

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biochemie



Bc. Lenka Přenosilová

**Biodegradace 17α -ethinylestradiolu
enzymy ligninolytických hub**

**Biodegradation of 17α -ethinylestradiol by
enzymes of ligninolytic fungi**

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Školitel specialista: Mgr. Kateřina Svobodová, PhD.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a Mgr. Kateřiny Svobodové, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 20. dubna 2012

.....

Bc. Lenka Přenosilová

Práce vznikla s podporou na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace RVO: 61388971 a grantu GAČR P503/10/0408.

Poděkování:

Poděkování patří především vedoucí této práce Prof. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. za umožnění vykonání práce v Mikrobiologickém ústavu AV ČR, v.v.i., a tedy i za seznámení s jiným odborným pracovištěm a nové zkušenosti v laboratorním prostředí. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Svobodové, PhD. za všestrannou pomoc při vypracovávání této práce, kvalitní vedení, trpělivost a přátelské jednání. Nakonec patří poděkování rodině, která mě podporovala během celého studia.

Abstract

This work is aimed at the study of the effect of 17 α -ethinylestradiol (EE2) on the production and characteristics of ligninolytic enzymes (laccase, Mn-dependent peroxidase and lignin peroxidase) in *I. lacteus*, *T. versicolor*, *P. chrysosporium* and *P. ostreatus* cultures grown on two types of liquid media.

Enzyme activity production in fungal cultures was affected by the composition of culture medium. In the case of *P. chrysosporium*, the addition of EE2 to the complex-medium cultures led to a MnP activity stimulation and simultaneously LiP production was partially repressed in these cultures. In the mineral MM medium, no effect of EE2 on enzyme production by *P. chrysosporium* was observed. In EE2 treated MM cultures of *P. ostreatus* lower MnP activities were found when compared to biotic controls. In the case of *T. versicolor* cultures, the addition of EE2 to the complex medium caused laccase and LiP stimulation in the cultures. In the MM medium, however, only laccase production was affected by EE2. *I. lacteus* MnP production was partially repressed by EE2 in MM medium. In contrast to that, significantly higher MnP activities were detected in complex-medium *I. lacteus* cultures after the treatment with EE2.

Further EE2 degradation by the fungal cultures was studied. The highest degradation efficiency was observed in *I. lacteus* and *T. versicolor* cultures that were able to remove 10 mg/l of EE2 within 3 days of incubation. Degradation experiments *in vitro* showed that laccase (*T.versicolor*) and MnP (*I. lacteus*) activity present in culture supernatant and fungal mycelium played the key roles in EE2 degradation by the fungi.

Compared to biotic controls, a higher amount of MnP transcripts was detected in *I. lacteus* cultures degrading EE2 7 to 12 days after the addition of EE2. The addition of EE2 to *T. versicolor* cultures led to an increase in the transcription level of a specific laccase encoding gene on day 2 of the cultivation. In addition to that, pI profiles of *I. lacteus* MnP and *T. versicolor* laccase underwent changes during the culture cultivation. The results of this work suggest that more than one regulation mechanism takes place in ligninolytic enzyme production by white rot fungi. (*The work is written in Czech*)

Key words: 17 α -ethinylestradiol, ligninolytic fungi, laccase, Mn-dependent peroxidase, gene expression, quantitative real-time PCR

Abstrakt

V této práci byl studován vliv 17 α -ethinylestradiolu (EE2) na produkci a vlastnosti ligninolytických enzymů, lakasy (Lac), Mn-dependentní peroxidasy (MnP) a lignin peroxidasy (LiP), u houbových kultur *I. lacteus*, *T. versicolor*, *P. chrysosporium* a *P. ostreatus* kultivovaných v minerálním (MM) a komplexním mediu.

Efekt EE2 na enzymové aktivity v houbových kulturách byl ovlivněn složením kultivačního media. V případě *P. chrysosporium* byla po přidání EE2 stimulována v komplexním mediu aktivita MnP a zároveň negativně ovlivněna aktivita LiP. V mediu MM tento jev pozorován nebyl. V kulturách MM *P. ostreatus* byla po přidání EE2 zjištěna nižší hladina aktivity MnP ve srovnání s biologickými kontrolami. U houby *T. versicolor* pěstované na komplexním mediu byl pozorován stimulační efekt EE2 na nárůst aktivity Lac a LiP. V případě media MM měl EE2 výrazný vliv pouze na aktivitu Lac. V případě kultur *I. lacteus* pěstovaných v mediu MM byl pozorován mírný inhibiční efekt EE2 na enzymovou aktivitu MnP. Za použití komplexního media byl naopak po přidání EE2 zjištěn významný nárůst aktivity MnP oproti kontrolám.

Studium degradace EE2 *in vivo* a *in vitro* v kulturách MM hub prokázalo, že nejefektivnější degradace EE2 probíhala v kulturách *I. lacteus* a *T. versicolor*, které byly schopny odstranit EE2 během prvních tří dnů kultivace. Degradace EE2 těmito kulturami byla spojena s enzymy obsaženými v supernatantech a myceliu kultur. V případě *T. versicolor* hrála v degradaci hlavní roli pravděpodobně Lac a u *I. lacteus* pak MnP.

Kvantifikace transkriptů genů pro MnP u kultur *I. lacteus* a pro Lac u kultur *T. versicolor* ukázala zvýšenou hladinu mRNA MnP v kulturách *I. lacteus* stimulovaných EE2 (7. až 12. den kultivace). Přidání EE2 ke kulturám *T. versicolor* vedlo 2. den kultivace k výraznému zvýšení transkripce jednoho specifického genu *lac*. Vedle změn úrovně transkripce docházelo v houbových kulturách v průběhu kultivace i ke změnám profilu pI Lac *T. versicolor* a MnP *I. lacteus*. Enzymové aktivity hub jsou tedy pravděpodobně regulovány více mechanismy než jen na úrovni transkripce genů.

Klíčová slova: 17 α -ethinylestradiol, ligninolytické houby, lakasa, Mn-dependentní peroxidasa, exprese genů, kvantitativní real-time PCR

Obsah

| | |
|---|-----------|
| Seznam použitých zkratk | 9 |
| 1. Úvod | 11 |
| 2. Cíle práce | 12 |
| 3. Přehled literatury | 13 |
| 3.1 Endokrinní disruptory | 13 |
| 3.1.1 Negativní účinky endokrinních disruptorů (ED) | 13 |
| 3.1.2 17 α -ethinylestradiol (EE2) | 13 |
| 3.2 Houby bílé hniloby (ligninolytické houby) | 15 |
| 3.3 Enzymy ligninolytických hub | 16 |
| 3.3.1 Ligninperoxidasa | 16 |
| 3.3.2 Mangan-dependentní peroxidasa | 17 |
| 3.3.3 Versatilní peroxidasa | 18 |
| 3.3.4 Lakasa | 18 |
| 3.3.5 Ostatní enzymy související s degradací ligninu | 19 |
| 3.3.6 Geny kódující ligninolytické enzymy | 19 |
| 3.3.6.1 Geny kódující ligninolytické peroxidasy | 19 |
| 3.3.6.2 Geny kódující lakasu (<i>Lac</i>) | 21 |
| 3.4 Biodegradační potenciál ligninolytických hub a jejich enzymů | 23 |
| 3.4.1 Biodegradace muničního odpadu | 23 |
| 3.4.2 Biodegradace polychlorovaných bifenylnů | 24 |
| 3.4.3 Biodegradace polycyklických aromatických uhlovodíků | 24 |
| 3.4.4 Biodegradace syntetických barviv | 25 |
| 3.4.5. Biodegradace EE2 | 26 |
| 3.5 Působení organopolutantů na expresi enzymů ligninolytických hub | 29 |
| 4. Materiál a metody | 33 |
| 4.1 Organismy | 33 |
| 4.2 Chemikálie | 33 |
| 4.3 Přístroje | 34 |
| 4.4 Sterilizace | 35 |
| 4.5 Kultivační media | 35 |
| 4.5.1 Medium s limitovaným (nízkým) obsahem dusíkatých látek- MM | 35 |

| | |
|--|----|
| 4.5.2 Glukosové medium „Malt extract“ - MEG | 36 |
| 4.6 Pufry | 36 |
| 4.6.1 TAE pufr | 36 |
| 4.6.2 TE pufr | 37 |
| 4.6.3 dcH ₂ O | 37 |
| 4.6.4 10x MOPS pufr | 37 |
| 4.6.5 Tris pufr | 37 |
| 4.7 Kultivace houbových kultur v tekutém mediu | 37 |
| 4.8 Stanovení enzymových aktivit | 38 |
| 4.8.1 Enzymové aktivity v supernatantech houbových kultur | 38 |
| 4.8.1.1 <i>Lakasa</i> | 39 |
| 4.8.1.2 <i>Mn-dependentní peroxidasa</i> | 40 |
| 4.8.1.3 <i>Ligninperoxidasa</i> | 40 |
| 4.8.2 Enzymy obsažené v myceliu oxidující ABTS | 41 |
| 4.9 Stanovení suché hmotnosti houbové biomasy | 42 |
| 4.10 Inkubace EE2 s extracelulárními enzymy a myceliem testovaných hub <i>in vitro</i> | 42 |
| 4.11 Kvantitativní stanovení koncentrace EE2 | 43 |
| 4.12 Izoelektrická fokusace IEF | 44 |
| 4.13 Izolace genomické DNA z houbového mycelia | 45 |
| 4.14 Stanovení koncentrace DNA | 45 |
| 4.15 Řetězová polymerasová reakce (PCR) užitá pro detekci genů | 46 |
| 4.15.1 PCR genu <i>lac</i> v gDNA <i>T. versicolor</i> | 46 |
| 4.15.2 PCR genu <i>mnp</i> v gDNA <i>I. lacteus</i> | 47 |
| 4.16 Agarosová elektroforéza genů lakasy a Mn-dependentní peroxidasy | 48 |
| 4.16.1 Agarosová elektroforéza DNA izolované z testovaných hub | 48 |
| 4.16.2 Agarosová elektroforéza RNA izolované z testovaných hub | 49 |
| 4.17 Extrakce DNA z agarosového gelu | 50 |
| 4.18 Izolace celkové RNA z houbového mycelia | 50 |
| 4.19 Reverzní transkripce RNA izolovaných z testovaných hub | 51 |
| 4.20 Kvantitativní PCR genů <i>lac</i> <i>T. versicolor</i> a <i>mnp</i> <i>I. lacteus</i> | 52 |
| 4.20.1 Kvantitativní PCR genu <i>lac</i> houby <i>T. versicolor</i> | 52 |
| 4.20.2 Kvantitativní PCR genu <i>mnp</i> houby <i>I. lacteus</i> | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 4.21 Statistické zpracování | 55 |
| 5. Výsledky | 56 |
| 5.1 Sledování enzymových aktivit v houbových kulturách | 56 |
| 5.1.1 Kultivace houbových kultur v mediu MEG | 56 |
| 5.1.2 Kultivace houbových kultur v mediu MM | 60 |
| 5.2 Degradace 17 α -ethinylestradiolu houbovými kulturami | 65 |
| 5.2.1 Degradace EE2 houbovými kulturami <i>in vivo</i> | 65 |
| 5.2.2 Degradace EE2 houbovými kulturami <i>in vitro</i> | 66 |
| 5.3 Exprese genů lakas <i>T. versicolor</i> a Mn-dependentních peroxidas <i>I. lacteus</i> | 69 |
| 5.3.1 Exprese genů lakas <i>T. versicolor</i> | 69 |
| 5.3.1.1 Detekce genů kódujících Lac v gDNA <i>T. versicolor</i> | 69 |
| 5.3.1.2 Izolace RNA z mycelia kultur <i>T. versicolor</i> | 69 |
| 5.3.1.3 Reverzní transkripce izolované RNA z mycelia <i>T. versicolor</i> | 70 |
| 5.3.1.4 RT-qPCR cDNA <i>T. versicolor</i> | 71 |
| 5.3.1.5 Sekvenování produktu PCR gDNA <i>T. versicolor</i> | 73 |
| 5.3.2 Exprese genů Mn-dependentních peroxidas <i>I. lacteus</i> | 73 |
| 5.3.2.1 Detekce genů kódujících MnP v gDNA <i>I. lacteus</i> | 73 |
| 5.3.2.2 Izolace RNA z mycelia kultur <i>I. lacteus</i> | 74 |
| 5.3.2.3 Reverzní transkripce izolované RNA z mycelia <i>I. lacteus</i> | 75 |
| 5.3.2.4 RT-qPCR cDNA <i>I. lacteus</i> | 76 |
| 5.4 Izoelektrická fokusace (IEF) lakas a Mn-dependentních peroxidas | 77 |
| 5.4.1 IEF lakas <i>T. versicolor</i> | 77 |
| 5.4.2 IEF Mn-dependentních peroxidas <i>I. lacteus</i> | 78 |
| 6. Diskuse | 80 |
| 7. Závěr | 87 |
| 8. Seznam literatury | 89 |

Seznam použitých zkratek

| | |
|-----------------------|---|
| ABTS | diamonná sůl kyseliny 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové) |
| AMK | aminokyselina |
| AOB | bakterie oxidující amoniak |
| BBP | benzylbutylftalát |
| BK | biologická kontrola |
| BPA | bisfenol A |
| BPB | bromfenolová modř |
| BSA | hovězí sérový albumin |
| dH ₂ O | destilovaná voda |
| dcH ₂ O | voda „ošetřená“ diethylpyrokarbonátem |
| deionH ₂ O | deionizovaná voda |
| DEP | diethylftalát |
| DEPC | diethylpyrokarbonát |
| DNT | dinitrotoluen |
| 2,6-DMP | 2,6-dimethoxyfenol |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| E1 | estron |
| E2 | 17 β -estradiol |
| E3 | estriol |
| EA | enzymová aktivita |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| ED | endokrinní disruptory |
| EE2 | 17 α -ethinylestradiol |
| EPR | reziduum produkující ethanol |
| EtBr | ethidium bromid |
| gDNA | genomická DNA |
| HBT | 1-hydroxybenzotriazol |
| HMC | látky imitující hormony |
| HRP | křenová peroxidasa |
| IEF | izoelektrická fokusace |
| Lac | lakasa |

| | |
|-----------|--|
| LiP | ligninperoxidasa |
| LME | „lignin-modifikující“ enzymy |
| MEG | glukosové medium „Malt extract“ |
| MIP | mangan-independentní peroxidasa |
| MM | medium s limitovaným (nízkým) obsahem dusíkatých látek |
| MnP | mangan-dependentní peroxidasa |
| MOPS | 3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina |
| NaAC | sodno-acetátový pufr |
| PAH | polycyklické aromatické uhlovodíky |
| PCB | polychlorované bifenyly |
| PCR | řetězová polymerasová reakce |
| <i>pI</i> | izoelektrický bod |
| POX | fenoloxidasa |
| qPCR | kvantitativní polymerasová řetězová reakce |
| RT | „real-time“ |
| SD | směrodatná odchylka |
| TAE | Tris-acetát-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| TNT | 2,4,6-trinitrotoluen |
| Tris | tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | jednotka enzymové aktivity |
| VeOH | veratrylalkohol |
| VP | versatilní peroxidasa |

1. Úvod

Diplomová práce je zaměřena na studium exprese extracelulárních ligninolytických enzymů, lakasy a mangan-dependentní peroxidasy, v průběhu degradace 17 α -ethinylestradiolu (EE2) pomocí vybraných hub bílé hniloby. Největší důraz a pozornost je věnována kvantifikaci exprese genů těchto enzymů v průběhu biodegradace.

Intenzivní růst průmyslu v posledních letech vedl ke kontaminaci životního prostředí velkým množstvím různorodých chemických látek, které se dostávají především do povrchové i podzemní vody a půdy. Tyto látky mají také často velice nepříznivý vliv na lidský organismus. 17 α -ethinylestradiol se do životního prostředí dostává prostřednictvím odpadních vod. Je používán jako hormonální antikoncepce. Člověk ho nedokáže metabolizovat a ve formě konjugátů s kyselinou glukuronovou a sulfátem se dostává do odpadních vod. Z konjugátů se uvolňuje hydrolýzou v čističkách odpadních vod a z odpadních vod kontaminuje životní prostředí. EE2 vykazuje silný estrogenní účinek, díky kterému dochází k ovlivnění zdraví člověka a vývoje živočichů v prostředí, např. ovlivnění rozmnožovacích schopností. V houbách bílé hniloby byl v laboratorních podmínkách prokázán jejich potenciál degradovat xenobiotika. Lze tedy usuzovat, že by se mohly uplatnit i v reálném užití při čištění odpadů kontaminovaných 17 α -ethinylestradiolem. K tomu je ovšem třeba řádně porozumět procesům, kterými degradace polutantů probíhá, a i fyziologii degradujících kultur.

Tato práce byla vypracována v Laboratoři environmentální biotechnologie Mikrobiologického ústavu AV ČR jako součást projektu, který se zabývá studiem mechanismu degradace organických polutantů, jako jsou například polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, endokrinně disruptivní látky a syntetická barviva, pomocí ligninolytických hub, bakterií a kompostováním.

Práce navazuje na téma laboratoře s využitím molekulárních metod ke studiu exprese enzymů v závislosti na přítomnosti přírodního polutantu, což by mělo přispět k pochopení procesů probíhajících v organismech, které ho degradují. Exprese lakasy a Mn-dependentní peroxidasy (MnP) je v této práci zkoumána na úrovni vlastností proteinů sekretovaných do kultivační tekutiny (enzymové aktivity, pI proteinů, degradační potenciál enzymů) a sledována byla i stimulace transkripce genů kódujících lakasu a MnP pomocí kvantitativní real-time PCR.

2. Cíle práce

- Určení lokalizace degradační aktivity pro 17 α -ethinylestradiol (EE2) v kulturách ligninolytických hub *T. versicolor*, *I. lacteus*, *P. chrysosporium* a *P. ostreatus*.
- Sledování vlivu EE2 na expresi a aktivitu ligninolytických enzymů v houbových kulturách:
 - Kvantifikace genové exprese Lac *T. versicolor* a MnP *I. lacteus* pomocí qPCR.
 - Detekce enzymových aktivit v houbových kulturách a studium jejich vlastností (*pI*).

3. Přehled literatury

3.1 Endokrinní disruptory (ED)

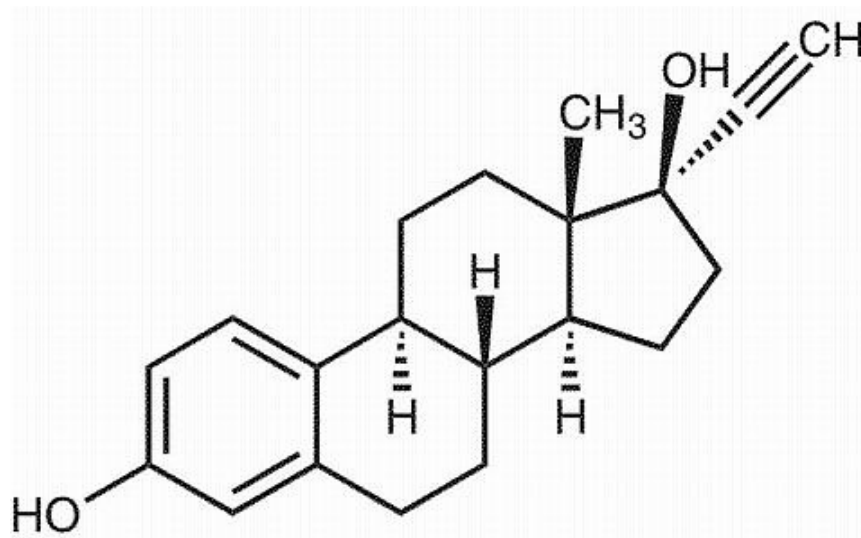
3.1.1 Negativní účinky endokrinních disruptorů (ED)

ED jsou látky, které narušují hormonální systém zvířat a člověka a mají nežádoucí efekt na vývoj reprodukčních orgánů a jejich správnou funkci. V závislosti na charakteru látky mohou blokovat receptory hormonů, napodobují funkci přirozených hormonů nebo ovlivňují syntézu hormonů na transkripční nebo translační úrovni [Tyler et al., 1998]. Mezi tyto látky jsou řazeny například 17α -ethinylestradiol (EE2), nonylfenol, bisfenol A nebo některé pesticidy [Cabana et al., 2007].

Během několika posledních dekad bylo do životního prostředí uvolněno mnoho endokrinně disruptivních látek. Například znečištění způsobené pesticidy vyvolalo navýšení mortality samců v populaci lososů, malformace gonád u amerických aligátorů a snížení populace tuleňů v Baltském moři [McKinlay et al., 2008]. EE2 přítomný v odpadních vodách byl identifikován jako hlavní ED s estrogením účinkem (ovlivňuje funkci lidského estrogenního receptoru) [Desbrow et al., 1998]. Estrogení látky svým působením na hormonální signální dráhy mohou také způsobit růst lidských prsních nádorů u lidí [Soto et al., 1991]. Pro své negativní účinky získaly ED a jejich sledování v životním prostředí pozornost mnoha vědeckých pracovníků.

3.1.2 17α -ethinylestradiol (EE2)

EE2, studovaný v této práci, je syntetický derivát přirozeného estrogenu používaný jako aktivní součást hormonální antikoncepce. Základem struktury jak přirozených (estron, 17α -estradiol, 17β -estradiol, estriol), tak syntetický estrogenů (17α -ethinylestradiol, mestranol) je cyklopentanfenanthrenové jádro. Struktura EE2 se vyznačuje ethinylovou skupinou, která je substituovaná na uhlíku C17 [Ying et al., 2002; Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010, Obr. 1, str. 14]. Předpokládá se, že ethinylová skupina EE2 stéricky brání vazbě receptor-substrát a metabolismu EE2 [Pauwels et al., 2008].



Obr. 1 Struktura 17 α -ethinylestradiolu

Přirozené a syntetické estrogény jsou uváděny jako hlavní příčina estrogenní aktivity odpadních vod v čističkách. Největší podíl na tom nese právě EE2, dále pak estradiol a v menší míře estron [Pauwels et al., 2008]. Rozpustnost přirozených estrogenů se pohybuje cca kolem 13 mg/l, kdežto EE2 má rozpustnost mnohem nižší (pohybuje se kolem 4,8 mg/l) [Ying et al., 2002]. Estrogény se do odpadních vod dostávají především močí vylučovanou z lidského organismu žen, kde se vytváří přirozenou produkcí a použitím hormonální antikoncepce. Se zcela nahodilým uvolňováním odpadních vod do životního prostředí mohou být estrogény nalezeny v řekách, jezerech a dokonce i v oceánech [Pauwels et al., 2008; Froehner et al., 2011]. Druhým hlavním zdrojem steroidních hormonů jsou hospodářská zvířata (ovce, skot, prasata, drůbež), stejně jako ostatní zvířata [Ying et al., 2002]. EE2 je odolný estrogen, který může způsobit feminizaci vodních organismů a tak poruchy v reprodukci [Pauwels et al., 2008]. Přítomnost steroidních látek v životním prostředí může mít vliv nejen na volně žijící živočichy, ale také na lidskou populaci a rostliny [Ying et al., 2002]. Výskyt estrogenů v povrchových a podzemních vodách je pravděpodobně způsoben hnojením zemědělské půdy, což může vést k jejich pohybu. Kontaminace pochází z hnojiv a zpracovaného trusu [Ying et al., 2002].

U lidí a zvířat procházejí estrogény řadou transformačních reakcí, a to především v játrech. Často dochází např. k oxidaci, hydroxylaci nebo methylaci ještě před konečnou konjugací s kyselinou glukuronovou nebo sulfátem. Např. antikoncepční složka mestranol

je po podání převedena demethylací na EE2. EE2 je pak eliminován v podobě konjugátů a vylučován hlavně ve formě neaktivních konjugátů s kyselinou sírovou a glukuronovou. Ačkoliv steroidní konjugáty nemají přímou biologickou aktivitu, mohou působit jako prekurzory hormonů, hydrolyzovatelné na volné steroidy. Přítomností mikroorganismů v odpadních vodách jsou totiž neaktivní konjugáty estrogenů štěpeny a aktivní estrogeny jsou uvolňovány do prostředí [Ternes et al., 1999; Ying et al., 2002].

3.2 Houby bílé hniloby (ligninolytické houby)

Houby bílé hniloby (anglicky „white rot“ fungi), které patří mezi dřevokazné basidiomycetní houby, jsou známé pro svůj jedinečný enzymový systém schopný degradovat lignin. Své pojmenování získaly především z toho důvodu, že po degradaci ligninu dochází k vybělení dřeva. Vedle degradace ligninu jsou tyto houby schopny degradovat i celou řadu polutantů životního prostředí [McMullan et al., 2001; Šušla & Svobodová, 2006; Asgher et al., 2008]. Houby bílé hniloby také mineralizují (oxidují na oxid uhličitý) některé chemikálie, které jsou již vysoce oxidované. Obecně se předpokládá, že tato biodegradační schopnost hub souvisí s jejich ligninolytickým enzymovým aparátem [Aust, 1995; Asgher et al., 2008].

Z ekologického hlediska jsou basidiomycetní houby, pro svou schopnost degradovat nebo modifikovat lignin, v přírodě hlavními dřevními škůdci. Umí překonat obtíže při rozkladu dřeva včetně nízkého obsahu dusíku a přítomnosti toxických a antibiotických látek. Degradace ligninu nebo jeho modifikace těmito houbami je klíčový krok v rozkladu ligninocelulosity [Martínez et al., 2005]. Tato práce je zaměřena na studium čtyř zástupců hub bílé hniloby, a to *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* a *Irpex lacteus*.

P. chrysosporium se v osmdesátých letech 20. století stala prvním modelovým organismem vhodným pro studium biodegradačního potenciálu hub bílé hniloby poté, co byla popsána její schopnost degradovat různé environmentálně nebezpečné látky [Bumpus et al., 1985; Eaton, 1985]. *P. chrysosporium* produkuje hlavně různé formy mangan-dependentní peroxidasy (MnP) a ligninperoxidasy (LiP) a její ligninolytický systém je atypický nedostatkem lakasové aktivity [Hatakka, 1994]. Na rozdíl od toho *T. versicolor* produkuje lakasu, LiP, MnP a arylalkoholoxidasu, ale pro oxidaci ligninu primárně využívá jen lakasu a MnP [Hatakka, 1994]. Ligninolytický systém *P. ostreatus*, obdobně

jako u jiných hub skupiny *Agaricaceae*, pak obsahuje především lakasu a arylalkoholoxidasu [Hatakka, 1994]. Dále byla v této houbě detekována také MnP a jiné peroxidasy [Bekker et al., 1992; Faraco et al., 2007]. *I. lacteus* roste obvykle na mrtvém dřevě. Byl izolován z půdy agroekosystémů v USA [shrnuto v práci Novotného et al., 2009]. Tato houba je známa jako efektivní rozkladač ligninu. Její vysoký biotechnologický význam a studie, zabývající se jejím enzymovým aparátem, byly nedávno shrnuty v práci Novotného a spolupracovníků.[2009].

3.3 Enzymy ligninolytických hub

Ligninolytické houby produkují různé isoformy extracelulárních enzymů, konkrétně oxidoreduktas, zahrnující dva hlavní typy peroxidas, manganovou peroxidasu (MnP) a ligninperoxidasu (LiP), a fenoloxidasu, lakasu (Lac). Tyto enzymy, modifikující lignin, jsou produkovány houbami bílé hniloby během jejich sekundárního metabolismu. Podílejí se především na degradaci ligninu, jejich přirozeného substrátu [Wesenberg et al., 2003]. K degradaci ligninu dochází během sekundárního metabolismu jen proto, že lignin neslouží jako zdroj živin, nýbrž je jeho degradací umožněn přístup k živinám, které jsou pod ním [Jeffries, 1990]. Díky nízké substrátové specifitě ovšem mohou enzymy oxidovat i různé cizorodé látky, včetně například barviv, které jsou ligninu strukturně podobné [Wesenberg et al., 2003]. Syntéza a sekrece těchto enzymů je často „spouštěna“ nedostatečným přísunem živin, většinou uhlíku nebo dusíku [Wesenberg et al., 2003].

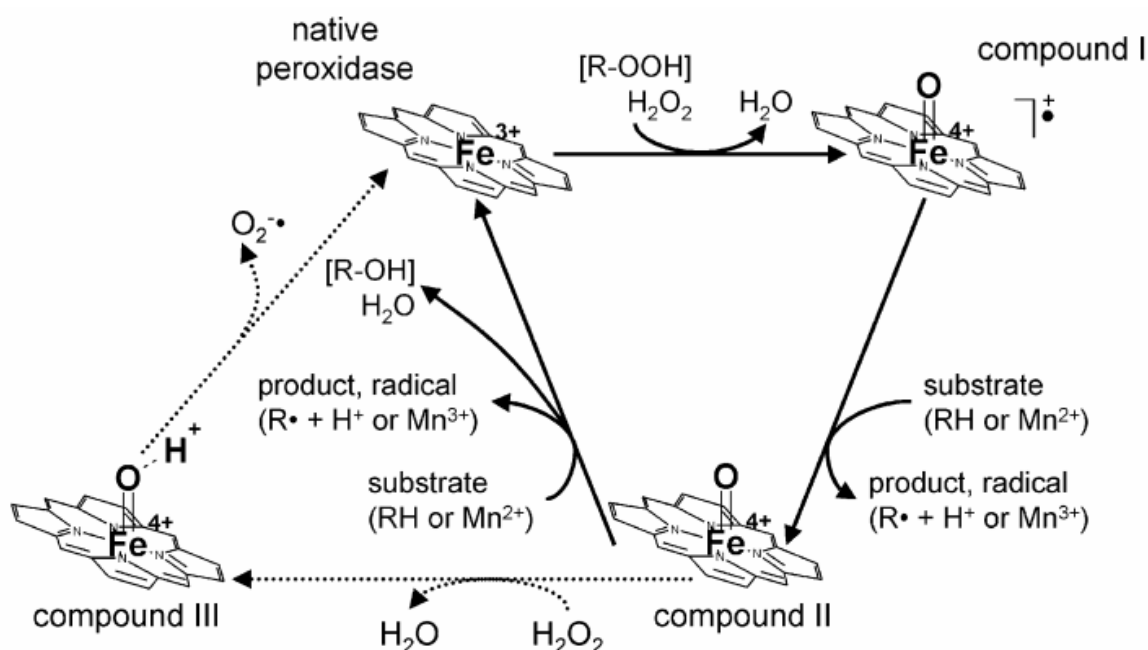
3.3.1 Ligninperoxidasa (LiP, E.C. 1.11.1.14)

Jedná se o extracelulární *N*-glykosylovaný enzym s molekulovou hmotností mezi 38 a 47 kDa obsahující hem v aktivním místě. LiP katalyzuje oxidaci nefenolických aromatických struktur ligninu a podobných sloučenin za tvorby reaktivních radikálů [Wesenberg et al., 2003, Obr. 2, str. 17]. Celý mechanismus začíná tvorbou aryl kationradikálu (sloučeniny I) za spotřeby endogenně vytvářeného H₂O₂, čímž dochází k oxidaci ligninperoxidasy a tím ke ztrátě dvou elektronů. Sloučenina I oxiduje první molekulu substrátu, tím ztrácí jeden elektron a vytváří se sloučenina II. Sloučenina II oxiduje další molekulu substrátu a tak se enzym vrací do nativního stavu. V případě vysoké koncentrace H₂O₂ a nedostatku substrátu může být sloučenina II přeměněna na

sloučeninu III (neaktivní forma enzymu). Tomu lze zabránit přítomností aromatických látek jako je veratrylalkohol a tryptofan a tak umožnit dokončení cyklu LiP [Wesenberg et al., 2003].

3.3.2 Mangan-dependentní peroxidasa (MnP, E.C. 1.11.1.13)

MnP patří mezi nejběžnější ligninolytické peroxidasy, které jsou produkovány téměř všemi basidiomycetními houbami bílé hniloby [Wesenberg et al., 2003]. Jedná se o glykosylované glykoproteiny obsahující protoporfyrin IX (hem) jako prostetickou skupinu, s molekulovou hmotností mezi 32 a 62,5 kDa. MnP přednostně oxiduje Mn^{2+} na Mn^{3+} , který je stabilizován chelátory, kterými jsou dikarboxylové kyseliny, jako je například kyselina šťavelová, která je taktéž houbami produkována. Chelatovaný Mn^{3+} je vysoce reaktivní a následně oxiduje substrát lignin stejně jako cizorodé látky [Wesenberg et al., 2003]. MnP takto oxiduje jak fenolické, tak nefenolické jednotky ligninu [Martínez et al., 2005]. Katalytický cyklus enzymu je obdobný LiP (Obr. 2) a enzym se po oxidaci Mn^{2+} sloučeninou I vrací do nativního stavu přes tvorbu sloučeniny II a oxidací druhého iontu Mn^{2+} . K reakci enzymu je třeba H_2O_2 .



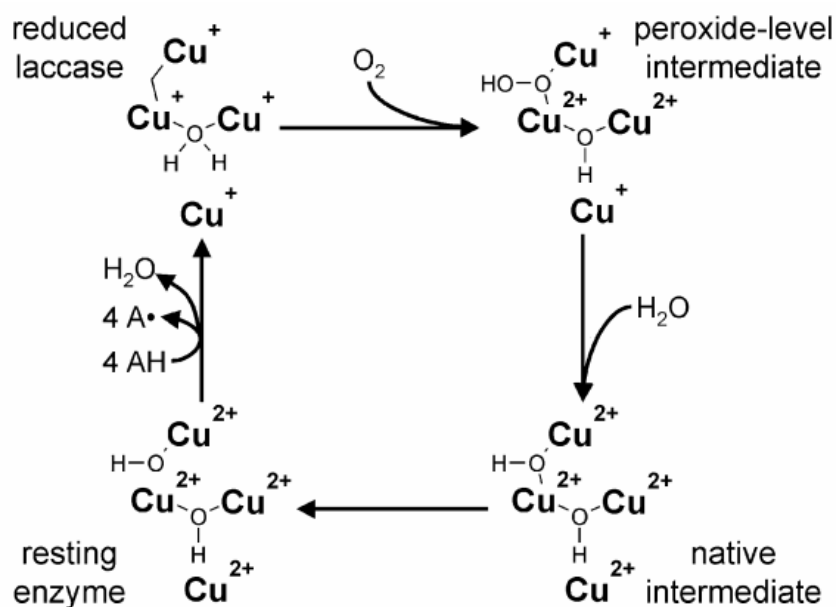
Obr. 2 Schéma katalytického cyklu peroxidas (LiP a MnP) [Wesenberg et al., 2003]

3.3.3 Versatilní peroxidasa (VP, E.C. 1.11.1.16)

Třetím typem ligninolýtických peroxidas je versatilní (univerzální) peroxidasa, kterou lze považovat za hybrid mezi MnP a LiP. Může oxidovat nejen Mn^{2+} , ale také fenolické a nefenolické aromatické sloučeniny. Tato peroxidasa byla nalezena v houbách rodu *Pleurotus* a *Bjerkandera* [Wesenberg et al., 2003].

3.3.4 Lakasa (Lac, E.C. 1.10.3.2)

Tento enzym patří do skupiny *N*-glykosylovaných extracelulárních „modrých“ oxidas s molekulovou hmotností 60 – 390 kDa, obsahující čtyři atomy mědi v aktivním centru. V případě nativního enzymu je měď v oxidačním čísle 2+. Lakasa katalyzuje oxidaci aromatických donorů vodíku za současné redukce kyslíku na vodu [Wesenberg et al., 2003, Obr. 3]. Tato fenoloxidasa má nízký redoxní potenciál, který umožňuje přímou oxidaci pouze fenolických jednotek ligninu. Fenolické jednotky ligninu jsou přitom zastoupeny v méně jak 10 % celkového polymeru ligninu [Martínez et al., 2005].



Obr. 3 Katalytický cyklus lakasy [Wesenberg et al., 2003]

3.3.5 Ostatní enzymy související s degradací ligninu

Mezi ostatní enzymy tvořící ligninolytický aparát hub patří tzv. pomocné enzymy, které nejsou schopné samostatně rozkládat lignin. Jsou to například glyoxaloxidas a superoxididismutasa zajišťující intracelulární produkci peroxidu vodíku (H_2O_2), kosubstrátu LiP a MnP, dále glukosaoxidasa, arylalkoholoxidas a cellobiosadehydrogenasa podílejících na propojení ligninolysy s degradací celulosy a hemicelulosy [Wesenberg et al., 2003].

3.3.6 Geny kódující ligninolytické enzymy

3.3.6.1 Geny kódující ligninolytické peroxidasy

Ligninolytické enzymy jsou v houbách kódovány rodinou genů, která umožňuje komplexní regulaci a produkci různých isoform enzymů [Pointing, 2001]. Isoenzymy ligninolytických peroxidas jsou tedy často kódovány rozdílnými geny a jejich alelami. Některé isoformy LiP jsou však produkovány enzymovou defosforylací jejich sacharidových složek [Kuan & Tien, 1989; Rothschild et al., 1997]. Nejedná se tedy o pravé isoenzymy. Předpokládané sekvence aminokyselin LiP [Tien & Tu, 1987] a MnP *P. chrysosporium* [Pribnow et al., 1989; Pease et al., 1989] byly zjištěny již po odhalení tohoto enzymu. Získány byly klonováním a sekvenováním cDNA isoenzymu H8 LiP (označení peroxidasy od kmene BKM-F-1767) a isoenzymu 1 MnP (označení od kmene OGC101). V současné době je známo více než 20 sekvencí genomových a cDNA klonů z různých kmenů *P. chrysosporium* odpovídajících isoenzymům LiP, MnP1, MnP2 (= H4) a MnP3 [shrnutí v Martínez et al., 2002].

Identifikace genů pro LiP byla zprvu komplikována různými názvy používanými v několika laboratořích pracujících se třemi kmeny *P. chrysosporium*. Jednotné označení genů *lip* *P. chrysosporium* zahrnuje geny *lipA* až *lipJ*, každý z nich s různými alelickými formami [Gaskell et al., 1994; Cullen, 1997; Stewart & Cullen, 1999]. Navíc je známo, že isoenzym označený jako LiPH2 je kódován genem *lipD*, proteiny (isoenzymy) typu LiPH8 jsou kódovány geny *lipA*, *lipB*, *lipE* a *lipH*, a isoenzym LiPH10 je kódován *lipC*. Další

exprimované proteiny nejsou dosud definitivně identifikované, i když některé z nich (např. *lipF*) pravděpodobně kódují další proteiny typu LiPH8 [Martínez, 2002].

Další geny ligninolytických peroxidas a jejich cDNA byly klonované a sekvenované z jiných ligninolytických hub, zahrnujících např. právě *T. versicolor* [Johansson & Nyman, 1996] a *P. ostreatus* [Asada et al., 1995; Giardina et al., 2000]. Tři geny kódující peroxidasy v *Pleurotus* mají nejvyšší počet intronů (15 s podobnou velikostí a uspořádáním) a jsou charakterizovány malou velikostí exonů. Vysoký počet intronů je přítomný také v genu *pgv* z *T. versicolor* (12 intronů), který kóduje hypotetický protein, který by se mohl podílet na vlastnostech typu LiP a MnP [Jönsson et al., 1994]. Počet intronů v genech kódující LiP v *P. chrysosporium* (8 – 9 intronů) a isoenzymy MnP (6 – 7 intronů) byl nižší, stejně jako byl nalezen v jiných genech peroxidas z *T. versicolor* (pouze 5 – 6 intronů) [Martínez, 2002]. Pozice intronů v genech pro peroxidasy je relativně konzervována a podle jejich rozložení byly také charakterizovány jednotlivé podskupiny v rodinách genů [Martínez, 2002].

Nově byly také identifikovány dva geny pro MnP z houby *Physisporinus rivulosus* [Hakala et al., 2006]. Geny vykazaly nízkou vzájemnou strukturní podobnost (v pozicích intronů). Z *Bjerkandera* sp. byl izolován gen pro versatilní peroxidasu [Moreira et al., 2005]. Z důvodů umožnění studia funkce jednotlivých isoenzymů byl gen pro MnP z houby *Dichomitus squalens* transformován a heterologně exprimován v *P. chrysosporium* [Li et al., 2001]. Obdobně byl gen *mnp2* *P. ostreatus* kódující versatilní peroxidasu exprimován homologně v *P. ostreatus* pod kontrolou promotoru *sd1* [Tsukihara et al., 2006]. Molekulární techniky PCR umožnily i identifikaci zcela nových enzymů a jejich genů. U houby *P. ostreatus* byl identifikován a charakterizován gen pro peroxidasu DyP dekolizující barviva [Faraco et al., 2007], která představuje zcela novou skupinu houbových peroxidas.

Expresí genů kódujících peroxidasy, MnP a LiP, v *P. chrysosporium* je regulována na úrovni transkripce genu vyčerpáním živin dusíku a uhlíku nebo množstvím manganatých iontů [Reddy & D'Souza, 1994; Martínez, 2002]. K dalším regulátorům genové transkripce patří také peroxid vodíku, molekulární kyslík, nebo jiný chemický stres [Li et al., 1995; Scheel et al., 2000]. Zatím jsou však minimální znalosti o tom, jak je na úrovni transkripce regulována produkce jednotlivých isoenzymů. U houby *P. rivulosus* bylo zatím popsáno, že jednotlivé, strukturně odlišné geny pro MnP, *mnpA* a *mnpB*, mohou

rozdlišně reagovat na stimulaci transkripce různými aditivy, jako je veratrylalkohol a Mn^{2+} [Hakala et al., 2006].

3.3.6.2 Geny kódující lakasu (Lac)

Gen pro lakasu byl jako první identifikován u ascomycetní houby *Neurospora crassa* [Germann & Lerch, 1986; German et al., 1988]. Následně pak byly publikovány sekvence genů z dalších zdrojů, jako např. ascomycetní houby *Aspergillus nidulans* a basidiomycetních hub *Coriolus hirsutus*, *Phlebia radiata* a *Agaricus bisporus* [Thurston, 1994]. Moderní analýza celých genomů hub ukázala existenci vícečetných genů pro měďnaté oxidasy, mezi které Lac patří [Kues & Ruhl, 2011]. Dosud největší rodina genů kódujících Lac byla popsána u koprofilní houby *Coprinopsis cinerea*. Po rozluštění genomu bylo u této houby identifikováno 17 genů pro Lac, které byly na základě podobnosti proteinových produktů a pozice intronů v genech rozděleny do dvou podrodin [Kilaru et al., 2006]. Fylogenetická analýza dále ukázala na možnost postupné duplikace některých genů *lcc* v genomu této houby a podobnost sekvencí některých genů s ferroxidasami, jinými zástupci měďnatých oxidas [Kilaru et al., 2006].

P. ostreatus produkuje několik isoenzymů Lac [Giardina et al., 1996; Giardina et al., 1999; Palmieri et al., 2003; Giardina et al., 2007], z nichž fenoloxidasa C (POXC) je nejhojnějším isoenzymem produkovaným za všech testovaných růstových podmínek [Palmieri et al., 2000]. Isoenzym POXA1w vykazuje zvláštní rozdíly s ohledem na jeho obsah kovu. Místo čtyř charakteristických iontů mědi tento enzym obsahuje dva ionty zinku, jeden iont železa a jen jeden iont mědi [Palmieri et al., 1997]. Z genů kódujících tyto isoenzymy byly dosud identifikovány *poxc* (dříve *pox2*), *pox1* (kóduje isoenzym Lac, který nebyl dosud identifikován), *poxa1b* a *poxa3* (kódující enzym POXA3) [Giardina et al., 1995; Giardina et al., 1996; Giardina et al., 1999; Palmieri et al., 2003].

Všechny sekvence genů typických lakas kódují polypeptidy o cca 520 – 550 aminokyselinových (AMK) zbytcích. Jeden cysteylový a deset histidylových zbytků se účastní vazby čtyř iontů mědi v molekule Lac. Těchto 11 AMK zbytků a další odpovědné za konformaci molekuly a vazbu substrátu jsou rozmístěny v konzervovaných oblastech proteinu [Kumar et al., 2003; Larrondo et al., 2003], kterým odpovídá i konzervace sekvence genů. Na základě konsenzuálních sekvencí těchto specifických oblastí genů lakas

byly vytvořeny techniky PCR vhodné pro izolaci lakasových genů a studium jejich exprese [D'Souza et al., 1996; Hoshida et al., 2001; González et al., 2003a; Luis et al., 2005].

Vyhledávání typických sekvencí pro Lac v genomu *P. chrysosporium*, která je považována za houbu neprodukující Lac, vedlo k objevení čtyř sekvencí (*mco1* až *mco4*) kódujících měďnaté oxidasy [Larrondo et al., 2004]. Strukturní analýza a heterologní exprese *mco1* ukázaly, že jde o odlišné oxidasy se silnou feroxidasovou aktivitou.

Mezi nejlépe prostudované lakasy patří Lac *T. versicolor*. Často používaný systém klasifikace isoenzymů Lac *T. versicolor* podle jejich *pI* [např. v Arana-Cuenca et al., 2004; Fujihira et al., 2009] byl nedávno pozměněn podle výsledků fylogenetických srovnání známých sekvencí Lac *T. versicolor* [Necochea et al., 2005]. Některé studie [Moldes et al., 2004; Koschorreck et al., 2008] dokumentují, že jednotlivé isoenzymy *T. versicolor* Lac mají navzájem odlišné katalytické vlastnosti.

Dosud bylo detekováno a klonováno několik genů kódujících Lac z různých kmenů *Trametes* sp. a *T. versicolor* a jejich možné alelické varianty [González et al., 2003b; Klonowska et al., 2005; Necochea et al., 2005; Koschorreck et al., 2008]. Díky klonování genů Lac a jejich heterologní exprese mohly být také jednotlivě popsány i vlastnosti dříve nedetekované nebo jen málo exprimované Lac *Trametes* sp. C30, LAC1 a LAC3 [Klonowska et al., 2005], či nové varianty Lac *T. versicolor* [Necochea et al., 2005].

Existující škála genů kódujících Lac a z nich exprimovaných isoenzymů nabízí houbám širokou možnost regulace a reakce na změny prostředí. Přesto zatím nebylo nalezeno spojení mezi distribucí genů Lac u hub a jejich životním stylem [Kues & Ruhl, 2011]. Nebylo zatím ani plně objasněno, jakou funkci mají jednotlivé isoenzymy/geny v houbových kulturách *in vivo* a mechanismus regulace jejich rozdílné exprese. Je známo, že transkripce genů kódujících Lac je u hub obecně regulována kovy, různými aromatickými látkami strukturně podobnými ligninu, či koncentrací zdrojů dusíku a uhlíku [Piscitelli et al., 2011], a příslušné regulační oblasti byly detekovány v promotorových oblastech genů [shrnuto v Piscitelli et al., 2011].

U *P. ostreatus* byla demonstrována odlišná míra indukce transkripce jednotlivých genů isoenzymů fenoloxidas (POX) v odpověď na indukci měďnatými ionty [Palmieri et al., 2000]. Nejvíce byla za studovaných podmínek indukována transkripce genu *poxa1b*, jehož indukce v této studii korelovala s aktivitou příslušného enzymu. Pozorovaná diskrepance mezi hladinami transkriptu a proteinu byla objasněna možnou nitrobuněčnou lokalizací enzymu a nestabilitou proteinu [Palmieri et al., 2000]. Tři geny pro Lac u

Trametes sp. I-62, *lcc1*, *lcc2* a *lcc3*, byly odlišně exprimovány v přítomnosti různých aromatických látek [Terrón et al., 2004]. Již dříve byla popsána odlišná regulace těchto tří genů v odpověď na veratrylalkohol a jeho dva izomery [González et al., 2003a]. Míra indukce genů aromatickými látkami pozorovaná v práci Terróna et al. [2004] však neodpovídala zjištěným enzymovým aktivitám. Naopak studie s *Trametes* sp. AH28-2 [Xiao et al., 2006] ukázala, že akumulace transkriptů LacA a LacB, které byly odlišně indukovány *o*-toluidinem a 3,5-dihydroxytoluenem, korelovala se vzrůstající aktivitou enzymů. To vše ukazuje na složitější mechanismus regulace produkce lakas u rodu *Trametes*.

3.4 Biodegradační potenciál ligninolytických hub a jejich enzymů

Díky nízké substrátové specifitě extracelulárních enzymů jsou ligninolytické houby schopné odbourávání různých aromatických látek, dokonce i těch s nízkou rozpustností ve vodě [Cajthaml et al., 2009b]. V mnoha případech jsou houby bílé hniloby jediný organismus, který má schopnost tyto látky rozkládat [Reddy, 1995; Pointing, 2001]. Ligninolytické enzymy jsou schopné transformace *in vitro* a mineralizace široké řady vysoce odolných organopolutantů se strukturou podobnou ligninu, i přesto není účast těchto enzymů v biodegradaci látek realnými kulturami hub dosud zcela vyjasněna.

3.4.1 Biodegradace muničního odpadu

Bezpečná likvidace muničního odpadu je neustálým problémem. Přináší nebezpečí exploze, ale součásti sloučenin jsou také toxické a perzistentní v životním prostředí. Přichází do kontaktu především s půdou a podzemní vodou [Pointing, 2001].

Jednou ze sloučenin je 2,4,6-trinitrotoluen (TNT). Houby bílé hniloby jsou schopné oxidační přeměny TNT a nabízejí tak potenciál pro mineralizaci výbušnin [Bennett et al., 1995; Pointing, 2001]. Některé houby bílé hniloby jsou schopné přeměnit TNT na dinitrotoluen (DNT) [Donnelly et al., 1997] a dále pak DNT degradovat a mineralizovat na oxid uhličitý. Příkladem je *P. chrysosporium*, která byla použita v několika degradačních studiích [Bumpus & Tatarko, 1994; Hawari et al., 1999; Jackson et al., 1999; Hodgson et al., 2000]. Této degradaci se účastní ligninolytické enzymy, konkrétně MnP [Scheibner & Hofrichter, 1998]. Kim & Song [2000; 2003] ukázali, že metabolismus TNT u houby *I.*

lacteus zahrnuje na rozdíl od jiných hub dvě možné počáteční transformace. Při jedné z nich je nitroskupina odstraněna z aromatického kruhu, zatímco v druhé metabolické dráze jsou nitroskupiny TNT redukovány přes hydroxylaminy na aminoskupiny. Degradace se tak tedy pravděpodobně účastní i jiné enzymy než MnP.

3.4.2 Biodegradace polychlorovaných bifenyků

Díky dlouhodobému používání polychlorovaných bifenyků (PCB) v průmyslu jsou tyto látky nyní přítomné v životním prostředí, ve kterém přetrvávají a mají toxické účinky [Pointing, 2001]. Řada studií prokázala, že houby bílé hniloby, jako například *Coriolopsis polyzona*, *P. chrysosporium*, *P. ostreatus* a *T. versicolor* jsou schopné odstranit PCB [Zeddel et al., 1993; Yadav et al., 1995; Novotný et al., 1997]. Studie, ve kterých byly použity PCB značené ¹⁴C, ukázaly, že *P. chrysosporium* [Dietrich et al., 1995] a *T. versicolor* [Beaudette et al., 2000] jsou schopné mineralizovat PCB, ale přesná role ligninolytických enzymů v tomto procesu není zatím zcela jasná.

Lakasy z *T. versicolor* a *P. ostreatus* byly testovány z hlediska jejich schopnosti degradovat hydroxy-PCB za podmínek *in vitro* [Keum & Li, 2004]. Bylo ukázáno, že lakasa *T. versicolor* degraduje tyto látky rychleji než enzym *P. ostreatus* a degradační rychlost přitom klesá se vzrůstajícím stupněm chlorace látek. Degradace tetra- a hexa-kongenerů lakasou *T. versicolor* vyžadovala přítomnost dalších mediátorů reakce. Obdobně byla demonstrována schopnost exoenzymů *T. versicolor* odstraňovat „koplanární“ a hydroxylované kongenery PCB [Takagi et al., 2007]. Navíc Fujihiro et al. [2009] nedávno popsal rozdílné substrátové specifity jednotlivých isoenzymů lakasy *T. versicolor* vůči hydroxy-PCB. Tyto studie tak podporují domnělou účast ligninolytických enzymů v degradaci PCB houbami bílé hniloby.

3.4.3 Biodegradace polycyklických aromatických uhlovodíků

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou benzenové homology tvořené spojením čtyř a více benzenových kruhů. Řada PAH pochází z přírodních olejových ložisek a rozkladu vegetace, kromě toho vznikají i lidskou činností používáním fosilních paliv při topení a výrobě energie, spalováním dřeva, automobilovou dopravou, spalováním odpadů a průmyslovými procesy [Alloway & Ayres, 1993]. Tyto sloučeniny představují

obrovský problém z hlediska toxicity a přetrvávání v životním prostředí. Houby bílé hniloby jsou organismy schopné PAH mineralizovat [Gramss et al., 1998] a míra mineralizace koreluje s produkcí ligninolytických enzymů [Field et al., 1992; Sack et al., 1997]. Tyto houby jsou schopné oxidovat PAH za podmínek *in vitro* a využívají k tomu lakasy a ligninolytické peroxidasy [Majcherczyk et al., 1998; Eibes et al., 2006; Baborová et al., 2006].

Mezi první houby bílé hniloby, u kterých byla tato vlastnost popsána, patří např. *P. chrysosporium* [Bumpus, 1989] a *T. versicolor* [Morgan et al., 1991]. Extracelulární LiP z *P. chrysosporium* byla mezi prvními, u které byla prokázána schopnost oxidovat PAH [Hammel et al., 1986; Bumpus, 1989]. LiP přímo katalyzuje jednoelektronovou oxidaci aromatických substrátů. Podle jiné práce hraje v degradaci PAH klíčovou roli MnP [Bogan & Lamar, 1995]. Majcherczyk et al. [1998] identifikovali několik produktů štěpení aromatického kruhu acenaftalenu a acenaftenu po štěpení těchto látek lakasou *T. versicolor* [Johannes et al., 1998; Majcherczyk et al., 1998]. V pozdější práci struktury metabolitů fenantrenu, anthracenu, fluoranthenu a pyrenu z kultur *I. lacteus* ukázaly na účast ligninolytických peroxidas a systému cytochromu P450 v degradaci těchto látek. Role MnP ze stejné houby v degradaci anthracenu byla pak potvrzena identifikací produktu štěpení aromatického jádra tímto enzymem, 2-(2'-hydroxybenzoyl)benzoové kyseliny [Baborová et al., 2006].

3.4.4 Biodegradace syntetických barviv

Syntetická barviva jsou chemicky různorodá [Pointing, 2001]. Jsou značně používaná v biomedicíně, potravinářství, v průmyslu pro zpracovávání plastů a textilním průmyslu, kde se odhaduje, že 10 - 14 % barviv se během procesů barvení dostává do odpadních vod [Vaidya & Datye, 1982]. Stejně jako v předchozích případech jsou tyto chemikálie odbouratelné houbami bílé hniloby, které jsou schopné dekolorizovat širokou škálu azo, trifenylmethanových i heterocyklických barviv [Pasti-Grigsby et al., 1992; Pointing, 2000]. Dekolorizace barviv houbami byla v poslední době shrnuta v různých pracech [Pointing, 2001; McMullan et al., 2001; Kaushik & Malik, 2009].

Velká pozornost byla věnována také účasti ligninolytických enzymů v dekolorizačních reakcích. LiP z *P. chrysosporium* byla schopna dekolorizovat azo, trifenylmethanová a heterocyklická barviva v přítomnosti veratrylalkoholu a H₂O₂ [Cripps

et al., 1990; Ollikka et al., 1993]. MnP z *Bjerkandera adusta* a *Pleurotus eryngii* také katalyzuje dekolorizaci různých barviv [Heinfling et al., 1998]. Role enzymů degradujících lignin v dekolorizaci barviv byla potvrzena studiemi *in vitro*, s purifikovanými enzymy [Pointing, 2001; Wesenberg et al., 2003; Husain, 2010]. Použita byla také řada nízkomolekulárních mediátorů reakcí s cílem zvýšit dekolorizační potenciál těchto enzymů [Husain & Husain, 2008]. Nedávno byl u houby *P. ostreatus* [Faraco et al., 2007] a i u jiných [Shimokawa et al., 2009] také objeven zcela nový enzym peroxidasa DyP dekolorizující barviva, která oxiduje barviva s vysokým redox potenciálem [Liers et al., 2010].

3.4.5 Biodegradace EE2

Pro svůj endokrinně disruptivní charakter se EE2 stal předmětem mnoha pokusů, které se pokoušejí EE2 z prostředí odstranit nebo alespoň snížit jeho estrogení aktivitu a to použitím různých mikroorganismů. Snahou je tedy identifikovat mikroorganismy, které jsou schopné EE2 transformovat a objasnit metabolické procesy, které mohou ke ztrátě estrogení aktivity vést.

V anaerobním prostředí bylo v případě bakteriální degradace výsledkem hromadění EE2 a jiných estrogenů v prostředí místo očekávané degradace [Czajka & Londry, 2006]. Degradace EE2 byla pozorována za aerobních podmínek [Ying & Kookana, 2003; Sarmah & Northcott, 2008]. Degradace EE2 probíhá také u bakterií oxidujících amoniak (AOB) z aktivovaného kalu, což bylo prokázáno inhibicí oxidace amoniaku, která vedla k inhibici růstu těchto bakterií a následně ke snížení aktivity degradující estrogen v kalu [Shi et al., 2004]. Z kalů čistíren odpadních vod v Japonsku a Číně byly izolovány a identifikovány bakterie metabolizující EE2 druhů *Rhodococcus zopfii* a *Rhodococcus equi* [Yoshimoto et al., 2004] a *Sphingobacterium* sp. JCR5 [Ren et al., 2007]. V práci Pauwelse et al. [2008] bylo izolováno 6 bakteriálních kmenů z kompostu, které kometabolizovaly EE2 při metabolizaci estronu (E1), 17 β -estradiolu (E2) a estriolu (E3). V průběhu degradace nebyly nalezeny žádné metabolity, což naznačuje, že došlo k úplné degradaci a štěpení aromatického kruhu.

Dále byly testovány biotransformační schopnosti 11 kmenů řas. Z testovaných organismů byly schopné degradace EE2 *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus vacuolatus* a *Ankistrodesmus braunii* [Della Greca et al., 2008].

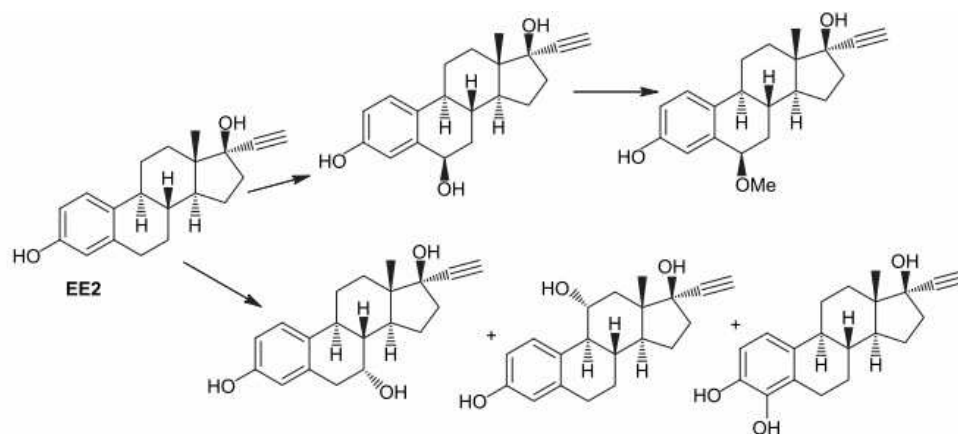
Z ligninolytických hub byla již v rané studii z roku 1973 [Lugaro et al., 1973] prokázána schopnost Lac z *Polyporus versicolor* oxidovat steroidní hormony, E1, E2 a E3. Struktury jejich produktů po transformaci však nebyly objasněny. Lac z *Trametes* sp. a *Pycnoporus coccineus* byla testována pro transformaci EE2, který byl absorbován na mořském písku ve zkumavce a rotačním reaktoru [Tanaka et al., 2001]. V případě prvního experimentu (mořský písek ve zkumavce) byl EE2 (2 mol/kg písku) odstraněn do 48 hodin z 90 % a 80 %. V rotačním reaktoru Lac z *Trametes* sp. dosáhla 80% degradační účinnosti po 8 hodinách [Tanaka et al., 2001]. Suzuki et al. [2003] zkoumali odstranění steroidních hormonů E2 a EE2 za pomoci MnP *P. chrysosporium* ME-446 a „lakasa-mediátorového“ systému s 1-hydroxybenzotriazolem (HBT) a Lac *T. versicolor* IFO-6482. MnP a „lakasa-HBT“ systém snížil estrogenní aktivitu E2 a EE2 o více než 80 % po 1 hodině. Ke kompletnímu odstranění této aktivity došlo po 8 hodinách.

Tamagawa et al. [2006] testovali degradaci přírodního hormonu E1 s použitím ligninolytické houby *Phanerochaete sordida* za ligninolytických podmínek s nízkým obsahem dusíku a vysokým obsahem uhlíku v kultivačním mediu. Po 5 dnech inkubace byla zaznamenána 95% transformace. Při inkubaci s MnP a Lac ze stejné houby došlo už po 1 hodině ke kompletnímu vymizení E1 a také k úplnému odstranění estrogenní aktivity [Tamagawa et al., 2006].

Po výsledcích s křenovou peroxidasou (HRP) [Auriol et al., 2006] byla stejnými autory, [Auriol et al., 2006], studována přeměna estrogenů E1, E2, E3 a EE2 v syntetické i reálné komunální odpadní vodě a to pomocí Lac *T. versicolor* [Auriol et al., 2007]. Studie prokázala, že schopnost enzymu oxidovat estrogény nebyla ovlivněna vlastnostmi odpadní vody. Účinnost obou enzymů, Lac *T. versicolor* a HRP, byla pak porovnána v další práci studující odstranění estrogenní aktivity a transformaci E1, E2, E3 a EE2 v reálných komunálních odpadních vodách obsahujících environmentální koncentrace těchto estrogenů [Auriol et al., 2008]. Steroidní estrogény, včetně EE2, byly kompletně degradovány během 1 hodiny inkubace s lakasou *T. versicolor* (20 U/ml) a HRP (8 - 10 U/ml). Degradace EE2 u *T. versicolor* byla přičítána hlavně aktivitě Lac i v případě kontinuální kultivace *T. versicolor* v bioreaktoru operujícím s houbovými peletami [Blánquez & Guieysse, 2008]. V této studii bylo dosaženo degradační rychlosti 0,09 mg EE2 l⁻¹h⁻¹ a bylo poprvé demonstrováno použití kontinuálního reaktoru k houbové degradaci estrogenů.

Schopnost *T. versicolor* degradovat pět různých sloučenin s ED aktivitou, zahrnující i EE2, byla pak srovnána za použití sedmi dalších hub bílé hniloby [Cajthaml et al. 2009a]. Nejúčinnější degradace byla zjištěna u hub *I. lacteus*, *P. ostreatus*, které byly schopny odstranit EE2 v koncentraci 10 mg/l během prvních tří dnů kultivace v statických tekutých kulturách. Přes úplné odstranění EE2 byla však v kulturách detekována residuální estrogení aktivita poukazující na možnou tvorbu estrogenních metabolitů [Cajthaml et al. 2009a].

Dosud však nebylo publikováno dostatečné množství informací o metabolitech vznikajících houbovou degradací EE2. Vedle studia metabolitů E2 po degradaci lakasou *Trametes pubescens* a *Myceliophthora* sp. [Nicotra et al., 2004] byly provedeny analýzy metabolitů transformace EE2 u zygomycetní houby *Cunninghamella elegans* [Choudhary et al., 2004]. Bylo identifikováno několik metabolitů EE2 vznikající působením *C. elegans* v tekutém kultivačním mediu (Obr. 4). Transformační reakce zahrnovaly několik hydroxylací EE2 a v jednom případě i metylaci hydroxylovaných derivátů [Choudhary et al., 2004].



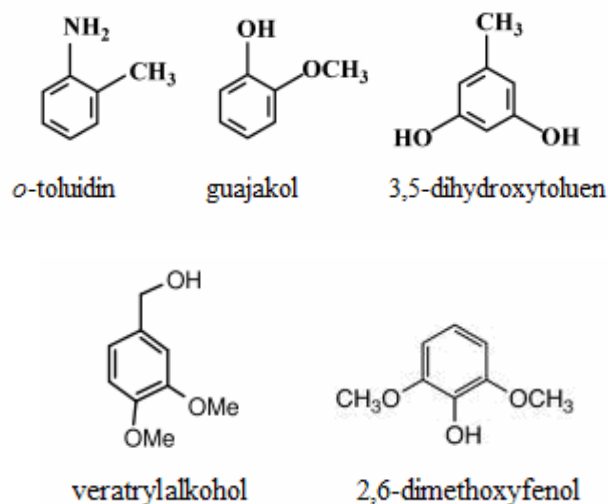
Obr. 4 Produkty vzniklé transformací EE2 *C. elegans* [Choudhary et al., 2004]

I když byla tedy řada ligninolytických hub i jejich purifikované enzymy úspěšně použity pro degradaci EE2, mechanismus těchto degradací a přesná role enzymů v těchto procesech nebyly dosud plně objasněny. Zároveň nebyl dostatečně popsán ani vliv ED látek na expresi ligninolytických enzymů u hub bílé hniloby pozorovaný v práci Cajthaml et al. [2009a].

3.5 Působení organopolutantů na expresi enzymů ligninolytických hub

Ve většině hub jsou ligninolytické enzymy produkovány v takovém množství, které je příliš nízké pro komerční účely. Expresie ligninolytických enzymů však může být zvýšena velkým množstvím různých látek, např. některými aromatickými sloučeninami [Eggert et al., 1996; Mansur et al., 1998; Arana-Cuenca et al., 2004]. Struktura a koncentrace aromatických sloučenin pak hraje důležitou roli v regulaci syntézy enzymů [Elisashvili et al., 2010]. Kromě toho může stejná aromatická látka fungovat jako induktor nebo represor v závislosti na houbě a studovaném enzymu [Elisashvili et al., 2010]. Efektivním induktorem syntézy Lac je 2,5-xyloidin [Bollag & Leonowicz, 1984; Elisashvili et al., 2002; Revankar & Lele, 2006]. Expresie Lac *T. versicolor* byla také zdvojnásobena použitím veratrylalkoholu nebo guajakolu [Lee et al., 1999]. Nejlepším induktorem syntézy Lac u *Lentinus strigosus* se naopak zdá být 2,6-dimethoxyfenol (2,6-DMP) [Myasoedova et al., 2008].

V regulaci syntézy enzymů hraje důležitou roli nejen struktura aromatických sloučenin, ale také jejich koncentrace. Toto zjištění je v souladu s dřívějšími výsledky práce autorů Xiao et al. [2004], které ukázaly, že aktivita Lac *Trametes* sp. AH28-2 byla výrazně zvýšena s rostoucí koncentrací guajakolu, *o*-toluidinu a 3,5-dihydroxytoluenu (z 0,5 mmol/l na 12, 4 a 20 mmol/l). Nejvyšší aktivita Lac (504 U/l) byla sledována v přítomnosti *o*-toluidinu. Ukázán byl i vliv různých induktorů na zastoupení isoenzymů Lac, které jsou produkovány *Trametes* sp. AH28-2 [Xiao et al., 2004]. Aktivita isoenzymu Lac A byla dominantní při indukci *o*-toluidinem, 2,5-xyloidinem, vanilinem, syringovou kyselinou nebo 2,4-diaminotoluenem. Naopak dominantní isoenzymem Lac, indukovaným 3,5-dihydroxytoluenem, byl isoenzym Lac B, který představoval více než 80 % celkové aktivity v supernatantu [Xiao et al., 2004]. Z hlediska struktury jsou guajakol, *o*-toluidin a 3,5-dihydroxytoluen aromatické sloučeniny s jedním benzenovým kruhem a různě substituovanými skupinami (Obr. 5, str. 30). Avšak jak tyto tři sloučeniny s různou chemickou strukturou ovlivňují složení exprimovaných isoenzymů Lac u *Trametes* sp. AH28-2 dosud není jasné [Xiao et al., 2004].



Obr. 5 Chemické struktury induktorů Lac

Terrón et al. [2004] studovali vliv devíti fenolických sloučenin z hlediska jejich schopnosti zvyšovat produkci Lac v ligninolytické basidiomycetní houbě *Trametes* sp. I-62. Nejvyšší navýšení hladiny aktivity Lac vůči kontrole bylo sledováno v přítomnosti kyseliny *p*-kumarové (253x, třetí den růstu), guajakolu (73x, druhý den růstu) a *p*-methoxyfenolu (71x, osmý den růstu). Guajakol (nejlepší induktor transkripce genu *lcc*) a *p*-kumarová kyselina selektivně indukovaly expresi *lcc1* a *lcc2* [Terrón et al., 2004]. Ferulová kyselina indukovala expresi *lcc3*, zatímco 3,5-dihydroxybenzoová kyselina neměla výrazný vliv na transkripci genů Lac. Růst *Trametes* sp. I-62 v přítomnosti různých aromatických sloučenin vedl nejen k ovlivnění hladiny extracelulární aktivity Lac, ale také ke změně v barvě kultivačního media [Terrón et al., 2004].

Některé studie uvádějí, že Lac může být indukována nejen organickými, ale také anorganickými substancemi. Příkladem může být indukce extracelulární Lac *P. chrysosporium* a *T. versicolor* CuSO_4 a NH_4^+ [Dittmer et al., 1997; Collins & Dobson, 1997]. V práci Choa et al. [2006] je uveden vliv dvojmocných kationtů kovů (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} a Zn^{2+}) na aktivitu Lac u *Abortiporus biennis*, *Cerrena unicolor* a *T. versicolor*. Nejúčinnějším induktorem aktivity Lac u *A. biennis* a *C. unicolor* bylo Cd^{2+} a u *T. versicolor* Zn^{2+} .

Obdobně je zvýšení enzymových aktivit u hub ovlivněno i látkami, které vznikají během degradačních studií. V těchto studiích jsou houby bílé hniloby používány jako bioremediační agens a právě u ligninolytických enzymů se předpokládá, že hrají

v degradaci významnou roli. Změny v produkci enzymů by tak mohly následně ovlivnit i degradační potenciál houbových kultur.

Takamiya et al. [2008] posuzovali dopad bisfenolu A (BPA) na produkci enzymů modifikujících lignin (LME) u *T. versicolor*, který je schopný BPA degradovat. Ke zvýšení produkce LME docházelo při koncentracích 200 a 300 µg/ml BPA. Vysoká enzymová aktivita při těchto koncentracích pravděpodobně hraje roli v přežití hub při stresových podmínkách spojených s BPA. Stupeň exprese *mnp* byl vyšší při koncentraci 300 µg/ml. Exprese *lcc* byla významně zvýšena při koncentraci 200 µg/ml BPA a exprese *lip* při všech koncentracích BPA. Nárůst úrovně *lip* a *lcc* transkriptů může kompenzovat úroveň *mnp* transkriptů v přítomnosti BPA. Tuto hypotézu lze vysvětlit tím, že všechny tři ligninolytické enzymy jsou kódovány stejnou rodinou genů, která umožňuje jejich komplexní regulaci [Takamiya et al., 2008].

Práce Šušly & Svobodové [2008] je prvním popisem profilu isoenzymů MnP ligninolytické houby *I. lacteus* pěstované v přítomnosti syntetických barviv. Zastoupení isoform MnP v kulturách *I. lacteus* se mění v průběhu degradace barviv ve spojení s množstvím manganu. Jejich výsledky naznačují, že vyšší úroveň manganu stimulovala aktivitu MnP stejně jako produkci nových isoform MnP s hodnotami *pI* 3,28 a 3,75. Ke změnám v isoformovém složení však nedocházelo po přidavku barviv ke kulturám v mediu s nízkým obsahem manganu. Přídavek bromfenolové modři (BPB) ke kulturám s vysokým obsahem manganu vedl k inhibici produkce isoform MnP s nižším *pI* (3,28; 3,50; 3,75; 3,81) a naopak k produkci isoform MnP s vyšším *pI* (5,67; 5,88; 6,04), což následně ovlivnilo schopnost enzymů odbarvovat testovaná barviva [Šušla & Svobodová, 2008].

Ovšem práce Gnanamani et al. [2006] naopak ukázala za použití kultury *P. chrysosporium* NCIM 1197, že přídavek induktorů (veratrylalkohol, cykloheximid, gallová kyselina a guajakol) pouze urychloval či zvyšoval produkci Lac. Použité induktory a kultivační podmínky neměly vůbec žádný vliv na zastoupení isoform Lac [Gnanamani et al., 2006].

Coriolopsis rigida je houba bílé hniloby, která produkuje dvě Lac jako jediné zástupce ligninolytických enzymů [Saparrat et al., 2002]. Tyto dvě Lac, kódované genem *lcc1*, se přímo podílejí na transformaci aromatických sloučenin z pevného odpadu vzniklého v průběhu produkce olivového oleje [Díaz et al., 2010]. V práci Saparrat et al. [2010] však byly identifikovány další dva nové geny *lac*, *lcc2* a *lcc3*. Geny Lac z *C. rigida* jsou odlišně regulované na úrovni transkripce. Amfotericin B (regulátor signální dráhy

zahrnující vápník), syringová kyselina (substrát Lac) a Cu^{2+} spouštěly transkripci *lcc1*, přičemž Cu^{2+} způsobil jeho nevyšší indukci. Zatímco amfotericin B a syringová kyselina indukovaly expresi *lcc2* a *lcc3*, 2,6-dimethoxy-1,4-benzochinon (substrát Lac) spouštěl expresi obou genů [Saparrat et al., 2010].

Důležitou skupinou induktorů enzymové aktivity jsou těžké kovy. Přídavek Cd^{2+} a Cu^{2+} způsobuje zvýšené hodnoty aktivity Lac v kulturách *P. ostreatus* pěstovaných v mediu s limitovaným (nizkým) obsahem dusíku [Baldrian & Gabriel, 2002]. Mírný stimulační účinek těžkých kovů na produkci Lac z *T. versicolor* byl pozorován v přítomnosti Ag^+ , Mn^{2+} , Cd^{2+} a Zn^{2+} [Lorenzo et al., 2006]. *T. versicolor* produkuje v přítomnosti různých kovů dva isoenzymy Lac v různém poměru, LacI a LacII. Ve všech případech je aktivita LacII vyšší než aktivita LacI, což naznačuje, že LacII je predominantní formou Lac *T. versicolor* [Lorenzo et al., 2006]. Degradace barviv závisí na isoenzimech Lac přítomných v extracelulární tekutině a každý isoenzym se liší z hlediska jeho schopnosti degradovat různá barviva. U isoenzymu LacI byly prokázány větší dekolizační schopnosti [Lorenzo et al., 2006].

Estery kyseliny ftalové jsou široce používány v kosmetice a v průmyslu na výrobu umělých hmot a současně se řadí mezi látky imitující hormony (HMC, z anglického „hormone mimicking compounds“). Yeo et al. [2008] izolovali basidiomycetní houbu bílé hniloby, *Phlebia tremellosa*, u které byl v tekutém mediu obsahujícím HMC prokázán nárůst Lac a LiP. Za podmínek vhodných pro degradaci esterů kyseliny ftalové docházelo nejen k vysokému nárůstu aktivity Lac, ale také úrovně její transkripce [Yeo et al., 2008]. *P. tremellosa*, kultivována s benzylbutylftalátem (BBP), BPA a diethylftalátem (DEP) v minimálním mediu, vykazovala značný nárůst aktivity Lac s přídavkem BBP (26x) a DEP (35x), kdežto s přídavkem BPA nedošlo k žádné změně. V případě BBP a DEP se však zvýšila i exprese genů Lac [Yeo et al., 2008].

Uvedená data tedy ukazují na složitější systém regulace produkce enzymů a jejich isoformem. Někdy se zvedá pouze hladina enzymů [Gnanamani et al., 2006] a jindy se mění i jejich isoformové složení [Xiao et al., 2004; Šušla & Svobodová, 2008]. Vliv na regulaci syntézy enzymů však mají i kultivační podmínky a struktura použitých sloučenin [Elishavili et al., 2010] a zatím se předpokládá jen to, že v případě Lac by v regulaci její exprese mohly hrát roli některé odlišnosti zjištěné v promotorech genů [Xiao et al., 2006].

4. Materiál a metody

4.1 Organismy

Houbové kultury *Trametes versicolor* 167/93, *Irpex lacteus* 931, *Pleurotus ostreatus* 3004/CCBAS 278 a *Phanerochaete chrysosporium* ME 446 byly získány ze sbírky CCBAS (Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, ČR). Houby byly udržovány na agarových plotnách (1% glukosa, 0,5% malt extrakt, 2% agar) a uchovávány při 4 °C.

4.2 Chemikálie

| | |
|--|--|
| „100 bp, DNA ladder“ | New England BioLabs Inc. (Velká Británie) |
| 2,6-dimethoxyfenol (čistota > 97%) (DMP) | Sigma- Aldrich (Německo) |
| 17 α -ethinylestradiol | Sigma- Aldrich (Německo) |
| 3-(<i>N</i> -morfolino)propansulfonová kyselina | Sigma- Aldrich (Německo) |
| 6x „Orange loading dye solution“ | FINNZYMES (Finsko) |
| Bromfenolová modř | Sigma- Aldrich (Německo) |
| Diethylpyrokarbonát (DEPC) \geq 97% | Sigma- Aldrich (Německo) |
| DNasa I | Sigma- Aldrich (Německo) |
| Diamonná sůl kyseliny 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové) (~ 98%) (ABTS) | Sigma- Aldrich (Německo) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma- Aldrich (Německo) |
| dNTP Mix | FINNZYMES (Finsko) |
| DyNAzyme TM II DNA polymerasa | FINNZYMES (Finsko) |
| Ethidium bromid (EtBr) | Merk (Německo) |
| Hovězí sérový albumin (BSA) | Sigma- Aldrich (Německo) |
| Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) | Sigma- Aldrich (Německo) |
| „Low molecular weight DNA ladder“ | New England BioLabs Inc. (Velká Británie) |
| M-MuLV Reverse Transcriptase RNase H ⁻ | FINNZYMES (Finsko) |

| | |
|--|----------------------------|
| Pharmalyte pI 2,5 – 5,0 | Pharmacia (Švédsko) |
| Pharmalyte pI 3,0 – 10,0 | Pharmacia (Švédsko) |
| Power SYBR [®] Green PCR Master Mix | Applied Biosystems (USA) |
| Random hexamer primer | Sigma- Aldrich (Německo) |
| Riblock inhibitor | Sigma- Aldrich (Německo) |
| RNasa A | Sigma- Aldrich (Německo) |
| ROX Reference Dye II 50x | Takara Bio Inc. (Japonsko) |
| SYBR [®] Premix Ex Taq [™] | Takara Bio Inc. (Japonsko) |

Ostatní použité chemikálie byly ve standardní p.a. čistotě.

4.3 Přístroje

| | |
|--|--|
| T Gradient PCR cycler | (Biometra, Německo) |
| StepOne Real-Time PCR System | (Applied Biosystems, USA) |
| Spectrafuge 24D | (Labnet International, Inc., USA) |
| Bloková lázeň PCH-2 | (Grant-bio, Velká Británie) |
| Vodní lázeň WB7 | (Memmert GmbH, Německo) |
| HPLC-UV systém Waters 2695 | |
| Separations Module | (Waters, USA) |
| Diode-array detektor Waters 2996 | (Waters, USA) |
| Ultra-Turrax T25 | (Janke & Kukul, IKA-Labortechnik, Německo) |
| Centrifuga Medifriger BL S | (I.C.T, S.L., Španělsko) |
| Orbital Shaker OS – 10 | (Biosan LTD., Lotyšsko) |
| Nanodrop ND – 1000 | (Thermo Scientific, USA) |
| SPECTRAmaxPlus ³⁸⁴ | (Molecular Devices Corporation, USA) |
| Analytické váhy ALJ 120-4 KERN | (Kern & Sohn GmbH, Německo) |
| Váhy ACBplus-600H | (Scalemasters, Inc., USA) |
| Elektroforesa Agagel Standard | (Biometra, Německo) |
| Multiphor II electrophoresis system | (Pharmacia Biotech, Švédsko) |
| Zdroj Power Pac 3000 | (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) |
| Zdroj pro elektroforesu Power Pack P25 T | (Biometra GmbH, Německo) |

| | |
|------------------------------|--|
| UV transiluminátor TCP-26.LM | (Vilber Lourmat, Francie) |
| Míchačka | (IKA [®] Works, Inc., USA) |
| pH metr IQ140 | (I.Q. Scientific Instruments, Inc., USA) |
| pH elektroda P17 | (Sentek, Velká Británie) |
| Speed vac DNA 110 | (Savant Instruments, Inc., USA) |
| Magnetická míchačka | (VELP Scientifica, Itálie) |
| Autokláv Falcon J 2570 | (LTE Scientific LTD., Velká Británie) |
| Sušárna Venticell | (Brněnská Medicínská Technika a.s., ČR) |
| Ultrazvuková lázeň U-13 STH | (Ecoson Ultrasonic Engineering, SK) |

4.4 Sterilizace

Sterilizace všech kultivačních medií a materiálu probíhala „autoklávováním“ po dobu 25 min při 121 °C pod přetlakem 0,15 kPa.

4.5 Kultivační media

Všechna media byla podle potřeby doplněna o agar v koncentraci 20 g/l. pH medií bylo upravováno použitím 3 mol/l NaOH a 3 mol/l HCl dle potřeby.

4.5.1 Medium s limitovaným (nízkým) obsahem dusíkatých látek- MM, dle Tien & Kirk [1988], pH = 4,5

A. Stopové prvky (hodnoty na 1 l)

| | |
|--------------------------------------|-------|
| MgSO ₄ | 3,0 g |
| MnSO ₄ | 0,5 g |
| NaCl | 1,0 g |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 g |
| CoCl ₂ | 0,1 g |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 g |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 1,0 g |
| CaCl ₂ | 0,1 g |

| | |
|--------------------------------|--------|
| H ₃ BO ₃ | 10 mg |
| Nitriloacetát | 1,5 g |
| deionH ₂ O | do 1 l |

B. Basální směs (hodnoty na 1 l)

| | |
|--------------------------------------|--------|
| KH ₂ PO ₄ | 20,0 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 5,0 g |
| CaCl ₂ | 1,0 g |
| Stopové prvky (viz A, str. 35) | 100 ml |
| deionH ₂ O | do 1 l |

C. Medium (hodnoty na 1 l)

| | |
|--------------------------------|--------|
| Glukosa | 10 g |
| Basální směs | 100 ml |
| 2,2'-dimethylsukcinát | 1,46 g |
| Thiamin | 1,0 g |
| Vínan amonný | 0,1 g |
| Stopové prvky (viz A, str. 35) | 60 ml |
| deionH ₂ O | do 1 l |

4.5.2 Glukosové medium „Malt extract“ - MEG (hodnoty na 1 l)

| | |
|-----------------------|--------|
| Malt extrakt Broth | 5 g |
| Glukosa | 10 g |
| deionH ₂ O | do 1 l |

4.6 Pufry

4.6.1 TAE pufr (pH = 8,5):

| | |
|-----------------------|---------|
| Tris | 242,0 g |
| EDTA | 37,0 g |
| deionH ₂ O | do 1 l |

4.6.2 TE pufr (pH = 8, pH bylo upraveno pomocí 3 mol/l NaOH)

| | |
|-----------------------|---------|
| Tris | 12,11 g |
| EDTA | 3,72 g |
| deionH ₂ O | do 1 l |

4.6.3 dcH₂O

Nejprve byl smíchán 1 l deionH₂O s 97% DEPC (konečná koncentrace 0,1 % v/v), poté byl ponechán přes noc při pokojové teplotě a „autoklávován“.

| | |
|-----------------------|--------|
| DEPC (97%) | 1 ml |
| deionH ₂ O | do 1 l |

4.6.4 10x MOPS pufr

| | | |
|---------|-------------|--------|
| smíchat | MOPS | 41,8 g |
| | octan sodný | 4,1 g |
| | EDTA | 3,72 g |

Rozpuštěno v 700 ml dcH₂O a upraveno na pH = 7 (3 mol/l NaOH v dcH₂O), poté doplněno do 1 l.

4.6.5 Tris pufr (pH = 8, pH bylo upraveno pomocí 3 mol/l NaOH)

| | |
|-----------------------|---------|
| Tris | 12,11 g |
| deionH ₂ O | do 1 l |

4.7 Kultivace houbových kultur v tekutém mediu

„Prekultury“ byly připraveny ve 250 ml Erlenmayerových baňkách s 20 ml tekutého media a „zaočkovány“ dvěma disky (o průměru přibližně 8 mm) ze zásobní kultury rostoucí na MEG miskách. Tyto prekultury byly inkubovány 7 dní při 28 °C a poté byly homogenizovány 1 minutu přístrojem Ultra-Turrax T25 (Janke & Kukul, IKA-Labortechnik, Německo) za sterilních podmínek. Na kultivaci kultury byly použity opět 250 ml Erlenmayerovy baňky s 20 ml media, do kterých byl přidán 1 ml homogenizovaného inokula (5% v/v). Kultury byly inkubovány staticky při 28 °C. Experimenty byly prováděny v tripletech.

Do kultur bylo přidáváno 10 mg/l EE2 (zásobní směs EE2 obsahovala 2000 mg/l a byla rozpuštěna v 99,5% DMSO). Do biologických kontrol bylo místo EE2 přidáno 100 µl DMSO (99,5%, pro GC).

Doby kultivace a přidání EE2 byly závislé na typu pokusu. Byly použity tyto typy:

A. Kultivace 14 dní (*I. lacteus*, *T. versicolor*, *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*). EE2 byl přidán první den kultivace. Kultivace probíhala 14 dní. Vzorky na analýzu enzymových aktivit (200 µl/odběr) odebírány 2., 4., 7., 9., 11. a 14. den kultivace. 3, 7 a 14 dní staré kultury byly použity na kvantitativní stanovení EE2.

B. Kultivace 10 dní (*I. lacteus*, *T. versicolor*, *P. chrysosporium*, *P. ostreatus*). EE2 byl přidán první den kultivace. Kultivace probíhala 10 dní. Po 10-ti dnech byly kultury rozděleny filtrací na mycelium a supernatant.

C. Kultivace 5 dní (*T. versicolor*). EE2 byl přidán první den kultivace. Kultivace probíhala 5 dní. Supernatanty ke studiu profilu *pI* Lac byly použity z 1., 2. a 5. dne kultivace. Mycelium získané filtrací kultur bylo použito na extrakci totální RNA.

D. Kultivace 14 dní (*I. lacteus*). EE2 byl přidán první den kultivace. Kultivace probíhala 14 dní. Supernatanty ke studiu profilu *pI* MnP byly použity ze 7., 9., 12. a 14. dne kultivace. Mycelium získané filtrací kultur bylo použito na extrakci totální RNA.

4.8 Stanovení enzymových aktivit

4.8.1 Enzymové aktivity v supernatantu houbových kultur

Enzymové aktivity v tekutých kulturách byly měřeny použitím standardních spektrofotometrických metod. Toto měření bylo prováděno na přístroji

SPECTRAMaxPlus³⁸⁴ (Molecular Devices Corporation, USA). Pro zjištění enzymových aktivit byla použita kultivační tekutina odebraná z kultur v jednotlivých dnech kultivace. Jako substráty enzymů byly použity látky, které jsou uvedeny v kapitolách 4.8.1.1, 4.8.1.2 a 4.8.1.3, pojednávajících o jednotlivých enzymech. Jednotka enzymové aktivity (U) je vyjádřena jako množství enzymu, které přemění 1 μmol substrátu za 1 minutu.

Pro výpočet byl použit vzorec:

$$EA = (\Delta A_{1\text{min}} * V_{\text{rm}}) / (\epsilon_{\lambda} * V_{\text{sam}})$$

| | |
|--------------------------|--|
| EA | enzymová aktivita (U/l) |
| $\Delta A_{1\text{min}}$ | změna absorbance reakční směsi za 1 min |
| V_{rm} | objem reakční směsi (l) |
| ϵ_{λ} | molární extinkční koeficient enzymového substrátu ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) |
| V_{sam} | objem vzorku (l) |

Pro vyjádření enzymové aktivity v jednotkách U/g byly vypočítané hodnoty EA nejprve vynásobeny objemem kultury a poté vyděleny suchou hmotností mycelia získaného z kultur.

4.8.1.1 *Lakasa*

Lakasová aktivita byla měřena pomocí oxidace ABTS (2,2'-azinodi-3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonátu) při $\lambda = 420 \text{ nm}$ [Matsumura et al., 1986] s molárním extinkčním koeficientem ABTS $\epsilon_{420} = 36\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Reakce byla startována přidáním ABTS do reakční směsi.

Složení reakční směsi:

- 20 μl vzorku
- 160 μl 120 mmol/l acetát sodný (pH = 5,0)
- 20 μl 50 mmol/l ABTS (start)

4.8.1.2 Mn-dependentní peroxidasa

Aktivita MnP byla měřena oxidací 2,6-dimethoxyfenolu (DMP) při $\lambda = 468 \text{ nm}$ [de Jong et al., 1994] s molárním extinkčním koeficientem $\varepsilon_{468} = 49\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Složení reakční směsi:

- | | |
|--------|---|
| 1. Lac | a. 20 μl vzorku |
| | b. 170 μl 65,8 mmol/l malonát sodný (pH = 4,5) |
| | c. 10 μl 20 mmol/l DMP (start) |
| 2. MnP | a. 20 μl vzorku |
| | b. 10 μl 20 mmol/l MnSO_4 |
| | c. 8 μl 10 mmol/l H_2O_2 |
| | d. 152 μl 65,8 mmol/l malonát sodný (pH = 4,5) |
| | e. 10 μl 20 mmol/l DMP (start) |
| 3. MIP | a. 20 μl vzorku |
| | b. 10 μl 20 mmol/l EDTA |
| | c. 8 μl 10 mmol/l H_2O_2 |
| | d. 152 μl 65,8 mmol/l malonát sodný (pH = 4,5) |
| | e. 10 μl 20 mmol/l DMP (start) |

Reakce byla zahájena přidáním DMP. Hodnota aktivity Mn-dependentní peroxidasy byla na závěr vypočtena odečtením hodnot měřených z reakční směsi 2. MnP a 3. MIP.

4.8.1.3 Ligninperoxidasa

Aktivita LiP byla měřena oxidací veratrylalkoholu (VeOH) při $\lambda = 310 \text{ nm}$ [Tien & Kirk, 1984] s molárním extinkčním koeficientem $\varepsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Složení reakční směsi:

- a. 30 μl vzorku
- b. 155 μl 0,1 mol/l vínan sodný (pH = 3,0)
- c. 10 μl 54 mmol/l H_2O_2
- d. 5 μl 20 mmol/l VeOH (start)

4.8.2 Enzymy obsažené v myceliu oxidující ABTS

Houbové mycelium (z kultivace B viz kapitola 4.7) bylo homogenizováno pomocí Ultra-Turrax T25 (Janke & Kukel, IKA-Labortechnik, Německo) a promyto 0,1 mol/l octanem sodným (pH = 5,0). Pro měření enzymové aktivity byly použity vzorky mycelia odpovídající 20 mg (mokrá hmotnost). Vzorky byly inkubovány v pufru s ABTS 1 min při pokojové teplotě se stálým mícháním. Po inkubaci bylo mycelium separováno centrifugací (0,5 min, max g) a byla měřena absorbance supernatantu při 420 nm. Jako blank byla použita reakční směs inkubovaná bez mycelia. Vzorky mycelia byly vysušeny (24 hod, 105 $^{\circ}\text{C}$) a zváženy. Enzymová aktivita byla vyjádřena v jednotkách U/mg suché hmotnosti mycelia. Jedna jednotka U byla definována jako množství enzymu konvertující 1 μmol substrátu za 1 minutu.

| | | |
|------------------------|---|-------------------|
| Složení reakční směsi: | mycelium | 20 mg |
| | 120 mmol/l octan sodn ý (pH = 5,0) | 900 μl |
| | 50 mmol/l ABTS (start) | 100 μl |

Výpočet aktivity:

$$\text{EA (U/mg)} = (A_{60} \cdot V_{\text{RM}}) / (\epsilon_{\lambda} \cdot m_{\text{vz}})$$

EA enzymová aktivita

A_{60} změna absorbance supernatantu za 1 min

V_{RM} objem reakční směsi (0,001 l)

ϵ_{λ} molární extinkční koeficient (0,036 $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

m_{vz} suchá hmotnost vzorku mycelia (mg)

4.9 Stanovení suché hmotnosti houbové biomasy

Obsah baněk byl filtrován a mycelium promyto destilovanou vodou. Poté bylo mycelium sušeno při teplotě 105 °C po dobu 24 hodin na předváženém filtračním papíře. Množství biomasy bylo stanoveno vážením na analytických vahách.

4.10 Inkubace EE2 s extracelulárními enzymy a myceliem testovaných hub *in vitro*

Ke studiu degradačních schopností mycelia testovaných hub a extracelulárních enzymů byly použity 10 dní staré kultury (kultivace B viz kapitola 4.7). Po 10-ti dnech byly kultury rozděleny filtrací na mycelium a supernatant. Mycelium bylo promyto vodou a následně homogenizováno Ultra-Turraxem T25 (Janke & Kukul, IKA-Laborotechnik, Německo). Supernatant byl koncentrován ultrafiltrací přes 10 kDa cut-off membránu. Složení reakčních směsí, použitých v pokusu, je uvedeno v Tab. 1 a 2 (str. 43).

Tab. 1 Složení reakční směsi pro degradaci EE2 *P. chrysosporium*, *I. lacteus*, *P. ostreatus*

| | mycelium ZK | mycelium MK | extracel ZK | extracel MK | extracel ZK Mn H₂O₂ | extracel MK Mn H₂O₂ |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--|--|
| NaAC pufr 300 mmol/l | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl |
| EE2 (200 ppm v 50% DMSO) | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| voda | 1500 µl | 1500 µl | 500 µl | 1000 µl | 200 µl | 700 µl |
| mycelium ZK | 60 mg | x | x | x | x | x |
| mycelium MK | x | 60 mg | x | x | x | x |
| extracel ZK | x | x | 1000 µl | x | 1000 µl | x |
| extracel MK | x | x | x | 500 µl | x | 500 µl |
| MnSO₄ 20 mmol/l | x | x | x | x | 100 µl | 100 µl |
| H₂O₂ 10 mmol/l | x | x | x | x | 200 µl | 200 µl |
| objem celkem (ml) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| počet vialek | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Tab. 2 Složení reakční směsi pro degradaci EE2 *T. versicolor*

| | mycelium ZK | mycelium MK | extracel ZK | extracel MK | extracel ZK Mn H ₂ O ₂ | extracel MK Mn H ₂ O ₂ |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|--|--|
| NaAC pufr 300 mmol/l | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl | 400 µl |
| EE2 (200 ppm v 50% DMSO) | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| voda | 1500 µl | 1500 µl | 1300 µl | 1400 µl | 1000 µl | 1100 µl |
| mycelium ZK | 60 mg | x | x | x | x | x |
| mycelium MK | x | 60 mg | x | x | x | x |
| extracel ZK | x | x | 200 µl | x | 200 µl | x |
| extracel MK | x | x | x | 100 µl | x | 100 µl |
| MnSO ₄ 20 mmol/l | x | x | x | x | 100 µl | 100 µl |
| H ₂ O ₂ 10 mmol/l | x | x | x | x | 200 µl | 200 µl |
| objem celkem (ml) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| počet vialek | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |

Vzorky byly inkubovány 24 hod při 28 °C za stálého míchání (100 rpm). Jako kontrola bylo použito mycelium testovaných hub a supernatant inaktivované převařením (30 min, 100 °C), v tabulce označené jako MK. Jako ZK bylo označeno aktivní mycelium a supernatant bez převaření.

4.11 Kvantitativní stanovení koncentrace EE2

Pro stanovení koncentrace EE2 v celé kultuře byl nejprve celý obsah kultury (mycelium a kultivační tekutina) homogenizován a okyselen 1 mol/l HCl na pH = 2. Poté byly kultury extrahovány 5x 10 ml ethylacetátu. Extrakce probíhala 10 min na třepačce (150 rpm) a 10 min v ultrazvukové lázni. Extrakty byly vysušeny pomocí síranu sodného a koncentrovány pod proudem dusíku na konečný objem 10 ml. Pro analýzu pomocí HPLC byl ethylacetátový extrakt smíchán s acetonitrilem v poměru 1:10 (v/v).

Vzorky po inkubaci *in vitro* byly okyseleny 20 µl 1 mol/l HCl a extrahovány 5x 1 ml ethylacetátu. Extrakce probíhala 10 min na třepačce (150 rpm) a 10 min v ultrazvukové lázni. Extrakty byly sušeny pod dusíkem do objemu 2,5 ml a následně sušeny pomocí síranu sodného. Ze síranové kolonky byly extrakty vymývány 5x 1 ml ethylacetátu a vysušeny do sucha. Na závěr byly extrakty rozpuštěny v 1 ml acetonitrilu a použity pro HPLC analýzu.

Vzorky byly analyzovány pomocí HPLC s UV detekcí (Waters 2695 Separations Module, USA) s diode-array detektorem (Waters 2996). EE2 byl eluován isokraticky ve 48% acetonitrilu při 38 °C s retenčním časem 7,3 min. Pro separaci byla použita kolona LichroCart (250 mm x 5 mm) s náplní LichroSphere RP-18e (velikost částic 5 µm, Merck, Německo). Vzorek byl dávkován po 10 µl a průtok kolony byl 1 ml min⁻¹. Jako standard byl použit roztok EE2 o koncentraci 20 mg/l (rozpuštěno v acetonitrilu).

4.12 Izoelektrická fokusace IEF

Ke studiu profilu *pI* Lac byly použity supernatanty z 1., 2. a 5. (kultivace C viz kapitola 4.7) dne kultivace *T. versicolor* v tekutém mediu MM. Ke studiu profilu *pI* MnP *I. lacteus* byly použity supernatanty ze 7., 9., 12. a 14. (kultivace D viz kapitola 4.7) dne kultivace v tekutém mediu MM. IEF byla prováděna na stroji Multiphor II electrophoresis systém (Pharmacia Biotech, Švédsko) za nativních podmínek. Nativní gel 7,5% (CleanGel IEF, GE Healthcare, Švédsko) byl rehydratován s použitím amfolitů o *pI* 2,5 – 5,0 a 3,0 – 10,0 (Pharmacia, Švédsko). Fokusace probíhala při 4 °C a napětí 1500 V, limitní hodnota proudu byla 25 mA. Pro vytvoření gradientu pH v gelu byl gel nejprve pod napětím 1500 V 20 minut. Poté byly na gel pomocí nanášecích papírků naneseny vzorky (jednomu papírku odpovídalo 20 µl vzorku, celkem pět papírků na sobě) a gel byl „fokusován“ 40 min. Následně byly nanášecí papírky z gelu odstraněny a fokusace pokračovala dalších 100 min.

Měření *pI* v gelu bylo prováděno pomocí dotykové elektrody P17 (Sentek). Gel byl aktivně obarven, v případě Lac pomocí ABTS (5 mmol/l v 120 mmol/l octanu sodném, pH = 5,0) a v případě MnP pomocí DMP (2 mmol/l v 65 mmol/l malonátu sodném) s přídavkem H₂O₂ (finální koncentrace 0,5 mmol/l) a MnSO₄ (finální koncentrace 1 mmol/l).

Složení rehydratační lázně:

| | |
|---------------------------------|----------|
| Sorbitol | 1,1 g |
| Pharmalyte <i>pI</i> 2,5 – 5,0 | 1,98 ml |
| Pharmalyte <i>pI</i> 3,0 – 10,0 | 0,22 ml |
| dH ₂ O | do 11 ml |

4.13 Izolace genomické DNA z houbového mycelia

Houbové mycelium získané z agarové kultury *T. versicolor* a *I. lacteus* bylo lyofilizováno a homogenizováno Ultra-Turraxem T25. Izolace genomické DNA (gDNA) byla provedena metodou dle Zolana & Pukkily [1986]. Mycelium (cca 40 mg) bylo rozpuštěno v 600 µl extrakčního pufru a inkubováno 30 min při 60 °C. Následně bylo přidáno 600 µl roztoku chloroform:isoamylalkoholu (24:1). Směs byla centrifugována 5 minut při 16000 g. Vodná fáze byla přenesena do nové mikrozkušavky s ekvivalentním množstvím isopropanolu a znovu centrifugována 30 s při 16000 g. Po následném odstranění supernatantu a přidání 300 µl Tris-EDTA pufru (TE, viz kapitola 4.6.2) a 3 µl RNasy A k peletě byla směs inkubována 30 min při 37 °C. Následně bylo přidáno 300 µl roztoku chloroform:isoamylalkoholu (24:1) a centrifugováno 5 minut při 16000 g. K vodné fázi bylo přidáno 50 µl 7,5 mol/l octanu amonného a 600 µl 96% ethanolu.

Po centrifugaci (30 s, 16000 g) byl odstraněn supernatant a peleta byla promyta 300 µl 0,2 mol/l octanu amonného a 600 µl 96% ethanolu. Po následné centrifugaci (1 minuta, 16000 g) byl supernatant vysušen (ve vakuové odstředivce) a peleta resuspendována v 50 µl TE pufru.

Složení extrakčního pufru:

| | |
|--|---------|
| „Hexadeciltrimethylamonium bromide“ | 10 g |
| NaCl | 40,88 g |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethan pH 8,0 | 6,055 g |
| Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) | 2,922 g |
| 2-merkptoethanol | 10 ml |
| deionH ₂ O | do 1 l |

4.14 Stanovení koncentrace DNA

Koncentrace DNA byla měřena na spektrofotometru Nanodrop ND – 1000 (Thermo Scientific, USA). Výsledná koncentrace byla udávána v ng/µl. Čistota vzorku DNA byla ověřována pomocí stanovení poměru absorbance měřené při 260 nm a 280 nm. Vzorek byl považován za čistý, pokud se výsledný poměr pohyboval v rozmezí 1,7 - 1,8.

4.15 Řetězová polymerasová reakce (PCR) užitá pro detekci genů

4.15.1 PCR genu *lac* v gDNA *T. versicolor*

Geny kódující Lac byly detekovány v gDNA pomocí PCR se specifickými primery *laccTv-F* a *laccTv-R* [Hiscox et al., 2010] a degenerovanými primery *Cu1F* a *Cu2R* [Luis et al., 2004].

Forward 5'-CAYTGGCAYGGNTTYTTYCA-3' (*Cu1F*, primer f)

Reverse 5'-GRCTGTGGTACCAGAANGTNCC-3' (*Cu2R*, primer r)

Forward 5'-CTTCAACGGCACCAACTTCTT-3' (*laccTv*, primer f)

Reverse 5'-GAAGTCGATGTGGCAGTGGAG-3' (*laccTv*, primer r)

PCR byla prováděna na PCR cykleru T Gradient (Biometra, Německo) za podmínek uvedených v Tab. 3 (str. 47) a Tab. 4 (str. 47). Výsledek každé PCR byl ověřen na agarosovém gelu (viz kapitola 4.16.1).

Složení směsi pro PCR pro specifické primery *laccTV-F* a *laccTv-R* (25 μ l):

| | |
|------------------------------------|--------------|
| 10x PCR pufr | 2,5 μ l |
| dNTP (2,5 mmol/l každý) | 0,5 μ l |
| DyNAzyme polymerasa (2 U/ μ l) | 0,7 μ l |
| Primer f (10 μ mol/l) | 0,5 μ l |
| Primer r (10 μ mol/l) | 0,5 μ l |
| DNA (cca 100 ng do reakce) | 1,0 μ l |
| deionH ₂ O | 18,3 μ l |

Složení směsi pro PCR pro degenerované primery Cu1F a Cu2R (25 µl):

| | |
|-------------------------------|---------|
| 10x PCR pufr | 2,5 µl |
| dNTP (2,5 mmol/l každý) | 0,5 µl |
| DyNAzyme polymerasa (2 U/ µl) | 0,7 µl |
| Primer f (50 µmol/l) | 0,5 µl |
| Primer r (50 µmol/l) | 0,5 µl |
| DNA (cca 100 ng do reakce) | 1,0 µl |
| deionH ₂ O | 18,3 µl |

Tab. 3 Podmínky PCR pro specifické primery laccTv-R a laccTv-F

| | Čas | Teplota |
|--------------------------|--------|---------|
| 1. Iniciace denaturace | 2 min | 94 °C |
| 2. Denaturace | 30 s | 94 °C |
| 3. Nasedání primerů | 30 s | 58 °C |
| 4. Polymerace | 45 s | 72 °C |
| 5. Ukončení polymerace | 10 min | 72 °C |
| Počet cyklů (krok 2 - 4) | 35 | |

Tab. 4 Podmínky PCR pro degenerované primery Cu1F a Cu2R

| | Čas | Teplota |
|--------------------------|--------|---------|
| 1. Iniciace denaturace | 2 min | 94 °C |
| 2. Denaturace | 30 s | 94 °C |
| 3. Nasedání primerů | 30 s | 54 °C |
| 4. Polymerace | 45 s | 72 °C |
| 5. Ukončení polymerace | 10 min | 72 °C |
| Počet cyklů (krok 2 - 4) | 35 | |

4.15.2 PCR genu *mnp* v gDNA *I. lacteus*

Geny kódující Mn-dependentní peroxidasu byly detekovány v gDNA pomocí PCR reakce s degenerovanými primery *mnpHet-F* a *mnpHet-R* [Maijala et al., 2003] a *mnp-U* a *mnp-L* [Nagai et al., 2007].

Forward 5'-GGHGGTGCCGATGGSTC-3' (*mnpHet-F*, primer f)

Reverse 5'-TCRGA CTGGAGSCGCATC-3' (*mnpHet-R*, primer r)

Forward 5'-ACNTTYCAYGAYGCNAT-3' (mnp-U, primer f)

Reverse 5'-GGNGCNCCNGGRCARTT-3' (mnp-L, primer r)

PCR byla prováděna na PCR cykleru T Gradient (Biometra, Německo) za podmínek uvedených v Tab. 5. Výsledek každé PCR byl ověřen na agarosovém gelu (viz kapitola 4.16.1).

Složení PCR směsi (25 μ l):

| | |
|------------------------------------|--------------|
| 10x PCR pufr | 2,5 μ l |
| dNTP (2,5 mmol/l každý) | 0,5 μ l |
| DyNAzyme polymerasa (2 U/ μ l) | 0,7 μ l |
| Primer f (50 μ mol/l) | 0,5 μ l |
| Primer r (50 μ mol/l) | 0,5 μ l |
| DNA (cca 100 ng do reakce) | 1,0 μ l |
| deionH ₂ O | 18,3 μ l |

Tab. 5 Podmínky PCR

| | Čas | Teplota |
|--------------------------|--------|---------|
| 1. Iniciace denaturace | 2 min | 94 °C |
| 2. Denaturace | 30 s | 94 °C |
| 3. Nasedání primerů | 30 s | 58 °C |
| 4. Polymerace | 45 s | 72 °C |
| 5. Ukončení polymerace | 10 min | 72 °C |
| Počet cyklů (krok 2 - 4) | 35 | |

4.16 Agarosová elektroforéza genů lakasy a Mn-dependentní peroxidasy

4.16.1 Agarosová elektroforéza DNA izolované z testovaných hub

Na agarosový gel bylo nanášeno 10 μ l reakční směsi získané po PCR s 1,5 μ l nanášecího pufru (6x „Orange loading dye solution“). Jako standard byl používán „100 bp DNA ladder“ (5 μ l) nebo „Low molecular weight DNA ladder“ (5 μ l). Elektroforéza probíhala v 1x Tris-acetát-EDTA pufru (TAE).

| | | | |
|-------------------------|------------|-----------------|------------|
| Podmínky elektroforézy: | pro 1% gel | proud | max 500 mA |
| | | napětí | 90 V |
| | | čas | 30 min |
| | pro 2% gel | proud | max 500 mA |
| | | napětí | 95 V |
| | | čas | 35 min |
| Agarosový gel: | 1% (40 ml) | agarosa | 0,4 g |
| | | 1x TAE pufr | do 40 ml |
| | | EtBr (10 mg/ml) | 8 μ l |
| | 2% (40 ml) | agarosa | 0,8 g |
| | | 1x TAE pufr | do 40 ml |
| | | EtBr (10 mg/ml) | 8 μ l |

4.16.2 Agarosová elektroforéza RNA izolované z testovaných hub

Aparatura byla předem ošetřena 6 mol/l NaOH. Na gel bylo nanášeno 3 μ l vzorku RNA se 7 μ l nanášecího pufru. Elektroforéza probíhala v 1x MOPS pufru.

| | | |
|-------------------------|-------------------------------------|------------|
| Podmínky elektroforézy: | proud | max 500 mA |
| | napětí | 90 V |
| | čas | 30 min |
| Agarosový gel (50 ml): | agarosa | 0,6 g |
| | dcH ₂ O | 35 ml |
| | po uvaření přidáno MOPS (0,2 mol/l) | 5 ml |
| | formaldehyd | 10 ml |

| | | |
|----------------|-----------------------------|-------------|
| Nanášecí pufr: | formamid | 660 μ l |
| | formaldehyd | 80 μ l |
| | bromfenolová modř (100 g/l) | 10 μ l |
| | EtBr (10 g/l) | 10 μ l |
| | 10x MOPS pufr | 100 μ l |

4.17 Extrakce DNA z agarosového gelu

Metoda dle Boyle & Lew [1995]. DNA byla vyříznuta po separaci DNA na agarosovém gelu s použitím TAE pufru. Gel obsahující DNA byl inkubován 5 min v 6 mol/l NaI (3x ekvivalentní množství gelu, 1 g ~ 1 ml) při 55 °C s občasným promícháním až do rozpuštění gelu. Následně bylo k suspenzi přidáno 10 μ l resuspendující silikonové suspenze (100 mg/ml SiO₂ v 3 mol/l NaI) a směs byla inkubována 5 min při 55 °C (občasné promíchání). Po 5 s centrifugací (10000 g) byl odstraněn supernatant a peleta byla 3x promyta 500 μ l vychlazeného promývacího pufru. Peleta byla poté resuspendována v 10 μ l 0,1x TE pufru, inkubována 5 min při 55 °C a centrifugována (30 s, 10000 g). Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky. Tento krok byl opakován ještě s 5 μ l 0,1x TE. Množství DNA bylo měřeno spektrofotometricky.

4.18 Izolace celkové RNA z houbového mycelia

Houbové mycelium získané filtrací kultur přes Büchnerovu nálevku bylo rozemleto v tekutém dusíku na jemný prášek. Prášek byl přenesen do mikrozkušavky v množství dosahující úrovně 200 μ l. Následně bylo přidáno 500 μ l denaturačního roztoku, 50 μ l 2 mol/l octanu sodného (272,16 g/l), 500 μ l fenolu a 100 μ l směsi chloroform:isoamylalkoholu (49:1). Po přidání každé složky byla suspenze jemně zamíchána. Poté následovala 15-ti minutová inkubace na ledě. Po centrifugaci (4 °C, 15000 g, 15 min) byla přenesena vodná fáze do nové mikrozkušavky společně s ekvivaletním množstvím isopropanolu. Roztok byl následně inkubován 30 min při -20 °C. Následovala centrifugace (4 °C, 15000 g, 5 min). Poté byla peleta promyta v 500 μ l 75% ethanolu a inkubována 15 min při pokojové teplotě. Po centrifugaci (4 °C, 15000 g, 5

min) byl supernatant slit, peleta byla plně vysušena na vzduchu při pokojové teplotě a resuspendována ve 100 μl dcH_2O . RNA byla skladována při $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Obsah RNA v roztoku byl měřen spektrofotometricky. Výsledek izolace byl vizualizován na agarosovém gelu (viz kapitola 4.16.2).

4.19 Reverzní transkripce RNA izolované z testovaných hub

Izolovaná RNA (normalizované množství 1000 ng) byla inkubována s DNasou I pro odstranění residuální DNA po dobu 25 min při pokojové teplotě (složení reakční směsi viz níže). Následně byl do směsi přidán roztok „Stop solution“ (2 μl 25 mmol/l EDTA). Celá směs byla inkubována 10 min při $70\text{ }^\circ\text{C}$. Takto inkubovaná RNA byla chlazená na ledě. Úspěšná izolace RNA byla prokázána pomocí PCR (viz kapitola 4.15) s 2 μl RNA jako templátem, kde absence produktu PCR znamenala úspěšné odstranění DNA.

Samotný přepis probíhal pomocí tzv. „random“ hexamer primeru (2 μl do směsi ošetřené DNasou I). RNA byla inkubována s primerem 10 min při $70\text{ }^\circ\text{C}$ a následně chlazená na ledě. Poté byla ke vzorku přidána reakční směs pro přepis RNA (viz níže). Inkubace probíhala 5 min při $37\text{ }^\circ\text{C}$. Nakonec byly přidány 2 μl reverzní transkriptasy H⁻M-MuLV. Tato směs byla inkubována nejprve 60 min při $42\text{ }^\circ\text{C}$ a 10 min při $70\text{ }^\circ\text{C}$, následně pak chlazená na ledě. Správnost přepisu byla ověřena pomocí PCR (viz kapitola 4.15), kde byl na následné agarosové elektroforéze detekován amplifikovaný fragment.

Složení reakční směsi pro odstranění DNA DNasou I:

| | |
|--|------------------|
| RNA (cca 1000 ng) | 15 μl |
| 10x reakční pufr pro DNasu I | 2 μl |
| DNasa I (1 U/ μl) | 2 μl |
| „Riblock inhibitor“ (40 U/ μl) | 1 μl |

Složení reakční směsi pro přepis RNA:

| | |
|--|-----------------|
| 10x pufr pro M-MuLV reverzní transkriptasu | 4 μl |
| MgCl_2 (50 mmol/l) | 1 μl |
| dNTP (10 mmol/l každý) | 4 μl |
| „Riblock inhibitor“ (40 U/ μl) | 1 μl |
| dcH_2O | 4 μl |

4.20 Kvantitativní PCR genů *lac* *T. versicolor* a *mnp I. lacteus*

4.20.1 Kvantitativní PCR genu *lac* houby *T. versicolor*

Analýza probíhala na přístroji StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Na kvantifikaci transkriptu *Lac* v cDNA bylo použito normalizované množství cDNA (2 μ l vzorku). PCR probíhala za podmínek uvedených v Tab. 6 (str. 53). V reakci byly použity degenerované primery Cu1F a Cu2R [Luis et al., 2004] a specifické primery *laccTv-F* a *laccTv-R* [Hiscox et al., 2010] popsané v kapitole 4.15.1. Použita byla komerční směs Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA). Normalizace výsledků proběhla porovnáním s kvantifikací transkriptů konstitutivně exprimovaného referenčního genu pro aktin, který byl amplifikován pomocí primerů *Act1* a *Act2* popsáných v práci Luis et al. [2005]. Jako standardy pro odečtení výtěžnosti PCR byly v amplifikaci použity „naamplifikované“ fragmenty gDNA genů kódujících lakasu (amplifikace pomocí primerů *laccTv-F* / *laccTv-R*, koncentrace 100 – 0,39 ng/ μ l a amplifikace pomocí primerů Cu1F / Cu2R, koncentrace 645 – 0,098 ng/ μ l) a genu kódujícího aktin (amplifikace pomocí primerů *Act1* / *Act2*, koncentrace 1,85 – 2,82 10^{-4} ng/ μ l).

Forward 5'-GHCACCAGGGTGTNATGGTCG-3' (*Act1*, primer f)

Reverse 5'-GCCAGATCTTCTCAATGTCRTCCC-3' (*Act2*, primer r)

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí vzorce:

$$A/B = (1+E_{\text{ref}})^{Ct_{\text{Aref}}-Ct_{\text{Bref}}} / (1+E_{\text{tar}})^{Ct_{\text{Atar}}-Ct_{\text{Btar}}}$$

A vzorek A (kultury s přidaným EE2)

B vzorek B (kontrolní kultury)

E výtěžnost PCR (0-1)

tar cílový gen (*lac*)

ref referenční gen (*act*)

Ct zjištěná hodnota Ct

Složení reakční směsi pro specifické primery laccTv-F a laccTv-R (20 µl):

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Power SYBR [®] Green PCR mix | 10 µl |
| Primer f (10 µmol/l) | 0,4 µl |
| Primer r (10 µmol/l) | 0,4 µl |
| „Bovine serum albumin“ (4 mg/l) | 2 µl |
| deionH ₂ O | 5,08 µl |
| cDNA | 2 µl |

Složení reakční směsi pro degenerované primery Cu1F a Cu2R (20 µl):

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Power SYBR [®] Green PCR mix | 10 µl |
| Primer f (50 µmol/l) | 0,4 µl |
| Primer r (50 µmol/l) | 0,4 µl |
| „Bovine serum albumin“ (4 mg/l) | 2 µl |
| deionH ₂ O | 5,08 µl |
| cDNA | 2 µl |

Tab. 6 Podmínky PCR pro přepis genů kódujících lakasu:

| | Čas | Teplota |
|--------------------------|--------|---------|
| 1. Iniclace denaturace | 10 min | 95 °C |
| 2. Denaturace | 20 s | 95 °C |
| 3. Nasedání primerů | 20 s | 55 °C |
| 4. Polymerace | 40 s | 72 °C |
| Počet cyklů (krok 2 – 4) | 40 | |

Po ukončení polymerace následovala analýza disociace produktů PCR (tzv. analýza „melting curve“). Analýza probíhala 15 s při 95 °C, poté 1 min při 65 °C a nakonec bylo dosaženo teploty 95 °C kroky po 0,1 °C, která byla držena po dobu 15 s.

4.20.2 Kvantitativní PCR genu *mnp* houby *I. lacteus*

Analýza probíhala na přístroji StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Na kvantifikaci transkriptu Mn-dependentní peroxidasy v cDNA bylo použito normalizované množství cDNA (2 µl vzorku). PCR probíhala za podmínek uvedených

v Tab. 7 (str. 55). V reakci byly použity degenerované primery *mnp-U* a *mnp-L* [Nagai et al., 2007] popsané v kapitole 4.12.2. Použita byla komerční směs SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Takara Bio Inc., Japonsko) a ROX Reference Dye II 50x (Takara Bio Inc., Japonsko). Normalizace výsledků proběhla porovnáním s kvantifikací transkriptů konstitutivně exprimovaného referenčního genu pro aktin, který byl amplifikován pomocí primerů popsaných v práci Luise et al. [2005]. Jako standardy pro odečtení výtěžnosti PCR byly v amplifikaci použity „naamplifikované“ fragmenty gDNA genů kódujících *MnP* (amplifikace pomocí primerů *mnp-U* / *mnp-L*, koncentrace 52,3 – 7,97 10⁻³ ng/μl) a genu kódujícího aktin (amplifikace pomocí primerů *Act1* / *Act2*, koncentrace 55,9 – 8,52 10⁻³ ng/μl).

Forward 5'-GHCACCAGGGTGTNATGGTTCG-3' (*Act1*, primer f)

Reverse 5'-GCCAGATCTTCTCAATGTCRTCCC-3' (*Act2*, primer r)

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí vzorce:

$$A/B = (1+E_{ref})^{CtA_{ref}-CtB_{ref}} / (1+E_{tar})^{CtA_{tar}-CtB_{tar}}$$

A vzorek A (kultury s přidaným EE2)

B vzorek B (kontrolní kultury)

E výtěžnost PCR (0-1)

tar cílový gen (*mnp*)

ref referenční gen (*act*)

Ct zjištěná hodnota Ct

Složení reakční směsi (20 μl):

| | |
|--|---------|
| SYBR [®] Premix Ex Taq [™] | 10 μl |
| Primer f (50 μmol/l) | 0,4 μl |
| Primer r (50 μmol/l) | 0,4 μl |
| Bovine serum albumine (4 mg/l) | 2 μl |
| deionH ₂ O | 5,08 μl |
| ROX | 1 μl |
| cDNA | 2 μl |

Tab. 7 Podmínky PCR pro přepis genů kódujících Mn-dependentní peroxidasu:

| | Čas | Teplota |
|--------------------------|------|---------|
| 1. Iniclace denaturace | 20 s | 95 °C |
| 2. Denaturace | 20 s | 95 °C |
| 3. Nasedání primerů | 20 s | 58 °C |
| 4. Polymerace | 40 s | 72 °C |
| Počet cyklů (krok 2 – 4) | 40 | |

Po ukončení polymerace následovala analýza disociace produktů PCR (tzv. analýza „melting curve“). Analýza probíhala 15 s při 95 °C, poté 1 min při 65 °C a nakonec bylo dosaženo teploty 95 °C kroky po 0,1 °C, která byla držena po dobu 15 s.

4.21 Statistické zpracování

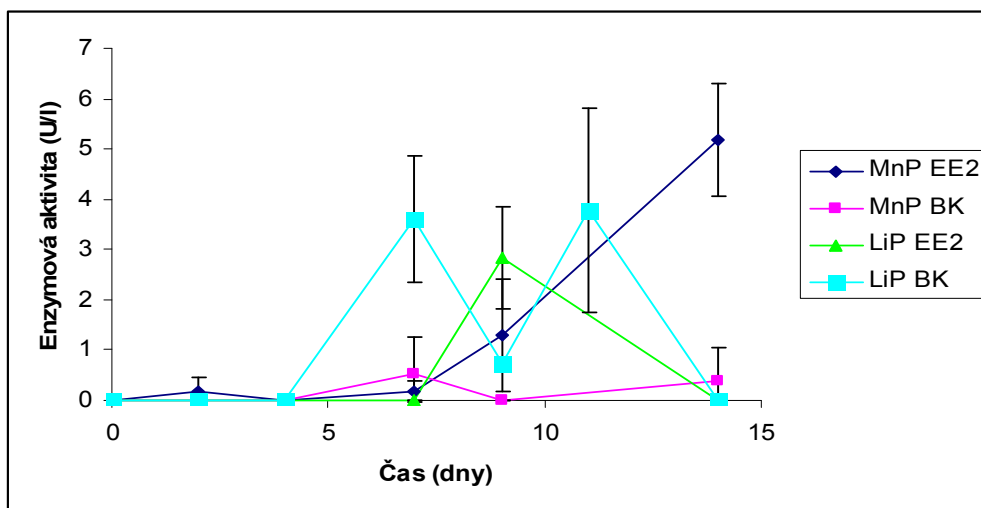
Všechna získaná data byla pro ověření průkaznosti zpracována standardními statistickými metodami (t test s hladinou pravděpodobnosti $\alpha = 0,05$).

5. Výsledky

5.1 Sledování enzymových aktivit v houbových kulturách

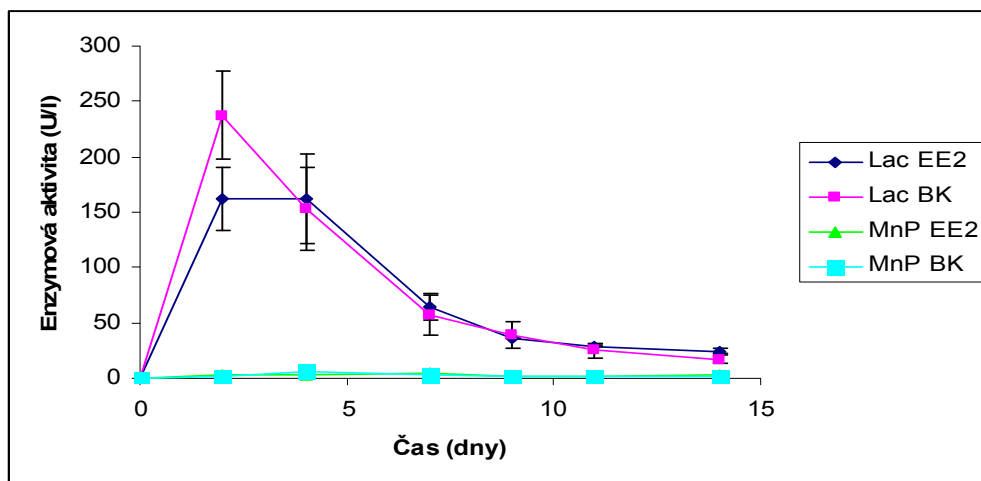
5.1.1 Kultivace houbových kultur v mediu MEG

V kulturách hub z kultivace A (viz kapitola 4.7) pěstovaných v mediu MEG v přítomnosti/absenci EE2 bylo stanovováno množství aktivních enzymů Lac, MnP a LiP produkovaných do supernatantu. Enzymová aktivita byla vyjádřena jako aktivita enzymu vztážená na 1 l supernatantu. Z Obr. 6 vyplývá, že k nejvyššímu nárůstu aktivity MnP v kulturách stimulovaných EE2 *P. chrysosporium* došlo 14. den kultivace, kdy byla zjištěna aktivita $5,2 \pm 1,1$ U/l MnP. Narozdíl od kultur exponovaných EE2 hladina enzymové aktivity MnP v biologických kontrolách zůstala nízká v průběhu celé kultivace (aktivita ve 14. dni kultivace dosáhla hodnoty $0,4 \pm 0,7$ U/l). V případě LiP byla v kulturách stimulovaných EE2 pozorována aktivita 9. den kultivace ($2,8 \pm 1,0$ U/l). V biologických kontrolách byla aktivita přítomna v kulturách 7. až 11. den kultivace. Z toho lze usuzovat, že přidání EE2 ke kulturám *P. chrysosporium* stimuluje expresi MnP a zároveň ovlivňuje i produkci LiP. V kulturách *P. chrysosporium* nebyla detekována žádná aktivita Lac.



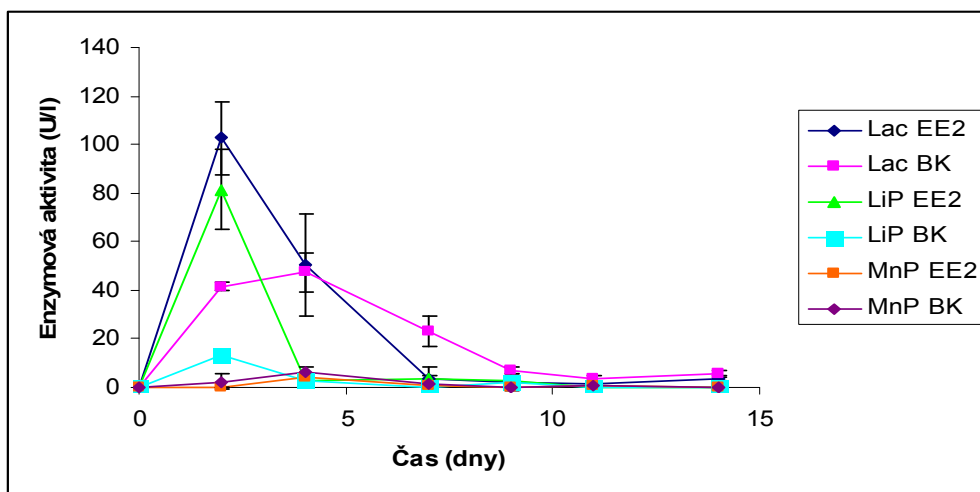
Obr. 6 Enzymové aktivity MnP a LiP zjištěné v supernatantu kultur *P. chrysosporium* pěstovaných v mediu MEG s/bez přidání EE2 (10 mg/l). Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.

V supernatantu kultur *P. ostreatus* byla zjištěna aktivita enzymů Lac a MnP. Z Obr. 7 lze pozorovat, že enzymové aktivity v kulturách stimulovaných EE2 a biologických kontrolách nevykazovaly žádné signifikantní rozdíly. EE2 v případě této houby tedy nijak neovlivňoval hladiny enzymových aktivit.



Obr. 7 Enzymové aktivity Lac a MnP zjištěné v supernatantu kultur *P. ostreatus* pěstovaných v mediu MEG s/bez přidání EE2 (10 mg/l). Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směřodonné odchylce těchto stanovení.

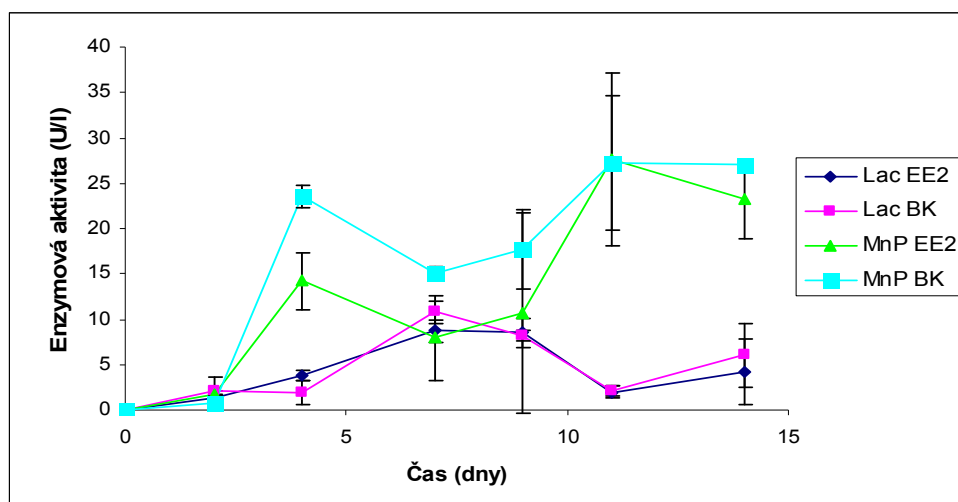
V kulturách *T. versicolor* pěstovaných v mediu MEG byly detekovány enzymové aktivity Lac, LiP a MnP. V kulturách stimulovaných EE2 došlo u Lac a LiP k významnému nárůstu aktivity 2. den kultivace (Obr. 8, str. 58). V případě Lac byla zjištěna hodnota aktivity $102,6 \pm 14,7$ U/l (biologická kontrola $41,5 \pm 1,7$ U/l), u LiP pak $81,4 \pm 16,6$ U/l (biologická kontrola $13,4 \pm 1,5$ U/l). Z toho lze usuzovat, že EE2 měl stimulační efekt na nárůst aktivity Lac i LiP. Aktivita MnP dosahovala nízkých hodnot (nejvyšší hodnota v biologických kontrolách 4. den kultivace, $6,1 \pm 2,6$ U/l) v průběhu celé kultivace.



Obr. 8 Enzymové aktivity Lac, LiP a MnP zjištěné v supernatantu kultur *T. versicolor* pěstovaných v mediu MEG s/bez přidání EE2 (10 mg/l). Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylky těchto stanovení.

V supernatantech kultur *I. lacteus* byla v přítomnosti/absenci EE2 zjištěna enzymová aktivita Lac a MnP (Obr. 9, str. 59). Aktivita LiP nebyla detekována. V případě MnP byla 4. a 7. den kultivace pozorována vyšší aktivita v biologických kontrolách ve srovnání s kulturami exponovanými EE2. Aktivita Lac byla srovnatelná jak v kulturách kontrolních tak i kulturách stimulovaných EE2 (Obr. 9, str. 59). V případě této houby byl tedy pozorován mírný inhibiční vliv EE2 na enzymovou aktivitu MnP.

Pro eliminaci vlivu nárůstu biomasy na expresi enzymových aktivit byl u *T. versicolor* a *I. lacteus* pěstovaných v mediu MEG stanovován přírůstek biomasy a hodnoty enzymové aktivity produkované kulturami (Lac *T. versicolor*, Tab. 8, str. 59 a MnP *I. lacteus*, Tab. 9, str. 60) byly vztaženy na množství suché biomasy kultur (aktivita enzymu U na 1 g suché hmotnosti mycelia v kultuře).



Obr. 9 Enzymové aktivity Lac a MnP zjištěné v supernatantu kultur *I. lacteus* pěstovaných v mediu MEG s/bez přidání EE2 (10 mg/l). Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.

Tab. 8 Enzymová aktivita Lac (U/g) a množství biomasy (mg) produkované kulturami *T. versicolor* v průběhu kultivace v mediu MEG. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a SD směrodatné odchylce měření.

| Den | EE2 | | BK | |
|-----|--------------|------|--------------|------|
| | Biomasa (mg) | ±SD | Biomasa (mg) | ±SD |
| 0 | 0,6 | 0,1 | 0,6 | 0,2 |
| 2 | 20,6 | 3,3 | 33,5 | 18,6 |
| 4 | 37,9 | 5,5 | 44,4 | 3,5 |
| 7 | 96,2 | 4,7 | 113,1 | 20,8 |
| 9 | 129,9 | 9,8 | 118,1 | 16,1 |
| 11 | 137,2 | 6,3 | 135,5 | 4,3 |
| 14 | 138,0 | 18,6 | 138,3 | 12,4 |
| Den | EA (U/g) | ±SD | EA (U/g) | ±SD |
| 0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2 | 99,6 | 14,3 | 24,8 | 1,0 |
| 4 | 26,6 | 11,2 | 21,3 | 3,7 |
| 7 | 0,7 | 0,3 | 4,1 | 1,1 |
| 9 | 0,4 | 0,3 | 1,2 | 0,3 |
| 11 | 0,3 | 0,0 | 0,5 | 0,2 |
| 14 | 0,6 | 0,1 | 0,8 | 0,2 |

Tab. 9 Enzymová aktivita MnP (U/g) a množství biomasy (mg) produkované kulturami *I. lacteus* v průběhu kultivace na MEG mediu. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a SD směrodatné odchylce měření.

| Den | EE2 | | BK | |
|-----|--------------|------|--------------|-----|
| | Biomasa (mg) | ±SD | Biomasa (mg) | ±SD |
| 0 | 0,3 | 0,1 | 0,2 | 0,1 |
| 2 | 12,6 | 1,1 | 12,3 | 0,4 |
| 4 | 17,1 | 2,7 | 14,6 | 1,4 |
| 7 | 27,1 | 2,1 | 25,4 | 0,6 |
| 9 | 32,6 | 0,7 | 28,9 | 1,0 |
| 11 | 45,2 | 10,5 | 30,9 | 4,9 |
| 14 | 45,5 | 5,9 | 51,3 | 2,8 |

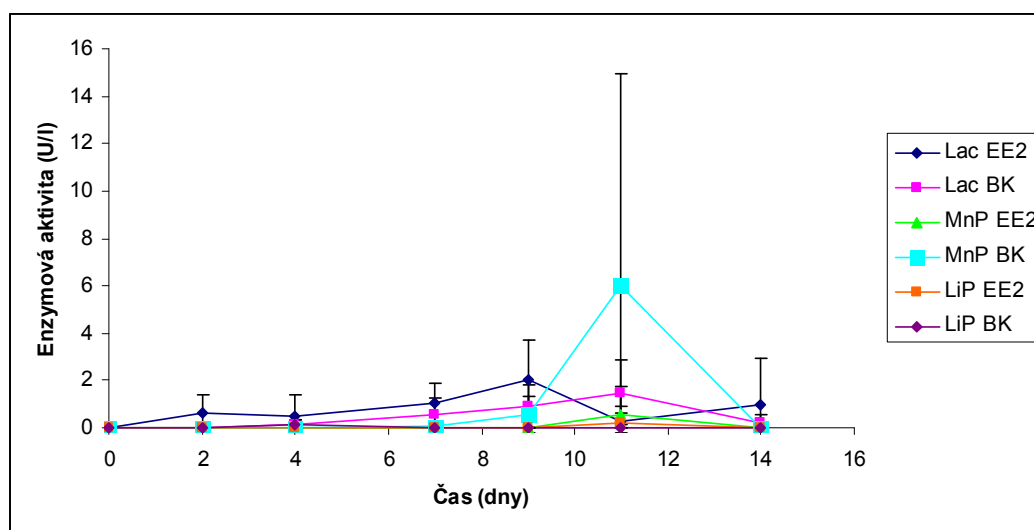
| Den | EA (U/g) | ±SD | EA (U/g) | ±SD |
|-----|----------|-----|----------|-----|
| 0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2 | 2,6 | 0,2 | 1,2 | 0,9 |
| 4 | 16,6 | 3,6 | 32,3 | 1,6 |
| 7 | 5,9 | 3,4 | 11,8 | 0,6 |
| 9 | 6,5 | 6,8 | 12,3 | 3,1 |
| 11 | 12,2 | 4,2 | 17,6 | 4,8 |
| 14 | 10,2 | 1,9 | 10,6 | 0,2 |

V případě obou hub nebyl pozorován žádný výrazný vliv EE2 na produkci biomasy v kulturách (Tab. 8, str. 59 a Tab. 9). V kulturách stimulovaných EE2 *T. versicolor* aktivita Lac dosáhla maxima 2. den kultivace ($99,6 \pm 14,3$ U/g), které bylo čtyřikrát vyšší než aktivita Lac v biologických kontrolách ($24,8 \pm 1,0$ U/g). U *I. lacteus* byla zjištěna maximální hodnota MnP v biologických kontrolách 4. den kultivace ($32,3 \pm 1,6$ U/g). Poté hladina enzymu v kulturách poklesla zhruba na jednu třetinu. Oproti tomu v kulturách stimulovaných EE2 hladina MnP dosáhla nejvyšší hodnoty $16,6 \pm 3,6$ U/g (4. den kultivace).

5.1.2 Kultivace houbových kultur v mediu MM

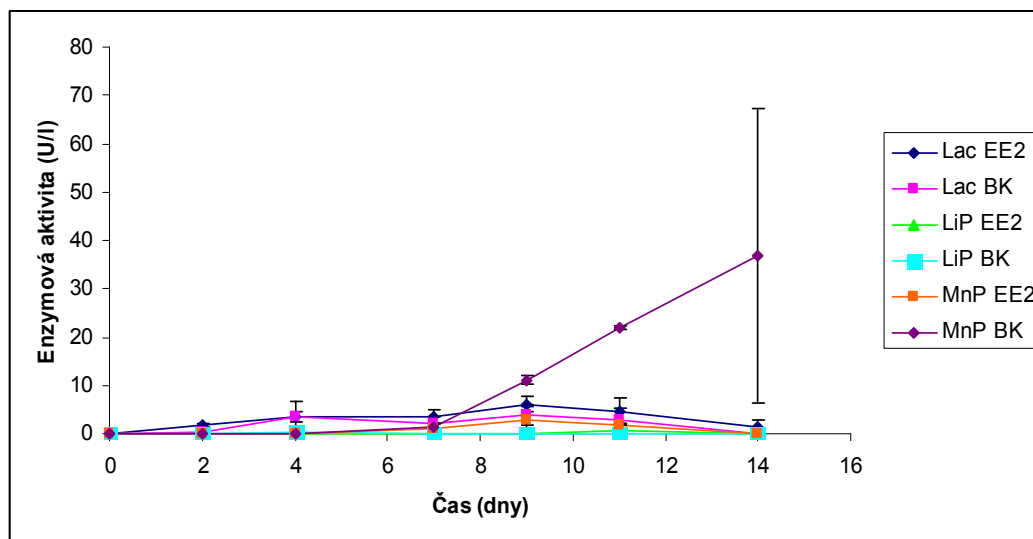
V kulturách hub z kultivace A (viz kapitola 4.7) pěstovaných v mediu MM v přítomnosti/absenci EE2 bylo stanovováno množství aktivních enzymů Lac, MnP a LiP produkovaných do supernatantu. Enzymová aktivita byla vyjádřena jako aktivita enzymu vztažená na 1 l supernatantu. Enzymové aktivity v kulturách *P. chrysosporium* stimulovaných EE2 a biologických kontrolách nevykazovaly signifikantní rozdíly (Obr.

10, str. 61). V kulturách byla detekována nízká aktivita Lac po celou dobu kultivace. Její hodnoty dosáhly maxima 9. den kultivace u kultur stimulovaných EE2 ($2,1 \pm 1,6$ U/l) a 11. den kultivace u biologických kontrol ($1,5 \pm 1,3$ U/l). V biologických kontrolách byla dále detekována 7. až 11. den kultivace nízká aktivita MnP. V kulturách exponovaných EE2 byla nízká aktivita MnP detekována 11. den kultivace.



Obr. 10 Enzymové aktivity Lac, MnP a LiP zjištěné v supernatantu kultur *P. chrysosporium* pěstovaných v mediu MM s/bez přidání EE2 (10 mg/l). Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.

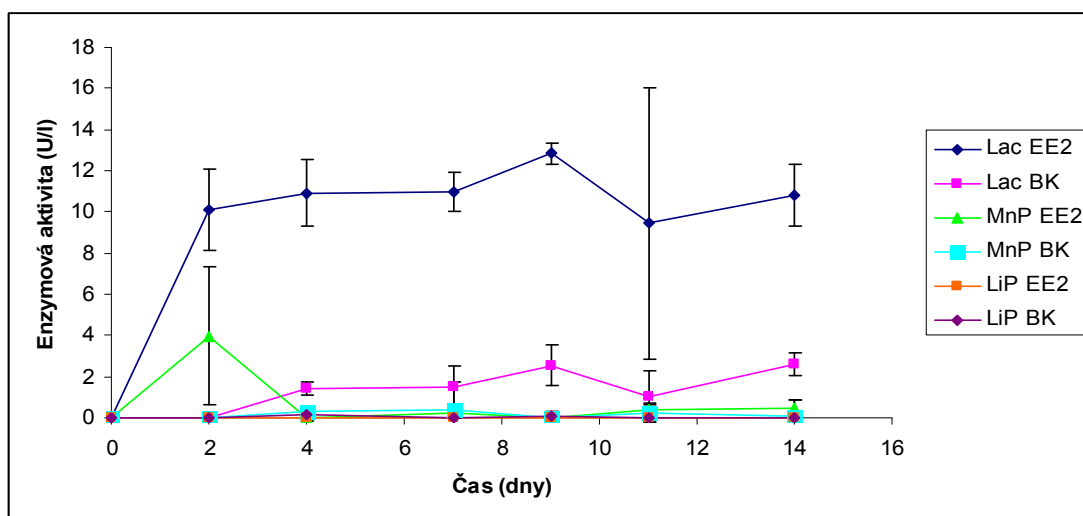
Obdobně v kulturách *P. ostreatus* dosahovaly zjištěné enzymové aktivity Lac, MnP a LiP nízkých hodnot (Obr. 11, str. 62). V druhé polovině kultivace byl pozorován nárůst aktivity MnP v biologických kontrolách (maximum 14. den, $36,8 \pm 30,5$ U/l). V kulturách stimulovaných EE2 nepřesáhla zjištěná aktivita MnP hodnotu $3,0 \pm 3,1$ U/l.



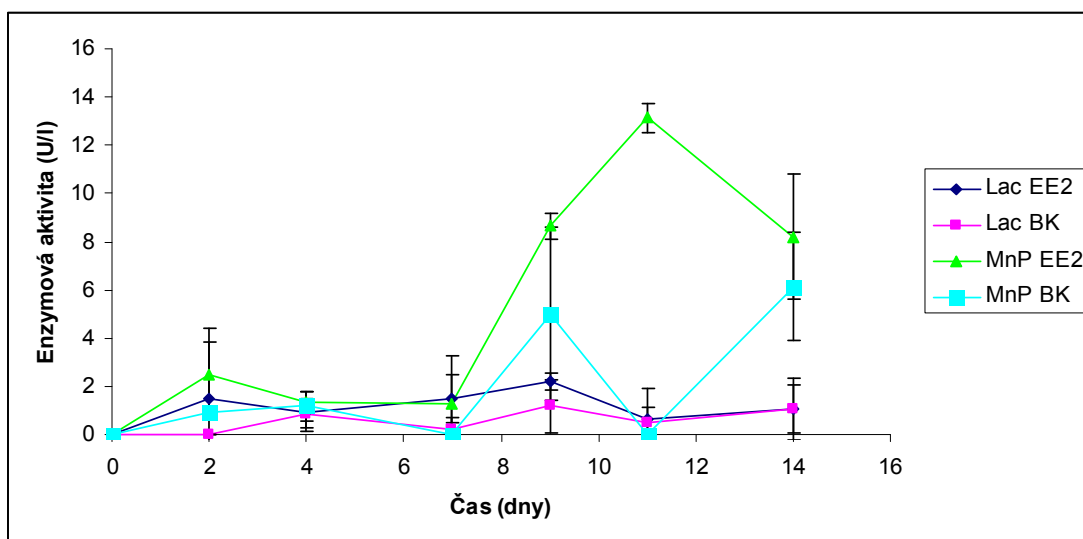
Obr. 11 Enzymové aktivity Lac, LiP a MnP zjištěné v supernatantu kultur *P. ostreatus* pěstovaných v mediu MM s/bez přidání EE2 (10 mg/l). Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.

V kulturách stimulovaných EE2 *T. versicolor* byla zaznamenána aktivita Lac s výrazným nárůstem po 2 dnech kultivace a s maximem v 9. dni kultivace, kdy byla zjištěna aktivita Lac $12,9 \pm 0,5$ U/l (Obr. 12, str. 63). V biologických kontrolách bylo maximum aktivity Lac $2,6 \pm 1,0$ U/l. 2. den kultivace *T. versicolor* s EE2 byla zjištěna aktivita MnP $4,0 \pm 3,4$ U/l. V biologických kontrolách byla MnP detekována až 4. den kultivace, její hodnoty však dosáhly maxima pouze $0,4 \pm 0,2$ U/l. V kulturách *T. versicolor* nebyla detekována žádná aktivita LiP (Obr. 12, str. 63).

V supernatantech *I. lacteus* byl zjištěn významný nárůst aktivity MnP v kulturách stimulovaných EE2 po 7. dni kultivace s maximální hodnotou $13,1 \pm 0,6$ U/l v 11. dni (Obr. 13, str. 63). V biologických kontrolách byla detekována maximální aktivita $6,1 \pm 2,2$ U/l ve 14. dni kultivace. V případě aktivity Lac nebyl pozorován signifikantní rozdíl mezi kulturami stimulovanými EE2 a biologickými kontrolami (Obr. 13, str. 63). Ani v jednom případě nebyla v kulturách *I. lacteus* detekována aktivita LiP.



Obr. 12 Enzymové aktivity Lac, MnP a LiP zjištěné v supernatantu kultur *T. versicolor* pěstovaných v mediu MM s/bez přidání EE2 (10 mg/l). Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.



Obr. 13 Enzymové aktivity Lac a MnP zjištěné v supernatantu kultur *I. lacteus* pěstovaných v mediu MM s/bez přidání EE2 (10 mg/l). Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení.

Pro ověření vlivu EE2 na enzymové aktivity v houbách *T. versicolor* a *I. lacteus* pěstovaných v mediu MM byl současně stanovován přírůstek biomasy. Enzymová aktivita pak byla vyjádřena jako aktivita enzymu vztažená na 1 g suché hmotnosti mycelia v kultuře. Hodnoty biomasy (mg) a Lac aktivity (U/g) *T. versicolor* jsou uvedeny v Tab. 10. Produkce biomasy (mg) a MnP (U/g) kulturami *I. lacteus* je shrnuta v Tab. 11 (str. 65).

Tab. 10 Enzymová aktivita Lac (U/g) a množství biomasy (mg) produkované kulturami *T. versicolor* v průběhu kultivace v mediu MM. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a SD směrodatné odchylce měření.

| Den | EE2 | | BK | |
|-----|--------------|-----|--------------|-----|
| | Biomasa (mg) | ±SD | Biomasa (mg) | ±SD |
| 0 | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,1 |
| 2 | 5,9 | 2,1 | 5,6 | 1,9 |
| 4 | 8,3 | 1,0 | 9,4 | 1,1 |
| 7 | 22,4 | 3,9 | 17,4 | 1,2 |
| 9 | 23,7 | 1,5 | 17,6 | 0,9 |
| 11 | 24,5 | 0,6 | 20,3 | 4,0 |
| 14 | 27,6 | 1,1 | 23,4 | 0,9 |

| Den | EA (U/g) | ±SD | EA (U/g) | ±SD |
|-----|----------|-----|----------|-----|
| 0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2 | 34,2 | 6,7 | 0,0 | 0,0 |
| 4 | 26,3 | 3,9 | 3,1 | 0,7 |
| 7 | 9,8 | 0,8 | 1,7 | 1,2 |
| 9 | 10,9 | 0,4 | 2,9 | 1,1 |
| 11 | 7,7 | 5,4 | 1,0 | 1,2 |
| 14 | 7,8 | 1,1 | 2,2 | 0,5 |

Tab. 11 Enzymová aktivita MnP (U/g) a množství biomasy (mg) produkované kulturami *I. lacteus* v průběhu kultivace v mediu MM. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a SD směrodatné odchylce.

| Den | EE2 | | BK | |
|-----|--------------|-----|--------------|-----|
| | Biomasa (mg) | ±SD | Biomasa (mg) | ±SD |
| 0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 |
| 2 | 5,7 | 0,4 | 5,3 | 0,4 |
| 4 | 8,1 | 1,2 | 7,3 | 0,6 |
| 7 | 11,2 | 0,1 | 11,9 | 0,3 |
| 9 | 13,2 | 0,6 | 14,6 | 0,3 |
| 11 | 13,8 | 1,2 | 16,8 | 5,1 |
| 14 | 16,7 | 1,3 | 18,2 | 4,1 |

| Den | EA (U/g) | ±SD | EA (U/g) | ±SD |
|-----|----------|-----|----------|-----|
| 0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 2 | 8,7 | 4,7 | 3,5 | 0,6 |
| 4 | 3,4 | 0,1 | 3,2 | 1,7 |
| 7 | 2,4 | 3,4 | 0,0 | 0,0 |
| 9 | 13,1 | 0,8 | 6,9 | 4,9 |
| 11 | 19,1 | 0,9 | 0,0 | 0,0 |
| 14 | 9,8 | 3,1 | 6,8 | 2,5 |

V případě kultur *T. versicolor* a *I. lacteus* pěstovaných v mediu MM přidání EE2 nevedlo k žádné změně produkce biomasy v kulturách (Tab. 10, str. 64 a Tab. 11). V kulturách *T. versicolor* byla po přidání EE2 do media zjištěna maximální hodnota aktivity Lac $34,2 \pm 6,7$ U/g, a to druhý den kultivace. V biologických kontrolách dosáhla Lac maxima $3,1 \pm 0,7$ U/g 4. den kultivace. Po vyjádření aktivity v U/g se průběh aktivity MnP v kulturách *I. lacteus* shodoval s průběhem aktivity při vyjádření v U/l. V kulturách stimulovaných EE2 bylo zjištěno maximum aktivity MnP $19,1 \pm 0,9$ U/g 11. den kultivace. V tento den nebyla v biologických kontrolách detekována žádná aktivita MnP. MnP v kontrolách dosáhla maxima $6,9 \pm 4,9$ U/g 9. den kultivace.

5.2 Degradace 17 α -ethinylestradiolu houbovými kulturami

5.2.1 Degradace EE2 houbovými kulturami *in vivo*

V případě hub *T. versicolor*, *I. lacteus*, *P. chrysosporium* a *P. ostreatus* byl během kultivace v mediu MM (kultivace A, viz kapitola 4.7) studován potenciál degradovat 10

mg/l EE2 (počáteční koncentrace). Jako kontroly byly použity kultury inaktivované „autoklávováním“ a výsledná degradace byla stanovena konečným porovnáním degradujících kultur s těmito kontrolami.

Jak je patrné z Tab. 12, kultury *I. lacteus* a *T. versicolor* byly schopny odstranit veškerý EE2 z media MM během prvních tří dnů kultivace. V případě *P. ostreatus* bylo v kulturách po 7 dnech kultivace detekováno stále 17,4 % původního množství EE2. Veškerý EE2 byl zdegradován až po 14 dnech inkubace. Kultury *P. chrysosporium* byly schopny odstranit veškerý EE2 během sedmi dnů kultivace (Tab. 12).

Tab. 12 Množství EE2 (mg/l) detekované v kulturách MM ligninolytických hub po 3, 7 a 14 dnech kultivace. Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a SD směrodatné odchylce měření.

| den inkubace | 3 | | 7 | | 14 | |
|-------------------------|------|------|------|------|------|----|
| | mg/l | SD | mg/l | SD | mg/l | SD |
| MM medium | | | | | | |
| <i>P. ostreatus</i> | 9,84 | 0,26 | 1,74 | 0,73 | 0 | 0 |
| <i>P. chrysosporium</i> | 3,49 | 1,08 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>I. lacteus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>T. versicolor</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

5.2.2 Degradace EE2 houbovými kulturami *in vitro*

Pro lokalizaci EE2 degradační aktivity u *T. versicolor*, *I. lacteus*, *P. chrysosporium* a *P. ostreatus* byla provedena inkubace 10 mg/l EE2 *in vitro* s „koncentrovaným“ supernatantem a myceliem z 10 dní starých houbových kultur (kultivace B, viz kapitola 4.7). Inkubace probíhala po dobu 24 hod při 28 °C. Degradace EE2 supernatanty a myceliem byla porovnávána proti kontrolám (mycelium a supernatant inaktivované převařením při 100 °C, 30 min).

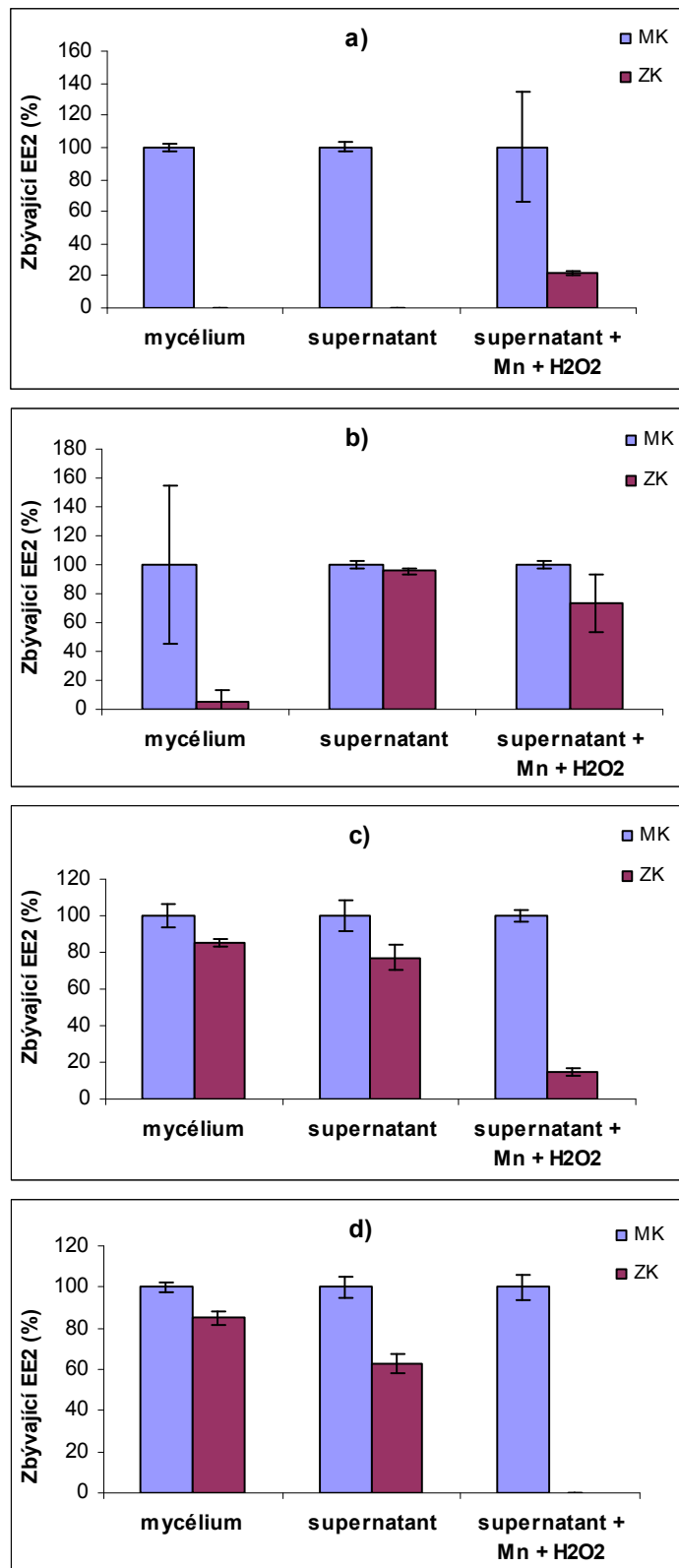
V případě houby *T. versicolor* byl veškerý EE2 odstraněn pomocí vzorku mycelia i „koncentrovaného“ supernatantu (Obr. 14a, str. 68). Vzorek mycelia vykazoval aktivitu Lac s hodnotou 10 mU. V supernatantu byla detekována pouze aktivita Lac a vzorek

odpovídal množství Lac 175 mU. Přidání iontů Mn a peroxidu vodíku k supernatantu vedlo k částečné inhibici odstranění EE2 supernatantem.

Vzorek mycelia *P. chrysosporium* s aktivitou Lac 19 mU byl schopen během 24 hod inkubace odstranit 95 % původního množství EE2 (Obr. 14b, str. 68). Supernatant, který obsahoval 1,7 mU aktivity Lac a 37,8 mU aktivity MnP, nebyl bez přidání Mn iontů a peroxidu vodíku schopen degradovat EE2. Přidání Mn iontů a peroxidu vodíku pak vedlo k míře EE2 degradace $27 \pm 20,3$ % (Obr. 14b, str. 68).

V případě houby *P. ostreatus* byla u vzorků mycelia a supernatantu pozorována jen limitovaná schopnost odstraňovat EE2 (Obr. 14c, str. 68). $85,4 \pm 2,4$ % EE2 bylo však degradováno vzorkem supernatantu s přidavkem Mn iontů a peroxidu vodíku. Vzorek mycelia vykazoval aktivitu Lac 25 mU. V supernatantu byla zjištěna aktivita Lac a MnP. Vzorek supernatantu v reakční směsi pak obsahoval 112 ± 14 mU Lac a $53,4 \pm 24,4$ mU MnP.

Supernatant *I. lacteus* degradoval během 24 hod inkubace $37,1 \pm 4,3$ % původního množství EE2 (Obr. 14d, str. 68). Přidání Mn iontů a peroxidu vodíku ke vzorku vedlo k zvýšení degradační schopnosti supernatantu. Bylo pozorováno úplné odstranění EE2 ze vzorku během 24 hod inkubace. Ve vzorku supernatantu byla přítomna aktivita Lac ($1,8 \pm 2,6$ mU) a aktivita MnP ($26,1 \pm 7,1$ mU). Pomocí vzorku mycelia (o aktivitě Lac 0,6 mU) bylo během stejné doby inkubace odstraněno pouze $15,1 \pm 3,6$ % EE2 (Obr. 14d, str. 68).



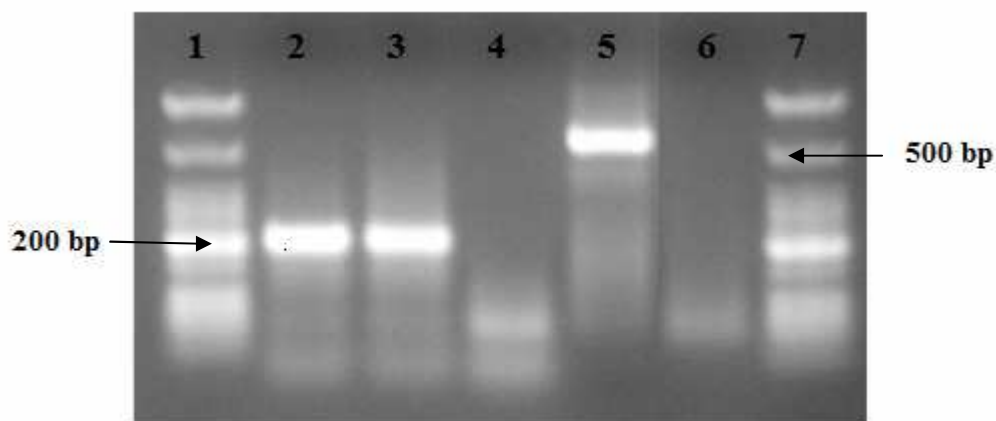
Obr. 14 Inkubace EE2 *in vitro* s myceliem a supernatantem houbových kultur *T. versicolor* (a), *P. chrysosporium* (b), *P. ostreatus* (c) a *I. lacteus* (d). Prezentovaná data odpovídají průměru ze tří stanovení a vyznačené chybové úsečky směrodatné odchylce těchto stanovení. MK = inaktivovaná kontrola, ZK = aktivní mycelium/supernatant.

5.3 Expres genů lakas *T. versicolor* a Mn-dependentních peroxidas *I. lacteus*

5.3.1 Expres genů lakas *T. versicolor*

5.3.1.1 Detekce genů kódujících Lac v gDNA *T. versicolor*

Geny kódující Lac byly detekovány v gDNA *T. versicolor* pomocí PCR se specifickými primery laccTv-F a laccTv-R a degenerovanými primery Cu1F a Cu2R. Jako templát do PCR bylo použito 0,5 μ l gDNA (koncentrace 122 ng/ μ l, čistota $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 1,78$). Pro odhad velikosti amplifikovaných fragmentů byl použit marker DNA („Low molecular weight DNA ladder“). Vizualizace produktů PCR probíhala na 2% agarose (95 V, 35 min). Pomocí primerů laccTv-F a laccTv-R byl amplifikován fragment o velikosti cca 500 bp a pomocí primerů Cu1F a Cu2R byl amplifikován fragment o velikosti cca 200 bp (Obr. 15).



Obr. 15 Amplifikace genů kódujících lakasy z gDNA *T. versicolor*. Dráhy: 1,7- marker („Low molecular weight DNA ladder“); 2, 3- fragmenty amplifikované primery Cu1F a Cu1R; 4- negativní kontrola (PCR bez templátu, primery Cu1F a Cu1R); 5- fragment amplifikovaný primery laccTv-F a laccTv-R; 6- negativní kontrola (PCR bez templátu, primery laccTv-F a laccTv-R).

5.3.1.2 Izolace RNA z mycelia kultur *T. versicolor*

Totální RNA byla izolována z biologických kontrol a kultur exponovaných EE2 *T. versicolor* kultivace C (viz kapitola 4.7) v mediu MM. Mycelium pro izolaci bylo

odebráno 2. a 5. den kultivace. Izolace byly prováděny v tripletech. Tab. 13 uvádí množství a čistotu izolované RNA z mycelia.

Tab. 13 Izolace RNA z mycelia *T. versicolor*. Čistota vzorku je dána poměrem absorbance 260 nm/280 nm. Za čistý vzorek je považován ten, jehož daná hodnota je v rozmezí 1,8 – 2,0.

| Číslo vzorku | Typ a den izolace vzorku | Množství izolované RNA (ng/μl) | Poměr absorbance 260 nm/280 nm | |
|--------------|--------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------|
| 1 | EE2 5 | 199,5 | 1,94 | |
| 2 | | 73,8 | 1,71 | |
| 3 | | 179,5 | 1,90 | |
| 4 | | BK 5 | 157,9 | 1,74 |
| 5 | | | 332,0 | 1,78 |
| 6 | | | 328,1 | 1,91 |
| 7 | EE2 2 | 986,2 | 1,71 | |
| 8 | | 516,6 | 1,95 | |
| 9 | | 589,8 | 1,68 | |
| 10 | BK 2 | 1101,2 | 1,99 | |
| 11 | | 903,4 | 1,78 | |
| 12 | | 621,9 | 1,80 | |

5.3.1.3 Reverzní transkripce izolované RNA z mycelia *T. versicolor*

Vzorky RNA (viz 5.3.1.2) izolované z mycelia *T. versicolor* (1000 ng) byly „ošetřeny“ DNasou a reverzně přepsány do cDNA. Správnost odstranění gDNA z RNA byla ověřena pomocí kontrolní PCR s použitím primerů Cu1F a Cu2R a laccTv-F a laccTv-R a RNA (1 μl RNA po „ošetření“ DNasou) jako templátu. Negativní výsledek amplifikace ukázal, že z RNA byla před přepisem odstraněna kontaminující gDNA (výsledky neuvedeny).

Pomocí primerů laccTv-F a laccTv-R byly z cDNA amplifikovány fragmenty genů kódující lakasy. Amplikony o velikosti shodné s velikostí amplikonů z gDNA *T. versicolor* (500 – 600 bp) byly získány u pěti vzorků cDNA (Obr. 16, str. 71).



Obr. 16 Amplifikace genů kódujících Lac z gDNA a cDNA *T. versicolor* pomocí primerů laccTv-F a laccTv-R. Dráhy: 1, 16- marker („Low molecular weight DNA ladder“); 2- negativní kontrola (PCR bez templátu); 3, 4, 5- amplifikace z cDNA z 5 dní starých EE2 kultur; 6, 7, 8- amplifikace z cDNA z 5 dní starých biologických kontrol; 9, 10, 11- amplifikace z cDNA z 2 dny starých EE2 kultur; 12, 13, 14- amplifikace z cDNA z 2 dny starých biologických kontrol, 15- amplifikace z gDNA *T. versicolor* (≈ 50 ng). Pořadí vzorků odpovídá Tab. 13 (viz kapitola 5.3.1.2).

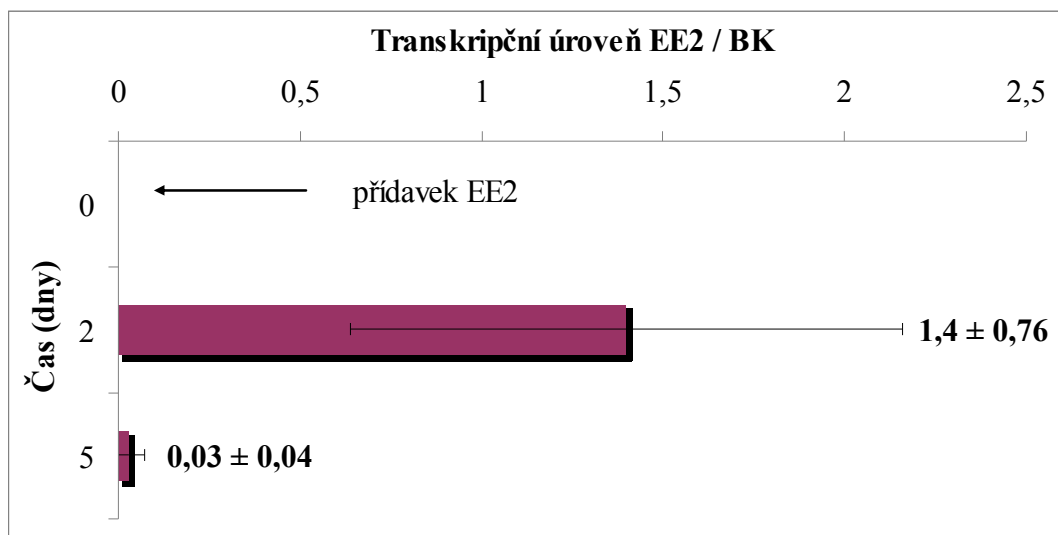
5.3.1.4 RT-qPCR cDNA *T. versicolor*

Hladina transkriptů genů pro Lac byla testována pomocí „real-time“ (RT) qPCR. Porovnávána byla úroveň transkripce kontrolních kultur bez přidaného polutantu a kultur pěstovaných v mediu s EE2 (kultivace C, viz kapitola 4.7) pomocí dvou sad primerů. Degenerované primery Cu1F a Cu2R byly použity pro sledování celkové hladiny Lac transkriptů amplifikovatelných těmito primery. Specifické primery laccTv-F a laccTv-R byly pak použity pro hodnocení transkripční úrovně specifického genu kódujícího Lac. Na normalizaci dat bylo použito stanovení hladiny transkriptů genu pro aktin. Na závěr qPCR cyklu byla provedena analýza tání dvoušroubovice, tzv. analýza „melting curve“, která potvrdila, že ve všech qPCR reakcích byl amplifikován shodný produkt PCR.

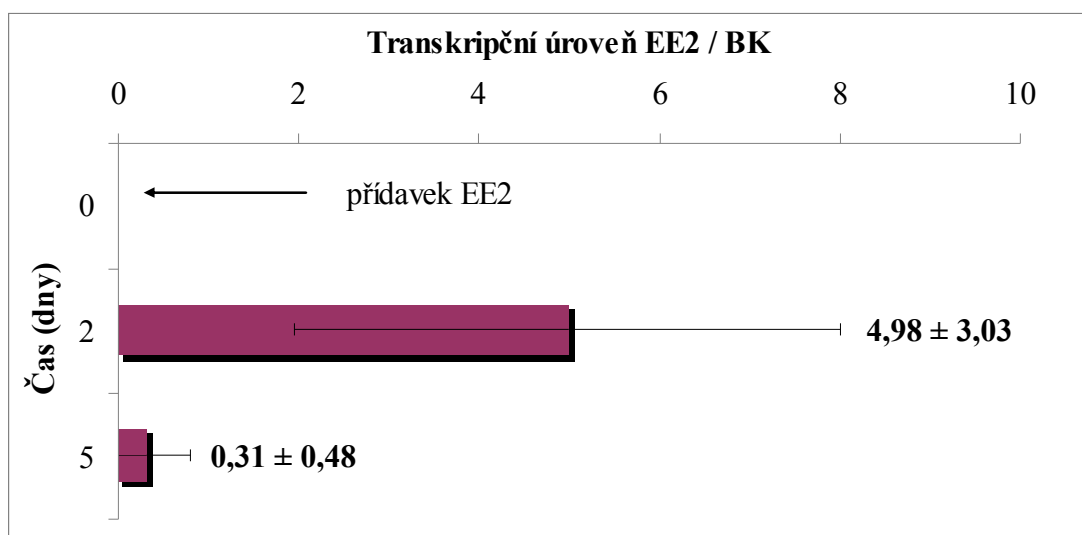
Pomocí degenerovaných primerů bylo zjištěno, že u kultur stimulovaných EE2 byla 2. den kultivace pouze mírně zvýšená hladina mRNA Lac oproti biologickým kontrolám (Obr. 17, str. 72). Poměr transkriptů Lac v EE2 kulturách ke kontrolám činil $1,4 \pm 0,76$. 5. den kultivace byl pozorován pokles transkripce genů pro Lac v kulturách s EE2. Sledovaný poměr transkriptů klesl na hodnotu $0,03 \pm 0,04$.

Sledování transkripční úrovně genů Lac pomocí specifických primerů laccTv-F a laccTv-R ukázalo, že přidání EE2 ke kulturám vedlo druhý den kultivace k výraznému zvýšení transkripce jednoho specifického genu Lac *T. versicolor* (Obr. 18, str. 72). Hladina

transkriptů tohoto genu byla v kulturách exponovaných EE2 5krát vyšší než v biologických kontrolách. Míra transkripce tohoto genu v kulturách exponovaných EE2 následně klesla a 5. den kultivace dosáhla hodnoty nižší než v biologických kontrolách.



Obr. 17 Porovnání transkripční úrovně genů pro lakasu v kulturách stimulovaných EE2 *T. versicolor* a biologických kontrolách (BK) s využitím primerů Cu1F a Cu2R.



Obr. 18 Porovnání transkripční úrovně genů pro lakasu v kulturách stimulovaných EE2 *T. versicolor* a biologických kontrolách (BK) s využitím primerů lacTv-F a lacTv-R.

5.3.1.5 Sekvenování produktu PCR gDNA *T. versicolor*

Produkt PCR amplifikovaný primery laccTv-F a laccTv-R z gDNA *T. versicolor* byl přečištěn přes agarosový gel a rozpuštěn v 1 mmol/l Tris pufru (výsledná koncentrace produktu PCR 45,2 ng/μl, čistota 2,29). Produkt PCR byl sekvenován ve Středisku sekvenování DNA (Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha, ČR). Zjištěná sekvence (Tab. 14) byla porovnána s databází NCBI („National Center for Biotechnology Information“) pomocí algoritmu „blastn“ a popis nejpříbuznější sekvence z databáze je uveden v Tab. 14.

Tab. 14 Sekvence produktu PCR a jeho porovnání s daty z NCBI databáze.

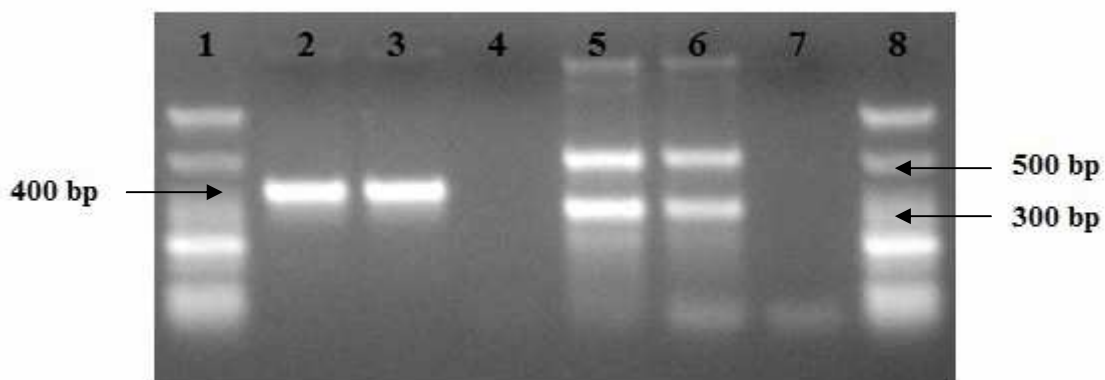
| Sekvence 5' → 3' | Výsledek srovnání s NCBI databází (blastn) | | |
|---|--|---|-----------|
| | Přístupové číslo (NCBI) | Popis | Podobnost |
| AGGGCATCGTCATGCCGCCACCGTTCGGTGCTCCTGCAG ATCCTGAGCGGCGCGCAGAGCGCCTCCGACCTGCTCCCG ACCGGCAGCGTCTACACTCTCCCTCTGAACTCGACCAT CGAGCTCTCGTTCGCCATTACCACCGTCAATGGCGTTAC GAATGCGCCTGGGGCCCCGCATCCTTTCCACTTGCACGG AGTAAGTGTCAATCACCCACGTCTGCGCTTATGGATCC GCAATTCTCACGCTTTGCACATGCAGCATGCCTTCTCCG TCGTGCGCAGCGCCGGAAGCTCGGACTACAACACTACGTC AACCCCGTCCGGCGCGACACCGTCAGCACGGGTAACCC TGGCGACAACGTCACCATCCGCTTACGGTATGTCTCCC GCGCAGCTCCTGCGCTCCTTATGTCCGCTGGCGGCTGACC ATCGCATCGTACCGCCGGCAGACTGACAACGCGGTCC GTGGTTCTCCACTGCCACATCGACTTCATCTTCAACGG CACCAACTTCTTCGTCAACTGGAACAAATTTTTATGT AAAGGATTATATTTTTTAATGGAGCTGT | AY846842.1 | Trametes sp. AH28-2 laccase B (<i>lac B</i>) gen | 86% |

5.3.2 Exprese genů Mn-dependentních peroxidas *I. lacteus*

5.3.2.1 Detekce genů kódujících MnP v gDNA *I. lacteus*

Geny kódující MnP byly detekovány v gDNA *I. lacteus* pomocí PCR s degenerovanými primery mnpHet-F a mnpHet-R, mnp-U a mnp-L. Jako templát do PCR reakce bylo použito 0,5 μl gDNA (koncentrace 174,6 ng/μl, čistota $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 1,60$). Pro odhad velikosti amplifikovaných fragmentů byl použit marker DNA („Low molecular

weight DNA ladder“). Vizualizace produktů PCR probíhala na 2% agarose (95 V, 35 min). Pomocí primerů mnpHet-F a mnpHet-R byl amplifikován fragment o velikosti cca 400 bp a pomocí primerů mnp-U a mnp-L byly amplifikovány fragmenty o velikostech cca 300 bp a 500 bp (Obr. 19).



Obr. 19 Amplifikace genů kódujících Mn-dependentní peroxidasy z gDNA *I. lacteus*. Dráhy: 1, 8- marker („Low molecular weight DNA ladder“); 2, 3- fragmenty amplifikované primery mnpHet-F a mnpHet-R; 4- negativní kontrola (PCR bez templátu, primery mnpHet-F a mnpHet-R); 5, 6- fragmenty amplifikované primery mnp-U a mnp-L; 7- negativní kontrola (PCR bez templátu, primery mnp-U a mnp-L).

5.3.2.2 Izolace RNA z mycelia kultur *I. lacteus*

Totální RNA byla izolována z mycelia biologických kontrol a kultur exponovaných EE2 *I. lacteus* kultivace D (viz kapitola 4.7) na MM mediu. Mycelium pro izolaci bylo odebráno 7., 9., 12. a 14. den kultivace. Izolace byly prováděny v tripletech. Tab. 15 (str. 75) uvádí množství a čistotu izolované RNA.

Tab. 15 Izolace RNA z mycelia *I. lacteus*. Čistota vzorku je dána poměrem absorbance 260 nm/280 nm. Za čistý vzorek je považován ten, jehož daná hodnota je v rozmezí 1,8 – 2,0.

| Číslo vzorku | Typ a den izolace vzorku | Množství vyizolované RNA (ng/μl) | Poměr absorbance 260 nm/280 nm | |
|--------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------|
| 1 | EE2 14 | 46,9 | 1,63 | |
| 2 | | 70,4 | 1,63 | |
| 3 | | 100,6 | 1,67 | |
| 4 | | BK 14 | 61,7 | 1,85 |
| 5 | | | 146,6 | 1,84 |
| 6 | | | 52,4 | 1,64 |
| 7 | EE2 12 | 13,3 | 1,66 | |
| 8 | | 24,1 | 1,49 | |
| 9 | | 17,5 | 1,44 | |
| 10 | BK 12 | 32,0 | 1,55 | |
| 11 | | 13,0 | 1,50 | |
| 12 | | 60,1 | 1,78 | |
| 13 | EE2 9 | 88,3 | 1,67 | |
| 14 | | 40,7 | 1,62 | |
| 15 | | 107,8 | 1,65 | |
| 16 | BK 9 | 14,2 | 1,45 | |
| 17 | | 77,6 | 1,65 | |
| 18 | | 66,5 | 1,81 | |
| 19 | EE2 7 | 33,4 | 1,60 | |
| 20 | | 69,9 | 1,59 | |
| 21 | | 45,7 | 1,59 | |
| 22 | BK 7 | 29,2 | 1,98 | |
| 23 | | 42,0 | 1,59 | |
| 24 | | 32,5 | 1,63 | |

5.3.2.3 Reverzní transkripce izolované RNA z mycelia *I. lacteus*

Vzorky RNA (viz 5.3.2.2) izolované z mycelia *I. lacteus* (1000 ng) byly „ošetřeny“ DNasou a reverzně přepsány do cDNA. Správnost odstranění gDNA z RNA byla ověřena pomocí kontrolní PCR s použitím primerů mnp-U a mnp-L a RNA (2 μl RNA po „ošetření“ DNasou) jako templátu. Negativní výsledek amplifikace ukázal, že z RNA byla před přepisem odstraněna kontaminující gDNA (výsledky nejsou uvedeny).

Pomocí primerů *mnp-U* a *mnp-L* byly z cDNA amplifikovány fragmenty genů kódující Mn-dependentní peroxidasy. Amplikony o velikosti shodné s velikostí amplikonů z gDNA *I. lacteus* (400 – 500 bp) byly získány u 19 vzorků cDNA (Obr. 20, str. 76).



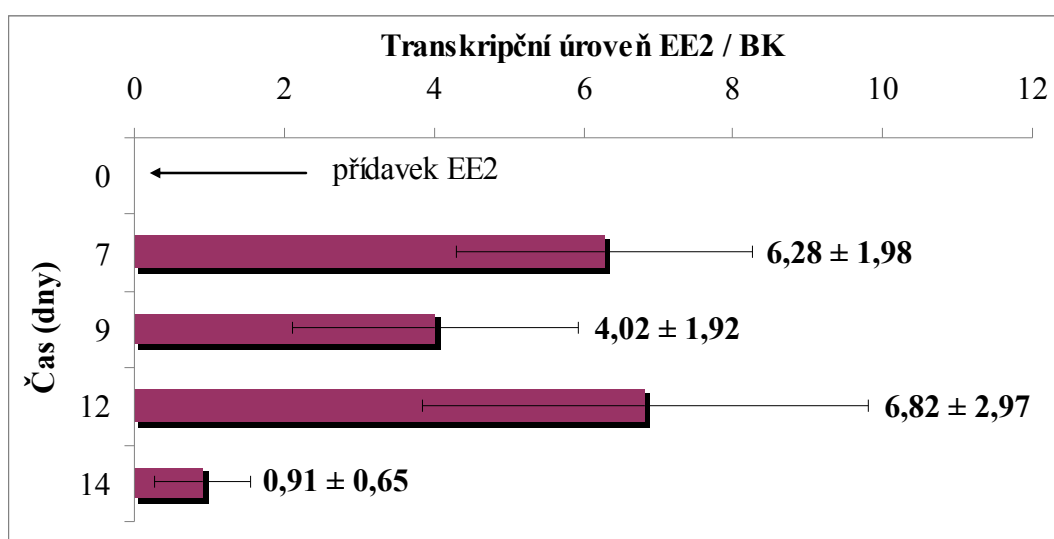
Obr. 20 Amplifikace genů kódujících Mn-dependentní peroxidasy z gDNA a cDNA *I. lacteus* pomocí primerů *mnp-U* a *mnp-L*. Dráhy: 1, 17, 18, 33- marker („100 bp DNA ladder“); 2- negativní kontrola (PCR bez templátu); 3- amplifikace z gDNA *I. lacteus* (\approx 174,6 ng); 4, 5, 6, 7- amplifikace z cDNA ze 14 dní starých EE2 kultur; 8, 9, 10- amplifikace z cDNA ze 14 dní starých biologických kontrol; 11, 12, 13- amplifikace z cDNA ze 12 dní starých EE2 kultur; 14, 15, 16- amplifikace z cDNA ze 12 dní starých biologických kontrol; 19, 20, 21, 22- amplifikace z cDNA z 9 dní starých EE2 kultur; 23, 24, 25, 26- amplifikace z cDNA z 9 dní starých biologických kontrol; 27, 28, 29- amplifikace z cDNA ze 7 dní starých EE2 kultur; 30, 31, 32- amplifikace z cDNA ze 7 dní starých biologických kontrol.

5.3.2.4 RT-qPCR cDNA *I. lacteus*

Hladina transkriptů genů pro MnP byla testována pomocí „real-time“ (RT) qPCR pomocí primerů *mnp-U* a *mnp-L*. Porovnávala byla úroveň transkripce kontrolních kultur bez přidaného polutantu a kultur pěstovaných v mediu s EE2 (kultivace D, viz kapitola 4.7). Na normalizaci dat bylo použito stanovení hladiny transkriptů genu pro aktin. Na

závěr qPCR cyklu byla provedena analýza tání dvoušroubovice, tzv. „analýza melting“ curve, která potvrdila, že ve všech reakcích byl amplifikován shodný produkt PCR.

Bylo zjištěno, že u kultur stimulovaných EE2 byla 7. až 12. den kultivace zvýšená hladina mRNA MnP oproti biologickým kontrolám (Obr. 21, str. 77). Poměr transkriptů v kulturách EE2 ke kontrolám činil 4,02 – 6,82. 14. den kultivace byl pozorován pokles transkripce genů pro MnP v kulturách s EE2. Hladina transkriptů klesla na hodnotu srovnatelnou s kontrolními kulturami.



Obr. 21 Porovnání transkripční úrovně genů pro Mn-dependentní peroxidasu v kulturách exponovaných EE2 *I. lacteus* a biologických kontrolách (BK).

5.4 Izelektrická fokusace (IEF) lakas a Mn-dependentních peroxidas

5.4.1 IEF lakas *T. versicolor*

Ověření přítomnosti různých isoformů enzymu Lac v supernatantu houbových kultur *T. versicolor* bylo provedeno pomocí IEF. Na gel bylo nanášeno 120 µl supernatantu z 1, 2 a 5 dní starých kultur (kultivace C, viz kapitola 4.7). Hodnoty aktivity Lac detekované v supernatantu a aplikované na gel jsou uvedeny v Tab 16 (str. 78). V kulturách stimulovaných EE2 byly detekovány 1. den kultivace dvě formy Lac o pI 4,05 a 4,13, 2. den kultivace jedna forma Lac o pI 4,05 a 5. den kultivace tři formy Lac o pI 3,93 – 4,09. V biologických kontrolách byly detekovány 1. a 2. den kultivace stejné formy

Lac jako v kulturách stimulovaných EE2. 5. den kultivace byla v biologické kontrole detekována pouze jedna forma Lac o *pI* 4,17. Zjištěné hodnoty *pI* Lac *T. versicolor* jsou uvedeny v Tab. 16 (str. 78). Přítomnost EE2 v kulturách tedy stimulovala produkci více isoformem enzymu Lac do supernatantu 5. den kultivace.

Tab. 16 Izoelektrické body (*pI*) Lac získané v různých dnech kultivace *T. versicolor*. Množství použitého vzorku supernatantu je uvedeno v mU aktivity Lac přítomné ve vzorku.

| Den odběru supernatantu na analýzu | Kultury BK | | Kultury EE2 | | | |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------|------------------|--|---------------------------------|------|
| | <i>pI</i> vzorku | Množství naneseného vzorku (mU) | <i>pI</i> vzorku | | Množství naneseného vzorku (mU) | |
| 1 | 4,05 4,13 | 0,36 | 4,05 4,13 | | | 0,33 |
| 2 | 4,05 | 0,15 | 4,05 | | | 0,16 |
| 5 | 4,17 | 0,39 | 3,93 4,01 4,09 | | | 0,93 |

5.4.2 IEF Mn-dependentních peroxidas *I. lacteus*

Zastoupení forem MnP v supernatantu během kultivace *I. lacteus* s EE2 bylo studováno pomocí IEF. Na gel bylo nanášeno 160 µl supernatantu ze 7, 9, 12 a 14 dní starých kultur (kultivace D, viz kapitola 4.7). Hodnoty aktivity MnP detekované v supernatantu a nanesené na gel jsou uvedeny v Tab 17 (str. 79). V kulturách stimulovaných EE2 byly detekovány 7., 9. a 14. den kultivace vždy dvě formy enzymu MnP o *pI* v rozmezí 3,98 – 4,31 (Tab. 17, str. 79). 12. den kultivace byla detekována pouze jedna forma MnP o *pI* 4,31. V biologických kontrolách byly detekovány vždy dvě formy enzymu MnP o *pI* v rozmezí 4,05 – 4,43 (Tab. 17, str. 79). V kulturách stimulovaných EE2 a biologických kontrolách byly tedy detekovány MnP formy o odlišných *pI*.

Tab. 17 Izoelektrické body (pI) MnP získané v různých dnech kultivace *I. lacteus*.
Množství použitého vzorku supernatantu je uvedeno v mU MnP aktivity přítomné ve vzorku.

| Den odběru supernatantu na analýzu | Kultury BK | | | Kultury EE2 | | |
|--|------------|------|---------------------------------------|-------------|------|---------------------------------------|
| | pI vzorku | | Množství naneseného vzorku (mU) | pI vzorku | | Množství naneseného vzorku (mU) |
| 7 | 4,13 | 4,20 | 1,13 | 3,98 | 4,05 | 0,39 |
| 9 | 4,05 | 4,13 | 0,67 | 4,28 | 4,31 | 0,15 |
| 12 | 4,35 | 4,43 | 0,12 | 4,31 | | 0,21 |
| 14 | 4,20 | 4,28 | 0,37 | 4,17 | 4,24 | 0,33 |

6. Diskuse

Řada prací z poslední doby popisuje vliv různých chemických látek na enzymové aktivity u ligninolytických hub [Terrón et al., 2004; Xiao et al., 2004; Elisashvili et al., 2010]. V případě Lac bylo popsáno, že v indukci exprese tohoto enzymu hrají významnou roli určité sekvence promotorových oblastí genů kódujících Lac [Piscitelli et al., 2011].

V této diplomové práci byl sledován vliv EE2 na hladiny ligninolytických aktivit u hub *T. versicolor*, *I. lacteus*, *P. ostreatus* a *P. chrysosporium* v průběhu kultivace na dvou typech tekutého media (media MM a MEG). Na obou typech media byly detekovány enzymové aktivity Lac, MnP a LiP. V kulturách MEG stimulovaných EE2 *P. chrysosporium* byl pozorován znatelný efekt EE2 na expresi MnP s nejvyšším nárůstem aktivity MnP ve 14. dni kultivace (Obr. 6, str. 56). V biologických kontrolách hladina enzymové aktivity MnP zůstala nízká v průběhu celé kultivace. U této houby byla exprese aktivity MnP ovlivněna složením media. V kulturách MM *P. chrysosporium* byla detekována v průběhu celé kultivace v kulturách stimulovaných EE2 a biologických kontrolách pouze nízká aktivita MnP.

V supernatantu kultur *P. ostreatus* pěstovaných v mediu MEG byly detekovány aktivity enzymů Lac a MnP. Enzymové aktivity v kulturách stimulovaných EE2 a biologických kontrolách však nevykazovaly signifikantní rozdíly. V kulturách pěstovaných v mediu MM dosahovaly enzymové aktivity Lac a MnP nízkých hodnot. V biologických kontrolách byl pozorován nárůst aktivity MnP s maximem ve 14. dni kultivace (Obr. 11, str. 62).

V kulturách stimulovaných EE2 *T. versicolor* pěstovaných v mediu MEG byl pozorován výrazný efekt EE2 na expresi dvou enzymů. 2. den kultivace byl detekován významný nárůst aktivity Lac a LiP. V biologických kontrolách byla zjištěna ve stejný den téměř 2,5krát nižší aktivita Lac a 6krát nižší aktivita LiP (Obr. 8, str. 58). V mediu MM byl zaznamenán v kulturách exponovaných EE2 nárůst hladiny Lac po 2 dnech kultivace. Vyšší aktivita Lac v kulturách přetrvávala po celou dobu kultivace.

V kulturách stimulovaných EE2 *I. lacteus* pěstovaných v mediu MEG byl pozorován mírný inhibiční vliv EE2 na enzymovou aktivitu MnP. V biologických kontrolách byla detekována vyšší aktivita MnP, a to 4. a 7. den kultivace. Významný

nárůst aktivity MnP byl však pozorován po 7. dni kultivace v kulturách stimulovaných EE2 pěstovaných na mediu MM s maximální hodnotou v 11. dni kultivace.

Průběh enzymových aktivit MnP, LiP a Lac v kulturách MEG *T. versicolor*, *I. lacteus*, *P. chrysosporium* a *P. ostreatus* pozorovaný v této práci byl obdobný jako v práci Cajthamla et al. [2009a]. Přidání EE2 k houbovým kulturám vedlo k výrazné stimulaci produkce MnP *P. chrysosporium*, Lac a LiP *T. versicolor* a k mírné represi aktivit MnP u *I. lacteus*. Navíc tato práce ukazuje, že produkce enzymových aktivit u těchto hub je ovlivněna také složením kultivačního media. V podmínkách s limitovaným (nízkým) obsahem dusíkatých látek (medium MM) byla potlačena exprese MnP *P. chrysosporium*, která byla v kulturách MEG stimulována přidáním EE2. Naopak v kulturách MM *I. lacteus* byla pozorována stimulace aktivit MnP po přidání EE2, kdežto v mediu MEG tento efekt polutantu na MnP pozorován nebyl. Výsledky tak ukazují, že regulace enzymových aktivit u hub pomocí EE2 je spojena s metabolismem dusíku. Regulace exprese ligninolytických enzymů živinami byla u *P. chrysosporium* navržena již v pracích Jeffriese et al. [1981] a Faisona & Kirka [1985]. U *T. versicolor* hraje koncentrace dusíku roli v expresi Lac a MnP a následně ovlivňuje i biodegradační potenciál houby vůči syntetickým barvivům [Swamy & Ramsay, 1999].

V porovnání s výsledky této práce, ve které přidání EE2 k kulturám MM *T. versicolor* vedlo pouze k významnější stimulaci exprese Lac, v práci Takamiyai et al. [2008] přidání jiného polutantu, bisfenolu A, ke kulturám MM *T. versicolor* vedlo ke stimulaci aktivit enzymů Lac, MnP a LiP. Navíc bylo prokázáno, že zde určitou roli hrálo přidání polutantu v různých koncentracích, přičemž enzymové aktivity dosahovaly nejvyšších hladin při koncentracích BPA 200 a 300 µg/ml [Takamiya et al., 2008].

Pro eliminaci vlivu nárůstu biomasy na expresi enzymových aktivit byl u *T. versicolor* a *I. lacteus* pěstovaných v mediu MEG a MM s/bez EE2 stanoven přírůstek biomasy. Přidání EE2 ke kulturám nevedlo k žádné změně produkce biomasy. Odlišný nárůst biomasy tedy neovlivňoval průběh enzymových aktivit. U *I. lacteus* se průběh aktivit vyjádřených v U/g shodoval s průběhem aktivit při vyjádření v U/l (viz Obr. 9, a 13, str. 59, 60 a Tab. 9 a 11, str. 60 a 65). V případě Lac *T. versicolor* vztažení její aktivity na množství biomasy v kulturách MM ukázalo pokles aktivity Lac po 4 dnech kultivace (Tab 10, str. 64). Maximum aktivity bylo produkováno v době intenzivního růstu kultur. Ani v jednom z uvedených medií EE2 neměl vliv na růst kultur, ale je známo, že např. guajakol, syringol, pyrokatechol nebo *p*-methoxyfenol mohou u hub ovlivňovat vedle enzymových

aktivit i jiné děje, např. biosyntézu pigmentů u *Trametes* sp. I-62 [Terrón et al., 2004]. V této práci nebyla pozorována žádná pigmentace kultivačního media.

V další části diplomové práce byla studována lokalizace aktivity enzymů schopných degradovat EE2 v kulturách kultivovaných v mediu MM. Nejefektivnější degradace byla pozorována v případě kultur *I. lacteus* a *T. versicolor*, kdy byl veškerý EE2 odstraněn z media již během prvních 3 dnů inkubace. *P. chrysosporium* byla EE2 schopna odstranit do 7 dní a nejméně efektivní degradace EE2 se projevila u *P. ostreatus*, kde byl EE2 degradován až do 14 dnů. V práci Cajthamla et al. [2009a], kde byla degradace EE2 sledována na komplexním mediu bohatém na živiny, byly kultury *P. ostreatus* naopak schopny odstranit stejné množství EE2 již během prvních 3 dnů. *P. chrysosporium* nedegradovala EE2 ani do 14 dnů inkubace. Současně s enzymovými aktivitami složení media tedy ovlivňuje i degradační potenciál houbových kultur.

Pokusy *in vitro* ukázaly, že degradace EE2 je u hub spojena s enzymy přítomnými v myceliu a supernatantu. V případě houby *T. versicolor* byla degradace EE2 spojena s aktivitou Lac detekovanou v houbovém myceliu a supernatantu. Degradace EE2 u houby *P. chrysosporium* byly spojena s aktivitami Lac a MnP. Houba *P. ostreatus* byla schopná většinu EE2 degradovat až po přidání Mn^{2+} iontů a peroxidu vodíku k supernatantu. Významnou roli v degradaci látky tedy pravděpodobně hrála peroxidasová aktivita. Shodně pak u *I. lacteus* k úplnému odstranění EE2 došlo po přidavku Mn iontů a peroxidu vodíku k supernatantu, kde hlavním detekovaným enzymem byla MnP.

EE2 patří mezi endokrinně destruktivní látky, které lze degradovat, či alespoň snížit jejich estrogenní aktivitu účinkem ligninolytických enzymů. Již v rané studii z roku 1973 [Lugaro et al., 1973] byla prokázána schopnost Lac z houby *Polyporus versicolor* (ekvivalent *Trametes versicolor*) oxidovat steroidní hormony, E1, E2 a E3. Lac izolovaná z *Trametes* sp. a *Pycnoporus coccineus* byla testována pro transformaci EE2, který byl absorbován na mořském písku ve zkumavce a rotačním reaktoru. Izolovaný enzym degradoval EE2, což prokazuje, že se Lac může účastnit degradačního procesu v houbových kulturách *in vivo* [Tanaka et al., 2001]. Pomocí MnP *P. chrysosporium* ME-446 a „lakasa-mediátorového“ systému s HBT bylo zkoumáno odstranění steroidních hormonů E2 a EE2. MnP a lakasa-HBT systém snížil estrogenní aktivitu obou látek a následně došlo k jejímu úplnému odstranění [Suzuki et al., 2003]. Steroidní hormony, včetně EE2, byly kompletně degradovány během 1 hodiny inkubace s Lac *T. versicolor* a

HRP. Degradace EE2 u *T. versicolor* byla přičítána hlavně Lac aktivitě [Blánquez & Guieysse, 2008].

Výsledky uvedené v této diplomové práci ukazují, že kromě enzymových aktivit volně sekretovaných do kultivační tekutiny se degradace polutantu mohou u *T. versicolor* a *P. chrysosporium* účastnit i enzymy vázané v myceliu hub (Obr. 14, str. 68). U *T. versicolor* bylo již dříve popsáno, že se dekolizace barviva Amaranth pravděpodobně účastní na mycelium vázaný ligninolytický enzym [Swamy & Ramsay, 1999]. Dekolorizační potenciál aktivity vázané na mycelium lakasového typu byl demonstrován i u *I. lacteus* [Svobodová et al., 2008]. V případě degradace EE2 pomocí mycelia *I. lacteus* však v této práci nebyl pozorován žádný výrazný úbytek EE2 z reakční směsi (Obr. 14c, str. 68).

Pomocí qPCR byla studována míra transkripce genů pro Lac *T. versicolor* a MnP *I. lacteus*. Expres těchto enzymů v kulturách MM hub byla ovlivněna přítomností EE2 a tyto enzymy se také pravděpodobně účastní degradace EE2 v houbových kulturách, jak bylo ukázáno v pokusech *in vitro*. V houbových kulturách stimulovaných EE2 *I. lacteus* byla pozorována vyšší hladina transkripce genů pro MnP 7. až 12. den kultivace s poměrem transkriptů ke kontrolám 4,02 – 6,82 (Obr. 21, str. 77). Zvýšení transkripce genů částečně předchází průběh enzymových aktivit MnP v kulturách. 7. den kultivace byla pozorována zvýšená hladina transkripce genů v EE2 kulturách, nárůst enzymové aktivity MnP v kulturách byl však zaznamenán až 9. den kultivace (Tab. 11, str. 65 a Obr. 21, str. 77). S poklesem transkripce 14. den kultivace klesla i hladina aktivity v kulturách. Z toho lze usuzovat na pouze omezenou stabilitu MnP *I. lacteus* v supernatantu.

U *T. versicolor* byla porovnávána transkripční úroveň genů pro Lac s využitím dvou sad PCR primerů. Degenerované primery Cu1F a Cu2R byly použity pro sledování celkové hladiny skupiny transkriptů Lac amplifikovatelných těmito primery a specifické primery laccTv-F a laccTv-R pak pro hodnocení transkripční úrovně specifického genu Lac. Pomocí degenerovaných primerů byla sledována 2. den kultivace v EE2 stimulovaných kulturách pouze mírně zvýšená hladina mRNA Lac naproti kontrolám (Obr. 17, str. 72). Analýza transkripční úrovně pomocí specifických primerů však 2. den kultivace ukázala výrazné zvýšení transkripce jednoho specifického genu Lac (Obr. 18, str. 72), což potvrzuje schopnost EE2 ovlivňovat produkci Lac na úrovni transkripce genů. 2. den kultivace byla v kulturách stimulovaných EE2 současně zaznamenána i zvýšená aktivita Lac. Ovšem 5. den kultivace bylo možno pozorovat pokles transkripce genů pro

Lac v kulturách stimulovaných EE2 naproti kontrolám, a to pomocí obou sad primerů užitých pro PCR. Hladina aktivity Lac v supernatantu v kulturách exponovaných EE2 po 4. dni kultivace také poklesla zhruba na třetinu maximální aktivity. Až do konce kultivace byly v kulturách stimulovaných EE2 detekovány vyšší hladiny aktivity Lac než v biologických kontrolách. Z toho lze usoudit, že zde hraje roli stabilita enzymu.

2. den kultivace byla tedy v kulturách exponovaných EE2 *T. versicolor* detekována vyšší hladina mRNA jednoho z genů kódujících Lac. LaccTv-F/laccTv-R ampikon tohoto genu byl osekvenován a jeho sekvence vykazala 86% podobnost s *lacB* genem *Trametes* sp. AH28-2. Tento gen je amplifikovatelný i pomocí primerů Cu1F a Cu2R (výsledky nejsou uvedeny) a hladina jeho transkriptů byla zahrnuta i v analýze pomocí těchto degenerovaných primerů. Zvýšená hladina transkriptů laccTv-F/laccTv-R ve 2 dnech starých kulturách exponovaných EE2 a hladina transkriptů Cu1F/Cu2R shodná s kontrolami pak indikují, že transkripce některého jiného z genů *lac* u *T. versicolor* by měla být po přidání EE2 ke kulturám snížena pod úroveň transkripce v kontrolách, aby poměr transkriptů Cu1F/Cu2R v kulturách stimulovaných EE2 a kontrolách dosáhl 2. den kultivace hodnoty $1,4 \pm 0,76$.

Výsledky kvantifikace genové transkripce z této práce byly porovnány se schopností hub *I. lacteus* a *T. versicolor* degradovat EE2. U houby *I. lacteus* byla transkripce MnP zvýšená oproti kontrolám až v době, kdy v kulturách nebyl detekován žádný EE2, neboť veškerý EE2 byl odstraněn z media již během prvních 3 dnů inkubace. Indukovaný enzym tedy pravděpodobně nehraje roli v primárním ataku molekuly EE2, ale mohl by se účastnit dalších kroků degradace, např. degradace meziproductů. U *T. versicolor* byla Lac transkribována zvýšenou měrou v době, kdy kultura degradovala EE2. Enzym by se tedy mohl přímo účastnit degradace EE2.

Obecně jsou peroxidasy MnP u hub regulovány na úrovni transkripce v odpověď na chemický stres, peroxid vodíku, molekulární kyslík, ionty Mn^{2+} a množství dusíku v mediu, jak bylo popsáno u modelové houby *P. chrysosporium* [Peace & Tien 1992; Li et al., 1995; Gettemy et al., 1998; Scheel et al., 2000; Martínez, 2002]. Tyto práce také ukázaly, že limitace kultur dusíkem má vliv na stabilitu MnP v kulturách, které jsou obecně stabilnější než LiP [Peace & Tien, 1992]. Naproti tomu, v naší práci jsme zjistili, že aktivita MnP v kultuře *I. lacteus* klesla na konci kultivace současně s poklesem transkripce.

Vliv organických polutantů na expresi MnP v *I. lacteus* dosud nebyl v literatuře plně popsán. V práci Šušly & Svobodové [2008] způsobily ionty Mn^{2+} a syntetická barviva v *I. lacteus* zvýšení hladiny aktivity MnP v kulturách imobilizovaných na polyuretanovém nosiči. Ve zmiňované práci byl studován stejný kmen *I. lacteus* jako v diplomové práci. V *I. lacteus* dochází také ke změnám v produkci MnP a nespecifické peroxidasy v kulturách dekolorigujících odpadní vody [Shin, 2004]. Předkládaná diplomová práce je však první, která ukazuje, že MnP je u kultur *I. lacteus* kultivovaných s EE2 regulována na úrovni transkripce. Vzhledem k tomu, že k indukci transkripce dochází až po odstranění EE2 z kultur, transkripce zřejmě není regulována přímo EE2, ale některým ze vznikajících metabolitů této látky.

Lac *T. versicolor* patří mezi nejlépe charakterizované enzymy studované pro bioremediaci organopolutantů. Podobně jako u jiných hub [Yeo et al., 2008] mohou mít organopolutanty vliv na expresi Lac u *T. versicolor*. Takamiya et al. [2008] ukázali, že aktivity Lac, MnP a LiP byly v kulturách *T. versicolor* R101 opravdu stimulované bisfenolem A v podmínkách s limitovaným (nízkým) obsahem dusíkatých látek. U *Trametes* sp. I-62 bylo poukázáno na zvýšenou expresi genů a enzymové aktivity tří isoenzymů Lac v přítomnosti kyseliny *p*-kumarové a guajakolu [Terrón et al., 2004]. Ve shodě s touto prací, v práci Cheonga et al. [2006] byla pozorována vyšší exprese Lac v kulturách *T. versicolor* pěstovaných v kvasinkovém mediu bohatém na obsah živin a mediu MEG v přítomnosti TNT a jeho katabolitů. Nárůst genové exprese byl větší v brzké fázi po přidání látek (6 hod). V diplomové práci bylo pozorováno zvýšení hladiny aktivit Lac 2. den po přidání EE2 do kultur MEG *T. versicolor*.

Profil lakas *T. versicolor* byl během degradace EE2 studován s využitím IEF. Nativní IEF analýza supernatantů kultur odhalila až tři formy Lac, které byly produkovány v kulturách pěstovaných v přítomnosti EE2 5. den kultivace s rozsahem *pI* 3,93 – 4,09 (Tab. 16, str. 78). V biologických kontrolách byla v tento den kultivace detekována pouze jedna forma Lac o *pI* 4,17. Z těchto výsledků lze odvodit, že přítomnost EE2 hraje roli v produkci více forem Lac, a to v době poklesu úrovně transkripce genů kódujících Lac a přetrvávající Lac aktivity. Fujihira et al. [2009] zjistili, že *T. versicolor* UAMH 8272 produkoval během degradace PCB dvě skupiny lakas, každá z nich zahrnuje několik isoform o různých hodnotách *pI*. Skupina I obsahuje lakasy o *pI* v rozmezí 5,0 – 6,0, a skupina 2 disponuje hodnotami nižšími, o *pI* 3,0 – 4,0. V předkládané diplomové práci se formy Lac liší od obou skupin (Tab. 16, str. 78).

V houbě *I. lacteus* bylo dále analyzováno zastoupení forem MnP produkovaných do supernatantu kultur. V tomto případě byly detekovány většinou dvě formy MnP, avšak v kulturách stimulovaných EE2 a biologických kontrolách byly formy MnP o odlišných *pI* (Tab. 17, str. 79). Také v průběhu kultivace docházelo v kulturách stimulovaných EE2 i v kontrolách ke změnám profilů *pI* enzymu.

Výsledky jsou v souladu se studiem profilů MnP kultur *I. lacteus* během dekolorizace syntetických barviv [Šušla & Svobodová, 2008], kdy přidání různých syntetických barviv ovlivnilo hodnoty *pI* produkovaných MnP a následně změnilo schopnost supernatantů kultur dekolorizovat barviva. Z imobilizovaných kultur *I. lacteus* byla jako hlavní forma enzymu izolována MnP o *pI* 4,8 [Sklenář et al., 2010]. V této práci byly však detekovány formy MnP o *pI* rozdílném od obou výše zmíněných prací (viz Tab. 17, str. 79).

Závěrem lze shrnout, že degradace EE2 u *I. lacteus*, *T. versicolor*, *P. chrysosporium* a *P. ostreatus* je spojena s enzymovými aktivitami Lac a MnP v supernatantu a myceliu. Exprese těchto enzymů je ovlivněna přidáním vlastního polutantu (EE2) a navíc podmínkami kultivace (složení media). V práci je ukázáno, že exprese enzymů je regulována na úrovni transkripce. Regulována je i tvorba *pI* forem enzymů i po poklesu transkripce. Dochází tedy k regulaci enzymové exprese na více úrovních.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo určení lokalizace degradační aktivity pro 17 α -ethinylestradiol (EE2) v kulturách MM ligninolytických hub *T. versicolor*, *I. lacteus*, *P. chrysosporium* a *P. ostreatus*.

- Nejefektivnější degradace EE2 byla pozorována u *I. lacteus* a *T. versicolor*, kdy byl veškerý EE2 (10 mg/l) odstraněn z media již během prvních 3 dnů inkubace.
- V *I. lacteus* byla degradace EE2 spojena s aktivitou MnP vyžadující přidání Mn²⁺ iontů a peroxidu vodíku k supernatantu a v *T. versicolor* s aktivitou Lac detekovanou v houbovém myceliu a supernatantu.
- *P. chrysosporium* odstranila EE2 (10 mg/l) za 7 dní a *P. ostreatus* až za 14 dní kultivace. Degradace u *P. chrysosporium* byla spojena s aktivitami Lac a MnP a u *P. ostreatus* byla degradace EE2 stimulována po přidání Mn²⁺ iontů a peroxidu vodíku k supernatantu kultur. Degradace se tedy pravděpodobně účastnila peroxidasová aktivita.

Dále byl v práci sledován vliv EE2 na expresi ligninolytických enzymů v houbových kulturách.

- V houbových kulturách *I. lacteus*, *T. versicolor*, *P. chrysosporium* a *P. ostreatus* v mediu MM a MEG byly detekovány aktivity Lac, MnP a LiP. Jejich exprese byla kromě EE2 ovlivněna i složením media.
 - V kulturách MEG stimulovaných EE2 *P. chrysosporium* byl pozorován znatelný efekt EE2 na expresi MnP. V kulturách MM byla detekována v průběhu celé kultivace nízká aktivita MnP.
 - Enzymové aktivity Lac a MnP v kulturách MEG *P. ostreatus* nevykazovaly signifikantní rozdíly. V kulturách pěstovaných v mediu MM byl pozorován nárůst aktivity MnP v biologických kontrolách.
 - Výrazný efekt EE2 na aktivity Lac a LiP byl pozorován v kulturách *T. versicolor* pěstovaných na mediu MEG. Obdobně byl v mediu MM zaznamenán v kulturách exponovaných EE2 nárůst hladiny Lac.
 - Mírný inhibiční efekt EE2 na enzymovou aktivitu MnP byl pozorován v kulturách stimulovaných EE2 *I. lacteus* kultivovaných v mediu MEG. V

kulturách pěstovaných v mediu MM stimulovaných EE2 byl naopak pozorován významný nárůst aktivity MnP oproti kontrolám.

- Genové exprese Lac *T. versicolor* a MnP *I. lacteus* byla kvantifikována pomocí qPCR.
 - Přidání EE2 ke kulturám *T. versicolor* vedlo druhý den kultivace k výraznému zvýšení transkripce jednoho specifického genu Lac.
 - U kultur *I. lacteus* stimulovaných EE2 byla 7. až 12. den kultivace zvýšená hladina mRNA MnP s poměrem transkriptů v kulturách exponovaných EE2 ke kontrolám 4,02 – 6,82. Indukce transkripce v kulturách mírně časově předchází nárůst aktivity MnP v supernatantu.
 - V kultuře houby *I. lacteus* byla transkripce MnP a hladina aktivity v supernatantu zvýšená oproti kontrolám až v době, kdy byl veškerý EE2 odstraněn z media. EE2 tedy pravděpodobně není přímým induktorem transkripce a indukovaný enzym nehraje roli v primárním ataku molekuly EE2.
 - U *T. versicolor* byla Lac transkribována zvýšenou měrou v době, kdy kultura degradovala EE2. Syntetizovaný enzym by se tedy mohl přímo účastnit degradace EE2.
- Zastoupení forem s různými hodnotami pI Lac *T. versicolor* a MnP *I. lacteus* v supernatantech kultur bylo studováno pomocí IEF.
 - IEF analýza supernatantu kultur *T. versicolor* odhalila až tři formy Lac, které byly produkovány v kulturách rostlých v přítomnosti EE2 5. den kultivace s rozsahem pI 3,93 – 4,09. V biologických kontrolách v tento den kultivace byla detekována pouze jedna forma Lac o pI 4,17.
 - V případě *I. lacteus* byly detekovány většinou dvě formy MnP, avšak v kulturách stimulovaných EE2 a biologických kontrolách byly MnP formy o odlišných hodnotách pI.
 - EE2 hraje roli v produkci více forem Lac *T. versicolor*, a to v době poklesu úrovně transkripce genů kódujících Lac a přetrvávající aktivity Lac. Aktivitu Lac v houbových kulturách ovlivňuje tedy kromě úrovně transkripce pravděpodobně i stabilita enzymu a mechanismy zajišťující tvorbu odlišných forem enzymů s různými hodnotami pI (posttranslační modifikace).

8. Seznam literatury

- Alloway J. B., Ayres D. C.: Chemical principles of environmental pollution. Chapman and Hall, London (1993)
- Arana-Cuenca A., Roda A., Téllez A., Loera O., Carbajo J.M., Terrón M. C., González A. E.: Comparative analysis of laccase-isozymes patterns of several related *Polyporaceae* species under different culture conditions. *J Basic Microbiol* 44 (2004) 79-87
- Asada Y., Watanabe A., Irie T., Nakayama T., Kuwahara M.: Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1251 (1995) 205-209
- Asgher M., Bhatti H. N., Ashraf M., Legge R. L.: Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19 (2008) 771-783
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Adams C. D., Tyagi R. D., Noguerol T. N., Pin B.: Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere* 70 (2008) 445-452
- Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R. D., Adams C. D.: Laccase-catalyzed conversion of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater. *Water Res* 41 (2007) 3281-3288
- Auriol M., Filali-Meknassia Y., Adams C. D., Tyagi R. D.: Natural and synthetic hormone removal using the horseradish peroxidase enzyme: temperature and pH effects. *Water Res* 40 (2006) 2847-2856
- Aust S. D.: Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environ Health Perspect* 103 (1995) 59-61
- Baborová P., Möder M., Baldrian P., Cajthamlová K., Cajthaml T.: Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Irpex lacteus*, and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the enzyme. *Res Microbiol* 157 (2006) 248-253
- Baldrian P., Gabriel J.: Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol Lett* 206 (2002) 69-74
- Beaudette L. A., Ward O. P., Pickard M. A., Fedorak P. M.: Low surfactant concentration increases fungal mineralization of a polychlorinated biphenyl congener but has no effect on overall metabolism. *Lett Appl Microbiol* 30 (2000) 155-160
- Bekker E. G., Pirtskhalaishvili D. O., Eliashvili V. J., Sinitssyn A. P.: Manganese peroxidase from *Pleurotus ostreatus*- isolation, purification, and properties. *Biochemistry* 57 (1992) 863-868
- Bennett J. W., Hollrah P., Waterhouse A., Horvarth K.: Isolation of bacteria and fungi from TNT-contaminated composts and preparation of ¹⁴C-ring labelled TNT. *Int Biodeter Biodegr* 35 (1995) 421-430
- Bogan B. W., Lamar R. T.: One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 61 (1995) 2631-2635
- Bollag J. M., Leonowicz A.: Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Appl Environ Microbiol* 48 (1984) 849-854
- Boyle J. S., Lew A. M.: An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet* 11 (1995) 8

- Bumpus J. A., Tatarko M.: Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: identification of initial degradation products and the discovery of a TNT-metabolite that inhibits lignin peroxidase. *Curr Microbiol* 28 (1994) 185-190
- Bumpus J. A., Tien M., Wright D., Aust S. D.: Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228 (1985) 1434-1436
- Bumpus J. A.: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 55 (1989) 154-158
- Cabana H., Jones J. P., Agathos S. N.: Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: A review. *Eng Life Sci* 7 (2007) 429-456
- Cajthaml T., Křesinová Z., Svobodová K., Möder M.: Biodegradation of endocrine disrupting compounds and suppression of estrogenic activity by ligninolytic fungi. *Chemosphere* 75 (2009a) 745-750
- Cajthaml T., Křesinová Z., Svobodová K., Sigler K., Řezanka T.: Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Environ Pollut* 157 (2009b) 3325-3335
- Collins P. J., Dobson A. D. W.: Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Appl Environ Microbiol* 63 (1997) 3444-3450
- Combalbert S., Hernandez-Raquet G.: Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Appl Microbiol Biotechnol* 86 (2010) 1671-1692
- Cripps C., Bumpus J. A., Aust S. D.: Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 56 (1990) 1114-1118
- Cullen D.: Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J Biotechnol* 53 (1997) 273-289
- Czajka C. P., Londry K. L.: Anaerobic biotransformation of estrogens. *Sci Total Environ* 367 (2006) 932-941
- D'Souza T. M., Boominathan K., Reddy C. A.: Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. *Appl Environ Microbiol* 62 (1996) 3739-3744
- de Jong E., Cazemier A. E., Field J. A., Debont J. A. M.: Physiological-Role of Chlorinated Aryl Alcohols Biosynthesized De-Novo by the White-Rot Fungus *Bjerkandera* Sp. Strain Bos55. *Appl Environ Microbiol* 60 (1994) 271-277
- Della Greca M., Pinto G., Pistillo P., Pollio A., Previtiera L., Temussi F.: Biotransformation of ethinylestradiol by microalgae. *Chemosphere* 70 (2008) 2047-2053
- Desbrow C., Routledge E. J., Brighty G. C., Sumpter J. P., Waldock M.: Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 32 (1998) 1549-1558
- Díaz R., Saparrat M. C. N., Jurado M., García-Romera I., Ocampo J. A., Martínez M. J.: Biochemical and molecular characterization of *Corioloopsis rigida* laccases involved in transformation of the solid waste from olive oil production. *Appl Microbiol Biotechnol* 88 (2010) 133-142
- Dietrich D., Hickey W. J., Lamar R. T.: Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3', 4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2', 4,4', 5,5'-hexachlorobiphenyl by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 61 (1995) 3904-3909
- Dittmer J. K., Patel N. J., Dhawale S. W., Dhawale S. S.: Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiol Lett* 149 (1997) 65-70
- Donnelly K. C., Chen J. C., Huebner H. J., Brown K. W., Autenrieth R. L., Bonner J. S.: Utility of four strains of white-rot fungi for the detoxification of 2,4,6-trinitrotoluene in liquid culture. *Environ Toxicol Chem* 16 (1997) 1105-1110

- Eaton D. C.: Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*: A ligninolytic fungus. *Enzyme Microb Technol* 7 (1985) 194-196
- Eggert C., Temp U., Eriksson K.-E. L.: The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl Environ Microbiol* 62 (1996) 1151-1158
- Eibes G., Cajthaml T., Moreira M. T., Feijoo G., Lema J. M.: Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 64 (2006) 408-414
- Elisashvili V., Kachlishvili E., Khardziani T., Agathos S. N.: Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot basidiomycetes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37 (2010) 1091-1096
- Elisashvili V., Kachlishvili E., Tsiklauri N., Bakradze M.: Physiological regulation of edible and medicinal higher basidiomycetes lignocellulolytic enzymes activity. *Int J Med Mushr* 4 (2002) 159-166
- Faison B. D., Kirk T. K.: Factors Involved in the Regulation of a Ligninase Activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 49 (1985) 299-304
- Faraco V., Piscitelli A., Sannia G., Giardina P.: Identification of a new member of the dye-decolorizing peroxidase family from *Pleurotus ostreatus*. *World J Microbiol Biotechnol* 23 (2007) 889-893
- Field J. A., De Jong E., Costa G. F., De Bont J. A. M.: Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi. *Appl Environ Microbiol* 58 (1992) 2219-2226
- Froehner S., Machado K. S., Stefen E., Nolasco M.: Occurrence of sexual hormones in sediments of mangrove in Brazil. *Water Air Soil Pollut* 219 (2011) 591-599
- Fujihiro S., Higuchi R., Hisamatsu S., Sonoki S.: Metabolism of hydroxylated PCB congeners by cloned laccase isoforms. *Appl Microbiol Biotechnol* 82 (2009) 853-860
- Gaskell J., Stewart P., Kersten P. J., Covert S. F., Reiser J., Cullen D.: Establishment of genetic linkage by allele-specific polymerase chain reaction: application to the lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol* 12 (1994) 1372-1375
- German U. A., Lerch K.: Isolation and partial nucleotide sequence of the laccase gene from *Neurospora crassa*: amino acid sequence homology of the protein to human ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1986) 8854-8858
- German U. A., Muller G., Hunziker P. E., Lerch K.: Characterization of two allelic forms of *Neurospora crassa* laccase. Amino- and carboxyl-terminal processing of a precursor. *J Biol Chem* 263 (1988) 885-896
- Gettemy J. M., Ma B., Alic M., Gold M. H.: Reverse Transcription-PCR Analysis of the Regulation of the Manganese Peroxidase Gene Family. *Appl Environ Microbiol* 64 (1998) 569-574
- Giardina P., Aurilia V., Cannio R., Marzullo L., Amoresano A., Siciliano R., Pucci P., Sannia G.: The gene, protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Eur J Biochem* 235 (1996) 508-515
- Giardina P., Autore F., Faraco V., Festa G., Palmieri G., Piscitelli A., Sannia G.: Structural characterization of heterodimeric laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 75 (2007) 1293-1300
- Giardina P., Cannio R., Martirani L., Marzullo L., Palmieri G., Sannia G.: Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 61 (1995) 2408-2413

- Giardina P., Palmieri G., Fontanella B., Riviuccio V., Sannia G.: Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. Arch Biochem Biophys 376 (2000) 171-179
- Giardina P., Palmieri G., Scaloni A., Fontanella B., Faraco V., Cennamo G., Sannia G.: Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. Biochem J 34 (1999) 655-663
- Gnanamani A., Jayaprakashvel M., Arulmani M., Sadulla S.: Effect of inducers and culturing processes on laccase synthesis in *Phanerochaete chrysosporium* NCIM 1197 and the constitutive expression of laccase isozymes. Enzyme Microb Technol 38 (2006) 1017-1021
- González T., Terrón M. C., Zapico E. J., Téllez A., Yagüe S., Carbajo J. M., González A. E.: Use of multiplex reverse transcription-PCR to study the expression of a laccase gene family in a Basidiomycetous fungus. Appl Environ Microbiol 69 (2003a) 7083-7090
- González T., Terrón M. C., Zapico E., Yagüe S., Téllez A., Junca H., González A.: Identification of a new laccase gene and confirmation of genomic predictions by cDNA sequences of *Trametes* sp. I-62 laccase family. Mycol Res 107 (2003b) 727-735
- Gramss G., Kirsche B., Voigt K. D., Gunther T., Fritsche W.: Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. Mycol Res 103 (1998) 1009-1018
- Hakala T. K., Hildén K., Majjala P., Olsson C., Hatakka A.: Differential regulation of manganese peroxidases and characterization of two variable MnP encoding genes in the white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. Appl Microbiol Biotechnol 73 (2006) 839-849
- Hammel K. E., Kalyanaraman B., Kirk T. K.: Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxin by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase. J Biol Chem 261 (1986) 16948-16952
- Hatakka A.: Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation. FEMS Microbiol Rev 13 (1994) 125-135
- Hawari J., Halasz A., Beaudet S., Paquet L., Ampleman G., Thiboutot S.: Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4.5. Appl Environ Microbiol 65 (1999) 2977-2986
- Heinfling A., Martinez M. J., Martinez A. T., Bergbauer M. S. U., Szewzyk U.: Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. Appl Environ Microbiol 64 (1998) 2788-2793
- Hiscox J., Baldrian P., Rogers H. J., Boddy L.: Changes in oxidative enzyme activity during interspecific mycelial interactions involving the white-rot fungus *Trametes versicolor*. Fungal Genet Biol 47 (2010) 562-571
- Hodgson J., Rho D., Guiot S. R., Ampleman G., Thiboutot S., Hawari J.: Tween 80 enhanced TNT mineralization by *Phanerochaete chrysosporium*. Can J Microbiol 46 (2000) 110-118
- Hoshida H., Nakao M., Kanazawa H., Kubo K., Hakukawa T., Morimasa K., Akada R., Nishizawa Y.: Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus *Trametes sanguinea* by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts. J Biosci Bioeng 92 (2001) 372-380
- Husain M., Husain Q.: Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: A review. Crit Rev Env Sci Tec 38 (2008) 1-42

- Husain Q.: Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 9 (2010) 117-140
- Cheong S., Yeo S., Song H. G., Choi H. T.: Determination of laccase gene expression during degradation of 2,4,6-trinitrotoluen and its catabolic intermediaters in *Trametes versicolor*. *Microbiol Res* 161 (2006) 316-320
- Cho N.-S., Kim D.-H., Cho H.-Y., Ohga S., Leonowicz A.: Effect of various compounds on the activity of laccases from basidiomycetes and their oxidative and demethoxylating activities. *J Fac Agr, Kyushu Univ* 51 (2006) 211-218
- Choudhary M. I., Musharraf S. G., Ali R. A., Atif M., Atta-ur-Rahman: Microbial transformation of Antifertility agents, norethisterone and 17- α -ethinyl estradiol. *Z Naturforsch* 59 (2004) 319-323
- Jackson M. M., Hou L. H., Banerjee H. N., Sridhar R., Dutta S. K.: Disappearance of 2,4-dinitrotoluene and 2-amino,4,6-dinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium* under non-ligninolytic conditions. *Bull Environ Contam Toxicol* 62 (1999) 390-396
- Jeffries T. W., Choi S., Kirk T. K.: Nutritional Regulation of Lignin Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 42 (1981) 290-296
- Jeffries T. W.: Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodeg* 1 (1990) 163-176
- Johannes C., Majcherczyk A., Huttermann A.: Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system. *J Biotechnol* 61 (1998) 151-156
- Johansson T., Nyman P. O.: A cluster of genes encoding major isozymes of lignin peroxidase, and manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Gene* 170 (1996) 31-38
- Jönsson L., Becker H. G., Nynam P. O.: A novel type of peroxidase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *BBA Protein Struct Mol Enzym* 1207 (1994) 255-259
- Kaushik P., Malik A.: Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. *Environ Int* 35 (2009) 127-141
- Keum Y. S., Li Q. X.: Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* 56 (2004) 23-30
- Kilaru S., Hoegger P. J., Kues U.: The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. *Curr Genet* 50 (2006) 45-60
- Kim H.-Y., Song H.-G.: Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Irpex lacteus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 61 (2003) 150-156
- Kim H.-Y., Song H.-G.: Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by white rot fungus *Irpex lacteus*. *Biotechnol Lett* 22 (2000) 969-975
- Klonowska A., Gaudin C., Asso M., Fournel A., Reglier M., Tron T.: LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp strain C30 obtained as recombinant protein in yeasts. *Enzyme Microb Technol* 36 (2005) 34 – 41
- Koschorreck K., Richter S. M., Swierczek A., Beifuss U., Schmid R. D., Urlacher V. B.: Comparative characterization of four laccases from *Trametes versicolor* concerning phenolic C-C coupling and oxidation of PAHs. *Arch Biochem Biophys* 474 (2008) 213-219
- Kuan I., Tien M.: Phosphorylation of lignin peroxidases from *Phanerochaete chrysosporium*. Identification of mannose 6-phosphate. *J Biol Chem* 264 (1989) 20350-20355
- Kues U., Ruhl M.: Multiple multi-copper oxidase gene families in Basidiomycetes- What for? *Curr Genomics* 12 (2011) 72-94
- Kumar S. V. S., Phale P. S., Durani S., Wangikar P. P.: Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol Bioeng* 83 (2003) 386-394

- Larrondo L. F., Avila M., Salas L., Cullen D., Vucuña R.: Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. *Microbiology* 149 (2003) 1177-1182
- Larrondo L. F., González B., Cullen D., Vucuña R.: Characterization of a multicopper oxidase gene cluster in *Phanerochaete chrysosporium* and evidence of altered splicing of the *mco* transcripts. *Microbiology* 150 (2004) 2775-2783
- Lee I. Y., Jung K. H., Lee CH., Park Y. H.: Enhanced production of laccase in *Trametes versicolor* by the addition of ethanol. *Biotechnol Lett* 21 (1999) 965-968
- Li D. M.; Youngs H. L.; Gold M. H.: Heterologous expression of a thermostable manganese peroxidase from *Dichomitus squalens* in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Biochem Biophys* 385 (2001) 348-356
- Li D., Alic M., Brown J. A., Gold M. H.: Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. *Appl Environ Microbiol* 61 (1995) 341-345
- Liers Ch., Bobeth C., Pecyna M., Ullrich R., Hofrichter M.: DyP-like peroxidases of the jelly fungus *Auricularia auricula-judae* oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. *Appl Microbiol Biotechnol* 85 (2010) 1869-1879
- Lorenzo M., Moldes D., Sanromán M. Á.: Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. *Chemosphere* 63 (2006) 912-917
- Lugaro G., Carrea G., Cremonesi P., Casellato M. M., Antonini E.: The oxidation of steroid hormones by fungal laccase in emulsion of water and organic solvents. *Arch Biochem Biophys* 1 (1973) 1-6
- Luis P., Kellner H., Martin F., Buscot F.: A molecular method to evaluate basidiomycete laccase gene expression in forest soils. *Geoderma* 128 (2005) 18-27
- Luis P., Walther G., Kellner H., Martin F., Buscot F.: Diversity of laccase genes from basidiomycetes in a forest soil. *Soil Biol Biochem* 36 (2004) 1025-1036
- Maijala P., Harrington T. C., Raudaskoski M.: A peroxidase gene family and gene trees in *Heterobasidion* and related genera. *Mycologia* 95 (2003) 209-221
- Majcherczyk A., Johannes C., Hüttermann A.: Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb Biotechnol* 22 (1998) 335-341
- Mansur M., Suárez T., González A. E.: Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62(CECT 20197). *Appl Environ Microbiol* 64 (1998) 771-774
- Martínez Á. T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M. J., Gutiérrez A., del Río J. C.: Biodegradation of ligninocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* 8 (2005) 195-204
- Martínez A. T.: Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb Technol* 30 (2002) 425-444
- Matsumura E., Yamamoto E., Numata A., Kawano T., Shin T., Murao S.: Structure of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxy-benzoic acids in the presence of ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)). *Agric Biol Chem* 50 (1986) 1355-1357
- McKinlay R., Plant J. A., Bell J. N. B., Voulvoulis N.: Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environ Int* 34 (2008) 168-183

- McMullan G., Meehan C., Conneely A., Kirby N., Robinson T., Nigam P., Banat I. M., Marchant R., Smyth W. F.: Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl Microbiol Biotechnol* 56 (2001) 81-87
- Moldes D., Lorenzo M., Sanroman M. A.: Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnol Lett* 26 (2004) 327-330
- Moreira P. R., Duez C., Dehareng D., Antunes A., Almeida-Vara E., Frere J. M., Malcata F. X., Duarte J. C.: Molecular characterisation of a versatile peroxidase from a *Bjerkandera* strain. *J Biotechnol* 118 (2005) 339-352
- Morgan P., Lewis S. T., Watkinson R. J.: Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotic compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 34 (1991) 693-696
- Myasoedova N. M., Chernykh A. M., Psurtseva N. V., Belova N. V., Golovleva L. A.: New efficient producers of fungal laccases. *Appl Biochem Microbiol* 44 (2008) 73-77
- Nagai M., Sakamoto Y., Nakade K., Sato T.: Isolation and characterization of the gene encoding a manganese peroxidase from *Lentinula edodes*. *Mycoscience* 48 (2007) 125-130
- Necochea R., Valderrama B., Diaz-Sandoval S., Folch-Mallol J. L., Vazquez-Duhalt R., Iturriaga G.: Phylogenetic and biochemical characterization of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiol Lett* 244 (2005) 235-241
- Nicotra S., Intra A., Ottolina G., Riva S., Danieli B.: Laccase-mediated oxidation of the steroid hormone 17 β -estradiol in organic solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* 15 (2004) 2927-2931
- Novotný Č., Cajthaml T., Svobodová K., Šušla M., Šašek V.: *Irpex lacteus*, a white-rot fungus with biotechnological potential – review. *Folia Microbiol* 54 (2009) 375-390
- Novotný Č., Vyas B. R. M., Erbanová P., Kubátová A., Šašek V.: Removal of various PCBs by various white-rot fungi in liquid cultures. *Folia Microbiol* 42 (1997) 136-140
- Ollikka P., Alhonmäki K., Leppänen V.-M., Glumoff T., Rajola T., Suominen I.: Decolorization of azo, triphenylmethane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 59 (1993) 4010-4016
- Palmieri G., Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G., Giardina P.: Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microb Technol* 33 (2003) 220-230
- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Fontanella B., Sannia G.: Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 66 (2000) 920-924
- Palmieri G., Giardina P., Bianco C., Scaloni A., Capasso A., Sannia G.: A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *J Biol Chem* 272 (1997) 31301-31307
- Pasti-Grigsby M. B., Paszcynski A., Gosczyński S., Crawford D. L., Crawford R. L.: Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 58 (1992) 3605-3613
- Pauwels B., Wille K., Noppe H., De Brabander H., Van de Wiele T., Verstraete W., Boon N.: 17 α -ethinylestradiol cometabolism by bacteria degrading estrone, 17 β -estradiol and estriol. *Biodeg* 19 (2008) 683-693
- Pease E. A., Andrawis A., Tien M.: Manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Primary structure deduced from cDNA sequence. *J Biol Chem* 264 (1989) 13531-13535

- Pease E. A., Tien M.: Heterogeneity and Regulation of Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. J Bacteriol 174 (1992) 3532-3540
- Piscitelli A., Giardina P., Lettera V., Pezzella C., Sannia G., Faraco V.: Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. Curr Genomics 12 (2011) 104-112
- Pointing S. B., Bucher V. V. C., Vrijmoed L. L. P.: Dye decolorization by sub-tropical basidiomycetous fungi and the effect of metals on decolorizing ability. World J Microbiol Biotechnol 16 (2000) 199-205
- Pointing S. B.: Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. Appl Microbiol Biotechnol 57 (2001) 20-33
- Pribnow D., Mayfield M. B., Nipper V. J., Brown J. A., Gold M. H.: Characterization of a cDNA encoding a manganese peroxidase, from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J Biol Chem 264 (1989) 5036-5040
- Reddy C. A., D'Souza T. M.: Physiology and molecular biology of the lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiol Rev 13 (1994) 137-152
- Reddy C. A.: The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. Curr Opin Biotechnol 6 (1995) 320-328
- Ren H. Y., Ji S. L., Ahmad N. U. D., Dao W., Cui C. W.: Degradation characteristics and metabolic pathway of 17 α -ethynylestradiol by *Sphingobacterium* sp. JCR5. Chemosphere 66 (2007) 340-346
- Revankar M. S., Lele S. S.: Enhanced production of laccase using a new isolate of white-rot fungus WR-1. Process Biochem 41 (2006) 581-588
- Rothschild N., Hadar Y., Dosoretz C. G.: Lignin peroxidase isozymes from *Phanerochaete chrysosporium* can be enzymatically dephosphorylated. Appl Environ Microbiol 63 (1997) 857-861
- Sack U., Heinze T. M., Deck J., Cerniglia C. E., Martens R., Zadrazil F., Fritsche W.: Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood decay fungi. Appl Environ Microbiol 63 (1997) 3919-3925
- Saparrat M. C. N., Guillén F., Arambarri A. M., Martínez A. T., Martínez M. J.: Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white-rot basidiomycete *Corioloropsis rigida*. Appl Environ Microbiol 68 (2002) 1534-1540
- Saparrat M., Balatti P. A., Martínez M. J., Jurado M.: Differential regulation of laccase gene expression in *Corioloropsis rigida* LPSC No. 232. Fungal Biol 114 (2010) 999-1006
- Sarmah A. K., Northcott G. L.: Laboratory degradation studies of four endocrine disruptors in two environmental media. Environ Toxicol Chem 27 (2008) 819-827
- Shi J., Fujisawa S., Nakai S., Hosomi M.: Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Water Res 38 (2004) 2323-2330
- Shimokawa T., Shoda M., Sugano Y.: Purification and characterization of two DyP isozymes from *Thanatephorus cucumeris* Dec 1 specifically expressed in an air-membrane surface bioreactor. J Biosci Bioeng 107 (2009) 113-115
- Shin K. W.: The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent. J Microbiol 42 (2004) 37-41
- Scheel T., Höfer M., Ludwig S., Hölker U.: Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. Appl Microbiol Biotechnol 54 (2000) 686-691
- Scheibner K., Hofrichter M.: Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. J Basic Microbiol 38 (1998) 51-59

- Sklenář J., Niku-Paavola M. L., Santos S., Man P., Kruus K., Novotný Č.: Isolation and characterization of novel pI 4.8 MnP isoenzyme from white-rot fungus *Irpex lacteus*. *Enzyme Microb Tech* 46 (2010) 550-556
- Soto A. M., Justicia H., Wray J. W., Sonnenschein C.: P-nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environ Health Persp* 92 (1991) 167-173
- Stewart P., Cullen D.: Organization and differential regulation of a cluster of lignin peroxidase genes of *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 181 (1999) 3427-3432
- Suzuki K., Hiraia H., Muratab H., Nishida T.: Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Res* 37 (2003) 1972-1975
- Svobodová K., Majcherczyk A., Novotný Č., Kües U.: Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresource Technol* 99 (2008) 463-471
- Swamy J., Ramsay J. A.: Effects of Mn²⁺ and NH₄⁺ concentrations of laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 51 (1999) 391-396
- Šušla M., Svobodová K.: Effect of various dyes on the production of manganese-dependent peroxidase isoenzymes by immobilized *Irpex lacteus*. *World J Microbiol Biotechnol* 24 (2008) 225-230
- Šušla M., Svobodová K.: Ligninolytické enzymy jako účinné nástroje pro biodegradaci obtížně rozložitelných organopolutantů. *Chem Listy* 100 (2006) 889-895
- Takagi S., Shirota C., Sakaguchi K., Suzuki J., Sue T., Nagasaka H., Hisamatsu S., Sonoki S.: Exoenzymes of *Trametes versicolor* can metabolize coplanar PCB congeners and hydroxy PCB. *Chemosphere* 67 (2007) 54-57
- Takamiya M., Magan N., Warner P. J.: Impact assessment of bisphenol A on lignin-modifying enzymes by basidiomycete *Trametes versicolor*. *J Hazard Mater* 154 (2008) 33-37
- Tamagawa Y., Yamaki R., Hirai H., Kawai S., Nishida T.: Removal of estrogenic activity of natural steroidal hormone estrone by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Chemosphere* 65 (2006) 97-101
- Tanaka T., Tonosaki T., Nose M., Tomidokoro N., Kadomura N., Fujii T., Taniguchi M.: Treatment of model soils contaminated with phenolic endocrine-disrupting chemicals with laccase from *Trametes* sp in a rotating reactor. *J Biosci Bioeng* 92 (2001) 312-316
- Ternes T. A., Stumpf M., Mueller J., Haberer K., Wilken R. D., Servos M.: Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* 225 (1999) 81-90
- Terrón M. C., González T., Carbajo J. M., Yaque S., Arana-Cuenca A., Téllez A., Dobson A. D. W., González A. E.: Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on *lcc* gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. *Fungal Genet Biol* 41 (2004) 954-962
- Thurston Ch. F.: The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140 (1994) 19-26
- Tien M., Kirk T. K.: Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Method Enzymol* 161 (1988) 238-248

- Tien M., Kirk T. K.: Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl. Acad Sci USA* 81 (1984) 2280-2284
- Tien M., Tu C.-P. D.: Cloning and sequencing of a cDNA for a ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Nature* 326 (1987) 520-523
- Tsukihara T., Honda Y., Sakai R., Watanabe T., Watanabe T.: Exclusive overproduction of recombinant versatile peroxidase MnP2 by genetically modified white rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. *J Biotechnol* 126 (2006) 431-439
- Tyler C. R., Jobling S., Sumpter J. P.: Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Crit Rev Toxicol* 28 (1998) 319-361
- Vaidya A. A., Datye K. V.: Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibres. *Colourage* 14 (1982) 3-10
- Wesenberg D., Kyriakides I., Agathos S. N.: White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol Adv* 22 (2003) 161-187
- Xiao Y. Z., Hong Y. Z., Li J. F., Hang J., Tong P. G., Fang W., Zhou C. Z.: Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 71 (2006) 493-501
- Xiao Y. Z., Chen Q., Hang J., Shi Y. Y., Wu J., Hong Y. Z., Wang Y. P.: Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia* 96 (2004) 26-35
- Yadav J. S., Quensen III J. F., Tiedje J. M., Reddy C. A.: Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254 and 1260) by white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener specific analysis. *Appl Environ Microbiol* 61 (1995) 2560-2565
- Yeo S., Kim M. K., Choi H. T.: Increased expression of laccase by the addition of phthalates in *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiol Lett* 278 (2008) 72-77
- Ying G. G., Kookana R. S.: Degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment. *Environ Sci Technol* 37 (2003) 1256-1260
- Ying G.-G., Kookana R. S., Ru Y.-J.: Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ Int* 28 (2002) 545-551
- Yoshimoto T., Nagai F., Fujimoto J., Watanabe K., Mizukoshi H., Makino T., Kimura K., Saino H., Sawada H., Omura H.: Degradation of estrogens by *Rhodococcus zopfii* and *Rhodococcus equi* isolates from activated sludge in wastewater treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 70 (2004) 5283-5289
- Zeddel A., Majcherczyk A., Hutterman A.: Degradation of polychlorinated biphenyls by white-rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* in a solid state system. *Toxicol Environ Chem* 40 (1993) 225-266
- Zolan M. E., Pukkila P. J.: Inheritance of DNA Methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol Cell Biol* 6 (1986) 195-200

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

| Jméno a příjmení S adresou | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|-------------------------------|----------|-----------------|----------|
|-------------------------------|----------|-----------------|----------|