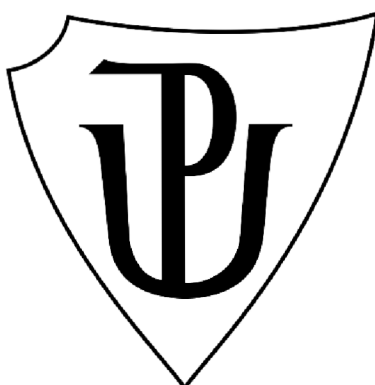


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Izolace aspartátových proteas z hub rodu Amanita**

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Štěpán Putna</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. Mgr. Marek Šebela Dr.</b>
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....

Podpis studenta

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat svému školiteli prof. Mgr. Marku Šebelovi Dr. za odborné vedení, rady  
vstřícný přístup, trpělivost a čas, který mi věnoval.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Štěpán Putna
Název práce:	Izolace aspartátových proteas z hub rodu Amanita
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	budova F2. Sdílené pracoviště Centrum regionu Haná pro biotechnologický a zemědělský výzkum (CATRIN) a PřF UP
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Šebela Dr.
Rok obhajoby práce:	2024
Abstrakt:	<p>Aspartátové proteasy jsou enzymy, které hydrolyzují vnitřní peptidové vazby v proteinech. V aktivním místě těchto endopeptidas se nacházejí dva zbytky kyseliny asparagové, které katalyzují samotnou hydrolýzu.</p> <p>V této práci byly připraveny extrakty z muchomůrky červené a růžovky. Z extraktů byly precipitovány proteiny, které byly následně přečištěny pomocí iontoměničové chromatografie. Proteiny z frakcí po iontoměničové chromatografii na koloně UNO Q1 byly separovány gelovou elektroforézou. Z gelu byly vyříznuty pásy pro identifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie a peptidového mapování. Pro muchomůrku červenou bylo takto potvrzeno dosažení vysokého přečištění aspartátové proteasy (peptidasa A1).</p>
Klíčová slova:	muchomůrky, aspartátová proteasa, chromatografie, proteasová aktivita, MALDI-TOF, SDS-PAGE
Počet stran	59
Počet příloh	0

Jazyk

Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Štěpán Putna
Title	Isolation of aspartic proteases from mushrooms of the genus <i>Amanita</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	building F2. Shared workplace of the Center of the Haná region for biotechnological and agricultural research (CATRIN) and the Faculty of Science UP
Supervisor	prof. Mgr Marek Šebela Dr.
The year of presentation	2024
Abstract	<p>Aspartic proteases are enzymes, that hydrolyze internal peptide bonds in proteins. In the active site of these endopeptidases, there are two residues of aspartic acids, that catalyze the hydrolysis itself.</p> <p>In this work, extracts from the fly agaric and blusher mushrooms were prepared. Proteins were precipitated from the extracts and subsequently purified using ion Exchange chromatography. Proteins from the fractions after ion exchange chromatography on a UNO Q1 column were separated by gel electrophoresis. Bands were excised from the gel for protein identification using mass spektrometry and peptide mapping. For the fly agaric, the achievement of high purification of aspartate protease (peptidase A1) was confirmed.</p>
Keywords	amanita, aspartic protease, chromatography, protease activity, MALDI-TOF, SDS-PAGE
Number of pages	59
Number of appendices	0

Language

Czech

# OBSAH

1	ÚVOD .....	2
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	4
2.1	Rod Amanita .....	4
2.1.1	Muchomůrka červená ( <i>Amanita muscaria</i> ).....	4
2.1.2	Muchomůrka růžovka ( <i>Amanita rubescens</i> ) .....	5
2.2	Látky obsažené v houbách z rodu Amanita .....	6
2.2.1	Proteiny .....	6
2.2.1.1	Acidotolerantní lektin z muchomůrky.....	6
2.2.1.2	Proteasy z muchomůrky červené.....	6
2.2.1.3	Trypsinové inhibitory .....	7
2.2.1.4	Extracelulární trehalasa .....	7
2.2.1.5	Falolysin .....	7
2.2.1.6	Toxofalin .....	8
2.2.2	Peptidy.....	8
2.2.2.1	Amatoxiny .....	8
2.2.2.2	Falotoxiny.....	12
2.2.2.3	Virotoxiny .....	14
2.2.2.4	Antamanid .....	15
2.2.3	Alkaloidy .....	17
2.2.3.1	Muskarin.....	17
2.2.3.2	Kyselina ibotenová, muscimol a muscazon .....	18
2.2.4	Barviva .....	20
2.2.4.1	Betalainy.....	20
2.2.5	Komplexy .....	21
2.2.5.1	Amavadin .....	21



3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
3.1	Materiál a metody.....	23
3.1.1	Použité chemikálie .....	23
3.1.2	Použité přístroje a pomůcky .....	24
3.1.3	Biologický materiál .....	25
3.2	Metody .....	25
3.2.1	Extrakce proteinů a purifikace aspartátové proteasy .....	25
3.2.2	SDS-PAGE.....	27
3.2.3	Měření obsahu proteinů.....	28
3.2.4	Měření proteolytické aktivity .....	29
3.2.5	Peptidové mapování MALDI-TOF .....	30
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	32
4.1	Měření obsahu proteinů a aktivity.....	32
4.2	Iontoměničová chromatografie na koloně UNO Q1 .....	33
4.3	SDS-PAGE elektroforéza.....	35
4.4	Peptidové mapování MALDI-TOF .....	37
5	ZÁVĚR.....	40
6	LITERATURA.....	41
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	47

## **CÍLE PRÁCE**

Budou připraveny proteinové extrakty z hub rodu *Amanita* (materiál je k dispozici zmrazený). Proteiny z extraktů budou separovány pomocí chromatografických metod (gelová a iontoměničová chromatografie). Ve frakcích bude měřena proteolytická aktivita sledováním štěpení chromogenního substrátu případně analýzou fragmentace modelových proteinů/peptidů (hmotnostní spektrometrie). Teoretická část se bude týkat hub rodu *Amanita* (muchomůrka) a informacím o proteinech, které byly z těchto hub studovány, například hemolytické lektiny.

# 1 ÚVOD

Říše hub je velmi rozšířenou skupinou různorodých organismů, která se účastní ve velké míře koloběhu látek v přírodě. Každým rokem se do této skupiny začleňuje okolo 700 nových druhů již k zhruba 270 000, kde odhady na konečný počet členů této skupiny činí až na 1,6 miliónu (J. Carlile et al., 2001).

Základní stavební jednotkou hub je eukaryotická buňka, která se od rostlinné buňky liší absencí chloroplastů a přítomností chitinu a glukanu místo celulosy v buněčné stěně. Rozmnožují se pomocí výtrusů (spory). Buňky se můžou sdružovat do dlouhých vláken nazývaných hyfy. Hyfy jsou mikroskopická větvená vlákna, které mezi jednotlivými buňkami můžou ale nemusí obsahovat přepážky, přepážka je propustná pro cytoplasmu a organely. Soubor hyf se nazývá podhoubí neboli mycelium (Webster & Weber, 2007). Podhoubí může při příznivých podmínkách teoreticky růst do nekonečna, příkladem může být podhoubí houby *Armillaria ostoyae*, které se rozkládalo na ploše 965 hektarů a jehož stáří se odhaduje na více než 2 000 let (A. Fergusson et al., 2003).

Houby jsou chemo-organotrofní organismy, to znamená že houby potřebují vnější zdroj organických látek pro získání energie a jako zdroj uhlíku. Podle zdroje organických látek je můžeme rozdělit na symbiotické a saprotrofní. Symbiotické získávají organické látky z ostatních organismů, a to buď na úkor hostitele (parazitismus) nebo ve vzájemně výhodném vztahu (mutualismus). Saprotrofní houby berou organické látky z odumřelých organismů (Kavanagh, 2005). Díky přítomnosti chitinu v buněčné stěně hyf houby nemohou přijímat velké molekuly, které by se až po vstupu enzymově štěpily. Proto se z hyf vylučují enzymy do prostředí, které velké molekuly rozštěpí a produkty následně mohou přejít přes buněčnou stěnu (Webster & Weber, 2007).

Houby se mohou množit pomocí spor, pučením, dělením nebo fragmentací. Pučení a dělení se vyskytuje u jednobuněčných hub jako jsou například kvasinky. Vyšší houby se mohou rozmnožovat fragmentací podhoubí anebo pomocí spor. Spory jsou jednobuněčné nebo mnohobuněčné částice, ze kterých může vzniknout další jedinec. Spory jsou vytvářeny ve velkých množstvích, aby se zvýšila šance na jejich uchycení v prostředí a nalezení vhodného substrátu. U vyšších hub se mohou hyfy organizovat do útvaru, který nazýváme plodnice a v nich se poté vytváří spory (Webster & Weber, 2007).

Některé houby vytvářejí mutualistické vztahy s řasami, sinicemi nebo kořeny různých rostlin. Mutualistické společenství mezi houbou a řasou či sinicí nazýváme lišejník a mutualistický vztah mezi houbou a kořeny nazýváme mykorhiza. V případě lišejníku dodává řasa houbě cukerné alkoholy a sinice sacharidy a houba pak naopak poskytne ochranu proti UV záření. U mykorhizy můžeme pozorovat kořeny které jsou obklopeny podhoubím. Rostlina dodává houbě produkty fotosyntézy a houba na oplátku dodává rostlině fosfáty, minerály, amoniak a může taky zvyšovat odolnost rostliny proti nemocem (Webster & Weber, 2007).

Mezi hlavní houby, které se využívají pro lidskou potřebu patří kvasinky z rodu *Saccharomyces* a *Candida* a houby z rodu *Aspergillus*. Tyto organismy mohou být snadno geneticky modifikovány, aby exprimovaly cizí geny jejichž produkty jsou pro člověka dále využitelné. Houby se využívají k výrobě enzymů (amylasa, cellulasa, proteasa), organických kyselin (citronová, jablečná a fumarová kyselina), ethanolu, aminokyselin (lysin, tryptofan a fenylalanin), léčiv (peniciliny, cefalosporiny, lovastatin, cyclosporin), vitamínů (B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> a C) a rekombinantních proteinů (inzulin, fytasa, protilátky) (Kavanagh, 2005).

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Rod *Amanita*

Houby z rodu *Amanita* (muchomůrka) jsou hojně rozšířeny, můžeme je najít téměř na všech kontinentech. Doposud známe kolem 500 druhů z tohoto rodu. Jsou důležitou součástí ekosystému, jelikož tvoří symbiotický vztah (mykorrhizu) s kořeny stromů. Nejvíce si však lidé tento rod spojují s jedovatými zástupci *A. phalloides* (muchomůrka zelená) a *A. muscaria* (muchomůrka červená)(Webster & Weber, 2007).

Rod *Amanita* můžeme taxonomicky zařadit do čeledi Amanitaceae (muchomůrkovité), podřádu Pluteineae, řádu Agaricales (lupenotvaré), podtřídy Agaricomycetidae (rouškaté), třídy Agaricomycetes (stopkovýtrusné), podkmene Agaricomycotina, kmene Basidiomycota (stopkovýtrusné) a do podříše Dikarya (Schoch et al., 2020).

Morfologicky můžeme tělo muchomůrek rozdělit na podzemní a nadzemní část. Podzemní část tvoří podhoubí a stará se o získávání živin z prostředí. Nadzemní část tvoří třeň a klobouk a dohromady tvoří celek nazývaný plodnice. Třeň má u svého počátku půlkulovitý útvar nazývaný pochva. Pochva vzniká při rozpadu plachetky, která chrání plodnici ve vývoji. Samotná třeň má tvar válce. Dále se na třeni může nacházet pozůstatek závoje nazývaný prstenec. Závoj začíná na hraně klobouku a vede pod kloboukem až na třeň a jeho hlavním účelem je krýt lupeny, které se nacházejí na spodní straně klobouku. Kulatý klobouk je zpravidla na horní straně hladký u některých druhů se mohou nacházet vystouplé skvrny, které vznikají při rozpadu plachetky. Na spodní straně klobouku se nacházejí lupeny, které vedou mezi hranou klobouku až do místa, kde klobouk dosedá na třeň. Lupeny mají právě tento tvar, protože tím zvyšují svůj povrch, na kterém se nachází výtrusné roušky, které se starají o vznik výtrusů (L. Stephenson, 2010).

#### 2.1.1 Muchomůrka červená (*Amanita muscaria*)

Muchomůrku červenou (obr. 1) nalezneme růst v různých poddruzích po celé severní polokouli. Vyskytuje se v lesích v okolí bříz (*Betula*), borovic (*Pinus*) a smrků (*Picea*), kde kořeny těchto stromů a podhoubí tvoří symbiotický vztah mykorrhizu (*Amanita muscaria* (L.) Pers. - Fly Agaric-First Nature, c1995-2023).



Obr. 1 Muchomůrka červená (*Amanita muscaria*). Převzato od (*Amanita muscaria* (L.) Pers. - Fly Agaric-First Nature, c1995-2023)

Nejstarší zmínky o muchomůrce červené pocházejí z knihy Rgvéda a v ní je popisováno užívání muchomůrky červené při rituálech nazývaných Soma. V tomto rituálu se používal extrakt získaný při lisování sušených muchomůrek mezi dvěma kameny, který se pak popíjel a následně vyvolával halucinace. Dále je také v ostatních knihách (Nový a Starý zákon, Yasna) popisována vlastnost léčit různé bolesti, nespavost a zažívací potíže (E. Teeter, 2007). Od muchomůrky červené odvozujeme samotné slovo muchomůrka, a to ze slov moucha a mořit (Rejzek, 2001), kdy se plodnice muchomůrky červené nechala mořit v mléce nebo vodě a poté se tento extrakt používal jakožto náplň do mucholapek, jelikož otupil mouchy a ty pak skončily v nádobě a následně se utopily (Lumpert & Kreft, 2016).

Hlavní biologicky aktivní látky a látky, které vyvolávají otravu a jsou obsažené v muchomůrce červené, jsou kyselina ibotenová a muscimol. První příznaky otravy muchomůrkou červenou se dostavují 15 až 30 minut po požití a patří mezi ně nevolnost, zvracení, průjem a nadměrné pocení. Po dalších 30 minutách se dostavuje euforie, halucinace, ospalost, zvýšená teplota, mimovolné pohyby svalů, rozšířené zorničky a citlivost na světlo (Stebelska, 2013). V ojedinělých případech může nastat koma (Mikaszewska-Sokolewicz et al., 2016) a při vysokých dávkách případně i smrt (Meisel et al., 2022) u většiny případů však příznaky odeznívají do 24 hodin po požití (Stebelska, 2013).

### **2.1.2 Muchomůrka růžovka (*Amanita rubescens*)**

Muchomůrku růžovku můžeme nalézt růst v lesích mírného pásu severní polokoule a taky v jižní Africe, kam nejspíše zavlečena člověkem. Tato houba roste v menších skupinách okolo stromů z jejichž kořeny tvoří mykorrhizu. Při jakémkoli poškození nebo jenom manipulaci se dužnina a lupeny zbarvují do růžova. Muchomůrka růžovka je jedna z jedlých hub z tohoto rodu, avšak syrová obsahuje hemolytický protein, který se musí tepelnou úpravou



Obr. 2 Muchomůrka růžovka (*Amanita rubescens*). Převzato od (*Amanita rubescens* Pers. - Blusher-First Nature, c1995-2023)

zdegradovat aby se stala jedlou. ((*Amanita rubescens* Pers. - Blusher-First Nature, c1995-2023).

## 2.2 Látky obsažené v houbách z rodu *Amanita*

### 2.2.1 Proteiny

#### 2.2.1.1 Acidotolerantní lektin z muchomůrky

Lektiny jsou proteiny neimunitního původu, které jsou schopné selektivně vázat sacharidy. Tento lektin byl izolován s houby *Amanita hemibapha* var. *ochracea*. Molekulární hmotnost tohoto lektinu je 37,4 kDa a dokáže si udržet svoji hemaglutinační aktivitu v kyselém prostředí, ale v zásaditém prostředí hemaglutinační aktivita rychle klesá, dále také ztrácí aktivitu při rostoucí teplotě, kdy při 40 °C je hemaglutinační aktivita poloviční a při 60 °C pouze osminová oproti aktivitě při 20 °C (Sekete et al., 2014).

Při testování vlastností tohoto lektinu, konkrétně v přítomnosti kovových iontů, tak zjistily že se zvyšující se koncentrací  $\text{Hg}^{2+}$  kationtů se hemaglutinační aktivita zvyšuje. Hemaglutinace je proces, při kterém se lektiny naváží na sacharidy na vnější membráně erytrocytů a následně vzniká sraženina. Díky vlastnosti tohoto lektinu zvyšovat svoji hemaglutinační aktivitu v přítomnosti  $\text{Hg}^{2+}$  iontů, může tento lektin najít uplatnění v diagnostice onemocnění spojených s otravou rtutí (Sekete et al., 2014).

#### 2.2.1.2 Proteasy z muchomůrky červené

Přítomnost dvou proteas AmProt1 a AmProt2 byla zjištěna z tekuté kultury v které bylo testováno podhoubí muchomůrky červené (*Amanita muscaria*). Obě tyto proteasy patří do skupiny aspartátových proteas, což znamená že tyto enzymy obsahují ve svém aktivním místě dva aspartátové zbytky, které katalyzují rozpad peptidové vazby. Proteasy se lišily hmotností,

kde AmProt1 má molekulovou hmotnost 45 kDa a AmProt2 90 kDa. Proteasa AmProt1 byla podhoubím vylučována až do hodnoty pH 5,4 a pH optimum této proteasy je kolem hodnoty 3 a AmProt2 byla vylučována v rozmezí pH 5,4-6,3, kde pH optimum této proteasy je v rozmezí 3 až 5,5. Rozdíl pH, během kterých se tyto proteasy vylučují, lze vysvětlit tím, že muchomůrka červená roste v lesích z různě kyselou půdou. Exkrece AmProt1 také ovlivňuje nedostatek dusíku a sacharidů (Nehls et al., 2001).

### **2.2.1.3 Trypsinové inhibitory**

Trypsin je proteolytický enzym ze skupiny serinových proteas, které ve svém aktivním místě obsahují serin. Trypsin je vylučován slinivkou břišní v inaktivované formě trypsinogenu do dvanáctníku. Optimální pH trypsinu se pohybuje v mírně zásadité oblasti. Trypsin štěpí peptidové vazby za aminokyselinami argininem a lysinu (Biochemický slovník-trypsin, 2007).

Trypsinové inhibitory byli izolovány z plodnic bedly vysoké (*Macrolepiota procera*), václavky obecné (*Armillaria mellea*) a muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*). Nakonec izolovali tři proteiny a nazvali je macrospin, amphaspin a armespin. Izolované inhibitory vykazují vysokou odolnost vůči teplotě, kde armespin a macrospin dokáží inhibovat i po vystavení teplotě 80 °C a amphaspin dokonce i po vystavení teplotě 100 °C, dále jsou také odolné vůči extrémním hodnotám pH okolo hodnot 2 a 11. Tyto inhibitory vykazují slabou inhibiční aktivitu i vůči jiným serinovým proteasám. Důvodem přítomnosti těchto inhibitorů u těchto hub je nejspíš to, že trypsiny jsou hojně sekretovány patogenními houbami a tím pádem tyto inhibitory chrání proti patogenním houbám (Lukanc et al., 2017).

### **2.2.1.4 Extracelulární trehalasa**

Trehalasa je enzym, který katalyzuje hydrolýzu neredukujícího sacharidu trehalosy na dvě molekuly glukosy. Přítomnost této trehalasy byla zjištěna z tekutého média, v kterém bylo pěstováno podhoubí muchomůrky červené. Optimální pH této trehalasy je kolem hodnoty 4 a izoelektrický bod okolo pH 3,7. Trehalosa je důležitým zásobním sacharidem u stopkovýtrusných hub (Basidiomycota), ale nalezneme ji i v bakteriích. Využití trehalosy z odumřelých bakterií může vést k tomu, že se zabrání růstu saprofytických organismů, které by mohly soutěžit o živiny s podhoubím (Wisser et al., 2000).

### **2.2.1.5 Falolysin**

Falolysin je hemolytický protein vyskytující se v muchomůrce zelené (*Amanita phalloides*). Většina otrav se stává z tepelně upravených hub a jelikož je tento enzym tepelně nestabilní a



rozkládá se v přítomnosti žaludečních šťáv, tak se mu přiřkládá malá role v celkové otravě muchomůrkou zelenou (Wieland et al., 1978).

Falolysin je směs tří proteinů s molekulovou hmotností 33 kDa. Falolysiny obsahují velké množství aminokyselin rozpustných ve vodě. V přítomnosti kyselin, močoviny a teploty 65 °C falolysin ztrácí svou hemolytickou aktivitu, avšak v přítomnosti proteas si svou hemolytickou aktivitu ponechává (Seeger, 1975).

Hemolytickou aktivitu falolysinu dělíme na tři fáze. První fáze je hotová do 30 minut po vystavení erythrocytu falolysinu a spočívá v navázání falolysinu do membrány erythrocytu. Ve druhé fázi vznikají iontové póry, a proto dochází k úniku  $K^+$  z buňky a vniknutí  $Na^+$  společně s vodou do buňky. Buňka začne zvětšovat svůj objem. Tato fáze trvá do 2 hodin po expozici. V třetí fázi dochází k rozrušení membrány, a to díky tomu že buňka příliš zvětšila svůj objem (Faulstich et al., 1983).

### **2.2.1.6 Toxofalin**

Toxofalin je toxický enzym nacházející se v muchomůrce zelené (*Amanita phalloides*). Vystavení buněk tomuto proteinu vede k vyvolání apoptozy nezávisle na aktivování kaspas (Stasyk et al., 2010).

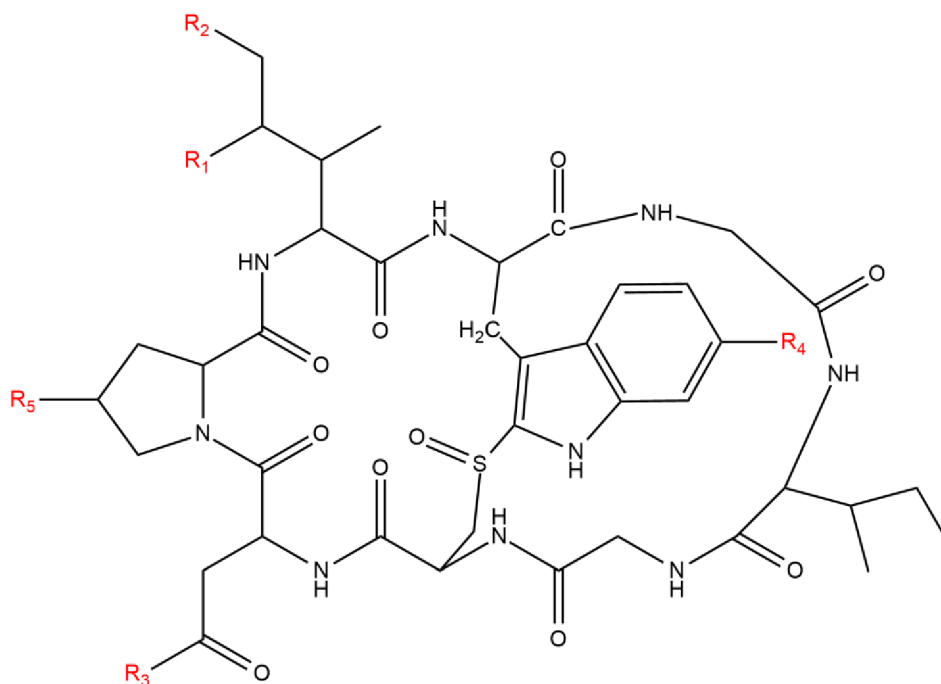
Toxofalin je poměrně nově objevený protein s molekulovou hmotností 55 kDa složený z 503 aminokyselin. Obsahuje větší množství prolinu, které nejspíše vede k jeho větší tuhosti (Stasyk et al., 2010).

Cytotoxická aktivita toxofalinu, spočívá v tvorbě reaktivních forem kyslíku (ROS). Jelikož toxofalin má jistou sekvenční podobnost s oxidasou L-aminokyselin z lakovky dvoubarvé (*Laccaria bicolor*), předpokládá se, že toxofalin má taky tuto enzymovou aktivitu. Oxidasa L-aminokyselin katalyzuje reakci při které z aminokyseliny vzniká oxokyselina a peroxid vodíku, který je jednou z ROS. Při působení nadměrné koncentrace ROS, dochází ke kondenzaci chromatinu a DNA a následně k apoptóze (Stasyk et al., 2010).

## **2.2.2 Peptidy**

### **2.2.2.1 Amatoxiny**

Amatoxiny jsou skupinou toxických peptidů, které stojí za většinou smrtelných otrav houbami. Amatoxiny jsou vytvářeny houbami rodu *Amanita*, *Lepiota*, *Galerina*, *Pholiotina* z čehož nejznámější jsou zástupci rodu *Amanita*, například muchomůrka jarní (*Amanita verna*), muchomůrka jízlivá (*Amanita virosa*) a muchomůrka zelená (*Amanita*



Obr. 3 Struktura amatoxinů. Převzato od (Garcia et al., 2015)

Tab. 1 Substituenty jednotlivých amatoxinů a jejich pozice. Převzato z (Garcia et al., 2015)

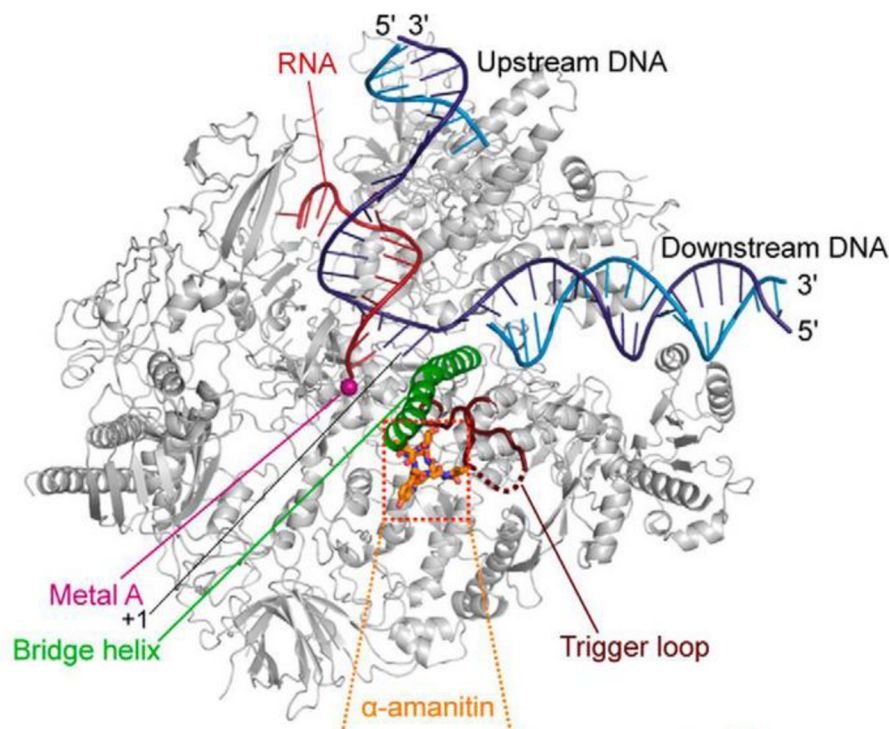
Amatoxin	R1	R2	R3	R4	R5
$\alpha$ -amanitin	CH <sub>2</sub> OH	OH	NH <sub>2</sub>	OH	OH
$\beta$ -amanitin	CH <sub>2</sub> OH	OH	OH	OH	OH
$\gamma$ -amanitin	CH <sub>3</sub>	OH	NH <sub>2</sub>	OH	OH
$\epsilon$ -amanitin	CH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	OH
Amanin	CH <sub>2</sub> OH	OH	OH	H	OH
Amaninamid	CH <sub>2</sub> OH	OH	OH	H	OH
Proamanullin	CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	OH	H
Amanullin	CH <sub>3</sub>	H	NH <sub>2</sub>	OH	OH
Amanullinová kys.	CH <sub>3</sub>	H	OH	OH	OH

*phalloides*), která sama o sobě stojí za 90-95 % všech úmrtí způsobených otravami z hub. Díky nízkému LD<sub>50</sub> amatoxinů pohybujícímu se okolo desetin mg/kg stačí k smrtelné otravě 75 kg člověka pouze 20-25 g muchomůrky zelené (Barbosa et al., 2023).

Do skupiny amatoxinů řadíme 9 sloučenin a to  $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin,  $\gamma$ -amanitin,  $\varepsilon$ -amanitin, amanin, amaninamid, amanullin, kyselinu amanullinovou a proamanullin. Amatoxiny se skládají z 8 L-aminokyselin uspořádaných do cyklického peptidu (obr 3). Uvnitř cyklu se nachází tryptathioninový můstek vytvořený mezi postranními řetězci aminokyselin cysteinu a tryptofanu. Amatoxiny se mezi sebou liší počtem navázaných hydroxylových skupin a taky podle toho, jestli mají v peptidovém řetězci kyselinu asparagovou (tab. 1), poté to jsou kyselé amatoxiny, anebo jestli mají asparagin, poté to jsou neutrální amatoxiny (Wieland, 1983)(Barbosa et al., 2023). Sekvence aminokyselin je Ile-Trp-Gly-Ile-Gly-Cys-Asn/Asp-Pro. Amatoxiny jsou bílé krystalické látky s molekulární hmotností okolo 900 g/mol. Díky navázaným hydroxylovým skupinám jsou dobře rozpustné v polárních rozpouštědlech. Amatoxiny jsou odolné vůči teplu, mrazu, enzymům a kyselinám, ale ve vodných roztocích se na vzduchu rozkládají. V amatoxinech přítomný indolový kruh způsobuje že amatoxiny pohlcují světlo, při pH 7 mají absorpční maxima okolo vlnové délky 300 nm, přesná hodnota záleží na tom, o jaký amatoxin se jedná (Barbosa et al., 2023) (Wieland et al., 1978).

Příznaky otravy amatoxiny se dostavují 6 až 12 hodin po požití. Mezi prvními symptomy se objevuje bolest břicha, zvracení a průjem, který přetrvává 1 až 2 dny, díky těmto příznakům dochází k velkému úbytku vody v organismu a dochází k hypovolemii a hypotenzii. Po 24 až 48 hodinách dochází k akutnímu selhání jater. Koncentrace sérových transaminas je několikanásobně vyšší, což značí že byla narušena integrita jaterních buněk, dále je taky snížená hladina koagulační faktoru V a prothrombinu. V důsledku selhání jater, která jsou hlavním metabolickým orgánem, se mohou objevit zvýšené koncentrace laktátu a amoniaku nebo snížené koncentrace fosforu a glukosy. Hypovolemie, selhání jater a toxicita amatoxinů vede k dysfunkci ledvin, které pak nejsou schopny vytvářenou moč v dostatečném množství, a proto dochází k metabolické acidóze, dysfunkci ledvin lze však předejít dostatečným dodáváním tekutin. Po selhání jater se dostaví hemodynamická nestabilita, tedy nedostatečný průtok krve organismem. Hromadění odpadních toxických metabolitů, které selhávající játra nezvládají odbourávat, způsobí jaterní encefalopatii a následné multiorgánové selhání (Valla, Durand, 2013).

Toxicita amatoxinů spočívá v jejich schopnosti inhibovat činnost DNA-dependentní RNA polymerasy II. Tento enzym vytváří vlákno RNA komplementární k DNA vzoru, takto vytvořená RNA pak slouží jako vzor pro tvorbu proteinů na ribozomu. Amanullin a proamanullin nejsou toxické, proamanullin díky chybějící hydroxylové skupině hydroxyprolinu ztrácí afinitu vůči RNA polymerase II a amanullin tvoří pouze slabý komplex s RNA



Obr. 4 Struktura savčí RNA-polymerasy II s navázaným  $\alpha$ -amanitinem (Liu et al., 2018).

polymerasou II, který podléhá rychlému rozpadu (Wieland et al., 1978). Většina článků, které jsem našel a jež, popisují mechanismus účinku amatoinů, se věnuje hlavně

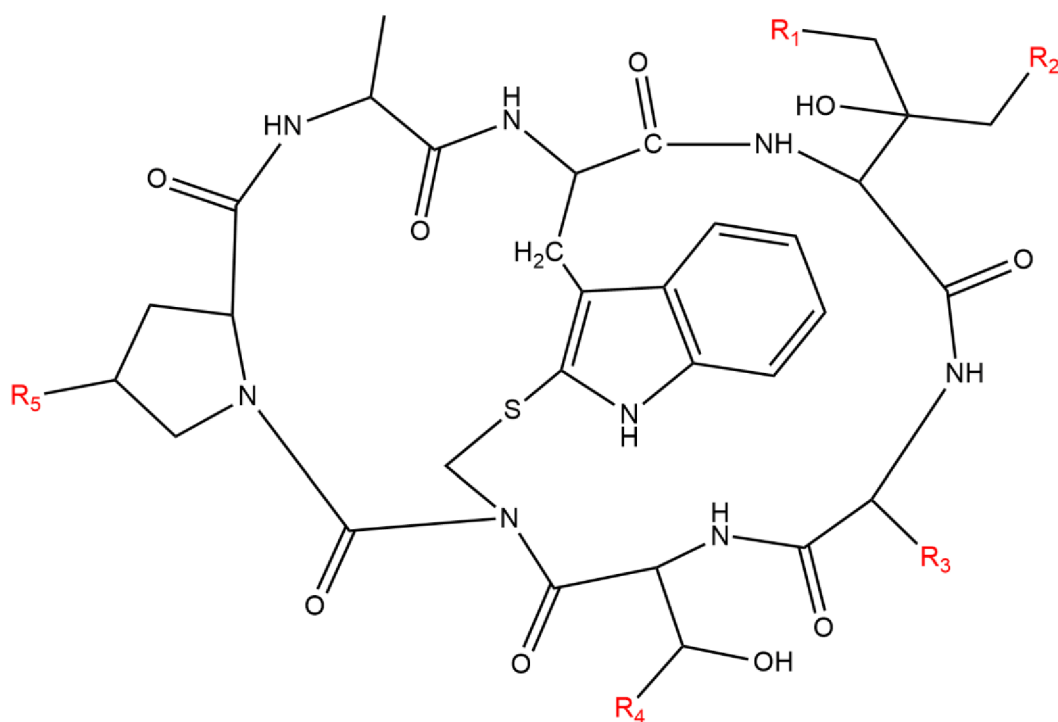
$\alpha$ -amanitinu, proto se část o mechanismu bude týkat pouze  $\alpha$ -amanitinu. Vysoká toxicita vůči játrům spočívá v přítomnosti transportního proteinu OATP1B3 (organic anion transport protein) v membráně hepatocytů, který je schopný přenášet  $\alpha$ -amanitin do buňky (Letschert et al., 2006). RNA polymerasa II ve své podjednotce Rbp1 obsahuje tzv. trigger loop, což je mobilní část aktivního místa, která zodpovídá za selektivitu a přisunukleosidtrifosfátů (NTP) kompatibilních k DNA templátu dále do aktivního místa. Trigger loop ve své sekvenci obsahuje His1085, který je důležitý pro aktivitu, a právě na tento histidin se váže  $\alpha$ -amanitin, který následně omezí pohyb trigger loopu a zastaví se transkripce mRNA (Kaplan et al., 2008). Ve struktuře krystalu RNA polymerasy II s  $\alpha$ -amanitinem (obr. 4), byla zjištěna taky jeho vazba na helix spojující podjednotky Rbp1 a Rbp2. Mezi  $\alpha$ -amanitinem a RNA polymerasou II vzniká v blízkosti helixového můstku několik vodíkových vazeb, tyto vazby omezují pozici helixového můstku vůči podjednotce Rbp2. Toto omezení poté blokuje translokaci DNA a RNA v aktivním místě enzymu (Bushnell et al., 2002). Takto způsobená inhibice translace  $\alpha$ -amanitinem vede k akumulaci proteinu p53. Protein p53 poté tvoří komplexy s protiapoptickými proteiny Bcl2 takto vzniklý komplex vede ke změně propustnosti vnější mitochondriální membrány, do cytoplasmy se tak dostane cytochrom *c*, který spouští reakci kaspáz vedoucí k apoptóze (Arima et al., 2005).

Pro svoji toxicitu byl také  $\alpha$ -amanitin testován jakožto součást možného léčiva proti některým typům rakoviny. Byla připravena protilátka specifická pro transmembránový protein EpCAM, který je exprimován v různých typech nádorů a dále na tuhle protilátku navázali  $\alpha$ -amanitin. Po rozpoznání EpCAM proteinu připravenou protilátkou se proteolyticky uvolní z molekuly  $\alpha$ -amanitin, který následně inhibuje funkci RNA polymerasy II v rakovinných buňkách (Moldenhauer et al., 2012).

### 2.2.2.2 Falotoxiny

Falotoxiny jsou cyklické peptidy, které se nacházejí v několika druzích hub z rodu *Amanita*, konkrétně v muchomůrce zelené (*Amanita phalloides*), muchomůrce jízlivé (*Amanita virosa*), muchomůrce jarní (*Amanita verna*) a v muchomůrce bílé (*Amanita phalloides* var. *Alba*) (Yilmaz et al., 2014)(Malak, 1976). LD<sub>50</sub> se řádově pohybuje kolem jednotek miligramů na kilogram váhy (Wieland, 1983).

Molekula falotoxinů (obr. 5) se skládá ze 7 aminokyselin uspořádaných do cyklického peptidu a stejně jako amatoxiny mají v molekule vnitřní tryptathioninový můstek, který se liší od toho v amatoxinech, tím že síra není oxidovaná na sulfoxidovou skupinu. Mezi falotoxiny řadíme faloin, profaloin, falisin, falacin falacidin, falisacin a nejznámější a nejvíce zkoumaný faloidin. Primární strukturu falotoxinů tvoří peptidová sekvence Ala- Thr-Cys-Pro-Ala-Trp-Leu. Rozdíl mezi jednotlivými falotoxiny je v počtu hydroxylových skupin, v substituci methylu za isopropylovou skupinu v molekule alaninu a taky v substituci



Obr. 5 Struktura falotoxinů. Převzato od (Garcia et al., 2015)

Tab. 2 Substituenty jednotlivých falotoxinů a jejich pozice. Převzato z (Garcia et al., 2015)

Falotoxin	R1	R2	R3	R4	R5
Faloidin	OH	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
Faloin	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
Profalin	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
Falisin	OH	OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH
Falacin	H	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COOH	OH
Falacidin	OH	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COOH	OH
Falisacin	OH	OH	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	COOH	OH

methylové skupiny threoninu za karboxylovou skupinu (Tab. 2). Až na threonin jsou všechny aminokyseliny v molekule v L konformaci. Také jsou odolné vůči teplu, mrazu, kyselinám i enzymovému štěpení (Wieland et al., 1978). Konkrétně nejvíce prozkoumaný faloidin je bílá látka s molekulární hmotností 788,9 g a je dobře rozpustný v polárních rozpouštědlech (PubChem Compound Summary for CID 4752, Phalloidin).

Falotoxiny oproti amatoxinům se nevstřebávají přes gastrointestinální trakt. Aby se projevíly jejich toxické účinky, musí být podány intraperitoneálně tzn. do břišní dutiny. Toxické účinky faloidinu se stejně jako u amatoxinů projevují v játrech. Faloidin působí daleko rychleji než amatoxiny, kdy v případě faloidinu může smrt nastat pár hodin po intoxikaci oproti smrti vyvolané amatoxiny, která nastává několik dní po intoxikaci (Wieland et al., 1978). Nejdříve se po 15 minutách zastavuje tvorba žluči a odbourávání bilirubinu. Játra díky velkému přísunu krve mohou až zdvojnásobit svoji váhu. Faloidin interaguje s cytoplazmatickou membránou a oslabuje jí. Toto oslabení způsobí to, že je buňka citlivá na změny v osmotickém tlaku. Přírodní tlak, který je přítomný v játrech, pak způsobí poničení cytoplasmatické membrány. Následně dochází k vylištění cytosolu do extracelulárního prostoru a k nekróze. Důsledkem je silné krvácení a smrt (Wieland, 1977).

Transport faloidinu probíhá přes transportní protein OATP1B1, který je přítomen pouze v hepatocytech (Fehrenbach et al., 2003). F-aktin je polymer složený z G-aktinových podjednotek a takto složený polymer tvoří mikrofilamenta, které jsou součástí cytoskeletu. Faloidin se váže na molekuly F-aktinu a stabilizuje ho vůči chaotropním iontům, ultrazvuku,

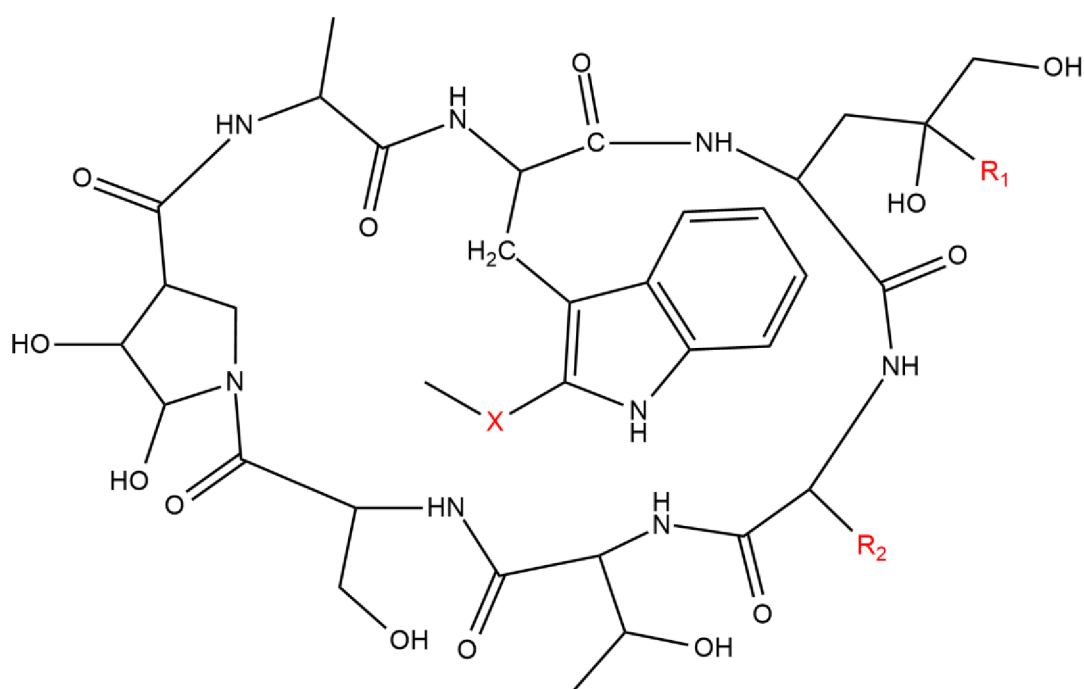
DNase I, cytochalasinům, teplu a proteolytickým enzymům. Faloidin se váže na vedlejší řetězce aminokyselin s číslem 117, 119 a 355 (Vandekerckhove et al., 1985). Faloidin taky urychluje polymerizaci G-aktinu na F-aktin z 10 až 20 minut na 2 až 4 minuty (Wieland, 1977).

Díky své vlastnosti, specifitě a silné vazbě vůči F-aktinu, se faloidin využívá při barvení v mikroskopii. Používá se faloidin konjugovaný s fluorescenčním barvivem, které díky specifitě faloidinu barevně zvýrazní pouze F-aktin (Phalloidin Conjugates for Actin Staining, c2006-2023).

### 2.2.2.3 Virotoxiny

Virotoxiny jsou cyklické peptidy obsažené pouze v muchomůrce jízlivé (*Amanita virosa*) (Faulstich et al., 1980). Do této skupiny řadíme viroisin, deoxyviroisin, viroidin, alaviroidin, deoxyviroidin a aladeoxoviroidin. LD<sub>50</sub> se pohybuje v jednotkách miligramů na kilogram hmotnost (Faulstich et al., 1980).

Strukturou jsou to monocyklické oktapeptidy s modifikovanými aminokyselinami (obr. 6). Například je zde přítomen 3,4-dihydroxyprolin a 2'-(methyl-sulfonyl)-L-tryptofan nebo 2'-(methyl-sulfinyl)-L-tryptofan (Tab. 3). Dále se předpokládá se, že vycházejí ze stejného prekurzoru jako falotoxiny. Stejně jako falotoxiny stabilizují F-aktin v hepatocytech. Příznaky jsou stejné jako při intoxikaci faloxiny (Wieland, 1983). Díky malé vstřebatelnosti a tím pádem i nebezpečí otravy je tato skupina toxinů málo prozkoumaná (Garcia et al., 2015).



Obr. 6 Struktura virotoxinů. Převzato od (Garcia et al., 2015).

Tab. 3 Substituenty jednotlivých virotoxinů a jejich pozice. Převzato z (Faulstich et al., 1980)

Virotoxin	X	R1	R2
Viroidin	SO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Deoxoviroidin	SO	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Alaviroidin	SO <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
Viroisin	SO <sub>2</sub>	CH <sub>2</sub> OH	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Deoxoviroisin	SO	CH <sub>2</sub> OH	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Aladeoxoviroidin	SO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

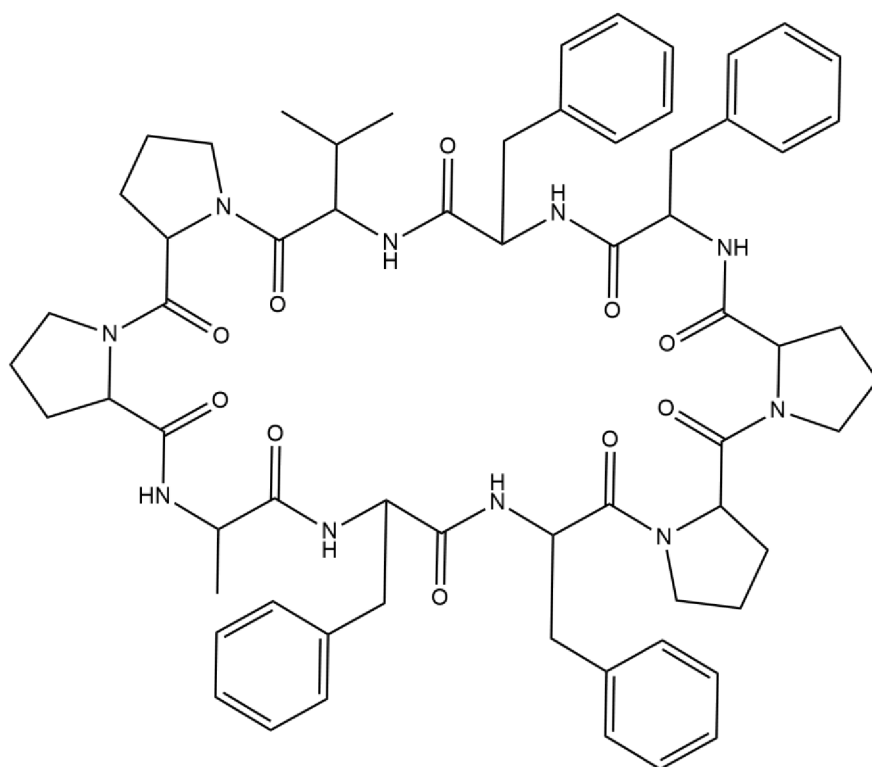
#### 2.2.2.4 Antamanid

Antamanid je peptid izolovaný z muchomůrky zelené (*Amanita phalloides*), který působí antagonisticky proti účinkům faloidinu. Už při dávce 0,5 až 1 mg dokáže zabránit otravě 5 mg faloidinu.

Antamanid je cyklický dekapeptid skládající se 10 nemodifikovaných L-aminokyselin (obr. 7). Sekvence antamanidu je Val-Pro-Pro-Ala-Phe-Phe-Pro-Pro-Phe-Phe. Proliny jsou důležité pro antitoxickou aktivitu, jelikož připravené analogy, u kterých chyběl alespoň jeden prolin už nevykazují antitoxickou aktivitu. Proliny nejspíše vytvářejí konformaci, která je schopna komplexovat ionty (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>) nebo napomáhají k navázání antamanidu na hepatocyty. V molekule obsahuje dvě vodíkové vazby mezi aminokyselinami valinem a fenylalaninem na pozici 5 a mezi fenylalaniny na pozici 6 a 10. Molekula antamanidu váže silně 2 až 3 molekuly vody, i v přítomnosti dehydratačního činidla P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> si dokáže alespoň 1 až 2 molekuly vody udržet (Wieland et al., 1978).

Mechanismus antitoxické aktivity vůči účinkům faloidinu není znám. Jelikož se faloidin nevstřebává při požití tak je i riziko otravy faloidinem nízké. Předpokládá se však, že nějakým způsobem interaguje buněčnou membránu (Wieland et al., 1978). Antamanid taky inhibuje otevírání mitochondriálního pór přechodné propustnosti (PTP) (Azzolin et al., 2011). PTP slouží k odvodu reaktivních forem kyslíku, Ca<sup>2+</sup> iontů a signálních molekul z mitochondrie do cytosolu a k udržení homeostázy buňky. Struktura PTP není dosud zcela přesně známá. PTP se může otevírat na krátkou nebo dlouhou dobu. Při krátkém otevření PTP se z mitochondrie dostávají reaktivní formy kyslíku, Ca<sup>2+</sup> ionty a signální molekuly a při delším otevření dochází inhibici syntézy ATP, rozrušení vnější mitochondriální membrány a vylití cytochromu c do cytosolu, který indukuje apoptózu (Endlicher et al., 2023). Při různých





Obr. 7 Struktura molekuly antamanidu. Převzato z ((Honisch et al., 2022).

nemocech se vylučují látky, indukující funkci PTP, což následně vede k apoptóze. Proto by mohl antamanid najít využití ve výzkumu inhibitorů PTP (Azzolin et al., 2011). Antamanid taky vykazuje imunosupresivní aktivitu např. při testu štěp versus hostitel nebo test přecitlivělosti oddáleného typu (Siemion et al., 1992), což je reakce T-lymfocytů na antigen (případně alergen) a následné vyvolání zánětlivé (alergické) reakce a nastává 12-72 hodin po styku s antigenem (alergenem) (Marwa & Kondamudi, 2023). Antamanid snižuje poškození orgánů spojené s jejich otokem vyvolaným působením interleukinu-2. Při otoku vyvolaném interleukinem-2 se mění propustnost membrány, kdy se do buněk dostává velké množství tekutin a ven unikají proteiny (Welbourn et al., 1991). Glycinové deriváty antamanidu jsou inhibitory enzymu tyrosinasy, který katalyzuje hydroxylaci fenolů a oxidaci difenolů ze kterých se poté syntetizuje hnědý pigment melanin (Honisch et al., 2022).

## 2.2.3 Alkaloidy

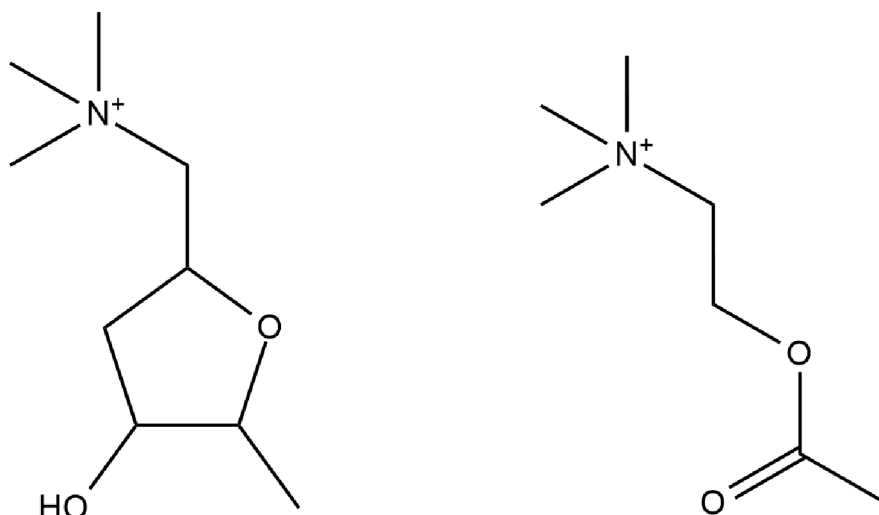
### 2.2.3.1 Muskarin

Muskarin je alkaloid nacházející se v houbách rodů *Inocybe* a *Clitocybe* a v malých množstvích i v muchomůrce červené (*Amanita muscaria*), ze které byl i poprvé izolován (Lurie et al., 2009).

Molekula muskarinu (obr. 8) obsahuje v molekule tetrahydrofuranový kruh a kvartérní amoniou sůl (QAS) (Jin, 2011). Muskarin se díky přítomnosti QAS nedostává přes hematoencefalickou bariéru, a proto působí jen na periferní nervovou soustavu (Wiegand, 2023).

Muskarin je agonistou muskarinových acetylcholinových receptorů. Tyto receptory jsou spřaženy s G-proteiny. Muskarinové receptory se dělí na 5 typů M1 až M5. M1 se nachází v CNS a exokrinních žlázách žaludku, M2 je v srdci a v CNS, M3 je v trávicí soustavě a exokrinních žlázách, M4 v CNS a v plicích a M5 je v CNS. Následně G-proteiny po aktivaci receptoru spouští reakční kaskádu, která buď stimuluje enzym fosfolipasu C (M1, M3, M5) nebo inhibuje enzym adenylyl cyklastu (M2, M4) (Caulfield, 1993).

Při otravě muskarinem se objevují symptomy jako je zvracení, tachykardie, průjem, bolest břicha, třes, rozostřené vidění a nadměrná tvorba potu, slin a slz. Příznaky mohou nastat už 15 minut po expozici, ale většinou se objevují do 2 hodin a odeznívají do 12 hodin při léčbě atropinem, který je antagonistou muskarinových receptorů (Lurie et al., 2009).



Obr. 8 Molekula muskarinu (vlevo) a acetylcholinu (vpravo). Převzato z (Muscarinic acetylcholine receptor, 2004)

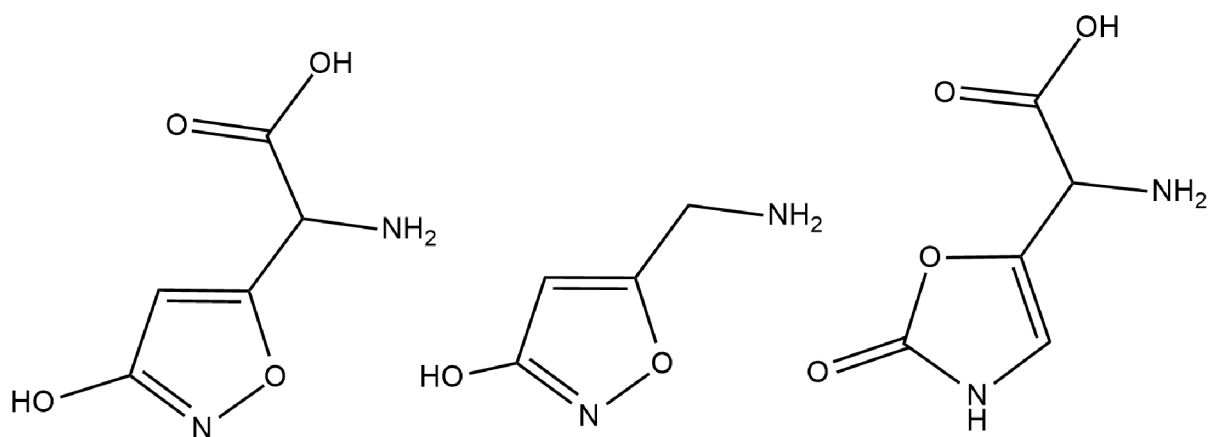
### 2.2.3.2 Kyselina ibotenová, muscimol a muscazon

Kyselina ibotenová, muscimol a muscazon jsou organické molekuly přítomné v muchomůrce červené (*Amanita muscaria*) a muchomůrce tygrované (*Amanita pantherina*). Muscimol je látka, která stojí za psychotropními účinky způsobenými otravou muchomůrkou červenou (Michelot & Melendez-Howell, 2003).

Kyselina ibotenová, muscimol a muscazon jsou malé organické molekuly tvořící bezbarvé krystaly. Molekuly kyseliny ibotenové a muscimolu obsahují isoxazolový kruh, zatímco muscazon obsahuje oxazolový kruh (obr. 9). Muscimol liší od kyseliny ibotenové absencí karboxylové skupiny a muscazon je laktamovým izomerem. Kyselina ibotenová a muscimol jsou rozpustné ve vodě (Michelot & Melendez-Howell, 2003). Kyselina ibotenová se v játrech dekarboxyluje na muscimol. Muscimol je pak následně schopen přecházet přes hematoencefalickou bariéru a působit na receptory v mozku (Stebelska, 2013).

Muscimol je strukturně podobný kyselině  $\gamma$ -aminobutanové (GABA)(obr. 10) a proto se dokáže vázat na  $GABA_{\alpha}$  receptor. GABA má v mozku funkci jako hlavní inhibiční neurotransmitter, takže při aktivaci receptoru se hyperpolarizuje membrána a snižuje se akční potenciál a tím pádem inhibuje přenos signálu (Stebelska, 2013).  $GABA_{\alpha}$  je transmitter-dependentní iontový kanál pro chloridy, kdy se po navázání transmiteru (GABA, muscimol) otevře kanál a umožní vstup chloridu přes membránu (Chebib & A. R. Johnston, 1999). Účinek muscimolu je taky umocněn tím, že blokuje zpětné vychytávání GABA ze synapse, a to tak, že je substrátem pro GABA-transaminasu, která odbourává GABA.

Kyselina ibotenová se díky strukturní podobnosti ke glutamátu váže na glutamátový receptor NMDA (Stebelska, 2013). Glutamát je hlavním excitačním neurotransmiterem.

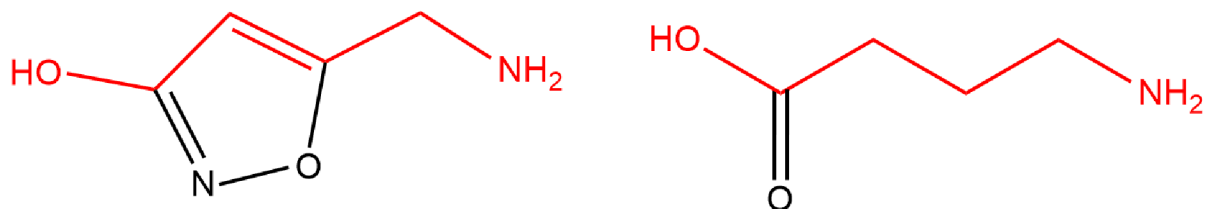


Obr. 9 Struktura molekuly kyseliny ibotenové (vlevo) a muscimolu (uprostřed) a muscazonu (vpravo). Převzato z (Michelot & Melendez-Howell, 2003)

v mozku. Pro aktivaci NMDA receptoru je potřeba navázání glutamátu a glycinu. Aktivování tohoto receptoru otevře kanál, který umožní kationtům jako jsou např.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  přecházet přes membránu (Scatton, 1993).

Vlivy muscazonu na centrální nervovou soustavu jsou oproti kyselině ibotenové a muscimolu minimální avšak působí později po intoxikaci. Muscazon vyvolává spavost zmatenost a nervozitu (Michelot & Melendez-Howell, 2003).

Muscimol se díky svým schopnostem vazby na GABA receptory stal terčem několika studií hledajících jeho možné lékařské využití. V jedné z těchto studií vpravovali injekcemi malé dávky muscimolu do thalamu pacientům s třesem, u kterých došlo po těchto injekcích ke krátkodobému utlumení třesu (Pahapill et al., 1999). Muscimol byl také testován na účinky proti záchvatům, kde opicím a potkanům podávali takové množství acetylcholinu schopného vyvolat záchvat a následně zjistili, že u jedinců, kterým předtím podali muscimol, se záchvat neobjevil (Ludvig et al., 2009). Při mozkové mrtvici vykazuje společně ve směsi s baclofenem neuroprotektivní účinky, kdy tato směs způsobí fosforylaci deaktivaci neuronové NO synthasy, která je při ischemii aktivovaná přílivem vápenatých iontů přes NMDA receptor aktivovaných glutamátem (Zhou et al., 2008). Oxid dusnatý totiž ve vysokých koncentracích způsobuje oxidační stres, inhibici enzymů dýchacího řetězce a glykolýzy, zvyšuje propustnost vnitřní mitochondriální membrány, kde pak následně tyto děje vedou k apoptóze nebo nekróze (Brown, 2010).



Obr. 10 Podobnost struktury muscimolu a GABA. Převzato z (Michelot & Melendez-Howell, 2003)

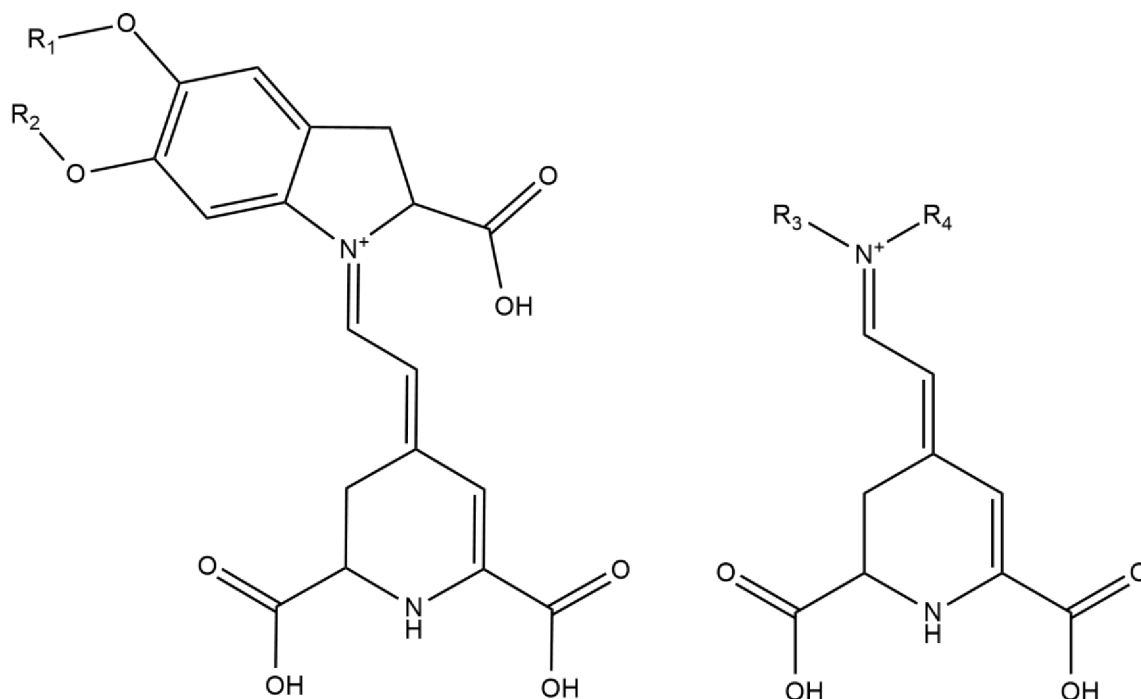
## 2.2.4 Barviva

### 2.2.4.1 Betalainy

Betalainy jsou pigmenty obsažené ve vyšších dvouděložných rostlinách z řádu hvozdíkotvaré (*Caryophyllales*) a v houbách z rodu muchomůrka (*Amanita*), voskovka (*Hygrocybe*) a šťavnatka (*Hygrophorus*). Dělíme je na dvě hlavní skupiny, a to betacyaniny, které mají červenou až fialovou barvu a na betaxanthiny, které jsou oranžové až žluté (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2021).

Všechny betalainy obsahují ve své molekule kyselinu betalamovou (obr. 11). U betacyaninů je na kyselinu betalamovou navázán iminiový adukt dioxyfenylalaninu, který může být ještě glykosylován nebo acylován. Betaxanthiny mají ve své molekule kyselinu betalamovou s navázanou aminovou skupinou nebo aminokyselinou. Betalainy díky přítomnosti konjugovaných dvojných vazeb pohlcují světlo, betaxanthiny absorbují světlo o vlnové délce 480 nm, kdežto betacyaniny absorbují vlnovou délku 540 nm. Tento rozdíl se dá vysvětlit přítomností cyklodioxyfenylalaninu v jejich molekule, který obsahuje další dvojně vazby schopné pohlcovat světlo. Betalainy se rozkládají při vystavení teplotě nad 50 °C (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2021).

Obr. 11 Obecná struktura betacyaninů (vlevo) a betaxanthinů (vpravo). Převzato (Sadowska-Bartosz &



Bartosz, 2021)

Betalainy jsou antioxidanty, a to díky přítomnosti fenolového a aminového cyklu, které dokáží darovat elektrony. Betalainy jsou schopny inhibovat peroxidaci lipidů a redukovat ROS např. superoxidový, peroxylový a hydroxylový radikál. Betalainy se touto reakcí nevratně zoxидují.

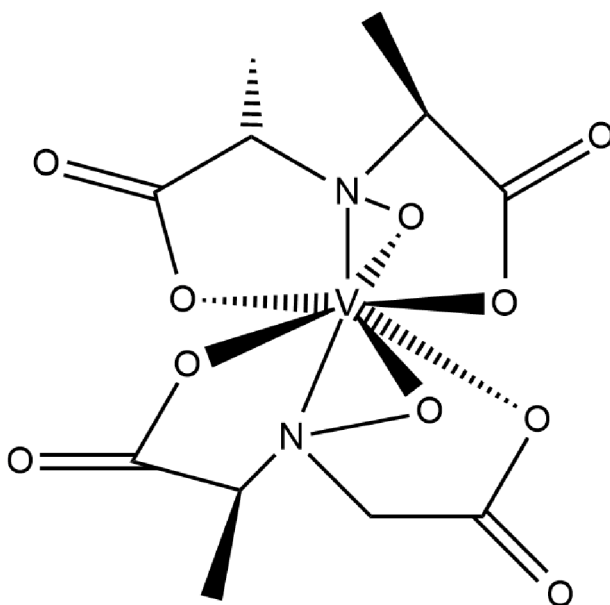
Betanin, který je obsažený v řepě červené (*Beta vulgaris*), se používá jako červené potravinářské barvivo, jeho použití je však omezené, protože se tepelně rozkládá a může mít zemitou chuť díky přítomnosti nečistot (Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2021).

## 2.2.5 Komplexy

### 2.2.5.1 Amavadin

Amavadin je komplex vanadu nacházející se v muchomůrce červené (*Amanita muscaria*), muchomůrce královské (*Amanita regalis*) a *Amanita velatipes*. Koncentrace vanadu u těchto hub je až 400x vyšší než u rostlin (Berry et al., 1999).

Vanad je v tomto komplexu přítomen jako iont  $Va^{4+}$ . Je vázán 8 koordinačně kovalentními vazbami, které vychází z dvou tetradentátních ligandů odvozených od *N*-hydroxyimino-2,2'-dípropionové kyseliny (Berry et al., 1999)(obr. 12). Je stabilní na vzduchu a rozpouští se ve vodě za vzniku modrého roztoku, při rozpuštění v dimethylsulfoxidu, dimethylformamidu a acetonu vytváří červený roztok, jelikož se v těchto rozpouštědlech vanad oxiduje do oxidačního stavu V (da Silva et al., 2013).



Obr. 12 Struktura molekuly amavadinu. Převzato od (da Silva et al., 2013)

Amavadin a jeho deriváty, u kterých je ligand odvozený od *N*-hydroxyimino-2,2'-dioctové kyseliny. Tyto sloučeniny katalyzují oxidaci thiolů, vody, uhlovodíků, alkoholů. Amavadin a jeho deriváty tyto reakce zprostředkovávají díky možnosti být ve stavu, kdy je atom vanadu oxidován na oxidační stav V (Pombeiro & , Sutradhar & da Silva, 2020).

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Materiál a metody

##### 3.1.1 Použité chemikálie

- 2-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- acetonitril (Merck, Německo)
- akrylamid (Bio-Rad, USA)
- azokasein (Sigma-Aldrich, Německo)
- bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan (Sigma-Aldrich, Německo) tj. BIS-TRIS
- Coomasie Brilliant Blue G250 (Serva, Německo)
- dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německo)
- dithiothreitol (Sigma-Aldrich, Německo)
- hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo)
- hydrogenfosforečnan draselný (Lach-ner, Česká republika)
- hydroxid sodný (Honeywell, USA)
- chlorid sodný (Lach-ner, Česká republika)
- jodacetamid (Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina fosforečná (Lach-ner, Česká republika)
- kyselina chlorovodíková (Lach-ner, Česká republika)
- kyselina trichloroctová (Sigma-Aldrich, Německo)
- kyselina  $\alpha$ -kyanohydroxyskořicová
- Laemmliho vzorkový pufr 2x koncentrovaný (Bio-Rad, USA)
- Macro-prep High Q (Bio-Rad, USA)
- methanol (Lach-ner, Česká republika)
- $N,N,N',N'$ -tetramethylethyldiamin (Bio-Rad, USA)
- $N,N'$ -metylenbisakrylamid (Bio-Rad, USA)
- *n*-butanol (Merck, Německo)
- octan amonný (Sigma-Aldrich, Německo)
- pepsin (MP Biomedicals, Německo)
- Peptide Calibration Standard II (Bruker Daltonik, Německo)
- peroxodisíran amonný (Bio-Rad, USA)
- pufr pro kalibraci pH metru (Chromservis, Česká republika)
- QC Colloidal Coomassie Stain (Bio-Rad, USA)



- síran amonný (Lach-ner, Česká republika)
- standardy pro SDS-PAGE Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ (Bio-Rad, USA)
- trifluoroctová kyselina (Merck, Německo)
- trypsin SOLu (Merck, Německo)

### **3.1.2 Použité přístroje a pomůcky**

- analytické váhy Wagi XA110/2X (Radwag, Polsko)
- centrifuga Frontier S306 (Ohaus, USA)
- centrifuga Microspin 12 (Biosan, Lotyšsko)
- centrifuga Multifuge X3R (Thermo Fisher Scientific, USA)
- centrifuga Sigma 4-16K (Sigma Zentrifugen, Německo)
- Dialyzační střívko D9527 (Sigma-Aldrich, Německo)
- elektroforetická komůrka Mini PROTEAN 3 (Bio-Rad, USA)
- elektromagnetická míchačka IKA C-MAG HS 7 (IKA-Werke, Německo)
- elektromagnetická míchačka IKA Squid (IKA-Werke, Německo)
- elektromagnetická míchačka M2-D (Chromservis, Česká republika)
- hmotnostní spektrometr MALDI-TOF Microflex LRF (Bruker Daltonik, Německo)
- homogenizátor ULTRA-TURRAX T 50 Basic (IKA-Werke, Německo)
- chromatografická kolona UNO Q1 (Bio-Rad, USA)
- inkubátor s tepelným blokem (Major Sciences, USA)
- kapalinový chromatograf BioLogic DuoFlow (Bio-Rad, USA) s UV-vis detektorem BioLogic QuadTec (Bio-Rad, USA)
- MALDI destička MSP BigAnchor 96 (Bruker Daltonik, Německo)
- monitor UV-1 (Pharmacia, Švédsko)
- nylonová tkanina
- peristaltická pumpa PCD 1082 (Dávkovací čepadla Kouřil, Česká republika)
- pH-metr pH 50 (XS instruments, Itálie)
- pipetové špičky ZipTip-C18 (Merck-Millipore, Irsko)
- předvážky Pioneer PA413C (Ohaus, USA)
- sada automatických pipet (Eppendorf, Německo)
- skener Umax U9908-HAR0 (Amersham Biosciences, Velká Británie)
- skleněná chromatografická kolona 2,5 x 20 cm (Sigma-Aldrich, USA)
- spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, Velká Británie)
- termostat Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)

- ultrafiltrační cela Amicon 8200 (Merck, Německo)
- ultrazvuk K-5LM (Kraintek, Slovensko)
- vakuová centrifuga Concentrator Plus (Eppendorf, Německo)
- vortex (Chromservis, Česká republika)
- vývěva (KNF, Německo)
- zapisovač REC 112 (Amersham Pharmacia Biotech, Švédsko).
- zdroj pro elektroforézu PowerPac HC (Bio-Rad, USA)
- běžné laboratorní vybavení: špičky pro automatické pipety, kádinky, zkumavky, kyvety do spektrofotometru, magnetická míchadla, sponky pro uzavření dialyzačního střívka, odměrné válce, stojany na zkumavky, kyvety do centrifugy, stříčky, pH papírky, lžičky, špachtle, skalpel, nádoby na ledovou tříšť

### 3.1.3 Biologický materiál

Jako vstupní materiál pro izolaci posloužily zmrazené plodnice hub muchomůrky červené (*Amanita muscaria*, AM) a muchomůrky růžovky (*Amanita rubescens*, AR) sbírané v září 2022. Tyto plodnice byly skladovány v mrazáku při teplotě  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

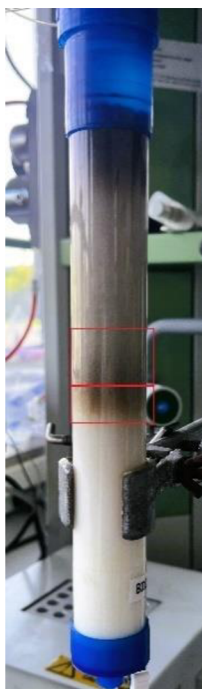
## 3.2 Metody

### 3.2.1 Extrakce proteinů a purifikace aspartátové proteasy

Extrakční a purifikační kroky probíhaly při  $0\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , díky chlazení ve směsi ledové tříště a vody, případně se vzorky mezi různými kroky uchovávaly v mrazničce při teplotě  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Navážky plodnic (AM 300 g, AR 330 g) byly pomocí homogenizátoru homogenizovány v  $0,1\text{ M}$  K-fosfátovém pufru (KBP, pH 7,0), který obsahoval 2,5% (w/v) glycerol a 5 mM 2-merkaptoethanolu (AM: 700 ml, AR: 600 ml). Následně se vzniklý homogenát přefiltroval přes nylonovou tkaninu a filtrát byl poté centrifugován při 4100 g a teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 35 min. Ze supernatantu (AM: 800 ml, AR: 700 ml) byl za stálého míchání a pomalého přidávání jemného síranu amonného až do 70% nasycení roztoku (AM 378 g, AR 330 g), připraven precipitát proteinů. Precipitát proteinů byl oddělen pomocí centrifugace při 4100 g a teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 35 min a skladován při  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pro další práci byl rozpuštěn v 50 ml 50 mM BIS-TRIS pufru (pH 7,0), přičemž nerozpuštěný podíl byl oddělen centrifugací při 13100 g a teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 25 min. Supernatant byl poté převeden do dialyzační membrány, která byla následně ponořena na 24 h do 50 mM BIS-TRIS pufru (pH 7,0). Dialýza probíhala při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pufr byl po 3 h vyměněn za nový. Po dialýze byl roztok centrifugován při 13100 g při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu 25 min.

Pro další krok byla ekvilibrována stacionární chromatografická fáze Macro-Prep High Q naplněná ve skleněné koloně 2,5 x 20 cm, a to pomocí 50 mM BIS-TRIS pufru (pH 7,0). Průtoková rychlost byla  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Na horní část stacionární fáze byl umístěn filtrační papír pro zachycení případných částic. Vzorky po precipitaci a dialýze (AM: 112 ml, AR: 88 ml) byly nanесeny při průtoku  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Následně byla kolona promývána ekvilibračním pufrem dokud absorbance při 280 nm monitorována celou UV-1 a zaznamenávána na analogovém zapisovači neklesla na nulovou hodnotu. Zachycené proteiny byly vymyty elučním pufrem 50 mM BIS-TRIS (pH 7,0) obsahujícím 2 M NaCl. Eluovaná frakce byla monitorována měřením absorpce proteinů při 280 nm a sledováním záznamu na zapisovači. V případě AR se sbíraly frakce dvě, první frakce obsahovala tmavší část vymývaných proteinů a druhá frakce byla hned za první a obsahuje zbylé vymyté proteiny až do konce chromatografie, kdy se již žádné proteiny z kolony nevymývaly (obr. 13). Získané frakce byly odsoleny dialýzou v ekvilibračním pufru při  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 24 h s výměnou pufru po 3 h. Následně byly posbírané frakce koncentrovány pomocí ultrafiltrace (AM: 15 ml, AR1: 2,8 ml, AR2: 2,5 ml) a skladovány při  $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Po rozmrazení byl z proteinových roztoků odstraněn přítomný zákal odstraněn pomocí centrifugace při 20000 g a teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 30 min. Následovala střednětlaká



Obr. 13 Kolona naplněná iontoměničem High Q při eluci proteinů ze vzorku AR. Elučním pufrem byl 50 mM BIS-TRIS (pH 7,0) obsahující 2 M NaCl. Na koloně jsou okem patrné dvě rozdílně barevné frakce, spodní frakce 1 a horní frakce 2 (červeně označené).

iontoměničová chromatografie. Roztok proteinů byl nanášen pomocí injekční stříkačky 1 ml na dávkovací smyčku chromatografu. Využita byla naprogramovaná metoda (software BioLogic). Jako ekvilibrační pufr (pufr A) byl použit 50 mM BIS-TRIS (pH 7,0), elučním pufrem (pufr B) byl 50 mM BIS-TRIS (pH 7,0) obsahující 2 M NaCl. Průtoková rychlost činila 1 ml·min<sup>-1</sup>. V první fázi se ekvilibrovaná kolona UNO Q1 pouze promývala čistým pufrem A, následovalo nanášení vzorku ze smyčky a krátké promývání pufrem A. Pokračovalo se programovanou gradientovou elucí se zvyšujícím se procentuálním podílem pufru B v několika krocích až do úrovně 100 %. Na konci metody se kolona promyla čistým pufrem A tak, aby byla znovu ekvilibrována pro další dávku vzorku. A. Během průběhu chromatografie se díky změně iontové síly roztoku promývajícího soustavu (zaznamenáváno detekcí vodivosti) uvolňovali různé proteiny, tyto proteiny registroval detektor při vlnové délce 280 nm a byly sbírány ve frakcích do 15 ml zkumavek.

### 3.2.2 SDS-PAGE

Vzorky pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) byly připraveny smícháním 1 dílu proteinového vzorku a 1 dílu Laemmliho vzorkového pufru o dvojnásobné koncentraci. Následně byly tyto roztoky umístěny do termobloku ohřátého na 100 °C po dobu 7 min a ochlazeny na laboratorní teplotu.

Rozdělovací gel byl připraven smícháním 4 ml 30 % akrylamidu (AA) + 0,8% *N,N'*-metylenbisakrylamidu (BIS), 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl pufru (pH 8,8) a 3,2 ml deionizované vody, následně byl nad roztokem snížen tlak vývěvou tak, aby se z roztoku vypudily bubliny vzduchu. K tomuto roztoku byly poté přidány další roztoky: 0,1 ml 10% dodecylsírany sodný (SDS), 10 µl *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiaminu (TEMED) a 50 µl 10% peroxidisírany amonný (APS) pro nastartování polymerace. Tato směs byla pomocí pipety nanášena mezi skla, následovalo převrstvení *n*-butanolem a gel se nechal polymerovat 30 min, do vytvoření viditelných rozhraní mezi gelem, vodou a vrstvou *n*-butanolu. Potom byla slita vrstva *n*-butanolu a gel se převrstvil roztokem zaostřovacího gelu, který byl připraven podobně jako rozdělovací, smíchány ale byly 0,65 ml 30 % AA + 0,8% BIS, 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl pufru (pH 6,8) a 2,95 ml deionizované vody. Po odvzdušnění se přidalo 0,1 ml 10% SDS; 10 µl TEMED a 60 µl 10% APS pro nastartování polymerace. Po nalití zaostřovacího gelu byl do něj ještě vložen hřebínek a gel se nechal polymerovat 1 h. Uvedené objemy odpovídaly přípravě dvou gelů 7 × 8 cm, 1 mm silných. Celková koncentrace AA a BIS (T) v zaostřovacím gelu byla 4 % a v rozdělovacím gelu 12 %.

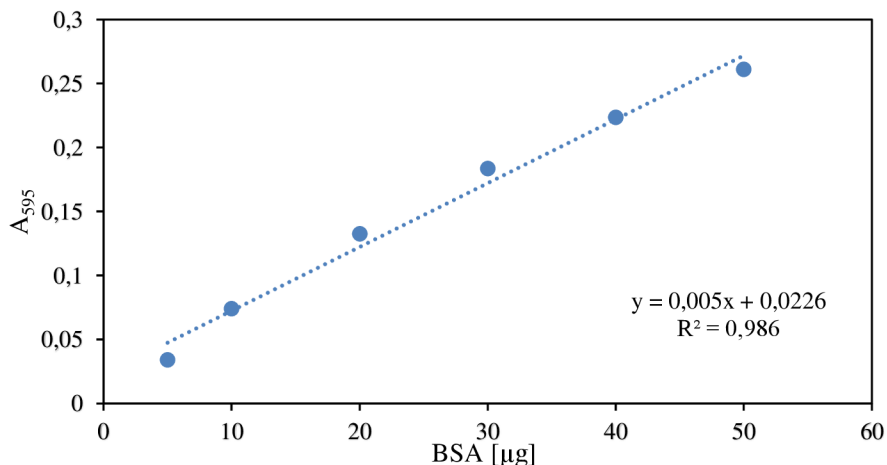
Po polymeraci byla skla s gely umístěna do elektroforetické komůrky a elektrodový prostor mezi skly byl naplněn elektrodovým pufrem: 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS. Tento pufr se následně vлил i do komůrky do úrovně poloviny skel. Poté byl připojen zdroj elektrického napětí, napětí nastaveno na -120 V a elektroforéza probíhala do té doby, než bromfenolová modř ze vzorkového pufru doputovala ke konci gelu (typicky 90 min).

Pro barvení gelů byl použit roztok koloidní Coomassie QC Colloidal Coomassie Stain. Do barvicího roztoku v plastových Petriho miskách se vložil rozdělovací gel a nechal se barvit přes noc na třepačce (18 h), potom byl roztok vyměněn za deionizovanou vodu a gel se nechal odbarvovat dalších 6 hod. Deionizovaná voda byla opakovaně měněna. Po odbarvení byly gely skenovány na kalibrovatelném skeneru.

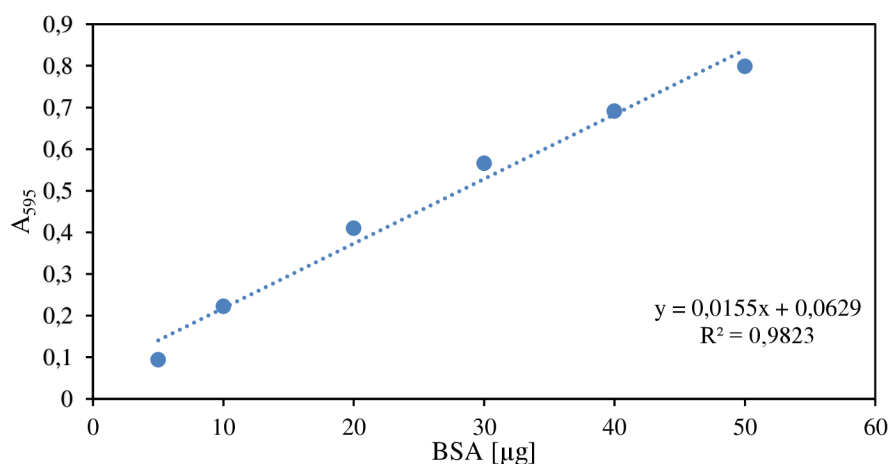
### 3.2.3 Měření obsahu proteinů

Obsah proteinů ve vzorcích byl měřen za využití Bradfordova činidla. Bradfordovo činidlo bylo připraveno přidáním 0,1 g CBB G-250 k roztoku 200 ml deionizované vody, 50 ml ethanolu a 100 ml 85%  $H_3PO_4$ . Následně byl roztok doplněn do objemu 1 l deionizovanou vodou a zfiltrován přes filtrační papír.

Do zkumavek byl napipetován objem 2 ml činidla a k němu se přidalo dané množství vzorku a následujících 5 minut se činidlo nechalo reagovat se vzorkem. Spektrofotometr se poté vynuloval na blank při vlnové délce 595nm, blank se skládal z čistého Bradfordova činidla. Po vynulování se poté měřila absorbance vzorků. Jelikož v průběhu měření vzorků činidlo došlo, byl připraven nový roztok, ale musela znovu být provedena kalibrace. Kalibrace se prováděla pomocí hovězího sérového albuminu (BSA) v množství 5 – 50  $\mu\text{g}$ ; použit byl roztok 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (obr. 14 a 15).



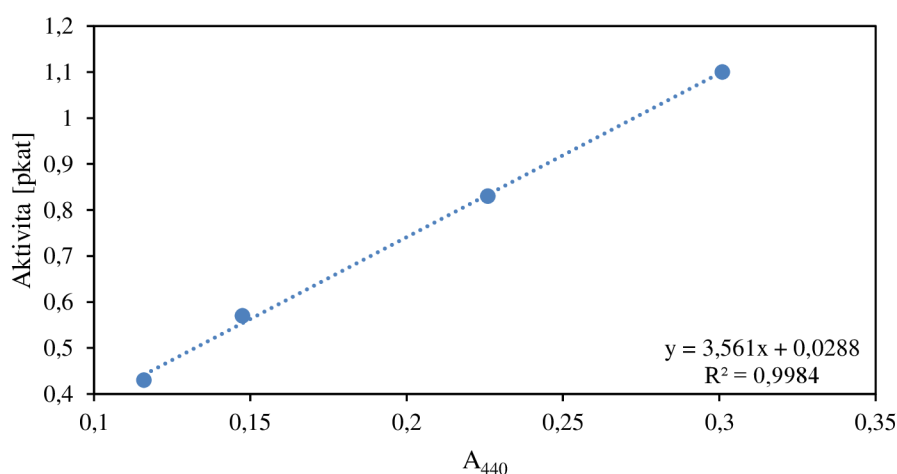
Obr. 14 Kalibrační křivka pro měření obsahu proteinů (původní činidlo)



Obr. 15 Kalibrační křivka pro měření obsahu proteinů (nové činidlo)

### 3.2.4 Měření proteolytické aktivity

Do zkumavek byl napipetován objem 0,666 ml 50 mM octanu amonného (pH 4,5), 0,333 ml 20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  azokaseinu v 10 mM HCl a následně vzorek o objemu maximálně 100  $\mu\text{l}$ . Připravený roztok byl umístěn do termostatu nastaveného na 37 °C na dobu 10 min. Po 10 minutách byla reakce zastavena přidávkem 1 ml 5% trichloroctové kyseliny (TCA) a precipitát proteinů byl oddělen pomocí centrifugace při 10000 g po dobu 3 min. Ze supernatantu bylo odebráno 0,5 ml do zkumavky, která už obsahovala 0,5 ml roztoku 0,5 M NaOH. V takto připraveném směsném roztoku se poté měřila absorpance při vlnové délce 440 nm. Pro ověření fungování metody byl použit pepsin jako běžně známá aspartátová proteasa (obr 16), použit byl roztok 10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  v množství 1, 2, 5 a 10  $\mu\text{l}$ .



Obr. 16 Ověření funkčnosti měření enzymové aktivity s použitím pepsinu.

Vzorový výpočet aktivity pro extrakt z AM:

Extinkční koeficient azokaseinu E1% (440 nm): 38                      Molekulová hmotnost: 23,6 kDa

Naměřená hodnota absorbance: 0,142

Výpočet procentuální koncentrace a přepočítání na hmotnostní koncentraci:

$$\% = \frac{\text{absorbance}}{E1\%} \text{ po dosazení } \frac{0,142}{38} = 0,0037 \% \rightarrow 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$$

Přepočítání hmotnostní koncentrace na látkovou:

$$c = \frac{\text{množství v 1 l}}{\text{molekulová hmotnost}} \text{ po dosazení } c = \frac{3,7 \cdot 10^{-3}}{23600} \rightarrow 1,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

Výpočet látkové množství produktu v původní reakční směsi:

$$n_p = (n \cdot V \cdot 2) \cdot \text{objem reakční směsi} \text{ po dosazení } n = (0,25 \cdot 10^{-7} \cdot 0,001 \cdot 2) \cdot 1,099 \rightarrow 0,35 \text{ nmol}$$

Výpočet aktivity:

$$\text{aktivita} = \frac{n}{\text{čas}} \text{ po dosazení } \frac{0,35 \cdot 10^{-9}}{600} \rightarrow 0,58 \text{ pkat}$$

### 3.2.5 Peptidové mapování MALDI-TOF

Po naskenování ve skeneru byly z gelu skalpelem vyříznuty pásy pro identifikaci proteinů, které byly dále nařezány na menší kousky. Ke gelovým kouskům v 0,5 ml zkumavce byl přidán odbarvovací roztok 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>: acetonitril 1:1 (v/v) o objemu 180 μl. Proces odbarvování probíhal 1 h při laboratorní teplotě. Po centrifugaci (10000 g, 2 min) byl roztok odpipetován a gel byl vysušen přidáním 180 μl acetonitrilu. Po 15 min inkubace a centrifugaci byl acetonitril pipetou odebrán.

K vysušeným gelovým kouskům bylo přidáno 100 μl redukčního roztoku 10 mM dithiothreitolu v 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Směs byla poté inkubována při teplotě 60 °C po dobu 30 min. Následovala krátká centrifugace jak uvedeno výše, odebrání kapaliny pipetou a vysušení gelových kousků acetonitrem. Zredukované proteiny přítomné v gelu byly alkylovány přidáním 100 μl 55 mM jodacetamidu v 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Inkubace proběhla 20 min ve tmě. Po odstranění alkylačního roztoku byl ke gelovým kouskům přidán 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (100 μl) pro promytí a následovalo vysušení acetonitrem. Kousky gelu byly poté rehydratovány v 100 μl roztoku obsahující 1 μM rekombinantní trypsin ve vychlazeném 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Inkubace probíhala 1 h v drceném ledu. Po rehydratování byl roztok odpipetován a nahrazen 100 μl 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Zkumavky byly umístěny do termostátového

inkubátoru na dobu 24 h při teplotě 37 °C. Po štěpení proteinů byl roztok peptidů oddělen od gelových kousků pomocí centrifugace při 10000 g po dobu 5 min. Následně byl supernatant pipetován do čistých zkumavek. Ke gelovým kouskům byl přidán objem 150 µl extrakčního roztoku 5% kyselina mravenčí/acetonitril, 1:2 (v/v). Gelové kousky s extrakčním roztokem byly inkubovány 30 min při 37 °C. Poté byl extrahovaný roztok pipetován k již dříve odpipetovanému roztoku a po spojení kapalina odpařena ve vakuové centrifuze. K odparku bylo pro rozpuštění přidáno 11 µl 0,1% TFA a zkumavka byla umístěna na 5 min do ultrazvukové lázně. Potom následovalo odsolení peptidů pomocí pipetovacích špiček ZipTip C18 podle návodu výrobce a převedení do elučního roztoku 0,1% TFA/ACN 1:1 (v/v), který byl pak odpařen ve vakuové centrifuze. Odparek s peptidy byl rozpuštěn v 11 µl 0,1% trifluoroctové kyseliny (TFA) a zkumavka umístěna na 5 min do ultrazvukové lázně. Ze vzniklého roztoku byl dávkován objem alikvotů 0,5 µl na MALDI destičku MSP BigAnchor 96 BC, dále byla ke vzorkům přidána matrice: kyselina  $\alpha$ -kyanohydroxyskořicová (CHCA), 5 mg·ml<sup>-1</sup> ve směsi acetonitril: 2,5 % TFA, 7:3 (v/v), v objemu 0,5 µl. Takto připravené směsi s matricí byly ponechány odpařit pro kokrytalizaci na vzduchu při laboratorní teplotě.

Destička se vzorky byla vložena do hmotnostního spektrometru Microflex LRF20 a pomocí ovládacího softwaru flexControl 3.4 byla provedena analýza jednotlivých vzorků měřením peptidových spekter v rozsahu m/z hodnot 500 – 3500. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru flexAnalysis 3.4, BioTools 3.2 a Mascot Server 2.0. Použita byla dílčí databáze sekvencí proteinů z hub rodu *Amanita* získaná z proteinové databáze NCBI a dílčí databáze sekvencí proteinů *Amanita muscaria* získaná z databáze UniProt. Nastavení přístroje a vyhledávacího software bylo doporučeno školitelem s použitím přednastavených metod používaných běžně v laboratoři.



## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Měření obsahu proteinů a aktivity

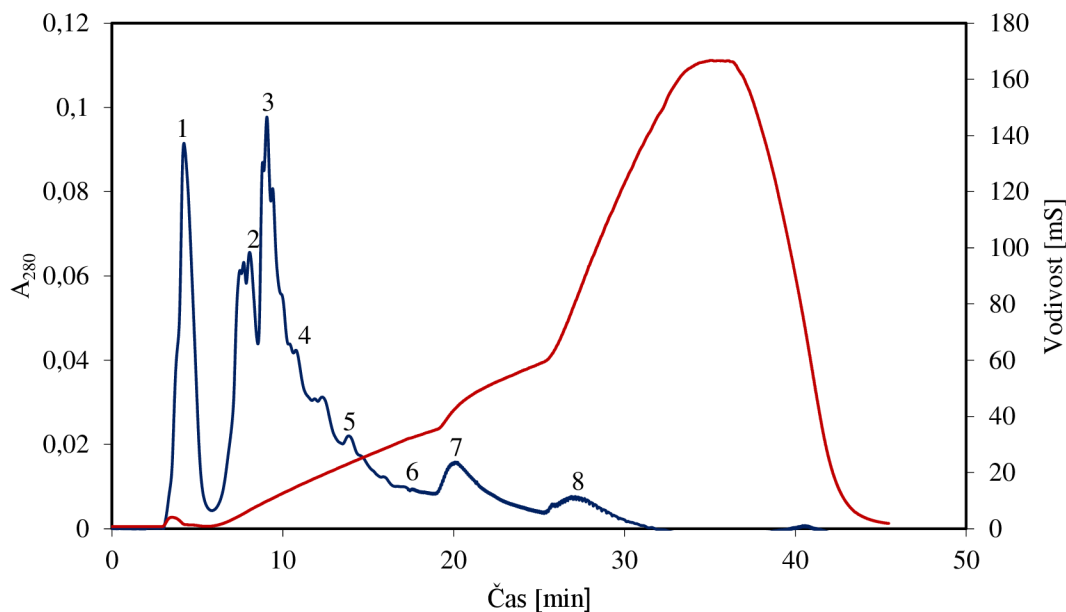
Během purifikace aspartátové proteasy, byly pro každý krok odebrány vzorky, u kterých byla změřena proteasová aktivita a obsah proteinů (tab 4). U vzorků 5 a 6 z AM nejsou v tabulce uvedeny hodnoty aktivity. Naměřená absorbance byla příliš nízká pro výpočet spolehlivé hodnoty aktivity a u vzorku 11 není uveden stupeň přečištění, jelikož naměřená hodnota absorbance pro stanovení proteinů u frakce č. 2 před ultrafiltrací byla příliš nízká pro spolehlivý výpočet obsahu proteinů.

Tab. 4 Zjištěné obsahy proteinů a proteasové aktivity u vzorků

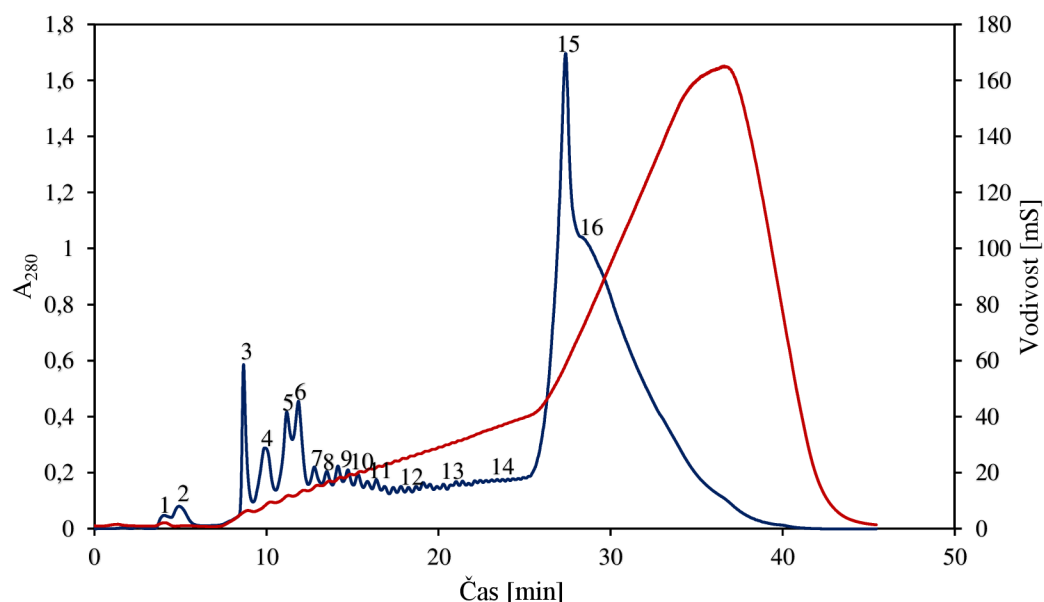
Hodnoty naměřené u vzorků z AM						
Vzorek	Koncentrace proteinů [μg/ml]	Celkový obsah proteinů [mg]	Celková aktivita [pkat]	Specifická aktivita [pkat·mg <sup>-1</sup> ]	Stupeň přečištění	Výtěžek [%]
1. Extrakt	651	521	4637	8,9	1	100
2. Dialyzát po precipitaci (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1410	161	419	2,6	0,3	9
3. Eluát z chromatografie High Q	330	36	360	10	1,1	7,8
4. Eluát z chromatografie High Q po ultrafiltraci	1209	18,1	154	8,5	0,9	3,3
5. Frakce 7 získaná na koloně UNO Q1	97	0,20	-	-	-	-
6. Frakce 8 získaná na koloně UNO Q1	121	0,4	-	-	-	-
Hodnoty naměřené u vzorků z AR						
7. Extrakt	2510	1757	5622	3,2	1	100
8. Dialyzát po precipitaci (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2106	137	548	4	1,3	10
9. Frakce č. 1 získaná z chromatografie na High Q	2189	85	187	2,2	0,7	3,3
10. Frakce č. 1 získaná z chromatografie na High Q po ultrafiltraci	20520	72	28,8	0,4	0,13	0,5
11. Frakce č. 2 získaná z chromatografie High Q po ultrafiltraci	2194	5,5	10,5	1,9	-	0,2

## 4.2 Iontoměničová chromatografie na koloně UNO Q1

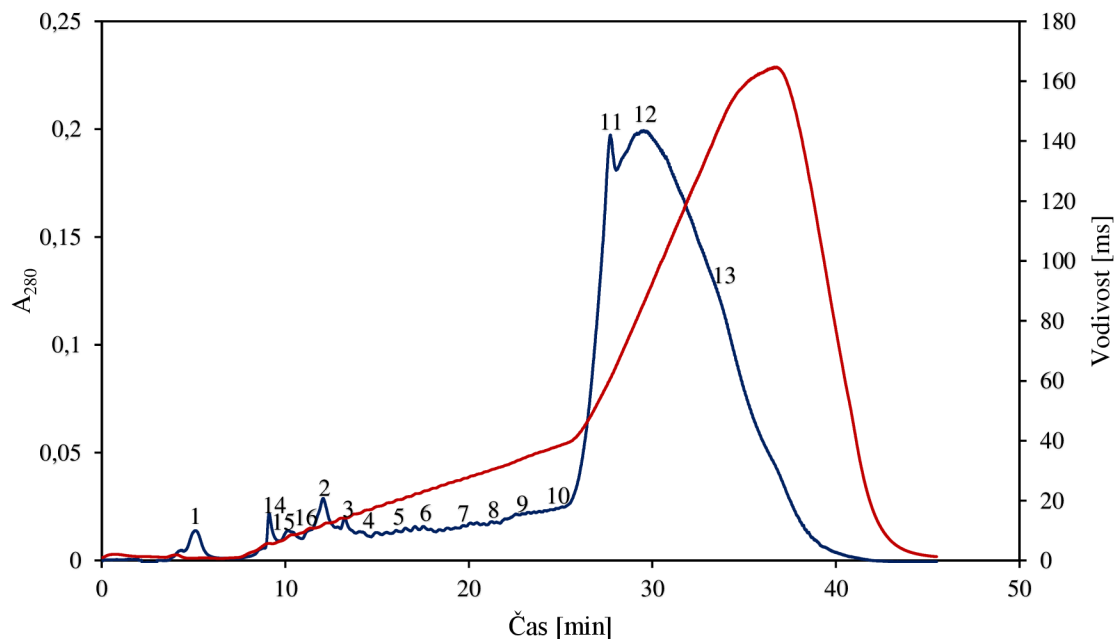
Pro AM bylo nasbíráno 8 frakcí (obr. 17), pro AR 16 frakcí z každé frakce (1 a 2) z předchozí chromatografie na High Q (obr. 18 a 19), tedy celkem 32 frakcí.



Obr. 17 Chromatogram z iontoměničové chromatografie na koloně UNO Q1, Separovány byly proteiny ze vzorku AM po nízkotlaké chromatografii na High Q. Modrá křivka zobrazuje absorpci eluátu při vlnové délce 280 nm, červená křivka zobrazuje vodivost. Číselně jsou označeny frakce, které byly sbírány.



Obr. 18 Chromatogram z iontoměničové chromatografie na koloně UNO Q1. Separovány byly proteiny 1. frakce ze vzorku AR po nízkotlaké chromatografii na High Q. Modrá křivka zobrazuje absorpci eluátu při vlnové délce 280 nm, červená křivka zobrazuje vodivost. Číselně jsou označeny frakce, které byly sbírány.

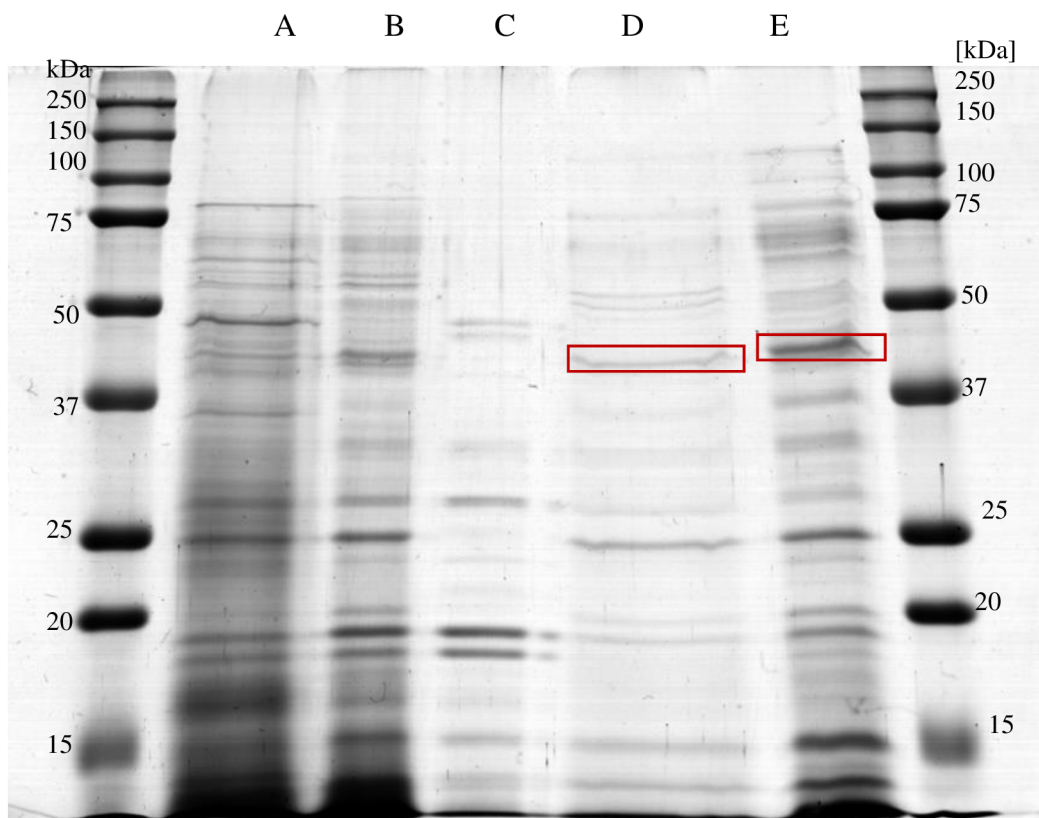


Obr. 19 Chromatogram z iontoměničové chromatografie na koloně UNO Q1. Separovány byly proteiny 2. frakce ze vzorku AR po nízkotlaké chromatografii na High Q. Modrá křivka zobrazuje absorpci eluátu při vlnové délce 280 nm, červená křivka zobrazuje vodivost. Číselně jsou označeny frakce, které byly sbírány

Kolona UNO Q1 obsahuje kladně nabitě skupiny, na které se váží záporně nabitě proteiny. Náboj proteinů souvisí s jejich isoelektrickým bodem a pH pufru. Při chromatografii na koloně UNO Q1 byl použit pufr pH 7,0, což znamená že proteiny, které mají isoelektrický bod nižší než 7 by měli být záporně nabitě a tím pádem by se měli zachytit na koloně. Eluce těchto proteinů by tedy měla nastat až při zvyšování iontové síly mobilní fáze. Přítomnost proteasy byla pomocí peptidového mapování potvrzena ve vzorcích VII a VIII ze vzorků AM. Jelikož se frakce VII a VIII eluovali, až při zvýšené iontové síle mobilní fáze lze předpokládat, že isoelektrický bod peptidasy A1 je méně než 7, což souhlasí s teoretickou hodnotou isoelektrického bodu 4,9.

### 4.3 SDS-PAGE elektroforéza

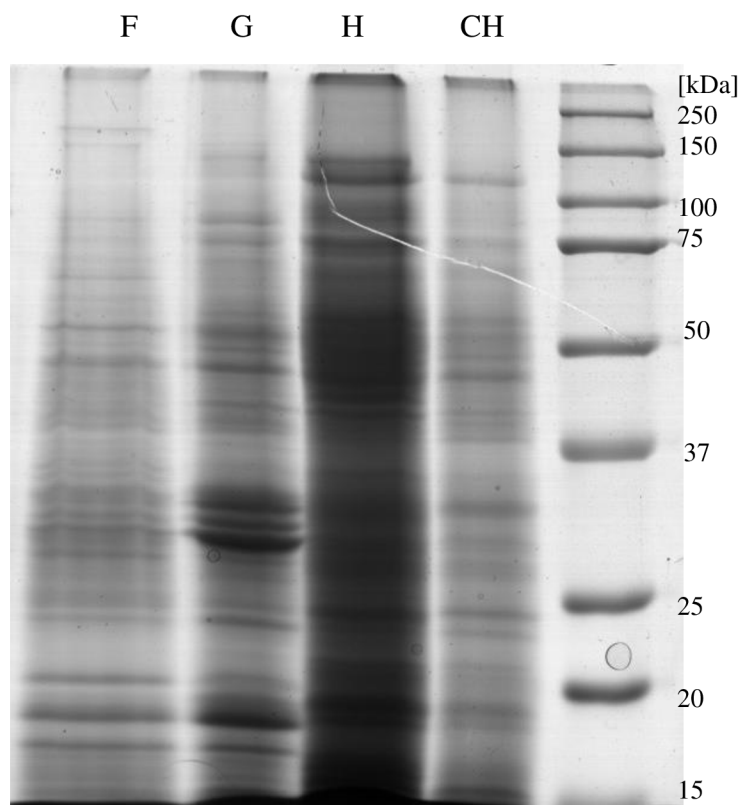
Pomocí SDS-PAGE elektroforézy byly rozděleny proteiny z různých vzorků AM a AR v průběhu purifikace.



Obr.20 SDS-PAGE gel se vzorky z purifikace aspartátové proteasy z AM. V krajních drahách jsou standardy molekulových hmotností (7  $\mu$ l). A je vzorek z extraktu (nanášeno 30  $\mu$ l, obsahuje 9,8  $\mu$ g proteinů); B je vzorek po precipitaci  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a dialýze (15  $\mu$ l, obsahuje 10,6  $\mu$ g proteinů); C je vzorek z frakce, která se nezachytila na High Q (nanášeno 30  $\mu$ l); D je eluát z High Q (nanášeno 30  $\mu$ l, obsahuje 5  $\mu$ g proteinů); E je eluát po ultrafiltraci (nanášeno 15  $\mu$ l, obsahuje 9  $\mu$ g proteinů). Červeně označené jsou pásy, v kterých by se měla nacházet hledaná proteasa. Obsah proteinů není uveden u dráhy B, jelikož naměřená hodnota absorbance pro měření proteinů byla příliš nízká.

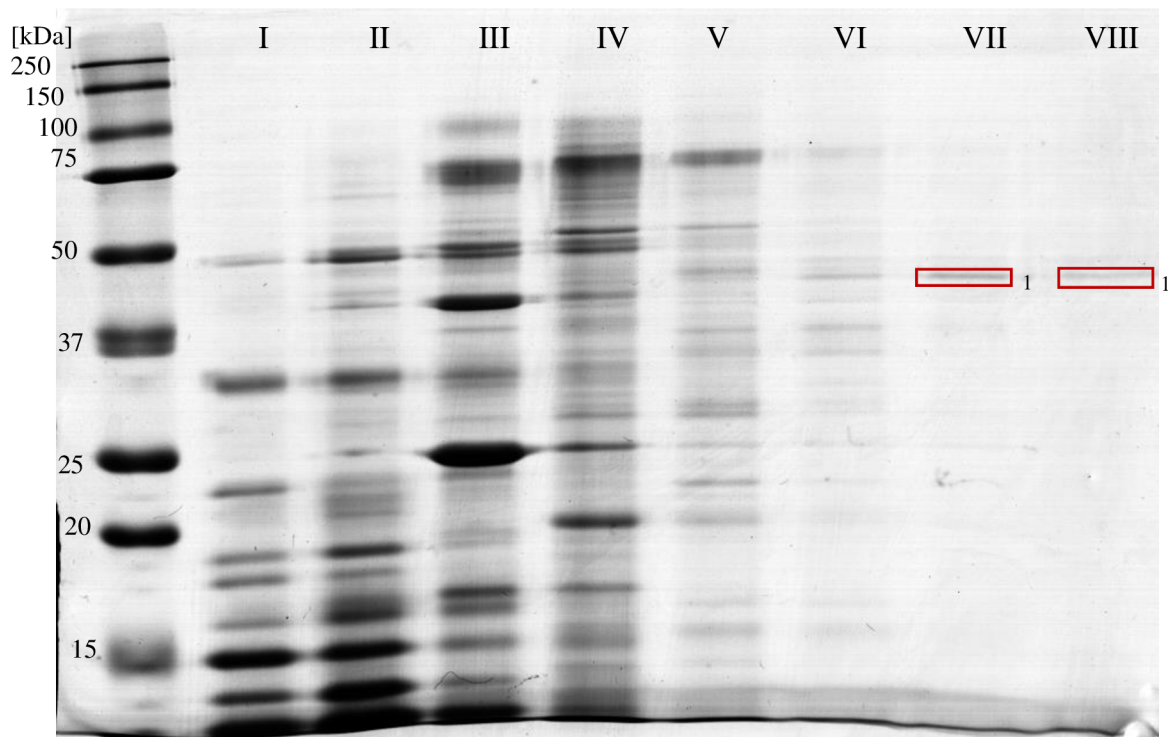
Na tomto gelu (obr. 20) můžeme vidět, jak se v průběhu purifikace oddělují proteiny ze vzorku. V drahách A a B můžeme vidět velké množství proteinů s molekulovou hmotností pod 100 kDa. V dráze C můžeme vidět méně pásů oproti dráze B, což odpovídá tomu, že se většina proteinů zachytila na koloně High Q. To odpovídá i měření obsahu proteinů v tomto vzorku, které díky nízké absorbanci nebylo možné spolehlivě určit, naopak u pásu B byla koncentrace proteinů stanovena. Pás E obsahuje stejné pásy jako dráha D, ale v dráze E jsou pásy daleko tmavší, což odpovídá tomu, že dráha E obsahuje vzorek, který byl koncentrován ultrafiltrací. Červeně označené jsou proteinové pásy, v kterých byla předpokládána aspartátová

proteasa. Školitelem byla na základě MALDI tandemové hmotnostní spektrometrie peptidů z trypsinového digestu potvrzena peptidasa A1 v dráze E, jak je označeno v obr. 17, přístupové číslo A0A0C2XLS1 AMAMK v databázi UniProt.

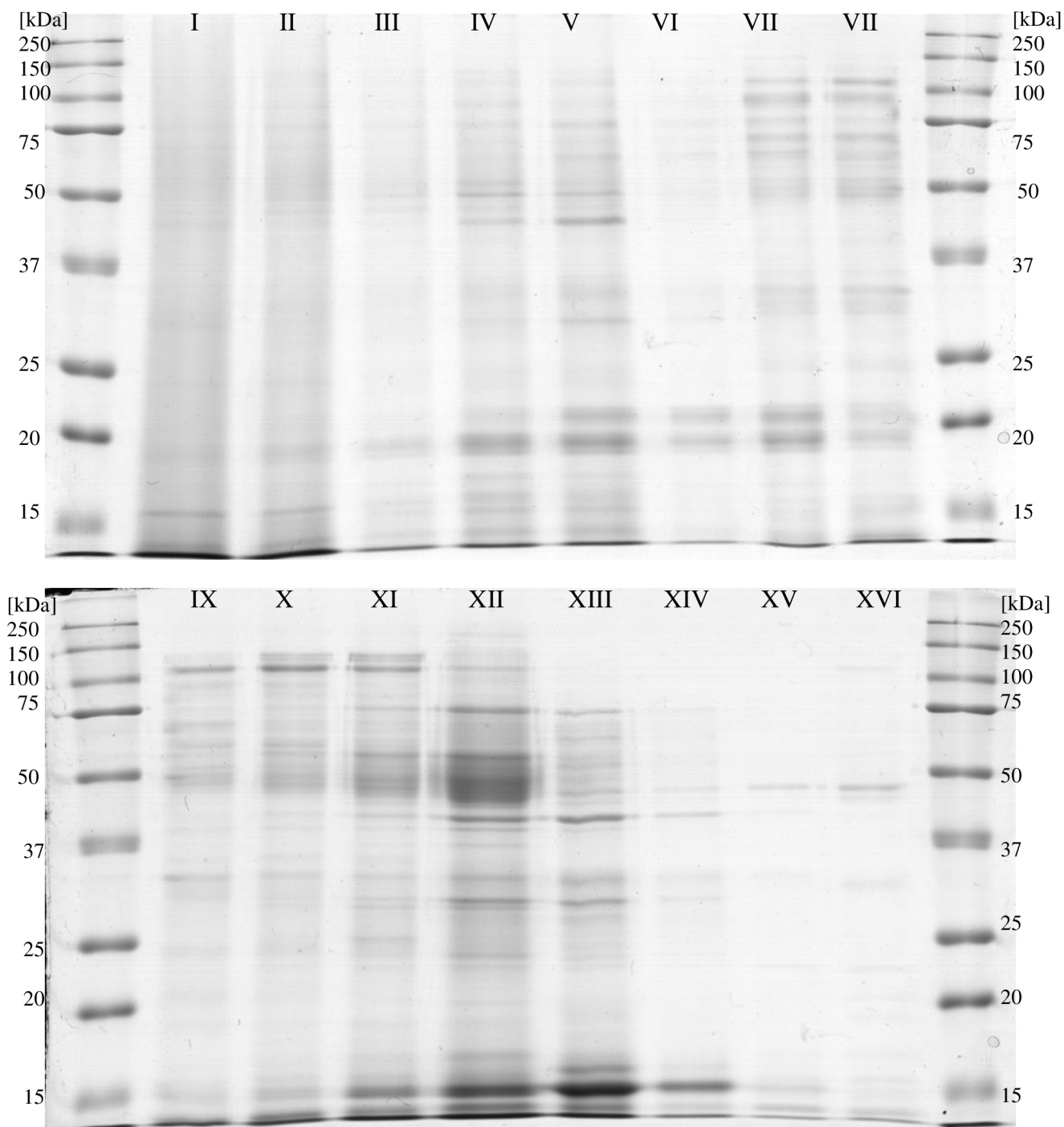


Obr. 21 SDS-PAGE gel se vzorky z purifikace aspartátové proteasy z AR. V pravé dráze je proteinový standard s odpovídajícími molekulovými hmotnostmi (5  $\mu$ l). F představuje extrakt AR (nanášeno 30  $\mu$ l, obsahuje 37  $\mu$ g proteinů); G je po precipitaci  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a dialýze (nanášeno 30  $\mu$ l, obsahuje 32  $\mu$ g proteinů); H je 1. frakce eluátu z High Q po ultrafiltraci (nanášeno 15  $\mu$ l, obsahuje 154  $\mu$ g proteinů), CH je vzorek z 2. frakce eluátu z High Q po ultrafiltraci (nanášeno 30  $\mu$ l, obsahuje 33  $\mu$ g proteinů).

Na dráze G na obr. 21 lze vidět, jak došlo ke zkoncentrování proteinů ve vzorku, protože pásy v dráze G kopírují ty ve sloupci F, ale jsou tmavší což značí přítomnost větší koncentrace proteinů. Dráha H obsahuje proteiny 1. frakce eluátu z HighQ. Jelikož tato frakce obsahovala velké množství hnědého barviva, které vytváří tmavé pozadí, je těžké v tomto gelu rozlišit jednotlivé pásy. Hnědé barvivo bylo přítomno ve všech použitých vzorcích, proto to tmavší pozadí oproti vzorkům z AM. Ve sloupci CH se nachází pás (červeně označený), ve kterém by se měla nacházet hledaná proteasa. Výskyt proteasy však nebyl potvrzen a opakování nebylo provedeno vzhledem k nedostatku času na další experimenty.



Obr. 22 SDS-PAGE gel se vzorky z purifikace aspartátové proteasy AM získanými z chromatografie koloně UNO Q1. V levé dráze je standard molekulových hmotností (7  $\mu$ l). V očíslovaných drahách jsou proteiny z frakcí uvedených na obr. 14 (nanášeno 30  $\mu$ l). Červeně označené jsou pásy, které byly následně z gelu vyříznuty a přítomné proteiny v nich byly zredukovány, alkylovány a pomocí trypsinu štěpeny. Následně byly tyto fragmenty analyzovány pomocí MALDI-TOF. Do dráhy VII bylo naneseno 1,5  $\mu$ g proteinů a do dráhy VIII 1,8  $\mu$ g proteinů.



Obr. 23 SDS-PAGE gely s frakcemi (nanášeno 30  $\mu$ l) I až XVI získanými chromatografií na koloně UNO Q1. Separována byla 1. frakce získaná nízkotlakou chromatografií na iontoměničce High Q. V krajních drahách jsou standardy s označením molekulových hmotností (5  $\mu$ l). Ostatní dráhy označené římskými číslicemi odpovídají frakcím z obr. 18.

U těchto vzorků (obr. 23) jsem však neprovedl identifikaci proteinů pomocí MALDI-TOF z důvodu nedostatku času. Školitel identifikoval MALDI tandemovou hmotností spektrometrií metalopeptidasu MepB (78,8 kDa; KAF8349335) v drahách XII a XIII. Výraznější pásy v drahách XV a XVI představují histidinofosfatasu (53,2 kDa; KAF8341004). Byly připraveny

i gely s proteiny z 2. frakce AR, avšak na těchto gelech se po barvení neobjevily žádné pásy, což odpovídá skutečnosti, že hodnoty koncentrace proteinů z tab. 4 jsou více jak desetkrát menší než u frakce 1. O nízkém obsahu proteinů taky svědčí daleko menší hodnota  $A_{280}$  v průběhu chromatografie 2. frakce oproti hodnotám  $A_{280}$  z chromatografie 1. frakce.

#### 4.4 Peptidové mapování MALDI-TOF

Pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF byly peptidovému mapování podrobeny pásy označené červeně v obr. 22. Přítomnost aspartátové proteasy byla však pomocí peptidového mapování prokázána jen ve vzorcích VII 1 a VIII 1 (tab. 5). Vzhledem k přítomnosti jediného výrazného pásu v gelu v drahách VII a VIII to dokládá vysoké přečištění proteasy. Získaný protein však pravděpodobně není homogenní. Je tam minoritní podíl jiného proteinu, jak dokládá přítomnost peptidů, které neodpovídají sekvenci peptidasy A1, v MALDI-TOF hmotnostních spektrech trypsinových digestů. Školitel pomocí MALDI-TOF/TOF tandemové hmotnostní spektrometrie zjistil přítomnost nečistoty, enzymové aktivita této nečistoty ale neruší při proteolytickém štěpení, tedy je výsledný vzorek použitelný například pro studium štěpné specifčnosti enzymu vůči peptidům a proteinům.

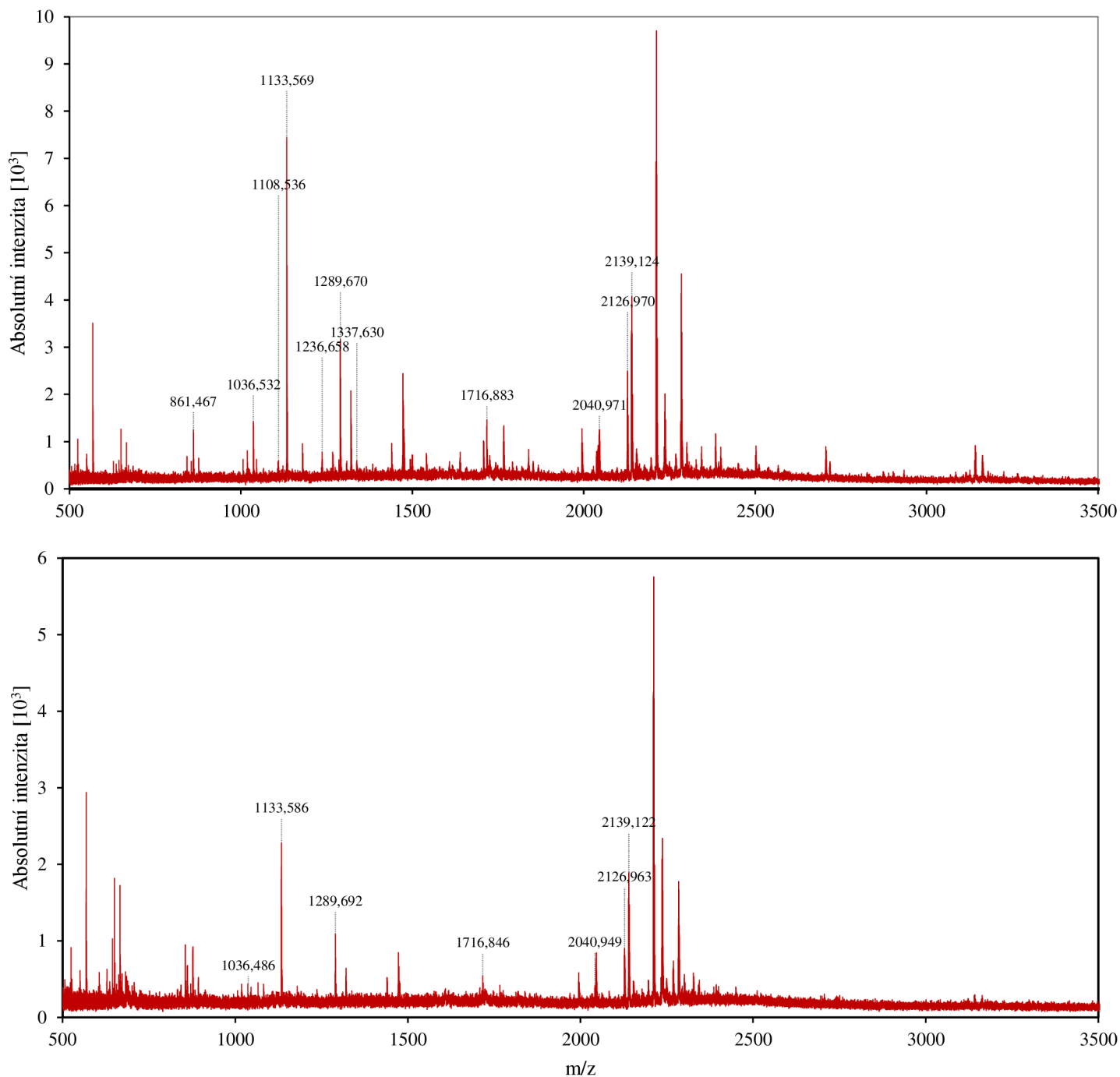
Tab. 5 Výsledky peptidového mapování vzorků z AM

Vzorek	Přístupový kód	Protein	Hmotnost [kDa]	Skóre	Počet peptidů	Pokrytí sekvence [%]
VII 1	A0A0C2XLS1_AMAMK	Peptidasa A1	44,5	88	11	28
VIII 1	A0A0C2XLS1_AMAMK	Peptidasa A1	44,5	58	7	21

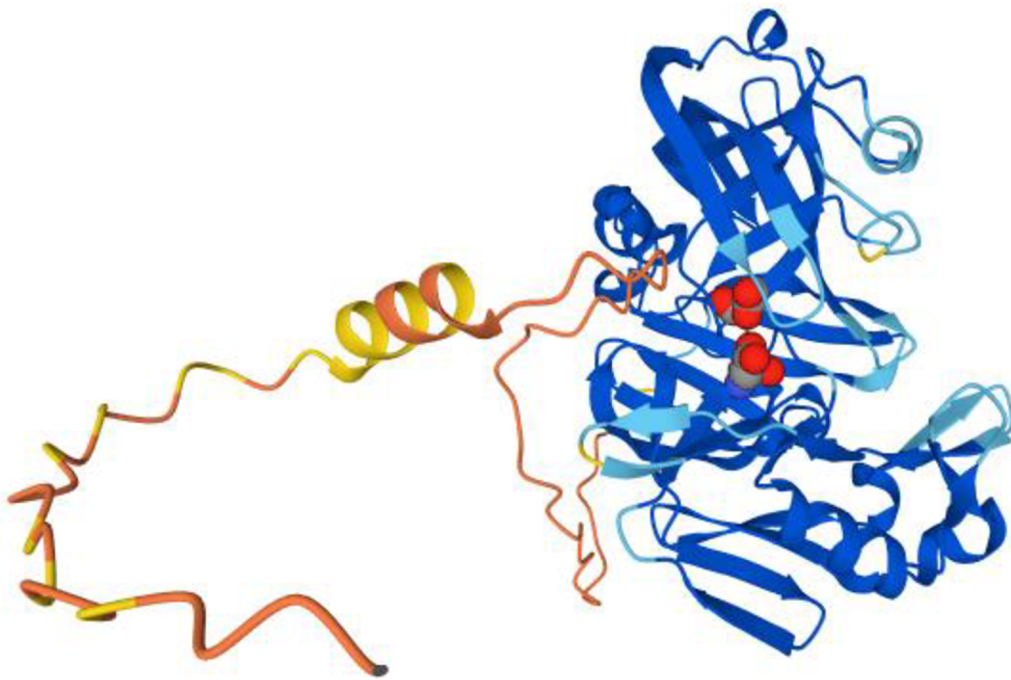
Zjištěná molekulová hmotnost peptidasy A1 činí 44,5 kDa, což odpovídá tomu, že pásy, ve kterých byla proteasa identifikována, byly vyřezány z oblastí gelu, které obsahovaly pásy proteinů v rozmezí 37 až 50 kDa.

Peptidasa A1 je aspartátová proteasa skládající z 407 aminokyselin. Prostorově je uspořádána do dvou laloků, z nichž z každého poté vychází vedlejší řetězec kys. asparagové, který je součástí aktivního místa enzymu (obr. 25). Strukturně je tato endopeptidasa podobná ostatním aspartátovým proteasám např. pepsin A a B, candidapepsin-2 nebo peptidasa A24. Peptidasa A1 je lokalizována ve vakuolách hub. Optimální pH této proteasy je v kyselé oblasti. Peptidasa A1 štěpí peptidové vazby mezi hydrofobními aminokyselinami.





Obr. 24 MALDI-TOF hmotnostní spektra peptidů získaných z pásů VII 1 (nahore) a VIII 1 (dole). Proteinové pásy byly po obarvení vyříznuty z SDS-PAGE gelu a zpracovány na analýzu podle návodu v kapitole 3.2.5. Číselně jsou označeny píky, které odpovídaly sekvenci peptidasy A1.



Obr. 25 Proteinová struktura peptidasy A1 se zvýrazněnými zbytky kyseliny asparagové v aktivním místě, vytvořené pomocí softwaru AlphaFold

## 5 ZÁVĚR

V teoretické části byly popsány muchomůrky, konkrétněji pak ještě muchomůrka červená a růžovka, dále byli v teoretické části popsány látky v muchomůrkách obsažených. Mezi tyto látky patří různé proteiny, peptidy, alkaloidy barviva a komplexy z nichž většina jsou biologicky aktivní.

V praktické části byl připraven homogenát z muchomůrek, z kterého byly proteiny vysoleny pomocí  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Následně byly z precipitátu proteinů po rozpuštění a dialýze pomocí iontoměničové chromatografie získány různé frakce. Tyto frakce byly analyzovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu za denaturujících podmínek. Pro identifikaci proteinů byly z obarveného gelu vyříznuty pásy s předpokládanou proteasou, tedy v oblasti odpovídající molekulové hmotností 45 kD. Proteiny obsažené v pásech byly štěpeny trypsinem získané peptidy byly analyzovány pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Metodou peptidového mapování byly výsledky porovnány s databázemi sekvencí proteinů z muchomůrek (rod *Amanita*). Takto se podařilo prokázat vysoce přečištěnou aspartátovou proteasu z muchomůrky červené, nikoli však z muchomůrky růžovky.

## 6 LITERATURA

A. Fergusson, B., Dreisbach, T., G. Park, C., M. Filip, G., & Schmitt, C. (2003). Coarse-scale population structure of pathogenic *Armillaria* species in a mixed-conifer forest in the Blue Mountains of northeast Oregon. *Canadian Journal of Forest Research*, 33(4), 612-623.

*Amanita muscaria* (L.) Pers. - Fly Agaric-First Nature. (c1995-2023). First Nature. Retrieved November 11, 2023, from <https://www.first-nature.com/fungi/amanita-muscaria.php>

*Amanita rubescens* Pers. - Blusher-First Nature. (c1995-2023). First Nature. Retrieved November 22, 2023, from <https://www.first-nature.com/fungi/amanita-rubescens.php>

Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M., & Saya, H. (2005). Transcriptional Blockade Induces p53-dependent Apoptosis Associated with Translocation of p53 to Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 19166-19176.

Azzolin, L., Antolini, N., Calderan, A., Ruzza, P., Sciacovelli, M., Marin, O., Mammi, S., Bernardi, P., & Rasola, A. (2011). Antamanide, a Derivative of *Amanita phalloides*, Is a Novel Inhibitor of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016280>

Barbosa, I., Domingues, C., Ramos, F., & Barbosa, R. M. (2023). Analytical methods for amatoxins: A comprehensive review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 232.

Berry, R. E., Armstrong, E. M., Beddoes, R. L., Collison, D., Ertok, S. N., Helliwell, M., & Garner, C. D. (1999). The Structural Characterization of Amavadin. *Angewandte chemie*, 38(6), 795-797.

*Biochemický slovník-trypsin*. (2007). E-learning VŠCHT. Retrieved January 27, 2024, from <https://e-learning.vscht.cz/mod/glossary/view.php?id=49341>

Brown, G. C. (2010). Nitric oxide and neuronal death. *Nitric oxide: biology and chemistry*, 23(3), 153-165.

Bushnell, D. A., Cramer, P., & Kornberg, R. D. (2002). Structural Basis of Transcription:  $\alpha$ -Amanitin-RNA Polymerase II Cocrystal at 2.8 Å Resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1218-1222.

Caulfield, M. P. (1993). Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacology & therapeutics*, 58(3), 319-379.

- da Silva, J. A. L., Fraústo da Silva, J. J. R., & Pombeiro, A. J. L. (2013). Amavadin, a vanadium natural complex: Its role and applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 257(15-16), 2388-2400.
- E. Teeter, D. (2007). *Herb of Immortality*. Ambrosia Society.
- Endlicher, R., Drahota, Z., Štefková, K., Červinková, Z., & Kučera, O. (2023). The Mitochondrial Permeability Transition Pore—Current Knowledge of Its Structure, Function, and Regulation, and Optimized Methods for Evaluating Its Functional State. *Cells*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/cells12091273>
- Faulstich, H., Buhning, H. J., & Seitz, J. (1983). Physical Properties and Function of Phallolysin. *Biochemistry*, 22(19), 4574-4580.
- Faulstich, H., Buku, A., Bodenmüller, H., & Wieland, T. (1980). Virotoxins: Actin-Binding Cyclic Peptides of Amanita virosa Mushrooms. *Biochemistry*, 19(14), 3334-3343.
- Fehrenbach, T., Cui, Y., Faulstich, H., & Kepler, D. (2003). Characterization of the transport of the bicyclic peptide phalloidin by human hepatic transport proteins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 368(5), 415-420.
- Garcia, J., Costa, V. M., Carvalho, A., Baptista, P., de Pinho, P. G., de Lourdes Bastos, M., & Carvalho, F. (2015). Amanita phalloides poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment. *Food and Chemical Toxicology*, 86, 41-55.
- Honisch, C., Gazziero, M., Dallochio, R., Dessi, A., Fabbri, D., Dettori, M. A., Delogu, G., & Ruzza, P. (2022). Antamanide Analogs as Potential Inhibitors of Tyrosinase. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11).
- Chebib, M., & A. R. Johnston, G. (1999). The 'ABC' of GABA receptors: A brief review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 26(11), 937-940.
- J. Carlile, M., C. Watkinson, S., & W. Gooday, G. (2001). *The fungi* (2nd ed.). Elsevier Academic Press.
- Jin, Z. (2011). Muscarine, imidazole, oxazole, and thiazole alkaloid. *Natural Products Reports*, 24(3), 1143-1191.
- Kaplan, C. D., Larsson, K. -M., & Kornberg, R. D. (2008). The RNA polymerase II trigger loop functions in substrate selection and is directly targeted by alpha-amanitin. *Molecular cell*, 30(5), 547-556.

- Kavanagh, K. (Ed.). (2005). *Fungi: Biology and Applications*. Wiley.
- L. Stephenson, S. (2010). *Kingdom of Fungi: The Biology of Mushrooms, Molds, and Lichens*. Timber Press.
- Letschert, K., Faulstich, H., Keller, D., & Keppler, D. (2006). Molecular Characterization and Inhibition of Amanitin Uptake into Human Hepatocytes. *Toxicological sciences*, *91*(1), 140-149.
- Liu, X., Farnung, L., Wigge, C., & Cramer, P. (2018). Cryo-EM structure of a mammalian RNA polymerase II elongation complex inhibited by  $\alpha$ -amanitin. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(19), 7189-7194.
- Ludvig, N., Baptiste, S. L., , H. M., Medveczky, G., von Gizycki, H., Charchaflied, J., Devinsky, O., & Kuzniecky, R. I. (2009). Localized transmeningeal muscimol prevents neocortical seizures in rats and nonhuman primates: therapeutic implications. *Epilepsia*, *50*(4), 678-693.
- Lukanc, T., Brzin, J., Kos, J., & Sabotič, J. (2017). Trypsin-specific Inhibitors from the Macrolepiota procera, Armillaria mellea and Amanita phalloides wild mushrooms. *Acta biochimica Polonica*, *64*(1), 21-24.
- Lumpert, M., & Kreft, S. (2016). Catching flies with Amanita muscaria: traditional recipes from Slovenia and their efficacy in the extraction of ibotenic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, *187*, 1-8.
- Lurie, Y., Wasser, S. P., Taha, M., Shehade, H., Nijim, J., Hoffmann, Y., Basis, F., Vardi, M., Lavon, O., Suaed, S., Bisharat, B., & Bentur, Y. (2009). Mushroom poisoning from species of genus Inocybe (fiber head mushroom): a case series with exact species identification. *Clinical Toxicology*, *47*(6), 562-565.
- Malak, S. H. A. (1976). Occurrence of phallotoxins in American collections of Amanita virosa. *Planta Medica*, *29*(1), 80-85.
- Marwa, K., & Kondamudi, N. P. (2023). Type IV Hypersensitivity Reaction. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562228/>
- Meisel, E. M., Morgan, B., Schwartz, M., Kazzi, Z., Cetin, H., & Sahin, A. (2022). Two Cases of Severe Amanita Muscaria Poisoning Including a Fatality. *Wilderness & Environmental Medicine*, *33*(4), 412-416.

- Michelot, D., & Melendez-Howell, L. M. (2003). *Amanita muscaria* : chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycological Research*, *107*(2), 131-146.
- Mikaszewska-Sokolewicz, M. A., Pankowska, S., Janiak, M., Pruszyk, P., Lazowski, T., & Jankowski, K. (2016). Coma in the course of severe poisoning after consumption of red fly agaric (*Amanita muscaria*). *Acta Biochimica Polonica*, *63*(1), 181-182.
- Moldenhauer, G., Salnikov, A. V., Lüttgau, S., Herr, I., Anderl, J., & Faulstich, H. (2012). Therapeutic Potential of Amanitin-Conjugated Anti-Epithelial Cell Adhesion Molecule Monoclonal Antibody Against Pancreatic Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, *104*(8), 622-634.
- Muscarinic acetylcholine receptor*. (2004). Wikipedia: the free encyclopedia. Retrieved from [https://en.wikipedia.org/wiki/Muscarinic\\_acetylcholine\\_receptor](https://en.wikipedia.org/wiki/Muscarinic_acetylcholine_receptor)
- Nehls, U., Bock, A., Einig, W., & Hampp, R. (2001). Excretion of two proteases by the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *Plant, Cell and Environment*, *24*(7), 741-747.
- Pahapill, P. A., Levy, R., , J. O., Davis, Rezai, A. R., , R. R., & , A. M. (1999). Tremor arrest with thalamic microinjections of muscimol in patients with essential tremor. *Annals of Neurology*, *46*(2), 249-252.
- Phalloidin Conjugates for Actin Staining*. (c2006-2023). ThermoFisher Scientific. Retrieved December 4, 2023, from <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-structure/cytoskeleton/phalloidin-and-phalloidin-conjugates-for-staining-actin.html>
- Pombeiro, A. J. L., & , Sutradhar, M. S., & da Silva (Eds.). (2020). *Vanadium Catalysis*. Royal Society of Chemistry.
- PubChem Compound Summary for CID 4752, Phalloidin*. National Center for Biotechnology Information (2023). Retrieved December 3, 2023, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4752>
- Rejzek, J. (2001). *Český etymologický slovník*. LEDA.
- Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2021). Biological Properties and Applications of Betalains. *Molecules*, *26*(9).
- Scatton, B. (1993). The NMDA receptor complex. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *7*(8), 389-400.

- Seeger, R. (1975). Some Physico-Chemical Properties of Phallolysin Obtained from Amanita Phalloides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 288(2-3), 155-162.
- Sekete, M., Ma, D., Wang, B., Wang, H. X., Gong, Z., & Ng, T. B. (2014). An acid-tolerant lectin coupled with high Hg<sup>2+</sup> potentiated hemagglutination enhancing property purified from Amanita hemibapha var. ochracea. *Process Biochemistry*, 49(3), 535-539.
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database(Oxford)*.
- Siemion, I. Z., Pedyczak, A., Trojnar, J., Zimecki, M., & Wieczorek, Z. (1992). Immunosuppressive Activity of Antamanide and Some of Its Analogues. *Peptides*, 13(6), 1233-1237.
- Stasyk, T., Lutsik-Kordovsky, M., Wernstedt, C., Antonyuk, V., Klyuchivska, O., Souchelnyskyi, S., Hellman, U., & Stoika, R. (2010). A new highly toxic protein isolated from the death cap Amanita phalloides is an l-amino acid oxidase. *FEBS Journal*, 277(5), 1260-1269.
- Stebelska, K. (2013). Fungal Hallucinogens Psilocin, Ibotenic Acid, and Muscimol: Analytical Methods and Biologic Activities. *Therapeutic Drug Monitoring*, 35(4), 420-442.
- Valla, D., Durand, F. (Ed.). (2013). Chapter 34 - Mushroom Poisoning: A Clinical Model of Toxin-Induced Centrilobular Necrosis. In N. Kaplowitz & L. D. DeLeve, *Drug-Induced Liver Disease* (3rd ed., pp. 621-629). Academic Press.
- Vandekerckhove, J., Deboen, A., Nassal, M., & Wieland, T. (1985). The phalloidin binding site of F-actin. *The EMBO Journal*, 4(11), 2815-2818.
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi* (3rd ed.). Cambridge University Press.
- Welbourn, R., Goldman, G., Kobzik, L., Valeri, C. R., Hechtman, H. B., & Shepro, D. (1991). Attenuation of IL-2-induced multisystem organ edema by phalloidin and antamanide. *Journal of Applied Physiology*, 70(3), 1364-1368.
- Wiegand, T. J. (2023). Mushrooms, muscarine. In *Encyclopedia of Toxicology* (4 ed., pp. 563-565). Academic Press.
- Wieland, T. (1977). Interaction of phallotoxins with actin. *Advances in Enzyme Regulation*, 15, 285-299.



Wieland, T. (1983). The toxic peptides from Amanita mushrooms. *Journal of Peptide and Protein Research*, 22(3), 257-276.

Wieland, T., Faulstich, H., & Fiume, L. (1978). Amatoxins, Phallotoxins, Phallolysin, and Antamanide: The Biologically Active Components of Poisonous Amanita Mushroom. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 5(3), 183-260.

Wisser, G., Guttenberger, M., Hampp, R., & Nehls, U. (2000). Identification and characterization of an extracellular acid trehalase from the ectomycorrhizal fungus Amanita muscaria. *NEW PHYTOLOGIST*, 146(1), 169-175.

Yilmaz, I., Kaya, E., Sinirlioglu, Z. A., Bayram, R., Surmen, M. G., & Colakoglu, S. (2014). Clinical importance of toxin concentration in Amanita verna mushroom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 87, 68-75.

Zhou, C., Li, C., Yu, H. -M., Zhang, F., Han, D., & Zhang, G. -Y. (2008). Neuroprotection of gamma-aminobutyric acid receptor agonists via enhancing neuronal nitric oxide synthase (Ser847) phosphorylation through increased neuronal nitric oxide synthase and PSD95 interaction and inhibited protein phosphatase activity in cerebral ischemia. *Journa of neuroscience research*, 86(13), 2973-2983.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
ACN	acetonitril
AcOH	kyselina octová
AM	muchomůrka červená, <i>Amanita muscaria</i>
APS	peroxodisíran amonný
AR	muchomůrka růžovka, <i>Amanita rubescens</i>
BIS	<i>N,N'</i> -metylenbisakrylamid
BIS-TRIS	bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
BSA	bovinní sérový albumin
CBB	Coomasie brilliant blue
CHCA	kyselina $\alpha$ -kyanohydroxyskořicová
CNS	centrální nervová soustava
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
KPB	fosfátový pufr
MALDI-TOF	matricí asistovaná laserová desorpce a ionizace s hmotnostním spektrometrem doby letu
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartát
OATPP1B1	organic anion transport protein P1B1
PTP	pór přechodné propustnosti
SDS	dodecyl síran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl síranu sodného
TCA	trichloroctová kyselina
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

(v/v)

objemový poměr