

CHARAKTERISTIKA A POTENCIÁL VYUŽITÍ ANTIMIKROBIÁLNÍCH PROTEINŮ A PEPTIDŮ BRAMBORU (*Solanum tuberosum* L.)

VERONIKA BÁRTOVÁ, JAN BÁRTA, ANDREA KAMENOVÁ, ADÉLA STAŇKOVÁ
a VLADISLAV ČURN

Katedra rostlinné výroby a agroekologie, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Studentská 13, 370 05 České Budějovice
vbartova@zjf.jcu.cz

Došlo 20.10.11, přijato 15.12.11.

Klíčová slova: antimikrobiální proteiny, *Solanum tuberosum* L., inhibitory proteas, patatin, bramborové defensiny

Obsah

1. Úvod
2. Význam druhu *Solanum tuberosum* L. a jeho fytopatologická specifičnost
3. Antimikrobiální potenciál proteinů izolovaných z druhu *S. tuberosum* L.
 - 3.1. Antimikrobiální potenciál proteinů patatinového komplexu
 - 3.1.1. Biochemické vlastnosti patatinu s možným vztahem k obrannému systému
 - 3.1.2. Antimikrobiální aktivita patatinových proteinů
 - 3.2. Antimikrobiální potenciál inhibitorů proteas hlíz bramboru
 - 3.2.1. Klasifikace inhibitorů proteas hlíz bramboru a jejich biochemické vlastnosti
 - 3.2.2. Antimikrobiální vlastnosti inhibitorů proteas hlíz bramboru
 - 3.3. Antimikrobiální potenciál defensinů a ostatních proteinů
 - 3.3.1. Antimikrobiální aktivita a charakteristika defensinů
 - 3.3.2. Charakteristika ostatních antimikrobiálních proteinů
4. Praktické aspekty využití antimikrobiálních proteinů
5. Závěr

1. Úvod

Antimikrobiální proteiny a peptidy (*Antimicrobial Proteins*; AMPs) rostlin jsou specifické stresové proteiny, které mají schopnost omezovat až zcela inhibovat růst mikroorganismů¹. Většina AMPs byla identifikována jako peptidy o malé až velmi malé molekulové hmotnosti, s bohatým zastoupením cysteinu ve své struktuře, které

vykazují konstitutivní i indukovanou expresi². Antimikrobiální aktivita proteinů je chápána v širším smyslu a neomezuje se pouze na antibakteriální aktivitu (inhibice růstu bakterií), ale bývají do této skupiny zahrnuty také antifungální proteiny (inhibice růstu hub) a často zjednodušeně také proteiny s antivirovou aktivitou. Byly popsány i proteiny, které vykazují kombinovanou aktivitu – velmi typickými zástupci tzv. bifunkčních proteinů jsou rostlinné inhibitory proteas, které vykazují nejen negativní vliv na růst a vývoj bakterií, hub a v několika případech i virů, ale mají také schopnost inhibovat trávicí enzymy hmyzu – především trypsin a α -amylasu³. Studium rostlinných proteinů s aktivitou vůči patogenním či potenciálně patogenním mikroorganismům nabývá v poslední době na významu, neboť tyto proteiny nabízejí široké možnosti využití.

2. Význam druhu *Solanum tuberosum* L. a jeho fytopatologická specifičnost

Lilek hlíznatý nebo-li brambor (*Solanum tuberosum* L.) patří celosvětově mezi významné hlíznaté okopaniny. Z hlediska hospodářského patří spolu s pšenicí, rýží a kukuřicí k nejvýznamnějším zemědělským plodinám. Podle údajů organizace FAO je celosvětová produkce na úrovni 315 milionů tun hlíz ročně a dle historických zdrojů je druh *S. tuberosum* L. pěstován jako kulturní plodina již více než 10 000 let (cit.⁴).

Brambor patří do skupiny plodin s vysokou náchylností k chorobám. Hlízy obsahují značné množství vody a sacharidů, což vytváří ideální živné médium pro rozvoj nejrozličnějších patogenů. *Phytophthora infestans* patří k historicky nejzávažnějším chorobám brambor a odhaduje se, že až 3,5 miliard dolarů ročně činí náklady spojené s ochranou brambor proti této chorobě⁵. Produkce rezistentních genotypů bramboru je vzhledem k vysoké plasticitě patogena obtížná a studium genů rezistence, proteinů, peptidů a dalších látek podílejících se na procesu patogenese mohou být klíčovými aspekty zvyšování rezistence nových genotypů. Z houbových patogenů lze dále jmenovat často se vyskytující *Rhizoctonia solani* způsobující tzv. vložkovitost hlíz bramboru, *Fusarium solani* jako hlavní příčina fusariové hniloby brambor či *Alternaria solani* způsobující hnědou skvrnitost listů bramboru.

Z bakteriálních patogenů patří k významným původcům onemocnění *Ralstonia solanacearum* způsobující tzv. hnědou hnilobu brambor a *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* způsobující bakteriální kroužkovitost brambor. Obě tyto bakterie jsou na území ČR dle platné legislativy řazeny mezi karanténny organismy. Vzhledem k vegetativnímu množení brambor představují významné zdravotní hledisko také virové choroby⁶.

3. Antimikrobiální potenciál proteinů izolovaných z druhu *S. tuberosum* L.

Informace o AMPs izolovaných z druhu *S. tuberosum* L. jsou omezené a dostupné ve značně roztržité podobě. Kim a spol.⁷ rozděluje proteiny a peptidy druhu *S. tuberosum* s možnou antimikrobiální aktivitou do tří skupin. První skupina zahrnuje hlavní hlízový protein – globulinovou frakci označovanou také jako tuberin. Tato proteinová frakce byla později označena jako patatin a pod tímto názvem je všeobecně známá. Druhou skupinu představují hlízové inhibitory proteas a třetí skupina AMPs jsou tzv. bramborové defensiny.

3.1. Antimikrobiální potenciál proteinů patatinového komplexu

Patatinové proteiny jsou majoritní skupina hlízových proteinů⁸. Tyto proteiny jsou homogenní skupina glykoproteinů s molekulovou hmotností od 39 do 43 kDa a hodnotou isoelektrického bodu v rozsahu pH 4,6 až 5,2 (cit.⁹). Zastoupení patatinu v komplexu extrahovatelných bílkovin vykazuje vysokou míru genotypové variability, ale obvykle se pohybuje v rozpětí mezi 20 až 40 % (cit.¹⁰). Patatin je považován především za zásobní protein¹¹, ale vzhledem ke specifické enzymové aktivitě této skupiny proteinů byla vyslovena také hypotéza o možné účasti v obranném systému hlízy⁹.

3.1.1. Biochemické vlastnosti patatinu s možným vztahem k obrannému systému

U patatinových proteinů byly zjištěny enzymové aktivity, o kterých se předpokládá, že mají vztah k stresové či obranné fyziologii hlíz, neboť pro zásobní protein nemají opodstatnění.

Aktivita nespecifické lipidacylhydrolasy

Patatinové proteiny vykazují nespecifické hydrolasové aktivity (EC 3.1.1), tedy esterasovou aktivitu pro tvorbu voskových esterů i pro deacylace lipidů¹². Teorie týkající se fyziologické role LAH aktivity patatinu v obranném systému hlízy zahrnuje dvě hypotézy, které uvádí Pots⁹. Podle jedné z nich se LAH aktivita patatinu podílí na uvolnění mastných kyselin při poškození buňky napadené rostliny. Mastné kyseliny jsou následně oxidovány lipoxigenasami, což vede ke vzniku cytotoxických oxidovaných mastných kyselin. LAH aktivita má také za následek tvorbu ve vodě nerozpustných vosků, které zabraňují šíření patogena v rostlině. Podle teorie, kterou uvádí Strickland a spol.¹³, působí LAH aktivita patatinu na invazivní organismy přímou inhibicí, pravděpodobně narušením integrity buněčných stěn. Žádná z uvedených teorií nebyla nikdy přímo potvrzena.

Aktivita cytosolové fosfolipasy A₂ a A₁

Patatin také vykazuje aktivitu cytosolové fosfolipasy A₂ a A₁ (PLA₂; PLA₁ aktivita; EC 3.1.1.4). Aktivita fosfolipasy A₂ je vyšší, a proto je patatin označován jako enzym

s PLA₂ aktivitou. PLA₂ je lipolytický enzym, který katalyzuje hydrolýzu esterové vazby mastných kyselin v pozici *sn*-2 u diacylfosfolipidů. Výrazná PLA₂ aktivita byla zaznamenána především při použití substrátu fosfatidylcholinu s linolovou kyselinou navázanou v pozici *sn*-2. Významná je závislost aktivity PLA₂ na pH prostředí. V rozsahu hodnot pH 7,5 až 9,0 byla zaznamenána nejvyšší aktivita; při poklesu hodnoty pH pod 7,0 byla aktivita minimální. Tento vztah naznačuje, že PLA₂ aktivita patatinu je v rostlině regulována jeho lokalizací¹⁴. Patatin je neaktivní, pokud se nalézá ve vakuolách rostlinných buněk, kde převládá kyselé pH. Pokud je vlivem poškození buněk uvolněn z vakuol a transportován do cytosolu, dostává se do zásaditého prostředí a stává se aktivním. PLA₂ aktivita patatinu je indukována přítomností Ca²⁺ a předpokládá se, že na aktivaci PLA₂ aktivity má také podíl protein kinasa¹⁵. Fyziologická funkce rostlinných fosfolipas spočívá ve schopnosti odštěpovat z membránových fosfolipidů nenasycené mastné kyseliny; u rostlinných buněk se uvolňuje linolová kyselina nebo linolenová kyselina. Uvolněné mastné kyseliny slouží jako signální látky vedoucí k expresi „obránných“ genů¹⁶. Účast PLA₂ na signální transdukcii vyvolávající rezistentní reakci v bramborových buňkách při inokulaci inkompatibilní rasou houbového patogena *P. infestans*, nebo při kontaktu s elicitorem stěn hyf tohoto patogena byla potvrzena v práci Senda a spol.¹⁷.

Aktivita kyselé β-1,3-glukanasy

Z hlíz bramboru byl také izolován enzym s aktivitou kyselé β-1,3-glukanasy (GLU-40; EC 3.2.1.39), který byl následně identifikován jako patatin¹⁸. Proteiny s β-1,3-glukanasovou aktivitou patří mezi velmi typické PR proteiny rostlin mající schopnost vázat se na buněčné stěny hub a degradovat je, a tím omezit růst houbových organismů¹⁹. Obdobný mechanismus lze předpokládat i u patatinových proteinů, přestože toto nebylo nikdy přímo potvrzeno.

Aktivita β-1,2-xylosidasy

Poslední enzymovou aktivitou, která byla detegována u patatinu je aktivita β-1,2-xylosidasy (EC 3.2.1.37). Izolovaný enzym byl identifikován jako patatin až na základě charakterizace biochemických vlastností – molekulová hmotnost v rozsahu 39–40 kDa, pH pro optimální aktivitu 4,0–4,5 (teplota 50 °C) a vysoká homologie *N*-koncové sekvence polypeptidu s patatinem. β-1,2-Xylosidasa uvolňuje z *N*-glykanů xylosidasové molekuly vázané β-1,2 vazbou na β-mannosu. Podstata fyziologické funkce β-1,2-xylosidasy v hlízách je neznámá, ale předpokládá se její účast na obranném mechanismu hlíz²⁰.

3.1.2. Antimikrobiální aktivita patatinových proteinů

Informace týkající se prokázaného antimikrobiálního působení patatinu jsou velmi omezené. U patatinových proteinů, resp. isoform patatinových proteinů vykazujících β-1,3-glukanasovou aktivitu, je popsána schopnost inhibice klíčení zoospor patogena *P. infestans*^{21, 22} – patatin izolovaný z hlíz rezistentního genotypu vykazoval až

70% inhibici klíčení zoospor *P. infestans* při koncentraci $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ (cit.²²). Vztah patatinu k obrannému mechanismu vůči tomuto patogenu dokládá také odlišný způsob exprese proteinů patatinového komplexu u rezistentní a náchylné odrůdy – množství β -1,3-glukanasy detegované v hlízách rezistentní odrůdy po 14 hodinách od inokulace kompatibilní rasou *P. infestans* dosahuje až čtyřnásobné koncentrace oproti náchylné odrůdě; po 72 hodinách lze zaznamenat indukci syntézy patatinu i ve stoncích²².

3.2. Antimikrobiální potenciál inhibitorů proteas hlíz bramboru

Při napadení rostliny produkují patogenní organismy hydrolasy, které usnadňují pronikání patogena do rostlinných buněk. K nejvýznamnějším hydrolasám tohoto typu patří aktivní extracelulární proteinasy, které se podílejí na degradaci pektino-proteinového komplexu buněčných stěn rostlin. Logickým obranným mechanismem rostlin je schopnost syntézy inhibitorů proteas, které aktivitu proteas snižují nebo zcela inhibují²³. Nejvýznamnější patogen brambor, *P. infestans*, produkuje extracelulární serinové proteinasy. Infekce hlíz tímto patogenem je logicky doprovázena kumulací serinových inhibitorů proteas s Mr v rozsahu 20 až 25 kDa (cit.²⁴). Inhibitory proteas tvoří v hlízách bramboru velmi rozsáhlou skupinu (až 40 % všech extrahovatelných proteinů hlíz) s vysokou mírou strukturní i funkční variability⁸.

3.2.1. Klasifikace inhibitorů proteas hlíz bramboru a jejich biochemické vlastnosti

Inhibitory proteas hlíz bramboru se liší svou molekulovou hmotností, aminokyselinovým složením, hodnotou pI a inhibiční aktivitou²⁵. Nejčastěji jsou proteasové inhibitory klasifikovány dle aminokyselinového zbytku v aktivním místě na 1) serinové inhibitory proteas (serin či histidin v aktivním místě); 2) cysteinové inhibitory proteas (cystein v aktivním místě); 3) aspartátové inhibitory proteas (aspartát v aktivním místě) a 4) metallopeptasové inhibitory (kovové ionty v aktivním místě)²⁶. Pro inhibitory proteas hlíz bramboru se v současné době uplatňují dva klasifikační systémy. Starší systém dělí hlízové inhibitory proteas do tří skupin²⁷. První skupinu tvoří bramborový inhibitor I (PI-I; serinový inhibitor, pentamer, 40 kDa); druhou bramborový inhibitor II (PI-II, serinový inhibitor, dimer) a konečně třetí představují inhibitory proteas o hmotnosti 20 a 22 kDa, které lze dále rozlišit na inhibitory proteas Kunitzova typu, inhibitory cysteinových proteas, inhibitory aspartátových proteas a inhibitor karboxypeptidasy⁹. Detailnější klasifikační systém dělí hlízové inhibitory proteas do sedmi tříd dle jejich molekulové hmotnosti, stavby molekuly, hodnoty isoelektrického bodu a počtu sulfidických můstků v molekule, jak je uvedeno v tabulce I (cit.²⁵).

Schopnost inhibovat trávicí proteasy hmyzu předurčuje tyto proteiny k insekticidnímu působení. Přesto inhibitory proteas hlíz bramboru jsou považovány i za zásobní

Tabulka I

Základní vlastnosti inhibitorů proteas hlíz bramboru dle klasifikačního systému²⁵

Skupina	MW	pI	Klasifikace	Inhibované enzymy
Bramborový inhibitor proteas I (PI-I; Potato inhibitor I)	7,7–7,9 kDa pentamer 8 isoform	pH 5,1–7,8	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor proteas II (PI-2; Potato inhibitor II)	10,2 kDa dimer 7 isoform	pH 5,5–6,9	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Bramborový cysteinový inhibitor proteas (PCPI, Potato Cystein Protease Inhibitor)	20,1–22,8 kDa 6 inhibitorů	pH 5,8–9,0	cysteinový inhibitor	papain trypsin chymotrypsin
Bramborový aspartátový inhibitor proteas (PAPI, Potato Aspartyl Protease Inhibitor)	19,9–22,0 kDa 6 inhibitorů	pH 6,2–8,7	aspartátový inhibitor	cathepsin D trypsin chymotrypsin
Bramborový inhibitor Kunitzova typu (PKPI, Potato Kunitz Protease Inhibitor)	20,2 kDa 2 inhibitory	pH 8,0–9,0	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Ostatní serinové inhibitory (OSPI, Other Serine Protease Inhibitor)	21,0 a 21,8 kDa 2 inhibitory	pH 7,5–8,8	serinový inhibitor	trypsin chymotrypsin
Bramborový karboxypeptidasový inhibitor proteas (PCI, Potato Carboxypeptidase Inhibitor)	4,3 kDa	pH	metallopeptasový inhibitor	karboxypeptidasa A

proteiny; u řady z nich byla prokázána antimikrobiální činnost a byla u této skupiny proteinů popsána také indukce jejich syntézy na základě působení řady abiotických i biotických faktorů⁷. Jako příklad lze uvést kumulace inhibitorů chymotrypsinu v hlízách bramboru po jejich infekci patogenem *P. infestans* – konkrétně se jednalo o kumulaci proteinů o molekulové hmotnosti 21, 22 a 23 kDa. Tyto proteiny byly později identifikovány jako serinové inhibitory proteas Kunitzova typu a označeny jako PSPI-21 a PSPI-22. Protein o velikosti 23 kDa byl charakterizován jako cysteinový inhibitor proteas a označen jako PCPI-23 (cit.²⁸). Klíčovým faktorem kumulace inhibitorů proteas je pravděpodobně arachidonová kyselina, která je produkována patogenem *P. infestans* a je významným elicitorem obranné reakce brambor.

3.2.2. Antimikrobiální vlastnosti inhibitorů proteas hlíz bramboru

Antimikrobiální aktivita inhibitorů proteas hlíz bramboru byla doposud popsána pouze u několika málo zástupců. Hlízové inhibitory proteas Kunitzova typu patří k nejvýznamnější skupině. Jak již bylo uvedeno, při napadení hlíz patogenem *P. infestans* byla zjištěna kumulace inhibitorů Kunitzova typu s označením PSPI-21, PSPI-22, PCPI-23 a PKSI (cit.²⁸).

Inhibitor PSPI-21 je tvořen dvěma polypeptidovými řetězci o velikosti 16,5 a 4,5 kDa a vykazuje inhibiční aktivitu vůči trypsinu, chymotrypsinu a elastase. Protein PKSI je tvořen pouze jedním polypeptidovým řetězcem o velikosti 21 kDa a je aktivní vůči subtilisinu Carlsberg²⁹. Obdobně proteiny PSPI-22 a PCPI-23 jsou tvořeny jedním polypeptidovým řetězcem o hmotnosti 22 a 23 kDa (cit.²⁸). Zatímco inhibitor PSPI-22 inhibuje trypsin a chymotrypsin, PCPI-23 vykazuje aktivitu pouze vůči papainu. U inhibitorů (PSPI-21, PSPI-22 a PKSI) byl zjištěn průkazný inhibiční vliv na růst hyf a klíčení zoospor patogena *P. infestans*; inhibitory PSPI-21 a PKSI vykazovaly *in vitro* inhibiční účinky na růst mycelia a klíčení konidií houby *Fusarium culmorum*²⁹.

Ke skupině hlízových inhibitorů Kunitzova typu pravděpodobně náleží také protein označený jako AFP-J (Mr = 13,5 kDa; inhibice trypsinu, chymotrypsinu a pepsinu), u kterého byla zjištěna silná aktivita vůči kvasinkám *C. albicans*, *Trichosporon beigeli* a *Saccharomyces cerevisiae*. Antifungální aktivita nebyla u tohoto proteinu zaznamenána³⁰.

N-Koncová sekvence peptidu označeného jako Potide-G naznačuje, že i tento peptid patří do skupiny inhibitorů proteas Kunitzova typu. Jedná se malý peptid (Mr = 5578,9 Da) s pozoruhodnou termostabilitou³¹. Inhibiční aktivita byla popsána vůči trypsinu, chymotrypsinu a papainu. Antimikrobiální aktivita peptidu Potide-G zahrnuje bakteriální (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*) i houbové (*C. albicans*, *R. solani*) patogeny³². U tohoto peptidu se také předpokládá antivirový účinek – Potide-G byl izolován z hlíz odrůdy Golden valley, která se vyznačuje vysokou mírou polní rezistence vůči viru Y (cit.³¹).

Geny kódující inhibitory proteas Kunitzova typu v hlízách bramboru se dělí do tří homogenních tříd s označením A, B a C (cit.³³). Antifungální aktivita, konkrétně vůči houbovému patogenu *Fusarium monniliforme*, byla zaznamenána u homogenní skupiny A a B (cit.³³).

Inhibitor karboxypeptidasy (PCI) představuje nejmenší inhibitor proteas (4,3 kDa; 39 aminokyselinových zbytků) hlíz bramboru vykazující vysokou míru termostability²⁵. U tohoto peptidu byla zjištěna silná antifungální aktivita vůči významným patogenům rýže *Fusarium verticillioides* a *Magnaporthe oryzae* a z tohoto důvodu byl gen *pci* využit pro transgenózu rýže. Rostliny syntetizující hlízový inhibitor karboxypeptidasy vykazovaly zvýšenou rezistenci vůči zmíněným patogenům rýže i vůči hmyzům škůdcům *Chilo suppressalis* a *Spodoptera littoralis*³⁴.

Ke skupině inhibitorů proteas pravděpodobně patří i skupina extracelulárních hlízových proteinů o nízké molekulové hmotnosti, které popisují Rymareva a spol.³⁵. Extracelulární protein získaný z hlíz odrůdy náchylné vůči *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* obsahoval proteiny o velikosti 13, 12 a 11 kDa; u odolné odrůdy byl zaznamenán navíc výskyt proteinů o velikosti 21,5 a 19,5 kDa. Proteinový extrakt odolné odrůdy také vykazoval výrazně intenzivnější inhibiční aktivitu vůči patogenu *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

3.3. Antimikrobiální potenciál defensinů a ostatních proteinů

Rostlinné defensiny jsou variabilní skupinou malých proteinů/peptidů bohatých na cystein. Mechanismus účinku těchto obranných proteinů není zcela znám³. Defensiny izolované z hlíz bramboru jsou charakterizovány pouze částečně bez přesné znalosti mechanismu jejich působení. Do skupiny bramborových defensinů jsou řazeny proteiny/peptidy Snakin-1 (StSN1), Snakin-2 (StSN2), pseudothionin bramboru (StPth1) a defensiny DL1 a DL2 (cit.⁷).

3.3.1. Antimikrobiální aktivita a charakteristika defensinů

Bramborový pseudothionin (StPth1) vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči významným bakteriálním a houbovým patogenům bramboru – mezi jinými i vůči bakteriálním patogenům *Pseudomonas solanacearum*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* a houbovým patogenům *Fusarium solani*, *Coletotrichum coccoides* a *Botrytis cinerea*³⁶. Struktura tohoto defensinu s Mr 5 kDa je tvořena 47 aminokyselinami. U peptidu StPth1 nebyla zaznamenána inhibiční aktivita vůči trypsinu a stejně tak na rozdíl od „pravých“ thioninů neovlivňuje syntézu proteinů buněčné stěny a aktivitu β-glukoronidasy. Vysoká koncentrace tohoto defensinu byla nalezena především v květech, hlízách a listech bramboru. Peptid StPth1 vykazuje aktivitu vůči závažnému patogenu *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Navíc byla zjištěna schopnost peptidu způsobovat agregaci lysosomů, což naznačuje schopnost peptidu interagovat s membránovými strukturami buňky³⁷.

Další významnou skupinou bramborových defensinů jsou peptidy označované jako snakin-1 a snakin-2. U basického peptidu Snakin-1 (StSN1) byla prokázána rozsáhlá antimikrobiální aktivita. Struktura peptidu obsahuje 63 aminokyselinových zbytků (mol. hmot. 6,9 kDa), z nichž 12 je cysteinových a tvoří 6 sulfidických můstků. Gen *StSN1* je v rostlině bramboru exprimován konstitutivně v různých tkáních v průběhu vývoje rostliny. U tohoto peptidu nebyla zjištěna indukce syntézy po ošetření tkáně gibberelinovou kyselinou ani v reakci na různé abiotické a biotické stresory. Spektrum antimikrobiálního působení StSN1 je podobný jako u peptidu StSN2 (cit.³⁸). Při transformaci kulturních brambor geny *StSN1* druhu *Solanum chacoense* byla u transgenních linií zaznamenána zvýšená rezistence vůči patogenům *Pectobacterium corotovora* a *R. solani*³⁹.

Snakin-2 (StSN2) je basický peptid (pI = 9,16) s molekulovou hmotností 7 kDa, jehož struktura je tvořena signálním peptidem, kyselým peptidem (pI = 3,1) a následnou sekvencí 66 aminokyselinových zbytků. Struktura peptidu obsahuje 12 cysteinových zbytků a dle N-koncová sekvence představuje tento peptid jednu ze tří podtříd skupiny snakin/GASA proteinů. V průběhu života rostliny je

StSN2 exprimován v hlízách, stoncích, květech a listech. Expres genů *StSN2* nebyla detegována v kořenech a stolonech a byla zjištěna indukce syntézy v reakci na mechanické poškození a ošetření tkáně absicovou kyselinou. Expres genů *StSN2* byla na lokální úrovni zvýšena ošetřením tkáně kompatibilní rasou patogena *B. cinerea* a snížena po ošetření virulentní bakterií *Ralstonia solanacearum* a *Pectobacterium chrysanthemi*. Snakin-2 vykazuje antimikrobiální aktivitu již při velmi nízké koncentraci ($EC_{50} = 1\text{--}20\text{ }\mu\text{M}$) vůči rozsáhlé skupině houbových i bakteriálních patogenů – podrobnější informace jsou uvedeny v tab. II. V současné době je peptid StSN2 považován za významnou komponentu konstitutivního i indukovaného obranného systému bramboru³⁸.

Málo informací je známo o skupině bramborových defensinů s označením DL1 a DL2 (angl. desintegrin-like). Jedná se o skupinu peptidů, které mohou být fylogeneticky příbuzní s proteiny hadích jedů tzv. hadími desintegranty a sdílejí s touto skupinou proteinů některé z obecných vlastností⁷. Peptidy DL1 a DL2 byly izolovány z hlíz bramboru a u obou peptidů byla prokázána schopnost inhibovat růst bakterie *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. U peptidu DL2 byla zjištěna schopnost agregovat lyposo-

Tabulka II

Inhibice vybraných bakteriálních a houbových organismů působením snakinů StSN1 a StSN2 a defensinu StPTH1 izolovaných z brambor³⁸

Patogen	Inhibiční aktivita proteinu (EC_{50}) ^a [μM]		
	StSN2	StSN1	STPTH1
Bakterie			
<i>Clavibacter michiganensis</i>	1	4	7
<i>Ralstonia solanacearum</i>	NA	NA	25
<i>R. solanacearum</i> (<i>rfa</i>)	30	15	25
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	NA	NA	NA
<i>Rhizobium meliloti</i>	8	nt	NA
Houby			
<i>Botrytis cinerea</i>	2	0,8	1
<i>Fusarium solani</i>	3	2	0,2
<i>Fusarium culmorum</i>	2	2	NA
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	10	13	nt
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	20	13	nt
<i>Plectosphaerella cucumerina</i>	10	10	10
<i>Colletotrichum graminicola</i>	10	20	2
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	10	10	nt
<i>Bipolaris maydis</i>	20	20	10
<i>Aspergillus flavus</i>	20	20	nt

^a EC_{50} – koncentrace účinné látky způsobující 50% inhibici cílového organismu; NA – peptid neaktivní při koncentraci $\leq 20\text{ }\mu\text{M}$; nt – varianta nebyla testována

my, což naznačuje schopnost tohoto peptidu interagovat s buněčnými membránami inhibovaných bakteriálních buněk; v případě peptidu DL1 schopnost agregace lysosomů zjištěna nebyla a mechanismus účinku tohoto peptidu zůstává neznámý.

3.3.2. Charakteristika ostatních antimikrobiálních proteinů druhu *S. tuberosum*

Převažující část izolovaných proteinů druhu *S. tuberosum*, u kterých byla popsána antimikrobiální aktivita, byla uvedena v předchozích částech. Z hlíz či jiných částí rostlinného těla druhu *S. tuberosum* byly izolovány také proteiny, které nelze řadit k žádné z již uvedených skupin, přesto je ale nutné se o nich zmínit.

Z listů bramboru byl izolován protein označený jako AP₁, který vykazoval inhibiční aktivitu vůči pěti patovarům bakteriálního patogena *R. solanacearum* a houbovým patogenům *Alternaria solani*, *R. solani*. Molekulová hmotnost proteinu je 32 kDa a na základě analýzy cDNA byla zjištěna přítomnost 343 aminokyselin. Protein obsahuje C-koncovou doménu, která má schopnost vazby na ATP a aminokyselinová sekvence N-konce proteinu vykazuje 58% podobnost s kyselou fosfatase izolovanou z druhu *Mesorhizobium loti*. Předpokládá se, že funkce AP₁ proteinu má souvislost s fosforylací a energetickým metabolismem rostliny⁴⁰. Potenciál z pohledu využití v genovém inženýrství má bramborový lektin, označovaný jako *Solanum tuberosum* agglutinin (STA). Bramborový lektin je chimerická, na chitin se vážající bílkovina skládající se z lektinové a glykoproteinové domény bohaté na hydroxyprolin⁴¹. Hmotnost bramborového lektinu v nativním stavu je 100 kDa, přičemž hmotnost sacharidické složky představuje 50 % (w/w)⁴². Doposud byla popsána schopnost lektinu inhibovat růst hyf a klíčení spor hub *Trichoderma viride* a *B. cinerea*⁴³.

Nedávno byla popsána antimikrobiální a proteolytická funkce rostlinných aspartátových proteas (APs)⁴⁴. U druhu *S. tuberosum* byly identifikovány tři aspartátové proteasy, z nichž jedna byla izolována⁴⁵ z hlíz (StAP1) a dvě z listů (StAP2 a StAP3). Purifikace a charakterizace byla provedena u proteinů StAP1 a StAP3, které oba mají extracelulární lokalizaci a jsou syntetizovány indukovaně v reakci na biotický i abiotický stres. Zmiňované proteiny pravděpodobně sehrávají klíčovou roli v obraně vůči *P. infestans*, neboť oba vykazují velmi silný, inhibiční účinek na klíčení zoospor *P. infestans* a konidií druhu *F. solani*⁴⁴. Podstatou mechanismu účinku proteinů StPA je pravděpodobně jejich schopnost interakce s povrchem spor a hyf zmiňovaných patogenů a následné zvýšení permeability buněčných membrán⁴⁶. Molekulová hmotnost aspartátové proteasy izolované z listů bramboru je 40 kDa; jedná se o monomerní glykoprotein s hodnotou optimálního pH kolem 3, který je inhibován pepstatinem⁴⁵. Vlastnosti aspartátové proteasy izolované z hlíz jsou podobné – molekulová hmotnost glykoproteinu 40 kDa, monomerní struktura, optimální pH 4–5 a inhibice pepstatinem⁴⁷.

4. Praktické aspekty využití antimikrobiálních proteinů druhu *S. tuberosum*

Proteiny či peptidy s antimikrobiální aktivitou mají široké možnosti uplatnění zahrnující oblasti humánní i veterinární medicíny (léčba houbových, kvasinkových a bakteriálních chorob, sterilizace nemocničního a chirurgického materiálu), potravinářský průmysl (např. konzervace potravin, produkce obalových materiálů nové generace) či oblasti zemědělských biotechnologií při tvorbě nových genotypů zemědělských plodin se zvýšenou rezistencí vůči klíčovým patogenům^{1,3}.

Inhibitory proteas hlíz bramboru patří k proteinové frakci, u které můžeme předpokládat nejširší varianty využití. Potenciál uplatnění inhibitorů proteas hlíz bramboru při léčbě různých onemocnění bylo již dříve shrnuto⁴⁸. Jako příklad lze uvést hlízový inhibitor karboxypeptidasy, který je dosud jediný známý inhibitor lidského epidermálního růstového faktoru (EGF). EGF spolu s receptorem (EGFR) tvoří součást některých aspektů vývoje nádoru⁴⁹. Antikarcinogenní účinky byly taktéž popsány u hlízových inhibitorů PI-1 a PI-2 (cit.⁵⁰).

Hlavní směr využití antimikrobiálních proteinů hlíz bramboru lze spatřovat ve zvyšování rezistence zemědělských plodin prostřednictvím zemědělských biotechnologií nebo šlechtitelských postupů – např. úspěšné využití genů *pci* (geny inhibitoru karboxypeptidasy) pro tvorbu GMO rýže se zvýšenou odolností vůči patogenům *F. verticillioidea* a *M. oryzae*³⁴. Potenciál markerů rezistence pro šlechtění druhu *S. tuberosum* má řada popsaných proteinů s prokázanou antibakteriální či antifungální aktivitou – např. patatin izolovaný z rezistentní odrůdy vykazoval vyšší míru inhibice klíčení spor patogena *P. infestans*²²; extracelulární protein (pravděpodobně skupina inhibitorů proteas) izolovaný z genotypů s prokázanou rezistencí vůči bakteriálnímu patogenu *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* obsahuje proteiny, které u náchylných odrůd nalezeny nebyly³⁵; protein Potide-G (inhibitor proteas Kunitzova typu) byl dosud izolován pouze z hlíz odrůdy Golden valley, která se vyznačuje vysokou mírou polní rezistence vůči viru Y (cit.³¹).

5. Závěr

Antimikrobiální proteiny a peptidy kulturního bramboru (*Solanum tuberosum* L.) byly dosud detegovány ve většině částí rostlinného těla, ale nejčastěji jsou izolovány z hlíz a listů. Jedná se o heterogenní skupinu proteinů, kterou lze klasifikovat dle společných biochemických vlastností do čtyř skupin. První skupinou je komplex patatinových proteinů, u nichž byla dosud popsána schopnost inhibice klíčení spor patogena *P. infestans*. Druhou skupinou jsou inhibitory proteas, a to zejména inhibitory proteas Kunitzova typu, u kterých byla popsána různorodá antifungální i antibakteriální aktivita. Třetí skupinou jsou tzv. bramborové defensiny, jejichž společným znakem je struk-

tura malých peptidů bohatých na cystein. A konečně poslední skupina zahrnuje proteiny vykazující antimikrobiální aktivitu, které nelze přiřadit k žádné z předchozích skupin, ať již z důvodu neexistence podobnosti či nedostatečného množství informací o těchto proteinech. Jedná se např. o AP₁ protein izolovaný z listů nebo velmi perspektivní skupinu aspartátových proteas. Potenciál využití antimikrobiálních proteinů druhu *Solanum tuberosum* je široký, zahrnující oblasti veterinární a humánní medicíny i uplatnění v zemědělských biotechnologiích při produkci genotypů plodin se zvýšenou rezistencí vůči patogenním organismům.

Referát vznikl v rámci řešení projektu GAČR 522/09/1693, GAJU 064/2010/Z a výzkumného záměru MSM 6007665806.

LITERATURA

- Neubauerová T., Macková M., Macek T., Koutek B.: Chem. Listy 103, 460 (2009).
- Broekaert W. F., Cammue B. P. A., De Bolle M. F. C., Thevissen K., De Samblanx G. W., Osborn R. W.: Crit. Rev. Plant Sci. 16, 297 (1997).
- Heřmanová V., Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 100, 495 (2006).
- FAOSTAT: <http://www.potato2008.org/en/world/index.html>, staženo 2.8. 2011.
- Wang M., Allefs S., van den Berg R. G., Vleeshauwers V. G. A. A., van der Vossen E. A. G., Vosman B.: Tudor. Appl. Genet. 116, 933 (2008).
- Rasocha V., Hausvater E., Doležal P.: Škodlivý činitel bramboru abionózy, choroby a škůdci. Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod s.r.o, Havlíčkův Brod (2008).
- Kim J.-Y., Park S.-Ch., Hwang I., Cheong H., Nah J.-W., Hahm K.-S., Park Y.: Int. J. Mol. Sci. 10, 2860 (2009).
- Bárta J., Čurn V.: Chem. Listy 98, 373 (2004).
- Pots A. M.: Disertační práce. Wageningen Agricultural University, Wageningen 1999.
- Bárta J., Bártová V.: Czech J. Food Sci. 26, 347 (2008).
- Rosahl S., Schmidt R., Schell J., Willmitzer L.: Mol. Gen. Genet. 203, 214 (1986).
- Dennis S., Galliard T.: Phytochemistry 13, 2469 (1974).
- Strickland J. A., Orr G. L., Walsh T. A.: Plant Physiol. 109, 667 (1995).
- Senda K., Yoshioka H., Doke N., Kawakita K.: Plant Cell Physiol. 37, 347 (1996).
- Kawakita K., Senda K., Doke N.: Plant Sci. 92, 183 (1993).
- Bostock R. M., Stermer B. A.: Annu. Rev. Phytopathol. 27, 343 (1989).
- Senda K., Doke N., Kawakita K.: Plant Cell Physiol. 39, 1080 (1998).
- Tonón C., Daleo G., Oliva C.: Physiol. Biochem. 39, 849 (2001).
- Selitrennikoff C. P.: Appl. Environ. Microbiol. 7, 2883 (2001).
- Peyer C., Boney P., Staudacher E.: Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics 1672, 27 (2004).
- Tonón C., Guevara G., Oliva C., Daleo G.: J. Phytopathol. 150, 189 (2002).
- Sharma N., Gruszewski H. A., Park S.-W., Holm D. G., Vivanco J. M.: Plant Physiol. Bioch. 42, 647 (2004).
- Ryan C. A.: Annu. Rev. Phytopathol. 28, 303 (1990).
- Valueva T. A., Revina T. A., Gvozdeva E. L., Gerasimova N. G., Ozeretskovskaya O. L.: Bioorg. Khim. 29, 499 (2003).
- Pouvreau L., Gruppen H., Piersma S. R., Broek van den L. A. M., Koningsveld van G. A., Voragen A. G. J.: J. Agric. Food Chem. 49, 2864 (2001).
- Jongsma M. A.: Disertační práce. Wageningen Agricultural University, Wageningen 1995.
- Richardson M.: Methods Plant Biochem. 5, 259 (1991).
- Valueva T. A., Revina T. A., Kladnitskaya G. V., Mosolov V. V.: FEBS Lett. 426, 131 (1998).
- Revina T. A., Gerasimova N. G., Kladnitskaya G. V., Halenko G. I., Valueva T. A.: Appl. Biochem. Microbiol. 44, 89 (2008).
- Park Y., Choi B. H., Klak J.-S., Kang Ch.-W., Lim H.-T., Cheong H.-S., Hahm K.-S.: J. Agric. Food Chem. 53, 6491 (2005).
- Tripathi G. R., Park J., Park Y., Hwang I., Park Y., Hahm K. S., Cheong H.: J. Agric. Food Chem. 54, 8437 (2006).
- Kim M. H., Park S. C., Kim J. Y., Lee S. Y., Kim Lim H. T., Cheong H. S., Hahm K. S., Park Y. K.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 346, 681 (2006).
- Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F.: Mol. Genet. Genomics 269, 526 (2003).
- Quallis J., Meynard D., Vila L., Avilés F. X., Guirderoni E.: Plant Biotechnol. J. 5, 537 (2007).
- Kovalskaya N., Hammond R. W.: Protein Expression Purif. 63, 12 (2009).
- Caaveiro J. M. M., Molina A., González-Mañas J. M., Rodríguez-Palenzuela P., García-Olmedo F., Goñi F. M.: FEBS Lett. 410, 338 (1997).
- Berrocal-Lobo M., Segura A., Moreno M., López G., García-Olmedo F., Molina A.: Plant Physiol. 128, 951 (2002).
- Almasia N. I., Bazzini A. A., Hopp E., Vazquez-Rovere C.: Mol. Plant Pathol. 9, 329 (2008).
- Feng J., Juan F., Gao Y., Liang Ch., Xu J., Zhang Ch., He L.: Biochem. J. 376, 481 (2003).
- Kieliszewski M. J., Showalter A. M., Leykam J. F.: Plant J. 5, 849 (1994).
- Damme van E. J. M., Barre A., Rougé P., Peumans W. J.: Plant J. 37, 34 (2004).
- Mirelman D., Galun E., Sharon N., Lotan R.: Nature 256, 414 (1975).

43. Guevara M. G., Veríssimo P., Pires E., Faro C., Daleo G. R.: J. Plant Pathol. 86, 233 (2004).
44. Guevara M. G., Daleo G. R., Oliva C. R.: Physiol. Plant 112, 321 (2001).
45. Mendieta J. R., Pagano M. R., Munoz F. F., Daleo G. R., Guevara M. G.: Microbiology 152, 2039 (2006).
46. Guevara M. G., Oliva C. R., Machinandiarena M., Daleo G. R.: Physiol. Plant 106, 164 (1999).
47. Stanford A., Bevan M., Northcote D.: Mol. Genet. Genomics 215, 200 (1989).
48. Pouvreau L.: *Disertační práce*. Wageningen Agricultural University, Wageningen 2004.
49. Sitja-Arnau M., Molina M. A., Blanco-Aparacio C., Ferrer-Soler L., Lorenzo J., Avilés F. C., Querol E., Llorens de R.: Cancer Lett. 226, 169 (2005).
50. Huang C., Ma W.-Y., Ryan C. A., Dong Z.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 11957 (1997).

V. Bártová, J. Bárta, A. Kamenová, A. Staňková, and V. Čurn (*Department of Plant Production and Agroecology, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, České Budějovice*): **Characteristics of Potato Antimicrobial Proteins and Peptides and Their Application Potential**

The review is focused on antimicrobial proteins and peptides isolated from cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* L.). The heterogenous group of specific proteins can be divided into four classes. The first is formed by patatin proteins which inhibit zoospore germination of the potato key pathogen *Phytophthora infestans*. The second class involves protease inhibitors mainly of the Kunitz type, which exhibit a wide range of antifungal and antibacterial activities. The third class contains potato defensins, small cysteine-rich peptides that are active against pathogens such as *Pseudomonas solanacearum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. The fourth class includes the antibacterial proteins that could not be classified into any of the mentioned classes. The AP₁ protein isolated from potato leaves or perspective aspartic proteases isolated from both potato tubers and leaves belong to this class. The application potentials of potato antimicrobial proteins and peptides are utilized in agricultural biotechnologies for creating resistant GMO genotypes of cultivated crops.