

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**2004**

**Milana Vůjtěchová**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
UNIVERZITY KARLOVY**

Katedra biochemie

**Obranné peptidasové inhibitory rostlin:  
analýza procesu indukce a mechanismu aktivace**

Milana Vůjtěchová

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Praha 2004

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Michaela Mareše, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 6.5.2004

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. M. Marešovi, CSc. za cenné rady a trpělivost při realizaci diplomové práce. Velké poděkování patří RNDr. M. Hornovi, CSc. za podnětné připomínky a ochotu, se kterou mi byl nápomocen při vlastní práci v laboratoři. Dále pak Ing. L. Dolečkové, CSc. za desing peptidů, mgr. Z. Voburkovi za sekvenování proteinů a RNDr. J. Konvalinkovi, CSc. za cenné připomínky k textu diplomové práce. Významnou měrou přispěl Max-Planck institut chemické ekologie (Jena, SRN): laboratoř Dr. I.T. Baldwina, kde byly určeny cDNA sekvence a připraveny rostlinné materiály, a laboratoř RNDr A. Svatoše, CSc. zodpovědná za hmotovou spektrometrii.

# Seznam použitých zkratek

A <sub>220</sub> , A <sub>280</sub>	absorbance při vlnové délce 220, 280 nm
AA	aminokyseliny, aminokyselinové zbytky
AMC	7-amido-4-methylkumarin
βNA	β-naftylamid
BPTI	hovězí pankreatický trypsinový inhibitor
BBI	"Bowman-Birk inhibitor"
BSA	hovězí sérum albumin
BTI	trypsinový inhibitor z ječmene
cDNA	DNA vzniklá zpětnou transkripcí mRNA
CrmA	"cytokine response modifier A"
Dabcyl	4-(dimethylamino)azobenzen-4' sulfonylová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
DFP	diisopropyl fluorofosfát
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová kyselina)
DTT	dithiothreitol
E-64	N-[N-(L-3-trans-karboxyoxirin-2-karbonyl)-L-leucin]- agmatin
EDANS	aminoethylenamin-1-naftalensulfonová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ExPASy	"expert protein analysis system"
Fmoc	fluorenylmethylkarbonyl
HPLC	"high performance liquid chromatography"
IA-3	proteinový inhibitor ze <i>Streptomyces cerevisiae</i>
ITI	"inter-alpha trypsin inhibitor"
kDa	kilodalton
MALDI-TOF flight"	"matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight"
MPI	"mucus proteinase inhibitor"
MW	molekulová hmota
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAGE	elektroforeza v polyakrylamidovém gelu
PCI-1	"potato chymotrypsin inhibitor – 1"
PDB	"protein data bank"
PDI	"potato cathepsin D inhibitor"
PI	peptidasový inhibitor
PI-I, PI-II	peptidasový inhibitor typu I resp. II
PI-3	pepsinový inhibitor-3 izolovaný z <i>Ascaris suum</i>
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
pNA	p-nitroanilid
PPO	polyfenoloxidasa
PSTI	pankreatický sekreční trypsinový inhibitor
RBTI	"rice Bowman-Birk inhibitor"
RECK motifs"	"reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs"
SDS	dodecylsulfát sodný
SQAPI	"squash aspartic proteinase inhibitor"
SSI	subtilisinový inhibitor ze <i>Streptomyces</i>
STI	sojový trypsinový inhibitor

TCA	kyselina trichloroctová
TFA	kyselina trifluoroctová
TIMP	"tissue inhibitor of metalloproteinases"
TLCK	N-tosyl-L-lysin-chloromethyl keton
TPCK	N-tosyl-L-fenylalanin-chloromethyl keton
Tris	tris[hydroxymethyl]aminomethan
WASI	"wheat-alpha trypsin inhibitor"

## 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
F	Phe	fenylalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	threonin
W	Trp	tryptofan
Y	Tyr	tyrosin
V	Val	valin

# Obsah

<b>Úvod</b>	1
<b>Teoretická část</b>	2
<b>1.1 Proteolytické enzymy</b>	2
<b>1.2 Proteinové inhibitory peptidas</b>	4
1.2.1 Proteinové inhibitory cysteinových peptidas	4
1.2.2 Proteinové inhibitory aspartátových peptidas	6
1.2.3 Proteinové inhibitory metalopeptidas	6
1.2.4 Proteinové inhibitory serinových peptidas	7
<b>1.3 Inhibitory peptidas ve fyziologii rostlin</b>	12
1.3.1 Obranné mechanismy rostlin proti škůdcům a patogenům	12
1.3.2 Signální dráhy při obraně rostliny	13
1.3.4 Adaptace škůdců na obranný mechanismus rostlin	15
1.3.5 Využití v zemědělských technologiích	16
<b>Materiál a metody</b>	18
<b>2.1 Použité materiály</b>	18
2.1.1 Chemikálie	18
2.1.2 Biologické materiály	19
2.1.3 Přístroje a vybavení	19
<b>2.2 Použité metody</b>	21
2.2.1 Izolace peptidas z trávicích šťáv <i>M.sexta</i>	21
2.2.1.1 Izolace <i>MS-trypsinu</i>	21
2.2.1.2 Izolace <i>MS-chymotrypsinu</i>	21
2.2.2 Příprava homogenátu z listové tkáně <i>N. attenuata</i>	21
2.2.3 Stanovení enzymových aktivit peptidas	22
2.2.3.1 Použité reagensie	22
2.2.3.2 Stanovení aktivity peptidas se substráty značenými <i>p</i> -nitroanilidem	24
2.2.3.3 Stanovení aktivity peptidas s azokaseinem	24
2.2.3.4 Stanovení aktivity peptidas s hemoglobinem	25
2.2.3.5 Stanovení aktivity peptidas se substráty značenými $\beta$ -naftylamidem	25
2.2.3.6 Stanovení aktivity peptidas se substráty značenými	

7-amido-4-methylkumarinem	26
2.2.3.7 Stanovení aktivity peptidas se substráty značenými Dabcyl-EDANS	26
2.2.3.8 Stanovení aktivity peptidas s resorufin-kaseinem	27
2.2.4 Izolace inhibitorů trypsinu	27
2.2.5 Analytické metody	28
2.2.5.1 Redukce a karboxymethylace disulfidových můstků	28
2.2.5.2 Určení N-koncové aminokyselinové sekvence	29
2.2.5.3 Určení molekulové hmoty proteinů	29
2.2.5.4 Stanovení obsahu proteinů	29
2.2.6 Analýza primárních a terciálních struktur	30
2.2.6.1 Analýza aminokyselinových sekvencí	30
2.2.6.2 Příprava 3D modelů	30
2.2.7 Syntéza peptidových substrátů	30
<b>Výsledky a diskuse</b>	31
<b>3.1 Biologický model</b>	31
<b>3.2 Přehled inhibitorů peptidas v tkáních <i>Nicotina attenuata</i></b>	32
<b>3.3 Izolace a charakterizace inhibitorů trypsinu</b>	33
3.3.1 Identifikace inhibitoru trypsinu	36
3.3.1.1 Zařazení do strukturní rodiny PI-II	36
3.3.1.2 Analýza primární struktury	37
3.3.1.3 Popis předpokládané terciální struktury	40
3.3.2 Charakterizace izoinhibitorů trypsinu	43
3.3.3 Inhibiční specifita	46
<b>3.4 Indukce exprese inhibitorů PI-II</b>	47
3.4.1 Charakterizace dvouřetězcové domény	51
<b>3.5 Proteolytická aktivace inhibitorů PI-II</b>	54
<b>3.6 Analýza inhibitorů PI-II v transgenní rostlině</b>	61
3.6.1 Charakterizace izoinhibitorů trypsinu produkovaných transgenním tabákem	62
<b>Závěr</b>	65



# ÚVOD

Práce se zabývá biochemií inhibitorů peptidas, které produkuje rostlina jako obranné proteiny směřované proti herbivorním škůdcům. Konkrétně je zaměřena na tyto dílčí cíle:

## **Cíle diplomové práce**

- Určit typy inhibitorů peptidas s potenciální obrannou funkcí přítomných v listovém pletivu divokého tabáku *Nicotiana attenuata*.
- Izolovat vybraný typ inhibitoru a biochemicky jej charakterizovat, zejména určit inhibiční specifitu a strukturní homologii s dosud známými peptidasovými inhibitory.
- Analyzovat změny biosyntézy tohoto inhibitoru indukované poraněním rostliny, zejména hladiny exprese a posttranslační úpravy molekuly inhibitoru.

Obecným cílem práce je přispět k pochopení obranných mechanismů a principů jejich regulace ve fyziologii rostlin. Významnou roli v těchto mechanismech hraje komplexní regulace proteolytických systému na úrovni interakce mezi rostlinou a škůdcem (hmyzem, fytopatogenem). Detailní pochopení uvedených vztahů nacházejí ve stále větší míře uplatnění v oblasti rostlinných biotechnologií při konstrukci nových rezistentních plodin.

# 1. Teoretická část

## 1.1 Proteolytické enzymy

Proteolýza patří mezi nejvýznamnější biologické procesy. Enzymy hydrolyzující peptidové vazby proteinů a peptidů jsou nazývány proteasy, proteinasy a peptidasy. Historicky je toto pojmenování odvozeno od substrátů těchto enzymů, v současné době je již významový rozdíl těchto termínů smazáván [1]. Enzyme Commission (E.C.) proto doporučuje název peptidasy jako obecný název pro enzymy hydrolyzující peptidovou vazbu.

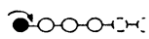

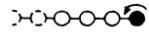
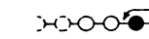

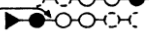
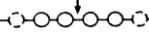
Podle E.C. jsou peptidasy řazeny do podtřídy 3.4 a dále do 14 skupin (tabulka 1.1, str. 3).

Peptidasy se podle katalytického typu rozdělují na exopeptidasy, odštěpující jednu nebo více aminokyselin z N- nebo C-terminálního konce, a na endopeptidasy, které štěpí uvnitř polypeptidového řetězce. Termín oligopeptidasy je užíván pro endopeptidasy, které působí na substráty menší než proteiny.

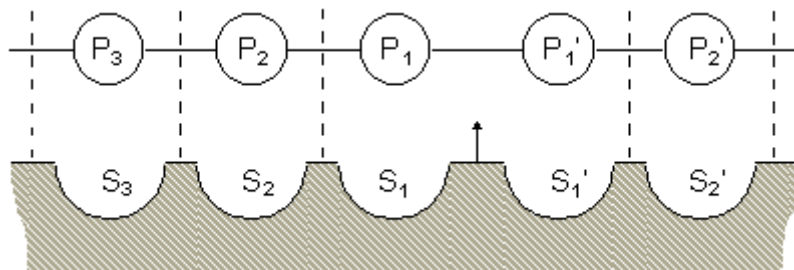
Dále se dělí na exopeptidasy odštěpující z N-terminálního konce jednu aminokyselinu (aminopeptidasy), dipeptid nebo tripeptid (dipeptidylpeptidasy nebo tripeptidylpeptidasy) a exopeptidasy odštěpující z C-terminálního konce jednu aminokyselinu (karboxypeptidasy) nebo dipeptid (peptidyl-dipeptidasy). Další exopeptidasy jsou specifické pro dipeptidy (dipeptidasy), nebo odštěpují terminální zbytek, který je substituován, cyklizován nebo spojen isopeptidovou vazbou (peptidová vazba nespojující  $\alpha$ -karboxyl s  $\alpha$ -aminoskupinou) (omega peptidasy).

Katalytický mechanismus peptidas závisí na chemické povaze reaktivních skupin v aktivním místě enzymu. Peptidasy jsou děleny na serinové peptidasy, cysteinové peptidasy, aspartátové peptidasy nebo metalopeptidasy. U serinových a cysteinových peptidas je nukleofilem atakujícím peptidovou vazbu hydroxylová nebo thiolová skupina, která je na postranním řetězci katalytické aminokyseliny v aktivním místě. Aspartátové peptidasy a metalopeptidasy se od serinových a cysteinových peptidas liší v tom, že nukleofilem atakujícím štěpenou peptidovou vazbu je aktivovaná molekula vody. Tato molekula u aspartátových peptidas interaguje se dvěma katalytickými zbytky kyseliny asparagové a u metalopeptidas s dvoumocným iontem kovu (nejčastěji zinku nebo manganu), který je v katalytickém místě vázán aminokyselinovými ligandy.

**Tabulka 1.1** Klasifikace peptidas podle Enzyme Commission (E.C.). Symboly představují: ○– aminokyselina, ●– terminální aminokyselina, která je odštěpována (▼) danými exopeptidasami, ◀-blokováný konec peptidu [2].

Typ reakce	Skupina peptidas	EC číslo
	<b>Exopeptidasy</b> <b>Aminopeptidasy</b>	<b>3.4.11</b>
	<b>Dipeptidyl peptidasy</b> <b>Tripeptidyl peptidasy</b>	<b>3.4.14</b>
	<b>Karboxypeptidasy</b> Serinové karboxypeptidasy Metallokarboxypeptidasy Cysteinové karboxypeptidasy	<b>3.4.16</b> <b>3.4.17</b> <b>3.4.18</b>
	<b>Peptidyl dipeptidasy</b>	<b>3.4.15</b>
	<b>Dipeptidasy</b>	<b>3.4.13</b>
	<b>Omega Peptidasy</b>	<b>3.4.19</b>
	<b>Endopeptidasy</b> Serinové endopeptidasy Cysteinové endopeptidasy Aspartátové endopeptidasy Metaloendopeptidasy Threoninové endopeptidasy Endopeptidasy neznámého typu	3.4.21 3.4.22 3.4.23 3.4.24 3.4.25 3.4.99

K popisu specifity peptidas se používá modelu, kde je katalytické místo obklopeno z jedné (exopeptidasa) nebo obou stran (endopeptidasa) specifickými podmísty, které jsou schopné vázat aminokyselinové zbytky substrátu (obrázek 1.1). Tato podmísta na enzymu jsou číslována od katalytického místa,  $S_1 \dots S_n$  směrem k N-terminálnímu konci substrátu a  $S'_1 \dots S'_n$  směrem k C-terminálnímu konci. Do podmíst enzymu se váží aminokyselinové zbytky substrátu označené  $P_1 \dots P_n$  nebo  $P'_1 \dots P'_n$ .



**Obrázek 1.1** Schematické znázornění substrátu a specifických vazebních podmíst enzymu, štěpená peptidová vazba je označena šipkou [3,4].

Jedním z dalších kritérií pro klasifikaci peptidas je evoluční příbuznost. Podle homologie terciálních struktur proteinů nebo bloků konzervovaných aminokyselinových sekvencí se peptidasy třídí do skupin, které se nazývají rodiny. Peptidasy z jedné rodiny se vyvinuly ze společného předka. Jednotlivé peptidasové rodiny jsou kódovány písmeny označujícími jejich katalytický typ (S, C, A, M pro serinové, cysteinové, aspartátové a metalopeptidasy nebo U pro peptidasy s neznámým katalytickým mechanismem) a přiřazeným číslem [2].

Klan zahrnuje skupinu rodin, které se vyvinuly z jednoho původního proteinu, ale divergovaly tak široce, že není možné dokázat jejich příbuznost na základě primární struktury [5,6]. Příbuznost rodin v klanu lze posoudit na základě příbuznosti v aminokyselinové sekvenci katalyticky aktivní části molekuly. Kódování klanů je tvořeno dvěma písmeny, z nichž první označuje katalytický typ jako u rodin.

## **1.2 Proteinové inhibitory peptidas**

Proteinové inhibitory peptidas 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 tekutinách, a jednak ochrana proteinové složky buněk, tekutin a tkání proti působení exogenních peptidas.

Proteinové inhibitory peptidas se dělí do čtyř hlavních skupin - na inhibitory serinových, cysteinových, aspartátových a metalopeptidas, přičemž každá z těchto rodin obsahuje několik vzájemně nepříbuzných strukturních rodin inhibitorů.

### **1.2.1 Proteinové inhibitory cysteinových peptidas**

Proteinové inhibitory cysteinových peptidas se rozdělují na základě molekulární struktury do šesti známých skupin - nadrodina cystatinů, rodina kalpastatinů, rodina inhibitorů Kunitzova typu, rodina inhibitorů bromelainů, rodina serpinů a rodina thyropinů (tabulka 1.2 str.5). Nadrodina cystatinů je početná skupina příbuzných inhibitorů, kterou lze dále dělit do čtyř základních rodin - stefiny, cystatiny, kininogeny, multicystatiny [7].

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

**Tabulka 1.2:** Přehled proteinových strukturních rodin inhibitorů cysteinových peptidas.

Název rodiny	Chrakter molekuly	Příklad zástupce	Cílová peptidasa/Funkce
<b>Stefiny</b> [8,9]	jednořetězcové, neobsahují disulfidy, nejsou glykosylovány, okolo 100 AA	lidský stefin A, B (obrázek 1.3 A, str. 11) kryší cystatin $\alpha$ , $\beta$ z rýže orycystatin I, II	intracelulární regulace kathepsinů
<b>Cystatiny</b> [7,8]	jednořetězcové, okolo 115 AA, 2 disulfidy v C-terminální oblasti	kuřecí cystatin lidské cystatiny C, S, SN a SA kryší cystatin C, S cystatin Drosophily a hovězího kolostra	extracelulární regulace kathepsinů
<b>Kininogeny</b> [7]	jednořetězcové glykoproteiny štěpeny kininogenasami (kalikreiny) na: - těžký řetězec (3 funkční cystatinové domény) - kininogeny - lehký řetězec (C-terminální oblast)	2 savčí druhy: H-kininogen (120 kDa) L-kininogen (68 kDa) kryší T-kininogen je rezistentní vůči kalikreinům	prekursory vasoaktivních kininů, spouštění koagulační kaskády, odezva akutní fáze
<b>Multicystatiny</b> [10-12]	jednořetězcové, okolo 85 kDa, 8 funkčních cystatinových domén	multicystatiny z bramborových hlíz a listů rajčat	obrana proti hmyzu
<b>Kalpastatiny</b> [13-15]	4 homologické inhibiční domény v tandemovém uspořádání, 120 - 140 AA	savčí kalpastatin	inhibice kalpainů
<b>Staphostatiny</b> [16,17]	jednořetězcové, obsahují disulfidy	bakteriální staphostatin A, B (obrázek 1.3 B, str. 11)	inhibice staphopainů
<b>Inhibitory Kunitzova sojového typu</b> [18]	jednořetězcové, možnost glykosylace, 22 - 25 kDa	skupina izoinhibitorů z hlíz a listů brambor s různou inhibiční aktivitou	obrana proti hmyzu a fytopatogenům
<b>Inhibitory bromelainů</b> [19-21]	dvouřetězcové, 52 AA, 5 disulfidů	8 izoinhibitorů ze stonku ananasu	inhibice bromelainů
<b>Clitocypiny</b> [22]	17 kDa (monomer), homodimer	inhibitor z houby <i>Clitotobybe nebuldris</i>	Inhibice papainu, kathepsinu L a B, bromelainu
<b>Serpiny</b> (serine protease inhibitor) [23-25]	objeveny jedno(dvou)řetězcové inhibitory cysteinových peptidas, svojí strukturou patřící do rodiny serpinů	Cowpox virus serpin CrmA SCC antigen-inhibitor	regulace apoptosy
<b>Thyropiny</b> (thyroglobulin type 1 domain protease inhibitor) [26-28]	doména thyroglobulinu typu 1, 64 AA, bohatá na cysteinové zbytky obsahuje motiv Cys-Trp-Cys-Val	inhibitor cysteinových peptidas z jiker pstruha <i>Oncorhynchus keta</i> lidský "p41 invariant Chain fragment"	regulace presentace antigenů

### 1.2.2. Proteinové inhibitory aspartátových peptidas

Inhibitory aspartátových peptidas (tabulka 1.3) se skutečně proteinovým charakterem tvoří méně početnou skupinu inhibitorů, vykazující vysokou specifitu. Např. inhibitor IA-3 inhibuje pouze proteinasu A. Neinhibuje žádnou jinou strukturně podobnou aspartátovou peptidasu, naopak je pro některé dobrým substrátem. U takových inhibitorů s vysokou specifitou lze očekávat, oproti nízkomolekulárním inhibitorům s obecně širším působením, sekundární interakci s peptidasou nejen v oblasti aktivního místa [27].

**Tabulka 1.3:** Přehled proteinových strukturních rodin inhibitorů aspartátových peptidas.

Název inhibitoru	Zdroj	Charakter molekuly	Inhibovaná peptidasa
<b>PDI</b> (potato cathepsin D inhibitor) [29]	hlízy brambor	glykoprotein, 22 kDa, homologie s rodinou inhibitorů Kunitzova typu	kathepsin D, proteinasa A trypsin (serinová peptidasa)
<b>PI-3</b> (pepsin inhibitor 3) (obrázek 1.4 B, str. 11) [30]	škrkavka <i>Ascaris suum</i>	149 AA	pepsin, gastricin
<b>IA-3</b> (obrázek 1.4 A, str. 11) [31]	kvasinka <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	68 AA, bez disulfidů	proteinasa A ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
<b>SQAPI</b> (squash aspartic proteinase inhibitor) [32]	floém dýně	10,5 kDa	pepsin
<b>Equistatin</b> [33]	mořská sasanka <i>Actinia equina</i>	21,7 kDa, 3 thyroglobulinové domény typu 1	kathepsin D, cysteinové peptidasy (papain, kathepsin B a L)

### 1.2.3 Proteinové inhibitory metalopeptidas

Skupina proteinových inhibitorů metalopeptidas (tabulka 1.4, str.7) má nejméně zástupců. Prostudovány jsou zejména tzv. tkáňové inhibitory metalopeptidas (TIMP) - jedná se o živočišné kolagenásové inhibitory, které hrají významnou roli ve fyziologii degradace pojivové tkáně a patologických procesech spojovaných např. s invazí rakovinných buněk. Ačkoliv je publikována řada nálezů kolagenásových inhibitorů, které lze obecně dělit do několika skupin, chybí většinou jejich hlubší strukturní charakteristiky. U rostlin a nižších organismů byly nalezeny inhibitory metalloexopeptidas.

**Tabulka 1.4:** Přehled proteinových strukturních rodin inhibitorů metalopeptidas.

<b>Příklad inhibitorů metalopeptidas</b>	<b>Charakter molekuly</b>	<b>Inhibovaná peptidasa</b>
<b>TIMP</b> ( <i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> )  (obrázek 1.5 A, str.12) [34,35]	21 kDa	matrix metalopeptidasy
<b>RECK</b> ( <i>Reversion inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs</i> )  [34]	110 kDa	matrix metalopeptidasa-2 a -9
<b>ScNPI</b> ( <i>Streptomyces caespitosus neutral proteinase inhibitor</i> )  [37]	141 AA	neutrální peptidasa z <i>S. caespitosus</i> , vimelysin
<b>Karboxypeptidasový inhibitor z brambor</b>  (obrázek 1.5 B, str. 12) [38,39]	39 AA	karboxypeptidasa A
<b>Inhibitor z <i>Erwinia chrysanthemi</i></b>  [40]	10 kDa	peptidasa A, B a C z <i>E. chrysanthemi</i> , alkalická peptidasa z <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , peptidasa z <i>Serratia marcescens</i>
<b>SMPI</b> ( <i>Streptomyces metalloproteinase inhibitor</i> )  [41]	102 AA	thermolysin
<b>Oprin</b>  [42]	43-52 kDa	metalopeptidasy hadího jedu

### 1.2.4 Proteinové inhibitory serinových peptidas

Jedná se o nejpočetnější skupinu inhibitorů peptidas. Jejich zástupce najdeme jak u bakterií, hub, virů, tak u rostlin a živočichů. O jejich evolučním stáří svědčí např. nálezy klasických inhibitorů obratlovců Kazalova typu i u bezobratlých (sasanka *Anemonia sulcata*) a příbuzných tzv. bdelinů u pijavky *Hirudo medicinalis*. Díky široké distribuci jsou funkce inhibitorů serinových peptidas velmi rozmanité. U rostlinné říše se jedná ve většině případů o ochranu rostliny před trávicími peptidasami hmyzu a fytopatogenů. V živočišné říši inhibitory serinových peptidas obecně regulují vlastní proteolýzu.

Přes velkou rozmanitost jejich molekulární architektury je významné zachování jednotné stavby reaktivního místa, které je v kontaktu s danou peptidasou, což naznačuje konvergentní evoluci vzájemně nepříbuzných proteinů. Na základě strukturních dat jsou v současné době inhibitory serinových peptidas rozděleny minimálně do 13 strukturních

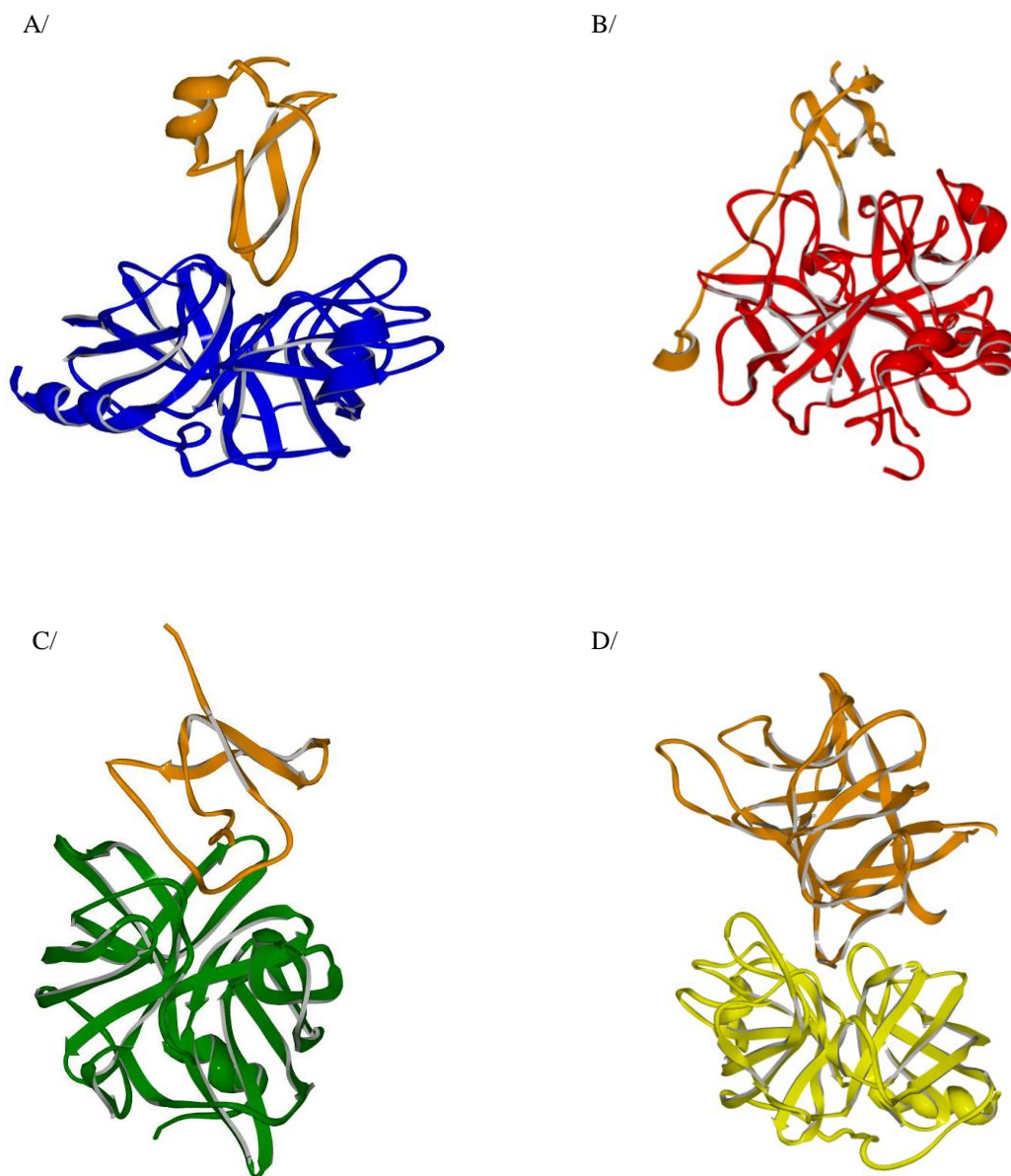
rodin (tabulka 1.5). Významným strukturním rysem inhibitorů serinových peptidas je jednak hypervariabilita oblasti reaktivního místa, a jednak snaha o doménovou stavbu molekuly.

**Tabulka 1.5:** Přehled proteinových strukturních rodin inhibitorů serinových peptidas.

Název rodiny	Charakter molekuly	Příklad zástupce	Inhibice/Funkce
<b>Kunitzův typ</b>       [43-45]	jednořetězcový, jednodoménový, 58 AA, 3 disulfidy  spojení inhibiční domény s odlišnou doménou (např. $\beta_1$ -bungarotoxin)  dvoudoménový, glykoprotein, 180 kDa,	BPTI (obrázek 1.2 A, str. 10)  hadí jedy ( <i>Bungarus multicinctus</i> )  ITI	trypsin, chymotrypsin, plasmin, kalikreiny    trypsin, chymotrypsin, elastasa, plasmin, akrosin, katepsin G
<b>Kazalův typ</b>       [46-48]	jednořetězcový, jednodoménový, 56 AA, 3 disulfidy  dvoudoménový, 12 kDa,  trojdoménový  dvořetězcový, dvoudoménový	PSTI  inhibitory akrosinů  inhibitory slinných žláz ( <i>Canidae, Felidae</i> )  ovomukoid z bílků ptačích vajec  testudin z bílků vajec želvy <i>Caretta caretta</i>	peptidasy pankreatu  akrosin  trypsin, chymotrypsin, subtilisin, elastasa
<b>Inhibitory z <i>Ascaris</i></b>   [49]	jednořetězcové, 63-65 AA, 5 disulfidů	isoinhibitory ze škrkavky <i>Ascaris lumbricoides</i>	trávicí enzymy hostitele: trypsin, chymotrypsin
<b>Hirudiny</b>   [50,51]	jednořetězcové, 64-66 AA, 3 disulfidy	hirudiny ze slinných žláz pijavky <i>Hirudo medicinalis</i> (obrázek 1.2 B, str. 10)	antikoagulační účinky
<b>Mukosní peptidasové inhibitory</b>  [52,53]	jednořetězcový, dvoudoménový, 107 AA, 8 disulfidů	lidský MPI	trypsin, chymotrypsin, elastasa, katepsin G ochrana slizničního epitelu
<b>Serpiny</b>   [54,55]	50-100 kDa, s 30% sekvenční homologií	lidský $\alpha 1$ -antitrypsin	kontrola proteolytic kých kaskád (koagulace, proces zánětu)
<b>Proteinasové inhibitory I (PI-I)</b>   [56,57]	jednořetězcový, 70-71 AA, 1 disulfid, tetramerizace	PI-I z brambor  egliny z pijavky <i>H. medicinalis</i>	chymotrypsin, subtilisin obrana proti hmyzu protizánětlivý potenciál

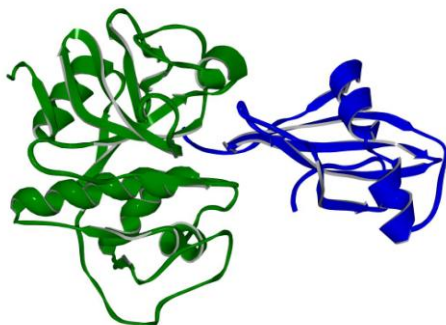


<b>Proteinasové inhibitory II (PI-II)</b> [58-60]	jednořetězcový, dvoudoménový, 51-52 AA  dvouřetězcový, jednodoménový	PI-II z rajčat (obrázek 1.2 C, str. 10)  PCI-1 a PTI z brambor	trypsin, chymotrypsin obrana proti hmyzu
<b>Kunitzův sojový typ</b> [61-63]	jednořetězcový, 20 kDa, 2 disulfidy	STI ze sojových bobů (obrázek 1.2 D, str. 10)  bifunkční inhibitor z pšenice <i>Triticum aestivum</i> (WASI)	trypsin, chymotrypsin obrana proti hmyzu  subtilisin (také rostlinná endogenní $\alpha$ -amylasa)
<b>Trypsinové inhibitory z ječmene</b> [64]	jednořetězcový, 121 AA, 5 disulfidů (vysoká homologie s obilnými $\alpha$ -amylasovými inhibitory)	BTI z ječmene <i>Hordeum vulgare</i>	trypsin
<b>Bowman- Birk peptidasové inhibitory (BBI)</b> [65]	jednořetězcový, 7 disulfidů, 8 kDa, 2 homologická reaktivní místa	BBI ze semen <i>Leguminosae</i>  RBTI	trypsin, chymotrypsin  trypsin
<b>Inhibitory z tykvovitých (Squash inhibitory)</b> [66,67]	jednořetězcové, 29-30 AA, 3 disulfidy	inhibitory se semen tykvovitých ( <i>Cucurbitaceae</i> )	trypsin, Faktor XIIa, elastasa
<b>Subtilisinové inhibitory ze Streptomyces</b> [37,68]	jednořetězcový, 113 AA, 2 disulfidy  dvoudoménový, 2 odlišná reaktivní místa	SSI produkovaný <i>Streptomyces alboqriseolum</i>  ScNPI z <i>S. caespitosus</i>	bakteriální alkalické peptidasy  subtilisin BPN (subtilisin z <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ), trypsin, chymotrypsin

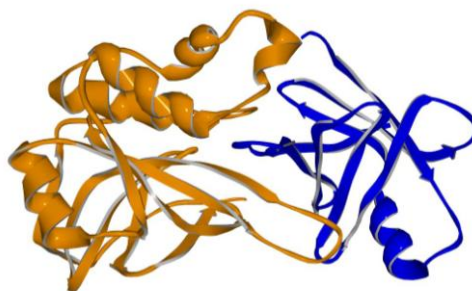


**Obrázek 1.2:** Krystalové struktury komplexů inhibitorů s jejich cílovými serinovými peptidasami. A/ Komplex hovězího trypsinu (modrá) s hovězím pankreatickým trypsinovým inhibitorem (oranžová) (PDB 1TPA). B/ Komplex lidského  $\alpha$ -trypsinu (červená) s hirudinem z *Hirudo medicinalis* (oranžová) (PDB 4HTC). C/ Komplex bakteriální peptidasy streptogrisinu B (zelená) s inhibitorem PI-II z brambor (oranžová) (PDB 4SGB). D/ Komplex prasečího trypsinu (žlutá) se sojovým trypsinovým inhibitorem Kunitzova typu (oranžová) (PDB 1AVW).

A/

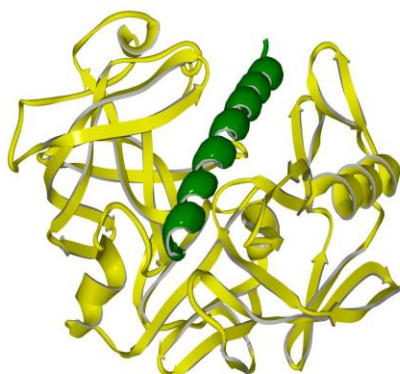


B/

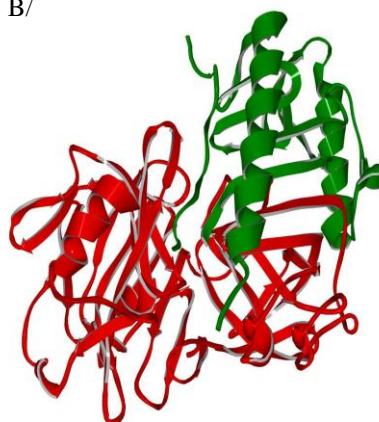


**Obrázek č. 1.3 :** Krystalové struktury komplexu inhibitorů s jejich cílovými cysteinovými peptidasami. A/ Komplex lidského stefinu B (modrá) s rostlinným papainem (zelená) (PDB 1STF). B/ Komplex bakteriálního inhibitoru staphostatatinu (modrá) se staphopainem (oranžová) (PDB 1PXV).

A/

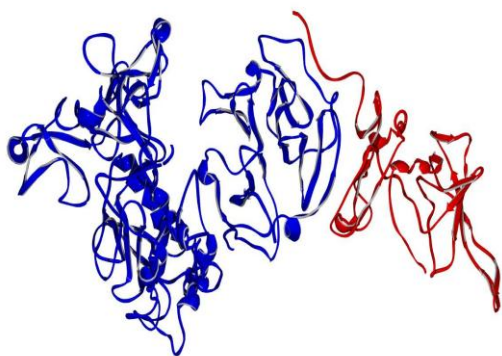


B/

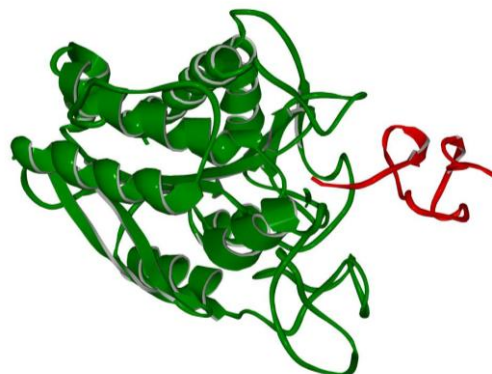


**Obrázek č. 1.4:** Krystalové struktury komplexů inhibitorů s jejich cílovými aspartátovými peptidasami. A/ Komplex endogenního inhibitoru IA-3 (zelená) s proteinasou A ze *Saccharomyces cerevisiae* (žlutá) (PDB 1DPJ). B/ Komplex inhibitoru PI-3 z *Ascaris suum* (zelená) s vepřovým pepsinem (červená) (PDB 1F34).

A/



B/



**Obrázek č. 1.5:** Krystalové struktury komplexů inhibitorů s jejich cílovými metalopeptidasami. A/ Komplex lidské metalopeptidasy 2 (modrá) s endogenním inhibitorem TIMP 2 (červená) (PDB 1GXD). B/ Komplex karboxypeptidasy A (zelená) z brambor s endogenním inhibitorem (červená) (PDB 4CPA).

### 1.3 Inhibitory peptidas ve fyziologii rostlin

Proteinové inhibitory regulují obecně u všech organismů endogenní proteolýzu. U rostlin mají kromě toho ještě další důležitou funkci a to obrannou. Inhibují trávicí peptidasy hmyzích škůdců a mikrobiálních fytopatogenů, čímž dochází k redukci nutriční kvality rostlinného pletiva. Tento efekt byl pozorován zejména u potlačení růstu a vývoje herbivorálních a gramivorálních druhů larev brouků a motýlů v závislosti na obsahu inhibitorů peptidas v jejich rostlinné potravě. Vzhledem k často vysoké koncentraci peptidasových inhibitorů v rostlinném pletivu je rostliny pravděpodobně využívají také jako zásobní proteiny [69].

#### 1.3.1 Obranné mechanismy rostlin proti škůdcům a patogenům

Obranu rostlin proti napadení škůdců a patogenů můžeme rozdělit na permanentní a indukovanou obranu, ačkoliv se obou případů obvykle účastní tytéž látky - peptidasové inhibitory, repelentní a toxické molekuly.

**Permanentní obrana** spočívá v tom, že rostliny syntetizují různé obranné látky (pryskyřice, repelenty a toxiny) sloužící jako stabilní bariéry. Tyto látky rostliny shromažďují během svého růstu a vývoje v různých orgánech. Příkladem takové

permanentní ochrany ve vegetativních orgánech je vysoká koncentrace alkaloidů, saponinů a vosků. V reprodukčním pletivu rostliny akumulují především antibakteriální, antifungální složky (např. lektiny) a peptidasové inhibitory. Biosyntéza a skladování jedovatých látek (terpenů, alkaloidů) i peptidasových inhibitorů je často pro rostliny energeticky náročná a představuje zátěž metabolismu [70-72], a proto rostliny, které nejsou vystavené častému napadení upřednostňují indukovaný způsob obrany, při kterém rostlina syntetizuje obranné látky jen v době aktuální potřeby [73,74]

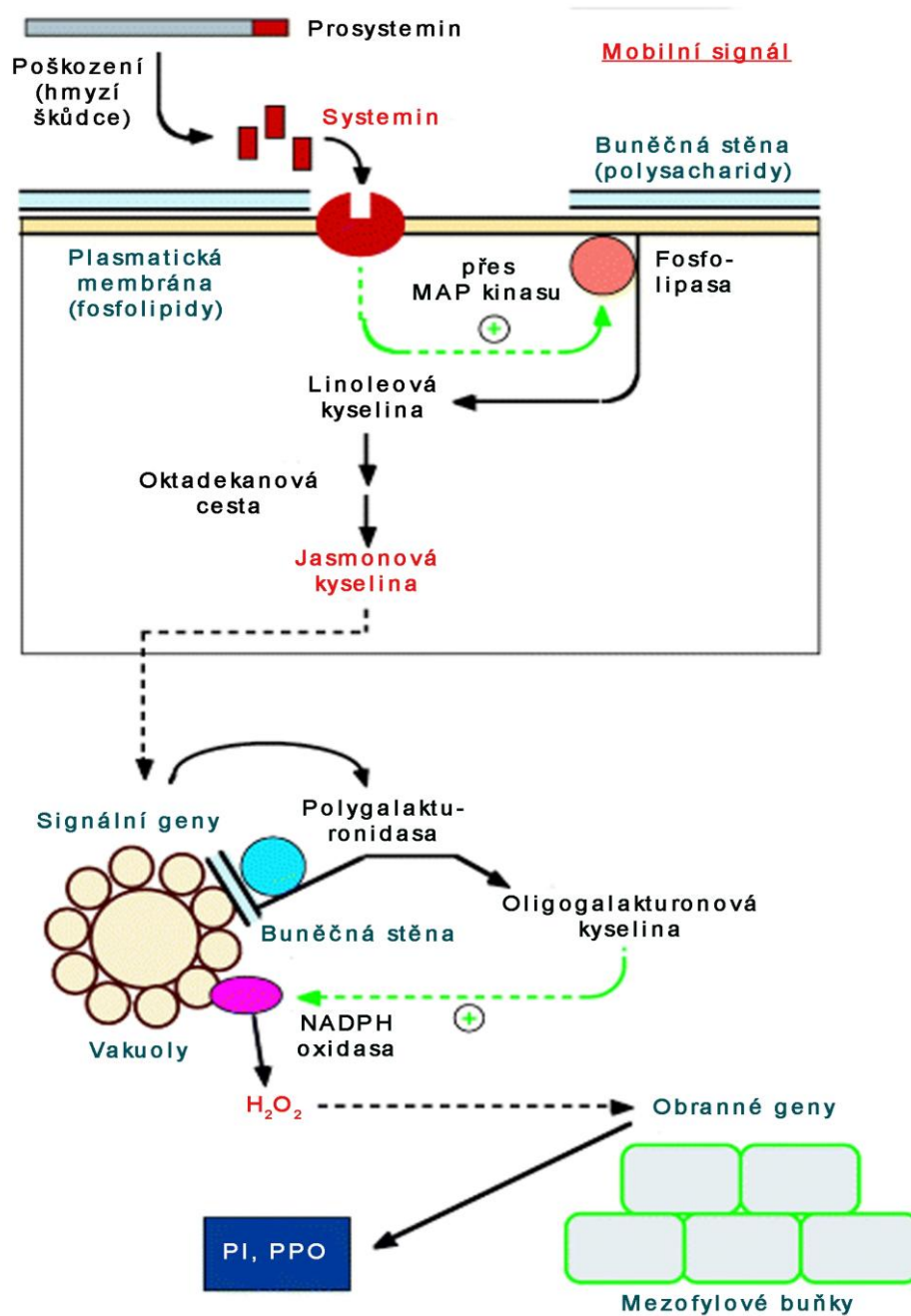
Mechanismus **indukované obrany** se spouští až po poranění rostliny. Poškozením rostlinného pletiva se aktivuje signální dráha biochemických reakcí, která zajišťuje lokální (v místě poranění) a systémovou (po celé rostlině) produkci inhibitorů hmyzích trávicích peptidas (PI), dalších insekticidních proteinů a polyfenoloxidas (PPO). Produkci PI a PPO řadíme k tzv. přímé reakci rostlin na poranění (interakce "rostlina–herbivor") [75], tyto látky jsou zodpovědné za primární supresi metabolismu škůdců a patogenů po požití indukovaného rostlinného pletiva [73].

Na druhou stranu k nepřímé reakci patří produkce různých těkavých éterických látek. Mezi nejznámější těkavé signální látky patří ester kyseliny jasmonové - metyljasmonát. Methyljasmonát se po poranění rostliny uvolňuje z poškozeného listového pletiva do okolí, a tím dává signál jednak ostatním listům dané rostliny a jednak okolním rostlinám k syntéze obranných látek (interakce "rostlina–rostlina") [76]. Další typ nepřímé obranné reakce rostlin (interakce "rostlina–predátor") [77] zprostředkovávají např. terpeny, které biosyntetizují a uvolňují napadené rostliny za účelem přivábění parazitů a predátorů specializovaných na hmyzí herbivorní škůdce [73].

### **1.3.2 Signální dráhy při obraně rostliny**

Jedná se o sled biochemických reakcí zahrnující čtyři hlavní signální molekuly - systemin, kyselinu jasmonovou, kyselinu oligalakturonovou a peroxid vodíku. (obrázek 1.6, str. 14).

Prvním krokem signální dráhy dobře popsané u lilkovitých (*Solanaceae*), je aktivace **rostlinného hormonu systeminu** (18 AA). Systemin je biosyntetizován ve formě neaktivního prekursoru prosysteminu (200 AA), který je lokalizován v buněčné cytoplasmě listového pletiva [78]. Po poranění rostliny hmyzím škůdcem se prosystemin dostává do kontaktu s peptidasami, které proteolyticky štěpí prosystemin za uvolnění



**Obrázek 1.6:** Schématický diagram signální dráhy při poškození rostlinného pletiva hmyzím herbivorem vedoucí k biosyntéze obranných látek, zejména inhibitorů exogenních peptidas (PI) a polyfenoloxidas (PPO). Po poškození rostlinného pletiva se proteolyticky aktivuje systemin, který spouští biosyntézu kyseliny jasmonové a těkavého methyljasmonátu. Jasmonáty jsou aktivátory biosyntetických drah spojených s dalšími signálními molekulami oligogalakturonidů a peroxidu vodíku, které výsledně řídí indukci genů kódujících obranné insekticidní molekuly. Obrázek je upraven podle [79].

aktivního systeminu. Díky volné pohyblivosti systeminu v rostlinném floému je zajištěna aktivace signální dráhy jak v okolí poranění, tak po celé rostlině.

Systemin interaguje se specifickým receptorem, který spouští kaskádu dějů zahrnující aktivaci enzymů jako fosfolipasy A<sub>2</sub>, MAP kinasy a dále finální uvolnění linoleové kyseliny z lipidové membrány [80]. Kyselina linoleová je prekursorem pro biosyntézu kyseliny jasmonové tzv. "oktadekanovou" cestou. Fytohormon **kyselina jasmonová** má zásadní úlohu v obranném mechanismu. Jednak je to hlavní signální molekula v produkci přímé obrany (PI, PPO) a zároveň prekursor těkavé signální molekuly metyljasmonátu, aktivátoru různých biosyntetických drah vedoucích k uvolnění dalších těkavých obranných látek nepřímé obrany [81,82].

Mezi další signální molekuly, které se účastní přenosu informace o poranění rostliny, patří oligogalakturonidy a peroxid vodíku. **Kyselina oligogalakturonová (OGA)** [83] je výsledkem hydrolýzy polygalakturonidů pektinové složky rostlinné buněčné stěny. Molekula **peroxidu vodíku** [84] je v poškozeném listovém pletivu biosyntetizovaná mnoha způsoby, ale za hlavní důvod se považuje aktivace membránově vázaného NADPH komplexu. Vzájemné propojení signálních drah různých signálních molekul není přesně prostudováno, ale u lokálních dějů v místě poškození se uvažuje o sekvenci dějů obsahujících systemin, oligogalakturonidy, peroxid vodíku, které vedou výsledně k indukci exprese genů kódující obranné proteiny (PI, PPO) [83].

### ***1.3.3 Adaptace škůdců na obranný mechanismus rostlin***

Tak jako si rostliny vyvinuly obranný mechanismus proti napadení různými herbivory, tak i ze strany škůdců existuje mechanismus k zvýšení odolnosti proti rostlinným peptidasovým inhibitorům a dalším insekticidním látkám. Obranný mechanismus hmyzu můžeme, podobně jako u rostlin, rozdělit na permanentní a indukovaný [84].

Hmyzí konzumenti se dělí na specializované monofágní a všestranné polyfágní. Specializovaní hmyzí škůdci potřebují ke svému vývoji a přežití pouze určité druhy hostitelských rostlin, zatímco všestranní škůdci toto omezení ve zdroji rostlinné potravy nemají. Specializovaní škůdci se při požeru jejich přirozených rostlinných hostitelů dostávají do kontaktu s rostlinnými obrannými molekulami, proti kterým jsou odolné díky svému permanentnímu **detoxikačnímu mechanismu**. Z konkrétních příkladů vyplývá, že tento detoxikační mechanismus je specifický pouze pro přirozené rostlinné sekundární metabolity [85]. Hladina permanentních detoxikačních látek hmyzu se indukuje na vyšší



koncentraci při nárůstu obsahu toxických sloučenin v potravě. Hlavní výhodou specializovaných škůdců oproti všestranným je schopnost v rostlinách omezit biosyntézu těkavých látek, které přivolávají predátory herbivorů [86]. Všestranní škůdci tyto výhody vyměnili za schopnost být efektivními herbivory na širokém spektru rostlinných druhů, ale přesto jsou schopni se přizpůsobit velkému počtu insekticidních látek.

Mezi hlavní detoxikační enzymy, které škůdci využívají, patří především **cytochrom P-450 monooxygenasa** a **glutathion S-transferasa**. Cytochrom P-450 se indukuje po interakci např. s isoquinolinovými alkaloidy (u octomilky *Drosophila melanogaster* konzumující kaktus *Carnegie gigantea*) [87] a s xanthotoxiny u všestranných škůdců [88]. Proti polyfenoloxidasám, které působí insekticidně na základě konjugace fenolů s proteiny, čímž snižují účinnost hmyzího trávení, se škůdci brání udržováním redukčního prostředí v trávicím traktu. Adaptační mechanismy, kterými hmyz reaguje na přítomnost inhibitorů trávicích peptidas, je možné dělit do tří kategorií. Prvním z nich je indukce biosyntézy trávicích peptidas, čímž dochází k saturaci rostlinných peptidasových inhibitorů přijatých v potravě a kompenzaci blokových peptidas [89]. Další obrannou strategií hmyzu je schopnost exprese trávicích peptidas z genomu hmyzu, které nejsou citlivé na určité peptidasové inhibitory a jejichž syntéza se spouští při snížení trávicí kapacity traktu vybaveného konstitutivními klasickými typy peptidas. To bylo poprvé popsáno pro "necitlivé" serinové peptidasy [90] a později také pro cysteinové peptidasy [91]. U některých serinových a cysteinových "necitlivých" peptidas je známa jejich aminokyselinová sekvence [92,93]. Zároveň byla u hmyzu nalezena detoxikační strategie založená na produkci peptidas jiné třídy, než proti kterým jsou cíleny inhibitory [91], a tyto peptidasy jsou schopny štěpit rostlinné peptidasové inhibitory a tím je deaktivovat.

#### **1.3.4 Využití v zemědělských biotechnologiích**

Význačným trendem moderního zemědělství je snaha o aplikaci šetrnějších metod na ochranu plodin proti hmyzím škůdcům. Jedná se o metody nezatěžující přírodní prostředí a zároveň výhodné i z ekonomického hlediska oproti masovému používání chemických pesticidů, u kterých v poslední době vzrůstala neefektivnost díky adaptaci hmyzích škůdců. Tímto problémem se ve světě zabývá organizace na ochranu plodin IPM ("integrate pest management"), která se snaží o maximální využití rostlinných obranných mechanismů a přírodní biologické kontroly (využití predátorů a parazitů hmyzích škůdců). Současný vývoj směřuje k šlechtění odolných transgenních plodin metodami genového inženýrství,



kdy jsou do rostlin inkorporovány geny rezistence jednak bakteriálního a rostlinného původu a v menší míře i geny vyšších živočichů a mikroorganismů [94].

Klasickým bakteriálním genem rezistence, který se hojně aplikuje v transgenních rostlinách je Bt toxin z bakterie *Bacillus thuringiensis*. Tato půdní sporovitá bakterie tyčinkovitého tvaru s velkou ekologickou tolerancí produkuje insekticidní protein zvaný Bt toxin nebo  $\delta$ -endotoxin. Prekursorová molekula Bt protoxin se proteolyticky aktivuje v trávicím traktu hmyzu, kde se váže na glykoproteinové receptory a následně dojde k vmezeření toxinu do buněčné membrány a k cytolýze epiteliální buňky, tím se celkově paralyzuje trávicí trakt hmyzu [95,96]. V současné době je věnována velká pozornost dvěma hlavními skupinám rostlinných genů udělujících odolnost proti škůdcům – inhibitorům trávicích enzymů (peptidasové a amylasové inhibitory) a lektinům [97,98]. Výhodou těchto insekticidních proteinů je, že jsou obecně přirozenou výbavou rostlin, proto přenos těchto genů do jiných rostlin je velmi šetrnou metodou pro zvýšení jejich odolnosti. Takto vyšlechtěné transgenní plodiny jsou pro běžného konzumenta dobře stravitelné a nijak škodlivé a navíc lze obranné proteinové insekticidy snadno inaktivovat vařením. Díky velkému zájmu o perspektivní obranné inhibitory se využívají také zástupci genů rezistence živočišného původu, jež se přenášejí do řady zemědělských plodin, např. pankreatický sekreční trypsinový inhibitor (Kazalova typu), který inhibuje serinové peptidasy hmyzích řádů *Lepidoptera*, *Homoptera*, *Orthoptera* [96].

## 2. Materiál a metody

### 2.1 Použité materiály

#### 2.1.1 Chemikálie

##### Enzymy:

hovězí pankreatický trypsin, hovězí pankreatický chymotrypsin, papain, subtilisin –  
– Sigma, USA

vepřová pankreatická elastasa – Fluka, SRN

hovězí kathepsin D – izolován ze slezin na ÚOCHB AV ČR, Praha

##### Substráty:

Bz-Arg-pNA, azokasein, resorufin-kasein, hemoglobin – Sigma, USA

Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Z-Phe-Arg-pNA, H-Val-Tyr-Ser-bNA, Z-Leu-Leu-Glu-bNA,

Z-Ala-Ala-Asn-AMC, Z-Phe-Arg-AMC – Bachem, SRN

(Dabcyl)PRSEEKNDRI(EDANS), (Dabcyl)PRSEEK(EDANS),

(Dabcyl)KKNNDRI(EDANS) – syntetizované na ÚOCHB AV ČR, Praha

##### Inhibitory peptidas:

N-tosyl-L-lysin-chloromethyl keton (TLCK) – Fluka, SRN

N-tosyl-L-fenylalanin-chloromethyl keton (TPCK), Pepstatin A, diisopropyl fluorofosfát (DPF), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) – Sigma, USA

trans-epoxysukcinyln-L-leucylamido-(4-guanidino)butan (E-64) – Serva, SRN

cystatin - izolovaný z vaječných bílků podle [99]

##### Ostatní chemikálie:

acetonitril, k. trifluoroctová, k. trichloroctová, glycin – Merck, SRN

dimethylsulfoxid - Fluka, SRN

chlorid sodný, chlorid vápenatý, síran sodný, siřičitan sodný, hydroxid sodný, k. citronová, k. octová, k. chlorovodíková, chelaton III. (EDTA), azid sodný – Lachema, ČR

Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Tris), monoethanolamin, dithiothreitol (DTT), Tween 20, Triton X-100, Brij 35, D-tryptophan methyl ester – Sigma, USA

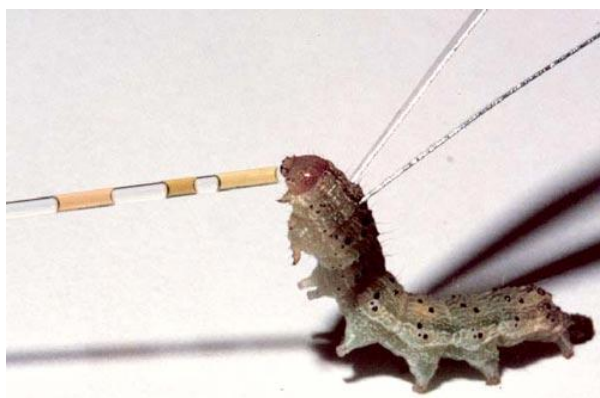
## 2.1.2 Biologické materiály

### Tabák (*Nicotiana attenuata*):

Rostlinný materiál byl získán z Max Planck institutu chemické ekologie (Jena, SRN). Rostliny byly vypěstovány ve skleníkovém režimu za standardizovaných podmínek (živiny: zemina bohatá na dusičnany, denní zálivka demineralizovanou vodou, fotoperioda: 16 hodin světla při 32°C, 8 hodin tmy při 27°C). Rostliny pěstované ze semen byly sklizeny kolem 25. dne růstu. Listové pletivo bylo sbíráno dle standardizovaného vývojového typu listů a uchovávalo při -70°C [100].

### Lišaj tabákový (*Manduca sexta*):

Housenky *M.sexta* byly získány ze standardizovaného chovu oddělení přírodních látek na ÚOCHB AV ČR v Praze. Housenky *M. sexta* byly chovány na komplexní umělé dietě. Trávicí šťávy byly housenkám starším než 2 týdny odebírány jednou denně neinvazivní metodou (obrázek 2.1) pomocí plastických pasturových pipet.



*Obrázek 2.1: Ukázka neinvazivního způsobu odebírání trávicích šťáv housenky pomocí plastické pasturové pipety.*

## 2.1.3 Přístroje a vybavení

### Přístroje:

homogenizátor Cat X-154 s nástavci T10N a T6N	CAT,SRN
lyofilizátor Freezone 6 Liter	Labconco, USA
rotační odparka SpeedVac Concentrator	Thermosavant, USA
UV/VIS spektrofotometr Pye Unicam PU 8610	Philips, UK
UV/VIS spektrofotometr Helios $\alpha$	Unicam, UK
fluorescenční spektrofotometr LS-3B	Perkim-Elmer, USA

HPLC chromatografický systém Lachrom	Merck, SRN
sonikátor Teson 1	Tesla, ČSSR
centrifuga Eppendorf 5415D	Eppendorf, SRN
centrifuga Beckmann J2-MI	Beckmann, USA
digitální pH-metr Pracitronic MW 870	Pracitronic, SRN
fluorescenční/absorbanční čtečka GENios	Tecan, Rakousko
hmotový spektrometr TofSpec 2E	Waters Micromass, UK
automatický syntetizátor peptidů	Vývojové dílny ÚOCHB AV ČR
proteinový sekvenátor Procise 491	Applied Biosystems, USA

Kolony a nosiče:

Sephadex G-50 Superfine	Amersham Biosciences, Švédsko
Vydac Protein C <sub>4</sub> 214TP54	
Vydac Protein C <sub>4</sub> 214TP510	
Vydac Protein & Peptides C <sub>18</sub> 218TP510	The separating group Hesperia, USA
p-aminobenzamidin-agarosa	Sigma, USA
NHS-aktivovaná Sepharosa 4B FF	Amersham Biosciences, Švédsko

## **2.2 Použité metody**

### **2.2.1 Izolace peptidas z trávicích šťáv *M. sexta***

#### **2.2.1.1 Izolace MS-trypsinu**

##### Použité reagensie:

- Trávicí šťávy byly centrifugovány (10 min, 4°C, 10000 g) a supernatant zředěn pufrům pH 8,5 v poměru 1:1.
- Afinitní kolona: p-aminobenzamidin-agarosa

##### Pufry:

- 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% NaN<sub>3</sub>
- 100 mM Na-acetát, pH 3,0, 20 mM CaCl<sub>2</sub>

Navázání MS-trypsinu (2 ml zředěného supernatantu viz výše) na chromatografický nosič s p-aminobenzamidinem (1 ml) bylo provedeno vsádkově při pH 8,5 za stálého míchání po dobu 30 min při 4°C. Následné promytí a samotná eluce byla provedena na koloně za laboratorní teploty. Kolona byla následně promyta pomocí 10 ml pufru pH 8,5, 10 ml pufru pH 8,5 s 0,1% Brij 35 a 10 ml 10-krát zředěného pufru pH 8,5. MS-trypsin byl eluován pomocí 10 ml pufru pH 3,0. Jednotlivé frakce byly sbírány po 2 ml, u elučných frakcí bylo pomocí 1 M roztoku Tris upraveno výsledné pH na hodnotu 8,5. U frakcí byla proměřena absorbance při 280 nm a byla testována aktivita peptidas se substráty BApNA a AAPFpNA při pH 10,0 (kapitola 2.2.3.2).

#### **2.2.1.2 Izolace MS-chymotrypsinu**

Byla použita afinitní kolona s ligandem D-tryptophan methyl esterem navázaným na nosiči NHS-aktivované Sepharose 4B FF. Kolona byla připravena reakcí 4 mg D-tryptophan methyl esteru s 1 ml nosiče podle firemního návodu. S tímto nosičem byly inkubovány průrazové nenavázané frakce z afinitní chromatografie na p-aminobenzamidin-agarose (kapitola 2.2.1.1). Použité pufry a další postup byl analogický jak je uvedeno v odstavci 2.2.1.1.

### **2.2.2 Příprava homogenátu z listového pletiva *N. attenuata***

##### Extrakční pufry:

- 50 mM Na-citrát, pH 4,3, 1 M NaCl, 0,5% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>
- 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM CaCl<sub>2</sub>

Listové pletivo bylo suspendováno v extrakčním pufru (pH 4,3 nebo pH 8,0) v poměru 1g/5 ml. Směs byla homogenizována za chlazení na ledové lázni pomocí nožového homogenizátoru Cat X-154 s nástavcem T6N. Po 30 min extrakci při 4°C byla směs centrifugována (30 min, 15000 g, 4°C). Takto získaný supernatant byl použit pro analýzu aktivit peptidasových inhibitorů.

## **2.2.3 Stanovení enzymových aktivit peptidas**

### **2.2.3.1 Použité reagensy**

- Extrakt z listového pletiva *N. attenuata* obsahující peptidasové aktivity byl použit neředěný (příprava je uvedena v kapitole 2.2.2).

#### Testovací pufr:

- 100 mM glycin-NaOH, pH 10,0, 10 mM CaCl<sub>2</sub> #
- 500 mM Tris-HCl, pH 8,8
- 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM CaCl<sub>2</sub> #
- 50 mM Na-citrát, pH 5,5, 2 mM EDTA
- 100 mM Na-fosfát, pH 5,5 \* #
- 50 mM Na-acetát, pH 5,5 \* #
- 200 mM Na-acetát, pH 3,6 \*

\* v případě testů enzymových aktivit cysteinových peptidas byl pufr obohacen 2,5-5 mM DTT,

# v testech s primárními rostlinnými extrakty byl pufr obohacen 0,1% Tween 20

#### Substráty:

- 2% azokasein (20 mg/ml příslušného pufru)
- 2% hemoglobin (20 mg/ml pufru pH 3,6)

Příprava 2% hemoglobinu: 10 g hemoglobinu bylo rozetřeno v třecí misce a suspendováno ve 200 ml vody. Pomocí 1 M HCl bylo pH upraveno na hodnotu 2 a směs byla míchána 8 hod při 4°C. Přidáním roztoku 0,5 M NaOH bylo pH upraveno na hodnotu 3,6 a směs byla doplněna vodou na výsledný objem 250 ml. Směs byla zfiltrována a skladována při -20°C. Zásobní roztok hemoglobinu byl vždy čerstvě připraven naředěním 1:1 pufr: 100 mM Na-acetát, pH 3,6, 20 mM NaCl.

- zásobní roztoky substrátů značených p-nitroanilidem (pNA): 50 mM Bz-Arg-pNA (20 mg/ml DMSO), 10 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (6,25 mg/ml DMSO)
- zásobní roztoky substrátů značených β-naftylamidem (βNA): 10 mM H-Val-Tyr-Ser-βNA (4,93 mg/ml DMSO), 10 mM Z-Leu-Leu-Glu-βNA (6,33 mg/ml DMSO)

- zásobní roztok substrátu značeného 7-amido-4-methylkumarinem (AMC): 5 mM Z-Ala-Ala-Asn-AMC (2,98 mg/ml DMSO), 2,5 mM Z-Phe-Arg-AMC (1,62 mg/ml DMSO)
- 0,4% resorufin-kasein (15 mg/3,75 ml voda)
- 5 mM zásobní roztoky substrátů značených fluorescenčním FRET (“Fluorescence resonance energy transfer“) markrem Dabcyl-EDANS:  
(Dabcyl)PRSEEKKNDRI(EDANS), (Dabcyl)PRSEEKK(EDANS),  
(Dabcyl)KKNDRI(EDANS)

#### Enzymy:

- trypsin (20 µg/ml voda)
- chymotrypsin (20 µg/ml voda)
- papain (10 µg/ml pufr pH 5,5)
- elastasa (20 µg/ml voda)
- subtilisin (20 µg/ml voda)
- kathepsin D (20 µg/ ml pufr pH 3,6)
- MS-trypsin (20 µg/ml voda)
- MS-chymotrypsin (20 µg/ml voda)

#### Peptidasové inhibitory:

- 5 mM E-64 (v 50% ethanolu)
- 1 mM pepstatinu (v DMSO)
- 20 mM PMSF (v DMSO)
- 0,5 mM cystatin (ve vodě)
- 27 mM TLCK (ve vodě)
- 29 mM TPCK (v ethanolu)
- 100 mM DFP (v izopropanolu)
- 200 mM EDTA/Na<sub>2</sub> (ve vodě)

#### Další činidla:

- 50% kyselina octová
- 5%, 6%, 25% TCA
- 500 mM DTT

### **2.2.3.2 Stanovení aktivit peptidas se substráty značenými p-nitroanilidem**

Stanovení enzymových aktivit: K 0-100  $\mu\text{l}$  testovaného rostlinného extraktu doplněného na 1 ml testovacím pufrům (Tris-HCl pH 8,0, Tris-HCl pH 10,0 nebo fosfátový pufr pH 5,5) bylo přidáno 25  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku substrátu značeného pNA. Po 30-180 min inkubaci při 37°C byly enzymové reakce zastaveny přidáním 100  $\mu\text{l}$  kyseliny octové. Absorbance reakční směsi byla proměřena při vlnové délce 405 nm proti příslušným kontrolním vzorkům.

Stanovení inhibičních aktivit: Použité reagensie a postup stanovení byl stejný jako je popsáno v předešlém odstavci s výjimkou začlenění preinkubace enzymu s inhibitorem jako prvního kroku.

A/ Varianta pro analýzu rostlinných peptidas: Preinkubační směs (200  $\mu\text{l}$ ) rostlinného extraktu a příslušného pufru byla inkubována (15 min, 20°C) s 5-40  $\mu\text{l}$  roztoku komerčního inhibitoru.

B/ Varianta pro analýzu rostlinných inhibitorů: Preinkubační směs (200  $\mu\text{l}$ ) rostlinného extraktu a příslušného pufru byla inkubována (15 min, 20°C) s 20-50  $\mu\text{l}$  roztoku purifikovaného enzymu. Měření bylo provedeno pro každý vzorek v duplikátech.

Obsah inhibitoru trypsinu (nmol/mg proteinů pletiva) v rostlinném extraktu byl určen titrací známého množství trypsinu.

### **2.2.3.3 Stanovení aktivit peptidas s azokaseinem**

Stanovení enzymových aktivit: K 0-100  $\mu\text{l}$  testovaného rostlinného extraktu doplněného na 200  $\mu\text{l}$  pufrům (pH 8,0 nebo pH 10,0) bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  roztoku azokaseinu. Reakční směs byla inkubována při 37°C 30-120 min. Enzymatická reakce byla ukončena přidáním 800  $\mu\text{l}$  6% roztoku TCA. Po 30 min při 4°C byl vysrážený neštěpený azokasein oddělen centrifugací (10 min, 10000 g). Absorbance supernatantu byla proměřena při vlnové délce 366 nm proti příslušným kontrolním vzorkům.

Stanovení inhibičních aktivit: Použité reagensie a postup stanovení byl stejný jako je popsáno v předešlém odstavci s výjimkou začlenění preinkubace enzymu s inhibitorem jako prvního kroku.



A/ Varianta pro analýzu rostlinných peptidas: Preinkubační směs (200 µl) obsahující rostlinný extrakt a příslušný pufr byla inkubována (15 min, 20°C) s 10-25 µl roztoku komerčního inhibitoru.

B/ Varianta pro analýzu rostlinných inhibitorů: Preinkubační směs (200 µl) obsahující rostlinný extrakt a příslušný pufr byla inkubována (15 min, 20°C) s 10-25 µl roztoku purifikovaného enzymu.

Měření bylo provedeno pro každý vzorek v duplikátech.

#### **2.2.3.4 Stanovení aktivit peptidas s hemoglobinem**

Stanovení enzymových aktivit: K 0-100 µl testovaného rostlinného extraktu doplněného na 200 µl testovacím acetátovým pufrem (pH 3,6) byl přidán 1 ml roztoku hemoglobinu. Po 60 min. inkubaci při 37°C byla reakce zastavena přidáním 250 µl 25% TCA. Po 30 min při 4°C byl vysrážený neštěpený hemoglobin oddělen centrifugací (10 min, 10000 g). Absorbance supernatantu byla proměřena při vlnové délce 280 nm proti příslušnému kontrolnímu vzorku.

Stanovení inhibičních aktivit: Použité reagentie a postup stanovení byl stejný jako je popsáno v předešlém odstavci s výjimkou začlenění preinkubace enzymu s inhibitorem jako prvního kroku.

A/ Varianta pro analýzu rostlinných peptidas: 200 µl preinkubační směs testovaného extraktu a acetátového pufru (pH 3,6) byla inkubována (15 min, 20°C) s 5 µl roztoku pepstatinu.

B/ Varianta pro analýzu rostlinných inhibitorů: 200 µl preinkubační směs testovaného extraktu a acetátového pufru byla inkubována (15 min, 20°C) s 50 µl roztoku kathepsinu D.

Měření bylo provedeno pro každý vzorek v duplikátech.

#### **2.2.3.5 Stanovení aktivit peptidas se substráty značenými β-naftylamidem**

Stanovení enzymových aktivit: 0-25 µl testovaného extraktu bylo doplněno acetátovým pufrem (pH 5,5) na výsledný objem 500 µl. Enzymová reakce byla zahájena přidáním 5 µl roztoku substrátu značeného β-NA. Enzymová měření byla prováděna na fluorescenčním spektrometru při 37°C. Uvolňování produktu bylo průběžně monitorováno po dobu 10 min měření fluorescence při excitační vlnové délce 335 nm a emisní vlnové délce 410 nm.

Stanovení inhibičních aktivit: Použité reagentie a postup stanovení byl stejný jako je popsáno v předešlém odstavci s výjimkou začlenění preinkubace (15 min) směsi rostlinného extraktu a acetátového pufru (pH 5,5) s 5 µl roztoku komerčního inhibitoru jako prvního kroku.

Měření bylo provedeno pro každý vzorek v duplikátech.

#### **2.2.3.6 Stanovení aktivit peptidas se substráty značenými 7-amido-4-methylkumarinem (AMC)**

Stanovení enzymové aktivity: 0-25 µl testovaného rostlinného extraktu bylo doplněno acetátovým pufrem (pH 5,5) na výsledný objem 500 µl. Enzymová reakce byla zahájena přidáním 5 µl roztoku substrátu značeného AMC. Enzymová měření byla prováděna na fluorescenčním spektrometru při 37°C. Uvolňování produktu bylo průběžně monitorováno po dobu 10 min měřením fluorescence při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 460 nm.

Stanovení inhibiční aktivity: Použité reagentie a postup stanovení byl stejný jako je popsáno v předešlém odstavci s výjimkou začlenění preinkubace (15 min) směsi rostlinného extraktu a acetátového pufru (pH 5,5) s 5 µl roztoku komerčního inhibitoru jako prvního kroku.

Měření bylo provedeno pro každý vzorek v duplikátech.

Pro měření aktivity legumainů, jednotka U odpovídá uvolnění 1 nmol produktu za jednu minutu.

#### **2.2.3.7 Stanovení aktivit peptidas se substráty značenými Dabcyl-EDANS**

Stanovení enzymových aktivit: Do jednotlivých jamek mikrodestičky bylo pipetováno: 20 µl rostlinného extraktu, 60 µl acetátového pufru (pH 3,6, pH 5,5) s 2 mM DTT, 20 µl 100 µM roztoku substrátu ve stejném pufre. Enzymová měření byla prováděna na fluorescenční čtečce při 31°C. Fluorescence byla proměřena po dobu 10-120 min podle typu substrátu při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 485 nm.

Stanovení inhibiční aktivity: Použité reagentie a postup stanovení byl stejný jako je popsáno v předešlém odstavci s výjimkou začlenění preinkubace (15 min) směsi rostlinného extraktu a acetátového pufru s 0,5-5 µl roztoku komerčního inhibitoru

(finální koncentrace 10  $\mu$ M pepstatin, 25  $\mu$ M cystatin, 50  $\mu$ M E-64, 1 mM EDTA) jako prvního kroku.

### **2.2.3.8 Stanovení aktivit peptidas s resorufin-kaseinem**

Stanovení enzymových aktivit: Reakční směs (60  $\mu$ l) obsahovala 0-25  $\mu$ l testovaného rostlinného extraktu, citrátový pufr (pH 5,5) a 25  $\mu$ l roztoku resorufin-kaseinu. Po 60 min inkubaci (37°C) byla reakce zastavena přidavkem 250  $\mu$ l 5% TCA a dále inkubována (37°C) dalších 10 min. Poté byla vzniklá sraženina oddělena centrifugací (10 min, 10000 g), k 200  $\mu$ l supernatantu bylo přidáno 300  $\mu$ l pufru (pH 8,8). Fluorescence byla proměřena při excitační vlnové délce 574 nm a emisní vlnové délce 584 nm.

Stanovení inhibičních aktivit: Použité reagensie a postup stanovení byl stejný jako je popsáno v předešlém odstavci s výjimkou začlenění preinkubace rostlinného extraktu s 5-20  $\mu$ l roztoku komerčního inhibitoru jako prvního kroku.

Měření bylo provedeno pro každý vzorek v duplikátech.

### **2.2.4 Izolace inhibitorů trypsinu**

#### 1/ Příprava proteinové frakce:

Listové pletivo skladováno při  $-70^{\circ}\text{C}$  byla suspendováno ve vychlazeném extrakčním pufru: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl v poměru 1 g/50 ml a homogenizována pomocí nožového homogenizátoru Cat X-154 s nástavcem T10N po dobu 5 min na ledové lázni. K homogenátu byly přidány peptidové inhibitory na výslednou koncentraci: 0,09 mM DFP (0,02  $\mu$ l 50 mM roztoku/ml homogenátu) a 1 mM PMSF (2  $\mu$ l 500 mM roztoku/ml homogenátu). Po 12 h extrakci za míchání při  $4^{\circ}\text{C}$  byl homogenát centrifugován (30 min, 15000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Proteinová frakce supernatantu byla vysrážena postupným přidáváním pevného síranu amonného do 80% nasycení. Po 2 h stání při  $4^{\circ}\text{C}$  byl proteinový precipitát oddělen centrifugací (30 min, 15000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Precipitát byl resuspendován ve vodě (12,5 ml/1 g původního materiálu) a dialyzován při  $4^{\circ}\text{C}$  proti vodě v dialyzační membráně Spectrapor 1000. Po dialyzaci byl materiál lyofilizován.

#### 2/ Gelová chromatografie:

Lyofilizát byl resuspendován v pufru: 100 mM Tris-HCl, pH=8,0, 500 mM NaCl, 0,02%  $\text{NaN}_3$  a nanesen na kolonu Sephadexu G-50 Superfine (2,2 x 125 cm) ekvilibrovanou stejným puftrem. Průtok kolonou byl 12 ml/h a frakce byly sbírány po hodině. Průběh

chromatografie byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 220 nm. Frakce s inhibiční aktivitou byly spojeny a dialyzovány proti vodě v dialyzační membráně Spectrapor 1000 a poté lyofilizovány.

### 3/ Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reversní fázi (RP-HPLC):

Lyofilizovaný vzorek po gelové chromatografii byl resuspendován v 0,1% TFA (1 mg/ml) a purifikován pomocí RP-HPLC na chromatografu Hitachi LaChrom model L7100 se spektrofotometrickým detektorem Hitachi L4000A. Použita byla kolona Vydac Protein C<sub>4</sub> 214TP54 pro analytickou chromatografii a kolona Vydac Protein C<sub>4</sub> 214TP510 pro preparativní chromatografii. Pro dělení proteinů byla použita následující mobilní fáze: roztok A=0,1% TFA, roztok B=0,1% TFA, 60% acetonitril. Eluce probíhala gradientem 0-5% B/10 min, 5-15% B/60 min, 45-100% B/30 min, při průtoku 1 ml/min pro analytickou kolonu a s průtokem 4 ml/min pro preparativní kolonu. Průběh chromatografie byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 220 nm. Získané frakce byly vysušeny na SpeedVac odparce.

## **2.2.5 Analytické metody**

### **2.2.5.1 Redukce a karboxymethylace disulfidových můstků**

Použitý postup byl modifikací metody podle [101]. Lyofilizát proteinu byl rozpuštěn v 80  $\mu$ l pufru: 0,25 M Tris-HCl pH 8,3, 8 M močovina, 2 mM EDTA. Dále byl přidán dithiothreitol jako 10% roztok v uvedeném pufru v množství, které bylo molárně 500–ti násobkem přítomných cystinů (4 cystiny/molekulu dvouřetězcové domény). Redukce probíhala 2 hodiny v dusíkové atmosféře za laboratorní teploty.

Modifikace volných thiolových skupin proteinu byla následně provedena za míchání postupným přidáváním roztoku kyseliny jodoctové (0,3 M roztok v původním pufru, pH upraveno na 8,3 pomocí 5 M NaOH). Množství použitého alkylačního činidla bylo 1,1 molárním násobkem přítomných thiolových skupin. Během reakce bylo pH udržováno na přibližné hodnotě 8,3 pomocí 2 M NaOH. Reakce probíhala v dusíkové atmosféře ve tmě. Průběh reakce byl kvalitativně kontrolován na přítomnost thiolových skupin reakcí s DTNB, k testu bylo vždy užito 10  $\mu$ l reakční směsi [102]. Po ukončení alkylační reakce byl roztok dále inkubován 30 min. Přidáním roztoku merkaptoethanolu na koncentraci 1% byla reakce zastavena.

Modifikované peptidové řetězce uvolněné rozpadem disulfidů byly separovány pomocí RP-HPLC na koloně Vydac Protein C4 214TP54. Pro dělení řetězců byla použita následující mobilní fáze: roztok A=0,1% TFA, roztok B=0,1% TFA, 60% acetonitril s gradientem 1% B/min.

#### **2.2.5.2 Určení N-koncové aminokyselinové sekvence**

Při automatickém odbourávání N-koncových aminokyselin byl použit proteinový sekvenátor Procise 491. Jednotlivé PTH-deriváty byly identifikovány pomocí RP-HPLC.

#### **2.2.5.3 Určení molekulové hmoty proteinů**

##### **Polyakrylamidová elektroforéza v přítomnosti SDS**

Provedení polyakrylamidové elektroforézy (PAGE) v přítomnosti 0,1% SDS vycházelo z postupu podle Laemmliho [103]. Používány byly 15% polyakrylamidové gely o rozměrech 80x60x0,7 mm, vlastní elektroforéza byla provedena na přístroji Hoeffer Mighty Small. Fixace probíhala 30 min v roztoku obsahujícím 45% ethanol, 10% kyselinu octovou. K barvení byla použita Coomassie Brilliant Blue G250 [104] nebo stříbro [105].

##### **Hmotová spektrometrie MALDI-TOF**

Stanovení molekulové hmoty proteinů bylo provedeno na hmotovém spektrometru SpecTof 2E, jako matrice byly použity:  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (MW<10 kDa) a sinapiková kyselina (MW>10 kDa).

#### **2.2.5.4 Stanovení obsahu proteinů**

V proteinovém extraktu byl stanoven celkový obsah proteinů kolorimetrickým testem podle Bradfordové [106]. Reakční směs (1050  $\mu$ l) tvořilo 10-30  $\mu$ l proteinového extraktu doplněných vodou do 50  $\mu$ l a 1 ml činidla podle Bradfordové. Po inkubaci (30 min, 37°C) byla proměřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Kalibrační křivka byla pro každé stanovení připravena se standardním proteinovým roztokem BSA, který byl pipetován v množství 0-50  $\mu$ l (0-14  $\mu$ g). Měření bylo pro každý vzorek provedeno v duplikátech.

## **2.2.6 Analýza primárních a terciálních struktur**

### **2.2.6.1 Analýza primárních sekvencí**

Databáze proteinových sekvencí Swiss-Prot/TrEMBL byla použita k vyhledání homologických cDNA sekvencí. Pro analýzu homologie a přiřazení sekvencí byly použity následující programy dostupné prostřednictvím internetu: Blast 2 sequences (NCBI server) a ClustalW (ExpASy server).

### **2.2.6.2 Příprava 3D modelů**

Výchozími templáty pro tvorbu 3D modelů inhibitorů PI-II z *N. attenuata* byly zvoleny struktury inhibitorů PI-II z *N. alata*, jejichž koordináty byly získány z PDB databáze [109]. Na základě vysoké homologie mezi těmito inhibitory byly na templátové molekule pomocí programu SwissPDB Viewer 3.7 provedeny záměny aminokyselin charakteristické pro inhibitor z *N. attenuata*. Optimalizace modelu byla provedena pomocí automatického modelovacího serveru Swiss Model. K prezentaci byl použit program SwissPDB Viewer 3.7.

## **2.2.7 Syntéza peptidových substrátů**

Syntéza peptidů na pevné fázi (polymerní kuličkový nosič typu TentaGel) byla provedena na automatickém syntetizátoru peptidů (Vývojové dílny ÚOCHB AV ČR) pomocí strategie Fmoc/tBu 95,96. Byly použity prekursory protogenních aminokyselin chráněné konvenčním způsobem a následující prekursory pro syntézu fluorescenční značky: Fmoc-Lys(DabcyI)-OH, Fmoc-Glu(EDANS)-OH.

Po ukončení celé syntézy následovala deprotektce bočních řetězců aminokyselin a odštěpení peptidů z nosiče TFA procedurou. Peptidový materiál byl extrahován a vysušen. Pro přečištění syntetizovaných peptidů byla použita RP-HPLC na preparativní koloně Vydac C18 (25x4,6 cm) při průtoku 3 ml/min. Mobilní fáze tvořily roztoky: A/ 0,04% TFA ve vodě, B/ 0,04% TFA v acetonitrilu, které byly míchány v gradientu 0,5% B/min. Chromatografie byla monitorována při vlnové délce 222 nm. Získané peptidy byly charakterizovány pomocí aminokyselinové analýzy a hmotové spektrometrie.

## 3. Výsledky a diskuse

### 3.1 Biologický model

V této práci byl zvolen jako biologický model pro studium interace “rostlina-hmyz“: divoký tabák *Nicotiana attenuata* a jeho přirozený škůdce lišaj tabákový *Manduca sexta*.

Divoký tabák *N. attenuata* (obrázek 3.1) patří do čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), pochází z pouštní oblasti jihozápadní části Severní Ameriky. Genotypy z různých geografických lokalit (např. genotypy z území států Utah, Arizona a Kalifornie) se liší svojí výbavou obranných peptidasových inhibitorů [111,112]. V této práci byly studovány peptidasové inhibitory dvou genotypů nazývaných Utah a Arizona. Byly sledovány indukované hladiny peptidasových inhibitorů v listovém pletivu vyvolané různými pro rostlinu stresovými podmínkami související s poraněním.



**Obrázek 3.1:** Divoký tabák *Nicotiana attenuata*

Lišaj tabákový *M. sexta* patřící do řádu *Lepidopteran* pochází ze Severní Ameriky. *M. sexta* během svého života prochází čtyřmi vývojovými stádii (vajíčko, larva, kukla a dospělec), přičemž pouze housenka se živí listovým pletivem tabáku (alternativně také rajčat a brambor), zatímco dospělec konzumuje výhradně nektar. Housenka *M. sexta* (obrázek 3.2) je herbivorální škůdce, u kterého se během evoluce vyvinula resistance vůči jedovatému insekticidnímu tabákovému alkaloidu - nikotinu [113]. Díky své dostupnosti, krátkému životnímu cyklu a dostatečné velikosti (housenka může dosahovat až 9 cm) je *M. sexta* široce využívána ve vědeckém výzkumu. V této práci byly studovány trávicí peptidasy ze střev housenek odchovaných na komplexní umělé dietě.



**Obrázek 3.2:** Housenka lišaje tabákového (*Manduca sexta*)

### 3.2 Přehled inhibitorů peptidas v pletivech *Nicotiana attenuata*

V předešlých studiích, které se zabývaly jinými druhy tabáků (*N. alata* a *N. tabacum*), byly identifikovány proteinové inhibitory se specifickou inhibiční aktivitou k serinovým peptidasám, konkrétně savčím trávicím peptidasám trypsinu, chymotrypsinu a elastase [114]. Dále byly u tabáků detekovány inhibitory serinových peptidas bakteriálního subtilisinu a oryzinu z vřeckovýtrusých hub, které zřejmě slouží k obraně rostlin proti fytopatogenům [115]. U dalších rostlin z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), jako jsou brambory a rajčata, byly navíc nalezeny obranné inhibitory se specifitou proti savčímu kathepinu D (aspartátová peptidasa) a rostlinnému papainu (cysteinová peptidasa) [116]. Výše uvedené rostlinné inhibitory, které jsou schopné inhibovat savčí modelové peptidasy, jsou zřejmě fyziologicky cíleny proti příbuzným trávicím enzymům hmyzu. Z těchto informací se vycházelo při sestavení následujícího spektra peptidas pro “screening“ peptidasových inhibitorů v listovém pletivu tabáku *N. attenuata*. Ze savčích peptidas byly testovány tyto modelové enzymy: chymotrypsin, trypsin, elastasa a kathepsin D, dále bakteriální subtilisin a rostlinný papain. Navíc byly do testů zařazeny autentické trávicí enzymy housenky *M. sexta* jako přirozeného škůdce na tabáku *N. attenuata*, konkrétně trypsin (MS-trypsin) a chymotrypsin (MS-chymotrypsin). Inhibice těchto cílových peptidas byla testována s proteinovým extraktem z *N. attenuata* v aktivním testu se specifickými substráty peptidas a spektrometrickou detekcí, jak je popsáno v kapitole 2.2.3. Získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.1.

**Tabulka 3.1:** Přehled zastoupení peptidasových inhibitorů v listovém pletivu dvou genotypů *N. attenuata*.

Genotyp	Inhibice cílové peptidasy							
	serinové				aspartátové		cysteinové	
	Try	Ctry	MS-Try	MS-Ctry	Elastasa	Subtilisin	Kathepsin D	Papain
<b>Utah</b>	+	+	+	+	+	+	-	-
<b>Arizona</b>	-	-	-	+	+	+	-	-

+ inhibitor detekován; - inhibitor nedetekován; Try a Ctry = hovězí pankreatický trávicí trypsin resp. chymotrypsin; MS-Try a MS-Ctry = trávicí trypsin resp. chymotrypsin housenky *M. sexta*

Výsledky ukazují, že ve všech testovaných extraktech listového pletiva *N. attenuata* byly nalezeny výhradně proteinové inhibitory serinových peptidas. U genotypu pocházejícího z Utahu byla určena výrazná inhibiční aktivita k trypsinovým peptidasám (savčím i hmyzím), dále pak k chymotrypsinu (savčímu i hmyzímu), k savčí elastase a k bakteriálnímu subtilisinu. Překvapivě u testovaných vzorků genotypu z Arizony nebyla

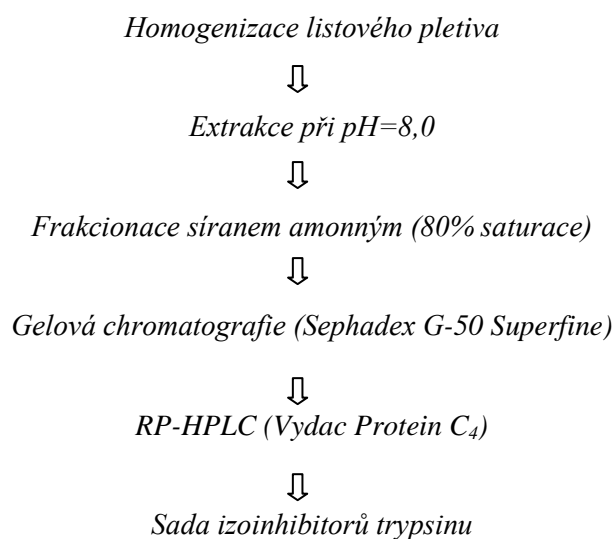


zaznamenána žádná inhibiční aktivita vůči trypsinovým peptidasám (ani savčím ani hmyzím), byla stanovena inhibiční aktivita pouze k hmyzímu chymotrypsinu (nikoli ale k savčímu chymotrypsinu), k savčí elastase a bakteriálnímu subtilisinu. Inhibitory aspartátových a cysteinových peptidas (kathepsinu D resp. papainu) nebyly u žádného genotypu tabáku *N. attenuata* detekovány.

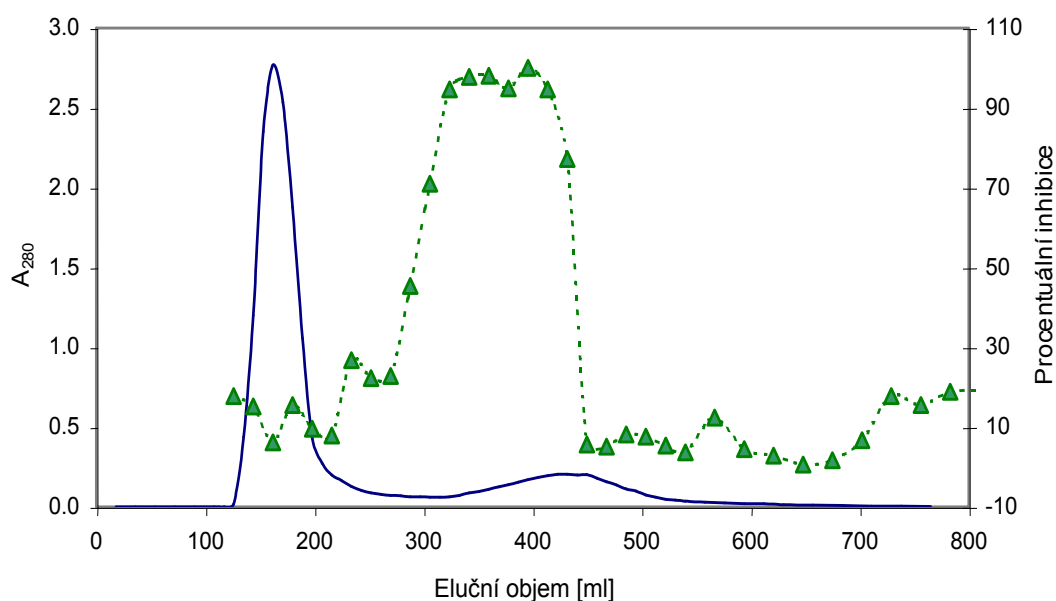
### **3.3 Izolace a charakterizace inhibitoru trypsinu**

Ze získaných výsledků aktivitních testů je patrné, že genotypy tabáku *N. attenuata* se vzájemně liší svojí výbavou peptidasových inhibitorů. Jedná se zejména o absenci inhibitorů peptidas trypsinového typu (blokujících savčí i hmyzí trypsin) u genotypu Arizona, zatímco genotyp Utah těmito inhibitory disponuje. Na základě uvedených poznatků byl vybrán trypsinový inhibitor pro izolaci a biochemickou analýzu jako zajímavý genotypově specifický protein s potencionální obrannou funkcí.

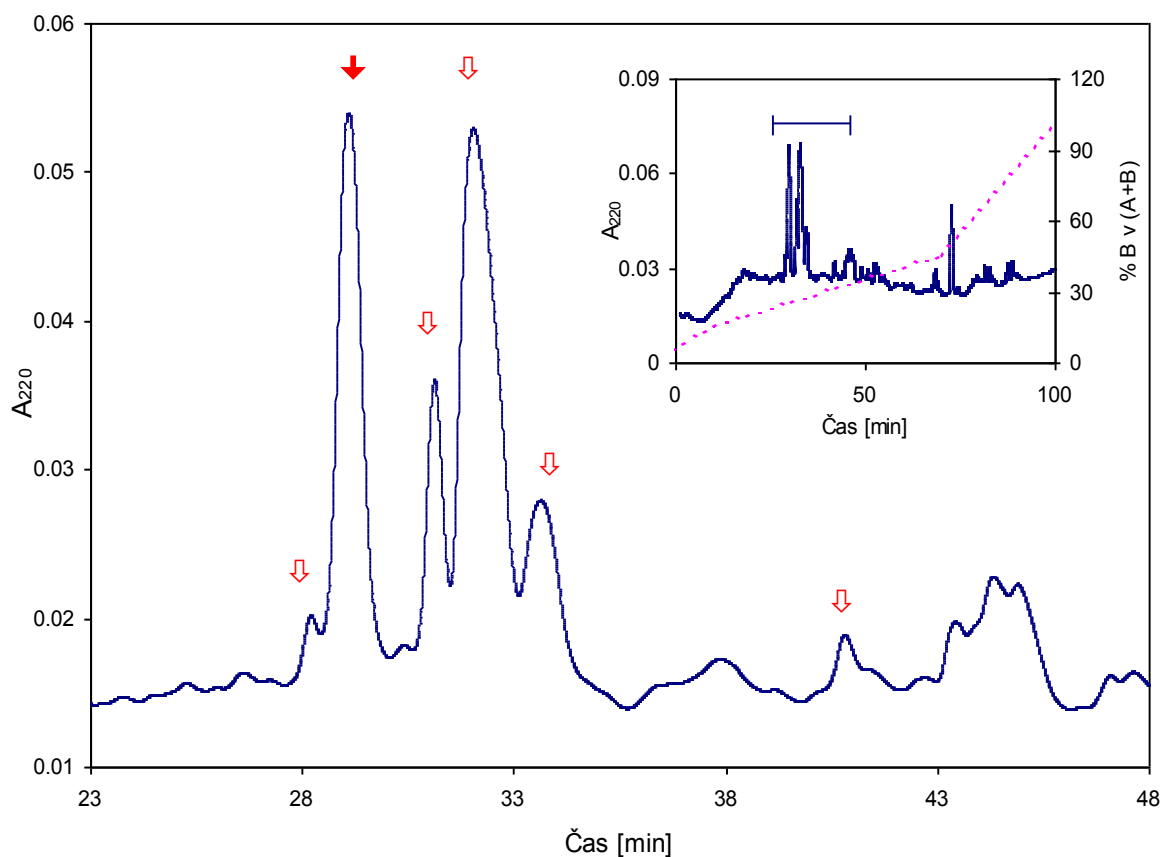
Extrakce listového pletiva *N. attenuata* byla porovnávána pro dvojí homogenizační podmínky běžně používané při izolaci rostlinných proteinových látek: v kyselém pufru pH 4,3 a mírně zásaditém pH 8,0 (kapitola 2.2.2). V takto získaných homogenátech byly stanoveny obdobné inhibiční aktivity k cílovým peptidasám typu trypsinu. Pro další práci v preparativním měřítku byly použity zásadité extrakční podmínky a byla vypracována izolační procedura, založená na kombinaci několika separačních kroků. Výsledný postup izolace je znázorněn na obrázku 3.3 (str. 34). V prvním kroku byla provedena frakcionace síranem amonným a získána proteinová frakce. Následné dělení proteinů podle molekulové hmoty na koloně Sephadex G-50 Superfine ukázalo, že inhibiční aktivita je spojena s nízkomolekulárními proteiny s molekulovou hmotností menší než cca 10 kDa. Gelová chromatografie umožnila jejich účinnou separaci od ostatních vysokomolekulárních proteinových složek listového pletiva (obrázek 3.4, str. 34). Spojená frakce inhibitorů trypsinových peptidas byla dále purifikována pomocí RP-HPLC na koloně Vydac Protein C<sub>4</sub> 214TP54. Výsledkem tohoto posledního purifikačního kroku byla série zhruba třiceti proteinových frakcí. Po provedení aktivitních testů byla identifikována sekce s frakcemi vykazujícími hledanou inhibiční aktivitu k savčímu a hmyzímu trypsinu. Obrázek 3.5 (str. 35) ukazuje, že tímto způsobem byly separovány dva majoritní a čtyři minoritní izoinhibitory. Frakce byly vysušeny a použity k další charakterizaci jednotlivých izoinhibitorů. Tímto způsobem bylo získáno 30 µg inhibitoru z 0,5 g suchého původního pletiva.



**Obrázek 3.3:** Obecné schéma izolace trypsinových inhibitorů z listového pletiva tabáku *N. attenuata*, genotyp Utah.



**Obrázek 3.4:** Izolace trypsinových inhibitorů z *N. attenuata* (genotyp Utah) gelovou chromatografií na koloně Sephadexu G-50 Superfine. Na kolonu (2,2 x 125 cm) ekvilibrovanou v pufru: 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM NaCl, 0,02% NaN<sub>3</sub> byla aplikována proteinová frakce z 5 g listového pletiva *N. attenuata*. Frakce byly sbírány po hodině při průtoku 12 ml/hod. Průběh chromatografie byl sledován absorbancí při vlnové délce 280 nm (modrá křivka) a inhibiční aktivitou vůči trypsinu (zelená křivka).



**Obrázek 3.5:** RP-HPLC chromatogram separace trypsinových inhibitorů. Na kolonu byl aplikován materiál získaný spojením inhibičních frakcí z kolony Sephadexu G-50 Superfine. Vložený obrázek ukazuje celý eluční profil chromatografie, větší graf pouze úsek s frakcemi, u nichž byla detekována inhibiční aktivita vůči trypsinu. Pro chromatografii byl použit následující eluční systém: roztok A=0,1% TFA, roztok B=0,1% TFA, 60% acetonitril s gradientem: 0-5% B/0 min, 5-15% B/10 min, 15-45% B/60 min, 45-100% B/30 min (-----). Průběh chromatografie byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 220 nm. Červenými šipkami jsou označeny vrcholy s prokázanou inhibiční aktivitou k trypsinu, měřenou se substrátem Bz-Arg-pNA (plná šipka označuje vrchol použitý pro N-terminální sekvenování v kapitole 3.3.1.1).

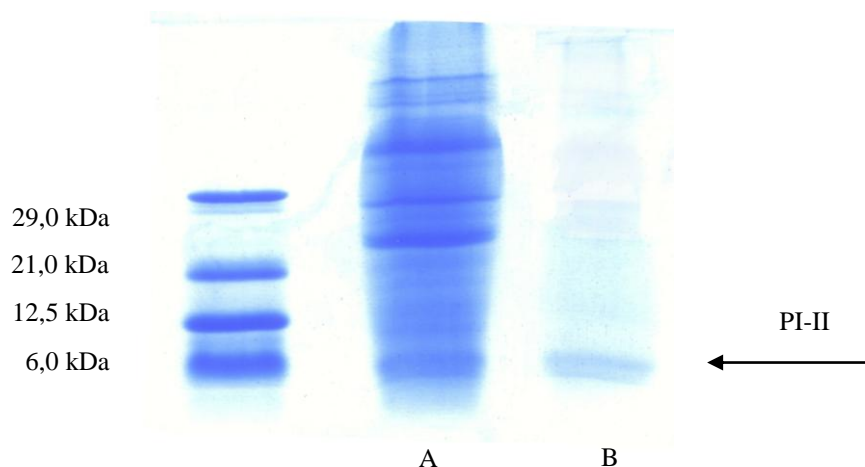
### 3.3.1 Identifikace inhibitoru trypsinu

#### 3.3.1.1 Zařazení do strukturní rodiny

Po purifikaci proteinových inhibitorů na RP-HPLC byla u frakce s nejvyšším obsahem inhibitoru specificky inhibujícího trypsinové peptidasy určena N-koncová sekvence pomocí automatického odbourávání v proteinovém sekvenátoru. Tento materiál vykazoval následující aminokyselinovou sekvenci úvodních 24 zbytků:

DRIXTNXXAGTKGXKYFSDDGTFI.

Pro určení molekulové hmoty inhibitoru byly použity dvě techniky: MALDI-TOF hmotová spektrometrie a SDS-PAGE analýza. Výsledky ukázaly, že se jedná o protein o molekulové hmotnosti cca 6 kDa (SDS-PAGE, obrázek 3.6) resp. 5749 Da (MALDI-TOF).



**Obrázek 3.6:** SDS-PAGE analýza trypsinového inhibitoru PI-II z listového pletiva *N. attenuata* genotyp Utah. A/ Proteinový extrakt listového pletiva. B/ Majoritní trypsinový inhibitor purifikovaný na RP-HPLC. SDS-PAGE analýza byla provedena podle Laemmliho [103] v 15% polyakrylamidovém gelu za redukujících podmínek.

Za účelem určení homologie trypsinového inhibitoru z *N. attenuata* s již známými strukturními rodinami inhibitorů byla jeho N-koncová aminokyselinová sekvence porovnána s dosud známými sekvencemi rostlinných proteinů pomocí programu "Blast 2 Sequences", který je dostupný na serveru NCBI. Tento program je využíván k určení podobnosti krátkých segmentů dvou sekvencí, výsledkem vyhodnocení je procentuální identita (shodnost aminokyselin v porovnávaných sekvencích) a procentuální pozitivita (strukturní podobnost aminokyselin v porovnávaných sekvencích). Tímto

způsoben byla určena vysoká homologie s aminokyselinovými sekvencemi inhibitorů serinových peptidas izolovaných z jiných tabákových druhů. Nejvyšší homologie byla nalezena s inhibitory trypsinu u tabáků *N. tabacum* a *N. alata* (79% identita), dále s chymotrypsinovým inhibitorem tabáku *N. alata* (78% identita) a s trypsinovým inhibitorem tabáku *N. glutinosa* (66% identita). Přiřazení N-koncových segmentů tabákových inhibitorů je uvedeno na obrázku 3.7. Tyto inhibitory se řadí do strukturní rodiny inhibitorů serinových peptidas PI-II (označení pochází z anglického "potato type II proteinase inhibitors"), které byly poprvé izolovány a charakterizovány u hlíz brambor *S. tuberosum* [117] a jejichž první kompletní cDNA sekvenci se podařilo získat pro inhibitor z rajčat *L. esculentum* [118].

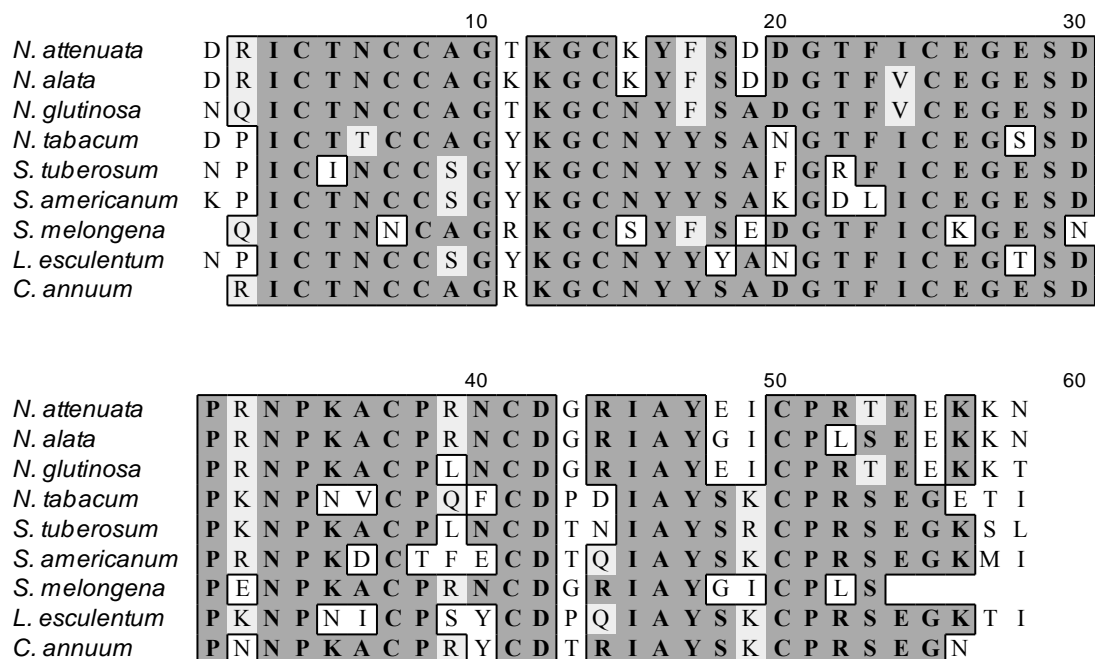
	1	24
<i>N. attenuata</i>	DRIXTNXXAGTKGXXKYFSDDGTFI	
<i>N. tabacum</i> #	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFV	(79%/83%)
<i>N. alata</i> #	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFV	(79%/83%)
<i>N. alata</i> *	DRICTNCCAGKKGCKYFSDDGTFI	(78%/78%)
<i>N. glutinosa</i> #	DRICTNCCAGMKGCNYFSADGTFV	(66%/70%)

**Obrázek 3.7:** Porovnání homologie N-koncové sekvence majoritního trypsinového inhibitoru tabáku *N. attenuata* genotypu Utah se sekvencemi inhibitorů dalších tabákových druhů pomocí programu "Blast 2 sequences". Tučně jsou zvýrazněny lišící se aminokyselinové zbytky. V závorkách je uvedena procentuální identita/pozitivita.

# inhibitor trypsinu, \* inhibitor chymotrypsinu

### 3.3.1.2 Analýza primární struktury

Na základě určení výše uvedené N-koncové sekvence trypsinového inhibitoru z *N. attenuata* byla ve spolupracující laboratoři Dr. Baldwina (Max Planck Institut, Jena, SRN) určena cDNA sekvence dvou genů kódujících biosyntézu inhibitorů rodiny PI-II u *N. attenuata*. Získaná nukleotidová sekvence byla přeložena na aminokyselinovou sekvenci (obrázek 3.9, str. 39), což umožnilo lokalizovat cysteinové zbytky, které nebyly identifikovány při analýze N-koncové sekvence na automatickém sekvenátoru (poloha X=C). Z takto získané kompletní sekvence je patrné, že obranné inhibitory PI-II z *N. attenuata* jsou biosyntetizovány ve formě dvou prekursorů, které vykazují vnitřní



**Obrázek 3.8:** Přiřazení aminokyselinových sekvencí inhibitorů typu PI-II z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*). Tmavě šedá vyznačuje shodné segmenty aminokyselin, světle šedá podobné aminokyseliny a bíle jsou ohraničeny specifické aminokyseliny pro jednotlivé druhy inhibitorů.

homologii a jsou složeny ze šesti resp. sedmi homologických domén. Tyto vysoce příbuzné domény obsahují přibližně 50 AA. Jednotlivé domény zjevně odpovídají samostatně existujícím aktivním inhibitorům o molekulové hmotě cca 6 kDa. V porovnání s dosud identifikovanými prekursory (77 prekursorů) inhibitorů strukturní rodiny PI-II z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*) se počet homologických domén různí v rozmezí od dvou až do osmi domén, např. prekursory nalezené u rajčat a brambor jsou dvoudoménové a u tabákových typů byly analyzovány prekursory obecně s vyšším počtem domén (např. čtyř- a šestidoménové u *N. alata*, osmidoménové u *N. glutinosa*).

Tato vysoká podobnost jednotlivých opakujících se domén existující mezi individuálními prekursory PI-II vede k domněnce, že PI-II prekursory se během evoluce vyvinuly z jedné původní sekvence kombinací různých modifikačních kroků (duplikace, vmezeření části sekvence aj.) [60,119]. Porovnání homologie sekvence domény inhibitoru z *N. attenuata* a dalších zástupců rodiny PI-II, jiných tabákových druhů a z čeledi lilkovitých (*Solanaceae*), je ukázáno na obrázku 3.8.

A)

```

1 MAVHRVSVFLALLLLFGMSMLVSNVEHADA SP
30 KACPRNCDGRIAYEICPRSEEKKN T7 N-ter
54 DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYGICPRSEEKKN T1
112 DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPRSEEKKN T2
170 DRICTNCCTGTGKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPRSEEKKN T3
228 DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPRSEEKKN T4
286 DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPRTEEKKN T5
344 DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDERIAYGICPRTEEKKN T6
402 NQICTNCCAGTKGCNYFSANGTFICEGES T7 C-ter
431 EYVSKVDEYVHEVENDLQKSRVAVS 455 VTS

```

B)

```

1 VHRVSVFLALLLLFGMSLLVSNVEHADA SP
28 KACPRNCDGRIAYEICPRSEEKKN T6 N-ter
52 DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYGICPRSEEKKN T1
110 DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYGICPRSEEKKN T2
168 DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPRSEEKKN T3
226 DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPRTEEKKN T4
284 DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDERIAYGICPRTEEKKN T5
342 NQICTNCCAGTKGCNYFSANGTFICEGES T6 C-ter
370 EYVSKVDEYVHEVENDLQKSRVAVS 395 VTS

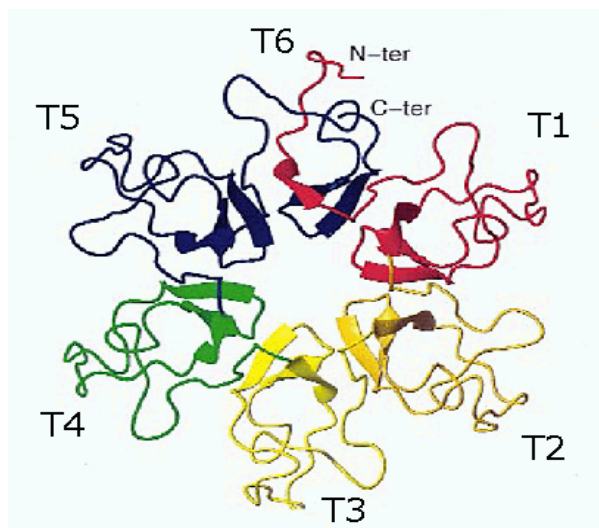
```

**Obrázek 3.9** : Kompletní aminokyselinové sekvence multidoménových prekursorů z *N. attenuata*.  
A/ Prekursor obsahující sedm homologických domén (T1-T7) představujících jednotlivé trypsinové inhibitory. Doména chybějící v šestidoménovém prekursoru je podtržena čárkovaně.  
B/ Šestidoménový prekursor (T1-T6). Obě molekuly prekursoru obsahují na N-konci 29 AA dlouhý signální peptid (SP) a C-koncová část molekul je tvořena 25 AA dlouhým peptidem typu VTS (“vacuolar targeting signal“). Reaktivní místa trypsinových inhibitorů jsou vyznačena rámečkem. Tučně jsou vyznačeny lišící se aminokyseliny.

### 3.3.1.3 Popis předpokládané terciální struktury

Z dosud známých 3D struktur inhibitorů strukturní rodiny PI-II vyplývá, že prekursorů těchto inhibitorů zřejmě mají kruhové uspořádání domén. Šestidoménový prekursor z *N. alata* je jako lineární produkt obranného genu sbalen do takzvané "náramkové" cirkulární struktury, přičemž N- a C-konec je spojen třemi disulfidovými vazbami. Takto kruhově zformovaný prekursor obsahuje pět kontinuálních domén a jednu doménu tvořenou spojením koncových segmentů molekuly tzv. dvouřetězcovou doménu, která je inhibičně aktivní stejně jako kontinuální domény [120]. Z analýzy cDNA sekvence prekursorů inhibitorů typu PI-II u *N. attenuata* a porovnání s údaji o homologii prekursorů inhibitorů PI-II z jiných druhů čeledi *Solanaceae* vyplývají tyto závěry: U prekursorů z *N. attenuata* lze očekávat analogické cirkulární uspořádání tandemových domén a vznik spojovací dvouřetězcové domény (obrázek 3.10, str. 41). Dále je u prekursoru *N. attenuata* zřejmá přítomnost signálního peptidu na N-konci molekuly a na C-konci prekursoru lze předpokládat peptid s vakuolární transportní funkcí. Signální peptid slouží k přenosu syntetizovaného preproteinu do endoplazmatického retikula. V případě proteinových prekursorů typu PI-II literatura mluví o přítomnosti transportní sekvence pro buněčné vakuoly (VTS – “vacuolar targeting signal”) na C-konci molekuly [121]. Tyto VTS sekvence zajišťují požadovaný transport prekursorů PI-II z endoplazmatického retikula do vakuol. V buněčných vakuolách dochází k odštěpení VTS sekvence a proteolytické fragmentaci spojené s uvolněním jednotlivých samostatně funkčních izoinhibitorů z cirkulárního prekursoru. Obecně je známo, že VTS sekvence se mohou značně lišit, i když mají stejnou funkci a cílové místo. Fyzikální vlastnosti jako hydrofobicita nebo umístění nabitých aminokyselin se často ukazuje pro jejich funkci důležitější než přesné pořadí aminokyselin. To vysvětluje dřívější experimenty, kdy některé vakuolární motivy byly identifikovány, ale vykazovaly nízkou sekvenční homologii [122]. VTS sekvence pro vakuolární transport u prekursoru PI-II z *N. alata* je tvořena C-koncovou doménou (25 AA) bohatou na kyselé a hydrofobní postranní řetězce aminokyselinových zbytků. Z jeho strukturního řešení pomocí NMR spektroskopie vyplývá že, se jedná o zakřivenou amfipatickou  $\alpha$ -šroubovici s hydrofilním konvexním a hydrofobním konkávním povrchem, která zřejmě vyčnívá z jinak kompaktní struktury samotné domény. Analogickou stavbu i funkci VTS sekvence lze očekávat i u prekursoru PI-II z *N. attenuata* vzhledem k vysoké sekvenční homologii.



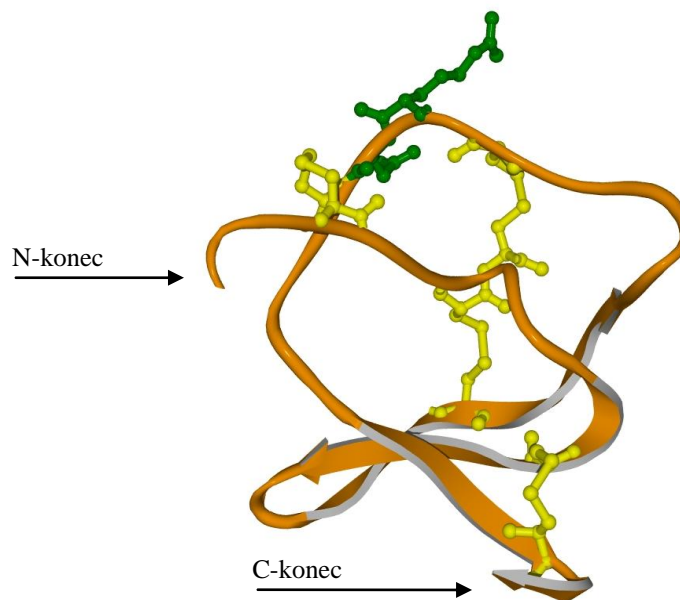


**Obrázek 3.10:** Schematický obrázek znázorňující cirkulární uspořádání jednotlivých domén v šestidoménovém prekursoru typu PI-II. Obrázek je vytvořen kruhovou permutací strukturního motivu jedné domény upraveno podle [123].

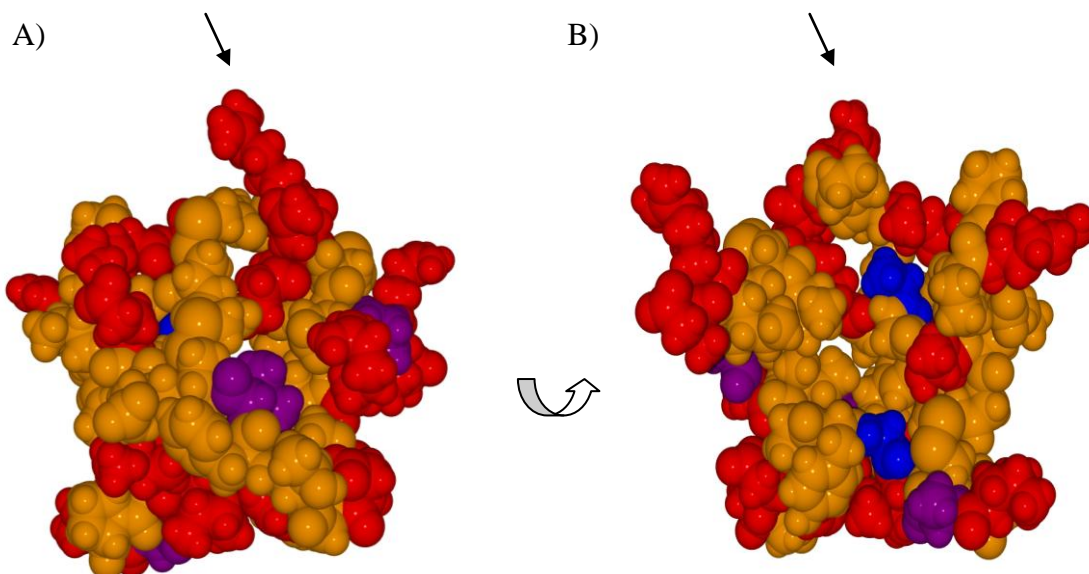
Analýza 3D struktury jednodoménového inhibitoru z *N. alata* pomocí NMR spektroskopie ukazuje, že dominantním motivem sekundární struktury je antiparalelní  $\beta$ -skládaný list a doména má celkový tvar plochého disku. Dále se v doméně objevují krátké úseky  $\alpha$ -šroubovice (10 AA) a především na povrchu domény smyčka obsahující aminokyselinovou sekvenci reaktivního místa, které je spojeno pomocí disulfidových můstků s oblastí  $\beta$ -skládaných listů [121,123].

Mezi doménami prekursoru z *N. alata* a z *N. attenuata* dochází pouze k mutacím na úrovni jednotlivých aminokyselinových zbytků a nikoli k složitějším strukturním změnám jako jsou např. inserce a delece jednotlivých aminokyselin či sekvenčních bloků. Na základě této skutečnosti byla využita známá 3D struktura domény z *N. alata* (PDB kód 1TIH) jako templát pro vytvoření 3D modelu domény *N. attenuata*, konkrétně domény T2 ze šestidoménového prekursoru. Model byl optimalizován, jak je popsáno v kapitole 2.2.6.2. Výsledný model inhibitoru *N. attenuata* je na obrázku 3.11 (str. 42), kde je zvýrazněno umístění reaktivního místa, které je exponované na povrchu molekuly a je snadno dostupné pro interakci s cílovou peptidasou. Na prostorovém sbalení inhibičně aktivní molekuly se podílí tvorba čtyř intramolekulárních disulfidových můstků, které jsou vyznačeny na obrázku 3.11 žlutými postranními řetězci. Na stužkovém modelu je vidět

dominantní, pro inhibitory PI-II charakteristická, oblast sekundární struktury  $\beta$ -skládaného listu. N- a C-konce molekuly jsou také lokalizovány na povrch molekuly, jak lze očekávat, aby byly dostupné pro peptidasu při vyštěpení domény ze struktury prekursoru. N-konec se nachází v blízkosti reaktivního místa, a proto nelze vyloučit, že by mohl mít vliv na inhibiční specifitu a účastnit se interakce s peptidasou. Na kalotovém modelu na obrázku 3.12 (str. 43) jsou znázorněny polohy, kde dochází k aminokyselinovým mutacím jednak mezi jednotlivými doménami inhibitorů *N. attenuata* a také mutace odlišující inhibitory z *N. attenuata* od PI-II inhibitorů ostatních tabákovitých. Tato 3D prezentace je odvozena z přiřazení sekvencí uvedených v obrázku 3.7 (str. 37). K mutacím dochází rovnoměrně po celé molekule, mutace v blízkosti reaktivního místa by mohly teoreticky ovlivňovat inhibiční působení na různé peptidasy.



**Obrázek 3.11:** 3D model trypsinového inhibitoru typu PI-II z *N. attenuata* konstruovaný podle templátu homologického inhibitoru z *N. alata* (PDB 1TIH) programem Swiss-Pdb Viewer 3.7. Stuhkový způsob znázornění polypeptidového řetězce obsahuje: postranní řetězce čtyř disulfidových můstků (žlutě), reaktivní místo (zeleně). Šipky ukazují polohu N- a C-konce jednořetězcové molekuly.



**Obrázek 3.12:** Kalotový způsob znázornění 3D modelu trypsinového inhibitoru z *N. attenuata* s vyznačenými polohami mutujících aminokyselin u izoinhibitorů z *N. attenuata* a homologických inhibitorů z různých druhů tabákových. Znázorněny jsou: mutace odlišující inhibitory *N. attenuata* a ostatních druhů tabáku (červená), mutace odlišující jednotlivé inhibitory *N. attenuata* (modrá), společná místa mutací u inhibitorů z *N. attenuata* a inhibitorů z ostatních druhů tabáků (fialová). Rovnými šipkami je vyznačeno reaktivní místo inhibitoru. Obrázky A) a B) ukazují pohled na molekulu při otočení o 180°.

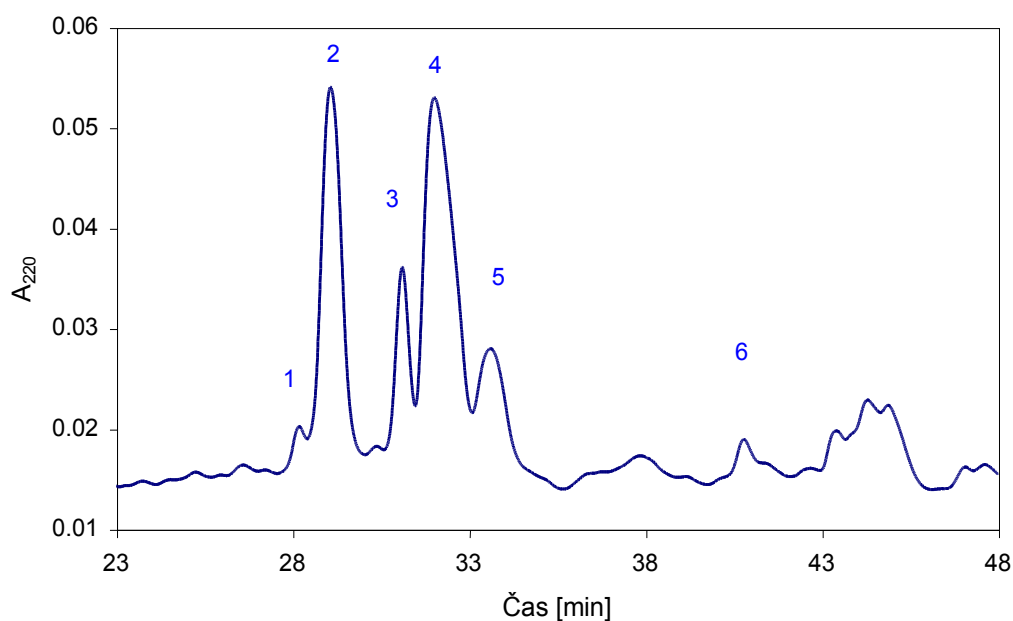
### 3.3.2 Charakterizace izoinhibitorů trypsinu

Pomocí RP-HPLC byla separována sada izoinhibitorů trypsinu (kapitola 3.3) izolovaných z *N. attenuata* genotyp Utah (obrázek 3.13, str. 45). Tato kapitola se zaměřuje na jejich charakterizaci a srovnání. U frakcí s trypsinovou inhibiční aktivitou, které odpovídají elučním vrcholům byla určena N-koncová aminokyselinová sekvence v proteinovém sekvenátoru a pomocí MALDI-TOF hmotové spektrometrie byly stanoveny molekulové hmoty jednotlivých trypsinových inhibitorů. Získané údaje jsou uvedeny v tabulce 3.2 (str. 44).

**Tabulka 3.2:** Přehled určených N-koncových sekvencí a molekulových hmot tryptsinových inhibitorů z listového pletiva *N. attenuata* genotyp Utah. Experimentálními údaji je přiřazena sekvence odvozená z cDNA sekvence multidoménového prekursoru PI-II.

Číslo frakce	MW teor.	MW exp.	N-term.	Doména	Doména podle cDNA sekvence
#1	5758	5759	DRIXT	T1	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYGICPRS
#2	5670	5671	DRIXT	T1	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYGICPR
	5727	5730	DRIXT	T6	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDERIAYGICPR
	5749	5743	DRIXT	T2/T4/T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPR
#3	5834	5831	DRIXT	T2/T4	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPRS
		5831	DRIXT	T6	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDERIAYGICPRT
#4	5743	5744	DRIXT	T2/T4/T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPR
	5846	5845	DRIXT	T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPRT
#5	5646	5643	RIXTN	T1	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYGICPRS
	5760	5759	DRIXT	T1	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYGICPRS
#6	n.a.	6265	KAXPR		n.a.
	n.a.	6137	AXPRN		n.a.

*MW teor.* - molekulová hmota v daltonech získaná výpočtem podle cDNA sekvence příslušné domény prekursoru, *MW exp.* - molekulová hmota v daltonech získaná hmotovou spektrometrií MALDI-TOF, *N-term.* - N-koncová sekvence určená na proteinovém sekvenátoru, *n.a.* - neurčeno. Značení domén (T1-T6) je odvozené ze sedmidoménového prekursoru PI-II. Číslování frakcí podle obrázku 3.13 (str. 45).



**Obrázek 3.13:** Separace směsi trypsinových inhibitorů z listového pletiva *N. attenuata* pomocí RP-HPLC. Na kolonu Vydac Protein C<sub>4</sub> 214TP54 byla nanesena frakce z kolony Sephadexu G-50 Superfine obsahující směs trypsinových inhibitorů (odpovídající 0,5 g původního suchého listového pletiva) Pro chromatografii byl použit následující eluční systém: roztok A=0,1% TFA, roztok B=0,1% TFA, 60% acetonitril, gradient 0,5% B/min. Průtok kolonou byl 1 ml/min. Průběh chromatografie byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 220 nm. Vyznačené je kódování materiálů jednotlivých vrcholů.

N-koncové aminokyselinové sekvence jednotlivých trypsinových inhibitorů byly porovnány s kompletní cDNA sekvencí šestidoménového a sedmidoménového prekursoru typu PI-II z *N. attenuata* (viz kapitola 3.3.1.2). Z těchto dat vyplývá, že všechny nalezené izoinhibitory jsou odvozeny proteolytickou fragmentací ze struktury prekursorů typu PI-II. Určené N-koncové aminokyselinové sekvence jsou převážně sekvence DRICT. Dále byla v malém množství také nalezena sekvence z ní odvozená RICT, která může naznačovat působení aminopeptidas na N-koncovou část molekuly. Další minoritní sekvencí je KACPR, která je odvozena z první N-koncové domény prekursoru a je součástí tzv. dvouřetězcové domény, jejíž bližší analýza je uvedena v kapitole 3.4.1. Pro hlavní izoinhibitory byla určena molekulová hmotnost, která se pohybovala v intervalu cca 5,6 - 5,9 kDa, což ukazuje, že tyto molekuly odpovídají jednotlivým doménám prekursorů PI-II z *N. attenuata*. Z informací o N-koncové aminokyselinové sekvenci a

z dat o molekulové hmotě jednotlivých trypsinových inhibitorů byla dále odvozena délka polypeptidového řetězce vyštěpeného z prekursoru a poloha C-konce. Tento výsledek ukazuje, že i na C-konci inhibitorů existuje heterogenita, která může být výsledkem působení karboxypeptidas. Strukturní charakterizace trypsinových inhibitorů izolovaných z listového pletiva *N. attenuata* (genotyp Utah) ukázala, že jde o skupinu homologických izoinhibitorů (homologie cca 98%) odvozených výlučně sérií proteolytických štěpení multidoménových prekursorů PI-II. Jednotlivé izoinhibitory jsou v prekursorech odděleny tzv. spojovacím peptidem s aminokyselinovou sekvencí EEKKN, který se během fragmentace prekursoru PI-II proteolyticky uvolňuje.

### **3.3.3 Inhibiční specifita**

Z informací získaných porovnáním kompletní aminokyselinové sekvence trypsinového inhibitoru z *N. attenuata* programem “Blast 2 sequences“ je zřejmá vysoká sekvenční homologie k chymotrypsinovému inhibitoru *N. alata*. Na základě tohoto zjištění byly provedeny inhibiční testy majoritního inhibitoru (obrázek 3.5, str. 35, vrchol je označen plnou šipkou) a i ostatních inhibitorů savčího trypsinu purifikovaných z *N. attenuata* s dalšími peptidasami - savčím chymotrypsinem a elastasou, bakteriálním subtilisinem a hmyzím MS-chymotrypsinem. Další inhibice byla pozitivní jen v případě savčího chymotrypsinu a hmyzího MS-trypsinu, což znamená, že se jedná o širokospektré inhibitory schopné inhibovat trypsin a zároveň i savčí chymotrypsin (nikoli ale jeho hmyzí homolog). Inhibiční potenciál majoritního inhibitoru vůči savčímu trypsinu a chymotrypsinu je vyjádřen hodnotami  $IC_{50}=5.4$  nM resp.  $IC_{50}=5.1$  nM. Hodnota  $IC_{50}$  pro inhibitor hmyzího trypsinu se pohybuje v nM oblasti. Podobně širokospektré inhibitory serinových peptidas nejsou časté a tato jejich vlastnost začala být studována až nedávno, protože klasický model reaktivního místa inhibitorů serinových peptidas předpokládá smyčku se sekvencí podobnou substrátu buď pouze trypsinu nebo pouze chymotrypsinu. Z hlediska aminokyselinové sekvence PRN reaktivního místa inhibitoru PI-II z *N. attenuata* lze předpokládat specifickou interakci inhibitoru s trypsinem, jelikož obsahuje kladně nabitou aminokyselinu arginin. Ale v případě inhibice chymotrypsinu, který specificky štěpí peptidové vazby v blízkosti objemných hydrofóbních aminokyselinových zbytků (např. tryptofan, tyrosin, fenylalanin), dochází k zdánlivému rozporu, jelikož reaktivní místo inhibitoru neobsahuje žádnou z typických aminokyselin pro interakci s chymotrypsinem a přesto je inhibitor PI-II schopen chymotrypsin inhibovat. Vysvětlení

těchto protikladů lze nalézt v literatuře, která popisuje vliv aminokyselinových mutací v pozicích P2 a P1' kolem bazického zbytku P1 reaktivního místa inhibitoru PI-II z brambor na jeho inhibiční specifitu a ukazuje možnosti reaktivního místa s aminokyselinou sekvencí PRN inhibovat tak rozdílně specifické peptidasy trypsinu a chymotrypsinu [124]. Zároveň existuje přímý strukturální důkaz v krystalografické studii, kdy bazický zbytek v pozici P1 inhibitoru je přijat podmištěm S1 v aktivním místě chymotrypsinu [125].

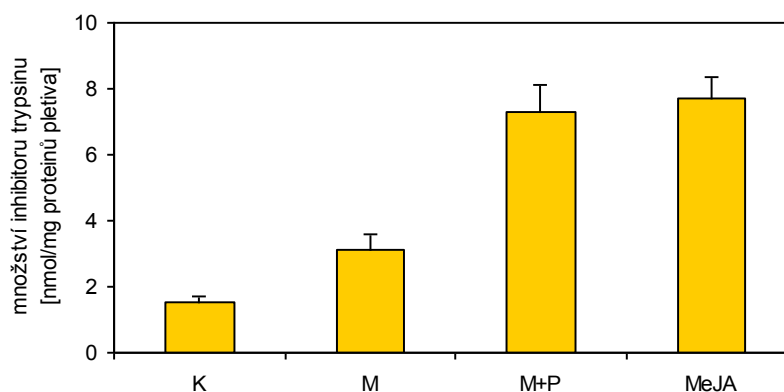
Z uvedené analýzy vyplývá, že rozdíly v inhibiční schopnosti mezi genotypy tabáku z Utahu a Arizony (tabulka 3.1, str. 31) způsobují inhibitory odvozené z prekursoru typu PI-II, jejichž inhibiční specifita rozšiřuje spektrum obranných proteinů tabáku z Utahu o inhibitory savčího a hmyzího trypsinu a zároveň savčího chymotrypsinu. Je zajímavé, že inhibitory PI-II neinhibují MS-chymotrypsin, na což upozorňuje poprvé tato práce. Literatura mluví o PI-II inhibitech trypsinu a chymotrypsinu jen na základě testů se savčími enzymy, ale nezabývala se cílovými peptidasami herbivorů. Inhibitory PI-II tedy nejsou fyziologicky cíleny proti chymotrypsinu z přirozeného škůdce *M. sexta*, ale bylo by možné spekulovat, že mohou inhibovat zřejmě chymotrypsinovou peptidasu z jiného druhu hmyzu nebo jde o rozšíření potenciálu proti peptidasám necitlivým na inhibitory, které se mohou indukovat a exprimovat v žaludku housenky *M. sexta*. Indukce tzv. necitlivých peptidas serinové třídy byla popsána u larev *Helicoverpa zea*, které konzumovaly stravu s vysokým obsahem inhibitorů [92].

### **3.4 Indukce exprese inhibitorů PI-II**

V této práci byl dále sledován vliv různých pro rostlinu stresových podmínek souvisejících s poraněním na expresi obranných inhibitorů. Listové pletivo *N. attenuata* byla vystavena opakovaně po dobu 2 až 3 dnů následujícím stresovým situacím: a) mechanické poranění skalpelem, b) mechanické poškození skalpelem s potíráním trávících šťáv housenky *M. sexta* (simulace požití housenkou), c) exogenní aplikace fytohormonu methyljasmonátu (MeJA), který funguje jako signální molekula při poranění [100].

Z výsledků inhibičních testů se vzorky stresovaného listového pletiva *N. attenuata* (genotyp Utah) je zřejmé zvýšení hladiny obranných peptidasových inhibitorů trypsinu v porovnání s konstitutivní hladinou inhibitorů příslušných kontrolních vzorků. V případě mechanického poškození se jednalo o nízkou indukci, indukční efekt byl mnohem výraznější v případě aplikace trávících šťáv do míst poranění. Tato skutečnost je v souladu

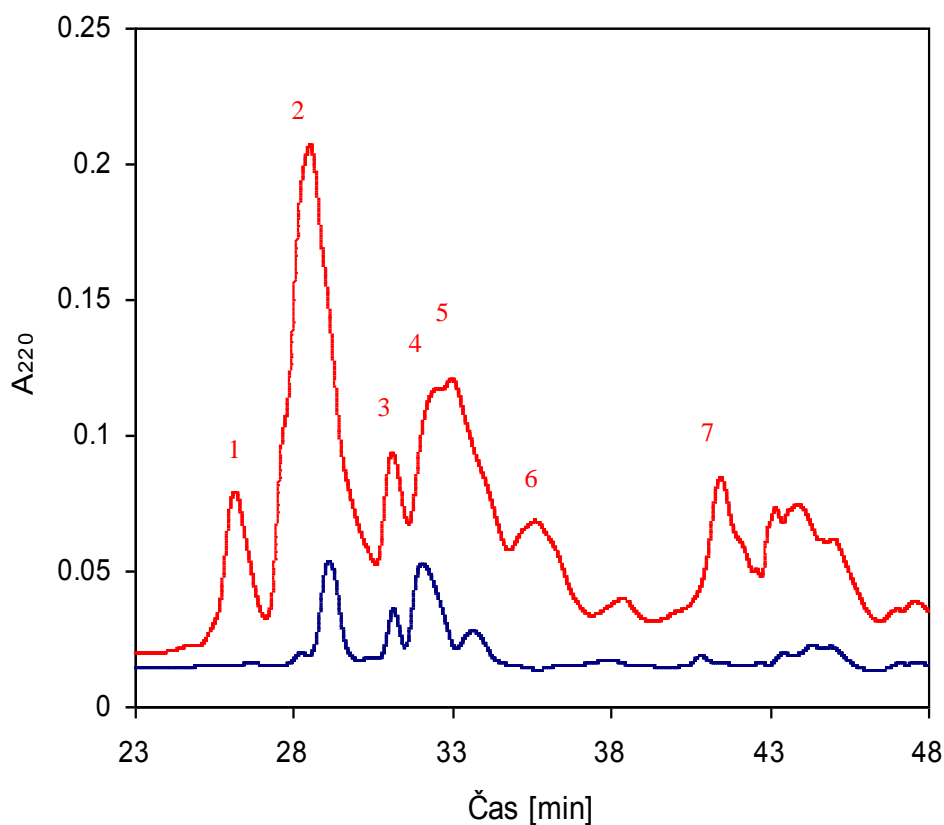
s nedávným nálezem látek produkovaných herbivory, které rostlina rozpoznává a které stimulují její obrannou odpověď [126]. V extraktech z pletiva indukovaného MeJA byla určena až pětinasobná hladina obranných peptidasových inhibitorů v porovnání s kontrolním vzorkem (obrázek 3.14). Test na indukcii biosyntézy trypsinových inhibitorů byl proveden také s listovým pletivem *N. attenuata* genotypu Arizona, ale výsledek byl podle očekávání negativní, nebyla nalezena žádná inhibiční aktivita vůči trypsinovým peptidasám.



**Obrázek 3.14:** Změna hladiny obranných trypsinových inhibitorů typu PI-II v závislosti na typu stresové situace související s poraněním listového pletiva *N. attenuata* genotyp Utah. Značení: K - konstitutivní hladina neindukovaného pletiva, M - indukovaná hladina vlivem mechanického poškození, M+P – indukovaná hladina vlivem mechanického poškození se současnou aplikací trávících šřáv z *M. sexta*, MeJA - indukovaná hladina vlivem exogenního působení fytohormonu methyljasmonátu. Stanovení provedeno v aktivním testu se savčím trypsinem a substrátem Bz-Arg-pNA (viz kapitola 2.2.3.2)

Jelikož vzorek indukovaný MeJA obsahoval nejvyšší hladinu obranných inhibitorů, byla z tohoto materiálu provedena analogicky jako u konstitutivního neindukovaného vzorku (jak je popsáno v kapitole 3.3) izolace trypsinových inhibitorů. Obrázek 3.15 (str.49) ukazuje porovnání elučních profilů na RP-HPLC pro indukovaný a konstitutivní materiál, kde je patrné několikanásobné navýšení obsahu trypsinových inhibitorů v indukovaném pletivu. Z indukovaného pletiva bylo izolací získáno 150 µg inhibitoru na 0,5 g původního suchého pletiva. Chromatografický profil indukovaného materiálu dále vykazuje změny v distribuci vrcholů jednotlivých izoinhibitorů.





**Obrázek 3.15:** RP-HPLC chromatogram separace směsi trypsinových inhibitorů indukovaného (červená křivka) vzorku listového pletiva *N. attenuata* (genotyp Utah). Na kolonu Vydac Protein C<sub>4</sub> 214TP54 byla nanesena frakce směsi trypsinových inhibitorů izolovaných na koloně Sephadexu G-50 Superfine. Pro chromatografii byl použit následující eluční systém: roztok A=0,1% TFA, roztok B=0,1% TFA, 60% acetonitril s gradientem 0,5% B/min. Průtok kolonou byl 1 ml/min. Průběh chromatografie byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 220 nm. Získané frakce jednotlivých materiálů indukovaných trypsinových inhibitorů jsou očíslovány. Pro možnost porovnání profilů je znázorněn chromatogram separace konstitutivních trypsinových inhibitorů (modrá křivka), který byl získán při zpracování stejného množství výchozího materiálu (0,5 g suchého listového pletiva).

U frakcí odpovídajících jednotlivým vrcholům byly určeny molekulové hmoty (MALDI-TOF), N-koncové aminokyselinové sekvence a analogicky jako u konstitutivního materiálu byly tyto terminální sekvence a údaje o molekulové hmotě jednotlivých inhibitorů trypsinu porovnány s kompletní cDNA sekvencí šestidoménového a sedmidoménového prekursoru typu PI-II z *N. attenuata*. Získané údaje jsou uvedeny v tabulce 3.3 (str. 50).

**Tabulka 3.3:** Přehled určených N-koncových sekvencí a molekulových hmot trypsinových inhibitorů z listového pletiva *N. attenuata* genotyp Utah. Experimentálními údaji je přiřazena sekvence odvozená z cDNA sekvence multidoménového prekursoru PI-II.

Číslo frakce	MW teor.	MW exp.	N-term.	Doména	Sekvence domény podle cDNA sekvence	
#1	6232	6226	EKKND	T6	EKKNDRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDERIAYGICPR	
	6332	6330	EKKND	T2/T4	EKKNDRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRS	
		6330			T6	EKKNDRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEIAYGICPRT
	6391	6388	EEKKN	T3	EEKNDRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPR	
		6387			T1	EEKNDRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYGICPRS
	6460	6459	EEKKN	T2/T4	EEKNDRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRS	
6459				T6	EEKNDRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEIAYGICPRT	
#2	5557	5556	RIXTN	T1	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYGICPR	
	5617	5614	RIXTN	T6	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEIAYGICPRT	
	5673	5671	DRIXT	T1	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYGICPR	
	5730	5729	RIXTN	T5	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRT	
		5731	RIXTN	T3	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRS	
		5729	DRIXT	T6	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEIAYGICPRT	
		5761	5760	DRIXT	T3	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPR
		5759	DRIXT	T1	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYGICPRS	
		5831	5831	DRIXT	T2/T4	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRS
	5831				T6	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEIAYGICPRT
	6373	6372	EEKKN	T2/T4/ T5	EEKNDRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPR	
	6475	6475	EEKKN	T3	EEKNDRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRS	
6478		EEKKN	T5	EEKNDRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRT		
#3	5834	5831	DRIXT	T2/T4	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRS	
		5831			T6	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEIAYGICPRT
#4	5629	5628	RIXTN	T2/T4/ T5	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPR	
	5742	5744	DRIXT	T2/T4/ T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPR	
#5	5629	5628	RIXTN	T2/T4/ T5	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPR	
	5742	5744	DRIXT	T2/T4/ T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPR	
				T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRT	
		5846	5845	DRIXT	T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRS
		5847			T3	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPR
	5733	5729	DRIXT	T6	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEIAYGICPRT	
5730		RIXTN	T5	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRT		
5732				T3	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPRS	
#6	5646	5644	RIXTN	T3	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPR	
	5643			T1	RICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEIAYGICPRT	
	5761	5760	DRIXT	T3	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYEICPR	
5759				T1	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDEGRIAYGICPRS	
#7	n.a.	6265	KAXPR		n.a.	
	n.a.	6136	AXPRN		n.a.	

MW teor. - molekulová hmota v daltonech získaná výpočtem podle cDNA sekvence příslušné domény prekursoru, MW exp. - molekulová hmota v daltonech získaná hmotovou spektrometrií

*MALDI-TOF, N-term. - N-koncová sekvence určená na proteinovém sekvenátoru, n.a. - neurčeno. Značení domén (T1-T6) je odvozené ze sedmidoménového prekursoru PI-II.*

Z těchto informací je patrné, že všechny nalezené inhibitory jsou odvozeny proteolytickou fragmentací ze struktury prekursorů typu PI-II. Dominantní N-koncovou sekvencí u indukovaného materiálu byla určena jednak sekvence DRICT, ale také sekvence EEKKN (v celkovém molárním výtěžku cca 25% všech sekvenovaných N-konců). Dále byly určeny v malém množství z nich odvozené sekvence RICT a EKKN, které pravděpodobně vznikly působením aminopeptidas na N-koncovou část molekuly. Detekována byla také minoritní sekvence KACPR a analýza této specifické domény je podrobně uvedena v následující kapitole. Molekulové hmoty indukovaných inhibitorů, které se pohybovaly v rozmezí 5,6 - 6,4 kDa, a N-koncové sekvence ukazovaly, že se jedná o izoinhibitory odvozené z jednotlivých domén prekursoru PI-II *N. attenuata*. Nalezena byla opět heterogenita sekvencí na C-konci domén.

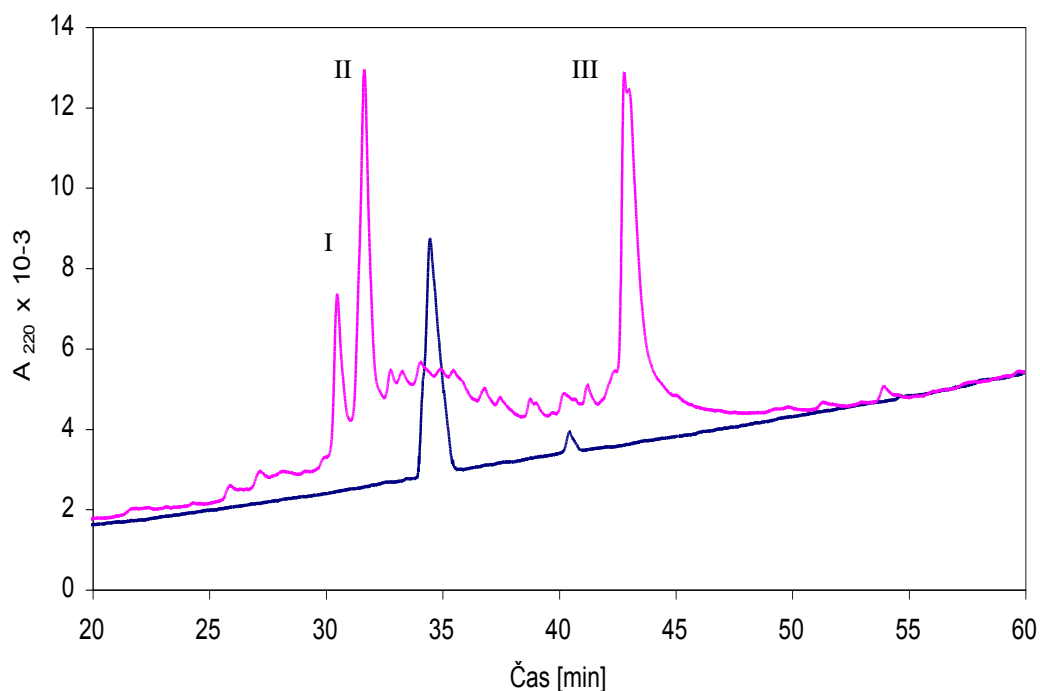
Hlavním rozdílem mezi konstitutivními a indukovanými izoinhibitory je tedy přítomnost nové N-koncové sekvence EEKKN u indukovaných inhibitorů. Tyto izoinhibitory vznikly proteolytickou fragmentací v oblasti spojovacího peptidu mezi jednotlivými doménami v odlišném místě než vykazují konstitutivní izoinhibitory. Spojovací peptid při tom zůstává i po štěpení domén součástí těchto nových forem izoinhibitorů. Existence specifických forem izoinhibitorů, které se objevují při indukci řízené fytohormonem MeJA, je v této práci popsána poprvé.

### **3.4.1 Charakterizace dvouřetězcové domény**

Z kompletní cDNA sekvence prekursoru PI-II z *N. attenuata* vyplývá, že inhibitor s N-koncovou aminokyselinovou sekvencí KACPR je odvozen z první N-koncové domény prekursoru. Z *N. alata* byl nedávno izolován inhibitor obsahující dva řetězce spojené disulfidy: řetězec z N-koncové domény prekursoru (N-koncová sekvence KACPR) a řetězec z C-koncové domény prekursoru (N-koncová sekvence RICTN) (viz schéma prekursoru na obrázku 3.18 A, str. 55). V případě nyní izolovaného inhibitoru z *N. attenuata* (frakce č. 7 viz obrázek 3.15, str. 49) byla nalezena homologická N-koncová sekvence KACPR, ale chyběl sekvenční signál, který by indikoval přítomnost druhého řetězce. Cílem další práce bylo analyzovat tuto molekulu a určit, jde-li o dvouřetězcovou nebo jednořetězcovou doménu. U tohoto materiálu byla provedena redukce disulfidických

můstků působením dithiothreitolu a následná stabilizace cysteinů karboxymethylací kyselinou jodoctovou. Tato metoda se běžně používá k rozpojení proteinových řetězců. Separace jednotlivých řetězců, které by vznikly rozpadem molekuly inhibitoru, byla provedena pomocí RP-HPLC. Na obrázku 3.16 (str. 53) jsou ukázány eluční profily inhibitoru před a po redukci cystinů, kde je zřejmý rozpad na jednotlivé řetězce se vznikem tří elučních vrcholů I, II a III. U vrcholů I a II byla určena N-koncová sekvence a molekulová hmota pomocí hmotové spektrometrie MALDI-TOF. V případě řetězce z vrcholu II byla identifikována sekvence celého řetězce. Tyto údaje (tabulka 3.4, str. 53) bylo možné korelovat s cDNA sekvencí prekursoru po korekci molekulových hmot spojené s karboxymethylací cysteinů. Výsledky ukazují, že materiál vrcholů I a II je polypeptidový řetězec, odvozený z první N-koncové domény prekursoru typu PI-II z *N. attenuata*, který se liší pouze přítomností N-koncové aminokyseliny. Polypeptidový řetězec separovaný ve frakci III nedával sekvenční signál při Edmanově odbourávání a hodnotu molekulové hmoty nebylo možné korelovat s teoretickým údajem o délce řetězce odvozeným z cDNA sekvence C-konce prekursoru z *N. attenuata* podle analogie se strukturou dvouřetězcového inhibitoru z *N. alata*. Analyzovaný řetězec III nicméně musí obsahovat dva nové hmotnostní příspěvky: a) neznámou modifikaci na N-konci řetězce, která blokuje Edmanovo sekvenční odbourávání, b) N-glykosidicky vázaný oligosacharid, který je předpokládán na aminokyselinovém zbytku Asn18 v sekvenci NGT, která vyhovuje klasickému glykosylačnímu signálu Asn-X-Ser/Thr. Rozdíl v experimentálním údaji o molekulové hmotě řetězce III a předpokládaného řetězce činí cca 1177 Da, je blízký např. kombinaci a) acetylace na N-konci a b) glykosylace oligosacharidovou strukturou o šesti cukerných jednotkách. Při hledání vhodné kombinace sacharidových jednotek, skládajících oligosacharid, se vycházelo z publikovaných struktur N-vázaných oligosacharidů na rostlinných glykoproteinech. Za možné řešení lze považovat: oligosacharid GlcNAc(3) Man(3) na řetězci NQICT...CEGES.

Z provedené proteinově-chemické analýzy vyplývá, že z prekursoru PI-II je vyštěpována inhibiční doména, která má dvouřetězcovou strukturu a která prodělává další posttranslační modifikaci specifickou pro inhibitor z *N. attenuata*. Předpokládaná struktura dvouřetězcového inhibitoru z *N. attenuata* je uvedena na 3D modelu (obrázek 3.17, str. 54) konstruovaném podle homologické struktury dvouřetězcové domény z *N. alata* (PDB 1QH2). Z modelu je patrné umístění glykosylačního signálu na povrchové, dobře přístupné smyčce.

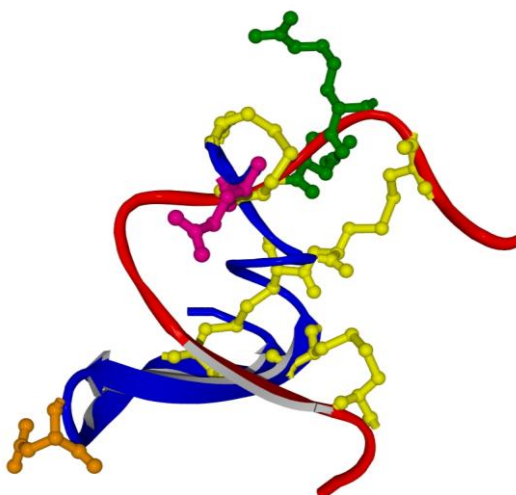


**Obrázek 3.16:** Srovnání RP-HPLC elučních profilů dvouřetězcové domény před (modrá) a po (fialová) redukcí disulfidových můstků. Separace byla provedena následujícím elučním systémem: roztok A=0,1% TFA, roztok B=0,1% TFA, 60% acetonitril s gradientem 1% B/min. Frakce I, II a III představují separované řetězce.

**Tabulka 3.4:** Přehled určených N-koncových sekvencí a molekulových hmot proteinových řetězců uvolněných redukcí disulfidů dvouřetězcového inhibitoru izolovaného z listového pletiva *N. attenuata* genotyp Utah. Experimentálními údaji je přiřazena předpokládaná sekvence, odvozená z cDNA sekvence multidoménového prekursoru PI-II.

Číslo frakce	MW teor.	MW exp.	N-term.	Aminokyselinová sekvence proteinového řetězce
# I	2240	2239	KAXPR	KACPRNCDGRIAYEICPR
# II	2114	2111	AXPRN	ACPRNCDGRIAYEICPR
# III	n.a.	4502	☒	n.a.

MW teor. - molekulová hmota v daltonech, získaná výpočtem podle cDNA sekvence příslušné domény prekursoru, MW exp. - molekulová hmota v daltonech, získaná hmotovou spektrometrií MALDI-TOF, N-term. - N-koncová sekvence, určená na proteinovém sekvenátoru, ☒ - chybí sekvenční signál, n.a. - neurčeno.



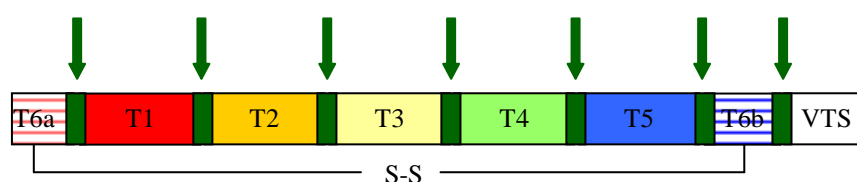
**Obrázek 3.17:** 3D model předpokládané dvouřetězcové domény odvozené ze struktury prekursoru PI-II z *N. attenuata*. Barevně jsou zvýrazněny: řetězec odvozený z N-koncové části prekursoru (červená), řetězec odvozený z C-koncové části prekursoru (modrá), disulfidové můstky (žlutá), reaktivní místo domény (zelená), N-konec řetězce obsahující blokovanou aminoskupinu (růžová), glykosylační místo Asn18 (oranžová). Organizace řetězců je patrná z obrázku 3.18 A (str. 55). Model byl připraven podle homologické struktury dvouřetězcové domény z *N. alata* (PDB 1QH2) programem Swiss PDB Viewer v. 3.7.

### 3.5 Proteolytická aktivace inhibitorů PI-II

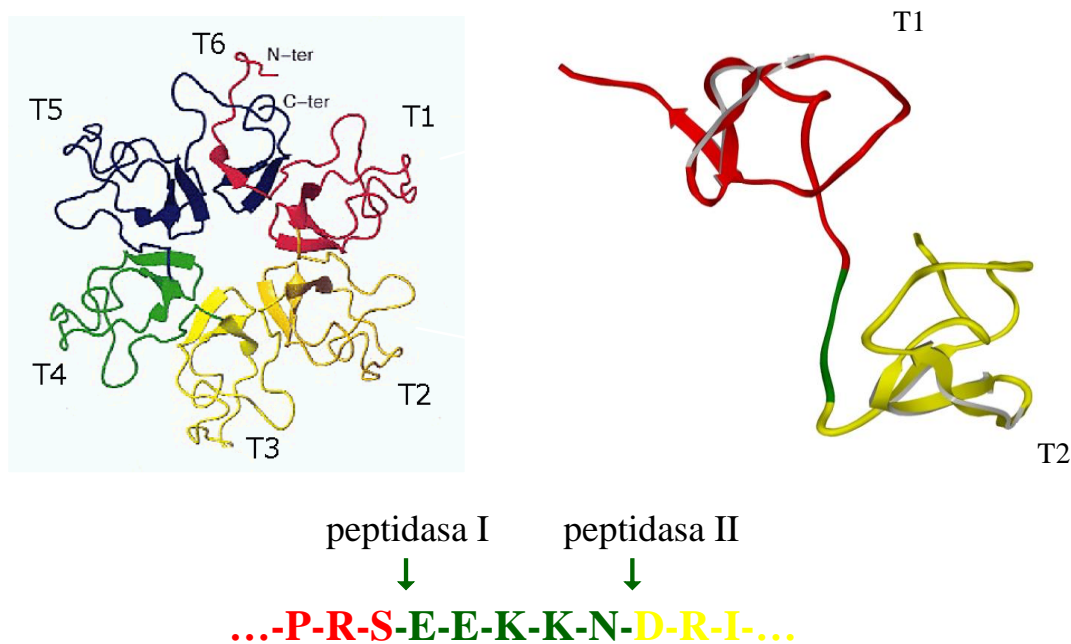
Z výsledků této práce je patrné, že obranné inhibitory typu PI-II jsou biosyntetizovány ve formě multidoménových prekursorů, které jsou díky své C-koncové VTS doméně (kapitola 3.3.1.3) transportovány do cílových vakuol, kde dochází pomocí endogenních peptidas k proteolytickému štěpení prekursorů na jednotlivé aktivní inhibitory a k odštěpení VTS domény. K proteolytickému štěpení dochází mezi homologickými doménami v místě spojovacího peptidu s aminokyselinovou sekvencí EEKKN. Podrobná analýza sekvencí izolovaných izoinhibitorů ukázala, že 1) C-koncová sekvence domén je PR(S) a 2) N-koncové sekvence domén jsou (D)RI nebo (E)EKKN. Aminokyseliny uvedené v závorkách jsou nepřítomny u malé populace sekvencí a naznačují pravděpodobně dodatečný “trimming“ působením exopeptidas. N-koncové sekvence (D)RI byly nalezeny u konstitutivních inhibitorů z neindukovaného listového pletiva i u inhibitorů přítomných po indukci. Naproti tomu N-koncové sekvence (E)EKKN byly přítomny v signifikantním množství (cca 25% molárního výtěžku celkových N-konců izoinhibitorů) jen

v indukovaném materiálu. To naznačuje, že štěpení spojovacího peptidu se zřejmě účastní dvě endogenní peptidasy s různou specifitou, pracovně označené jako peptidasa I a II. Peptidasa I štěpí peptidovou vazbu S-E mezi spojovacím peptidem a předcházející doménou a peptidasa II způsobuje fragmentaci vazby N-D mezi spojovacím peptidem a následující doménou.

A/



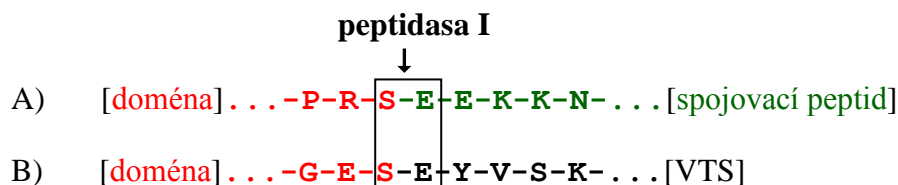
B/



**Obrázek 3.18:** A/ Lineární znázornění šestidoménového prekursoru PI-II s vyznačenými místy, kde dochází k posttranslační proteolytické fragmentaci (zelené šipky). Jednotlivé domény jsou barevně odlišeny, dvouřetězcová doména, skládající se z disulfidicky spojených koncových částí prekursoru, je vyšrafovaná (červená a modrá). Zelené pásy

mezi doménami znázorňují úsek s aminokyselinovou sekvencí spojovacího peptidu EEKKN. Na C-konci prekursoru je VTS sekvence. B/ Schéma lokalizace spojovacího peptidu mezi dvěma inhibičními doménami T1 a T2 u prekursoru typu PI-II z *N. attenuata*. Použito je stejné barevné kódování jako u obrázku A. Schéma cirkulárního prekursoru je upraveno podle [120,123] a orientace dvou domén podle 3D modelu dvoudoménového homologického inhibitoru z *N. alata* (PDB 1FYB).

Podle analýzy homologie aminokyselinových sekvencí (obrázek 3.19) lze předpokládat, že peptidasa I je zodpovědná jednak za fragmentaci mezi doménou a spojovacím peptidem, ale i za uvolnění VTS domény z C-konce prekursoru PI-II z *N. attenuata* (genotyp Utah). V obou případech jde o štěpenou vazbu S-E, přičemž okolní sekvence homologické nejsou. Je pravděpodobné, že peptidasy I a II jsou evolučně konzervované u tabákovitých, protože stejné nebo podobné sekvence štěpených vazeb mezi doménami nebo VTS lze nalézt i u homologických prekursorů PI-II z několika jiných druhů *Nicotiana*.

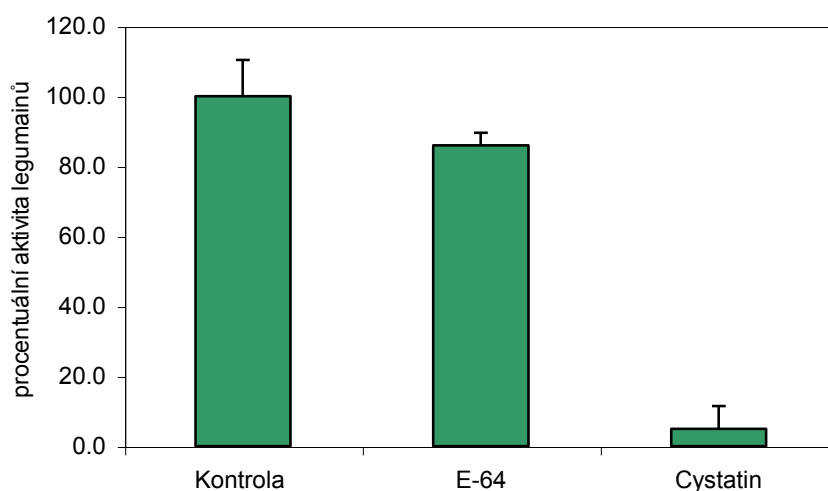


**Obrázek 3.19:** Srovnání aminokyselinových sekvencí v místech, kde dochází k posttranslační fragmentaci prekursoru typu PI-II z *N. attenuata*: A) mezi spojovacím peptidem (zelená) a C-koncem předcházející domény (červená) a B) mezi VTS (“vacuolar targeting signal”) (černá) a C-koncem předcházející domény (červená).

Ve spojitosti s fragmentací prekursorů několika typů proteinů rostlinnými endogenními peptidasami uvádí literatura účast cysteinových peptidas legumainového typu, které štěpí peptidové vazby za asparaginovými zbytky [127]. Na základě těchto informací byl proveden test na enzymovou aktivitu legumainu v proteinovém extraktu listového pletiva z *N. attenuata* (genotyp Utah) se specifickým fluorescenčním substrátem legumain Z-Ala-Ala-Asn-AMC. Tato aktivita byla skutečně nalezena (specifická aktivita činí 68 mU/mg proteinu pletiva, viz kapitola 2.2.3.6) a byla dále testována na inhibici pomocí



dvou selektivních inhibitorů cysteinových peptidas: E-64 a cystatinu, pro které je známá odlišná inhibiční specifita k cysteinovým peptidasám typu papainu a typu legumainu [128,129]. Výsledek inhibičních testů ukázal vysokou citlivost studované peptidasové aktivity v extraktu k cystatinu a nízkou citlivost k E-64, což je inhibiční specifita charakteristická pro legumainy (obrázek 3.20). Tímto způsobem byla klasifikována endogenní peptidasa II účastnící se fragmentace prekursoru PI-II z *N. attenuata* na jednotlivé aktivní inhibitory jako cysteinová peptidasa legumainového typu



**Obrázek 3.20:** Závislost aktivity peptidasy legumainu v proteinovém extraktu z listového pletiva *N. attenuata* na přítomnosti selektivních inhibitorů cysteinových peptidas: 50  $\mu\text{M}$  cystatinu a 500  $\mu\text{M}$  E-64. Testováno se specifickým fluorogenním substrátem Z-Ala-Ala-Asn-AMC.

Pro určení peptidasy I a detailnější studii fragmentace byly použity autentické peptidové substráty značené fluorescenčním FRET (“Fluorescence resonance energy transfer“) markrem Dabcyl-EDANS odvozené z aminokyselinové sekvence spojovacího peptidu a koncových částí okolních domén (peptid PRSEKKNDRI). Peptid PRSEKKNDRI byl připraven také ve dvou dílčích značených fragmentech, z nichž každý obsahoval jedno štěpené místo pro studované endogenní peptidasy I resp. II (obrázek 3.21, str. 58).

**NC-SP**            Dabcyl-**PRSE**EEKKNDRI-EDANS

**N-SP**            Dabcyl-**PRSE**EEKK-EDANS

**C-SP**            Dabcyl-**KK**NDRI-EDANS

***Obrázek 3.21:** Struktura syntetických peptidů odvozených ze sekvence prekursoru PI-II z *N. attenuata*, které byly použity jako substráty pro analýzu peptidas účastnících se fragmentace prekursoru. Substráty jsou značeny markry Dabcyl-EDANS pro fluorometrické monitorování štěpení. N-konce peptidů jsou modifikovány jako -Lys(Dabcyl)- a C-konce jsou modifikovány jako -Glu(EDANS)amid. Značení: NC-SP = N- i C-oblast spojovacího peptidu, N-SP a C-SP = N-oblast resp. C-oblast spojovacího peptidu. Štěpené vazby jsou zvýrazněny.*

Tyto substráty byly štěpeny v aktivním testu s extraktem z listového pletiva kontrolních rostlin *N. attenuata*. To umožnilo následně určit třídu peptidas, které štěpí substráty, pomocí testované citlivosti k selektivním skupinovým inhibitorům (tabulka 3.5, str. 36)

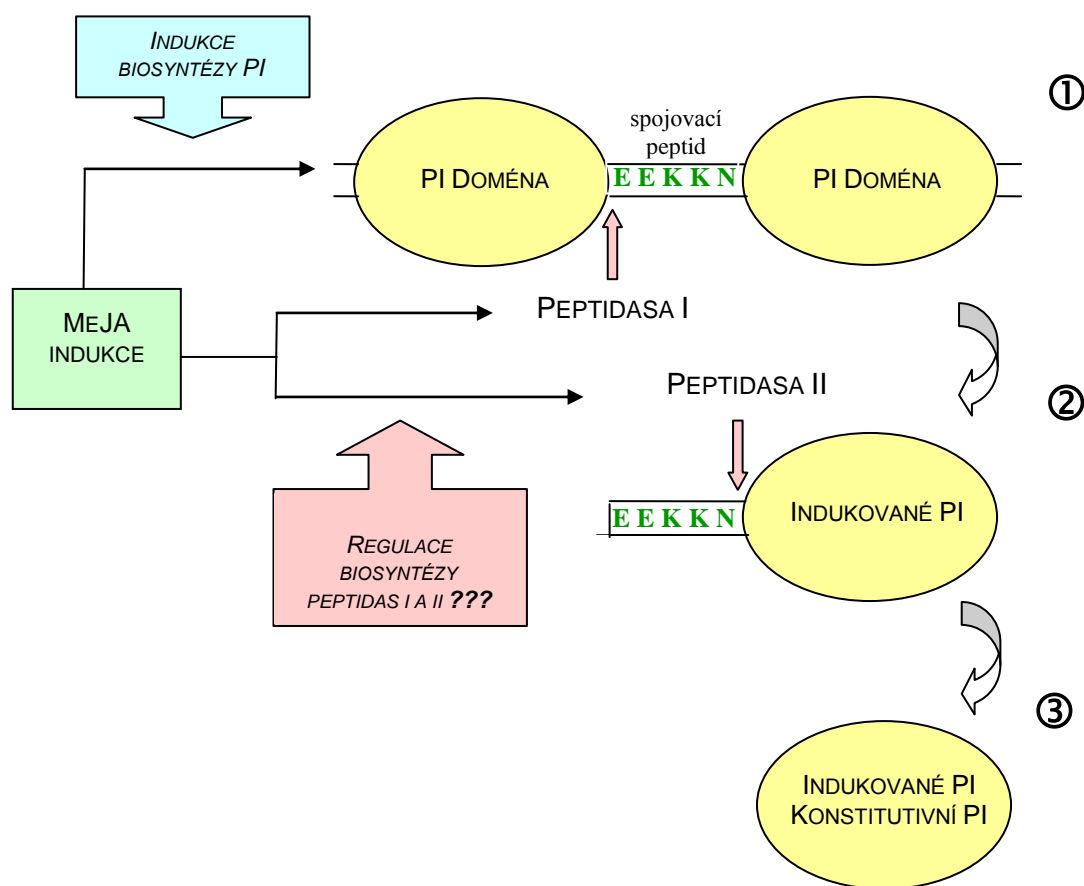
Výsledky ukazují, že 1) Peptidasa, štěpící substrát C-SP, vykazuje vysokou citlivost na přítomnost inhibitoru cysteinových peptidas cystatinu, ale nikoli na E-64. Z toho vyplývá, že se jedná o peptidasu legumainového typu [128,129]. 2) Peptidasa, štěpící peptidový substrát N-SP, je naopak citlivá na inhibitor E-64 a nikoli na cystatin, což vyhovuje vlastnostem peptidas papainového typu [129]. 3) Fragmentace peptidového substrátu NC-SP je inhibovaná jak cystatinem tak E-64, což indikuje kooperaci obou typů peptidas. Tyto výsledky jsou v souladu s předešlými testy s legumainovým substrátem Z-Ala-Ala-Asn-AMC, které přítomnost legumainu v listovém pletivu prokázaly. Uvedené analýzy tedy naznačují, že peptidasy, účastnící se fragmentace prekursoru PI-II a následného uvolňování spojovacího peptidu EEKKN, jsou papainového typu (peptidasa I) a legumainového typu (peptidasa II).

**Tabulka 3.5:** Analýza peptidasové aktivity přítomné v listovém pletivu *N. attenuata* provedená pomocí selektivních inhibitorů peptidas a specifických substrátů odvozených ze sekvence prekursoru PI-II. Detaily provedení testu jsou uvedeny v kapitole 2.2.3.7.

	Inhibice			
	E-64	cystatin	pepstatin	EDTA
<b>NC-SP</b>	+	+	-	-
<b>N-SP</b>	+	-	-	-
<b>C-SP</b>	-	+	-	-

+ nalezena inhibice peptidasové aktivity, - nenalezena inhibice peptidasové aktivity

Z analýzy aminokyselinových sekvencí N- a C-konců jednotlivých izoinhibitorů PI-II, izolovaných jak z konstitutivního, tak indukovaného listového pletiva *N. attenuata*, vyplývá, že jejich posttranslační fragmentace se účastní pravděpodobně jako první endogenní peptidasa I štěpící peptidovou vazbu S-E. Peptidasa I štěpí proteinový prekursor PI-II na izoinhibitory, mající N-koncovou aminokyselinovou sekvenci EEKKN. Jelikož nebyl nalezen žádný izoinhibitor s C-koncovou sekvencí EEKKN, je zřejmé, že izoinhibitory s N-koncovou sekvencí DRICT vznikly sekundárním proteolytickým účinkem peptidasy II. Ta způsobuje uvolnění spojovacího peptidu EEKKN z N-konce izoinhibitorů, vzniklých primárním působením peptidasy I (obrázek 3.22, str. 60)



**Obrázek 3.22:** Předpokládané schéma regulace biosyntézy obranných trypsinových inhibitorů (PI) v listovém pletivu *N. attenuata* genotyp Utah. 1) Působením fytohormonu MeJA se v rostlině zvyšuje hladina obranných trypsinových inhibitorů. Možný vliv MeJA na hladinu peptidas I a II zatím není objasněn. 2) Působením endogenní peptidasy I se fragmentuje multidoménový prekursor typu PI-II na trypsinové inhibitory s N-koncovou sekvencí EEKKN, které lze detekovat jako meziprodukt v indukovaném pletivu. 3) Dalším působením peptidasy II je odštěpen spojovací peptid a vznikají zralé inhibitory v indukovaném i neindukovaném pletivu.

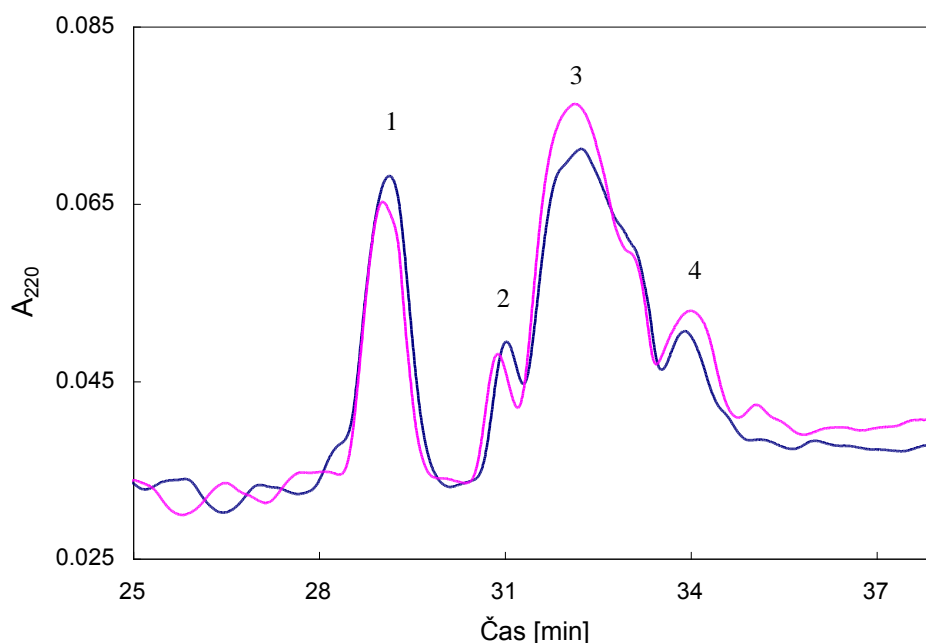
V indukovaném listovém pletivu byl nalezen vysoký obsah (cca 25%) pouze nekompletně fragmentovaných izoinhibitorů s N-koncovou sekvencí EEKKNDRICT, které chybí v konstitutivním neindukovaném pletivu. Na úrovni současné znalosti tématu lze diskutovat dvě hypotézy pro vysvětlení rozdílného poměru zastoupení “krátkých“ DRICT a “dlouhých“ EEKKNDRICT forem izoinhibitorů v indukovaném a konstitutivním materiálu. A/ Saturační hypotéza vychází z představy saturace endogenní peptidasy II vysokou koncentrací substrátu, tj. prekursoru typu PI-II, která dosahuje až pětinašobně

vyšší hladiny u indukovaného pletiva oproti konstitutivnímu. Saturací peptidasy II dochází k omezení uvolňování spojovacích peptidů EEKKN ze struktury izoinhibitorů, což by vysvětlovalo přítomnost velkého množství izoinhibitorů s N-koncovou sekvencí EEKKN u indukovaného materiálu. B/ Hypotéza indukce uvažuje indukční vliv signálních molekul typu MeJA nejen na indukci biosyntézy substrátu, ale i možný vliv na regulaci biosyntézy peptidas zodpovědných za “processing“ prekursoru. Tím může dojít ke změně vzájemného poměru peptidas. Vzájemné synchronizace jednotlivých proteinů, účastnících se komplexní regulace fyziologie během poranění rostliny je zatím málo prostudovaná. Další zajímavá otázka je, zdali mají izoinhibitory EEKKN specifickou fyziologickou funkci. Zvýšení strukturní diverzity izoinhibitorů typu PI-II by mohlo rozšířit inhibiční spektrum a změnit obranný potenciál rostlin. V této souvislosti je možné uvést, že N-koncová extenze EEKKN je lokalizovaná v blízkosti reaktivního centra (kapitola 3.3.1. a obrázek 3.8, str. 38) a mohla by ovlivňovat interakci s cílovými peptidasami např. necitlivého typu (kapitola 1.3.3). Analýza uvedených hypotéz je v současné době předmětem další práce na tématu.

### **3.6 Analýza inhibitorů PI-II v transgenní rostlině**

Pro další studium regulace proteolytické fragmentace prekursoru typu PI-II a zúčastněných endogenních peptidas byl využit transgenní přístup. Ve spolupracujícím pracovišti (Max-Planck Institut, Jena, SRN) byla připravena transgenní rostlina odvozená z *N. attenuata* genotyp Arizona, která je přirozeně deficitní na inhibitory savčích i hmyzích trypsinových peptidas [100]. Do genomu genotypu Arizona byl nyní vnesen gen kódující biosyntézu sedmidoménového prekursoru PI-II obranných izoinhibitorů trypsinu z genomu genotypu Utah. Transgen byl umístěn do genomu Arizona pod konstitutivním promotorem.

Isolace izoinhibitorů trypsinu z Arizona “sense“ rostlin byla provedena analogicky jako u *N. attenuata* genotyp Utah (kapitola 2.2.4). Na obrázku 3.23 (str. 60) je srovnání RP-HPLC elučních profilů kontrolní a indukované (pomocí MeJA) hladiny transgenních izoinhibitorů trypsinu. Eluční profily se téměř překrývají, nedochází k navýšení hladiny izoinhibitorů trypsinu, což je důsledkem konstitutivního promotoru, který nereaguje na působení signálních molekul, zajišťujících indukci při poranění.



**Obrázek 3.23:** Srovnání RP-HPLC elučních profilů separace směsi trypsinových inhibitorů z konstitutivního (modrá křivka) a indukovaného (fialová křivka) listového pletiva transgenní rostliny *N. attenuata* (genotyp Arizona) s vloženým genem prekursoru PI-II (z genotypu Utah). Na kolonu Vydac Protein C<sub>4</sub> 214TP510 byla nanášena frakce směsi trypsinových inhibitorů izolovaných na kolaně Sephadex G-50 Superfine. Pro chromatografii byl použit následující eluční systém: roztok A=0,1% TFA, roztok B=0,1% TFA, 60% acetonitril s gradientem 0,5% B/min. Průtok kolonou byl 1 ml/min. Průběh chromatografie byl sledován kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 220 nm. Získané frakce jednotlivých materiálů indukovaných a konstitutivních trypsinových inhibitorů jsou očíslovány. Oba chromatogramy byly získány při zpracování stejného množství výchozího materiálu (0,5 g původního suchého listového pletiva).

### 3.6.1 Charakterizace izoinhibitorů trypsinu produkovaných transgenním tabákem

Charakterizace byla provedena analogicky jako u izoinhibitorů trypsinu z *N. attenuata* genotyp Utah. Byla určena N-koncová sekvence, molekulová hmotnost pomocí MALDI-TOF a z cDNA sekvence prekursoru PI-II kompletní aminokyselinová sekvence jednotlivých inhibitorů. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.5 (str. 63)

**Tabulka 3.5:** Přehled určených N-koncových sekvencí a molekulových hmot trypsinových inhibitorů z listového pletiva transgenní rostliny Arizona “sense“. Experimentálním údajům je přiřazena sekvence odvozená z cDNA sekvence multidoménového prekursoru PI-II.

Číslo frakce	MW teor.	MW exp.	N-term.	Doména	Doména podle cDNA sekvence
#1 K	5673	5671	DRIXT	T1	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYGICPR
#1 MeJA	5673	5671	DRIXT	T1	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYGICPR
#2 K	5833	5831	DRIXT	T2/T4	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPRS
		5831		T6	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDERIAYGICPRT
#2 MeJA	5832	5831	DRIXT	T2/T4	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPRS
		5831		T6	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFVCEGESDPRNPKACPRNCDERIAYGICPRT
#3 K	5745	5742	DRIXT	T2/T4/T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPR
#3 MeJA	5745	5744	DRIXT	T2/T4/T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPR
#4 K	5743	5742	DRIXT	T2/T4/T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPR
#4 MeJA	5743	5745	DRIXT	T2/T4/T5	DRICTNCCAGTKGCKYFSDDGTFICEGESDPRNPKACPRNCDGRIAYEICPR

MW teor. - molekulová hmota v daltonech, získaná výpočtem podle cDNA sekvence příslušné domény prekursoru, MW exp. - molekulová hmota v daltonech, získaná hmotovou spektrometrií MALDI-TOF, N-term. - N-koncová sekvence, určená na proteinovém sekvenátoru. Značení domén (T1-T6) je odvozené ze sedmidoménového prekursoru PI-II. Číslování frakcí je podle obrázku 3.23, (str. 62), značení odpovídá: K – konstitutivní izoinhibitory, MeJA – indukované izoinhibitory.

Z výsledků je zřejmé, že v transgenním indukovaném i neindukovaném materiálu jsou přítomny izoinhibitory s N-koncovou sekvencí převážně DRICT a v malém množství se sekvencí z ní odvozenou RICT. Jejich molekulové hmoty se pohybují v intervalu 5,6 – 5,9 kDa. Spektrum N-koncových sekvencí a údaje o molekulové hmotě jsou srovnatelné s charakteristickými hodnotami pro izoinhibitory získané z konstitutivního materiálu *N. attenuata* genotyp Utah. Z těchto výsledků vyplývá, že posttranslační fragmentace prekursorů PI-II v transgenním tabáku Arizona “sense“ se účastní stejný proteolytický mechanismus zajištěný peptidasami I a II jako v genotypu Utah. Peptidasy I a II mají pravděpodobně širší spektrum svého působení a zajišťují fragmentaci více typů proteinových prekursorů.

Celková hladina produkce trypsinových inhibitorů v transgenní rostlině Arizona “sense“ je obdobná jako u neindukované rostliny s genotypem Utah (cca 30 reps. 40 µg izolovaných izoinhibitorů z 0,5 g suchého listového pletiva). Obdobné hladiny trypsinových inhibitorů v těchto rostlinách a skutečnost, že jsou fragmentovány analogickým způsobem, jsou v souladu se saturační hypotézou o vlivu kapacity

proteolytického systému zodpovědného za “processing“ inhibitorů na typ fragmentace izoinhibitorů (tj. výskyt EEKKN a DRICT N-koncových sekvencí; kapitola 3.5). To dále potvrzuje skutečnost, že indukce fytohormonu MeJA u Arizona “sense“ rostlin nevede ke změně fragmentace izoinhibitorů.



## ZÁVĚR

- ✓ Byl určen typ peptidasových inhibitorů s potenciální obrannou funkcí přítomný v listovém pletivu divokého tabáku *Nicotiana attenuata*. Analyzovány byly dva genotypy tabáku Utah a Arizona, které se lišily přítomností resp. absencí inhibitorů trypsinu.
- ✓ Pro izolaci trypsinového inhibitoru z tabáku genotypu Utah byla vypracována izolační procedura, která v koncovém purifikačním kroku na RP-HPLC separovala sadu izoinhibitorů trypsinu (molekulová hmota cca 6 kDa).
- ✓ Pro detailní testy inhibiční specifity izoinhibitorů byly použity trávicí peptidasy housenky lišaje tabákového (*Manduca sexta*), která je přirozeným herbivorním škůdcem na tabáku. Izoinhibitory vykazovaly potenciál blokovat aktivitu hmyzího trypsinu a dále savčího trypsinu a chymotrypsinu.
- ✓ Izoinhibitory byly charakterizovány pomocí proteinového sekvenování a hmotové spektrometrie MALDI-TOF a klasifikovány jako členy strukturní rodiny PI-II (“potato type II protease inhibitors“). Porovnání s cDNA sekvencí ukázalo, že izoinhibitory jsou odvozeny proteolytickou fragmentací dvou multidoménových prekursorů obsahujících šest resp. sedm homologických inhibičních domén. Prekursory nejsou lineární, ale mají inhibiční domény uspořádané cirkulárně, protože N- a C- koncová oblast prekursoru je spojena disulfidy a vytváří samostatnou inhibiční doménu. Dvouřetězcové složení této domény bylo určeno pomocí proteinově chemických metod.
- ✓ Obsah inhibitorů trypsinu se výrazně zvýšil (až 5ti násobně) při poškození listového pletiva rostliny nebo indukci fytohormonem methyljasmonátem, který slouží jako signální molekula při poranění rostliny. Izoinhibitory přítomné v indukovaném pletivu byly izolovány a porovnány s konstitutivními izoinhibitory z neindukovaného pletiva. U části indukovaných izoinhibitorů byl nalezen odlišný způsob fragmentace na N-konci molekuly. Diskutovány byly mechanismy vzniku tohoto efektu.

- ✓ Dále byly analyzovány izoinhibitory z transgenního tabáku Arizona (deficientního na inhibitory trypsinu), do kterého byl vnesen gen pro prekursor izoinhibitorů trypsinu (z genotypu Utah) s konstitutivním promotorem. Izolované izoinhibitory vykazovaly stejný způsob fragmentace jako konstitutivní izoinhibitory genotypu Utah. Tento výsledek ukazuje přítomnost stejných peptidas zodpovědných za fragmentaci prekursoru inhibitorů u obou genotypů.
  
- ✓ Pomocí specifických substrátů a inhibitorů byly analyzovány endogenní peptidasy, které jsou zodpovědné za štěpení multidoménových prekursorů na jednotlivé izoinhibitory. K fragmentaci spojovací sekvence mezi doménami dochází ve dvou polohách působením cysteinové peptidasy typu legumainu resp. papainu.

## Seznam použité literatury

1. Barrett, A. J., McDonald, J. K.: *Biochem. J.* **237**, 935 (1986)
2. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology: "Enzyme Nomenclature 1992", Academic Press, Orlando, Florida (1992)
3. Berger, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157 (1967)
4. Barrett, A. J.: In *Proteinase Inhibitors* (A. J. Barrett, G. Salvesen, eds.) str. 3-22, North-Holland, Amsterdam (1986)
5. Rawlings, N. D., Barrett, A. J.: *Biochem. J.* **290**, 250-218 (1993)
6. Barret, A. J., Rawlings, N. D.: *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 247-250 (1995)
7. Turk, V., Bode, W.: *FEBS Lett.* **285**, 213-219 (1991)
8. Barret, A. J., Rawlings, N. D., Davies, M. E., Machleidt, W., Salvesen, G., Turk, V.: In *Proteinase Inhibitors* (A. J. Barrett, G. Salvesen, eds.), Elsevier, Amsterdam, str. 515-569 (1986)
9. Stubbs, M.T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B., Turk, V.: *EMBO J.* **9**, 1939-1947 (1990)
10. Walsh, T. A., Strickland, J. A.: *Plant Physiol.* **103**, 1227-1234 (1993)
11. Waldron, C., Wegrid, C. M., Merlo, P. A. O., Walts, T. A.: *Plant Mol. Biol.* **23**, 801-812 (1992)
12. Bulter, C. J.: *Plant Physiol.* **103**, 1347-1353 (1993)
13. Emori, Y., Kawasaki, H., Uzuki, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3590-3599 (1987)
14. Takano, E., Maki, M., Mori, H., Hatanaka, M., Marti, T., Titani, K., Kannagi, R., Ooi, T., Murachi, T.: *Biochemistry* **27**, 1964-1972 (1988)
15. Maki, M., Takano, E., Mori, H., Hatanaka, M.: *FEBS Lett.* **223**, 174-180 (1987)
16. Dubin, G., Krajewski, M., Popowicy, G., Stec-Niemczyk, J., Bochtler, M., Potempa, J., Dubin, A., Holak, T. A.: *Biochemistry* **42**, 13449-13456 (2003)
17. Filipek, R., Rzychon, M., Oleksy, A., Gruca, M., Dubin, A., Potempa, J., Bochtler, M.: *J. Biol. Chem.* **278** 40959-40966 (2003).
18. Brzin, J., Popovič, T., Drobnič-Košorok, M., Kotnik, M., Turk, V.: *Biol. Chem. Hoppe-Seylers Suppl.* **369**, 233-238 (1988)
19. Heinrikson, R. L., Kézdy, F. L.: *Methods Enzymol.* **45**, 740-751 (1976)
20. Hatano, K., Kojima, M., Tanokura, M., Takahashi, K.: *Eur. J. Biochem.* **232**, 335-343 (1995)
21. Reddy, M. N., Keim, P. S., Heinrikson, R. L., Kédzy, F. J.: *J. Biol. Chem.* **250**, 1741-1750 (1975)
22. <http://merops.ac.uk/>
23. Komiyama, T., Pay, C. A., Pickup, D. J., Howard, A. D., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Salvesen, G.: *J. Biol. Chem.* **269**, 19331-19337 (1994)
24. Takeda, A., Yamamoto, T., Nakamura, Y., Takahashi, T., Hibinu, T.: *FEBS Lett.* **359**, 78-80 (1995)
25. Haak, V. Y. H., Purviance, R. T., Azaryan, A. V., Hubbard, G., Krieger, T.: *J. Biol. Chem.* **268**, 20570-20577 (1993)
26. Malthiery, Y., Lissitzky, S.: *Eur. J. Biochem.* **165**, 491-498 (1987)
27. Yamashita, M., Konagaya, S.: *J. Biol. Chem.* **271**, 1282-1284 (1996)
28. Lenari, B., Ritonja, A., Trukelj, B., Turk, B., Turk, V.: *J. Biol. Chem.* **272**, 13899-13903 (1997)
29. Mareš, M., Meloun, B., Pavlík, M., Kostka, V., Baudyš, M.: *FEBS Lett.* **251**, 94-98 (1989)

30. Ng, K. K. S., Petersen, J. F. W., Cherney, M. M., Garen, C., Zalatoris, J. J., Rao-Naik, Ch., Dunn, B. M., Martzen, M. R., Peanasky, R. J., James, M. N. G.: *Nat. Struct. Biol.* **7**, 653-657 (2000)
31. Li, M., Phylip, L. H., Lees, W. E., Winther, J. R., Dunn, B. M., Wlodawer, A., Kay, J., Gustchina, A.: *Nat. Struct. Biol.* **7**, 113-117 (2000)
32. Christaller, J. T., Farley, P. C., Ramsay, J. R., Sullivan, P. A., Laing, W. A.: *Eur. J. Biochem.* **254**, 160-167 (1998)
33. Shoichet, B. K., et.al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 452 (1995)
34. Baker, A. H., Edwards, D. R., Murphy, G.: *Journal of Cell Science* **115**, 3719-3727 (2002)
35. Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Tryggvason, K.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 7414-7419 (2002)
36. Gomez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., Thorgeirsson, U. P.: *Eur. J. Cell Biol.* **74**, 111-22 (1997)
37. Hiraga, K., Suzuki, T., Oda, K.: *J. Biol.Chem.* **275**, 25173-25179 (2000)
38. Bode, W., Hubert, R.: *Eur. J. Biochem.* **204**, 433-451 (1992)
39. Rees, D.C., Lipscomb, W.N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4633-4637 (1980)
40. Baumann, U., Bauer, M., Létoffé, S., Delepelaire, P., Wandersman, C.: *J. Mol. Biol.* **248**, 653-661 (1995)
41. Murai, H., Hara, S., Ikenaka, T., Oda, K., Murao, S.: *J. Biochem.* **97**, 173-180 (1985)
42. Catanese, J.J., Lawrence, F.K.: *Biochemistry*, **31**, 410-418 (1992)
43. Kondo, K., Narita, K., Lee, C.Y.: *J. Biochem.* **83**, 101-115 (1978)
44. Kaumeyer, J.F., Polazzi, J.O., Kotick, M.P.: *Nucleic. Acids Res.* **14**, 7839-7850 (1986)
45. Huber, R., Bode, W., Kukla, D., Kohl, U., Ryan, C.A.: *Biophys. Struct. Mech.* **30**, 189-201 (1975)
46. Laskowski, M., jr., Kato, I.: *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 593-626 (1980)
47. Laskowski, M., jr., Kato, I., Kohr, W.J., March, C.J., Bogard, W.C.: *Protides Biol. Fluids.* **28**, 123-128 (1980)
48. Reisinger, P.W.M., Hochstrasser, K., Gottlicher, I., Eulitz, M., Wachter, E.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **368**, 717-726 (1987)
49. Babin, D.R., Peanasky, R.J., Goos, S.M.: *Arch. Biochem. Biophys.* **232**, 143-161 (1984)
50. Seemuller, V., Dodt, J., Fink, E. Fritz, H.: In Proteinase Inhibitors (Barrett, A.J., Salvesen, G.S., eds), Elsevier, Amsterdam, str. 337-359 (1986)
51. Rydel, T.J., Ravichandran, K.G., Tulinsky, A., Bode, W., Huber, R., Roitsch, C., Fenton, J.W. 2nd.: *Science* **249**, 277-280 (1990)
52. Fritz, H.: *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 79-82 (1988)
53. Thompson, R.C., Ohlson, K.: *Proct. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 6692-6696 (1986)
54. Carrell, R., Travis, J.: *Trends Biochem. Sci.* **10**, 20-24 (1985)
55. Heidtmann, H., Travis, J.: In Proteinase Inhibitors (Barrett, A.J., Salvesen, G., eds), Elsevier, Amsterdam, 441-445 (1986)
56. Cleveland, T.E., Thornburg, R.W., Ryan, C.A.: *Plant. Mol. Biol.* **8**, 199-207 (1987)
57. Graham, J.S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Lowell, H.E., Clarence, A. R.: *J. Biol. Chem.* **260**, 6555-6560 (1985)
58. Sánchez-Serrano, J., Schmidt, R., Schell, J., Willmitzer, L.: *Mol. Gen. Genet.* **203**, 15-20 (1986)
59. Graham, J.S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Lowell, H.E., Clarence, A.R.: *J. Biol. Chem.* **260**, 6561-6554 (1985)
60. Greenblatt, H.M., Ryan, C.A., James, M.N.: *J. Mol. Biol.* **205**, 201-218 (1989)
61. Koide, T., Ikenaka, T.: *Eur. J. Biochem.* **32**, 417-432 (1973)

62. Mundy, J., Hejgaarg, J., Svendsen, J.: *FEBS Lett.* **167**, 210-214 (1984)
63. Song, H.K., Suh, S.W.: *J.Mol. Biol.* **275**, 347-363 (1998)
64. Odani, S., Koide, T., Ono, T.: *J. Biol. Chem.* **258**, 7998-8003 (1983)
65. Ikenaka, T., Norioka, S.: In *Proteinase Inhibitors* (Barrett, A.J., Salvesen, G., eds) 361-374, Elsevier, Amsterdam (1986)
66. Hojima, Y., pierce, J.V., Pisano, J.J.: *Biochemistry* **21**, 3741-3746 (1982)
67. Bode, W., Greyling, H.J., Huber, R., Otlewski, J., Wilusz, T.: *FEBS Lett.* **242**, 285-292 (1989)
68. Sato, S., Murao, S.: *Agr. Biol. Chem.* **37**, 1067-1074 (1973)
69. Lawrence, P.K., Koundal, K.R.: *EJB* **5**, 93-109 (2002)
70. Gershenzon, J.: *J. Chem. Ecol.* **20**, 1281-1328 (1994)
71. Purrington, C.B.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 305-308 (2000)
72. Adler, L.S., Karban, R., Strauss, S.Y.: *Ecology* **82**, 2032-2044 (2001)
73. Kessler, A., baldwin, I.T.: *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 299-328 (2002)
74. Wittstock, U., Gershenzon, J.: *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 1-8??? (2002)
75. Tamayo, M.C., Rufat, M., Bravo J.M., San Segundo, B.: *Planta* **211**, 62-71 (2000)
76. Farmer E.E.: *Nature* **411**, 854-856 (2001)
77. Dicke, M., van Loon, J.J.A.: *Entomol. Exp. Appl.* **97**, 237-249 (2000)
78. Ryan, C.A., Pearce, G.: *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.*: **14** , 1-17 (1998)
79. Gatehouse, J.A.: *New Phytol.* **156**, 145-169 (2002)
80. Ryan, C.A., Pearce, G.: *Proct. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 14577-14580 (2003)
81. Weber, H.: *Trends in Plant Sci.* **7**, 217-224 (2002)
82. Ryan, C.A.: *BBA-Prot. Struct. Mol. Enzymol.* **1477**, 112-121 (2000)
83. Leon, J., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J.J.: *J. Exp. Bot.* **52**, 1-9 (2001)
84. Orozco-Cardenas, M., Narveaz-Vasquez, J., Ryan, C.A.: *Plant Cell* **13**, 179-191 (2001)
85. Tetterall, D.B., Bak, S., Jones, P.R., Olsen, C.E., Nielsen, J.K., Hansen, M.L., Hoj, J.F., Moller, B.L.: *Science* **293**, 1826-1828 (2001)
86. Dobler, S.: *Basic Appl. Ecol.* **2**, 15-26 (2001)
87. Danielson, P.B., Foster, J.L.M., McMahill, M.M., Smith, M.K., Foglemann, J.C.: *Mol. Gen. Genet.* **259**, 54-59 (1998)
88. Li, X.C., Berenbaum, M.R., Schuler, M.A.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 75-84 (2000)
89. McManus, M.T., Burgess, E.P.J.: *Transgenic Research* **8**, 383-395 (1995)
90. Jongsma, M.A., Bakker, P.L., Peters, J., Bosch, D., Stiekema, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 8041-8045 (1995)
91. Gruden, K., Popović, T., Cimerman, N., Križaj, I., Štrukelj, B.: *Biol. Chem.* **384**, 305-310 (2003)
92. Volpicella, M., Ceci, L.R., Cordewener, J., America, T., Gallerani, R., Bode, W., Jongsma, M.A., Beekwilder, J.: *Eur. J. Biochem.* **270**, 10-19 (2003)
93. Gruden, K., Kuipers, A.G.J., Gunčar, G., Spalar, N., Štrukelj, B., Jongsma, M.A.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 365-375 (2004)
94. Hilder, V.A., Boulter, D.: *Crop protection* **18**, 177-191 (1999)
95. Schuler, T.J., Poppy, G.M., Kerry, B.R., Denholm, I.: *Tibetech* **17**, 210-216 (1999)
96. Schuler, T.J., Poppy, G.M., Kerry, B.R., Denholm, I.: *Tibetech* **16**, 168-175 (1998)
97. Gatehouse, A.M.R., Hilder, V.A.: *Molecular Biology in Crop Protection* (Marshall, G., Walters, D., eds), str. 177-201 Chapman & Hall (1994)
98. Altabella, T., Chrispeels, M.J.: *Plant Physiol.* **107**, 1233-1239 (1990)
99. Turk, V., Brzin, J., Langer, M., Ritonja, A., Eropkin, M., Borchart, U., Machleidt, W.: *Biol. Chem. Hoppe-Seylers* **364**, 1487-1496 (1983)

100. Van Dam, N.M., Horn, M., Mareš, M., Baldwin, I.T.: *J. Chem. Ecol.* **27**, 547-567 (2001)
101. Allen, G.: Sequencing of Proteins Peptides, str. 30-31, Elsevier, Amsterdam (1983)
102. Baudy, M., Meloun, B., Gan-Erdene, T., Pohl, J., Kostka, V.: *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **371**, 485-491 (1990)
103. Laemmli, U.K.: *Nature* **227**, 680-685 (1970)
104. Blakesley, R.W., Boezi, J.A.: *Anal. Biochem.* **82**, 580-582 (1977)
105. Blum, H., Bier, H., Gross, H.J.: *Elektrophoresis* **8**, 93-99 (1987)
106. Bradford, M.N.: *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)
107. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
108. <http://www.cmbi.kun.nl/gv/servers/WIWWWI/>
109. <http://www.rscb.org/pdb/>
110. <http://www.us.expasy.org/spdbv/>
111. Glawe, G.A., Zavala, J.A., Kessler, A., Van Dam, N.M., Baldwin, I.T.: *Ecology* **84**, 79-90 (2003)
112. Van Dam, N.M., Baldwin, I.T.: *Plant Biol.* **5**, 179-185 (2003)
113. Fickbohm, D., Trimmer, B.A.: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **53**, 172-185 (2003)
114. Pearce, G., Johnson, S., Ryan, C.A.: *Plant Physiol.* **102**, 639-644 (1993)
115. Barrette-Ng, I.H., Ng, K.K.S., Cherney, M.M., Pearce, G., Ryan, C.A., James, M.N.G.: *J. Biol. Chem.* **278**, 24062-24071 (2003)
116. Pouvreau, L., Gruppen, H., Piersma, S.R., van den Broek, L.A., van Koningsveld, G.A., Voragen, A.G.: *J. Agric. Food Chem.* **49**, 2864-2874 (2001)
117. Bryant, J., Green, T.R., Gurusaddaiah, T., Ryan, C.A.: *Biochemistry* **15**, 3418-3424 (1976)
118. Graham, J.S., Pearce, G., Merryweather, J., Titani, K., Ericsson, L.H., Ryan, C.A.: *J. Biol. Chem.* **260**, 6561-6564 (1985)
119. Antcheva, N., Pintar, A., Patthy, A., Simoncsits, A., Barta, E., Tchorbanov, B., Pongor, S.: *Protein Science* **10**, 2280-2290 (2001)
120. Scalon, M.J., Lee, M.C.S., Anderson, M.A., Craik, D.J.: *Structure* **7**, 793-802 (1999)
121. Schirra, H.J., Scalon, M.J., Lee, M.C.S., Anderson, M.A., Craik, D.J.: *J. Mol. Biol.* **306**, 69-79 (2001)
122. Nakamura, K., Matsuoka, K.: *Plant Physiol.* **101**, 1-5 (1993)
123. Lee, M.C.S., Scalon, M.J., Craik, D.J., Anderson, M.A.: *Natur. Struc. Biol.* **6**, 526-530 (1999)
124. Beekwilder, J., Schipper, B., Bakker, P., Bosch, D., Jongasma, M.: *Eur. J. Biochem.* **267**, 1975-1984 (2000)
125. Jongasma, M.A., Bakker, P.L., Stiekema, W.J., Bosch, D.: *Mol. Breed.* **1**, 181-191 (1995)
126. Korth, K.L., Diwon, R.A.: *Plant Physiol.* **115**, 1299-1305 (1997)
127. Muntz, K., Blattner, F.R., Shutov, A.D.: *J. Plant Physiol.* **159**, 1281-1293 (2002)
128. Rotari, V.I., Dando, P.M., Barrette, A.J.: *Biol. Chem.* **382**, 953-959 (2001)
129. Kembhavi, A.A., Buttle, D.J., Knight, C.G., Barrette, A.J.: *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 208-213 (1993)

