Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biochemie

Bc. Markéta Čermáková

Trávicí proteasy termitů

Digestive proteases of termites

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Konzultant: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

PRAHA 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 9. 2011

Podpis

Děkuji školiteli RNDr. Michaelu Marešovi, CSc. za celkové vedení a ochotu při zpracování jak teoretické, tak praktické části práce, dále pak Ing. Janě Pytelkové, PhD. za vedení v chemické části a Mgr. Janu Šobotníkovi za vedení v biologické části práce. Dále bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za konečné posouzení celé práce.

Abstrakt

Narozdíl od trávení celulosy nebyla u termitů dosud studována trávicí proteolýza, proto byly v diplomové práci analyzovány proteolytické enzymy trávicího traktu významných termitích škůdců *Reticulitermes santonensis* a *Coptotermes formosanus* (čeleď Rhinotermitidae). Pomocí panelu specifických substrátů a inhibitorů byly kvantifikovány a klasifikovány proteasy v jednotlivých kompartmentech střeva. Hlavní proteasy byly identifikovány ve středním střevě jako endogenní serinové proteasy trypsinového typu; v bachoru byly detekovány minoritní cysteinové proteasy, které jsou pravděpodobně produkovány symbiotickými organismy. Hlavní trypsinová proteasa termita *R. santonensis* (RsSP) byla chromatograficky izolována jako protein o 26 kDa a byla určena její N-koncová sekvence. S využitím selektivních proteasových inhibitorů byla prokázána fyziologická významnost trávicí trypsinové proteasy v testech *in vivo* s termitem *C. formosanus*. Na základě analýzy proteas u dalších 12 druhů termitů bylo navrženo obecné schéma trávicí proteolýzy u řádu Isoptera.

Abstract

Digestive proteolysis in termites has not been studied yet. In this diploma thesis, proteolytic enzymes of the digestive tract of two significant pest species *Reticulitermes santonensis* and *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae) were analyzed. Proteases were identified and quantified in gut compartments using a panel of specific substrates and inhibitors. Major proteases were localized in the midgut and were classified as endogenous serine proteases of trypsin type. Minor cysteine proteases were detected in the paunch and were most likely produced by symbionts. The trypsin protease from *R. santonensis* was chromatographically isolated and its N-terminal sequence was identified. The physiological importance of the digestive trypsin proteases was demonstrated using selective inhibitors tested *in vivo* with *C. formosanus*. Based on the analysis of proteases from additional 12 termite species, a general scheme of digestive proteolysis in the order Isoptera was proposed.

Seznam zkratek

AMC	7-amino-4-methylkumarin
APS	peroxodisíran amonný
bestatin	(S)-N-(3-amino-2-hydroxy-1-oxo-4-fenylbutyl)-L-Leu
BPTI	hovězí pankreatický trypsinový inhibitor
BSA	hovězí sérum albumin
$CaCl_2$	chlorid vápenatý
Cf (C. f.)	*Coptotermes formosanus*
Cf ext.	extrakt ze středního střeva *C. formosanus*
CfSP	serinová proteasa z *C. formosanus*
CP	cysteinové proteasy
CMK	chlormethylketon
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiotreitol
E64	N-(trans-epoxysukcinyl)-L-Leu-4-guanidinbutylamid
EtOH	ethanol
KatB	kathepsin B
KatL	kathepsin L
kDa	kilodalton
LAP	leucinaminopeptidasa
MP	metaloproteasy
MetOH	methanol
NaCl	chlorid sodný
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
Pefabloc	4-(2-aminoethyl)-benzensulfonylfluorid, hydrochlorid
PEG 6000	polyethyleglykol
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
RFU	relativní fluorescenční jednotky
Rs (R. s.)	*Reticulitermes satonensis*
Rs ext	extrakt ze středního střeva *R. santonensis*
RsSP	serinová proteasa z *R. santonensis*
SDS	dodecylsulfát sodný
SP	serinové proteasy
Suc	3-karboxy-propionyl
TCA	trichloroctová kyselina
TEMED	tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxylmethyl)aminomethan
Try	trypsin
Z	benzyloxykarnonyl

Zkratky aminokyselin

A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Asn	asparagin
D	Asp	kyselina asparagová
C	Cys	cystein
Q	Gln	glutamin
E	Glu	kyselina glutamová
G	Gly	glycin
H	His	histidin
I	Ile	isoleucin
L	Leu	leucin
K	Lys	lysin
M	Met	methionin
F	Phe	fenylalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	threonin
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tyrosin
V	Val	valin

Obsah

1 ÚVOD 11

1.1 Taxonomie termitů 11

1.1.1 Rod Coptotermes 12

1.1.2 Rod Reticulitermes 12

1.2 Biologie termitů 13

1.2.1 Termiti jako sociální hmyz 13

1.2.2 Stavba těla termitů 13

1.2.3 Rozdělení na kasty 14

1.2.3.1 Dělníci 14

1.2.3.2 Vojáci 15

1.2.3.3 Královský pár 16

1.2.4 Reprodukce termitů 16

1.3 Trávicí systém termitů 18

1.3.1 Morfologie trávicího traktu 18

1.3.2 Potrava termitů 20

1.3.2.1 Celulosa 22

1.3.2.2 Hemicelulosa 23

1.3.2.3 Lignin 23

1.3.3 Symbiotické organismy termitů 24

1.3.4 Metabolické funkce symbiotických organismů 27

1.3.4.1 Fixace dusíku 27

1.3.4.2 Acetogeneze a melanogeneze 27

1.3.4.3 Degradace celulosy 28

1.3.5 Strategie procesu trávení 28

1.4 Proteolytické enzymy 30

1.4.1 Serinové proteasy 31

1.4.1.1 Serinové proteasy hmyzu 32

1.4.1.2 Struktura serinových proteas 32

1.4.1.3 Mechanismus katalytické reakce 33

1.4.1.4 Inhibitory serinových proteas 34

1.4.2 Cysteinové proteasy 36

1.4.3 Metaloproteasy 36

1.4.4 Aspartátové proteasy 37

2 CÍL PRÁCE 38

3 MATERIÁL A METODY 39

3.1 Materiál 39

3.2 Přístroje a vybavení 40

3.3 Experimentální metody 41

3.3.1 Preparace střev a příprava střevních fragmentů termitů 41

3.3.2 Příprava extraktu z tkání termitů 41

3.3.3 Stanovení koncentrace proteinů 42

3.3.4 Aktivitní test s azokaseinem jako substrátem 42

3.3.5 Aktivitní test s fluorogenními peptidovými substráty 43

3.3.6 Afinitní chromatografie na imobilizovaném benzamidinu 43

3.3.7 SDS-PAGE 44

3.3.8 Přenos proteinů z gelu na membránu 45

3.3.9 Značení proteas pomocí syntetické aktivitní značky 45

3.3.10 Určení N-koncové aminokyselinové sekvence 46

3.3.11 Biologické testy s termity 46

4 VÝSLEDKY 48

4.1 Celková proteolytická aktivita v trávicím traktu *R. santonensis* a *C. formosanus* 48

4.2 Specifické proteolytické aktivity v kompartmentech trávicího traktu 50

4.2.1 Proteolytické aktivity - *R. santonensis* 51

4.2.2 Proteolytické aktivity - *C. formosanus* 52

4.2.3 Přehled identifikovaných proteolytických aktivit 54

4.3 Inhibiční specifita a klasifikace hlavních proteas v kompartmentech trávicího traktu 55

4.3.1 Lokalizace proteas - *R. santonensis* 56

4.3.2 Lokalizace proteas - *C. formosanus* 57

4.3.3 Klasifikace hlavních proteas a vliv pH na jejich aktivitu 57

4.4 Hlavní trávicí serinová proteasa RsSP z *R. santonensis* 59

4.4.1 Izolace RsSP 59

4.4.2 N-koncová sekvence a homologie RsSP 61

4.4.3 pH optimum aktivity RsSP 61

4.5 Vizualizace trávicích serinových proteas pomocí syntetické aktivitní značky 62

4.6 Srovnání proteolytického trávicího systému mezi termity řádu Isoptera 64

4.7 Vliv inhibice proteas na metabolismus *C. formosanus*.....66

4.7.1 Experimenty s termity s potlačenou střevní mikroflórou 67

4.7.2 Experiment s termity s redukovaným příjmem potravy 68

5 DISKUZE 70

6 ZÁVĚR..... 73

7 C ITOVANÁ LITERATURA..... 74

1 Úvod

Termiti (Isoptera, všekazi) patří mezi pravý sociální (tj. eusociální) hmyz žijící v koloniích, jejichž počet členů může přesáhnout i 5 milionů jedinců. Vyskytují se převážně v tropických či subtropických oblastech. Taxonomicky jsou termiti blízce příbuzní se švábi. Patří do stejného řádu Dictyoptera (1).

Nejstarší dochovaný termit pochází z období křídy (před 130 milióny let; (2)). V přírodě existuje přes 2 600 popsaných druhů termitů, které dělíme do 7 čeledí (3). Termiti jsou významní škůdci dřeva a zemědělských plodin v celosvětovém měřítku, dále jsou zdrojem skleníkových plynů (CO_2 a CH_4). Negativní dopad termitů na hospodářství se nejčastěji vyjadřuje ve formě výdajů za škody, opravy a prevenci. Jenom ve Spojených státech amerických se tato částka pohybuje mezi 2 – 3 miliardami dolarů ročně (4). Kromě negativních vlivů, mají i vliv pozitivní. Termiti patří mezi významné dekompozitory (jsou základem potravní pyramidy) a jsou nezanedbatelným faktorem pedogeneze (5). Termití specializace na konzumaci odumřelého rostlinného materiálu v tropických a subtropických oblastech zajišťuje celoroční koloběh látek.

1.1 Taxonomie termitů

Následuje zařazení termitů do taxonomického systému (6; 7) s uvedením dvou modelových druhů, studovaných v této práci.

- říše Animalia (živočichové)
- podříše Eumetazoa
- oddělení Bilateria
- pododdělení Protostomia (prvoústí)
- kmen Arthropoda (členovci)
- podkmen Hexapoda (šestinozí)
- třída Insecta (hmyz)
- podtřída Pterygota (křídlatí)
- infratřída Neoptera (novokřídlí)
- kohorta Polyneoptera (mnohožilní)

- nadřád Dictyoptera
- řád Isoptera (všekazi)
- čeleď Rhinotermitidae
- rod *Reticulitermes* **(***Reticulitermes santonensis)*
- rod *Coptotermes* **(***Coptotermes formosanus)*

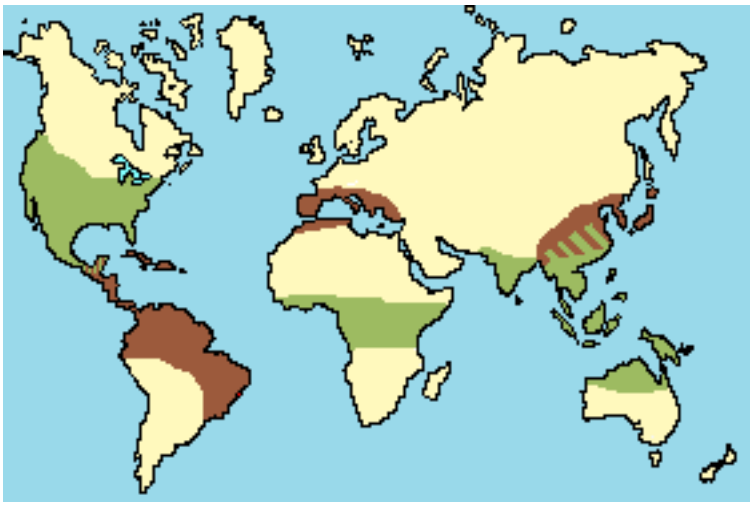
1.1.1 Rod Coptotermes

Termiti rodu *Coptotermes* patří mezi nejničivější termity na Zemi. Jejich kolonie dosahují vysokého počtu jedinců (miliony jedinců) a snadno se šíří (8). Termiti tohoto rodu se živí surovou dřevní hmotou a žijí v podzemních hnízdech. Ekonomicky nejvýznamnějším je *C. formosanus* (9). Původní vlastí tohoto druhu je jihovýchodní Asie, odkud byl postupně zavlečen do dalších částí světa (severní Amerika, Havaj) (10). Hlavní příčinou šíření je obchod (dřevěné bedny a palety) (11).

1.1.2 Rod Reticulitermes

Zástupci rodu *Reticulitermes* žijí stejně jako zástupci rodu *Coptotermes* v podzemních hnízdech a živí se dřevěným materiálem. Do tohoto rodu patří řada významných škůdců. Mezi nejvýznamnější patří *Reticulitermes flavipes* (všekaz zhoubný), který pochází ze Spojených států amerických, odkud byl v průběhu 16. století zavlečen do Evropy a v roce 2006 popsán pod synonymem *R. santonensis* (12). Rod *Reticulitermes* je rozšířen v severní Americe a v Evropě podél Středozemního moře (především ve Španělsku, Francii, Řecku a na Balkáně) a dále ve střední Asii, Číně a Japonsku (13).

Oblast výskytu těchto dvou rodů je znázorněna na obr. 1, str. 13.



Obr. 1: Rozšíření termitů rodu *Reticulitermes* (zelená barva) a rodu *Coptotermes* (hnědá barva). Mapa převzata z (12; 13) a aktualizovaná podle údajů, které poskytl J. Šobotník.

1.2 Biologie termitů

1.2.1 Termiti jako sociální hmyz

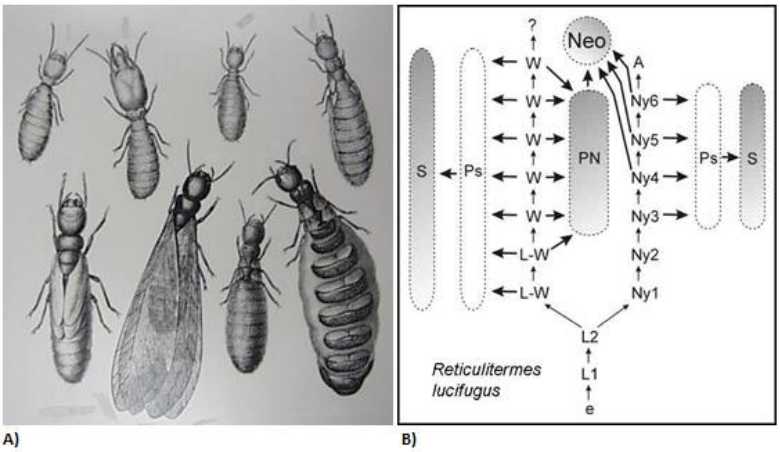
Termití společenstva se řadí k eusociálním zřízením. Eusocialita u živočichů je takové společenské uspořádání, kdy v jednom hnízdě žije ve vzájemné pospolitosti a spolupráci více jedinců téhož druhu. Eusocialita je vymezena následujícími rysy:

- kooperativní péče o potomstvo
- v hnízdě existuje několik generací
- dělba práce (reprodukce, shánění potravy, obrana, ...)

Eusocialita se vyskytuje i u dalších skupin hmyzu (mravenci, včely, některé vosy, atd.) (14).

1.2.2 Stavba těla termitů

Mezi základní typické znaky termitů patří rozdělení jedinců do kast podle jejich specializace (obr. 2. A, str. 14). Rozlišujeme tři základní kasty – dělníky, vojáky a pohlavní jedince (králové a královny). Vývoj termití kolonie je typickou vlastností daného druhu (schematické znázornění pro čeleď Rhinotermitidae je na obr. 2. B, str. 14).



Obr. 2: A) Porovnání velikostí členů jednotlivých kast čeledi Rhinotermitidae: horní řada zleva dělník, voják, larva, mladá nymfa; dolní řada zleva starší nymfa, okřídlené imago, odkřídlené imago - král, odkřídlené imago - královna. Převzato z (15). B) Schematické znázornění vývoje termitů čeledi Rhinotermitidae (každá šipka označuje svlékání ve vyšší instar): e - vajíčko, L - larva, Ny - Nymfa (okřídlený jedinec), W - dělník, Ps - bílý voják, S - voják, A - alátní dospělec, PN - preneotenický pohlavní jedinec, Neo - neotenický pohlavní jedinec (16).

Stavba těla příslušníků jednotlivých kast se výrazně liší. Velikost těla termitů se může pohybovat od 2 mm do 3 cm, nejčastěji kolem 5 mm pro kastu dělníka. Okřídlení jedinci (král a královna před vylétnutím z hnízda) mají dva páry dlouhých úzkých blanitých křídel, která jsou opatřena švem, umožňující jejich odlomení. Hlava termitů je volná, oči přítomné pouze u okřídlených jedinců, ústní ústrojí vždy kousací. Mezi společné vlastnosti všech kast patří světloplachost.

Délka života jednotlivých členů společenstva se pohybuje od několika týdnů (dělníci některých druhů) až po desetiletí (pohlavní jedinci některých druhů) (17).

1.2.3 Rozdělení na kasty

1.2.3.1 Dělníci

Tělo dělníků je měkké, mají silně sklerotizovaná (tvrdá) kusadla a zakrnělé oči, které obvykle (s výjimkou např. čeledi Hodotermitidae) úplně chybí. Dělníci jsou vždy bezkřídlí, a i když obvykle mají základy pohlavních orgánů, jsou vždy sterilní. Dělníci jsou primárně obou pohlaví, u některých druhů ale existuje pohlavní specializace. U druhů (např. čeleď Termitidae: rody *Macrotermes*, *Acanthotermes*, *Hospitalitermes*) můžeme rozlišit 2 (výjimečně i 3) velikostní kategorie dělníků i vojáků, kteří se specializují na různé typy činností. Dělníci jsou vždy nejpočetnější skupinou zastoupenou v kolonii (9). Dělníci sami

mezi sebou praktikují proktodeální krmení tj. krmí se navzájem potravou z řitního otvoru, zatímco ostatní kasty a larvy jsou vyživovány stomodeálně tj. ústy. Tento způsob výživy pravděpodobně určuje kastovní zařazení dané larvy. Porovnání dělníků a vojáků modelových druhů je uvedeno na obr. 3.

Obr. 3: Porovnání dělníků a vojáků, – vlevo - *C. formosanus,* vpravo – *R. santonensis*: dělníci nejsou sklerotizovaní (kromě kusadel), vojáci mají zvětšenou hlavu a velká kusadla. Foto: J. Šobotník.

1.2.3.2 Vojáci

Vojáci jsou bezkřídlí a stejně jako dělníci nemají oči. Mají zvětšenou a silně sklerotizovanou hlavu, obvykle s velkými kusadly (obr. 3). Vojáci jsou natolik přizpůsobeni obraně, že nedokáží sami přijímat potravu a jsou odkázáni na péči dělníků. Vojáci sice mají základy pohlavních orgánů, nicméně jsou sterilní - jedinou výjimkou jsou vojáci čeledi Termopsidae, kde se mohou vyskytovat plodní vojáci. Vojáci jsou primárně obou pohlaví, sekundárně však u řady druhů dochází ke vzniku vojáků přednostně z jednoho pohlaví. Vojáci zajišťují obranu. V kolonii se jejich počet pohybuje mezi 1 – 15% (platí průměrně pro různé druhy) (3), u několika skupin termitů kasta vojáků druhotně zanikla. Na hlavě vojáků čeledí Rhinotermitidae a Termitidae ústí frontální žláza, která v některých případech může zabírat až třetinu objemu těla vojáka (např. u rodu *Coptotermes*). Z této žlázy vystřikují obranný sekret, který může být toxický, repelentní nebo lepivý. U některých vojáků je tato žláza modifikována v nosec (např. termiti rodu Nasutitermes). Vojáci s noscem mohou mít kusadla dobře vyvinutá, ale častěji jsou redukovaná a vojáci pro obranu kolonie používají jen frontální žlázu. Vojáci vznikají z dělníků přes krátkodobé stadium bílého vojáka (10).

1.2.3.3 Královský pár

Králové a královny jsou jedinými členy kolonie schopnými rozmnožování. U některých termitů je vždy přítomen jen jediný královský pár, zatímco u jiných je tolerována přítomnost více králů a královen. Podle původu rozlišujeme odkřídlené (dealátní) pohlavní jedince vznikající z křídlatých po odhození křídel a neotenické pohlavní jedince vznikající z dělníků či nymf. Podle okolností vzniku můžeme rozlišit primární a sekundární pohlavní jedince; sekundární jsou buď náhradní pohlavní jedinci (nahrazují primární v případě jejich úmrtí) nebo doplňkoví (žijí zároveň s primárními) (5).

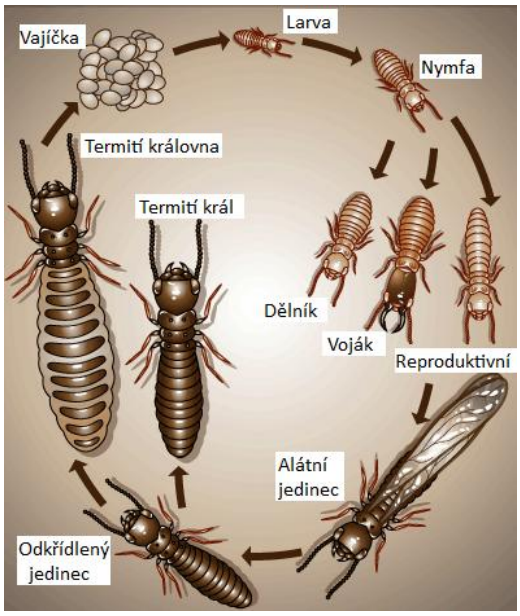
Odkřídlení pohlavní jedinci mají tvrdé tělo a v době rojení dva páry křídel, která zahazují po disperzním letu. U termitů s hnízdy (řada termitů obývá jen kusy dřeva bez jakékoliv hnízdní struktury) je královský pár chráněn pevnými stěnami královské komůrky, kde se o něj starají dělníci. Samičce se v průběhu života zvětšuje zadeček (obr. 4), ve kterém dozrává obrovské množství vajíček, a proto je schopna pohybu jen ve velmi omezené míře (5).

Obr. 4: Královský pár, dělníci a vojáci druhu *Labiotermes labralis*: Královně se v důsledku růstu vaječníků v průběhu života dramaticky zvětšuje zadeček. Foto: J. Šobotník.

1.2.4 Reprodukce termitů

Při rojení vylétá z hnízda velké množství okřídlených termitů, kteří posléze zahazují křídla. Samice začne vylučovat pohlavní feromon, kterým láká samce. Poté, co samec nalezne samici, zformují oba partneři tzv. tandem, ve kterém samice běží a hledá zdroj potravy, těsně

následována samcem. Po nalezení vhodné potravy si pár vybuduje komůrku, která se stane základem příštího hnízda. V této komůrce dojde ke kopulaci a po několika týdnech samice naklade vajíčka. Vývoj je hemimetabolní (proměna nedokonalá) (obr. 5). Samicím se v průběhu života zvětšuje zadeček a úměrně tomu roste i schopnost produkovat vajíčka - staré královny některých druhů jsou schopny klást až několik tisíc vajíček denně (1 vajíčko každé 2 vteřiny). U některých druhů mohou s původními pohlavními jedinci koexistovat i sekundární neoteničtí jedinci (12).



Obr. 5: Životní cyklus termitů. Převzato z (18) a upraveno.

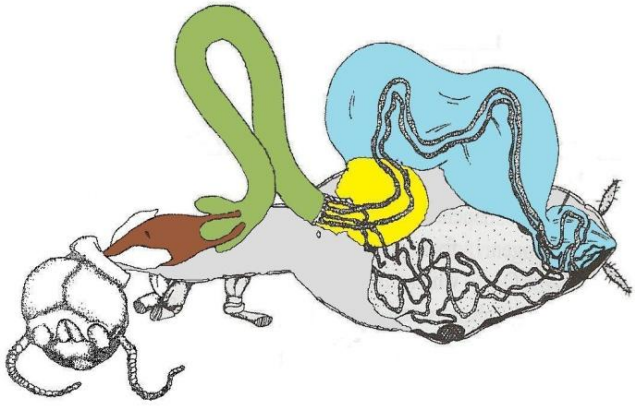
Na začátku životního cyklu vylétají dvě okřídlená imaga z mateřských hnízd a po setkání a odpadnutí křídel zakládají novou kolonii, oplozená královna klade vajíčka. Z nakladených vajíček se nejdříve vylíhnou larvy, které se dále vyvíjejí v nymfy. Podle vnějších podmínek se nymfy mohou vyvinout v dělníky, vojáky či reproduktivní jedince. O kastě rozhoduje složení potravy, feromony a hmatové impulzy při kontaktu s ostatními jedinci. Z reproduktivních jedinců mohou vznikat okřídlená imaga (zakládající novou kolonii) anebo sekundární pohlavní jedinci (neotenici, podílející se na produkci vajíček). Na počátku ontogenetického vývoje jsou všechny larvy (nedospělá stadia) schopny stát se libovolnou kastou (12).

1.3 Trávicí systém termitů

Termiti jsou hojní v suchozemských ekosystémech a jsou ekonomicky a ekologicky velmi významní. Jejich schopnost degradace dřevěného materiálu závisí na mikrobiálním společenství v jejich trávicím traktu. Většina střevních prvoků je specifická pro nižší termity a šváby rodu *Cryptocercus* živící se dřevem (švábi *Cryptocercus* jsou sesterskou čeledí termitů, spolu se šváby - *Blattidae* patří do stejného řádu Dictyoptera). Ze studií molekulární fylogeneze vyplývá, že střevní prvoky patrně získali termiti a švábi *Cryptocercus* od společného předka (19).

1.3.1 Morfologie trávicího traktu

Nejen ústní ústrojí, ale také struktura, charakter i funkce trávicí soustavy je u hmyzu přizpůsobeno složením potravy. Všechny skupiny hmyzu mají trávicí trubici rozdělenou na tři části: přední střevo (stomodeum), střední střevo (mesenteron) a zadní střevo (proctodeum). Schematické znázornění trávicího traktu termitů je uvedeno na obr. 6; fotografie termitího střeva je na obr. 7, str. 20. Základním typem ústního ústrojí je ústrojí kousací, které se vyskytuje i u termitů. Střevo je u termitů krátké, stejně jako u ostatních býložravých druhů hmyzu. Důvodem je potrava, které je dostatečné množství a trávicím traktem prochází velmi rychle (20).



Obr. 6: Schematické znázornění stavby střeva termitího dělníka: přední střevo (hnědá), střední střevo (zelená), zadní střevo (modrá) s bachorem (žlutá). Převzato z (20) a upraveno.

Přední střevo začíná ústní dutinou a pokračuje hltanem (pharynx), přes jícen (oesophagus) a vole (ingluvies) až po žvýkací žaludek (proventriculus). Úkolem předního

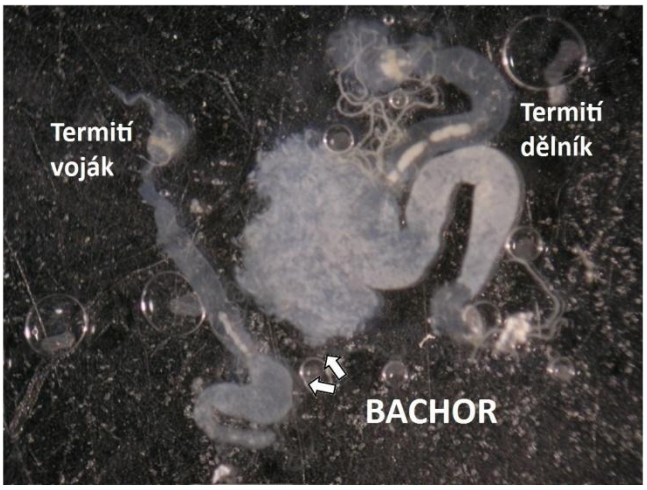
střeva je přijmout potravu a připravit ji na chemické trávení (mechanicky rozmělnit). Buňky střevní stěny jsou ploché, nediferencované a nemají sekreční ani vstřebávací funkci (20). Trávení potravy začíná zvlhčením slinami. Sliny jsou produkované labiální slinnou žlázou, která funkčně patří k trávicí soustavě. Sliny slouží k zvlhčování potravy, hladkému polykání potravy a obsahují také trávicí enzymy (nejčastěji amylasy). Vole u hmyzu slouží k ukládání potravy před jejím zpracováním. Jeho stěny jsou složeny v záhyby, které se při naplnění roztahují a zvětšují tak jeho kapacitu. Žvýkací žaludek je velmi variabilních tvarů, často obsahuje kutikulární výběžky (zuby), které slouží k drcení potravy. Termiti čeledi Rhinotermitidae mají v předním střevě pH okolo 5 (21).

Z funkčního hlediska je střední střevo nejdůležitější částí trávicí soustavy hmyzu. Zde dochází k vlastnímu trávení potravy a vstřebávání živin. Součástí středního střeva je trubicovité ventriculum, které často obsahuje slepé výběžky (caeca). Epiteliální výstelka bývá zřasena v záhyby. Funkcí slepých výběžků a záhybů je zvětšení plochy epitelu a posílení trávící a vstřebávací funkce středního střeva. Buňky střevní sliznice jsou protáhlé, sloupečkovité a jsou pokryty membránou tvořící microvili, které se také efektivně podílí na zvětšení plochy střeva. Mikrovili bývají kryty vrstvou glykoproteinů a mukopolysacharidů. Tato vrstva se označuje jako glykokalyx. Buňky střevní sliznice produkují enzymy, které jsou sekretovány do lumen střeva. Glykokalyx má ochrannou, trávící a imunitní funkci. (20). Mnoho důležitých živin pochází z metabolismu symbiotických mikroorganismů (žijících na začátku zadního střeva) (22).

Důležitou částí středního střeva je peritrofická membrána, která se tvoří na rozhraní předního a zadního střeva. Je to vrstva tvořená chitinem, bílkovinami a glykoproteiny. Peritrofická membrána obaluje zpracovávanou potravu a zamezuje tak jejímu přímému kontaktu se sliznicí středního střeva (chrání buňky epitelu před mechanickým poškozením a před působením enzymů) (20). V peritrofické membráně jsou jemné póry, kterými procházejí pouze malé molekuly, zatímco velké molekuly, bakterie a částečky potravy zůstávají ve střevě (23). Peritrofická membrána vytváří permeabilní bariéru a odděluje jednotlivé fáze trávení. Rovněž rozděluje prostor střeva na endoperitrofický (uvnitř membrány) a ektoperitrofický (mezi membránou a stěnou střeva), což zefektivňuje trávicí proces, neboť malé molekuly živin pronikají k buňkám a jsou zde vstřebávány, zatímco substrát zůstává ve vysoké koncentraci uzavřen v endoperitrofickém prostoru. Na rozhraní středního a zadního střeva ústí

do trávicí soustavy malpighické trubice. Prostředí ve středním střevě čeledi Rhinotermitidae je kolem pH 8,5 – 10,0 (21; 24).

Zadní střevo se dělí na ileum, tlusté střevo (colon), konečník (rectum) a ústí řitním otvorem ven z těla. V zadním střevě probíhá resorpce vody a solí (20). Symbiotické organismy se převážně vyskytují ve zvětšené části zadního střeva zvané bachor („paunch“), zde pH dosahuje hodnot – 6,5 (21). Termiti čeledi Rhinotermitidae mají v zadním střevě pH kolem 5 (21; 24). Vojáci mají ve srovnání s dělníky bachor několikanásobně menší (obr. 7), jsou totiž krmeni již předtrávenou potravou od dělníků.



Obr. 7: Porovnání střev dělníka (vpravo) a vojáka (vlevo) *C. formosanus*. Od shora – stomodeum, poté mesodeum, bachor a zbytek proctodea. Největší rozdíl v trávicí trubici dělníka a vojáka je ve velikosti bachoru. U dělníka je několikanásobně větší (perforoval pod sklíčkem). U dělníka jsou také lépe patrné malpigické trubice. Foto: J. Šobotník.

Jednotlivé části trávicí trubice jsou odděleny chlopněmi (valvami), které zabraňují zpětnému pohybu potravy. Jsou to chlopňovité vchlípeniny do následujícího oddílu.

1.3.2 Potrava termitů

Termití potrava se skládá výhradně z materiálu dřeva (v podobě zdravého dřeva, dřeva ve stádiu rozkladu) či jiného rostlinného materiálu (jako jsou listy, stonky), jehož hlavní složkou je celulosa. Celulosa je nejhojněji se vyskytujícím biopolymerem na Zemi, je hlavní polysacharidovou složkou rostlinných buněčných stěn. Úplná hydrolýza celulosy je běžná u hub a bakterií (25). Navzdory její hojnosti v biosféře se donedávna předpokládalo, že bez pomoci mikroorganismů je její degradace živočichy nemožná, vzhledem k jejich neschopnosti vytvářet celulasy.

U hmyzu bylo popsáno několik způsobů trávení celulosy. V prvé řadě je to využívání symbiotických prvoků a/nebo bakterií, kteří dokáží celulosu rozložit. Symbiotické organismy se obvykle nacházejí v zadním střevě, v části zvané bachor. Mimo této možnosti zisku důležitých enzymů od symbiotických organismů, může hmyz produkovat vlastní enzymy (endoglukanasy, celohydrolasy a β-glukosidasy (26)) degradující celulosu, případně celulosu trávit pomocí ektosymbiosy s houbou. Houba v tomto případě natráví celulosové rostlinné pletivo a hmyz následně přijme houbové pletivo nebo dřevo s celulolytickými enzymy vyprodukovanými houbami (27; 28). V případě termitů je to právě rozvoj symbiotického vztahu s organismy, což jim umožňuje žít xylofágním způsobem života (živící se pouze dřevem).

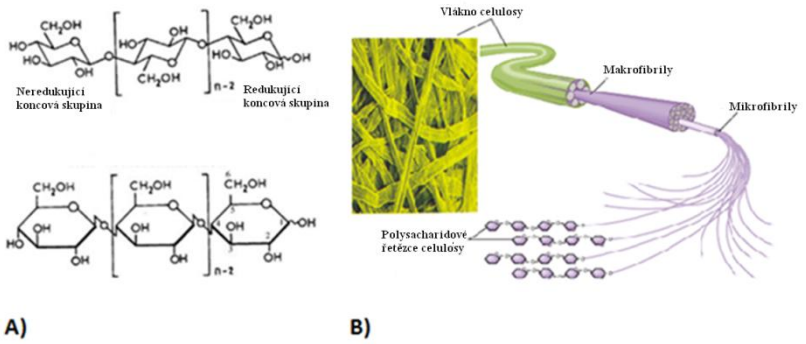
Trávení celulosy bylo prokázáno u 78 druhů hmyzu z 20 čeledí (29). Nejznámějšími xylofágními organismy jsou termiti, účinnost rozkladu celulosy pomocí jejich trávicího aparátu je až 99%. Mezi další hmyz rozkládající rostlinná pletiva patří xylofágní larvy blanokřídlých z čeledí Xiphydriidae, Siricidae a brouků z čeledí Anobiidae, Cerambycidae a Buprestidae, ti jsou schopní degradovat celulosu na 12 - 68%. Trávení celulosy se vyskytuje i u všežravého hmyzu jako jsou např. Thysanura, konkrétně u rybenky skleníkové *(Thermobia domestica)*. Zástupci této podtřídy tráví celulosu s účinností 40 – 90%. U detritivorního hmyzu (potravou je organický materiál ve stádiu rozkladu) je trávení celulosy vzácné a účinnost je malá v rozmezí 11 – 50% (složení potravy – dřeva, je uvedeno v tab. 1) (27).

Tab. 1.: Složení dřeva. Data převzata z (30).

Složení dřeva/dřevního materiálu:	dřevo	
	tvrdé	měkké
celulosa	40-60%	
lignin	16-20%	23-33%
hemicelulosa	20-30%	15-20%
další složky (voda, pryskyřice, ...)	5-30%	
minerály	0,1-3%	

Struktura dřeva je tvořena fibrilárními vlákny celulosy (a hemicelulosy). Lignin vytváří spojovací materiál mezi těmito fibrilami. V pletivech rostlin je celulosa obalena a propojena s hemicelulosou a ligninem a dohromady vytvářejí skelet buněk, tzv. lignocelulosu. Rozklad tohoto komplexu není možný bez směsi celulas a hemicelulas (30).

1.3.2.1 Celulosa

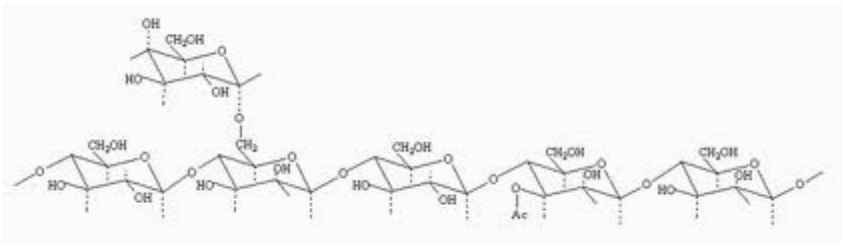


Obr. 8: Chemická struktura celulosy. A: strukturní vzorec základního stavebního segmentu celulosy (31), B: schematické znázornění stavby celulosového vlákna (32).

Celulosa je polysacharid sestávající z β-D-glukosy (obr. 8). Jednotlivé glukosové jednotky jsou spojené β-1,4 glykosidickou vazbou a tvoří dlouhé, nerozvětvené řetězce. Stupeň polymerizace může být až 15000 (33; 34). Celulosa je zcela nerozpustná ve vodě. Sumární vzorec celulosy je $(C_6H_{10}O_5)_n$. Celulosa je tvořena paralelně uspořádanými řetězci, které jsou v některých oblastech spojeny vodíkovými můstky - krystalická část, v jiných amorfních regionech jsou tyto řetězce umístěné volně. Stupeň krystalizace celulosy je od 0 do 100% - u bavlny je to například 70% (35). Od stupně krystalizace se odvíjí stravitelnost celulosy - amorfní části jsou mnohem snadněji hydrolyzovatelné (např. už v žaludku), ale krystalické části jsou velmi těžko přístupné pro celulasy i kyseliny. Při hydrolytickém štěpení celulosy vznikají různé štěpné produkty (celopentosa, celotetrosa, celotriosa, celobiosa) až po glukosu (36).

Celulosa je degradována pomocí celulolytických enzymů - celulas. Pojem celulasa, zahrnuje skupinu enzymů se stejnou substrátovou specifitou. Mezi celulasy patří následující enzymy: (1.) endoglukanasy (endocelulasy; EC 3.2.1.4), které hydrolyzují β-1,4 glykosidické vazby amorfní celulosy; (2.) celobiohydrolasy (exocelulasy; EC 3.2.1.91), jejichž funkcí je uvolnění celobiosy z redukujícího nebo neredukujícího konce amorfní celulosy (existují dva typy); (3.) exoglukanasy (glukohydrolasy; EC 3.2.1.74), které uvolňují glukosu z neredukujícího konce amorfní celulosy; (4.) β-glukosidasy (celobiasy; EC 3.2.1.21), které uvolňují glukosu z celobiosy nebo z krátkých řetězců oligosacharidů (36).

1.3.2.2 Hemicelulosa

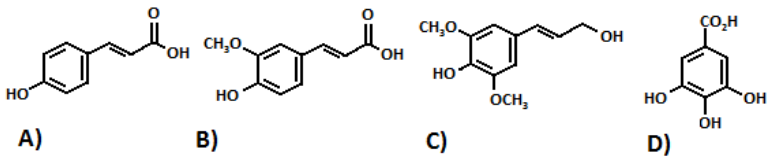


Obr. 9: Příklad fragmentu hemicelulosy (strukturní vzorec). Převzato z (37).

Jako hemicelulosa je označována skupina látek polysacharidického charakteru, který se od celulosy liší nižší relativní molekulovou hmotností a stavbou řetězce (obr. 9). Jsou to rovné, lineární polysacharidy (polymerační stupeň je 100–200) s krátkými postranními řetězci a menším stupněm krystalického podílu (převládá u nich amorfní část, mohou však rovněž tvořit i krystalické části). Hemicelulosy doprovázejí celulosu v jednotlivých vrstvách buněčné stěny rostlin. Tvoří zde tmelící vrstvu mezi celulosovými řetězovitými makromolekulami, váže se na ni lignin. Hemicelulosy mají zásobní funkci - chemicky se dají rozložit na jednoduché sacharidy (xylosa, arabinosa, galaktosa, manosa, fruktosa, rhamnosa, rodeosa, fukosa) a uronové kyseliny (glukuronová, galktorunová, mannuronová kyselina) (37; 38).

Nejčastějšími monomery hemicelulosy jsou xylan a manosa. Xylanové monomery hemicelulosy jsou štěpeny pomocí xylanas (EC 3.2.1.8), které přerušují β-1,4 glykosidické vazby xylanu na náhodných místech s preferencí nesubstituovaných míst (36)).

1.3.2.3 Lignin



Obr. 10: Strukturní stavební jednotky ligninu: A) kyselina p-kumarová, B) kyselina ferulová, C) kyselina syringylová, D) kyselina gallová. Převzato z (39).

Lignin je vysokomolekulární polyfenolická amorfní látka. Základní stavební jednotkou jsou deriváty fenylpropanu (obr. 10). Tyto prekurzory jsou vázány do trojrozměrných struktur etherovými vazbami nebo C-C vazbami. Je kovalentně vázán na

polysacharidy. Lignin postrádá pravidelnou strukturu a opakující se jednotky, které nacházíme u jiných přírodních polymerů. Z tohoto důvodu se na lignin pohlíží nikoliv jako na samostatnou sloučeninu, ale jako na směs fyzikálně a chemicky heterogenních látek. Lignin je po celulose druhou nejčastější organickou sloučeninou na Zemi, tvoří 25 % rostlinné biomasy. Hlavní funkcí ligninu je spojování celulosových vláken a celkové mechanické zpevnění v rámci rostlinné buněčné stěny (40).

1.3.3 Symbiotické organismy termitů

První zmínky o symbiotických organismech termitů pocházejí z doby před více jak sto lety od Josepha Leidy (41; 42). Tyto organismy obývají specializovanou komoru zadního střeva nazývanou bachor. A mají nezastupitelnou roli v trávení rostlinných materiálů či čisté celulosy, dále pak v produkci celulolytických enzymů a anaerobním kvašení celulosy na výsledný produkt - acetát. Symbiotické organismy v trávicím traktu termitů patří mezi prvoky skupiny Oxymonadida a Parabasalia. U termitů rodu *Coptotermes* jsou symbiotické organismy pouze z nadtřídy Parabasalia, u termitů rodu *Reticulitermes* převážně z řádu Oxymonadida (41).

Vztah termitů se symbiotickými prvoky patří do skupiny symbiotických vztahů - konkrétně se zde jedná o mutualismus, jenž odpovídá vzájemnému soužití mezi dvěma, či více organismy, přičemž je tento vztah výhodný pro všechny zúčastněné.

Ze vzájemného porovnání složení symbiotických organismů jednotlivých termitích rodů lze vyvodit závěr, že si termiti významně zachovávají svou střevní mikroflóru v rámci konkrétního rodu. Rozmanitost střevních komunit je autochtonní (původní, vyskytující se v místech svého původu nebo vzniku) a neodpovídá složení okolního prostředí (např. půdy) (19). V tabulce 2, str. 25 jsou uvedeny jednotlivé identifikované rody symbiotických organismů spolu s funkcí, kterou mají v trávicím traktu termita (42).

Vedle symbiotických prvoků, byla v trávicím traktu termita zjištěna přítomnost symbiotických bakterií. Celkem bylo určeno více jak 700 fylotypů (genetická příbuznost) z více jak 15 kmenů. Dominantní skupinou bakterií jsou spirochety *Treponema* (viz obr. 11. D, str. 26) a *Bacteroides*, tvořící dohromady více jak 80% všech střevních bakterií (42).

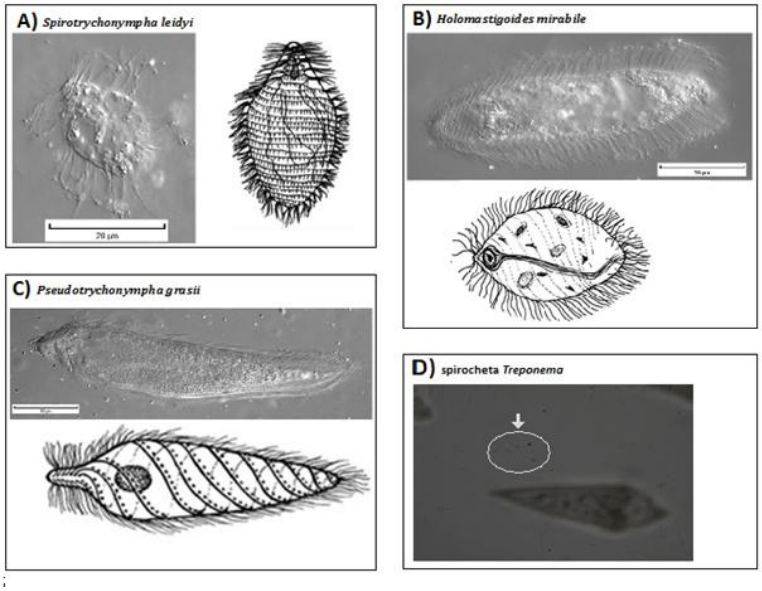
Tab. 2.: Druhy mikroorganismů identifikovaných v trávicím traktu termitů. Převzato z (42).

Oblast	Rod, Druh	Stručný popis/Funkce mikroorganismů
Bakterie	*Treponema*	volné ve střevě nebo vázané na prvoky; acetogeneze
	Bacteroides, *Bacteroides termitis*	fermentační acidogenní bakterie; recyklace dusíku z kyseliny močové
	Desulfovibrio	bakterie redukující sulfát; přenos vodíku ve formě H_2 donoru
	Citrobacter, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter*, *Enterobacter agglomerans*	bakterie fixující dusík
	Enterococcus, *Lactococcus*	bakterie mléčného kvašení
Archebakterie	*Methanobrevibacter*	metanogen, vázané na prvoky; metanogeneze
Prvoci	*Trichonympha*, *Mixotricha*, *Dinenympha*, *Euconomympha*	degradace celulosy přijaté endocytozou a produkuce H_2 a CO_2; anaerobní, probíhá v mitochondriích

U některých druhů hmyzu se střevní mikroflóra předává další generaci transovariálně (tj. z matky na potomky depozicí v/na vajíčku). U termitů to však nelze, neboť ztrácejí symbiotické organismy při každém svlékání. Díky společenskému chování je však zaručen vertikální přenos - proktodeální trofalaxe (sdílené krmení) mezi jednotlivými členy kolonie. Do nově vzniklých kolonií, jsou symbionti přeneseni v trávicím traktu alátních jedinců (budoucí král a královna). Díky tomuto způsobu přenosu se dá využívat složení mikroflóry na určení vzájemné fylogenetické příbuznosti termitů (42).

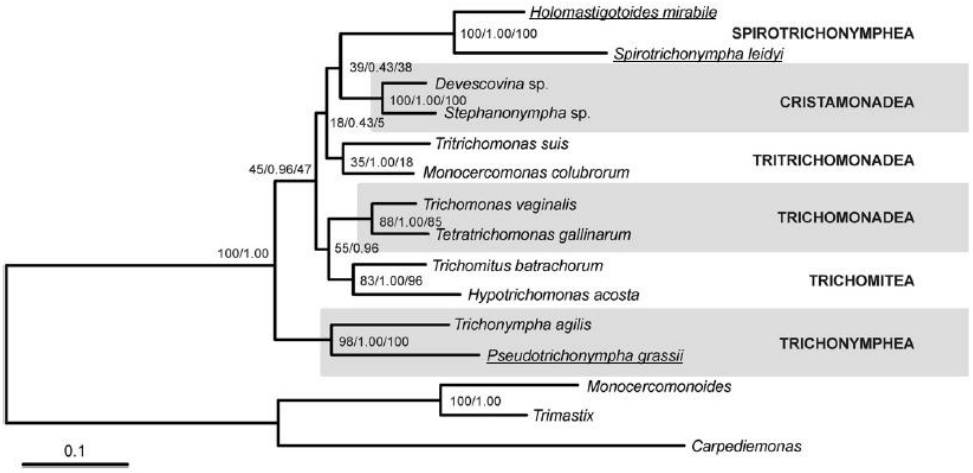
Termit *C. formosanus* má ve svém trávicím traktu přítomny tyto tři zástupce prvoků (obr. 11, str. 26): *Spirotrichonympha leidyi* (spirotrichonymphea; obr. 11. A, str. 26), *Holomastigoides mirabile* (spirotrichonymphea; obr. 11. B, str. 26) a *Pseudotrichonympha grassii* (trichonymphea; Obr. 11. C, str. 26). Všichni vyjmenovaní zástupci prvoků patřící do nadtřídy Parabasalia a jejich fylogenetická příbuznost je uvedena na obr. 12, str. 26.

Mimo těchto symbiotických prvoků zde byly identifikovány také bakterie patřící mezi spirochety (obr. 11. D, str. 26).



Obr. 11: Symbiotické organismy termita *C. formosanus*. A) *Spirotrychonympha leidyi*, B) *Holomastigiodes mirabile*, C) *Pseudotrychonympha grasii*, D) spirocheta *Treponema*. U každého mikroorganismu je uvedena fotografie (pořízená autorkou) a schematický obrázek, který byl převzat z (41).

Spirochety se řadí k pohyblivým bakteriím, které mají zvlněný tvar těla (40). Spirochety jsou v přírodě široce rozšířené, vyskytují se jak volně žijící ve sladkovodních i v mořských vodách, tak také v symbiotických, někdy až parazitických vztazích k bezobratlým i obratlovcům. V zadním střevě termitů se spirochety vyskytují ve velkém množství.



Obr. 12: Fylogenetický strom "nadtřídy" Parabasalia. Podtržením jsou zvýrazněné symbiotické organismy identifikované v trávicím traktu *C. formosanus*. Převzato z (41).

Symbiotické organismy termita *R. santonensis* nebyly v této práci podrobně studovány. V trávicím traktu převažují symbiotické organismy patřící do řádu *Oxymonadida*.

1.3.4 Metabolické funkce symbiotických organismů

Symbiotické organismy mají v trávicím traktu termitů několik rolí, mezi jejich hlavní funkce patří: degradace celulosy (zisk uhlíku a energie), metanogeneze a acetogeneze z H_2 a CO_2, fixace vzdušného dusíku, recyklace kyseliny močové (recyklace dusíku), udržení nízkého redoxního potenciálu a zabránění vstupu cizím bakteriím (43; 44).

1.3.4.1 Fixace dusíku

Fixace vzdušného dusíku je jednou ze stěžejních funkcí metabolismu termitích střevních symbiontů, především u druhů živících se dřevem (jež je obecně velmi chudé na dusíkaté látky tvořící jen 0,03 - 0,15% hmotnosti (45; 46)). Bakterie fixující dusík vyskytující se v trávicím traktu termitů jsou například: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aglomerans*, a spirochety rodu *Treponema*. Tyto symbiotické organismy mají nitrogenasovou aktivitu, která redukuje N_2 na NH_3. Objem fixovaného dusíku je nízký oproti množství dusíku dodávaného recyklací (43). U termitích druhů živících se půdou nemá fixace atmosférického dusíku takový význam, protože v jejich potravě je dusík zastoupen v dostatečném množství.

1.3.4.2 Acetogeneze a metanogeneze

Procesy acetogeneze a metanogeneze jsou anaerobní metabolické procesy, které probíhají v symbiotických bakteriích. Využívají H_2 a CO_2 vytvářené prvoky během degradace celulosy k syntéze acetátu a metanu. Například spirochety *Treponema* působí jako acetogen a realizuje acetogenezi redukcí CO_2: $4H_2 + 2CO_2 \rightarrow CH_3COOH + 2\ H_2O$. *Methanobrevibacter* má metanogenní roli a také používá H_2 jako redukční činidlo pro výrobu metanu: $4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$. Vzhledem k tomu, že termiti využívají acetát jako jediný zdroj energie, acetogeneze dominuje nad metanogenezí. Proto je pouze 1% uhlíku vytvořeného mikroby vyloučeno ve formě CH_4 (metanogeneze) a zbytek 99% uhlíku je přeměněn na acetát. Je známo, že i "malé" množství metanu vyprodukovaného termity (díky metanogenezi archebakterií) je považováno za zdroj atmosférického metanu, který představuje významný skleníkový plyn (47).

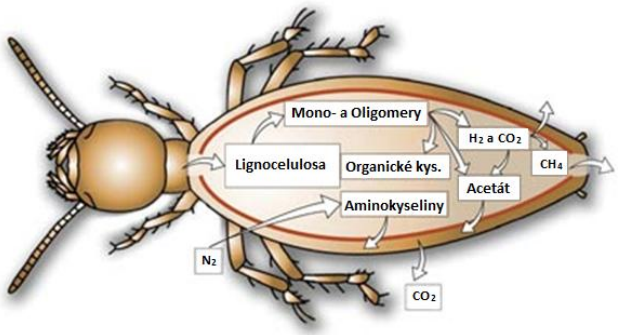
1.3.4.3 Degradace celulosy

Prvoci žijící ve střevě termitů tráví částice dřeva přijaté endocytosou a degradují je ve svých vakuolách. Celulolytičtí prvoci (například *Trichonympha* nebo *Mixotricha*) vytvářejí celulasy a různé glykolytické enzymy, kterými lze rozložit celulosu a přeměnit ji postupně přes glukosu až na další důležitý meziprodukt – malát (48). Dále je pak malát transportován do hydrogenosomů, kde je dále přeměněn pomocí hydrogenas za produkce CO_2, H_2, a acetátu. Během procesu vzniká ATP, který je uložen jako energie dále použitelná pro termity i pro symbiotické mikroorganismy.

1.3.5 Strategie procesu trávení

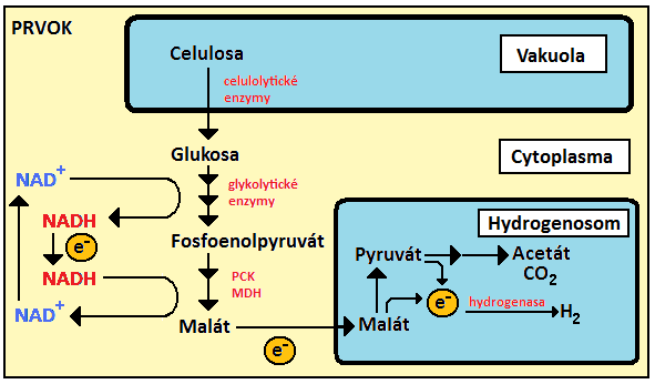
Trávení je u termitů velmi složitý proces, na kterém se výraznou měrou podílejí symbiotické organismy žijící ve střevě termitů. V této kapitole je popsáno trávení typické pro symbiotické mikroorganismy žijící v trávicím traktu *C. formosanus*.

Primární rozklad probíhá v kousacím ústním ústrojí termita, kdy jsou kousky dřeva zvlhčeny a rozmělněny. Této fáze trávení se účastní hydrolasy, jako jsou amylasy, celulasy, a trypsin, dochází zde k poklesu molekulové hmotnosti polymerních molekul potravy. Amylasy jsou vylučovány ze slinných žláz (18%) a z přední části středního střeva (73%) (49). Další část trávení probíhá ve středním střevě, zde se hlavně zapojují endogenní celulasy, které přednostně degradují amorfní části polymeru celulosy. Natrávená potrava poté putuje do zadního střeva, kde se zapojují symbiotické organismy žijící v bachoru. Pomocí exogenních celulas symbiotické organismy depolymerují především krystalické části celulosy (43). Schematické znázornění přijímaných a vylučovaných látek termitem je uveden na obr. 13.



Obr. 13: Schematické zobrazení termitem přijímaných a vylučovaných látek a obecné znázornění vztahů mezi těmito látkami. Převzato z (50) a upraveno.

Degradace celulosy v symbiotických organismech začíná transportem makromolekul celulosy do vakuol prvoků, kde je celulosa postupně degradována pomocí celulolytických enzymů na glukosu (ve formě glukosa-6-fosfátu). Poté v cytoplasmě, za účasti glykolytických enzymů a NAD^+ je glukosa-6-fosfát přeměněna na fosfoenolpyruvát. Ten je dále metabolizován pomocí enzymů (fosfokreatinkinasy a malátdehydrogenasy) na malát. V tomto kroku dochází k regeneraci NADH na NAD^+. Poté je malát transportován do hydrogenosomů, kde pomocí hydrogenasy dochází k redukci malátu přes pyruvát za vzniku acetátu, H_2 a CO_2. Zde dochází k syntéze ATP. Výsledný produkt metabolismu acetát slouží jako hlavní zdroj energie a uhlíku jak termitovi, tak symbiontům (obr. 14) (48).



Obr. 14: Schematické znázornění metabolismu symbiotických prvoků nadtřídy Parabasalia, kteří žijí v trávicím traktu termitího hostitele *C. formosanus*. Upraveno podle (48).

Do degradace celulosy se u nižších termitů společně zapojují exogenní celulasy symbiotických organismů (23; 51; 52) a termití endogenní celulasy (53). Celulasy jsou převážně sekretovány ve středním střevě (více jak 90% exprimovaných celulas), v menší míře ve slinných žlázách (49). Exogenní celulasy pocházejí především z *P. grassii*. Termiti jsou unikátní, jsou nejvyšším fylogenetickým taxonem, u kterého byly potvrzeny endogenní celulasy (54). Sekreci endogenních celulas poprvé zmínil Yokoe v roce 1964 (55). Yamaoka a Nagatani prokázali přítomnost endogenních enzymů (konkrétně endo-1,4-β-glukanasy) hydrolyzujících karboxymetylcelulosu ve slinných žlázách *Reticulitermes speratus* (56). Později bylo identifikováno větší množství genů kódující termití endogenní celulasy (53).

U termitů byla zjištěna vysoká úroveň aktivity proteas. Proteolytické enzymy identifikované v trávicím traktu termitů se daly inhibovat pomocí inhibitorů serinových proteas. Inkubací s chromogenními substráty byla v celém trávicím traktu potvrzena přítomnost trypsinu s největší koncentrací ve středním střevě (49). V přirozené potravě termitů jsou dusíkaté látky obsažené v minimálním množství. Bylo prokázáno, že v trávicím

traktu termitů jsou symbiotické fakultativně anaerobní bakterie (57), které fixují atmosférický dusík. Předpokládá se, že termit část těchto bakterií také stráví (58). Mechanismus není znám, ale lze očekávat účast endogenních proteolytických enzymů termita. Proteasy v trávicím traktu termitů byly detekovány teprve nedávno (58) a o jejich typech a biochemických charakteristikách je toho známo velmi málo.

1.4 Proteolytické enzymy

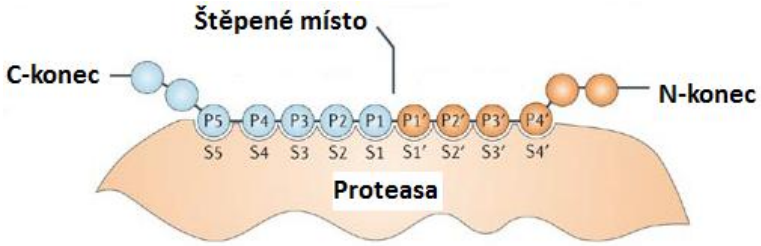
Hlavní úlohou proteas je obecně degradace proteinů (na peptidové fragmenty a postupně až na aminokyseliny) a dále specifická přeměna neaktivních proproteinů nebo peptidů do formy s biologickou aktivitou (např. konverze zymogenů na aktivní peptidy a prohormonů na hormony) (34). Proteasy jsou nezbytné pro velké množství fyziologických procesů jako pozitivní nebo negativní efektory.

Proteasy (také peptidasy nebo proteinasy) patří obecně mezi hydrolasy štěpící peptidové vazby proteinů. Rozdělujeme je na exoproteinasy (odštěpují jednu nebo více aminokyselin z C- nebo N-terminálního konce) a endopeptidasy (štěpí uvnitř polypeptidového řetězce). Proteasy můžeme dále dělit podle katalytického mechanismu (chemická povaha reaktivní skupiny v aktivním místě enzymu) do šesti tříd, z nichž mezi nejdůležitější patří proteasy serinové, cysteinové, aspartátové a metaloproteasy (tab. 3) (34). Barret a Rawlings navrhli klasifikační systém založený na statisticky významné podobnosti v sekvenci a struktuře všech známých proteolytických enzymů a pojmenovali tuto databázi MEROPS (59). Klasifikační systém proteas je rozdělen do klanů (podle katalytického mechanismu) a rodin podle (podle evoluční příbuznosti a homologie). V současné době je známo více jak 66 000 proteas, které byly rozděleny do 50 klanů a 184 rodin.

Tab. 3: Rozdělení proteas podle katalytických aminokyselin v aktivním místě. Podle (60).

Třídy proteas	Katalytické aminokyseliny v aktivním místě	Příklady proteas	Klasifikace	pH optimum
serinové	Ser, His, Asp	trypsin, chymotrypsin,	EC 3.4.21	7-9
cysteinové	Cys, His	caspasy, kathepsiny, papain	EC 3.4.22	4-7
metaloproteasy	většinou Zn2+	kolagenasa, aminopeptidasa	EC 3.4.24	7-9
aspartátové	Asp, Asp	pepsin, renin, HIV proteinasa	EC 3.4.23	<5

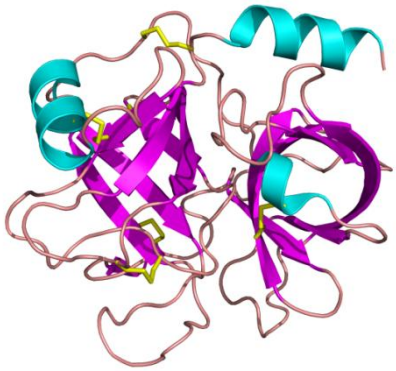
Substrátová specifita je dána strukturou a charakterem aktivního místa proteasy, která určuje, jaký typ substrátu se může navázat do aktivního místa. Úsek proteasy, který je přímo schopen interagovat s jednotlivými zbytky proteinového substrátu se nazývá podmísto („subsite“). Pro bližší popis se používá ustálené značení podmíst S1….Sn směrem k N-terminálnímu konci a S1´….Sn´ směrem k C-terminálnímu konci substrátu. Podobně jsou označeny aminokyselinové zbytky substrátu P1….Pn nebo P1´….Pn´ (obr. 15) (61).



Obr. 15: Štěpení peptidové vazby v aktivním místě proteasy. Upraveno podle (61).

1.4.1 Serinové proteasy

Serinové proteasy (EC 3.4.21.X) tvoří bohatou skupinu proteolytických enzymů, které lze nalézt ve velkém množství organismů včetně bakterií, rostlin a živočichů. Do této skupiny proteas patří více jak třetina známých proteolytických enzymů (59). Mezi nevýznamnější funkce serinových proteas patří digestivní a regulační funkce (43). Charakteristickým rysem serinových proteas je přítomnost reaktivního zbytku serinu v aktivním místě, který se účastní katalytického mechanismu, kterým jsou hydrolyzovány peptidové vazby. Serinové proteasy rozdělujeme podle primární struktury do více jak 13 rodin, které se dále dělí do 40 klanů (59). Mezi nejvíce zastoupené serinové proteasy patří proteasy typu trypsinu (EC 3.4.21.4) (obr. 16, str. 32), chymotrypsinu (EC 3.4.21.1) a elastasy (EC 3.4.21.36), které si jsou strukturně podobné, avšak mají rozdílnou míru homologie a funkční vlastnosti zejména substrátovou specifitu.



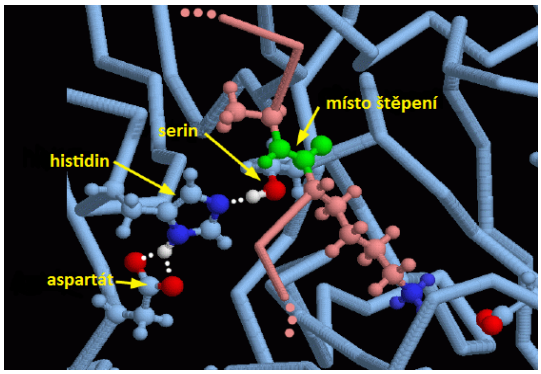
Obr. 16: Rentgenová struktura hovězího trypsinu (PDB kód 3OTJ). Znázornění struktury enzymu se zvýrazněním β-skládaných listů (fialová), α-helixů (tyrkysová) a disulfidických můstky (žlutá). Vytvořeno v programu PyMOL.

1.4.1.1 Serinové proteasy hmyzu

U některých druhů hmyzu mají serinové proteasy hlavní trávicí a regulační roli (62; 63). Serinové proteasy trypsin a chymotrypsin byly detekovány v hmyzích epiteliálních buňkách některých členů řádů Coleoptera (brouci), dále pak Diptera (dvoukřídlý), Dictyoptera, Hymenoptera (blanokřídlý), Lepidoptera (motýli) a Orthoptera (kobylky) (64). Narozdíl od lidského trypsinu, hmyzí trypsin není stabilizován vápenatými ionty (63).

1.4.1.2 Struktura serinových proteas

Enzymy typu trypsinu a chymotrypsinu mají významnou míru sekvenční homologie. Primární struktura trypsinu, chymotrypsinu i elastasy je asi z 40% identická (34). Mají ale odlišnou substrátovou specifitu: trypsin štěpí pouze za kladně nabitým zbytkem bazických L-aminokyselin (arginin a lysin) (obr. 17, str. 33), zatímco chymotrypsin za velkým hydrofobním zbytkem nebo zbytkem aromatických aminokyselin (např. tryptofan, tyrosin, fenylalanin, leucin nebo methionin).



Obr. 17: Rentgenová struktura hovězího trypsinu (PDB kód 2PTC). Pohled do aktivního centra enzymu, kde je reaktivní smyčka inhibitoru, napodobující substrát a v pozici P1 je zbytek lysinu, který vyhovuje substrátové specifitě trypsinu v podmístě S1. Vyznačená je triáda katalytická triáda aminokyselin Asp-102, His-57 a Ser-195. Převzato z (65) a upraveno.

Molekulová hmotnost lidského trypsinu je 24,5 kDa. Enzym se skládá ze dvou domén, které obsahují rozsáhlé oblasti antiparalelních β-skládaných listů uspořádaných do soudkovitého útvaru. Celkově obsahují velmi málo α-helikálních struktur (obr. 16, str. 32) (34). Struktura lidského trypsinu je stabilizována oktaedrálně koordinačně vázaným iontem Ca^{2+}, po jeho odstranění se indukuje autolýza. Ve struktuře trypsinu je 6 disulfidických můstků. Trypsin, stejně jako chymotrypsin a elastasa obsahuje ve svém aktivním místě stejnou katalytickou triádu Asp-102, His-57 a Ser-195 (obr. 17) (34), která je stabilizována třemi disulfidickými můstky mezi Cys5-Cys55, Cys14-Cys38 a Cys30-Cys51. Tato katalytická triáda byla poprvé popsána před více jak 30 lety ve struktuře chymotrypsinu (66). Obecně je pro serinové proteasy typické pH optimum v alkalické oblasti nejčastěji mezi 8 a 9 (61).

1.4.1.3 Mechanismus katalytické reakce

Každá z aminokyselin katalytické triády serinových proteas vykonává v katalytickém procesu určitou úlohu:

- Ser-195: Hydroxylová skupina serinu se chová jako nukleofil a napadá uhlík karbonylu a štěpí peptidovou vazbu v substrátu.
- His-57: Elektronový pár na dusíku histidinu má schopnost přijímat H^+ z hydroxylové skupiny serinu

- Asp-102: Karboxylová skupina kyseliny asparagové interaguje s vodíkem ve struktuře histidinu, čímž zvyšuje elektronegativitu elektronového páru.

Prvním krokem katalytické reakce je navázání (poly)peptidového substrátu na povrch serinové proteasy tak, že štěpená vazba je umístěna do aktivního centra enzymu (do blízkosti katalytické triády). Stabilizace katalytické triády je zprostředkována sítí vodíkových vazeb poskytovaných aminokyselinovými zbytky obklopující triádu Thr-54, Ala-56 a Ser-124. Vlastní katalýza je podporována vodíkovou vazbou mezi Asp-102 a His-57, která odebírá proton ze Ser-57 a tím vytvářejí silný nukleofil. V první fázi hydroxyl Ser-195 napadá karbonyl štěpeného peptidu. Produktem je tetrahedrální meziprodukt. Tetrahedrální meziprodukt je stabilizován interakcí s Gly-193 a Ser-195, tyto dvě aminokyseliny generují kladně nabitou „kapsu“ ve které se nachází aktivní místo proteinu nazývané „oxyaniontová díra“. Rozpadem terahedrálního meziproduktu vzniká acyl-enzymový komplex. Stabilizace nově vzniklého N-koncového polypetidového fragmentu štěpeného substrátu je zprostředkována pomocí His-57. V druhé části mechanismu molekula vody nahradí N-koncový polypetidový fragment a napadá acyl-enzymový komplex. Výsledkem je druhý terahedrální meziprodukt. Jehož rozpadem dochází k uvolnění C-koncové části polypeptidového řetězce a regeneraci enzymu.

Popis tohoto mechanismu je teoreticky odvozený. Existence tetraedrálního meziproduktu byla již potvrzena důkazem v podobě rentgenové struktury komplexu trypsin-BPTI (27) a důkaz o acyl-enzymovém komplexu podal Hartley a Kilbey už v roce 1954 (67).

1.4.1.4 Inhibitory serinových proteas

Inhibitory serinových proteas zahrnují nejpočetnější skupinu inhibitorů. Díky široké distribuci serinových proteas napříč živými organismy (od bakterií, přes houby a viry, po rostliny a živočichy) jsou i funkce inhibitorů těchto proteas široké. Mezi typické příklady funkcí patří ochrana před trávicími proteasami hmyzu u rostlin a regulace proteolýzy u živočichů.

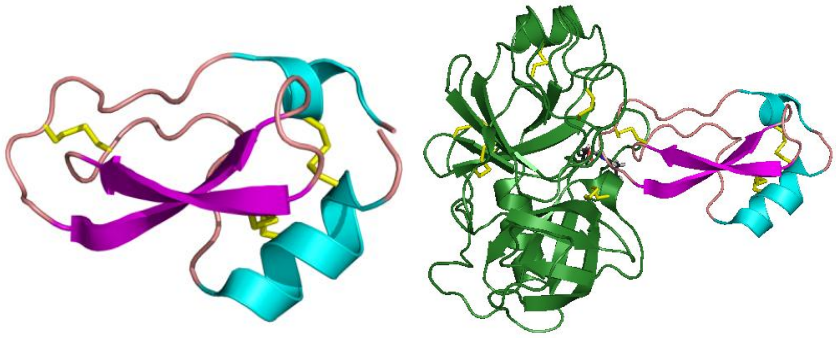
Podobně jako serinové proteasy jsou i inhibitory serinových proteas na základě strukturní podobnosti jsou rozděleny do zhruba 15 rodin.

V této práci bylo využíváno inhibičních vlastností inhibitorů BPTI (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor) a p-aminobenzamidinu.

BPTI

BPTI je inhibitor trypsinu izolovaný z hovězího pankreatu, který patří mezi proteasové inhibitory Kunitzova typu. Jeho fyziologickou funkcí je inaktivací trypsinu chránit tkáň pankreatu před poškozením. Obecně se inhibitory tohoto typu nachází v mnoha savčích tkáních. BPTI se používá jako selektivní inhibitor serinových proteas. Škála enzymů, které může inhibovat, zahrnuje různé enzymy zejména typu trypsinu a chymotrypsinu. BPTI je monomerní polypeptid, skládající se z 58 aminokyselinových zbytků. Struktura je uvedena na obrázku 18 (68).

Při interakci s enzymem se inhibitor naváže do aktivního centra enzymu pevně sbalenou částí připomínající strukturu substrátu. Ta je zpevněna sítí disulfidických můstků, což umožňuje zabránit jejímu rozštěpení díky zamezení přístupu molekuly vody do katalytického centra (kap. 1.4.1.3, str.35).



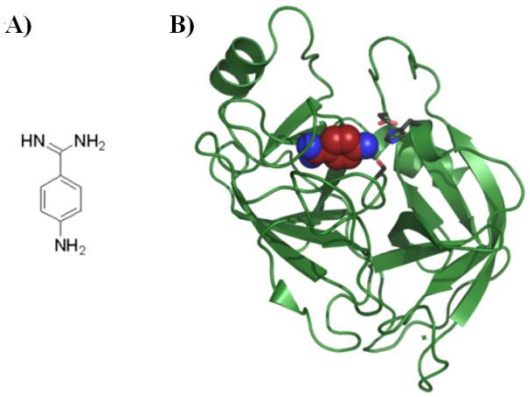
A) B)

Obr. 18: Struktura BPTI (A) a komplexu BPTI s hovězím trypsinem (PDB kód 3OTJ) (B). Fialovou barvou jsou znázorněné β-skládané listy, tyrkysovou α-helikální struktury. Žlutou barvou jsou znázorněny cysteinové disulfidické můstky mezi Cys5-Cys55, Cys14-Cys38 a Cys30-Cys51 a zeleně je zvýrazněna struktura hovězího trypsinu. Vytvořeno v programu PyMOL.

Benzamidin (p-aminobenzamidin hydrochlorid)

Bylo popsáno velké množství trypsinových inhibitorů se strukturou alifatických nebo aromatických alkylaminů. Struktura p-aminobenzamidinu je vyobrazena na obr. 19, str. 36. Je to kompetitivní reverzibilní inhibitor trypsinu a mnoha dalších typu serinových proteas. p-

Aminobenzamidin je možné chemicky navázat na chromatografický nosič (např. sepharosu) a připravit tak účinný nástroj pro afinitní izolaci trypsinových proteas (69).



Obr. 19: Struktura p-aminobenzamidinu (A) a struktura hovězího trypsinu v komplexu s p-aminobenzamidinem (PDB kód 3GY4). Molekula trypsinu je znázorněna zeleně, p-aminobenzamidin červeně s aminoskupinami modře. Vytvořeno v programu PyMOL

1.4.2 Cysteinové proteasy

Cysteinové proteasy obsahují v aktivním místě diádu katalytických aminokyselin - cystein a histidin. U cysteinových proteas je nukleofilem atakujícím peptidovou vazbu thiolová skupina, která je v aktivním místě na postranním řetězci katalytické aminokyseliny cysteinu.

Jednou z nejpočetnějších rodin cysteinových proteas je rodina C1 (rodina papainu). Do této rodiny patří např. trávicí proteasy hmyzu nebo lysosomální kathepsiny savců, jako jsou např. aminopeptidasa kathepsin H, karboxydipeptidasa kathepsin B, aminodipeptidasa kathepsin C a endopeptidasa kathepsin L. Cysteinové proteasy rodiny papainu jsou obecně méně specifické enzymy a jsou syntetizovány ve formě neaktivních zymogenů (34). pH optimum pro aktivitu těchto proteas je nejčastěji v mírně kyselé oblasti pH 5-7 (61).

1.4.3 Metaloproteasy

Metaloproteasy patří mezi proteolytické enzymy, jejichž katalytický mechanismus vyžaduje iont kovu. Metaloproteasy mají jako nukleofil atakující štěpenou peptidovou vazbu aktivovanou molekulu vody. Tato molekula reaguje s dvoumocným iontem kovu (např. Zn nebo Mn). Optimum aktivity metaloproteas je při pH 3-6 (61).

Metaloproteasy se vyskytují napříč organismy (bakterie, houby, bezobratlí a obratlovci). Evolučně jsou velmi staré. U savců mají význam při tkáňové remodelaci a embryonálním růstu. Příkladem jsou enzymy štěpící extracelulární matrix, tzv. matrixové metaloproteasy (MMP), dalším příkladem může být leucinaminopeptidasa (LAP), která je typickým příkladem zinkové metaloproteasy. Leucinaminopeptidasa selektivně odstraňuje N-terminální aminokyselinové zbytky proteinů (70).

1.4.4 Aspartátové proteasy

Aspartátové proteasy (EC 3.4.23.X) jsou enzymy s širokou škálou fyziologických aktivit a funkcí. Jsou přítomny ve všech živých organismech (zvířata, rostliny, houby a viry) (70). Mezi nejdůležitější funkce aspartátových proteas patří například trávení živin u obratlovců (např. gastricsin neboli pepsin C, chymosin, pepsin), lyzosomální degradace proteinů, obrana proti patogenům, regulace krevního tlaku (např. renin), degradace hemoglobinu u řady krevsajících parazitů jako jsou plasmodium nebo krevnička (např. plasmepsin) a proteasa viru HIV (např. HIV-1 retropepsin) (71).

Jednou z nejrozšířenějších rodin aspartátových proteas je rodina A1 (47). Aspartátové proteasy jsou syntetizovány ve formě preproenzymů a dále autokatalyticky aktivovány. Obecně se enzymy aspartátových proteas skládají z jednoho peptidového řetězce. Aspartátové proteasy mají jako nukleofil atakující štěpenou peptidovou vazbu aktivovanou molekulou vody. Tato molekula reaguje se dvěma katalytickými zbytky kyseliny asparagové (61).

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo analyzovat proteolytický trávicí systém termitů pomocí biochemických metod. Studie byla zaměřena na dva ekonomicky významné druhy dřevokazných termitů: *Reticulitermes santonensis* a *Coptotermes formosanus* (čeleď Rhinotermitidae).

Dílčí cíle:

- Identifikovat typy proteas ve střevních kompartmentech studovaných druhů termitů
- Vizualizovat hlavní typ proteasy pomocí specifické fluorescenční značky na SDS-PAGE elektroforese
- Izolovat hlavní trávicí proteasu z vybraného modelového druhu termita, určit její N-koncovou sekvenci a porovnat ji se sekvenční databází
- Analyzovat vliv inhibice hlavní trávicí proteasy v testech *in vivo*
- Porovnat identifikované trávicí proteasy u modelových druhů se zástupci jiných termitích čeledí

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

- Biologický materiál

  Preparovaná střeva a střevní fragmenty dělníků termitů *R. santonensis, C. formosanus, Mastotermes darwiniensis, Hodotermes mosambicus, Labiotermes labralis, Neocapritermes taracua, Odontotermes sp., Prorhinotermes simplex, Glossotermes oculatus, Anoplotermes banksi, Zootermopsis angusticollis, Neotermes castaneus, Nasutitermes priceps, Neotermes castaneus* a *Kalotermes flavicollis*, které poskytl Mgr. Jan Šobotník, Ph.D. (ÚOCHB AV ČR).

- Substráty

Tab. 4: Substráty uvedené pro jednotlivé třídy proteas.

Substráty	Zásobní roztok	Cílové proteasy
azokasein*	2% azokasein v 1 M	všechny skupiny
Z-Phe-Arg-AMC**	10 mM v DMSO	kathepsin B/L, trypsin
Z-Arg-Arg-AMC**	10 mM v DMSO	kathepsin B, trypsin
Leu-AMC**	10 mM v DMSO	leucinaminopeptidasa
Z-Gly-Pro-AMC**	10 mM v DMSO	prolyl endopeptidasa
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC**	10 mM v DMSO	chymotrypsin

(*) Sigma, USA; (**) Bachem, SRN

- Inhibitory

Tab. 5: Souhrn inhibitorů pro jednotlivé třídy proteas.

Inhibitory	Zásobní roztoky	Cílové proteasy	Konečná koncentrace inhibitoru v testu
bestatin*	5 mM v MetOH	metaloproteasy	50 μM
BPTI*	1 mM v H_2O	serinové proteasy	10 μM
E64*	1 mM v 50% EtOH	cysteinové proteasy	10 μM
Pefabloc*	0,1 M v H_2O	serinové proteasy	1 mM
PMSF*	0,1 M v isopropanolu	serinové proteasy	2mM

(*)Sigma, USA

- Afinitní značka
  Try-BP (Bodipy-TMR-D-Phe-Pro-Arg-CMK): koncentrace zásobního roztoku 20 μM v DMSO, syntéza byla provedena na ÚOCHB AV ČR (Ing. Martina Nussbaumerová, Ph.D.)

- Ostatní chemikálie
  Sigma, USA:
  BSA, DTT,SDS, TEMED, akrylamid, merkaptoethanol, APS, glycin, azokasein, Tris, močovina, Coomasie Brilliant Blue G250, benzamidin, $CaCl_2$, Brij 35, PMSF

  Fluka, SRN:
  DMSO, glycerol, TCA, PEG 6000, guanidin, metronidazol

  Pierce, USA:
  BCA Protein Assay Kit

  Lachema, ČR:
  EtOH, kyselina octová, MetOH, NaCl, aceton, kyselina boritá, kyselina fosforečná

  Fermentas, Lotyšsko:
  hmotnostní standardy pro SDS-PAGE: "Page Ruler Prestained Protein Ladder Plus"

  Biotika, SR:
  ampicilin

  Duchefa biochemie, Nizozemí:
  carbenicilin

3.2 Přístroje a vybavení

Analytické váhy AE 163	Mettler, Švýcarsko
Centrifuga Eppendorf 5415D	Eppendorf, SRN
Rotační vakuový koncentrátor Speed Vac	Thermosavant, USA
Ultrafree-MC centrifugační filtr, 0,45 μm	Millipore, USA
Fluorescenční/absorbanční čtečka GENios	Tecan, Rakousko
pH metr Pracitronic MW 870	Pracitronic, SRN
Termoblok	Vývojové dílny, ÚOCHB AV ČR
Vertikální elektroforesa	Bio-Rad, USA
Blotovací zařízení Mini Trans-Blot	Bio-Rad, USA
Mikrotitrační destičky	Nunc GmbH & Co. KG, SRN
Fluorescenční skener Typhoon Imager	Amersham, Švédsko
PVDF membrána	Millipore, USA
Kolona agarosy s imobilizovaným bezamidinem	Sigma, USA
Stereoskopický mikroskop Olympus SZ61	Olympus, ČR

Osvětlení binoklu KL 1500 LCD	Zeiss, SRN
Fotoaparát Olympus C5060	Olympus, ČR
Mikroskop Amplival	Zeiss, SRN
Váhy Sartorius 4501 micro	Sartorius, SRN
dialyzační membrána	Visking, VB

3.3 Experimentální metody

3.3.1 Preparace střev a příprava střevních fragmentů termitů

Živí dělníci obou druhů byli umístěni na pitvací misku (s podkladem z černého parafínu). Hlava byla odříznuta skalpelem a celé střevo vytaženo ostrou pinzetou (Dumont 5/45) spolu se špičkou abdomenu (zadečku). Vypitvaná střeva byla uchována ve 150 µl extrakčního pufru v -20°C.

Jednotlivé střevní kompartmenty byly pro vybrané experimenty odděleny skalpelem z celého střeva po vypitvání: střední střevo (mesodeum, které obsahuje také zbytek předního střeva, stomodea), bachor ("paunch") a zadní střevo (proktodeum, které je bez bachoru). Pro detailní experimenty byl bachor rozříznut a propláchnut extrakčním pufrem. Obsah střeva s extrakčním pufrem byl dále centrifugován (2 min, 100g, 18°C) a získaný supernatant, sediment i stěna bachoru byly použity pro přípravu extraktů.

Extrakční pufr: 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 20% glycerol, pH 7,0

3.3.2 Příprava extraktu z tkání termitů

K zamraženým vzorkům tkáně byl přidán vychlazený extrakční pufr do výsledného objemu 1,2 ml v případě celostřevních homogenátů, nebo do objemu 0,6 ml v případě střevních kompartmentů (střední střevo, bachor, kompartmenty bachoru, zadní střevo). Směs byla homogenizována teflonovým pístem v mikrozkumavce. Extrakce probíhala 10 min za chlazení na ledu a homogenizovaná směs byla poté centrifugována (10 min, 15000g, 4°C). Supernatant byl filtrován přes Ultrafree-MC centrifugační filtr 0,45 µm (10 min, 5000g, 4°C). Koncentrace proteinu v jednotlivých extraktech byla v rozmezí 1,5 - 2,0 mg/ml pro extrakty z celého střeva a 0,1 - 0,5 mg/ml pro střevní fragmenty. Extrakty byly skladovány při teplotě -20°C.

Vzorek: Preparovaná střeva z 30 nebo střevní kompartmenty z 50 dělníků termitů *R. santonensis* nebo *C. formosanus*. Pro přípravu extraktu z celého těla bylo použito 30 dělníků termitů.

Extrakční pufr: 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, 20% glycerol, pH 7,0

3.3.3 Stanovení koncentrace proteinů

Pro stanovení koncentrace proteinů byla použita komerční sada BCA™ Protein Assay Kit. Kalibrační křivka se stanovovala ze standardu roztoku BSA (koncentrace 0-2 mg/ml). Do každé jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 10 µl standardu nebo testovaného extraktu s 200 µl činidla. Poté se mikrotitrační destička inkubovala 15 min při 37°C a pomocí čtečky GENios byla změřena absorbance při 562 nm. Koncentrace proteinů ve vzorcích se určila ze sestavené kalibrační standardní křivky.

3.3.4 Aktivitní test s azokaseinem jako substrátem

Principem metody je kolorimetrické stanovení produktu, který vzniká štěpením kaseinu značeného sulfanilamidovou skupinou působením proteolytického enzymu. Složení reakční směsi bylo následující:

- Preinkubační směs (100µl):
  - 10 µl extraktu (obsahujícího 5-50 µg proteinu)
  - 12 µl inhibiční směsi (v kontrolním vzorku byl inhibitor nahrazen vodou), použité inhibitory a jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce 4, str. 39)
  - 78 µl pufrační směsi:
    1,5 µl 0,25 M DTT (finálně: 2,5 mM)
    1,5 µl 10% PEG 6000 (finálně: 0,1%)
    75 µl Britton-Robinsonova pufru (pH 3,5-10,0) (finálně: 0,1 M)

Preinkubační směs byla inkubována (10 min, laboratorní teplota), ke každému vzorku bylo přidáno 50 µl roztoku substrátu (2% azokasein, 1 M močovina) a výsledná reakční směs byla dále inkubována (12 hod, 37°C). Reakce byla zastavena přidáním 300 µl 6% TCA a následně ponechána 30 min při 4°C. Směs byla centrifugována (10 min, 13000g). Z každého vzorku bylo odebráno 330 µl supernatantu do mikrotitrační destičky a na čtečce GENios byla

změřena absorbance při vlnové délce 360 nm. Jako blank byly použity kontrolní vzorky připravené bez použití enzymu. Měření bylo provedeno v duplikátech.

Britton-Robinson pufr: 0,2 M kyselina boritá, 0,2 M kyselina octová, 0,2 M kyselina fosforečná (pH 3,5 - 10,0)

3.3.5 Aktivitní test s fluorogenními peptidovými substráty

Pro stanovení aktivity proteas byly použity fluorogenní peptidové substráty s fluorescenční skupinou AMC (7-amido-4-methylkumarin). Flourescenční signál vznikající odštěpením AMC působením proteas byl měřen pomocí čtečky GENios při excitační vlnové délce 365 nm, emisní vlnové délce 460 nm. Složení reakční směsi bylo následující:

- Reakční směs (100 µl):
  - 5 µl extraktu:
    0,5 µl - 2,5 µl extraktu doplněno vodou
  - 5 µl inhibiční směsi (v kontrolním vzorku byl inhibitor nahrazen vodou), použité inhibitory a jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce 4, str. 39)
  - 70 µl pufrační směsi:
    68 µl Britton-Robinson pufru (pH 3,5-10,0) (finálně: 0,14 M)
    1,0 µl 0,25 M DTT (finálně: 2,5 mM)
    1,0 µl 10% PEG 6000 (finálně: 0,1%)
  - 20 µl substrátové směsi:
    0,5 µl zásobního roztoku substrátu (finálně: 50 µM) doplněno vodou

Po protřepání reakční směsi byl kontinuálně měřen vznikající fluorescenční signál. Byla určena počáteční rychlost reakce a jako blank byla použita reakční směs bez enzymového extraktu. Měření bylo provedeno v triplikátech.

Britton-Robinson pufr: 0,2 M kyselina boritá, 0,2 M kyselina octová, 0,2 M kyselina fosforečná (pH 3,5 - 10,0)

3.3.6 Afinitní chromatografie na imobilizovaném benzamidinu

Pro izolaci majoritní serinové proteasy RsSP bylo použito 200 celých dělníků *R. santonensis*. Tento materiál byl homogenizován v 1 ml navazovacího pufru; příprava extraktu probíhala podle metody uvedené v kap. 3.3.2, str. 41. Izolace byla provedena metodou afinitní

chromatografie na agarosovém nosiči s imobilizovaným benzamidinem. Před vlastní izolací byla kolona (1 ml) promyta 20 ml H_2O a 20 ml navazovacího pufru. Poté bylo na nosič vsádkově aplikováno 350 µl extraktu, a směs byla po dobu 1 h za třepání inkubována při 4°C. Následně byla jímána frakce nenavázaného materiálu. Dále byla kolona promyta následujícími promývacími kroky: 1. 10 ml navazovacího pufru, 2. 20 ml navazovacího pufru s 0,2% Brij 35, 3. 10 ml navazovacího pufru. V další fázi bylo postupně aplikováno 10x 1ml elučního pufru; frakce byly jímány po 5 min. Nakonec byla kolona promyta (po 20 ml) pomocí H_2O, dále 6 M guanidinu a opět H_2O.

Identifikace elučních frakcí obsahujících RsSP byla provedena pomocí značení se syntetickou aktivitní značkou (kap. 3.3.9, str. 45), tyto frakce byly následně spojeny a dialyzovány (3x 1 l) proti 20 mM Tris-HCl, pH 7,0. Získaný roztok byl zahuštěn lyofilizací na objem 1 ml a použit pro testování enzymové aktivity. U materiálu použitého k určení N-koncové sekvence byl do spojených elučních frakcí před dialýzou přidán 2 mM PMSF, lyofilizace byla provedena kompletně, získaný materiál byl rozpuštěn v 250 µl H_2O a protein byl separován acetonovou precipitací.

Navazovací pufr: 50 mM Tris-HCl, 20 mM $CaCl_2$, 10% glycerol, pH 8,5
Eluční pufr: 100 mM benzamidin rozpuštěný v navazovacím pufru, pH 8,5

3.3.7 SDS-PAGE

Provedení polyakrylamidové elektroforesy v přítomnosti 0,1% SDS vycházelo z postupu dle Laemmliho (72). Na vertikální elektroforese Bio-Rad byly použity 15% polyakrylamidové gely o rozměrech 80x60x0,75 mm. K proteinovým vzorkům bylo přidáno 12 µl vzorkového pufru a směs byla inkubována na vroucí vodní lázni (5 min).

K detekci proteinů byl polyakrylamidový gel elektroforesy nejdříve promyt 3x 10 min v destilované vodě a následně analyzován na fluorescenčním skeneru Typhoon Imager (670 nm).

Elektroforetický pufr: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0
Vzorkový pufr: 100 mM Tris-HCl,1% SDS, 4% merkaptothanol, 0,02% Coomasie Brilliant Blue G250, 24% glycerol, pH 6,8

3.3.8 Přenos proteinů z gelu na membránu

Po skončení SDS-PAGE byly elektroforetický gel, PVDF membrána, podložka a filtrační papír ekvilibrovány 15 min v transferovém pufru. Po ekvilibraci byly navrstveny do blotovacího přístroje v pořadí: anoda, podložka, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír, podložka a katoda. Přenos proteinů na membránu probíhal 7 min při konstantním napětí 100 V pomocí komerčního setu iBlot^{TM}. Poté byla membrána obarvena roztokem Coomassie Brilliant Blue G250 (73). Membrána byla odbarvena 25% MetOH s 10% kyselinou octovou a třikrát promyta vodou.

Transferový pufr: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycin, 20% MetOH, pH 8,3

3.3.9 Značení proteas pomocí syntetické aktivitní značky

Značení serinových proteas bylo provedeno pomocí syntetické aktivitní značky Try-BP. Struktura značky obsahuje inhibitor trypsinu Phe-Pro-Arg-CMK s navázanou fluorescenční skupinou BODIPY-TMR. Try-BP se kovalentně naváže do aktivního místa enzymu v průběhu inkubace následující reakční směsi.

- Reakční směs (15 µl):
  - 5 µl proteinového extraktu (10-25 µg proteinu) nebo izolátu (<0,1 µg)
  - 5 µl pufrační směsi:
    4,85 µl Britton-Robinson pufru, pH 6,5
    0,15 µl 0,25 M DTT
  - 5 µl směsi s afinitní značkou:
    0,15 µl 20 µM afinitní značky Try-BP (finálně: 0,2 µM)
    4,85 µl 0,1 M Britton-Robinson pufru, pH 6,5

Reakční směs byla inkubována v mikrozkumavkách ve tmě v termobloku (1 hod, 37°C). Poté následovala acetonová precipitace proteinů: ke směsi byl přidán aceton do konečné koncentrace 80%, směs byla inkubována (30 min, -20°C) a následovala separace sedimentu centrifugací (10 min, 15000g). Takto připravené proteinové vzorky byly separovány na SDS-PAGE a elektroforetické gely byly analyzovány na fluorescenčním skeneru Typhoon Imager (530 nm /580 nm).

Elektroforetický pufr: 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0

Britton-Robinson pufr: *0,2 M kyselina boritá, 0,2 M kyselina octová, 0,2 M kyselina fosforečná (pH 3,5 - 10,0)*

3.3.10 Určení N-koncové aminokyselinové sekvence

Vzorky určené k analýze byly separovány pomocí SDS-PAGE (kap. 3.3.8, str. 45). Poté následoval přenos proteinů na PVDF membránu a proteiny byly barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue G250 (kap. 3.3.9, str. 45). Část membrány obsahující příslušný proteinový pás byla vyříznuta a analyzována automatickým Edmanovým odbouráváním N-koncových aminokyselin pomocí proteinového sekvenátoru ABI Procise 491. Analýzu provedl Ing. Z. Voburka na ÚOCHB AV ČR.

3.3.11 Biologické testy s termity

Do Petriho misek byly umístěny dvaceti členné skupiny dělníků *C. formosanus*. Substrátem byl buď vlhčený filtrační papír (zároveň i potrava) nebo vlhčený skleněný filtrační papír (u experimentu s hladovějícími termity). Ve vodě, kterou byl filtrační papír navlhčen, byly rozpuštěny testované chemikálie v množství uvedeném v tabulce 6. Experimenty byly založeny v pěti opakováních. Pokusy probíhaly při teplotě 27°C a stálé tmě.

Tab. 6: Koncentrace roztoků antibiotik a proteasových inhibitorů použitých v biologických testech s dělníky termita *C. formosanus*.

	Název	Finální koncentrace v aplikovaném roztoku
Antibiotika	carbenicilin	2,0 mg/ml
	metronidazol	0,1 mg/ml
	ampicilin	2,0 mg/ml
Proteasové inhibitory	Pefabloc	3,3 mg/ml
	bestatin	1,7 mg/ml

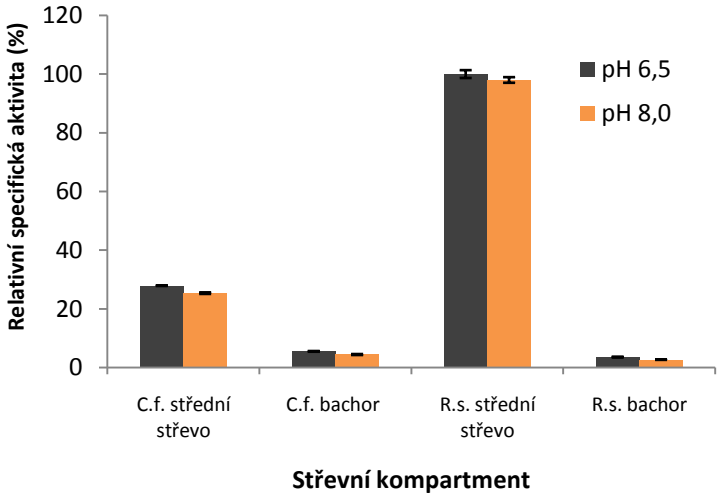
Experimenty byly ukončeny po 11 dnech. Výsledky byly vyhodnoceny jako úbytek váhy celé testované skupiny (20 termitů) vzhledem k váze před zahájením experimentu. Rozdíly mezi jednotlivými typy ošetření pak byly testovány s pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). V prvním kroku byl proveden Levenův test homogenity rozptylu, který testuje způsobilost rozložení dat pro použití v ANOVA. V dalším kroku pak byla provedena samotná

ANOVA a nakonec LSD ("least square difference") post-hoc srovnání průměrů s cílem zhodnotit vzájemné rozdíly mezi jednotlivými typy ošetření.

4 Výsledky

4.1 Celková proteolytická aktivita v trávicím traktu *R. santonensis* a *C. formosanus*

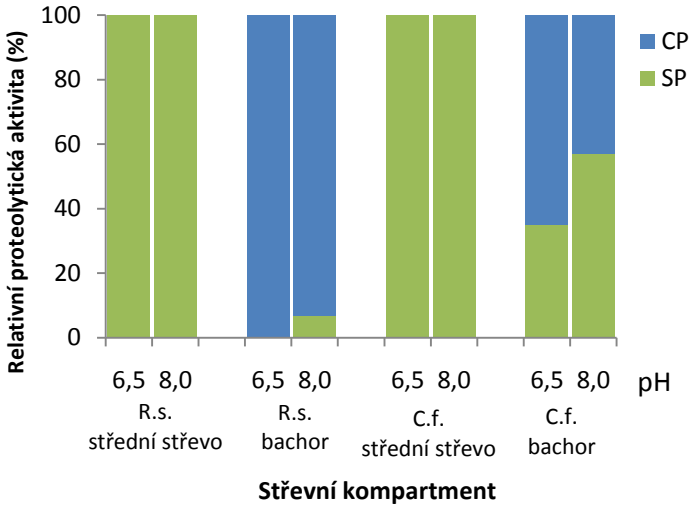
Celková proteolytická aktivita v trávicím traktu modelových druhů termitů byla analyzována pomocí aktivitního testu s proteinovým substrátem azokaseinem (metoda 3.3.4, str. 42). Aktivita byla testována při pH 6,5 a 8,0. Tato pH odpovídají nejvyšším hodnotám aktivity proteas v extraktech z celého střeva termitů analyzovaných v rámci bakalářské práce (74). Výsledky měření specifické proteolytické aktivity extraktů ze středního střeva a bachoru obou modelových druhů jsou uvedeny na obr. 20.



Obr. 20: Test proteolytické aktivity extraktů ze středního střeva a bachoru *R. santonensis* (R.s.) a *C. formosanus* (C.f.) s azokaseinem jako substrátem při pH 6,5 (černá) a 8,0 (oranžová). Maximální naměřená hodnota relativní specifické aktivity (1,992 U/mg) byla nastavena jako 100%. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku průměru.

Porovnání aktivity extraktů ze středního střeva a bachoru *R. santonensis* a *C. formosanus* ukazuje u obou druhů výrazně vyšší proteolytickou aktivitu v extraktech ze středního střeva oproti aktivitě v bachoru. Nejvyšších hodnot specifické aktivity dosahoval extrakt ze středního střeva *R. santonensis* a to pro obě zvolená pH. V porovnání s těmito nejvyššími hodnotami byla proteolytická aktivita ve středním střevě *C. formosanus* zhruba čtvrtinová. Aktivita proteas v bachoru obou druhů byla řádově nižší než nejvyšší naměřená hodnota.

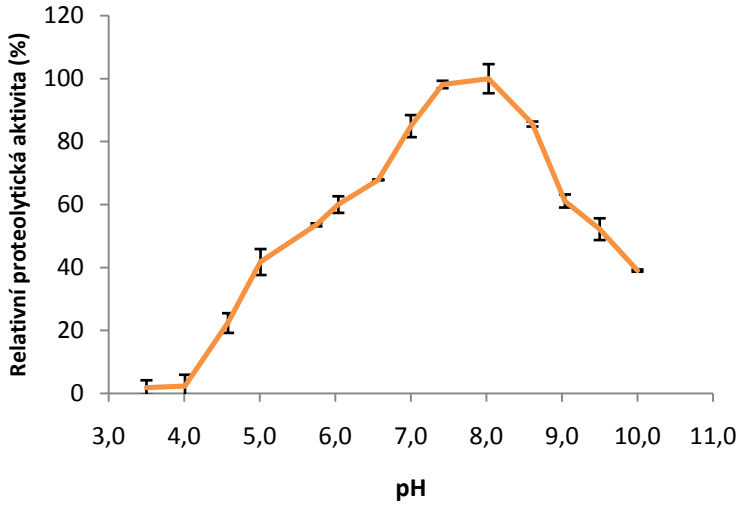
V další fázi byly extrakty ze středního střeva a bachoru termitů *R. santonensis* a *C. formosanus* analyzovány s proteinovým substrátem azokaseinem v přítomnosti specifických inhibitorů proteas BPTI a Pefabloc, inhibujících serinové proteasy, a E64, který inhibuje cysteinové proteasy. Tyto výsledky uvedené na obr. 21 umožňují určit relativní podíl serinových a cysteinových proteas na celkové proteolýze.



Obr. 21: Inhibice proteolytické aktivity extraktů ze středního střeva a bachoru *R. santonensis* (R.s.) a *C. formosanus* (C.f.). Použit byl aktivitní test s azokaseinem jako substrátem při pH 6,5 a 8,0. Modře je označena frakce proteolytické aktivity odpovídající cysteinovým proteasám (inhibovatelná specifickým inhibitorem E64). Zeleně je označena frakce proteolytické aktivity odpovídající serinovým proteasam (inhibovatelná kombinací specifických inhibitorů BPTI a Pefabloc).

U obou tesovaných modelových druhů termitů se na degradaci proteinového substrátu ve středním střevě podílejí pouze serinové proteasy, které byly v testu inhibovatelné specifickými inhibitory serinových proteas BPTI a Pefabloc (na obr. 21 znázorněné zelenou barvou). Naopak v bachoru obou druhů byla identifikována přítomnost cysteinových proteas (na obr. 21 znázorněné modrou barvou). Tyto proteasy inhibovatelné specifickým inhibitorem E64 byly nalezeny u obou druhů v bachoru spolu se serinovými proteasami, jejichž aktivita byla obecně méně výrazná. U druhu *R. santonensis* byl v extraktu z bachoru poměr cysteinových proteas vůči serinovým proteasam vyšší než u *C. formosanus*, a to u obou testovaných pH. Tyto výsledky naznačují, že střední střevo je vybaveno serinovými proteasami, které jej zřetelně odlišují od proteolytické výbavy cysteinovými proteasami v bachoru. Nelze vyloučit, že přítomnost serinových proteas v bachoru je způsobena kontaminací tohoto preparátu při pitvě vzhledem k tomu, že sousední kompartment středního střeva obsahuje řádově vyšší aktivity serinových proteas.

Dále byl testován vliv pH na proteolytickou aktivitu extraktu ze středního střeva *R. santonensis* s proteinovým substrátem azokaseinem (obr. 22). Tento modelový extrakt byl vybrán na základě nejvyšších naměřených hodnot (obr. 20, str. 48). Aktivita byla měřena v rozmezí pH 3,5 – 10,0.



Obr. 22: Vliv pH na proteolytickou aktivitu extraktu ze středního střeva *R. santonensis* s proteinovým substrátem azokaseinem. Naměřené hodnoty byly vztaženy k nejvyšší naměřené hodnotě (100%). Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku průměru.

Závislost aktivity extraktu ze středního střeva *R. santonensis* na pH dosahovala nejvyšších hodnot v rozmezí pH 7,0-8,5. Tento výsledek je v souladu s výskytem serinových proteas v tomto kompartmentu, které mají obecně pH optimum v neutrální až mírně alkalické oblasti.

4.2 Specifické proteolytické aktivity v kompartmentech trávicího traktu

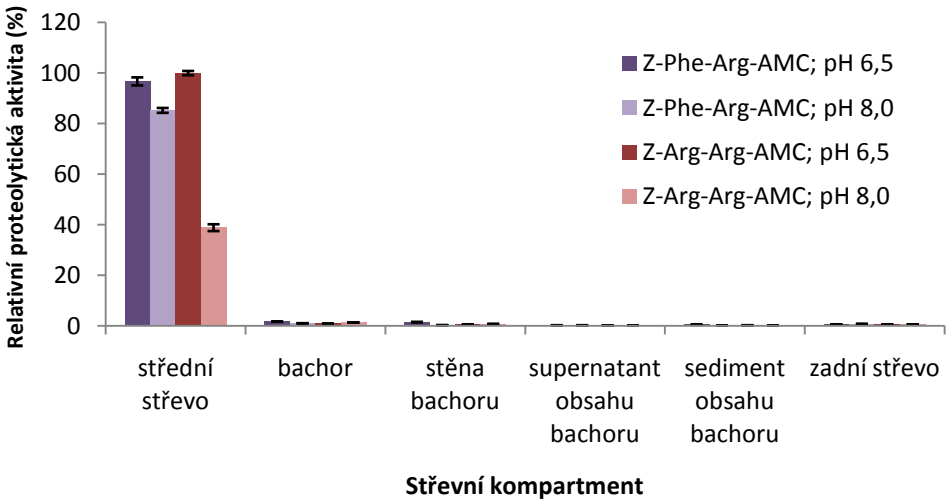
U modelových druhů termitů *R. santonensis* a *C. formosanus* byly analyzovány proteolytické aktivity v jednotlivých střevních kompartmentech s využitím specifických peptidových fluorogenních substrátů Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC a Leu-AMC. Výsledky bakalářské práce autorky (74) ukázaly, že s těmito substráty je možné měřit aktivitu serinových a cysteinových proteas (Z-Arg-Arg-AMC a Z-Phe-Arg-AMC) a leucinaminopeptidasy (Leu-AMC) přítomných v trávicím traktu modelových druhů termitů. Analyzovány byly tyto části trávicího traktu: střední střevo, bachor a zbytek zadního střeva bez bachoru. Dále byly testovány separované frakce bachoru – stěna, sediment a supernatant

obsahu bachoru; frakce supernatantu představuje obsah bachoru, který byl zbaven symbiotických prvoků, kteří byli centrifugací převedeni do frakce sedimentu.

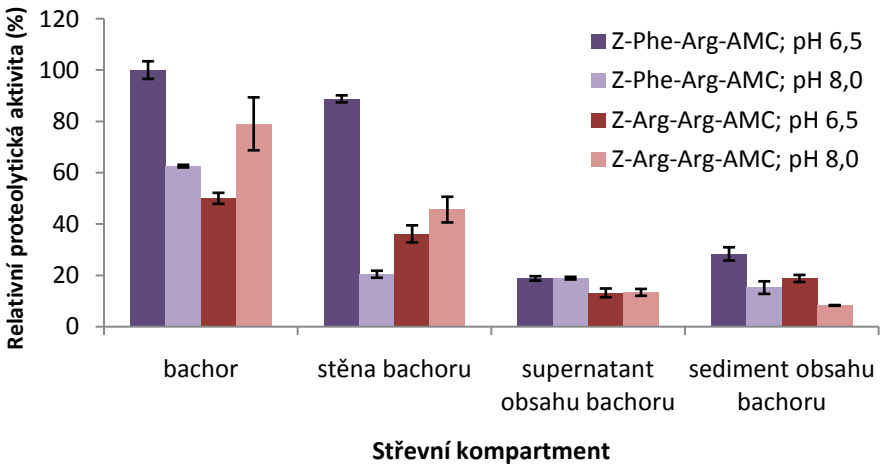
4.2.1 Proteolytické aktivity - *R. santonensis*

Na obr. 23. A je uvedena aktivita trávicích proteas v jednotlivých střevních kompartmentech *R. santonensis* a na obr. 23 B jsou detailně uvedeny aktivity proteas v jednotlivých frakcích bachoru. Aktivita extraktů byla analyzována při pH 6,5 a 8,0. Tato pH odpovídají nejvyšším hodnotám aktivity proteas ze střeva termita testovaných s těmito substráty v rámci bakalářské práce (74).

A)



B)



Obr. 23: Aktivita trávicích proteas *R. santonensis* v jednotlivých střevních kompartmentech (A) a v jednotlivých částech bachoru (B). Použité fluorogenní substráty a pH jsou uvedené v grafu. Hodnoty aktivity jsou vztaženy na extrakt z jednoho termita. Maximální naměřená hodnota aktivity byla nastavena jako 100%. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku průměru.

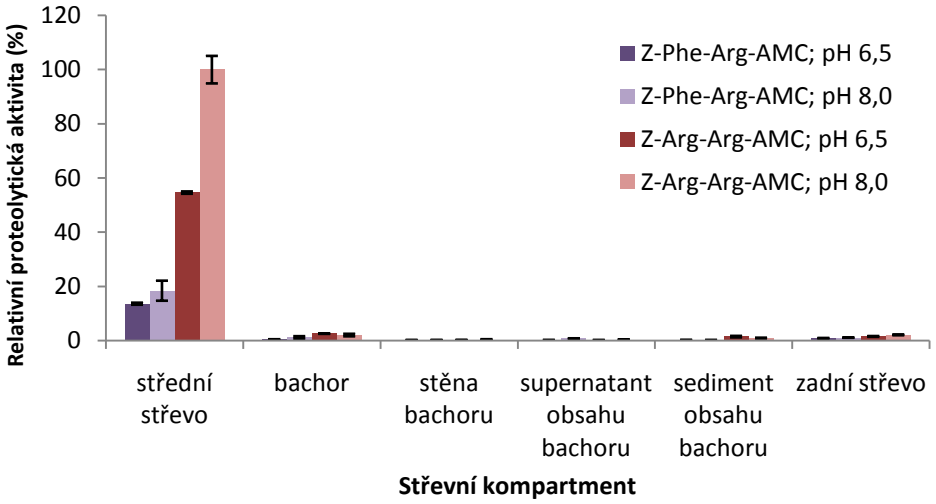
Z výsledků uvedených v obr. 23. A, str. 51 je patrné, že nejvyšší proteolytické aktivity jsou lokalizovány v kompartmentu středního střeva. Hodnoty naměřené pro tento kompartment přesahují ostatní analyzované kompartmenty o více než dva řády. Nejvyšší aktivita byla naměřena se substrátem Z-Arg-Arg-AMC a Z-Phe-Arg-AMC při pH 6,5. Proteolytická aktivita v ostatních analyzovaných kompartmentech je vzhledem k naměřeným hodnotám středního střeva minoritní.

Údaje získané z analýzy aktivity proteas v bachoru a jeho frakcích (obr. 23. B, str. 51) ukazují, že nejvyšší aktivita je spojená se stěnou bachoru. Hodnoty aktivity naměřené s analyzovanými substráty pro tuto frakci dosahují obecně více než 50% aktivity detekované v celém bachoru. Hodnoty aktivit pro supernatant a sediment obsahu bachoru jsou nižší než 25% aktivity detekované v celém bachoru. Celkově byla naměřena vyšší aktivita se substrátem Z-Phe-Arg-AMC a preferenční pH bylo pH 6,5.

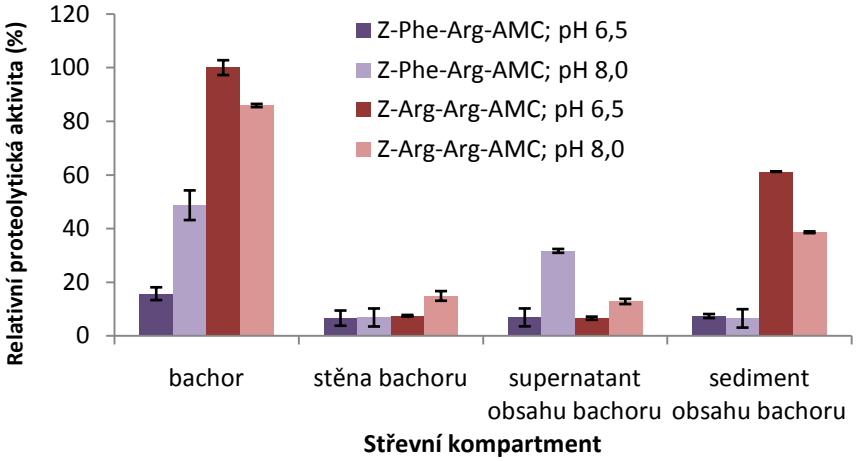
4.2.2 Proteolytické aktivity - *C. formosanus*

Na obr. 24. A, str. 53 je uvedena aktivita trávicích proteas v jednotlivých střevních kompartmentech *C. formosanus* a na obr. 24. B, str. 53 jsou detailně uvedeny aktivity proteas v jednotlivých frakcích bachoru. Aktivita extraktů byla analyzována při pH 6,5 a 8,0. Tato pH odpovídají nejvyšším hodnotám aktivity proteas ze střeva termita testovaných s těmito substráty v rámci bakalářské práce (74).

A)



B)



Obr. 24: Aktivita trávicích proteas *C. formosanus* v jednotlivých střevních kompartmentech (A) a v jednotlivých částech bachoru (B). Použité fluorogenní substráty a pH jsou uvedené v grafu. Hodnoty aktivity jsou vztaženy na extrakt z jednoho termita. Maximální naměřená hodnota aktivity byla nastavena jako 100%. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku průměru.

Stejně jako u *R. santonensis*, tak i v případě *C. formosanus* dosahuje nejvyšší proteolytické aktivity extrakt ze středního střeva (obr. 24. A), naměřené hodnoty s tímto extraktem několikanásobně převyšovaly ostatní testované kompartmenty. Nejvyšší aktivita byla naměřena se substrátem Z-Arg-Arg-AMC při pH 8,0. Proteolytická aktivita v ostatních analyzovaných kompartmentech je vzhledem k naměřeným hodnotám středního střeva minoritní.

Porovnáním proteolytických aktivit jednotlivých frakcí bachoru je patrný největší podíl extraktu sedimentu obsahu bachoru (obr. 24. B). Relativní aktivita s touto částí dosahovala se substrátem Z-Arg-Arg-AMC cca 60% aktivity detekované v celém bachoru. Hodnoty aktivit s tímto substrátem pro stěnu a supernatant obsahu bachoru jsou nižší než 25% aktivity detekované v celém bachoru. Celkově byla naměřena nižší aktivita se substrátem Z-

Phe-Arg-AMC, zajímavý je výraznější podíl této aktivity nalezený v extraktu supernatantu obsahu bachoru.

4.2.3 Přehled identifikovaných proteolytických aktivit

Tabulka 7 shrnuje experimentální data uvedená v předchozích dvou kapitolách a ukazuje zjištěné zastoupení proteas v extraktech jednotlivých střevních kompartmentů resp. frakcí u obou modelových druhů termitů.

Tab. 7.: Detekce aktivity proteas v jednotlivých částech trávicího traktu *R. santonensis* a *C. formosanus*. V aktivitním testu byly použity fluorogenní substráty specifické pro následující proteasy: cysteinové proteasy (CP) typu kathepsin B (KatB) a kathepsin L (KatL), serinové proteasy typu trypsinu (Try) a metaloproteasy (MP) typu leucinaminopeptidasy (LAP). Testy byly provedeny při pH 6,5[1]; 8,0[2] a 9,0[3]. Vysvětlivky: A = substrát je štěpen, N = substrát není štěpen, n.a. = nebylo analyzováno, protože aktivita s tímto substrátem a celostřevním extraktem nebyla detekována (74). Aktivity byly měřeny v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU/min). Experimentální podrobnosti měření aktivit jsou uvedeny v metodách (kap. 3.3.5, str. 43). Uvedená data byla převzata z grafů 4-6. Spodní panel ukazuje barevné kódování pro hodnoty naměřené aktivity.

Substrát		Z-Phe-Arg-AMC	Z-Arg-Arg-AMC	Leu-AMC
Cílová proteasa		KatB a KatL/ Try	KatB a KatL/ Try	LAP
Třída proteas		CP/SP	CP/SP	MP
Reticulitermes santonensis	střední střevo	A[1,2]	A[1,2]	A[1]
	bachor	A[1,2]	A[1,2]	n.a.
	stěna bachoru	A[1,2]	A[1,2]	n.a.
	supernatant obsahu bachoru	A[1,2]	A[1,2]	n.a.
	sediment obsahu bachoru	A[1,2]	A[1,2]	n.a.
	zadní střevo	A[1,2]	A[1,2]	n.a.
Coptotermes formosanus	střední střevo	A[1,2,3]	A[1,2,3]	A[1]
	bachor	A[2,3]	A[1,2,3]	A[1]
	stěna bachoru	A[3]	A[1,2,3]	A[1]
	supernatant obsahu bachoru	A[1,2,3]	A[1,2,3]	N
	sediment obsahu bachoru	A[1]	A[1,2,3]	N
	zadní střevo	A[1,2,3]	A[1,2,3]	A[1,2]

Aktivita (RFU/min)
0 – 10
$10 – 10^2$
$10^2 – 10^3$
$10^3 – 10^4$
$10^4 – 10^5$
$<10^5$

Výsledky ukazují přítomnost proteas štěpících substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Arg-Arg-AMC, které podle specifity těchto substrátů mohou odpovídat serinovým proteasám trypsinového typu nebo cysteinové proteasy kathepsinu B a kathepsinu L. Tato aktivita byla zjištěna ve všech testovaných kompartmentech s výrazně nejvyšším zastoupením ve středním střevě, jak pro *R. santonensis*, tak pro *C. formosanus*. V této části střeva dochází stejně jako u ostatních druhů hmyzu k hlavnímu trávení potravy.

U ostatních testovaných kompartmentů byly drobné rozdíly ve výsledcích mezi *R. santonensis* a *C. formosanus*. Pokud jde o bachor a jeho frakce, lze předpokládat, že tyto rozdíly v aktivitě jsou způsobeny symbiotickými organismy, které mají u obou druhů obecně různé zastoupení, pokud jde o druhy symbiontů a jejich konkrétní lokalizaci.

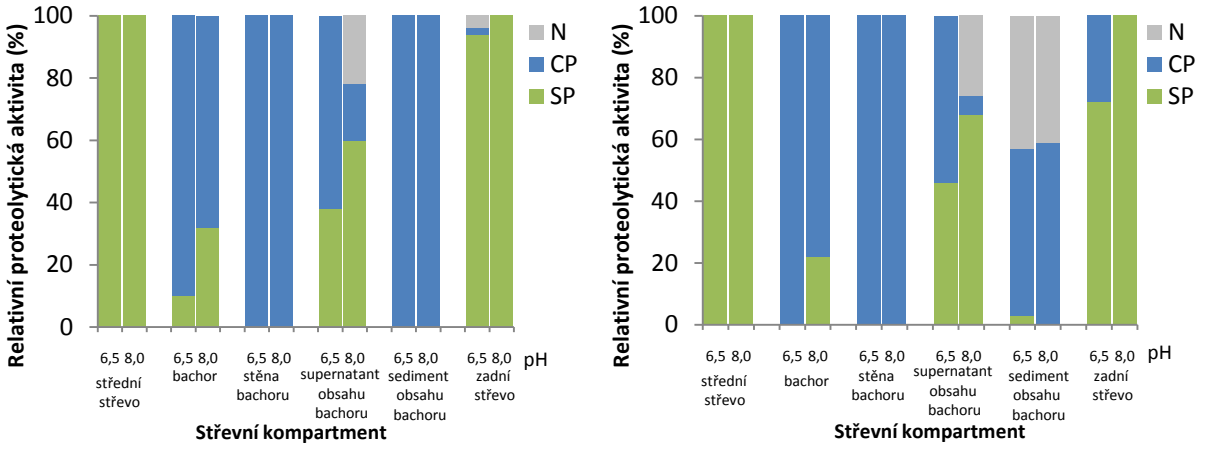
Dále byla v kompartmentech střeva měřena aktivita s fluorogenním substrátem Leu-AMC odpovídající leucinaminopeptidase; přítomnost tohoto enzymu byla prokázána ve střevě *C. formosanus* v bakalářské práci autorky (74). Nyní byla tato aktivita ve střevě detailně lokalizována. V rámci testovaných kompartmentů byla nejvyšší aktivita detekována v extraktu ze středního střeva obou studovaných druhů, ale výrazně vyšších hodnot (řádově) dosahoval u *C. formosanus*. Aktivita byla také potvrzena inhibiční reakcí v přítomnosti specifického inhibitoru leucinaminopeptidasy bestatinu. V porovnání se substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Arg-Arg-AMC byla specifická aktivita s Leu-AMC u *C. formosanus* zhruba o dva řády nižší.

4.3 Inhibiční specifita a klasifikace hlavních proteas v kompartmentech trávicího traktu

Úkolem této kapitoly bylo přiřadit konkrétním proteasam detekované proteolytické aktivity s fluorogenními s peptidovými substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Arg-Arg-AMC (kap. 4.2, str. 50). K tomuto účelu bylo využito inhibiční specifity, která byla testována pomocí specifických inhibitorů proteas, konkrétně inhibitorů serinových proteas BPTI a Pefabloc a cysteinových proteas E64. Tímto způsobem byly analyzovány extrakty ze středního střeva, bachoru, stěny bachoru, sedimetu a supernatantu obsahu bachoru, a zadního střeva.

4.3.1 Lokalizace proteas - *R. santonensis*

Extrakty střevních kompartmentů resp. frakcí byly testovány s peptidovými substráty Z-Phe-Arg-AMC a Z-Arg-Arg-AMC při pH 6,5 a 8,0 v přítomnosti specifických inhibitorů proteas. Výsledky jsou uvedeny ve formě podílových grafů, ketré ukazují relativní zastoupení cysteinových a serinových proteas podílejících se na celkové aktivitě (obr. 25).



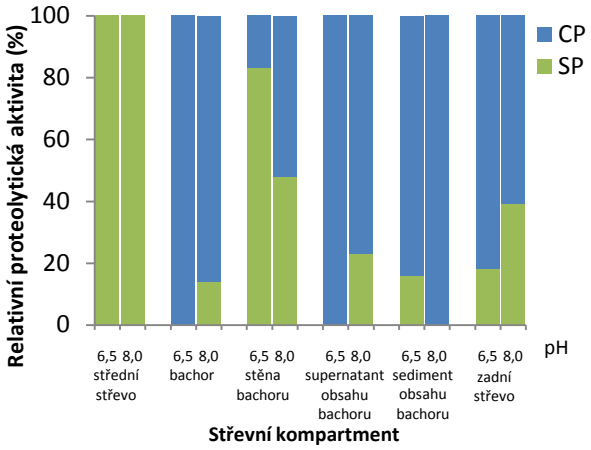
Obr. 25: Podílový graf proteolytických aktivit v trávicím traktu termitů *R. santonensis* se substrátem Z-Phe-Arg-AMC (A) a Z-Arg-Arg-AMC (B) při pH 6,5 a 8,0. Modře je označena frakce proteolytické aktivity odpovídající cysteinovým proteasám (inhibovatelná specifickým inhibitorem E64). Zeleně je označena frakce proteolytické aktivity odpovídající serinovým proteasám (inhibovatelná kombinací specifických inhibitorů BPTI a Pefabloc). Šedá označuje proteolytickou aktivitu necitlivou k výše uvedeným specifickým inhibitorům.

Výsledky pro substrát Z-Arg-Arg-AMC (obr. 25. A) jsou obecně podobné výsledkům se substrátem Z-Phe-Arg-AMC (obr. 25. B).

V extraktu ze středního střeva jsou přítomné pouze serinové proteasy. Naproti tomu v bachoru jsou přítomné především cysteinové proteasy a obsah serinových proteas je minoritní. Ve frakcích bachoru byla distribuce těchto dvou skupin proteas následující. Stěna bachoru obsahovala pouze cysteinové proteasy. Vysoký obsah cysteinových proteas byl dále v sedimentu obsahu bachoru, který obsahuje symbiotické prvoky. Ve frakci supernatantu obsahu bachoru byly přítomny oba dva typy proteolytických aktivit. V extraktu ze zadního střeva je vysoký obsah serinových proteas, cysteinové proteasy lze považovat za minoritní (nelze vyloučit, že jde o kontaminací sousedící tkání bachoru při pitvě).

4.3.2 Lokalizace proteas - *C. formosanus*

Extrakty střevních kompartmentů resp. frakcí byly testovány s peptidovým substrátem Z-Arg-Arg-AMC při pH 6,5 a 8,0 v přítomnosti specifických inhibitorů proteas. Výsledky jsou uvedeny ve formě podílových grafů, které ukazují relativní zastoupení cysteinových a serinových proteas podílejících se na celkové aktivitě (obr. 26).



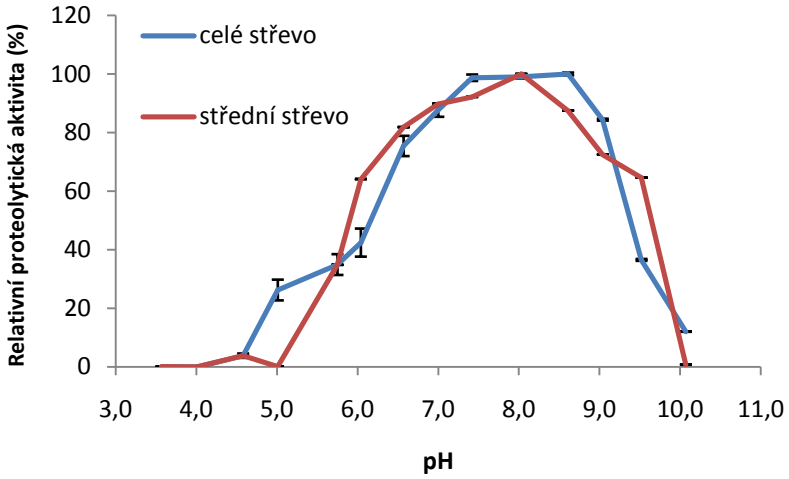
Obr. 26: Podílový graf proteolytických aktivit v trávicím traktu termitů *C. formosanus* se substrátem Z-Arg-Arg-AMC při pH 6,5 a 8,0. Modře je označena frakce proteolytické aktivity odpovídající cysteinovým proteasám (inhibovatelná specifickým inhibitorem E64). Zeleně je označena frakce proteolytické aktivity odpovídající serinovým proteasám (inhibovatelná kombinací specifických inhibitorů BPTI a Pefabloc). Šedá označuje proteolytickou aktivitu necitlivou k výše uvedeným specifickým inhibitorům.

U termita *C. formosanus* jsou v extraktu ze středního střeva přítomné pouze serinové proteasy. Naproti tomu v bachoru jsou přítomné především cysteinové proteasy a obsah serinových proteas je minoritní. Ve frakcích bachoru byla distribuce těchto dvou skupin proteas následující. Stěna bachoru obsahovala především serinové proteasy a obsah cysteinových proteas byl minoritní. Naopak ve frakci supernatantu a sedimentu obsahu bachoru byly přítomny hlavně cysteinové proteasy a serinové proteasy byly zastoupeny v menší míře. V extraktu ze zadního střeva je vysoký obsah cysteinových proteas, serinové proteasy lze považovat za minoritní (nelze vyloučit, že jde o kontaminací sousedící tkání bachoru při pitvě).

4.3.3 Klasifikace hlavních proteas a vliv pH na jejich aktivitu

V kapitole 4.2.1, str. 51 byla u termita *R. santonensis* identifikována výrazná aktivita serinové proteasy ve středním střevě a cysteinové proteasy v bachoru. V další fázi byly analyzovány tyto aktivity, pokud jde o jejich závislost na pH.

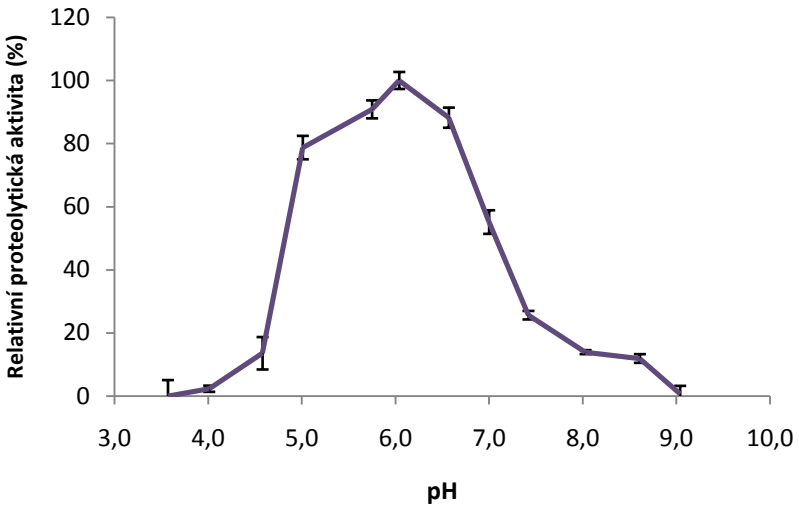
Obr. 27 ukazuje vliv pH na proteolytickou aktivitu extraktů ze středního střeva a celého střeva *R. santonensis* se specifickým substrátem Z-Arg-Arg-AMC v přítomnosti specifického inhibitoru cysteinových proteas E64, aby bylo eliminováno případné působení stop cysteinové proteasy. Analogickou závislost vlivu pH byla určena i se substrátem Z-Phe-Arg-AMC (data nejsou ukázána).



Obr. 27: Vliv pH na proteolytickou aktivitu v extraktech z *R. santonensis*: extrakt z celého střeva (zelená) a extrakt ze středního střeva (červená). Aktivita byla měřena s fluorogenním substrátem Z-Arg-Arg-AMC. Měření byla provedena v přítomnosti E64, specifického inhibitoru cysteinových proteas. Hodnoty byly vztaženy k nejvyšší naměřené hodnotě (100%) pro daný extrakt. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku průměru.

Oba testované extrakty měly pH optimum v mírně alkalické oblasti mezi pH 7,5 až 8,5. Z této analýzy vyplývá, že proteasa středního střeva je pravděpodobně zodpovědná i za celkovou aktivitu měřenou v extraktu z celého střeva. Identifikované pH optimum odpovídá bazickému pH optimu typickému pro serinové proteasy. Příslušnost analyzované aktivity k serinové proteasy byla prokázána kompletní inhibicí této aktivitu v pH optimu pomocí inhibitorů BPTI a Pefabloc.

Obr. 28, str. 59 ukazuje vliv pH na proteolytickou aktivitu extraktu z bachoru *R. santonensis* se specifickým substrátem Z-Arg-Arg-AMC v přítomnosti specifického inhibitoru serinových proteas BPTI a Pefabloc, aby bylo eliminováno působení minoritních serinových proteas. Analogická závislost vlivu pH byla určena i se substrátem Z-Phe-Arg-AMC (data nejsou ukázána).



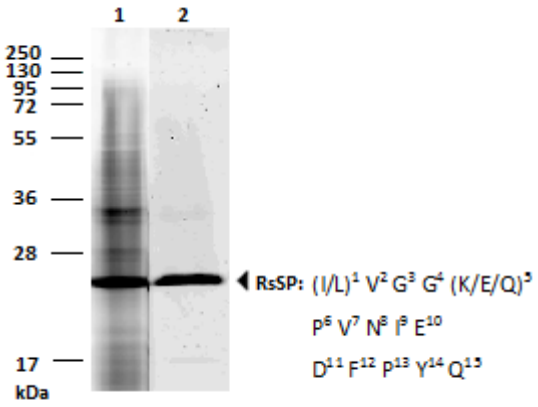
Obr. 28: Vliv pH na proteolytickou aktivitu v extraktech z bachoru *R. santonensis* se substrátem Z-Arg-Arg-AMC. Aktivita byla měřena s fluorogenním substrátem Z-Arg-Arg-AMC. Měření byla provedena v přítomnosti kombinace specifických inhibitorů serinových proteas BPTI a Pefabloc. Hodnoty byly vztaženy k nejvyšší naměřené hodnotě (100%) pro daný extrakt. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku průměru.

Analyzovaná proteasa extraktu z bachoru má pH optimum mezi pH 5,5 a 7,0. Identifikované pH optimum odpovídá mírně kyselému pH optimu typickému pro cysteinové proteasy. Příslušnost analyzované aktivity k cysteinové proteasy byla prokázána kompletní inhibicí této aktivity v pH optimu pomocí inhibitoru E64.

4.4 Hlavní trávicí serinová proteasa RsSP z *R. santonensis*

4.4.1 Izolace RsSP

Z analýzy s proteinovým substrátem azokaseinem a s peptidovými substráty se podařilo identifikovat hlavní trávicí proteasu modelového druhu *R. santonensis*. Jedná se o serinovou proteasu trypsinového typu, která byla pojmenována RsSP. Její izolace byla provedena pomocí afinitní chromatografie na agarosové koloně s imobilizovaným benzamidinem. Benzamidin je středně silný inhibitor serinových proteas, který se reverzibilně naváže do aktivního centra enzymu. K izolaci byl použit extrakt z 200 termitích dělníků a provedení afinitní chromatografie je popsáno v metodách (kap. 3.3.7, str. 44).



Obr. 29: Vizualizace serinových proteas typu trypsinu v extraktech z celého těla dělníků termita *R. santonensis* [1] a purifikované RsSP [2]. Použita byla syntetická aktivitní značka Try-BP, která obsahuje fluorescenční skupinu a kovalentně se váže do aktivního místa. Značené proteasy byly separovány na gelu SDS-PAGE a vizualizovány pomocí fluorescenčního skeneru. Šipka označuje pozici pásu RsSP, který byl použit pro určení uvedené N-koncové sekvence proteinovým sekvenováním. Uvedeny jsou molekulové hmotnosti standardů.

Na obr. 29 je vizualizace RsSP v celotělním extraktu použitém pro izolaci a finálního preparátu purifikované RsSP. Vizualizace byla provedena pomocí technologie aktivitního značení využívající proteomickou syntetickou značku Try-BP. Struktura této značky obsahuje inhibitor s kovalentně navázanou fluorescenční skupinou Bodipy-TMR (kap. 3.3.10, str. 46). Značka Try-BP je specifická pro serinové proteasy trypsinového typu. Značka byla inkubována s analyzovaným extraktem a purifikovaným enzymem a enzym značený kovalentně navázanou značkou byl vizualizován po separaci na SDS-PAGE pomocí fluorescenčního skeneru.

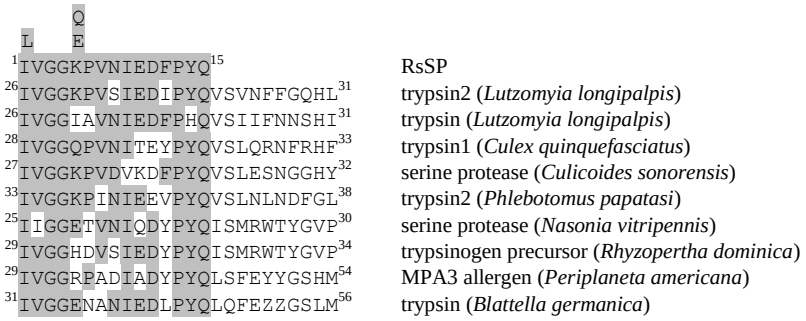
Z této proteomické analýzy s aktivitní značkou Try-BP lze vyvodit závěr, že vyizolovaná proteasa RsSP odpovídá hlavní protease trypsinového typu detekované v extraktu z celého těla dělníka *R. santonensis*. RsSP je protein s molekulovou hmotností cca 26 kDa.

Preparát izolované proteasy RsSP byl zbaven dialýzou kontaminace benzamidinem, který je součástí elučního pufru a představuje inhibitor trypsinových proteas (kap. 3.3.7, str. 44). Tento materiál byl testován na enzymovou aktivitu s peptidovými substráty Z-Arg-Arg-AMC a Z-Phe-Arg-AMC při pH 8,0. Byla zjištěna významná aktivita, která dokazuje, že RsSP byla izolována v enzymaticky aktivní formě.

4.4.2 N-koncová sekvence a homologie RsSP

Pro identifikaci izolované proteasy RsSP byla určená N-terminální sekvence pomocí automatického proteinového sekvenování z blotu (kap. 3.3.10, str. 46). Byla získaná sekvence 15 aminokyselin, z nichž polohy 1 a 5 obsahují heterogenitu, která může být způsobena přítomností isoenzymů RsSP v analyzovaném materiálu: $(I/L)^1$ V^2 G^3 G^4 $(K/E/Q)^5$ P^6 V^7 N^8 I^9 E^{10} D^{11} F^{12} P^{13} Y^{14} Q^{15}.

Pro nalezenou sekvenci byly vyhledány sekvence hmyzího původu s nejvyšší homologií pomocí programu Blast (76) v dostupných sekvenčních databázích (Swiss-Prot/TrEMBL, GenBank). S vybranými reprezentativními sekvencemi bylo připraveno porovnání těchto sekvencí ("alignment") se sekvencí RsSP pomocí programu ClustalW (77), které je na obrázku 30.



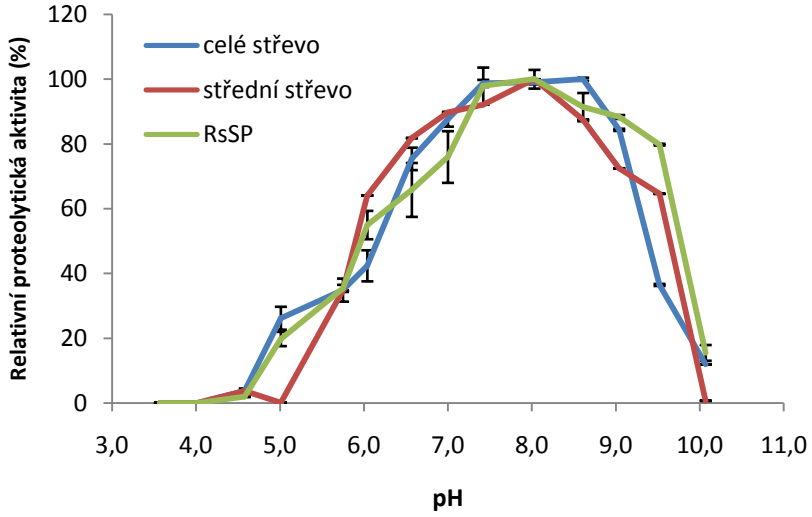
Obr. 30: Porovnání N-koncové proteinové sekvence RsSP s nejvíce homologickými serinovými proteasami hmyzu: *Lutzomyia longipalpis* (ABM26905 a ABV60300), *Culex quinquefasciatus* (XP_001866832), *Culicoides sonorensis* (AAV84264), *Phlebotomus papatasi* (ADJ57670), *Nasonia vitripennis* (NP_001166071), *Rhyzopertha dominica* (AAD31267), *Periplaneta americana* (AAX33734), *Blattella germanica* (AAZ78212). Sekvenční alignment byl sestaven pomocí programu ClustalW (77). Šedou barvou jsou zvýrazněny aminokyseliny, které se shodují se sekvencí RsSP. Alternativní aminokyseliny určené sekvenováním RsSp jsou uvedeny nad touto sekvencí. Indexy popisují číslování aminokyselin v analyzovaných sekvencích.

Tato analýza ukazuje významnou homologii mezi izolovanou RsSP a serinovými proteasami trypsinového typu u uvedených druhů hmyzu. U většiny z těchto homologických sekvencí databáze uvádí jejich trávicí funkci, což v souladu s předpokládanou funkcí RsSP v trávicím traktu termitů.

4.4.3 pH optimum aktivity RsSP

V další části práce byl analyzován vliv pH na aktivitu izolované RsSP a získaná závislost byla porovnána s analogickým měřením provedeným s extrakty z celého střeva a ze středního střeva. Aktivita byla měřena v rozmezí pH 3,5–10,0 se substrátem Z-Arg-Arg-

AMC. Tento substrát byl vybrán na základě silné aktivity nalezené v extraktu ze středního střeva *R. santonensis* (obr 23. A, str. 51). Výsledek analýzy je uveden na obr. 31.

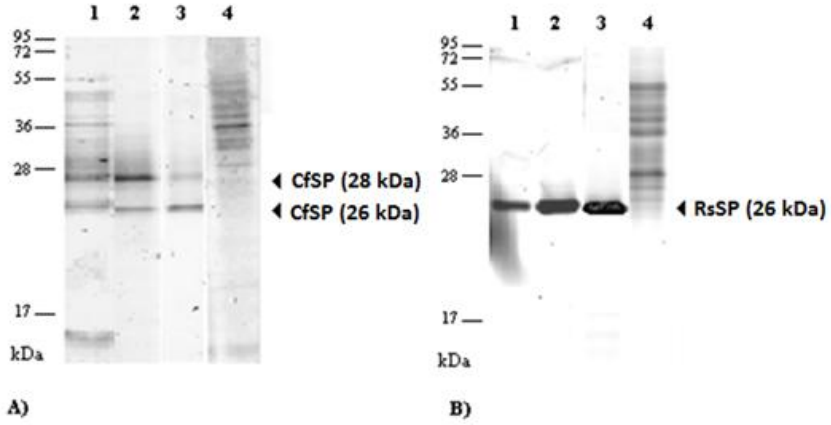


Obr. 31: Vliv pH na proteolytickou aktivitu extraktu *R. santonensis*: extrakt z celého střeva (modrá), extrakt ze středního střeva (červená) a izolované RsSP (zelená). Aktivita byla měřena s fluorogenním substrátem Z-Arg-Arg-AMC. Měření byla provedena v přítomnosti E64, specifického inhibitoru cysteinových proteas. Hodnoty byly vztaženy k nejvyšší naměřené hodnotě (100%) pro daný extrakt. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku průměru.

Z obr. 31 je patrné, že izolovaná serinová proteasa RsSP vykazuje analogickou závislost aktivity na pH jako je proteolytická aktivita extraktech z celého střeva a středního střeva. Tento výsledek naznačuje, že RsSP je hlavní trávicí proteasa v trávicím traktu dělníka *R. santonensis*. Nejvyšší aktivita této proteasy je v rozmezí pH 7,0 až 9,0. Tento výsledek odpovídá pH optimu typickému pro většinu serinových proteas.

4.5 Vizualizace trávicích serinových proteas pomocí syntetické aktivitní značky

Přítomnost serinových proteas typu trypsinu v extraktech z *R. santonensis* a *C. formosanus* byla určena pomocí technologie aktivitního značení se specifickou fluorescenční značkou Try-BP. Analyzovány byly extrakty z celého těla, celého střeva, středního střeva a bachoru (kap. 3.3.10, str. 46). Extrakty byly separovány pomocí SDS-PAGE a elektroforetický gel byl vizualizován pomocí fluorescenčního skeneru. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 32, str. 63.

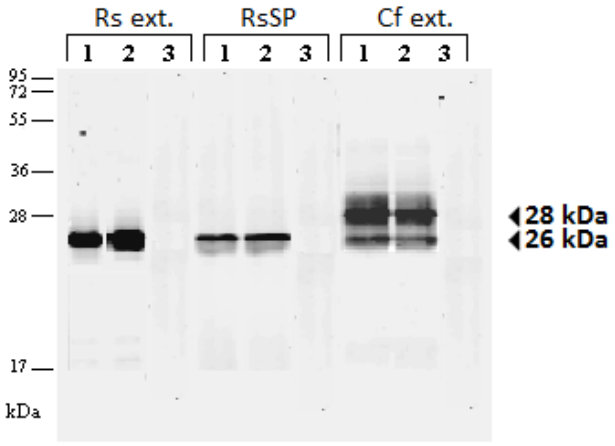


Obr. 32.: Vizualizace serinových proteas typu trypsinu v extraktech z *C. formosanus* (A) a *R. santonensis* (B) pomocí syntetické aktivitní značky Try-BP, která obsahuje fluorescenční skupinu a kovalentně se váže do aktivního místa. Při pH 6,5 byla Try-BP inkubována s extrakty z následujících tkání: celé tělo [1], celé střevo [2], střední střevo [3] a bachor [4]. Značené proteasy byly separovány na gelu SDS-PAGE a vizualizovány pomocí fluorescenčního skeneru. Pozice značených proteas a jejich molekulová hmotnost jsou vyznačeny šipkami. Uvedeny jsou molekulové hmotnosti standardů.

V extraktech odvozených z celého těla, celého střeva a středního střeva *R. santonensis* byl identifikován jeden pás o molekulové hmotnosti cca 26 kDa, který svou pozicí odpovídá protease RsSP izolované z celého těla (kap. 4.4.1, str. 59). Tento výsledek prokazuje, že vyizolovaná proteasa RsSP odpovídá hlavní serinové proteasy přítomné ve střevě, konkrétně ve středním střevě, kde je aktivita této proteasy nejvyšší (obr 23. A, str. 51). V extraktu z tkáně bachoru tato proteasa nebyla prokázána ve významném množství.

V extraktech odvozených z celého těla, celého střeva a středního střeva *C. formosanus* byly identifikovány dva pásy o molekulové hmotnosti cca 26 a 28 kDa. Lze předpokládat, že pás 26 kDa odpovídá analogickému pásu u *R. santonensis*. Pás 28 kDa může být jiný isoenzym trypsinové proteasy nebo jiná isoforma isoenzymu 26 kDa, která je specificky přítomná v *C. formosanus*. Podobně jako u *R. santonensis* nebyla v extraktu z tkáně bachoru *C. formosanus* vizualizována významná trypsinová proteasa s molekulovou hmotností typickou pro tento typ enzymu (24 - 30 kDa).

V další fázi bylo vzájemné porovnání proteas označených afinitní fluorescenční značky Try-BP v extraktech z *R. santonensis* (Rs), *C. formosanus* (Cf) a RsSP. Analýza je uvedená v drahách označených 1 a zároveň slouží jako kontrolní měření pro druhou část experimentu, ve které byla analyzována schopnost inhibovat proteolytickou aktivitu pomocí specifických inhibitorů cysteinových (inhibitor E64, dráhy označené 2) a serinových proteas (inhibitor BPTI a Pefabloc, dráhy označené 3).

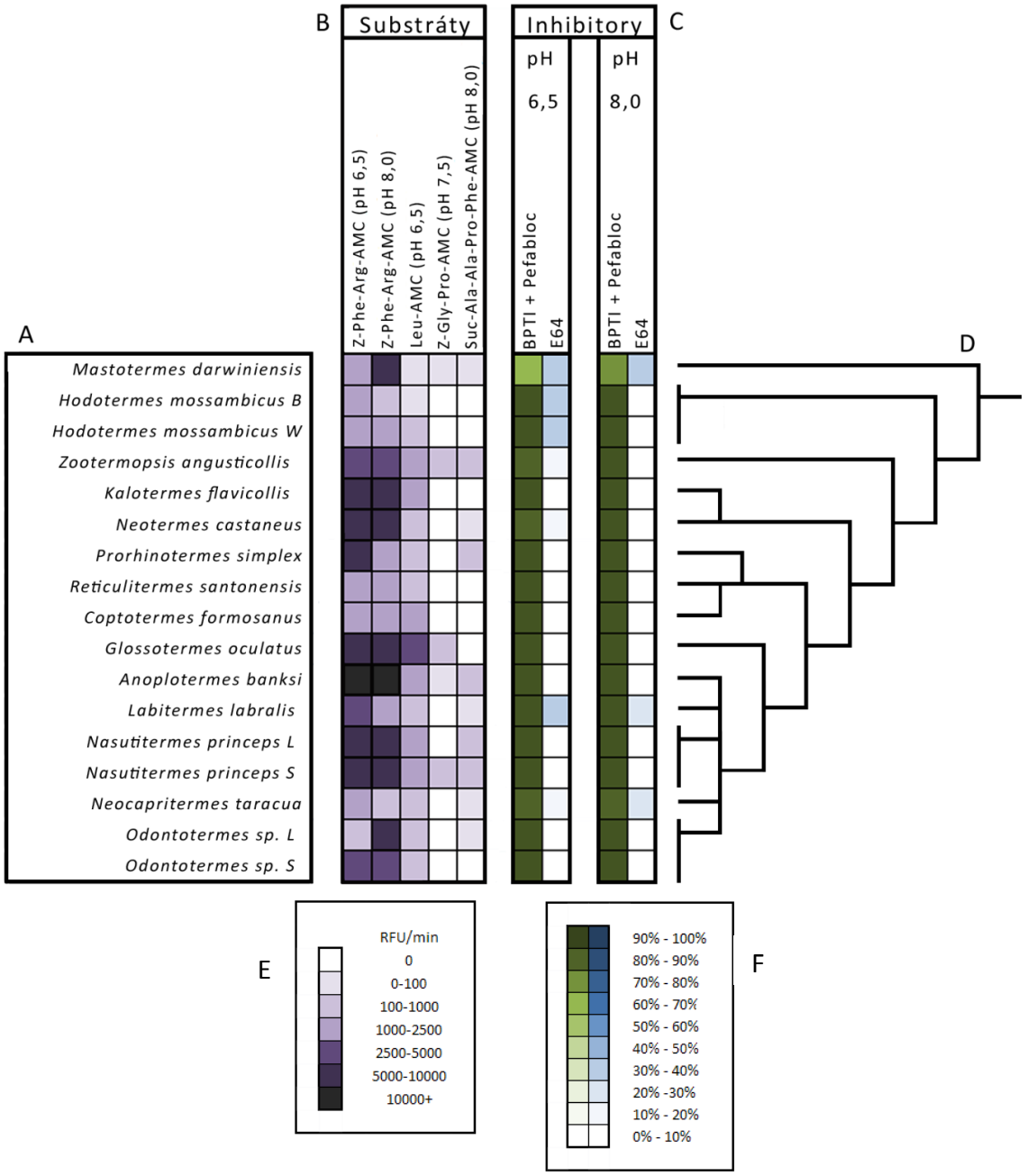


Obr. 33.: Vizualizace serinových proteas typu trypsinu v extraktech ze středního střeva *R. santonensis* a *C. formosanus* a izolované RsSP pomocí aktivitní fluorescenční značky Try-BP při pH 6,5. Značení pomocí Try-BP bylo provedeno v přítomnosti specifických proteasových inhibitorů: E64 inhibující cysteinové proteasy [2], BPTI a Pefabloc inhibující serinové proteasy [3]. Kontrolní značení bylo provedeno bez inhibitoru [1]. Značené extrakty byly separovány na SDS-PAGE a vizualizovány pomocí fluorescenčního skeneru. Použité materiály: Rs ext.- extrakt ze středního střeva *R. santonensis*; RsSP - izolovaná trypsinová proteasa z *R. santonensis*; Cf ext.- extrakt ze středního střeva *C. formosanus.* Vyznačeny jsou molekulové hmotnosti standardů. Šipkami jsou vyznačeny pozice pásů hlavních serinových proteas.

Na obr. 33 je analýza inhibiční specifity proteas detekovaných aktivitní fluorescenční značkou Try-BP. Testována byla kompetice vazby Try-BP a specifických inhibitorů proteas E64 (inhibitor cysteinových proteas), BPTI a Pefabloc (inhibitory serinových proteas). Výsledek ukazuje, že inhibitory serinových proteas specificky blokují vazbu Try-BP, což podává přímý důkaz, že proteasy 26 kDa a 28 kDa patří do třídy serinových proteas.

4.6 Srovnání proteolytického trávicího systému mezi termity řádu Isoptera

U vybraných zástupců termitích čeledí řádu Isoptera byla analyzována distribuce trávicích proteas v extraktech z celého střeva. Testované substráty byly: 1. Z-Phe-Arg-AMC při pH 6,5 a 8,0 pro serinovou proteasu trypsin a cysteinové proteasy kathepsiny B a L, 2. Leu-AMC při pH 6,5 pro leucinaminopeptidasu (metaloproteasa), 3. Z-Gly-Pro-AMC při pH 7,5 pro prolylendopeptidasu (serinová proteasa), 4. Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC při pH 8,0 pro chymotrypsin (serinová proteasa). Pro substrát Z-Phe-Arg-AMC byla dále měřena inhibice této aktivity pomocí selektivních proteasových inhibitorů: pro serinové proteasy (BPTI a Pefabloc) nebo cysteinové proteasy (E64). Souhrn výsledků je zobrazen na obr. 34, str. 65.



Obr. 34.: Analýza distribuce trávicích proteas u příslušníků reprezentativních termitích druhů řádu Isoptera. Panel A uvádí testované druhy termitů a panel D jejich fylogenetickou příbuznost. Panel B obsahuje výsledky z měření proteolytické aktivity se čtyřmi specifickými fluorogenními peptidovými substráty. Tyto hodnoty aktivity (RFU/min) jsou barevně kódovány, jak je uvedeno v panelu E. Panel C obsahuje výsledky z měření proteolytické aktivity se substrátem Z-Phe-Arg-AMC v přítomnosti proteasových inhibitorů specifických pro serinové proteasy (BPTI a Pefabloc) nebo cysteinové proteasy (E64). Hodnoty jsou vyjádřeny relativně v procentech jako míra inhibice aktivity proti kontrolnímu měření bez použití inhibitoru. Tyto hodnoty jsou barevně kódovány, jak je uvedeno v panelu F. Použité zkratky týkající se označování typů dělníků: B - černý dělník; W - bílý dělník; L - velký dělník; S - malý dělník.

Panel B ukazuje, že u všech testovaných substrátů byla pro všechny druhy termitů identifikována nejvyšší proteolytická aktivita se substrátem Z-Phe-Arg-AMC. Proteolytická aktivita se substrátem Leu-AMC byla nalezena u všech testovaných druhů a byla výrazně nižší oproti aktivitě se Z-Phe-Arg-AMC. U méně než poloviny analyzovaných extraktů byly identifikovány velmi nízké aktivity i se dvěma zbývajícími testovanými substráty Z-Gly-Pro-AMC a Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC.

Panel C ukazuje analýzu distribuce trypsinových a cysteinových proteas, které se podílejí na štěpení hlavního substrátu Z-Phe-Arg-AMC. U všech testovaných druhů byly jako majoritní střevní proteasy identifikovány trypsinové proteasy; cysteinové proteasy byly detekovány u méně jak čtvrtiny testovaných extraktů a vykazovaly ve srovnání se serinovými proteasami výrazně nižší aktivity. Jediným druhem, který vybočoval z výše popsaného trendu, byl *Mastotermes darwiniensis*, který vykazoval nižší podíl serinových proteas vůči cysteinovým. Jedná se o fylogeneticky nejstaršího termita, spíše podobného švábům.

Testování různých typů dělníků v rámci jednoho druhu (obr 34. panel A, str. 65) neukázalo významné rozdíly v měřených parametrech proteolytických aktivit. Z analýzy vzplývá, že různé typy dělníků, které mají rozdílné pracovní funkce v rámci kolonie, využívají analogické schéma trávicí proteolýzy.

4.7 Vliv inhibice proteas na metabolismus *C. formosanus*

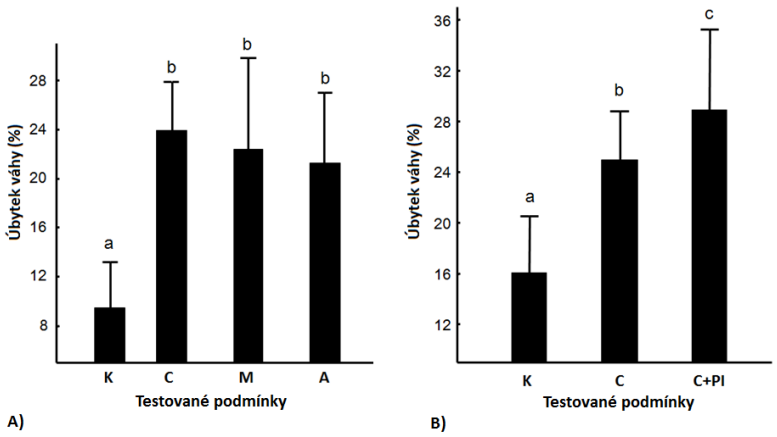
Cílem této kapitoly bylo testovat vliv inhibice hlavních střevních proteas produkovaných termitem na celkový metabolismus. Jako hlavní střevní proteasa byla identifikována trypsinová proteasa středního střeva (kap. 4.3.2, str. 57). Proto byl pro *in vivo* testy použit netoxický inhibitor serinových proteas Pefabloc. Byl kombinován s proteasovým inhibitorem bestatinem, který blokuje leucin aminopeptidasu, která byla také identifikována ve střevních tkáních termitů (kap. 4.2.3, str. 54) a která se pravděpodobně podílí na proteolýze fragmentů produkovaných serinovou proteasou.

Po počátečních optimalizačních testech byl jako vhodný kandidát pro biologické testy vybrán *C. formosanus*; termiti *R. santonensis* testům nevyhovovali, neboť nebyli schopni přežívat ve stresových podmínkách. Úvodní testy dále ukázaly, že termiti, kteří mají standardní přísun potravy založené na celulose, nejsou ovlivňováni uvedenými proteasovými

inhibitory. Proto byly připraveny dva typy testů s proteasovými inhibitory, při kterých byli použiti termiti s omezeným příjmem potravy a to dvěma způsoby: a) s potlačenou střevní mikroflórou symbiontů, b) s hladovějícími termity.

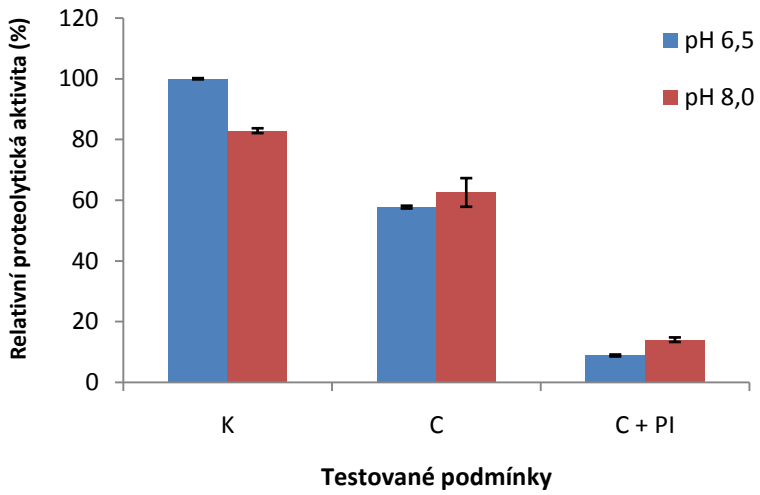
4.7.1 Experimenty s termity s potlačenou střevní mikroflórou

V prvním experimentu byl analyzován vliv antibiotik na metabolismus termitů, který byl monitorován jako váhové úbytky (obr. 35. A). Testována byla tato tři antibiotika - carbenicilin (potlačuje gramnegativní bakterie), metronidazol (potlačuje anaerobní bakterie a prvoky) a ampicilin (potlačuje grampozitivní bakterie). U všech použitých antibiotik byl vidět zvýšený váhový úbytek oproti kontrole, který byl nejvýraznější u carbenicilinu (obr. 35. A). V druhém experimentu byl testován carbenicilin v kombinaci s proteasovými inhibitory. Obr. 35. B ukazuje, že přídatné působení proteasových inhibitorů způsobuje statisticky významný nárůst váhových úbytků ve srovnání s kontrolním experimentem (samotný carbenicilin).



Obr. 35: Vliv antibiotik a proteasových inhibitorů na váhu dělníků termita *C. formosanus*. Testované molekuly byly aplikovány v potravě termitům po dobu 11 dnů a poté byl měřen úbytek jejich relativní váhy (%). A) Srovnání kontrolních termitů (K) a termitů ošetřených antibiotiky: C - carbenicilin, M - metronidazole, A – ampicilin. B) Srovnání kontrolních termitů (K), termitů ošetřených carbenicilinem (C) a kombinací carbenicilinu s inhibitorů bestatin a Pefabloc (C+PI). Experimentální hodnoty označené stejnými písmeny v daném grafu (a - c) nejsou statisticky odlišné (α = 0.05).

Z termitů použitých v experimentu uvedeném na obr. 35. B byly připraveny extrakty z celého střeva a byla měřena proteolytická aktivita. Výsledek analýzy na obr. 36, str. 67 ukazuje, že aplikované proteasové inhibitory výrazně (více než 5x) snížili proteolytickou aktivitu střeva, což prokázalo účinnost testovaných inhibitorů na proteasy střeva.

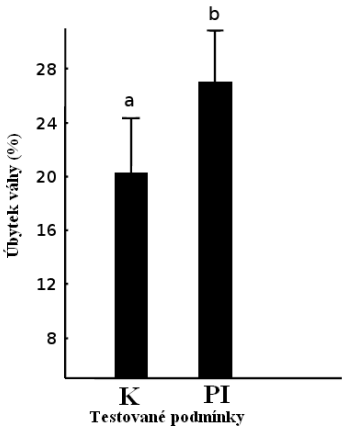


Obr. 36: Analýza proteolytické aktivity v extraktech z celého střeva dělníků termitů *C. formosanus* z experimentu popsaným na obr. 35. Srovnání kontrolních termitů (K), termitů ošetřených carbenicilinem (C) a kombinací carbenicilinu s proteasovými inhibitory bestatin a Pefabloc (C+PI). Aktivita byla měřena se substrátem Z-Arg-Arg-AMC při pH 6,5 a 8,0. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku průměru.

4.7.2 Experiment s termity s redukovaným příjmem potravy

V experimentu byl analyzován vliv proteasových inhibitorů na termity, jejichž metabolismus byl redukován absencí přirozené celulosové potravy. Místo celulosového filtračního papíru, který je dobrým zdrojem potravy termitů (viz předchozí kapitola), byl použit skleněný filtrační papír, který termiti v omezené míře konzumovali spolu s roztokem inhibitorů.

Z obr. 37, str. 69 je patrné, že při použití proteasových inhibitorů termiti ztráceli statisticky významně svou tělesnou hmotnost rychleji oproti kontrole provedené za analogických podmínek, ale bez použití proteasových inhibitorů.



Obr. 37: Vliv proteasových inhibitorů na váhu dělníků termita *C. formosanus*. Testované inhibitory (bestatin a Pefabloc) byly aplikovány hladovějícím termitům ve formě roztoku k sání. Po 11 dnech byl měřen úbytek jejich relativní váhy (%). Srovnání kontrolních termitů (K) a termitů ošetřených inhibitory (PI). Experimentální hodnoty jsou statisticky odlišné ($\alpha = 0.05$).

5 Diskuze

Výhradním potravním zdrojem termitů jsou materiály rostlinného původu, především celulosa, hemicelulosy a lignin, a proto byl o trávení těchto substrátů intenzivně studováno. Byly identifikovány jednak endogenní celulolytické enzymy termita a jednak celulasy ze symbiotických organismů, které hrají při finální degradaci celulosy klíčovou roli (75). Narozdíl od celulolytického trávení nebylo dosud u termitů studováno trávení proteolytické. Vzhledem k tomu, že potrava termitů živících se dřevem je velmi chudá na dusík, jsou v metabolismu termita využíváni někteří střevní symbionti, kteří fixují dusík (42). Dostupná literatura předpokládá, že termiti jsou rovněž schopni využívat symbiotickou mikroflóru jako zdroj proteinů pro vlastní trávicí proteolýzu (58).

Obecným cílem této diplomové práce bylo identifikovat hlavní proteasy v trávicím traktu modelových druhů termitů a určit jejich distribuci v hlavních střevních kompartmentech. Jako modelové druhy byli vybráni termiti *Reticulitermes santonensis* a *Coptotermes formosanus*, jakožto ekonomicky významní škůdci z čeledi Rhinotermitidae. Pomocí panelu specifických substrátů a inhibitorů byly kvantifikovány a klasifikovány proteasy v jednotlivých střevních kompartmentech. Tato analýza přinesla dva hlavní výsledky: [1] Za většinu proteolytické aktivity v trávicím traktu je zodpovědná serinová proteasa trypsinového typu, která byla lokalizovaná ve středním střevě a jejíž pH optimum je v mírně alkalické oblasti (pH 7,5-9,0); toto pH optimum vyhovuje hodnotě pH (8,5-10,0) ve středním střevě termitů čeledi Rhinotermitidae (21). Vzhledem k tomu, že ve středním střevě nejsou přítomni symbionti, lze předpokládat, že je endogenně produkovaná touto tkání termita. [2] V bachoru byla identifikována minoritní cysteinová proteasa, s pH optimem v kyselé až neutrální oblasti (pH 5,5-7,0); uvedené pH optimum je v souladu s hodnotou pH (cca 6,5) v bachoru termitů čeledi Rhinotermitidae (21). Tato cysteinová proteasa je pravděpodobně produkovaná symbiotickými organismy, protože její aktivitu bylo možné detekovat ve frakci symbiotických prvoků připravené z obsahu bachoru (frakce „sediment“). Mezi oběma studovanými druhy termitů byly zjištěny také rozdíly v distribuci této proteasy, pokud jde o její aktivitu ve stěně bachoru: u *C. formosanus* byla minoritní a naopak u *R. santonensis* byla tato aktivita vysoká. Tento výsledek koreluje s literárními údaji o lokalizaci symbiontů u těchto druhů. Symbiotičtí prvoci termita *C. formosanus* patří do taxonu Parabasalia a žijí volně v bachoru. Naproti tomu symbiotičtí prvoci *R. santonensis* patří

taxonu Parabasalia, ale také Oxymonadida, kde například rod *Pyrsonympha* je přichycen na stěnu bachoru (41).

Na základě výše uvedených výsledků je navrženo následující hypotetické schéma průběhu trávení proteinů ve střevě termita. Je známo, že mezi bachorem a středním střevem probíhá transport oběma směry (5). Může tedy dojít k následující kompartmentaci proteolytického trávení: [1] Části symbiontů přechází z bachoru do středního střeva, kde jsou degradováni trypsinovou proteasou. [2] Obsah středního střeva s trypsinovou proteasou přechází do bachoru, kde působí na dostupné proteiny pocházející ze symbiontů (včetně např. uhynulých); s tímto mechanismem je v souladu i nález parciální aktivity trypsinové proteasy v obsahu bachoru. Hlavní střevní trypsinová proteasa patří mezi serinové endopeptidasy, takže fragmentuje proteinové substráty na oligopeptidy. Tyto fragmenty jsou pravděpodobně dále degradovány až na aminokyseliny působením leucinaminopeptidasy (exopeptidasy z třídy metaloproteas). Aktivita tohoto enzymu byla detekována ve vysoké hladině ve středním střevě, ale také ve stěně bachoru.

Hlavní trypsinová proteasa z dělníka termita *R. santonensis* (označená jako RsSP) byla chromatograficky izolována a určená N-koncová AMK sekvence prokázala její příbuznost s trypsinovými proteasami hmyzu včetně proteas se známou trávicí funkcí. Trypsinové proteasy byly identifikovány např. ve středním střevě některých druhů motýlů (Lepidoptera) (76), blanokřídlých (Hymenoptera), dvoukřídlých (Diptera) nebo brouků (Coleoptera) (64). Serinové proteasy byly také detekovány u švábů, taxonomicky nejbližších příbuzných termitů. Nicméně u švábů je celkové schéma trávení výrazně odlišné od termitů (ve střevě např. není vytvořen bachor) a nalezená distribuce proteas je pestřejší než u termitů: zahrnuje kromě trypsinu, také chymotrypsin a tzv. „SH-dependentní“ proteasu (78).

Na základě analýzy proteolytické aktivity se dvěma modelovými druhy *R. santonensis* a *C. formosanus* byl navržen systematický test s proteasovými substráty a inhibitory, ve kterém byly identifikovány hlavní proteolytické aktivity přítomné ve střevě dalších 12 druhů termitů napříč celým řádem Isoptera. Unikátní sada těchto druhů pokrývá 6 ze 7 tradičních čeledí termitů, tj. všechny kromě čeledi Serritermitidae tvořené 2 vzácnými druhy jihoamerických termitů. Rovněž nejvíce diversifikovana skupina termitů, čeleď Termitidae zahrnující zhruba 90% známých druhů termitů (5), byla v tomto vzorku zastoupena 5 ze 7

podčeledí. Výsledky ukazují, že testované druhy mají podobnou distribuci proteas, pokud jde o jejich typy a kvantitu. Jediným druhem s výraznější odlišností byl *Mastotermes darwiniensis*, který vykazoval nižší podíl serinových proteas vůči cysteinovým. Tento druh je evolučně nejblíže příbuzný švábům. Tato analýza naznačuje, že schéma trávicí proteolýzy navržené v této diplomové práci je pravděpodobně obecně platné pro celý řád Isoptera.

6 Závěr

Cílem diplomové práce bylo identifikovat proteolytické enzymy v trávicím traktu termitů. Jako modelové druhy byli vybráni termiti *Reticulitermes santonensis* a *Coptotermes formosanus* z čeledi Rhinotermitidae, kteří jsou ekonomicky velmi významní škůdci.

1. V jednotlivých kompartmentech střeva termita byla měřena proteolytická aktivita pomocí obecného proteinového substrátu a specifických peptidových substrátů. Hlavní proteolytická aktivita byla lokalizovaná ve středním střevě.

2. Analýzou inhibiční specifity s využitím selektivních inhibitorů byla určena distribuce proteas ve střevních kompartmentech. Ve středním střevě byly identifikovány endogenní serinové proteasy trypsinového typu a v bachoru cysteinové proteasy, které mohou pocházet ze symbiotických organismů.

3. Pomocí afinitní chromatografie byla izolována trávicí trypsinová proteasa středního střeva termita *R. santonensis* (RsSP) o molekulové váze 26 kDa. Byla určena její N-koncová sekvence, která prokázala homologii s hmyzími trávicími serinovými proteasami.

4. Na základě analýzy proteas u vybraných 14 druhů termitů bylo navrženo schéma proteolytického trávení založené na endogenních trypsinových proteasach, které je společné pro celý řád Isoptera.

5. Fyziologická významnost trávicí trypsinové proteasy byla prokázána v testech *in vivo* s termitem *C. formosanus* se selektivními proteasovými inhibitory přijatými s potravou.

7 Citovaná literatura

1. **Inward D. J., Beccaloni G., Eggleton P.:** Death of an order a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches; *Biol. Lett.* 3; 331-335 (2007)

2. **Grimaldi D., Engel M.S.:** *Evolution of the Insects;* Cambridge: Cambridge University Press (2005)

3. **Macek J.:** *Bezobratlí 2 (Hmyz)*; Praha: Svět zvířat, Albatros (2001)

4. www.chem.unep.ch/pops/termites/termitech2.html [Online] 6. 8. 2011

5. **Kambhampati S., Eggleton P.:** *Taxonomy and phylogeny of termites*; In: **Abe Y., Bignell D.E., Higashi T.:** *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers (2000)

6. http://tolweb.org/tree/ [Online] 30. 10. 2008

7. http://www.biolib.cz/ [Online] 29. 10. 2008

8. **Su N.-Y., Scheffrahn R. H.:** *Formosan Subterranean Termite, Coptotermes formosanus Shiraki*; University of Florida, USA (2008)

9. http://chppm-www.apgea.army.mil/documents/FACT/18-035-0606Formosansubterranean termite.pdf. [Online] 30. 10. 2008

10. **Yates III. J. R., Tamashiro M.:** *The Formosan Subterranean Termite in Hawai; College of Tropical Agriculture and Human Resources*; University of Hawaii at Manoa (1999)

11. **Obenberger J.:** *Ze života všekazů*; Praha: Vyšehrad, (1949)

12. **Cornelius M. L., Osbrink W. L. A.:** Interspecific interactions between Coptotermes formosanus and Reticulitermes flavipes (Isoptera: Rhinotermitidae) in laboratory bioassays; *J. Insect Behav.* 13, 757-770 (2000)

13. **Austin J. W. et al.:** Genetic evidence for the synonymy of two Reticulitermes species Reticulitermes flavipes (Kollar) and Reticulitermes santonensis (Feytaud); *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98; 395–401 (2005)

14. **Hamilton W. D.:** The genetical evoluion of social behaviour, I., II.; *J. Theor. Biol.* 7, 1-52, (1964)

15. http://www.chem.unep.ch/pops/pdf/termrpt/termiterpt.pdf [Online] 10. 5. 2009

16. **Buchli H.:** L'origine des castes et les potentialités ontogénetiques des termites européens du genre Reticulitermes Holmgren; *Ann. Sci. Nat. Zool. Biol. Anim.* 20; 263–429, (1958)

17. **Hanzák J., Moucha J., Zahradník J.:** *Světem zvířat, V. díl II. část Bezobratlí*; Praha: Albatros, (1979)

18. http://animals.howstuffworks.com/insects/termite2.html [Online] 12. 4. 2011

19. **Cleveland L. R., et al.:** The wood-feeding roach Cryptocercus, its Protozoa, and the symbiosis between Protozoa and roach; *Mem. Am. Acad. Arts Sci.* 17, 185-342, (1934)

20. **Kordík D.:** *Fyziologie hmyzu – učební texty*; Entomologický ústav AV ČR a Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, (2004)

21. **Krishna K., Weesner F. M.:** *Biology of termites vol. 1.*; USA: Academic Press Inc., (1969)

22. biomikro.vscht.cz/documents/biochemie_mikroorganismu/pdf/Anaerob_resp.pdf [Online] 30. 10. 2008

23. **Breznak J. A., Brune A.:** Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites; *Annu. Rev. Entomol.* 39: 453–487, (1994)

24. **Bignell D. E., Eggleton P.:** On the elevated intestinal pH of higher termites (Isoptera: Termitidae); *Ins. Soc.* 42: 57-69, (1995)

25. **Goodenough S., Goodenough S.:** Who needs cellulase? *J. Biol. Educ.* 27, 97–102, (1993)

26. **Kukor J. J., Martin M. M.:** Acquisition of digestive enzymes by siricid wood- wasps from their fungal symbiont; *Science* 220, 1161-116, (1983)

27. **Martin M. M., Jones C. G., Bernays E. A.:** The evolution of cellulose digestion in insects; *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 333, 281- 288, (1991)

28. **Klepzig K. D. et al.:** Symbioses: A key driver of insect physiological processes, ecological interactions, evolutionary diversification, and impacts on human; *Environ. Entomol.* 38, 67 – 77, (2009)

29. **Martin M. M.:** Minireview: Cellulose digestion in insects; *Comp. Biochem. Physiol.* 75A, 313 – 324, (1983)

30. http://www.britannica.com/EBchecked/topic/647253/wood/216132/Structure-and-composition [Online] 12. 1. 2011

31. http://cs.wikipedia.org/wiki/Celulóza [Online] 8. 2. 2011

32. http://www.abcbodybuilding.com/magazine03/fiberdynamics1_files/image001 [Online] 11. 4. 2011

33. http://leccos.com/index.php/clanky/celulosa [Online] 8. 2. 2011

34. **Voet D., Voet J. G.:** *Biochemie.* Praha: Victoria Publishing, (1995)

35. **Fan T. J., Medioni G., Nevatia R.:** Recognizing 3D objects using surface descriptions; IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence 11,1140-1157, (1989)

36. **Bhat M.K., Hazlewood G.P.:** Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanase; M.R., Partridge, G.G. Bedford; *Enzymes in farm animal nutrition;* CABI International, (2001)

37. http://en.wikipedia.org/wiki/Hemicellulose [Online] 12. 1. 2011

38. **Khandeparker R., Numan M. T.:** Bifunctional xylanases and their potential use in biotechnology; *J. Microbilo. Biotech.* 35, 635–644, (2008)

39. http://www.biologie.uni-hamburg.de/bonline/library/newton/Chy251_253/Lectures/BiopolymersI/BiopolymersI.html [Online] 8. 2. 2011

40. http://en.wikipedia.org/wiki/Lignin [Online] 12. 1. 2011

41. **Čepička I., Hampl V., Kulda J.:** Critical Taxonomic Revision of Parabasalids with Description of one New Genus and three New Species; *Protist.* 161,400–433, (2010)

42. **Ohkuma M., Noda S., Kudo T.:** Phylogenetic Diversity of Nitrogen Fixation Genes in the Symbiotic Microbial Community in the Gut of Diverse Termites; *Appl. Envir. Microbiol.* 65, 4926-4934, (1999)

43. **Youssef M.A.:** *Modeling nitrogen transport and transformations in high water table soils*; North Carolina State University, Raleigh, NC.: Ph.D. dissertation, (2003)

44. **Breznak J. A.:** Phylogenetic Diversity and Physiology of Termite Gut Spirochetes; *Integr. Comp. Biol.* 42, 313-318, (2002)

45. **Cowling E. B., Merril W.l.:** Nitrogen in wood and its role in wood deterioration; *Can. J. of Bot.* 44: 1539-1554, (1966)

46. **Potrikus C. J., Breznak J. A.:** Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites: A strategy for nutrient conservation; *Proc. Natl Acad. Sci.; USA.* 78, 4601 - 4605, (1981)

47. **Rawlings N. D., Alan J.:** Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases; *Methods in Enzymology* 244, 19-61, (1994)

48. **Ohkuma M.:** Metabiolic Symbiosis between Termite Gut Protists and Their Intracellular Bacteria; *Noda Institute for Scientific Research, 35-36,* (2006)

49. **Warnecke F. et al.:** Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite; *Nature* 450: 256-565, (2008)

50. http://www.jgi.doe.gov/education/bioenergy/bioenergy_4.html [Online] 10. 3. 2011

51. **Varma A. et al.:** Lignocellulose degradation by microorganisms from termite hills and termite guts; *Microbiol. Rev.* 15: 9-28, (1994)

52. **Konig H. et al.:** Diversity and microhabitats of the hindgut flora of termites; *Res. Microbiol.* 6: 125-156, (2002)

53. **Wantanabe H., Noda, H., Tokuda, G., Lo, N.:** A cellulase gene of termite origin; *Nature* 394: 330-331, (1998)

54. **Nakashima K., Watanabe H., Azuma J.-I.:** Cellulase genes from the parabasalian symbiont Pseudotrichonympha grassii in the hindgut of the wood-feeding termite Coptotermes formosanus; *Cell. and Mol. Life Sci.* 59, 1554-1560, (2002)

55. **Yokoe Y.:** Cellulase activity in termite, Leucotermes speratus, with new evidence in support of a cellulase produced by the termite itself; *Sci. Paper Coll. Gen. Educ,. University Tokyo* 14: 115-120, (1964)

56. **Yamaoka J., Nagatani Y.:** Cellulose digestion in the termite, Reticulitermes speratus (Kolbe). I. Producing sites and physiological significance of two kinds of cellulase in the worker. *Zool. Mag.* 84: 23-29, (1975)

57. **Ohkuma M.:** Symbioses of flagellates and prokaryotes in the gut of lower termites; *Trends Microbiol.* 16, 345-52, (2008)

58. **Fujita A., Shimizu I., Abe T.:** Distribution of lysozyme and protease, and amino acid concentration in the guts of a wood-feeding termite, Reticulitermes speratus (Kolbe): Possible digestion of symbiont bacteria transferred by trophallaxis; *Physiol. Entomol.* 26; 116–123, (2001)

59. **Page M. J., Di Cera E.:** Review Serine peptidases: Classificaton, structure and function; *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1220-1236, (2008)

60. http://merops.sanger.ac.uk/ [Online] 29. 10. 2008

61. **Turk B.:** Targeting proteases: successes, failures and future prospects; *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 785-799, (2008)

62. **Applebaum S. W.:** Biochemistry of digestion; *Comprehen. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol.* 4, 279 – 312, (1985)

63. **Terra W. R., Ferreira C.:** Insect digestive enzymes: Properties, comparmentalization and function; *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 1 – 62, (1994)

64. **Hraška M., Rakouský S., Čurn V.:** Inhibitory proteas, mechanismy účinku a perspektivy jejich využití v transgenozi; *Chem. Listy.* 100, 5001-507, (2006)

65. www.pdb.org [Online] 12. 5. 2011

66. **Blow D. M., Birktoft J. J., Hartley B. S.:** Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin; *Nature* 221, 337-340, (1969)

67. **Hartley B. S., Kilbey B. A.:** The reaction of p-nitrophenyl esters with chymotrypsin and insulin; *Biochem. J.* 56: 288-297, (1954)

68. **Berndt K. D., Guntert P., Orbons L. P. M., Wüthrich K.:** Determination of a high-quality nuclear magnetic resonance solution structure of the bovine pancreatic trypsini nhibitor and comparison with three crystal structures; *J. Mol. Biol.* 227, 757, (1992)

69. **Schmer G.:** The purification of bovine thrombin by affinity chromatography on benzamidine-agarose; *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 353: 810-814, (1972)

70. **Davies G. E., Martin B. M.:** A latent Mr 94,000 gelatin-degrading metalloprotease induced during differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells: A member of the collagenase family of enzymes; *Cancer Res.* 50, 1113-1120, (1990)

71. **Claverie-Martin F., Vega-Hernàndez M. C.:** Aspartic Proteases Used in Cheese Making; J. MacCabe, A. P. Polaina; *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*, (2007)

72. **Laemmli U. K.:** Cleavege of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685, (1970)

73. **Blakesley R. W., Boezy J. A.:** A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 82, 580-582, (1977)

74. **Čermáková M.:** *Trávicí proteasy termitů R. santonensis a C. formosanus*; PřFUK, Bakalářská práce (2008)

75. **Slaytor M.:** Cellulose digestion in termites and cockroach: What role do symbionts play? *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 775-784, (1992)

76. **Dow J. A. T.:** Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.* 46, 633-635, (1984)

77. **Elpidina E. N. et al.:** Compartmentalization of proteinases and amylases in Nauphoeta cinerea midgut. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 48: 206-216, (2001)

.