

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Bc. Renata Rybáriková**

Rekombinantní exprese a funkční charakterizace rostlinných Kunitzových inhibitorů

Recombinant expression and functional characterization of plant Kunitz inhibitors

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Konzultant: Doc. RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Michaela Mareše, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne:

Podpis:

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala všem, co se podíleli na realizaci mé diplomové práce. Především bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Jaroslavovi Srpovi Phd za velmi cenné rady, ochotu, trpělivost, vstřícnost a veškerý čas, který mi věnoval. Také bych chtěla poděkovat RNDr. Michaelu Marešovi CSc. za cenné rady a náměty pro vypracování práce. Dále děkuji Mgr. Adrianu Leontovyči, Ing. Anně Fuller za praktické rady a pomoc při zpracovávání experimentální části mé diplomové práce. Též bych chtěla poděkovat všem členům skupiny Dr. Michaela Mareše CSc. ÚOCHB AVČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Velký dík patří též Ing. Zdeňku Voburkovi za určení N-koncové sekvence proteinů, Ing. Součkovi za aminokyselinovou analýzu a Dr. Hubálkovi za identifikaci proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Nakonec bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za posouzení celé práce.

Také bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za podporu a trpělivost při vypracování mé diplomové práce.

## Abstrakt

PDI (z angl. „potato cathepsin D inhibitor“) a NID (z angl. „novel inhibitor of cathepsin D“) z lilku brambor (*Solanum tuberosum*) patří do proteinové rodiny Kunitzových inhibitorů (rodina I3 podle databáze Merops). Tyto isoinhibitory s molekulovou hmotností cca 20 kDa a typickou prostorovou architekturou  $\beta$ -trojlístku inhibují aspartátové a serinové peptidasy. Byly připraveny konstrukty pro rekombinantní expresi PDI a NID v kvasinkovém expresním systému *Pichia pastoris* a vybrány kolonie pro jejich účinnou produkci. Oba proteiny byly identifikovány v kultivačním médiu pomocí hmotnostní spektrometrie a N-koncového sekvenování. Pro PDI byl navržen isolační protokol se třemi chromatografickými kroky. Purifikovaný rekombinantní PDI byl porovnán s nativním PDI z přírodního zdroje a byly prokázány analogické funkční vlastnosti. Analýza inhibiční specifity dále ukázala, že PDI inhibuje vybrané aspartátové peptidasy rodiny A1 a serinové peptidasy rodiny S1 včetně relevantního enzymu hmyzího původu. To podporuje hypotézu o funkci Kunitzových inhibitorů jako obranných molekul rostlin proti herbivornímu hmyzu. Připravené inhibitory budou využity pro analýzu reaktivních center proti cílovým peptidasám pomocí proteinové krystalografie.

*Klíčová slova:* proteolytické enzymy, aktivita a inhibice enzymů, aspartátové a serinové peptidasy, inhibitory peptidas, Kunitzovy inhibitory, rekombinantní exprese proteinů, chromatografická purifikace proteinů

## Abstract

PDI („potato cathepsin D inhibitor“) and NID („novel inhibitor of cathepsin D“) from potato (*Solanum tuberosum*) belong to the protein family of Kunitz inhibitors (I3 family, Merops database). These 20 kDa isoforms with the typical  $\beta$ -trefoil architecture inhibit aspartic and serine peptidases. In this thesis, the constructs for recombinant expression of PDI and NID in the yeast *Pichia pastoris* system were prepared and high-producing colonies were selected. Both proteins were identified in the cultivation media by mass spectrometry and N-terminal sequencing. A purification protocol for PDI with three chromatographic steps was designed. Analogous functional properties were demonstrated for the purified recombinant PDI and the native PDI isolated from a natural source. Analysis of the inhibitory specificity showed that PDI is a potent inhibitor of selected aspartic peptidases from the A1 family and serine peptidases from the S1 family, including a relevant enzyme of insect origin. This finding supports the hypothesis that Kunitz inhibitors are involved in plant defense against herbivorous insects. The inhibitors prepared within the project will be used for analysis of the reactive centers against target peptidases by protein crystallography.

*(In Czech)*

*Key words:* proteolytic enzymes, activity and inhibition of enzymes, aspartic and serine peptidases, peptidase inhibitors, Kunitz inhibitors, recombinant protein expression, chromatographic purification of proteins

# Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Seznam zkratek.....	9
1. Literární přehled .....	12
1.1 Proteolytické enzymy a jejich klasifikace .....	12
1.1.1 Aspartátové peptidasy.....	13
1.1.1.1 Katepsin D.....	14
1.1.1.2 Další medicínálně významné aspartátové peptidasy .....	16
1.1.2 Serinové peptidasy .....	17
1.1.2.1 Další medicínálně významné serinové peptidasy.....	19
1.2 Regulace aktivity proteolytických enzymů .....	20
1.3 Přirozené inhibitory peptidas .....	21
1.3.1 Polypeptidové a peptidové inhibitory aspartátových a serinových peptidas .....	24
1.3.2 Proteinové inhibitory aspartátových a serinových peptidas.....	25
1.3.2.1 Proteinové inhibitory aspartátových peptidas.....	25
1.3.2.2 Proteinové inhibitory serinových peptidas .....	27
1.3.2.3 Rostlinné proteinové inhibitory peptidas.....	29
1.3.2.4 Rostlinné peptidasové inhibitory z Kunitzovy rodiny .....	29
2. Cíle diplomové práce .....	35
3. Materiály a použité metody .....	36
3.1. Materiály .....	36
3.1.1 Biologický materiál .....	36
3.1.2 Chemikálie .....	36
3.1.2.1 Enzymy.....	36
3.1.2.2 Peptidové substráty.....	36
3.1.2.3 Standardy molekulových hmotností pro SDS-PAGE a agarosovou elektroforézu.....	37
3.1.2.4 Ostatní chemikálie .....	37
3.1.3 Přístroje a vybavení .....	38
3.1.3.1 Přístroje .....	38

3.1.3.2	Komerční soupravy.....	39
3.1.3.3	Kolony a nosiče.....	39
3.1.3.4	Programy .....	39
3.1.3.5	Ostatní vybavení.....	39
3.1	Metody .....	40
3.1.1	Rekombinantní exprese v kvasinkách <i>Pichia pastoris</i> .....	40
3.1.1.1	Příprava expresních plasmidů pUC19.....	40
3.1.1.2	Amplifikace plasmidů pUC19 v buňkách <i>E. coli</i> NEB-5 alpha .....	40
3.1.1.3	Restrikční štěpení vektoru.....	40
3.1.1.4	Isolace fragmentů DNA z agarosového gelu.....	41
3.1.1.5	Ligace insertů PDI a NID do plasmidu pPICZαA .....	41
3.1.1.6	Výběr kolonií pomocí PCR .....	41
3.1.1.7	Isolace plasmidové DNA .....	42
3.1.1.8	Transformace plasmidu do buněk <i>P. pastoris</i> elektroporací.....	42
3.1.1.9	Rekombinantní exprese PDI a NID .....	43
3.1.2	Chromatografická purifikace rPDI .....	44
3.1.2.1	Gelová chromatografie s kolonou Sephadex G-25.....	44
3.1.2.2	Ionexové chromatografie na koloně Mono S.....	45
3.1.2.3	Gelová chromatografie na koloně Superdex 75 .....	46
3.1.3	Elektroforetické metody.....	46
3.1.3.1	Horizontální agarosová elektroforéza .....	46
3.1.3.2	Příprava vzorků pro SDS-PAGE acetonovou precipitací proteinů .....	47
3.1.3.3	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE).....	47
3.1.3.4	Analýza N-koncové aminokyselinové sekvence proteinů .....	48
3.1.3.5	Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie .....	48
3.1.3.6	Určení koncentrace proteinu pomocí aminokyselinové analýzy.....	48
3.1.4	Analýza inhibiční specifity rPDI.....	49
3.1.4.1	Kinetická měření aktivity enzymu .....	49
3.1.4.2	Určení inhibičního parametru IC <sub>50</sub> .....	50
4.	Výsledky.....	51

4.1	Amplifikace komerčního plasmidu pUC19 s genem pro rPDI a NID.....	53
4.2	Příprava expresního plasmidu pPICZαA .....	53
4.3	Elektroporace do <i>Pichia pastoris</i> .....	55
4.4	Rekombinantní exprese rPDI a NID v <i>Pichia pastoris</i> .....	56
4.5	Chromatografická purifikace rPDI .....	59
4.5.1	Purifikace pomocí gelové chromatografie na koloně Sephadex G 25.....	59
4.5.2	Purifikace pomocí iontoměničové chromatografie na koloně Mono S.....	60
4.5.3	Purifikace pomocí gelové chromatografie na koloně Superdex 75.....	62
4.6	Analýza inhibiční specifity rPDI a nativního PDI .....	65
4.6.1	Kinetické měření inhibice vybraných proteolytických enzymů s rPDI a nativním PDI .....	65
4.6.2	Stanovení inhibiční konstanty IC <sub>50</sub> pro inhibitory rPDI a PDI.....	67
5.	Diskuze.....	68
6.	Závěr.....	73
	Seznam použité literatury .....	74



## Seznam zkratk

Abz	kyselina aminobenzoová
ACE	angiotensin konvertující enzym („angiotensin converting enzyme“)
AIDS	syndrom získané imunodeficiency („acquired immune deficiency syndrome“)
Amc	7-amino-4-methylkumarin
API	inhibitor aspartátových proteas („aspartic protease inhibitor“)
APS	peroxodisíran amonný
BACE	$\beta$ -sekretasa
BASI	„barley $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor“
BbCI	„ <i>Bauhinia bauhinioides</i> cruzipain inhibitor“
BMG	minimální glycerolové médium („buffered minimal glycerol“)
BMM	minimální metanolové médium („buffered minimal methanol“)
BPTI	hovězí pankreatický inhibitor trypsinu („bovine pancreatic trypsin inhibitor“)
Cbz	benzyloxycarbonyl
CV	objem kolony („column volume“)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EcTI	inhibitor trypsinu z <i>Enterolobia contortisiliquum</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
F*	p-nitrofenylalanin
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie („fluorescence resonance energy transfer“)
HIV	virus lidské imunodeficiency („human immunodeficiency virus“)

IA-3	inhibitor aspartátové proteinasy A z kvasinek („inhibitor of yeast proteinase A“)
IC <sub>50</sub>	koncentrace enzymu, při které je aktivita enzymu 50%
IrCD	kathepsin D z klišťete obecného
kDa	kilodalton
KLK-3	s kalikreinem související peptidasa 3
KLK-4	s kalikreinem související peptidasa 4
LB	lysogenylový bujón („lysogeny broth“)
LdCD	kathepsin D z mandelinky bramborové
mAU	tisícina absorbanční jednotky („milli-absorbation unit“)
MWCO	membrána s póry o definované velikosti („molecular weight cut-off“)
NID	nový inhibitor kathepsinu D („novel inhibitor of cathepsin D“)
OD	optická denzita
OMTKY3	třetí doména krocaního ovomukoidu („turkey ovomucoid third domain“)
PI-3	pepsinový inhibitor 3
PDB	„protein data bank“
PDI	párů bází
pb	inhibitor kathepsinu D z brambor („potato cathepsin D inhibitor“)
PEG	polyethylenglykol
pI	isoelektrický bod
PVDF	polyvinylidifluorid
PSA	prostatický specifický antigen („prostate specific antigen“)
rPDI	rekombinantní forma PDI s mutací N19D
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SFTI	slunečnicový inhibitor trypsinu („sunflower trypsin inhibitor“)
SOC	„super optimal broth“
Suc	sukcinyl

STI	sójový inhibitor trypsinu („soybean trypsin inhibitor“)
SQAPI	dýňový inhibitor aspartátových peptidas („squash aspartic proteinase inhibitor“)
SPINK-LEKTI	inhibitor serinových peptidas Kazalova typu
TAP	klíšťový antikoagulačný peptid („tick anticoagulant peptide“)
TEMED	N,N,N',N'-tetraethylenmethyldiamin
TKI	inhibitor tyrosinkinas („tyrosine kinase inhibitor“)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
YNB	složka média pro expresi v kvasinkách („yeast nitrogen base“)
YPD	kvasnicový extrakt pepton dextrosa

# 1. Literární přehled

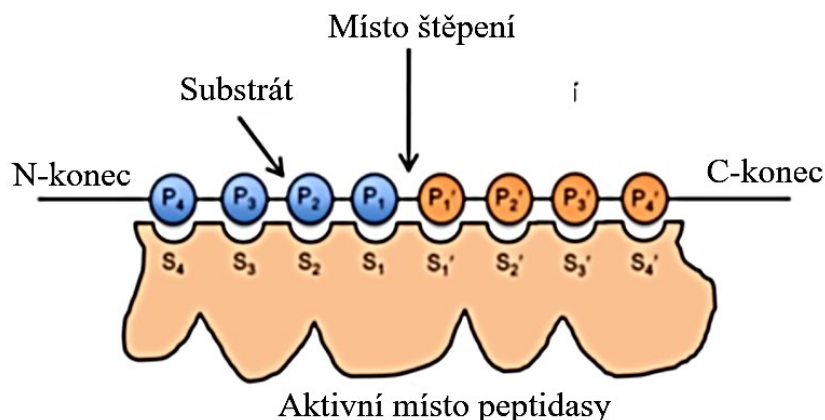
Proteolytické enzymy, též peptidasy nebo proteasy, hydrolyzují peptidovou vazbu v proteinových a peptidových substrátech. Jsou součástí mnoha fyziologických procesů probíhajících ve všech živých organismech. Jejich zástupci hrají důležité role například při vývoji a diferenciaci buněk, trávení, koagulaci krve, apoptóze nebo při imunitní odpovědi vůči cizorodým látkám. Proteolýza je ireverzibilní děj, proto musí být vysoce regulována na všech úrovních a ve všech buněčných systémech (Rawlings a Salvesen 2013).

## 1.1 Proteolytické enzymy a jejich klasifikace

Proteolytické enzymy zastupují víc než 10 % všech známých enzymů lidského těla. Všechny vykazují katabolickou aktivitu, ale navzájem se liší mechanismem štěpení vazeb, primární a kvartérní strukturou, lokalizací a evolucí (Rawlings a Salvesen 2013).

Podle způsobu místa štěpení polypeptidového substrátu se proteolytické enzymy rozlišují na exopeptidasy, které odštěpují aminokyselinový zbytek nebo krátké peptidy z N-konce (aminopeptidasy) nebo C-konce (karboxypeptidasy) polypeptidového řetězce a endopeptidasy, které štěpí vazby uvnitř polypeptidového řetězce (Rawlings a Salvesen 2013).

Vazba peptidového substrátu do aktivního místa peptidasy se popisuje pomocí konvenční terminologie (obr. 1.1). Jednotlivé aminokyselinové zbytky substrátu jsou popsány od N-konce substrátu ke štěpené vazbě jako pozice  $P_n-P_1$  a od štěpené vazby k C-konci substrátu jako pozice  $P_1'-P_n'$ . Příslušná podmísta v aktivním místě peptidasy, které vážou jednotlivé pozice substrátu, se označují obdobně jako  $S_n-S_1$  od N-konce substrátu ke štěpené vazbě a  $S_1'-S_n'$  k C-konci substrátu. Štěpená peptidová vazba je lokalizována mezi zbytky  $P_1-P_1'$  substrátu a váže se do podmíst  $S_1$  a  $S_1'$ . Analogicky k substrátu se používá popis vazby inhibitoru nebo jiného ligandu do aktivního místa peptidasy (Motwani a kol. 2015).



**Obr. 1.1:** Schéma vazby peptidového substrátu do aktivního místa peptidasy.

K vazbě peptidového substrátu do aktivního místa peptidasy dochází na základě specifity vazebných podmínek. Aminokyselinové zbytky substrátu jsou od N-konce ke štěpené vazbě označeny jako pozice  $P_4$ ,  $P_3$ ,  $P_2$ ,  $P_1$  (modře) a od této vazby k C-konci jako pozice  $P_1'$ ,  $P_2'$ ,  $P_3'$ ,  $P_4'$  (oranžově). Místo štěpení substrátu mezi zbytky v pozicích  $P_1$  a  $P_1'$  je vyznačeno šipkou. Analogicky jsou popisována odpovídající vazebná podmínka peptidas jako  $S_4$ – $S_1$  a  $S_1'$ – $S_4'$ . Převzato a upraveno podle (Song a kol. 2011).

Systematická klasifikace peptidas je vytvořena na základě chemické povahy kritické reaktivní skupiny, díky které dochází ke katalýze. Takto lze rozdělit peptidas do pěti základních tříd, a to na serinové, aspartátové, cysteinové a threoninové peptidas a metalopeptidas (Merops 2020).

### 1.1.1 Aspartátové peptidas

Aspartátové peptidas jsou enzymy skládající se ze dvou strukturních domén, mezi kterými se nachází aktivní místo se dvěma katalytickými zbytky kyseliny asparagové (Beneš a kol. 2008). Aspartátové peptidas se vyskytují ve všech organismech, včetně virů. Jsou důležitými enzymy mnoha fyziologických a patologických procesů. Jejich zástupci jsou spojeny s řadou onemocnění, jako je třeba hypertenze, Alzheimerova choroba, nádorová onemocnění, malárie a AIDS. Inhibitory aspartátových peptidas jsou vyvíjeny jako významná chemoterapeutika. Příkladem je inhibitor reninu aliskiren, který snižuje hypertenzi, nebo inhibitory HIV proteasy, které se užívají pro léčbu onemocnění AIDS. Většina aspartátových peptidas je inhibována pepstatinem, což je mikrobiální

peptid obsahující zbytek neproteinogenní aminokyseliny statinu (Coates a kol. 2008, Knight a Barrett 1976).

Významnou rodinou aspartátových peptidas je rodina A1 nazývaná také jako rodina pepsinu (dle Merops databáze), jejíž zástupci se vyskytují v eukaryotických organismech. Známými zástupci této rodiny jsou zejména pepsin, katepsin D, renin, chymosin, katepsin E (Hánová a kol. 2018).

Aspartátové peptidasy z pepsinové rodiny jsou endopeptidasy. Jejich aktivní místo je schopno interagovat s peptidovým substrátem (o délce 6-10 aminokyselin) po obou stranách štěpené vazby. V aktivním místě jsou dva aminokyselinové zbytky aspartátu (Asp33 a Asp231, číslování dle lidského katepsinu D), které v aktivním stavu vážou molekulu vody. Katalytický mechanismus aspartátových peptidas je založen na deprotonaci vody pomocí jednoho zbytku kyseliny asparagové. Takto aktivovaná molekula vody nukleofilně atakuje peptidovou vazbu substrátu, který je navázán v aktivním místě enzymu. Výsledkem je vznik tetrahedrálního intermediátu, který je stabilizován vodíkovou vazbou k druhému zbytku kyseliny asparagové. Při štěpení peptidové vazby dochází k přesunu protonu k aminoskupině a hydroxylu ke karbonylu. Následuje uvolnění vzniklých produktů z aktivního místa a regenerace peptidasy pomocí vazby nové molekuly vody (Coates a kol. 2008).

Přestože mezi aspartátové proteasy rodiny A1 patří významné enzymy, stále se ví poměrně málo o molekulách regulujících jejich aktivitu. Je známo pouze několik endogenních proteinových inhibitorů vyskytujících se u nižších organismů a rostlin (Hánová a kol. 2018).

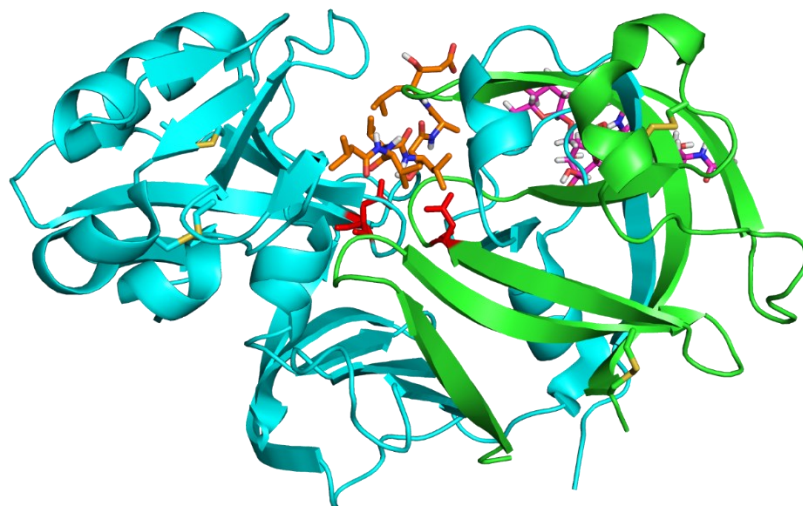
#### 1.1.1.1 Katepsin D

Katepsin D je lysozomální aspartátová endopeptidasa vyšších eukaryot, řadící se do rodiny A1 (Beneš a kol. 2008). K jeho biosyntéze dochází v endoplazmatickém retikulu ve formě neaktivního proenzymu, kde propeptid na N-konci řetězce blokuje aktivní místo peptidasy (Gieselmann a kol. 1985, Máša a kol. 2006, Hánová a kol. 2018). Aktivní místo katepsinu D je schopno vázat až 8 aminokyselinových zbytků substrátu (obr. 1.2). V porovnání s ostatními aspartátovými peptidasami má poměrně vyhraněnou specifitu vůči oligopeptidovým substrátům,

kdy preferuje velké hydrofobní aminokyseliny v P1 a P1' (Beneš a kol. 2008). Na rozdíl od jiných členů rodiny A1 obsahuje katepsin D fosforylované N-vázané oligosacharidy, které cílí proenzym do lysozomu prostřednictvím manosa-6-fosfátových receptorů. Zralá forma katepsinu D se vyskytuje ve dvouřetězcové formě díky post-translačnímu štěpení uvnitř molekuly (Silva a Erickson 1993).

Katepsin D hraje významnou roli v proteolýze při různých fyziologických procesech a podílí se i několika významných patologiích. Vyskytuje se typicky v lysozomech, fagozomech, ale také v cytoplazmě nebo je sekretován do extracelulárního matrix. Zde se účastní buněčných procesů jako je apoptóza, proliferace, stárnutí a také je spojován s onemocněními jako je ateroskleróza, neurodegenerativní a nádorová onemocnění nebo artritida (Sun a kol. 2013, Suire a Leissring 2021). V současnosti je katepsin D zkoumán převážně v souvislosti s nádorovými onemocněními, jelikož je nadměrně exprimován a hypersekretován např. prsními nádorovými buňkami. Katepsin D je prognostickým markerem a slibnou cílovou molekulou pro léčbu rakoviny prsu (Nussbaumerová a kol. 2010, Houštická a kol. 2020).

Aspartátové peptidasy podobné katepsinu D se hojně vyskytují i u bezobratlých živočichů. Příkladem je katepsin D, který byl objeven u samic klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). Zde se společně s cysteinovými peptidasami podílí na degradaci molekuly hemoglobinu a sérového albuminu (Horn a kol. 2009, Sojka a kol. 2016). Dalším příkladem je larva zrnokaze skvrnitého (*Callosobruchus maculatus*), která produkuje katepsin D jako odpověď na přítomnost peptidasových inhibitorů získaných z potravy a podílí se na jejich degradaci (Ahn a Zhu-Salzman 2009). Katepsin D byl také identifikován u mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*), která patří mezi nejzávažnější škůdce brambor, kdy se listy živí larvy i dospělí jedinci, což má za následek snížení výnosu této plodiny (Brunelle a kol. 1999, Srp a kol. 2016). Aspartátové peptidasy typu katepsinu D byly též nalezeny u mouchy domácí (*Musca domestica*), přičemž byly objeveny tři odlišné isoformy katepsinu D s různou tkáňovou distribucí (Padilha a kol. 2009).



**Obr. 1.2: Prostorová struktura komplexu lidského katepsinu D s inhibítoem pepstatinem.**

*Katepsin D je zobrazen stužkovým modelem (PDB kód: 1LYB), N-koncový řetězec je zeleně, C-koncový řetězec je znázorněn modře. Zvýrazněny jsou postranní řetězce katalytických aspartátů Asp33 a Asp231 (červeně), disulfidické můstky (žlutě) a oligosacharidové zbytky N-glykosylace (růžově). Molekula pepstatinu (přírodního peptidomimetického inhibitoru) v aktivním místě je zobrazena v tyčinkovém modelu (oranžově). Obrázek byl připraven pomocí programu PyMol.*

#### 1.1.1.2 Další medicínálně významné aspartátové peptidasy

**$\beta$ -sekretasa** (BACE) je transmembránová aspartátová peptidasa, která se podílí na fyziologických procesech regulace imunity, diferenciaci buněk a apoptózy. Klíčovou roli hraje při vzniku Alzheimerovy choroby, kde se podílí na chybném štěpení amyloidního prekursorového proteinu za vzniku  $\beta$ -amyloidních peptidů (Strooper a kol. 2010). Ve své struktuře obsahuje katalytickou doménu, transmembránovou a také C-koncovou cytosolární doménu. V současné době jsou vyvíjeny inhibitory  $\beta$ -sekretasy, které by blokovaly vznik  $\beta$ -amyloidních peptidů, ale zároveň by nedošlo k supresi jiných fyziologických funkcí tohoto enzymu (Barao a kol. 2016).



**Renin** společně s angiotensinem a aldosteronem hraje důležitou roli v regulaci arteriálního krevního tlaku (tzv. renin-angiotensinový systém). K sekreci reninu dochází v juxtaglomerulárních buňkách ledvin jako odpověď na snížení krevního tlaku a cirkulačního objemu krve. Následně dojde ke štěpení angiotensinu reninem za vzniku peptidu angiotensinu I, který se dále působením ACE (“angiotensin converting enzyme“) přemění na angiotensin II. Ten interaguje indukuje zúžení cév a uvolnění katecholaminu, také katalyzuje sekreci aldosteronu a reabsorpci sodíku a poskytuje negativní zpětnou vazbu snížením sekrece reninu. Inhibitory reninu se používají k léčbě hypertenze, kardiovaskulárních chorob a pro léčbu ledvinových onemocnění (Nadeem a Batisky 2014).

**HIV proteasa** patří mezi aspartátové peptidasy rodiny A2 (retrovirální, dle Merops databáze). Její funkcí je štěpit strukturní a funkční proteiny z polyproteinového řetězce viru. Jedná se o proces tzv. zrání virů, při kterém dochází k morfologickým změnám viru, které jsou nutné pro vznik infekčních virových částic. HIV proteasa slouží jako molekulární cíl pro terapii pacientů s onemocněním AIDS (Pokorná a kol. 2009).

### 1.1.2 Serinové peptidasy

Serinové peptidasy vykonávají v organismu škálu biologických funkcí, jako je trávení, celkový metabolismus proteinů nebo koagulace krve a představují terapeutické cílové molekuly pro léčbu řady chorob (Xu a kol. 2017). Obsahují ve svém aktivním místě zbytek serinu, který hraje klíčovou roli při hydrolýze peptidové vazby, a kromě něj tvoří katalytickou triádu ještě histidin a aspartát (Kalinska a kol. 2016).

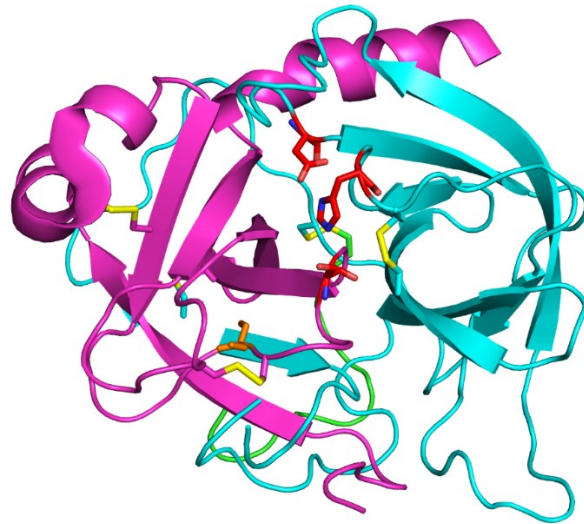
Katalytický mechanismus serinových peptidas využívá hydroxylové skupiny serinového zbytku, která působí při hydrolýze peptidové vazby jako nukleofil (Rawlings a Salvesen 2013). Hydrolýza peptidové vazby probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku aktivovaná hydroxylová skupina rozštěpí peptidovou vazbu substrátu za vzniku kovalentně navázaného acyl-enzym meziprojektu a zároveň se uvolňuje C-terminální fragment jako první produkt. Ve druhém kroku probíhá deacylace vzniklého komplexu pomocí molekuly vody, což vede k uvolnění N-terminálního fragmentu a regeneraci enzymu (Radisky a kol. 2006).

Na základě podoby prostorové struktury se serinové peptidasy rozdělují do 14 klanů a na základě podobné aminokyselinové sekvence se dělí zhruba do 60 rodin. Nejvýznamnější je rodina S1 také nazývaná rodina chymotrypsinu (klan PA), do které patří např. trypsin a chymotrypsin.

Peptidasy rodiny S1 mají strukturu složenou ze dvou domén, mezi kterými jsou lokalizovány katalytické zbytky. U jednotlivých zástupců jsou výrazné rozdíly v substrátové specifitě. Příkladem je chymotrypsin a trypsin, kdy trypsin preferuje bazicky nabitě aminokyseliny arginin a lysin v P<sub>1</sub> pozici a chymotrypsin naopak objemné hydrofobní zbytky (např. Phe a Trp). Tato odlišná specifita je způsobená aminokyselinou v S<sub>1</sub> podmístě peptidasy, kde se u trypsinu nachází kyselý zbytek Asp189, který nábojově interaguje s bazickým zbytkem substrátu (Craik a kol. 1987), zatímco S<sub>1</sub> podmísto chymotrypsinu obsahuje zbytek serinu s menší polaritou (Jelínek a kol. 2004).

Serinové peptidasy z chymotrypsinové rodiny jsou produkovány ve formě neaktivního zymogenu. K aktivaci zymogenu dochází odštěpením propeptidu, přičemž dojde k lokální změně konformace a vzniku aktivního enzymu. (Rawlings a Salvesen 2013).

Molekula **chymotrypsinu** se skládá ze tří řetězců, které jsou propojeny disulfidovými můstky (obr. 1.3). Aminokyselinová sekvence je asi z 50 % identická se sekvencí trypsinu (Rawlings a Salvesen 2013, Wang a kol. 1985). Chymotrypsin je exprimován ve formě neaktivního zymogenu - chymotrypsinogenu (Venekei a kol. 1996). **Trypsin** je také produkován v podobě neaktivního trypsinogenu. Molekula zralého trypsinu je složena z jednoho řetězce a má ve struktuře místo pro vazbu vápenatého iontu, které se skládá ze dvou zbytků glutamátu (Glu70, Glu80). Při vazbě vápníku se zvýší aktivita trypsinu a je odolnější vůči autodegradaci (Bode a Schwager 1975).



**Obr. 1.3: Prostorová struktura chymotrypsinu.**

*Struktura chymotrypsinu je zobrazena ve stužkovém modelu (PDB kód: 4CHA). Skládá se ze tří řetězců (fialově, zeleně a modře). Zvýrazněny jsou disulfidické můstky (žlutě) a aktivní místo chymotrypsinu se skládá z aminokyselinových zbytků Asp102, His57 a Ser195 (červeně). Převzato a upraveno podle (Tsukada a Blow 1985). Obrázek byl připraven v programu PyMol.*

### 1.1.2.1 Další medicíně významné serinové peptidasy

**Trombin** se účastní proteolytické kaskády srážení krve. Aktivní trombin vzniká z protrombinu působením další serinové peptidasy - faktoru X. Trombin je zodpovědný za štěpení fibrinogenu na fibrin, který způsobuje tvorbu krevní sraženiny. Ve struktuře trombinu se nacházejí dvě alosterická místa pro specifickou regulaci jeho aktivity, která se jsou mimo aktivní místo (Huntington 2012). Výzkum regulace aktivity trombinu se zaměřuje na ligandy, které interagují právě s těmito alosterickými místy (Mehta a kol. 2014).

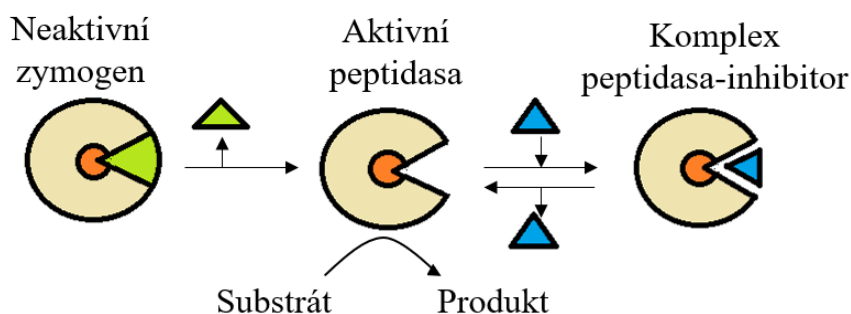
**Kalikreiny** tvoří skupinu úzce příbuzných sekretovaných serinových peptidas (KLK-1 až KLK-15) z rodiny S1, které mají podobnou substrátovou specifitu jako trypsin nebo chymotrypsin. Kalikreiny slouží jako regulační peptidasy a jsou zapojeny do drah, které např. regulují deskvamaci

kůže, tvorbu zubní skloviny a funkci ledvin (Kalinska a kol. 2016). Některé kalikreiny (např. KLK-1, KLK-2, KLK-3) obsahují tzv. „kalikreinovou smyčkou“, která pravděpodobně hraje důležitou roli při interakci se substrátem (Skala a kol. 2014, Kalinska a kol. 2016). Mezi medicínálně významné zástupce kalikreinů patří zejména KLK-3 a KLK-4. KLK-3, též zvaný PSA (“prostate specific antigen“) je využíván k diagnostice rakoviny prostaty (Skala a kol. 2014) a KLK-4 se stal terapeutickým cílem pro léčbu rakoviny prostaty (Riley a kol. 2019). Hlavními přirozenými regulátory kalikreinů jsou inhibitory z rodiny SPINK/LEKTI (Riley a kol. 2019).

## 1.2 Regulace aktivity proteolytických enzymů

Proteolytické enzymy se účastní komplexním způsobem řady důležitých fyziologických dějů a je nutné, aby jejich aktivita byla přísně kontrolována. Chyby v kontrole vedou nerovnováze v proteolytických systémech a ke vzniku různých poruch a onemocnění. Regulace probíhá na úrovni genové exprese, translace a pomocí dalších mechanismů. Jedním z nich je syntéza peptidas ve formě neaktivních prekurzorů tzv. proenzymů neboli zymogenů, které se přemění na aktivní enzymy po odštěpení aktivačního peptidu (propeptidu) (obr. 1.4). Propeptid u zymogenu blokuje aktivní místo peptidasy, zvyšuje stabilitu peptidas a napomáhá správnému sbalení. K řízené aktivace zymogenu dochází při správné lokalizaci peptidasy v buňce nebo po sekreci mimo buňku (Wiederanders a kol. 2003).

Důležitým mechanismem, jak zabránit nechtěné a nekontrolované proteolýze, je inhibice enzymové aktivity peptidas pomocí specifických endogenních inhibitorů, které mohou být peptidového i proteinového charakteru. Přirozené inhibitory peptidas jsou studovány pro jejich unikátní inhibiční specifitu a mechanismus interakce, jelikož představují významný zdroj nových molekul pro vývoj léčiv. Mezi regulátory aktivity proteolytických enzymů patří také iontová síla nebo pH (Krowarsch a kol. 2003, Buša 2019).



**Obr. 1.4:** Schéma víceúrovňové regulace aktivity peptidas.

Proteolytické enzymy jsou produkovány ve formě neaktivních zymogenů, kde aktivní místo (značeno oranžově) je blokováno propeptidem (zeleně). K aktivaci zymogenu dochází proteolytickým odštěpením propeptidu, čímž je generována zralá aktivní peptidasa, která hydrolyzuje peptidovou vazbu substrátu za vzniku produktu. Do aktivního místa peptidasy se může navázat specifický inhibitor (modře) a vytvořit tak komplex peptidasa-inhibitor, který není proteolyticky aktivní.

### 1.3 Přirozené inhibitory peptidas

Většina přirozených inhibitorů proteolytických enzymů je proteinového charakteru. Výjimku tvoří např. některé mikroorganismy, které pro blokování exogenních peptidas často využívají malé nebílkovinné molekuly (Krowarsch a kol. 2003). Příkladem takových mikroorganismů jsou bakterie z rodu *Streptomyces* (Hozumi a kol. 1972) a *Actinomyces* (Knight a Barrett 1976) nebo plísně z rodu *Aspergillus* (Hashida a kol. 1980). Přirozené inhibitory peptidas lze na základě jejich molekulové hmotnosti a stavby obecně rozdělit na nízkomolekulární inhibitory (obvykle peptidového charakteru) a vysokomolekulární inhibitory proteinového charakteru.

Na základě mechanismu inhibice je možné přírodní inhibitory klasifikovat jako inhibitory kovalentní nebo nekovalentní. Kovalentní inhibitory se vážou na katalytické zbytky peptidasy za vzniku ireversibilních, kovalentních komplexů. Mnohem častěji se vyskytují nekovalentní inhibitory, které interagují s peptidasou pouze pomocí nekovalentních vazeb za vzniku

reverzibilního komplexu, jehož stabilita je zajištěna větším počtem slabších interakcí vytvářejících komplexní prostorovou síť (Buša 2019).

Přirozené inhibitory peptidas proteinového charakteru lze rozdělit podle sekvenční homologie do více než 80 rodin (Rawlings a Barrett 2010). Rodiny inhibitorů jsou ve většině případů úzce specifické pro jednotlivé třídy peptidas, v některých případech jsou však schopny inhibovat i více tříd peptidas (Krowarsch a kol. 2003). Příkladem rodin s širší inhibiční specifitou jsou serpiny (inhibice serinových a cysteinových peptidas) nebo inhibitory Kunitzovy rodiny z rostlin (inhibice serinových, cysteinových i aspartátových peptidas) (tab. 1.1) (Mihelic a Turk 2007; Srp a Mareš 2016).

**Tab. 1.1: Přehled vybraných přirozených inhibitorů serinových a aspartátových peptidas.**  
 Převzato a upraveno podle (Kowarsch a kol. 2003).

<b>Třída peptidas</b>	<b>Inhibitor</b>	<b>Příklad inhibitoru</b>	<b>Vlastnosti inhibice</b>	<b>Velikost</b>
<b>Serinové</b>	Kanonické inhibitory	BPTI, OMTKY3	Nekovalentní interakce s aktivním místem peptidasy, bez výrazných konformačních změn	3-21 kDa
	Nekanonické inhibitory	Hirudin, TAP, ornithodorin	Specifická interakce využívající exo-místa na povrchu peptidasy	6-8 kDa
	Serpiny	serpin	Tvorba kovalentního komplexu acyl-enzym, konformační změny inhibitoru	45-55 kDa
<b>Aspartátové</b>	-	IA-3	Vysoká specifita, indukovaná změna konformace inhibitoru	8 kDa
	-	PI-3	Vysoká specifita, bez konformačních změn	17 kDa
	-	PDI	neznámý vazebný mód	20 kDa
	-	SQAPI	neznámý vazebný mód	10,5 kDa
	-	Equistatin	neznámý vazebný mód	22 kDa
	-	Pepstatin	Peptidový analog substrátu mimikující reakční intermediát	0,7 kDa

### 1.3.1 Polypeptidové a peptidové inhibitory aspartátových a serinových peptidas

Polypeptidové a peptidové inhibitory aspartátových a serinových peptidas jsou hojně zastoupeny zejména u rostlin, kvasinek a bakterií, kde působí proti endogenním i exogenním peptidasám. Následují příklady několika významných představitelů.

Mezi peptidové inhibitory serinových peptidas patří například slunečnicový trypsinový inhibitor **SFTI** (“sunflower trypsin inhibitor“), který produkuje slunečnice rolní (*Helianthus annuus*) a patří do rodiny Bowman-Birk inhibitorů (podle databáze Merops I12 rodina) (Luckett a kol. 1999). Tento bicyklický inhibitor, který je stabilizován pomocí intramolekulárního disulfidického můstku, obsahuje ve své struktuře 14 aminokyselin. SFTI je schopen inhibovat serinové peptidasy podobné trypsinu. Při vazbě do aktivního místa napodobuje substrát a do  $S_1$  podmísta peptidasy váže zbytek Lys5. Díky svým strukturním a funkčním vlastnostem lze SFTI využít jako templát pro navrhování inhibičních derivátů se změněnou selektivitou (Veer a kol. 2015).

**Pepstatin** je silný pikomolární peptidomimetický inhibitor aspartátových peptidas izolovaný z bakterií rodu *Actinomyces*. Díky jeho vlastnostem lze pepstatin použít ke studiu biologických funkcí této třídy peptidas (Knight a Barrett 1976). Pepstatin obsahuje ve své sekvenci Iva-Val-Val-Sta-Ala-Sta nestandardní aminokyselinu statin (Sta). Zbytek Sta4 je lokalizován v aktivním místě enzymu mezi pozicemi  $P_1$  a  $P_1'$ . Hydroxylová skupina statinu interaguje s karboxyly aspartátů, vytěsňuje molekuly vody z aktivního místa peptidasy, čímž dochází k zablokování aktivity enzymu (obr. 1.2) (Majer a kol. 1997). Použití pepstatinu pro terapeutické účely je limitováno jeho nepříznivými fyzikálními vlastnostmi jako je např. velká molekulová hmotnost nebo špatná rozpustnost. Proto byly v poslední době připraveny makrocyclické deriváty pepstatinu, které vylepšují jeho vlastnosti pro využití v medicíně (Houštická a kol. 2020).

**IA-3** je účinným inhibitorem proteinasy A z kvasinek. Skládá se z 68 aminokyselinových zbytků a jeho inhibiční aktivita je lokalizována v N-koncové části molekuly. IA-3 nemá v roztoku



žádnou sekundární strukturu, ale při vazbě na peptidasu se stává strukturovaný a tvoří  $\alpha$ -šroubovici (obr. 1.5 A), která prochází aktivním místem enzymu. Proteinasa A stabilizuje strukturu inhibitoru, čímž dochází ke vzniku silné a specifické interakce; s katalytickým centrem interaguje zbytek Lys18 inhibitoru (Li a kol. 2000).

Peptidové inhibitory aspartátových peptidas lze odvodit ze struktury propeptidu, který v neaktivní formě zymogenu blokuje aktivní místo enzymu. Podrobněji byly studovány především propeptidy lidského katepsinu D (Máša a kol. 2006) a také katepsinu D z klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) (Hánová a kol. 2018).

## 1.3.2 Proteinové inhibitory aspartátových a serinových peptidas

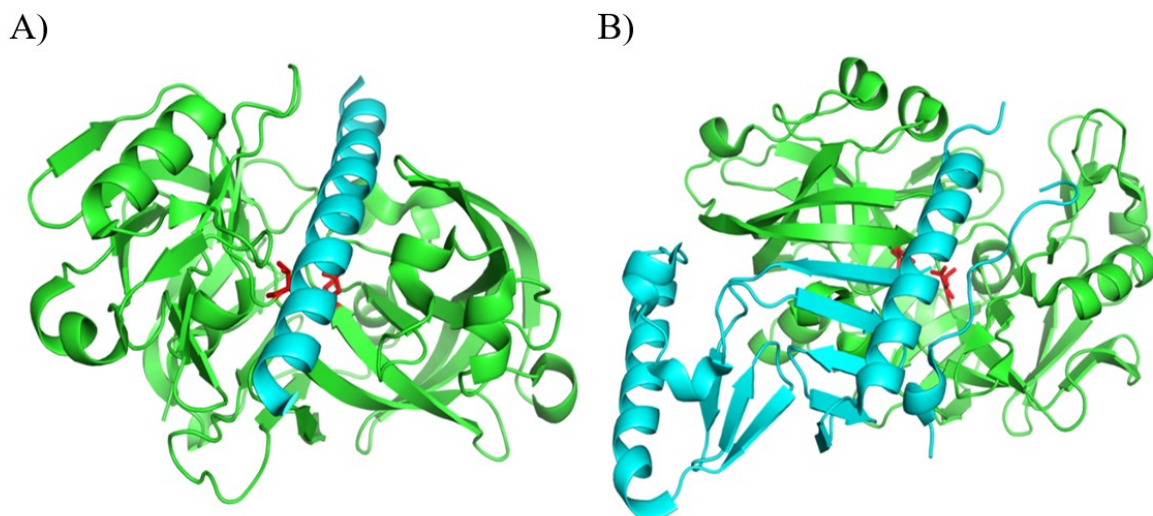
### 1.3.2.1 Proteinové inhibitory aspartátových peptidas

Proteinové inhibitory aspartátových peptidas jsou relativně vzácné, pocházejí jen z několika inhibičních rodin a předpokládá se, že se u nich vyvinuly odlišné vazebné módy. Doposud se podařilo strukturně popsat pouze vazebný mód pro inhibitor PI-3 ze škrkavky (Ng a kol. 2000) v komplexu s pepsinem. Mezi další známé inhibitory patří SQAPI z dýně (Christeller a kol. 1998), doména 2 equistatinu ze sasanky mořské (Lenarcic a Turk 1999) a Kunitzovy inhibitory z lilkovitých rostlin, kterým je věnována kapitola níže (Mareš a kol. 1989, Cater a kol. 2002).

**PI-3** neboli pepsinový inhibitor 3 byl izolován ze škrkavky *Ascaris suum*. Jeho struktura se skládá ze dvou domén. Tři aminokyselinové zbytky na N-konci inhibitoru (Gln-Phe-Leu) jsou umístěny v pozicích S<sub>3</sub>'-S1 aktivního místa pepsinu a blokují tak vstup substrátu (obr. 1.5 B). Prostorovou strukturu komplexu pepsin s PI-3 lze využít pro návrh nových inhibitorů aspartátových peptidas (Ng a kol. 2000).

**Equistatin**, který byl izolován z mořské sasanky *Actinia equina*, patří do tyropinové rodiny a je složen ze tří thyroglobulinových domén typu 1. Doména 2 ze struktury equistatinu inhibuje některé aspartátové peptidas rodiny A1. Jedná se zatím o jediného známého zástupce proteinových inhibitorů katepsinů D z živočišné říše (Lenarcic a Turk 1999).

**SQAPI** (“squash aspartic proteainase inhibitor“) je inhibitor izolovaný z dýně *Cucurbita maxima* a vykazuje inhibiční aktivitu vůči pepsinu. Jedná se o proteinový inhibitor o molekulové hmotnosti 10,5 kDa, který je velmi stabilní v kyselém i neutrálním pH. Primární struktura SQAPI vykazuje částečnou homologii s cystatiny, inhibitory cysteinových peptidas (Christeller a kol. 1998).



**Obr. 1.5: Prostorové struktury komplexů aspartátových peptidas s polypeptidovým inhibitorem IA3 a proteinovým inhibitorem PI3.**

A) Komplex kvasinkové proteiny A s inhibitorem IA3 z kvasinky *Saccharomyces cerevisie* (PDB kód: 1DPJ). Inhibitor IA3 je zvýrazněn modře a proteínasa A zeleně. IA3 interaguje pomocí zbytku Lys18 s katalytickým centrem proteiny A (znázorněné tyčinkovým modelem červeně).  
B) Komplex pepsinu (zeleně) s inhibitorem PI3 (modře) ze škrkavky *Ascaris suum* (PDB kód: 1F34). PI3 nemá přímý kontakt s katalytickými zbytky pepsinu (červeně), ale interaguje s vazebnými podmínkami S<sub>1</sub>'-S<sub>3</sub>'. Obě prostorové struktury jsou znázorněny ve stužkovém modelu. Obrázek byl připraven v programu PyMol.

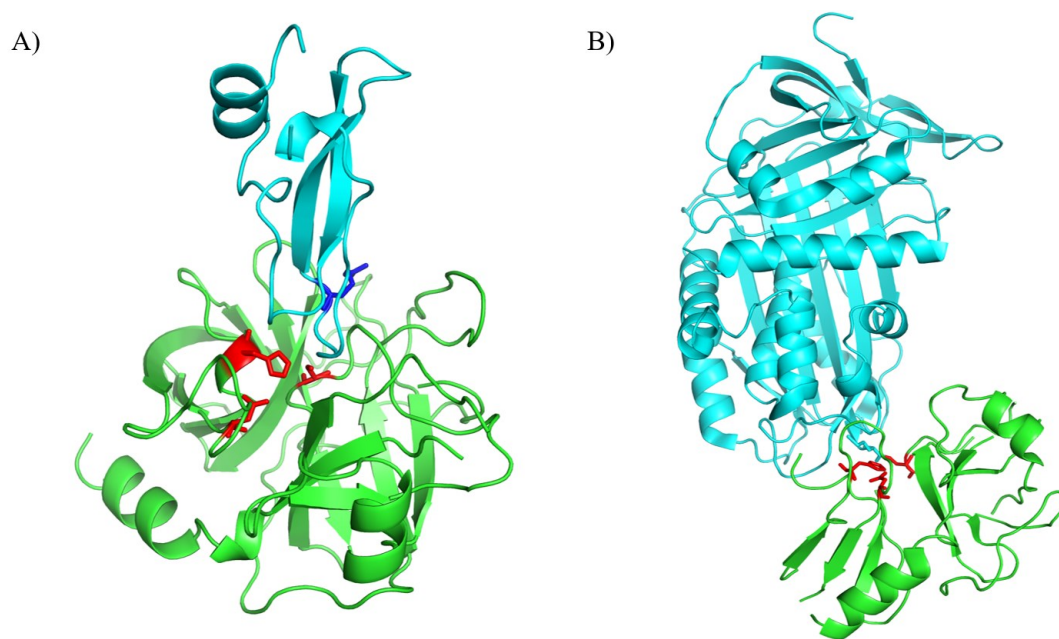
### 1.3.2.2 Proteinové inhibitory serinových peptidas

Inhibitory serinových peptidas proteinového charakteru jsou nejrozmanitější skupinou přirozených inhibitorů peptidas. Jejich zástupci se výrazně liší ve své struktuře, molekulové hmotnosti a mechanismu interakce. Jsou zde zastoupeny inhibitory, které tvoří kovalentní vazby s peptidasami (např. rodina serpinů), inhibitory, které vytvářejí stabilní komplexy pomocí slabých interakcí (např. Kunitzova rodina) nebo neselektivní inhibitory, které využívají pro zachycení peptidas mechanismus pastí ( $\alpha_2$  makroglobuliny). Na základě sekvenční homologie rozdělujeme inhibitory serinových peptidas do 16 rodin z databáze Merops (Bode a Huber 1992). Podle vazebného módu lze tyto inhibitory také klasifikovat na kanonické inhibitory, nekanonické inhibitory a reaktivní serpinové inhibitory. Největší skupinou jsou kanonické inhibitory, které jsou obsaženy téměř ve všech organismech (Krowarsch a kol. 2003).

**Kanonické inhibitory** serinových peptidas se nekovalentně vážou na své cílové peptidasy pomocí pevné smyčky, která je stabilizovaná prostřednictvím vnitřních vodíkových a disulfidických vazeb (Swedberg a kol. 2011). Modelovým zástupcem je BPTI (hovězí pankreatický inhibitor trypsinu, “bovine pancreatic trypsin inhibitor“, neboli aprotinin), který byl izolován ze slinivky a patří do rodiny I2. Vyznačuje se širokou specifiitou inhibice, přičemž dokáže inhibovat serinové peptidasy s elastasovou, trypsinovou nebo chymotrypsinovou substrátovou specifiitou. Jeho struktura se skládá z jednoho řetězce a molekulová hmotnost je okolo 6,5 kDa (obr. 1.6 A) (Helland a kol. 1999, Krowarsch a kol. 2005).

**Nekanonické inhibitory** patří zejména do rodiny I52. Tvoří interakce prostřednictvím N-terminálního segmentu, který se váže do aktivního místa peptidasy, a kromě toho tvoří další rozsáhlé interakce s tzv. exo-místy na povrchu peptidasy. Tyto interakce jsou významné z hlediska specifiity inhibitoru a také síly a rychlosti interakce (Krowarsch a kol. 2003). Zástupcem nekanonických inhibitorů serinových peptidas je inhibitor TAP (“tick anticoagulant peptide“) s molekulovou hmotností 27 kDa, který byl nalezen u klíštěte. Jedná se o vysoce selektivní inhibitor inhibující pouze faktor Xa v koagulační kaskádě krve (Wilby a kol. 1995).

**Serpiny** z rodiny I4 patří tvoří největší skupinu inhibitorů; dosud bylo identifikováno okolo 1500 členů u zvířat, rostlin, bakterií i archeí. Serpiny jsou poměrně velké molekuly, které se skládají zhruba z 330–500 aminokyselin (40–50 kDa). Jedná se o konformačně nestabilní proteiny, které jsou atakovány peptidasou jako substrát a vzniklý kovalentní intermediát je pak stabilizován ve formě inhibičního komplexu (Huntington a kol. 2000). Serpiny patří mezi inhibitory serinových i cysteinových peptidas (Law a kol. 2006).



**Obr. 1.6: Prostorové struktury komplexů serinových peptidas s proteinovými inhibitory s nekovalentní a kovalentní vazbou.**

A) Komplex hovězího trypsinu s inhibitorem BPTI (I2 rodina, PDB kód: 3BTK). BPTI (modře) interaguje s S1 podmístem trypsinu (zeleně) pomocí zbytku Arg13 (tmavě modře), katalytické centrum trypsinu je znázorněno červeně.

B) Komplex hovězího trypsinu s  $\alpha$ 1-antitrypsinovým inhibitorem serpinového typu (I4 rodina, PDB kód: 1EZK). Inhibitor  $\alpha$ 1-antitrypsin je zvýrazněn modře (katalytické zbytky jsou červeně) a trypsin zeleně. Obě prostorové struktury jsou znázorněny ve stužkovém modelu, konkrétní aminokyselinové zbytky v tyčinkovém modelu. Obrázek byl připraven v programu PyMol.

### 1.3.2.3 Rostlinné proteinové inhibitory peptidas

Rostliny produkují inhibitory peptidas, které slouží jako ochrana před herbivorním hmyzem a jinými škůdci. Vyskytují se v reprodukčních, zásobních i vegetativních pletivech rostlin, proto patří k primární strategii pro přirozenou ochranu rostlin. Obecným mechanismem jejich účinku je inhibice trávicích enzymů, což může mít za následek zpoždění vývoje škůdce, snížení plodnosti nebo i jejich smrt. Spektrum působení inhibitorů ale může být mnohem komplexnější (Zhu-Salzman a Zensg 2015). V rostlinné říši se vyskytují inhibitory serinových peptidas několika rodin, z nichž se tato diplomová práce soustředí na inhibitory z Kunitzovy rodiny, které jsou popsány v následující kapitole.

### 1.3.2.4 Rostlinné peptidasové inhibitory z Kunitzovy rodiny

Rostlinné inhibitory peptidas z Kunitzovy rodiny jsou často N-glykosylované glykoproteiny o molekulové hmotnosti 18-22 kDa. Zástupci této rodiny mají podobnou prostorovou stavbu, základ jejich struktury tvoří tzv.  $\beta$ -trojlístek (z angl. „ $\beta$ -trefoil“), který se skládá z  $\beta$ -skládaných listů. Tyto strukturní segmenty jsou propojeny různě dlouhými, sekvenčně variabilními smyčkami (obr. 1.7). Prostorová struktura inhibitorů z Kunitzovy rodiny je stabilizovaná pomocí dvou disulfidických můstků mezi zbytky Cys39-Cys86 a Cys136-Cys145 (číslování podle STI). Nicméně počet disulfidických můstků se může lišit u jednotlivých zástupců inhibitorů z této rodiny. Příkladem je inhibitor PDI, NID nebo API-A, které mají jeden disulfidický můstek navíc, zatímco inhibitory BbCI a BbKI neobsahují žádný disulfidický můstek (Srp a Mareš 2016). Jednotliví zástupci Kunitzovy rodiny se liší svými biologickými funkcemi. Kromě inhibice peptidas jsou také známé proteiny z Kunitzovy rodiny, které jsou schopné např. vázat chlorofyl (Horigome a kol. 2007), sacharidy (Ferreira a kol. 2013), interagovat s chuťovými receptory (Koizumi a kol. 2011) nebo regulovat amylasy (Vallée a kol. 1998). Kunitzova rodina se vyznačují výskytem isoinhibitorů, které mohou obsahovat jedno nebo dvě reaktivní centra pro inhibici peptidas. Unikátní vlastností této rodiny inhibitorů je schopnost blokovat aktivitu proteolytických enzymů ze tří různých tříd – cysteinových, aspartátových a serinových peptidas (Gamero a kol. 2013, Srp a Mareš 2016).

Kunitzovy inhibitory byly nalezeny v různých rostlinných pletivech, převážně se vyskytují v semenech, listech a zásobních pletivech (semena a hlízy), kde vytvářejí ochrannou bariéru proti herbivorům a patogenům. Produkce v listech zabraňuje zejména defoliaci listů herbivorním hmyzem. Indukce exprese těchto obranných molekul je při poškození listu požerem nebo při signalizaci molekulou methyljasmonátu při systémové odpovědi rostliny. Produkce a akumulace v zásobních pletivech je konstitutivní (Srp a Mareš 2016).

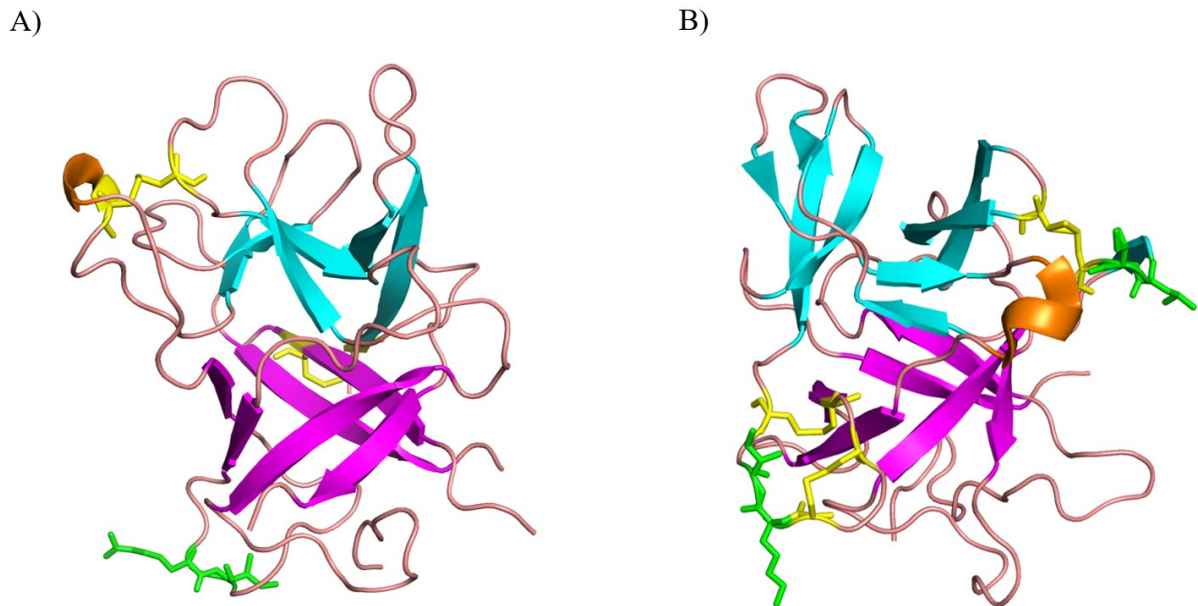
Inhibitory z Kunitzovy rodiny dostaly svůj název podle objevitele inhibitoru trypsinu STI (sójový inhibitor trypsinu, “soybean trypsin inhibitor“, obr. 1.7 A) Mosese Kunitze, který ve 40. letech 20. století izoloval STI ze semen sóje a charakterizoval jeho vlastnosti. Dalším významným jménem spojeným s těmito inhibitory je Laskowski, který v 80. letech popsal mechanismus interakce trypsinu s Kunitzovými inhibitory a zobecnil tento mechanismus pro další rodiny inhibitorů interagujících se serinovými peptidasami (Srp a Mareš 2016)

V současné době je v PDB databázi více než 30 prostorových struktur rostlinných proteinů z Kunitzovy rodiny a 6 struktur jejich komplexů s navázanou serinovou peptidasou (tab. 1.2, Li a kol. 2019, Patil a kol. 2012, Song a Suh 1998, Zhou a kol. 2013, Zhou a kol. 2015, Bao a kol. 2009).

**Tab. 1.2: Přehled vybraných inhibitorů z Kunitzovy rodiny s vyřešenou prostorovou strukturou v komplexu s cílovou serinovou peptidasou.**

Uvedeno je označení proteinů a jejich rostlinný původ. PDB kód se týká prostorových struktur samotných proteinů a jejich komplexů s uvedenými enzymy.

Inhibitor	Původ	Inhibiční specifita	3D struktura (PDB kód)	
			Inhibitor	Komplex s enzymem
API-A	<i>Sagittaria sagittifolia</i>	trypsin	-	2x trypsin 3E8L
BASI	<i>Hordeum vulgare</i>	subtilisin	-	subtilisin 3BXI
BbKI	<i>Bauhinia bauhinoides</i>	trypsin	4ZOT	trypsin 6DWH
EcTI	<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	trypsin	4J2K	trypsin 4J2Y
STI	<i>Glycine max</i>	trypsin, chymotrypsin	1BA7, 1AVU	trypsin 1AVW, 1AVX
TKI	<i>Tamarindus indica</i>	trypsin	4AN6	trypsin 4AN7



**Obr. 1.7: Prostorové struktury inhibitorů STI a API-A z Kunitzovy rodiny.**

Prostorové struktury inhibitorů STI (A, PDB kód: 1AVW) a API-A (B, PDB kód 3EPL) z Kunitzovy rodiny jsou znázorněny ve stužkovém modelu. Fialově a modře jsou  $\beta$ -struktury tvořící dvě domény v architektuře  $\beta$ -trojlístku,  $\alpha$ -šroubovice je oranžově, disulfidové můstky jsou žlutě. Aminokyselinové zbytky tvořící reaktivní centrum pro serinové peptidasy (Arg64-Ile65 pro STI a Lys145-Ile146, Leu87-Ile88 pro API-A) jsou znázorněny zeleně v tyčinkovém modelu. Obrázek byl připraven v programu PyMol.

Inhibitory z Kunitzovy rodiny exprimované v lilku brambor (*Solanum tuberosum*) vytvářejí početnou skupinu isoinhibitorů a mají širokou sekvenční variabilitu. Jejich zástupci jsou schopni inhibovat aspartátové peptidasy rodiny A1, serinové peptidasy rodiny S1 a cysteinové peptidasy rodiny C1. Významnými zástupci z Kunitzových inhibitorů z lilku brambor jsou bifunkční inhibitory PDI (“potato cathepsin D inhibitor“) a NID (“novel inhibitor of cathepsin D“), které jsou schopné inhibovat serinové i aspartátové peptidasy (Ritonja a kol. 1990, Mareš 1989).

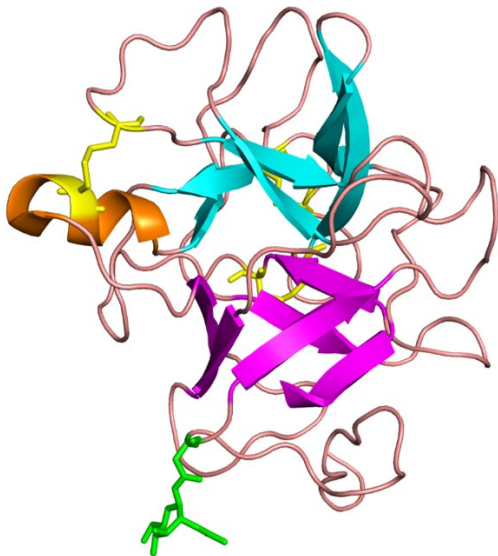
**PDI** (UnitProt: P16348) je inhibitorem aspartátových peptidas (katepsin D) a serinových peptidas (trypsin, chymotrypsin) (Keilová a Tomášek 1972). Jeho polypeptidový řetězec se skládá



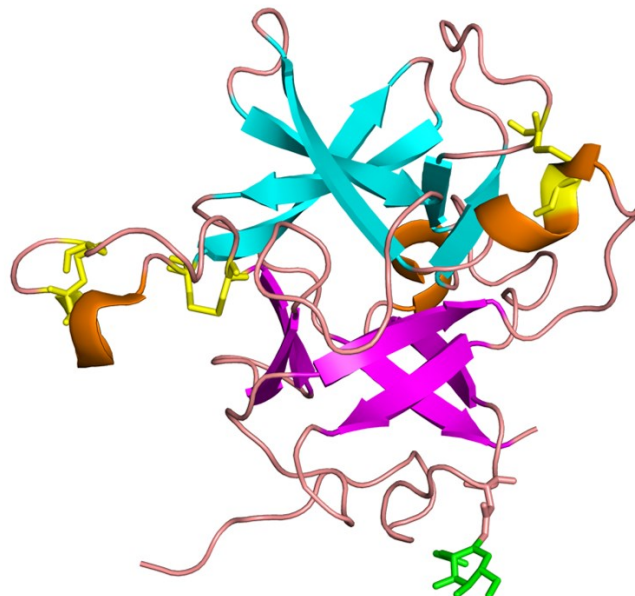
ze 188 aminokyselinových zbytků a na polypeptidový řetězec je N-glykosidicky vázán oligosacharid přes zbytek Asn19 (Mareš a kol. 1989). Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, struktura molekuly obsahuje flexibilní smyčky, kde se nachází zatím neidentifikované reaktivní centrum pro serinové a aspartátové peptidasy (obr. 1.8 A). PDI je odolné vůči zvýšené teplotě a nízkým i vysokým hodnotám pH. K jeho produkci dochází v hlízách, listech a poupatech rostliny a je známo že jeho sekvenční homology se vyskytují i u jiných lilkovitých rostlin jako je lilek černý (*Solanum nigrum*) a rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*) (Guo a kol. 2015).

Celogenomové sekvenování lilku brambor ukázalo, že existují geny pro různé isoinhibitory PDI, které mají až 90 % shodu v aminokyselinové sekvenci. V UnitProt databázi se nachází 11 anotovaných sekvencí isoinhibitorů PDI. Jeden ze strukturně popsanych isoinhibitorů je nazýván **NID** (UnitProt: P58521) a má obdobné vlastnosti jako PDI: jeden polypeptidový řetězec, 187 aminokyselin v sekvenci se 3 disulfidickými můstky a N-glykosylací na zbytku Asn19 (obr. 1.8 B). U NID byla také prokázána schopnost inhibovat trypsin i katepsin D (Ritonja a kol. 1990). Sekvence NID má 93 % identitu s PDI, přičemž nejvíce aminokyselinových záměn je ve smyčce L9, která obsahuje dva disulfidové můstky. S ostatními zástupci z Kunitzovy rodiny mají PDI a NID výrazně nižší sekvenční homologii, např. identita s STI je jen 20 % (Guerra a kol. 2016).

A)



B)



**Obr. 1.8: Prostorové struktury Kunitzových inhibitorů PDI a NID z lilku brambor.**

Prostorové struktury PDI (A, PDB kód: 5DZU) a NID (B, PDB kód: 5G00) jsou zobrazeny ve stužkovém modelu. Fialově a modře jsou vyznačeny  $\beta$ -struktury tvořící dvě domény v architektuře  $\beta$ -trojlístku. Oranžově je zvýrazněná helikální struktura, žlutě jsou disulfidické můstky a zeleně N-glykosylace na zbytku Asn19. Obrázek byl připraven v programu PyMol. Převzato a upraveno podle (Guo a kol. 2015, Guerra a kol. 2016).

## 2. Cíle diplomové práce

Diplomová práce se zabývá peptidasovými inhibitory PDI a NID z lilku brambor (*Solanum tuberosum*). Jedná se proteiny z Kunitzovy rodiny, které inhibují aspartátové a serinové peptidasy, ale jejich funkční vlastnosti a mechanismus inhibice nebyly doposud podrobně studovány.

Dílčí cíle diplomové práce jsou následující:

1. Příprava expresního plasmidu pro produkci rekombinantní formy PDI a NID.
2. Rekombinantní exprese PDI a NID v kvasinkách *Pichia pastoris*.
3. Navržení purifikačního protokolu pro separaci rekombinantního PDI z kultivačního média.
4. Srovnání funkčních vlastností purifikovaného rekombinantního PDI a nativního PDI z přírodního zdroje.
5. Analýza inhibiční specifity rekombinantního PDI s vybranými modelovými aspartátovými a serinovými peptidasami.

## 3 Materiály a použité metody

### 3.1. Materiály

#### 3.1.1 Biologický materiál

*Invitrogen, USA*

kvasinkové buňky *Pichia pastoris* (kmen X-33), plasmid pPICZ $\alpha$ A

*New England Biolabs, USA*

kompetentní buňky *E. coli* NEB-5 alpha

*GenScript, USA*

plasmid pUC19 s genem pro PDI

plasmid pUC19 s genem pro NID

#### 3.1.2 Chemikálie

##### 3.1.2.1 Enzymy

*Serva, Německo*

chymotrypsin, trypsin

*Sigma, USA*

Pepsin

*ThermoFisher, USA*

Xho I, Not I, DNA ligasa, Sac I

ÚOCHB AV ČR (připraveno v laboratoři Dr. M. Mareše)

katepsin D z klíštěte obecného (IrCD1),

katepsin D z mandelinky bramborové (LdCD)

PDI izolovaný z lilku brambor (*Solanum tuberosum*)

##### 3.1.2.2 Peptidové substráty

*Bachem, Německo*

Cbz-Phe-Arg-Amc, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-Amc

ÚOCHB AV ČR (zakázková syntéza peptidů)

Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu

### 3.1.2.3 Standardy molekulových hmotností pro SDS-PAGE a agarosovou elektroforézu

*BioRad, USA*

Precision Plus Protein™ Dual Color Standards

*ThermoFisher, USA*

GeneRuler 1 kb DNA ladder

### 3.1.2.4 Ostatní chemikálie

*New England Biolabs, USA*

Taq 2x Master Mix, NEBuffer, CutSmart Buffer 10

*Fluka, Německo*

N,N-methylenbisakrylamid, PEG 1500

*ForMedium, Velká Británie*

YNB médium

*Lach:ner, Česká republika*

methanol, síran amonný, hydroxid sodný, aceton

*Penta, Česká republika*

hydrogenfosforečnan didraselný, dihydrogenfosforečnan draselný, glycerol, kyselina octová, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková, ethanol, agarosa

*Serva, Německo*

peroxodisíran amonný (APS), Coomassie Brilliant Blue R-250

*Sigma, USA*

biotin, Zeocin™, Trizma báze, ampicilin, dodecylsulfát sodný (SDS), LB médium, akrylamid, hovězí sérový albumin (BSA), glycin, chlorid vápenatý, 1, -dithiotreitol (DTT), uhličitan sodný, dusičnan stříbrný, formaldehyd, glutaraldehyd, octan amonný, kyselina ethylendiamintetraoctová

(EDTA),  $\beta$ -merkapt ethanol, N,N,N',N'-tetraethylenmethylen diamin (TEMED), YPDS agar, sorbitol, SOC médium, ethidium bromid

*ThermoFisher, USA*

Orange Loading Dye Solution, CutSmart Buffer 10

primery: AOX'3,  $\alpha$ -Fac

### 3.1.3 Přístroje a vybavení

#### 3.1.3.1 Přístroje

Analytické váhy 82/220/2X	Radwag, Polsko
Autokláv Labo Auoclave	Sanyo, Japonsko
Blotovací zařízení Power Pac HC	BioRad, USA
Centrifuga Allegra X-15R	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Eppendorf 5424R	Eppendorf, Německo
Centrifuga Sorvall Evolution RC	Thermo Fisher Scientific, USA
Elektropotátor Eppendorf 2510	Eppendorf, Německo
Fluorescenční/absorpční čtečka GENios M200	Tecan, Rakousko
FPLC ÄKTA Explorer	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
Lyofilizátor Freezone 6 liter	Labconco, USA
Orbitální třepačka Innova 44	New Brunswick Scientific, USA
Orbitální třepačka PSU-20i	Biosan, Lotyšsko
PCR termocyklér	BioTech, USA
pH metr Orion 3 Star	Thermo Fisher Scientific, USA
Power Pac Basic Bio-Rad	Thermo Fisher Scientific, USA
Termoblok QBH2	Grant Instruments, Velká Británie
Vertikální elektroforéza Power Pac Basic	BioRad, USA
Vakuová odparka Speed Vac Concentrator	Thermosavant, USA

### 3.1.3.2 Komerční soupravy

GenElute™ PCR Clean-up Kit	Sigma Aldrich, USA
Gel Extraction Kit (Qiagen)	Qiagen, Německo
Nucleospin Gel and PCR Clean-up	Sigma-Aldrich, USA
QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen, Německo

### 3.1.3.3 Kolony a nosiče

Sephadex G-25	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
MonoS 5/50 GL	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
Superdex 75 10/300	GE Healthcare Life Sciences, Švédsko
Zeba spin desalting columns	ThermoFisher Scientific, USA

### 3.1.3.4 Programy

Compute pI/MW
GraFit Data Analysis Software

### 3.1.3.5 Ostatní vybavení

Koncentrátory Amicon	Milipore, USA
PVDF membrána	Millipore, USA
Filtr MWCO 10 kDa	Sigma-Aldrich, USA

## 3.1 Metody

### 3.1.1 Rekombinantní exprese v kvasinkách *Pichia pastoris*

#### 3.1.1.1 Příprava expresních plasmidů pUC19

Geny pro PDI a NID, jejichž sekvence byly optimalizovány pro expresi v kvasinkách *Pichia pastoris*, byly připraveny firmou GenScript a dodány ve formě plasmidu pUC19. Lyofilizované plasmidy (4 µg) byly rozpuštěny ve 200 µl sterilní vody.

#### 3.1.1.2 Amplifikace plasmidů pUC19 v buňkách *E. coli* NEB-5 alpha

Plasmidy (20 ng/µl) byly inkubovány s kompetentními buňkami *E. coli* NEB-5 alpha (New England Biolabs) půl hodiny na ledu. Poté byly buňky transformovány teplotním šokem (30 s při 42 °C). Po 30 s se okamžitě přidalo 250 µl SOC média a směs se kultivovala 1 h při 37 °C za třepání (230 rpm).

Buňky byly ve třech množstvích (10 µl, 100 µl a 400 µl) rozetřeny na Petriho misky s LB agarem a ampicilinem (100 µg/ml) a inkubovány přes noc při 37 °C. Následně bylo vybranou kolonií zaočkováno LB médium o objemu 100 ml obsahujícího ampicilin (100 µg/ml) a inkubováno přes noc v 37 °C (za třepání při 220 rpm). Narostlé buňky byly centrifugovány (15 min, 6000 g, 4 °C) a následně proběhla purifikace plasmidové DNA pomocí komerční sady QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit (Qiagen).

Výsledná koncentrace DNA v roztoku byla změřena spektrofotometricky na NanoDrop 2000.

*SOC medium*: 0,5% kvasinkový extrakt, 2% trypton, 10 mM chlorid sodný, 2,5 mM chlorid draselný, 10 mM chlorid hořečnatý, 10 mM síran hořečnatý, 20 mM glukosa

#### 3.1.1.3 Restrikční štěpení vektoru

Plasmidy pUC19 obsahující inzerty pro PDI, NID a expresní plasmid pPICZαA byly štěpeny restrikčními endonukleasami *Xho I* a *Not I*. Množství plasmidové DNA a enzymů použitých v reakci bylo vypočítáno podle návodu výrobce: 1 µg DNA, 5 µl NEBuffer 3, 2 µl *Xho I* a 4 µl *Not I*. Reakce byla doplněna do 50 µl sterilní vodou a inkubována v 37 °C přes noc.



#### 3.1.1.4 Isolace fragmentů DNA z agarosového gelu

Vyštěpené inzerty a plasmid pPICZ $\alpha$ A byly přečištěny pomocí agarosové elektroforézy. Části gelu obsahující požadované úseky DNA byly vyříznuty skalpelem a DNA z nich byla izolována pomocí komerční sady QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Výsledná koncentrace DNA byla měřena spektrofotometricky na NanoDrop 2000.

#### 3.1.1.5 Ligace insertů PDI a NID do plasmidu pPICZ $\alpha$ A

Ligace insertu pro PDI a NID do plasmidu pPICZ $\alpha$ A byla prováděna pomocí T4 DNA ligasy. Reakční směs obsahovala 2  $\mu$ l ligačního pufru, 100 ng plasmidu pPICZ $\alpha$ A, 80 ng insertu, 1  $\mu$ l T4 DNA ligasy. Reakce byla doplněna do celkového objemu 20  $\mu$ l sterilní vodou. Ligace probíhala po dobu 2 h při 37 °C. Takto připravené vektory byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* NEB-5 alpha metodou teplotního šoku (kap. 3.2.1.2). Buňky byly následně rozetřeny na Petriho misky s LB/Z agarem obsahujícím selekční antibiotikum Zeocin (25  $\mu$ g/ml).

#### 3.1.1.6 Výběr kolonií pomocí PCR

Sterilní špičkou byly odebrány vybrané kolonie a přeneseny do PCR mikrozkušavek a zároveň přečárkovány na nové Petriho misky s LB/Z agarem (25  $\mu$ g/ml Zeocin).

Do PCR reakce byly přidány primery 1  $\mu$ l AOX'3 a 1  $\mu$ l  $\alpha$ -Fac, 8  $\mu$ l sterilní vody a 10  $\mu$ l Taq 2x Master Mix (New England BioLabs).

Pro amplifikaci DNA v PCR termocykléru byl zvolen tento pracovní postup:

počáteční denaturace DNA templátu..... 98 °C, 20 s.

denaturace DNA templátu ..... 98 °C, 20 s.

nasedání primerů ..... 50 °C, 20 s.

elongace..... 72 °C, 60 s. 37 cyklů

závěrečná elongace ..... 72 °C, 10 min.

Produkty PCR reakce byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy.

### 3.1.1.7 Isolace plasmidové DNA

Narostlé kolonie, které podle kontrolní agarosové elektroforézy obsahovaly inzert pro PDI a NID byly inkubovány ve 100 ml LB/Z media (25 µg/ml Zeocin) přes noc při 37 °C, (za třepání při 230 rpm). Z narostlé kultury byla izolována plasmidová DNA pomocí soupravy NucleoSpin Plasmid Mini kit (Sigma-Aldrich) dle návodu výrobce. Správnost sekvence byla ověřena DNA sekvenováním společností SEQme s využitím primerů 3' AOX nebo  $\alpha$ -Fac.

### 3.1.1.8 Transformace plasmidu do buněk *P. pastoris* elektroporací

#### 3.1.1.8.1 Linearizace plasmidové DNA

Plasmidy pPICZ $\alpha$ A s geny pro PDI a NID byly štěpeny pomocí restričního enzymu *SacI* a komerčního pufru CutSmart Buffer 10. Reakční směs (60 µl) obsahovala: 15 µg plasmidové DNA, 6 µl CutSmart Buffer 10, 2 µl *SacI* a byla doplněna na objem 60 µl sterilní vodou.

Směsi pro linearizaci plasmidu byly inkubovány přes noc v 37 °C. Získané vektory byly přečištěny pomocí sady QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) a rozpuštěny ve 12 µl sterilní vody.

Linearizované expresní plasmidy byly precipitovány přidáním 0,1 objemu 3M acetátu sodného a 2,5–3 objemy ledového 100% ethanolu. Precipitace probíhala hodinu při -20°C. Po precipitaci byly expresní plasmidy centrifugovány a promyty 0,5 ml ledového 75% ethanolu, poté byly plasmidy vysušeny. K vysušeným plasmidům bylo přidáno 12 µl sterilní vody. Čistota a množství DNA bylo určeno spektrofotometricky na NanoDrop 2000 a byla provedena kontrolní agarosová elektroforéza.

#### 3.1.1.8.2 Příprava kompetentních buněk *P. pastoris* na elektroporaci

YPD médium o objemu 50 ml bylo zaočkováno kolonií *P. pastoris* (kmen X-33) (Invitrogen). Buňky byly kultivovány v orbitální třepačce (přes noc, 220 rpm, 30 °C). Následně byly přeneseny do 500 ml YPD média a kultivovány za stejných podmínek, dokud OD<sub>600</sub> nedosáhla hodnoty 1,5. Poté byly buňky odstředěny (5 min, 1500 g, 4 °C) a resuspendovány v 500 ml vychlazené vody. Odstředění a resuspendování buněk bylo za stejných podmínek dvakrát opakováno. V posledním

promývacím kroku byly buňky resuspendovány ve 20 ml ledového 1M sorbitolu, znovu odstředěny a na závěr resuspendovány v 1,5 ml vychlazeného 1M sorbitolu. Tyto buňky byly uchovávány na ledu a použity k elektroporaci.

*YPD medium*: 1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, 2% dextrosa ve vodě

### 3.1.1.8.3 Elektroporace kvasinek *P. pastoris* expresními vektory

Suspenze buněk *P. pastoris* o objemu 80  $\mu$ l ve vychlazeném 1M sorbitolu byla smíchána s 15  $\mu$ l linearizovaného plasmidu (8 ng) s geny pro PDI a NID a inkubována 5 min na ledu v elektroporační kyvetě. Následovala elektroporace při 2000 V po dobu 5 ms v elektroporátoru Eppendorf 2510. K buňkám byl ihned přidán 1 ml ledového 1M sorbitolu a obsah kyvety byl přenesen do sterilní 15ml zkumavky, ve které byl 2 h inkubován v 30 °C bez třepání. Takto připravené buňky byly v třech různých množstvích (10  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 200  $\mu$ l) rozetřeny na misky s YPDS/Z agarem a inkubovány v 30 °C dokud se kolonie nerozrostly (3 dny). Vybrané kolonie byly poté přečárkovány na nové misky s YPDS/Z agarem.

*YPDS/Z agar*: YPD agar, 1 M sorbitol, 25  $\mu$ g/ml Zeocin

### 3.1.1.9 Rekombinantní exprese PDI a NID

Expresí rekombinantního PDI (dále označovaného jako rPDI) a NID byla provedena v methylotrófních kvasinkách *Pichia pastoris* (kmen X-33), které byly transformovány plasmidem pPICZ $\alpha$ A s příslušnými geny pro expresi. Plasmid pPICZ $\alpha$ A obsahuje faktor  $\alpha$ , který umožňuje sekreci exprimovaného proteinu do kultivačního média a rezistenci na antibiotikum Zeocin.

Nejprve byla provedena pilotní rekombinantní exprese rPDI a NID v malém objemu za účelem výběru optimálního kvasinkového klonu pro produkci proteinů. Kvasinky byly kultivovány ve 3 ml BMG média se Zeocinem (25  $\mu$ g/ml) do  $OD_{600} = 4-5$ , poté byly převedeny do 3 ml BMM média se Zeocinem, kde byly kultivovány následujících 6 dní za každodenního přidavku 30  $\mu$ l methanolu (finální koncentrace 1 %). Pomocí SDS-PAGE analýzy byly vybrány kolonie,

keré exprimovaly proteiny rPDI a NID neúčinněji. S vybranou kolonií rPDI následovala velkoobjemová exprese.

Kvasinky byly kultivovány v 50 ml BMG média se Zeocinem (25 µg/ml) při 30 °C a za třepání (220 rpm) přes noc. Následně byly buňky převedeny do 0,5 l BMG média se Zeocinem (25 µg/ml) a dále kultivovány do OD<sub>600</sub> = 4–5 za stejných podmínek. Poté byly kvasinky převedeny do 0,5 l BMM média se Zeocinem, kde byly kultivovány následujících 6 dní. Během této fáze byla exprese rPDI každý den indukována přidávkem 5 ml methanolu do média (finální koncentrace 1% methanol). Pro analýzu produkce rekombinantního rPDI byly každý den odebrány 2ml vzorky média, které byly centrifugovány (5 min, 2000 g, 4 °C), supernatant byl vysušen na vakuové odparce Thermosavant a přítomnost rPDI byla následně analyzována pomocí SDS-PAGE (viz kap. 3.2.3.3). Po 6 dnech byla inkubace ukončena centrifugací kvasinek (5 min, 2000 g, 4 °C) a supernatant obsahující rPDI byl zamražen v -80 °C.

*BMG Buffered Minimal Glycerol (0,5 l):* 10 ml glycerol, 50 ml 1M fosfátový pufr, pH 6,2, 390 ml voda, 50 ml YNB

*BMM Buffered Minimal Methanol (0,5 l):* 50 ml 1M fosfátový pufr, pH 6,2, 400 ml voda, 50 ml YNB, 1 ml biotin, 1% methanol

### 3.1.2 Chromatografická purifikace rPDI

Pro purifikaci rPDI byly použity kolony pro gelovou chromatografií (Sephadex G-25 a Superdex 75) a iontoměničová chromatografie proběhla na koloně Mono S. Supernatant získaný v kap. 3.2.1.9 byl koncentrován lyofilizací z objemu 0,5 l na přibližně 50 ml a tento materiál byl dále použit pro gelovou chromatografií na koloně Sephadex G-25.

#### 3.1.2.1 Gelová chromatografie s kolonou Sephadex G-25

Zahuštěné kultivační médium bylo centrifugováno (10 min, 15000 g, 8 °C), filtrováno přes 0,45 µm filtr s CME membránou a poté nanášeno na kolonu Sephadex G-25, která byla předem

ekvilibrována elučním roztokem. Průtok elučního pufru kolonou byl nastaven na 2 ml/min a byly sbírány frakce o objemu 10 ml.

Pro určení proteinové frakce byla v jednotlivých frakcích měřena na spektrofotometru absorbance při  $\lambda = 280$  nm a elektrická vodivost na konduktometru. Z jednotlivých frakcí byly také odebrány 200  $\mu$ l vzorky, ve kterých byly proteiny precipitovány acetonem a následně analyzovány pomocí SDS-PAGE. Frakce, které obsahovaly proteiny, byly spojeny, zahuštěny přes koncentrační celu (membrána s MWCO („molecular weight cut-off“) 10 kDa) a skladovány při  $-20$  °C pro další zpracování.

*Nosič:* Sephadex G-25

*Eluční roztok:* 10 mM acetát sodný, pH 4,0

### 3.1.2.2 Ionexové chromatografie na koloně Mono S

Purifikace rPDI metodou ionexové chromatografie probíhala na koloně Mono S (katexová chromatografie).

Kolona Mono S byla nejprve ekvilibrována 5 objemy kolony (CV, „column volume“) nanášecího pufru. Proteinový vzorek byl naředěn nanášecím puftrem (1/5 objemu vzorku), přefiltrován přes 0,45  $\mu$ m filtr a poté nanesen na kolonu (frakce „průraz“). Následně byla kolona promyta pomocí 5 CV nanášecího pufru („promývací frakce“). Po ustálení absorbance při 280 nm byla provedena eluce navázaných proteinů lineárním gradientem 1M chloridu sodného (1 % elučního pufru za 1 CV). Průtok kolonou byl 1 ml/min a byly sbírány 2ml frakce. Průběh chromatografie byl monitorován měřením absorbance při 280 nm a 220 nm, koncentrace elučního pufru B a konduktivity. Pro vyhodnocení chromatogramu a jeho úpravy byl použit program UNICORN.

Z frakcí, které obsahovaly proteiny (podle absorbance při 280 nm), bylo odebráno 50  $\mu$ l na analýzu SDS-PAGE. Frakce, ve kterých byla prokázána přítomnost rPDI, byly spojeny a zahuštěny

přes koncentrátor Amicon 10 K (MWCO 10 kDa) na finální objem 2,5 ml. Koncentrace proteinu byla určena spektrofotometricky na NanoDrop 2000.

*Kolona:* Mono S 5/50 GL

*Nanášecí pufr pro Mono S:* 50 mM acetát sodný, pH 4,0

*Eluční pufr pro Mono S:* 50 mM acetát sodný a 1 M chlorid sodný, pH 4,0

### 3.1.2.3 Gelová chromatografie na koloně Superdex 75

Kolona Superdex 75 byla předem ekvilibrována elučním pufrem. Na kolonu bylo naneseno 300 µl proteinového vzorku, který byl filtrován přes 0,45µm filtr. Průtok byl nastaven na 0,8 ml/min a byly sbírány frakce o objemu 0,5 ml. Průběh chromatografie byl monitorován měřením absorbance při 280 nm a konduktivity. Z frakcí obsahujících proteiny dle absorbance byly odebrány 20 µl alikvoty a analyzovány pomocí SDS-PAGE. Pro vyhodnocení chromatogramu a jeho úpravy byl použit program UNICORN.

Frakce, které obsahovaly protein, byly zahuštěny přes koncentrátor Amicon 10 K (MWCO 10 kDa) na finální objem 0,5 ml. Výsledná koncentrace proteinu byla určena spektrofotometricky na NanoDrop 2000.

*Kolona:* Superdex 75 10/300

*Eluční pufr:* 50 mM Tris-HCl, 0,2 M chlorid sodný, pH 8,5

## 3.1.3 Elektroforetické metody

### 3.1.3.1 Horizontální agarosová elektroforéza

Agarosa (výsledná koncentrace 1,5 %) byla rozpuštěna zahřátím v TAE pufru. Po ochlazení na přibližně 60 °C byl přidán ethidium bromid do výsledné koncentrace 0,5 µg/ml. Směs tuhla v elektroforetické vaně s vloženým hřebenem pro nanášení vzorků. Do jamek se aplikovalo

12 µl vzorku v nanášecím pufru a standardy molekulové hmotnosti. Elektroforetické dělení probíhalo při konstantním napětí 120 V po dobu 30 min. Fragmenty DNA byly vizualizovány pod UV lampou při vlnové délce 302 nm.

*Nanášecí pufr (6x koncentrováný):* 6 x Orange Loading Dye Solution (ThermoFisher)

*Standardy molekulové hmotnosti DNA:* GeneRuler 1 kb DNA ladder (ThermoFisher)

*TAE pufr:* 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA, pH 8.6

### 3.1.3.2 Příprava vzorků pro SDS-PAGE acetonovou precipitací proteinů

Ke vzorkům určeným k analýze pomocí SDS-PAGE byl přidán vychlazený aceton na výslednou koncentrací 80 %. Poté byly vzorky ponechány po dobu 1 h v -20 °C, odstředěny (10 min, 10000 g, 4 °C), supernatant byl opatrně odstraněn pipetou a zbytek acetonu byl vysušen na vakuové odparce Thermosavant. K takto připraveným vzorkům bylo přidáno 15 µl vzorkového pufru (VZP) a proteiny ve směsi byly denaturovány varem při 100 °C v termobloku po dobu 10 min.

*Vzorkový pufr:* 100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 5 mM dithiothreitol, 0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250 a R-250, glycerol

### 3.1.3.3 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE)

Provedení SD-PAGE v přítomnosti 0,1 % SDS vycházelo z postupu podle Laemmliho. Byly použity 15% polyakrylamidové dělicí gely o rozměrech 80 x 60 x 0,75 mm. Vlastní elektroforéza probíhala na přístroji Power Pac Basic Bio-Rad ve dvou fázích – zaostřovací (80 V po dobu 15 min) a separační (140 V po dobu 45 min).

Proteiny byly zafixovány v gelu (fixační roztok, 15 min), obarveny roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo G-250 a následně odbarveny 10 % roztokem kyseliny octové.

*Fixační roztok:* 45% ethanol, 10% kyselina octová

*Coomassie Brilliant Blue R-250:* 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% methanol, 10% kyselina octová

#### 3.1.3.4 Analýza N-koncové aminokyselinové sekvence proteinů

Pro určení N-koncové aminokyselinové sekvence proteinu byly vzorky rozděleny na SDS-PAGE (viz kap. 3.2.3.3). Poté byl polyakrylamidový gel společně s PVDF membránou a filtrační papíry ekvilibrovány v transferovém pufru (15 min při 8 °C) a navrstveny do blotovací aparatury Power Pac HC (BioRad) v pořadí filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír ve směru od katody k anodě. Přenos proteinu z gelu na PVDF membránu probíhal při konstantním napětí (100V) a chlazení po dobu 1 h. Po přenosu byla membrána obarvena barvicím roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250, následně odbarvena roztokem 50% metanolu a omyta vodou. Určení N-koncové aminokyselinové sekvence proteinu bylo provedeno pomocí sekvenátoru ABI Procise 491 (Ing. Z. Voburka, servisní laboratoř ÚOCHB AV ČR).

*Transferový pufr:* 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycin, 20% methanol, pH 8,3

*Barvicí roztok:* 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% metanol, 10% kyselina octová

#### 3.1.3.5 Identifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie

Kultivační médium (2 ml) obsahující NID bylo odsoleno na koloně Zeba spin desalting columns (ThermoFisher Scientific) a roztok purifikovaného rPDI (5 µg) byl precipitován acetonem (kap. 3.1.3.2) a rozdělen pomocí SDS-PAGE. Pásky o molekulové hmotnosti odpovídající rPDI a NID byly extrahovány z gelu, štěpeny trypsinem a chymotrypsinem. Následně byly identifikovány peptidové fragmenty pomocí hmotnostní spektrometrie, z nichž byly složeny oblasti ověřené aminokyselinové sekvence rPDI a NID. Analýzu provedl Dr. M. Hubálek v servisní laboratoři ÚOCHB AV ČR.

#### 3.1.3.6 Určení koncentrace proteinu pomocí aminokyselinové analýzy

Proteinový vzorek čistého rPDI (cca 5 nmol) byl vysušen lyofilizací, hydrolyzován a kvantifikován na přístroji Biochrom 20 Amino Acid Analyzer; analýzu provedl Ing. R. Souček v servisní laboratoři ÚOCHB AV ČR.



### 3.1.4 Analýza inhibiční specifity rPDI

#### 3.1.4.1 Kinetická měření aktivity enzymu

Měření inhibičních parametrů pro rPDI bylo provedeno v mikrotitračních destičkách v celkovém reakčním objemu 100  $\mu$ l. Enzymová směs obsahovala peptidasu, pufr (100 mM) a aditiva, která jsou uvedena v tabulce 3.1. Vzorky byly měřeny v triplicátech.

**Tab. 3.1: Složení reakčních směsí pro měření inhibičních aktivit rPDI.**

V tabulce jsou uvedeny složení reakčních směsí pro jednotlivé typy aspartátových a serinových peptidas. Uvedeny jsou typ a pH pufru, aditiva a typ a koncentrace specifického substrátu pro jednotlivé peptidasy.

<b>Třída peptidas</b>	<b>Peptidasa</b>	<b>Pufr (pH)</b>	<b>Aditiva</b>	<b>Substrát (koncentrace)</b>
<b>Aspartátové</b>	Katepsin D z klíštěte obecného (IrCD1)	Acetát sodný (pH 4,5)	0,1 % PEG 1500	Abz-KPAEFF*AL (40 $\mu$ M)
	Katepsin D z mandelinky bramborové (LdCD)	Acetát sodný (pH 4,5)	0,1 % PEG 1500	Abz-KPAEFF*AL (40 $\mu$ M)
	Vepřový pepsin	Acetát sodný (pH 4,0)	0,1 % PEG 1500	Abz-KPAEFF*AL (40 $\mu$ M)
<b>Serinové</b>	Hovězí trypsin	Tris-HCl (pH 8,0)	0,1 % PEG 1500, 10 mM CaCl <sub>2</sub>	Cbz-FR-Amc (25 $\mu$ M)
	Hovězí chymotrypsin	Tris-HCl (pH 8,0)	0,1 % PEG 1500, 10 mM CaCl <sub>2</sub>	Suc-AAPF-Amc (25 $\mu$ M)

Reakční směs s rPDI o různých koncentracích (0,05 nM – 5 μM) byla 10 min preinkubována při 25 °C. Reakce byla zahájena přidáním specifického substrátu pro jednotlivé peptidas (tab. 3.1), který byl inkubován na 37 °C. Enzymová reakce byla monitorována kontinuálním měřením fluorescence na čtečce GENios M200 při teplotě 37 °C. FRET substráty (obsahující skupiny Abz a F\*) byly měřeny při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 410 nm. Fluorescenční substráty s Amc skupinou byly monitorovány při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 465 nm. Naměřené hodnoty byly vyhodnoceny v programu Magellan.

Zbytkové aktivity peptidas v přítomnosti inhibitoru rPDI byly vypočítány z počátečních rychlostí pomocí vzorce:

$$\text{zbytková aktivita enzymu (\%)} = v_i/v_0 \times 100,$$

kde  $v_i$  značí počáteční rychlost reakce směsi v přítomnosti inhibitoru a  $v_0$  je počáteční rychlost reakce směsi bez inhibitoru rPDI (kontrola).

Stejným způsobem byly určeny zbytkové aktivity i pro nativní PDI. Výsledné hodnoty zbytkových aktivity byly vyneseny do grafů v závislosti na koncentraci inhibitoru.

#### 3.1.4.2 Určení inhibičního parametru $IC_{50}$

Inhibiční parametry  $IC_{50}$  byly určeny ze zbytkových aktivit peptidas pro různé koncentrace inhibitoru rPDI a nativního PDI (kap. 3.2.4.1). Hodnoty  $IC_{50}$  byly odečteny z křivky závislosti zbytkové aktivity peptidasy na koncentraci inhibitoru v programu GraFit 5.0.4. Přesné koncentrace inhibitoru byly stanoveny pomocí aminokyselinové analýzy (kap. 3.2.3.6).

## 4. Výsledky

Hlavním cílem práce bylo připravit inhibitory PDI (z angl. „potato inhibitor of cathepsin D“) a NID (z angl. „novel inhibitor of cathepsin D“) z lilku brambor (*S. tuberosum*) jako rekombinantní proteiny. Aminokyselinové sekvence PDI a NID, které patří podle homologie do Kunitzovy rodiny, jsou uvedeny na obr. 4.1. V případě rekombinantního PDI (označovaného dále jako rPDI) byla připravena mutovaná varianta bez N-glykosylace na zbytku Asn19, který byl nahrazen zbytkem Asp.

### rPDI

```
>sp|P16348|API11_SOLTU Aspartic protease inhibitor 11 OS=Solanum tuberosum
OX=4113 PE=1 SV=1
ESPLPKPVLDTNGKELNPDSSYRIISIGRGALGGDVYLGKSPNSDAPCPDGVFRYNSDVG
PSGTPVRFIPLSGGIFEDQLLNIIQFNIATVKLCVSYTIWKVGNLNAYFRMTLLETGGTIG
QADSSYFKIVKLSNFGYNLLYCPITPPFLCPCFRDDNFCAKVGVVVIQNGKRRLLALVNENP
LDVLFQEV
Theoretical pI/Mw: 7.79 / 20589.64
```

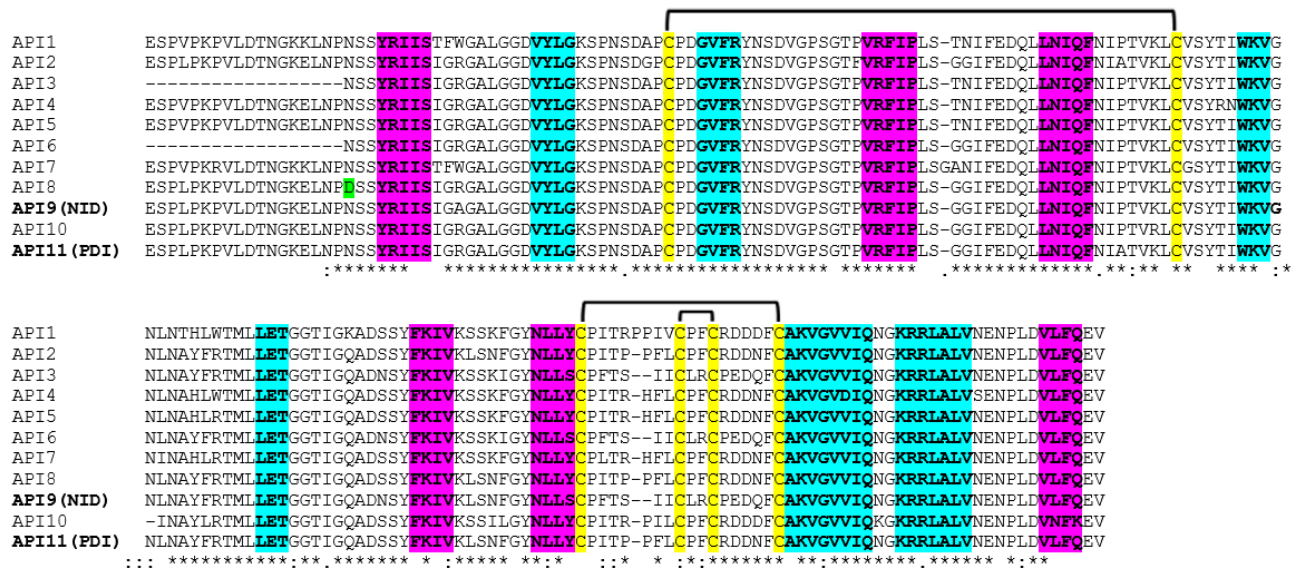
### NID

```
>sp|P58521|API9_SOLTU Aspartic protease inhibitor 9 OS=Solanum tuberosum
OX=4113 PE=1 SV=1
ESPLPKPVLDTNGKELNPNSSYRIISIGAGALGGDVYLGKSPNSDAPCPDGVFRYNSDVG
PSGTPVRFIPLSGGIFEDQLLNIIQFNIPTVKLCVSYTIWKVGNLNAYFRMTLLETGGTIG
QADNSYFKIVKLSNFGYNLLSCPFTSIIICLRCPEDQFCAKVGVVVIQNGKRRLLALVNENPL
DVLFQEV
Theoretical pI/Mw: 6.53 / 20368.38
```

### **Obr. 4.1: Aminokyselinová sekvence proteinů rPDI a NID.**

Aminokyselinová sekvence proteinů rPDI (rekombinantní PDI) a NID ze sekvenční databáze UniProt. U inhibitoru rPDI bylo cíleně vypnuto místo pro N-glykosylaci pomocí substituce N19D (zvýrazněno červeně). Uvedeny jsou teoretické hodnoty isoelektrického bodu (pI) a molekulové hmotnosti (Mw) pro oba proteiny vypočtené ze sekvence pomocí programu ExPASy (SIB Swiss Institute of Bioinformatics).

Na obr. 4.2 je přiřazení aminokyselinových sekvencí PDI a NID v rámci všech 11 anotovaných sekvencí isoinhibitorů API (z angl. „aspartic protease inhibitor“) z lilku bramboru, které jsou dostupné v databázi UniProt.



**Obr. 4.2: Přiřazení aminokyselinových sekvencí PDI, NID a dalších isoinhibitorů API z databáze UniProt.**

Analyzováno bylo 11 anotovaných sekvencí isoinhibitorů API („aspartic protease inhibitor“) z lilku bramboru (*S. tuberosum*) uvedených v databázi UniProt včetně sekvencí pro PDI a NID. Sekundární struktury  $\beta$ -skládaného listu tvoří u inhibitorů Kunitzovy rodiny architekturu tzv.  $\beta$ -trojlístku, který se skládá ze dvou domén (zvýrazněny modře a fialově). Žlutě jsou zvýrazněny cysteiny tvořící disulfidické můstky (znázorněny svorkou). Zeleně je zvýrazněna přirozená mutace N19D u isoinhibitoru API8. Velikost bloků je dělaná jako konsensus podle krystalografických struktur. Přiřazení sekvencí bylo provedeno programem ClustalW (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>) a upraveno podle superpozice prostorových struktur proteinů PDI a NID v programu PyMol.

Syntetické geny pro rPDI a NID byly získány od firmy GenScript (USA) a dodány ve formě lyofilizovaného plasmidu pUC19. Práce byla primárně zaměřena na isoinhibitor PDI, pro který byla

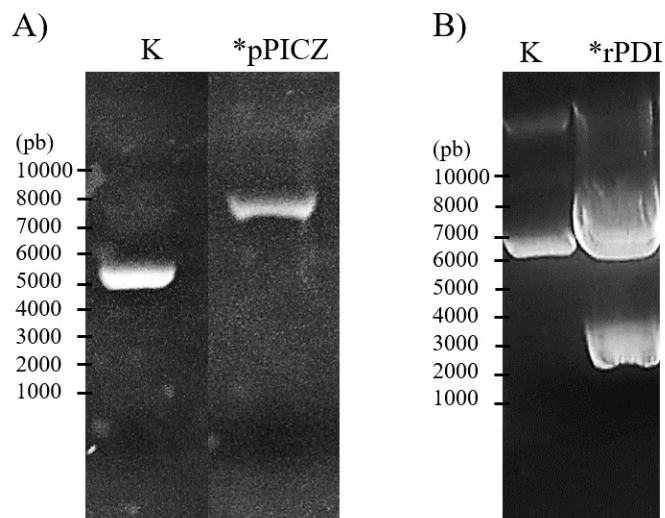
realizována příprava expresního systému, produkce v kvasinkách *P. pastoris*, purifikace a následná identifikace a funkční charakterizace. Příprava NID probíhala stejným postupem jako pro rPDI, nicméně byla z časových důvodů ukončena pilotní expresí a identifikací produktu v expresním médiu. Na základě obdobných fyzikálně-chemických vlastností proteinů NID a PDI, lze předpokládat, že postup izolace rPDI, bude možné využít i pro přípravu čistého isoinhibitoru NID.

#### 4.1 Amplifikace komerčního plasmidu pUC19 s genem pro rPDI a NID

Pro získání dostatečného množství materiálu k přípravě expresních vektorů pPICZ $\alpha$ A byly plasmidy pUC19 s geny pro rPDI a NID amplifikovány v buňkách *E. coli* NEB 5-alpha. Transformace plasmidů do kompetentních buněk byla provedena teplotním šokem a pozitivní kolonie selektovány na Petriho miskách s LB agarom obsahujícím Ampicilin. Pro každý plasmid byla vybrána jedna kolonie pro velkoobjemovou produkci v LB médiu. Bylo získáno 1,9 mg plasmidu pPUC19 s genem rPDI a 2,0 mg plasmidu pPUC19 s genem NID.

#### 4.2 Příprava expresního plasmidu pPICZ $\alpha$ A

Ze získaných plasmidů pPUC19 obsahující geny pro rPDI a NID byly pomocí restričních endonukleas (*XhoI* a *NotI*) vyštěpeny inserty, které byly následně ligovány do expresního plasmidu pPICZ $\alpha$ A, linearizovaného stejnými restričními enzymy. Průběh štěpení byl analyzován na agarosové elektroforéze (obr. 4.3).



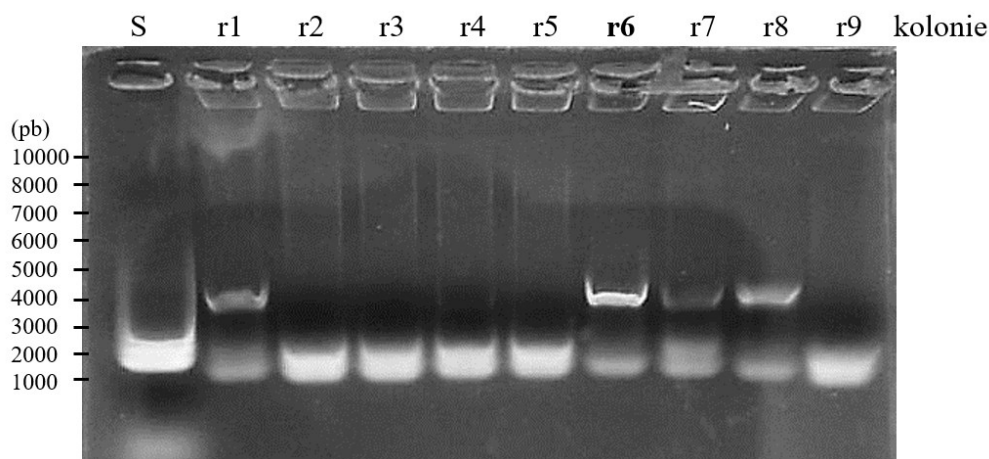
**Obr. 4.3: Agarosová elektroforéza štěpeného plasmidu pPICZαA a insertu rPDI v plasmidu pPUC19.**

A) Plasmid pPICZαA štěpený pomocí restričních endonukleas XhoI a NotI (\*pPICZ). Jako kontrola správného průběhu štěpící reakce byl použit neštěpený plasmid (K).  
 B) Plasmid pPUC19 obsahující inserty pro rPDI štěpený pomocí restričních endonukleas XhoI a NotI (\*rPDI). Jako kontrola správného průběhu štěpící reakce byly použity neštěpené plasmidy obsahující insert pro rPDI (K). Standardy molekulové hmotnosti (S) jsou uvedeny v pb (páry bází).

Inserty byly izolovány z gelu a ligovány do plasmidu pPICZαA pomocí T4 DNA ligasy. Výsledné vektory byly transformovány do kompetentních buněk *E. coli* NEB 5-alpha metodou teplotního šoku.

Narostlé kolonie byly použity jako templát pro PCR reakci, která měla potvrdit přítomnost insertu v plasmidu. Produkty PCR reakce byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (obr. 4.4). Pro každý vektor (rPDI a NID) byla vybrána jedna kolonie obsahující plasmid s insertem, která byla použita pro produkci plasmidu ve velkém objemu. Výsledné plasmidové DNA byly

isolovány a správnost jejich sekvencí byla ověřena DNA sekvenováním. Bylo získáno 1,8 mg plasmidu pPICZ $\alpha$ A s genem rPDI a 1,9 mg s genem NID.



**Obr. 4.4:** Agarosová elektroforéza po PCR reakci z bakteriálních kolonií transformovaných plasmidem pPICZ $\alpha$ A obsahující insert pro rPDI

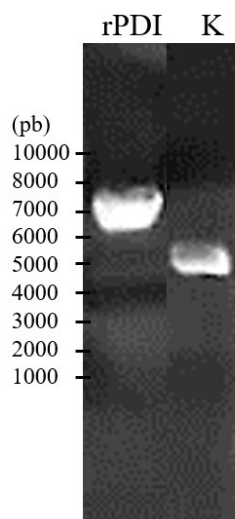
Na agarosový gel byly nanášeny produkty PCR reakce z bakteriálních kolonií po transformaci plasmidem pPICZ $\alpha$ A obsahujícím insert rPDI (r1 - r9). Pozitivní kolonie r6 (vyznačená tučně), byla vybrána pro další práci. Standardy molekulové hmotnosti (S) jsou uvedeny v pb (páry bází).

### 4.3 Elektroporace do *Pichia pastoris*

Rekombinantní exprese rPDI a NID byla provedena v methylotrofních kvasinkách *P. pastoris* (kmen X-33), do kterých byly vneseny expresní plasmidy pro produkci rPDI a NID pomocí elektroporace.

Linearizace expresních plasmidů před elektroporací byla provedena pomocí endonukleasy *Sac I*, která štěpí expresní plasmid pPICZ $\alpha$ A, ale neštěpí v genech pro rPDI a NID. Linearizované expresní plasmidy byly přechištěny ethanolovou precipitací a byla provedena kontrolní agarosová elektroforéza (obr. 4.5). Takto připravené plasmidy byly elektroporovány do připravených kompetentních buněk *P. pastoris*. Elektroporované buňky byly natřeny na Petriho misky s YPD

agarem obsahující antibiotikum Zeocin, který sloužil jako selekční marker. Pro každý konstrukt bylo získáno několik desítek pozitivních kolonií.



**Obr. 4.5: Kontrolní agarosová elektroforéza po linearizaci expresního plasmidu pPICZ $\alpha$ A s insertem pro rPDI.**

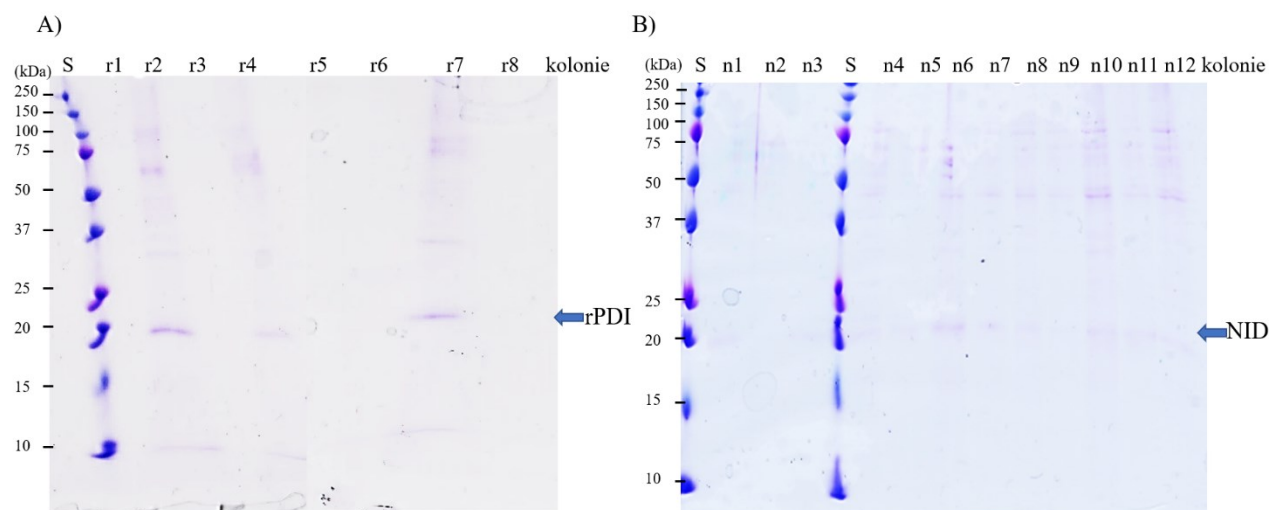
Na agarosový gel byl nanesen linearizovaný expresní plasmid pPICZ $\alpha$ A s genem rPDI. Jako kontrola sloužil nelinearizovaný plasmid (K). Standardy molekulové hmotnosti (S) jsou uvedeny v pb (páry bází).

#### 4.4 Rekombinantní exprese rPDI a NID v *Pichia pastoris*

rPDI a NID byly připraveny jako rekombinantní proteiny v methylotrofních kvasinkách *P. pastoris* (kmen X-33) podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2. BMG médium obohacené o antibiotikum Zeocin bylo zaočkováno transformovanými buňkami. Kultivace probíhala do hodnoty OD<sub>600</sub> = 4–5. Následně byly kvasinky zaočkovány do expresního média BMM, ve kterém byla exprese rPDI a NID indukována každodenním přídatkem methanolu (finální koncentrace 1 %), který *P. pastoris* metabolizuje jako její jediný zdroj uhlíku. Po šesti dnech byla exprese ukončena centrifugací a separací média. Přítomnost sekrečního  $\alpha$ -faktoru v plasmidu pPICZ $\alpha$ A zajistila účinnou sekreci rPDI a NID do média.



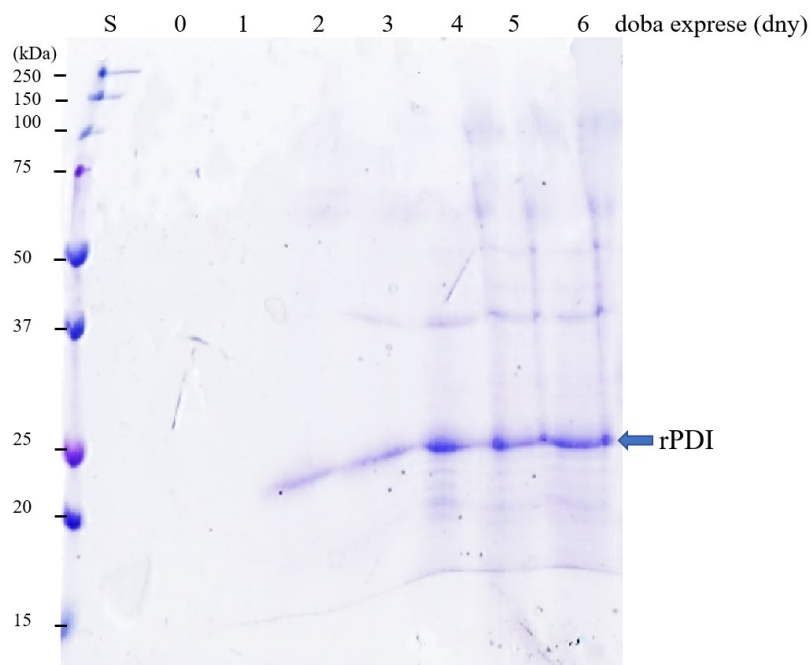
Nejprve byla provedena pilotní exprese v malém objemu (3 ml) expresního média BMM pro výběr optimálního kvasinkového klonu pro produkci rekombinantního proteinu. Exprese proteinu byla každý den indukována přidávkem methanolu a byla ukončena po 6 dnech. Produkce proteinů rPDI a NID byla analyzována na SDS-PAGE. Byla vybrána kolonie č. 2 (r2) pro rPDI a kolonie č. 10 (n10) pro NID (obr. 4.6), které produkovaly studované proteiny nejúčinněji.



**Obr. 4.6: SDS-PAGE analýza exprese rPDI a NID v jednotlivých koloniích *P. pastoris*.**

Na SDS-PAGE byly naneseny vzorky z expresního média BMM po šesti dnech kultivace a produkce rekombinantních proteinů. Jednotlivé kolonie obsahující rPDI (A) jsou označeny r1 až r8 a kolonie obsahující NID (B) jako n1 až n12. Gel byl obarven roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250, standardy molekulové hmotnosti (S) jsou uvedeny v kDa.

U expresního systému pro produkci rPDI byla optimalizována doba exprese. Vybraná kolonie č. 2 byla kultivována v 500 ml expresního média BMM a exprese proteinu byla každý den indukována přidávkem metanolu. Z média bylo každý den odebráno 250  $\mu$ l pro analýzu produkce proteinu pomocí SDS-PAGE. Z obr. 4.7 je patrné, že množství rPDI akumulovaného v médiu kontinuálně rostlo v čase po dobu šesti dnů.



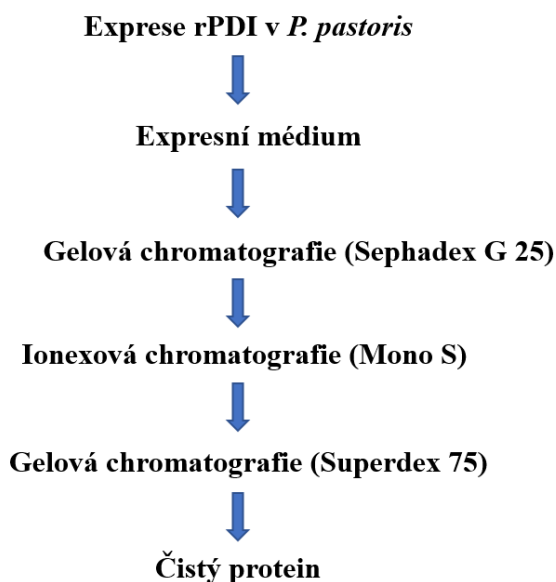
**Obr. 4.7: SDS-PAGE analýza průběhu akumulace rPDI v kultivačním médiu.**

Na SDS-PAGE byly nanесeny vzorky z kultivačního média BMM pro expresi rPDI, které byly odebrány každý den po dobu 6 dnů. Gel byl obarven roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250, standardy molekulové hmotnosti (S) jsou uvedeny v kDa. Elektroforéza prokázala, že množství produkovaného rPDI v médiu kontinuálně rostlo.

Následně byla s vybranou kolonií č. 2 provedena exprese ve velkém objemu média (6x 500 ml BMM média) s cílem získat dostatečné množství proteinu rPDI pro jeho purifikaci a následnou biochemickou charakterizaci. Exprese probíhala podle postupu popsaného v kapitole 3.2.1.9. po dobu šesti dnů. Získané médium obsahující exprimovaný protein bylo centrifugací separováno od buněk, a následně zahuštěno lyofilizací na výsledný objem přibližně 50 ml.

## 4.5 Chromatografická purifikace rPDI

Pro purifikaci rPDI z expresního média byl navržen tříkrokový chromatografický postup uvedený na obr. 4.8. Nejprve byla pomocí gelové chromatografie na nosiči Sephadex G 25 získána proteinová frakce, která byla přečištěna iontoměničovou chromatografií na koloně Mono S. Závěrečným krokem purifikace byla gelová chromatografie na koloně Superdex 75. Jednotlivé chromatografie probíhaly na systému FPLC (z angl. „Fast Protein Liquid Chromatography“).



**Obr. 4.8:** Schéma navrženého purifikačního postupu pro separaci rPDI.

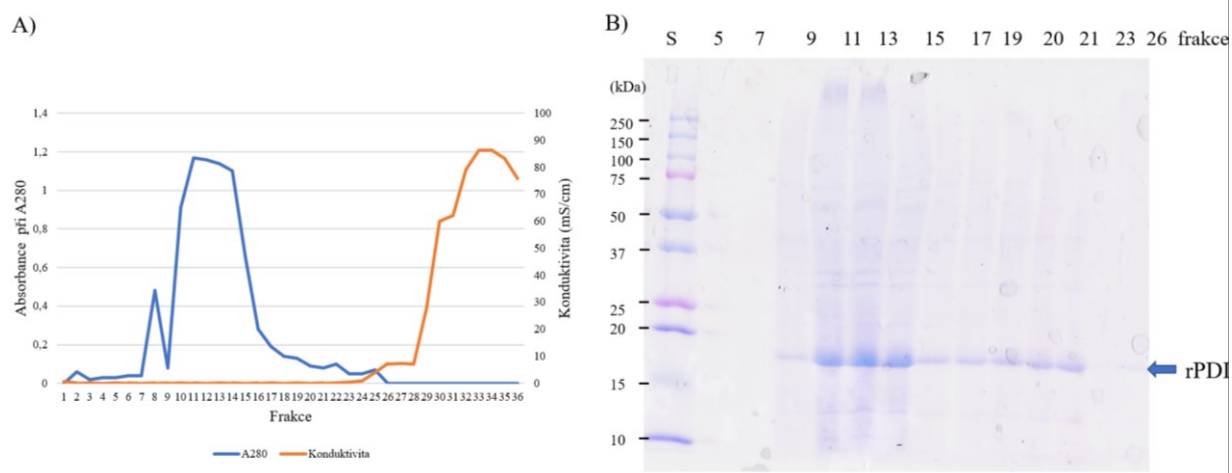
*V postupu jsou uvedeny typy chromatografií a kolon, které byly použity pro purifikaci rPDI z kultivačního média *P. pastoris*.*

### 4.5.1 Purifikace pomocí gelové chromatografie na koloně Sephadex G

#### 25

Proteinová frakce obsahující rPDI byla získána pomocí gelové chromatografie na koloně Sephadex G 25 (viz kap. 3.2.3.1). Na kolonu bylo nanášeno kultivační médium zahuštěné lyofilizací na objem přibližně 50 ml. Průběh chromatografie byl analyzován pomocí měření absorbance při

$\lambda = 280 \text{ nm}$  a konduktivity. Z vybraných frakcí byly odebrány vzorky (200  $\mu\text{l}$ ), které byly analyzovány na SDS-PAGE (obr. 4.9). Frakce č. 9 až 23, které obsahovaly rPDI, byly spojeny a zahuštěny na koncentrační jednotce s filtrem MWCO 10 kDa na výsledný objem přibližně 50 ml.



**Obr. 4.9: Příprava proteinové frakce rPDI z expresního média.**

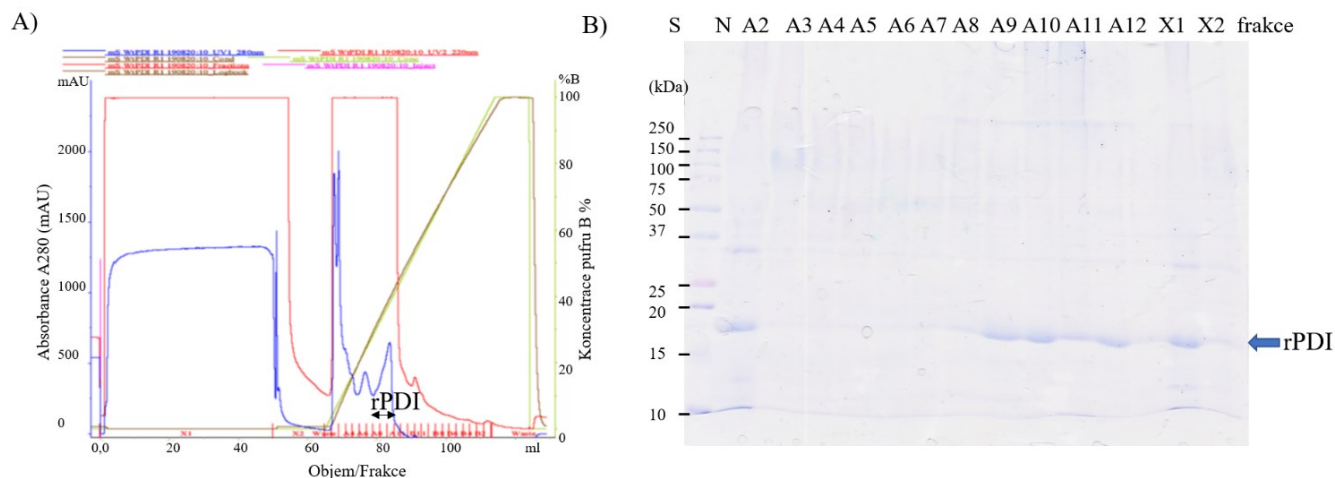
A) Záznam průběhu chromatografie na koloně Sephadex G 25 s měřením absorbance při 280 nm (modrá křivka) a konduktivity (oranžová křivka) v jednotlivých frakcích (objem 5 ml).  
 B) SDS-PAGE analýza vybraných frakcí z kolony Sephadex G 25. Pro analýzu byly použity vzorky z vybraných frakcí v rozmezí 5–26, které podle měření absorbance obsahovaly proteiny. Gel byl obarven roztokem Coomassie Brilliant Blue G-250, standardy molekulové hmotnosti (S) jsou uvedeny v kDa.

#### 4.5.2 Purifikace pomocí iontoměničové chromatografie na koloně

##### Mono S

Získaná proteinová frakce z kolony Sephadex G 25 obsahující rPDI byla dále separována pomocí iontoměničové chromatografie (katex) na koloně Mono S. Složení a pH pufrů pro tuto kolonu bylo navrženo na základě hodnoty pI proteinu ( $pI = 7,8$ ), která byla vypočtena z aminokyselinové sekvence rPDI v programu „Compute pI/MW“.

Na kolonu Mono S byla nanášena zahuštěná proteinová frakce, která byla zředěna nanášecím pufrům (50 mM acetát sodný, pH 4,0). Eluce probíhala lineárním gradientem 0–1 M chloridem sodným (kap. 3.2.2.2). Frakce, které dle chromatogramu obsahovaly proteiny, byly analyzovány na SDS-PAGE a frakce A6–A12 obsahující rPDI byly spojeny a zahuštěny na koncentrační jednotce s filtrem MWCO 10 kDa.



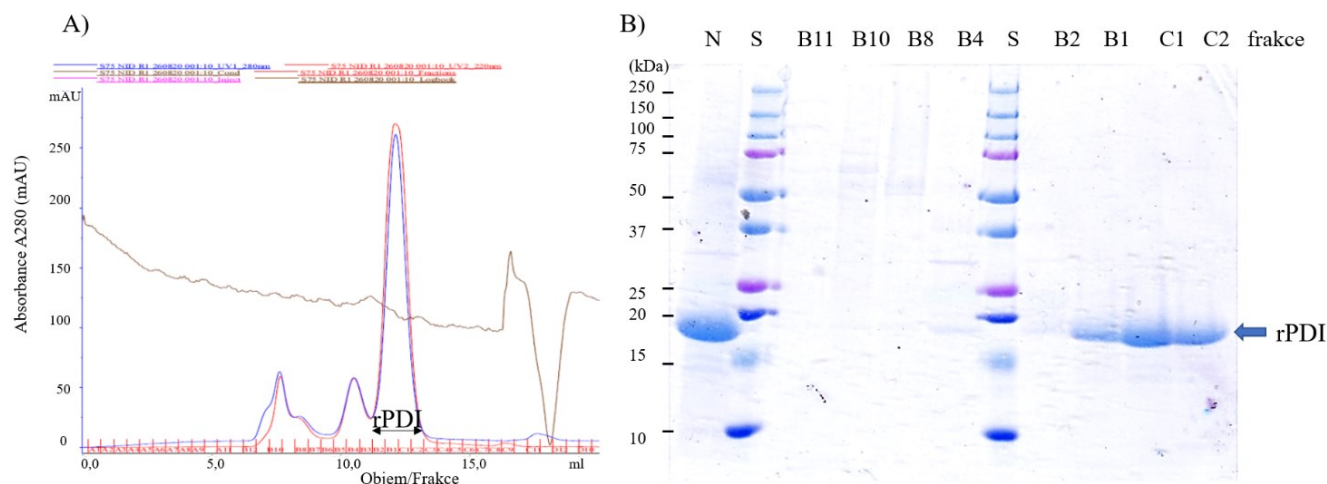
**Obr. 4.10: Separace rPDI pomocí iontoměničové chromatografie na koloně Mono S.**

A) Záznam průběhu chromatografie na koloně Mono S při pH 4,0. Kontinuálně byla měřena absorbance při 280 nm (levá osa, modře), vyznačena jsou procenta elučního pufru (pravá osa, zeleně), eluční objem a frakce (objem 2 ml). Dále je na chromatogramu uvedena absorbance při 220 nm (červeně) a konduktivita (hnědě). Chromatogram byl upraven v programu UNICORN.

B) Frakce, které obsahovaly protein, byly analyzovány na SDS-PAGE. Na gel byly nanášeny jednotlivé frakce označené podle chromatogramu jako A2–A12, vzorek z nánosu (N), nenavázaná frakce (X1) a promývací frakce (X2). Gel byl obarven roztokem Coomassie Brilliant Blue G-250, standardy molekulové hmotnosti (S) jsou uvedeny v kDa.

### 4.5.3 Purifikace pomocí gelové chromatografie na koloně Superdex 75

Finální purifikovaný preparát rPDI byl získán gelovou chromatografií na koloně Superdex 75. Přefiltrovaný vzorek (100  $\mu$ l) byl nanesen na kolonu ekvilibrovanou elučním puforem (50 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 8,5). Vybrané frakce, které dle chromatogramu obsahovaly protein, byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Frakce B2–C3, ve kterých byla prokázána přítomnost proteinu rPDI, byly zahuštěny na centrifugačním koncentrátoru s filtrem MWCO 10 kDa a zmraženy pro další použití.



**Obr. 4.11: Separace rPDI pomocí gelové chromatografie na koloně Superdex 75.**

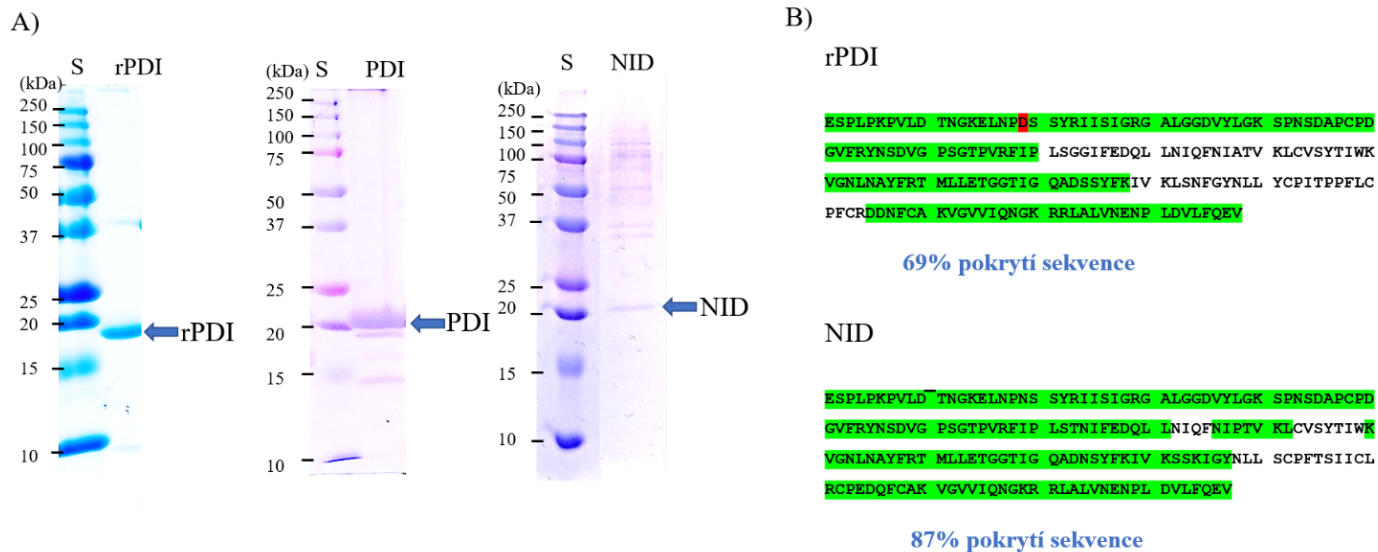
A) Záznam průběhu gelové chromatografie na koloně Superdex 75. Kontinuálně byla monitorována absorbance při 280 nm (modře) a konduktivita (hnědě), vyznačen je eluční objem a frakce (objem 0,5 ml). Frakce, ve kterých byl dle chromatogramu přítomen protein, byly analyzovány na SDS-PAGE. Chromatogram byl upraven v programu UNICORN.

B) SDS-PAGE analýza vybraných chromatografických frakcí. Jednotlivé frakce jsou značeny B11–C2 a vzorek, který byl nanesen na kolonu, je označen jako N. Gel byl obarven roztokem Coomassie Brilliant Blue G-250, standardy molekulové hmotnosti (S) jsou uvedeny v kDa. Frakce B2–C2, které obsahovaly rPDI, byly spojeny.

Pomocí SDS-PAGE byl získaný preparát rPDI porovnán s nativním PDI izolovaným z přírodního zdroje a s nepřečištěným vzorkem NID (k tomuto účelu byl použit alikvot expresního média z kolonie č. 10 produkující NID) (obr. 4.12 A). Jediný pás rPDI o velikosti cca 20 kDa prokázal, že byl získán preparát o vysoké čistotě. Vzorek nativního PDI obsahuje minoritní proteinové kontaminace o nižší molekulové hmotnosti. NID, který neprošel purifikačním protokolem, naopak obsahoval více kontaminujících proteinů. Dále je patrné, že nativní PDI má větší molekulovou hmotnost (cca 21 kDa) díky N-glykosylaci v poloze Asn19.

Pro vzorky rPDI a NID byla provedena sekvenční identifikace pomocí N-koncového sekvenování prvních osm aminokyselin (kap. 3.2.3.4) a pomocí peptidového mapování hmotnostní spektrometrií, které poskytlo vysoké pokrytí aminokyselinové sekvence (69 % pro rPDI a 87 % pro NID) (obr. 4.12 B, kap. 3.2.3.5).

Celkový výtěžek rPDI byl cca 1,8 mg z jednoho litru expresního média a výsledná koncentrace čistého preparátu byla stanovena pomocí aminokyselinové analýzy (kap. 3.2.3.6) na 110  $\mu$ M. Získaný rPDI byl dále použit pro stanovení inhibice vybraných enzymů.



**Obr. 4.12: Porovnání preparátů rPDI, nativního PDI a NID pomocí SDS-PAGE a identifikace rPDI a NID pomocí peptidového mapování hmotnostní spektrometrií.**

A) Srovnávací SDS-PAGE analýza purifikovaného preparátu rPDI, nepřečištěného vzorku NID a nativního PDI izolovaného z přírodního zdroje. Použitý vzorek NID byl získán z expresního média odsolením na koloně Zeba Spin Desalting Column. Gely byly obarveny roztokem Coomassie Brilliant Blue G-250 a R-250, standardy molekulové hmotnosti (S) jsou uvedeny v kDa.

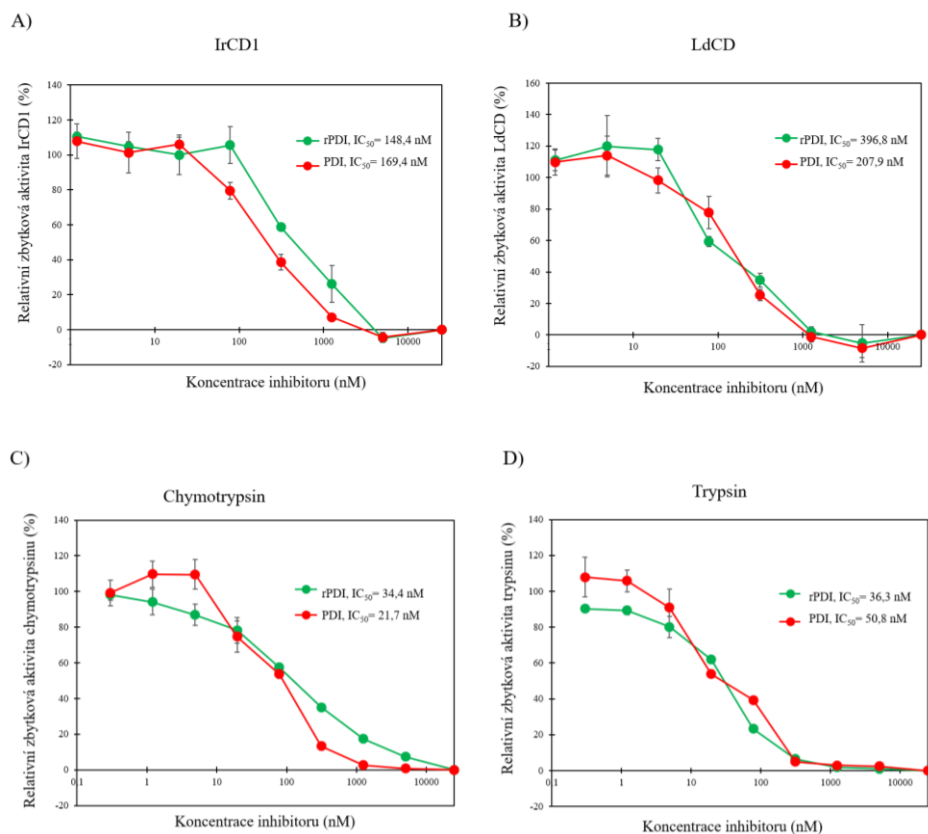
B) Analýza aminokyselinové sekvence rPDI a NID pomocí peptidového mapování hmotnostní spektrometrií byla provedena z příslušných pásů SDS-PAGE gelu. Zeleně jsou označeny identifikované úseky sekvence (s uvedeným pokrytím sekvence v %) a červeně substituce N19D, která byla zavedena do sekvence rPDI a poskytuje deglykosylovanou variantu proteinu.



## 4.6 Analýza inhibiční specifity rPDI a nativního PDI

### 4.6.1 Kinetické měření inhibice vybraných proteolytických enzymů s rPDI a nativním PDI

Výsledný preparát purifikovaného rPDI byl použit pro stanovení inhibiční aktivity s vybranými peptidasami. Pro porovnání byla také změřena inhibiční aktivita pro nativní PDI, izolovaný z přírodního zdroje. Pro inhibiční analýzu byly vybrány: (a) tři reprezentativní zástupci aspartátových peptidas z rodiny A1 - katepsin D z mandelinky bramborové (LdCD), katepsin D z klíštěte obecného (IrCD1) a vepřový pepsin, (b) dva zástupci serinových peptidas z rodiny S1 - hovězí trypsin a hovězí chymotrypsin. Kinetické měření bylo provedeno v mikrotitrační destičce na fluorescenční čtečce s fluoregenními substráty s AMC skupinou nebo systémem FRET (z angl. „Fluorescence Resonance Energy Transfer“) (kap. 3.2.4.1). Závislost zbytkové aktivity jednotlivých peptidas v přítomnosti rPDI a nativního PDI je graficky znázorněno na obr. 4.13. rPDI je schopen v nanomolárních koncentracích účinně inhibovat oba zástupce serinových peptidas a v submikromolárních koncentracích zástupce aspartátových peptidas typu katepsinu D. Pro samotný pepsin nebyla prokázána inhibice až do koncentrace inhibitoru 5  $\mu\text{M}$  (tab. 4.1), což je v souladu s původním zjištěním (Keilová a Tomášek 1972). Analogický inhibiční profil s velmi podobnými hodnotami inhibičního parametru  $\text{IC}_{50}$  byl pozorován i pro nativní PDI. Tento výsledek prokazuje, že rekombinantně připravený rPDI má stejné funkční vlastnosti jako nativní PDI a že N-glykosylace (přítomna na nativním PDI a nepřítomna na rPDI) nemá vliv na inhibiční vlastnosti.



**Obr. 4.1: Kinetické měření inhibice vybraných aspartátových a serinových peptidas s rPDI a nativním PDI**

Závislost relativní zbytkové aktivity testovaných peptidas na koncentraci inhibitoru rPDI nebo nativního PDI (neinhibovaná aktivita odpovídá 100 %). Analyzované peptidasy: A) katepsin D z klišťete obecného (IrCD1), B) katepsin D z mandelinky bramborové (LdCD), C) hovězí trypsin a D) hovězí chymotrypsin. Grafy byly připraveny v programu Excel a hodnoty inhibičního parametru  $IC_{50}$  byly určeny pomocí programu GraFit Data Analysis Software.

#### 4.6.2 Stanovení inhibiční konstanty IC<sub>50</sub> pro inhibitory rPDI a PDI

Inhibiční parametr IC<sub>50</sub> byl určen pro testované aspartátové a serinové peptidasy, které byly účinně inhibovány pomocí rPDI a PDI. Ze závislosti zbytkové rychlosti štěpení substrátů na koncentraci inhibitoru byla určena hodnota IC<sub>50</sub> vyhodnocením v programu GraFit Data Analysis Software (Erithacus, Velká Británie). Přesné koncentrace rPDI a PDI byly stanoveny pomocí aminokyselinové analýzy (kap. 3.2.3.6). Výsledné hodnoty IC<sub>50</sub> jsou uvedeny v tab. 4.1.

**Tab. 4.1: Srovnání hodnot IC<sub>50</sub> pro rPDI a nativní PDI při inhibici aspartátových a serinových peptidas**

*Inhibiční parametr IC<sub>50</sub> byl určen z kinetického měření zbytkové inhibice enzymové aktivity jednotlivých peptidas a vyhodnocen v programu GraFit Data Analysis (obr. 4.13). Hodnoty IC<sub>50</sub> jsou uvedeny v nM. Přesná koncentrace inhibitorů rPDI a nativního PDI byla stanovena pomocí aminokyselinové analýzy.*

<b>Třída peptidas</b>	<b>Peptidasa</b>	<b>Inhibitor</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nM)</b>
<b>Aspartátové</b>	Katepsin D z klíštěte	rPDI	396,8 ± 13,8
	obecného (IrCD1)	PDI	207,9 ± 12,3
	Katepsin D z mandelinky	rPDI	148,4 ± 24,6
	bramborové (LdCD)	PDI	169,4 ± 13,8
<b>Serinové</b>	Vepřový pepsin	rPDI	> 5 000
		PDI	> 5 000
	Hovězí trypsin	rPDI	34,4 ± 0,9
		PDI	21,7 ± 5,7
Hovězí chymotrypsin	rPDI	36,3 ± 6,8	
	PDI	50,8 ± 9,1	

## 5. Diskuze

Rostlinné proteiny z Kunitzovy rodiny jsou doposud málo prostudovanou skupinou peptidasových inhibitorů zejména pokud jde o vztah mezi jejich komplexními biochemickými funkcemi a molekulární strukturou. Zástupci Kunitzových inhibitorů se vyznačují konzervovanou architekturou tzv.  $\beta$ -trojlístku a unikátní širokou inhibiční specifitou proti cysteinovým, aspartátovým a serinovým peptidasám, přičemž jednotlivé inhibitory mohou mít spektrum cílových peptidas velmi odlišné (Srp a Mareš 2016). Proteiny Kunitzovy rodiny jsou obecně velmi diverzifikované ve svých biologických funkcích, a tak kromě inhibitorů peptidas jsou známé také např. jako proteiny schopné vázat chlorofyl (Horigome a kol. 2007) nebo sacharidy (Ferreira a kol. 2013), interagovat s chuťovými receptory (Koizumi a kol. 2011) nebo regulovat amylasy (Vallée a kol. 1998). Peptidasové inhibitory z Kunitzovy rodiny se vyznačují výskytem isoinhibitorů, které mohou obsahovat jedno nebo dvě reaktivní centra pro interakci s peptidasami.

Předkládaná diplomová práce se zabývá dvěma Kunitzovými inhibitory z lilku brambor (*Solanum tuberosum*), které jsou označovány jako PDI (z angl. „potato cathepsin D inhibitor“) a NID (z angl. „novel cathepsin D inhibitor“). Oba studované isoinhibitory mají obdobné funkční vlastnosti – inhibují jednak aspartátové peptidasy a také serinové peptidasy (Mareš a kol. 1989, Ritonja a kol. 1990). Jádro obou inhibitorů se skládá ze struktury  $\beta$ -trojlístku, které je propojeno flexibilními smyčkami, na kterých se nacházejí předpokládaná reaktivní centra pro vazbu peptidas (Guerra a kol. 2016, Guo a kol. 2015). Přesná lokalizace reaktivních center však zatím není známá. Sekvence NID a PDI jsou téměř identické (93 % shoda), přičemž nejvíce aminokyselinových záměn je ve smyčce L9, která obsahuje dva disulfidové můstky (obr. 5.1).

Cílem diplomové práce bylo získat dostatečné množství čistého rekombinantního proteinu PDI (rPDI) v neglykosylované formě a biochemicky ho charakterizovat. rPDI byl připraven v kvasinkovém expresním systému *Pichia pastoris* a z kultivačního média separován pomocí více krokové chromatografické purifikace. Výtěžek čistého rPDI byl 1,2 mg z 1 litru média, což je srovnatelné množství proteinu, které bylo získáno v předchozích studiích popsaných v literatuře pro

Kunitzovy inhibitory produkované expresními systémy v *E. coli* (Bao a kol. 2009, Li a kol. 2000, Dasgupta a kol. 2006) a *P. pastoris* (Guerra a kol. 2016, Fischer a kol. 2002, Micheelsen a kol. 2008). Postup pro přípravu expresního systému a samotná produkce rPDI byla použita pro isoinhibitor NID. Tato práce byla ukončena úspěšnou expresí NID a jeho identifikací pomocí hmotnostní spektrometrie a N-koncového sekvenování. Díky obdobným fyzikálně-chemickým vlastnostem (molekulová hmotnost a hodnota pI) proteinů PDI a NID lze předpokládat, že purifikační protokol vyvinutý pro rPDI bude možné aplikovat i na NID.

Z SDS-PAGE analýzy rekombinantní formy rPDI a nativního PDI izolovaného z lilku bramboru (obr. 4.12) je patrné, že přírodní izolát má větší molekulovou hmotnost, jelikož obsahuje N-glykosylaci na zbytku Asn19. Tato posttranslační modifikace byla u rPDI cíleně vypnuta na úrovni syntetického genu z důvodu budoucího využití připraveného materiálu pro krystalizaci a rentgenostrukturní analýzu. Dále bylo zjištěno, že izolovaný preparát není tak čistý jako rekombinantně připravený rPDI, přestože prošel více purifikačními kroky.

Rekombinantní forma rPDI a nativní PDI byly dále porovnány, pokud jde o jejich funkční vlastnosti. Inhibiční specifita byla analyzována se třemi aspartátovými peptidasami (pepsin, LdCD – katepsin D z mandelinky bramborové, IrCD1 – katepsin D z klíštěte obecného) a dvěma serinovými peptidasami (trypsin, chymotrypsin). Bylo zjištěno, že rPDI je schopen inhibovat jednak enzymy typu katepsinu D z aspartátových peptidas rodiny A1 a jednak zástupce serinových peptidas rodiny S1. Z testovaných peptidas nebyl rPDI schopen inhibovat pepsin (do koncentrace 50  $\mu$ M). Tento výsledek je v souladu s inhibičními vlastnostmi, které byly nalezeny pro přírodní isoinhibitor typu PDI, včetně neschopnosti inhibovat pepsin (Keilová a Tomášek 1972). Inhibiční působení PDI na LdCD bylo již dříve prokázáno (Srp 2010), v této práci ale byla poprvé tato interakce potvrzena na úrovni rekombinantních proteinů a byla změřen inhibiční parametr  $IC_{50}$ . Porovnání rPDI a nativního PDI prokázalo analogickou inhibiční specifitu, z čehož lze vyvodit závěr, že N-glykosylace v pozici Asn19 není potřeba pro inhibici serinových a aspartátových peptidas. Vliv glykosylace na inhibiční vlastnosti byly zkoumány již u isoinhibitoru NID, přičemž byl získán stejný výsledek jako v případě PDI (Guerra a kol. 2016).

PDI je inhibitor aspartátových i serinových peptidas a řadí se tak mezi tzv. bifunkční inhibitory. Reaktivní centrum pro vazbu peptidas na molekule PDI není doposud známé, proto nelze určit, zda je využíváno jedno centrum společné pro serinové i aspartátové peptidasy nebo jestli existují dvě různá reaktivní centra. Dvě reaktivní centra pro vazbu trypsinu má tzv. dvouhlavý inhibitor API-A z Kunitzovy rodiny ze šípátky středolisté (*Sagittaria sagittifolia*). K vazbě dvou molekul trypsinu dochází díky tomu, že tato centra jsou lokalizována na opačných stranách molekuly API-A a nedochází tak ke sterickému bránění při vazbě. Pomocí mutační analýzy v kombinaci s enzymologickými testy bylo prokázáno, že jednotlivá reaktivní centra na molekule API-A nejsou rovnocenná a lze je podle síly inhibice rozlišit (Bao a kol. 2009). Z výsledků diplomové práce nelze vyvodit, zda PDI je schopen vázat jednu molekulu trypsinu jako je tomu např. u inhibitoru STI (Song a Suh 1998) nebo dvě molekuly jako inhibitor API-A. Vznik ternárního komplexu bifunkčního inhibitoru PDI s aspartátovou i serinovou peptidasou je pravděpodobně znemožněn odlišnými pH optimy těchto peptidas (kyselé pH optimum pro aspartátové peptidasy a bazické pro serinové peptidasy).

Pozice reaktivního centra pro serinové peptidasy na molekule PDI a NID lze predikovat z analýzy sekvencí jiných inhibitorů z Kunitzovy rodiny, u kterých byla tato centra identifikována pomocí proteinové krystalografie jejich komplexu se serinovou peptidasou trypsinem. Přiřazení aminokyselinových sekvencí na obr. 5.1 ukazuje, že reaktivní centrum na PDI a NID pro vazbu serinových peptidas bude pravděpodobně lokalizováno na smyčce L5, stejně jako je jedno z center na molekule API-A, nikoliv v pozici jako u STI (smyčka L4).



peptidasami. Tyto komplexy budou studovány pomocí rentgenostrukturní analýzy za účelem identifikace reaktivních center. Rekombinantní exprese PDI a NID dále umožňuje připravit inhibitory cíleně mutované v pozicích predikovaných reaktivních center a analyzovat u nich vztahy mezi strukturou a funkcí. Získané výsledky mají využití při navrhování modifikovaných inhibitorů z Kunitzovy rodiny s optimalizovanými vlastnostmi, které lze využít při konstrukci odolných transgenních plodin jako proteinové bioinsekticidy cílené proti herbivornímu hmyzu.



## 6. Závěr

Diplomová práce se zabývala peptidasovými inhibitory PDI a NID z lilku brambor (*Solanum tuberosum*). Tyto proteiny z Kunitzovy rodiny jsou považovány za obranné molekuly rostliny, ale biochemické aspekty jejich interakcí nejsou zatím známy.

Hlavní výsledky diplomové práce jsou následující:

- Byly připraveny konstrukty plasmidu pPICZ $\alpha$ A s geny neglykosylované formy PDI (rPDI) a NID a byla s nimi provedena transformace kvasinek *Pichia pastoris*.
- Rekombinantní proteiny rPDI a NID byly exprimovány v kvasinkovém systému *P. pastoris* a jejich identita byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrie a N-koncového sekvenování.
- Pro purifikaci rPDI byl navržen protokol se třemi chromatografickými kroky.
- Inhibiční specifita rPDI byla analyzována pomocí kinetického fluorescenčního testu a byly určeny inhibiční parametry IC<sub>50</sub> s reprezentativními zástupci aspartátových peptidas z rodiny A1 a serinových peptidas z rodiny S1.
- Bylo prokázáno účinné inhibiční působení rPDI na aktivitu trávicí aspartátové peptidasy LdCD z mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*); tato interakce představuje obranný molekulární mechanismus rostliny před herbivorním hmyzem.
- Srovnání připraveného rPDI a nativního PDI z přírodního zdroje prokázalo jejich analogické funkční vlastnosti v inhibičních testech s aspartátovými a serinovými peptidasami.

Diplomová práce přinesla nové významné informace o inhibiční specifitě PDI. Připravený expresní systém a purifikační protokol umožní produkci isoinhibitorů rPDI a NID v dostatečném množství pro strukturní analýzu jejich reaktivních center a mechanismu interakce s cílovými peptidasami.

## Seznam použité literatury

1. Ahn, J. E., and K. Zhu-Salzman. 2009. "CmCatD, a Cathepsin D-like Protease Has a Potential Role in Insect Defense against a Phytocystatin." *Journal of Insect Physiology* 55 (8): 678–85.
2. Bao, R., C. Zhou, C. Jiang, S. Lin, C. Chi, and Y. Chen. 2009. "The Ternary Structure of the Double-Headed Arrowhead Protease Inhibitor API-A Complexed with Two Trypsins Reveals a Novel Reactive Site Conformation." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (39): 26676–84.
3. Barao, S., D. Moechars, S. F. Lichtenthaler, and B. De Strooper. 2016. "BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease." *Trends in Neurosciences* 39 (3): 158–69.
4. Beneš, P., V. Vetvicka, and M. Fusek. 2008. "Cathepsin D-Many Functions of One Aspartic Protease." *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 68 (1): 12–28.
5. Bode, W., and P. Schwager. 1975. "The Single Calcium-Binding Site of Crystallin Bovin Beta-Trypsin." *FEBS Letters* 56 (1): 139–43.
6. Bode, W., and R. Huber. 1992. "Natural Protein Proteinase Inhibitors and Their Interaction with Proteinases." *European Journal of Biochemistry* 204 (2): 433–51.
7. Brunelle, F., B. Nguyen-Quoc, C. Cloutier, and D. Michaud. 1999. "Protein Hydrolysis by Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa Decemlineata*, Digestive Proteases: The Catalytic Role of Cathepsin D." *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 42 (1): 88–98.
8. Buša, M. 2019. "Přirozené proteinové inhibitory proteolytických enzymů. " Bioprospect č.4, ročník 29.
9. Cater, S. A, W. E. Lees, J. Hill, J. Brzin, J. Kay, and L. H. Phylip. 2002. "Aspartic Proteinase Inhibitors from Tomato and Potato Are More Potent against Yeast Proteinase A than Cathepsin D." *Biochimica et Biophysica Acta* 1596 (1): 76–82.
10. Coates, L., H. F. Tuan, S. Tomanicek, A. Kovalevsky, M. Mustyakimov, P. Erskine, and J. Cooper. 2008. "The Catalytic Mechanism of an Aspartic Proteinase Explored with Neutron and X-Ray Diffraction." *Journal of the American Chemical Society* 130 (23): 7235–37.

11. Craik, C. S., S. Rocznik, C. Largman, and W. J. Rutter. 1987. "The Catalytic Role of the Active Site Aspartic Acid in Serine Proteases." *Science* 237 (4817): 909–13.
12. Dasgupta J., Khamrui S., Dattagupta J. K., Sen U.: *Biochemistry* 45, 6783 (2006).
13. Ferreira, R., D. Zhou, J. G. Ferreira, M. C. C. Silva, R. A. Silva-Lucca, R. Mentele, E. J. Paredes- in Human Prostate Cancer Cell Lines." *PloS One* 8 (6): e64426.
14. Fischer, G., Velthuizen, H., Shah, M., Nachtergaele, F. 2002. Global Agro-ecological Assessment for Agriculture in the 21st Century: Methodology and Results. IIASA, FAO, ISBN: 3704501417.
15. Gamero, et al. 2013. "Crystal Structure of Crataeva Tapia Bark Protein (CrataBL) and Its Effect in Human Prostate Cancer Cell Lines." *PloS One* 8 (6): e64426.
16. Gieselmann, V., A. Hasilik, and K. von Figura. 1985. "Processing of Human Cathepsin D in Lysosomes in Vitro." *The Journal of Biological Chemistry* 260 (5): 3215–20. 155.
17. Guerra, Y., Valiente A. P., Pons, T., Rudiño-Piñera, E. B. 2016. "Structures of a bi-functional Kunitz-type STI family inhibitor of serine and aspartic proteases: Could the aspartic protease inhibition have evolved from a canonical serine protease-binding loop?" *Journal of Structural Biology* 195: 259–271.
18. Guo, J., Erskine, T. E, Coker R. A., Wood, P. S., Cooper B. J. 2015. "Structure of a Kunitz-type potato cathepsin D inhibitor." *Journal of Structural Biology*, Volume 192, Issue 3, December 2015, Pages 554-560.
19. Hánová, I., J. Brynda, R. Houštická, N. Alam, D. Sojka, P. Kopáček, L. Marešová, et al. 2018. "Novel Structural Mechanism of Allosteric Regulation of Aspartic Peptidases via an Evolutionarily Conserved Exosite." *Cell Chemical Biology* 25 (3): 318–329.e4.
20. Harris. 2015. "Engineered Protease Inhibitors Based on Sunflower Trypsin Inhibitor-1 (SFTI-1) Provide Insights into the Role of Sequence and Conformation in Laskowski Mechanism Inhibition." *The Biochemical Journal* 469 (2): 243–53.
21. Hashida, S., T. Towatari, E. Kominami, and N. Katunuma. 1980. "Inhibitions by E-64 Derivatives of Rat Liver Cathepsin B and Cathepsin L in Vitro and in Vivo." *Journal of Biochemistry* 88 (6):1805–11.

22. Helland, R., J. Otlewski, O. Sundheim, M. Dadlez, and A. O Smalas. 1999. "The Crystal Structures of the Complexes between Bovine Beta-Trypsin and Ten P1 Variants of BPTI." *Journal of Molecular Biology* 287 (5): 923–42.
23. Horigome D, Satoh H, Itoh N, Mitsunaga K, Oonishi I, et al. (2007) Structural mechanism and photoprotective function of water-soluble chlorophyll-binding protein. *J Biol Chem* 289: 6525–6531.
24. Horn, M., M. Nussbaumerová, M. Šanda, Z. Kovářová, J. Srba, Z. Franta, D. Sojka, et al. 2009. "Hemoglobin Digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multi-peptidase Pathway by Functional Proteomics." *Cell Chemical Biology* 16 (10): 1053–63.
25. Houšteká, R., Hadzima, M., Fanfrlík, J., Brynda, J., Pallova, L., Hánova, I., Mertlíková-Kaiserova, H., Lepšík, M., Horn, M., Smrčina, M., Majer, P., Mareš, M. 2020 "Biomimetic Macrocyclic Inhibitors of Human Cathepsin D: Structure–Activity Relationship and Binding Mode Analysis." *J Med Chem.* 2020 Feb 27;63(4):1576-1596.
26. Hozumi, M., M. Ogawa, T. Sugimura, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1972. "Inhibition of Tumorigenesis in Mouse Skin by Leupeptin, a Protease Inhibitor from Actinomycetes." *Cancer Research* 32 (8): 1725–28.
27. Huntington, J. A. 2012. "Thrombin Plasticity." *Biochimica et Biophysica Acta* 1824 (1): 246–52.
28. Huntington, J. A., R. J. Read, and R. W. Carrell. 2000. "Structure of a Serpin-Protease Complex Shows Inhibition by Deformation." *Nature* 407 (6806): 923–26.
29. Christeller, J. T., P. C. Farley, R. J. Ramsay, P. A. Sullivan, and W. A. Laing. 1998. "Purification, Characterization and Cloning of an Aspartic Proteinase Inhibitor from Squash Phloem Exudate." *European Journal of Biochemistry* 254 (1): 160–67.
30. Jelinek, B., J. Antal, I. Venekei, and L. Graf. 2004. "Ala226 to Gly and Ser189 to Asp Mutations Convert Rat Chymotrypsin B to a Trypsin-like Protease." *Protein Engineering, Design and Selection* 17 (2): 127–31.
31. Kalinska, M. , U. Meyer-Hoffert, T. Kantyka, and J. Potempa. 2016. "Kallikreins - The Melting Pot of Activity and Function." *Biochimie* 122: 270–82.

32. Keilová, H., V. Tomašek. 1972. "Effect of Pepsin Inhibitor from *Ascaris Lumbricoides* on Cathepsin D and E." *Biochimica et Biophysica Acta* 284 (2): 461–64.
33. Knight, C. G., and A. J. Barrett. 1976. "Interaction of Human Cathepsin D with the Inhibitor Pepstatin." *The Biochemical Journal* 155 (1): 117–25.
34. Koizumi, A., A. Tsuchiya, K. Nakajima, K. Ito, T. Terada, A. Shimizu-Ibuka, L. Briand, T. Asakura, T. Misaka, and K. Abe. 2011. "Human Sweet Taste Receptor Mediates Acid-Induced Sweetness of Miraculin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (40): 16819–24.
35. Krowarsch, D., T. Cierpicki, F. Jelen, and J. Otlewski. 2003. "Canonical Protein Inhibitors of Serine Proteases." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 60 (11): 2427–44.
36. Krowarsch, D., M. Zakrzewska, A. O. Smalas, and J. Otlewski. 2005. "Structure-Function Relationships in Serine Protease-Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor Interaction." *Protein and Peptide Letters* 12 (5): 403–7.
37. Law, R. H. P., Q. Zhang, S. McGowan, A. M. Buckle, G. A. Silverman, W. Wong, C. J. Rosado, et al. 2006. "An Overview of the Serpin Superfamily." *Genome Biology* 7 (5): 216.
38. Lenarcic, B., and V. Turk. 1999. "Thyroglobulin Type-1 Domains in Equistatin Inhibit Both Papainlike Cysteine Proteinases and Cathepsin D." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (2): 563–66.
39. Li, M., L. H. Phylip, W. E. Lees, J. R. Winther, B. M. Dunn, A. Wlodawer, J. Kay, and A. Gustchina. 2000. "The Aspartic Proteinase from *Saccharomyces Cerevisiae* Folds Its Own Inhibitor into a Helix." *Nature Structural Biology* 7 (2): 113–17.
40. Li, M., Srp, J., Gustchina, A., Dauter, Z., Mares, M., Wlodawer, A. 2019. "Crystal structures of the complex of a kallikrein inhibitor from *Bauhinia bauhinioides* with trypsin and modeling of kallikrein complexes." *Acta Cryst. D* 75, 56-69
41. Lockett, S., R. S. Garcia, J. J. Barker, A. V. Konarev, P. R. Shewry, A. R. Clarke, and R. L. Brady. 1999. "High-Resolution Structure of a Potent, Cyclic Proteinase Inhibitor from Sunflower Seeds." *Journal of Molecular Biology* 290 (2): 525–33.

42. Majer, P., J. R. Collins, S. V. Gulnik, and J. W. Erickson. 1997. "Structure-Based Subsite Specificity Mapping of Human Cathepsin D Using Statine-Based Inhibitors." *Protein Science* 6 (7): 1458–66.
43. Mareš, M., B. Meloun, M. Pavlík, V. Kostka, and M. Baudyš. 1989. "Primary Structure of Cathepsin D Inhibitor from Potatoes and Its Structure Relationship to Soybean Trypsin Inhibitor Family." *FEBS Letters* 251 (1–2): 94–98.
44. Máša, M., L. Marešova, J. Vondrášek, M. Horn, J. Ježek, and M. Mareš. 2006. "Cathepsin D Propeptide: Mechanism and Regulation of Its Interaction with the Catalytic Core." *Biochemistry* 45 (51): 15474–82.
45. Mehta, A. Y., Y. Jin, and U. R. Desai. 2014. "An Update on Recent Patents on Thrombin Inhibitors (2010 - 2013)." *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 24 (1): 47–67.
46. Merops: the peptidase database. Available at: [https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family\\_index?type=P](https://www.ebi.ac.uk/merops/cgi-bin/family_index?type=P) (Staženo dne 18. 3. 2021).
47. Mihelic, M., and D. Turk. 2007. "Two Decades of Thyroglobulin Type-1 Domain Research." *Biological Chemistry* 388 (11): 1123–30.
48. Micheelsen, P. O., J. Vevodova, L. De Maria, P. R. Ostergaard, E. P. Friis, K. Wilson, and M. Skjot. 2008. "Structural and Mutational Analyses of the Interaction between the Barley Alpha-Amylase/Subtilisin Inhibitor and the Subtilisin Savinase Reveal a Novel Mode of Inhibition." *Journal of Molecular Biology* 380 (4): 681–90.
49. Motwani, H. V., M. De Rosa, L. R. Odell, A. Hallberg, and M. Larhed. 2015. "Aspartic Protease Inhibitors Containing Tertiary Alcohol Transition-State Mimics." *European Journal of Medicinal Chemistry* 90: 462–90.
50. Nadeem, S., and D. L. Batsky. 2014. "Aliskiren, the First Direct Renin Inhibitor: Assessing a Role in Pediatric Hypertension and Kidney Diseases." *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)* 29 (11): 2105–11.
51. Ng, K. K., J. F. Petersen, M. M. Cherney, C. Garen, J. J. Zalatoris, C. Rao-Naik, B. M. Dunn, M. R. Martzen, R. J. Peanasky, and M. N. James. 2000. "Structural Basis for the

- Inhibition of Porcine Pepsin by Ascaris Pepsin Inhibitor-3.” *Nature Structural Biology* 7 (8): 653–57.
52. Nussbaumerová, M., J. Srp, M. Máša, M. Hradilek, M. Šanda, M. Reiniš, M. Horn, and M. Mareš. 2010. “Single- and Double-Headed Chemical Probes for Detection of Active Cathepsin D in a Cancer Cell Proteome.” *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology* 11 (11): 1538–41.
53. Padilha, M. H., A. C. Pimentel, A. F. Ribeiro, and W. R. Terra. 2009. “Sequence and Function of Lysosomal and Digestive Cathepsin D-like Proteinases of *Musca Domestica* Midgut.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39 (11): 782–91.
54. Patil, D. N., A. Chaudhary, A. K. Sharma, S. Tomar, and P. Kumar. 2012. “Structural Basis for Dual Inhibitory Role of Tamarind Kunitz Inhibitor (TKI) against Factor Xa and Trypsin.” *The FEBS Journal* 279 (24): 4547–64.
55. Pokorná, J., L. Machala, P. Řezáčová, and J. Konvalinka. 2009. “Current and Novel Inhibitors of HIV Protease.” *Viruses* 1 (3): 1209–39.
56. Radisky, S. E., Lee, M. E., Lu K., Koshland, E. D. 2006. “Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates. “ *PNAS* May 2, vol. 103, no. 18: 6835–6840.
57. Rawlings, N. D., and A. J. Barrett. 2010. “MEROPS: The Peptidase Database.” *Nucleic Acids Research* 38 (1): 325–31.
58. Rawlings, N. D., and G. Salvesen. 2013. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier.
59. Riley, T. B., E. Hoke E. D., McGowan S., and Ashley M. Buckle. 2019. “Crystal structure of the inhibitor-free form of the serine protease kallikrein-4.” *JBCB* 2011
60. Ritonja, A., I. Krizaj, P. Mesko, M. Kopitar, P. Lucovnik, B. Strukelj, J. Pungercar, D. J. Buttle, A. J. Barrett, and V. Turk. 1990. “The Amino Acid Sequence of a Novel Inhibitor of Cathepsin D from Potato.” *FEBS Letters* 267 (1): 13–15.
61. Skala, W., D. T. Utzschneider, V. Magdolen, M. Debela, S. Guo, C. S. Craik, H. Brandstetter, and P. Goettig. 2014. “Structure-Function Analyses of Human Kallikrein-

- Related Peptidase 2 Establish the 99-Loop as Master Regulator of Activity.” *The Journal of Biological Chemistry* 289 (49): 34267–83.
62. Sojka, D., D. Hartmann, P. Bartošová-Sojková, and J. Dvořák. 2016. “Parasite Cathepsin D-Like Peptidases and Their Relevance as Therapeutic Targets.” *Trends in Parasitology* 32 (9): 708–23.
  63. Song, H. K., and S. W. Suh. 1998. “Kunitz-Type Soybean Trypsin Inhibitor Revisited: Refined Structure of Its Complex with Porcine Trypsin Reveals an Insight into the Interaction between a Homologous Inhibitor from *Erythrina Caffra* and Tissue-Type Plasminogen Activator.” *Journal of Molecular Biology* 275 (2): 347–63.
  64. Srp, J. Trávicí aspartátová proteasa mandelinky bramborové. Praha, 2010. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce RND. Michael Mareš CSc.
  65. Srp, J., Nussbaumerová, M., Horn M., Mareš M. 2016. “Digestive proteolysis in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: Activity-based profiling and imaging of a multipetidase network.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 78: 1e11.
  66. Srp, J., Mareš, M. 2016. “Kunitzovy proteasové inhibitory z rostlin: strukturní a funkční diverzita.” *chem. listy* 110, 761-768.
  67. Strooper, B. De, R. Vassar, and T. Golde. 2010. “The Secretases: Enzymes with Therapeutic Potential in Alzheimer Disease.” *Nature Reviews Neurology* 6 (2): 99–107.
  68. Suire, N., C., Leissring A., M. 2021. “Cathepsin D: A Candidate Link between Amyloid  $\beta$ -protein and Tauopathy in Alzheimer Disease” *J Exp Neurol* 2(1):10-15.
  69. Swedberg, J. E., S. J. de Veer, K. C. Sit, C. F. Reboul, A. M. Buckle, and J. M. Harris. 2011. “Mastering the Canonical Loop of Serine Protease Inhibitors: Enhancing Potency by Optimising the Internal Hydrogen Bond Network.” *PloS One* 6 (4): e19302.
  70. Tsukada, H., Blow D., M. 1985. “Structure of alpha-chymotrypsin refined at 1.68 Å resolution.” *J Mol Biol*, Aug 20;184(4):703-11.
  71. Vallée, F., Kadziola, A., Bourne, Y., Juy, M., Rodenburg, W. K., Svensson, B., Haser R. 1998. “Barley alpha-amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution” *Structure* 1998 May 15;6(5):649-59.



72. Veer, S. J. de, J. E. Swedberg, M. Akcan, K. J. Rosengren, M. Brattsand, D. J. Craik, and J. M. Wang, D., W. Bode, and R. Huber. 1985. "Bovine Chymotrypsinogen A X-Ray Crystal Structure Analysis and Refinement of a New Crystal Form at 1.8 Å Resolution." *Journal of Molecular Biology* 185 (3): 595–624.
73. Venekei, I., L. Graf, and W. J. Rutter. 1996. "Expression of Rat Chymotrypsinogen in Yeast: A Study on the Structural and Functional Significance of the Chymotrypsinogen Propeptide." *FEBS Letters* 379 (2): 139–42.
74. Wiederanders, B., G. Kaulmann, and K. Schilling. 2003. "Functions of Propeptide Parts in Cysteine Proteases." *Current Protein & Peptide Science* 4 (5): 309–26.
75. Wilby-Lim, M. S., Hallenga, K., de Maeyer, M., Lasters, I., Vlasuk, G. P., Brunck, K. T. 1995. "NMR structure determination of tick anticoagulant peptide (TAP)." *Protein Science* Feb;4(2):178-86.
76. Zhou, D., Y. A. Lobo, I. F. C. Batista, R. Marques-Porto, A. Gustchina, M. L. V. Oliva, and A. Wlodawer. 2013. "Crystal Structures of a Plant Trypsin Inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI) and of Its Complex with Bovine Trypsin." *PloS One* 8 (4): e62252
77. Zhou, D., D. Hansen, I. G. Shabalin, A. Gustchina, D. F. Vieira, M. V. de Brito, A. P. Araujo, M. L.V. Oliva, and A. Wlodawer. 2015. "Structure of BbKI, a Disulfide-Free Plasma Kallikrein Inhibitor." *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 71 (Pt 8):1055–62.
78. Zhu-Salzman, K., and R. Zeng. 2015. "Insect Response to Plant Defensive Protease Inhibitors." *Annual Review of Entomology* 60: 233–52.
79. Xu, P., P. A. Andreasen, and M. Huang. 2017. "Structural Principles in the Development of Cyclic Peptidic Enzyme Inhibitors." *International Journal of Biological Sciences* 13 (10): 1222–33.

