

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

---

**Produkce mutantních propeptidů plísňové hexosaminidasy  
vhodných pro studium vlivu glykosylace na rekonstituci  
enzymové aktivity**

**Bakalářská práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza**

**Praha 2008**

**Miloslava Vítovcová**

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru  
MSM0021620857 a MSM0021620808.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 30. května 2008.

*Miloslava Vítovcová*

Miloslava Vítovcová

## Seznam zkratek

Asn	asparagin
CNBr	kyanobromid
Cys	cystein
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraethanová
GlcNAc	$\beta$ - <i>N</i> -acetylglukosamin
IUB	International Union of Biochemistry
LB	Luria-Bertani
Man	manosa
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
Met	methionin
RNA	ribonukleová kyselina
Ser	serin
TFA	trifluoroctová kyselina
CCF	culture collection of fungi

Obsah:	
Seznam zkratk.....	3
1. ÚVOD .....	5
1.1. Plísňová hexosaminidasa .....	5
1.1.1. Enzymová charakteristika .....	5
1.1.2. Historický vývoj nomenklatury hexosaminidas .....	6
1.1.3. Struktura enzymu .....	6
1.1.4. Mechanismus katalýzy .....	7
1.1.5. Funkce $\beta$ -N-acetylhexosaminidasy .....	8
1.2. Mutagenese .....	9
1.2.1. QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit .....	9
1.2.2. Schéma čtyřkrokového postupu mutace .....	11
1.3. Rekonstituce enzymové aktivity plísňové hexosaminidasy .....	12
1.4. Glykosylace propeptidů plísňových hexosaminidas .....	13
2. CÍLE PRÁCE.....	15
3. MATERIÁLY A METODY .....	16
3.1. Experiment molekulární mutagenese.....	18
3.2. Příprava plasmidové DNA metodou „Easyrep“ a její restriční analýza.....	19
3.3. Příprava čisté plasmidové DNA metodou „Maxiprep“ .....	20
3.4. DNA sekvenování .....	20
3.5. Produkce fuzního proteinu .....	21
3.6. Štěpení fuzního proteinu a izolace cílového peptidu.....	21
3.7. Potvrzení primární struktury cílového peptidu N-terminálním sekvenováním a hmotnostní spektrometrií .....	22
3.8. Glykosylace propeptidu in vitro.....	22
3.9. Rekonstituční experimenty .....	23
4. VÝSLEDKY.....	24
4.1. Příprava expresního vektoru a návrh mutačních oligonukleotidů.....	24
4.2. Kontrola úspěšnosti vytvořených mutací .....	24
4.3. Příprava fuzního proteinu, jeho štěpení, izolace a charakterizace cílového peptidu.....	25
4.4. In vitro glykosylace na cysteinovém zbytku .....	26
4.5. Seznam látek použitých pro rekonstituce enzymové aktivity .....	27
4.6. Rekonstituce enzymové aktivity .....	28
5. DISKUSE .....	30
6. ZÁVĚR.....	32
7. LITERATURA .....	33
PŘÍLOHY.....	35

# 1. ÚVOD

## 1.1. Plísňová hexosaminidasa

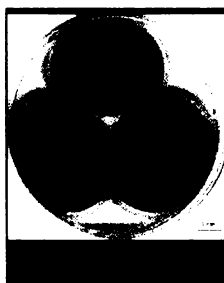
### 1.1.1. Enzymová charakteristika

Téměř všechny metabolicky významné reakce jsou katalysovány enzymy, které tvoří až 90 % počtu buněčných bílkovin. V současnosti je dobře popsáno a charakterisováno více než 2 000 enzymů. Enzymy se člení do šesti tříd: oxidoreduktasy, transferasy, hydrolasy, lyasy, isomerasy a ligasy.

$\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) je enzym patřící do enzymové třídy hydrolas. V této třídě se nacházejí enzymy katalysující hydrolytické štěpení vazeb, které vznikly nebo mohly vzniknout kondensací molekul za odštěpení vody. Jedná se o nejpočetnější skupinu enzymů, které plní řadu biochemicky nezastupitelných funkcí (např. trávení, hemokoagulace pomocí thrombinu).

Studiem námi sledovaného enzymu ( $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa) se vědci podrobně zabývají od 30. let minulého století. Zkoumán byl jak u vyšších obratlovců, včetně člověka, tak i u bakterií.<sup>(1)</sup>  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa hraje důležitou roli v hydrolyze koncových neredukujících se *N*-acetyl-D-hexosaminových zbytků v *N*-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidech.<sup>(2)</sup>

Pro náš účel byl použit enzym uvolňovaný vláknitou plísní *Penicillium oxalicum* (viz. Obrázek 1) do kultivačního média. Tento enzym je důležitou součástí binárního chitinolytického systému, kde štěpí chitobiosu na základní monosacharidy (*N*-acetyl-D-glukosaminy).<sup>(3)</sup> Houbová  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa je fyziologicky důležitá během životního cyklu hub pro tvorbu septa, zárodečných rourek a plodnice. Dále jsou používány v chemoenzymatických syntézách, biologicky zajímavých oligosacharidů, založených na jejich efektivní transglykosylaci.<sup>(4)</sup>



Obrázek 1: Vlákňitá houba *Penicillium oxalicum*.<sup>(5)</sup>

### 1.1.2. Historický vývoj nomenklatury hexosaminidas

S námi popisovaným enzymem se můžeme v literatuře setkat i pod jinými názvy. Objevuje se pod označeními: hexosaminidasa,  $\beta$ -acetylaminodeoxyhexosidasa, *N*-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidasa, *N*-acetyl- $\beta$ -hexosaminidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa,  $\beta$ -acetylhexosaminidasa,  $\beta$ -D-*N*-acetylhexosaminidasa,  $\beta$ -*N*-acetyl-D-hexosaminidasa,  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidasa, hexosaminidasa A, *N*-acetylhexosaminidasa,  $\beta$ -D-hexosaminidasa.<sup>(8)</sup>

$\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa má duální aktivitu:  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidasovou a  $\beta$ -*N*-acetylgalaktosaminidasovou. Tyto enzymy mají stejnou teplotnu inaktivace, pI a chování ke směsi substrátů, jsou si podobné v pH optimu a  $K_i$  pro kompetitivní inhibitory, jsou katalyzovány jedním proteinem a ve stejném aktivním místě.

$\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase je podle IUB přiřazeno pro enzymovou nomenklaturu číslo EC 3.2.1.30 a číslo EC 3.2.1.52 pro  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasu. Dvě čísla a dva názvy byly možné v minulosti použít pro označení stejných enzymových aktivit.

$\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) byla oficiálně pojmenována a vložena do databáze IUB poprvé až v roce 1972, oproti tomu  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidasa (EC 3.2.1.30) se v této databázi vyskytuje již od roku 1961. Enzym  $\beta$ -*N*-acetylgalaktosaminidasa byl poprvé zahrnut do norem nomenklatury v roce 1972 pod číslem EC 3.2.1.53.

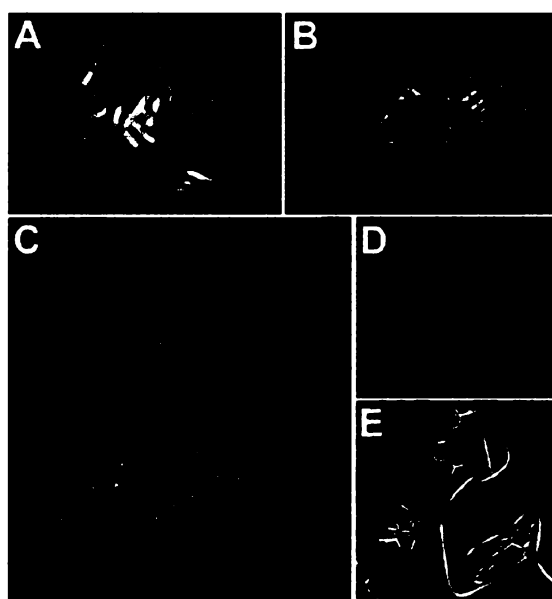
IUB rozhodlo, že enzymy musí být dostatečně doloženy referencemi vědců. V opačném případě by měly být nepodložené enzymy z databáze vyřazeny.  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidasa (EC 3.2.1.30) se nezdála být plně podložena referencemi. Dvě z pěti referencí byly zastaralé a ostatní spíše přispívaly k doložení  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas (EC 3.2.1.52). V případě  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidas (EC 3.2.1.30) a  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas (EC 3.2.1.52) došlo k jejich spojení a od roku 1992 se vyskytují pod jedním číslem a to EC 3.2.1.52.<sup>(9)</sup>

### 1.1.3. Struktura enzymu

Enzymy zodpovědné za katabolismus sacharidů byly tříděny podle jejich sekvenční podobnosti. Tento klasifikační systém vedl k vymezení 85 různých rodin. Většina  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas je členem rodiny 20 glykosylhydrolas, kromě enzymu z *Vibrio furnissii* a *Streptomyces thermoviolaceus*, ty se významně liší od rodiny 20 a jsou klasifikováni jako členové rodiny 3 tohoto enzymu. Svědectví o jejich evolučním původu

je obvykle opřené o podobné terciární struktury nebo o běžné sekvenční motivy, pokud nejsou struktury dostupné. Nejprve sekvenční analýza vybraných  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas zřejmě ukázala jejich běžné evoluční původy.

Krystalová struktura  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas ze *Serratia marcescens*, později ze *Streptomyces plicatus* a lidského enzymu již poskytla podrobnější náhled do struktury a katalytického mechanismu enzymu. Glykosylhydrolasy rodiny 20 i 3 mají ve své struktuře podobný strukturní motiv a to tvar soudku ( $\alpha/\beta$  TIM-barrel) (viz. Obrázek 2), ve kterém se nachází katalytická doména. Aktivní místo enzymu je opravdu vysoce konzervované s jednou aminokyselinou – kyselinou glutamovou (v případě *S. marcescens* Glu<sup>540</sup>), která plní funkci acidobazického katalyzátoru. <sup>(1)</sup>

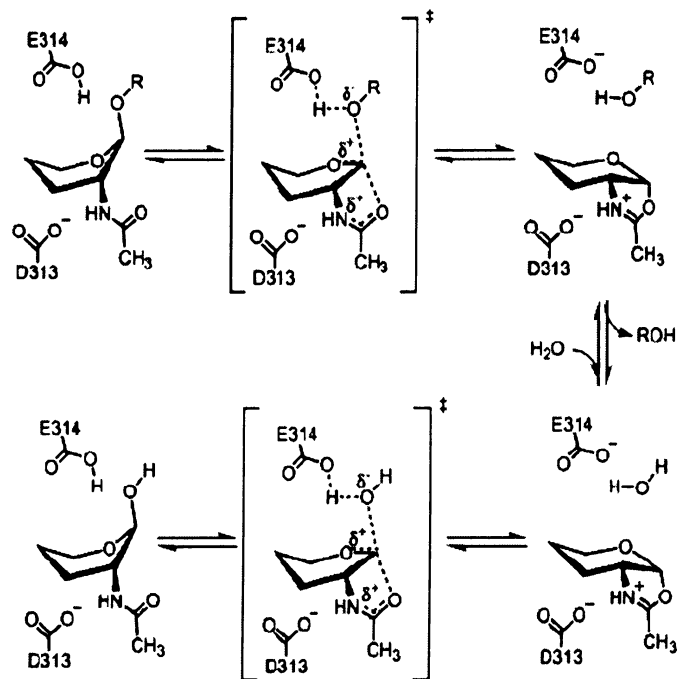


Obrázek 2: Molekulární model  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas z *Aspergillus oryzae*, modely ukazují podobu katalytické podjednotky, (A) pohled ze strany, (B) pohled shora s aktivním místem v C-terminální čele ( $\beta, \alpha$ )-soudku. (C) ukazuje úpravu katalytické podjednotky v plně *N*-glykosylovaném dimeru. (D) pohled ze strany, (E) pohled shora na dlouhou ohebnou smyčku (značenou žlutě) zeleného monomeru, která je přibližně o 1 nm nad aktivním místem zbytků (ukázány šedivě) červeného monomeru. (4)

#### 1.1.4. Mechanismus katalýzy

Výsledky stereochemických studií enzymů rodiny 20 ze *S. marcescens* a lidské  $\beta$ -hexosaminidas podaly vysvětlení, že rodina pracuje mechanismem uchování původní konformace.<sup>(6)</sup> Reakce katalyzované  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasami patří formálně mezi nukleofilní substituce na nasyceném uhlíku anomerického centra.<sup>(7)</sup> Konvenční pohled na mechanismus glykosylhydrolas vyžaduje obecnou katalyzovanou kyselinu. Tato kyselina štěpí  $\beta$ -(1,4)-glykosidické spojení za přechodného stavu iontu, který má oxakarbeniový

charakter. Následkem štěpení dochází ke tvorbě glykosylenzymového intermediátu s karboxylovaným aktivním místem (Obrázek 3.).<sup>(6)</sup>



Obrázek 3: Předpokládaný katalytický mechanismus pro  $\beta$ -hexosaminidasu. Kyselina glutamová (Glu<sup>314</sup>) a asparagová (Asp<sup>313</sup>) jsou primárně zodpovědné za stabilizující kladný náboj na oxazoliniovém iontu, coby intermediátu<sup>(6)</sup>

### 1.1.5. Funkce $\beta$ -N-acetylhexosaminidas

Hlavním důvodem k podrobnému zkoumání enzymu je existence disfunkcí lidských  $\beta$ -N-acetylhexosaminidas, které jsou spojeny s dvěma lysosomálními degenerativními poruchami.<sup>(1)</sup> Dimerní lysosomální enzymy u lidí, které jsou tvořeny dvěma podjednotkami  $\alpha$  a  $\beta$ , jejichž sekvence je asi ze 60 % identická. Vyskytují se ve třech isoformách, homodimerické hexosaminidas B ( $\beta\beta$ ) a S ( $\alpha\alpha$ ) a heterodimerická hexosaminidasa A ( $\alpha\beta$ ). Pro katalytickou aktivitu těchto enzymů je požadována dimerizace.<sup>(2)</sup>

Zájem o lidské hexosaminidas je spojen s alelickými variacemi u HEXA a HEXB genů. Dysfunkce těchto genů způsobuje fatální vrozené chyby v metabolismu, jenž jsou známé jako Tay-Sachsova a Sandhoffova choroba. Tyto choroby patří mezi autosomální



recesivní onemocnění, které jsou způsobeny mutací v hexosaminidasových genech (u Tay-Sachsovy choroby v HEXA genu a u Sandhoffovy choroby v HEXA i HEXB genech). Onemocnění jsou charakterizována nahromaděním gangliosidů  $G_{M2}$  v neuronových lysosomech vedoucí k těžké neurodegeneraci. Dále se tento lidský enzym sleduje v souvislosti se synoviální tekutinou, která může být spojena s osteoartritidou, oplodněním a funkcí spermií.<sup>(1)</sup>

Bakteriální hexosaminidasy hrají důležitou roli při obměně buněčné stěny. Enzym byl sledován také u rostlin, ale v tomto případě mu byla věnována menší pozornost než u bakterií a vyšších obratlovců.

## 1.2. Mutagenese

Existence mutací byla prokázána v roce 1901 jedním ze znovuobjevitelů Mendelových zákonů, Hugo de Vriesem. Tento objev výrazně přispěl k rozvoji genetiky.<sup>(10)</sup> Mutace můžeme definovat jako změnu genetické informace.<sup>(11)</sup>

Nové účinné nástroje výzkumu mechanismů enzymového působení poskytují techniky molekulární biologie. Mezi nimi je zvláště významná možnost libovolné změny sekvence nukleotidů v genu a nadměrná exprese (hyperexprese) odpovídajících proteinů v jednobuněčném hostiteli, např. v kultivovaných savčích buňkách nebo v bakterii *Escherichia coli*. V kombinaci s rentgenostrukturním řešením trojrozměrné struktury a klasickými kinetickými studiemi poskytují tyto molekulární techniky nové pohledy na mechanismy působení enzymů.

Obecnější přístup je založen na využití cílené mutagenese k mutaci genu kódujícího daný enzym, následné hyperexpresi a charakterizaci daného enzymu. Změnou sekvence basí specifického kodonu může cílená mutagenese nahradit danou aminokyselinu jakoukoliv jinou požadovanou aminokyselinou. Tento mutantní gen se přenesení do expresního vektoru za silný promotor, exprimuje, získaný mutantní enzym se purifikuje a stanoví se jeho vlastnosti.<sup>(12)</sup>

### 1.2.1. QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit

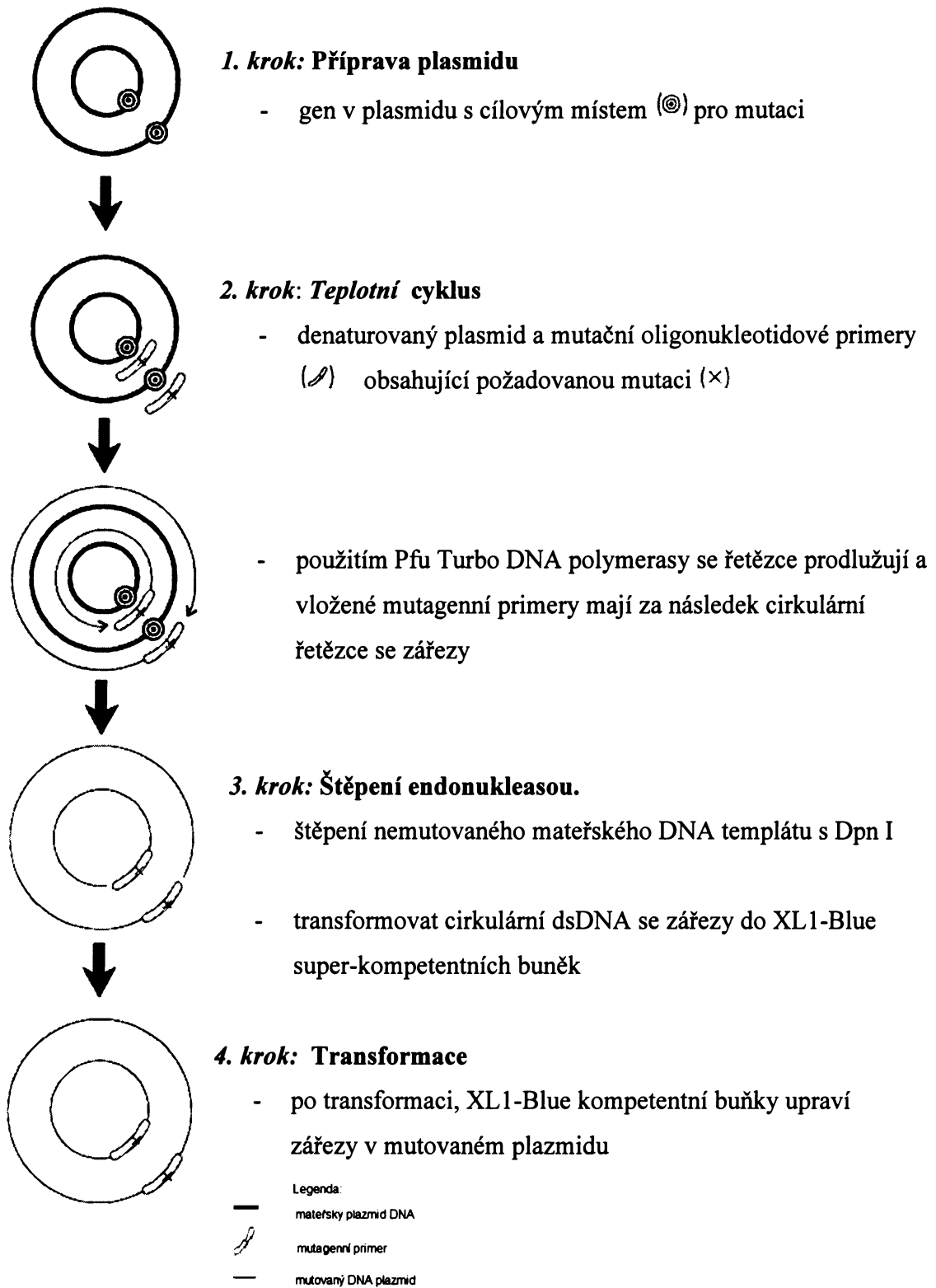
Souprava *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis* lze volně přeložit do češtiny jako „Rychlá přeměna® souprava pro cílenou mutagenesi“. V odborném jazyce se názvy souprav nepřekládají, a proto i já budu používat v dalším textu originální název.

Tato souprava má velký význam pro studium strukturně-funkčních proteinových vztahů, genovou expresi, a také při vektorových modifikacích. Význam soupravy se skrývá v použití dvouřetězcového plasmidu, čímž se stává jednodušší a odpadá potřeba subklonování do bakteriophágového vektoru M-13 a dále také ochrana ssDNA. Specializované vektory tento test nevyžadují, stejně jako jedinečná restriční místa nebo rozmanité transformace, což představuje další přednosti metody. Metodika probíhá ve čtyřech krocích a mutanty vytváří s více než 80% účinností.

Souprava se používá při tvorbě bodové mutace, výměně aminokyselin a při vymazání nebo vložení jednoduchých či složených aminokyselin. Metoda se provádí s použitím PfuTurbo® polymerasy a teplotního cyklátoru. PfuTurbo polymerasa replikuje oba plasmidové řetězce s vysokou přesností a bez přemístění mutantních oligonukleotidových primerů. V základním postupu se využívá jako vektor dvouřetězcová DNA (dsDNA) s insertem a dvěma syntetickými oligonukleotidovými primery, které obsahují požadované mutace. Oligonukleotidové primery, každý komplementární k opačnému řetězci vektoru, jsou prodlužovány během teplotních cyklů PfuTurbo DNA polymerasou. Začlenění oligonukleotidových primerů vytváří mutované plasmidy. Původní nemutovaná DNA je poté vyštěpena pomocí Dpn I během následného teplotního cyklu. Endonukleasa Dpn I (cílová sekvence 5'-GmATC-3') je specifická pro metylovanou a hemimetylovanou DNA, používá se ke štěpení mateřského DNA templátu a k výběru mutace obsahující syntetizovanou DNA. Vektor DNA s požadovanými mutacemi je dále transformován do XL1-Blue kompetentních buněk.

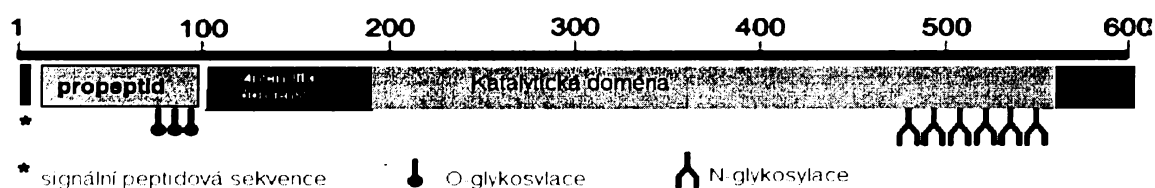
Malé množství výchozího DNA templátu požadovaného k provedení této metody, vysoká přesnost PfuTurbo DNA polymerasy a nízký počet teplotních cyklů, přispívají k vysoké účinnosti mutace a snížení potenciálu pro tvorbu náhodných mutací během reakce. <sup>(16)</sup>

## 1.2.2. Schéma čtyřkrokového postupu mutace (16)



### 1.3. Rekonstrukce enzymové aktivity plísňové hexosaminidasy

Molekulové klonování a sekvenování hexosaminidasového genu odhalilo výskyt signálního peptidu, dlouhých propeptidů (78 aminokyselin), zincin-like domény, katalytické domény a C-terminální části u plísňových glykosylhydrolas rodiny 20 (Obrázek 4). Jak propeptid, tak katalytická doména byly navrženy pro glykosylaci.



Obrázek 4: Navrhnutá struktura domén  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* a její glykosylace.

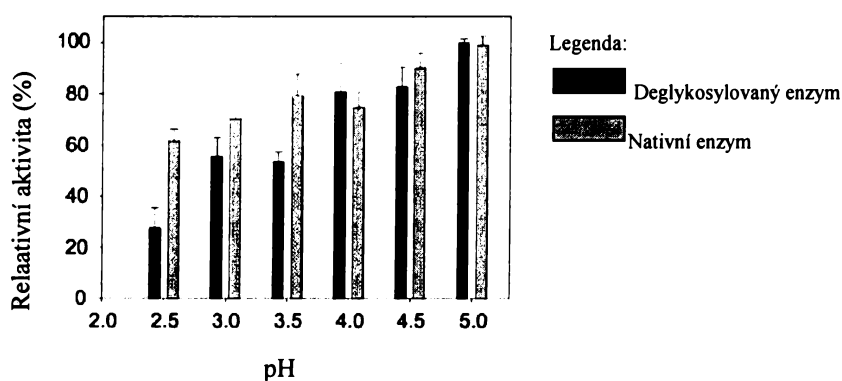
Gelová filtrace celkového nativního enzymu odhalila jeho dimerické uspořádání. Avšak jeho stechiometrické složení závisí na převaze molekulárních forem produkovaných v různých podmínkách. Izolované monomerické katalytické jednotky se vyskytly jen intracelulárně jako krátkodobé metastabilní produkty postrádající enzymovou aktivitu. Nejvíce sekretovaného enzymu obsahovaly dimery katalytické jednotky spojené s jedním nebo dvěma molekulami propeptidu.<sup>(3)</sup>

Rekonstituční studie *in vitro* ukázaly, že  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa obsahující 2 moly propeptidu na dimer katalytické jednotky měla dvojnásobnou specifickou aktivitu ve srovnání s typem složeným z jednoho propeptidu na dimer katalytické jednotky (viz. Tabulka 1.) Spojení propeptidu s katalytickou jednotkou je rychlé a specifické a předchází enzymové dimerizaci. Ve formě, kde jsou nekovalentně spojeny dvě molekuly propeptidu s dimerem katalytické jednotky je tvorba spojení i sekrece mnohem rychlejší než při spojení jedné molekuly na dimer katalytické jednotky.<sup>(2)</sup>

Tabulka 1: Rekonstituce enzymové aktivity  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy s použitím 1 nmol monomerní katalytické jednotky po 1 hodině inkubace při pH 5.<sup>(3)</sup>

přídavek propeptidu	analýza gelovou filtrací	specifická aktivita (jednotky/nmol katalytické podjednotky)
nativní enzym	dimer	2,81±0,01
0	monomer	0,07±0,01
0,5 nmol	dimer	1,38±0,11
1,0 nmol	dimer	2,90±0,55

Při deglykosylačních studiích byla odhalena úloha *N*-glykosylace. Po deglykosylaci enzymu můžeme najít plně aktivní enzym. Snížením pH do kyselé oblasti, se stává enzym méně stabilní a enzymová aktivita klesá (Obrázek 5).<sup>(3)</sup>



Obrázek 5: Účinek deglykosylace  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy na stabilitu enzymu při rozdílných hodnotách pH.<sup>(4)</sup>

#### 1.4. Glykosylace propeptidů plísňových hexosaminidas

Glykosylace plní zejména funkci ochrannou, brání proteolýze, působení nízkých či extrémně vysokých pH a ochraňují proteiny před volnými radikály. Dále u řady proteinů napomáhají zaujmout správnou prostorovou strukturu, zajišťují dobrou rozpustnost, ovlivňují aktivitu enzymů, určují směřování uvnitř buňky a stabilizují proteiny uvolňované z buňky ven. Odlišujeme dva základní druhy glykosylace *N*- a *O*-typu. U *N*-glykosylací je sacharid vázán na volný amidový dusík aminokyseliny asparaginu, u glykosylací *O*-typu je vázán přes hydroxyskupinu serinu nebo threoninu.<sup>(15)</sup>

Připravené mutantní propeptidy plísňové hexosaminidasy bylo nutné pro sledování dalších jejích vlastností glykosylovat. Propeptid i katalytická doména byly navrženy ke glykosylaci, a to tak, že propeptid má být *O*-glykosylován a katalytická doména *N*-glykosylována.<sup>(3)</sup>

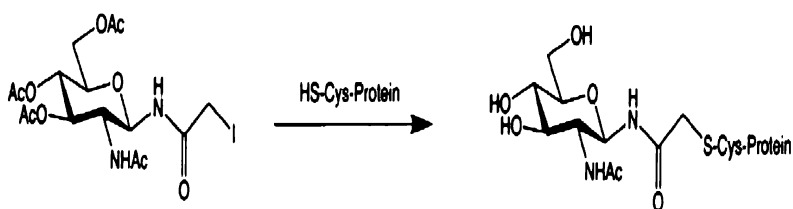
Syntézy glykoproteinů, umístěné cílovou mutagenesí v požadovaných glykosylačních místech byly vyvolány prostřednictvím selektivní reakce glykosylovaných jodoacetamidů s thiolovými skupinami cysteinových zbytků (Obrázek 6).<sup>(13)</sup>

Pro produkci glykoproteinů se tedy jako alkylační činidlo používají bromo- a jodoacetamidové deriváty oligosacharidů. Výhody těchto metod jsou:

- alkylace proteinů thiohy používající jodoacetamidové deriváty ve vodných pufrch je jednoduchá a efektivní,
- spojení jodoacetamidových derivátů je selektivní k cysteinovým zbytkům,
- výsledné thioetherové spojení nepotřebuje přeměnu struktury cukru,
- thioethery jsou stabilní a nebylo zjištěno, že jsou imunogenetické nebo antigenetické.

Předložené výsledky ukázaly, že bromo- a iodoacetamidové deriváty oligosacharidů jsou ihned tvořeny z jejich glykosylaminů, tyto deriváty jsou schopné reakcí a mohou být selektivně připojeny k proteinům obsahující cystein.

Tato metoda konjugace definována oligosacharidy k cysteinovým místům řetězce v proteinu skýtá jemněji laděnou strategii pro syntetické glykosylace proteinů, než tradiční konjugační metody využívající  $\epsilon$ -amino funkci lysinových zbytků v proteinech, ale je o mnoho méně častější než lysinové zbytky.<sup>(14)</sup>



Obrázek 6: Selektivní reakce glykosylovaných jodoacetamidů s thiolovými skupinami cysteinových zbytků.

## 2. CÍLE PRÁCE

- Metodami cílené mutagenese vyměnit dvě aminokyseliny nesoucí sacharidové zbytky v propeptidu hexosaminidasy za cysteinové zbytky, a to jednotlivě i v kombinaci.
- Produkovat a izolovat příslušné fuzní proteiny obsahující ketosteroidisomerasu následovanou produkovaným mutovaným propeptidem a C-terminální histidinovou kotvou.
- Po štěpení fuzního proteinu CNBr izolovat čisté mutované propeptidy, tyto dále glykosylovat na cysteinových zbytcích připojením *N*-acetylglukosaminu nebo manosy, a glykosylované proteiny izolovat a charakterizovat.
- Provést rekonstituční experimenty s hexosaminidasou z plísně *P. oxalicum*.

### 3. MATERIÁLY A METODY

#### Chemikálie:

- 4-nitrofenyl- $\beta$ -D-GlcNAc Lachema, ČR
- Acetonitril Merck, SRN
- Acrylamid Sigma, USA
- Agar Oxoid, Anglie
- Agarosa Jersey Lab Supply, USA
- Amonium persulfát Sigma, USA
- Ampicilin Jersey Lab Supply, USA
- ATP New England Biolabs, USA
- Bromfenolová modř Sigma, USA
- Coomassie Brilliant Blue R-250 Serva, Německo
- DTT Fluka, Švýcarsko
- EDTA Fluka, Švýcarsko
- Ethanol Lachema, ČR
- Ethidiumbromid Jersey Lab Supply, USA
- Fenol Sigma, USA
- GlcNAc Lachema, ČR
- Glukosa Lachema, ČR
- Glycerol Sigma, USA
- Glycin Fluka, Švýcarsko
- Chlorid sodný Lach-ner, ČR
- Chloroform Lachema, ČR
- Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid Sigma, USA
- Kvasničný autolyzát Imunapharm, SR
- Kyanobromid Sigma, USA
- kyselina mravenčí Lachema, ČR
- Kyselina octová Lachema, ČR
- Manganistan draselný Lachema, ČR
- Manosa Lachema, ČR
- Methanol Lachema, ČR
- Močovina Sigma, USA
- Ni-NTA Sepharosa Qiagen, Německo
- Pepton Imunapharm, SR
- Polyethylenglykol 8000 Sigma, USA
- SDS Serva, Německo
- TEMED Serva, Německo
- Tetracyklin Léčiva, ČR
- Trifluorocotvá kyselina Lachema, ČR
- Tris Serva, Německo
- Tris-Cl Serva, USA
- Uhličitan sodný Lachema, ČR

#### Souprava pro mutagenesi:

- QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit Stratagene, USA



### Bakteriální kmeny:

- Kompetentní buňky *Escherichia coli* NovaBlue Novagen, USA
- Produkční buňky *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Stratagene, USA  
Gold

### Vektory:

- pET 31b Novagen, USA

### Enzymy:

- Ribonukleasa A Sigma, USA
- Restrikční endonukleasa Xba I New England Biolabs, USA
- Restrikční endonukleasa Xho I New England Biolabs, USA
- Restrikční endonukleasa Dpn I New England Biolabs, USA

### Roztoky a pufrů:

- LB médium  
1% pepton; 0,5% kvasničného autolyzátu; 1% NaCl; ddH<sub>2</sub>O
- Agarosový gel 1%  
0,5 g agarosy , 50 ml TAE pufru , 2 µl ethidiumbromidu
- LB agar  
15 g agaru na 1000 ml LB média
- TE roztok  
10 mM TrisCl (pH 8,0 ); 0,5 mM EDTA
- TAE pufr  
40 mM Tris; 20 mM CH<sub>3</sub>COOH; 1 mM EDTA
- Fixační a odbarvovací roztok pro AA SDS elektroforézu:  
35% Ethanol, 10% HAc
- Barvicí roztok pro SDS elektroforesu:  
45% Methanol, 10% HAc, 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250
- Elektrodový pufr pro SDS elektroforesu:  
250 mM glycin, 10 mM Tris, 0,1% SDS, pH = 8,3
- Vzorkový pufr pro SDS elektroforesu:  
50 mM Tris-Cl pH = 6,8; 100 mM DTT; 2% SDS; 0,01% bromfenolová modř;  
10% glycerol
- 50mM sodnocitrátový pufr (pH 5,0)

## Přístroje:

- Automatické pipety Gilson, USA
- Automatický DNA sekvenátor ABI Pris Applied Biosystems, USA
- Bakteriální třepačka na Erlenmayerovy baňky Gallenkamp Ltd., UK
- Bakteriální orbitální třepačka Bigger Bill Thermolyne, USA
- Centrifuga J2-2I Beckman Coulter, USA
- Centrifuga J-6M Beckman Coulter, USA
- Centrifuga stolní Spectrofuge 16M Edison, USA
- Dialyzační střeვა Spectrum Laboratories, USA
- Hmotnostní spektrometr Biflex III Bruker (SRN)
- Chladnička Whirpool, USA
- Chladnička Skandiluxe, Dánsko
- Kolona Vydac C-18 Grace Vydac, USA
- Kolona Vydac C-4 Grace Vydac, USA
- pH metr Beckman, Německo
- Proteinový sekvenátor Procise Applera (USA)
- Předvážkové váhy HF – 1200 G AND, USA
- Rotační vakuová odpařka Jouan RC 1010 Trigon-plus, ČR
- Souprava pro elektroforesu Sigma, USA
- Souprava Sequelon AA Millipore, USA
- Spektrofotometr SAFIRE<sup>2</sup> Tecan-Schoeller Instruments, Rakousko
- Spektrofotometr SPEKTROMOM 195D MOM, Maďarsko
- Sterilní box Jouan, Francie
- Sušárna WTB Binder, SRN
- Ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 Cole-Parmer Instrument Co., USA
- Vařič Eta, ČR
- Vortexový mixér VELP Scientifica, Itálie
- Zdroj deionizované vody Milli Q Millipore, USA
- Zdroj napětí EPS 500/400 Pharmacia, USA

Všechny použité chemikálie byly nejvyšší komerčně dostupné čistoty, nejméně však p.a. Byly použity bez dalšího přečištění.

### 3.1. Experiment molekulární mutagenese

Byl použit firemní kit QuickChange od firmy Stratagene (viz. obrázek na straně 11), a postup sledoval standardní firemní protokol. Pro provedení experimentu je nejprve nezbytné navrhnout oligonukleotidy, pomocí nichž budeme mutace provádět. V mém případě byly mutace většinou třínukleotidové, musel se vyměnit kodon pro původní aminokyselinu Asn nebo Ser za kodon kódující aminokyselinu Cys. Použité

oligonukleotidy tedy byly čtyři, dva pro N-terminální místo *N*-glykosylace (aminokyselina Asn<sup>11</sup>), a dva pro C-terminální místo *O*-glykosylace (aminokyselina Ser<sup>66</sup>). Byly tedy použity následující oligonukleotidy: oligonukleotid HPPRNCFW o sekvenci 5'-CCC TTG CCC GCA CCT TGC ATC ACC TGG GGC TCC TCC-3', oligonukleotid HPPRNCRE o sekvenci 5'-GGA GGA GCC CCA GGT GAT GCA GCG AGG TGC GGG CAA GGG-3', oligonukleotid HPPRSCFW o sekvenci 5'-ATC GAG GCG CGG ATT CCC TGC TTC CGA CCA TTC CCG ACC-3', a oligonukleotid HPPRSCRE o sekvenci 5'-GGT CGG GAA TGG TCG GAA GCA GGG AAT CGG CGC CTC GTA-3', kdy byl cystein kodován pomocí TGC tripletu (vyznačeno tučně), protože je to v bakteriích *Escherichia coli* nejběžnější triplet kódující tuto aminokyselinu. Jako templát byl použit plasmid pPROP01 s insertem kodujícím celý propeptid, který byl poskytnut kolegyní Marií Vysokou. Dále již celý postup sledoval standardní protokol sestávající z PCR amplifikace, odstranění nemutované DNA štěpením restriční endonukleasou Dpn I, a dále byla vzniklá reakční směs transformována do kompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli* kmene NovaBlue, a po teplotním šoku a regeneraci naneseny na agarové misky s médiem LB, ampicilinem (150 µg / ml) a tetracyklinem (5 µg / ml). Misky byly umístěny přes noc v bakteriálním inkubátoru při 37 °C, druhý den byly pozorovány kolonie transformovaných bakterií, které získaly odolnost vůči oběma použitým antibiotikům. Takto byly do výchozího plasmidu zaneseny nejprve jednotlivé mutace na obou mutovaných místech, čímž byly získány plasmidy pPROPNC a pPROPCC. Tyto plasmidy potom posloužily v druhém kroku pro přípravu dvojitého mutanta, tento plasmid byl nazvaný pPROPDC (double cysteine).

### **3.2. Příprava plasmidové DNA metodou „Easyrep“ a její restriční analýza**

Kolonie buněk *Escherichia coli* rezistentní na ampicilin byly přeneseny do 1 ml kapalného média LB a ampicilinem (150 µg/ml), a byla připravena „noční“ stacionární kultura třepáním v bakteriální třepačce po dobu nejméně 20 h. S 0,8 ml této kultury byla provedena minipreparační příprava plasmidové DNA metodou tzv. „Easyrepu“ podle publikované metody<sup>(18)</sup>. Získá se cca 30 µl plasmidové DNA, z níž 9 µl bylo použito na restriční štěpení pomocí restričních endonukleas Xba I a Xho I v 10 µl štěpící reakci za

standardních podmínek. Restrikční štěpení probíhalo 1 h při 37 °C, a bylo ukončeno přidáním 3 µl vzorkového pufru pro agarosovou gelovou elektroforesu. Výsledek restrikčního štěpení byl poté analyzován elektroforesou na 1 % agarosovém gelu.

### 3.3. Příprava čisté plasmidové DNA metodou „Maxiprep“

Byl použit standardní protokol pro přípravu velkých množství plasmidové DNA<sup>(17)</sup> v modifikaci publikované ve firemním manuálu firmy Promega<sup>(19)</sup>, a to dle níže uvedeného postupu. 2 ml kapalné kultury bylo zaočkováno do 200 ml média LB s ampicilinem, a kultura byla třepána v 1 l Erlenmayerových baňkách v bakteriální třepačce přes noc. Ráno byla stacionární kultura stočena ve 250 ml kyvetách při 2000xg 20 minut při 4°C. Médium bylo vyhozeno, a usazené bakterie byly resuspendovány ve 20 ml roztoku I s glukosou<sup>(17)</sup>, a přeneseny do 30 ml centrifugačních kyvet. Následovala alkalická lýza a extrakce plasmidové DNA podle publikovaného standardního protokolu<sup>(17)</sup>. Směs sražené RNA a plasmidové DNA byla štěpena ribonukleasou A, a plasmidová DNA selektivně srážena pomocí polyethylenglykolu 8000<sup>(19)</sup>. Takto získaná plasmidová DNA byla rozpuštěna v roztoku TE<sup>(17)</sup>, extrahována fenolem a chloroformem, precipitována ethanolem, a promyta 70 % ethanolem. Poté byla rozpuštěna v 50 µl roztoku TE, a koncentrace a čistota plasmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky<sup>(17)</sup>. Nakonec byla koncentrace plasmidové DNA upravena na hodnotu 1 µg / µl, a vzorky plasmidů byly zmrazeny a uchovávány pro další použití při -20 °C.

### 3.4. DNA sekvenování

Po identifikaci pozitivních klonů obsahujících Xba I - Xho I insert správné délky (viz. kapitola 3.4.) byly bakteriální buňky *E. coli* kmene NovaBlue transformované příslušným plasmidem rozetřeny na čerstvou misku obsahující médium LB a ampicilinem (150 µg/ml), a miska byla inkubována přes noc při 37°C. Druhý den byla miska s narostlými koloniemi předána do DNA sekvenační laboratoře MBÚ AV ČR v.v.i. dr. Jurgenu Felsbergovi, který zajistil přípravu plasmidové DNA s použitím purifikačního kitu firmy Genomed, a dále DNA sekvenování insertů v obou směrech zahájené z míst specifických primerů obsažených v klonovacím vektoru M13 forward a M13 reverse

primeru. K vlastnímu sekvenování byla použita Sangerova dideoxynukleotidová metoda v provedení vhodném pro automatický DNA sekvenátor firmy Applied Biosystems ABI Prism 3100. Výsledky sekvenování jsou zaslány ve formě úplných chromatogramů (soubory .ab1), k jejichž vyhodnocení byl využit volně dostupný program Chromas verze 1.45 (Griffith University, Southport, Queensland, Austrálie).

### **3.5. Produkce fuzního proteinu**

Pro produkci fuzního proteinu ketosteroidisomerasa – Met – propeptid – Met – histidinová kotva byl sekvenovaný plasmid transformován do produkčního bakteriálního kmene *E. coli* BL-21 (DE3) Gold, pozitivní transformanty byly opět selektovány na misce s médiem LB agar, ampicilinem a tetracyklinem. Kolonie byly poté očkovány do 100 ml kapalného média stejného složení, a byla připravena startovní kultura inkubací přes noc při 37°C. 4 ml této stacionární kultury bylo poté očkováno do 400 ml média LB s ampicilinem a tetracyklinem ve dvou 2 l Erlenmayerových baňkách. Kultury byly třepány v orbitální bakteriální třepačce při 260 ot/min, a v odebíraných 1 ml vzorcích byla měřena optická hustota při 550 nm. Jakmile dostoupila hodnoty cca 0.8, byla provedena indukce tvorby proteinu přidáním 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosidu jako induktoru. Poté byla kultura třepána ještě 4 hodiny, přičemž bakterie většinou dorostly do optické hustoty asi 2,0 při 550 nm. Bakterie byly centrifugovány v centrifuze Beckman J-6M při 2000 x g asi 30 minut. Fuzní protein byl poté připraven podle publikovaného postupu<sup>(20,21)</sup> za denaturujících podmínek na sloupci Ni-NTA Sepharosy (Qiagen). Isolovaný protein byl intenzivně dialyzován proti 2 l destilované vody po doby 4 x 8 hodin, sraženina proteinu byla centrifugována a poté sušena pod vakuem.

### **3.6. Štěpení fuzního proteinu a izolace cílového peptidu**

Tato část práce byla provedena podle dostupné literatury<sup>(20,21)</sup>. 100 mg suchého fuzního proteinu bylo rozpuštěno v 950  $\mu$ l 70% kyseliny mravenčí, a poté byl přidán stonásobný molární nadbytek CNBr rozpuštěný v 50  $\mu$ l acetonitrilu. Reakční směs byla umístěna do temna, a reakce probíhala 24 h při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce, a odpařený CNBr zachycený ve vymrazovačce byl

detoxikován oxidací pomocí nasyceného roztoku  $\text{KMnO}_4$ . Odpařená reakční směs byla opět rozpuštěna v 70% kyselině mravenčí, a poté přímo nastříkována do semipreparativní kolony Vydac C-4 o rozměrech 10 x 250 mm ekvilibrované směsí 80 % vody a 20 % acetonitrilu obsahující 0,1 % TFA. Látky byly separovány pomocí půlhodinového lineárního gradientu do 5 % vody a 95 % acetonitrilu v přítomnosti 0,1 % TFA při eluční rychlosti 2 ml/min. Eluce byla monitorována pomocí průtokového absorbančního detektoru při 280 nm. Během gradientové eluce došlo k vymytí tří frakcí s retenčními maximy při 17 min, 19 min a 22 min. Byly odebírány 0,5 ml frakce, které byly odpařeny a uschovány pro další analýzu.

### **3.7. Potvrzení primární struktury cílového peptidu *N*-terminálním sekvenováním a hmotnostní spektrometrií**

Analýzy byly prováděny v proteinovém sekvenátoru Procise firmy Applera (USA), a na hmotnostním spektrometru Biflex III firmy Bruker (SRN) s použitím ionizace MALDI v režimu opožděné extrakce a s použitím reflektoru. Tyto analýzy byly prováděny proškolenými operátory Prof. K. Bezouškou a Mgr. P. Pompachem podle protokolů dodaných výrobcem zařízení. Pro analýzu propeptidů v proteinovém sekvenátoru byla provedena kovalentní C-terminální imobilizace pomocí soupravy Sequelon AA (Millipore).

### **3.8. Glykosylace propeptidu *in vitro***

Glykosylace peptidů *in vitro* byla prováděna podle publikované metody<sup>(13)</sup> s použitím iodoacetamidových derivátů obsahujících  $\beta$ -glykosidicky vázaný *N*-acetyl-D-glukosamin nebo  $\alpha$ -glykosidicky vázanou D-mannosu. Po skončení reakce, která se provádí v silně denaturujícím prostředí, byla celá reakční směs nanesena na kolonu Vydac C-18 za podmínek uvedených v kapitole 3.7. Za těchto podmínek byl peptid glykosylovaný pomocí GlcNAc eluovaný asi v 15. minutě, peptid glykosylovaný manosou dokonce již ve 13. minutě, zatímco nezreagovaný peptid asi v 17. minutě. Průběh glykosylace byl též potvrzen pomocí analytických technik popsanych v kapitole 3.7., a dále pomocí kvantitativní sacharidové a aminokyselinové analýzy.<sup>(1,3)</sup>

### 3.9. Rekonstituční experimenty

Do mikrotitrační destičky s jamkami s kulatým dnem pipetujeme 30  $\mu$ l 50 mM sodno citrátového pufru pH 5,0, 10  $\mu$ l roztoku testované látky ve vodě, a nakonec 10  $\mu$ l roztoku katalytické podjednotky hexosaminidasy ve 4 M močovně a 50 mM sodno citrátového pufru pH 5.0.<sup>(5)</sup> Po smíchání všech komponent inkubujeme destičku 1 h při 4°C v lednici, a poté přeneseme všech 50  $\mu$ l směsi do jamek mikrotitrační destičky s plochým dnem, a přidáme 50  $\mu$ l chladného (4°C) substrátového roztoku obsahujícího 5 mM 4-nitrofenyl- $\beta$ -D-GlcNAc v 50 mM sodno citrátovém pufru pH 5.0. Destičku umístíme do sušárny vyhřáté na 30 °C, a inkubujeme při této teplotě přesně 30 min. Poté desku vyjmeme, a veškeré reakce okamžitě zastavíme přidávkem 100  $\mu$ l 2 M roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Změříme hodnoty absorbance při 400 nm, a aktivitu v jednotlivých experimentech vyjadřujeme jako procento aktivity v kontrolních jamkách obsahující nativní propeptid hexosaminidasy.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Příprava expresního vektoru a návrh mutačních oligonukleotidů

Celá strategie spočívala v použití výchozího plasmidu pPROP01 připraveného kolegyní Marií Vysokou, který již obsahuje celou sekvenci propeptidu v expresním vektoru. V prvním kole byly do tohoto vektoru vnášeny dvě mutace, a to mutace měnící asparagin v pozici 11 (místo *N*-glykosylace v přirozeném propeptidu) na cystein (výsledný plasmid byl nazván pPROPNC), a dále mutace měnící serin v poloze 66 (místo *O*-glykosylace v přirozeném peptidu) též na cystein (výsledný plasmid byl nazván pPROPCC). Po kontrole obou získaných plasmidů DNA sekvenováním může být kterýkoliv ze získaných jednotlivých mutantů použit k získání dvojitého mutantu, kdy se použije vždy opačná sada oligonukleotidů oproti první mutaci. Ve své práci jsem použila obě možné cesty, získaný plasmid kódující dvojité mutovaný propeptid byl potom nazván pPROPDC.

### 4.2. Kontrola úspěšnosti vytvořených mutací

Prvá kontrola úspěšnosti mutačního experimentu je triviální, ale velmi důležitá. Vzhledem k tomu, že v použité metodě se mutovaná molekula plasmidu s insertem celá nově tvoří, a vzhledem ke značné velikosti expresních pET31b plasmidů, je nutno zkontrolovat velikost nově vytvořené DNA restrikční analýzou, a srovnáním s velikostí výchozího plasmidu. Obě velikosti by měly být identické. Klony, které se podařilo takovým způsobem amplifikovat jsou poté namnoženy, plasmidová DNA se z nich připraví v preparativním měřítku, a nakonec je přítomnost správné mutace ověřena DNA sekvenováním. Pro sekvenování se používají dva standardní primery hybridizující se na okrajové sekvence polylinkeru v plasmidu pET31b, jde o tzv. T7 promotor primer a T7 terminátor primer. Výhodné je tedy použít sekvenování z obou stran, vzhledem k tomu, že potřebujeme číst sekvenci na úrovni nukleotidu číslo 680, což už bývá dosti na hranici kvalitních dat. V mém případě jsem tedy sekvenovala vždy dva pozitivní klony s využitím obou primerů. Ukázky výsledků mého DNA sekvenování jsou v přílohách 3 až 6. Příloha 3 (výsledky získané od kolegyně Vysoké) ukazují pro orientaci sekvenci výchozího nemutovaného plasmidu při použití T7 promoterového primeru. Vidíme, že po přečtení



určitého úseku v polylinkeru vektoru pET31b se na úrovni asi 110 nukleotidu dostáváme do proteinové sekvence, nejprve ovšem čteme sekvenci 315 nukleotidů nosičového proteinu ketosteroidisomerasy. V pozici 487 vidíme rozdělovací methionin, a dále následuje již sekvence vlastního propeptidu. V pozici 520 potom vidíme nemutovanou původní sekvenci (viz. příloha 1), tj. triplet AAT kódující původní asparagin.

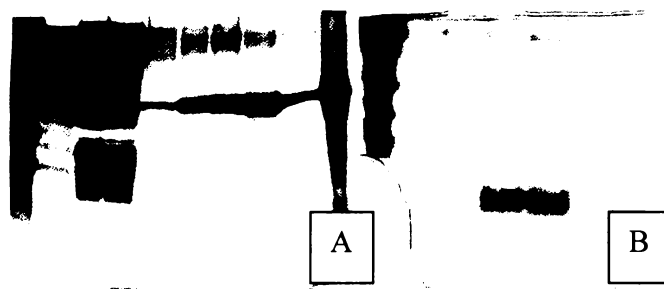
Příloha 4 ukazuje sekvenci N-terminálního mutantu, konkrétně plasmidu pPROPNC04. Na prvý pohled je patrné, že se jedná o naprosto identickou sekvenci jako byla sekvence výchozího plasmidu s výjimkou místa mutace, kdy se v pozici 506 místo původního tripletu AAT nachází oligonukleotidem vnesený triplet TGC (podtrženo a označeno hvězdičkou), což je důkaz, že došlo k požadované mutaci.

Podobně ukazuje příloha 5 sekvenci C-terminálního mutantu, i když v tomto případě musíme hledat již na samém konci zobrazeného elektroforeogramu. V pozici 675, v níž se v původním plasmidu nacházel triplet TCA náležící serinu je nyní trinukleotid TGC (opět označeno hvězdičkou a podtrženo). Vzhledem k tomu, že celá ostatní sekvence změněna nebyla, je toto důkazem, že došlo ke správné mutaci serinu 66 na cystein.

V příloze 6 jsou konečně uvedeny výsledky DNA sekvenování dvojité mutovaného plasmidu. V obou sledovaných pozicích se nyní nacházejí TGC trinukleotidy kodující cysteinové zbytky.

### **4.3. Příprava fuzního proteinu, jeho štěpení, izolace a charakterizace cílového peptidu**

Sekvenovaný produkční plasmid pPROP01 byl transformován do produkčního bakteriálního kmene *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Gold (Stratagene), a byla provedena produkce, jejíž výsledek je znázorněn na Obrázku 7. V dráze číslo 3 je jasně viditelný indukovaný protein (v daném případě pro dvojité mutovaný propeptid), který se daří dále



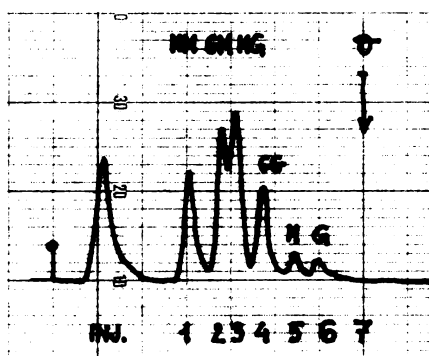
Obrázek 7: Produkce propeptidu v bakteriálních buňkách. V obrázku (A) je vidět produkce proteinu v bakteriálních buňkách a jeho purifikace bioafinitní chromatografií. V obrázku (B) je SDS elektroforesa peptidu purifikovaného na koloně s obrácenou fází. Tato analýza musela být prováděna na 17.5 % polyakrylamidovém gelu pro malou velikost proteinu.

purifikovat, což je ukázáno v obrázku 7 (B). Takto připravené mutované propeptidy byly po separaci na koloně s obrácenou fází vysušeny, a poté použity pro *in vitro* glykosylaci. Přítomnost cysteinových zbytků v takto připraveném proteinu byla ještě dále nezávisle potvrzena metodou tzv. peptidového mapování gelově separovaných cysteinových mutantů. Tato analýza byla provedena Mgr. Petrem Pompachem, ve všech případech potvrdila přítomnost cysteinových zbytků v odpovídajících pozicích v propeptidu.

#### 4.4. In vitro glykosylace na cysteinovém zbytku

Pro potřeby projektu sledujícího vliv glykosylace propeptidu na jeho aktivitu v rekonstitučních experimentech bylo třeba propeptid glykosylovat, k čemuž lze výhodně využít publikovaného protokolu pro vazby sacharidu na reaktivní –SH skupině cysteinu s využitím jodoacetamidových derivátů jednotlivých sacharidů. Tyto deriváty byly syntetizovány Ing. Karlem Křenkem v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR v.v.i., a reakce s nimi byla provedena na základě publikovaného protokolu. Navázání cukerných zbytků na propeptid způsobí zvýraznění jeho hydrofilního charakteru, v důsledku čehož jsou sacharidové deriváty eluovány dříve při chromatografii na obrácené fázi. (Obrázek 8). V případě glykosylace propeptidových mutantů s jedním cysteinovým zbytkem není proto získání cílových produktů žádným problémem, protože reakce probíhá kvantitativně, a glykosylovaný propeptid je navíc snadno separovaný od velmi malého zbytku neglykosylované látky. Ovšem dokonce i u dvojitého mutantu, kdy dochází k náhodné reakci s oběma cysteinovými zbytky, se podařilo od sebe různé glykoformy dobře separovat (Obrázek 8). Pro potvrzení toho, že sacharid je opravdu umístěn na

cysteinovém zbytku bylo použito několik dalších analýz, včetně fragmentační hmotnostní spektrometrie, analýzy v proteinovém sekvenátoru, a kvantitativní sacharidové analýzy.



Obrázek 8: Separace různě glykosylovaných forem dvojitě mutovaného propeptidu na koloně s obrácenou fází. Při popisu píků jsou identifikované glykoformy značeny v pořadí výskytu sacharidu na polypeptidové části, tj. GM je propeptid s počátečním GlcNAc.

#### 4.5. Seznam látek použitých pro rekonstituce enzymové aktivity

Seznam všech látek použitých pro rekonstituci enzymové aktivity je uvedený v tabulce 2. Experiment jsem prováděla společně s kolegyní Marií Vysokou, s ní jsem též sdílela některé použité látky. Výběr látek byl proveden na základě předcházejících rekonstitučních experimentů<sup>(1,2,6)</sup>. Jako negativní kontrola byl vzat použitý citrátový pufr, jako pozitivní kontrola pak přirozený propeptid izolovaný ze stejného zdroje jako katalytická podjednotka. Dále jsem zkoušela rekonstituovat aktivitu hexosaminidasy v propeptidech jiných blízkce příbuzných enzymů, a to glykosylovanými i neglykosylovanými. Další experimenty byly poté prováděny s propeptidy připravenými právě mnou, kdy byly do různých pozic propeptidu vnášeny mutací cysteinové zbytky, které byly následně použity pro glykosylaci *in vitro*.

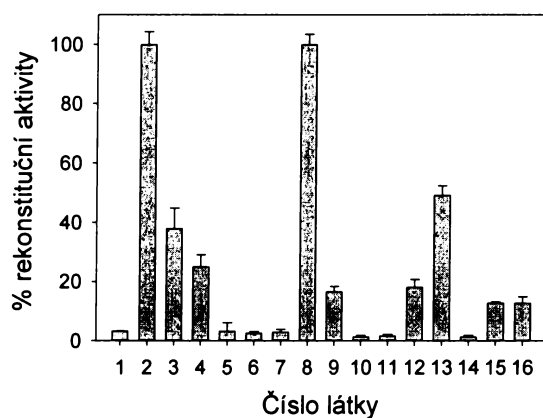
Tabulka 2: Popis látek používaných v rekonstitučních experimentech s plísňovou hexosaminidasou z *Penicillium oxalicum* CCF3438.

číslo látky	chemické složení	původ a analýza
1	citrátový pufr (negativní kontrola)	
2	nativní propeptid z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF3438	isolace <sup>(6)</sup>
3	nativní propeptid z <i>Aspergillus oryzae</i> CCF1066	isolace
4	nativní propeptid z <i>Talaromyces flavus</i>	H. Kroupová <sup>(22)</sup>
5	neglykosylovaný propeptid z <i>Penicillium oxalicum</i>	M. Vysoká <sup>(24)</sup>
6	neglykosylovaný propeptid z <i>Aspergillus oryzae</i>	O. Plíhal <sup>(3)</sup>
7	neglykosylovaný propeptid z <i>Talaromyces flavus</i>	K. Bezouška <sup>(23)</sup>
8	nativní propeptid z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF3438	Isolace <sup>(6)</sup>
9	rekombinantní propeptid, Asn <sup>11</sup> - GlcNAc	tato práce
10	rekombinantní propeptid Asn <sup>11</sup> - Man	tato práce
11	rekombinantní propeptid Ser <sup>66</sup> - GlcNAc	tato práce
12	rekombinantní propeptid Ser <sup>66</sup> – Man	tato práce
13	rekomb. propeptid Asn <sup>11</sup> -GlcNAc Ser <sup>66</sup> -Man	tato práce
14	rekomb. propeptid Asn <sup>11</sup> -Man Ser <sup>66</sup> -GlcNAc	tato práce
15	rekomb. propeptid Asn <sup>11</sup> -GlcNAc Ser <sup>66</sup> -GlcNAc	tato práce
16	rekomb. propeptid Asn <sup>11</sup> -Man Ser <sup>66</sup> -Man	tato práce

#### 4.6. Rekonstituce enzymové aktivity

Výsledky rekonstitučních aktivit jsou uvedeny na obrázku 9. Bez přítomnosti propeptidu k rekonstituci enzymové aktivity nedochází, a naopak v přítomnosti přirozené formy propeptidu došlo k velmi účinné rekonstituci (vzorek 2 a 8) v souladu s literaturou<sup>(1,6)</sup>. Tato úroveň rekonstituované enzymové aktivity byla proto vzata jako 100 % rekonstituce, a na ní byly vztahovány ostatní výsledky. Z výsledků je evidentní, že při použití nativních (a tedy glykosylovaných) propeptidů izolovaných z hexosaminidas jiných živočišných druhů, jsou jejich rekonstituční aktivity poměrně nízké (vzorek 3 a 4). Velmi dramatická a nápadná je dále úplná ztráta rekonstituční aktivity u neglykosylovaných propeptidů, ať již tyto obsahují aminokyselinovou sekvenci s identické hexosaminidasou (vzorek 5), nebo z blízkce příbuzných druhů (vzorky 6 a 7). Je tedy evidentní, že glykosylace propeptidu je naprosto nezbytná pro jeho náležitou rekonstituční aktivitu, neglykosylované propeptidy mají tuto aktivitu velmi nízkou, pouze několik procent rekonstituční aktivity nativního glykosylovaného propeptidu. Dále je zajímavé, že již přidání jediného sacharidového zbytku umístěného v náležité poloze na

polypeptidový řetězec propeptidu vede ke zvýšení rekonstituční aktivity, ovšem pouze za předpokladu, že se jedná o správný sacharidový zbytek, tj, takový, odpovídající přirozené situaci. Tak například látky 9 a 12 obsahují buď pouze jeden zbytek *N*-acetylglukosaminu nebo jeden zbytek mannosy umístěný ve správné pozici jak to odpovídá přirozenému uspořádání (viz. Příloha 2), což vede ke zvýšení rekonstituční aktivity asi na 20 % plně glykosylovaného propeptidu. V případě použití dvojitého cysteinového mutanta se správně umístěnými sacharidovými zbytky se potom získá dokonce 50 % rekonstituční aktivity.



Obrázek 9: Rekonstituční aktivity použitých látek sledované v hexosaminidasovém rekonstitučním systému. Úroveň rekonstituce dosahovaná pomocí přirozeného peptidu je vzata jako 100 %, a na ní jsou potom vztahovány ostatní experimenty.

## 5. DISKUSE

Přirozená forma propeptidu z *Penicillium oxalicum* je glykosylovaná (viz. Příloha 2), a to pomocí *N*-glykosidicky vázaného oligosacharidového řetězce umístěného na zbytku asparaginu Asn<sup>11</sup> stejně jako pomocí *O*-glykosidicky vázaného řetězce (jedná se o tzv. *O*-mannosylaci hojně se vyskytující u glykoproteinů z kvasinek nebo vláknitých hub. Jednou z funkcí takto umístěných oligosacharidových řetězců je udržovat dobrou rozpustnost celého propeptidu prostřednictvím hydrofilních oligosacharidových řetězců.

V našem rekonstitučním pokusu bylo přítomno 16 látek, z čehož první látka citrátový pufr, sehrála roli negativní kontroly. Pozitivní kontrolu zastala látka 2 a 8, jednalo se o nativní propeptidy izolované z *P. oxalicum* CCF 3438. Hodnota enzymové aktivity při přidání této látky byla vzata jako 100 % rekonstituce a na ní byly vztahovány ostatní výsledky.

Z grafu tedy můžeme jasně vidět, že aktivita různých plísňových látek nativních propeptidů, které jsou přirozeně glykosylované, se výrazně liší. Tedy u látky 3 izolované z *Aspergillus oryzae* CFF 1066 hodnota klesla na necelých 40 % a u izolace z *Talaromyces flavus* dokonce až pod úroveň 30 % z kontrolní aktivity. Hodnoty aktivit u neglykosylovaných propeptidů jsou podobné údaji negativní kontroly. Z tohoto zjištění vyplývá, že pro rekonstituční aktivitu je nutná glykosylace propeptidu.

Zajímavé výsledky byly získány pomocí látek připravených v této bakalářské práci. Jde o rekombinantní propeptidy, u kterých byly v různých variantách pomocí jodoacetamidové glykosylace navázány sacharidy a to v místech Asn<sup>11</sup> nebo Ser<sup>66</sup>. Z našeho pokusu plyne, že je velmi důležitá volba navázaného sacharidu. U propeptidů s jedním sacharidem, ale navázaným ve správné pozici (viz výše), sledujeme aktivitu kolem 20 %, a to jak u *N*-glykosidicky tak i *O*-glykosidicky vázaného řetězce. Při navázání sacharidu do špatné pozice jsou hodnoty látek 10 a 11 opět srovnatelné s negativní kontrolou. Nejzajímavější poznatky nám přináší hodnoty látek 13, 14, 15, 16, jde o dvojité cysteinové mutanty, kde sacharidový řetězec je navázán jak v pozici Asn<sup>11</sup> tak Ser<sup>66</sup>. U látky 13 je glykosylace provedena tak jako u přirozeného propeptidu Asn<sup>11</sup>-GlcNAc Ser<sup>66</sup>-Man, látka vykazovala 50 % aktivity nativní kontroly. Oproti tomu látka 14, kde byla glykosylace provedena ve špatných pozicích Asn<sup>11</sup>-Man Ser<sup>66</sup>-GlcNAc, se aktivita pohybuje pouze v několika procentech a je opět srovnatelná s negativní kontrolou. Zbylé látky 15, 16 byly glykosylovány vždy v obou pozicích stejným sacharidovým řetězcem,

tedy v jedné pozici byl sacharid umístěn správně a v druhé nikoli. V našem pokusu se toto navázání stejných řetězců projevilo aktivitou v procentech o něco nižší než u látek 9 a 12, kde šlo o glykosylaci jednoho sacharidu ve správné pozici. Z těchto výsledků je tedy možné odvodit, že aktivitu nám zajišťují jen správně glykosylované sacharidy. U dvojitého cysteinového mutanta pak špatná poloha jediného sacharidu může vést dokonce k mírnému snížení aktivity.

## 6. ZÁVĚR

Cíl této práce spočíval v cílené mutagenesi propeptidu plísňové hexosaminidasy z *P. oxalicum*, jeho glykosylaci a dále v použití námi připravených rekombinantních propeptidů v rekonstitučních pokusech.

- Propeptid byl mutován prostřednictvím soupravy *QuikChange® Site-Directed Mutagenesis*. Došlo k vytvoření jak jednotlivého tak dvojitého cysteinového mutantu, což bylo prokázáno DNA sekvenováním.
- Glykosylací jodoacetamidovými deriváty *in vitro* se navázaly sacharidové řetězce do polohy Asn<sup>11</sup> nebo Ser<sup>66</sup> v různých požadovaných variantách.
- Glykosylované rekombinantní propeptidy byly požity pro rekonstituční pokusy.
- Z rekonstitučního pokusu jsme došli k závěru, že propeptid je nezbytný pro glykosylaci a glykosylace je zase nezbytná pro aktivitu enzymu. Dále nám ukázal, že na aktivitě se podílejí jen sacharidy glykosylované ve správné poloze. Naopak špatně zvolená poloha, oproti přirozené glykosylaci propeptidu, sacharidového řetězce vede k mírnému snížení aktivity. Z výsledků můžeme dále vidět i rozdíly aktivit přirozených propeptidů, lišící se původem izolace.



## 7. LITERATURA

- (1) Plíhal, O.: Investigation of fungal  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase structural properties related of function: Kandidátská disertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 1-11 (2005)
- (2) Plíhal, O., Sklenář, J., Hofbauerová, K., Novák, P., Man, P., Pompach, P., Kavan, D., Ryšlavá, H., Weignerová, L., Charvátová-Pišvejcová, A., Křen, V., Bezouška, K.: *Biochemistry* **46**, 2719-2734 (2007). Large propetides of fungal  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidases are novel enzyme regulators that must be untracellularly processed to kontrol aktivitu, dimerization, and secretion into the extracellular environment.
- (3) Plíhal, O., Sklenář, J., Kmoníčková, J., Man, P., Pompach, P., Havlíček, V., Křen, V., Bezouška, K.: *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 764-765 (2004). *N*-glycosylated catalytic unit meets *O*-glycosylated propeptide: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase.
- (4) Rüdiger, E., Kopecký Jr, V., Hofbauerová, K., Baumruk, V., Novák, P., Pompach, P., Man, P., Plíhal, O., Kutý, M., Kulik, N., Sklenář, J., Ryšlavá, H., Křen, V., Bezouška, K.: *BMC Structural Biology* **7**, 32 (2007). Structure of the dimeric *N*-glycosylated form of fungal  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase revealed by computer modeling, vibrational spectroscopy, and biochemical studies.
- (5) <http://botany.natur.cuni.cz/pdf/kubatova/3.06%20Eurotiales-Pen%20subg%20Furc.pdf> (20.5.2008)
- (6) Mark, B. L., Vocadlo, D.J., Knapp, S., Triggs-Raine, B.L., Withers, S.G., James, M.N.G.: *J. Biol. Chem.* **276**, 10330-10337 (2001). Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial  $\beta$ -Hexosaminidase.
- (7) Sinnott, M.L.: *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202 (1990). Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer.
- (8) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/52.html> (5.5.2008)
- (9) Cabezas, J. A.: *Biochem. J.* **261**, 1059-1061 (1989). Some comments on the type references of the official nomenclature (IUB) for  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase,  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase and  $\beta$ -*N*-acetylgalactosaminidase,
- (10) Benda, V., Babůrek, I., Kotrba P.: *Základy biologie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006.*
- (11) Soukupová, M., Soukup, F.: *Kapitoly z lékařské biologie a genetiky II., Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum, 2005*

- (12) Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W.: Harperova biochemie. Nakladatelství H+H (2002)
- (13) Macmillan, D., Bill, R.M., Sage, K.A., Fern, D., Flitsch, S.L.: Chem. Biol. 8, 133-145 (2001). Selective in vitro glycosylation of recombinant proteins: semi-synthesis of novel homogeneous glycoforms of human erythropoietin.
- (14) Wong, S.Y. C., Guile, G.R., Dwek, R.A., Arsequell, G.: Biochem. J. 300, 843-850 (1994). Synthetic glycosylation of proteins using *N*-( $\beta$ -saccharide) iodoacetamides: applications in site-specific glycosylation and solid-phase enzymic oligosaccharide synthesis.
- (15) Man, P., Bezouška, K.: Chemické listy 100, 1084-1095 (2006). Současné trendy v analýze eukaryotických proteomů, glykomů a lipidomů.
- (16) Instruction manual, QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Catalog #200518 and #200519, Stratagene
- (17) Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
- (18) Berghammer, H., Auer, B.: Biotechniques 14, 524-528 (1993). „Easypreps“: fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *Escherichia coli*.
- (19) Promega Protocols and Applications Guide, 2. vydání, Promega Corporation (1991).
- (20) Kuliopulos, A., Walsh, C.T.: J. Am. Chem. Soc. 116, 4599-4607 (1994). Production, purification, and cleavage of tandem repeats of recombinant peptides.
- (21) Rodríguez, J.C., Wong, L., Jennings, P.A.: Protein Expres. Purif. 28, 224-231 (2003). The solvent in CNBr cleavage reactions determines the fragmentation efficiency of ketosteroid isomerase fusion proteins used in the production of recombinant peptides.
- (22) Kroupová, H., vypsáno z bakalářské práce, katedra biochemie UK PŘF 2008
- (23) Bezouška, K., osobní sdělení
- (24) Vysoká, M., vypsáno z bakalářské práce, Katedra biochemie UK PŘF 2008

# PŘÍLOHY

Příloha 1: Úplná nukleotidová a aminokyselinová sekvence hexosamniidiasy z vláknité houby *Penicillium oxalicum* kmene CCF 3438.

CCAAATTCATATTCTCGATGGGGTTTGGAAGGTCATCAAATTCCCAGTGATCATTGCGCTACCCGCTGGCCCTCC  
GCCAAATATGCGTCTTGGGCATCGTTTGAAGCTGCCGTATCTCGCAAGATGGCAGACACGAAAACGAGCCTTATGGC  
CAGAGGCCCTTGAAACAGCACTATTTCAATTCAGCATCAAGACACACGTCCACCTTGAATGGACGTCCCGTATCTTTCT  
GTGAGCATGCGACAGGATCCAGTACCTTTAAATAGGTGGCTCACCTCGCTGCTTCATAAATTGCCCGTTCTCTTC  
CACTCTCCGCTACTCACCTCTCACTTTCTCTGATCGTCTGACTGATTACGACTTGGGTTTTCTACCTTCAG  
**ATGAAGTGTACCCGCTTGTTTGGTGGCTTGGCGCTTTCCGCTCGCTAGCCACGGCCGTC****CAAGGTGAATCCCTTGCC**  
**M K C T A L F G L A L S A S L A T A** V K V N P L P  
GCACCTCGCAATATCACCTGGGGCTCCTCCGGTCCCATTTCAATCACGAAGCCGGCGCTACATCTCGAGAATCACCAT  
A P R N I T W G S S G P I S I T K P A L H L E N H H  
GGCCAGAACCAAGATATCCTGCACCACGCCTGGGATCGGACGTGGGCCACCATCACCAACCTCGAATGGGTGCCCGCC  
G Q N Q D I L H H A W D R T W A T I T N L E W V P A  
GCTATCGAGGGCCGATTCCCTCATTCGACCATTCCCGACCCCTGCGGACCAGGTGAAGCGTGACACCGCCGCGACC  
A I E A P I P S F R P F P T P A D Q V **K R** D T A A T  
GCCATTCACCTCGTGCACCTGTCCGTCGTCGATGCGGCTGCAGACCTGCAGCACGGGGTGGACGAGTCTTATACCTTG  
A I H S V H L S V V D A A A D L Q H G V D E S Y T L  
GAGGTCACTGCCACTCGGGACCATTCCAGATTCATGCCAGACCGTGTGGGTGCGATTTCATGCCATGACCACCTTG  
E V T A D S G T I Q I H A Q T V W G A I H A M T T L  
CAGCAGCTGGTCAATACGGATGGCCATGGGAACCTGATCATTGAACAGCCCGTCAAGATTAGGATGCTCCGCTGTAT  
Q Q L V I T D G H G N L I I E Q P V K I Q D A P L Y  
CCCTACCGGGTATCATCGATACGGGACGAAACTTCTCTGTCCGAAGATCCTCGAGCAGATTGACGGCATG  
P Y R G I M I D T G R N F I S V P K I L E Q I D G I  
GCCCTCTCAAACCTCAATGTGCTGCATTGGCATCTGGATGATACCCAATCGTGGCCCGTTTCAGATTCGGTTCGTATCCT  
A L S K L N V L H W H L D D T Q S W P V Q I R S Y P  
CAGATGACCAAGGACGCTACTCGAGCCGTGAAATCTACACCGAGACCAGCTCCGCGCGTTCGGCCTATGCACGT  
Q M T K D A Y S S R E I Y T E T D L R R V L A Y A R  
GCGGTGGCGTCCGCTCATTCCAGAGTTCGACATCGCCGGCCACTCAGCCTCCGGGTGGAACAAGTCGATCCGGAC  
A R G V R V I P E V D M P G H S A S G W K Q V D P D  
GTGGTACCTGCACCGATAACATGGTGGTCCAACGATGACTGGCCCAAGCACACCGCGGTGGAGCCTAACCCCGGGCAG  
V V T **C** T D T W W S N D D W P K H T A V E P N P G Q  
TTGGACATCATCTACAACAAGACCTATGAAGTGTGGGCAACGTCTACAAAGATCTGTCGGCCATCTTCAGCGACAAC  
L D I I Y N K T Y E V V G N V Y K D L S A I F S D N  
TGTTTCCAGTGGGTGGCGACGAGCTTCAGAACAATTTGTTCAATTTCAATTTAGTACCCACATCACCAAGTGGTTCGCCGAG  
W F H V G G D E L Q N N **C** F N F S T H I T K W F S E Q  
GATCCCTCGCGAACCTACAACGACCTGTCTCAGTACTGGCTGGACCACGCTTTGCCCATCTTTACGGAACCGGAGGC  
D P S R T Y N D L S Q Y W L D H A L P I F H G T G G  
CCCCAGCGTCGCTGATGATGTGGGAAGATATCTTCATCAACACGGACGCTGCTCATCACGTTCCGAGGGACATTGTG  
P Q R R L M M W E D I F I N T D A A H H V P R D I V  
ATGCAGTCTGGAACAATGGTATCGACAATATCAAGAATTTGACCGCAAGCGGATTCGACGTGGTTCGCTCCTCAGCC  
M Q S W N N G I D I I K N L T A S G F D V V V S S A  
GACTTCCTTATCTCGACTGCGGCTTTGCGGGCTTTGTGGGCAACGATCCCCGATAACGATGAGCAACCCCGGG  
D F L Y L D **C** G F A G F V G N D P R Y N V I S N P G  
GGTGTGTCACCTTCAACTACGGCGGTAGCGGTGGTTTCTGGTGGCGCCTTACAAGTCTGGCAACGTATCTACGAC  
G D V T F N Y G G S G G S W **C** A P Y K S W Q R I Y D  
TAGACTTCACCACCAACCTCACTGCATCGGAAGCGAAGCACGTCATCGGTGCCGAGGCTCCCTTGTGGTCCGAACAG  
Y D F T T N L T A S E A K H V I G A E A P L W S E Q  
GTCGATGATGTTACCATTTCCAGCAAGATGTGGCCTCGAGCGGCCGCTCTCGGCGAATTGGTGTGGTCAAGCAACCGA  
V D D V T I S S K M W P R A A A L G E L V W S G N R  
GACGCTTCTGGCCACAAGCGTACCACCCAGCTCACACAGCGCTGTTGAACTTCCGCGAGTATCTGGTTGCCAATGGC  
D A S G H K R T T Q L T Q R L L N F R E Y L V A N G  
GTCATGGCCACCAACCTGGCGCCAAAGTACTGCTGCAGCATCCCCATGCGTGGCAGCTTGTACTACAACAGAGTGT A  
V M A T N L A P K Y **C** L Q H P H A **C** D L P H A **C** D L P H A **C** D L P H A **C** D L P H A **C** D L P H A **C** D L P H A  
ATCACACCTTGAGCTGGGAACCTTGATGCTTTGAATTCGAGGACTCGTTGGCGGCATTTCATGGTTGGTGCATTTCTTTT  
I T P \*\*\*  
CCCCCGGAGGACATTCAAATAGCCAATGCGGGCATCGTGCATCTGTGCTGTGACTGTTGATTGTTACTCTCTGTTTTT  
G

Příloha 2:

**A) Aminokyselinová sekvenční podobnost kmene *Aspergillus oryzae* CCF1066 (zelená sekvence), a *Penicillium oxalicum* CCF3438 (žlutá sekvence)**

**B) Schéma jednotlivých částí propeptidu**

**C) Experimentálně zjištěná glykosylace u obou kmenů**

**A)**

MGVRNPLPAPRELSMGSSGPKSLDAGELQLRITDSQSDGIVADAMNTRAVETIVALLRNVPAATEAPISSFEPEPTPTAGAS

NIT

S S TST SS



**N-glykosylace je přítomna jen u kmene *P. oxalicum***



**O-glykosylace je přítomna u obou enzymů**

**B)**

**19 aminokyselin**

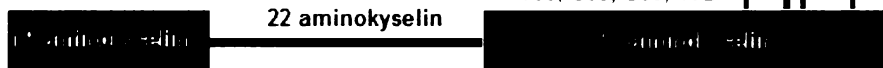
**37 aminokyselin**

**spojovač**

**N-terminální konec**

**C-terminální konec**

**C)**



O-mannosylace

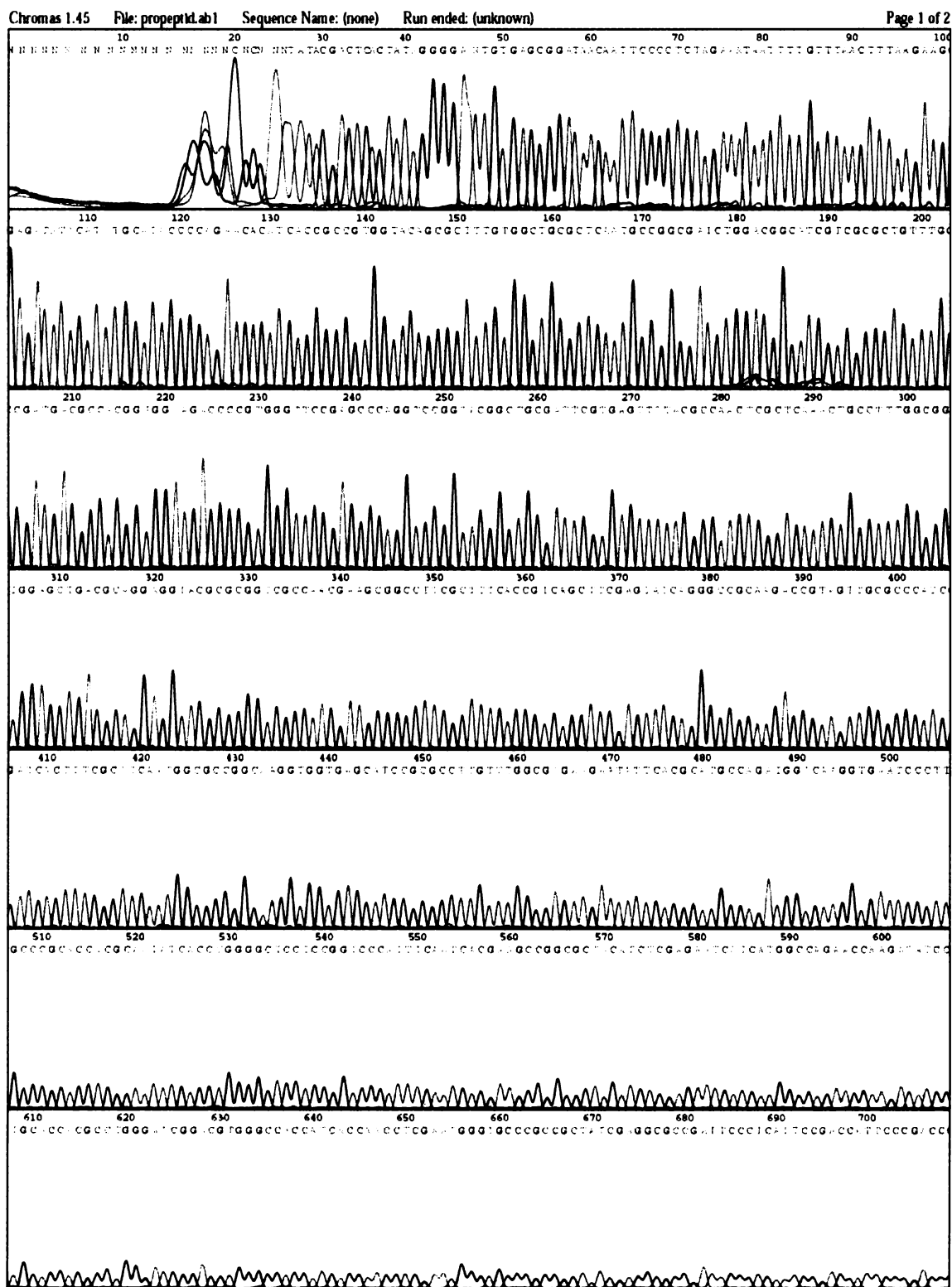
T60, S65, S66, T72

22 aminokyselin

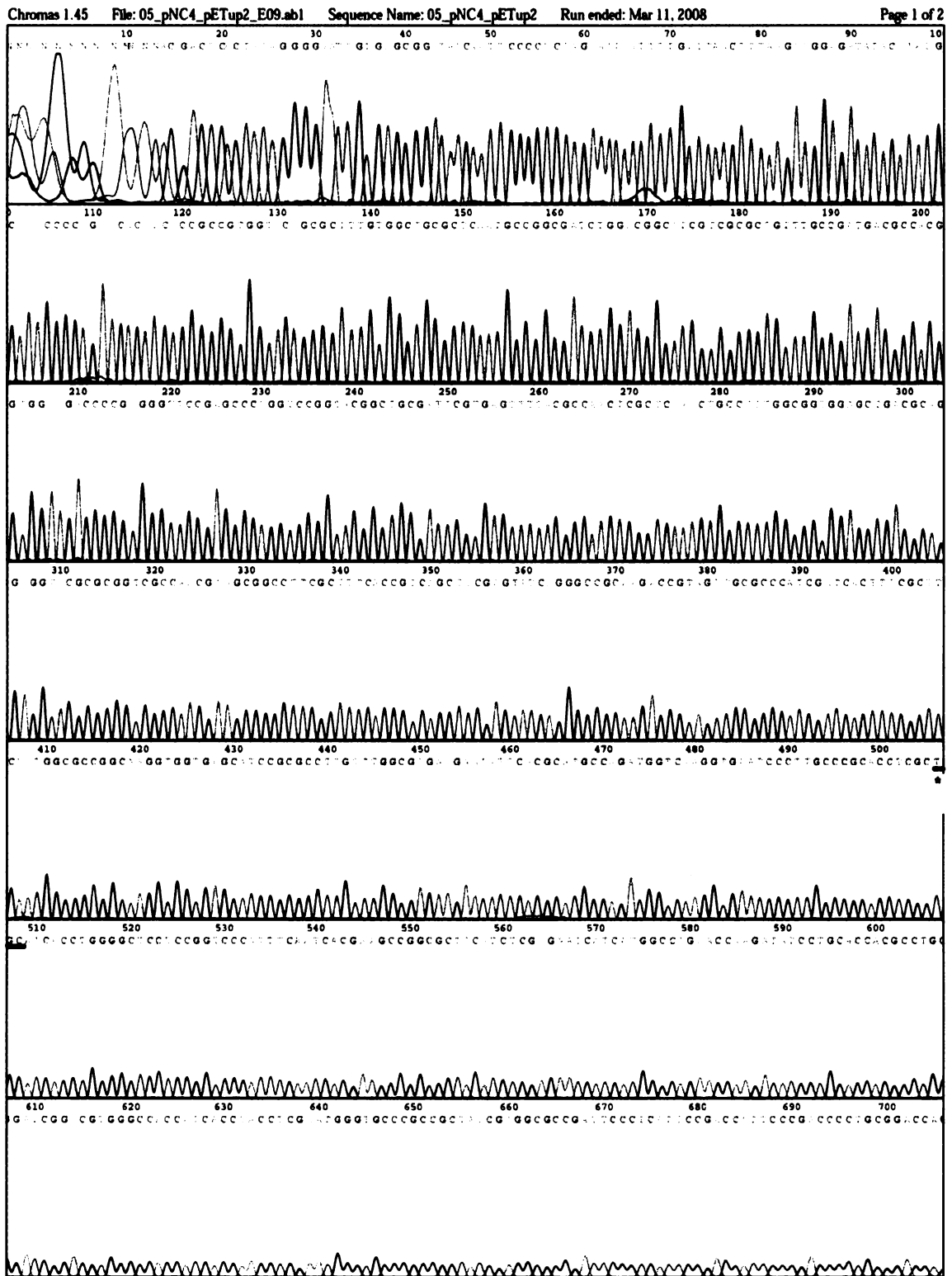
**19 aminokyselin**

**37 aminokyselin**

Příloha 3 : Výsledek DNA sekvenování plasmidu pPROP01 s použitím T7 promoter primeru.

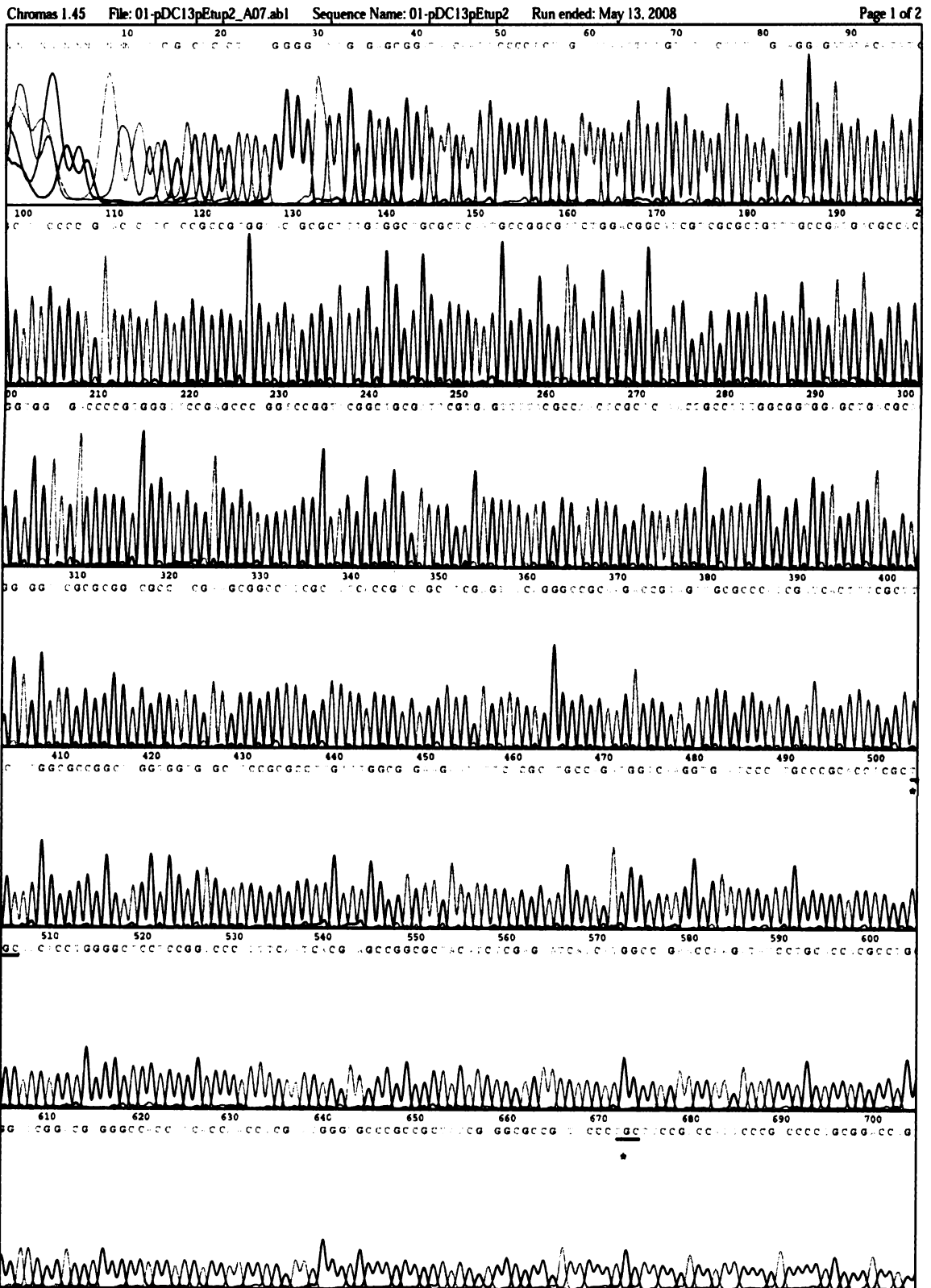


Příloha 4: Analýza N-terminálního cysteinového mutanta DNA sekvenováním.





Příloha 6: Analýza dvojitého mutanta DNA sekvenováním.





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

Jméno a příjmení	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka