

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Expres propeptidu hexosaminidasy a jeho  
použití pro enzymovou rekonstituci**

**Marie Vysoká**

Bakalářská práce

Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

**UNIVERZITA KARLOVA v Praze**

Přirodovědecká fakulta

Oborová knihovna chemie

Albertov 6, 128 43 Praha 2

IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208

UK 22

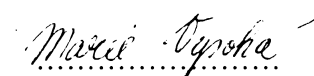
*pr.č. 74b/08 stud  
(biochemie)*

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru  
MSM0021620857 a MSM21620808.

## 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 28. května 2008.



Marie Vysoká

### **Poděkování**

Ráda bych zde poděkovala za pomoc a ochotu Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. pod jehož vedením jsem mohla vypracovat bakalářskou práci v Laboratoři architektury proteinů na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky.

## OBSAH

Seznam zkratk.....	5
1. TEORETICKÝ ÚVOD .....	6
1.1 Plísňové hexosaminidasy a jejich specifické postavení v rodině glykosylhydrolas 20.....	6
1.2 Klonování druhé hexosaminidasy .....	10
1.3 Rekonstituce enzymové aktivity a její závislost na propeptidu.....	11
1.4 Analýza glykosylace propeptidů plísňových hexosaminidas .....	12
2. CÍLE PRÁCE .....	13
3. Materiál a chemikálie .....	14
4. VÝSLEDKY.....	25
5. DISKUSE .....	34
6. SOUHRN VÝSLEDKŮ .....	35
7. POUŽITÁ LITERATURA .....	36

## Seznam zkratek

Asp	asparagin
CCF	sbírka kultur hub – <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection of <u>F</u> ungi
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GlcNAc	$\beta$ - <i>N</i> -acetylglukosamin
HAc	kyselina octová
Man	mannosa
SDS	dodecylsulfát sodný
Ser	serin
TEMED	tetramethylethylen diamin
TFA	trifluoroctová kyselina

# 1. TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1 Plísňové hexosaminidasy a jejich specifické postavení v rodině glykosylhydrolas 20

### 1.1.1 Charakteristiky enzymu

$\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) se řadí mezi exoglykosidasy odpovědné za hydrolýzu koncových neredukujících *N*-acetyl-D-hexosaminových zbytků v *N*-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidech. Zatímco enzym je absolutně specifický, co se týče typu glykosidické vazby a glykolové části, jeho tolerance v aglykonové části je velmi vysoká v případě mnoha  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas <sup>(1)</sup>.  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidasa má jak  $\beta$ -*N*-acetylglukosaminidasovou, tak  $\beta$ -*N*-acetylgalaktosaminidasovou aktivitu <sup>(2)</sup>. Tyto enzymy jsou intenzivně studovány u rostlin, mikroorganismů a vyšších obratlovců (včetně člověka). Zvláště významné jsou lidské  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy, jejichž disfunkce je zodpovědná za fatální vrozené chyby metabolismu, které se projevují jako lysosomální poruchy, tzv. Tay Sachsovo a Sandhoffovo onemocnění <sup>(3)</sup>. Enzym je znám též pod jinými alternativními názvy jako je  $\beta$ -hexosaminidasa, hexosaminidasa nebo *N*-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidasa <sup>(1)</sup>.

### 1.1.2 Struktura enzymu

Všechny známé *O*-glykosylhydrolasy (EC 3.2.1.-), enzymy zodpovědné za katabolismus sacharidů, byly klasifikovány podle jejich sekvenčních podobností a následně rozděleny do 85 rodin. Většina  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas jsou členy glykohydrolas rodiny s číslem 20. Výjimku tvoří enzym z *Vibrio furnissii* a *Streptomyces thermoviolaceus*, který se významně odlišuje od rodiny 20 a je zařazován ke skupině glykohydrolas s číslem 3. Dvě nebo více rodin spolu mohou vytvářet rod, což poukazuje na jejich jednotný evoluční původ. Zřejmým důkazem těchto evolučních vztahů je podobnost terciálních struktur nebo není-li struktura dostupná, pak podobnost obvyklých sekvenčních motivů <sup>(1)</sup>.

Krystalická struktura je známa pro několik  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas z glykohydrolasové rodiny 20, včetně monomerických bakteriálních enzymů ze *Serratia marsescenes* a *Streptomyces plicatus* a lidských enzymů <sup>(3)</sup>. Obě rodiny glykohydrolas (20 a 3) mají ve své struktuře podobný strukturní motiv, a to tvar soudku, ve kterém se nachází

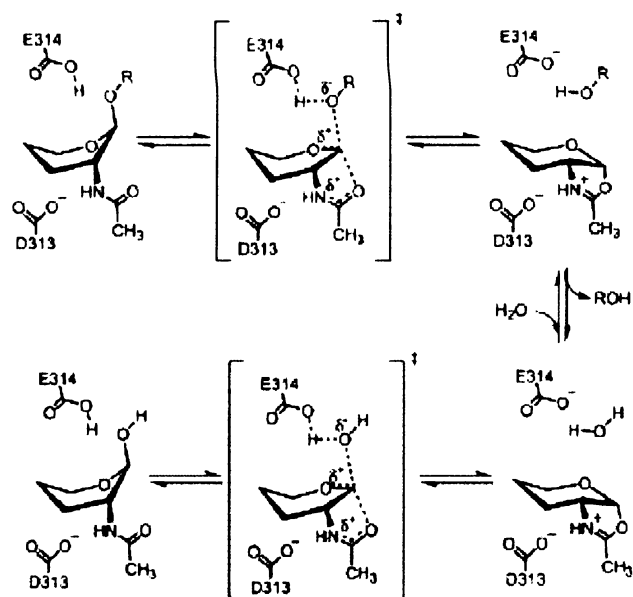
katalytické centrum. Aktivní místo enzymu je vysoce konzervované s jednou aminokyselinou – kyselinou glutamovou, která plní funkci acidobazického katalyzátoru <sup>(1)</sup>.

### 1.1.3 Příklady $\beta$ -N-acetylhexosaminidas a jejich funkcí v různých organismech

$\beta$ -N-Acetylhexosaminidas jsou enzymy se širokým spektrem biologických funkcí. Bylo zjištěno, že intracelulární bakteriální  $\beta$ -N-acetylhexosaminidas jsou monomerní, extracelulární sekretované plísňové a lidské  $\beta$ -N-acetylhexosaminidas se vyskytují jako dimery <sup>(4)</sup>.

#### 1.1.3.1 Plísňové $\beta$ -N-acetylhexosaminidas

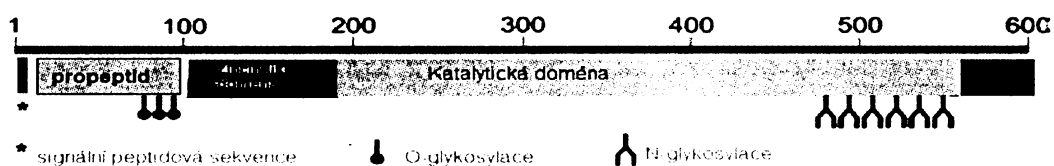
Plísňová  $\beta$ -N-acetylhexosaminidas je produkovaným a sekretovaným enzymem vláknitých hub jako je *Aspergillus oryzae* a je důležitou součástí binárního chitinolitického systému <sup>(5)</sup>. Chitin je strukturální polysacharid podobný celulóze. Skládá se z N-acetyl-D-glukosaminových jednotek vázaných  $\beta(1\rightarrow4)$  vazbou. Opakující se jednotkou je disacharid – chitobiosa <sup>(6)</sup>. Právě plísňové  $\beta$ -N-acetylhexosaminidas štěpí chitobiosu až na základní monosacharidové jednotky. Reakce hexosaminidas můžeme řadit mezi nukleofilní substituci na nasyceném anomerním uhlíku (Obr. 1) <sup>(7)</sup>.



Obrázek 1

Předpokládaný katalytický mechanismus  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy ze *Streptomyces plicatus*. Kyselina glutamová (Glu<sup>314</sup>) a asparagová (Asp<sup>313</sup>) jsou primárně zodpovědné za stabilizující kladný náboj na oxazoliniovém iontu, coby inetrmediátu <sup>(8)</sup>.

Tyto enzymy jsou fyziologicky důležité během životního cyklu hub <sup>(4)</sup>. Klonování hexA genu a sekvenování enzymu vláknité houby *Aspergillus oryzae* odhalilo, že se skládá ze signálního peptidu, neobvykle velkého propeptidu (78 aminokyselin), Zincin-like domény a katalytické podjednotky náležící k glykosylhydrolasové rodině s číslem 20 (Obr. 2).

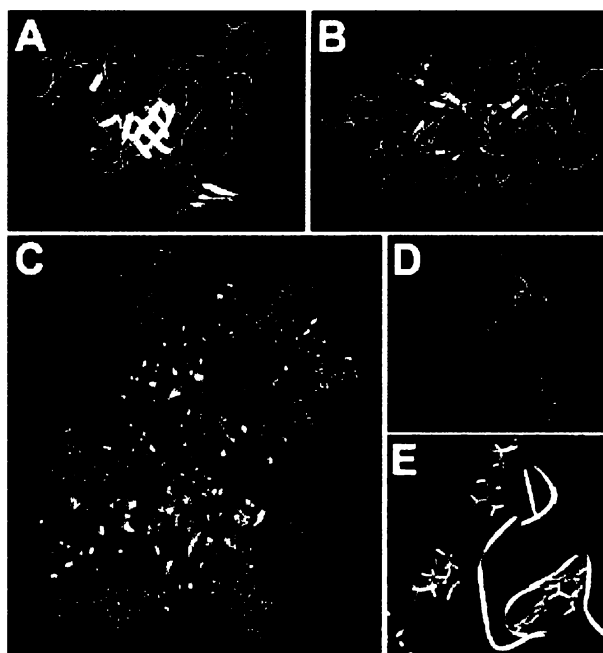


Obrázek 2

Struktura hexosaminidasy a její glykosylace <sup>(6)</sup>

Této struktuře byla předpovězena glykosylace <sup>(5)</sup>. Kompletní primární struktura houbových  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidas z *Asperillus oryzae* byla použita ke konstrukci molekulárních modelů katalytické podjednotky, dimeru enzymu a *N*-glykosylovaného dimeru. Experimentální data byla získána z infračervené a Ramanovi spektroskopie a

biochemických studií nativního a deglykosylovaného enzymu a s molekulárním modelem se velmi dobře shodují (Obr. 3).



Obrázek 3

Molekulární model  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*. Na modelu je vidět tvar katalytické podjednotky z bočního pohledu (A) a z vrchu (B) s aktivním místem na C-terminálním čele ( $\beta$ ,  $\alpha$ )<sub>8</sub>-barelu a uspořádání těchto podjednotek v plně *N*-glykosylovaném dimeru (C). Velká pružnost smyčky (D: boční pohled, E: svrchní pohled, vyznačeno žlutě) zeleného monomeru je velká pouze okolo 1 nm nad aktivními místy zbytků (šedá barva) červeného monomeru<sup>(3)</sup>.

Jak již bylo výše zmíněno, plísňové enzymy se vyskytují jako dimery. Dimerizace se objevuje jako reverzibilní proces striktně závislý na pH. Oligosacharidové části se mohou též podílet na dimerizačních procesech, které mohou představovat unikátní vlastnost výhradně extracelulárních enzymů. Dimerizace a *N*-glykosylace jsou strategiemi enzymu, jak stabilizovat katalytickou podjednotku. Nedávno byla právě plísňovým  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasám věnována značná pozornost, jsou běžně využívané laboratořemi v chemoenzymatických reakcích oligosacharidů<sup>(3)</sup>. Například různé druhy filamentárních hub včetně *Aspergillus oryzae*, *Penicillium oxalicum*, byly použity při syntézách disacharidů, oligosacharidů, modifikovaných sacharidů nebo derivátů alkaloidů a steroidů<sup>(4)</sup>.

### 1.1.3.2 Lidské $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy

Asi nejvíce prostudovaným enzymem je lidská  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa kdy jeho disfunkce způsobuje závažná lysosomální onemocnění, Tay Sachsovu a Sandhoffovu chorobu. Jak už bylo dříve zmíněno, lidská  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa je lysosomální dimerický protein složený z  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek majících přibližně 60 % sekvenční podobnost. Obě podjednotky jsou syntetizovány ve formě pre-pro-proteinu a vyskytují se ve třech isoformách, homodimerická acetylhexosaminidasa B ( $\beta\beta$ , Hex B) a S ( $\alpha\alpha$ , Hex S) a heterodimerická acetylhexosaminidasa A ( $\alpha\beta$ , Hex A). Dimerizace je důležitá pro katalytickou aktivitu těchto enzymů <sup>(4)</sup>.

$\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidasa je též dominantní glykosidasa v lidské synoviální tekutině. Tento enzym je spojován s katabolismem glykosaminglykanů. Existuje hypotéza, že zrychlený katabolismus glykosaminglykanů, který vede k degenerativnímu onemocnění kloubů, je spojován právě s tímto enzymem <sup>(1)</sup>.

## 1.2 Klonování druhé hexosaminidasy

Pod pojmem molekulové klonování si představujeme především pomnožení specifického (často cizorodého) fragmentu DNA v hostitelském organismu schopném jej efektivně několikanásobně namnožit a vytvářet identické kopie této DNA (klony). Pro klonování DNA *in vivo* je nejprve nutno vytvořit rekombinantní DNA, která sestává z klonovaného fragmentu a tzv. klonovacího vektoru. Klonovací vektor je genetický element, který je schopen samostatné reprodukce v hostitelském organismu, tj. musí být schopen autonomní replikace. Rekombinantní DNA je následně vnesena do buňky hostitele, kterým je nejčastěji bakterie *Escherichia coli* (kmen neprodukující restriční endonukleasy) kde je při růstu buněčné kultury DNA mnohonásobně replikována – klonována <sup>(9)</sup>. Komerčně jsou dostupné různé plasmidy vhodné ke klonování. Liší se použitím některých specifických sekvencí, ale princip je u všech velmi podobný. Každý plasmid obsahuje pro zajištění replikace sekvenci, kterou rozpoznává DNA-polymerasa hostitelské buňky. Tato sekvence se označuje jako *ori* (z *angl.* origin = začátek replikace). Dále obvykle obsahuje gen, který zajišťuje hostitelským buňkám, které plasmid uchovávají a množí, nějakou selekční výhodu v soutěži s hostitelskými buňkami, které plasmid

neobsahují. Nejčastěji se používají geny pro rezistenci k antibiotikům. Pro vložení cizí DNA technologií rekombinantní DNA pak geneticky upravené plasmidy obsahují tzv. mnohočetné klonovací místo, ve kterém lze plasmid rozštěpit (otevřít) mnoha různými restriktivními endonukleasami <sup>(10)</sup>. První plísňovou hexosaminidasou, jejíž gen byl klonován, byl enzym z *Aspergillus oryzae* <sup>(4)</sup>. V současné době byla v Laboratoři architektury proteinů klonována již druhá hexosaminidasa, a to z organismu *Penicillium oxalicum*. Srovnáním obou aminokyselinových sekvencí v oblastech propeptidu bylo zjištěno, že se skládají ze strukturně uspořádaných N- a C- terminálních částí, které jsou spojeny peptidovým linkerem (viz příloha 2).

### 1.3 Rekonstituce enzymové aktivity a její závislost na propeptidu

Jak bylo již zmíněno, plísňové  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy obsahují unikátní velký propeptid nekovalentně vázaný ke katalytické podjednotce, na rozdíl od lidské formy enzymu vázaného disulfidickými můstky. Přestože je vázán nekovalentně, spojení s katalytickou podjednotkou je za fyziologických podmínek velmi stabilní po celý život molekuly enzymu. Propeptid je nepostradatelný při aktivaci enzymu, dimerizaci a jeho sekreci. Spojení propeptidu s katalytickou podjednotkou je rychlé a specifické a předchází dimerizaci. S dimerem katalytické podjednotky je nekovalentně spojena buď jedna nebo dvě molekuly propeptidu. Z dostupných informací je tedy patrné, že propeptid plísňových hexosaminidas drží enzym v aktivním stavu a to ho činí odlišným od ostatních intramolekulárních chaperonů. Podobné vlastnosti bychom mohli nalézt pouze u propeptidu lidské hexosaminidasy B. Data získaná z enzymových rekonstitucí jasně naznačují, že propeptid hexosaminidasy musí být uvolněn ze zbytku polypeptidu, aby byl schopen podílet se na aktivaci enzymu. Toto chování je unikátní a zcela odlišné od propeptidů I. třídy, které zprostředkovávají sbalení polypeptidů, ke kterým zůstávají kovalentně připojeny. Je to individuální mechanismus, který dovoluje buňkám hub regulovat koncentraci propeptidu nezávisle na katalytické podjednotce <sup>(4)</sup>.

Dále u propeptidu dochází k *O*-glykosylaci (katalytická podjednotka podléhá *N*-glykosylaci). Při deglykosylačních pokusech byla dokázána nezbytnost *O*-glykosylace k dosažení plné enzymové aktivity. Katalytickou podjednotku lze od propeptidu separovat metodou HPLC v kyselém prostředí, ale pouze v přítomnosti propeptidu může být enzym

opět aktivní. Rekonstituční procesy ukazují, že spojení jedné katalytické podjednotky s jedním propeptidem dostačuje k dimerizaci enzymu, ale ve srovnání s komplexem vzniklým spojením katalytické podjednotky s oběma propeptidy, je specifická aktivita poloviční [Tab. 1] <sup>(5)</sup>.

Přídavek propeptidu	Analýza gelovou filtrací	Specifická aktivita (jednotka/ nmol katalytické podjednotky *)
neaktivní 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 ± 0,05

\* Aktivita byla změřena spektrometrickou metodou. Výsledek je vyjádřen jako střední naměřená hodnota ± směrodatná odchylka. Prováděla se tři na sobě nezávislá měření.

Tabulka 1

Rekonstituce enzymové aktivity  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy s použitím 1 nmol monomerní katalytické jednotky po jednogodinové inkubaci při pH 5.0.

## 1.4 Analýza glykosylace propeptidů plísňových hexosaminidas

Plísňové hexosaminidasy díky své struktuře podléhají glykosylaci, jedné z nejčastější kovalentní modifikaci bočního řetězce aminokyselin v nascentním polypeptidovém řetězci. Sacharidy jsou k polypeptidovému řetězci kovalentně připojeny buď *N*-glykosidovou vazbou přes volnou amidovou skupinu asparaginu <sup>(6)</sup>, který se navíc vyskytuje v tripletu asparagin, následovaný libovolnou aminokyselinou (pozice N+1) a hydroxykyselinou (pozice N+2). U savčích *N*-glykosylací vycházíme ze struktury – 2 *N*-acetylglukosaminy a 3 mannosy <sup>(11)</sup>. Nebo se může sacharid vázat *O*-glykosidovou vazbou na hydroxyskupinu threoninu nebo serinu <sup>(6)</sup>. U toho typu glykosylace se zatím žádná pravidla nepodařila nalézt, ale serin nebo threoninu může být nahrazen tyroxinem nebo hydroxyprolinem <sup>(11)</sup>. Deglykosylační experimenty odhalily, že *N*-glykosylace zvyšuje stabilitu a rozpustnost enzymu, naopak *O*-glykosylace propeptidu je nezbytná pro dosažení

plné enzymové aktivity <sup>(5)</sup>. *O*-glykosylace se většinou nevyskytuje na proteinu osamoceně, ale v určitých shlucích v oblastech bohatých na výskyt serinu nebo threoninu <sup>(11)</sup>.

Glykosylace má několik ochranných funkcí – brání hydrolytickému štěpení peptidových vazeb u bílkovin, působení nízkých či extrémně vysokých pH a ochraňuje proteiny před volnými radikály. U řady proteinů pomáhají sacharidy zaujmout správnou prostorovou strukturu, zajišťují dobrou rozpustnost, ovlivňují aktivitu, určují směřování uvnitř buňky a stabilizují proteiny uvolňované z buňky <sup>(11)</sup>.

Pokud jde o glykosylaci propeptidů plísňových hexosaminidas, detailně byly doposud analyzovány propeptidy izolované z hexosaminidas *A. oryzae* a *P. oxalicum*. Souhrn výsledků těchto analýz je uveden v příloze 2. Je patrné, že propeptid z *P. oxalicum* je pro studium glykosylace vhodnější, neboť ta je zde jednodušší oproti *A. oryzae*. Skládá se z jednoho *N*-glykosidicky vázaného sacharidového řetězce umístěného na Asp<sup>11</sup> a jednoho *O*-glykosidicky vázaného sacharidového řetězce umístěného na Ser<sup>66</sup> (viz příloha 2).

## 2. CÍLE PRÁCE

1. Příprava expresního vektoru pro rekombinantní produkci propeptidu hexosaminidasy a potvrzení jeho správnosti DNA sekvenováním.
2. Produkce a izolace fuzního proteinu obsahujícího ketosteroidisomerasu následovanou produkovaným propeptidem a C-terminální histidinovou kotvou.
3. Štěpení fuzního proteinu CNBr a izolace čistého propeptidu, potvrzení jeho identity a čistoty pomocí biochemických technik, N-terminálního sekvenování a hmotnostní spektrometrie MALDI.
4. Rekonstituční experimenty s hexosaminidasou z plísně *P. oxalicum*.

## 3. Materiál a chemikálie

### 3.1 Seznam použitých materiálů

#### 3.1.1 Chemikálie

4-nitrofenyl- $\beta$ -D-GlcNAc	Lachema, ČR
10 x koncentrovaný ligační pufr	New England Biolabs, USA
acetonitril	Merck, SRN
Agar	Oxoid, Anglie
Agarosa	Jersey Lab Supply, 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
Mannosa	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

### 3.1.2 Enzymy

Alkalická fosfatasa	Sigma, USA
Ribonukleasa A	Sigma, USA
Restrikční endonukleasa Xba I	New England Biolabs, USA
Restrikční endonukleasa Xho I	New England Biolabs, USA
Restriktasa Awn I	New England Biolabs, USA
T4 DNA polymerasa	New England Biolabs, USA

### 3.1.3 Biologický materiál

- Kompetentní buňky *Escherichia coli* Novagen, USA NovaBlue
- Produkční buňky *Escherichia coli* BL-21 Stratagene, USA (DE3) Gold
- Kmen *Penicillium oxalicum* CCF 3438

### 3.1.4 Vektory

pET 31b

Novagen, USA

### 3.1.5 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 7,5 ); 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 glycín, 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
- Sodnitrátový pufr

### 3.1.6 Použité materiály

- Automatické pipety Gilson, USA
- Automatický DNA sekvenátor ABI Prism 3100 Applied Biosystems, USA
- Bakteriální třepačka na Erlenmayerovy baňky Gallenkamp Ltd., UK
- bakteriální orbitální třepačka Bigger Bill Thermolyne, USA
- Centrifuga J2-21 Beckman Coulter, USA
- Centrifuga J-6M Beckman Coulter, USA
- Centrifuga stolní Spectrofuge 16M Edison, USA
- Dialyzační střeva Spectrum Laboratories, USA
- Hmotnostní spektrometr Biflex III Bruker (SRN)
- Hmotnostní spektrometr Biflex III Bruker, SRN
- Chladnička Whirpool, USA
- Chladnička Skandiluxe, Dánsko
- Kolona Vydac C-18 *Grace Vydac*, USA
- 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 odparka 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 Cole-Parmer Instrument Co., USA  
4710
- Vařič Eta, ČR
- Vortexový mixér VELP Scientifica, Itálie
- Zdroj deionizované vody Milli Q Millipore, USA
- Zdroj napětí EPS 500/400 Pharmacia, USA

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

### 3.2 Příprava insertu pomocí PCR amplifikace

Insert odpovídající celému propeptidu hexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* (viz. příloha 1, modře vyznačená část) je příliš dlouhý, aby mohl být vytvořen ligací syntetického oligonukleotidu. Na druhé straně je možné použít techniky PCR amplifikace s použitím specifických koncových primerů. V tom případě je ovšem třeba navrhnout kromě amplifikačního protokolu též techniku ligace do produkčního vektoru. V mém případě se jednalo o komerčně dostupný vektor pET31b od firmy NovaGen (Obr. 4). Vzhledem k tomu, že restriční enzym AlwN I používaný pro otevření (linearizaci) produkčního vektoru zanechává trojbázový 3' překryv, je možno tento překryv odstranit a amplifikovaný insert ligovat do takto připraveného vektoru „natupo“. Této situaci je potom třeba přizpůsobit jak navrhované primery, do nichž je třeba odštěpený trinukleotid ATG kódující aminokyselinu Met na začátku a na konci sekvence propeptidu přidat. Byl tedy použit forward primer 5'-ATG GTC AAG GTG AAT CCC TTG CCC GCA CCT-3' a reverse primer 5'-CAT CAC CTG GTC CGC AGG GGT CGG AAT-3'. Pomocí těchto dvou primerů a genomové DNA z *Penicillium oxalicum* CCF 3438 byl amplifikován DNA fragment o délce 240 párů bazí, jehož délka byla prověřena agarosovou elektroforesou. Směs po PCR amplifikaci byla jedenkrát extrahována fenolem a chloroformem, a poté byla DNA precipitována ethanolem v prostředí acetátového pufru <sup>(12)</sup>, promyta 70 % ethanolem, a vysušena pod vakuem.



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.

### 3.4 Příprava plasmidové DNA metodou „Easyrep“ a její restriční analýza

Kolonie buněk *Escherichia coli* rezistentní na ampicilin byly přeneseny do 1 ml kapalného média LB s 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>(13)</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. Restriční štěpení probíhalo 1 h při 37 °C, a bylo ukončeno přidáním 3 µl vzorkového pufru pro agarosovou gelovou elektroforesu. Výsledek restričního štěpení byl poté analyzován elektroforesou na 1 % agarosovém gelu.

### 3.5 Příprava čisté plasmidové DNA metodou „Maxiprep“

Byl použit standardní protokol pro přípravu velkých množství plasmidové DNA <sup>(12)</sup> v modifikaci publikované ve firemním manuálu firmy Promega <sup>(14)</sup>, a to v níže uvedené modifikaci. 2 ml kapalné kultury bylo zaočkováno 200 ml média LB a 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 2000 xg 20 minut při 4°C. Médium bylo vyhozeno a usazené bakterie byly resuspendovány ve 20 ml roztoku I s glukosou <sup>(12)</sup> a přeneseny do 30 ml centrifugačních kyvet. Následovala alkalická lýza a extrakce plasmidové DNA podle publikovaného standardního protokolu <sup>(12)</sup>. Směs sražené RNA a plasmidové DNA byla štěpena ribonukleasou A a plasmidová DNA selektivně srážena pomocí polyethylenglykolu 8000 <sup>(14)</sup>. Takto získaná plasmidová DNA byla rozpuštěna v roztoku TE <sup>(12)</sup>, extrahována fenolem a chloroformem, precipitována ethanolem a promyta 70 % ethanolem. Poté byla rozpuštěna v 50 µl roztoku TE. Koncentrace a čistota plasmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky <sup>(12)</sup>. Nakonec byla koncentrace

plasmidové DNA upravena na hodnotu 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , a vzorky plasmidů byly zmrazeny a uchovávány pro další použití při  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.6 DNA sekvenování

Po identifikaci pozitivních klonů obsahujících EcoR I insert správné délky byly bakteriální buňky *Escherichia coli* kmene NovaBlue transformované příslušným plasmidem rozetřeny na čerstvou misku obsahující médium LB a ampicilin (150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a miska byla inkubována přes noc při  $37^\circ\text{C}$ . 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).

### 3.7 Produkce fuzního proteinu

Pro produkci fuzního proteinu ketosteroidisomerasa – Met –propeptid –Met – histidinová kotva byl sekvenovaný plasmid transformován do produkčního bakteriálního kmene *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Gold, pozitivní transformanty byly opět selektovány na agarové misce s médiem LB, ampicilinem a tetracyklinem. Kolonie byly poté očkovány do 100 ml kapalného média stejného složení a byla připravena startovní kultura inkubací přes noc při  $37^\circ\text{C}$ . 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. V odebíraných 1 ml vzorcích byla měřena optická hustota při 550 nm. Jakmile dostupila 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 xg asi 30 minut. Fuzní protein byl poté připraven podle publikovaného postupu <sup>(16,17)</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.

### *3.8 Štěpení fuzního proteinu a izolace cílového peptidu*

Tato část práce byla provedena podle dostupné literatury <sup>(15,16)</sup>. 100 mg suchého fuzního proteinu bylo rozpuštěno v 950 µl 70 % kyseliny mravenčí, a poté byl přidán stonásobný molární nadbytek CNBr rozpuštěný v 50 µl acetonitrilu. Reakční směs byla umístěna do temna. Reakce probíhala 24 h při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce. Odpařený CNBr zachycený ve vymrazovačce byl likvidován pomocí nasyceného roztoku KMnO<sub>4</sub>. 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 ekvilibrovanou 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.

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

Analýzy byla 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).

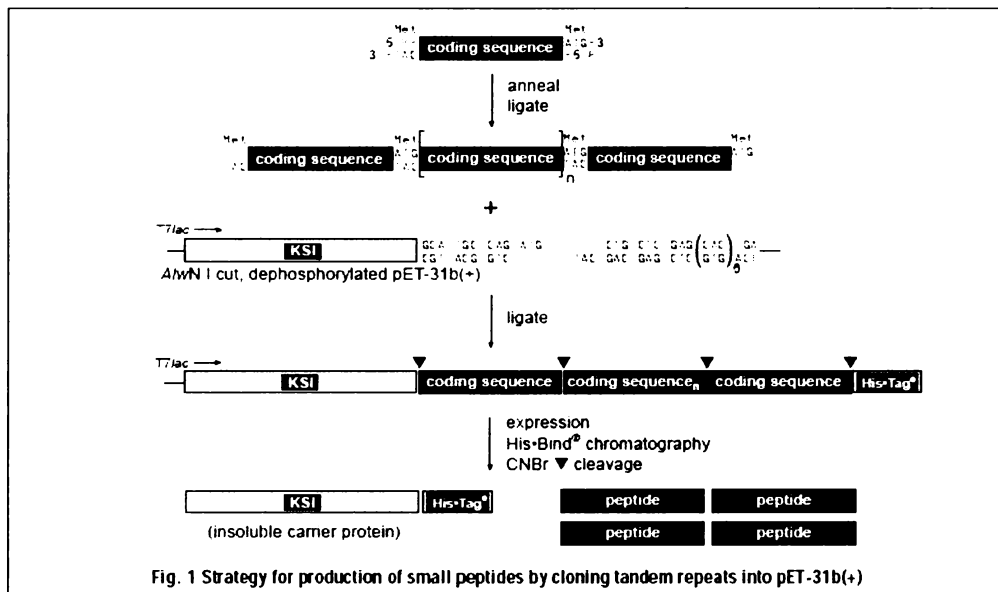
### 3.10 Rekonstituční experimenty

Do mikrotitrační destičky s jamkami s kulatým dnem pipetujeme 30  $\mu\text{l}$  50 mM sodno citrátového pufru pH 5.0, 10  $\mu\text{l}$  roztoku testované látky ve vodě, a nakonec 10  $\mu\text{l}$  roztoku katalytické podjednotky hexosaminidasy ve 4 M močovíně a 50 mM sodno citrátového pufru pH 5.0. Po smíchání všech komponent inkubujeme destičku 1 h při 4°C v lednici, a poté přeneseme všech 50  $\mu\text{l}$  směsi do jamek mikrotitrační destičky s plochým dnem a přidáme 50  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  2 M roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Změříme hodnoty absorpance při 400 nm. Aktivitu v jednotlivých experimentech vyjadřujeme jako procento aktivity v kontrolních jamkách obsahující nativní propeptid hexosaminidasy.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Návrh expresních oligonukleotidů a příprava expresního vektoru

Pro bakteriální expresi peptidů a menších proteinů do celkové délky cca 100 aminokyselin doporučuje firma NovaGen, jeden z hlavních dodavatelů bakteriálních expresních systémů, použít expresní systém založený na vektoru pET31b. Strategie experimentu je uvedena na obrázku 5 převzatém z firemní literatury. Rozštěpením produkčního vektoru restriční endonukleasou *AlwN I* dojde k linearizaci plasmidové DNA za současné tvorby 3'-jednovláknového překryvu ATG, který kóduje aminokyselinu methionin umístěnou ve správném čtecím rámci za genem pro enzym ketosteroidisomerasu (hojně produkovaný bakteriální protein). Cílový produkovaný peptid je do linearizovaného vektoru většinou zanesen jako DNA insert obsahující požadovanou sekvenci aminokyselin ohraničenou na obou koncích též ATG methioninovým kodonem. Takovým postupem připravíme souvislý DNA fragment, v němž sekvence kodující ketosteroidisomerasu je následována jednou nebo několika sekvencemi produkovaného peptidu oddělenými mezi sebou na obou stranách methioninovým zbytkem a dále C-terminální histidinovou kotvou nezbytnou pro izolaci fuzního proteinu.



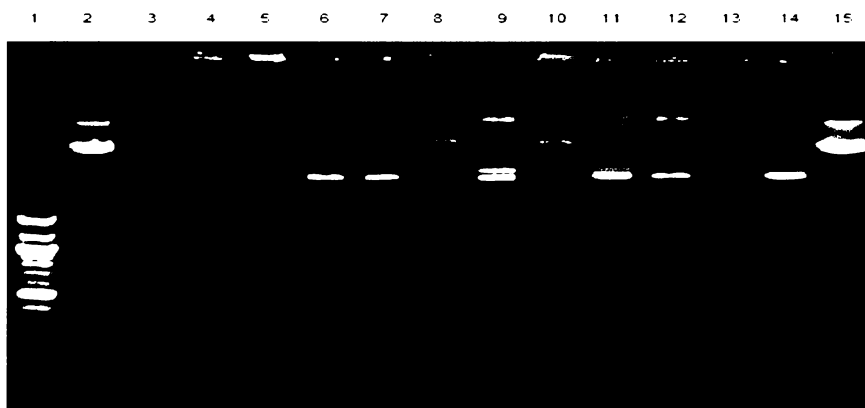
Obrázek 5

Strategie produkce krátkých peptidových sekvencí s použitím expresního vektoru pET31b linearizovaného restriční endonukleasou AlwNI.

Prvním krokem pro získání expresního vektoru produkujícího N-terminální nonadekapeptid plísňové hexosaminidasy *Penicillium oxalicum* CCF 3438 je návrh a syntéza obou oligonukleotidů, které zahrnovaly sekvenci charakteristickou pro N-terminální a C-terminální sekvenci celého propeptidu o délce 80 aminokyselin. K těmto aminokyselinám propeptidu byly ještě přidány oba methioninové zbytky, přičemž třínukleotidová extenze kódující tuto aminokyselinu byla přidána na 5' konec obou použitých nukleotidů. Takové uspořádání zajišťuje, že se methionin nezbytný pro vyštěpení propeptidové sekvence bude opravdu nacházet po obou stranách (v sekvenci se nevyskytuje žádný interní methioninový zbytek).

#### 4.2 Ligace, transformace, selekce transformantů, příprava plasmidu a sekvenování

Insert kodující propeptid byl amplifikován pomocí DNA polymerasy Deep Vent a poté natupo ligován do vektoru pET31b, který byl linearizován restriktasou AlwN I, z něhož byly jednovláknové překryvy odstraněny. 12 rezistentních kolonií bylo podrobena restriční analýze s použitím restričních endonukleas Xba I a Xho I, zásahová místa pro tyto enzymy se nacházejí po obou stranách AlwN I místa. Pokud tedy byl insert opravdu do tohoto místa ligován, musí dojít k prodloužení délky Xba I / Xho I restričního fragmentu o tuto velikost, což by mělo být na gelu dobře pozorovatelné ve srovnání s kontrolním štěpením samotného vektoru. Výsledek (Obr. 6) ukazuje, že v daném případě bylo obtížné insert pozorovat, pravděpodobně proto, že ho vzniklo pouze malé množství. Proto byly vybrány 4 klony se správnou velikostí vektoru (klony číslo 1, 2, 3 a 6), které byly namnoženy na větším objemu živného média a použity pro preparativní přípravu plasmidové DNA.



Obrázek 6

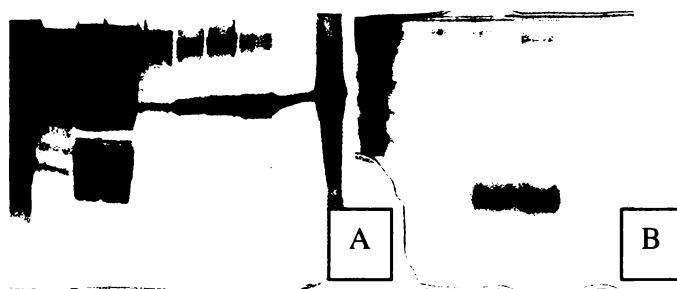
Výsledek restričního štěpení plasmidové DNA izolované z 12 bakteriálních kolonií transformovaných ligační směsí. V dráze 2 a 15 je uvedeno kontrolní štěpení samotného vektoru, v dráze 3,4, 5 a 8 úspěšný klon, v dráze 6,7,9, 11-13 neúspěšné.

Bakteriální kultura obsahující úspěšně nakombinovaný klon byla namnožena ve 200 ml kapalného média a použita pro přípravu plasmidové DNA ve větším množství. Plasmidy ze čtyř produkčních klonů byly získány ve vysokém množství (cca 100 µg) a čistotě. Plasmid označený pPROP01 byl sekvenován v DNA sekvenační laboratoři na Mikrobiologickém ústavu vedené dr. Jurgenem Felsbergem. Výsledek této sekvenace je

uveden v příloze 3 ve formě originálního elektroforeogramu, jehož zobrazení je kritické pro posouzení kvality získané sekvence. Na počátku získané sekvence se vyskytly určité technické problémy, je nicméně dobře čitelné (v pozici 95) restriční místo pro enzym Nde I, které zároveň definuje iniciační methionin ATG. Poté následuje sekvence 315 pb definující 105 aminokyselin nosičové ketosteroidisomerasy, tato sekvence je ukončená dalším methioninem definovaným ATG v poloze 475 (znázorněno čarou přes chromatogram). Poté následuje sekvence 80 požadovaných aminokyselin ukončená opět methioninem, celý usek je tedy 240 nukleotidů dlouhý. Na úplném konci sekvence se nalézá histidinová kotva – jedná se o sekvenci 6 histidylových zbytků CAC-CAC-CAC-CAC-CAC-CAC následovaná stop kodonem (TGA), v tomto místě sekvence produkovaného fuzního proteinu končí. DNA sekvenování tedy ukázalo, že se mezi sekvenci nosičové ketosteroidisomerasy a sekvenci histidinové kotvy podařilo oligonukleotidovou sekvenci definující požadovaný peptid ligovat jednou. Podařilo se tak připravit DNA insert kódující fuzní protein se strukturou ketosteroidisomerasa – Met – propeptid – Met – histidinová kotva.

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

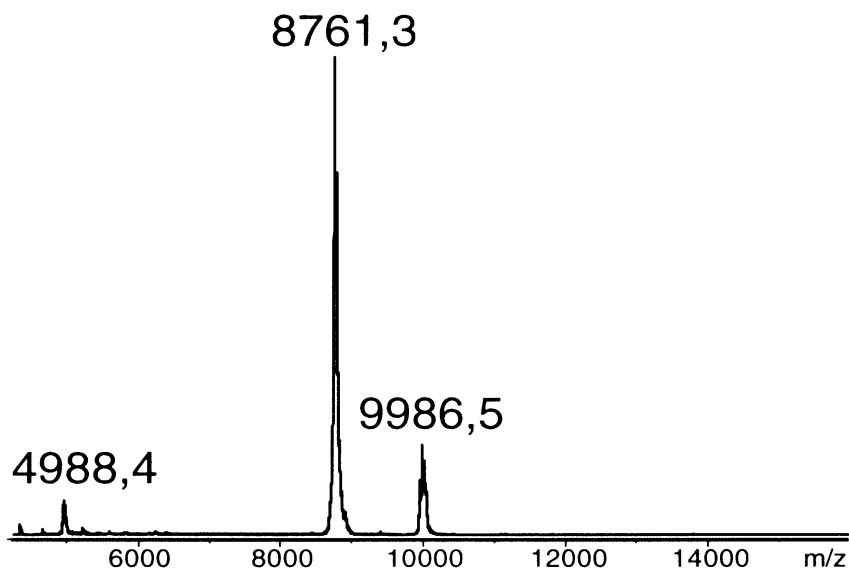
Sekvenovaný produkční plasmid pPROP01 byl transformován do produkčního bakteriálního kmene *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Gold (Stratagene) a byla provedena produkce, jejíž výsledek je znázorněn (Obr. 7). V dráze číslo 3 je jasně viditelný indukova-



Obrázek 7

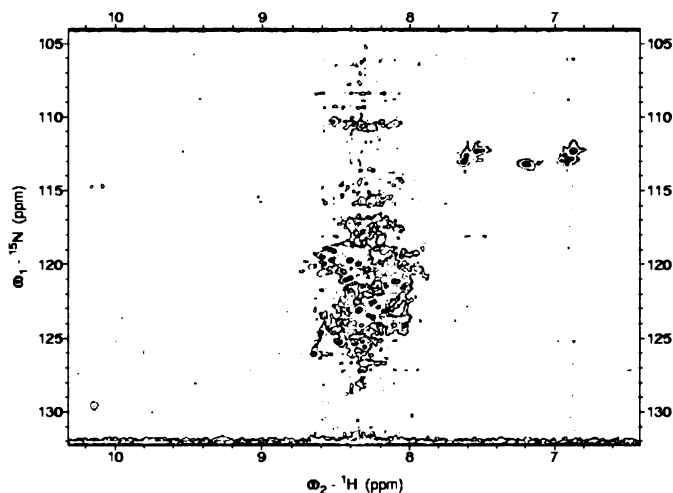
Produkce propeptidu v bakteriálních buňkách. V obrázku (A) je vidět produkce proteinu v bakteriálních buňkách a jeho purifikace chelatační chromatografií. V obrázku (B) je SDS elektroforesa peptidu purifikovaného na koloně s obrácenou fází. Tato analýza musela být prováděna na 17.5 % polyakrylamidovém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

ný protein, který se podařilo účinně purifikovat afinitní chromatografií za denaturujících podmínek. Po štěpení fuzního proteinu CNBr a separaci jeho jednotlivých komponent chromatografií na obrácené fázi s butylovým zbytkem (kolona Vydac C-4) se podařilo velmi účinně purifikovat vlastní propeptid, jak je patrné z výsledku SDS elektroforesy na velmi hustém polyakrylamidovém gelu (Obr. 7b). Po separaci SDS elektroforesou byl také produkovaný propeptid elektropřenosem přenesen na PVDF membránu a takto přenesený protein byl analyzován v proteinovém sekvenátoru. Bylo provedeno 10 cyklů Emanova odbourávání a identifikace PTH-aminokyselin v jednotlivých cyklech poskytlo očekávanou sekvenci VKVNPLPAP(R). Dále byla měřena hmotnostní spektrometrií MALDI v lineárním režimu celková hmota purifikovaného peptidu. Při těchto přesných měřeních je třeba uvážit, že během štěpení polypeptidového řetězce pomocí CNBr je chemickou reakcí koncová aminokyselina methionin přeměněna na aminokyselinu homoserin (tj. odštěpuje se koncová  $\text{CH}_3$  -S- skupina, která je nahrazena OH-skupinou), který se navíc v kyselém reakčním prostředí laktonizuje na lakton homoserinu. Teoretická molekulová hmotnost celého propeptidu je v laktonizované podobě 8741,8, po otevření kruhu 8759,8. Měření hmotnostní spektrometrií MALDI poskytla hodnotu 8761,3 (obr. 8), což indikuje, že se propeptid vyskytuje v podobě nereaktivní decyklizované formy.



Obrázek 8

MALDI spektrum propeptidu hexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* měřené v lineárním režimu. Dominantní pík při m/z 8761,3 přísluší decyklizované formě látky.



Obrázek 9

Dvojměrné  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum značeného propeptidu. Spektrum bylo změřeno na 600 MHz NMR spektrometru s kryosondou s použitím 0.4 ml 1 mM roztoku propeptidu rozpuštěného v 10 mM fosfátovém pufru o pH 3.8.

Další velmi důležitou výzkumnou otázkou je rozpustnost bakteriálního neglykosylovaného peptidu za různých chemických podmínek. Důležitá tedy byla zejména rozpustnost při hodnotě pH odpovídající pH optimu celého enzymu hexosaminidasy, což je asi kolem 5.0. Vzhledem k tomu, že v průběhu separace se s propeptidem vždy pracovalo v kyselém prostředí, kdy je vysoce rozpustný, bylo nejprve 8 mg čistého propeptidu rozpuštěno v 1 ml 10 mM kyseliny fosforečné, za těchto podmínek se propeptid dobře rozpustil na cca 1 mM roztok o pH cca 2.5. Poté byl tento roztok titrován hydroxidem sodným na cílovou hodnotu pH 5.0, při níž ovšem došlo téměř ke kvantitativní precipitaci. Dalším zvyšováním hodnoty pH se sraženina opět začala rozpouštět, takže při pH 9.0 byl propeptid již opět rozpustný. Vzhledem k tomu, že alkalické podmínky nejsou výhodné pro měření NMR spekter, byl poté roztok ještě titrován zpět kyselinou fosforečnou, přičemž při pH 4.0 opět došlo ke kvantitativnímu rozpuštění. Tento vzorek byl poté použit pro měření spekter NMR. Tato měření (obr. 9) ukázala, že propeptid je pravděpodobně za daných chemických podmínek neposkládaný, poskládaná může být maximálně jeho určitá část. Je možné například pozorovat pouze jeden charakteristický pík bočních řetězců tryptofanů (levá spodní část spektra), ačkoliv u poskládaného propeptidu by se zde měly nacházet 4 signály. Totéž platí i pro signály náležející aminokyselinám asparaginu a glutaminu (v pravé horní části spektra), které jsou všechny shluknuty do velice malého prostoru, a

rozhodně není možné odlišit 8 dvojic těchto aminokyselin. Vzhledem k vysokému obsahu prolinu by mělo být vidět 67 N-H korelací, po sečtení je jich však vidět pouze 40.

#### 4.4 Seznam látek použitých pro rekonstituci enzymové aktivity

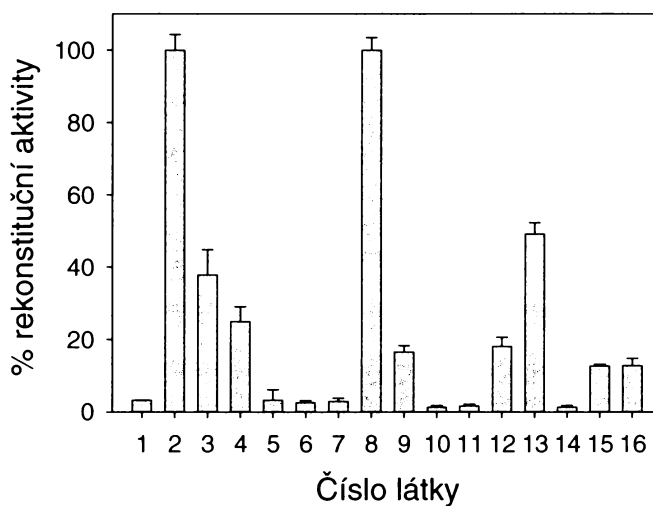
Seznam všech látek použitých pro rekonstituci enzymové aktivity je uvedený v tabulce 2. Experiment jsem prováděla společně s kolegyní Miloslavou Vítovcovou, s ní jsem též sdílela některé použité látky. Výběr látek byl proveden na základě předcházejících rekonstitučních experimentů<sup>(1,2,6)</sup>. Jako negativní kontrola byl vzat použitý citrátový pufr, jako pozitivní kontrola pak přirozený propeptid izolovaný ze stejného zdroje jako katalytická podjednotka. Neglykosylovaný propeptid produkovaný bakterií *Escherichia coli* byl též použit jako negativní kontrola, protože mívá v rekonstitučních experimentech velmi nízkou aktivitu. Dále jsem zkoušela rekonstituovat aktivitu propeptidů hexosaminidas z jiných blízce příbuzných enzymů, a to glykosylovaných i neglykosylovaných. Další experimenty byly poté prováděny s propeptidy připravenými právě kolegyní Vítovcovou, kdy byly do různých pozic propeptidu vnášeny mutací cysteinové zbytky, které byly následně použity pro glykosylaci *in vitro*.

<b>Tabulka 2. Popis látek používaných v nekonstitučních experimentech s plísníovou hexosaminidasou z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF3438.</b>		
Číslo látky	Chemické složení	Původ a analýza
1	Citrátový pufr (negativní kontrola)	
2	Nativní propeptid z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF3438	Isolace <sup>4</sup>
3	Nativní propeptid z <i>Aspergillus oryzae</i> CCF1066	Isolace <sup>4</sup>
4	Nativní propeptid z <i>Talaromyces flavus</i>	H. Kroupová <sup>18</sup>
5	Neglykosylovaný propeptid z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF3438, produkovaný v <i>Escherichia coli</i>	Tato práce
6	Neglykosylovaný propeptid z <i>Aspergillus oryzae</i>	O. Plíhal <sup>4</sup>
7	Neglykosylovaný propeptid z <i>Talaromyces flavus</i>	K. Bezouška <sup>19</sup>
8	Nativní propeptid z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF3438	Isolace <sup>4</sup>
9	Rekombinantní propeptid, Asn <sup>11</sup> - GlcNAc	M. Vítovcová <sup>20</sup>
10	Rekombinantní propeptid Asn <sup>11</sup> - Man	M. Vítovcová <sup>20</sup>
11	Rekombinantní propeptid Ser <sup>66</sup> - GlcNAc	M. Vítovcová <sup>20</sup>
12	Rekombinantní propeptid Ser <sup>66</sup> - Man	M. Vítovcová <sup>20</sup>
13	Rekomb. propeptid Asn <sup>11</sup> -GlcNAc Ser <sup>66</sup> -Man	M. Vítovcová <sup>20</sup>
14	Rekomb. propeptid Asn <sup>11</sup> -Man Ser <sup>66</sup> -GlcNAc	M. Vítovcová <sup>20</sup>
15	Rekomb. propeptid Asn <sup>11</sup> -GlcNAc Ser <sup>66</sup> -GlcNAc	M. Vítovcová <sup>20</sup>
16	Rekomb. propeptid Asn <sup>11</sup> -Man Ser <sup>66</sup> -Man	M. Vítovcová <sup>20</sup>

#### 4.5 Rekonstituce enzymové aktivity

Výsledky rekonstitučních aktivit jsou uvedeny na obrázku 10. Bez přítomnosti propeptidu k rekonstituci enzymové aktivity nedochází. 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 obsahují aminokyselinovou sekvenci z identické hexosaminidas (vzorek

4), 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 vzorky 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 10

Rekonstituční aktivity použitých látek sledované v hexosaminidasovém rekonstitučním systému. Úroveň rekonstrukce dosahovaná pomocí přirozeného propeptidu 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. Proto bylo velmi zajímavé sledovat rozpustnost za různých podmínek u neglykosylované varianty propeptidu produkované v bakterii *Escherichia coli*.

Při rekonstituci enzymové aktivity jsem měřila rekonstituční aktivitu různých látek (viz. tabulka 2). Z obrázku 10 je patrné, že nejvyšší rekonstituční aktivity dosahuje nativní propeptid z *Penicillium oxalicum*, a proto jsem právě tuto rekonstituční aktivitu brala jako 100 %. Zajímavé je, že nativní propeptid z *Aspergillus oryzae* dosahoval asi 40 % rekonstituční aktivity *Penicillia oxalica* a nativní propeptid z *Talaromyces Flavus* dokonce ještě o něco méně ( okolo 30 % rekonstituční aktivity), i když se jedná o velice příbuzné druhy. Naopak u rekombinantního propeptidu se správným umístěním obou sacharidových zbytků, jak mannosy, tak *N*-acetylglukosaminu (přirozená situace), dosahuje aktivita 50 %, což je ze všech měřených látek rekonstituční aktivita nejvyšší (vzorek 13). Je-li k rekombinantnímu propeptidu připojen jeden sacharidový zbytek ve správné poloze, dosahuje rekonstituční aktivita pouze 20 % (vzorek 9 a 12). Umístíme-li na polypeptidový řetězec propeptidu dva sacharidové zbytky, ale jen jeden do správné polohy, dosahuje rekonstituční aktivita také téměř 20 %, což je ale méně, než u rekombinantního propeptidu s jedním, ale správně umístěným sacharidovým zbytkem. Lze tedy říci, že špatně umístěný sacharidový zbytek rekonstituční aktivitu ještě snižuje (vzorek 15 a 16). U vzorku 10 a 11 jsou oba sacharidové zbytky umístěné v nesprávné poloze, a proto je rekonstituční aktivita velmi nízká, stejně jako u všech neglykosylovaných propeptidů (vzorek 5,6,7).

Při rekonstituci enzymové aktivity jsem došla k závěru, že glykosylace propeptidu je zcela nezbytná pro jeho rekonstituční aktivitu. U různých druhů hexosaminidas dosahuje různých hodnot, i když jsou tyto druhy velice příbuzné. Dále rekonstituční aktivita závisí, zda jsou sacharidové zbytky umístěny ve správné poloze na polypeptidovém řetězci

propeptidu. K dosažení rekonstituční aktivity postačuje navázání i jediného sacharidového zbytku, ovšem ve správné poloze.

## 6. SOUHRN VÝSLEDKŮ

Cílem práce bylo připravit expresní vektor pro produkci propeptidu hexosaminidasy, produkovat a izolovat fuzní protein, následně fuzní protein štěpit CNBr, izolovat čistý propeptid a jeho identitu potvrdit biochemickými metodami. Závěrem byly provedeny rekonstituční experimenty s hexosaminidasou z plísně *P. oxalicum*.

- Do rozštěpeného a linearizovaného produkčního vektoru byl zanesen DNA insert o požadované sekvenci aminokyselin, na každé straně ohraničené ATG methioninovými kodony, ketosteroidisomerasou a histidinovou kotvou.
- Ligační směs byla přidána ke kompetentním buňkám *Escherichia Coli* kmene NovaBlu.
- 12 rezistentních kolonií bylo podrobena restričnímu štěpení a z nich byly vybrány 4 kolonie o správné velikosti vektoru, které byly namnoženy ve větším objemu živného média a použity pro preparativní přípravu plasmidové DNA.
- Produkční plazmid označený pPROP01 byl transformován do produkčních bakterií *Escherichia Coli* kmene BL-21 Gold a provedla se produkce.
- Produkovaný fuzní protein se štěpil CNBr a chromatografií s obrácenou fází se podařilo separovat a purifikovat propeptid.
- Molekulová hmotnost celého propeptidu byla spektrometrií MALDI stanovena na 8761.3. Tento výsledek přísluší decyklizované formě látky.
- Výsledky rekonstituce enzymové aktivity dokázaly, že bez přítomnosti propeptidu k rekonstituci nedochází, naopak v přítomnosti přirozené formy propeptidu ano. Dokázalo se, že glykosylace propeptidu je tedy nezbytná pro náležitou rekonstituční aktivitu.

## 7. POUŽITÁ 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. Yamamoto, K., Lee, K.M., Kumagai, H., Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem* **49**, 611-619 (1985). Purification and Charakterization  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum*.
3. Rüdiger, E., Kopecký, 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 Struc. Biol.* **7**:32 (2007). Structure of the dimeric *N*-glykosylated form of fungal  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase revealed by computer modeling, vibrational spektroskopie, and biochemical studies.
4. Plíhal, O., Sklenář, J., Hofbauerová, K., Novák, 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.
5. Plíhal, O., Sklenář, J., Kmoníčková, J., Man, P., Pompach, P., Havlíček, V., Křen, V., Bezouška, K.: *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 764-765 (2004). *N*-glykosylated catalytic unit meets *O*-glykosylated propeptide: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase.
6. Kolektiv: *Biochemie*, skriptum PřF UK Praha, str. 86 (2005).
7. Sinnott, M.L.: *Chem. Rev.* **90**, 1171-1202 (1990). Catalytic mechanism of enzymatic glycosyl transfer.
8. Mark, B.L., Vocadlo, D.J., Knapp, S., Triggs-Raine, B.L., Wither, S.G., James, M.N.: *J. Biol. Chem.* **276**, 10330-10337 (2001). Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in bacterial  $\beta$ -Hexosaminidase.
9. <http://www.otevrena-veda.cz/ov/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/1kotrba.pdf> (staženo 15.5.2008). Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha: Izolace, klonování a analýza DNA.
10. <http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani%20DNA.htm> (staženo 15.5.2008).

11. Man, P., Bezouška, K.: Chem. Listy 100, 1084-1095 (2006). Současné trendy v analýze eukaryotických proteinů, glykolů a lipidomů.
12. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
13. Berghammer, H., Auer, B.: Biotechniques 14, 524-528 (1993). „Easypreps“: fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *Escherichia coli*.
14. Promega Protocols and Applications Guide, 2. vydání, Promega Corporation (1991)
15. Kuliopulos, A., Walsh, C.T.: J. Am. Chem. Soc. 116, 4599-4607 (1994). Production, purification, and cleavage of tandem repeats of recombinant peptides.
16. 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.
17. Kuliopulos, A., Shortle, D., Talalay, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8893-8897 (1987). Isolation and sequencing of the gene encoding  $\Delta^5$ -3-ketosteroid isomerase from *Pseudomonas testosteroni*: overexpression of the protein.
18. Kroupová, H., vypsáno z bakalářské práce, katedra biochemie UK PĚF 2008.
19. Bezouška, K., osobní sdělení.
20. Vítovcová, M., vypsáno z bakalářské práce, katedra biochemie UK PĚF 2008.

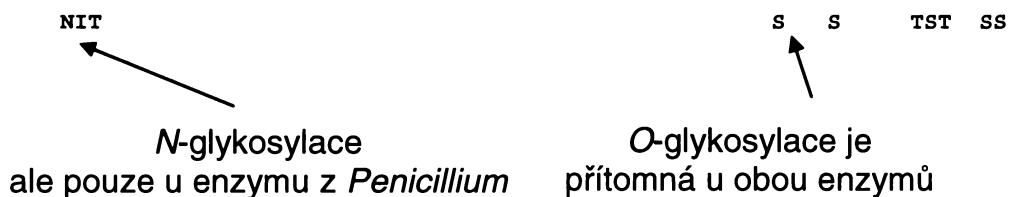
**Příloha 1. Úplná nukleotidová a aminokyselinová sekvence hexosamniidasy z vláknité houby *Penicillium oxalicum* kmene CCF 3438.**

CCAATTCATATTCTCGATGGGGTTTGGAAAGGTCATCAAATTCCCAGTGATCATTGCGCTACCCGTCTGGCCCTCC  
GCCAAATATTGCGTCTTGGGCATCGTTTGAAGTCCCGTATCTCGAAGATGGCAGACACGAAAACGAGCCTTATGGC  
CAGAGGCCTTGAAACAGCACTATTTCAATTCAGCATCAAGACACACGTCCACCTTGAATGGACGTCCCGTATCTTTCT  
GTGAGCATGCGACAGGATCCAGTACCTTTAAATAGGTCGGCTCACCTCGCTGCTTCATAAATGGCCCGTTCTCTTC  
CACTCTCCCGTACTCACCTCTCACTTTCTCTGATCGTGCTCGACTGATTACGACTTGGGTTTTCTACCTTCAGC  
**ATGAAGTGTACCGCCTTGTTTGGTGGCTTGGCGCTTCCGCCTCGTAGCCACGGCCGTCAAGGTGAATCCCTTGCCC**  
**M K C T A L F G 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  
GGCCAGAACCAAGATATCTGCACCACGCCTGGGATCGGACGTGGGCCACCATCACCAACCTCGAATGGGTGCCCGCC  
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  
GCTATCGAGGCGCCGATTCCCTCATTCCGACCATTTCCGACCCTGCGGACCAGGTGAAGCGTGACACCGCCGCGACC  
A I E A P I P S F R E P F P T P A D Q V K R D T A A T  
GCCATTCACTCCGTGCACCTGTCCGTCGATGCGGCTGCAGACCTGCAGCACGGGGTGGACGAGTCTTATACCTTG  
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  
GAGGTCACTGCCACTCGGCACCATCCAGATTCATGCCAGACCGTGTGGGGTGGATTGATGCCATGACCACCTTG  
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  
CAGCAGCTGGTATTACGGATGGCCATGGGAACCTGATCATTGAACAGCCCGTCAAGATTGAGGATGCTCCGCTGTAT  
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  
CCCTACCGGGGTATCATGATCGATACGGGACGAAACTTCACTCTGTCCCGAAGATCCTCGAGCAGATTGACGGCATG  
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  
GCCTCTCCAAACTCAATGTGCTGCATTGGCATCTGGATGATACCCAATCGTGGCCCGTTGAGATTCCGGTCGTATCCT  
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  
CAGATGACCAAGGACGCTACTCGAGCCGTGAATCTACACCGAGACCGACCTCCGCGGTTCTGGCCATGACACGT  
Q M T K D A Y S F R E I Y T E T D L R R V L A Y A R  
GCGCGTGGCGTCCGCGTATTCCAGAGGTCGACATGCCGGGCCACTCAGCCTCCGGGTGGAACAAGTCGATCCGGAC  
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  
GTGGTGACCTGCACCGATACATGGTGGTCCAACGATGACTGGCCCAAGCACACCGCGTGGAGCCTAACCCCGGGCAG  
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  
TTGCACATCATCAACAAGACCTATGAAGTTGTGGGCAACGCTCTACAAAGATCTGTGCCCATCTTCAGGCAACAAC  
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  
TGGTTCCACGTGGGTGGCGACGAGCTTCAGAACAATTGTTTCAATTTCACTACCCACATACCAAGTGGTTCGCGGAG  
W F H V G G D E L Q N N C F N F S T H I T K W F A E  
GATCCCTCGGAACCTACAACGACCTGTCTCAGTACTGGTGGACCACGCTTTGCCCATCTTTACGGAACCCGGAGGC  
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  
CCCAGCGTCGCTGATGATGTTGGGAAGATATCTTCACTCAACACGACGCTGCTCATCACGTTCCGAGGGACATTGTG  
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  
ATGCAGTCTGGAACAATGGTATCGACAATATCAAGAATTTGACCGCAAGCGGATTCGACGTGGTCTCTCTCAGCC  
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  
GACTTCCTTTATCTCGACTGCGGCTTTGCGGGCTTTGTGGGCAACGATCCCCGATACAACGTGATGAGCAACCCCGGG  
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  
GGTGTGATGTCACCTTCAACTACGGCGGTAGCGGTGGTTCCTGGTGCAGCGCCTTACAAGTCCGGCAACGTATCTACGAC  
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  
TAGACTTCACCACCAACCTCACTGCATCGGAAGCGAAGCACGTATCGGTGCCGAGGCTCCCTGTGGTGGGAACAG  
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  
GTCGATGATGTTACCATTTCCAGCAAGATGTGGCCTCGAGCGGCCGCTCTCGGCGAATTGGTGTGGTCAGGCAACCGA  
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  
GACGCTTCTGGCCACAAGCGTACCACCCAGCTCACACAGCCCTGTTGAACTTCCGCGAGTATCTGGTTGCCAATGGC  
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  
GTCATGGCCACCAACCTGGCGCCAAAGTACTGCTTGCAGCATCCCCATGCGTGCAGTCTGTACTACAACCAGAGTGTA  
V M A T N L A P K Y C L Q H P H A C D L Y Y N Q S V  
ATCACACCTTGAGTGGGAACTTGATGTCTTGAATTCGAGGACTCGTTGGCGGCATTGATGGTGGTGCATTCTTTTT  
I T P \*\*\*  
CCCCCGGAGGACATTCAAATAGCCAATGCGGGCATCGTGCATCTGTGCTGTGACTGTTGATTGTTACTCTCTGTTTT  
G

**Příloha 2 – Srovnání aminokyselinových sekvencí a glykosylace u propeptidů izolovaných z plísňových hexosaminidas získaných ze sbírkových kmenů *Aspergillus oryzae* CCF1066, a *Penicillium oxalicum* CCF3438, a výsledek analýzy glykosylace těchto propeptidů.**

**a) sekvenční podobnost obou propeptidů a jejich schéma**

VGVNPLPAPREISWGSSGPKSIAGELQLRTDSDSADGIVADAWNRAWETIVALRWVPAATEAPISSFFEPFPPTAGAS



19 aminokyselin

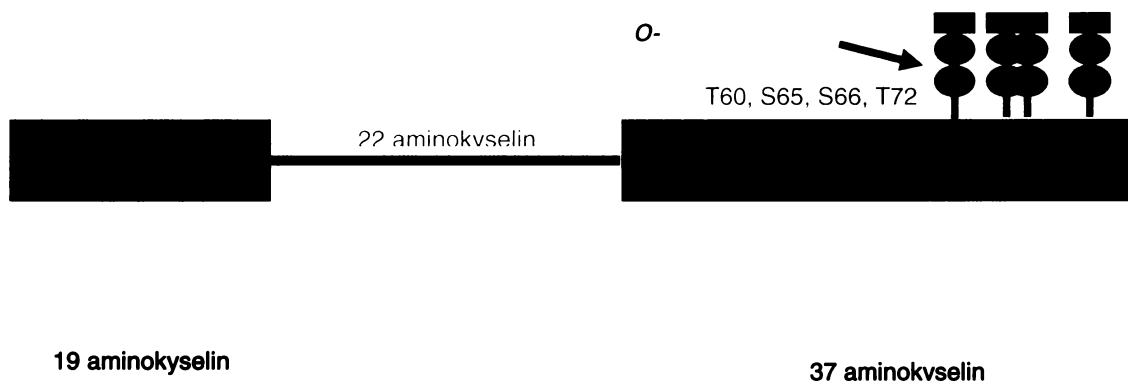
37 aminokyselin

N-terminální

Linker

C-terminalní

**b) experimentálně vyzkoumaná glykosylace**





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