



Středoškolská technika 2024

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

Funkční charakterizace Lipid Transfer Proteinů rostlin a jejich role v imunitní odpovědi

Jakub Merta

Střední průmyslová škola chemická

Vranovská 4, 635 Brno

Poděkování

Chtěl bych poděkovat Mgr. Davidu Novákovi, který mi umožnil zpracovávat tuto SOČ, za otevření nových možností pro můj další akademický rozvoj. Dále bych chtěl poděkovat doc. Mgr. Janu Lochmanovi, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři a při sepsání textu práce.

Mé poděkování patří i PhDr. Mgr. Marcele Helešicové, jež mi pomáhala se vstupem do biochemie jako vědního oboru a za pomoc při vysvětlování nových konceptů.

Na závěr bych chtěl poděkovat především mému školiteli Mgr. Adamu Janotíkovi, který mě skrz celou mou práci vedl, naučil mě novým metodám a přístupům a poskytl velkou podporu při vypracování a zkompletování této práce.

Tato práce byla vypracována za finanční podpory JMK a JCMM

Anotace

Tato práce se zabývá funkční charakterizací Lipid Transfer Proteinů (LTP) a jejich rolí v imunitní odpovědi rostlin. LTP proteiny jsou zapojeny v mnoha fyziologických a biologických procesech, jako je například tvorba kutikuly, rozvolňování buněčné stěny, diferenciace buňky, signalizace a inhibice patogenních nákaz. LTP proteiny jsou poměrně malé bazické proteiny, jež obsahují hydrofobní dutinu, která je schopná do sebe vázat mastné kyseliny a malé molekuly lipidické povahy. Jedním z hlavních cílů této práce bylo provést expresi čtyř LTP proteinů a následně otestovat jejich správné sbalení do terciální struktury tvořenou 4 až 5 α -helixy a dále stabilizovanou přítomností 4 nebo 5 disulfidických můstků. Dalším cílem bylo otestování jejich biologické v rámci měření schopnosti vázat mastné kyseliny. Cíl této práce bylo úspěšná exprimace vybraných proteinů a důkaz jejich biologické aktivity.

Klíčová slova

nespecifický LTP protein, heterologní exprese, lipidy, mastné kyseliny, buněčná stěna, obranná reakce

Annotation

This study focuses on a functional feature of Lipid Transfer Proteins and their role in the immune response. LTP proteins are involved in many physiological processes such as cuticle formation, cell wall expansion or signaling of the plant's immune response. LTP proteins are relatively small basic proteins that contain a hydrophobic cavity capable of binding fatty acids and small molecules of a lipid nature. One of the main aims of this work was to express four LTP proteins and then test their correct folding into a tertiary structure consisting of 4 or 5 α -helices and further stabilized by the presence of 4 or 5 disulfide bridges. Another aim was to test their biological properties by measuring their fatty acid binding capacity. The goal of this work was the successful expression of selected proteins and proof of their biological activity.

Keywords

non-specific LTP protein, heterologous expression, lipids, fatty acids, cell wall, defence reactio

Seznam zkratek

nsLTP	Nespecifický lipid transfer protein
SAR	Systemic acquired resistance
ABC- transportér	ATP Binding Cassette transportér
GPI-kotva	Glycosylphosphatidylinositol kotva
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electroforesis
cRNA	Complementary DNA
mRNA	messenger DNA
DIR1	Defective in induced resistance
DMPG	Dimyristoylphosphatidylglycerol
PGB	Porphobilinogen
LMPC	Lyso-myristoylphosphatidylcholine
CD	Cirkulární dichroismus
TNS	2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate
YPD	Yeast extract peptone dextrose
β-SL	β skládaný list
FA	Fatty acid

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretická část	8
2.1	Biologická role lipid transfer proteinů	8
2.1.1	Depozice lipidů na povrch rostliny	8
2.1.2	Rozvolňování buněčné stěny	9
2.1.3	Inhibice patogenů	11
2.1.4	Signální role LTP v imunitní reakci rostlin	11
2.1.5	LTP jako alergen	13
2.2	Chemické a fyziologické vlastnosti LTP proteinů	14
2.2.1	Struktura LTP	14
2.2.1	Vazba ligandu	15
2.3	Kvasinky <i>P. pastoris</i>	17
3	Praktická část	18
3.1	Cíle	18
4	Metodika práce	19
4.1	Expres LTP	19
4.2	Purifikace LTP	19
4.2.1	FPLC	19
4.2.2	HPLC	19
4.2.3	SDS-PAGE	19
4.3	Důkaz biologické aktivity	20
5	Výsledky	21
5.1	Expres LTP	21
5.2	FPLC	22
5.3	SDS-PAGE	22
5.4	HPLC	24
5.5	Cirkulární dichroismus	25
5.6	Fluorescenční důkaz biologické aktivity	26
6	Diskuse	27
7	Závěr	28
8	použité zdroje	29
	Seznam obrázků a tabulek	31

1 ÚVOD

Nespecifické lipid transfer proteiny (nsLTPs) jsou velká skupina proteinů, nacházejících se v malém množství ve všech suchozemských rostlinách. Jsou to poměrně malé proteiny s molekulovou velikostí do 10 kDa, které jsou dobře rozpustné ve vodě, což je činní ideálními pro pohyb v hydrofilním prostředí uvnitř rostlin. Jejich izoelektrický bod se pohybuje v rozmezí 8-10. LTP proteiny dosud nebyly nalezeny uvnitř žádných řas či jiných podobných organismů. Zajímavý je i fakt, že LTP proteiny jsou nejčastější příčinnou alergie na potraviny ve Středozezemním regionu. Společným znakem LTP proteinů je jejich struktura, konkrétně čtyři alfa-helixy stabilizované čtyřmi disulfidickými můstky, které tvoří a stabilizují vnitřní nepolární dutinu, do které se mohou vázat hydrofobní molekuly, či jiné ligandy. Na základě podobnosti struktury se LTP proteiny dělí do pěti hlavních (LTP1, LTP2, LTPc, LTPd a LTPg) a pět vedlejších (LTPe, LTPf, LTP h, LTPj, LTPk) skupin. Kompaktní struktura činní LTP proteiny velmi odolné vůči teplu a jiným denaturačním podmínkám. *In vitro* experimenty ukázali schopnost LTP proteinů vázat jak nasycené, tak i nenasycené mastné acylové řetězce přítomné v různých molekulách, tak samotné volné mastné kyseliny. Biologická role LTP proteinů zatím zůstává nejasná. Většina současných studií však směřuje k závěru, že jsou nezbytné pro depozici a funkčnost voskových a lipidových polymerů, jako je například suberin, či kutikula. Další důležitá funkce LTP proteinů je jejich zapojení v obranném mechanismu rostlin proti patogenům, ať už v rámci inhibice růstu hub, či formování kutikuly tvořící ochrannou hydrofobní vrstvu na povrchu listových pletiv. LTP proteiny jsou rovněž schopné rozvolňovat buněčnou stěnu a umožňovat tak rostlinné buňce růst a diferenciovat se. Samotný mechanismus a principy těchto funkcí nám ovšem nejsou dodnes zcela známy. V závislosti na konkrétním typu LTP proteinu budou tedy různé skupiny pravděpodobně plnit několik různých funkcí najednou. Tato práce se poté zaměřuje na jejich potenciální roli v rámci imunitního systému rostlin proti biotickým stresovým faktorům.

Teoretická část této práce se zabývá strukturou LTP proteinů z chemického a biochemického hlediska, jejich rolí při depozici látek na povrch rostlinných pletiv, při expanzi buněk a schopnosti LTP proteinů inhibovat růst a vývoj patogenů.

Praktická část se poté zaměřuje na úspěšnou expresi čtyř LTP proteinů, různého typu, jejich purifikaci, potvrzení jejich správného sbalení s následným ověřením a jejich biologické aktivity.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část této práce se zabývá obecným popisem biologických rolí, jež LTP proteiny zastávají, jejich vlivu na obranyschopnost organismu, jejich strukturu. Zaměříme se zde i na způsob navazování ligandů a vlastnosti hydrofobní dutiny LTP proteinů. Zároveň zde zmíníme kvasinky *Pichia pastoris*, které byly využity k expresi zkoumaných proteinů.

2.1 Biologická role lipid transfer proteinů

LTP proteiny se vyskytují v malém množství v tělech všech suchozemských rostlin. Plní zde vícero rolí, které může zastupovat i více různých LTP proteinů, jako například tvorba hydrofobní ochranné vrstvy, stabilizace adheze, rozvolňování buněčné stěny, či případně v imunitní odpovědi rostliny, jako inhibitor, či jako nosič SAR nabuzujícího signálu.

2.1.1 Depozice lipidů na povrch rostliny

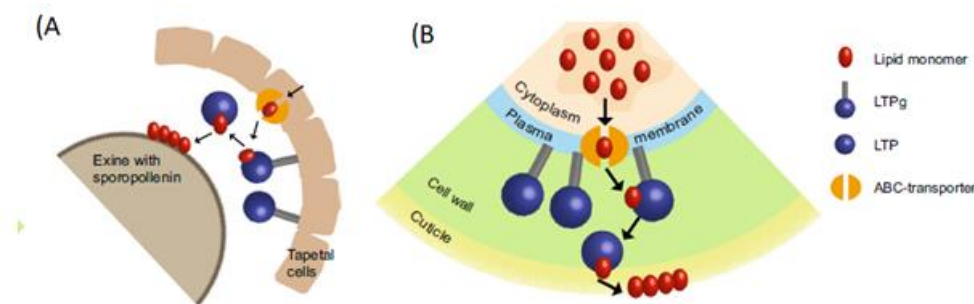
Suchozemské rostliny jsou chráněny před abiotickým a biotickým stresem, ztrátou vody, radiací, patogeny a býložravci polopropustnou primární buněčnou stěnou, vosky a hydrofobními lipidovými polyesterami, jako jsou například suberin, kutin, či sporopollenin (Edqvist *et al.*, 2018).

Suberin je látka příbuzná vosce, která je přítomná v buněčné stěně vyšších rostlin a má zabránit pronikání vody v rámci pletiv. Většinou je přítomná v obalech semen, rostlinné epidermis, či stonku, kde se akumuluje ve vrstvách mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Kutin je jedním ze dvou voskových polymerů tvořících kutikulu rostliny. Jedná se o nerozpustnou lipidickou látku odpuzující vodu a pokrývající vnější povrch buněčné stěny nadzemních orgánů rostlin. Sporopollenin je poté další velmi komplexní biopolymer s lipidovým základem, tvořený především nasycenými prekurzory. Sporopollenin se nachází ve vnější ochranné vrstvě spor a pylových zrn a ochraňuje je před vnějšími podmínkami a patogeny. Sporopollenin není rozpustný ve vodě ani organických rozpouštědlech, což jej činí chemicky zcela inertní (Samuels, Kunst and Jetter, 2008; Ranathunge, Schreiber and Franke, 2011; Fich, Segerson and Rose, 2016; Edqvist *et al.*, 2018).

Syntéza kutikuly, suberinu a sporopolleninových polymerů vyžaduje nejprve syntézu prekurzorů, která probíhá hlavně v endoplazmatickém retikulu. Toto je následováno přenosem prekurzorů do extracelulárního prostoru přes plazmatickou membránu. Tento proces je umožňován ABC- nebo ABCG-transportéry v plazmatické membráně, kdy po dosažení extracelulárního prostoru se musí ještě prekurzor přemístit na místo, kde započne syntéza vlastního polymeru (Pighin *et al.*, 2004; Do, Martinoia and Lee, 2018; Edqvist *et al.*, 2018).

Podle nedávných studií se posledního výše zmíněného kroku účastní právě LTP proteiny, které se tak podílí na zprostředkovávání přenosu lipidových polymerů a voskových komponentů do míst vzniku vlastních polymerních struktur extracelulární straně plazmatické

membrány. Tento proces nejspíše zahrnuje i průchod vosků nebo prekurzorů polymerů skrz buněčnou stěnu pro tvorbu kutikuly nebo pro ukládání suberinu. Do dnešního dne však nebylo objasněno, jak přesně LTP proteiny pomáhají při přenosu hydrofobních stavebních částí polymerů skrz extracelulární prostor. Je možné, že ABC transportéry předávají polymerové součásti LTPg proteinům, které jsou přichycené k apoplastické straně plazmatické membrány skrze svou GPI-kotvu. Následně mohou být tyto součásti předány jinému LTP proteinu, který dokáže volně prostupovat apoplastem (DeBono *et al.*, 2009; Edqvist *et al.*, 2018) (Obrázek 1).



Obrázek 1: Schematický model depozice lipidových monomerů pomocí LTP A) při tvorbě sporopoleninové ochranné vrstvy pylových zrn B) při tvorbě kutikuly (zdroj)

Roli LTP proteinů v depozici lipidů podporuje i analýza knockdown mutantu AtLTPg1 rostliny *Arabidopsis thaliana*, který vyústil ve zmenšení voskové vrstvy na stonku (Salminen, Blomqvist and Edqvist, 2016). Zajímavé je, že nadměrná exprese BrLTPd1 genu v rostlině *Brassica napus* způsobila snížení voskové depozice na listech a morfologické změny listů a květů. Je možné, že nadměrná exprese BrLTPd1 vedla k nesprávné depozici vosku na povrchu, či inhibici dalších LTP proteinů, které jsou zapojené v depozici vosků (Liu *et al.*, 2014; Edqvist *et al.*, 2018).

U rostlin rýže umlčení genu OsC6 (později přejmenován na OsLTPg25) vedlo ke snížení pylové plodnosti, kdy tyčinky sice prošly běžným vývojem, ale následně došlo k předčasnému vypuštění mladých zrn (Zhang *et al.*, 2010).

Data ukazují, že některé LTP mají adhezivní funkci a stabilizují interakce mezi hydrofobními polymery a hydrofilní buněčnou stěnou (Žamberský, 2021).

2.1.2 Rozvolňování buněčné stěny

Rostlinné buňky jsou na rozdíl od buněk živočišných obaleny buněčnou stěnou, která jim zajišťuje ochranu, udržuje její tvar a zároveň působí jako vnější kostra působící proti turgorem stimulovaného růstu. Kvůli tomu musí být buněčná stěna rigidní a zároveň schopná růstu, či zvětšování. Důležitá vlastnost buněčné stěny je tak visko elasticita, kdy stěna vykazuje znaky plastické, a i elastické deformace, když je vystavena mechanické síle. Vlastní buněčná stěna se dělí na primární stěnu, střední lamelu a sekundární stěnu. Primární buněčná stěna existuje u všech rostlin a je tvořena sítí celulóзовých fibril zabudovaných do matrix

tvorených hemicelulózou, pektinem a malým množstvím strukturních proteinů. Primární buněčná stěna je plastická a uplatňuje se při růstu buňky. Oproti tomu sekundární buněčná stěna je tužší a pevnější vrstva tvořená poté, co buňka dokončí svůj růst a slouží především ke konečnému zpevnění struktury buňky. Mikrofibrily celulózy zajišťují nosnou strukturu, která je držena pohromadě pomocí rozvětvených polysacharidů. Zdá se, že polysacharidová vlákna jsou spojena pomocí nekovalentních interakcí. Tato struktura je homologní pro většinu rostlin, avšak způsob, kterým se tato síť pojí, se pro jednotlivé druhy rostlin liší. Tlak turgoru ovšem zůstává v zájmu homeostázy konstantní, proto záleží růst buňky na rigidnosti buněčné stěny. Expanze buněčné stěny tedy spočívá v aktivním snižování rigidnosti buněčné stěny, což se následně projeví v klouzavém pohybu polymerů v rámci stěny po sobě (Nieuwland *et al.*, 2005; Edqvist *et al.*, 2018; Žamberský, 2021).

Zvětšování buňky je tak podmíněno rozvolňováním buněčné stěny. Síla, které pohání tuto expanzi, se nazývá turgor. Zdrojem turgoru je osmotický tlak, kdy v buňce je zvýšená koncentrace solí oproti okolnímu prostředí a tento rozdíl koncentrací pohání molekuly vody přes semipermeabilní membránu dovnitř buňky. Molekuly vody tedy mají tendenci proudit dovnitř buňky, což rozpíná buněčnou membránu, jejímuž rozpínání zabraňuje právě buněčná stěna. Schopnost rozvolňovat buněčnou stěnu byla nalezena u rodiny proteinů expansinů, a to bez detekce jakékoli běžné enzymatické aktivity (Blein *et al.*, 2002; Nieuwland *et al.*, 2005; Žamberský, 2021).

Tato schopnost však byla nalezena i v případě LTP proteinů, kdy u apoplastické tekutiny z rostlin tabáku jediná SDS-PAGE frakce, která vykazovala aktivitu rozvolňování buněčné stěny, obsahovala 8,8 kDa protein o pI hodnotě 9. Tento purifikovaný protein prokázal schopnost rozvolňovat buněčnou stěnu u hypokotylu okurky seté a analýza jeho N-koncové sekvence odhalila 100 % shodu s LTP proteinem ToLTP2, který byl izolován z cDNA knihovny tabáku. Další důkaz aktivity LTP proteinů v rámci rozvolnění buněčné stěny byl proveden s purifikovanými LTP proteinem ze semen pšenice, u kterých byla tato schopnost rovněž pozorována. Následný důkaz role právě LTP proteinů v tomto procesu byl proveden pomocí umlčení exprese LTP proteinu v tabáku pomocí RNA interference, kdy apoplastická tekutina nevykazovala žádnou aktivitu rozvolňování buněčné stěny (Nieuwland *et al.*, 2005).

Důležité je rovněž uvést, že LTP proteiny a expansiny nesdílí žádné sekvenční ani strukturní podobnosti. Jak již bylo mnohokrát v této práci zmíněno, LTP proteiny se skládají ze čtyř až pěti α -helixů, zatímco dominantní sekundární struktura expansinů je β -skládaný list. Bylo však zjištěno, že vliv na aktivitu rozvolňování buněčné stěny má i dostupnost hydrofobní dutiny, kdy LTP proteiny s dutinou obsazenou benzenem a β -sitosterolem nevykazovaly žádnou aktivitu, zatímco čistý LTP protein ano (Nieuwland *et al.*, 2005).

I když do dnešní doby není znám přesný způsob, jakými interakcemi jsou k sobě polymerní řetězce v rámci buněčné stěny propojeny, podle nejnovějších modelů existují v buněčné stěně speciální místa, tzv. „hot spots“, ve kterých jsou vlákna celulózy propojena. Tyto „hot spoty“ mohou být poté právě místem působení proteinů expansinů a dalších enzymů a proteinů podílejících se na rozvolnění buněčné stěny (Nieuwland *et al.*, 2005).

2.1.3 Inhibice patogenů

LTP proteiny, nacházející se v buněčné stěně a kutikule, mohou být sekretovány do extracelulárního prostoru pomocí signálního peptidu, kde se mohou poté podílet na imunitní reakci rostlinných buněk. LTP proteiny jsou schopné inhibovat růst patogenů, kdy efektivita inhibice vybraných patogenů však byla u různých LTP proteinů rozdílná. Jejich efektivita proti bakteriálním patogenům byla obecně vyšší, než proti patogenům houbového původu. Trypsin a papain jsou proteázy podílející se na trávení, kdy štěpí peptidické vazby. Po jejich inkubaci s LTP proteinem byla jeho inhibiční aktivita proti patogenům narušena, což dokazuje, že se na antimikrobiální aktivitě podílí vlastní struktura proteinu. Antimikrobiální aktivita LTP proteinů bývá často srovnávána s thioniny, u kterých je známo, že hrají roli v obraně rostlin proti infekcím. Tuto hypotézu o jejich roli v obraně rostliny podporuje i analýza exprese po napadení rostliny mikroorganismy. Infekce patogenem *Erysiphe graminis* vedla ke zvýšené expresi genů pro nsLTP, kdy zároveň byla zaznamenána i zvýšená exprese genů pro thioniny a další geny spojené s patogenezí. Ke zvýšení exprese mRNA spojených s expresí nsLTP nad normální úroveň došlo během pár hodin po infekci. V tuto chvíli ovšem stále není znám přesný mechanismus toho, jak LTP proteiny patogeny inhibují (García-Olmedo *et al.*, 1995; Žamberský, 2021).

2.1.4 Signální role LTP v imunitní reakci rostlin

Elicitory jsou obecně sloučeniny, které jsou schopny stimulovat biosyntézu jiné sloučeniny uvnitř buněčného organismu, či žádanou sloučeninu aktivovat (Blein *et al.*, 2002).

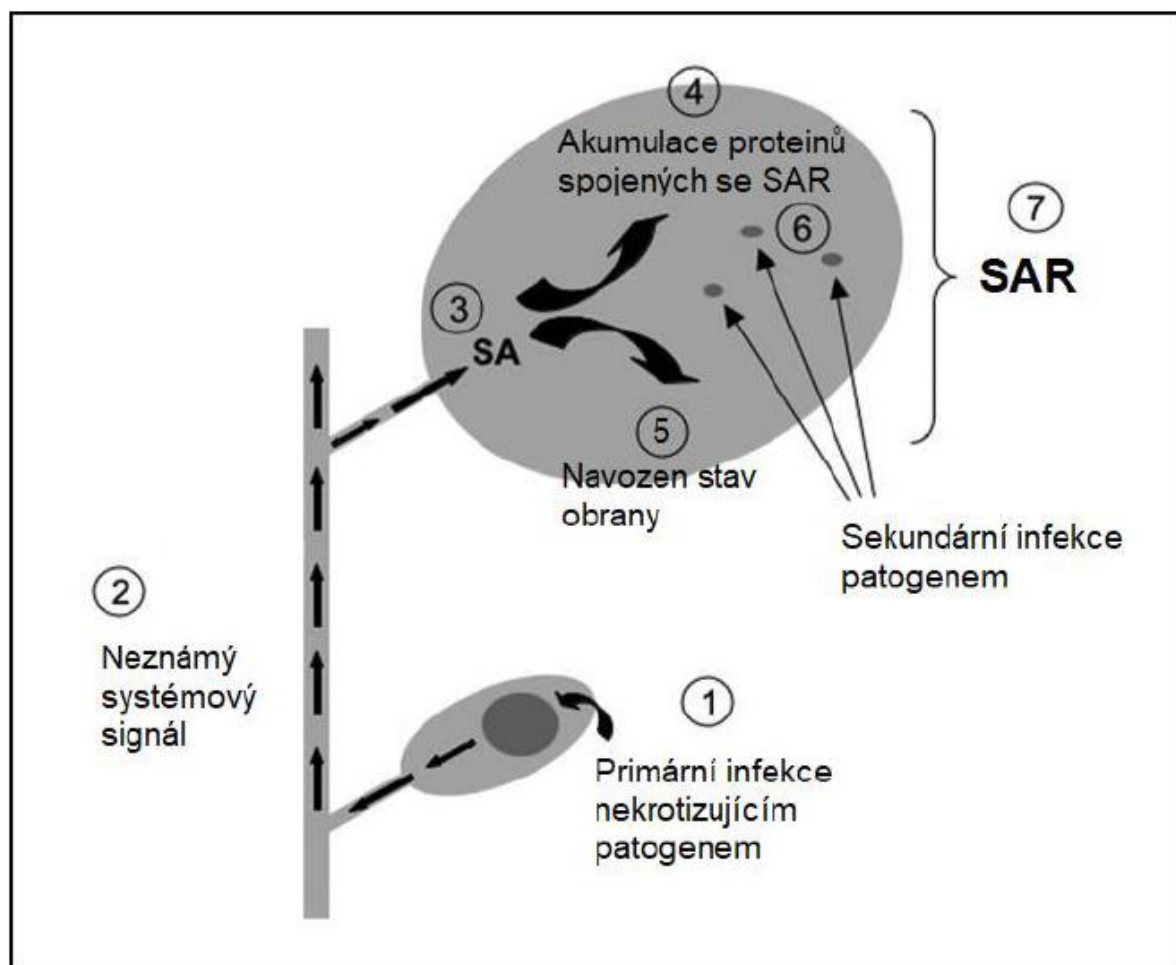
Elicitin je, jak už může být z názvu patrné, jeden z elicitorů. Tento elicitor je tvořen fytopatogenními oomycetami rodů *Phytophthora* a *Pythium*, a zároveň je to spouštěč rostlinné imunitní reakce proti patogenům. Jedna zvláštnost, která odlišuje elicitiny od ostatních elicitorů je jejich schopnost vázat steroly. Toto je nejspíše i jejich hlavní biologická funkce, jelikož si oomycety rodů *Phytophthora* ani *Pythium* nedokážou syntetizovat steroly potřebné pro jejich reprodukci. Elicitin tedy nejspíše funguje jenom jako nespecifický přenašeč pro transport sterolů z hostitele, pro možnost zahájení sexuální a asexuální reprodukce patogenu. Tato schopnost vázat na sebe sterol a tvořit komplex je zároveň velice důležitá vzhledem k imunitnímu systému rostlin, jelikož sterol-elicitinový komplex aktivuje biologickou odpověď rostlinné buňky. Transport sterolu z rostlinné plazmatické membrány umožňuje elicitinu navázat se na receptor, který následně aktivuje obranný mechanismus rostliny (Ricci *et al.*, 1989; PanabiÈRes *et al.*, 1997; Blein *et al.*, 2002).

Nedávno bylo zjištěno, že nsLTP1 protein se váže s vysokou afinitou k plazmatické membráně rostlin, kdy místo vazby bylo identifikováno jako receptor pro vazbu elicitinů. nsLTP1 protein a elicitiny ovšem nesdílí sekvenční identitu a ani homologní strukturu. Je ovšem možné předpokládat, že některé α -helixy nsLTP1 proteinu a elicitinů se mohou vzájemně prostorově překrývat, což by vysvětlovalo jejich vzájemnou afinitu ke stejnému receptoru na plazmatické membráně. Nicméně jejich způsob vazby k receptoru je rozdílný, kdy vazba elicitinu vyústí v hypersenzitivní reakci charakterizovanou buněčnou smrtí a následnou nespecifickou systémovou rezistencí. Tato buněčná reakce je ovšem inhibována

po vazbě nsLTP1 proteinu na receptor, takže nsLTP1 protein se zde chová jako antagonist elicitinů. V této chvíli není známo, zda je pro interakci s receptorem potřeba, aby nsLTP1 protein vytvořil komplex s lipidem. Je ovšem známo, že některé kutinové monomery mohou být v důsledku houbové infekce uvolněny z kutinu a následně mohou spustit obrannou reakci rostliny (Buhot *et al.*, 2001).

Některé rostliny poté reagují na elicitiny pouze slabě. Tento jev může být vysvětlen konkurencí elicitinu a LTP proteinů, jelikož rostliny se slabou reakcí na elicitiny mají zároveň přibližně desetkrát větší koncentraci LTP proteinů (například rajčata), než rostliny reagující na elicitin normálním způsobem, jak bylo popsáno výše (například tabák) (Blein *et al.*, 2002).

Další důležitá součástí imunitní obrany rostlin je systémová imunitní odpověď (SAR). SAR je obranná reakce proti infekci patogenem indukovaná napadením, často doprovázená nekrotizací způsobenou jako symptom infekce, či jako důsledek hypersenzitivní odpovědi buňky na infekci. Signál indukující SAR se šíří z místa infekce a navazuje stav obrany proti širokému spektru patogenů v pletivech nezasazených infekcí. Stav zvýšené obrany může v rostlině setrvat několik týdnů, či v některých případech i celou sezónu. Přesný mechanismus SAR není znám, kdy pravděpodobně se zde uplatňují proteiny s anti-patogenní aktivitou (Žamberský, 2021). (Obrázek 2)



Obrázek 2: Schéma přenosu signálu po nabuzení SAR 1) primární infekce rostlinného pletiva způsobuje nekrózu, 2) DIR1 přenáší signál vyvolaný infekcí po řápíku, 3) akumulace kyseliny salicylové (SA), 4) aktivace tvorby SAR indukovaných proteinů, 5) v pletivu je navozen stav obrany 6) případná sekundární infekce patogenem je efektivně potlačena. Převzato z článku (Systemic Acquired Resistance - PMC, no date)

Napadené pletivo při SAR produkuje signál zatím neznámého charakteru, který se přenáší floémem (není ovšem vyloučen přenos z buňky na buňku, či nějaká kombinace obou). Pro navození SAR je zapotřebí zvýšená koncentrace kyseliny salicylové, která ovšem není zapojená do samotného přenosu signálu. Do přenosu signálu SAR je se vši pravděpodobností zapojen protein AtLTPd1 (DIR1), který se pohybuje při napadení tkáně v řápíku. Dosud však není znám princip, kterým tento LTP protein SAR indukuje (Salminen, Blomqvist and Edqvist, 2016; Žamberský, 2021; *Systemic Acquired Resistance* - PMC, no date).

2.1.5 LTP jako alergen

Rostlinné LTP proteiny jsou nejčastějším zdrojem alergické reakce na potraviny rostlinného původu v oblasti středomořího moře. Zajímavé také je, že výskyt LTP senzitivních alergií v Severní Evropě a Severní Americe je pouze minimální. Vystavení pylu břízy nejspíše tuto

senzitivitu vůči LTP proteinům do jisté míry potlačuje. Toto by mohlo vysvětlit geografickou distribuci alergií spojených s LTP proteiny, jelikož bříza se vyskytuje pouze v severních oblastech Evropy i Ameriky. Protein Prup3 je LTP protein broskve, jež je považován za marker odpovědný za silné systémové reakce na potraviny rostlinného původu, kdy dominuje imunitní odpověď na LTP proteiny. LTP proteiny jsou hojně exprimované ve většině rostlin, tudíž LTP senzitivní jedinci budou vykazovat reakce vůči velkému počtu potravin rostlinného původu (Edqvist *et al.*, 2018).

2.2 Chemické a fyziologické vlastnosti LTP proteinů

LTP proteiny jsou menší proteiny, jejichž molekulová velikost nepřesahuje 10 kDa, zároveň jsou velmi dobře rozpustné ve vodě a hydrofilním prostředí, jejich pI se pohybuje v rozmezí 8-10. Zajímavá je jejich struktura, která tvoří hydrofobní dutinu veprostřed proteinu a hydrofilní vnější část proteinu, díky níž se protein může bez potíží pohybovat v extracelulárním prostředí.

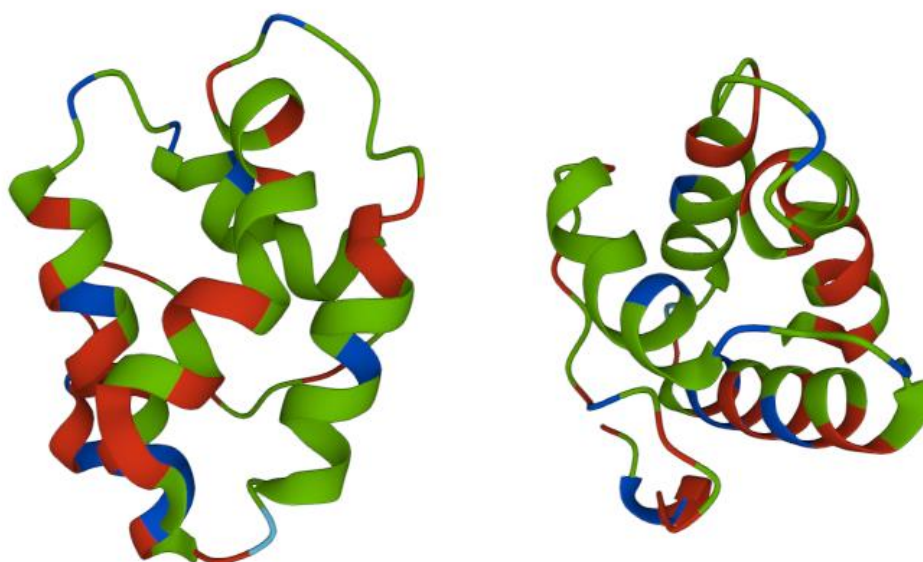
2.2.1 Struktura LTP

Struktura LTP proteinů je homologní a konzervovaná napříč různými druhy rostlin. Naprostá většina LTP proteinů je složena zpravidla ze čtyř, či pěti alfa-helixů sbalených oproti C-konci, které jsou vůči sobě stabilizované disulfidickými můstky tvořenými osmi konzervovanými cysteiny, jejichž motiv má obecně podobu C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C. Jejich primární struktura obsahuje sekvenci pro signální peptid, díky které jsou sekretovány do apoplastu, což zřejmě souvisí i s jejich biologickou funkcí. Zbylé oblasti proteinu jsou zpravidla nestrukturované, nebo vytváří beta smyčky. Jak N-konec prvního helixu (H1) tak i C – koncová část jsou propojeny s třetím helixem (H3) pomocí dvou disulfidických můstků. Pozice druhého helixu (H2) je stabilizována dvěma disulfidickými vazbami; jedna z nich propojuje N-koncovou část H2 s C-koncovou částí H1 a druhá propojuje H2 s čtvrtým helixem (H4). LTP proteiny jsou exprimované s N-koncem, díky kterému může být protein sekretován do apoplastického prostoru. Homologní struktura LTP proteinů je velice odolná vůči tepelné denaturaci a jiným denaturujícím podmínkám (Salminen, Blomqvist and Edqvist, 2016; Edqvist *et al.*, 2018; Žamberský, 2021) (Obrázek 3).

Vnitřní hydrofobní dutina prochází napříč celým proteinem je tvořena zbytky z H1, H2, H3, H4, dále dlouhou smyčkou mezi H3 a H4 a C-koncovou částí. Vzniklá hydrofobní dutina může tvořit jeden celek, nebo může být rozdělena na několik menších dutin. Příklad této vlastnosti je tabákový LTP1 protein. Do vnějšího prostředí naopak směřují bazické aminokyselinové zbytky argininu a lysinu, které udělují LTPs bazický náboj (pI 8-10), podílí se na rozpustnosti a vzájemných interakcích LTPs s okolím (Salminen, Blomqvist and Edqvist, 2016). (Obrázek 4)



Obrázek 3: Vizualizace nsLTP2, zvýrazněno je zde také 8 cysteinů (žlutá) jež tvoří disulfidické stabilizující můstky.

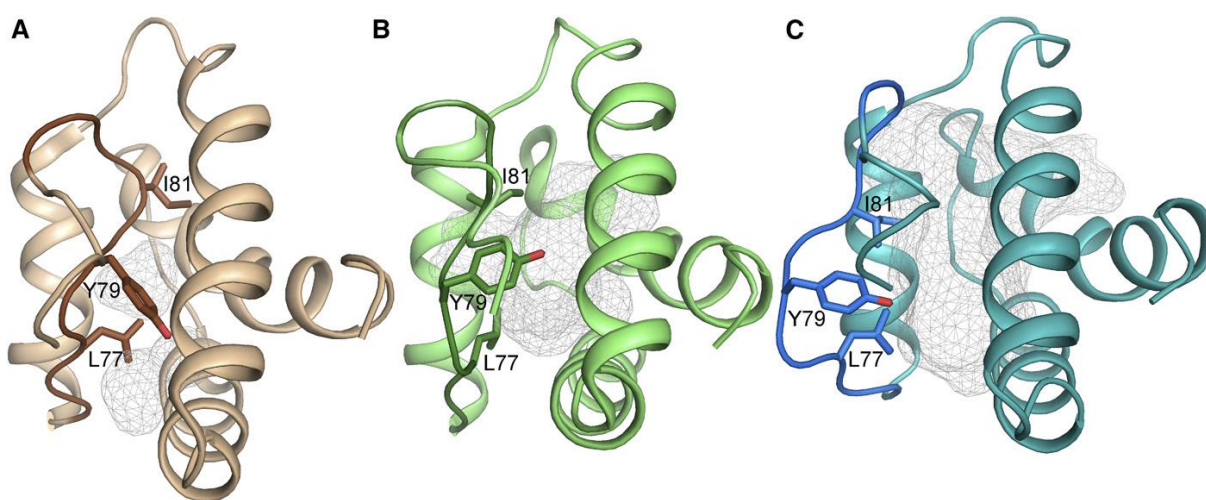


Obrázek 4: Vizualizace nsLTP2, kde se nepolární aminokyseliny (zelená) nacházejí hlavně kolem centrální dutiny a polární aminoskupiny (červená) hlavně na vnější straně proteinu.

2.2.1 Vazba ligandu

LTP proteiny mají *in vitro* schopnost vázat lipidy. Alifatický řetězec lipidu se váže do hydrofobní dutiny, zatím co polární koncové skupiny jsou směřovány k oblastem rozpouštědla na obou koncích dutiny (Salminen, Blomqvist and Edqvist, 2016). Přes všechny společné znaky LTP proteinů existují výrazné rozdíly v terciární struktuře. Tyto rozdíly se mohou projevovat třeba polaritou v různých místech dutiny, či ve stavbě této dutiny. Ta může tvořit jeden celek, nebo může být rozdělena na několik menších dutin. Velikost dutiny také závisí na různých LTP proteinech, přičemž vazebné možnosti nemusí nutně korelovat s její

velikostí (Žamberský, 2021). Růst velikosti dutiny je důsledek konformačních změn v nestrukturovaném C-konci celého proteinu. Konkrétně zbytek tyrozinu nacházející se poblíž vstupu dutiny je klíčový proteinogenní zbytek, který nejspíše kontroluje tvar, velikost a vazební kapacitu hydrofobní dutiny. Zajímavá je skutečnost, že v určitých LTP proteinech (např.: TaLTP1.1; ZmLTP1.6; OsLTP1.18; NtLTP1.1) některé ligandy (např.: DMPG) způsobují změnu v orientaci aromatického benzenu v tyroinu směrem ven do rozpouštědla, čímž se znemožní tvorba vodíkových můstků mezi tyrozinem a ligandem, zatímco si jiné ligandy (např.: PGB) zdánlivě přizpůsobují orientaci zbytku tyrozinu, aby došlo k tvorbě stabilizujících vodíkových můstků. Z tohoto vyplývá, že charakteristika a vlastnosti ligandu ovlivňují 3D strukturu uvnitř a kolem dutiny (Edqvist *et al.*, 2018). Například navázáním cholesterolu do dutiny LTP2 proteinu pocházejícího z rýže se objem dutiny zvětšil z 132,55 Å na 325,59 Å a při vazbě ergosterolu byl objem dutiny zvětšen na 294,81 Å. (Da Silva *et al.*, 2005; Salminen, Blomqvist and Edqvist, 2016; Žamberský, 2021).



Obrázek 5: Tvar a velikost hydrofobní dutiny proteinu TaLTP1.1 A) bez ligandu, B) v komplexu s PGB₂ a C) v komplexu s dvěma molekulami LMPC. Velikost dutiny je upravována a měněna velikostí navázaného ligandu pohybem C-koncových aminokyselinových zbytků, zde vymodelovaných jako tyčinky. (Edqvist *et al.*, 2018)

Některé LTP proteiny mohou vázat jen jeden řetězec, zatímco jiné mohou díky přítomnosti dvou vazebných míst vázat řetězce dva, přičemž afinita k druhému řetězci je výrazně snížena. Vazba prvního řetězce v nsLTP1 proteinu pocházejícím z pšenice je zprostředkována silnými hydrofobními interakcemi, zatímco druhý řetězec je vázán s druhým vazebným místem výrazně slaběji (Žamberský, 2021). Oproti tomu LTP1 protein z tabáku je schopen vázat jen jeden lipid a druhé vazebné místo je nedostupné. Toto je především díky velmi silným hydrofobním interakcím, které nedovolují změnu konformace a otevření dutiny pro navázání druhého lipidu (Žamberský, 2021). Důležité je uvést, že disulfidické můstky stabilizující strukturu proteinu hrají důležitou roli v schopnosti vázat nepolárních alifatické řetězce. Redukce těchto disulfidických můstků činidlem dithiothreitolu vedla k přerušení stabilizujících vazeb mezi alfa-helixy a podstatnému snížení schopnosti LTP proteinu vázat nepolární řetězce (Zachowski *et al.*, 1998; Douliez *et al.*, 2001; Žamberský, 2021) (Obrázek 5).

2.3 Kvasinky *P. pastoris*

Biologické expresní systémy jsou v dnešní době používány v medicíně a průmyslových odvětvích pro produkci heterologních proteinů. Mezi tyto proteiny patří vakcíny, léky nebo zemědělské produkty. Kvasinky jsou eukaryotické buňky, jež jsou široce používány pro expresi různých proteinů pro farmaceutický průmysl. Zároveň mají pro produkci proteinů spoustu výhod, například rychlé množení, jednoduché a nenákladné výživové požadavky, vysokou úroveň exprese a rychlý a jednoduchý transformační proces. Na rozdíl od bakterií se také vyznačují schopností posttranslačních modifikací, sekrečních expresí a jednoduché genetické manipulace. Další výhodou kvasinek nad bakteriemi a jinými jednobuněčnými organizmy je možnost jednoduché integrace cizí linearizované DNA do chromozomů (Daly and Hearn, 2005; Institute of Animal Health and Veterinary Biologicals, KVAFSU, Hebbal, Bengaluru-560024, Karnataka, India *et al.*, 2016).

Kvasinky *P. pastoris* byly poprvé izolovány z výměšku kaštanovníku ve Francii. Bylo prokázáno, že *P. pastoris* jako uměle vytvořený methylotrófní mikroorganismus může využívat methanol jako jediný zdroj uhlíku a energie. Kmen GS115 je jedním z nejpopulárnějších kmenů, které jsou využívány v důležitých expresních systémech. *Pichia pastoris*- GS115 kmen má 2 kódující geny (AOX1 a AOX2) enzymu alkoholoxidázy (AOX). V přítomnosti methanolu je indukována transkripce genů AOX1 a AOX2, které vyprodukují AOX enzym (Vanz *et al.*, 2012; Zahrl *et al.*, 2017).

Expresní systém kvasinek *P. pastoris* je schopen tvorby různých rekombinačních proteinů, kotranslačních a posttranslačních úprav, tvorby disulfidických vazeb a rychlé exprese. Jsou schopny i přímé exprese proteinů přímo do supernatantu kulturního média. Zároveň je díky omezené produkci endogenních sekrečních proteinů čištění supernatantu výsledná izolace proteinu snadné (Cereghino *et al.*, 2002; Byrne, 2015).

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Cíle

Jako cíle této středoškolské odborné činnosti byly vybrány následující body:

- 1) Exprese čtyř LTP proteinů: NtLTP2_AB518680 (proteinové č. E3W9R1, označován dále jen jako LTP A), NtLTP2_D13952 (Q03461, dále jen jako LTP D), NtLTP1_X62395 (Q42952, dále jen jako LTP X) a LTP1_AY562132 (Q56V56, dále jen jako LTP Y).
- 2) Izolace a přečištění exprimovaných proteinů, pomocí HPLC a FPLC.
- 3) Ověření exprese LTP pomocí SDS-PAGE.
- 4) Důkaz biologické aktivity LTP.

4 METODIKA PRÁCE

4.1 Exprese LTP

Při expresi LTP proteinů jsme postupovali podle metodik v bakalářské práci Ondřeje Žamberského (Žamberský, 2021). LTP byly exprimované po dobu pěti dní kvasinkami *Pichia pastoris*- GS115 s naklonovaným plazmidem pPIC9, který nese sekvenci LTP kontrolované promotorem AOX1. Expresní médium bylo centrifugované při 5000 g po dobu 15 min a supernatant byl zakoncentrovaný pomocí ultrafiltrace na objem 25 ml.

4.2 Purifikace LTP

4.2.1 FPLC

Purifikace LTP byla docílena pomocí FPLC (z anglického fast protein liquid chromatography). Funguje na principu vázání jednotlivých proteinů na kolonu, ze které jsou následně postupně vyplavovány.

LTP proteiny jsou proteiny poměrně bazické a jejich izoelektrické body se tudíž nacházejí mezi hodnotami pI 9-11, vhodná tedy bude katexová kolona (SOURCE 15S). Dále byl použit 5 mM acetátový pufr o hodnotě pH=5,0. Tento pufr způsobil naprotonování aminokyselinových zbytků argininu a lysinu, které se následně při průchodu přes kolonu na ni zachytávaly. Obsah kolony byl postupně eluován gradientem NaCl a jednotlivé frakce eluovaných proteinů byly sbírány do zkumavek. Gradient měl profil postupně se lineárně zvyšující koncentrace NaCl z 0 mol/l na 1 mol/l za časový úsek 30 minut.

4.2.2 HPLC

LTP proteiny mají již od své exprese zaplněnou hydrofobní dutinu látkami přítomnými v buňce, kde byly syntetizovány, jeden způsob jak tyto nečistoty z dané dutiny odstranit je HPLC (z anglického high-performance liquid chromatography). Tato metoda používá podobného principu jako předešlé FPLC, ale na rozdíl od FPLC využívá vysokotlaké čerpadlo, které umožňuje průtok mobilní fáze kolonou úzkou kolonou, v níž je stacionární fáze vázána na částice o velikostech často i několik mikrometrů.

Na kolonu (Discovery® BIO Wide Pore C5 HPLC Column) stabilizovanou v roztoku 20 mM formiátu, 10mM síranu amonného a 20 % acetonitrilu bylo naneseno 300 µl vzorku proteinu. Následně došlo k eluci proteinu gradientem roztoku 100 mM formiátu a 50 % acetonitrilu. Gradient měl profil postupně se lineárně zvyšující koncentrace roztoku 100 mM formiátu a 50% acetonitrilu z 0 na 100% za časový úsek 15 minut.

4.2.3 SDS-PAGE

Jeden ze způsobů jak se dá určit přítomnost daného proteinu je metoda SDS-PAGE. Tato metoda je založena na rozdílné velikosti jednotlivých proteinů, což v praxi znamená, že při

vystavení elektrickému proudu budou jednotlivé proteiny unášeny skrz předem připravenou stacionární fázi (v našem případě gel) rychlostí závislou na jejich velikosti.

4.3 Důkaz biologické aktivity

LTP proteiny jsou velmi důležité pro chod organismu, jejich hlavní biologické funkce se vážou na jejich schopnost vázat hydrofobní ligandy do své hydrofobní dutiny.

Sekundární struktury proteinu byla zjištěna pomocí metody cirkulárního dichroismu v rozmezí UV 180-250 nm. Tato analýza odhalí přibližné zastoupení jednotlivých typů sekundárních struktur ve zkoumaném proteinu.

Biologická aktivita LTP byla sledována pomocí experimentu založenému na principu afinity proteinu k mastným kyselinám a jejich schopnosti vytěsnit TNS (2-p-toluidinylnaphthalene-6-sulfonate) z dutin LTP proteinů. TNS je sloučenina, která je schopná fluorescence, pokud je vázána v hydrofobním prostředí, jako například předem zmíněná hydrofobní dutina LTP. Samotný pokus probíhal ve fluorimetru při excitační vlnové délce 320 nm a emisní délce 437 nm.

V prvním měření byly kyvety naplněny pouze proteinem (250 nM) a roztokem TNS (3 μ M), pro zjištění fluorescence pozadí. V druhém měření byly k těmto roztokům přidány samotné mastné kyseliny (16 μ M), čímž by teoreticky mělo dojít ke snížení fluorescence, díky vytěsnění TNS mastnými kyselinami. Interakce byly sledovány v měřicím pufru (175 mM mannitol, 0,5 mM K_2SO_4 , 0,5 mM $CaCl_2$, a 5 mM MES, pH 7,0).

5 VÝSLEDKY

5.1 Exprese LTP

Jednotlivé LTP byly klonovány a amplifikovány bez signálního peptidu podle vybraných genových sekvencí (sekvence pro signální peptid je uvedena před lomítkem):

LTP A:

MKKGGNSFAAHLVVTLLVFLGFLVTEA / VTCSVVELSPCAGAISSPQPSSACCAKLKEQK-
PCLCGYLKNPNLRPYVNSPNAKRVAKSCGVPTPSC

LTP D:

MEMVGKIACFVVLCMVVVAPHAEA / LSCGQVQSG LAPCLPYLQGRGPLGSCCGGVKGLL-
GAAKSLSDRKTACTCLKSAANAIGIDMGKAAGLPGACGVNIPYKISPSTDCSKVQ

LTP X:

MEIAGKIACFVVLCMVVAAP-CAEA / ITCGQVTSNLAPCLAYLRNTGPLGRCCGGVKALVNS-
ARTTEDRQIACTCLKSAAGAISGINLGKAAGLPSTCGVNIPYKISPSTDCSKVQ

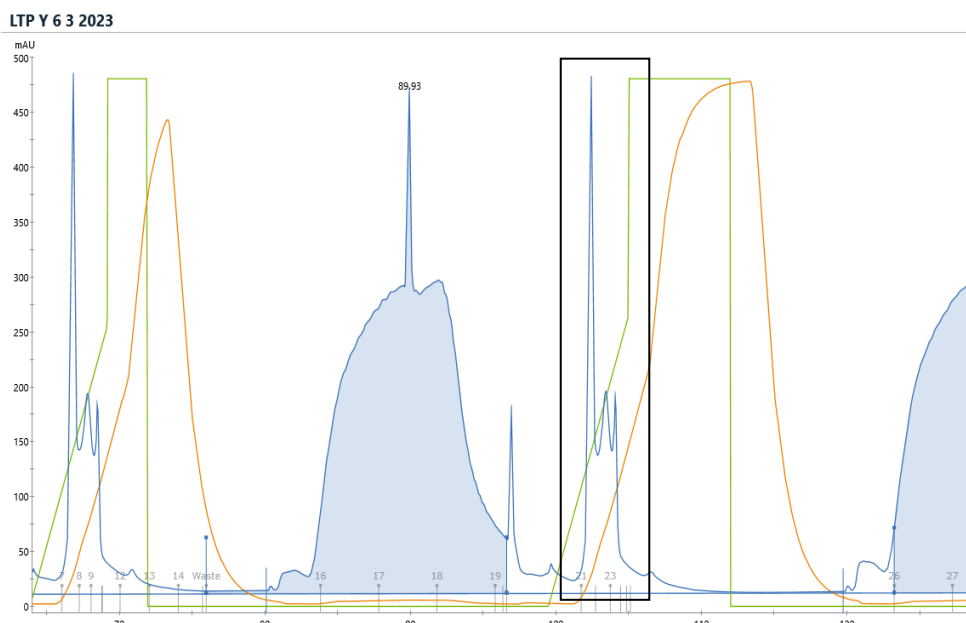
LTP Y:

MIKLAHSMKAVALLVVVCMAAVAVMLTPHADA / DISCGQVVASLSPCISYVRQGGAIPAP-
CCSGINSLNNQATSTPDRQTACNCIKSAAAGISGINFSLAGSLPSKCGVNLPYKISPSIDCSTVQ

Kolonie 4 typů kvasinek *Pichia Pastori* - GS115, do kterých byly vloženy gen pro expresi jednotlivých LTP, byla založena na miskách s pevným YPD médiem. Kultury byly na miskách ponechány po době 3 dnů za stálé teploty 30 °C, následně byly přeneseny do 100 ml tekutého expresního média v Erlenmeyerových baňkách (6 baňek po 100 ml pro každý protein). Ty byly přikryty kusem bavlny a do každé bylo přidáno 500 µl methanolu s biotinem (1 mg biotinu na 1 ml methanolu). Přítomnost methanolu v kvasinkách indukovala expresi daných LTP proteinů. Baňky s naočkovaným expresním médiem byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 5 dní, každý den do nich bylo přidáváno 500 µl methanolu, přičemž poslední den byl přidán 1 ml methanolu. (Žamberský, 2021)

Po 5 dnech inkubace byla z média odstraněna buněčná hmota centrifugací na 5000 × g po dobu 15 minut a zbylý supernatant byl uschován při teplotě - 20°C.

5.2 FPLC



Obrázek 6: FPLC závislost absorbance na čase - v ohraničené části grafu eluace proteinu, oranžová křivka pro vodivost, zelená pro koncentraci NaCl, modrá pro stupeň absorbance (280 nm).

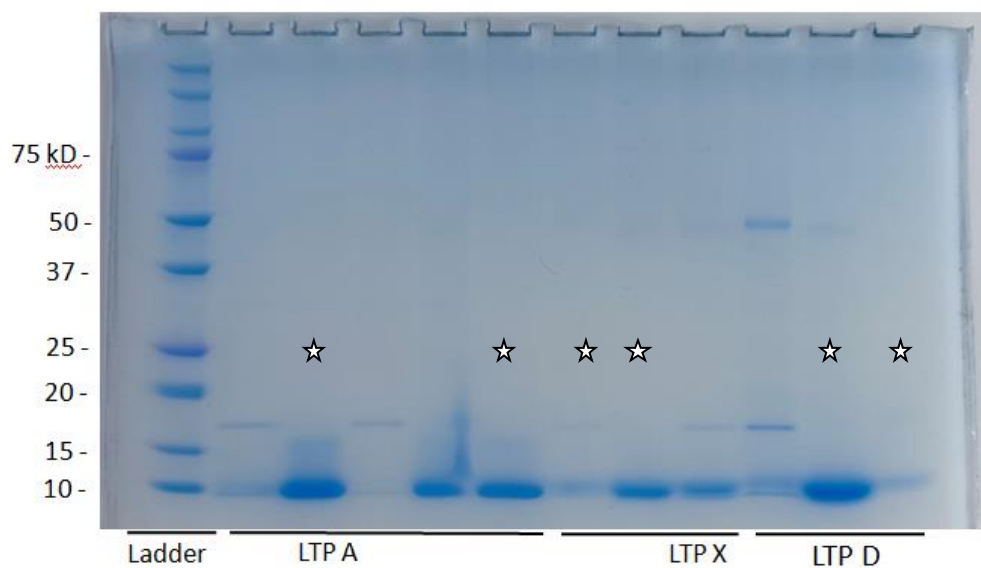
Proteiny byly úspěšně izolovány pomocí FPLC a rozděleny do jednotlivých frakcí pro následné ověření pomocí SDS-PAGE a separaci HPLC. V ohraničené části grafu je vidět zvýšení absorbance protékajícího roztoku skrz detektor FPLC, signalizující eluci proteinu usazeného na koloně. (Obrázek 6)

5.3 SDS-PAGE

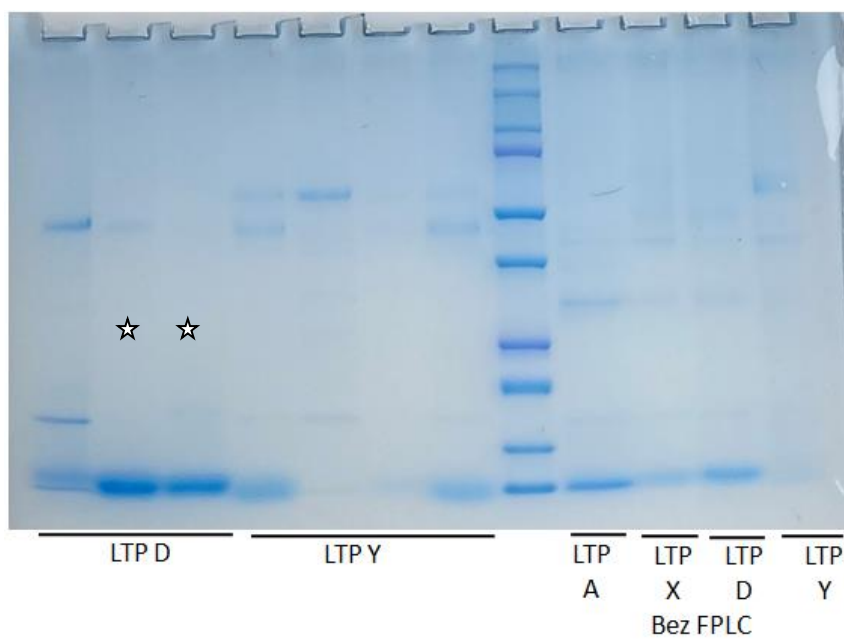
SDS-PAGE byla provedena pro všechny 4 proteiny, jenž byly separovány pomocí FPLC. Pro srovnání byl proveden i SDS-PAGE pro proteiny, jenž nebyly přečištěny pomocí FPLC. Bylo zde zjištěno, že LTP Y byl v eluovaných vzorcích přítomen pouze minimálně. U ostatních proteinů je vidět silná barevná stopa zanechaná proteiny o velikosti podobné LTP proteinům. (Obrázek 7)

V důsledku zjištění minimální přítomnosti LTP Y byly znovu kultivovány kvasinky *Pichia Pastoris*, pro další expresi LTP Y. Nově exprimované LTP Y byly izolovány, přečištěny FPLC a HPLC a znovu na nich byl proveden SDS-PAGE. (Obrázek 8)

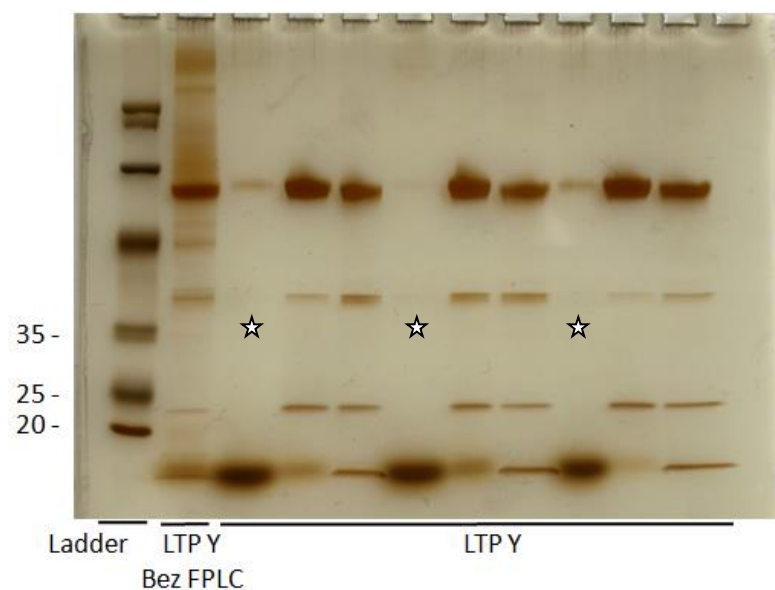
Dodatečná exprese LTP Y a následná izolace proběhla úspěšně, jak je vidět na výsledku dodatečné SDS-PAGE, kde je silná barevná indikace přítomnosti proteinu s identickou molekulární velikostí jako LTP Y, což by značilo přítomnost LTP Y proteinů. (Obrázek 9)



Obrázek 7: Výsledek SDS-PAGE pro LTP A, LTP X a první část LTP D (vlastní foto)



Obrázek 8: Výsledek SDS-PAGE druhou polovinu LTP D a LTP Y, zároveň zde byla provedena SDS-PAGE pro proteiny bez FPLC (vlastní foto)

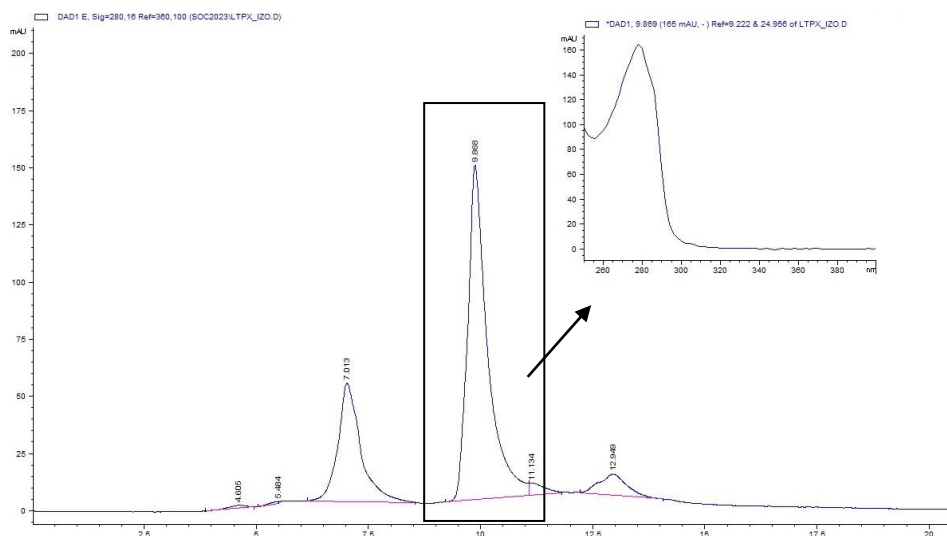


Obrázek 9: Výsledek dodatečné SDS-PAGE proteinu LTP Y (vlastní foto)

5.4 HPLC

Izolace proteinů v HPLC byla provedeno úspěšně. Daným peakům byly změřeny absorbance při různých vlnových délkách pro potvrzení přítomnosti proteinů, přičemž standardní vlnová délka, považovaná jako indikátor je 280 nm, což je absorbance aminokyselin tryptofanu a tyrosinu. (Obrázek 10)

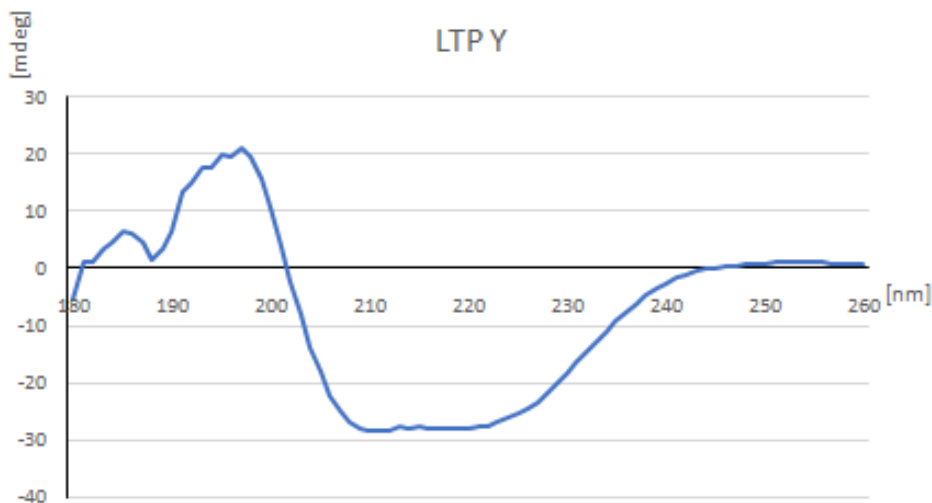
Jak FPLC tak HPLC jsou 2 nezbytné metody pro izolaci námi chtěných proteinů a i jejich přečištění. LTP proteiny syntetizované v buňce jsou neodvratně vystaveny v inkubačním prostředí hydrofobickým lipidům a mastným kyselinám, které obsazují centrální dutinu LTP proteinů, čímž zabraňují následnému potvrzování biologické funkce LTP proteinů, jelikož zabraňují LTP proteinům vytvořit komplex s TNS.



Obrázek 10: HPLC závislost absorbance na čase – v označené části grafu eluace proteinu, v menším grafu je vidět absorbance vlnové délky peaku.

5.5 Cirkulární dichroismus

CD pro všechny 4 proteiny byly testovány pro jejich fold profil. U všech 4 proteinů bylo potvrzeno převládající α -helix, přičemž největší zastoupení α -helixu bylo u proteinu LTP Y. Mimo α -helixů se ve foldu proteinů vyskytoval i β -SL paralelní a β -SL antiparalelní viz tabulka 1. (Obrázek 11)



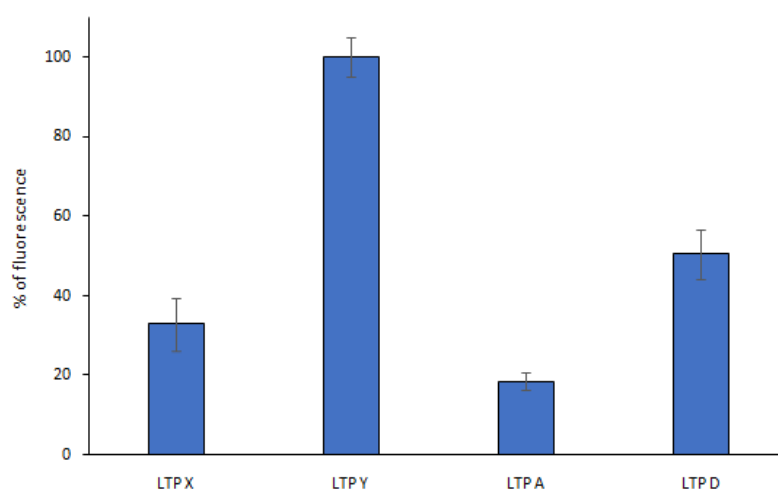
Obrázek 11: Graf CD pro LTP Y protein

Tabulka 1: Jednotlivé zastoupení foldů sekundárních struktur v jednotlivých proteinech.

	α -Helix	α -H. neuspořádaný	β -SL paralelní	neuspořádaný
LTP X	70,00%	0,80%	0,00%	29,20%
LTP Y	72,40%	0,00%	27,60%	0,00%
LTP A	48,00%	7,20%	0,00%	44,80%
LTP D	63,50%	1,10%	6,20%	29,20%

5.6 Fluorescenční důkaz biologické aktivity

Byla sledována interakce LTP s kyselinou olejovou, která v hydrofobní dutině LTP vytlačovala TNS, čím byla potvrzena schopnost vázat mastné kyseliny. Protein, jenž je nejochotnější vytěsnit TNS kyselinou olejovou se zde jeví LTP A, kterého fluorescence po přidání mastné kyseliny fluorescence klesla na 18,6 %. O něco méně ochotný je LTP X a D, který fluorescence klesla na 32,9 a 50,5 %. U LTP Y nebyla prokázána schopnost interakce s mastnými kyselinami. (Obrázek 12)



Obrázek 12: Graf závislosti změny fluorescence na jednotlivých typech LTP

6 DISKUSE

V práci byl popsán původ, biologická aktivita LTP proteinů, jejich význam v průběhu rozvoje nebo imunitní odpovědi rostliny a vliv na lidské zdraví. Rovněž byly popsány chemické vlastnosti LTP, jejich distribuce v rostlině, struktura a vazba ligandu.

V rámci experimentální části práce byly úspěšně exprimovány vybrané LTP proteiny v expresním systému *Pichia pastoris*. Proteiny byly následně purifikovány pomocí metody iontově výměnné FPLC, přítomnost a čistota proteinů LTP byla ověřena pomocí SDS-PAGE. Elektroforéza potvrdila vysokou koncentraci a čistotu purifikovaných proteinů. Za účelem eliminace hydrofobních sloučenin navázaných v hydrofobní kavitě LTP byla provedena metoda HPLC. Správně sekundární struktura LTPs byla ověřena pomocí metody CD.

Byla prokázána schopnost proteinů LTP tvořit komplex spolu s mastnými kyselinami. Sledování interakce LTP s mastnými kyselinami byla založena na schopnosti mastné kyseliny vytěsnit sloučeninu TNS z hydrofobní kavity proteinu.

Ochota proteinů LTP tvořit komplexy s mastnými kyselinami závisí na vzájemné afinitě ligandů a proteinu, velikosti centrální hydrofobní dutiny proteinu a velikosti ligandu a uspořádanosti sekundární struktury. Protein LTP A, který nejochotněji interaguje s kyselinou oleovou, je LTP typu LTP2 o přibližné velikosti 7 kDa a zároveň má největší podíl neuspořádané sekundární struktury. Signifikantní pokles fluorescence byl sledován také u LTP X a D, což potvrzuje interakci s kyselinou oleovou. LTP Y, u kterého nebyla prokázána interakce s kyselinou oleovou měl zároveň nejvíce uspořádanou sekundární strukturu s největším podílem β -skládaného listu.

V práci byly exprimovány a purifikované LTP proteiny v dostatečné kvalitě a čistotě, zároveň byla sledována interakce vybraných LTP s kyselinou oleovou. Budou sledovány interakce LTP se širokým spektrem hydrofobních látek zapojených v obranných reakcích a rozvoji rostlin. Rovněž bude následně sledována interakce LTP s proteiny pocházejícími z patogenních organismů a tím bude sledována participace LTP v obranných procesech.

7 ZÁVĚR

Lipid transfer proteiny jsou známy již od 90. let minulého století, jejich struktura, role v biologických procesech a vlastnosti byly v minulosti cílem mnoha studií. Mechanismy, jimiž se do biologických procesů LTP zapojují, ovšem známy stále nejsou a nejspíše v blízké budoucnosti známy nebudou. Například jakým způsobem si LTP vybírá, kterým lipidem, či FA utvoří komplex, či signalizace cesty, kterou se má LTP vydat a kde má svůj náklad vyložit, či jakým způsobem se svého ligandu zbavuje. Do jednotlivých procesů se zapojuje jak primární, tak sekundární struktura LTP proteinů, dostupnost jejich dutiny, či jaký komplex v danou chvíli tvoří.

V této práci jsme se věnovali rozboru jednotlivých biologických funkcí LTP proteinů, jejich složení a struktuře. Dále byly úspěšně eprimovány vybrané proteiny, které byly purifikovány a následně podrobeny analýze sekundární proteinové struktury. Testována byla i jejich biologická aktivita.

Jako výzvu pro můj další výzkum soustředěný kolem LTP by mohlo být hledání korelace mezi zastoupením jednotlivých sekundárních struktur a schopností tvořit komplexy s jednotlivými ligandy. Dále bych navrhoval výzkum do procesů, kterými se LTP zapojují do imunitní reakce organismu, jelikož by to mohlo přinést nové poznatky k pochopení procesů vedoucích k úspěšné imunitní reakci rostlin a potlačení infekce.

8 POUŽITÉ ZDROJE

1. Blein, J.-P. *et al.* (2002) 'From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms', *Trends in Plant Science*, 7(7), pp. 293–296. Available at: [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02284-7](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02284-7).
2. Buhot, N. *et al.* (2001) 'A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses', *FEBS letters*, 509(1), pp. 27–30. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)03116-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03116-7).
3. Byrne, B. (2015) 'Pichia pastoris as an expression host for membrane protein structural biology', *Current Opinion in Structural Biology*, 32, pp. 9–17. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.01.005>.
4. Cereghino, G.P.L. *et al.* (2002) 'Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris', *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), pp. 329–332. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00330-0](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00330-0).
5. Da Silva, P. *et al.* (2005) 'Solution structure of a tobacco lipid transfer protein exhibiting new biophysical and biological features', *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 59(2), pp. 356–367. Available at: <https://doi.org/10.1002/prot.20405>.
6. Daly, R. and Hearn, M.T.W. (2005) 'Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production', *Journal of molecular recognition: JMR*, 18(2), pp. 119–138. Available at: <https://doi.org/10.1002/jmr.687>.
7. DeBono, A. *et al.* (2009) 'Arabidopsis LTPG Is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface', *The Plant Cell*, 21(4), pp. 1230–1238. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064451>.
8. Do, T.H.T., Martinoia, E. and Lee, Y. (2018) 'Functions of ABC transporters in plant growth and development', *Current Opinion in Plant Biology*, 41, pp. 32–38. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.08.003>.
9. Douliez, J.P. *et al.* (2001) 'Binding of two mono-acylated lipid monomers by the barley lipid transfer protein, LTP1, as viewed by fluorescence, isothermal titration calorimetry and molecular modelling', *European Journal of Biochemistry*, 268(2), pp. 384–388. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.01889.x>.
10. Edqvist, J. *et al.* (2018) 'Plant lipid transfer proteins: are we finally closing in on the roles of these enigmatic proteins?', *Journal of Lipid Research*, 59(8), pp. 1374–1382. Available at: <https://doi.org/10.1194/jlr.R083139>.
11. Fich, E.A., Segerson, N.A. and Rose, J.K.C. (2016) 'The Plant Polyester Cutin: Biosynthesis, Structure, and Biological Roles', *Annual Review of Plant Biology*, 67, pp. 207–233. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111929>.
12. García-Olmedo, F. *et al.* (1995) 'The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants', *Trends in Microbiology*, 3(2), pp. 72–74. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88879-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88879-4).

13. Institute of Animal Health and Veterinary Biologicals, KVAFSU, Hebbal, Bengaluru-560024, Karnataka, India *et al.* (2016) 'An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins', *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 4(7), pp. 346–356. Available at: <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2016/4.7.346.356>.
14. Liu, F. *et al.* (2014) 'BraLTP1, a Lipid Transfer Protein Gene Involved in Epicuticular Wax Deposition, Cell Proliferation and Flower Development in Brassica napus', *PLOS ONE*, 9(10), p. e110272. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110272>.
15. Nieuwland, J. *et al.* (2005) 'Lipid Transfer Proteins Enhance Cell Wall Extension in Tobacco', *The Plant Cell*, 17(7), pp. 2009–2019. Available at: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032094>.
16. PanabiÈRes, F. *et al.* (1997) 'Characterization of border species among Pythiaceae: several Pythium isolates produce elicitors, typical proteins from Phytophthora spp.', *Mycological Research*, 101(12), pp. 1459–1468. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0953756297004413>.
17. Pighin, J.A. *et al.* (2004) 'Plant Cuticular Lipid Export Requires an ABC Transporter', *Science*, 306(5696), pp. 702–704. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1102331>.
18. Ranathunge, K., Schreiber, L. and Franke, R. (2011) 'Suberin research in the genomics era--new interest for an old polymer', *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 180(3), pp. 399–413. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.003>.
19. Ricci, P. *et al.* (1989) 'Structure and activity of proteins from pathogenic fungi Phytophthora eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco', *European Journal of Biochemistry*, 183(3), pp. 555–563. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb21084.x>.
20. Salminen, T.A., Blomqvist, K. and Edqvist, J. (2016) 'Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function', *Planta*, 244(5), pp. 971–997. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2585-4>.
21. Samuels, L., Kunst, L. and Jetter, R. (2008) 'Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells', *Annual Review of Plant Biology*, 59, pp. 683–707. Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.103006.093219>.
22. *Systemic Acquired Resistance - PMC* (no date). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2634024/> (Accessed: 14 January 2024).
23. Vanz, A.L. *et al.* (2012) 'Physiological response of Pichia pastoris GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes', *Microbial Cell Factories*, 11, p. 103. Available at: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-103>.
24. Zachowski, A. *et al.* (1998) 'Characterisation of acyl binding by a plant lipid-transfer protein', *European Journal of Biochemistry*, 257(2), pp. 443–448. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2570443.x>.

25. Zahrl, R.J. *et al.* (2017) 'Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*', *FEMS yeast research*, 17(7). Available at: <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox068>.
26. Žamberský, O. (2021) *Funkční charakterizace Lipid Transfer Proteinů rostlin a jejich role v imunitní odpovědi*. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Faculty of Science. Available at: <https://theses.cz/id/nmajrf/?lang=sk> (Accessed: 9 January 2024).
27. Zhang, Dasheng *et al.* (2010) 'OsC6, encoding a lipid transfer protein, is required for postmeiotic anther development in rice', *Plant Physiology*, 154(1), pp. 149–162. Available at: <https://doi.org/10.1104/pp.110.158865>.

SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

1. Obrázek 1: Schematický model depozice lipidových monomerů pomocí LTP A) při tvorbě sporopoleninové ochranné vrstvy pylových zrn B) při tvorbě kutikuly (zdroj)
2. Obrázek 2: Schéma přenosu signálu po nabuzení SAR 1) primární infekce rostlinného pletiva způsobuje nekrózu, 2) DIR1 přenáší signál vyvolaný infekcí po řápiku, 3) akumulace kyseliny salicylové (SA), 4) aktivace tvorby SAR indukovaných proteinů, 5) v pletivu je navozen stav obrany 6) případná sekundární infekce patogenu je efektivně potlačena. Převzato z článku (Systemic Acquired Resistance - PMC, no date)
3. Obrázek 3: Vizualizace nsLTP2, zvýrazněno je zde také 8 cysteinů (žlutá) jež tvoří disulfidické stabilizující můstky.
4. Obrázek 4: Vizualizace nsLTP2, kde se nepolární aminokyseliny (zelená) nacházejí hlavně kolem centrální dutiny a polární aminoskupiny (červená) hlavně na vnější straně proteinu.
5. Obrázek 13: Tvar a velikost hydrofobní dutiny proteinu TaLTP1.1 A) bez ligandu, B) v komplexu s PGB₂ a C) v komplexu s dvěma molekulami LMPC. Velikost dutiny je upravována a měněna velikostí navázaného ligandu pohybem C-koncových aminokyselinových zbytků, zde vymodelovaných jako tyčinky. (Edqvist *et al.*, 2018)
6. Obrázek 6: FPLC závislost absorbance na čase - v ohraničené části grafu eluace proteinu, oranžová křivka pro vodivost, zelená pro koncentraci NaCl, modrá pro stupeň absorbance (280 nm).
7. Obrázek 7: Výsledek SDS-PAGE pro LTP A, LTP X a první část LTP D (vlastní foto)
8. Obrázek 8: Výsledek SDS-PAGE druhou polovinu LTP D a LTP Y, zároveň zde byla provedena SDS-PAGE pro proteiny bez FPLC (vlastní foto)
9. Obrázek 9: Výsledek dodatečné SDS-PAGE proteinu LTP Y (vlastní foto)

10. Obrázek 10: HPLC závislost absorbance na čase – v označené části grafu eluace proteinu, v menším grafu je vidět absorbance vlnové délky peaku.
11. Obrázek 11: Graf CD pro LTP Y protein
12. Obrázek 114: Graf závislosti změny fluorescence na jednotlivých typech LTP

Tabulka 1 Jednotlivé zastoupení foldů sekundárních struktur v jednotlivých proteinech.