX1* kódující cytokinin dehydrogenasu, a to pomocí metody RNA ineterference. Celkové výnosy zrna byly následně přibližně o 20% vyšší (Zalewski *et al.*, 2010). Také již byly připraveny transgenní linie ječmene poskytující lepší kvalitu zrna. V roce 2011 byl

geneticky modifikován ječmen genem *CslF*, který reguluje biosyntézu β -glukanů. Transgenní rostliny produkovaly v zrně až o 80% víc β -glukanů oproti kontrolním netransgenním rostlinám. Zvýšený obsah těchto sloučenin v ječmenném zrně může být prospěšný pro lidi, jelikož β -glukany jsou schopny redukovat vznik obesity, kolorektálního karcinomu a také snižují hladinu cholesterolu v krvi (Burton *et al.*, 2011). Dále byly připraveny transgenní linie ječmene s vyšším obsahem minerálních látek jako například zinku a železa (Ramesh *et al.*, 2004), nebo se zvýšenou produkcí aminokyselin lysinu a threoninu (Ohnoutková *et al.*, 2012), či větším kořenovým systémem a tedy i vyšší odolností vůči suchu. V roce 2011 byl připraven transgenní ječmen nesoucí geny pro transkripční faktor DREB/CBFs, které byly původem z pšenice. Zmiňovaný transkripční faktor reguluje aktivitu genů odpovědných za snášení abiotického stresu způsobeného suchem. Transgenní rostliny s konstitutivním promotrem byli odolnější vůči nedostatku vody, ovšem jejich fenotyp byl výrazně pozměněn na rozdíl od kontrolních rostlin. Při použití indukibilního promotoru z kukuřice seté, jehož aktivita byla indukována suchem, byly rostliny odolné vůči nedostatku vody, a to beze změny fenotypu (Morran *et al.*, 2011). V roce 2012 byl v ječmeni exprimován transkripční faktor OsMYB4, přičemž exprese genu byla řízena chladem indukovatelným promotorem. Transgenní rostliny byly schopny klíčit a růst při nepříznivých podmínkách způsobených nízkými teplotami (Soltész *et al.*, 2012). V roce 2013 byl připraven transgenní ječmen nesoucí gen *AtCIPK16* přirozeně se nacházející v genomu rostliny *Arabidopsis thaliana*. GMO rostliny byly schopny dlouhodobě přežít (30 dní) v prostředí s vysokou salinitou, které bylo navozeno 300 mmol.l⁻¹ roztokem chloridu sodného (Roy *et al.*, 2013).

V současné době je však čím dál častěji předmětem zájmu nejrůznějších vědeckých skupin využití ječmene coby bioreaktoru pro produkci rekombinantních proteinů, jakými jsou třeba industriální proteiny, enzymy, protilátky, či růstové regulátory, které posléze mohou nalézt uplatnění například jako terapeutika nebo reagenty ve výzkumu či průmyslu. Atraktivním pletivem pro produkci rekombinantního proteinu v rostlině je právě obilka, a to díky její morfologii (Obr. 4) a biochemickým vlastnostem. Ječmenná obilka je složena z obalů, endospermu a embrya. Endosperm tvoří většinu obsahu zrna, první vrstvou endospermu je aleuronová vrstva, která obsahuje proteinová tělíska, tuky a škrobová tělíska. Vnitřní vrstva endospermu je tvořena hlavně škrobem (<http://maltingandbrewing.com/composition-of-barley-kernels.html>, staženo 21.2.2016).

Z chemického hlediska je obilka složena ze sacharidů, proteinů, minerálů a fytohormonů, přičemž většinu zralého zrna tvoří sacharidy (MacGregor a Fincher, 1993), které jsou zastoupeny škrobem ve formě škrobových tělísek v endospermu zrna. Druhou nejhojněji zastoupenou skupinou molekul ve zralém zrně jsou proteiny, které se rovněž vyskytují převážně v endospermu (Henry, 1988). V roce 1895 zavedl pan Osborn členění ječmenných proteinů do čtyř skupin na základě jejich rozpustnosti v různých rozpouštědlech na albuminy, globuliny, prolaminy a gluteliny (Osborn, 1895). Obilka poskytuje optimální prostředí pro uchovávání produktu po dlouhou dobu při laboratorní teplotě, a to díky možnosti zrna přejít do stádia dormance, či už vynucené, nebo přirozené.

Zrající obilka obsahuje velké množství inhibitorů proteas, například Bowman-Birkův typ inhibitorů (BBBI), α -amylasový/subtilisinový inhibitor (BASI), chymotrypsinový inhibitor 2 (CI-2) a CM protein, které se mimo jiné účastní procesu dormance. Díky tomu není nutná dodatečná úprava zrna obsahujícího rekombinantní produkt (Boothe *et al.*, 2010). V obilce je krom nízkého obsahu proteas také nízký obsah sekundárních metabolitů jakými jsou fenolické látky, alkaloidy nebo kyselina oxalová, které znesnadňují proces izolace proteinů. Zralá obilka obsahuje celý soubor molekul, které zabezpečují správné skládání proteinů, což je nezbytné pro jejich správnou funkci a aktivitu (Müntz, 1998).



Obr. 4 Stavba ječmenné obilky (převzato a upraveno podle <http://maltingandbrewing.com/composition-of-barley-kernels.html>, staženo 21.2.2016).

2.1.5.1 Látky produkované v ječmeni za účelem molekulárního farmaření

V roce 2000 Horvath *et al.* produkovali termostabilní (1,3-1,4)- β -glukanasu v endospermu nezralého ječmenného zrna pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tento enzym zabezpečuje depolymerizaci β -glukanů obsažených v buněčné stěně endospermu, aby následně mohly proteasy a α -amylasy rozštěpit škrob na cukry a aminokyseliny, které nezbytné pro klíčící rostliny jako zásobní látky. Díky vysokému obsahu zmiňovaných β -glukanů je ječmen považován za nízkoenergetický zdroj potravy. Zvýšená termostabilita rekombinantního enzymu je výhodnou vlastností pro zpracování zrna jako je například pasterizace, která se provádí za účelem zabránění kontaminace bakterií *Salmonella typhimurium*. Tento transgenní ječmen může být využit jako vysokoenergetické krmivo hospodářských zvířat (Horvath *et al.*, 2000). V roce 2002 Schunmann *et al.* publikovali práci popisující úspěšnou produkci plně funkčního rekombinantního proteinu vzniklého fúzí syntetického antiglykophorinu s epitopem HIV viru, který je schopen detekovat přítomnost HIV-1 viru v lidské krvi a

může tak nahradit doposud k tomuto účelu používaný finančně nákladný reagent SimpliRED™, jehož laboratorní příprava je velice náročná, neboť zahrnuje chemické modifikace polyklonální na monoklonální protilátku. Protein byl exprimován v listech tabáku, bramborových hlízách a ječmenném zrně. Ve všech pletivech se rekombinantní protein akumuloval v množství od 40-150 µg na gram pletiva. Jelikož ječmenné zrno poskytuje ideální prostředí pro skladování rekombinantního proteinu po relativně dlouhou dobu při pokojové teplotě, jeho produkce je ekonomicky nenáročná a také neobsahuje alkaloidy jako např. tabák, byl autory vyhodnocen jako nejvhodnější platforma. Jedná se o pravděpodobně první rekombinantní fúzní protein produkovaný v transgenním ječmeni, který může být přímo využit v diagnostickém průmyslu. (Schunmann *et al.*, 2002). Stahl *et al.* v roce 2002 připravili transgenní ječmen s vektorem obsahujícím geny pro produkci lidského antitrombinu III, α1-antitrypsinu, lysozymu, sérového albuminu a laktoferinu (Stahl *et al.*, 2002). Rok poté Xue *et al.* produkovali enzym celulasu ve vyvíjejícím se ječmenném endospermu. Enzym tvořil 1,5% obsahu z celkových proteinů zrna (Xue *et al.*, 2003). Ječmen byl také využit jako hostitelská rostlina pro moderní produkci jedlých vakcín určených pro hospodářská zvířata, a sice pro telata, která po odstavení trpí průjmem způsobeným především F4-positivním enterotoxickým kmenem bakterie *Escherichia coli*. F4 vlákno se skládá z velké (FaeG) a několika malých podjednotek a umožňuje mikroorganismům navázání na F4-specifické receptory enterocytů vedoucí ke kolonizaci střeva, což má za následek průjem. Glykosylovaný FaeG fragment produkovaný v transgenním ječmeni byl odolný vůči působení uměle připravených žaludečních šťáv. Navíc vedl ke tvorbě protilátek u myši imunizovaných extrakty z transgenních zrn ječmene, které obsahovaly glykosylovanou podjednotku FaeG. Jelikož byla koncentrace rekombinantního produktu v transgenním zrně poměrně vysoká, jeví se tato strategie jako vhodná pro praktickou aplikaci (Joensuu *et al.*, 2006). Wilhelmson a jeho tým v roce 2007 připravili geneticky modifikovaný ječmen, a to vložením *VHB* genu kódujícím homodimerní hemoglobin přirozeně se vyskytující u G- bakterií rodu *Vitreoscilla*. Hemoglobin zmiňované bakterie je schopen zvyšovat intracelulární koncentraci kyslíku, což může být prospěšné u rostlin během energeticky náročných procesů, jakými jsou klíčení a růst, protože vyžadují dostatečnou koncentraci kyslíku. Kořeny transgenního ječmene rostoucího v prostředí s nedostatkem kyslíku vykazovaly zvýšení aktivity alkoholdehydrogenasy vzhledem ke kontrolním netransgenním rostlinám, což značí, že by tyto rostliny mohly

být méně náchylné na kyslíkovou deficienci. Na druhou stranu ale produkce VHB proteinu neovlivnila pozitivně klíčení zrn a v některých případech bylo klíčení dokonce inhibováno a navíc autoři pozorovali omezený růst kořenů. Klíčení zrn a formování kořenů jsou totiž pravděpodobně závislé také na hladině endogenní signální molekuly NO (Wilhelmson *et al.*, 2007). V roce 2009 Stahl, Luhrs a Dargatz patentovali metodu produkce a purifikace rekombinantního thaumatinu v ječmeni, pomocí které lze získat více jak 2 g rekombinantního produktu na 1 kg zrna (Stahl *et al.*, 2009). Thaumatin je sladidlo vyskytující se přirozeně v ovoci *Thaumatococcus daniellii* a je 200 až 3000krát sladší než sacharosa. Z toho důvodu se používá pouze ve velmi malých dávkách, ve kterých je jeho kalorická hodnota zanedbatelná, což představuje výraznou pomoc v boji proti populačním nemocem spojeným s obezitou. Thaumatin byl testován organizacemi EFSA (European Food Safety Authority) i JEFCA (Joint Expert Committee on Food Additives of the FAO/WHO), také získal status GRAS a jeho používání je povoleno v Evropské unii, USA, Kanadě, Jižní Africe, Japonsku, Austrálii a v mnohých dalších krajínách. V minulosti se i několik dalších vědeckých skupin zaměřovalo na produkci thaumatin metodami molekulárního farmaření za využití bakteriálních i kvasinkových expresních systémů nebo rostlin jakými jsou okurky, brambory, hrách, rajče nebo tabák. Ve všech případech však byla koncentrace rekombinantního produktu velice nízká. Výjimkou byla heterologní produkce thaumatinu v tabáku, jehož použití jako produkční platformy s sebou nese mnohem více nevýhod nežli je tomu u ječmene. V roce 2010 byl produkován v ječmenném zrně lidský růstový faktor FLT3 ligand, který přirozeně stimuluje proliferaci a diferenciaci krevních buněk. Protein získaný rekombinantní technologií za využitím ječmenného expresního systému se akumuloval přibližně ve stejném množství jako protein, pro jehož produkci byl využit bakteriální expresní systém. Protein byl posttranslačně glykosylován a jeho biologická aktivita byla srovnatelná s aktivitou komerčního růstového faktoru (Erlendsson *et al.*, 2010). Ječmen jako platformu pro komerční produkci nejrůznějších na trhu uplatnitelných látek využívá firma Maltagen, ORF Genetics a Ventria Bioscience Inc. (Ramessar *et al.*, 2008). ORF Genetics úspěšně produkuje terapeutické proteiny - lidské růstové faktory a cytokiny v endospermu ječmenného zrna, které jsou dostupné pod komerčním názvem ISOkine™ a DERMOkine™ (<http://orfgenerics.com/ISOkine/ProductList/>; staženo 13.1.2016). Ventria Bioscience produkuje laktoferin a lysozym rovněž

s využitím ječmene (<http://www.ventria.com/component/content/article/13-bioreagents/51-products>; staženo 13.1.2016).

2.2 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMPs) představují látky s velkým potenciálem praktického využití ve farmaceutickém a zemědělském průmyslu. Tyto peptidy lze heterologně vyprodukovat v rostlinných expresních systémech, a to bez ztráty antimikrobiální aktivity. AMPs jsou malé molekuly tvořené 5-100 aminokyselinami, které jsou součástí vrozené imunity naprosté většiny organismů, respektive byly nalezeny u všech organismů, u nichž se doposud přítomnost AMPs testovala. V současnosti bylo popsáno více jak 5000 antimikrobiálních peptidů (Zhao *et al.*, 2013) přirozeného nebo chemického původu s biologickou aktivitou zacílenou vůči virům, bakteriím, prvokům nebo houbám. Mimo to byly popsány i peptidy s antitumorovou aktivitou. Jako první byla antitumorová aktivita popsána v roce 1991 u magaininu 2 a jeho syntetických analogů. Peptidy vykazovaly *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči rozličným druhům tumorů doprovázejících jednotlivé typy leukemie a také vůči karcinomu prsu, prostaty a neuroepitheliomu (Cruciani *et al.*, 1991). V současnosti byla popsána antitumorová aktivita téměř u 200 AMPs (<http://aps.unmc.edu/AP/database/antiC.php>, staženo 20.4.2016). Z lidských antimikrobiálních peptidů se jedná například o katherlicidin. Jeho zvýšená hladina byla pozorována u rakovinových buněk prsu (Heilborn *et al.*, 2005), plic (von Haussen *et al.*, 2008), prostaty (Hensel *et al.*, 2011) nebo vaječnicků (Coffelt *et al.*, 2008). Peptidy s antitumorovou aktivitou jsou schopny rozlišit a atakovat pouze rakovinové buňky na základě jejich odlišných vlastností jakými jsou zvýšený obsah kyseliny sialové (Dennison *et al.*, 2006), vyšší obsah proteoglykanů (Koo *et al.*, 2008) a fosfatidylserinu (Zwaal *et al.*, 2005). Selektivita, účinnost a citlivost AMPs vůči různým typům rakovinových buněk je však mnohem komplikovanější. Například při karcinomu prsu, plic a prostaty LL-37 stimuloval proliferaci, migraci a tumorigenezi prostřednictvím receptorové signalizace, zatímco u rakoviny žaludku, střeva a T-leukemii proliferaci naopak potlačoval a stimuloval buněčnou apoptózu (Kuroda *et al.*, 2015). Jedním z hlavních důvodů, proč jsou AMPs předmětem zájmu celé řady výzkumných skupin je skutečnost, že některé z nich jsou biologicky aktivní vůči patogenům, které si vybudovaly antibiotickou rezistenci. AMPs lze použít jakožto samostatná léčiva, nebo v kombinaci s jinými antibiotiky. Například synergické působení penicilinu (ATB) a pediocinu (AMP) a kombinace ampicilinu (ATB) a nisinu

Z (AMP) měla za následek usmrcení bakterie *Pseudomonas fluorescens* při 13-155x menší potřebě minimální inhibiční koncentrace (MIC) vzhledem k použití samotného antibiotika. Tyto kombinace by tak mohly vést ke všeobecnému užívání antibiotik v nižších dávkách, což by mohlo významně zpomalit proces budování bakteriální antibiotické rezistenci (Naghmouchi *et al.*, 2012).

Jednotlivé peptidy lze vyhledat v několika přehledných databázích, jakými jsou například The Antimicrobial Peptide Database (ADP, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>, staženo 19.4.2016) nebo A Database Linking Antimicrobial Peptides (LAMP, <http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp/index.php>, staženo 19.4.2016), databáze BAGEL (<http://bagel.molgenrug.nl/>, staženo 19.4.2016) obsahující všechny prokaryotické AMPs, databáze Defensins Knowledgebase (<http://defensins.bii.a-star.edu.sg/>, staženo 19.4.2016), kde je možné vyhledat všechny antimikrobiální peptidy ze skupiny defensinů, PepBank (<http://pepbank.mgh.harvard.edu/>, staženo 19.4.2016), PhytAMP (databáze rostlinných AMPs; <http://phytamp.pfba-lab-tun.org/main.php>, staženo 19.4.2016) nebo databáze AMPs, které se nacházejí v mléku – MilkAMP (<http://milkampdb.org/home.php>, staženo 19.4.2016).

Většina antimikrobiálních peptidů jsou kationty, a proto je mechanismus jejich působení na negativně nabitě bakteriální membrány založen na jednoduché elektrostatické interakci. Po přiblížení a interakci s cytoplasmatickou membránou dochází k jejímu narušení. Může nastat depolarizace membrány, která je pro buňku fatální, v membráně se mohou vytvořit kanály a otvory, kterými dojde k vylití buněčného obsahu, může dojít k aktivaci hydrolas, enzymů, které způsobí rozklad buněčné stěny, nebo může dojít k narušení funkce membrány prostřednictvím translokace membránových lipidů. Jednotlivé modely interakce AMP-membrána jsou známy pod názvem agregační model, kobercový model, model sudové skruže a model toroidního póru. Většina těmito mechanismy působících AMPs má strukturu amfipatického α -helixu a vytvoření rezistence, je pro patogeny velice nepravděpodobné (Teixeira *et al.*, 2012). Za antimikrobiální vlastnosti peptidu je zodpovědná vyšší, sekundární, struktura, na základě které dělíme AMPs do čtyř skupin: β -skládaný list, α -helix, rozvolněná struktura a smyčka (Powers a Hancock, 2003). Nejvíce se vyskytuje sekundární struktura α -helikální, kde jsou sousední aminokyseliny vzdáleny 0,15 nm a úhel mezi nimi vzhledem ke středu struktury je 100° . Struktury β -skládaného listu jsou zase tvořeny minimálně dvěma β -vlákný navzájem spojenými disulfidovými vazbami.

Mnoho peptidů se však vyskytuje v této sekundární struktuře pouze až po interakci s bakteriální membránou. Mnoho peptidů, které mají stejnou sekundární strukturu, vykazují různou antimikrobiální aktivitu a různý mechanismus působení na cílové organismy (Jenssen *et al.*, 2006). Sekundární struktura je sice důležitá pro odvození základních charakteristik antimikrobiálních peptidů, ovšem klíčovými faktory jsou délka, náboj, helicitá, hydrofóbnost, amfipaticita a rozpustnost (Tossi *et al.*, 2000). Mechanismus působení a cytotoxicita AMPs jsou dány nejen jejich amfipatickým charakterem s jedním hydrofobním a druhým hydrofilním koncem a 3D strukturálními vlastnostmi, ale i jejich celkovým nábojem. Ten je součtem všech ionizovaných skupin peptidu a může dosahovat hodnoty přibližně od -7 až do +9. Oren a Shai v roce 1996 publikovali práci, v níž popsali přípravu chemicky modifikovaného derivátu pardaxinu, póry tvořícího polypeptidového toxinu z ryby *Pardachirus marmoratus*, se strukturou helix-smyčka-helix. Tato struktura je typická pro antibakteriální peptidy, které napadají bakteriální membránu (cecropin) a cytotoxické peptidy, které lyzují savčí i bakteriální buňky (melittin). Chemickou modifikací sekundární struktury polypeptidu došlo ke snížení toxického účinku vůči savčím buňkám, při zachování antibakteriální aktivity (Oren a Shai, 1996). Jak uvádí Huang *et al.*, hydrofobicita peptidu koreluje s antimikrobiálním účinkem (Huang *et al.*, 2010) a s výběrem cílového organismu, což bylo prokázáno u magaininu a jeho syntetických analog (Dathe *et al.*, 1997). Podmínkou pro translokaci antimikrobiálního peptidu přes cytoplasmatickou membránu je jeho rozpustnost ve vodném prostředí cytoplasmy. V opačném případě totiž dochází k jejich agregaci, přičemž v takovém uspořádání nejsou schopny atakovat cytoplasmatickou membránu (Chen *et al.*, 2005). Všechny tyto základní vlastnosti spolu souvisí a vzájemně se ovlivňují a na to je třeba přihlížet, například při navrhování struktury nových syntetických peptidů. I malá změna v primární struktuře peptidu, způsobena nesprávným zařazením aminokyseliny nebo zařazením neobvyklé aminokyseliny, může vést ke změně těchto vlastností. Pro mnoho antimikrobiálních peptidů je rovněž důležitá správná posttranslační modifikace, jelikož ne všechny jsou syntetizované přímo v jejich aktivní formě. Tyto modifikace mohou zahrnovat fosforylace (Goumon *et al.*, 1996), metylace (Hancock *et al.*, 1999), amidace (Rifflet *et al.*, 2012), glykosylace (Oman *et al.*, 2011), přidávání D-aminokyselin (Kreil, 1997), formování disulfidových vazeb (Mangoni *et al.*, 1996) či proteolytické odštěpení signální sekvence (Shinnar *et al.*, 2003).

2.2.1 Molekulární farmaření za účelem produkce antimikrobiálních peptidů v rostlinných systémech

Produkce přirozených AMPs nebo jejich syntetických derivátů v rostlinných bioreaktorech představuje slibnou budoucnost především pro farmaceutický průmysl. Z antimikrobiálních peptidů byla doposud publikována exprese v transgenním ječmeni pouze Metchnikowinu – AMP přirozeně se vyskytujícímu u octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*), a to v roce 2009. Cílem autorů bylo připravit GMO ječmen se zvýšenou odolností vůči patogenním houbám. Exprese transgenů byla řízena patogen-inducibilním promotorem. Metchnikowin se akumuloval v apoplastickém prostoru jakožto odezva na padlí ječmene, fusaria klasu či hniloby kořenu (Rahnamaeian *et al.*, 2009).

Ječmen obsahuje několik skupin antimikrobiálních peptidů. Podle databáze LAMP byl zatím v ječmeni potvrzen výskyt celkem 14 antimikrobiálních peptidů zařazených do tří skupin: defensiny, thioniny a nespecifické lipidové transferové proteiny, s účinností vůči virům, bakteriím i houbám (http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp/results_complex.php, staženo 13.4.2016). Defensiny jsou malé, bazické, kladně nabité peptidy bohaté na cystein s délkou od 45-54 aminokyselin s biologickou aktivitou vůči houbám i bakteriím. Jejich mechanismus účinku u rostlin zatím není úplně jasný, pravděpodobně ale dochází k elektrostatické interakci mezi AMP a membránou patogenu, což vede k její destabilizaci, narušení a úniku intracelulárních komponent. Thioniny jsou nízkomolekulární peptidy s kladným nábojem, bohaté na arginin, lysin a cystein. Jsou toxické pro některé druhy bakterií, kvasinek i hub. Nespecifické lipidové transferové proteiny jsou proteiny vyskytující se u jednoděložných i dvouděložných rostlin a plní nejrůznější funkce. Krom biologické aktivity vůči houbám se podílejí na formování kutiny, embryogenezi, symbióze, pomáhají rostlinám adaptovat se na nejrůznější podmínky prostředí, jsou schopny výměny lipidů v membránách *in vitro* a také regulují zásobu intracelulárních mastných kyselin. Mechanismus jejich působení na membrány zatím není úplně objasněn, pravděpodobně však dochází k vytvoření pórů v membráně patogena, což vede k vylití vnitřního obsahu buňky a následné smrti (Nawrot *et al.*, 2014). V roce 2012 publikoval Muramoto *et al.* produkci ječmenného α -hordothioninu (α HT), a to transgením přístupem pomocí povijnice batátové (*Ipomoea batatas*), jejíž kořenové hlízy jsou známé jako batáty. Do komerčního kultivaru rostliny byl vložen ječmenný gen pro

produkcí α -hordothioninu, jehož exprese byla řízena buď silným konstitutivním promotorem, anebo promotorem genu pro β -amylasu původem z povijnice batátové. Zmiňovaný enzym se přirozeně vyskytuje v zásobních kořenech. α HT vykazuje biologickou aktivitu vůči houbě *Ceratocystis fimbriata*, která parazituje na batátech. Po inokulaci listů transgenní povijnice batátové sporama patogenní houby k rozvoji infekce sice došlo, ovšem ve výrazně menší míře než u kontrolní netransgenní rostliny. Rovněž byly sporama inokulovány zásobní kořeny. Průměrná plocha všech lézí byla o víc jak polovinu menší než u kontrolní netransgenní rostliny. To by mohlo vést ke snížení ztrát způsobených patogenní houbou a také ke snížení množství chemikálií užívaných v současnosti na likvidaci této houby (Muramoto *et al.*, 2012). V roce 2002 popsal Morassutti *et al.* produkci transgenního tabáku, který obsahoval gen kódující antimikrobiální peptid ze skupiny lidských kathericidinů SMAP-29. Strategie spočívala ve fúzi peptidu s inteinem, který má samoštěpící vlastnosti a tudíž je obejitá nutnost použití proteas. SMAP-29 vykazuje *in vitro* biologickou aktivitu vůči řadě bakterií, hub a dokonce i vůči rezistentnímu kmenu *Pseudomonas aeruginosa* (Morassutti *et al.*, 2002). Za účelem molekulárního farmaření byla popsána v roce 2005 exprese *GLP-1* genu pro antimikrobiální peptid, a to pod endospermově specifickým promotorem pro glutelinový protein (GluB1). Jako hostitelský organismus pro produkci byla vybrána rýže. Produkce zmiňovaného antimikrobiálního peptidu by mohla nalézt uplatnění při léčbě onemocnění diabetes mellitus typu II (Yasuda *et al.*, 2005). Laktostatin, antimikrobiální peptid tvořený z β -laktoglobulinu z kravského mléka, byl heterologně produkován v rýži pod endospermově specifickým promotorem. Peptid se akumuloval v endospermu rýže v množství $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ suchého zrna a mohl by být využit v klinické praxi při léčbě hypercholesterolemie (Cabanos *et al.*, 2013). V roce 2014 Bundó *et al.* publikovali produkci transgenní rýže nesoucí gen pro cekropin A. Peptid se přirozeně vyskytuje v těle hmyzu *Hyalophora cecropia*. Exprese AMP byla řízena endospermově specifickým promotorem GluB1 nebo GluB4 a peptid se akumuloval v zrnech v množství 1-4 μg na gram zralého zrna. Autoři testovali antimikrobiální aktivitu rekombinantního produktu vůči houbě *Fusarium verticillioides*, která je hojně rozšířená v Asii a každoročně způsobuje obrovské ztráty úrod a také vůči bakterii *Dickeya dadantii*. Peptid vykazoval biologickou aktivitu vůči oběma testovaným patogenům. Transgenní rostliny inokulované těmito patogeny byly na rozdíl od kontrolních rostlin schopné klíčení (Bundó *et al.*, 2014). Cekropin A byl dále v roce 2006 produkován

transgenním přístupem konstitutivně v rýži, a to buď v endoplasmatickém retikulu či apoplastu. Extrakty z listů transgenní rýže vykazovaly *in vitro* biologickou aktivitu vůči houbě *Magnaporthe grisea*. Apoplastické linie měly změněný fenotyp a nebyly fertlní na rozdíl od linií s cílenou expresí transgenu do ER (Coca *et al.*, 2006). V roce 2013 vyšel článek popisující produkci transgenního čínského čajovníku exprimujícího antimikrobiální peptid dermaseptin. Peptid byl aktivní vůči bakterii *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, která způsobuje onemocnění citrusů a u transgenních rostlin došlo ke zmírnění příznaků nemoci až o 50% (Furman *et al.*, 2013). V rostlinných systémech byla heterologně produkována celá řada dalších antimikrobiálních peptidů, včetně uměle navržených AMPs, a to například za účelem ochrany rostlin před patogeny (Rajasekaran *et al.*, 2005; Xing *et al.*, 2006; Nadal *et al.*, 2012), oxidativním stresem (Nadal *et al.*, 2012), za účelem zvýšení výnosů rostlin (Xing *et al.*, 2006) nebo za účelem molekulárního farmaření s využitím produktů ve farmaceutickém průmyslu (Rubio-Infante *et al.*, 2012).

7 LITERATURA

- Altosaar I., Sardana R., Dudani A., Ganz P., Tuckaberry E.: *Production of GM-CSF in plants*. US 7214862, B2, 8.5.2007, 6 stran. <http://www.google.com/patents/US7214862> (25.4.2016).
- Antimicrobial Peptide Database: <http://aps.unmc.edu/AP/database/antiC.php> (20.4.2016).
- Antimicrobial Peptide Database: <http://aps.unmc.edu/AP/main.php> (19.4.2016).
- Apweiler R., Hermjakob H., Sharon N. (1999): On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta* **1473**, 4-8.
- Arcadia Biosciences: <http://www.arcadiabio.com/technologies/nutritional-oils> (13.1.2016).
- Austin-Phillips S., Burgess R.R., German T.L., Ziegelhoffer T. (Wisconsin Alumni Research Foundation): *Transgenic plants as an alternative source of lignocellulosic-degrading enzymes*. US 5981835, A1, 9.11.1999, 4 strany. <http://www.google.ch/patents/US5981835> (25.4.2016).
- Babaeizad V., Imani J., Kogel K.H., Eichmann R., Hückelhoven R. (2009): Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics* **118**, 455-463.
- Badosa E., Moiset G., Montesinos L., Talleda M., Bardají E., Feliu L., Planas M., Montesinos E. (2013): Derivatives of the antimicrobial peptide BP100 for expression in plant systems. *PloS ONE* **8**. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0085515>.
- Bagel: <http://bagel.molgenrug.nl/> (19.4.2016).
- Baszczynski C., Czaplá T., Hood E., Meyer T.E., Peterson D., Rao A.G., Register J.C., Witcher D., Howard A.: *Commercial production of aprotinin in plants*. US 5824870, A1, 20.10.1998a, 2 strany. <http://www.google.com/patents/US5824870> (25.4.2016).
- Baszczynski C., Hood E., Maddock S., Meyer T.E., Register J.C., Witcher D., Howard J.A.: *Commercial production of avidin in plants*. US 5767379, A1, 16.6.1998b, 2 strany. <http://www.google.com/patents/US5767379> (25.4.2016).
- Bevan M.W., Flavell R.B., Chilton M.D. (1983): A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* **304**, 184-187.
- Biotechlab: <http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp/index.php> (19.4.2016).
- Biotechlab: http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp/results_complex.php (13.4.2016).
- Boothe J., Nykiforuk C., Shen Y., Zaplachinski S., Szarka S., Kuhlman P., Murray E., Morck D., Moloney M.M. (2010): Seed-based expression systems for plant molecular farming. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 588-606.
- 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.
- Bruce W. B., Hood E., Peterson D.J., Register J.C., Witcher D., Howard J.A. (ProdiGene Inc.): *Commercial production of β -glucuronidase in plants*. US 5804694, A1, 8.9.1998, 8 stran. <http://www.google.ch/patents/US5804694> (25.4.2016).
- 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>.
- Burton R., Collins H., Kibble N., Smith J., Shirley N., Jobling S., Henderson M., Singh R.R., Pettolino F., Wilson S.M., Bird A.R., Topping D.L., Bacic A., Fincher G.B. (2011): Over-expression of specific *HvCslF* cellulose synthase-like genes in transgenic barley increases the levels of cell wall (1,3;1,4)- β -d-glucans and alters their fine structure. *Plant Biotechnology Journal* **9**, 117-135.

- Cabanos C., Ekyo A., Amari Y., Kato N., Kuroda M., Nagaoka S., Takaiwa S., Utsumi S., Maruyama N. (2013): High-level production of lactostatin, a hypocholesterolemic peptide, in transgenic rice using soybean A1aB1b as carrier. *Transgenic Research* **22**, 621–629.
- Coca M., Peñas G., Gómez J., Campo S., Bortolotti C., Messeguer 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.
- Coffelt S.B., Waterman R.S., Florez L., Honer zu Bentrup K., Zvezdaryk K.J., Tomchuck S.L., LaMarca H.L., Danka E.S., Morris C.A., Scandurro A.B. (2008): Ovarian cancer overexpress the antimicrobial protein hCAP-18 and its derivate LL-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion. *Interantional Journal of Cancer* **122**, 1030-1039.
- Cruciani R.A., Barker F.L., Zasloff M., Chen H.C., Colamonici O. (1991): Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 3792-3796.
- Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K. (2001): Medical molecular pharming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science* **6**, 219-226.
- Dathe M., Wieprecht T., Nikolenko H., Handel L., Maloy W.L., MacDonald D.L., Beyermann M., Bienert M. (1997): Hydrophobicity, hydrophobic moment and angle subtended by charged residues modulate antibacterial and haemolytic activity of amphipathic helical peptides. *FEBS Letters* **403**, 208-212.
- Defensins: <http://defensins.bii.a-star.edu.sg/> (19.4.2016).
- Demain A.L., Vaishnav P. (2009): Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* **27**, 297-306.
- Dennison S.R., Whittaker M., Harris F., Phoenix D.A. (2006): Anticancer alpha-helical peptides and structure/function relationship underpinning their interactions with tumor cell membranes. *Curret Protein and Peptide Science* **7**, 487-499.
- Dorokhov Y.L., Sheveleva A.A., Frolova O.Y., Komarova T.V., Zvereva A.S., Ivanov P.A., Atabekov J.G. (2006): Superexpression of tuberculosis antigens in plant leaves. *Tuberculosis* **87**, 218-224.
- Erbayraktar S., Grasso G., Sfacteria A., Xie Q., Coleman T., Kreilgaard M., Torup L., Sager T., Erbayraktar Z., Gokmen N., Yilmaz O., Ghezzi P., Villa P., Fratelli M., Casagrande M., Leist M., Helboe L., Gerwien J., Christensen S., Geist M.A., Pedersen L.O., Cerami-Hand C., Wuerth J.P., Cerami A., Brines M. (2003): Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6741-6.
- Erlendsson L.S., Muench M.O., Hellman U., Hrafnkelsdóttir S.M., Jonsson A., Balmer Y., Mäntylä E., Örvar B.L. (2010): Barley as a green factory for the production of functional Flt3 ligand. *Biotechnology Journal* **5**, 163-171.
- Faostat: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (23.4.2016).
- Faostat: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (25.3.2016).
- Fischer R., Emans N.J., Twyman R.M., Schillberg S. (2004b): *Molecular farming in plants: technology platforms*. In: *Encyclopedia of Plant and Crop Science* (Goodman R.M. eds.), Marcel Dekker Inc., New York, USA, 753-756.
- Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Twyman R.M. (2004a): Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 152-158.
- Floss D.M., Sack M., Arcalis E., Stadlmann J., Quendler H., Rademacher T., Stoger E., Scheller J., Fischer R., Conrad U. (2009): Influence of elastin-like peptide fusions on the quantity and quality of a tobacco-derived human immunodeficiency virus-neutralizing antibody. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 899-913.
- Fraunhofer: <http://www.ime.fraunhofer.de/content/dam/ime/en/documents/MB/Production%20and%20characterization%20of%20the%20tumour-specific%20antibody%20M12%20in%20plants.pdf> (25.4.2016).
- Fraunhofer: <http://www.ime.fraunhofer.de/content/dam/ime/en/documents/MB/Engineering%20Durable%20Pathogen%20Resistance%20in%20Grapevine.pdf> (25.4.2016).

- Furman N., Kobayashi K., Zaneck M.C., Calcagno J., Garcia M.L., Mentaberry A. (2013): transgenic sweet orange plants expressing a dermaseptin coding sequence show reduced symptoms of citrus canker disease. *Journal of Biotechnology* **167**, 412-419.
- Gils M., Kandzia R., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y. (2005): High-yield production of authentic human growth hormone using a plant virus-based expression system. *Plant Biotechnology Journal* **3**, 613-620.
- Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. (2007): Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 134-141.
- Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., Hadley D., Hutchison D., Martin Ch., Katagiri F., Lange B.M., Moughamer T., Xia Y., Budworth P., Zhong J., Miguel T., Paszkowski U., Zhang S., Colbert M., Sun W., Chen L., Cooper B., Park S., Wood T.Ch., Mao L., Quail P., Wing R., Dean R., Yu Y., Zharkikh A., Shen R., Sahasrabudhe S., Thomas A., Cannings R., Gutin A., Pruss D., Reid J., Tavtigian S., Mitchell J., Eldredge G., Scholl T., Miller R.M., Bhatnagar S., Adey N., Rubano T., Tusneem N., Robinson R., Feldhaus J., Macalma T., Oliphant A., Briggs S. (2002): A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica). *Science* **296**, 92-100.
- Goldstein D.A., Thomas J.A. (2004): Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM: An International Journal of Medicine* **97**, 705-716.
- Gomord V., Fitchette A.C., Menu-Bouaouiche L., Saint-Jore-Dupas C., Plasson C., Michaud D., Faye L. (2010): Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 564-587.
- Goumon Y., Strub J.M., Moniatte M., Nullans G., Poteur L., Hubert P., van Dorsselaer A., Aunis D., Metz-Boutique M.H. (1996): The c-terminal biophosphorylated proenkephalin-a-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *European Journal of Biochemistry* **235**, 516-525.
- Hancock R.E., Chapple D.S. (1999): Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 1317-1323.
- Harwood W. A., Bartlett J. G., Alves S. C., Perry M., Smedley M. A., Leyland N., Snape J. W. (2009): Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 478, *Transgenic Wheat, Barley and Oats* (Jones H. D., Shewry P. R. eds.), Humana Press, New York, USA, 137-147.
- Heilborn J.D., Nilsson M.F., Jimenez C.I., Sandstedt B., Borregaard N., Tham E., Sørensen O.E., Weber G., Stähle M. (2005): Antimicrobial protein hCAP/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *International Journal of Cancer* **114**, 713-713.
- Helmholtz München: <https://www.helmholtz-muenchen.de/biop/research-groups-units/redox-signalling-and-antimicrobial-peptides/antimicrobial-peptides-molecular-farming/index.html> (20.4.2016).
- Henry R.J. (1988): The carbohydrates of barley grains – a review. *Journal of the Institute of Brewing* **94**, 71-78.
- Hensel J.A., Chanda D., Kumar S., Sawant A., Grizzle W.E., Siegal G.P., Ponnazhagan S. (2011): LL-37 as a therapeutic target for late stage prostate cancer. *Prostate* **71**, 659-670.
- Hiatt A., Cafferkey R., Bowdish K. (1989): Production of antibodies in transgenic plant. *Nature* **342**, 76-78.
- Hood E.E., Witcher D.R., Maddock S., Meyer T., Baszczyński Ch., Bailey M., Flynn P., Register J., Marshall L., Bond D., Kulisek E., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C., Mehig R.J., Hernan R., Kappel W.K., Ritland D., Li Ch.P., Howard J.A. (1997): Commercial production of avidin from transgenic maize. Characterization of transformant, production, processing, extraction and purification. *Molecular Breeding* **3**, 291-306.
- 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.

- Horvath H., Rostoks N., Brueggeman R., Steffenson B., von Wettstein D., Kleinhofs A. (2003): Genetically engineered stem rust resistance in barley using the *Rpg1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 364-369.
- Howard J.A., Hood E. (ProdiGene Inc.): *Commercial production of proteases in plants*. US 6087558, A1, 11.7.2000, 4 strany. <http://www.google.com/patents/US6087558> (25.4.2016). <http://bmcplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-12-159>.
- Huang Y. B., Huang J.F., Chen Y.X. (2010): Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein Cell* **1**, 143-152.
- Chen Y., Mant C.T., Farmer S.W., Hancock R.E., Vasil M.L., Hodges R.S. (2005): Rational design of alpha-helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *The Journal of Biological Chemistry* **280**, 12316-12329.
- Icon Genetics: http://www.icongenetics.com/html/tech4_1.htm (20.4.2016).
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987): GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6**, 3901-3907.
- Jenssen H., Hamill P., Hancock R.E. (2006): Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **19**, 491-511.
- Joensuu J.J., Kotiaho M., Teeri T.H., Valmu L., Nuutila A.M., Oksman-Caldentey K.M., Niklander-Teeri V. (2006): Glycosylated F4 (K88) fimbrial adhesin FaeG expressed in barley endosperm induces ETEC-neutralizing antibodies in mice. *Transgenic Research* **15**, 359-373.
- 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.
- Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., Pniewski T., Letellier M., Lisowa O., Yusibov V., Koprowski H., Plucienniczak A., Legocki A.B. (1999): A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *The FASEB Journal* **13**, 1796-1799.
- Knauf V.C., Shewmaker C., Flider F., Emlay D., Rey E. (Arcadia Biosciences Inc.): *Safflower with elevated gamma-linolenic acid*. US 20070067870, A1, 22.3.2007, 10 stran. <http://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US20070067870.pdf> (13.1.2016).
- Koo C.Y., Sen Y.P., Bay B.H., Yip G.W. (2008): Targeting heparan sulfate proteoglycans in breast cancer treatment. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* **3**, 151-158.
- Koprivova A., Stemmer Ch., Altmann F., Hoffmann A., Kopriva S., Gorr G., Reski R., Decker E.L. (2004): Targeted knockouts of *Physcomitrella* lacking plant-specific immunogenic N-glycans. *Plant Biotechnology Journal* **2**, 517-523.
- Kreil G. (1997): D-amino acids in animal peptides. *Annual Review of Biochemistry* **66**, 337-345.
- Kumar G.B.S., Ganapathi T.R., Revathi C.J., Srinivas L., Bapat V.A. (2005): Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic banana plants. *Planta* **222**, 484-493.
- Kuroda K., Okumura K., Isogai H., Isogai E. (2015): The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 and mimics are potential anticancer drug. *Frontiers in Oncology* **5**. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4485164/>.
- Kusnadi A.R., Evangelista R.L., Hood E.E., Howard J.A., Nikolov Z.L. (1998): Processing of transgenic corn seed and its effect on the recovery of recombinant beta-glucuronidase. *Biotechnology and Bioengineering* **60**, 44-52.
- Lynch P.T., Jones N., 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.
- Ma J.K.-C., Pascal M.W.D., Christou P. (2003): The production of recombinant pharmaceuticals in plants. *Nature Reviews Genetics* **4**, 794-805.

- MacGregor A.W., Fincher G.B. (1993): *Carbohydrates of the barley grains*. In: *Barley: chemistry and technology*. (MacGregor A.W., Bhatti R.S. eds.) American Association of Cereals Chemists, St. Paul, USA, 73-130.
- Malting and Brewing: <http://maltingandbrewing.com/composition-of-barley-kernels.html> (21.2.2016).
- Mangoni M.E., Aumelas A., Charnet P., Roumestand C., Chiche L., Despau E., Grassy G., Calas B., Chavanieu A. (1996): Change in membrane permeability induced by protegrin 1: Implication of disulphide bridges for pore formation. *FEBS Letters* **383**, 93-98.
- Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. (2005): Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature Biotechnology* **23**, 718-723.
- Mavituna A.M. (2005): Production of recombinant Human Serum Albumin in transgenic plants and plant cells. Ph.D. thesis, RWTH University, Aachen, Germany.
- Menassa R., Nguyen V., Jevnikar A., Brandle J. (2001): A self-contained system for the field production of plant recombinant interleukin-10. *Molecular Breeding* **8**, 177-185.
- Milkampdb: <http://milkampdb.org/home.php> (19.4.2016).
- Moloney M. M., habibi H.R. (SemBioSys Genetics Inc.): *Expression of somatotropin in plant seeds*. US 6288304, B1, 11.9.2001, 4 strany. <http://www.google.com/patents/US6288304> (25.4.2016).
- Moloney M.M., Boothe J., Kreon R., Nykiforuk C., Van Rooijen G. (SemBioSys Genetics Inc.): *Methods for the production of insulin in plants*. US 7547821, B2, 16.6.2009, 17 stran. <http://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US7547821.pdf> (13.1.2016).
- Morassutti C., Dem Amicis F., Skerlavaj B., Zanetti M., Marchetti S. (2002): Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Letters* **519**, 141-146.
- Morran S., Eini O., Pyvovarenko T., Parent B., Singh R., Ismagul A., Eliby S., Shirley N., Langridge P., Lopato S. (2011): Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal* **9**, 230-249.
- Muhitch M.J., Shatters R.G. (1998): Regulation of the maize ubiquitin (Ubi-1) promoter in developing maize (*Zea mays* L.) seeds examined using transient gene expression in kernels grown *in vitro*. *Plant Cell Reports* **17**, 476-481.
- Müntz K. (1998): *Deposition of storage proteins*. In: *PMB: Protein Trafficking in Plant Cells*. (Soll J. eds.), Springer Netherlands, Netherlands, 77-99.
- Muramoto N., Tanaka T., Shimamura T., Mitsukawa N., Hori E., Koda K., Otani M., Hirai M., Nakamura K., Imaeda T. (2012): Transgenic sweet potato expressing thionin from barley gives resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in leaves and storage roots. *Plant Cell Report* **31**, 987-997.
- Nadal A., Montero M., Company N., Badosa E., Messeguer J., Montesinos L., Montesinos E., Pla M. (2012): Constitutive expression of transgenes encoding derivatives of the synthetic antimicrobial peptides BP100: impact on rice host plant fitness. *BMC Plant Biology* **12**:159.
- Naghmouchi K., Le Lay 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.
- Nawrot R., Baryliski J., Nowicki G., Broniarczyk J., Buchwald W., Goździcka-Józefiak A. (2014): Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica* **59**, 181-196.
- Nochi T., Takagi H., Yuki Y., Yang L., Masumura T., Mejima M., Nakanishi U., Matsumura A., Uozumi A., Hiroi T., Morita S., Tanaka K., Takaiwa F., Kiyono H. (2007): Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain and needle-free vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10986-10991.
- Novák J., Skalický M. (2008): Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika, 1. vydání, Powerprint, Praha, Česká republika, 344 stran.
- Obembe O.O., Popoola J.O., Leelavathi S., Reddy S.V. (2011): Advances in plant molecular farming. *Biotechnology Advances* **29**, 210-222.

- Ohnoutková L., Zitka O., Mrízová K., Vašková J., Galuszka P., Cernei N., Smedley M.A., Harwood W.A., Adam V., Kizek R. (2012): Electrophoretic and chromatographic evaluation of transgenic barley expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase. *Electrophoresis* **33**, 2365-2373.
- Oman T.J., Boettcher J.M., Wang H., Okalibe X.N., van der Donk W.A. (2011): Sublancin is not a lanbiotic but an s-linked glycopeptide. *Nature Chemical Biology* **7**, 78-80.
- Oren Z., Shai Y. (1996): A class of highly potent antibacterial peptides derived from pardaxin, a pore-forming peptide isolated from Moses sole fish *Pardachirus marmoratus*. *European Journal of Biochemistry* **237**, 303-310.
- ORF Genetics: <http://orfgenetics.com/ISOkine/ProductList/> (13.1.2016).
- Osborn T. B. (1895): The proteins of barley. *American Chemical Society Journal* **17**, 539-567.
- Osusky M., Zhou G., Osuska L., Hancock R.E., Kay W.W., Misra S. (2000): Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens. *Nature Biotechnology* **18**, 1162-1166.
- Pepbank: <http://pepbank.mgh.harvard.edu/> (19.4.2016).
- Perrin Y., Vaquero C., Gerrard I., Sack M., Drossard J., Stöger E., Christou P., Fischer R. (2000): Transgenic pea seeds as bioreactors for the production of a single-chain Fv fragment (scFV) antibody used in cancer diagnosis and therapy. *Molecular Breeding* **6**, 345-352.
- Petrucelli S., Otegui M.S., Lareu F., Tran Dinh O., Fitchette A.C., Circosta A., Rumbo M., Bardor M., Carcamo R., Gomord V., Beachy R.N. (2006): A KDEL-tagged monoclonal antibody is efficiently retained in the endoplasmic reticulum in leaves, but is both partially secreted and sorted to protein storage vacuoles in seeds. *Plant Biotechnology Journal* **4**, 511-527.
- Pharma-Planta: <http://www.pharma-planta.net/index.php?pg=50> (13.1.2016).
- PhytAMP Database: <http://phytamp.pfba-lab-tun.org/main.php> (19.4.2016).
- Poole J., Daniels G. (2007): Blood group antibodies and their significance in transfusion medicine. *Transfusion Medicine Reviews* **21**, 58-71.
- Powers J.P., Hancock R.E. (2003): The relationship between peptide structure and antimicrobial activity. *Peptides* **24**, 1681-1691.
- Protalix: <http://protalix.com/products/elelyso-taliglucerase-alfa.asp> (13.1.2016).
- Pujol M., Ramírez N.I., Ayala M., Gavilondo J.V., Valdés R., Rodríguez M., Brito J., Padilla S., Gómez L., Reyes B., Peral R., Pérez M., Marcelo J.L., Milá L., Sánchez R.F., Páez R., Cremata J.A., Enríquez G., Mendoza O., Ortega M., Borroto C. (2005): An integral approach towards a practical application for plant-made monoclonal antibody in vaccine purification. *Vaccine* **23**, 1833-1837.
- Rahnamaeian M., Langen G., Imani J., Khalifa W., Altincicek B., von Wettstein D., Kogel K.H., Vilcinskas A. (2009): Insect peptide metchnikowin confers on barley a selective capacity for resistance to fungal ascomycetes pathogens. *Journal of Experimental Botany* **60**, 4105-4114.
- Rajasekaran K., Cary J.W., Jaynes J.M., Cleveland T.E. (2005): Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Plant Biotechnology Journal* **3**, 545-554.
- Ramesh S., Choimes S., Schachtman D. (2004): Over-expression of an *Arabidopsis* zinc transporter in *Hordeum vulgare* increases short-term zinc uptake after zinc deprivation and seed zinc content. *Plant Molecular Biology* **54**, 373-385.
- Ramessar K., Capell T., Christou P. (2008): Molecular pharming in cereal crops. *Phytochemistry Reviews* **7**, 579-592.
- Rifflet A., Gavalda S., Tene N., Orivel J., Leprince J., Guilhaudis L., Genin E., Vetillard A., Treilhou M. (2012): Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide from venom of the ant *Tetramorium bicarinatum*. *Peptides* **38**, 363-370.
- Roy S.J., Huang W., Wang X.J., Evrard A., Schmockel S.M., Zafar Z.U., Tester M. (2013): A novel protein kinase involved in Na(+) exclusion revealed from positional cloning. *Plant Cell Environment* **36**, 553-568.

- Rubio-Infante N., Govea-Alonso D.O., Alpuche-Solis Á.G., García-Hernández A.L., Soria-Guerra R.E., Paz-Maldonado L.M., Ilhuicatzí-Alvarado D., Varona-Santos J.T., Verdín-Terán L., Korban S.S., Moreno-Fierros L., Rosales-Mendoza S. (2012): A chloroplast-derived C4V3 polypeptide from the human immunodeficiency virus (HIV) is orally immunogenic in mice. *Plant Molecular Biology* **78**, 337-349.
- Sadashiv S.O., Kaliwal B.B. (2016): *Resistance in Bacteria*. IN: *Insecticide resistance*. (Trdan S. Ed.), InTech, 295-312.
- Saitoh H., Kiba A., Nishihara M., Yamamura S., Suzuki K., Terauchi R. (2001): Production of antimicrobial peptide defensin in *Nicotiana benthamiana* with a potato virus X vector. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 111-115.
- Santi L., Giritch A., Roy C.J., Marillonnet S., Klimyuk V., Gleba Y., Webb R., Arntzen C.J., Mason H.S. (2006): Protection conferred by recombinant *Yersinia pestis* antigens produced by a rapid and highly scalable plant expression system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 861-866.
- Shinnar A.E., Butler K.L., Park H.J. (2003): Cathelicidin family of antimicrobial peptides: Proteolytic processing and protease resistance. *Bioorganic Chemistry* **31**, 425-436.
- Schiellberg S., Twyman R.M., Fischer R. (2005): Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants-technology assessment. *Vaccine* **23**, 1764-1769.
- Schünmann P.H.D., Coia G., Waterhouse P.M. (2002): Biopharming the SimpliRED™ HIV diagnostic reagent in barley, potato and tobacco. *Molecular Breeding* **9**, 113-121.
- Sijmons P.C., Dekker B.M., Schrammeijer B, Verwoerd T.C, Van den Elzen P.J.M., Hoekema A.A. (1990): Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology* **8**, 217-221.
- Soltész A., Vágújfalvi A., Rizza F., Kerepesi I., Galiba G., Cattivelli L., Coraggio I., Crosatti C. (2012): The rice *Osmyb4* gene enhances tolerance to frost and improves germination under unfavourable conditions in transgenic barley plants. *Journal of Applied Genetics* **53**, 133-143.
- Sparrow P.A., Irwin J.A., Dale P.J., Twyman R.M., Ma J.K. (2007): Pharma-Planta: road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals. *Transgenic Research* **16**, 147-161.
- Stahl R., Horvath H., Van Fleet J., Voetz M., von Wettstein D., Wolf N. (2002): T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2146-2151.
- Stahl R., Luhrs R., Dargatz H. (Maltagen Forschung GmbH, Germany): *Thaumatococcus* from transgenic barley. US 20090031458, A1, 29.1.2009, 9 stran.
- Statista: <http://www.statista.com/statistics/263977/world-grain-production-by-type/> (25.3.2016).
- Stein N., Perovic D., Kumlehn J., Pellio B., Stracke S., Streng S., Ordon F., Graner A. (2005): The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive *Bymovirus* resistance in *Hordeum vulgare* L. *The Plant Journal* **42**, 912-922.
- Strasser R., Altmann F. Mach L., Glössl J., Steinkellner H. (2004): Generation of *Arabidopsis thaliana* plants with complex N-glycans lacking beta 1,2-linked xylose and core alpha 1,3-linked fucose. *FEBS Letters* **561**, 132-136.
- Stöger E., Parker M., Christou P., Casey R. (2001): Pea Legumin Overexpressed in Wheat Endosperm Assembles into an Ordered Paracrystalline Matrix. *Plant Physiology* **125**, 1732-1742.
- Stöger E., Sack M., Fischer R., Christou P. (2002): Plantibodies: applications, advantages and bottlenecks. *Current Opinion in Biotechnology* **13**, 161-166.
- Stöger E., Vaquero C., Torres E., Sack M., Nicholson L., Drossard J., Williams S., Keen D., Perrin Y., Christou P., Fischer R. (2000): Cereals crops as viable production and storage systems for pharmaceuticals scFv antibodies. *Plant Molecular Biology* **42**, 583-590.
- Sutliff T.D., Rodriguez R.L. (Applied Phytologics Inc.): *Production of α 1-antitrypsin in plants*. US 006127145, A1, 3.10.2000, 11 stran. <http://www.google.com/patents/US6127145> (25.4.2016).

- Takagi H., Saito S., Yang L., Nagasaka S., Nishizawa N., Takaiwa F. (2005): Oral immunotherapy against a pollen allergy using a seed-based peptide vaccine. *Plant Biotechnology Journal* **3**, 521-533.
- Takaiwa F., Takagi H., Hirose S., Wakasa Y. (2007): Endosperm tissue is good production platform for artificial recombinant proteins in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* **5**, 84-92.
- Teixeira V., Feio M.J., Bastos M. (2012): Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research* **51**, 149-177.
- Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. (2000): Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4-30.
- Tremblay R., Wang D., Jevnikar A.M., Ma S. (2010): Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances* **28**, 214-221.
- Twyman R.M., Stoger E., Schillberg S., Christou P., Fischer R. (2003): Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* **21**, 570-578.
- Úroda: <http://uroda.cz/choroby-jarniho-jecmene-a-ochrana-proti-nim/> (24.4.2016).
- Van Ooijen A. J. J., Rietveld K., Hoekema A., Pen J., Sijmons P.C., Verwoerd T.C.: *Expression of phytase in plants*. US 6022846, A1, 8.2.2000, 13 stran. <http://www.google.com/patents/US6022846> (25.4.2016).
- Van Rooijen G., Glenn K.R., Shen Y., Boothe J. (Sembiosys Genetics Inc.): *Commercial production of chymosin in plants*. US 7390936, B1, 24.6.2008, 8 stran. <http://www.google.com/patents/US7390936> (25.4.2016).
- Véniza L.P., Faye L., Lerouge P., D'Aoust M.A., Marquet-Blouin E., Burel C., Lavoie P.O., Bardor M., Gomord V. (2009): Transient co-expression for fast and high-yield production of antibodies with human-like N-glycans in plants. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 442-455.
- Ventria Biosciences: <http://www.ventria.com/component/content/article/13-bioreagents/51-products> (13.1.2016).
- Von Haussen J., Koczulla R., Shaykhiev R., Herr C., Pinkenburg O., Reimer D., Wiewrodt R., Biesterfeld S., Aigner A., Czubayko F., Bals R. (2008): The host defense peptide LL-37/hCAP-18 is a growth factor for lung cancer cells. *Lung Cancer* **59**, 12-23.
- Von Schaewen A., Stitt M., Schmidt R., Sonnwald U., Willmitzer L. (1990): Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *The EMBO Journal* **9**, 3033-3044.
- Walsh G., Jefferis R. (2006): Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology* **24**, 1241-1252.
- Watson S.A., Ramstad P.T. (1987): *Structure and composition*. In: *Corn: chemistry and technology*. (Watson S.A., Ramstad P.E. eds.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, 53-82.
- Wilhelmson A, Kallio P.T., Oksman-Caldentey K.M., Nuutila A.M. (2007): Heterologous expression of *Vitreoscilla* haemoglobin in barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Cell Reports* **26**, 1773-1783.
- Witcher D.R., Hood E.E., Peterson D., Bailey M., Bond D., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C., Mehig R., Kappel W., Register J., Howard J.A. (1998): Commercial production of β -glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants. *Molecular Breeding* **4**, 301-312.
- Xing H., Lawrence C.B., Chambers O., Davies H.M., Everett N.P., Li Q.Q. (2006): Increased pathogen resistance and yield in transgenic plants expressing combinations of the modified antimicrobial peptides based on indolicidin and magainin. *Planta* **223**, 1024-1032.
- Xue G.P., Patel M., Johnson J.S., Smyth D.J., Vickers C.E. (2003): Selectable marker-free transgenic barley producing a high level of cellulase (1,4-b-glucanase) in developing grains. *Plant Cell Reports* **21**, 1088- 1094.
- Yasuda H., Tada Y., Hayashi Y., Jomori T., Takaiwa F. (2005): Expression of the small peptide GLP-1 in transgenic rice. *Transgenic Research* **14**, 677-684.

- Zalewski W., Galuszka P., Gasparis S., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. (2010): Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1839-1851.
- Zhao X., Wu H., Lu H., Li G., Hunag Q. (2013): LAMP: A database linking antimicrobial peptides. *PLoS ONE* **8**.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0066557>.
- Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M. (2005): Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**, 971-988.

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADP	The Antimicrobial Peptide Database
AMP	antimikrobiální peptid
ATB	antibiotikum
BASI	α -amylasový/subtilisinový inhibitor
BaYMV	ječmenný žlutý mosaikový virus
BBBI	Bowman-Birkův typ inhibitorů
BBCH	Stupnice pro klasifikaci vývojových stádií obilnin
<i>B-HORp</i>	hordeinový promotor
bp	pár bazí
cDNA	komplementární DNA
CI-2	chymotrypsinový inhibitor 2
CKX1	cytokinin oxidasa/dehydrogenasa
<i>cv.</i>	kultivar
DON	deoxynivalenol
FAO	Organizace pro výživu a polnohospodářství
FDA	americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
Fw	forward primer
gDNA	genomová DNA
GFP	zelený fluorescenční protein
<i>GLUB1</i>	glutelinový promotor B1
<i>GLUB4</i>	glutelinový promotor B4
GMO	geneticky modifikovaný organismus
GRAS	generally recognized as safe
HBsAg	antigen hepatitidy
<i>hpt</i>	gen kodující hygromycintransferasu
LAMP	A Database Linking Antimicrobial Peptides
Le ^a	Lewisův epitop
MAb	monoklononální protilátka
MIC	minimální inhibiční koncentrace
<i>ntp</i> II	gen pro neomycin fosfotransferasu II
PCR	polymerasová řetězová reakce
qRT-PCR	kvantitativní polymerasová řetězová reakce v reálním čase
Rev	reverse primer
scFV	jednořetězový fragment Fv protilátky
SDS	dodecylsulfát sodný
T0	první generace transgenních rostlin
TAE	Tris-acetát-EDTA
TEP	total extracted proteins
TSP	total soluble proteins
<i>UBI-1</i>	ubiquitinový promotor
Zm	<i>Zea mays</i> (kukuřice setá)
α -HT	alfa-hordothionin

