

Univerzita Karlova  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie  
Obor: Biochemie



Karolína Hrdinová

**Studium enzymů sekretovaných oomycetou**

***Pythium oligandrum***

Study of enzymes secreted by oomycete *Pythium oligandrum*

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Praha 2019



## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne .....

.....

Karolína Hrdinová



## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí práce, paní docentce RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za odborné vedení, pomoc a čas, který mi věnovala, za množství cenných rad a zejména za nezměrnou dávku trpělivosti. Děkuji také Mgr. Kateřině Bělonožníkové za veškerou pomoc a rady, které mi ochotně poskytovala. V neposlední řadě děkuji své rodině za neutuchající podporu a trpělivost.



## Abstrakt

*Pythium oligandrum* je jedním z nepatogenních zástupců rodu *Pythium*, který nalezl uplatnění jako prostředek biologické ochrany rostlin. Hlavní mechanismus účinku této oomycety spočívá v indukci obranného systému rostlin pomocí elicitorů a v mykoparazitismu patogenních hub a houbám podobných organismů, které oomyceta napadá pomocí řady hydrolytických enzymů, jež uvolňuje do svého okolí.

V první části této práce byla sledována aktivita hydrolytických enzymů endo-1,3- $\beta$ -glukanasy, celulasy, chitinasy a proteas v komerčním přípravku na ochranu rostlin na bázi *Pythium oligandrum*, Polyversum-Biogarden. Bylo zjištěno, že přímé působení hydrolytických enzymů pravděpodobně není hlavním mechanismem účinku tohoto přípravku, neboť aktivita glykosidas významněji narůstá až po šestihodinové inkubaci přípravku ve vodě a proteolytická aktivita nebyla prokázána.

V druhé části práce byly studovány vlastnosti proteas sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum*. Nejvyšší proteolytická aktivita byla zjištěna při pH 6,5. Ovomukoid působil jako inhibitor sekretovaných proteas. Byla sledována také stabilita proteas, kterou snižovaly SDS i detergenty v tekutých mýdlech, roztok tuhého mýdla nebo NaOH; močovina ji snižovala pouze ve vyšších koncentracích. Naproti tomu ethanol stabilitu proteas neovlivňoval.

## Klíčová slova

biologická ochrana rostlin, *Pythium oligandrum*, endo-1,3- $\beta$ -glukanasa, celulasa, chitinasa, proteasy, stabilita enzymů



# Abstract

*Pythium oligandrum* is one of the non-pathogenic microorganisms of *Pythium* species which found its use as biological control agent. The main modes of action of this oomycete lie in inducing the plant immunity and in mycoparasitism of pathogenic fungi and fungus-like organisms. The oomycete attacks the pathogens by secretion of hydrolytic enzymes into the environment.

In the first part of this bachelor's thesis, activity of hydrolytic enzymes endo-1,3- $\beta$ -glucanase, cellulase, chitinase and proteases was observed in a commercial product based on *Pythium oligandrum*, called Polyversum-Biogarden. It was concluded that the direct hydrolysis of phytopathogens is probably not the main mechanism of this product because the activity of glycosidases increased only after six hour-long incubation of the Polyversum-Biogarden in water and the proteolytic activity was not detected.

In the second part of the bachelor's thesis, properties of proteases secreted by organism *Pythium oligandrum* were studied. The highest proteolytic activity was observed at pH 6,5. Ovomuroid acted as an inhibitor of secreted proteases. The stability of proteases was lowered by SDS, detergents present in liquid soaps and by a solution of a solid soap or NaOH. Only the highest concentrations of urea lowered the activity of proteases. Ethanol did not influence the protease activity.

(In Czech)

## Key words

biological control agent, *Pythium oligandrum*, endo-1,3- $\beta$ -glucanase, cellulase, chitinase, proteases, enzyme stability



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
1.1	Obranné mechanismy rostlin . . . . .	1
1.2	Oomycota . . . . .	2
1.3	Rod <i>Pythium</i> . . . . .	3
1.4	<i>Pythium oligandrum</i> . . . . .	4
1.4.1	Interakce organismu <i>Pythium oligandrum</i> s patogenem . . . . .	4
1.4.2	Interakce organismu <i>Pythium oligandrum</i> s rostlinou . . . . .	6
1.5	Elicitiny . . . . .	7
1.5.1	Oligandrin . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Cíl</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>11</b>
3.1	Chemikálie . . . . .	11
3.2	Enzymové preparáty . . . . .	13
3.3	Pomůcky a přístroje . . . . .	13
3.4	Metody . . . . .	13
3.4.1	Aktivace <i>P. oligandrum</i> v přípravku Polyversum-Biogarden . . . . .	13
3.4.2	Stanovení aktivity endo-1,3- $\beta$ -glukanasy . . . . .	14
3.4.3	Stanovení aktivity celulasy . . . . .	15
3.4.4	Stanovení aktivity chitinasy . . . . .	15
3.4.5	Stanovení aktivity proteas . . . . .	15
3.4.6	Stanovení inhibitorů proteas v přípravku Polyversum-Biogarden . . . . .	16
3.4.7	Stanovení pH optima proteas . . . . .	16
3.4.8	Inhibice proteas ovomukoidem . . . . .	17
3.4.9	Měření stability enzymů ovlivněných vybranými činidly . . . . .	17
3.4.10	Stanovení proteinů podle Lowryho . . . . .	18
3.4.11	Elektroforetická separace v prostředí SDS . . . . .	19
<b>4</b>	<b>Výsledky</b>	<b>20</b>
4.1	Enzymové aktivity v přípravku Polyversum-Biogarden . . . . .	20
4.1.1	Aktivita glykosidas . . . . .	20
4.1.2	Aktivita proteas . . . . .	21
4.1.3	Obsah proteinů v aktivovaném přípravku Polyversum-Biogarden . . . . .	22
4.2	Vlastnosti enzymů sekretovaných oomycetou <i>Pythium oligandrum</i> . . . . .	24
4.2.1	Stanovení aktivity proteas . . . . .	24
4.2.2	Vliv ovomukoidu na aktivitu proteas . . . . .	26
4.2.3	Vliv vybraných činidel na stabilitu proteas a endo-1,3- $\beta$ -glukanasy . . . . .	26
<b>5</b>	<b>Diskuze</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>Závěr</b>	<b>35</b>



## Seznam zkratek

BCAs	prostředky biologické ochrany ( <i>angl.</i> biological control agents)
BSA	hovězí sérový albumin ( <i>angl.</i> bovine serum albumin)
DTT	1,4-dithiotreitol
ELR	receptor elicitinu ( <i>angl.</i> elicitin response receptor)
HR	hypersenzitivní reakce ( <i>angl.</i> hypersensitive response)
IC <sub>50</sub>	koncentrace inhibitoru, která způsobí snížení rychlosti reakce na polovinu rychlosti neinhibované reakce
MAPK kaskáda	mitogenem aktivovaná proteinkinasová kaskáda ( <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase cascade)
MBTH	3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazon hydrochlorid
MOPS	kyselina 3-(N'-morfolino)propansulfonová
POD-1, POD-2	elicitory, glykoproteiny z buněčné stěny organismu <i>Pythium oligandrum</i>
PR proteiny	proteiny spojené s patogenezí ( <i>angl.</i> pathogenesis-related proteins)
ROS	reaktivní formy kyslíku ( <i>angl.</i> reactive oxygen species)
SDS	dodecylsírán sodný ( <i>angl.</i> sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	objemová koncentrace
w/v	hmotnostní koncentrace



# 1 Úvod

## 1.1 Obranné mechanismy rostlin

Rostliny byly za dobu své existence nuceny vytvořit si důmyslný systém obranných mechanismů sloužících jim k přežití nepříznivých vlivů biotických (např. bakterie, houby) či abiotických (např. sucho, výkyvy teplot) faktorů vyskytujících se na Zemi. Tyto mechanismy lze souhrnně nazvat imunitním systémem rostlin, v rámci něhož odlišujeme konstitutivní a indukovaný systém obrany[1, 2].

Konstitutivním systémem obrany rozumíme předem připravený obranný systém, do něhož lze v makroskopickém měřítku zařadit například kůru stromů či kutikulu, na buněčné úrovni poté buněčnou stěnu či řadu sekundárních metabolitů s antimikrobiálními vlastnostmi, například saponiny, glukosinoláty a benzoxazinoidy. Tyto metabolity, často skladované jako inaktivní prekurzory ve vakuolách, jsou syntetizovány zdravými rostlinami, kterým slouží jako jedna z prvních obran při napadení patogenem či při mechanickém poškození[2, 3].

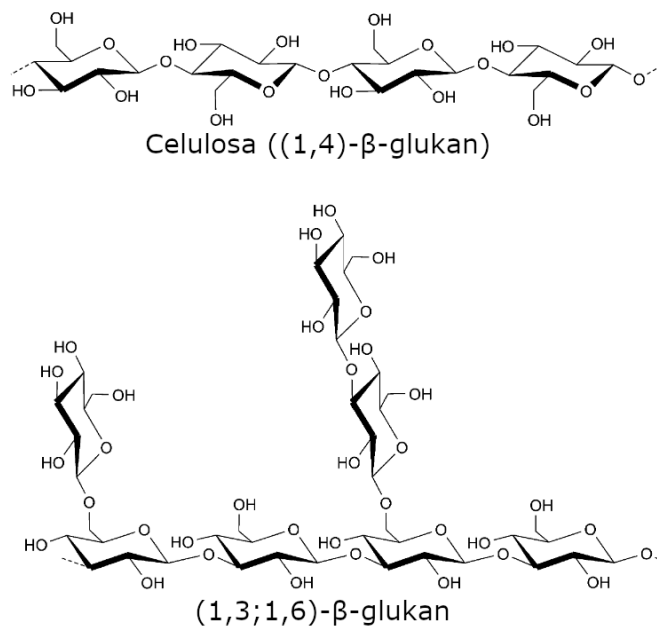
Některé obranné látky rostlin bývají ovšem syntetizovány až v reakci na napadení rostliny patogeny. V takovém případě hovoříme o indukovaném systému obrany. K spuštění tohoto obranného systému dochází vlivem tzv. elicitorů, látek, které se vážou na specifické receptory nacházející se na vnější straně buněčných membrán napadených rostlin[4]. Elicitory mohou pocházet jak z patogenního organismu, v takovém případě se jedná o exogenní elicitory, tak z rostliny samotné (endogenní elicitory)[5]. Endogenními elicitory jsou například části buněčné stěny rostliny (oligosacharidy) vzniklé působením hydrolytických enzymů sekretovaných patogenním organismem. Exogenními elicitory pak jsou například proteiny sekretované patogeny (např. hydrolytické enzymy), fosfolipidy či části buněčných stěn patogenů[4, 5].

Interakcí elicitorů s rostlinnými receptory dochází k spuštění signálních drah, které vedou k strukturním změnám v rostlinách (např. tvorba kalosy), k tvorbě obranných enzymů, fytoalexinů, reaktivních forem kyslíku, a které mohou vést až k programované buněčné smrti napadených rostlinných buněk a jejich okolí[4, 5].

## 1.2 Oomycota

Oomycota (též oomycety či řasovky) jsou kmenem houbám podobných eukaryotických organismů spadajících do říše Stramenopila (někdy též Straminipila)[6, 7, 8]. Jsou charakteristické tvorbou oogonií a oospor[9]. Oogonia jsou samičí pohlavní orgány, ve kterých meiosou vznikají nepohyblivé samičí gamety, oosféry[6]. Po splynutí oosféry s haploidním jádrem samčí gamety, v některých případech partenogenezí (např. *Pythium oligandrum*), dochází k vzniku diploidní oospory, což je odolný útvar se ztlustělou buněčnou stěnou, který slouží k přečkání nepříznivých podmínek. Oospora může následně vyklíčit v novou hyfu či sporangium[8, 9].

Oomycety jsou pozoruhodné organismy, neboť vykazují mnohé podobnosti s pravými houbami (Mycota nebo též Eumycota), přestože jim nejsou geneticky příbuzné. Například produkují enzymy degradující buněčnou stěnu, což jim slouží k proniknutí do rostlinných buněk. Na druhou stranu se oomycety od pravých hub v některých zásadních znacích liší a podobají se spíše rostlinám. Oomycety, na rozdíl od pravých hub, mají ve svých buněčných membránách obsaženy rostlinné steroly. (Pravé houby obsahují ergosterol.) Dále vykazují oproti pravým houbám odlišnou stavbu mitochondrií a Golgiho aparátu, obsahují jiné zásobní látky[8]. V pravých houbách je obvyklým zásobním sacharidem glykogen, který v oomycetách nebyl nalezen. V oomycetách se ale nachází mykolaminaran, glukán s vazbami  $\beta$ -(1,3) a  $\beta$ -(1,6), který je strukturně podobný laminarinu[10, 11]. Další pozoruhodnou odlišností oomycet oproti pravým houbám je složení jejich buněčné stěny. V buněčné stěně pravých hub se nachází především chitin a (1,3)- $\beta$ -glukany propojené krátkými řetězci (1,6)- $\beta$ -glukanů. Naproti tomu v buněčné stěně oomycet se chitin téměř nevyskytuje, nachází se zde převážně (1,3;1,6)- $\beta$ -glukany a celulóza (viz obrázek 1, str. 3). Díky těmto mnohým odlišnostem oomycet oproti pravým houbám jsou oomycety často odolné vůči běžným fungicidům[8, 10]. Odolnost proti fungicidům je nepříjemnou skutečností, neboť do kmene Oomycota můžeme zařadit některé velmi významné patogeny rostlin, způsobující vážné ztráty úrody. Mezi tyto patogeny patří například rody *Aphanomyces*, *Pythium* či *Phytophthora*. Významným zástupcem těchto patogenů je *Phytophthora infestans*, která je původcem plísně brambor (rovněž rajčat) a která byla příčinou hladomoru v Irsku v 19. století[7, 8].



Obrázek 1: **Polysacharidy vyskytující se v buněčné stěně oomycet.** Celulosa a (1,3;1,6)- $\beta$ -glukany jsou polysacharidy, které se převážně vyskytují v buněčných stěnách kmene Oomycota. Převzato z [10] a upraveno.

### 1.3 Rod *Pythium*

Rod *Pythium* kmene Oomycota, náležící do stejného řádu (Perenosporales) a čeledi (Pythiaceae) jako rod *Phytophthora*[6], zahrnuje rozmanitou skupinu zástupců, kteří obývají jak souš, tak vodní prostředí. Někteří z těchto zástupců žijí jako saprofyté, většina z nich je však patogeny napadajícími širokou škálu organismů[12]. Mezi zástupci rodu *Pythium* nalezneme patogeny napadající ryby (*Pythium undulatum*), hmyz (*Pythium carolinianum*) a savce (*Pythium insidiosum*). Poslední zmíněný zástupce napadá dokonce i člověka[7]. Největší ekonomický dopad na společnost mají však druhy rodu *Pythium*, které řadíme mezi rostlinné patogeny (např. *Pythium aphanidermatum*, *Pythium debaryanum* či *Pythium ultimum*). Tyto druhy, které způsobují hniloby plodů, stonků i kořenů a které jsou příčinou tzv. padání klíčnicích rostlin, každoročně zaviní velké škody na zemědělské úrodě[7, 12].

Poněkud zvláštní skupinou, kterou lze v rámci rodu *Pythium* vyčlenit, jsou nepatogenní zástupci, kteří parazitují na ostatních, patogenních druzích svého rodu a na některých houbových patogenech. Těmito nepatogenními zástupci jsou například: *Pythium periplocum*, *Pythium nunn*, *Pythium mycoparasiticum* a *Pythium oligandrum*[12].

## 1.4 *Pythium oligandrum*

*Pythium oligandrum* je celosvětově rozšířený půdní organismus[13], který byl poprvé popsán americkým mykologem Charlesem Drechslerem v roce 1930[14]. Tento organismus se vyskytuje na povrchu kořenů rostlin (v rhizosféře), sdílí tedy ekologickou niku s četnými rostlinnými patogeny[15, 16]. *Pythium oligandrum* tyto patogenní druhy pro svou vlastní obživu napadá (viz kapitola 1.4.1, str. 4), čímž je odstraňuje z dosahu rostlin, které tak chrání. Díky schopnosti neobyčejně agresivně napadat rostlinné patogeny a díky interakcím s rostlinami (viz kapitola 1.4.2, str. 6) je organismus *Pythium oligandrum* v současnosti využíván jako jeden z prostředků biologické ochrany rostlin. (V České republice je oomyceta *Pythium oligandrum* součástí přípravku Polyversum, který byl registrován jako biofungicid v roce 1994[16].) Mezi organismy sloužící jako biologická ochrana rostlin před patogeny dále patří například některé druhy rodu *Trichoderma* (např. jako fungicidy působí *T. asperellum*, *T. atroviride*) či některé druhy rodu *Bacillus* (např. *B. thuringiensis* působí jako insekticid)[15]. Jejich využití by v budoucnosti mohlo omezit používání chemických pesticidů, které mají často negativní dopad na okolní prostředí[15].

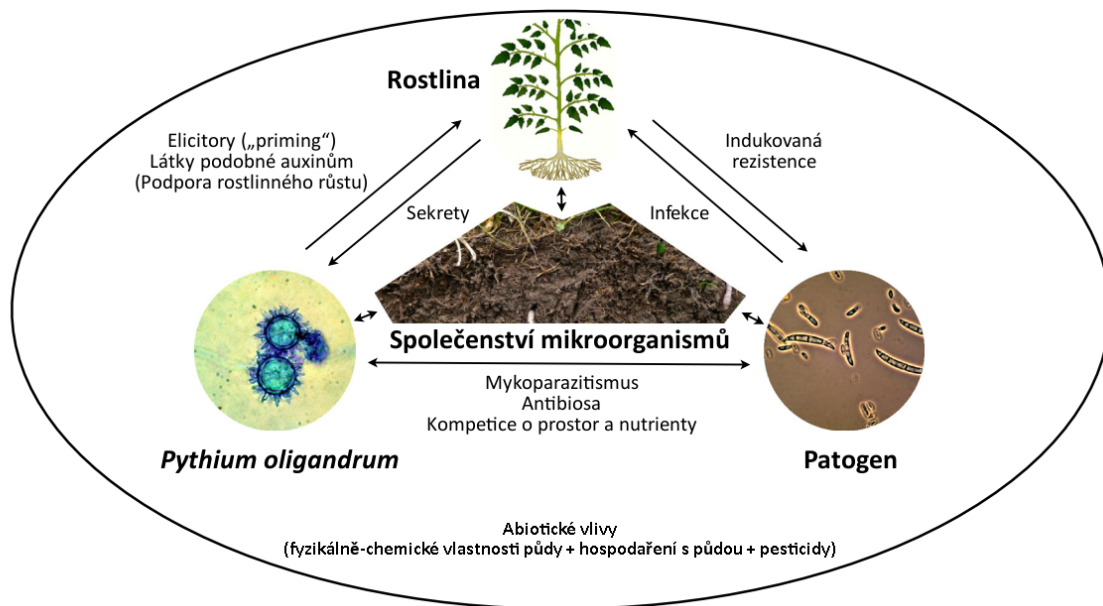
*Pythium oligandrum* se prozatím jeví jako slibný prostředek biologické ochrany rostlin, neboť působí v několika rovinách[12]:

1. Působí proti patogenům v půdě obsazením rhizosféry, a tedy kompeticí o prostor a o živiny.
2. Přímo napadá některé rostlinné patogeny žijící v půdě.
3. Zvyšuje rezistenci rostlin, neboť indukuje jejich obranný systém.
4. Svou produkcí tryptaminu, prekursoru auxinu, podporuje růst rostlin[17].

Souhrn vzájemných interakcí mezi oomycetou *Pythium oligandrum*, rostlinami a patogenními organismy je znázorněn na obrázku 2 na straně 5.

### 1.4.1 Interakce organismu *Pythium oligandrum* s patogenem

Při interakci oomycety *Pythium oligandrum* s patogenním organismem v rhizosféře je jedním z mechanismů jeho působení prospívajícího rostlinám kompetice s patogenem o přítomné volné živiny (např. látky vylučované rostlinami do okolí) a o životní prostor. Tento mechanismus působení na patogenní organismy je pravděpodobně vedlejším[15].



Obrázek 2: Souhrn vztahů mezi oomycetou *Pythium oligandrum*, rostlinami a patogenními organismy v půdě. Na obrázku je kromě interakcí *Pythium oligandrum* s patogeny (viz kap. 1.4.1, str. 4) a s rostlinou (viz kap. 1.4.2, str. 6) znázorněn také vliv abiotických faktorů. Vysvětlivky: „priming“ = vybudování rezistence rostliny vlivem elicitorů. Převzato z [15] a upraveno.

Další mechanismus spočívá v přímém napadání patogenního organismu oomycetou, které je druhově specifické[16] a může, v závislosti na napadeném druhu, probíhat buď antibiosou, nebo mykoparaziticky. Při antibiose je patogenní organismus zničen působením sekundárních metabolitů oomycety[15]. K takovému jevu dochází například při interakci oomycety s organismem *Phytophthora megasperma*, kdy patogen degeneruje, aniž by se *Pythium oligandrum* ocitlo v jeho blízkosti a aniž by byla poškozena jeho buněčná stěna[12]. Dalším příkladem antibiosy je inhibice růstu organismů *Phoma medicaginis* a *Mycosphaerella pinodes* vlivem působení metabolitů oomycety *Pythium oligandrum*[15]. Hlavním mechanismem, který oomyceta *Pythium oligandrum* využívá při boji s patogenními organismy, je však pravděpodobně mykoparazitismus[12].

Mykoparazitismus je zahájen chemotropním růstem oomycety ve směru patogenního organismu. Následně dochází k přichycení organismu *Pythium oligandrum* k patogenovi, dále k obtočení patogenní hyfy a k penetraci oomycety do hostitelského organismu. K penetraci dochází vlivem působení hydrolytických enzymů (celulas, chitinas,  $\beta$ -glukanasy) produkovaných oomycetou[12, 15, 18]. Posledními fázemi procesu mykoparazitismu je kompletní rozložení cytoplazmy napadeného organismu a roz-

množení oomycety *Pythium oligandrum* uvnitř zbytků hyf patogena[15, 18].

Tomuto osudu se patogenní organismus brání strukturními obrannými reakcemi. Například v případech interakce oomycety *Pythium oligandrum* s patogeny *Rhizoctonia solani* či *Phytophthora parasitica* vytváří patogenní organismus lokální zesílení buněčné stěny, která mají buněčnou stěnu zpevnit v místech potenciálního vniknutí, a zabránit tak vstupu organismu *Pythium oligandrum* do hyfy patogena[12, 18].

Nejasností prozatím zůstává, jak *Pythium oligandrum* dokáže tak účinně rozkládat buněčné stěny patogenních organismů, aniž by byla poškozena jeho vlastní. Možným vysvětlením je využití celulas nejen k napadání patogenů, ale rovněž k opravě vlastních buněčných struktur. Tuto možnost podporuje objev sekvencí v cDNA knihovnách organismu *Pythium oligandrum*, které odpovídají celulasám obsahujícím transmembránový helix, jež by mohly být ukotveny v plazmatické membráně a mohly by se podílet na opravách buněčné stěny[7, 12].

#### 1.4.2 Interakce organismu *Pythium oligandrum* s rostlinou

Při interakci oomycety *Pythium oligandrum* s rostlinami dochází k velmi rychlému rozšíření tohoto organismu hluboko do pletiv kořene, což je pro nepatogenní druh poněkud neobvyklé – nepatogenní druhy se většinou rozšíří pouze do jeho povrchových struktur[15]. Toto překotné obsazení pletiv kořene přitom probíhá bez vnějších projevů, a rostliny při něm nejsou nijak poškozeny. Po asi 14 h od inokulace rostliny organismem *Pythium oligandrum* naopak dochází k postupným změnám ve struktuře a k následné degeneraci buněk oomycety za současného vzniku oogonií[12]. Tento náhlý rozpad buněčných struktur oomycety je nejspíš zapříčiněn rozpoznáním oomycety jakožto potenciálního patogena, neboť během interakce rostliny s organismem *Pythium oligandrum* dochází k vybuzení obranných rostlinných reakcí, mezi které lze zařadit indukci fenylypropanoidní a terpenoidní metabolické dráhy či například lokální zesilování buněčné stěny[12].

Vlivem interakce s oomycetou navíc dochází k vybuzení rezistence rostliny (tzv. „priming“), kdy rostlina dokáže rychleji a s větší intenzitou reagovat na případné napadení patogenem. Například při napadení rajčete patogenním organismem *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (po ošetření rostliny oomycetou *Pythium oligandrum*) dochází k lokálnímu zesilování buněčné stěny, které zabraňuje patogennímu organismu

v postupu. Dále dochází také k syntéze fytoalexinů a proteinů spojených s patogenezí (PR proteiny) (např. hydrolytických enzymů chitinasy a endo-1,3- $\beta$ -glukanasy), které pravděpodobně způsobují degradaci patogena[12]. Indukovaná rezistence byla pozorována rovněž při interakci ošetřeného rajčete s organismem *Botrytis cinerea*. V tomto případě byly opět syntetizovány PR proteiny, avšak k jejich syntéze došlo pouze v listech, které byly přímo napadeny patogenem[15].

Za indukci rezistence rostliny po ošetření oomycetou *Pythium oligandrum* mohou pravděpodobně minimálně dva typy elicitorů (elicitor viz kap. 1.1, str. 1), konkrétně se jedná o protein oligandrin (viz kap. 1.5.1, str. 11) a o glykoproteiny buněčné stěny POD-1, POD-2 [12]. Stejně jako oligandrin, obsahují glykoproteiny POD-1, POD-2 ve své struktuře elicitinovou doménu (elicitiny viz kap. 1.5, str. 7). Jejich rozeznáním dochází v rostlinách k aktivaci jasmonátové signální dráhy a k syntéze ethylenu. Aktivace drah poté vyvolá regulaci genové exprese, a následnou syntézu fytoalexinů, PR proteinů[13].

Interakce rostlin s organismem *Pythium oligandrum* neprospívá rostlinám pouze díky indukci rezistence, ale dochází rovněž k podpoře rostlin v růstu. Podpora v růstu je způsobena schopností oomycety syntetizovat prekurzor rostlinných hormonů auxinů, tryptamin. Organismus je schopen jej syntetizovat pomocí tryptaminové dráhy z prekurzorů tryptofanu, který je sekretován některými rostlinami do rhizosféry, a indol-3-acetaldehydu. Na rozdíl od patogenního druhu *Pythium ultimum* nedovede *Pythium oligandrum* vzniklý tryptamin převést na kyselinu indol-3-octovou (auxin)[12, 17]. Rostliny však dovedou syntetizovaný tryptamin kořeny přijímat. Pravidelné a nízké dávky této látky pak nejspíš v rostlinách indukují syntézu auxinu, který způsobuje rozvoj kořenového systému rostliny, včetně tvorby sekundárních kořenů[17].

## 1.5 Elicitiny

Někteří zástupci kmene Oomycota, konkrétně se jedná o rody *Phytophthora* a *Pythium*, sekretují do svého okolí proteiny s nízkou molekulovou hmotností (cca 10 kDa), které mají vlastnosti elicitorů, tedy jsou schopny vyvolat silnou obrannou reakci zasažených rostlin. Mnoho elicitinů vyvolá v rostlinách (například v rostlině tabáku *Nicotiana tabacum*) silnou obrannou reakci, která vyústí až v HR[7, 19]. Kromě samotného spuštění

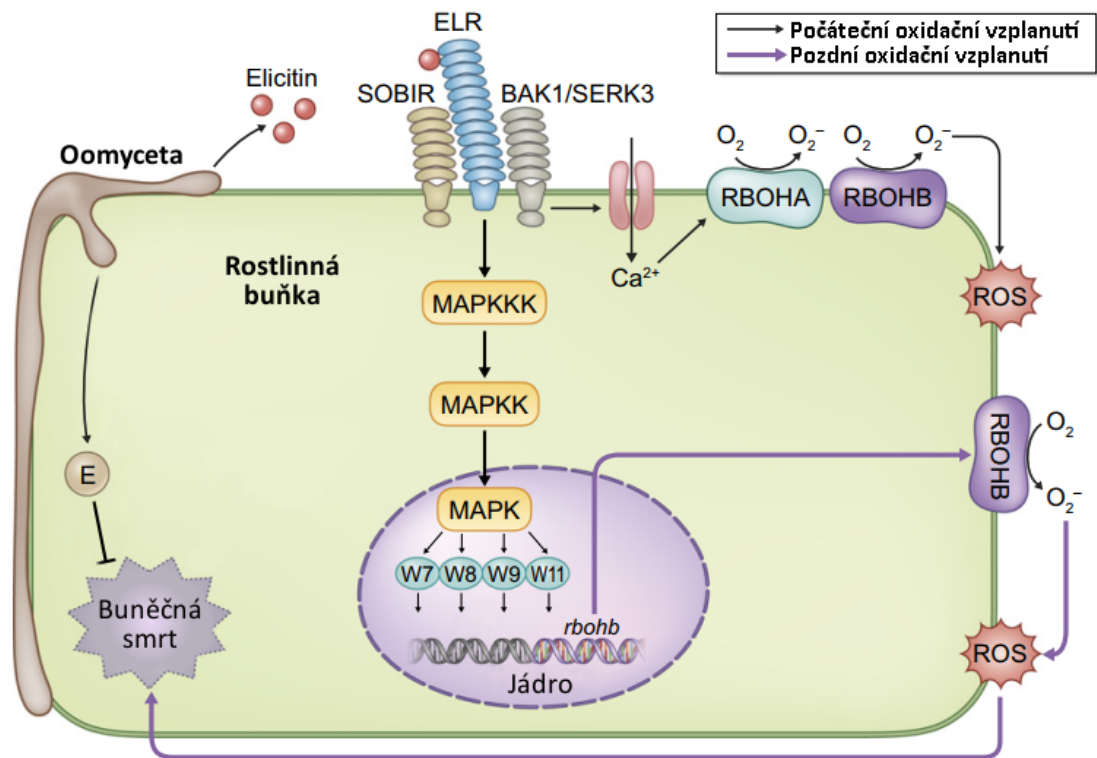
obránné reakce elicitory umožňují rostlinám získat systémovou rezistenci[20].

Obranná reakce (viz obrázek 3, str. 9) je například u rostliny *Solanum microdontum* (druh divokých brambor) zahájena rozpoznáním elicitoru pomocí receptoru ELR vázaného na buněčné membráně. Aktivací tohoto receptoru (a jeho koreceptorů BAK1/SERK3 a SOBIR1) dochází k otevření  $\text{Ca}^{2+}$  iontových kanálů, které vede k aktivaci NADPH oxidasy, jež poté katalyzuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) – nastává počáteční oxidační vzplanutí. Dále dochází k aktivaci receptoru také k spuštění signalizační kaskády (MAPK kaskáda), která vede k regulaci transkripce, k zvýšené syntéze NADPH oxidasy, a tedy k další tvorbě reaktivních forem kyslíku a následné hypersenzitivní reakci – nastává pozdní oxidační vzplanutí. Zda v rostlině dojde k vyvolání HR je však druhově specifická záležitost, proto k spuštění hypersenzitivní reakce nedochází vždy[19].

Další pozoruhodnou vlastností elicitorů, kromě schopnosti vyvolat obrannou reakci rostlin, je jejich schopnost vázat steroly a přenášet je přes buněčné membrány. Některé druhy rodů *Phytophthora* a *Pythium* nedovedou syntetizovat steroly, které jsou nezbytné pro jejich vývoj, a jsou tedy závislé na externím zdroji[21]. K vychytávání sterolů z okolí těmito oomycetám slouží tzv.  $\Omega$ -smyčka, která je součástí konzervované elicitorové domény[19].

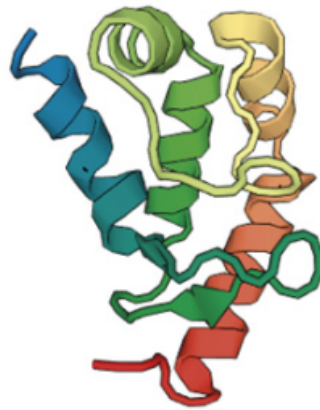
Aminokyselinové sekvence konzervovaných domén vybraných elicitorů a elicitorům podobných proteinů jsou porovnány na obrázku 4b na straně 10. Z obrázku je patrné, že v primární struktuře těchto domén se nachází šest konzervovaných cysteinylových zbytků. Tyto zbytky mezi sebou vytváří tři disulfidové můstky (mezi prvním a pátým; druhým a čtvrtým; třetím a šestým cysteinylovým zbytkem), které stabilizují prostorové uspořádání elicitorové domény, skládající se převážně z  $\alpha$ -helixů (viz prostorové uspořádání  $\beta$ -kryptogeinu, obrázek 4a, str. 10)[19, 22]. Mezi druhým a čtvrtým cysteinylovým zbytkem, tedy převážně v místě  $\Omega$ -smyčky, se nachází nejvíce konzervovaná část elicitorové domény[22]. Právě  $\Omega$ -smyčka byla původně považována za oblast zodpovědnou za vyvolávání obranných reakcí rostlin vlivem vázání sterolů, a tedy narušování membrán. V pozdějších experimentech se však ukázalo, že obranné reakce vyvolávají i mutacemi upravené elicitory, které postrádají schopnost vázat steroly[19].

Elicitinovou doménu sdílejí spolu s elicitiny také elicitinům podobné proteiny, které jsou rovněž sekretovány zástupci kmene Oomycota a které mají s elicitiny mnoho společných vlastností (např. velikost, schopnost vyvolat obrannou reakci rostlin), jejich aminokyselinová sekvence je však více variabilní[22].

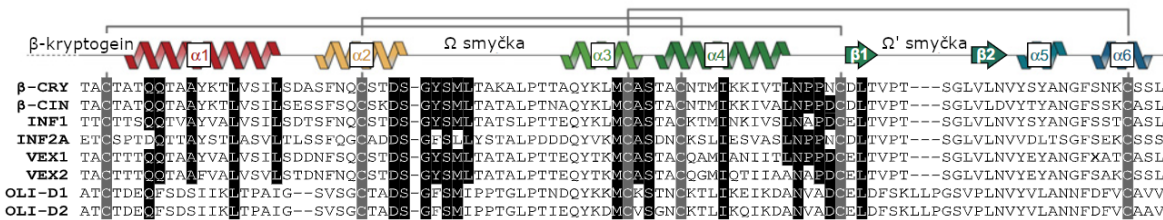


Obrázek 3: **Obranná reakce v rostlině *Solanum microdontum*.** Navázáním elicitinů na membránový receptor ELR, dochází k aktivaci receptoru a jeho koreceptorů (BAK1/SERK3, SOBIR1), což vyvolá jednak otevření  $\text{Ca}^{2+}$  iontových kanálů, jednak aktivaci MAPK kaskády. Otevření iontových kanálů způsobuje vtok  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, které aktivují membránově vázané NADPH oxidasy (RBOHA, RBOHB). Dochází k tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS) – k počátečnímu oxidačnímu vzplanutí. Aktivace MAPK kaskády způsobuje regulaci transkripce (regulace exprese genu *rbohB* pomocí transkripčních faktorů WRKY – W7, W8, W9, W11), následné zvýšení syntézy NADPH oxidasy (RBOHB) a tvorbu dalších reaktivních forem kyslíku (ROS). Dochází k pozdnímu oxidačnímu vzplanutí, které v mnohých případech vede k HR a k buněčné smrti. Některé druhy oomycet produkují látky, tzv. efektoři (E), které zabraňují buněčné smrti. Převzato z [19] a upraveno.

## β-kryptogein



(a)



(b)

Obrázek 4: **Struktura elicitinu β-kryptogeinu a porovnání aminokyselinových sekvencí konzervované domény elicitinů (elicitinům podobných proteinů).** (a) Struktura β-kryptogeinu (PDBID: 1BEO), elicitinu pocházejícího z oomycety *Phytophthora cryptogea*. (b) Porovnání aminokyselinových sekvencí několika vybraných elicitinů (elicitinům podobných proteinů) pocházejících z rodu *Phytophthora* (β-CRY, β-CIN, INF1, INF2A) a z rodu *Pythium* (VEX1, VEX2, OLI-D1, OLI-D2). Dále je zde zobrazen rozvinutý strukturní model elicitinu β-kryptogeinu. Šedé čáry nad modelem znázorňují disulfidové můstky. Na obrázku je patrná Ω-smyčka vázající steroly. Barevné provedení 3D modelu β-kryptogeinu odpovídá barvě rozvinutého strukturního modelu zobrazeného nad aminokyselinovými sekvencemi. Převzato z [19] a upraveno.

### 1.5.1 Oligandrin

Jedním z elicitinů podobných proteinů je oligandrin. Tento protein s nízkou molekulovou hmotností (cca 10 kDa) je sekretován oomycetou *Pythium oligandrum* (viz kapitola 1.4, str. 4). Jeho pozoruhodnou vlastností je schopnost indukovat obranný systém rostlin, aniž by způsobil hypersenzitivní reakci[20].

V experimentu skupiny K. Picard, ve kterém byly rostliny rajčete (*Lycopersicon esculentum*) ošetřeny oligandrinem a následně inokulovány patogenním organismem *Phytophthora parasitica*, došlo k významnému snížení závažnosti vzniklého onemocnění a k snížení úmrtnosti ošetřených rostlin v porovnání s kontrolními neošetřenými rostlinami. V ošetřených rostlinách rajčat došlo k navození obranných reakcí spočívajících mimo jiné v lokálnímu zesílení buněčné stěny v místech potenciální penetrace patogena, vyplnění mezibuněčných prostor či některých napadených buněk amorfnní hmotou[20].

## 2 Cíl

V této bakalářské práci byly studovány vlastnosti proteinů sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum* M1. Cílem práce bylo :

1. Zjistit, zda po rozpuštění – aktivaci – komerčního přípravku Polyversum-Bio-garden budou měřitelné aktivity hydrolytických enzymů celulasy (EC 3.2.1.4), chitinasy (EC 3.2.1.14), endo-1,3- $\beta$ -glukanasy (EC 3.2.1.6) a proteolytická aktivity.
2. Zjistit pH závislost proteas sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum* M1 a vliv denaturačních činidel na stabilitu sekretovaných proteas.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Chemikálie

- akrylamid; Sigma-Aldrich; USA
- azokasein; Sigma-Aldrich; USA
- 1,4-dithiotreitol (DTT); Sigma-Aldrich; USA
- dodecylsírán sodný; Sigma-Aldrich; USA

- dodekahydrát síranu amonno-železitého; Lach-Ner, s.r.o.; Česká republika
- dusičnan stříbrný; Lachema; Česká republika
- ethanol; Lach-Ner, s.r.o.; Česká republika
- Folin-Ciocalteuovo fenolové reagens; Dr. Kulich Pharma; Česká republika
- formaldehyd; Lach-Ner, s.r.o.; Česká republika
- glycin; Lach-Ner, s.r.o.; Česká republika
- hovězí sérový albumin (BSA); Sigma-Aldrich; USA
- hydrogenfosforečnan sodný; Lachema; Česká republika
- hydroxid sodný; Lachema; Česká republika
- chitin; Sigma-Aldrich; USA
- kyselina citronová; Lachema; Česká republika
- kyselina chlorovodíková; Lach-Ner, s.r.o.; Česká republika
- kyselina 3-(N'-morfolino)propansulfonová (MOPS); Sigma-Aldrich; USA
- kyselina octová; Lach-Ner, s.r.o.; Česká republika
- kyselina sulfanilová; Lach-Ner, s.r.o.; Česká republika
- kyselina trichloroctová; Avondale laboratories; Velká Británie
- laminarin; Sigma-Aldrich; USA
- 3-methyl-2-benzothiazolinonhydrazon hydrochlorid, monohydrát (MBTH); Sigma-Aldrich; USA
- methylcelulosa; Sigma-Aldrich; USA
- N, N'-methylenbisakrylamid; Sigma-Aldrich; USA
- mýdlo tekuté, zn. ISANA, varianty „Speciál“, „Mango a pomeranč“; Dirk Rossmann GmbH; Německo
- mýdlo tuhé, zn. Palmolive, varianta „Mléko a okvětní lístky růže“; Colgate-Palmolive; USA
- ovomukoid; vyroben na pracovišti
- peroxidisíran amonný; Sigma-Aldrich; USA
- síran měďnatý, pentahydrát; Lach-Ner, s.r.o.; Česká republika
- standard molekulové hmotnosti pro SDS-PAGE, Protein Test Mixture 5; SERVA Electrophoresis GmbH; Německo
- N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin (TEMED); Sigma-Aldrich; USA
- thiosíran sodný; Lachema; Česká republika
- tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris); Fluka Biochemika; Česká republika
- trypsin (EC 3.4.21.4); Sigma-Aldrich; USA
- L-tyrosin; Sigma-Aldrich; USA
- uhličitan sodný; Lachema; Česká republika
- uhličitan vápenatý; Lachema; Česká republika
- vinan sodný, dihydrát; Lachema; Česká republika

## 3.2 Enzymové preparáty

V první části práce byla provedena enzymová analýza v komerčním přípravku biologické ochrany rostlin s obsahem oomycety *Pythium oligandrum* M1, Polyversum-Biogarden, vyráběného společností Biopreparáty, spol. s r. o.

Ve druhé části práce byla měření prováděna v roztocích proteinů sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum* M1. Tyto preparáty byly již dříve využity v experimentech, které byly součástí projektu č. FV10735 Ministerstva průmyslu a obchodu ČR[23].

## 3.3 Pomůcky a přístroje

- analytické váhy XE-100A; Denver Instrument; USA
- aparatura na gelovou elektroforézu; Biometra<sup>®</sup>; Německo
- centrifuga UNIVERSAL 32 R; Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Německo
- laboratorní váhy 440-45; KERN<sup>®</sup>; Německo
- prosvětlovací pult Kaiser pro lite basic; Kaiser Fototechnik GmbH & Co. KG; Německo
- pH metr UltraBasic, model UB-10; Denver Instrument; USA
- snímač absorbance ST Sunrise Remote; Tecan Group Ltd.; Švýcarsko
- spektrofotometr Multiskan<sup>®</sup> GO; Thermo Fisher Scientific Oy; Finsko
- termostat Elite Dry Bath Incubator, modely EL-01 a EL-02; Major Science; USA
- třepačka orbitální ES-60, MIUlab; Hangzhou Miu Instruments Co., Ltd.; Čína

## 3.4 Metody

Pokud není uvedeno jinak, byly všechny roztoky připraveny rozpuštěním daných látek v deionizované vodě. Laboratorní teplota se pohybovala v rozmezí 20 a 23 °C.

### 3.4.1 Aktivace *P. oligandrum* v přípravku Polyversum-Biogarden

Přípravek Polyversum-Biogarden společnosti Biopreparáty, spol. s r. o. je biologický fungicid, jehož účinnou složkou je mikroorganismus *Pythium oligandrum* M1, který se v přípravku nachází ve formě oospor ( $1 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ )[24].

Podle návodu uvedeného v příbalové informaci k produktu je nezbytné před aplikací vytvořit 0,05 % (w/v) suspenzi přípravku ve vodě. Po jejím promíchání je nutné nechat suspenzi 30 min stát, aby došlo k aktivaci mikroorganismu[24].

Pro potřeby experimentu byla připravena suspenze přípravku Polyversum-Biogarden o koncentraci 5% (w/v) rozmícháním 1 g přípravku v 20 ml deionizované vody. Takto připravená suspenze byla inkubována při 25 °C. V časech 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 a 144 h byl pomocí pipety s uštíženou špičkou odebrán 1 ml suspenze a ihned centrifugován 15 min při 17 000 × g a teplotě 4 °C. Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky a uchován v lednici při 5 °C.

### 3.4.2 Stanovení aktivity endo-1,3- $\beta$ -glukanasy

K stanovení aktivity endo-1,3- $\beta$ -glukanasy (EC 3.2.1.6) se využívá její schopnosti specificky štěpit  $\beta(1\rightarrow3)$  vazby substrátu laminarinu za vzniku kratších redukujících sacharidů. Nově vzniklé redukující sacharidy mohou být kvantitativně stanoveny pomocí následných reakcí s MBTH a ionty železa. Finálním produktem těchto reakcí je sytě modrá sloučenina s maximem absorpance v okolí 620 nm, kterou je možno stanovit spektrofotometricky. Míra zabarvení produktu je závislá na množství vzniklých redukujících –OH skupin, a tedy na aktivitě endo-1,3- $\beta$ -glukanasy[25].

Reakční směs pro stanovení aktivity endo-1,3- $\beta$ -glukanasy byla připravena smísením 20  $\mu$ l 100 mM pufru MOPS-NaOH, pH 5,0 s 12  $\mu$ l 1,6 mg ml<sup>-1</sup> laminarinu a s 8  $\mu$ l enzymového preparátu. Enzymová reakce probíhala při 37 °C po dobu 60 min (u preparátů připravených aktivací přípravku Polyversum-Biogarden) nebo 90 min a byla zastavena přidáním 40  $\mu$ l 0,5 M NaOH. Poté bylo přidáno 40  $\mu$ l směsi MBTH a DTT, která byla připravena smísením 3 mg ml<sup>-1</sup> MBTH s 1 mg ml<sup>-1</sup> DTT v poměru 1:1. Následně byly zkumavky inkubovány 15 min při 80 °C. Po vyjmutí z blokového termostatu bylo ke směsi přidáno 80  $\mu$ l činidla složeného z 0,5 % FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; 0,5 % kyseliny sulfanilové a 0,25 M HCl. Nakonec byla změřena absorpance při 630 nm.

Slepý pokus byl připraven přednostním smísením 8  $\mu$ l enzymového preparátu s 40  $\mu$ l 0,5 M NaOH, po němž následovala inkubace 30 min při 80 °C. Poté byly přidány zbylé složky směsi, nakonec byla změřena absorpance při 630 nm.

Kalibrace byla provedena nahrazením roztoků substrátu a enzymového preparátu 20  $\mu$ l roztoků glukosy o koncentracích 0,05–2 mM, tedy v rozsahu látkového množství glukosy 1–40 nmol. Ze změřených absorpancí při 630 nm byla zjištěna směrnice kalibrační přímky, pomocí které byly převedeny hodnoty absorpancí jednotlivých stanovení na ekvivalenty zvoleného standardu.

### 3.4.3 Stanovení aktivity celulasy

Aktivita celulasy (EC 3.2.1.4) byla stanovena na základě její schopnosti specificky štěpit vazbu  $\beta(1\rightarrow4)$  příslušného substrátu, tj. methylcelulosity. Reakční směs se skládala z 20  $\mu\text{l}$  100 mM pufru MOPS-NaOH, pH 5,0; 12  $\mu\text{l}$  1,6  $\text{mg ml}^{-1}$  methylcelulosity a 8  $\mu\text{l}$  enzymového preparátu. Reakce probíhala 60 min při 37 °C a byla zastavena přidáním 40  $\mu\text{l}$  0,5 M NaOH. Následný postup kvantitativního stanovení redukujících sacharidů vzniklých štěpením methylcelulosity, stejně jako příprava slepého pokusu a provedení kalibrace jsou shodné s postupem v kapitole 3.4.2, na straně 14.

### 3.4.4 Stanovení aktivity chitinasy

K stanovení aktivity chitinasy (EC 3.2.1.14) byla využita její schopnost specificky štěpit  $\beta(1\rightarrow4)$  vazby chitinu, polysacharidu složeného z monomerů N-acetyl-D-glukosaminu, za vzniku redukujících sacharidů. Reakce byla zahájena přidáním 8  $\mu\text{l}$  enzymového preparátu k směsi 20  $\mu\text{l}$  100 mM pufru MOPS-NaOH, pH 5,0 a 12  $\mu\text{l}$  1,6  $\text{mg ml}^{-1}$  chitinu. Reakce probíhala 60 min při 37 °C, poté byla zastavena přidáním 40  $\mu\text{l}$  0,5 M NaOH. Následné kvantitativní stanovení redukujících sacharidů, tvorba slepého pokusu a kalibrace byly shodné s postupem popsaným v kapitole 3.4.2, na straně 14.

### 3.4.5 Stanovení aktivity proteas

K stanovení aktivity proteas bylo využito hydrolýzy barevného substrátu azokaseinu podle principu popsaného v [26]. 50  $\mu\text{l}$  2,5 % (w/v) azokaseinu bylo smíšeno s 25  $\mu\text{l}$  100 mM pufru MOPS-NaOH, pH 7,0 nebo pH 5,0. Následným přidáním 25  $\mu\text{l}$  enzymového preparátu byla zahájena enzymová reakce, která probíhala 60 min při 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 250  $\mu\text{l}$  5 % trichloroctové kyseliny. Poté byla směs centrifugována po dobu 10 min při 7400  $\times$  g při 4 °C. K 100  $\mu\text{l}$  supernatantu bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  2 M NaOH. Nakonec byla změřena absorbance při vlnové délce 450 nm. Obdobným postupem byl proveden slepý pokus. Kyselina trichloroctová však byla vnesena do reakční směsi před přidáním enzymového preparátu.

Kalibrace byla provedena smísením 100  $\mu\text{l}$  roztoku azokaseinu v koncentračním rozsahu 0,05–3,1  $\text{mg ml}^{-1}$  (tedy v rozsahu látkového množství 0,2–13,1 nmol) se 100  $\mu\text{l}$  2 M NaOH a následným změřením absorbance při 450 nm. Směrnice získaná z této

závislosti byla využita pro převod hodnot absorbancí jednotlivých stanovení na ekvivalenty zvoleného standardu.

### 3.4.6 Stanovení inhibitorů proteas v přípravku Polyversum-Biogarden

Bylo provedeno měření vlivu preparátů aktivovaného Polyversum-Biogarden na serinovou proteasu trypsin (EC 3.4.21.4), a to ve dvou variantách. V prvním případě se reakční směs skládala z 50  $\mu\text{l}$  2,5 % (w/v) azokaseinu; 25  $\mu\text{l}$  100 mM pufru MOPS-NaOH, pH 7,0; 15  $\mu\text{l}$  testovaného preparátu a 10  $\mu\text{l}$  0,1 % (w/v) trypsinu. V druhém případě byla složena z 50  $\mu\text{l}$  2,5 % (w/v) azokaseinu již rozpuštěného v 100 mM pufru MOPS-NaOH, pH 7,0; z 40  $\mu\text{l}$  testovaného preparátu a z 10  $\mu\text{l}$  0,1 % (w/v) trypsinu. V obou případech byla reakce zahájena přidáním trypsinu a probíhala 10 min při 37 °C. Zastavení reakce a následné kroky (též kalibrace) byly již shodné s postupem popsáním v kapitole 3.4.5 na straně 15. Slepý vzorek byl vytvořen přidáním kyseliny trichloroctové před vnesením testovaného preparátu a trypsinu.

### 3.4.7 Stanovení pH optima proteas

K stanovení pH optima proteas byla využita metoda hydrolýzy kaseinu v prostředí McIlvainových (citrát-fosfátových) pufrů, jejichž složení je uvedeno v tabulce 1 na straně 17. Reakční směs obsahovala 60  $\mu\text{l}$  5 % (w/v) kaseinu a 60  $\mu\text{l}$  McIlvainova (citrát-fosfátového) pufru, pH 5,0–8,0. Reakce byla zahájena přidáním 30  $\mu\text{l}$  enzymového preparátu a probíhala 60 min při 37 °C. Zastavena byla přidáním 125  $\mu\text{l}$  20 % (v/v) kyseliny trichloroctové. Poté byla směs 10 min centrifugována při 7400  $\times$  g a 4 °C. Následně bylo smíseno 50  $\mu\text{l}$  supernatantu se 125  $\mu\text{l}$  6 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a s 25  $\mu\text{l}$  25 % (v/v) Folin-Ciocalteuova činidla. Po 30 min inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena absorbance při 750 nm. Pro vytvoření slepého pokusu byla kyselina trichloroctová vnesena do reakční směsi před přidáním enzymového preparátu.

Pro vytvoření kalibrace (upraveno podle [28]) byl supernatant nahrazen 50  $\mu\text{l}$  roztoku L-tyrosinu tak, aby se látkové množství tyrosinu ve směsích pohybovalo v rozsahu 1,4–22 nmol. Získaná kalibrační závislost absorbance při 750 nm na látkovém množství L-tyrosinu byla využita pro převod hodnot absorbancí jednotlivých stanovení na ekvivalenty zvoleného standardu.

Tabulka 1: **Složení McIlvainových pufrů**[27]. Výsledná hodnota pH byla docílena pomocí 0,5 M NaOH.

pH	0,1 M kyselina citronová (ml)	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (ml)
5,0	3,90	4,10
5,5	3,50	4,60
6,0	2,90	5,10
6,5	2,30	5,70
7,0	1,40	6,60
8,0	0,20	7,80

### 3.4.8 Inhibice proteas ovomukoidem

Ovomukoid byl testován jako možný inhibitor sekretovaných proteas upravenou metodou podle [27]. Reakční směs obsahovala 50 µl roztoku azokaseinu o koncentraci 0,5 % (w/v) nebo 2,5 % (w/v); 25 µl 100 mM pufru MOPS-NaOH, pH 7,0 a 15 µl roztoku ovomukoidu v rozsahu koncentrací 0,04–2,8 % (w/v). Pro vytvoření kontroly byl roztok ovomukoidu nahrazen 15 µl vody. Reakce byla zahájena přidáním 10 µl enzymového preparátu a probíhala 30 min při 37 °C. Zastavena byla přidáním 250 µl 5 % (v/v) kyseliny trichloroctové. V případě slepého pokusu byla kyselina trichloroctová přidána před přidáním enzymového preparátu. Následné kvantitativní stanovení a kalibrace byly shodné s postupem uvedeným v kapitole 3.4.5 na straně 15.

### 3.4.9 Měření stability enzymů ovlivněných vybranými činidly

Byla testována stabilita sekretovaných enzymů v prostředí činidel, jako jsou SDS, močovina či hydroxid sodný. Enzymové preparáty byly inkubovány v různých koncentracích těchto činidel při laboratorní teplotě po stanovenou dobu. Kompletní seznam použitých činidel, rozmezí jejich koncentrací ve směsi s enzymovým preparátem a doba inkubace činidla s enzymovým preparátem jsou uvedeny v tabulce 2 na straně 18. Pro vytvoření kontrol byly enzymové preparáty inkubovány vždy odpovídající čas v deionizované vodě (bez přítomnosti činidel).

Po inkubaci enzymového preparátu v přítomnosti zmíněných činidel po uvedené dobu byla provedena vlastní enzymová reakce. V případě měření stability proteas obsahovala reakční směs vždy 50 µl 2,5 % (w/v) azokaseinu a 25 µl 100 mM pufru MOPS–NaOH, pH 7,0. Reakce byla zahájena přidáním 25 µl směsi enzymového pre-

Tabulka 2: **Přehled použitých činidel.** V tabulce je uveden seznam činidel, jejichž vliv na stabilitu sekretovaných enzymů byl sledován. Dále jsou zde uvedeny koncentrace roztoků, ve kterých byly inkubovány enzymové preparáty. Poslední údaj ( $t$ ) udává čas inkubace enzymového preparátu v roztoku daného činidla. \*Zásobní roztok tuhého mýdla byl připraven navážením 20,6 g mýdla do 40 ml deionizované vody. Po celodenní inkubaci při laboratorní teplotě byl roztok přefiltrován přes skládaný filtrační papír. Ve vzniklém filtrátu byla změřena hodnota  $\text{pH} = 8$ .

Činidlo	Koncentrace činidla		$t$ (min)
Močovina	1–8 M		120
Tuhé mýdlo	50 % (v/v) roztok*		120
SDS	0,5 % a 1,0 % (w/v)		120
NaOH	0,05 M a 0,1 M		120
Tekuté mýdlo ISANA	25 % (v/v)		30
Směs SDS a NaOH	2,5–25 mM NaOH v 0,5 % (w/v) SDS	2,5–25 mM NaOH v 1,0 % (w/v) SDS	30
Ethanol	10–48 % (v/v)		30

parátu s příslušným činidlem a probíhala vždy 30 min při 37 °C. Poté byla zastavena přidáním 250  $\mu\text{l}$  5 % (v/v) kyseliny trichloroctové. Následný postup (včetně kalibrace) byl již shodný s postupem popsáním v kapitole 3.4.5 na straně 15.

V případě měření stability endo-1,3- $\beta$ -glukanasy obsahovala reakční směs 12  $\mu\text{l}$  1,6  $\text{mg ml}^{-1}$  laminarinu a 20  $\mu\text{l}$  100 mM pufru MOPS–NaOH,  $\text{pH}$  5,0. Reakce byla zahájena přidáním 8  $\mu\text{l}$  směsi enzymu a příslušného činidla. Reakce probíhala 90 min a byla zastavena přidáním 40  $\mu\text{l}$  0,5 M NaOH. Následné kroky (včetně kalibrace) se již shodovaly s postupem uvedeným v kapitole 3.4.2 na straně 14.

### 3.4.10 Stanovení proteinů podle Lowryho

Celkového množství rozpustných proteinů bylo stanoveno podle Lowryho[29]. Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno vždy 15  $\mu\text{l}$  roztoku proteinů (roztoky standardu BSA nebo enzymové preparáty). Poté bylo přidáno 165  $\mu\text{l}$  roztoku C, který vznikl smísením padesáti dílů roztoku A (2 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  v 0,1 M NaOH) a jednoho dílu roztoku B (0,5 % (w/v)  $\text{CuSO}_4$  v 1 % (w/v) vinanu sodném). Po 10 min inkubaci bylo k směsi přidáno 20  $\mu\text{l}$  50 % (v/v) Folin-Ciocalteuova fenolového činidla. Následovala 30 min inkubace, po které byla změřena absorbance při 700 nm. Slepý pokus byl vytvořen nahrazením roztoku proteinů deionizovanou vodou.

Koncentrace proteinů v enzymových preparátech byla vypočtena z rovnice regresní

přímky závislosti absorbance roztoků standardu (roztoky BSA v koncentračním rozsahu 0,05–0,7 mg ml<sup>-1</sup>) při 700 nm na jejich hmotnostní koncentraci.

### 3.4.11 Elektroforetická separace v prostředí SDS

Byla provedena elektroforetická separace proteinů v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS podle Laemmliho[30]. Pro separaci proteinů byl použit zaostřovací gel s koncentrací akrylamidu 4 % (w/v) a separační gel s koncentrací akrylamidu 15 % (w/v).

Zaostřovací gel byl připraven smísením 2,7 ml vody; 670 µl 30 % (w/v) zásobního roztoku akrylamidové směsi; 500 µl 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 40 µl 10 % SDS; 4 µl TEMED a 40 µl 10 % peroxidisíranu amonného. Separační gel obsahoval 3,4 ml vody; 7,5 ml 30 % (w/v) zásobního roztoku akrylamidové směsi; 3,8 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 150 µl 10 % SDS; 6 µl TEMED a 150 µl 10 % peroxidisíranu amonného. 30 % (w/v) zásobní roztok akrylamidové směsi se skládal z 29,2 % (w/v) akrylamidu a 0,8 % (w/v) N, N'-methylenbisakrylamidu.

Enzymové preparáty byly smíseny se vzorkovým pufrům v poměru 1:1 a směs byla následně povařena 5 min ve vodní lázni. Vzorkový pufr se skládal z 2,4 ml vody; 2,6 ml 0,5 M pufru Tris-HCl, pH 6,8; 2 ml glycerolu; 2 ml 10 % SDS; 0,5 ml β-merkapt ethanolu a 0,5 ml 1 % bromfenolové modři.

Takto připravené preparáty byly nanášeny do jamek gelu ponořeného do elektrodového pufru (pH 8,3), který byl složen z 0,3 % (w/v) Tris; 1,44 % (w/v) glycinu a 0,1 % (w/v) SDS. Do jednotlivých jamek bylo nanášeno 5 µg proteinů. Použitým standardem molekulových hmotností byl přípravek "Protein Test Mixture 5 for SDS PAGE", který pokrývá oblast 6,5–29 kDa. Elektroforetická separace probíhala nejdříve při 70 V. Po prostoupení preparátů do separačního gelu bylo napětí zvýšeno na 140 V.

Po ukončení separace byly proteiny obarveny pomocí dusičnanu stříbrného. Nejdříve byl gel po dobu 1,5 h ponořen do fixačního roztoku (50 % (v/v) ethanol; 12 % (v/v) kyselina octová; 0,05 % formaldehyd), poté byl během 20 min dvakrát propláchnut promývacím roztokem (20 % (v/v) ethanol) a dvakrát vodou. Dále byl gel na 2 min vložen do čerstvě připraveného senzitivizujícího roztoku (0,02 % (w/v) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), poté byl dvakrát promyt vodou. Následovalo ponoření do barvicího roztoku (0,2 % (w/v) AgNO<sub>3</sub>; 0,076 % (v/v) formaldehyd). Po obarvení byl

gel krátce propláchnut vodou. Vyvíjení ve vyvíjecím roztoku (6 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 0,0004 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; 0,05 % (v/v) formaldehyd), které probíhalo po dobu asi 10 min, bylo zastaveno přidáním terminačního roztoku (12 % (v/v) kyselina octová). Po pořízení fotografií byl gel převeden do deionizované vody.

## 4 Výsledky

V této práci byly studovány některé vlastnosti enzymů sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum*. V první části práce byl sledován vývoj aktivity vybraných hydrolytických enzymů a bylo měřeno množství rozpustných proteinů v aktivovaném komerčním přípravku Polyversum-Biogarden v závislosti na době jeho aktivace. V druhé části práce byl studován vliv některých látek na aktivitu a stabilitu sekretovaných enzymů v enzymových preparátech, které jsou součástí projektu č. FV10735 Ministerstva průmyslu a obchodu ČR.

### 4.1 Enzymové aktivity v přípravku Polyversum-Biogarden

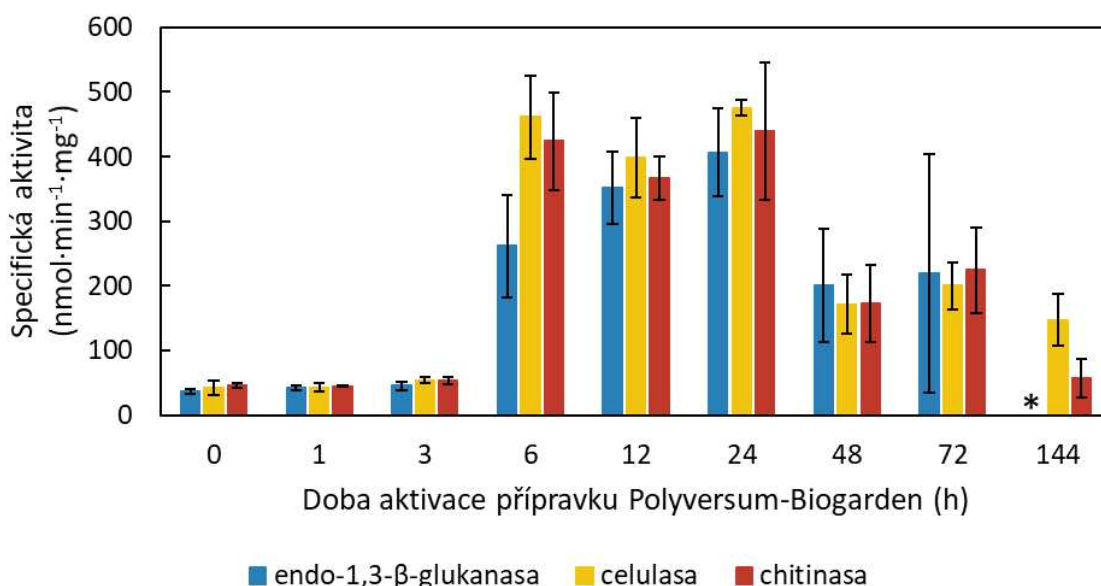
Přípravek Polyversum-Biogarden má být dle pokynů výrobce před použitím aktivován rozmícháním ve vodě a 30 min inkubován[24]. V první fázi experimentu byla připravena suspenze přípravku Polyversum-Biogarden o desetinásobné koncentraci oproti pokynům výrobce, tedy 0,5 % (w/v) suspenze[24]. I přes tuto záměrně vyšší koncentraci byly však naměřené enzymové aktivity v přípravku velmi nízké. (Data nejsou uvedena.) Z tohoto důvodu byla připravena suspenze přípravku se stonásobnou (tj. 5 % (w/v)) koncentrací oproti doporučení výrobce. (Postup aktivace viz kapitola 3.4.1, str. 13.) Následně byla v jednotlivých enzymových preparátech (supernatantech po odstředění suspenze) změřena aktivita sekretovaných glykosidas a proteas. (Postup byl popsán v kapitolách 3.4.2, 3.4.3, 3.4.4 a 3.4.5, str. 14–15.)

#### 4.1.1 Aktivita glykosidas

Na obrázku 5 na straně 21 jsou uvedeny hodnoty specifických aktivit naměřených v preparátech připravených různě dlouhou aktivací přípravku Polyversum-Biogarden. (Aktivace viz kap. 3.4.1, str. 13.) Aktivity jsou vyjádřeny v ekvivalentech látkového množství

redukujícího sacharidu glukosy vztažených na jednotku času a mg rozpustných proteinů. (Obsah rozpustných proteinů viz kap. 4.1.3, str. 22.)

Jak je z obrázku patrné, v krátkých časech aktivace přípravku, tj. 1 h a 3 h, byla aktivita glykosidas srovnatelná s hodnotami v čase 0 h, tedy s aktivitou glykosidas bez aktivace přípravku. Po šestihodinové aktivaci přípravku však došlo k skokovému nárůstu aktivit všech glykosidas, nejvyšší nárůst byl zaznamenán u celulasy, nejnižší u endo-1,3- $\beta$ -glukanasy. Podobně vysokých hodnot dosahovaly aktivity glykosidas také v následujících hodinách aktivace. V preparátech aktivovaných po dobu 48 h byl zaznamenán prudký pokles aktivity. I přes tento pokles však byly aktivity glykosidas přibližně čtyřnásobné oproti počátečním hodnotám. Srovnatelných hodnot dosahovaly aktivity celulasy a chitinasy v preparátech aktivovaných 72 h, další pokles nastal po aktivaci trvající 144 h. Aktivita endo-1,3- $\beta$ -glukanasy klesla po 144 h aktivaci k nule.



Obrázek 5: **Specifická aktivita glykosidas v přípravku Polyversum-Biogarden.** Aktivita byla měřena v preparátech lišících se dobou aktivace přípravku. Preparáty byly připraveny z 5% (w/v) suspenze Polyversum-Biogarden v deionizované vodě, inkubované při 25 °C. Symboly: \* - Aktivita enzymu klesla k nule.

#### 4.1.2 Aktivita proteas

V preparátech aktivovaného přípravku Polyversum-Biogarden byly rovněž měřeny aktivity proteas podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.5 na straně 15. Jak je vidět na obrázku 6 na straně 23, aktivita proteas nebyla v některých preparátech vůbec

měřitelná. Nejvyšší naměřenou hodnotou byla specifická aktivita preparátu aktivovaného 24 h, která činila přibližně  $0,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

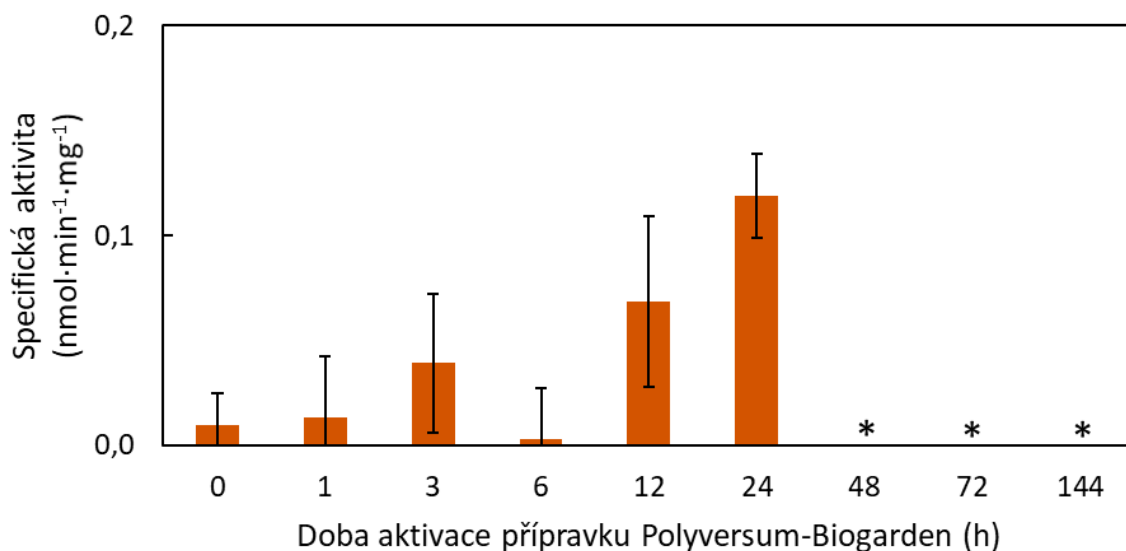
Vzhledem k prakticky nulovým aktivitám proteas v aktivovaném přípravku Polyversum-Biogarden byla vyslovena úvaha, že by se v něm mohly vyskytovat inhibitory proteas. Za účelem otestování tohoto předpokladu byla, podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.6 na straně 16, vytvořena reakční směs, která kromě enzymových preparátů obsahovala serinovou proteasu trypsin (EC 3.4.21.4), jejíž aktivita by mohla být případnými inhibitory negativně ovlivněna. Jak ovšem vyplývá z obrázku 7 na straně 23, aktivita trypsinu byla ve všech případech srovnatelná s kontrolou (tj. reakcí ve které byl enzymový preparát nahrazen vodou). Přítomnost inhibitorů serinových proteas mezi proteiny sekretovanými oomycetou *Pythium oligandrum* tedy nebyla potvrzena.

Zobrazená data pochází z druhé série měření, ve které bylo množství enzymového preparátu vnášeného do reakční směsi navýšeno na 40  $\mu\text{l}$ . (Výsledky prvního měření, při kterém bylo do reakční směsi vnášeno pouze 15  $\mu\text{l}$  enzymového preparátu, nejsou uvedeny, neboť naměřené hodnoty byly obdobné.)

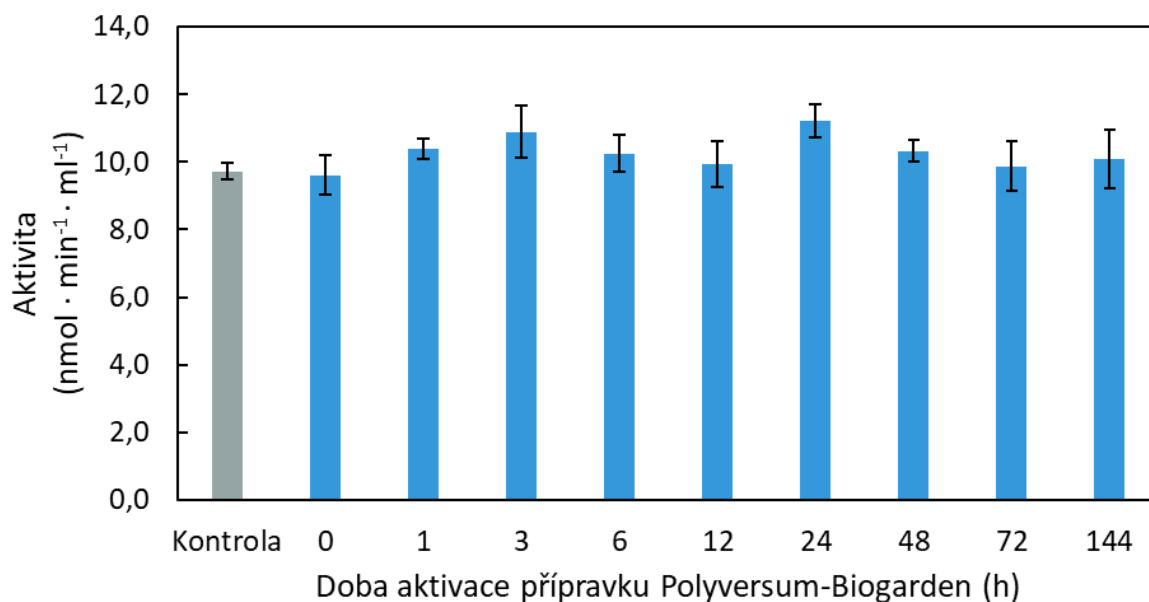
#### 4.1.3 Obsah proteinů v aktivovaném přípravku Polyversum-Biogarden

Na obrázku 8 na straně 25 jsou uvedeny koncentrace rozpustných proteinů v aktivovaném přípravku Polyversum-Biogarden změřené podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.10 na straně 18. Ačkoliv byla koncentrace rozpustných proteinů v kontextu ostatních naměřených hodnot vysoká již na počátku (tj. v preparátu, kterému nebyl ponechán čas k aktivaci – 0 h), je patrné, že během prvních tří hodin aktivace množství rozpustných proteinů v preparátech pozvolna vzrostlo, a to přibližně o  $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ . Takto zvýšená koncentrace proteinů (přibližně  $0,7 \text{ mg ml}^{-1}$ ) byla naměřena i v následujících hodinách aktivace. Při aktivaci trvajících 24 a více hodin byly naměřené koncentrace rozpustných proteinů nižší než koncentrace naměřená v neaktivovaném preparátu (0 h).

Za účelem charakterizace proteinů nacházejících se v preparátech Polyversum-Biogarden, byla provedena jejich elektroforetická separace v polyakrylamidovém gelu v prostředí SDS podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.11 na straně 19. Protože je známo, že organismus *Pythium oligandrum* sekretuje oligandrin, protein s nízkou



Obrázek 6: **Specifická aktivita proteas v přípravku Polyversum-Biogarden.** Aktivita byla měřena v preparátech lišících se dobou aktivace přípravku. Preparáty byly připraveny z 5 % (w/v) suspenze Polyversum-Biogarden v deionizované vodě, inkubované při 25 °C. Symboly: \* - Aktivita enzymu klesla k nule.



Obrázek 7: **Vliv přípravku Polyversum-Biogarden na aktivitu trypsinu.** Byla měřena aktivita serinové proteasy trypsinu v reakční směsi se zvýšeným podílem (40  $\mu$ l) aktivovaného přípravku Polyversum-Biogarden. Aktivita je vztažena na ml roztoku trypsinu. Jako kontrola sloužila reakce, ve které byl aktivovaný přípravek Polyversum-Biogarden nahrazen deionizovanou vodou.

molekulovou hmotností (přibližně 10 kDa)[20], bylo využito 15 % (w/v) polyakrylamidového gelu a standardních proteinů, které pokrývají rozsah molekulových hmotností 6,5–29 kDa.

Po elektroforetické separaci proteinů byly vyhodnoceny jejich relativní molekulové hmotnosti za pomoci programu GelAnalyzer. Na snímku gelu (obr. 9, str. 25) jsou viditelné dva slabé proužky odpovídající proteinům s molekulovou hmotností v přibližném rozmezí 11–12 kDa, které se nacházejí v preparátech aktivovaných 24 a 48 h. Tyto proužky jsou na obrázku červeně zakroužkovány.

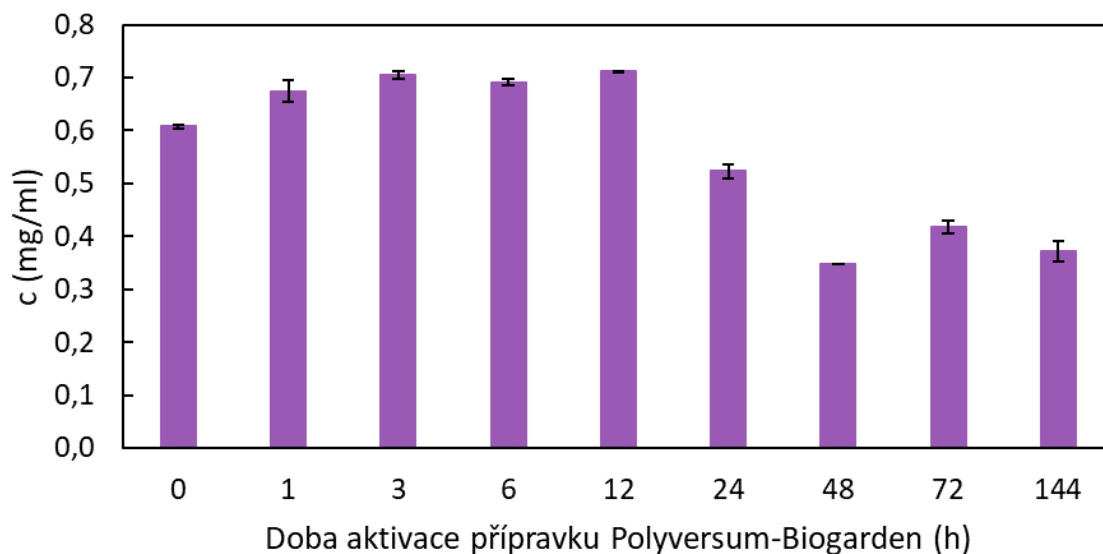
Dále je na snímku gelu patrné množství proužků nacházejících se nad horní hranicí rozsahu standardu molekulových hmotností (více než 29 kDa). Jedná se o poměrně rozsáhlou oblast výraznějších proužků odpovídajících proteinům s molekulovými hmotnostmi v rozsahu přibližně 56–67 kDa a o oblast méně výrazných proužků, které odpovídají proteinům s molekulovou hmotností v rozsahu přibližně 41–50 kDa. Jak je ze snímku patrné, proužky odpovídající proteinům s vyšší molekulovou hmotností jsou dobře viditelné ve všech enzymových preparátech, na rozdíl od proužků druhé zmíněné oblasti, které jsou výraznější v preparátech aktivovaných 24 h a déle.

## **4.2 Vlastnosti enzymů sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum***

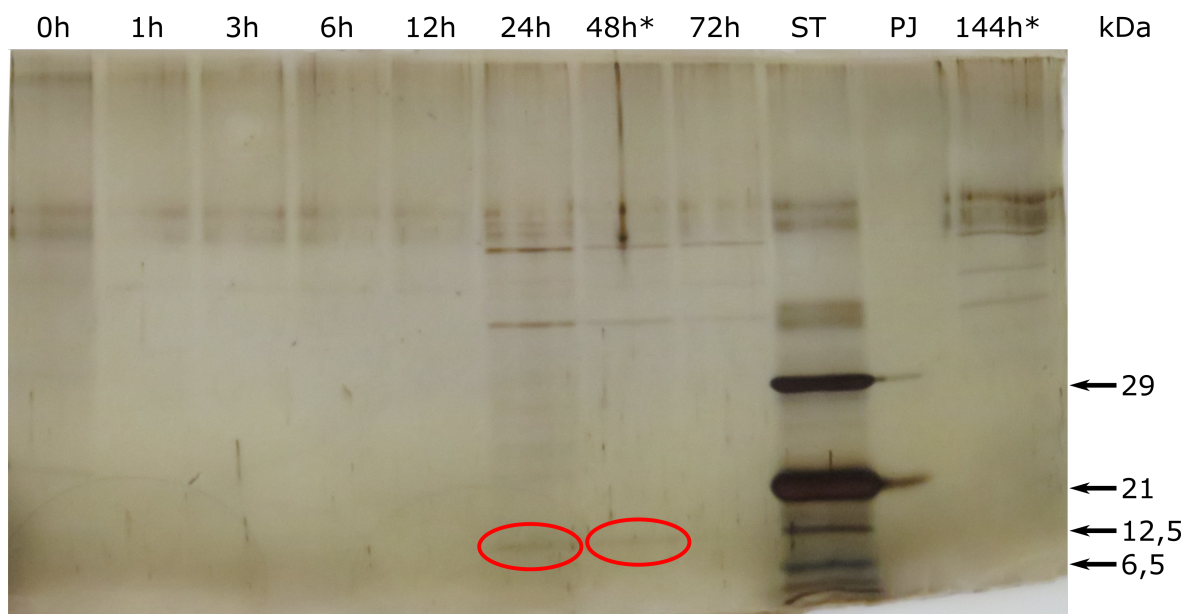
### **4.2.1 Stanovení aktivity proteas**

Byla stanovena aktivita proteas v preparátech, které byly skladovány po dobu dvou let v mrazničce při teplotě  $-24^{\circ}\text{C}$ . Výsledky tohoto stanovení (viz obrázek 10, str. 27) byly důležité pro zjištění stability proteas při jejich dlouhodobém skladování. Naměřené hodnoty se nelišily od původních[23], nejvyšší aktivitu měly preparáty číslo 1 a číslo 5. Měření probíhalo při dvou různých hodnotách pH (pH 5,0 a pH 7,0) podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.5 na straně 15. Naměřené specifické aktivity byly pro obě hodnoty pH ve všech preparátech srovnatelné.

Z předchozích studií je známo, že mezi sekretovanými enzymy se vyskytuje více typů proteas[23], byla tedy stanovena závislost aktivity sekretovaných proteas na pH. Měření bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.7 na straně 16. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny na obrázku 11 na straně 27. Aktivita proteas, vyjádřena



Obrázek 8: **Obsah rozpustných proteinů v přípravku Polyversum-Biogarden.** Koncentrace proteinů je vyjádřena v miligramech zvoleného standardu, BSA, vztahených na ml aktivovaného přípravku.



Obrázek 9: **Elektroforetická separace proteinů aktivovaného přípravku Polyversum-Biogarden v prostředí SDS.** Separace byla provedena v 15 % (w/v) polyakrylamidovém gelu. Popisky jednotlivých jamek označují dobu aktivace přípravku Polyversum-Biogarden v hodinách, ST = standard molekulových hmotností, PJ = prázdná jamka. Do jamek bylo nanášeno 5  $\mu$ g proteinů. Hvězdičky označují jamky, do kterých bylo kvůli nízké koncentraci nanášeno méně než 5  $\mu$ g proteinů. (48 h: 4,4  $\mu$ g; 144 h: 4,6  $\mu$ g.) Červeně zakroužkovaná oblast označuje proužky odpovídající molekulové hmotnosti přibližně 11–12 kDa.

v ekvivalentech látkového množství standardu, L-tyrosinu, vztažených na čas reakce a mililitr enzymového preparátu, se pohybovala v rozsahu 8,2–14,0 nmol min<sup>-1</sup> ml<sup>-1</sup>. Nejvyšší hodnoty dosahovala při pH 6,5.

#### 4.2.2 Vliv ovomukoidu na aktivitu proteas

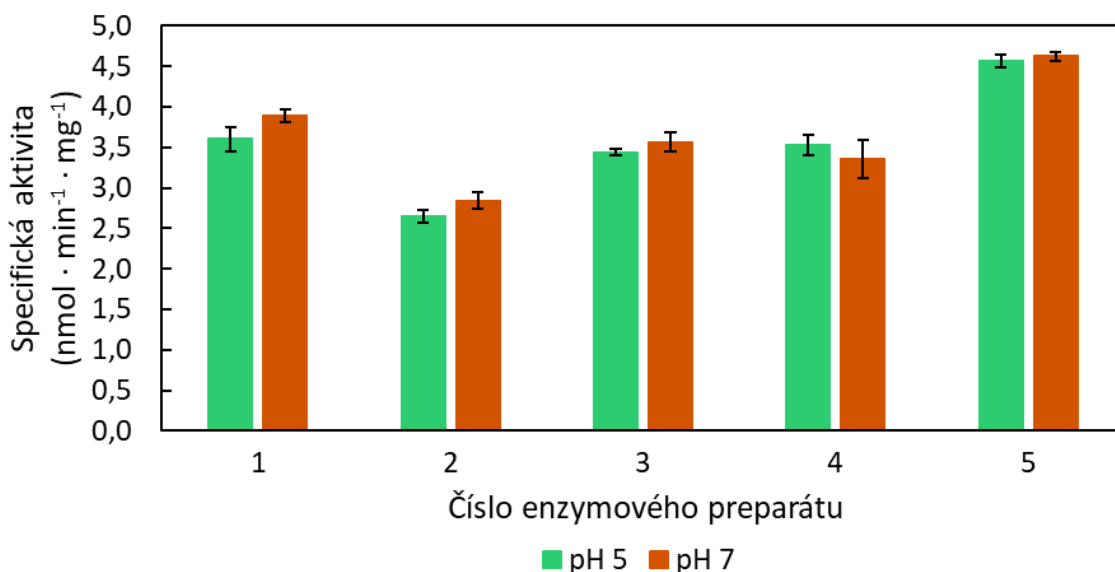
V roztoku sekretovaných enzymů oomycety *Pythium oligandrum* byl sledován vliv inhibitoru ovomukoidu na přítomné proteasy podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.8 na straně 17. Na obrázku 12 na straně 28 je znázorněna závislost rychlosti reakce na molární koncentraci inhibitoru, při dvou koncentracích substrátu a pH 7,0. Z naměřených dat byly pomocí rovnice spojnice trendu Dixonova výnosu (závislosti reciproké rychlosti reakce na koncentraci inhibitoru) vypočteny hodnoty IC<sub>50</sub> pro obě koncentrace substrátu. V případě reakce probíhající v prostředí 106 μM azokaseinu se vypočtená hodnota IC<sub>50</sub> rovná přibližně 17 μM. Hodnota IC<sub>50</sub> vypočítaná pro reakci probíhající v prostředí 530 μM azokaseinu odpovídá přibližně 20 μM.

#### 4.2.3 Vliv vybraných činidel na stabilitu proteas a endo-1,3-β-glukanasy

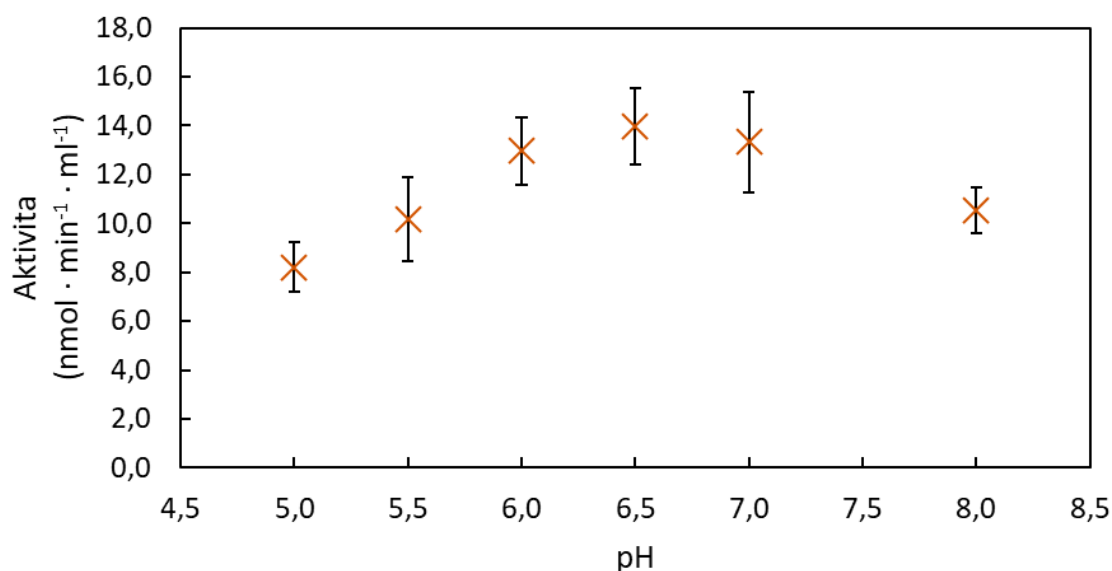
Dále byl sledován vliv různě koncentrovaných roztoků vybraných činidel (konkrétně močoviny, tuhého a tekutého mýdla, ethanolu, SDS, NaOH a směsi posledních dvou zmíněných látek) na stabilitu sekretovaných proteas a endo-1,3-β-glukanasy podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.9, na straně 17.

Na obrázku 13 na straně 29 je znázorněn vliv 1–8 M roztoků močoviny na stabilitu sekretovaných proteas. Doba inkubace enzymového preparátu v roztocích močoviny byla 2 h. Z obrázku je patrné, že k snížení specifické aktivity proteas došlo v prostředí 4 M a 8 M močoviny. Ve zbylých roztocích byly naměřené specifické aktivity srovnatelné s kontrolou.

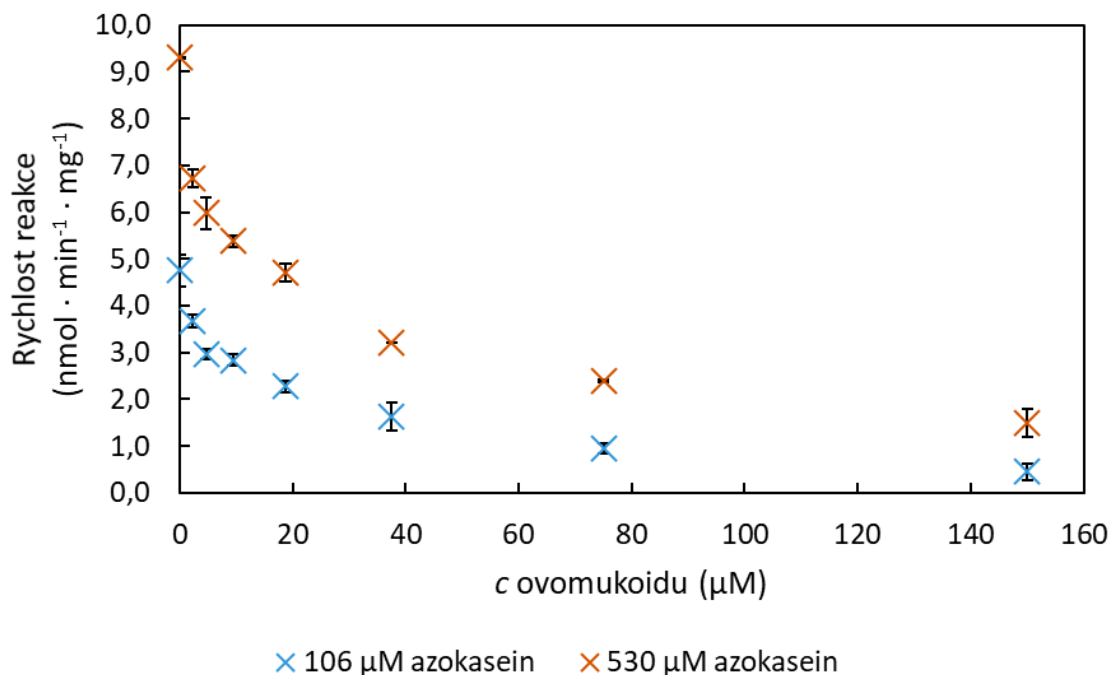
Odlišná situace nastala v případě 2 h inkubace preparátu v roztocích tenzidů (0,5 % a 1 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) roztoku připraveného z tuhého mýdla) a v 0,05 M či 0,1 M roztocích NaOH (obrázek 14, str. 29). V porovnání s kontrolou byla změřena nižší specifická aktivita ve všech uvedených roztocích. Nejnižší specifická aktivita pak byla naměřena v roztocích 1 % (w/v) SDS a 0,1 M NaOH; v těchto prostředích tedy byly proteasy méně stabilní.



Obrázek 10: **Stabilita proteas sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum*.** Specifická aktivita sekretovaných proteas byla měřena v preparátech (č. 1–5), které byly dva roky skladovány při teplotě  $-24^{\circ}\text{C}$ . Enzymová reakce probíhala při pH 5,0 nebo pH 7,0 po dobu 1 h při  $37^{\circ}\text{C}$ .



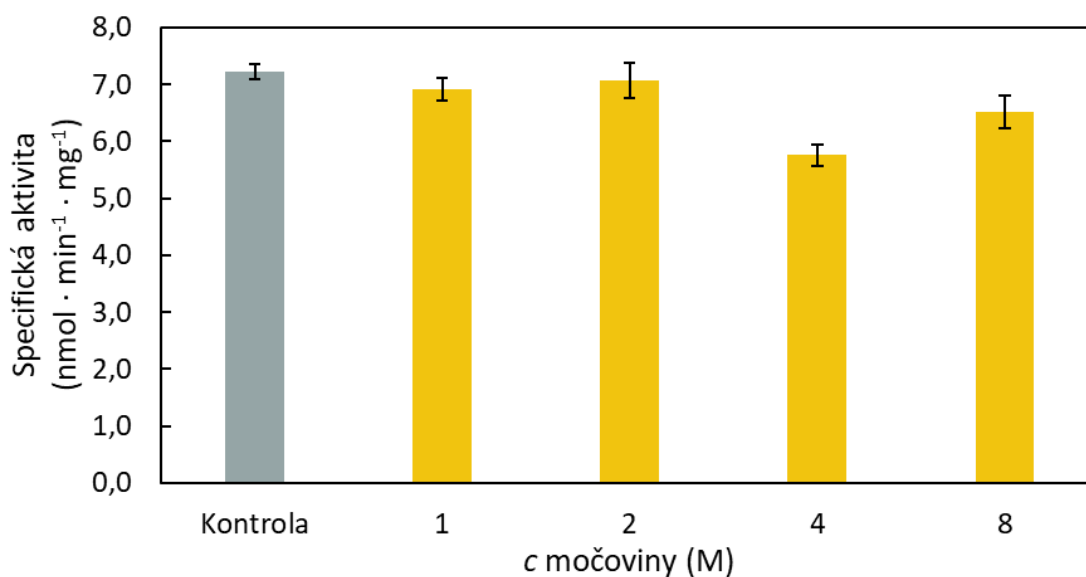
Obrázek 11: **Závislost aktivity sekretovaných proteas na pH.** Aktivita proteas byla měřena v prostředí McIlvainových pufrů, pH 5,0 – pH 8,0. Vyjádřena je v odpovídajícím množství standardu L-tyrosinu vztaheném na čas reakce a mililitr enzymového preparátu.



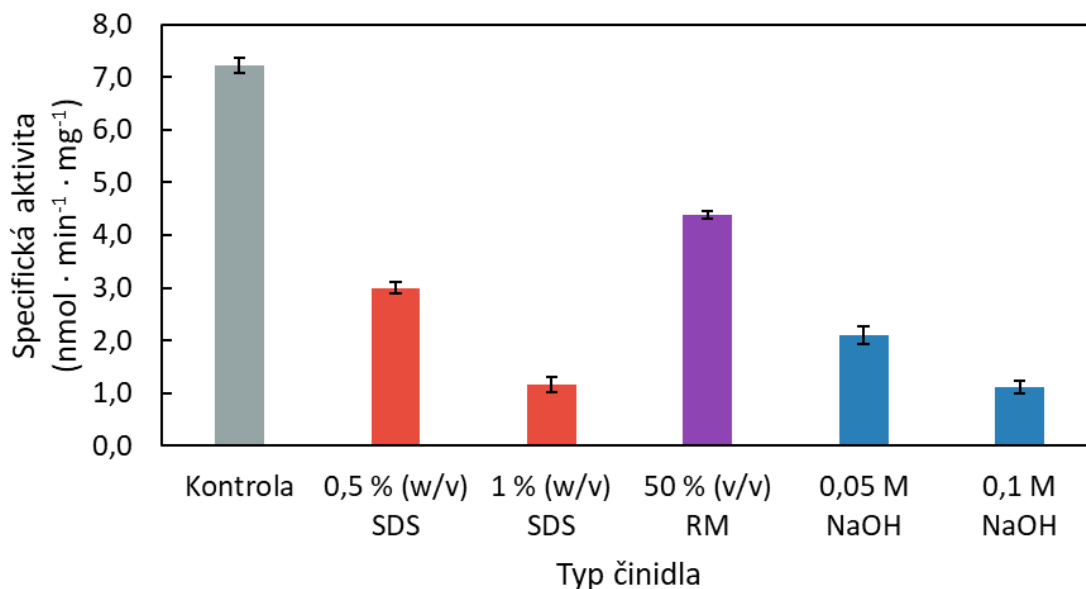
Obrázek 12: **Inhibice sekretovaných proteas ovomukoidem.** Graf znázorňuje závislost rychlosti reakce na molární koncentraci inhibitoru ovomukoidu v reakční směsi. Znázorněny jsou průběhy pro dvě koncentrace substrátu (106 μM a 530 μM azokasein). Rychlost reakce je vztažena na miligram rozpustných proteinů obsažených v enzymovém preparátu.

Specifická aktivita sekretovaných proteas byla oproti kontrole významně snížena rovněž po 30 min inkubaci enzymového preparátu v 25 % (v/v) roztocích tekutých mýdel značky ISANA (obr. 15, str. 31). Sekretované proteasy byly méně stabilní v prostředí tekutého mýdla varianty „Mango a pomeranč“ oproti variantě „Speciál“, která má dle informací výrobce antibakteriální účinky. V případě varianty „Speciál“ došlo k snížení specifické aktivity proteas na 60 % ve srovnání s kontrolou, v případě varianty „Mango a pomeranč“ došlo k snížení aktivity až na 18 % ve srovnání s kontrolou.

Na obrázku 16 na straně 31 je znázorněna stabilita sekretovaných proteas v enzymových preparátech inkubovaných 30 min v 0,5 % (w/v) (popřípadě 1 % (w/v)) roztocích SDS současně obsahujících NaOH v koncentračním rozsahu 2,5–25 mM. Ve všech roztocích byly sekretované proteasy málo stabilní, neboť v nich byla změřena nízká specifická aktivita v porovnání s kontrolou. Navíc při porovnání hodnot specifických aktivit proteas mezi sebou bylo zjištěno, že dvojnásobné navýšení koncentrace SDS



Obrázek 13: **Stabilita sekretovaných proteas v přítomnosti močoviny.** Enzymový preparát byl inkubován v roztocích 1–8 M močoviny při laboratorní teplotě po dobu 2 h. Kontrola byla připravena inkubací enzymového preparátu v deionizované vodě.

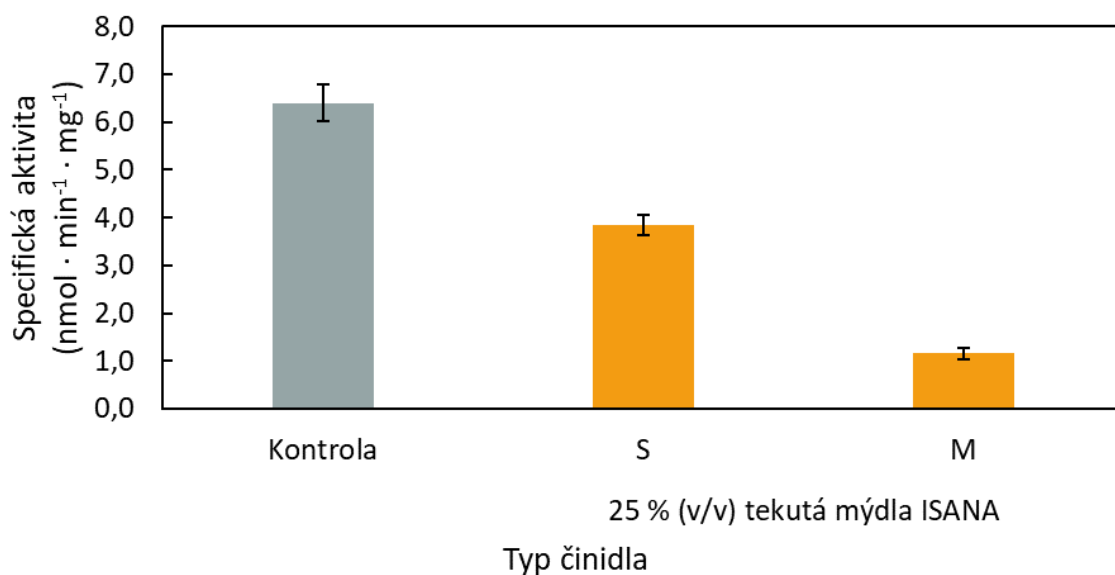


Obrázek 14: **Stabilita sekretovaných proteas v přítomnosti tenzidů a NaOH.** Enzymový preparát byl inkubován v uvedených roztocích po dobu 2 h při laboratorní teplotě. Kontrola byla připravena inkubací enzymového preparátu v deionizované vodě. RM = roztok mýdla, který byl připraven z tuhého mýdla podle postupu uvedeného v kapitole 3.4.9, str. 17.

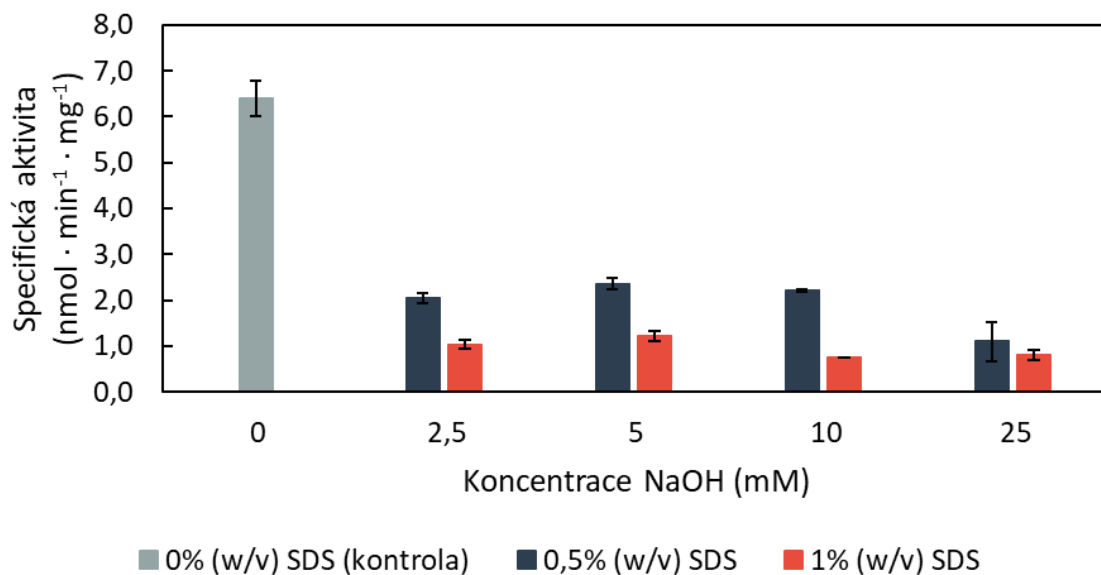
(při zachování koncentrace NaOH) způsobilo ve většině případů přibližně dvojnásobné snížení aktivity. Naproti tomu dvojnásobné navýšení koncentrace NaOH (při zachování koncentrace SDS) ve většině případů dvojnásobný pokles aktivity nezpůsobilo.

Byl sledován rovněž vliv různě koncentrovaných roztoků ethanolu na stabilitu sekretovaných proteas (obrázek 17, str. 32). Enzymový preparát byl inkubován v roztocích ethanolu o koncentracích 10–48 % (v/v) po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Z porovnání naměřených hodnot s kontrolou vyplývá, že ethanol neměl vliv na stabilitu sekretovaných proteas.

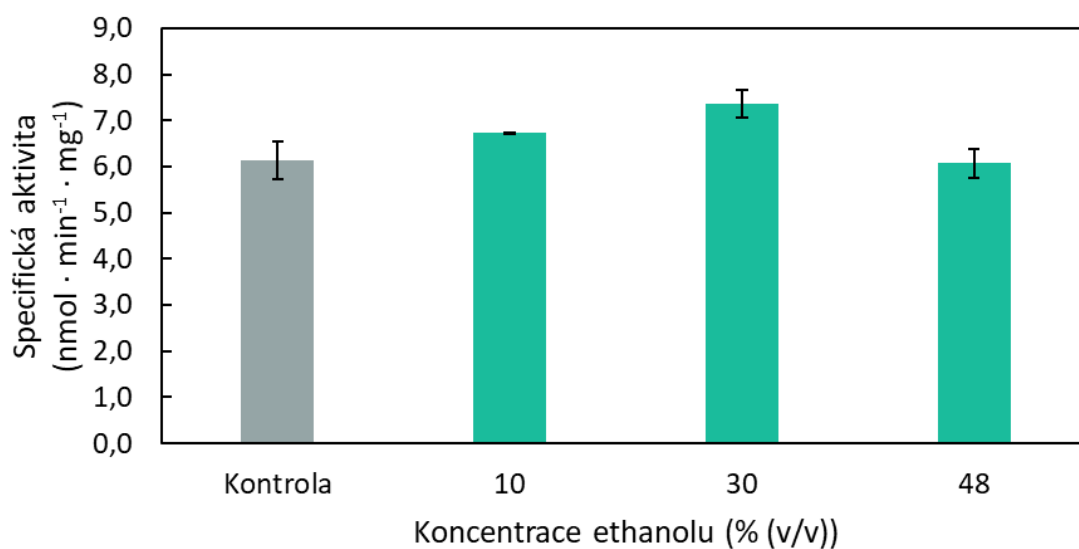
Na obrázku 18 na straně 32 jsou uvedeny specifické aktivity sekretované endo-1,3- $\beta$ -glukanasy, která byla před vlastní enzymovou reakcí 30 min inkubována při laboratorní teplotě v 10–48 % (v/v) roztocích ethanolu. Jak je z obrázku vidět, ethanol neměl významný vliv na stabilitu tohoto enzymu, a to ani při vyšší, téměř 50 % (v/v) koncentraci.



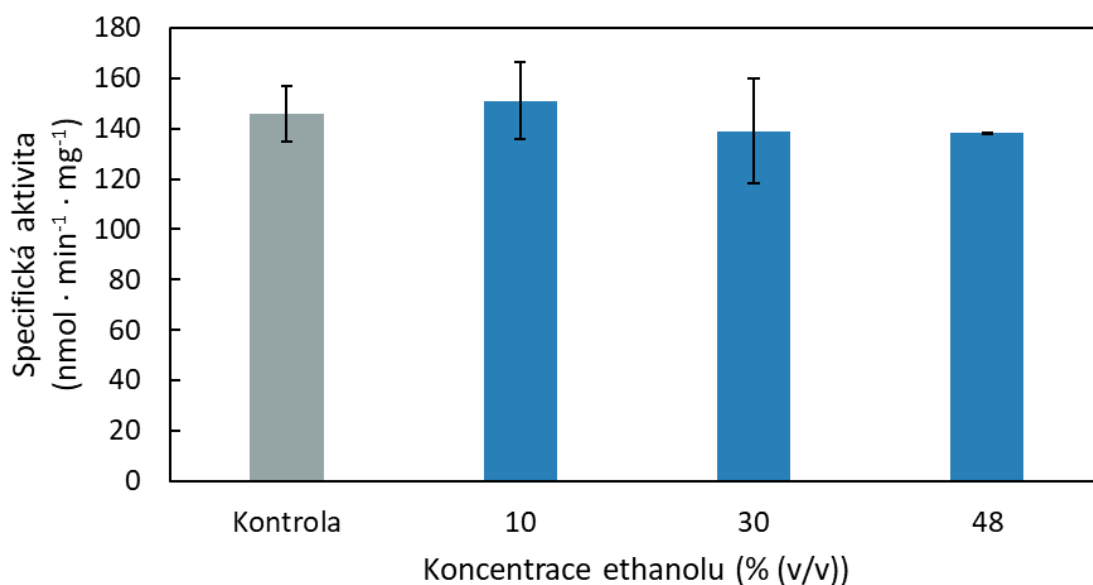
Obrázek 15: **Stabilita sekretovaných proteas v přítomnosti tekutých mýdel značky ISANA.** Enzymový preparát byl inkubován v 25 % (v/v) roztocích tekutých mýdel značky ISANA (S = varianta „Speciál“, M = varianta „Mango a pomeranč“) po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Kontrola byla připravena inkubací enzymového preparátu v deionizované vodě.



Obrázek 16: **Stabilita sekretovaných proteas v přítomnosti směsi SDS a NaOH.** Enzymový preparát byl inkubován 30 min při laboratorní teplotě v roztocích 0,5 % nebo 1 % (w/v) SDS, které zároveň obsahovaly NaOH, a to v koncentračním rozsahu 2,5–25 mM. Kontrola byla připravena inkubací enzymového preparátu v deionizované vodě.



Obrázek 17: **Stabilita sekretovaných proteas v přítomnosti ethanolu.** Enzymový preparát byl inkubován v roztocích ethanolu o koncentracích 10–48 % (v/v) po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Kontrola byla připravena inkubací enzymového preparátu v deionizované vodě.



Obrázek 18: **Stabilita sekretované endo-1,3-β-glukanasy v přítomnosti ethanolu.** Enzymový preparát byl inkubován 30 min při laboratorní teplotě v 10–48 % (v/v) roztocích ethanolu. Kontrola byla připravena inkubací enzymového preparátu v deionizované vodě.

## 5 Diskuze

Oomycety jsou kmenem houbám podobných organismů, mezi které můžeme zařadit některé velmi významné patogeny živočichů (např. *Pythium insidiosum*) a rostlin (např. *Phytophthora infestans*, *Pythium ultimum*)[7], jež způsobují každý rok ohromné ztráty na zemědělské úrodě[31]. K ochraně úrody před těmito patogeny jsou vynakládány nemalé prostředky a úsilí. Rostliny jsou chráněny šlechtěním rezistentních plodin či například používáním chemických pesticidů[12].

Využívání pesticidů je přitom spojeno s řadou environmentálních problémů. Dochází například k ukládání reziduí pesticidů v půdě, což vede k ovlivnění zastoupení půdních mikroorganismů (které se na kvalitě půdy významně podílejí), a tedy ke změně vlastností půdy. Pesticidy se také dostávají do vodních toků, dokonce do spodních vod, dochází tak k úhynu vodních organismů a k narušování potravních řetězců[32]. Dalším problémem je nedostatek informací o degradaci pesticidů a o mechanismu jejich působení na metabolismus mikroorganismů, rostlin a živočichů. Řešením těchto četných problémů se jeví využití tzv. BCAs – prostředků biologické ochrany rostlin, tedy mikroorganismů, kteří přirozeně konkurují rostlinným patogenům. Mezi tyto prospěšné mikroorganismy patří například *Trichoderma harzianum* působící jako fungicid, *Bacillus subtilis* využívaný jako fungicid a bakteriocid, *Bacillus thuringiensis* sloužící jako insekticid či *Pythium oligandrum* působící jako fungicid[15].

*Pythium oligandrum* je nepatogenní oomyceta, která při ochraně rostlin jednak soutěží s patogenními organismy v rhizosféře o prostor a živiny, jednak tyto mikroorganismy mykoparaziticky napadá. Zároveň *Pythium oligandrum* v rostlinách indukuje rezistenci a podporuje je v růstu produkcí tryptaminu[12, 15, 17]. Mykoparazitický účinek oomycety spočívá v produkci hydrolytických enzymů (například glukanas, celulas, chitinas či proteas), které uvolňují do okolí a degradují tak buněčnou stěnu patogenního organismu[15, 18].

V první části této bakalářské práce byla sledována aktivita endo-1,3- $\beta$ -glukanasy (EC 3.2.1.6), celulasy (EC 3.2.1.4), chitiny (EC 3.2.1.14) a proteas v suspenzi komerčního přípravku biologické ochrany rostlin, Polyversum-Biogarden, společnosti Biopreparáty, s. r. o., jehož účinnou složkou jsou oospory organismu *Pythium oligandrum* M1 (v množství  $1 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$ ), a který je určen k moření, postřiku a zalévání[24].

O přítomnosti enzymů v tomto přípravku nejsou dosud žádné informace, aktivity uvedených enzymů proto byly sledovány v několika časech aktivace přípravku. (Aktivace viz kapitola 3.4.1, str. 13.) Konkrétně byly měřeny aktivity ihned po smísení přípravku s vodou (0 h), po jedné hodině aktivace (Tento čas byl zvolen z důvodu doporučení výrobce aktivovat přípravek přibližně 30 min před aplikací na rostliny.) i v delších časech (až 144 h).

Bylo zjištěno, že specifická aktivita glykosidas (viz obrázek 5, str. 21) dosahovala nejvyšších hodnot v případech, kdy byl přípravek aktivován mezi 6 a 24 hodinami. Naproti tomu proteolytická aktivita prakticky nebyla za zvolených podmínek prokázána (viz obrázek 6, str. 23). Vzhledem k tomu, že produkce proteas je v organismu *Pythium oligandrum* předpokládána[7, 15], bylo ověřováno, zda se mezi sekretovanými proteiny oomycety nenachází inhibitory proteas. Za tímto účelem bylo provedeno měření aktivity serinové proteasy trypsinu (EC 3.4.21.4) v reakci, do které byly přidány roztoky s proteiny sekretovanými oomycetou *Pythium oligandrum*. Pokles aktivity trypsinu však nebyl zaznamenán (viz obrázek 7, str. 23); inhibitory serinových proteas tedy nebyly prokázány. Provedené měření ovšem nevylučuje přítomnost jiných typů inhibitorů. Nízké specifické aktivity proteas dále mohly být způsobeny nepřítomností případných nezbytných aktivátorů v reakční směsi či přítomností proteas, které nejsou schopny štěpit zvolený substrát azokasein (exoproteasy).

Vzhledem k nízkým specifickým aktivitám glykosidas naměřeným v kratších časech aktivace a prakticky neměřitelným specifickým aktivitám proteas se zdá, že mechanismus působení přípravku Polyversum-Biogarden po aplikaci na rostliny nespočívá primárně v bezprostředním účinku těchto enzymů na patogenní organismy, ale že dochází v první řadě ke kolonizaci rostliny a následně k indukci její rezistence. Tomu by nasvědčovaly rovněž výsledky separace sekretovaných proteinů oomycety gelovou elektroforézou v prostředí SDS (viz obrázek 9, str. 25). Po separaci byl totiž nalezen protein o velikosti přibližně 11–12 kDa, který svou molekulovou hmotností přibližně odpovídá oligandrinu, elicitinům podobnému proteinu, známému svou schopností indukovat imunitní odpověď v rostlinách rajčete[20].

Díky své schopnosti agresivně napadat houbové, ale i houbám podobné patogeny, a díky skutečnosti, že se jedná o nepatogenní organismus, našla oomyceta *Pythium oligandrum* své uplatnění i v humánní a veterinární medicíně. Přípravky na bázi *Py-*

*thium oligandrum* působí proti dermatofytózám (houbovým onemocněním kůže, vlasů a nehtů) mechanismy podobnými těm, které oomyceta *Pythium oligandrum* využívá při boji s fytopatogeny[33].

V dnešní době dostupné kosmetické přípravky, které jsou běžně využívány při péči o tělo, obsahují množství látek, jež by mohly nepříznivě ovlivnit léčebný účinek přípravků na bázi *Pythium oligandrum*. V druhé části této práce proto byla studována stabilita enzymů sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum* v přítomnosti činidel běžně se vyskytujících v některých kosmetických přípravcích. Byly rovněž hledány další látky a podmínky, které by mohly aktivitu těchto enzymů snižovat.

Z předchozích studií je známo, že stabilita sekretovaných proteas skladovaných v průběhu dvou měsíců při teplotě 5 °C byla velmi dobrá. S těmito studiemi je v souladu i současné pozorování stability proteas skladovaných dva roky při –24 °C – zjištěná specifická aktivita se nelišila od hodnot naměřených před skladováním[23].

Byla sledována také závislost aktivity sekretovaných proteas na pH, nejvyšší aktivity dosahují přítomné proteasy v okolí pH 6,5. Dále bylo zjištěno, že proteolytická aktivita enzymů sekretovaných organismem *Pythium oligandrum* je významně snižována ovomukoidem, proteinem, který je znám jako inhibitor serinových proteas. Mezi sekretovanými enzymy organismu *Pythium oligandrum* se tedy serinové proteasy pravděpodobně vyskytují.

Stabilitu sekretovaných proteas významně snižovala přítomnost tenzidů (zejména 1 % (w/v) SDS) a hydroxidu sodného (viz obr. 14, str. 29 a obr. 16, str. 31). Při sledování stability proteas v roztocích tekutých mýdel ISANA (viz obrázek 15, str. 31) byla překvapivě naměřena vyšší proteolytická aktivita ve variantě mýdla s antibakteriálním účinkem, tedy variantě „Speciál“, oproti hodnotě naměřené ve variantě „Mango a pomeranč“, která nebyla označena jako antibakteriální. Je proto možné, že další příměsi obsažené v těchto mýdlech (například parfémové složky) by mohly snižovat stabilitu sekretovaných proteas.

## 6 Závěr

1. V přípravku Polyversum-Biogarden inkubovaném ve vodě byla zjištěna aktivita glykosidas – endo-1,3- $\beta$ -glukanasy, celulasy a chitinasy, která se s časem akti-

vace (inkubace přípravku ve vodě) zvyšovala. Nejvyšší aktivita glykosidas byla naměřena po aktivaci trvající 6–24 h, poté došlo k jejímu snížení.

2. V aktivovaném přípravku Polyversum-Biogarden nebyla zjištěna proteolytická aktivita, zároveň zde ale nebyla prokázána přítomnost inhibitorů serinových proteas. Po aktivaci trvající 24 a 48 hodin se mezi sekretovanými proteiny objevil protein o molekulové hmotnosti 11–12 kDa, který svou molekulovou hmotností přibližně odpovídá oligandrinu.
3. Jako pH optimum proteas sekretovaných oomycetou *Pythium oligandrum* bylo stanoveno pH 6,5.
4. Ovomukoid inhiboval aktivitu sekretovaných proteas. Byla zjištěna hodnota  $IC_{50}$  přibližně 17  $\mu$ M při koncentraci substrátu 106  $\mu$ M a hodnota  $IC_{50}$  přibližně 20  $\mu$ M při koncentraci substrátu 530  $\mu$ M.
5. Stabilita sekretovaných proteas nebyla ovlivněna dlouhodobým skladováním při teplotě  $-24^{\circ}C$ , snižovala ji ovšem přítomnost SDS, tekutých mýdel, hydroxidu sodného či roztoku tuhého mýdla. Močovina stabilitu proteas příliš neovlivňovala; k jejímu snížení došlo až v roztocích 4 a 8 M močoviny působících po dobu dvou hodin.
6. Ethanol neměl vliv na stabilitu sekretovaných proteas či endo-1,3- $\beta$ -glukanasy. Dokonce ani po třicetiminutové inkubaci enzymů v 48 % (v/v) roztoku ethanolu nebylo zaznamenáno její snížení.

## Seznam literatury

1. SALAČOVÁ, L.; FALTUSOVÁ, Z.; OVESNÁ, J. Jaké mechanismy využívají rostliny pro obranu proti houbovým patogenům. *Chemické listy* [online]. 2015, roč. 109, č. 8, s. 613–618 [cit. 2018-10-10]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015\\_08\\_613-618.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2015_08_613-618.pdf).
2. FREEMAN, B. C.; BEATTIE, G. A. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor* [online]. 2008 [cit. 2018-10-12]. Dostupné z DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
3. BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry & molecular biology of plants. Druhé vydání. John Wiley & Sons, Ltd, 2005, kap. 21. Responses to Plant Pathogens. ISBN 9780470714225.
4. HELDT, H.; PIECHULLA, B. Plant Biochemistry. Čtvrté vydání. Academic Press, 2011, kap. 16. Secondary metabolites fulfill specific ecological functions in plants. ISBN 978-0-12-384986-1. Dostupné z DOI: 10.1016/C2009-0-63188-3.
5. BENHAMOU, N. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in Plant Science*. 1996, roč. 1, č. 7, s. 233–240. Dostupné z DOI: 10.1016/1360-1385(96)86901-9.
6. ULLOA, M.; HANLIN, R. T. Illustrated dictionary of mycology. První vydání. The American Phytopathological Society, 2000, s. 269, 439. ISBN 0-89054-257-0.
7. HORNER, N. R.; GRENVILLE-BRIGGS, L. J.; VAN WEST, P. The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation. *Fungal Biology*. 2012, roč. 116, s. 24–41. Dostupné z DOI: 10.1016/j.funbio.2011.09.004.
8. DEACON, J. W. Fungal biology. Čtvrté vydání. Blackwell Publishing Ltd, 2006, s. 16–17, 41–43, 49, 55–56. ISBN 978-1-4051-3066-0.
9. MALLOCH, D. *The Mycology Web Pages* [online]. Ed. NEW BRUNSWICK MUSEUM. 2017 [cit. 2019-03-27]. Dostupné z: <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/mycologywebpages.html>.

10. MYKLESTAD, S. M.; GRANUM, E. Biology of (1,3)- $\beta$ -glucans and related glucans in protozoans and chromistans. BACIC, A.; FINCHER, G. B.; STONE, B. A. (ed.). *Chemistry, Biochemistry and Biology of (1,3)- $\beta$ -Glucans and Related Polysaccharides*. První vydání. Academic Press, 2009, s. 353–385. ISBN 9780123739711. Dostupné z DOI: 10.1016/B978-0-12-373971-1.00010-8.
11. DUBEY, H. C. An introduction to fungi. Čtvrté vydání. Scientific Publishers (Indie), 2012, s. 406–407. ISBN 978-81-7233-743-8.
12. BENHAMOU, N.; FLOCH, G. le; VALLANCE, J.; GERBORE, J.; GRIZARD, D.; REY, P. *Pythium oligandrum*: An example of opportunistic success. *Microbiology*. 2012, roč. 158, s. 2679–2694. Dostupné z DOI: 10.1099/mic.0.061457-0.
13. TAKENAKA, S. Studies on biological control mechanisms of *Pythium oligandrum*. *Journal of General Plant Pathology*. 2015, roč. 81, č. 6, s. 466–469. Dostupné z DOI: 10.1007/s10327-015-0620-0.
14. DRECHSLER, C. Some new species of *Pythium*. *Journal of the Washington Academy of Sciences* [online]. 1930, roč. 20, č. 16, s. 398–418 [cit. 2019-03-31]. Dostupné z: <http://www.jstor.org/stable/24523710>.
15. GERBORE, J.; BENHAMOU, N.; VALLANCE, J.; LE FLOCH, G.; GRIZARD, D.; REGNAULT-ROGER, C.; REY, P. Biological control of plant pathogens: Advantages and limitations seen through the case study of *Pythium oligandrum*. *Environmental Science and Pollution Research*. 2014, roč. 21, č. 7, s. 4847–4860. Dostupné z DOI: 10.1007/s11356-013-1807-6.
16. BROŽOVÁ, J. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. *Plant Protection Science*. 2002, roč. 38, č. 1, s. 29–35. ISSN 1212-2580.
17. LE FLOCH, G.; REY, P.; BENIZRI, E.; BENHAMOU, N.; TIRILLY, Y. Impact of auxin-compounds produced by the antagonistic fungus *Pythium oligandrum* or the minor pathogen *Pythium* group F on plant growth. *Plant and Soil*. 2003, roč. 257, č. 2, s. 459–470. Dostupné z DOI: 10.1023/A:1027330024834.

18. PICARD, K.; TIRILLY, Y.; BENHAMOU, N. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, roč. 66, č. 10, s. 4305–4314. Dostupné z DOI: 10.1128/aem.66.10.4305-4314.2000.
19. DEREVNINA, L. et al. Nine things to know about elicitors. *New Phytologist*. 2016, roč. 212, č. 4, s. 888–895. Dostupné z DOI: 10.1111/nph.14137.
20. PICARD, K.; PONCHET, M.; BLEIN, J.-P.; REY, P.; TIRILLY, Y.; BENHAMOU, N. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiology*. 2000, roč. 124, č. 1, s. 379–396. Dostupné z DOI: 10.1104/pp.124.1.379.
21. MIKEŠ, V.; MILAT, M.; PONCHET, M.; PANABIÉRES, F.; RICCI, P.; BLEIN, J. Elicitors, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1998, roč. 245, č. 1, s. 133–139. Dostupné z DOI: 10.1006/bbrc.1998.8341.
22. JIANG, R. H. Y.; TYLER, B. M.; WHISSON, S. C.; HARDHAM, A. R.; GOVERS, F. Ancient origin of elicitor gene clusters in *Phytophthora* genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 2006, roč. 23, č. 2, s. 338–351. Dostupné z DOI: 10.1093/molbev/msj039.
23. RYŠLAVÁ, H. *Osobní sdělení*.
24. BIOPREPARÁTY, s. r. o. *Polyversum-Biogarden: produktový manuál* [online] [cit. 2018-09-18]. Dostupné z: [http://eshop.oslavan.cz/editor/image/eshop\\_products/soubor\\_1053.pdf](http://eshop.oslavan.cz/editor/image/eshop_products/soubor_1053.pdf).
25. ANTHON, G. E.; BARRETT, D. M. Determination of reducing sugars with 3-methyl-2-benzothiazolinonehydrazone. *Analytical Biochemistry*. 2002, roč. 305, č. 2, s. 287–289. Dostupné z DOI: 10.1006/abio.2002.5644.
26. CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*. 1947, roč. 171, č. 2, s. 501–505.

27. RYŠLAVÁ, H.; LIBERDA, J.; HÝSKOVÁ, V.; MARTÍNEK, V.; MAN, P.; NOVÁK, P.; KAVAN, D. *Návody biochemických praktik I*. Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Karlova univerzita, 2017.
28. CUPP-ENYARD, C. Sigma's non-specific protease activity assay - casein as a substrate. *Journal of Visualized Experiments*. 2008, č. 19, s. 899. Dostupné z DOI: 10.3791/899.
29. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951, roč. 193, č. 1, s. 265–275. Dostupné z PMID: 14907713.
30. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970, roč. 227, č. 5259, s. 680–685.
31. VAN WEST, P.; APPIAH, A. A.; GOW, N. A. Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 2003, roč. 62, č. 2, s. 99–113. Dostupné z DOI: 10.1016/S0885-5765(03)00044-4.
32. GILL, H. K.; GARG, H. Pesticides: Environmental impacts and management strategies. LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (ed.). *Pesticides: Toxic Aspects*. IntechOpen, 2014, kap. 8, s. 187–230. Dostupné z DOI: 10.5772/57399.
33. GABRIELOVÁ, A.; MENCL, K.; SUCHÁNEK, M.; KLIMEŠ, R.; HUBKA, V.; KOLAŘÍK, M. The oomycete *Pythium oligandrum* can suppress and kill the causative agents of dermatophytoses. *Mycopathologia*. 2018, roč. 183, č. 5, s. 751–764. Dostupné z DOI: 10.1007/s11046-018-0277-2.

