

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Jan Illner**

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze  
Katedra biochemie

# **Trávicí proteasy mandelinky bramborové**

## **Digestive proteases of Colorado potato beetle**

Jan Illner

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Konzultant: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

2008

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Michaela Mareše, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 4.9.2008

Podpis: ..........

Velmi rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Michaelovi Marešovi, CSc. za cenné rady, vstřícnost, ochotu a trpělivost při zpracovávání bakalářské práce a také Ing. Martině Nussbaumerové, Ph.D. za obětavé vedení v praktické části této práce. Za posouzení celé práce bych chtěl poděkovat Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc.

## Seznam použitých zkratek

A <sub>360</sub>	absorbance při vlnové délce 360 nm
Abz	2-aminobenzoyl
AMC	7-amino-4-methylkumarin
APS	peroxodisíran amonný
bestatin	(S)-N-(3-amino-2-hydroxy-1-oxo-4-fenylbutyl)-L-Leu
BM Bleu POD Substrate	komerční chromogenní substrát pro peroxidasu
BPTI	hovězí pankreatický trypsinový inhibitor
BSA	hovězí sérum albumin
CAPS	3-[cyklohexylamino]-1-propansulfonová kyselina
CA-074	L-trans-epoxysukcinyl(propylamid)-Ile-Pro-OH
cDNA	DNA vzniklá zpětnou transkripcí mRNA
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát
DMSO	dimethylsulfoxid
DOC	deoxycholát sodný
DTT	dithiotreitol
E-64	N-(trans-epoxysukcinyl)-L-Leu-4-guanidinbutylamid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EtOH	ethanol
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kDa	kilodalton
LB	Luria-Bertani
LdAP	aspartátová proteasa <i>Leptinotarsa decemlineata</i>
NTA	nitrilotrioctová kyselina
OD <sub>600</sub>	optická hustota při vlnové délce 600 nm
PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
pefabloc	4-(2-aminoethyl)-benzensulfonylfluorid, hydrochlorid
pepstatin	isovaleryl-L-Val-L-Val-4-(S)-amino-3-(S)-hydroxy-6-methyl-heptanová kyselina
PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	polyvinylidendifluorid

RE	směs regurgitant a exkrementů vyloučených larvou za stresových podmínek
regurg	regurgitant, orální sekret(směs slin a obsahu žaludku)
RFU	relativní fluorescenční jednotky
SDS	dodecylsulfát sodný
SOC	"super optimal broth with catabolite repression"
STI	sojový trypsinový inhibitor
střevo	střevní tkáň larev včetně obsahu
střevo-do	střevní tkáň dospělců včetně obsahu
Suc	3-karboxy-propionyl
SŽ	slinné žlázy
TCA	trichloroctová kyselina
tělo-STT	tělní tkáň zbavená střeva a tukového tělíska
TPCK	N-tosyl-L-Phe-chloromethylketon
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TT	tukové tělísko
Z	benzyloxykarbonyl

## Zkratky aminokyselin

A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Asn	asparagin
D	Asp	kyselina asparagová
C	Cys	cystein
Q	Gln	glutamin
E	Glu	kyselina glutamová
G	Gly	glycin
H	His	histidin
I	Ile	isoleucin
L	Leu	leucin
K	Lys	lysin
M	Met	methionin
	Nph	nitrofenylalanin
F	Phe	fenylalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	threonin
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tyrosin
V	Val	valin

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1	PROTEOLYTICKÉ ENZYMY .....	1
1.2	KLASIFIKACE PROTEAS.....	2
1.2.1	<i>Cysteinové proteasy.....</i>	2
1.2.2	<i>Serinové proteasy .....</i>	3
1.2.3	<i>Aspartátové proteasy.....</i>	3
1.2.4	<i>Metaloproteasy.....</i>	4
1.3	TRÁVENÍ HMYZU .....	4
1.3.1	<i>Trávicí trakt.....</i>	4
1.3.2	<i>Morfologie trávicí soustavy.....</i>	5
1.4	PROTEINOVÉ INHIBITORY PROTEAS .....	6
1.4.1	<i>Proteinové inhibitory proteas u rostlin .....</i>	7
1.4.2	<i>Obranné mechanismy rostlin proti škůdcům a patogenům.....</i>	7
1.4.3	<i>Adaptace škůdců na obranný mechanismus rostlin .....</i>	8
1.4.4	<i>Klasifikace proteinových inhibitorů .....</i>	9
1.4.4.1	<i>Proteinové inhibitory cysteinových proteas .....</i>	9
1.4.4.2	<i>Proteinové inhibitory serinových proteas .....</i>	9
1.4.4.3	<i>Proteinové inhibitory aspartátových proteas .....</i>	10
1.4.4.4	<i>Proteinové inhibitory metaloproteas .....</i>	10
1.5	MANDELINKA BRAMBOROVÁ ( <i>LEPTINOTARSA DECEMLINEATA</i> ) .....	10
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>14</b>
3.1	MATERIÁL .....	14
3.1.1	<i>Biologický materiál .....</i>	14
3.1.2	<i>Chemikálie.....</i>	14
3.1.2.1	<i>Peptidové substráty (zásobní roztoky 10 mM v DMSO) .....</i>	14
3.1.2.2	<i>Inhibitory.....</i>	14
3.1.2.3	<i>Ostatní chemikálie.....</i>	15
3.1.3	<i>Přístroje a vybavení .....</i>	15
3.2	EXPERIMENTÁLNÍ METODY .....	16
3.2.1	<i>Příprava extraktů z biologického materiálu.....</i>	16
3.2.2	<i>Stanovení obsahu bílkovin.....</i>	17
3.2.3	<i>Stanovení enzymové aktivity proteas.....</i>	17
3.2.3.1	<i>Aktivitní test s azokaseinem.....</i>	17
3.2.3.2	<i>Aktivitní test s fluorogeními peptidovými substráty .....</i>	18
3.2.3.3	<i>Inhibice enzymové aktivity.....</i>	20
3.2.4	<i>Elektroforetické metody.....</i>	21
3.2.4.1	<i>Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS.....</i>	21
3.2.4.2	<i>Western blot s imunodetekcí.....</i>	21
3.2.5	<i>Rekombinantní exprese .....</i>	22
3.2.5.1	<i>Transformace a kultivace v Escherichia coli .....</i>	22
3.2.5.2	<i>Příprava inkluzních tělísek.....</i>	22
3.2.5.3	<i>Test rozpustnosti inkluzí .....</i>	23
3.2.5.4	<i>Purifikace rekombinantního proteinu pomocí Ni-NTA kolony .....</i>	23



<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>25</b>
4.1	DISTRIBUCE TRÁVICÍCH PROTEAS MANDELINKY BRAMBOROVÉ .....	25
4.1.1	<i>Analýza proteolytické aktivity s proteinovým substrátem .....</i>	25
4.1.2	<i>Analýza proteolytické aktivity s peptidovými substráty.....</i>	27
4.1.2.1	<i>Cysteinové endopeptidasy .....</i>	27
4.1.2.2	<i>Cysteinové exopeptidasy .....</i>	29
4.1.2.3	<i>Aspartátové proteasy .....</i>	30
4.1.2.4	<i>Metaloproteasy .....</i>	31
4.1.2.5	<i>Serinové proteasy .....</i>	32
4.2	PŘÍPRAVA TRÁVICÍ ASPARTÁTOVÉ PROTEASY MANDELINKY BRAMBOROVÉ .....	32
4.2.1	<i>Rekombinantní exprese v bakteriálním systému.....</i>	32
4.2.2	<i>Purifikace rekombinantního proteinu .....</i>	34
4.2.2.1	<i>Příprava a analýza inkluzních tělísek .....</i>	34
4.2.2.2	<i>Afinitní chromatografie .....</i>	35
<b>5</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>38</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>39</b>

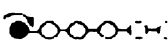
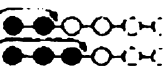
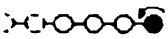
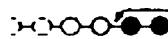

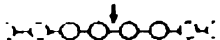
# 1 Úvod

## 1.1 Proteolytické enzymy

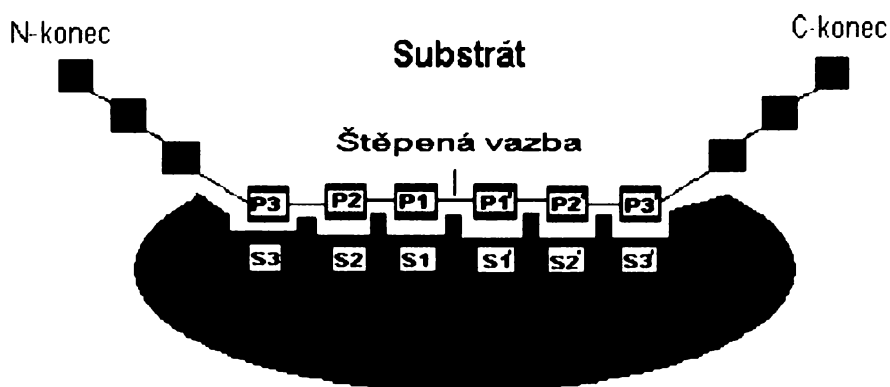
Enzymy provádějící kompletní hydrolýzu proteinů na aminokyseliny se nazývají proteasy, proteinasy a peptidasy. Toto pojmenování je historicky odvozeno od substrátů těchto enzymů, v současné době je však významový rozdíl těchto termínů smazáván [1]. Enzyme Commission (E.C.) proto doporučuje název peptidasy jako obecný název pro enzymy hydrolyzující peptidovou vazbu.

Proteasy se podle pozice štěpení peptidové vazby ve struktuře proteinu rozdělují na exopeptidasy odštěpující jednu nebo více aminokyselin z N- nebo C-terminálního konce a na endopeptidasy, které štěpí uvnitř polypeptidového řetězce. Dále se dělí na exopeptidasy odštěpující z N-terminálního konce jednu aminokyselinu (aminopeptidasy), dipeptid nebo tripeptid (dipeptidylpeptidasy nebo tripeptidylpeptidasy) a exopeptidasy odštěpující z C-terminálního konce jednu aminokyselinu (karboxypeptidasy) nebo dipeptid (peptidyl-dipeptidasy) (Tab. 1.1) [2].

**Tab. 1.1:** Klasifikace peptidas podle Enzyme Commission (E.C.). Symboly představují: ○ - aminokyselina, ● - terminální aminokyselina, která je odštěpována (↓) danými exopeptidasami. Upraveno podle [2].

Typ reakce	Skupina peptidas
	<b>Exopeptidasy</b> Aminopeptidasy
	Dipeptidyl peptidasy Tripeptidyl peptidasy
	Karboxypeptidasy
	Peptidyl dipeptidasy
	Dipeptidasy
	<b>Endopeptidasy</b>

Substrátová specifita je dána strukturou a charakterem aktivního místa proteasy, neboť ta určuje, jaký typ substrátu bude se může se navázat do aktivního místa proteasy. Oblast proteasy schopná přímo interagovat s jednotlivými aminokyselinovými zbytky proteinového substrátu se nazývá podmísto („subsite“). Označení jednotlivých podmíst interakce začíná od štěpící se peptidové vazby a je číslované  $S_1 \dots S_n$  směrem k N-terminálnímu konci substrátu a  $S'_1 \dots S'_n$  směrem k C-terminálnímu konci. Paralelně jsou také označeny aminokyselinové zbytky substrátu interagující s aktivním místem proteasy označené  $P_1 \dots P_n$  nebo  $P'_1 \dots P'_n$  (Obr. 1.1) [3].



*Obr. 1.1: Štěpení peptidové vazby v aktivním místě proteasy. Upraveno podle [3].*

## 1.2 Klasifikace proteas

Katalytický mechanismus proteas závisí na chemické povaze reaktivních skupin v aktivním místě enzymu. Proteasy jsou podle něj děleny na třídy, z nichž nejrozšířenější jsou proteasy cysteinové, aspartátové, serinové a metaloproteasy [4].

### 1.2.1 Cysteinové proteasy

U cysteinových proteas je nukleofilem atakujícím peptidovou vazbu thiolová skupina, která je na postranním řetězci katalytické aminokyseliny cysteinu v aktivním místě. Cysteinové proteasy obsahují v aktivním místě cystein a histidin.

Jednou z nejpočetnějších rodin cysteinových proteas je rodina C1 (rodina papainu). Do této rodiny patří např. trávicí proteasy hmyzu nebo lysosomální kathepsiny savců, jako jsou např. endopeptidasa kathepsin L, karboxydipeptidasa kathepsin B, aminopeptidasa kathepsin

H a aminodipeptidasa kathepsin C. Cysteinové proteasy rodiny papainu jsou obecně méně specifické enzymy. Jsou syntetizovány ve formě neaktivních zymogenů [5]. Optimum pro aktivitu těchto proteas je při pH 5-7, což odpovídá pH ve střevě, kde hmyz výrazně využívá cysteinové proteasy k trávení proteinů [6].

### 1.2.2 Serinové proteasy

U serinových proteas je nukleofilem atakujícím peptidovou vazbu hydroxylová skupina, která je na postranním řetězci katalytické aminokyseliny serinu v aktivním místě. Serinové proteasy mají ve struktuře aktivního místa zbytek aminokyselin serinu a histidinu.

Mezi nejrozšířenější typy serinových proteas patří proteasy typu trypsinu a chymotrypsinu. Trypsin štěpí peptidový řetězec na karboxylové straně bazických L-aminokyselin, např. arginin nebo lysin. Chymotrypsin štěpí peptidový řetězec na karboxylové straně hydrofobních a aromatických aminokyselin, např. tryptofan, tyrosin, fenylalanin, leucin nebo methionin.

### 1.2.3 Aspartátové proteasy

Aspartátové proteasy se od předchozích dvou typů proteas liší tím, že nukleofilem atakujícím štěpenou peptidovou vazbu je aktivovaná molekula vody. Tato molekula interaguje se dvěma katalytickými zbytky kyseliny asparagové.

Aspartátové proteasy lze rozdělit do několika rodin, z nichž nejpočetnější jsou rodiny pepsinu, retropepsinu a enzymů izolovaných z pararetrovirů. Typickým příkladem rodiny pepsinu jsou savčí trávicí enzymy pepsin a chymosin, krevní renin a dále lysosomální kathepsin D a E. Maximální aktivitu vykazují tyto proteasy v kyselé oblasti (pH 3-4). Podobně jako cysteinové proteasy jsou i aspartátové proteasy syntetizovány ve formě neaktivních zymogenů [5].

#### **1.2.4 Metaloproteasy**

U metaloproteas je též atakujícím nukleofilem molekula aktivované vody, která na rozdíl od aspartátových proteas interaguje s dvojmocným iontem kovu, nejčastěji zinku nebo manganu, který je v katalytickém místě vázán aminokyselinovými zbytky jako ligand. Příkladem rozšířené metaloproteasy je leucin aminopeptidasa.

### **1.3 Trávení hmyzu**

Hmyz je velmi různorodou skupinou bezobratlých s více než milionem druhů. Živí se prakticky čímkoli organické povahy; a to od listů, květů, kořenů, hlíz, nektaru, semen a plodů rostlin, přes živočišnou tkáň, exkrementy a krev až po houby a bakterie. K úspěšnému růstu, vývoji a reprodukci vyžaduje hmyz stejných deset esenciálních aminokyselin jako savci. Tyto aminokyseliny jsou získávány z potravy ve formě proteinů. K jejich degradaci používá hmyz proteasy ve svém hlavním trávicím orgánu – střevě. Díky ohromné rozmanitosti své potravy má hmyz široké spektrum trávicích proteas [7].

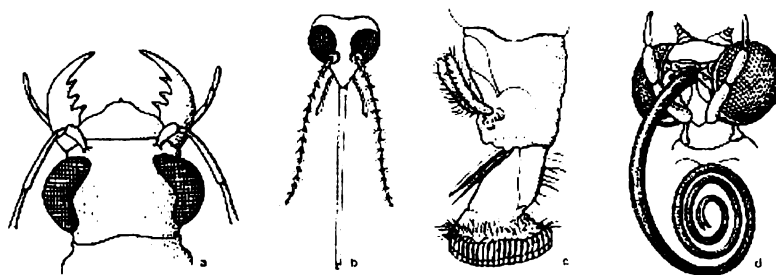
Analýza křivky pH optima řady hmyzích druhů odhalil, že jednotlivé taxony mají optimální proteolytickou aktivitu od extrémně kyselé oblasti pH v rozmezí 2-4, přes mírně kyselou až neutrální oblast (5-7) až po silně alkalickou oblast pH kolem hodnoty 11 [8]. Tomu odpovídá rozdílné spektrum tříd proteas, které jednotlivé hmyzí druhy využívají k trávení a detailní adaptaci trávicích proteas na dané pH.

#### **1.3.1 Trávicí trakt**

Trávicí trakt jednotlivých druhů hmyzu (a obecně členovců) je velmi různorodý. Tato různorodost je dána nejen příslušností k jednotlivým taxonům, ale také životním stádiem nebo typem konzumované potravy. Druhu potravy je pak přizpůsobeno jak ústní ústrojí, tak i struktura, charakter a funkce trávicí soustavy [9].

### 1.3.2 Morfologie trávicí soustavy

Trávicí soustava začíná článkovitými přívěsky, které tvoří ústní ústrojí. Základním typem je ústní ústrojí kousací, které je typické pro hmyzí herbivorní škůdce. Odvozeným ústním ústrojím je bodavě sací, lízavě sací (Obr. 1.2). Na ústní ústrojí navazuje trávicí trubice, která je rozdělena na tři části: stomodeum (přední část), mesodeum (střední část) a proctodeum (zadní část) (Obr. 1.3 na str. 6).



**Obr. 1.2:** Typy hmyzího ústního ústrojí: a-kousací, b-bodavě sací, c-lízavě-sací, d-sací. Převzato z [10].

Stomodeum slouží k příjmu a mechanickému zpracování potravy. Začíná dutinou ústní, v níž jsou umístěny slinné žlázy, a dále ho tvoří hltan, jícen, vole a žvýkací žaludek. U mnoha druhů má stomodeum přímý trubicovitý tvar. Jeho buňky jsou pokryty kutikulou [4].

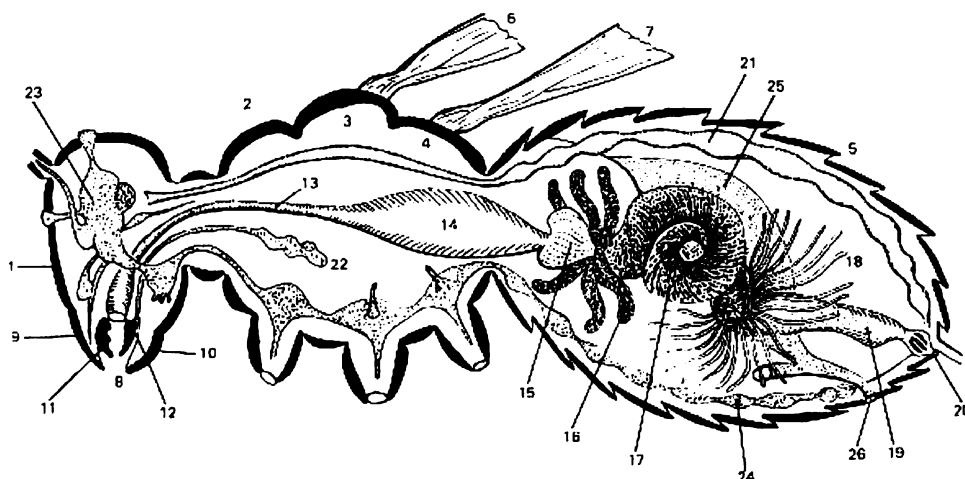
V mesodeu dochází k chemickému trávení přijaté potravy a vstřebávání živin. Mesodeum tvoří trubicovitý žaludek, který často vybíhá do slepých výběžků (caeca) [12].

Epiteliální výstelka mesodea bývá zřasena v záhyby. Základem střevního epitelu jsou tři typy buněk: trávicí, regenerativní a endokrinní. Trávicí buňky mají cylindrický tvar, který se však mění v závislosti na lokalizaci ve střevě, fyziologickém stádiu nebo na procesu, který v daném místě mesodea probíhá [13-15]. Regenerativní buňky se vyskytují buď samostatně, nebo ve skupinách a zajišťují obnovu epiteliálních buněk. Jsou v kontaktu s bazální membránou, nikoli však s lumen střeva. Endokrinní buňky produkují hormony sloužící k regulaci sekrece a činnosti trávicích enzymů [13,15].

Mesodeum pokrývá peritrofická membrána, která obaluje zpracovanou potravu a zamezuje tak jejímu případnému kontaktu se sliznicí středního střeva. Peritrofická membrána tak chrání buňky epitelu před enzymatickým i mechanickým působením, chrání proti napadení viry, bakteriemi a parazity [16]. Je to jemná blána, která obsahuje chitin, proteoglykany a bílkoviny [17]. Většina trávicího procesu probíhá uvnitř prostoru vymezeného membránou (endoperitrofický prostor). U některých druhů je zde však trávení

pouze zahájeno a jeho větší část probíhá vně (mezi peritroficou membránou a sliznicí). Na rozhraní mesodea a proctodea ústí do střeva Malpighické trubice – rozvětvené vychlípeniny střeva, které slouží jako orgány exkreční soustavy.

Proctodeum se dělí na ileum, colon a rectum. Buňky tvořící proctodeum jsou kryty kutikulou. U některých druhů hmyzu se zde nachází fermentační komory, které dokončují trávení těžce stravitelné potravy. V proctodeu probíhá také resorpce vody a/nebo solí. Ústí řitním otvorem z těla ven [11].



**Obr. 1.3:** Stavba těla a trávicí soustavy hmyzu: 1-hlava, 2,3,4-hrudní články, 5-zadeček, 6,7-1. a 2. pár křídel, 8-ústní ústrojí, 9-svrchní pysk, 10-spodní pysk, 11-kusadla, 12-čelist, 13-jícen, 14-vole, 15-žaludek, 16-laloky středního střeva, 17-střední střevo, 18-malpighické žlázy, 19-zadní střevo, 20-řitní otvor, 21-trubicovité srdce, 22-slinné žlázy, 23-mozek, 24-ústřední nervová páska, 25-pohlavní žlázy (párové, vyobrazena je jen polovina), 26-vejcovod. Převzato z [10].

## 1.4 Proteinové inhibitory proteas

Proteinové inhibitory proteas jsou široce rozšířené. Byly nalezeny u všech žijících forem a patří mezi nejpočetnější skupinu proteinů. Jejich úlohou v přírodě je jednak regulace vlastní proteolýzy v organelách, buňkách a tělních dutinách, a jednak ochrana proteinové složky buněk, tekutin a tkání proti působení exogenních proteas.

Proteolýza jako klíčový proces ve všech žijících organismech musí být přesně kontrolována. Proto není překvapující, že bylo popsáno velké množství přirozeně působících inhibitorů proteas u živočichů, rostlin i mikroorganismů. Jejich detailní funkce a mechanismus působení je předmětem intenzivního výzkumu vzhledem k mnoha praktickým využitím v medicíně a zemědělství [18].

### **1.4.1 Proteinové inhibitory proteas u rostlin**

Proteinové inhibitory regulují obecně u všech organismů endogenní proteolýzu. U rostlin mají kromě toho ještě další důležitou roli, kterou je obrana proti predátorům a patogenům. Inhibují trávicí proteasy hmyzích škůdců a mikrobiálních fytopatogenů, čímž dochází k redukci nutriční kvality rostlinné tkáně. Vzhledem k často vysoké koncentraci proteinových inhibitorů v rostlinné tkáni je rostliny pravděpodobně využívají také jako zásobní proteiny. Tyto inhibitory jsou rozsáhle studovány za účelem objasnění jejich strukturních a funkčních vlastností a k jejich potenciálnímu praktickému využití v zemědělských biotechnologiích jako insekticidní a antimikrobiální proteiny [19,20].

### **1.4.2 Obranné mechanismy rostlin proti škůdcům a patogenům**

Obranu rostlin proti napadení škůdci a patogeny můžeme obecně rozdělit na konstitutivní a indukovanou. V obou případech se jí mohou účastnit tytéž látky – specifické proteiny, terpeny, fenolické látky, alkaloidy.

Při konstitutivní obraně jsou obranné metabolity přítomny v rostlině trvale, nezávisle na kontaktu s patogenem či škůdcem. Jedná se o produkci látek toxických (alkaloidy) nebo látek působících odpudivě či způsobující špatnou stravitelnost, nechutnost (ligniny, fenolické látky, inhibitory proteas). Biosyntéza a skladování těchto látek je často pro rostliny energeticky náročná a představuje zátěž metabolismu [21-23]. Proto rostliny, které nejsou vystaveny častému napadení, upřednostňují indukovaný způsob obrany, při kterém rostlina syntetizuje obranné látky jen v době aktuální potřeby [24,25].

Mechanismus indukované obrany se spouští až po poranění rostliny. Poškozením rostlinné tkáně se aktivuje signální dráha biochemických reakcí, která zajišťuje lokální (v místě poranění) a systémovou (po celé rostlině) odezvu, např. produkci inhibitorů trávicích proteas (PI) nebo dalších specifických stresových proteinů a polyfenoloxidas (PPO). Produkci PI a PPO řadíme k tzv. přímé reakci rostlin na poranění (interakce „rostlina-herbivor“) [26]. Tyto látky jsou zodpovědné za primární supresi metabolismu škůdců a patogenů po použití indukované rostlinné tkáně [24].

Na druhou stranu k nepřímé reakci patří produkce různých těkavých látek. Mezi nejznámější těkavé signální látky patří ester kyseliny jasmonové – methyljasmonát. Methyljasmonát se po poranění rostliny uvolňuje z poškozené listové tkáně do okolí a tím



dává signál jednak ostatním listům dané rostliny, a jednak okolním rostlinám k syntéze obranných látek (interakce „rostlina-rostlina“) [27]. Další typ nepřímé obranné reakce rostlin (interakce „rostlina-predátor“) [28] zprostředkovávají např. terpeny, které biosyntetizují a uvolňují napadené rostliny za účelem přivábění parazitů a predátorů specializovaných na hmyzí herbivorní škůdce [24].

### 1.4.3 Adaptace škůdců na obranný mechanismus rostlin

Tak jako si rostliny vyvinuly obranný mechanismus proti napadení různými herbivory, tak i ze strany škůdců existuje mechanismus ke zvýšení odolnosti proti rostlinným proteasovým inhibitorům a dalším insekticidním látkám. Během evoluce byli škůdci v kontaktu s různorodými inhibitory proteas přirozeně produkoványmi hostiteli, a proto mají vyvinuté strategie, jak reagovat na tlumící účinky. Obranný mechanismus hmyzu můžeme, podobně jako u rostlin, rozdělit na konstitutivní a indukovaný [29].

Adaptační mechanismy, kterými hmyz reaguje na přítomnost inhibitorů trávicích proteas, lze rozdělit do tří kategorií. První z nich je indukce biosyntézy trávicích proteas, čímž dochází k saturaci rostlinných proteasových inhibitorů přijatých v potravě a kompenzaci blokováných proteas [30]. Další obrannou strategií hmyzu je schopnost exprese trávicích proteas z genomu hmyzu, které nejsou citlivé na určité proteasové inhibitory a jejich syntéza se spouští při snížení trávicí kapacity traktu vybaveného konstitutivními klasickými typy proteas. U hmyzu byla také nalezena detoxikační strategie založená na produkci proteas jiné třídy, než proti kterým jsou cíleny inhibitory [31], a tyto proteasy jsou schopny štěpit rostlinné proteasové inhibitory a tím je deaktivovat.

Sekrece proteas v hmyzích střevech závisí spíše na obsahu proteinu ve střevech než na objemu potravy. Sekrece proteas je přisuzována dvěma mechanismům zahrnujících buď přímý účinek složek potravy na střevní epitelální buňky, nebo hormonální účinek spuštěný strávením potravy [32]. Potravou přijaté proteiny spustí syntézu a uvolnění enzymů ze zadních epitelálních střevních buněk. Proteasy jsou sekretovány do ektoperitrofického prostoru mezi výstelku (epitel), ze které se pohybují napříč do lumen střeva, kde jsou potravní proteiny degradovány. Rostlinné inhibitory proteas přijaté s potravou inhibují proteasovou aktivitu těchto enzymů a redukují množství proteinů, jež mohou být stráveny, a také způsobují hyperprodukcí trávicích enzymů, čímž oslabují hmyz. Oslabení se může projevat např. zpomalením vývoje larev, sníženou plodností dospělců či zvýšenou mortalitou [33].

#### **1.4.4 Klasifikace proteinových inhibitorů**

Proteinové inhibitory proteas se dělí do čtyř hlavních skupin – na inhibitory proteas cysteinových, serinových, aspartátových a metaloproteas, přičemž každá z těchto rodin obsahuje několik vzájemně strukturních rodin inhibitorů [4]. U členů některých strukturních rodin se během evoluce vyvinula odlišná reaktivní centra umožňující inhibici různých tříd proteas.

##### ***1.4.4.1 Proteinové inhibitory cysteinových proteas***

Funkce proteinových inhibitorů cysteinových proteas je velmi komplexní. U živočišných organismů je jejich fyziologické působení spojováno hlavně s regulací lysosomálních kathepsinů. U rostlin plní kromě regulace endogenních proteas také funkci ochrany před škůdci a fytopatogeny.

Mezi nejvýznamnější rostlinné zástupce proteinových inhibitorů cysteinových proteas patří inhibitory z následujících strukturních rodin: stefiny, multicystatiny, inhibitory Kunitzova sojového typu a inhibitory bromelainů [4].

##### ***1.4.4.2 Proteinové inhibitory serinových proteas***

Jedná se o nejpočetnější skupinu inhibitorů proteas. Jejich zástupce nalezneme u bakterií, virů, hub, ale i u rostlin a živočichů. Díky široké distribuci jsou funkce inhibitorů serinových proteas velmi rozmanité. U rostlin se ve většině případů jedná o ochranu rostliny před trávicími proteasami hmyzu a fytopatogenů. U živočichů inhibitory serinových proteas obecně regulují endogenní proteolýzu. Přes velkou rozmanitost jejich molekulární architektury je významné zachování jednotné stavby reaktivního místa, které je v kontaktu s danou proteasou, což naznačuje konvergentní evoluci vzájemně nepříbuzných proteinů.

Mezi nejvýznamnější rostlinné zástupce proteinových inhibitorů serinových proteas patří inhibitory z následujících strukturních rodin: proteasové inhibitory typu I a II, Kunitzův sojový typ, trypsinové inhibitory z ječmene, Bowman-Birk proteasové inhibitory a „Squash“ inhibitory z tykvovitých [4].

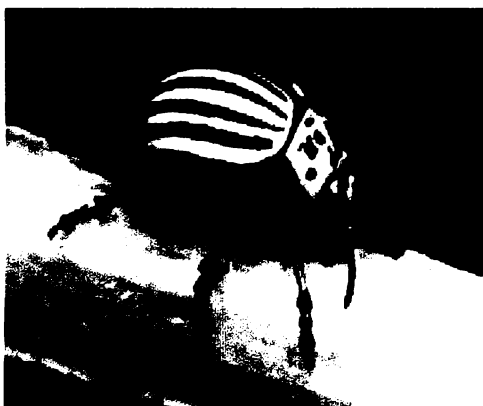
### 1.4.4.3 *Proteinové inhibitory aspartátových proteas*

Inhibitory aspartátových proteas se skutečně proteinovým charakterem tvoří málo početnou skupinu inhibitorů vykazující vysokou specifitu. Jsou známy pouze dvě strukturální rodiny aspartátových inhibitorů rostlinného původu: PDI (potato cathepsin D inhibitor) z rodiny Kunitzova sojového typu, který byl nalezen v hlízách bramboru [34], a SQAPI (squash aspartic proteinase inhibitor), který byl izolován z tykve [35].

### 1.4.4.4 *Proteinové inhibitory metaloproteas*

Skupina inhibitorů metaloproteas má nejméně zástupců. Prostudovány jsou zejména tzv. tkáňové inhibitory metaloproteas (TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinases) [36,37]. U rostlin byly nalezeny inhibitory metalloexopeptidas, např. v hlízách bramboru.

## 1.5 Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*)



Říše: Živočichové (*Animalia*)

Kmen: Členovci (*Arthropoda*)

Podkmen: Vzdušnicovci (*Tracheata*)

Třída: Hmyz (*Insecta*)

Řád: Brouci (*Coleoptera*)

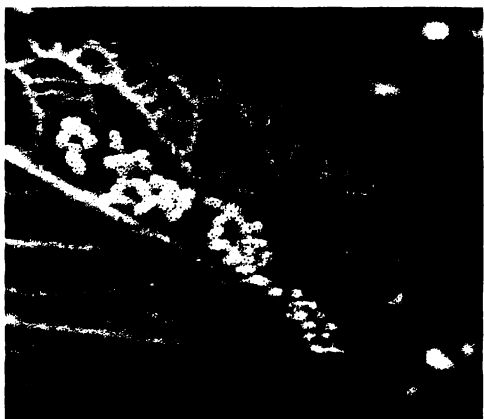
Čeleď: Mandelinkovití (*Chrysomelidae*)

Rod: Mandelinka (*Leptinotarsa*) [38]

**Obr 1.3:** Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*). Převzato z [39].

Mandelinka bramborová má bíložluté až bílooranžové krovky s celkem deseti černými podélnými čarami (Obr. 1.3). Dorůstá velikosti až 12 mm délky a 8 mm šířky [38]. Mandelinka přezimuje ve stádiu dospělců v půdě a objevuje se záhy po vzejití bramboru. Přibližně po dvou týdnech úživného žíru dochází k páření a následně ke kladení vajíček po skupinách na spodní stranu listů (Obr. 1.4 na str. 11). Jedna samička přitom klade 600 vajíček po částech na několik rostlin [40]. Z podlouhlých žlutooranžových vajíček se po 4 až 15 dnech vylíhnou charakteristicky cihlově červené larvy s černou hlavou, černým obojkem a

řadou černých teček na zadní části těla (Obr. 1.5). Larvy se po 21 dnech soustavného žíru na listech zahrabávají 4-10 cm do země, kde se zakuklí a po dvou týdnech se vyvinou v dospělé [39].



**Obr. 1.4:** Vajíčka mandelinky na spodní straně bramborových listů. Převzato z [39].



**Obr. 1.5:** Larvy mandelinky bramborové. Převzato z [38].

Původní oblastí výskytu mandelinky bramborové je Severní Amerika (Obr. 1.6 na str. 12). Pravděpodobně nikoliv celá, předpokládá se, že než ji začali kolonisté šířit i s bramborami, byl její výskyt omezen na oblast severního Mexika a Colorada. Patrně se jednalo o dost malé oblasti, protože vztah mandelinka – brambory byl vzat na vědomí až v roce 1859, kdy bylo zaznamenáno její první masivní přemnožení. Do kontinentální Evropy byla zavlečena společně s bramborami. Její pomalé šíření prudce nabralo na rychlosti po druhé světové válce, kdy vzrostla úroveň transportu brambor. Mandelinka pak postupně doputovala až k Uralu. Na české území (resp. do tehdejšího Československa) dorazila v 50. letech minulého století a její invaze okamžitě nabrala podobu kalamity [38].

Mandelinka je nebezpečný škůdce, který může značně snížit výnosy bramborového pole. Větší množství brouků může rostlinám zcela zničit veškeré listy (tzv. holožír). Vedle brambor navíc mohou napadat i rajčata a některé domácí rostliny z čeledi lilkovitých (papriky, lilek, atd.). Faktorem, který zesiluje napadení, je na jedné straně časný, vlhký podzim a chladná zima, a na straně druhé je to teplé, ne příliš suché léto v kombinaci s pěstováním pozdních odrůd bramboru [39].



**Obr. 1.6:** Rozšíření mandelinky bramborové. Žlutá barva značí původní rozšíření mandelinky bramborové, oranžová značí současné rozšíření mandelinky bramborové a zelená značí původní rozšíření bramboru. Převzato z [38].

V současné době se hledají nové způsoby ochrany bramboru. Jedním z nejnadějnějších způsobů se zdají být transgenní brambory obsahující Bt-toxin (delta-endotoxin) typu Cry3A cílený proti membráně epitelálních buněk ve střevě mandelinky. Bílkovinné molekuly Bt-toxinů jsou obecně toxiny produkované bakterií *Bacillus thuringiensis*. Bt-toxiny jsou několika typů a působí pouze na určité skupiny hmyzu, k ostatním živočichům včetně člověka jsou netoxické. Bt-toxiny, ať už jsou používány ve formě ekologických postřiků nebo v geneticky modifikovaných plodinách, vytvářejí na populaci škůdců silný tlak, který vede k vytváření rezistence [41]. Proto jsou hledány jiné typy proteinových insekticidů. Nadějným způsobem ochrany bramboru před škůdci jsou proteasové inhibitory. Typickým příkladem je experimentální příprava transgenních brambor s genem z mořské sasanky pro inhibitor cysteinových proteas, který inhibuje trávicí proteasy mandelinky bramborové [42].

## 2 Cíl práce

Bakalářská práce se zabývá identifikací hlavních trávicích proteas mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) a zahrnuje následující dílčí cíle:

- vybrat substráty, které jsou hydrolyzované trávicími proteasami mandelinky
- určit pH profil hydrolýzy vybraných substrátů
- určit zastoupení konkrétních cysteinových, serinových, aspartátových proteas a metaloproteas pomocí inhibičního profilu zjištěného použitím specifických inhibitorů

Dalším cílem bylo využít expresní systém v *E. coli* pro produkci rekombinantní trávicí aspartátové proteasy LdAP a purifikovat tento protein.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Biologický materiál

Veškerý biologický materiál byl získán ze standardního chovu mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) Výzkumného ústavu rostlinné výroby, Praha Ruzyně. Střeva a slinné žlázy byly vypreparovány z larev v polovině čtvrtého instaru. Střeva byla zbavena tukového tělíska. Zbytek těla larvy po pitvě sloužil jako materiál pro vzorek tělo-STT. Regurgitant byly mandelinkám odebírány neinvazivní metodou pomocí plastových pasturových pipet. Směs regurgitant a exkrementů (stresový sekret) je materiál produkovaný larvou po odebrání z listu bramboru. Střevní stěny byly získány z vypitvaného střeva zbaveného střevního obsahu opláchnutím fyziologickým roztokem. Materiál vajíček pocházel z jediné čerstvě nakladené snůšky (20-30 kusů).

#### 3.1.2 Chemikálie

##### 3.1.2.1 Peptidové substráty (zásobní roztoky 10 mM v DMSO)

Bachem, SRN:

Z-Phe-Arg-AMC

Z-Ala-Ala-Asn-AMC

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC

Arg-AMC

Gly-Arg-AMC

Leu-AMC

ÚOCHB AV ČR, v.v.i.(zakázková syntéza peptidů):

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

*Cílové proteasy:*

kathepsin B a kathepsin L

asparaginyl endopeptidasa (legumain)

serinové peptidasy typu chymotrypsinu

kathepsin H

kathepsin C

leucin aminopeptidasa

kathepsin D

##### 3.1.2.2 Inhibitory

Sigma, USA:

Pepstatin, 1 mM v DMSO

*Cílové proteasy:*

kathepsin D

E-64, 5 mM v 50% EtOH	kathepsin B/L/C
STI, 3 mg/ml v H <sub>2</sub> O	serinové proteasy
BPTI, 6,5 mg/ml v H <sub>2</sub> O	serinové proteasy
<i>Bachem, SRN:</i>	
Pefabloc, 100 mM v H <sub>2</sub> O	serinové proteasy
CA-074, 1 mM v DMSO	kathepsin B
TPCK, 10 mM v DMSO	serinové proteasy
Bestatin, 5 mM v MeOH	leucin aminopeptidasa

### 3.1.2.3 Ostatní chemikálie

*Sigma, USA:*

BSA, DTT, EDTA, SDS, TEMED, akrylamid, merkaptoethanol, DOC, imidazol, IPTG, PMSF, CAPS, N-lauroylsarkosin sodný, APS, LB médium, ampicilin, Triton X-100, glycin, azokasein

*Fluka, SRN:*

DMSO, glycerol, CHAPS, lysozym, TCA

*Pierce, USA:*

BCA Protein Assay Kit

*Lachema, ČR:*

EtOH, kyselina octová, MeOH, NaCl, aceton, kyselina boritá, kyselina fosforečná, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

*Serva, SRN:*

Coomassie Brilliant Blue G250, močovina, Tween 20, Tris báze

*Roche, SRN:*

BM Blue POD Substrate

*Fermentas, Lotyšsko:*

Page Ruler™ Prestained Protein Ladder Plus

*Invitrogen, USA:*

SOC médium

### 3.1.3 Přístroje a vybavení

Analytické váhy AE 163

Mettler, Švýcarsko

Centrifugy:



Centrifuga Eppendorf 5415D	Eppendorf, SRN
Centrifuga Beckman J2-MI	Beckman, USA
Rotační vakuový koncentrátor Speed Vac	Thermosavant, USA
Ultrafree-MC Microcentrifuge filter, 0,45 µm	Millipore, USA
Fluorescenční/absorbanční čtečka GENios	Tecan, Rakousko
pH metr Pracitronic MW 870	Pracitronic, SRN
Sonikátor Soniprep 150 MSE	Hielscher, SRN
Termoblok	Vývojové dílny, ÚOCHB AV ČR
Vertikální elektroforéza	Bio-Rad, USA
Blotovací zařízení	Bio-Rad, USA
Ni-NTA Superflow	Qiagen, USA
PVDF membrána	Millipore, USA
Lyofilizátor Freezone 6 liter	Labconco, USA
Spektrofotometr Helios α	Unicam, UK
Rotační třepačka Inova 4300	New Brunswick Scientific, USA
Autokláv Labo Autoclave	Sanyo, Japonsko
GradiFrac System	Pharmacia, Švédsko
Mikrotitrační destičky	Nunc GmbH & Co. KG, Německo

## 3.2 Experimentální metody

### 3.2.1 Příprava extraktů z biologického materiálu

K zamraženým vzorkům odvozených z mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) bylo přidáno 500 µl vychlazeného extrakčního pufru (0,05 M Na-acetát, pH 4,5). Směs byla homogenizována teflonovým pístem ve skleněném homogenizátoru za chlazení na ledu. Po přidavku 50 µl 10% CHAPS probíhala extrakce 10 minut a homogenizovaná směs byla poté centrifugována (10 min, 15000 g, 4 °C). Supernatant byl zfiltrován na Ultrafree-MC Microcentrifuge filter, 0,45 µm (10 min, 5000 g, 4 °C) a následně rozdělen do alikvotů a skladován při -80 °C .

### 3.2.2 Stanovení obsahu bílkovin

Pro stanovení obsahu bílkovin byl použit komerční BCA™ Protein Assay Kit. Kalibrační křivka byla pro každé stanovení připravena ze standardu roztoku BSA (rozsah koncentrací 0-2000 µg/ml). Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo pipetováno 25 µl standardu nebo vzorku a následně do každé jamky přidáno 200 µl pracovního činidla. Mikrodestička se inkubovala 30 min při 37 °C. Nakonec byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm.

### 3.2.3 Stanovení enzymové aktivity proteas

#### 3.2.3.1 Aktivitní test s azokaseinem

Principem stanovení je kvantifikace barevného produktu, který vzniká štěpením kaseinu značeného oranžovou sulfanilamidovou skupinou působením proteas.

Reakční směs (100 µl):

- 80 µl Britton-Robinson pufr pH 5,8 obsahující 0,1 M EDTA
- 10 µl aktivační směs
  - 1,5 µl 0,25 M DTT
  - 0,6 µl 4 M NaCl
  - 1,5 µl PEG 6000 10%
  - 6,4 µl H<sub>2</sub>O
- 10 µl směs s extraktem
  - 0,7-10 µl extraktu (obsahujícího 10 µg proteinu) doplněno vodou

Po preinkubaci reakční směsi (10 min, laboratorní teplota) bylo ke každému vzorku přidáno 50 µl roztoku substrátu (2% azokasein, 1 M močovina) a inkubováno (2,5 h, 37 °C). Reakce byla zastavena přidáním 300 µl 6% TCA a následně zchlazena (30 min, 4 °C). Nerozpuštěný precipitovaný substrát byl centrifugován (10 min, 13000 g). Z každého vzorku bylo odebráno 330 µl supernatantu a byla změřena jejich absorbance při 360 nm proti

příslušnému blanku (kontrolnímu vzorku bez enzymů). Měření bylo pro každý vzorek provedeno v duplikátech.

Tento základní test byl modifikován pro stanovení proteolytické aktivity v přítomnosti inhibitorů následujícím způsobem: zásobní roztok inhibitoru (viz kap. 3.1.2.2 ) byl pipetován do aktivační směsi v množství, které dalo finální koncentraci v reakční směsi: E-64 (50  $\mu\text{M}$ ), pepstatin (10  $\mu\text{M}$ ), STI (6  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ).

V aktivním testu byla sledována aktivita extraktu při různých pH. Reakční směs (100  $\mu\text{l}$ ) byla připravena stejným způsobem jako v předchozím odstavci s tím rozdílem, že byly použity Britton-Robinson pufrů v rozmezí pH 4,0-8,5.

*Britton-Robinson pufr*: 0,2 M kyselina boritá, 0,2 M kyselina octová, 0,2 M kyselina fosforečná

### 3.2.3.2 *Aktivní test s fluorogeními peptidovými substráty*

Ke stanovení aktivity jednotlivých proteas byla použita fluorescence vznikající po rozštěpení substrátu s fluorescenční značkou AMC (7-amido-4-methylkumarin) nebo Abz (2-aminobenzoyl). Fluorescence byla měřena při 37 °C v mikrodestičkách pomocí fluorescenční čtečky GENios při excitační vlnové délce 365 nm a emisní vlnové délce 460 nm (pro AMC) nebo při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 410 nm (pro Abz).

Reakční směs (100  $\mu\text{l}$ ):

- 10  $\mu\text{l}$  směs s extraktem (E-mix):
  - 0-10  $\mu\text{l}$  extraktu doplněno vodou
- 70  $\mu\text{l}$  aktivační směs (A-mix):
  - 1  $\mu\text{l}$  DTT (0,25 M v  $\text{H}_2\text{O}$ )
  - 69  $\mu\text{l}$  Britton-Robinson pufru
- 20  $\mu\text{l}$  substrátová směs (S-mix):
  - 0,4  $\mu\text{l}$  substrátu
  - 19,6  $\mu\text{l}$  Britton-Robinson pufru

Toto základní složení reakční směsi bylo pro některé testy modifikováno následujícím způsobem:

- Gly-Arg-AMC substrát byl testován v přítomnosti 25  $\mu$ M NaCl.
- Leu-AMC substrát byl testován bez přítomnosti DTT a v přítomnosti E-64.
- Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu substrát byl testován na extraktech, které byly připraveny v přítomnosti E-64.
- Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC substrát byl testován bez přítomnosti DTT a v přítomnosti E-64.

Do jednotlivých jamek mikroleštičky byl napipetován E-mix a A-mix, směs byla protřepána a inkubována ve fluorescenční čtečce (15 min, 37 °C), aby došlo k aktivaci proteas. Poté byl přidán S-mix. Po protřepání byla kontinuálně měřena fluorescence směsi při dané vlnové délce a byla určena počáteční rychlost reakce. Měření bylo pro každý vzorek provedeno v triplicátech. Jako blank byla použita reakční směs bez enzymového extraktu.

*Britton-Robinson pufr*: 0,2 M kyselina boritá, 0,2 M kyselina octová, 0,2 M kyselina fosforečná

Jednotlivé substráty byly testovány v kombinaci s následujícími hodnotami pH Britton-Robinson pufru:

<i>peptidový substrát:</i>	<i>pH:</i>
Z-Phe-Arg-AMC	5,8
Z-Ala-Ala-Asn-AMC	5,8
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC	6,5
Arg-AMC	5,8
Gly-Arg-AMC	5,8
Leu-AMC	7,5
Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu	4,5

V aktivním testu byla sledována aktivita extraktu při různých pH. Reakční směs (100  $\mu$ l) byla připravena stejným způsobem jako v předchozím odstavci s tím rozdílem, že byly použity Britton-Robinson pufr v rozmezí pH 3,0-8,5.

### 3.2.3.3 *Inhibice enzymové aktivity*

Výše uvedený základní test byl modifikován pro stanovení proteolytické aktivity v přítomnosti inhibitorů následujícím způsobem: zásobní roztok inhibitoru (viz kap. 3.1.2.2 ) byl pipetován do aktivační směsi v množství, které dalo finální koncentraci v reakční směsi: E-64 (50  $\mu\text{M}$ ), pepstatin (10  $\mu\text{M}$ ), STI (6  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ), CA-074 (10  $\mu\text{M}$ ), bestatin (300  $\mu\text{M}$ ), TPCK (100  $\mu\text{M}$ ), BPTI (65  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ ).

Reakční směs (100  $\mu\text{l}$ ):

- 70  $\mu\text{l}$  aktivační směs (A-mix):
  - 0,7-5  $\mu\text{l}$  extraktu
  - 1  $\mu\text{l}$  DTT (0,25 M v  $\text{H}_2\text{O}$ )
  - doplněno Britton-Robinson pufrem
- 10  $\mu\text{l}$  inhibiční směs (I-mix):
  - 1-2,5  $\mu\text{l}$  inhibitoru/destilované vody
  - doplněno Britton-Robinson pufrem
- 20  $\mu\text{l}$  substrátová směs (S-mix):
  - 0,4  $\mu\text{l}$  substrátu
  - 19,6  $\mu\text{l}$  Britton-Robinson pufru

Do jednotlivých jamek mikroleštičky byl napipetován A-mix a I-mix, směs byla protřepána a inkubována ve fluorescenční čtečce (15 min, 37 °C), aby došlo k inhibici proteas. Poté byl přidán S-mix. Po protřepání byla kontinuálně měřena fluorescence směsi při dané vlnové délce a byla určena počáteční rychlost reakce. Měření bylo pro každý vzorek provedeno v triplicátech. Jako blank byla použita reakční směs bez enzymového extraktu a jako kontrolní vzorek byla použita reakční směs bez inhibitoru.

### 3.2.4 Elektroforetické metody

#### 3.2.4.1 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS

Provedení elektroforézy v přítomnosti 1% SDS vycházelo z postupu podle Laemmliho [43]. Byly použity 15% polyakrylamidové gely o rozměrech 80 x 60 x 0,7 mm. Vlastní elektroforéza byla provedena na přístroji Bio-Rad. Fixace probíhala 20 min v roztoku obsahujícím 50% ethanol a 12% kyselinu octovou. K barvení byla použita Coomassie Brilliant Blue G250 [44] nebo následně proveden Western blot s imunodetekcí.

#### 3.2.4.2 Western blot s imunodetekcí

Po provedení SDS-PAGE byly gel, filtrační papíry a PVDF membrána o velikosti gelu 15 min ekvilibrovány v transferovém pufru. Po ekvilibraci byly navrstveny do blotovacího přístroje v pořadí: anoda, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír, katoda. Přenos probíhal 1 h za konstantního napětí 100 V. K vizualizaci byla použita metoda imunodetekce protilátkou rozpoznávající histidinovou kotvu. Při imunodetekci byla membrána nejprve pro zablokování nespecifických interakcí inkubována v roztoku TTBS obsahujícím 10% odtučněné mléko a 1% PVP 1 h při 4 °C. Poté byla opláchnuta v TTBS roztoku (3 x 10 min). Membrána byla inkubována v přítomnosti protilátky proti histidinové kotvě s navázanou peroxidasou v roztoku TBS (ředění 1:5000) 1 h při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla membrána znovu promyta TTBS roztokem (3 x 15 min) a vystavena působení 1 ml komerčního chromogenního substrátu pro peroxidasu BM Blue POD Substrate. Po vyvolání byla membrána omyta vodou, usušena mezi filtračními papíry a uchována v temnu.

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

*TBS roztok:* 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl

*TTBS roztok:* 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween

### 3.2.5 Rekombinantní exprese

#### 3.2.5.1 Transformace a kultivace v *Escherichia coli*

50  $\mu$ l standardizované suspenze buněk BL21 Star™ *E. coli* bylo rozmrazeno na ledu a bylo k nim přidáno 5  $\mu$ l plazmidové DNA (vektor pET101/D-TOPO®). Směs byla inkubována 30 min na ledu. Poté byl proveden teplotní šok při 42 °C po dobu 30 sekund. Po 30 sekundách byla směs okamžitě zchlazena přenesením na led a poté přidáno 250  $\mu$ l SOC média o laboratorní teplotě. Směs byla kultivována 30 min při 37 °C za třepání (225 rpm). Vzorek byl poté přidán k 10 ml LB média obsahující antibiotikum ampicilin a buňky byly kultivovány při 37 °C přes noc. Narostlá kultura byla druhý den přidána k 500 ml LB média obsahující ampicilin a kultivace pokračovala za stejných podmínek do dosažení  $OD_{600} = 0,5$ . Poté byla provedena indukce exprese přidavkem IPTG o výsledné koncentraci 1 mM. Exprese probíhala 6,5 h při 37 °C. Následně byly buňky centrifugovány (10 min, 3000 g, 4 °C) a získané pelety skladovány při -20 °C.

V průběhu kultivace byly odebrány 0,5 ml alikvoty kultury, které byly centrifugovány (10 min, 10000 g). Peleta byla rozpuštěna v 80  $\mu$ l vzorkového pufru a s 10  $\mu$ l vzorku byla provedena SDS-PAGE.

*SOC médium*: 2% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukosa

*LB médium*: 1% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 0,5% NaCl, ampicilin (100  $\mu$ g/ml), pH 7,0

#### 3.2.5.2 Příprava inkluzních tělísek

Bakteriální peleta pocházející z kultivace v objemu 2 x 0,5 l byla resuspendována v 30 ml lyzovacího pufru A. Ke směsi byl přidán lysozym (1 mg/g mokré pelety), PMSF (1 mM) a merkaptoethanol (0,1%). Lyze probíhala 30 min při laboratorní teplotě a vzniklý lyzát byl homogenizován tyčovým sonikátorem a poté inkubován v přítomnosti 0,1% DOC (inhibitor lysozymu) 30 min při 4°C. Poté byl lyzát centrifugován (10 min, 10000 g, 4 °C). Peleta obsahující inkluzní tělíška byla promyta nejprve resuspendováním v 10 ml pufru B a centrifugována (10000 g, 10 min, 4 °C). Peleta byla dále promyta resuspendováním v 10 ml pufru C a centrifugována (10000 g, 10 min, 4 °C). Získané pelety byly skladovány při -20 °C.

*Lyzovací pufr A:* 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

*Pufr B:* 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100

*Pufr C:* 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,1% merkptoethanol

Po jednotlivých centrifugačních krocích byly odebírány supernatanty. K 200  $\mu$ l alikvotům supernatantů byl přidán vychlazený aceton o výsledné koncentraci 80%. Protein byl srážen při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 h, následně získán centrifugací (15 min, 15000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a vysušen na rotačním vakuovém koncentrátoru. Dále byl připraven vzorek z čistých inkluzí. K sraženinám a k 2 mg inkluzí bylo přidáno 20  $\mu$ l redukčního vzorkového pufru a provedena SDS-PAGE a imunoblot.

### **3.2.5.3 Test rozpustnosti inkluzí**

5 mg mokrých inkluzí bylo rozsuspendováno v 1 ml destilované vody a sonikováno. Vzniklá suspenze byla rozdělena do deseti 100  $\mu$ l alikvotů, centrifugována (10 min, 10000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a peleta byla zamrazena.

Rozpustnost inkluzí byla testována v často používaných činidlech: a) 8 M močovina, b) 50% kyselina octová, c) 0,3% N-lauroylsarkosin sodný, 50 mM CAPS pH 11, 0,3 M NaCl. K získaným alikvotům inkluzí bylo přidáno 50  $\mu$ l uvedených činidel. Vzorky byly inkubovány za občasného promíchání a sonikace na vodní lázni 1 h za laboratorní teploty. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány (10 min, 15000 g). K 25  $\mu$ l supernatantu byl přidán vychlazený aceton o výsledné koncentraci 80%. Protein byl srážen při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 h, následně získán centrifugací (15 min, 15000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), vysušen na rotačním vakuovém koncentrátoru a rozpuštěn ve 12  $\mu$ l vzorkového pufru. Vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a barveny Coomassie Brilliant Blue G250.

### **3.2.5.4 Purifikace rekombinantního proteinu pomocí Ni-NTA kolony**

Vzorek byl připraven rozpuštěním 0,5 g mokrých inkluzí v 1 ml rozpouštěcího pufru, dále byl přidán 100 mM merkptoethanol a inkubován 1 h při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Následně bylo přidáno 9 ml rozpouštěcího pufru a vzorek byl centrifugován (10 min, 15000 g). Supernatant byl



nanesen na afinitní kolonu pumpou a následující chromatografický postup byl proveden na automatickém zařízení pro nízkotlakou chromatografii při průtoku 0,2 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona promyta 10 ml rozpouštěcího pufru. Poté byl průtok kolony zvýšen na 0,5 ml/min a kolona byla promyta 20 ml promývacího pufru. Následně byla kolona eluována 40 ml elučního pufru. Průběh purifikace byl vyhodnocen kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm. Materiál elučního píku byl skladován při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*Nosič:* Ni-NTA Superflow (Qiagen)

*Rozpouštěcí pufr:* 10 mM Tris-HCl, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,0, 8 M močovina

*Promývací pufr:* 10 mM Tris-HCl, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,0, 8 M močovina, 20 mM imidazol

*Eluční pufr:* 10 mM Tris-HCl, 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8,0, 8 M močovina, 250 mM imidazol

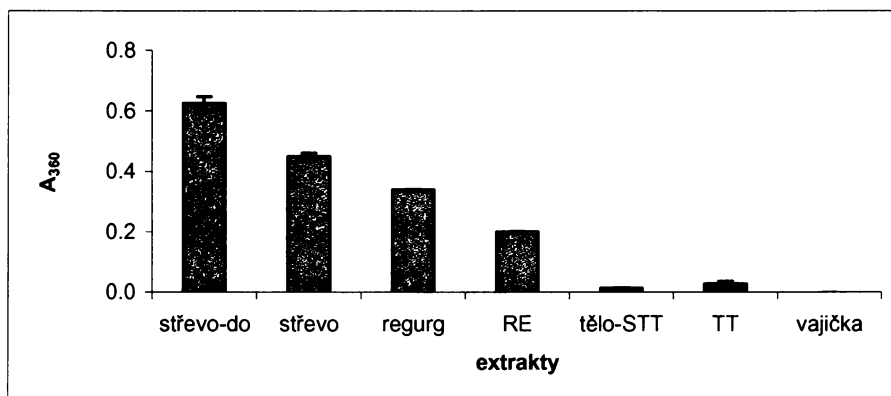
## 4 Výsledky

### 4.1 Distribuce trávicích proteas mandelinky bramborové

#### 4.1.1 Analýza proteolytické aktivity s proteinovým substrátem

Jako proteinový substrát pro analýzu proteolytické aktivity v extraktech odvozených z tkání a sekretů *L. decemlineata* byl použit azokasein při pH 5,8.

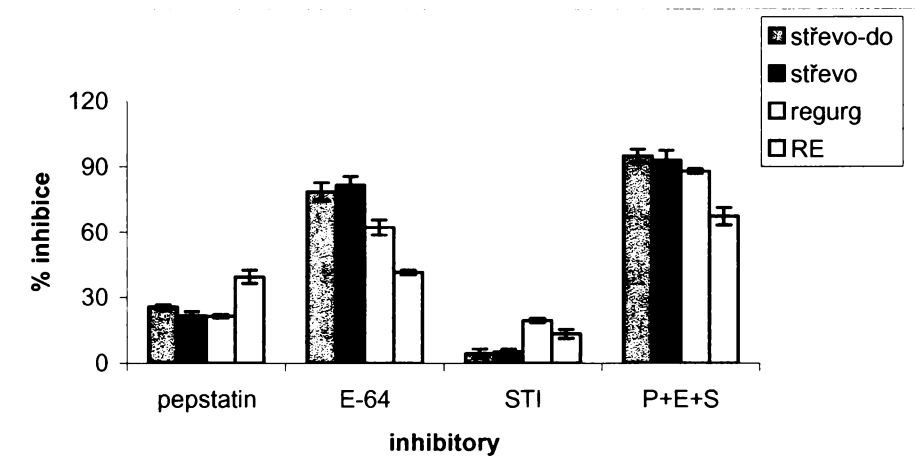
Nejvyšší specifická aktivita byla nalezena u extraktů ze střev (larev i dospělců) a dále u sekretů se střevním obsahem (regurg a RE). Slabá aktivita byla nalezena v mimostřevních tělních tkáních (tělo-STT), tukovém tělísku (TT) a prakticky žádná ve vajíčkách (Obr. 4.1). Z toho vyplývá, že hlavní proteolytická aktivita umožňující degradaci obecných proteinových substrátů je lokalizována v trávicím traktu.



**Obr. 4.1:** Proteolytická aktivita v extraktech odvozených z *L. decemlineata* měřená s azokaseinem jako proteinovým substrátem při pH 5,8. Jako extrakty byly použity: střevo-do (střevo dospělé), střevo (střevo larvy), regurg (regurgitant), RE (směs regurgitant a exkrementů), tělo-STT (tělní tkáň zbavená střeva a tukového tělíska), TT (tukové tělísko), vajíčka. V testu bylo použito množství extraktu obsahující 10 µg proteinu. Aktivita je uvedena jako absorbance produktu hydrolyzy azokaseinu provedené podle testu uvedeného v kap. 3.2.3.1.

Distribuce proteas hydrolyzujících azokasein byla dále podrobněji analyzována s využitím specifických inhibitorů (Obr. 4.2 na str. 26). Pepstatin je selektivní inhibitor aspartátových proteas, E-64 je skupinový inhibitor cysteinových proteas (klanu CA) a STI je inhibitor serinových proteas. Vedle testování jednotlivých inhibitorů byla použita také jejich kombinace (P+E+S), která vedla k velmi výrazné celkové inhibici proteolýzy. Z Obr. 4.2 na str. 26 můžeme vyvodit závěr, že na degradaci obecných proteinových substrátů v trávicím

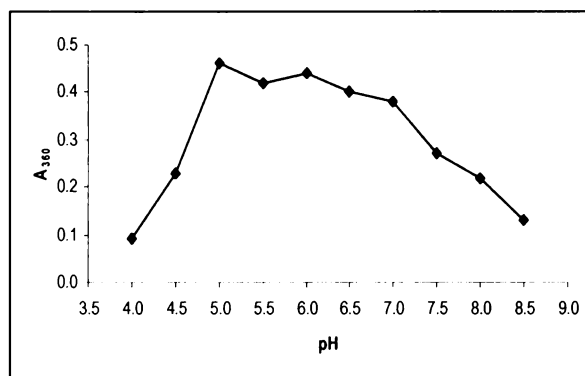
traktu mandelinky se nejvíce podílejí cysteinové proteasy, v menší míře aspartátové proteasy a nejméně serinové proteasy. Tento trend je méně výrazný u extraktu RE (směs regurgitant a exkrementů), což může být způsobeno vysokou kontaminací mikrobiálními proteasami.



**Obr. 4.2:** Inhibice proteolytické aktivity v extraktech odvozených z *L. decemlineata* měřená s azokaseinem jako proteinovým substrátem při pH 5,8. Jako inhibitory byly použity: pepstatin (inhibitor aspartátových proteas), E-64 (inhibitor cysteinových proteas), STI (inhibitor serinových proteas), kombinace těchto tří inhibitorů (P+E+S). Jako extrakty byly použity: střevo-do (střevo dospělé), střevo (střevo larvy), regurg (regurgitant), RE (směs regurgitant a exkrementů). Výsledek je vyjádřen jako relativní inhibice aktivity vzhledem k neinhibované kontrole.

Dále byl pro tento proteinový substrát určen pH profil degradace (Obr. 4.3).

K maximální degradaci dochází v poměrně široké škále pH 5-7. V této oblasti se pohybují i hodnoty pH obsahu žaludku mandelinky [45-47].



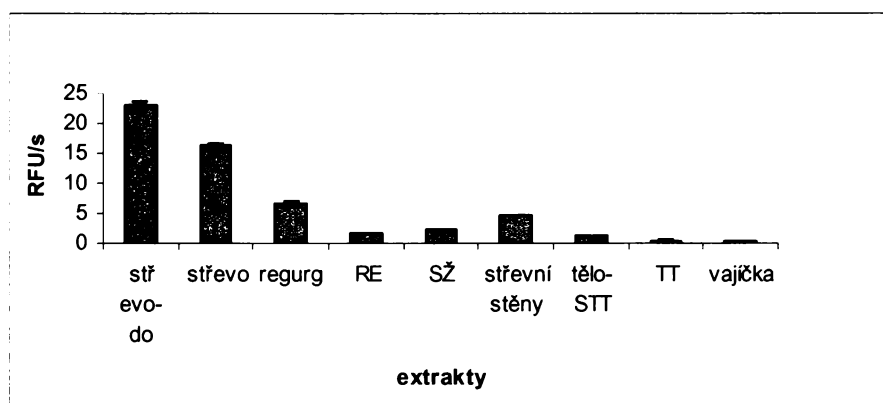
**Obr. 4.3:** pH profil proteolytické aktivity v homogenátu střevní tkáně larev *L. decemlineata* měřený s azokaseinem jako proteinovým substrátem.

## 4.1.2 Analýza proteolytické aktivity s peptidovými substráty

### 4.1.2.1 Cysteinové endopeptidasy

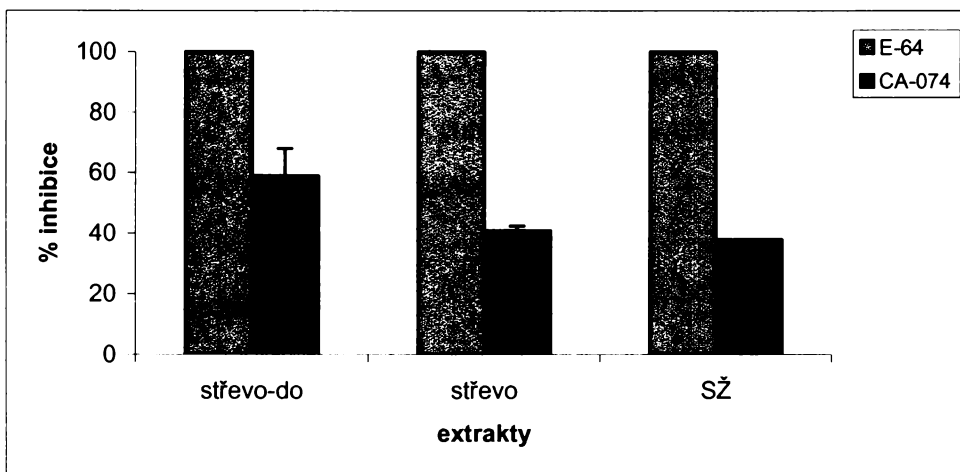
#### Kathepsin B a kathepsin L

Přítomnost kathepsinu B a/nebo L v extraktech odvozených z tkání a sekretů *L. decemlineata* byla testována hydrolýzou specifického substrátu Z-Phe-Arg-AMC při pH 5,8 (viz  $pH_{opt}$  proteolýzy azokaseinu, kap. 4.1.1). Nejvyšší specifická aktivita byla nalezena u extraktů ze střev (larev i dospělců) a dále u extraktu ze střevních stěn a sekretů se střevním obsahem (regurg a v menší míře také RE). Slabá aktivita byla nalezena v mimostřevních tělních tkáních (tělo-STT), např. slinných žlázách (SŽ), tukovém tělísku (TT) a také ve vajíčkách. Z toho vyplývá, že rozšíření cysteinových endopeptidas v tkáních je poměrně obecné, ale jejich masivní produkce ve střevě ukazuje hlavní funkci jako trávicích enzymů (Obr. 4.4).



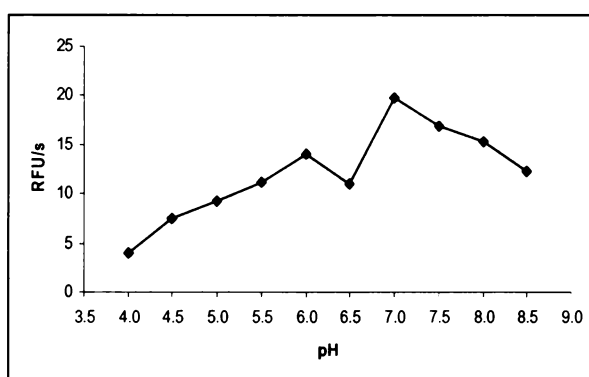
**Obr. 4.4:** Proteolytická aktivita v extraktech odvozených z *L. decemlineata* měřená s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC při pH 5,8. Jako extrakty byly použity: střevo-do (střevo dospělé), střevo (střevo larvy), regurg (regurgitant), RE (směs regurgitant a exkrementů), SŽ (slinné žlázy), střevní stěny, tělo-STT (tělní tkáň zbavená střeva a tukového tělíska), TT (tukové tělísko), vajíčka. V testu bylo použito množství extraktu obsahující 0,5  $\mu\text{g}$  proteinu. Aktivita je uvedena v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU).

Dále byla podrobněji analyzována distribuce kathepsinu L a B s využitím specifických inhibitorů (Obr. 4.5 na str. 28). Inhibitor E-64 je skupinový inhibitor cysteinových proteas, který inhibuje kathepsin B i L; naproti tomu inhibitor CA-074 selektivně inhibuje pouze kathepsin B. Tato analýza ukázala, že ve všech testovaných extraktech jsou přítomné oba typy kathepsinů, nicméně jejich detailní poměr vykazuje mírné rozdíly.



**Obr. 4.5:** Inhibice proteolytické aktivity v extraktech odvozených z *L. decemlineata* měřená s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC při pH 5,8. Jako inhibitory byly použity: E-64 (skupinový inhibitor cysteinových proteas klanu CA), CA-074 (specifický inhibitor kathepsinu B). Jako extrakty byly použity: střevo-do (střevo dospělce), střevo (střevo larvy), SŽ (slinné žlázy). Výsledek je vyjádřen jako relativní inhibice aktivity vzhledem k neinhibované kontrole.

Dále byl určen pH profil aktivity k Z-Phe-Arg-AMC substrátu. Jak je patrné z Obr. 4.6, profil má dva vrcholy, což naznačuje přítomnost minimálně dvou typů kathepsinů (nebo jejich isoenzymů).



**Obr. 4.6:** pH profil proteolytické aktivity v homogenátu střevní tkáně larev *L. decemlineata* měřený s fluorogenním substrátem Z-Phe-Arg-AMC. Aktivita je uvedena v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU).

#### Asparaginylní endopeptidasa (legumain)

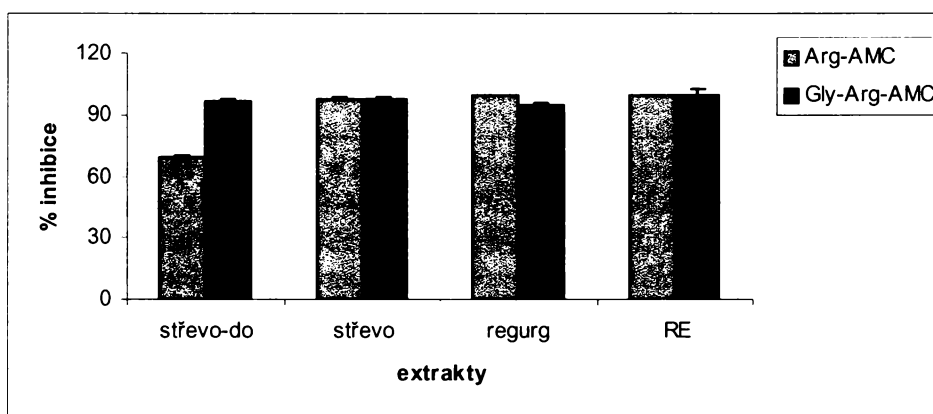
V extraktu ze střevní tkáně (larev a dospělců) a sekretech (regurg a RE) byla nalezena enzymatická aktivita hydrolyzující specifický substrát Z-Ala-Ala-Asn-AMC (při pH 5,8), která se běžně používá k prokázání legumainu, cysteinové proteasy z klanu CD působící jako asparaginylní endopeptidasa. Nejednalo se však o námi předpokládanou aktivitu, protože byla zcela inhibovatelná pomocí E-64, jenž je dobrým inhibitorem cysteinových proteas klanu CA,

ale nikoli klanu CD včetně legumainu. Dále byla tato aktivita inhibovatelná z 50-60% pomocí specifického inhibitoru kathepsinu B CA-074. Z toho vyplývá, že legumain není trávicí proteasou mandelinky a za hydrolyzu substrátu Z-Ala-Ala-Asn-AMC byly odpovědné proteasy typu kathepsinu B a zřejmě i kathepsinu L.

#### 4.1.2.2 Cysteinové exopeptidasy

##### Kathepsin C a kathepsin H

V extraktu ze střevní tkáně (larev a dospělců) a sekretech (regurg a RE) byl detekován kathepsin C (aminodipeptidasa) pomocí specifického substrátu Gly-Arg-AMC a kathepsin H (aminopeptidasa) pomocí specifického substrátu Arg-AMC. Aktivita kathepsinu C byla nicméně výrazně nižší než kathepsinu H a pro její monitorování bylo potřeba použít 10x více extraktu než pro kathepsin H. Ověření, že obě analyzované aktivity patří cysteinovým proteasám papainové rodiny (klanu CA), bylo provedeno pomocí inhibitoru E-64, který zcela inhiboval aktivity (Obr. 4.7). Nekompletní inhibice Arg-AMC aktivity byla nalezena u střeva dospělců, což naznačuje přítomnost jiného typu aminopeptidasy.

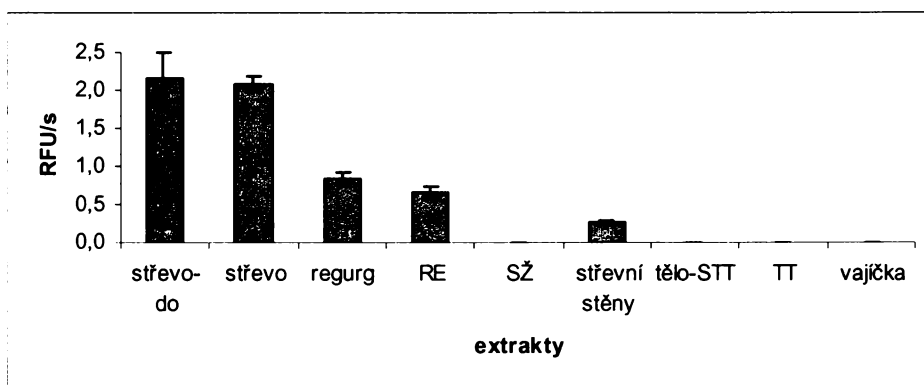


**Obr. 4.7:** Inhibice proteolytické aktivity v extraktech odvozených z *L. decemlineata* měřená s fluorogenními substráty Arg-AMC a Gly-Arg-AMC při pH 5,8. Jako inhibitor byl použit skupinový inhibitor cysteinových proteas E-64. Jako extrakty byly použity: střevo-do (střevo dospělé), střevo (střevo larvy), regurg (regurgitant), RE (směs regurgitant a exkrementů). V testu bylo použito množství extraktu obsahující 0,5  $\mu\text{g}$  (Arg-AMC) nebo 5  $\mu\text{g}$  (Gly-Arg-AMC) proteinu. Výsledek je vyjádřen jako relativní inhibice aktivity vzhledem k neinhibované kontrole.

### 4.1.2.3 Aspartátové proteasy

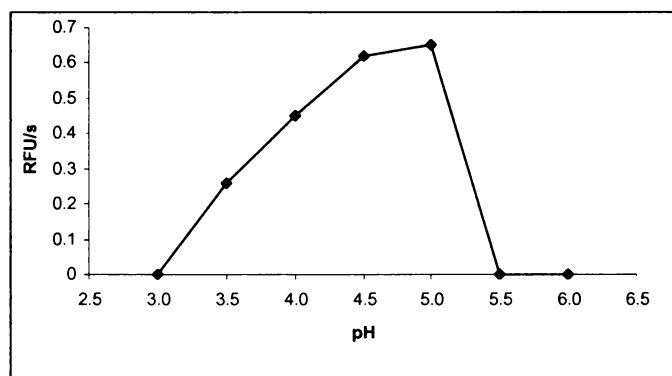
#### Kathepsin D

Přítomnost kathepsinu D v extraktech odvozených z tkání a sekretů *L. decemlineata* byla zjištěna na základě štěpení specifického substrátu Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu při pH 4,5 (Obr. 4.8). Nejvyšší specifická aktivita byla nalezena u extraktů ze střev (larev i dospělců) a dále u sekretů se střevním obsahem (regurg a RE). Nižší aktivita byla nalezena u extraktu ze střevních stěn. V mimostřevních tělních tkáních (tělo-STT), např. slinných žlázách (SŽ), tukovém tělisku (TT) a také ve vajíčkách nebyla nalezena aktivita žádná. Z toho vyplývá, že hlavní proteolytická aktivita aspartátových proteas je lokalizována v trávicím traktu. Aktivita všech uvedených extraktů byla zcela inhibovatelná selektivním inhibitorem aspartátových proteas pepstatinem.



**Obr. 4.8:** Proteolytická aktivita v extraktech odvozených z *L. decemlineata* měřená se specifickým substrátem Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu při pH 4,5. Jako extrakty byly použity: střevo-do (střevo dospělé), střevo (střevo larvy), regurg (regurgitát), RE (směs regurgitát a exkrementů), SŽ (slinné žlázy), střevní stěny, tělo-STT (tělní tkáň zbavená střeva a tukového těliska), TT (tukové tělísko), vajíčka. V testu bylo použito množství extraktu obsahující 2  $\mu$ g proteinu. Aktivita je uvedena v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU).

Dále byl určen pH profil aktivity k Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu substrátu. K maximální aktivitě dochází v poměrně úzké škále pH 4,5-5,0 a žádná aktivita nebyla nalezena nad pH 5,5 (Obr. 4.9 na str. 31).

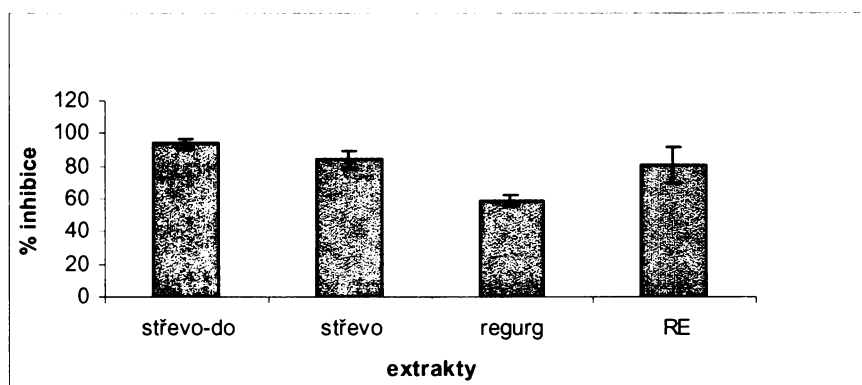


**Obr. 4.9:** pH profil proteolytické aktivity v homogenátu střevní tkáně larev *L. decemlineata* měřený se specifickým substrátem *Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu*. Aktivita je uvedena v relativních fluorescenčních jednotkách (RFU).

#### 4.1.2.4 Metaloproteasy

##### Leucin aminopeptidasa

V extraktu ze střevní tkáně (larev a dospělců) byla nalezena enzymatická aktivita hydrolyzující specifický substrát Leu-AMC (při pH 7,5), který se běžně používá k prokázání leucin aminopeptidasy. Tento test byl proveden v přítomnosti inhibitoru cysteinových proteas E-64, který by blokoval případnou interakci cysteinové aminopeptidasy kathepsinu H s tímto substrátem. Výrazně nižší aktivita než v extraktech ze střevních tkání byla nalezena v sekretech (regurg a RE); k jejímu měření bylo nutné použít 10x více extraktu než u střevních tkání. To naznačuje, že tato proteasa není sekretovaná, ale její výskyt je vázán na střevní tkáň. Aktivita leucin aminopeptidasy v extraktech byla významně inhibovatelná specifickým inhibitorem leucin aminopeptidasy bestatinem (Obr. 4.10).



**Obr. 4.10:** Inhibice proteolytické aktivity v extraktech odvozených z *L. decemlineata* měřená s fluorogenním substrátem *Leu-AMC*. Jako inhibitor byl použit specifický inhibitor leucin aminopeptidasy bestatin. Jako extrakty byly použity: střevo-do (střevo dospělce), střevo



(střevo larvy), regurg (regurgitant), RE (směs regurgitant a exkrementů). V testu bylo použito množství extraktu obsahující 0,5 µg (střevní extrakty) nebo 5 µg (sekrety) proteinu. Výsledek je vyjádřen jako relativní inhibice aktivity vzhledem k neinhibované kontrole.

#### 4.1.2.5 Serinové proteasy

Hydrolýzou specifického substrátu Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC byla prokázána proteolytická aktivita serinových proteas chymotrypsinového typu v extraktech odvozených ze střevní tkáně (dospělců a larev) a sekretů (regurg a RE) *L. decemlineata*. Byla měřena při pH 6,5 v přítomnosti inhibitoru E-64 pro potlačení případné interference majoritních cysteinových proteas. Tato aktivita je velmi nízká a na její detekci bylo nutné použít nejvyšší množství extraktu (15 µg proteinu v testu) ve srovnání s ostatními testovanými fluorogenními peptidovými substráty. Aktivity extraktů byly částečně inhibovatelné (40-60%) inhibitorem serinových proteas STI. Další běžné inhibitory serinových proteas (BPTI, Pefabloc, TPCK) vykazovaly pouze slabý efekt, což naznačuje vyhraněnou inhibiční specifitu této serinové proteasy.

## 4.2 Příprava trávicí aspartátové proteasy mandelinky bramborové

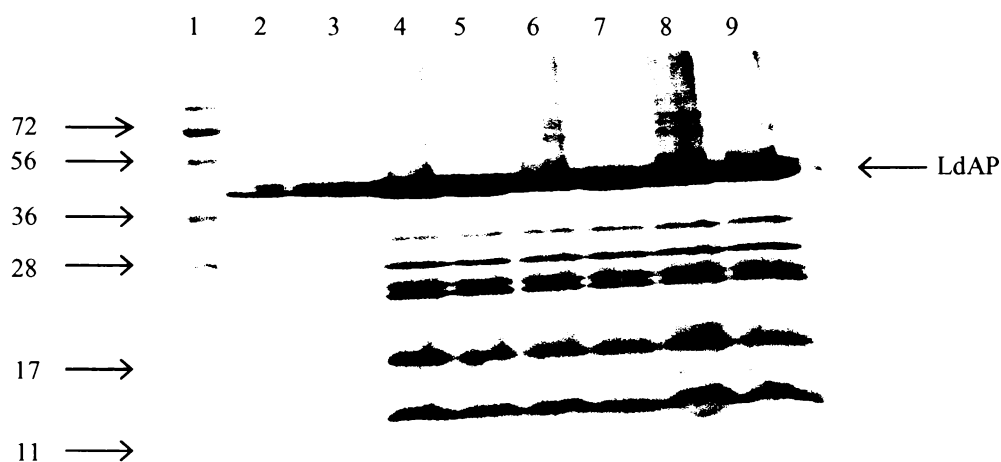
Další část bakalářské práce se zabývala trávicí aspartátovou proteasou mandelinky bramborové (LdAP, *Leptinotarsa decemlineata* aspartic protease), pro kterou byla na pracovišti ÚOCHB AV ČR určena cDNA sekvence a připraven vektor pro rekombinantní expresi v *Escherichia coli*. Cílem bylo připravit rekombinantní protein, který bude v následujícím období použit pro produkci polyklonální protilátky k imunolokalizaci ve střevě mandelinky a dále pro refolding aktivního enzymu.

### 4.2.1 Rekombinantní exprese v bakteriálním systému

Buňky *E. coli* BL21Star byly transformovány vektorem pET101/D-TOPO<sup>®</sup>, který obsahuje sekvenci prekurzoru LdAP s histidinovou kotvou na C-konci. Buňky byly transformovány teplotním šokem podle postupu uvedeného v kap. 3.2.5.1. Připravené inokulum (10 ml) bylo převedeno do většího objemu LB média (0,5 l) obsahujícího ampicilin a kultivace dále probíhala při 37 °C do požadované hodnoty OD<sub>600</sub> = 0,5. Po jejím dosažení

bylo k narostlé kultuře přidáno IPTG a indukovaná exprese probíhala po dobu 6,5 h. V pravidelných časových intervalech byly odebírány alikvoty (0,5 ml) pro následnou analýzu kinetiky exprese. Po ukončení kultivace byla celá kultura centrifugována a získaná buněčná peleta byla skladována při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Jednotlivé odebrané alikvoty pro analýzu exprese byly centrifugovány, získaná peleta rozpuštěna v redukčním vzorkovém pufru pro SDS-PAGE. Proteiny separované na SDS-PAGE byly elektroblotovány na PVDF membránu a získaný „Western blot“ byl analyzován imunodetekční metodou popsanou v kap. 3.2.4.2 (Obr. 4.11). K tomuto účelu byla využita komerční protilátka rozpoznávající histidinovou kotvu fúzního rekombinantního proteinu. Tento protein je složen ze sekvence LdAP (371 aminokyselin) a fúzní domény s histidinovou kotvou (32 aminokyselin). Tento fúzní protein má teoretickou relativní molekulovou hmotnost 44 kDa. Tato hodnota je v souladu s majoritním proteinem detekovaným na imunoblotu (pás migrující mezi standardy 36 a 56 kDa), čímž byla prokázána funkčnost připraveného expresního systému. Porovnání alikvotů odebíraných v časových intervalech ukázalo zřetelný nárůst exprese po indukci s IPTG.



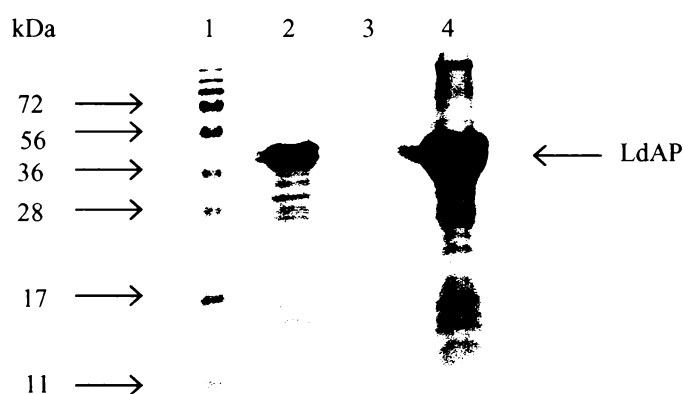
**Obr. 4.11:** Analýza kinetiky exprese pomocí Western blotu s imunodetekcí histidinové kotvy. Alikvoty byly odebírány v časovém rozvoji od přidání IPTG. Dráha č. 1: standardy molekulových hmotností; dráhy č. 2 a 3: čas 0 před indukci pomocí IPTG; dráhy č. 4 a 5: 3 h indukce exprese; dráhy č. 6 a 7: 5 h indukce exprese; dráhy č. 8 a 9: 6,5 h indukce exprese. Byly analyzovány vzorky ze dvou paralelních kultivací.

## 4.2.2 Purifikace rekombinantního proteinu

### 4.2.2.1 Příprava a analýza inkluzních tělísek

Peleta buněk získaných po kultivaci (popsáno v kap. 3.2.5.1) byla použita pro přípravu inkluzních tělísek, kde je předpokládána akumulace rekombinantního proteinu. Pro přípravu inkluzí byl použit postup uvedený v kap. 3.2.5.2; zkráceně: a) buňky byly lyzovány v lyzovacím pufru v přítomnosti lysozymu, PMSF a merkaptoethanolu, b) vzniklý lyzát byl inkubován v přítomnosti DOC a odstředěn, c) peleta obsahující inkluze byla dále čištěna dvěma promývacími pufrů se zvyšující se koncentrací NaCl. Získané přečištěné inkluze byly skladovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Přítomnost rekombinantního proteinu v tomto výsledném produktu inkluzí byla ověřena pomocí imunoblotu. Žádné významné množství rekombinantního proteinu nebylo nalezeno ve frakcích supernatantů získaných během výše uvedeného postupu přípravy inkluzí, což ukazuje akumulaci rekombinantního proteinu v nerozpustné formě během exprese.

Se získanými inkluzemi byla testována jejich rozpustnost ve třech často používaných činidlech: a) 8 M močovina, b) 50% kyselina octová, c) 0,3% N-lauroylsarkosin sodný, 50 mM CAPS pH 11, 0,3 M NaCl (Obr. 4.12). Alikvoty inkluzí rozpouštěné v těchto činidlech byly centrifugovány a supernatanty analyzovány pomocí SDS-PAGE. Z Obr. 4.12 je patrné, že inkluze jsou rozpustné v činidlech a) a c).



**Obr. 4.12:** Analýza rozpustnosti inkluzních tělísek obsahujících rekombinantní protein LdAP. Supernatanty obsahující rozpuštěný protein byly separovány pomocí SDS-PAGE a vizualizovány barvením proteinů pomocí Coomassie Brilliant Blue G250. Dráha č. 1: standardy molekulových hmotností; testovaná rozpouštěcí činidla: dráha č. 2: 8 M močovina; dráha č. 3: 50% kyselina octová; dráha č. 4: 0,3% N-lauroylsarkosin sodný, 50 mM CAPS pH 11, 0,3 M NaCl.

#### 4.2.2.2 *Afinitní chromatografie*

Rekombinantní protein LdAP byl z připravených inkluzí izolován pomocí afinitní kolony Ni-NTA, která obsahuje imobilizovanou NTA (nitrilotrioctovou kyselinu), se kterou specificky interaguje histidinová kotva rekombinantního proteinu.

Vzorek pro afinitní chromatografii byl připraven rozpuštěním mokrých inkluzí v rozpouštěcím pufru: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl, 8 M močovina, pH 8 a přidáním 100 mM merkaptoethanolu. Supernatant byl nanesen na afinitní kolonu pumpou a následující chromatografický postup byl proveden na automatickém zařízení pro nízkotlakou chromatografii jak je popsáno v kap. 3.2.5.4 ; zkráceně: a) kolona byla promyta rozpouštěcím pufrem (bez merkaptoethanolu), b) promývacím pufrem odvozeným od rozpouštěcího pufru s přídavkem 20 mM imidazolu, c) elučním pufrem, který se od promývacího liší pouze vyšším obsahem imidazolu silně kompetujícího o vazbu na NTA s histidinovou kotvou rekombinantního proteinu. Průběh purifikace byl vyhodnocen kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a materiál elučního píku byl skladován při -20 °C.

Tímto způsobem bylo získáno 40 mg rekombinantního proteinu (určeno stanovením obsahu proteinu v eluční frakci) z původních 0,5 g vlhkých čištěných inkluzí. Alikvot roztoku eluční frakce (0,6 mg proteinu/ml) byl dialyzován proti vodě a lyofilizován. Tento materiál byl poskytnut pro imunizaci a přípravu specifických polyklonálních protilátek rozpoznávajících LdAP.

## 5 Diskuse

Cílem této bakalářské práce bylo analyzovat distribuci trávicích proteas u mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*).

V první fázi byla v extraktech odvozených ze střevních tkání a sekretů mandelinky testována proteolytická aktivita pomocí obecného proteinového substrátu azokaseinu a nalezeno bylo pH optimum hydrolýzy v širším rozmezí pH mezi 5 a 7. Tato hodnota je v souladu s hodnotami pH, které byly naměřeny pro střevní obsah pro jednotlivé kompartmenty trávicího traktu různými autory [45-47]. To ukazuje, že molekulární evoluce trávicích enzymů adaptovala jejich funkční vlastnosti na prostředí, ve kterém působí. Hydrolýza azokaseinu byla dále testována v přítomnosti vybraných selektivních inhibitorů hlavních tříd proteas. Tato analýza ukázala, že hydrolýzy se účastní tři hlavní třídy proteas a jejich podíl na hydrolýze klesá v pořadí: cysteinové proteasy, aspartátové proteasy, serinové proteasy. Kombinované použití inhibitorů, které blokuje tyto proteasy, vedlo k prakticky kompletní inhibici hydrolýzy. Tento výsledek je v souladu s literaturou, která uvádí přítomnost těchto tří typů proteas v extraktech ze střev larev mandelinky bramborové [48,49].

V druhé fázi byla se stejnými extrakty testována proteolytická aktivita specifických peptidových substrátů a inhibitorů, které se používají pro diagnostiku jednotlivých typů proteas. Tato analýza prokázala přítomnost následujících typů proteas: cysteinové endopeptidasy kathepsinu B a L (ale nebyla prokázána asparaginylní endopeptidasa legumain), cysteinové exopeptidasy kathepsinu H a ve výrazně nižším množství kathepsinu C, aspartátové proteasy kathepsinu D, metaloproteasy leucin aminopeptidasy a serinové proteasy chymotrypsinu (ve velmi nízkém zastoupení). Tuto distribuci můžeme porovnat s jinými trávicími systémy bezobratlých, jako jsou klíš'ata nebo krevničky rodu *Schistosoma*, které byly podrobně studovány a které jsou známy, že fungují v kyselém pH. V těchto systémech je také významná role kathepsinu B, L a D, ale důležitou roli hraje i legumain a kathepsin C. Naopak zde nebyl detekován kathepsin H [50,51]. U klíš'te je tento trávicí systém lokalizován v lysosomech střevní tkáně a u krevničky je pravděpodobně kombinovaný jako sekretovaný a intracelulární.

U mandelinky je možné diskutovat lokalizaci nalezených trávicích proteas díky tomu, že byly analyzovány různé typy extraktů odvozených z celkové střevní tkáně, z čistých střevních stěn (bez střevního obsahu) a sekretů střeva. Tento rozbor ukazuje, že trávicí

proteasy jsou sekretovány do střevního lumen; pouze leucin aminopeptidasa je vázaná na střevní stěny.

Druhým cílem bakalářské práce bylo připravit rekombinantní aspartátovou proteasu mandelinky bramborové LdAP s využitím expresního systému v *E. coli* a expresního vektoru, který byl konstruován na ÚOCHB AV ČR. Tato proteasa byla výsledně purifikována afinitní chromatografií a bude v následujícím období použita jednak pro přípravu polyklonální protilátky a jednak pro refolding aktivního enzymu.

## 6 Závěr

- V extraktech odvozených ze střevní tkáně a sekretů mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) byla analyzována proteolytická aktivita. Pomocí specifických peptidových substrátů a inhibitorů byly identifikovány následující hlavní typy trávicích proteas:

cysteinové endopeptidasy:	kathepsin B a kathepsin L
cysteinové exopeptidasy:	kathepsin C a kathepsin H
aspartátové proteasy:	kathepsin D
metaloproteasy:	leucin aminopeptidasa
serinové proteasy:	chymotrypsin

- Byla měřena proteolýza proteinového substrátu azokaseinu pomocí extraktu a modifikovaného extraktu, kde byly aktivity hlavních tříd proteas blokovány pomocí selektivních inhibitorů. Tato analýza ukázala, že podíl proteas na proteolýze klesá v pořadí: cysteinové proteasy, aspartátové proteasy, serinové proteasy.
- Pro celkovou proteolýzu a dva hlavní typy proteas – cysteinových a aspartátových byla určena pH optima, která jsou v kyselé až neutrální oblasti.
- Z porovnání proteolytických aktivit v jednotlivých typech extraktů vyplývá, že cysteinové a aspartátové proteasy jsou sekretovány do trávicího traktu, na rozdíl od metaloproteasy, která je lokalizována především ve střevní tkáni.
- Pro trávicí aspartátovou proteasu larev mandelinky LdAP byl sestaven expresní systém pro produkci rekombinantního proteinu v *E. coli*. LdAP byla akumulována v inkluzních těliscích, která byla izolována a následně testována jejich rozpustnost. LdAP byla z tohoto materiálu izolována pomocí afinitní chromatografie využívající interakci s histidinovou kotvou.

## Seznam použité literatury

- [1] Barrett, A. J., McDonald, J. K.: *Biochem. J.* **237**, 935 (1986)
- [2] <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcfn> (20.8.2008)
- [3] Turk, B.: *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 785-799 (2006)
- [4] <http://merops.sanger.ac.uk> (20.8.2008)
- [5] Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. V.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597-635 (1998)
- [6] Murdock, L. L., Brookhart, G., Dunn, P. E., Foard, D. E., Kelley, S.: *Comp. Biochem. Physiol.* **87**, 783-787 (1987)
- [7] Murdock, L. L., Shade, R. E.: *J. Agric. Food Chem.* **50** 6605-6611 (2002)
- [8] Wolfson, J. L., Mudrock, L. L.: *J. Chem. Ecol.* 1089-1102 (1990)
- [9] Kodrík, D.: Fyziologie hmyzu, učební texty. Entomologický ústav Akademie věd České republiky a Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Skriptum 2004. Dostupné z: <http://zoo.bf.jcu.cz/typografie/fyz-hmyz-2004.pdf>
- [10] Zahradník, J., Chvála, M., Cuisin, M.: *La Grande Encyclopedie Des Insectes*, Artia Praha/Grund Paris (1989)
- [11] Terra, W. R., Ferreira, C.: *Comp. Biochem. Physiol.* **109** 1-62 (1994)
- [12] Chapman, R. F.: *The Insects: Structure and Function*, Cambridge University Press (1998)
- [13] Billingsley, P. F., Lehane, M. J.: *Biology of the Insect Midgut*, Chapman and Hall, London (1996)
- [14] Ribeiro, A. F., Ferreira, C., Terra, W. R.: *Comp. Physiol.* **55**, 96-105 (1990)
- [15] Serrão, J. E., Cruz-Landim, C.: *J. Adv. Zool.* **17**, 1-6 (1996)
- [16] Miller, N., Lehane, M. J.: *Parasitol. Today* **9**, 45-50 (1993)
- [17] Peters, W.: *Zoophysiology: Peritrophic Membranes*, Springer-Verlag, Berlin (1992)
- [18] Lawrence, P. K., Koundal, K. R.: *EJB* **5**, 93-109 (2002)
- [19] Bode, W., Huber, R.: *Eur. J. Biochem.* **204**, 433-451 (1992)
- [20] Hibbetts, K., Hines, B., Williams, D.: *J. Vet. Int. Med.* **13**, 302-308 (1999)
- [21] Gershenzon, J.: *J. Chem. Ecol.* **20**, 1281-1328 (1994)
- [22] Purrington, C. B.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 305-308 (2000)
- [23] Adler, L. S., Karban, R., Strauss, S. Y.: *Ecology* **82**, 2032-2044 (2001)
- [24] Kessler, A., Baldwin, I. T.: *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 299-328 (2002)
- [25] Wittstock, U., Gershenzon, J.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 1-8 (2002)
- [26] Tamayo, M. C., Rufat, M., Bravo, J. M., San Segundo, B.: *Planta* **211**, 62-71 (2000)



- [27] Farmer, E. E.: *Nature* **411**, 854-856 (2001)
- [28] Dicke, M., van Loon, J. J. A.: *Entomol. Exp. Appl.* **97**, 237-249 (2000)
- [29] Orozco-Cardenas, M., Narveaz-Vasquez, J., Ryan, C. A.: *Plant Cell* **13**, 179-191 (2001)
- [30] McManus, M. T., Burgess, E. P. J.: *Transgenic Res.* **8**, 383-395 (1995)
- [31] Gruden, K., Popovič, T., Cimerman, N., Križaj, I., Štrukelj, B.: *Biol. Chem.* **384**, 305-310 (2003)
- [32] Applebaum, S. W., Kerkot, G. A., Gilbert, L. I.: *Biochem.Pharmacol.* **4**, 279-311 (1985)
- [33] Shulke, R. H., Murdock, L. L.: *Environ. Entomol.* **12**, 787-791 (1983)
- [34] Mareš, M., Meloun, B., Pavlík, M., Kostka, V., Baudyš, M.: *FEBS Lett.* **251**, 94-98 (1989)
- [35] Christaller, J. T., Farley, P. C., Ramsay, J. R., Sullivan, P. A., Laing, W. A.: *Eur. J. Biochem.* **254**, 160-167 (1998)
- [36] Baker, A. H., Edwards, D. R., Murphy, G.: *J. Cell Sci.* **115**, 3719-3727 (2002)
- [37] Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Tryggvason, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7414-7419 (2002)
- [38] [http://cs.wikipedia.org/wiki/Mandelinka\\_bramborov%C3%A1](http://cs.wikipedia.org/wiki/Mandelinka_bramborov%C3%A1) (4.8.2008)
- [39] <http://www.skudci.com/mandelinka-bramborova> (4.8.2008)
- [40] <http://syngenta.cz/cz/atlas/skudci/mandelinka-bramborova.html> (4.8.2008)
- [41] <http://www.osel.cz/index.php?clanek=3060> (25.8.2008)
- [42] Outchkourov, N. S., Rogelj, B., Strukelj, B., Jongsma, M. A.: *Plant Physiol.* **133**, 379-390 (2003)
- [43] Laemmli, U.K.: *Nature* **227**, 680-685 (1970)
- [44] Blakesl, Boezy, J.A.: *Anal. Biochem.* **82**, 580-582 (1977)
- [45] Wolfson, J. L., Mudrock, L. L.: *Entomol. Exp. Appl.* **44**, 235-240 (1987)
- [43] Thie, N. M. R., Houseman, J. G.: *Insect Biochem.* **20**, 313-318 (1990)
- [47] Bolter, C. J., Latoszek-Green, M.: *Entomol. Exp. Appl.* **83**, 295-303 (1997)
- [48] Novillo, C., Castañera, P., Ortego, F.: *Arch.Insect Biochem. Physiol.* **36**, 181-201 (1997)
- [49] Brunelle, F., Nguyen-Quoc, B., Cloutier, C., Michaud, D.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **42**, 88-98 (1999)
- [50] Sojka, D., Hajdusek, O., Dvorak, J., Sajid, M., Franta, Z., Schneider, E. L., Craik, C. S., Vancova, M., Buresova, V., Bogyo, M., Sexton, K. B., McKerrow, J. H., Caggrey, C. R., Kopacek, P.: *Int. J. Parasitol.* **37**, 713-724 (2007)
- [51] Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdusek, O., Caffrey, C. R., Mares, M., Kopacek, P.: *Parasit. Vectors* **1**, 7 (2008)