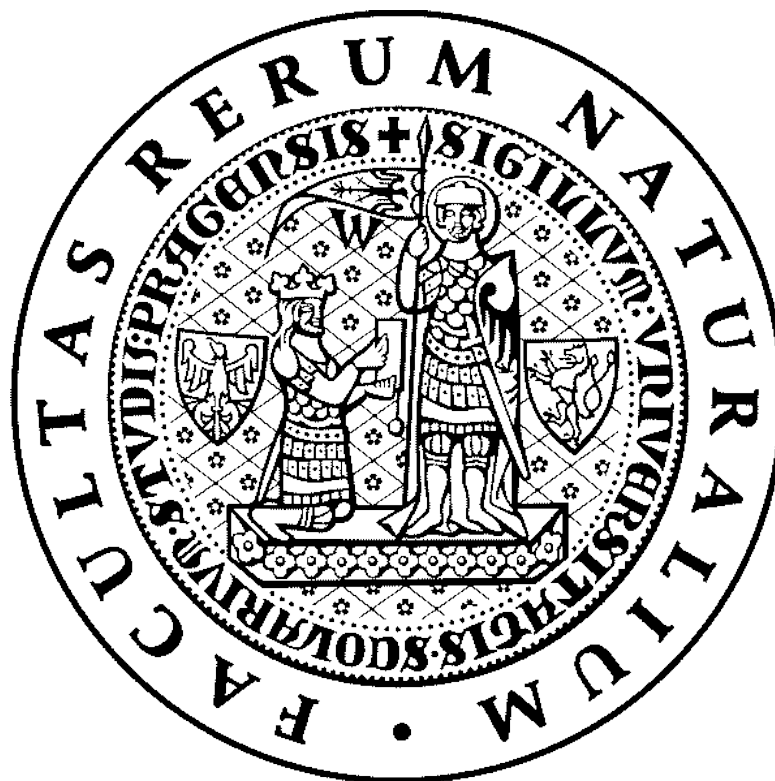


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



Studium β -N-acetylhexosaminidasy v rostlinách tabáku

Study of β -N-acetylhexosaminidase in tobacco plants

Bakalářská práce

Školitelka: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Robert Valenta

Praha 2010

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky doc. RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.“

V Praze dne:

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své školitelce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za odborné rady, trpělivost a podporu při zpracování této bakalářské práce. Děkuji RNDr. Veronice Doubnerové, Ph.D. za pomoc při řešení každodenních problémů v laboratoři a za odborné rady při zpracování výsledků. Děkuji Mgr. Tomáši Křížkovi za pomoc při měření a vyhodnocení kapilární elektroforézy.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK:

a	aktivita
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
(GlcNAc) ₂ , diacetylchitobiosa	N,N'-diacetylchitobiosa
(GlcNAc) _n	chitooligomer
p-NP	p-nitrofenol
p-NP-GlcNAc	p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glukosaminid
p-NP-(GlcNAc) _n	p-nitrofenyl-chitooligomer
p-NP-GalNAc	p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-galaktosaminid
PVP	polyvinylpolypyrrolidon
V _e	eluční objem
K _m	Michaelisova konstanta
V _{max}	maximální rychlost reakce
M _R	relativní molekulová hmotnost
BSA	hovězí sérový albumin

ABSTRAKT

β -N-acetylhexosaminidasy jsou přítomny ve všech živých organismech, avšak informací o tomto enzymu v rostlinách a především listech je známo málo. V případě rostlinných β -N-acetylhexosaminidas se spekuluje o možné obranné funkci proti houbovým i jiným patogenům a také o degradaci zásobních glykoproteinů. Z listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) byla precipitací síranem amonným, gelovou chromatografií na koloně Sephacrylu S-300 a afinitní chromatografií na koloně Con A-Sepharosy připravena β -N-acetylhexosaminidasa o specifické aktivitě $190 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ pro substrát p-NP-GlcNAc. Byla stanovena Michaelisova konstanta a maximální rychlost reakce β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc ($K_m = 0,33 \text{ mM}$ a $V_{\max} = 414 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Pomocí kapilární elektroforézy bylo studováno štěpení diacetylchitobiosy β -N-acetylhexosaminidasou. Stanovená aktivita β -N-acetylhexosaminidasy pro diacetylchitobiosu byla více než jedenáctkrát nižší než v případě aktivity β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc. Z těchto výsledků lze usoudit, že chitobiosa, a pravděpodobně ani další chitooligomery, nejsou přirozeným substrátem β -N-acetylhexosaminidasy a tedy neslouží primárně k ochraně před houbovými patogeny. Přirozeným substrátem by mohly být spíše oligosacharidové řetězce glykoproteinů.

Klíčová slova:

β -N-acetylhexosaminidasa, tabák, kapilární elektroforéza, diacetylchitobiosa

ABSTRACT

β -N-acetylhexosaminidases are ubiquitous in all living organisms, but there is little information about these enzymes in plants, especially in leaves. Suggested functions of plant β -N-acetylhexosaminidases are participation in defence responses against fungal and other pathogens and also in degradation of storage glycoproteins. β -N-acetylhexosaminidase from tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.) was purified to final specific activity $190 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ with p-NP-GlcNAc as substrate. Precipitation by ammonium sulphate, gel filtration chromatography on Sephacryl S-300 column and affinity chromatography on Con A-Sepharose column were used. Michaelis constant and maximal reaction rate of β -N-acetylhexosaminidases determined for p-NP-GlcNAc was 0.33 mM and $414 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectively. The cleavage of diacetylchitobiose catalyzed by β -N-acetylhexosaminidase was studied using capillary electrophoresis. Determined activity of β -N-acetylhexosaminidase for diacetylchitobiose was more than 10-times lower compared to β -N-acetylhexosaminidase activity for p-NP-GlcNAc. These results indicate that chitobiose and probably other chito oligomers are not natural substrates of β -N-acetylhexosaminidase and thus this enzyme is most likely not involved in protection against fungal pathogens. Natural substrate would rather be saccharides chains of glycoproteins.

(In Czech)

Keywords:

β -N-acetylhexosaminidase, tobacco, capillary electrophoresis, diacetylchitobiose

OBSAH

1. Úvod.....	1
1.1. Nomenklatura chitinolytických enzymů	1
1.2. Stanovení enzymové aktivity	3
1.3. Funkce β -N-acetylhexosaminidas	4
1.4. Struktura a relativní molekulová hmotnost rostlinných β -N-acetylhexosaminidas	6
1.5. Substrátová specifita a kinetické vlastnosti rostlinných β -N-acetylhexosaminidas....	8
1.6. Kapilární elektroforéza.....	10
2. Cíl práce.....	12
3. Materiál a metody	13
3.1. Přístroje a pomůcky.....	13
3.2. Analytický software	13
3.4. Chemikálie a pufrý	14
3.5. Metody a pracovní postupy	15
3.5.1. Separace β -N-acetylhexosaminidasý z rostlin tabáku	15
3.5.1.1. Extrakce	15
3.5.1.2. Precipitace síranem amonným	15
3.5.1.3. Dialýza	15
3.5.1.4. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300	16
3.5.1.5. Afinitní chromatografie na koloně Con A-Sepharosý	16
3.5.1.6. Stanovení koncentrace bílkovin metodou dle Bradfordové.....	16
3.5.2. Štěpení substrátu p-NP-GlcNAc β -N-acetylhexosaminidasou.....	18
3.5.2.1. Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasý pro p-NP-GlcNAc.....	18
3.5.2.2. Závislost absorbance při 405 nm na množství p-NP	18
3.5.2.3. Časový průběh enzymové reakce pro substrát p-NP-GlcNAc.....	19

3.5.2.4. Stanovení kinetických parametrů β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc.....	20
3.5.3. Štěpení substrátu diacetylchitobiosy β -N-acetylhexosaminidasou	21
3.5.3.1. Časový průběh enzymové reakce pro substrát diacetylchitobiosu	21
3.5.3.2. Závislost signálu detektoru kapilární elektroforézy na koncentraci diacetylchitobiosy a GlcNAc	21
4. Výsledky	22
4.1. Separace β -N-acetylhexosaminidasy z listů tabáku (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	22
4.1.1. Extrakce, precipitace síranem amonným a dialýza	22
4.1.2. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300	22
4.1.3. Afinitní chromatografie na koloně Con A-Sepharosy.....	23
4.2. Štěpení substrátu p-NP-GlcNAc β -N-acetylhexosaminidasou	25
4.2.1. Časový průběh enzymové reakce pro substrát p-NP-GlcNAc	25
4.2.2. Stanovení kinetických parametrů β -N-acetylhexosaminidasy pro p-NP-GlcNAc	26
4.3. Štěpení substrátu diacetylchitobiosy β -N-acetylhexosaminidasou	28
4.3.1. Závislost signálu detektoru kapilární elektroforézy na koncentraci diacetylchitobiosy a GlcNAc.....	28
4.3.2. Časový průběh enzymové reakce pro substrát diacetylchitobiosu	29
5. Diskuze	34
6. Závěr	36
7. Reference	37

1. ÚVOD

1.1. Nomenklatura chitinolytických enzymů

Chitin je považován za druhou nejrozšířenější látku na Zemi, po celulóse. Chitin je nevětvený homopolymer složený z molekul N-acetyl-D-glukosaminu (GlcNAc), které jsou spojené β -1,4 glykosidovou vazbou [1]. Chitin je ve velké míře produkován mořskými živočichy, hmyzem, řasami a houbami. Některé organismy, například *Absidia coerulea*, produkují chitosan, což je deacetylovaný chitin (složený z molekul D-glukosaminu spojených β -1,4 glykosidovou vazbou) [2]. Enzymy schopné štěpit chitin, popř. oligosacharidy na bázi chitinu (a jim podobné substráty), byly popsány v celé řadě organismů, včetně virů, bakterií, hub, hmyzu, rostlin a živočichů [1].

Podle doporučené nomenklatury mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie (IUBMB) se enzymy podílející se na hydrolýze chitinu dělí do dvou skupin, na chitinasy (EC 3.2.1.14) a β -N-acetylhexosaminidasy (EC 3.2.1.52) [31].

Chitinasy (EC 3.2.1.14) katalyzují hydrolýzu náhodných vazeb v řetězci chitinu a uvolňují rozpustné oligomery (GlcNAc)_n.

β -N-acetylhexosaminidasy (EC 3.2.1.52) katalyzují odštěpení N-acetyl-D-glukosaminu nebo N-acetyl-D-galaktosaminu z neredukujících konců oligosacharidů, polysacharidů a cukerných složek glykoproteinů a glykolipidů [1, 3]. K dnešní skupině β -N-acetylhexosaminidas (EC 3.2.1.52) byla v roce 1992 připojena skupina β -N-acetylglukosaminidas (EC 3.2.1.30), se kterou se předtím v roce 1972 sloučila i skupina EC 3.2.1.29. Tímto se chitinolytické enzymy odlišují od enzymů štěpících celulosu, u kterých k podobnému sloučení nedošlo a enzymy odštěpující dimer a monomer si zachovávají samostatné označení [4, 31].

Toto doporučení IUBMB ale není většinou dodržováno, neboť nezahrnuje všechny známé chitinolytické enzymy. Byla proto popsána nová klasifikace chitinolytických enzymů. V této klasifikaci se v souvislosti s chitinolytickými enzymy používá označení chitinasy. Za chitinasu je pak považován každý enzym, který je schopen katalyzovat hydrolytické štěpení chitinu a chito oligomerů. Chitinasy se poté dělí na endochitinasy (EC 3.2.1.14) a exochitinasy. Exochitinasy se dále dělí na dvě podskupiny, chitobiosidas (EC 3.2.1.29) a β -N-acetylglukosaminidasy (EC 3.2.1.30) [1, 5, 8].

Endochitinasy (3.2.1.14) katalyzují hydrolýzu náhodných vazeb v řetězci chitinu a uvolňují rozpustné oligomery (GlcNAc)_n.

Chitobiosidasy (EC 3.2.1.29) katalyzují odštěpení diacetylchitobiosy z neredukujícího konce chitinového řetězce. Produktem hydrolýzy je výhradně diacetylchitobiosa (GlcNAc)₂. Enzym nekatalyzuje odštěpení ani monomerů ani delších oligomerů.

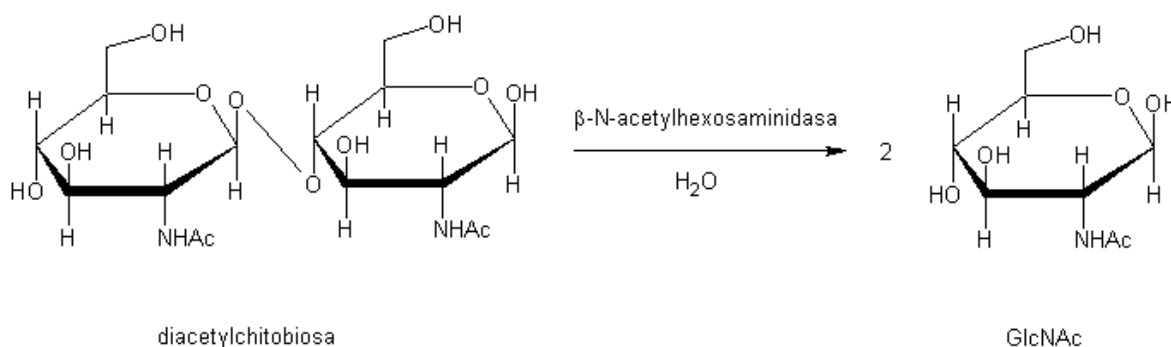
β-N-acetylglukosaminidasy (EC 3.2.1.30) katalyzují hydrolytické odštěpení monomeru GlcNAc od neredukujícího konce oligomerů (a případně polymerů) N-acetyl-D-glukosaminu. Jelikož byla u těchto enzymů zjištěna široká substrátová specifita, je dnes preferováno označení β-N-acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) [1, 6].

Někteří autoři ani tuto klasifikaci nepovažují za dostačující, neboť ne všechny endochitinasy jsou schopné štěpit chitin jako takový, některé hydrolyzují toliko rozpustné chitinové oligomery (GlcNAc)_n až krátké polymery. Pro tyto enzymy bylo navrženo označení chitodextrinasy [7].

Další nejednoznačnosti se vyskytují v souvislosti se sloučením β-N-acetylglukosaminidas (EC 3.2.1.30) do jedné skupiny s β-N-acetylhexosaminidasami (EC 3.2.1.52), neboť ne všechny enzymy v této sloučené skupině mají stejné vlastnosti. Ve většině popsaných případů β-N-acetylhexosaminidasy nejsou schopny rozlišit mezi přirozenými substráty, jako je například diacetylchitobiosa, a syntetickými substráty, jako je například p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glukosaminid nebo p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-galaktosaminid. Ve většině případů také tyto enzymy štěpí umělé substráty mnohem efektivněji než substráty přirozené [4]. V některých případech jsou ale popsané enzymy schopné katalyzovat hydrolýzu přirozených substrátů efektivněji, než v případě substrátů umělých [14, 17]. Dále některé enzymy vykazují žádnou nebo minimální aktivitu při hydrolýze p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-galaktosaminidu. Existují také rozdíly v aktivitě enzymů v závislosti na délce substrátu, kdy některé β-N-acetylhexosaminidasy vykazují zvyšující se aktivitu s rostoucí délkou substrátu, u jiných je tomu opačně [4, 17, 19].

V této práci budu za β-N-acetylhexosaminidasu (N-acetyl-β,D-hexosaminid-N-acetylhexosamino hydrolasa; EC 3.2.1.52) považovat každý enzym, který je schopen katalyzovat hydrolytické odštěpení N-acetyl-D-glukosaminu nebo N-acetyl-D-galaktosaminu z neredukujících konců oligosacharidů, polysacharidů a cukerných složek glykoproteinů a glykolipidů, či umělých substrátů na bázi chitinu. V souvislosti s ostatními enzymy podílejícími se na degradaci chitinu budu používat termínu chitinasy.

β -N-acetylhexosaminidasy byly popsány v různých organismech, včetně virů, bakterií, hub, rostlin a živočichů. Mohou se vyskytovat ve formě izoenzymů, aktivita se může lišit v závislosti na stáří organismu nebo na studované části organismu. Mohou se lišit ve struktuře, molekulové hmotnosti, afinitě k substrátům, preferovanými substráty, pH a teplotními optima i dalšími vlastnostmi. Příkladem reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou je hydrolýza diacetylchitobiosy (obrázek 1, str. 3) [1, 3, 4].



Obrázek 1: Hydrolýza diacetylchitobiosy β -N-acetylhexosaminidasou.

1.2. Stanovení enzymové aktivity

Ke stanovení enzymové aktivity β -N-acetylhexosaminidasy se využívají syntetické chromogenní substráty, jako je například p-nitrofenyl- β -N-acetyl-D-glukosaminid (p-NP-GlcNAc) nebo p-nitrofenyl- β -N-acetyl-D-galaktosaminid. Hydrolýzou těchto substrátů vzniká N-acetyl-D-glukosamin (obrázek 2, str. 4), resp. N-acetyl-D-galaktosamin, a p-nitrofenol. p-nitrofenol je slabá organická kyselina, jejíž anion má výrazné absorpční maximum při vlnové délce 405 nm, čehož lze využít k spektrofotometrickému stanovení aktivity v zásaditém prostředí [1, 8, 9]. Stejnou metodou (při použití vhodných p-NP značených substrátů, např. p-NP-(GlcNAc)₂ a p-NP-(GlcNAc)₃), popřípadě metodou měření turbidity, je možné stanovit aktivity endochitinas a chitobiosidas [1, 8].

β -N-acetylhexosaminidasa hraje důležitou úlohu v houbách. Buněčná stěna hub obsahuje chitin, a proto by buněčné dělení, růst a morfogeneze bez enzymu, který by chitin dokázal hydrolyzovat, nebyl možný. V případě některých hub byl zjištěn výskyt několika izoenzymů. Dnes se zastává názor, že část z nich je určena k exkreci a má výživovou funkci. Některé houby jsou tímto způsobem schopny napadat druhé [10].

Bakteriální β -N-acetylhexosaminidasy mají funkci výživovou. Bakterie obecně produkují několik izoenzymů. Jednotlivé izoenzymy postupně štěpí chitin na menší a rozpustnější oligomery, které jsou pak β -N-acetylhexosaminidasou hydrolyzovány až na konečný GlcNAc. V případě bakterie *Vibrio furnissii* je pak GlcNAc zpracován na fruktosa-6-fosfát a začleněn do metabolismu sacharidů [7].

Mezi živočišnými β -N-acetylhexosaminidasami je nejvíce prozkoumána lidská. Vyskytuje se ve formě tří izoenzymů, označovaných A, B a S. β -N-acetylhexosaminidasa A je heterodimer složený z podjednotek α a β . Forma B je homodimer složený z podjednotek β . Forma S je homodimer složený z podjednotek α . β -N-acetylhexosaminidasa S je ze všech tří forem nejméně stabilní a má také nejnižší aktivitu. Mutace genetického kódu podjednotek lidské β -N-acetylhexosaminidasy vede ke vzniku vrozených neurodegenerativních chorob, jako jsou Tay-Sachsova choroba a Sandhoffova choroba. Tay-Sachsova choroba je způsobena mutacemi v genu kódujícím α podjednotku, má vážný průběh začínající již zhruba v jednom roku po narození a obvykle do tří let způsobuje smrt [11, 25].

Rostlinné β -N-acetylhexosaminidasy patří k nejméně prozkoumaným a popsáným vůbec. Předpokládá se, že jejich funkce je primárně obranná. Virová infekce způsobuje zvýšení aktivity β -N-acetylhexosaminidas v rostlinách tabáku [24]. Existují mnohé pokusy o vyšlechtění rostlin s vyšší resistencí proti houbovým patogenům [12]. Některé studie také naznačují, že rostlinné chitinasy se podílejí na odpovědi rostlin na stres vyvolaný zvýšenou koncentrací těžkých kovů [13]. Studovány byly β -N-acetylhexosaminidasy například z rostlin pískavice řecké seno (*Trigonella foenum graecum*) [14], jabloně domácí (*Malus domestica*) [15], kanaválie (*Canavalia ensiformis*) [16], kukuřice seté (*Zea mays*) [17], rýže seté (*Oryza sativa* L.) [18], pšenice obecné (*Triticum aestivum* L.) [19], hrachu setého (*Pisum sativum* L.) [20], fazole mungo (*Vigna radiata*) [21], papriky roční (*Capsicum annuum*) [22]. Také byly připraveny tři rekombinantní β -N-acetylhexosaminidasy huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), první rostliny, jejíž genom byl sekvenován (v roce 2000) [23].

1.4. Struktura a relativní molekulová hmotnost rostlinných β -N-acetylhexosaminidas

Vlastnosti β -N-acetylhexosaminidas izolovaných z různých zdrojů se můžou výrazně lišit, a to molekulovou hmotností, strukturou, afinitou k substrátům, pH a teplotním optimem i dalšími vlastnostmi.

β -N-acetylhexosaminidasy hub a živočichů mají relativní molekulovou hmotnost okolo 65 000 a převážně se vyskytují jako dimery. Naproti tomu u rostlinných β -N-acetylhexosaminidas byla zjištěna značná nejednotnost jak relativní molekulové hmotnosti, tak kvartérní struktury. Relativní molekulová hmotnost se ohybuje v rozmezí od 24 000 pro nejmenší podjednotku β -N-acetylhexosaminidasy izolovanou z rostliny pískavice řecké seno (*Trigonella foenum graecum*) [14] až po 236 000 pro nativní formu β -N-acetylhexosaminidasy z jabloně (*Malus domestica*), složené z 8 identických podjednotek o relativní molekulové hmotnosti 29 000 [15].

β -N-acetylhexosaminidasa ve formě monomeru byla izolovaná ze semen kanaválie (*Canavalia ensiformis*; relativní molekulová hmotnost 100 000) [16] a semen kukuřice (*Zea mays*; relativní molekulová hmotnost 70 000) [17].

Dále byla u některých rostlin zjištěna přítomnost několika izoenzymů. V semenech rýže (*Oryza sativa* L.) bylo zjištěno 7 různých izoenzymů. Z nich byla šestá forma (s nejvyšší aktivitou) dále purifikována, relativní molekulová hmotnost byla stanovena na 52 000 použitím gelové elektroforézy a 37 400 s použitím gelové chromatografie [18].

Z listů pšenice (*Triticum aestivum* L.) byly izolovány dva izoenzymy (A a B) se srovnatelnou relativní molekulovou hmotností 167 000 [19].

Ze semen hrachu (*Pisum sativum* L.) byly izolovány čtyři různé izoenzymy, každý o relativní molekulové hmotnosti 210 000 [20].

Ze semen fazole mungo (*Vigna radiata*) byly izolovány tři izoenzymy (I, II, III). Forma I je homodimer složený ze dvou podjednotek o relativní molekulové hmotnosti 67 000, forma II je heterodimer složený z podjednotek o relativních molekulových hmotnostech 48 000 a 60 000 a forma III je homodimer složený ze dvou podjednotek o relativní molekulové hmotnosti 48 000 [21].

V plodech papriky (*Capsicum annuum*) byly nalezeny tři různé izoenzymy, označené I, II a III. Relativní molekulová hmotnost 85 000 byla stanovena pro formu II, která se vyskytuje jako monomer [22].

Dále byly připraveny tři rekombinantní izoformy β -N-acetylhexosaminidasy z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) o relativních molekulových hmotnostech 61 200, 65 000 a 60 000 [23].

Uvedené hodnoty shrnuje tabulka 1 (str. 7).

Tabulka 1: Relativní molekulová hmotnost a struktura β -N-acetylhexosaminidasy ve vybraných rostlinách.

rostlina	zdroj	latinský název	počet izoformem	$\frac{M_R}{1000}$	struktura	$\frac{M_R}{1000}$ podjednotek	ref.
Pískavice řecké seno	semena	<i>Trigonella foenum graecum</i>	4	84-150	polymer	24-30,5	14
Jabloň domácí	plod	<i>Malus domestica</i>	1	236	oktamer	29	15
Kanaválie	semena	<i>Canavalia ensiformis</i>	1	100	monomer	100	16
Kukuřice setá	sazenice	<i>Zea mays</i>	3	70	monomer	70	17
Rýže setá	semena	<i>Oryza sativa</i> L.	7	52	/	/	18
Pšenice obecná	listy	<i>Triticum aestivum</i> L.	5	167	/	/	19
Hrách setý	semena	<i>Pisum sativum</i> L.	4	210	/	62-64	20
Mungo fazole	semena	<i>Vigna radiata</i>	3	110-135	dimer	48-67	21
Paprika roční	plod	<i>Capsicum annuum</i>	3	85	monomer	85	22
Huseniček rolní	-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3	60-65	monomer	60-65	23

Pozn.: vlastnosti označené symbolem "/" nejsou dostupné. Pokud je uveden rozptyl hodnot, pak zobrazuje vlastnosti jednotlivých izoformem.

1.5. Substrátová specifita a kinetické vlastnosti rostlinných β -N-acetylhexosaminidas

Ke sledování aktivit rostlinných β -N-acetylhexosaminidas se využívají syntetické chromogenní substráty. U některých rostlinných β -N-acetylhexosaminidas byla dále prokázána schopnost hydrolyzovat chitin a chitooligomery $(\text{GlcNAc})_n$.

Ve všech sledovaných rostlinách byla prokázána schopnost β -N-acetylhexosaminidas hydrolyzovat umělý substrát p-NP-GlcNAc. Michaelisova konstanta pro substrát p-NP-GlcNAc má u většiny rostlinných β -N-acetylhexosaminidas hodnotu zpravidla $K_m = 0,4-2,0$ mM. Výjimkou je například izoforma I z rostliny pískavice řecké seno (*Trigonella foenum graecum*), u které je hodnota $K_m = 0,04$ mM.

β -N-acetylhexosaminidasa I z rostliny pískavice řecké seno (*Trigonella foenum graecum*) vykazuje vyšší aktivitu pro substrát diacetylchitobiosu než k umělým substrátům p-NP-GlcNAc a p-methylumbelliferyl-GlcNAc. Ostatních tři izoformy mají aktivitu vůči diacetylchitobiose řádově nižší [14].

β -N-acetylhexosaminidasa izolovaná ze semen kanaválie (*Canavalia ensiformis*) byla schopná hydrolyzovat jak umělé substráty (p-NP-GlcNAc, methyl-GlcNAc, ethyl-GlcNAc atd.), tak diacetylchitobiosu [16].

Jedna ze tří izoform β -N-acetylhexosaminidas z kukuřice seté (*Zea mays*) vykazuje až 15x vyšší aktivitu pro substrát diacetylchitobiosu, než pro substrát p-NP-GlcNAc. Je také schopna hydrolyzovat oligomery $(\text{GlcNAc})_n$ a chitin, ale její aktivita s rostoucí délkou substrátu klesá. Zbylé dvě izoformy aktivitu pro substrát diacetylchitobiosu nevykazovaly [17].

β -N-acetylhexosaminidasa z rýže seté (*Oryza sativa* L.) nebyla schopná hydrolyzovat chitin [18].

Směs dvou izoform β -N-acetylhexosaminidas z pšenice obecné (*Triticum aestivum* L.) vykazovala aktivitu pro p-NP-GlcNAc i chitooligomery. Snadněji hydrolyzovala p-NP-GlcNAc, na rozdíl od β -N-acetylhexosaminidas z kukuřice seté. Schopnost hydrolyzovat chitooligomery rostla s délkou řetězce (nejdelší zkoumaný substrát byl $(\text{GlcNAc})_5$), což je další odlišnost od β -N-acetylhexosaminidas z kukuřice seté [19].

V případě β -N-acetylhexosaminidasy z fazole mungo (*Vigna radiata*) nebyla studována schopnost hydrolyzovat diacetylchitobiosu, ale byly u ní zjištěno, že aktivita vůči p-NP-GlcNAc je přítomností diacetylchitobiosy inhibována [21].

Izoforma β -N-acetylhexosaminidasy HEXO2 z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) je schopná hydrolyzovat (GlcNAc)₃ [23].

Uvedené hodnoty shrnuje tabulka 2 (str. 9).

Tabulka 2: Substrátová specifita a kinetické vlastnosti β -N-acetylhexosaminidasy (pro substrát p-NP-GlcNAc) ve vybraných rostlinách.

rostlina	zdroj	latinský název	substrát		p-NP-GlcNAc		ref.
			p-NP-GlcNAc	chitin a (GlcNAc) _n	K _m [mM]	V _{max}	
Pískavice řecké seno	semena	<i>Trigonella foenum graecum</i>	+	(GlcNAc) ₂ +	0,04-0,62	0,14-19,4 μmol/min	14
Jabloň domácí	plod	<i>Malus domestica</i>	+	/	0,23	0,008 μmol/min	15
Kanaválie	semena	<i>Canavalia ensiformis</i>	+	(GlcNAc) ₂ +	0,64	137,2 μmol/min/mg	16
Kukuřice setá	sazenice	<i>Zea mays</i>	+	(GlcNAc) _n + chitin +	0,168	/	17
Rýže setá	semena	<i>Oryza sativa</i> L.	+	chitin -	1,65	0,08 μmol/min	18
Pšenice obecná	listy	<i>Triticum aestivum</i> L.	+	(GlcNAc) _n +	2,0	2,58 μmol/min/ml	19
Hrách setý	semena	<i>Pisum sativum</i> L.	+	/	0,49-0,76	/	20
Mungo fazole	semena	<i>Vigna radiata</i>	+	/	0,67-1,76	/	21
Paprika roční	plod	<i>Capsicum annuum</i>	+	/	/	/	22
Huseníček rolní	-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	(GlcNAc) ₃ +	0,7-2,2	7,9-151 μmol/min/mg	23

Pozn.: vlastnosti označené symbolem "/" nejsou dostupné. β -N-acetylhexosaminidasa hydrolyzuje substráty označené symbolem "+", substráty označené "-" nehydrolyzuje. Pokud je uveden rozptyl hodnot, pak zobrazuje vlastnosti jednotlivých izoforem.

1.6. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza patří mezi elektromigrační analytické metody. Elektroforetické metody jsou obecně založeny na rozdílné pohyblivosti látek v stejnosměrném elektrickém poli. Každá nabitá částice je charakterizovaná svojí elektroforetickou pohyblivostí, která udává její rychlost pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě. Elektroforetická pohyblivost je kromě náboje a intenzity elektrického pole ovlivňována také velikostí a tvarem molekuly, a dále viskozitou prostředí. Během analýzy se tedy nejrychleji pohybují nejvíce nabitě částice, které mají v daném prostředí nejnižší odpor.

Čím je analyzovaný roztok koncentrovanější, tím více dochází k uplatnění dvou dalších jevů ovlivňujících elektroforetickou pohyblivost. Elektroforetický efekt je způsoben tím, že každá nabitá částice kolem sebe vytváří solvatační obal. Jak dochází vlivem působení elektrického pole k migraci nabitých částic, putují s nimi i jejich solvatační obaly a vzniká hydrodynamický tok. Druhým jevem je asymetrický efekt. Za normálních okolností se nabitá částice nachází ve středu svého solvatačního obalu. Vlivem elektrického pole se nabitá částice pohybuje, ale solvatační obal, který se pohybuje až následkem pohybu nabitě částice, tuto změnu nestíhá. Takto vzniká „prázdný solvatační obal“ s opačným nábojem než nese nabitá částice, která je tímto přitahována zpět do středu solvatačního obalu. Proto dochází k efektivnímu brzdění pohybu.

Kapilární elektroforéze je vysoce citlivá analytická metoda, která je mírou reprodukovatelnosti srovnatelná s HPLC. Kapilára pro kapilární elektroforézu je zhotovena z taveného křemene, který se v prostředí neutrálních a zásaditých pufrů deprotonizuje. Tímto vzniká na povrchu kapiláry záporný náboj, přičemž pufr získává naopak kladný náboj. Pufr se pak pohybuje směrem k záporně nabitě elektrodě, a vznikající elektroosmotický tok je natolik silný, že s sebou nese i neutrální a záporně nabitě částice. Rychlost migrace částic pak roste s rostoucím nábojem. Při tomto uspořádání nelze dostatečně separovat některé neutrální částice. Proto byla vyvinuta metoda, při které se k pufru přidávají látky vázající se na neutrální částice, které tímto získávají náboj a jsou snadněji separované.

Kapilára má obvykle vnitřní průměr v rozmezí 25-100 μm . Délka kapiláry se pohybuje v rozmezí 25-100 cm. Před vyústěním kapiláry se nachází detektor, který takto zkracuje délku, na které dochází k efektivní separaci částic. Pokud je kapilára dlouhá

celkem 65 cm a detektor se nachází 8,5 cm před vyústěním kapiláry, pak k efektivní separaci dochází pouze na 56,5 cm. Detekce obvykle probíhá měřením absorpance v ultrafialové oblasti. Další možností jsou fluorescenční detektory a elektrochemické detektory. Při analýze dochází vlivem rozdílných migračních časů k oddělení jednotlivých látek a ty pak poskytují signál úměrný koncentraci. Výšky píků a plochy pod píky jsou pak kvantitativním ukazatelem množství látky v analyzované směsi. Jelikož se při měření dávkuje řádově nanolitry analyzovaného roztoku, lze pomocí této metody provést mnoho měření s relativně malým množstvím vzorku. Používané napětí se pohybuje v řádu desítek kV.

Kapilární elektroforéza je běžně využívanou metodou k analýze v biologii i biochemii. Využívá se k analýze proteinů, nukleových kyselin i jiných biopolymerů a analýze iontů v biologických roztocích [26].

V posledních letech se objevují práce dokumentující vysokou přesnost a časovou nenáročnost stanovení enzymové aktivity pomocí kapilární elektroforézy. Touto metodou byla stanovena aktivita methionin sulfoxid reduktasy A a B srovnatelná s hodnotou, jakou poskytla HPLC [27]. Kapilární elektroforéza byla dále využita ke stanovení aktivity thiopurin S-methyltransferasy v erytrocytech [28] a dále ke stanovení aktivity β -glukosidasy, kdy bylo pomocí laserem indukované fluorescence dosaženo řádově vyšší citlivosti, než při běžném stanovení s p-NP značenými substráty [29].

2. CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda je chitobiosa substrátem β -N-acetylhexosaminidasy z rostlin tabáku. Práce probíhala v následujících krocích:

1. Separace β -N-acetylhexosaminidasy z listů rostlin tabáku.
2. Stanovení aktivity a kinetických parametrů β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc.
3. Separace diacetylchitobiosy a GlcNAc pomocí kapilární elektroforézy. Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát diacetylchitobiosu pomocí kapilární elektroforézy.
4. Porovnání aktivit β -N-acetylhexosaminidasy pro substráty p-NP-GlcNAc a diacetylchitobiosu.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy 100A – Denver Instrument Company, USA

Centrifuga Universal 32R – Hettich Zentrifugen, Německo

Termostat se suchou lázní EL-01 – Major Science, USA

Magnetická míchačka s ohřívačem RH basic – Labortechnik, Německo

pH/mV metr UB-10 – Denver Instrument Company, USA

Spektrofotometr Ultrospec 2100 Pro – Biochrom, Velká Británie

Peristaltická pumpa P-1 – Pharmacia Fine Chemicals, Švédsko

Sběrač frakcí FCC 60 – VD OPUS, ČR

Mixér Easy Power Y 45 – Moulinex, Španělsko

Přístroj pro kapilární elektroforézu ^{3D}CE – Agilent Technologies, Německo

3.2. Analytický software

Analytický software pro vyhodnocení kapilární elektroforézy 3D CE ChemStation - Agilent Technologies, Německo

3.3. Rostlinný materiál

Pro studium β -N-acetylhexosaminidasy jsem použil rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Petit Havana* SR1) laskavě poskytnuté Dr. Helenou Synkovou, CSc, Ústav experimentální botaniky, AV ČR. Rostliny byly 11. 12. 2009 vysazeny na živné médium a dne 18. 1. 2010 byly přesazeny do skleníku. Listy byly sklizeny 2. 3. 2010, zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C. K separaci a studiu β -N-acetylhexosaminidasy jsem použil střední listy rostlin, ze kterých byl odstraněn řapík.

3.4. Chemikálie a pufrý

Chemikálie:

Polyvinylpolypyrrolidon – Sigma, USA
p-nitrofenyl- β -N-acetyl-D-glukosaminid – Sigma, USA
Chlorid hořečnatý - Sigma, USA
Chlorid vápenatý - PENTA, ČR
Chlorid manganatý - Sigma, USA
Bradfordovo činidlo - Sigma, USA
Síran amonný - PENTA, ČR
Sephacryl S-300 - Pharmacia Fine Chemicals, Švédsko
Methyl- α -D-glukopyranosid - Sigma, USA
Kyselina chlorovodíková - Lach-Ner, ČR
Diacetylchitobiosa - Sigma, USA
N-acetyl-D-glukosamin - Sigma, USA
Con A-Sepharosa 4B - Pharmacia Fine Chemicals, Švédsko

Pufrý:

25 mM borátový pufr pH 9,2
0,1 M borátový pufr pH 9,0
0,1 M citrátový pufr pH 6,0
0,2 M citrátový pufr pH 4,5
0,1 M Tris-HCl pufr pH 7,0

3.5. Metody a pracovní postupy

3.5.1. Separace β -N-acetylhexosaminidasy z rostlin tabáku

3.5.1.1. Extrakce

K separaci β -N-acetylhexosaminidasy jsem použil 30 g listů tabáku. Listy jsem homogenizoval v mixéru s 200 ml 0,1 M citrátového pufru pH 6,0 a vzniklou suspenzi jsem přefiltroval přes čtyři vrstvy gázy. K filtrátu jsem poté přidal 0,2 g PVP a centrifugoval jsem jej 30 minut při 4 °C a 9400 x g. K dalším krokům separace β -N-acetylhexosaminidasy jsem použil supernatant.

3.5.1.2. Precipitace síranem amonným

Proteiny obsažené v supernatantu jsem srážel síranem amonným ve dvou krocích. První srážení jsem provedl v rozmezí 0-20%. K 210 ml supernatantu z předchozího kroku jsem pomalu, aby nedošlo k lokálnímu přesycení, přidával celkem 24 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Roztok jsem poté centrifugoval 30 minut při 4 °C a 9400 x g. Supernatant jsem poté srážel v rozmezí 20-75%. K 216 ml supernatantu jsem pomalu přidával celkem 82,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Roztok jsem poté centrifugoval 30 minut při 4 °C a 9400 x g. Sediment jsem resuspendoval v 0,1 M citrátovém pufru pH 6,0 a převedl do dialyzačního střívka. Celkem jsem dialyzoval 6 ml suspenze.

3.5.1.3. Dialýza

6 ml suspenze získané po precipitaci síranem amonným jsem za stálého míchání na magnetické míchačce dialyzoval při 4 °C přes noc v 1 litru 0,1 M citrátového pufru pH 6,0. Došlo k vysrážení směsi, a proto jsem obsah dialyzačního střívka resuspendoval. Takto jsem získal celkem 8 ml suspenze, kterou jsem uchoval v uzavřené zkumavce v lednici pro další kroky separace β -N-acetylhexosaminidasy.

3.5.1.4. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300

Připravil jsem kolonu Sephacrylu S-300 o objemu 25 ml. Kolonu jsem ekvilibroval 50 ml 0,1 M Tris-HCl pufru pH 7,0. Poté jsem na kolonu nanal 2 ml vzorku suspenze po dialýze, nechal zapustit a dále jsem kolonu promýval Tris-HCl pufrům pH 7,0. Jímal jsem frakce o objemu 2 ml. Sledoval jsem v nich množství proteinů, měřením absorbance při 280 nm proti slepému vzorku, tedy 0,1 M Tris-HCl pufru pH 7,0. Zároveň jsem měřil aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy postupem popsaným v kapitole 3.5.2.1. (str. 18), pomocí substrátu p-NP-GlcNAc. Frakce s nejvyšší aktivitou β -N-acetylhexosaminidasy jsem spojil.

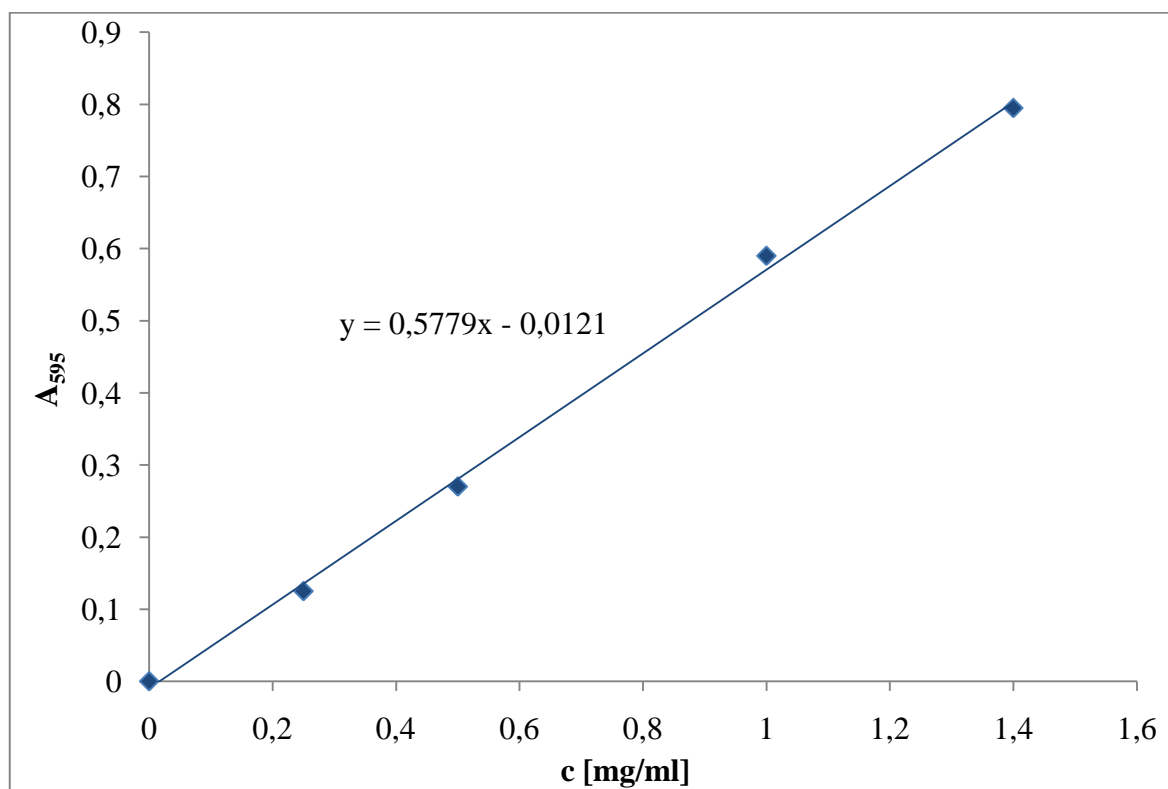
3.5.1.5. Afinitní chromatografie na koloně Con A-Sepharosy

Připravil jsem kolonu Con A-Sepharosy o objemu 10 ml. Kolonu jsem poté ekvilibroval 50 ml roztoku A (5 mM $MgCl_2$, 5 mM $MnCl_2$ a 5 mM $CaCl_2$ v Tris-HCl pufru pH 7,0). Aplikoval jsem 6 ml vzorku z gelové chromatografie na koloně Sephacrylu S-300. Eluci nezachycených proteinů jsem prováděl roztokem A. Zachycené proteiny jsem eluoval roztokem B (0,2 M methyl- α -D-glukopyranosid v Tris-HCl pufru pH 7,0). Jímal jsem frakce o objemu přibližně 2 ml. Sledoval jsem v nich množství proteinů, měřením absorbance při 280 nm. Zároveň jsem měřil aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy postupem popsaným v kapitole 3.5.2.1. (str. 18), pomocí substrátu p-NP-GlcNAc. Frakce s nejvyšší aktivitou β -N-acetylhexosaminidasy jsem spojil.

3.5.1.6. Stanovení koncentrace bílkovin metodou dle Bradfordové

V roztocích jsem stanovil obsah bílkovin metodou dle Bradfordové [30]. K 33 μ l vhodně naředěného stanovovaného roztoku jsem přidal 1 ml Bradfordova činidla. Po 10 min inkubace jsem změřil absorbanci při 595 nm proti slepému vzorku, který obsahoval 33 μ l destilované vody a 1 ml Bradfordova činidla. Koncentrace bílkovin byla odečtena z kalibrační přímky sestavené pro rozsah koncentrací 0-1,4 mg/ml. Jako standard byl použit BSA. Kalibrační přímka je zobrazena na obrázku 4 (str. 17).

Tato metoda je spolehlivá i v prostředí různých neproteinových složek, ale konkrétně Tris ovlivňuje přesnost měření. Tato interference se ale pohybuje pouze v řádu μg (2 M roztok Trisu poskytuje odpověď ekvivalentní s 2,34 $\mu\text{g/ml}$ BSA), proto jsem se jí vzhledem ke koncentraci Trisu v elučním roztoku (0,1 M Tris) a relativně vysokým koncentracím proteinů mohl zanedbat [30].



Obrázek 4: Kalibrační přímka závislosti absorbance při 595 nm na koncentraci bílkovin, ke stanovení metodou dle Bradfordové. Jako standard byl použit BSA.

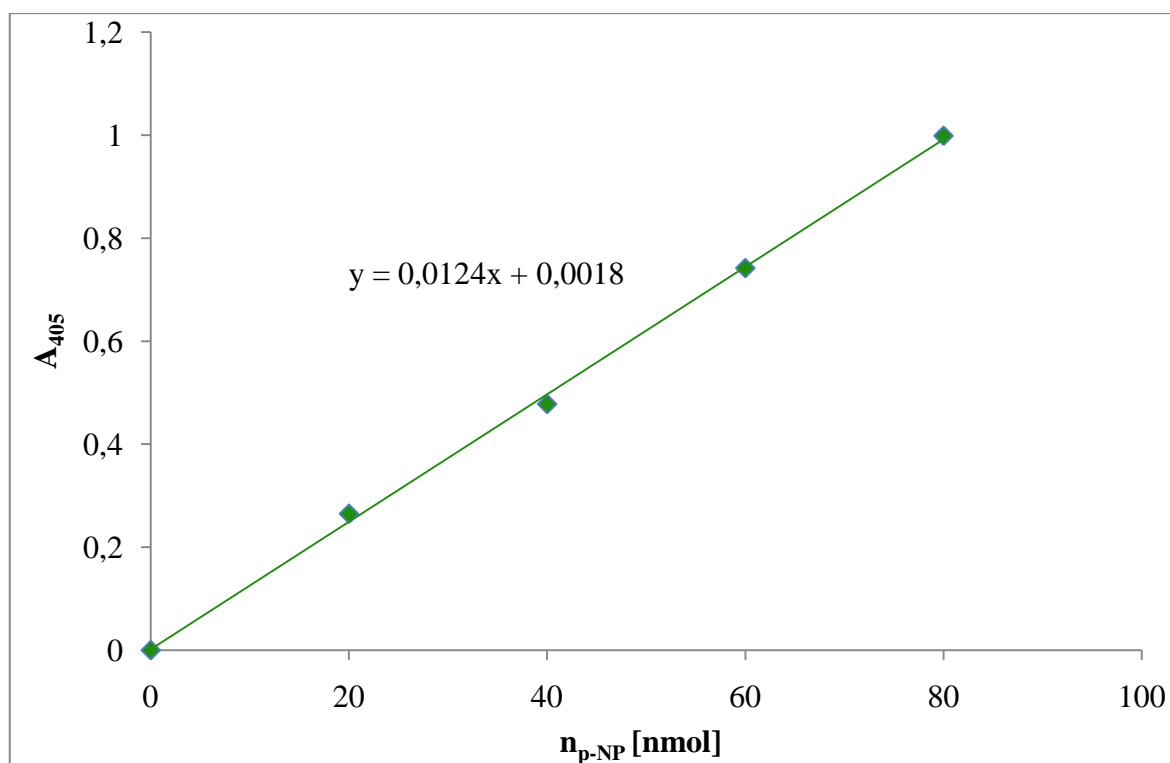
3.5.2. Štěpení substrátu p-NP-GlcNAc β -N-acetylhexosaminidasou

3.5.2.1. Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy pro p-NP-GlcNAc

K měření enzymové aktivity jsem využil substrát p-NP-GlcNAc. Aktivitu jsem stanovoval při optimálním pH 4,5 v prostředí 0,2 M citrátového pufru [24] a teplotě 25 °C. Reakční směs obsahovala 100 μ l 0,2 M citrátového pufru pH 4,5; 50 μ l 0,2 mM roztoku p-NP-GlcNAc a 50 μ l roztoku enzymu. Inkubace probíhala po dobu 10 min. K zastavení reakce a obarvení reakční směsi jsem po ukončení inkubace přidal 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0 [24]. Množství uvolněného p-NP jsem stanovil spektrofotometricky, měřením absorbance při 405 nm proti slepému pokusu, který obsahoval 100 μ l 0,2 M citrátového pufru pH 4,5; 50 μ l 0,2 mM roztoku p-NP-GlcNAc; 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0 a 50 μ l roztoku enzymu, který byl do směsi přidán jako poslední. Enzymovou aktivitu jsem vyjádřil v jednotkách nmol min⁻¹ (množství substrátu, které bylo enzymem přeměněno za 1 minutu, při 25 °C a pH 4,5). Specifická aktivita je aktivita vztažená na 1 mg proteinů.

3.5.2.2. Závislost absorbance při 405 nm na množství p-NP

Množství p-NP jsem stanovil odečtením z kalibrační přímky závislosti absorbance při 405 nm na molárním množství p-NP v prostředí 0,1 M borátového pufru pH 9,0; vypracovanou pro rozsah 0-80 nmol. Kalibrační přímka je zobrazena na obrázku 5 (str. 19).



Obrázek 5: Kalibrační přímka závislosti absorpance při 405 nm na molárním množství p-NP.

3.5.2.3. Časový průběh enzymové reakce pro substrát p-NP-GlcNAc

Sledoval jsem průběh reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou v závislosti na čase. K měření jsem využil roztok enzymu získaný po afinitní chromatografii na koloně Con A-Sepharosy (kapitola 3.5.1.5., str. 16). Připravil jsem 2,4 ml reakční směsi o složení 0,6 ml roztoku enzymu, 0,6 ml 4 mM p-NP-GlcNAc a 1,2 ml 0,2 M citrátového pufru pH 4,5. Reakční směs jsem nechal inkubovat při 25 °C. Ve vhodných časových intervalech jsem odebral vždy 200 μ l směsi, reakci jsem zastavil přidáním 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0 a změřil aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy způsobem popsáným v kapitole 3.5.2.1. (str. 18). Jako slepý vzorek jsem použil roztok připravený z 50 μ l 4 mM p-NP-GlcNAc, 100 μ l 0,2 M citrátového pufru pH 4,5; 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0 a 50 μ l roztoku enzymu, který byl do směsi přidán jako poslední. Získané hodnoty jsem proložil exponenciálou.

3.5.2.4. Stanovení kinetických parametrů β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc

Stanovil jsem Michaelisovu konstantu a maximální rychlost reakce β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc. K měření jsem použil roztok enzymu získaný po afinitní chromatografii na koloně Con A-Sepharosy (kapitola 3.5.1.5., str. 16). Měřil jsem závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Reakční směs obsahovala 100 μ l 0,2 M citrátového pufru pH 4,5; 50 μ l roztoku enzymu a 50 μ l roztoku substrátu o koncentracích v rozsahu 0-4,0 mM, takže výsledná koncentrace p-NP-GlcNAc v reakční směsi byla 0-1,0 mM. Reakční směs jsem nechal inkubovat vždy 10 minut při 25 °C. Poté jsem reakci zastavil přidáním 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0. Změřením absorbance při 405 nm jsem stanovil množství vzniklého p-NP. Slepý vzorek obsahoval 100 μ l 0,2 M citrátového pufru pH 4,5; 50 μ l příslušného roztoku substrátu; 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0 a 50 μ l roztoku enzymu. Vypočítal jsem rychlost reakce, kterou jsem vyjádřil v jednotkách $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (vztaženo na hmotnost proteinů). Stanovil jsem hodnotu Michaelisovy konstanty a maximální rychlost reakce nelineární regresi, podle rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

kde v je rychlost enzymové reakce, V_{\max} je maximální rychlost enzymové reakce, $[S]$ je koncentrace substrátu a K_m je Michaelisova konstanta. Výsledky jsem ověřil grafickou metodou dle Lineweavera a Burka.

3.5.3. Štěpení substrátu diacetylchitobiosy β -N-acetylhexosaminidasou

3.5.3.1. Časový průběh enzymové reakce pro substrát diacetylchitobiosu

Časový průběh hydrolýzy diacetylchitobiosy katalyzovaný β -N-acetylhexosaminidasou jsem stanovil pomocí kapilární elektroforézy. Použitá kapilára měla vnitřní průměr 50 μ m, celkovou délku 65 cm a efektivní délku 56,5 cm. Jako elektroforetický pufr jsem použil 25 mM borátový pufr pH 9,2. Separace probíhala při napětí 30 kV. Detekce probíhala v UV oblasti při 200, 214 a 254 nm. Pro konečné vyhodnocení jsem využil hodnot absorbance naměřených při 200 nm.

Reakce probíhala při pH 4,5 a teplotě 25 °C. Reakční směs obsahovala 8 μ l 5 mM roztoku diacetylchitobiosy, 12 μ l 0,2 M citrátového pufru pH 4,5 a 20 μ l zředěného roztoku enzymu získaného po gelové chromatografii (kapitola 3.5.1.4, str. 16). Inkubace probíhala celkem 3 hodiny, úbytek diacetylchitobiosy a množství vzniklého GlcNAc jsem vyhodnocoval vždy v půlhodinových intervalech. Reakce byla zastavena zavedením směsi do kapiláry a smísením s 25 mM borátovým pufrem pH 9,2. Měřil jsem absorbanci při 200 nm, určil jsem výšku píku a plochu pod píkem jak pro substrát (diacetylchitobiosa, migrační čas přibližně 3 min 50 s), tak pro produkt (GlcNAc, migrační čas přibližně 4 min 5 s). Integraci jsem prováděl manuálně. Pro vyhodnocení jsem získané hodnoty proložil exponenciálou. Aktivitu jsem vyjádřil v jednotkách nmol min^{-1} .

3.5.3.2. Závislost signálu detektoru kapilární elektroforézy na koncentraci diacetylchitobiosy a GlcNAc

Pomocí kapilární elektroforézy jsem určoval závislost relativní plochy pod píkem a relativní výšky píku na koncentraci diacetylchitobiosy a GlcNAc. Experimentální podmínky byly totožné jako při měření popsáném v předchozí kapitole. Připravil jsem roztok o 1 mM koncentraci obou složek, a to z 8 μ l 5 mM diacetylchitobiosy, 8 μ l 5 mM GlcNAc a 24 μ l roztoku A (destilovaná voda a 0,2 M citrátový pufr pH 4,5 v poměru 2:1). Tento původní roztok jsem proměřil a poté jej dále ředil roztokem A tak, že jsem postupně připravil roztoky o 0,1-1 mM koncentraci obou složek. Pro vyhodnocení jsem použil absorbanci naměřenou při 200 nm. Integraci jsem prováděl manuálně.

4. VÝSLEDKY

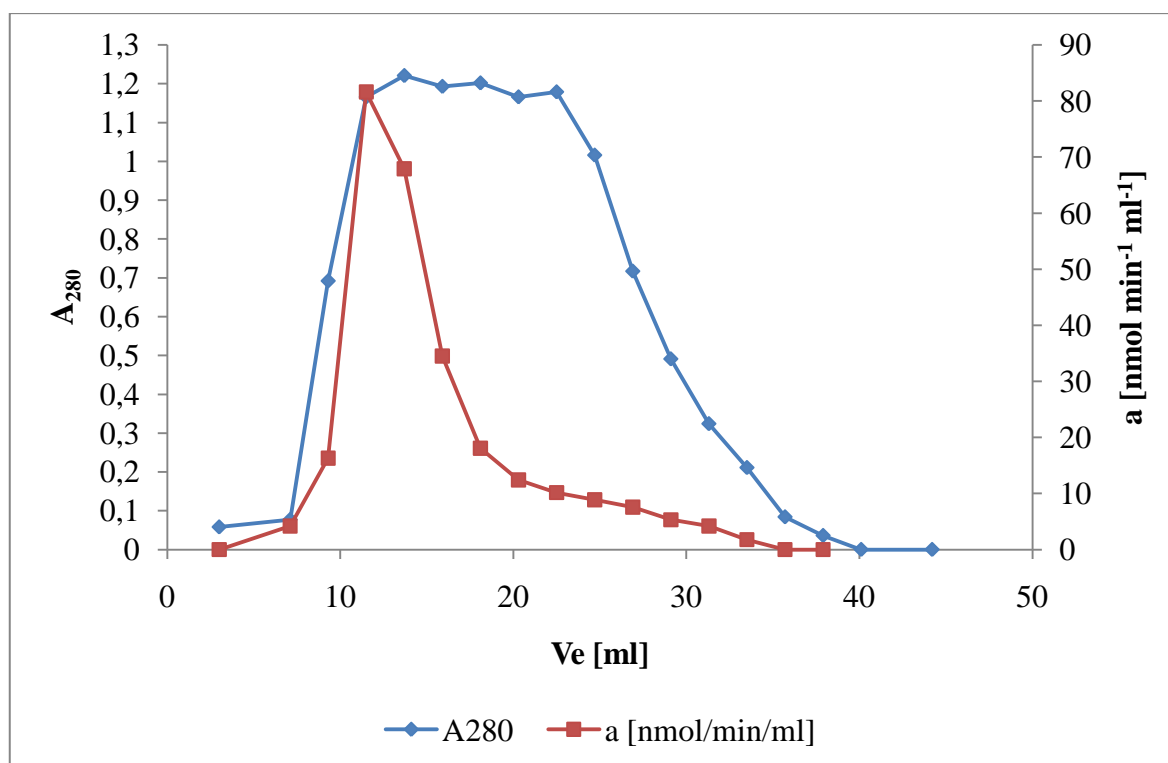
4.1. Separace β -N-acetylhexosaminidasy z listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)

4.1.1. Extrakce, precipitace síranem amonným a dialýza

Homogenizoval jsem 30 g listů tabáku v 200 ml 0,1 M citrátového pufru pH 6,0 způsobem popsáným v kapitole 3.5.1.1. (str. 15). Následovalo frakcionované srážení síranem amonným v rozmezí 20-75% (kapitola 3.5.1.2., str. 15). Enzymový preparát jsem poté dialyzoval přes noc způsobem popsáným v kapitole 3.5.1.3. (str. 15). Získal jsem 8 ml roztoku enzymu o specifické aktivitě $71,1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

4.1.2. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300

K další separaci enzymu jsem použil gelovou chromatografií na koloně Sephacrylu S-300. Postupoval jsem způsobem popsáným v kapitole 3.5.1.4. (str. 16). Na kolonu jsem nanal 2 ml roztoku enzymu získaného po dialýze a kolonu dále promýval 0,1 M Tris-HCl pufrům pH 7,0. Jímal jsem frakce o objemu přibližně 2 ml. V jednotlivých frakcích jsem stanovil obsah bílkovin měřením absorbance při 280 nm a aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy způsobem popsáným v kapitole 3.5.2.1 (str. 18). Slil jsem celkem 3 frakce s nejvyšší aktivitou β -N-acetylhexosaminidasy o celkovém objemu 6,6 ml a specifické aktivitě $150,4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Průběh gelové chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 dokumentuje obrázek 6 (str. 23).

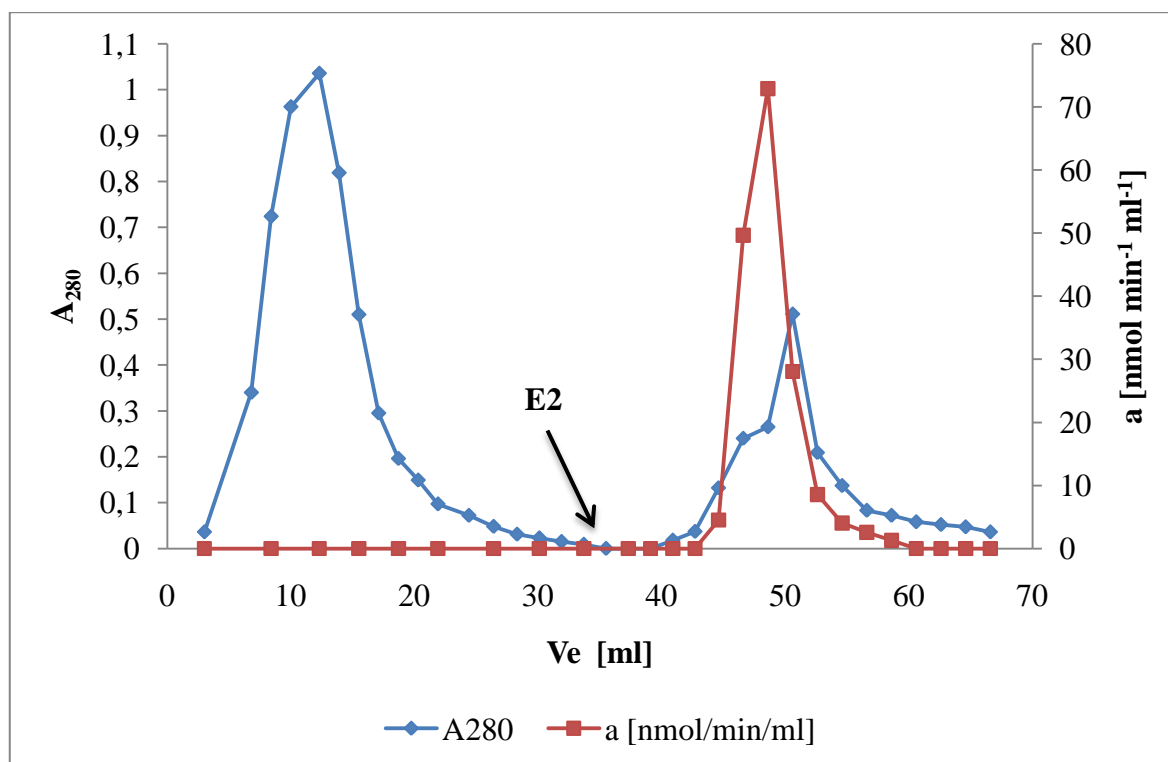


Obrázek 6: Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na koloně Sephacrylu S-300, barevně jsou zobrazeny koncentrace bílkovin (modrá barva) a aktivita β -N-acetylhexosaminidasy (červená barva).

4.1.3. Afinitní chromatografie na koloně Con A-Sepharosy

V posledním kroku separace β -N-acetylhexosaminidasy jsem provedl afinitní chromatografii na koloně Con A-Sepharosy, způsobem popsaným v kapitole 3.5.1.5. (str. 16). K separaci β -N-acetylhexosaminidasy na této koloně jsem použil 6 ml roztoku β -N-acetylhexosaminidasy získaného při gelové chromatografii na koloně Sephacrylu S-300. Po nanesení vzorku jsem kolonu promýval roztokem A (5 mM MgCl_2 , 5 mM MnCl_2 a 5 mM CaCl_2 v Tris-HCl pufru pH 7,0), kterým se eluovaly nezachycené proteiny. Jímal jsem frakce o objemu přibližně 2 ml a sledoval jsem koncentraci bílkovin měřením absorbance při 280 nm. Zároveň jsem průběžně měřil aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy způsobem popsaným v kapitole 3.5.2.1 (str. 18). Jakmile obsah bílkovin poklesl, začal jsem kolonu promývat roztokem B (0,2 M methyl- α -D-glukopyranosid v 0,1 M Tris-HCl pufru pH 7,0). Tímto jsem eluoval zachycené proteiny, včetně β -N-acetylhexosaminidasy. Z tohoto plyne, β -N-acetylhexosaminidasa z listů tabáku je glykoprotein. Frakce s nejvyšší aktivitou jsem

slil, čímž jsem získal celkem 4 ml výsledného roztoku enzymu o specifické aktivitě $189,8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Obrázek 7 (str. 24) dokumentuje celý průběh chromatografické separace na této koloně.

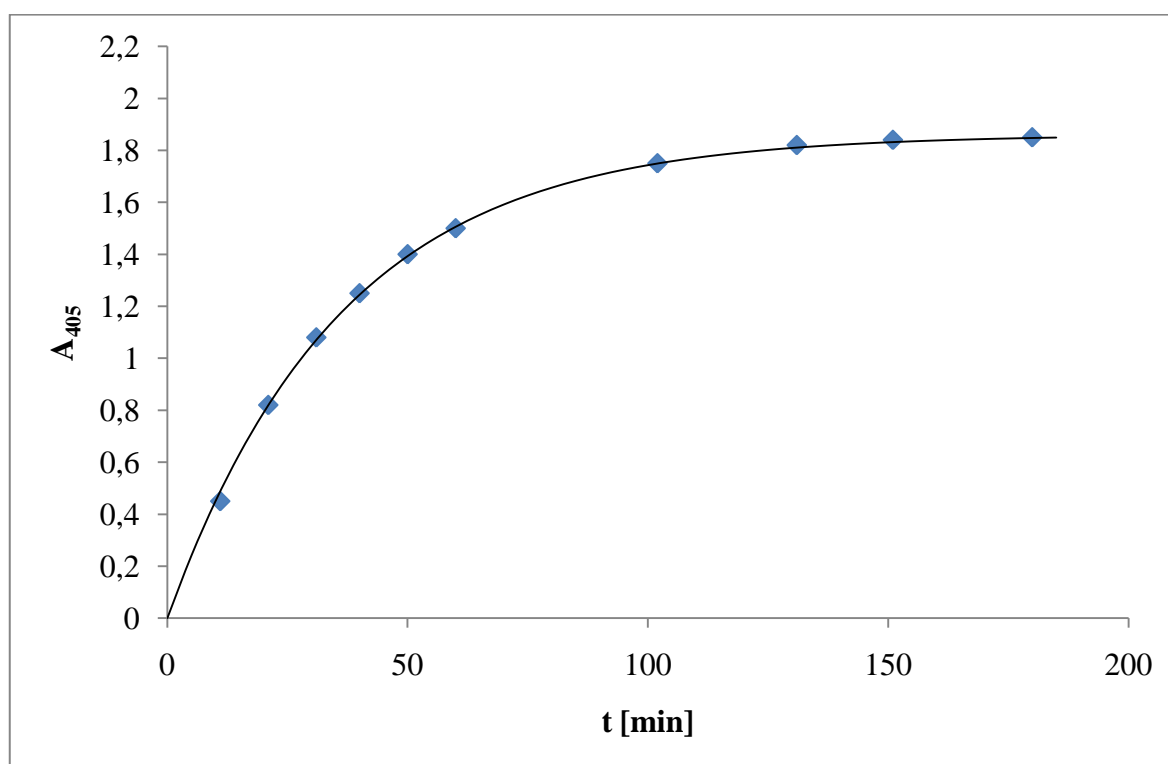


Obrázek 7: Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na koloně Con A-Sepharosy, barevně jsou zobrazeny koncentrace bílkovin (modrá barva) a aktivita β -N-acetylhexosaminidasy (červená barva). E2 - počátek eluce 0,2 M methyl- α -D-glukopyranosidem.

4.2. Štěpení substrátu p-NP-GlcNAc β -N-acetylhexosaminidasou

4.2.1. Časový průběh enzymové reakce pro substrát p-NP-GlcNAc

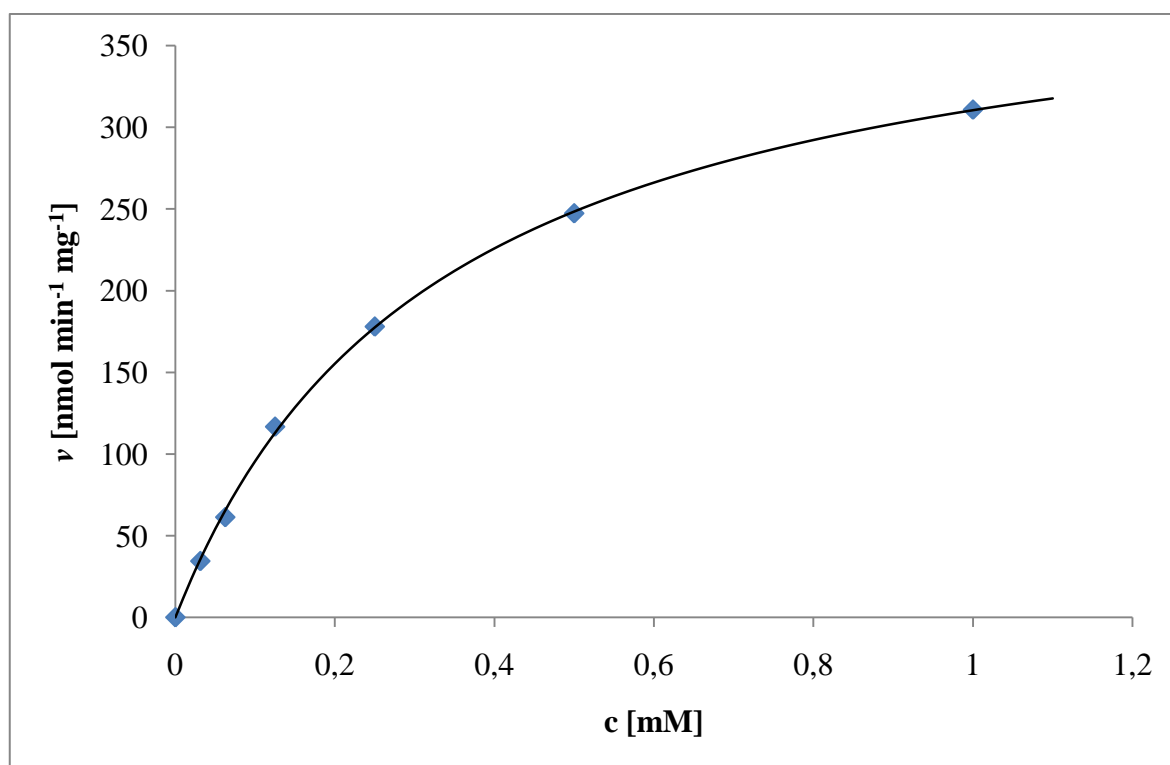
Při měření časového průběhu reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou jsem postupoval způsobem popsáním v kapitole 3.5.2.3. (str. 19). Z reakční směsi jsem ve vhodných časových intervalech odebíral 200 μ l, reakci jsem zastavoval přidáním 800 μ l 0,1 M borátového pufru pH 9,0 a měřil jsem absorbanci při 405 nm proti slepému vzorku. Závislost absorbance na čase dokumentuje obrázek 8 (str. 25). Z tohoto měření plyne, že hydrolyza substrátu p-NP-GlcNAc katalyzovaná β -N-acetylhexosaminidasou (obrázek 2, str. 4) se řídí kinetikou prvního řádu. To potvrzuje pseudomonomolekulární mechanismus reakce při tomto uspořádání, kdy je voda v nadbytku.



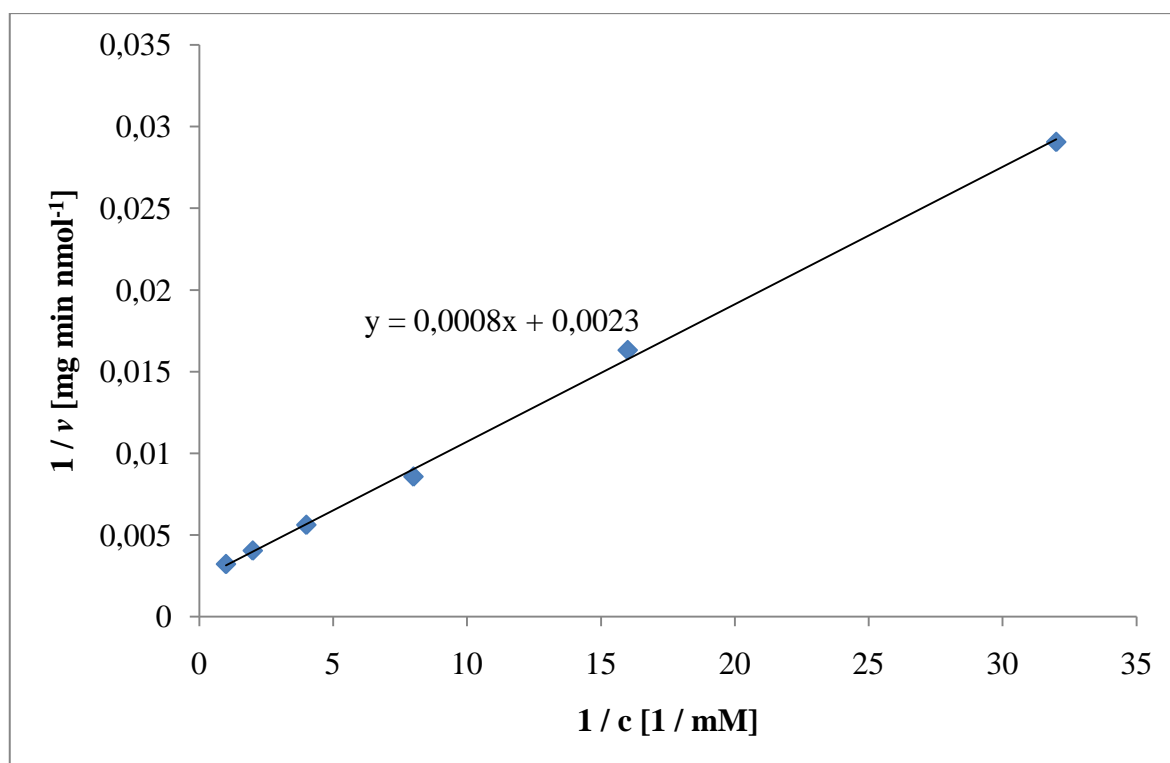
Obrázek 8: Časový průběh hydrolyzy p-NP-GlcNAc katalyzovaný β -N-acetylhexosaminidasou.

4.2.2. Stanovení kinetických parametrů β -N-acetylhexosaminidasy pro p-NP-GlcNAc

Při stanovení Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti reakce β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc jsem postupoval způsobem popsáním v kapitole 3.5.2.4. (str. 20). K měření jsem použil roztok enzymu získaný po afinitní chromatografii na koloně Con A-Sepharosy (kapitola 4.1.3., str. 23). Závislost rychlosti reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou na koncentraci substrátu p-NP-GlcNAc dokumentuje obrázek 9 (str. 26). Nelineární regresí jsem stanovil Michaelisovu konstantu na hodnotu $K_m = 0,33$ mM a maximální rychlost reakce na hodnotu $V_{max} = 414$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ (vztaženo na miligram proteinů). Na obrázku 10 (str. 27) je zobrazeno dvojnásobné reciproké vynesení podle Lineweavera a Burka.



Obrázek 9: Závislost rychlosti reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou na koncentraci substrátu p-NP-GlcNAc.

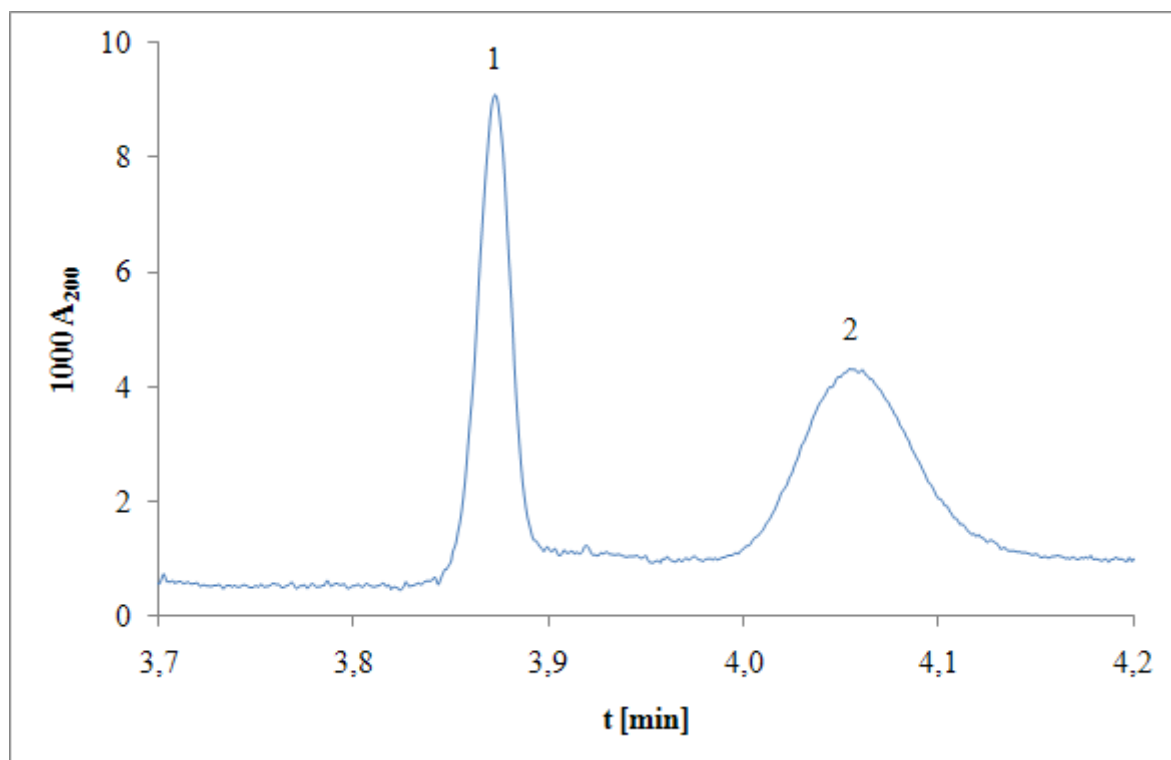


Obrázek 10: Dvojnásobné reciproké vynesení závislosti rychlosti reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou na koncentraci substrátu p-NP-GlcNAc podle Lineweavera a Burka.

4.3. Štěpení substrátu diacetylchitobiosy β -N-acetylhexosaminidasou

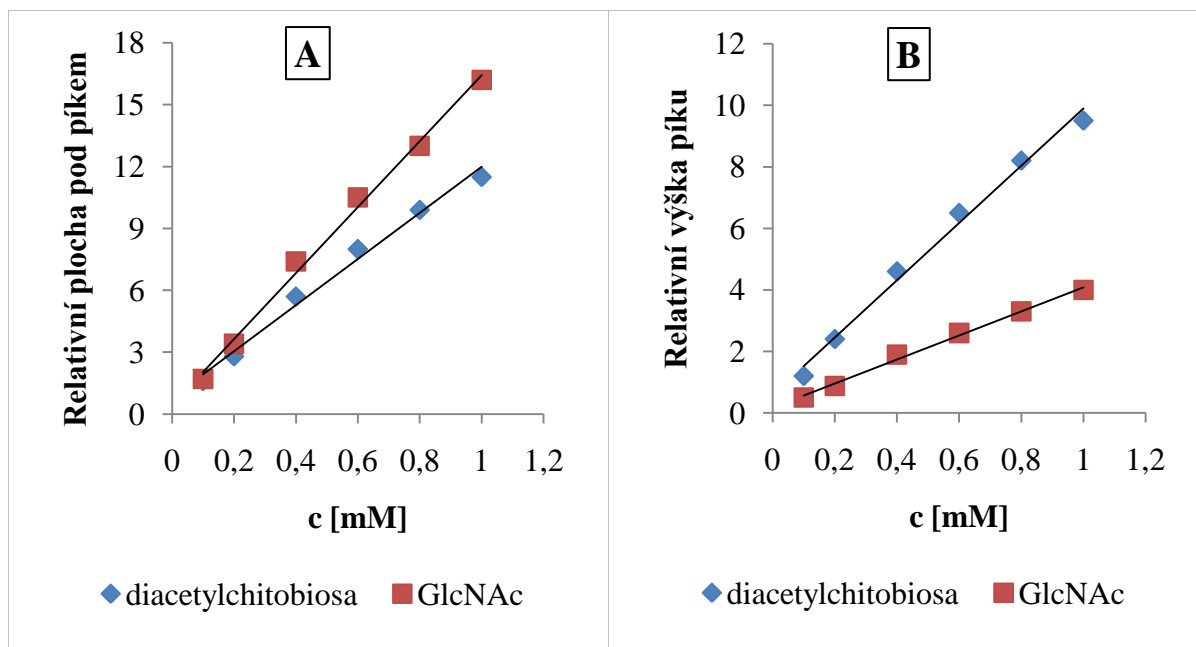
4.3.1. Závislost signálu detektoru kapilární elektroforézy na koncentraci diacetylchitobiosy a GlcNAc

Při sestrování kalibrační závislosti signálu detektoru při 200 nm na koncentraci diacetylchitobiosy (substrát) a GlcNAc (produkt) pro měření časového průběhu reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou pomocí kapilární elektroforézy jsem postupoval způsobem popsaným v kapitole 3.5.3.2 (str. 21). Analyzoval jsem roztoky s koncentrací obou látek v rozsahu 0,1-1,0 mM. Manuálně jsem odečetl relativní plochu pod píkem a relativní výšku píku. Migrační čas diacetylchitobiosy byl přibližně 3 min 50 s a migrační čas GlcNAc byl přibližně 4 min 5 s. Separaci pomocí kapilární elektroforézy dokumentuje obrázek 11 (str. 28).



Obrázek 11: Separace diacetylchitobiosy (1) a GlcNAc (2) pomocí kapilární elektroforézy.

Ověřil jsem lineární závislost relativní plochy pod píkem i relativní výšky píku na koncentraci diacetylchitobiosy i GlcNAc v rozsahu koncentrací 0,1-1,0 mM. Hodnota spolehlivosti byla při všech stanoveních $R^2 > 0,99$. Stanovené kalibrační závislosti dokumentuje obrázek 12 (str. 29).

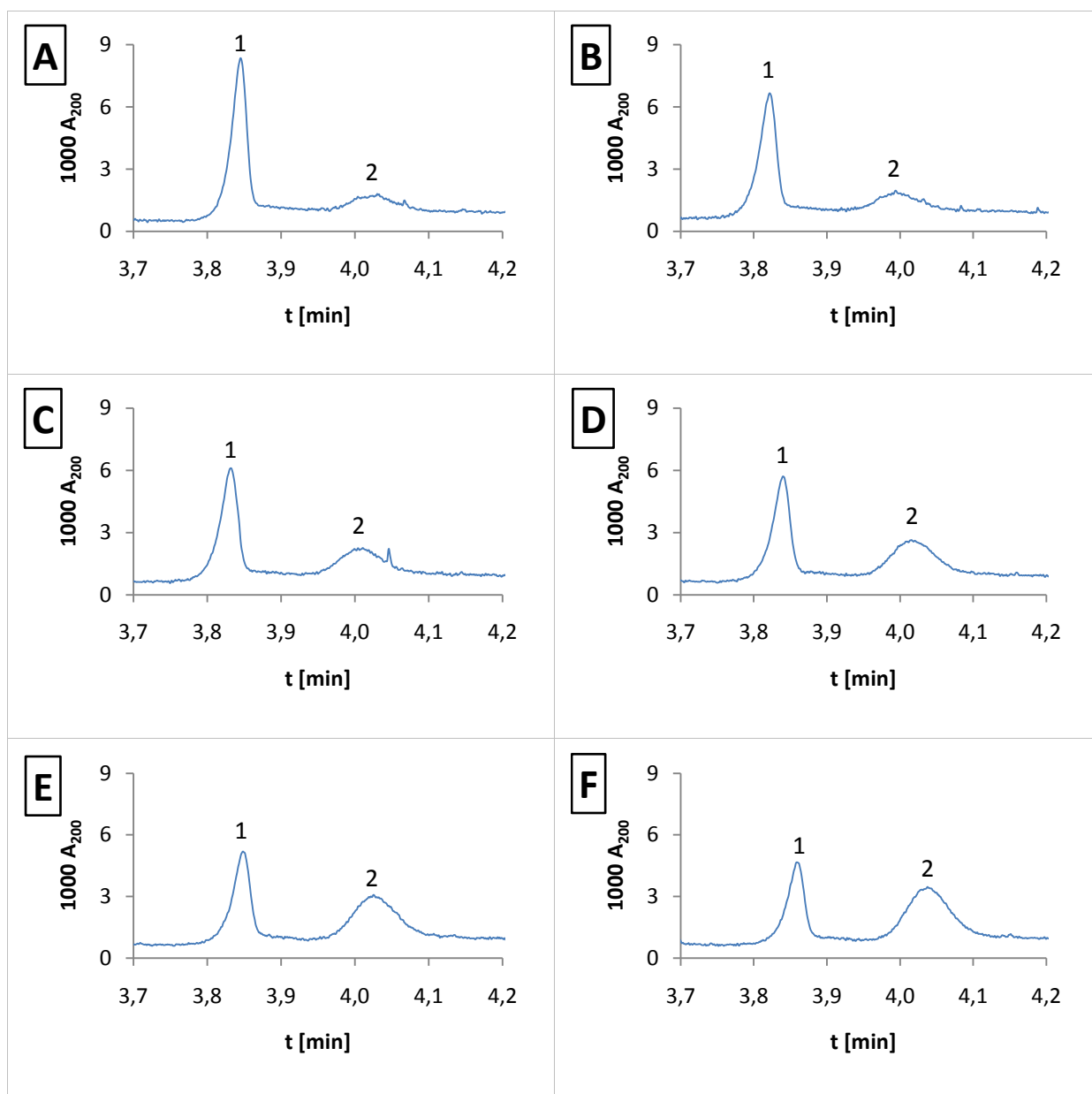


Obrázek 12: Závislost relativní plochy pod píkem na koncentraci diacetylchitobiosy a GlcNAc (graf A) a relativní výšky píku na koncentraci diacetylchitobiosy a GlcNAc (graf B). Při všech stanoveních byla hodnota spolehlivosti $R^2 > 0,99$.

4.3.2. Časový průběh enzymové reakce pro substrát diacetylchitobiosu

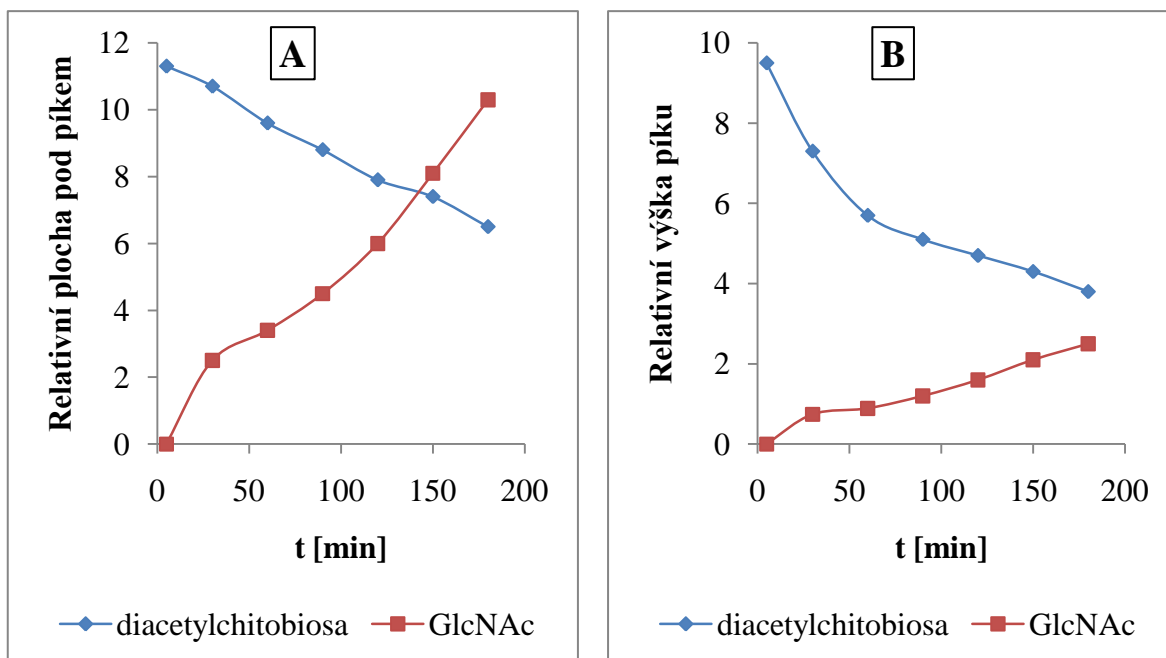
Při stanovení časového průběhu reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou pro substrát diacetylchitobiosu jsem postupoval způsobem popsáním v kapitole 3.5.3.1 (str. 21). Reakce probíhala při 25 °C a pH 4,5. Reakční směs obsahovala 8 μ l 5 mM roztoku diacetylchitobiosy, 12 μ l 0,2 M citrátového pufru pH 4,5 a 20 μ l zředěného roztoku enzymu získaného při gelové chromatografii na koloně Sephacrylu S-300 (kapitola 4.1.2., str. 22). Roztok enzymu vykazoval aktivitu 40,3 $\text{nmol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ vůči substrátu p-NP-GlcNAc (v reakční směsi, která obsahovala 100 μ l roztoku enzymu a 50 μ l roztoku p-NP-GlcNAc o koncentraci 4 mM v celkovém objemu 200 μ l). K vyhodnocení jsem využil hodnot absorbance naměřených při 200 nm. V půlhodinových intervalech, po dobu celkem

tří hodin, jsem spouštěl analýzu reakční směsi, v záznamech jsem poté vyhodnocoval relativní plochu pod píkem a relativní výšku píku jak substrátu (diacetylchitobiosy), tak produktu reakce (GlcNAc). Integraci jsem prováděl manuálně. Obrázek 13 (str. 30) dokumentuje jednotlivá měření.



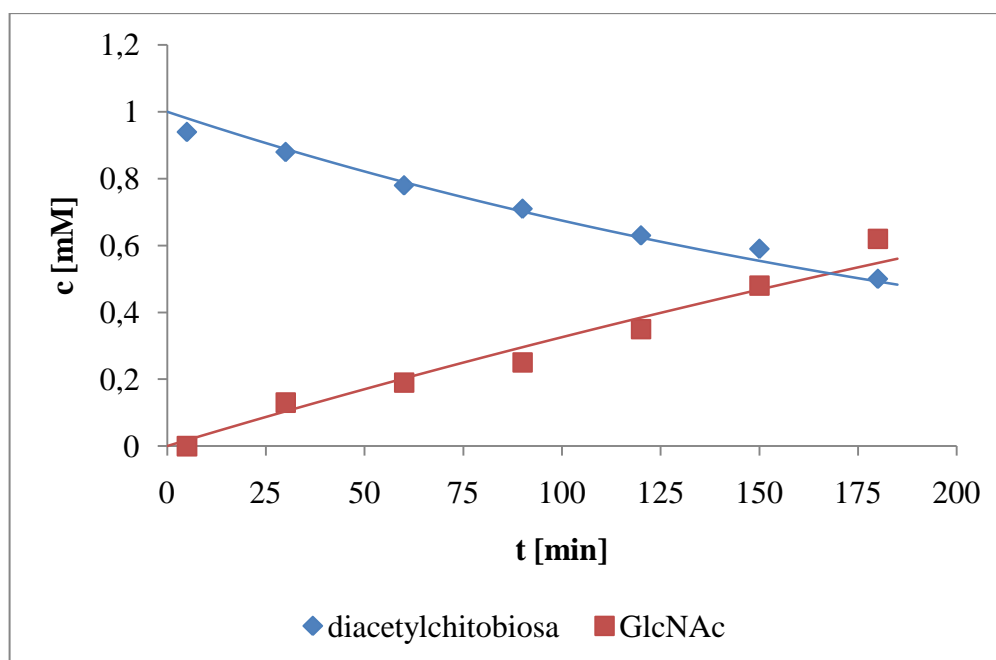
Obrázek 13: Elektroferogramy dokumentující časový průběh hydrolýzy diacetylchitobiosy katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou. Pík 1 - diacetylchitobiosa, pík 2 - GlcNAc. Doba reakce: A - 30 min, B - 60 min, C - 90 min, D - 120 min, E - 150 min, F - 180 min.

Závislost relativní plochy pod píkem a relativní výšky píku na čase dokumentuje obrázek 14 (str. 31).

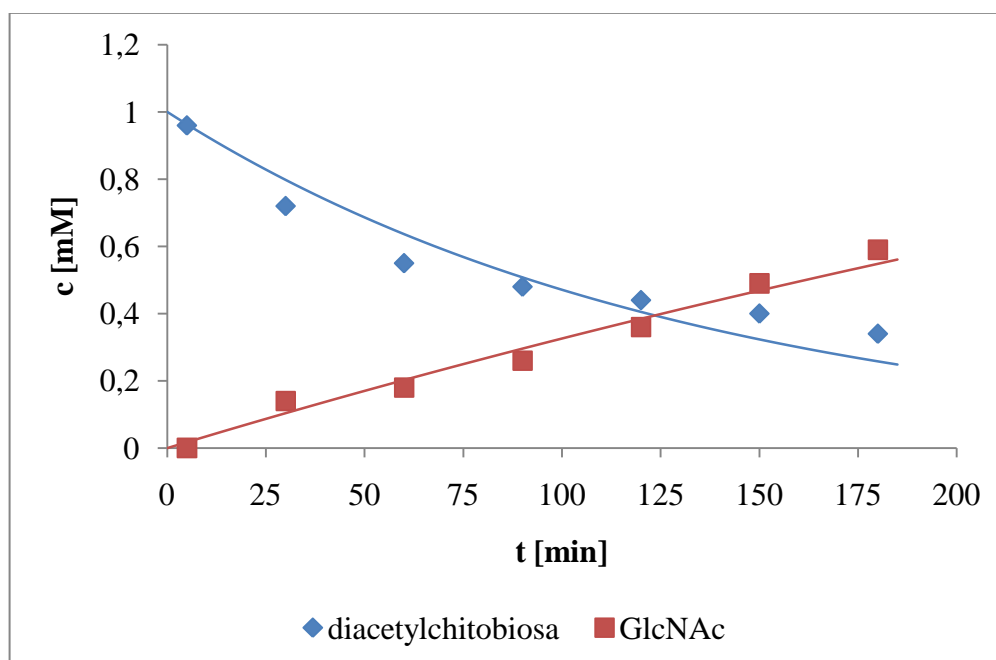


Obrázek 14: Závislost relativní plochy pod píkem (graf A) a relativní výšky píku (graf B) diacetylchitobiosy a GlcNAc na čase.

Ze stanovených hodnot relativní plochy pod píkem a relativní výšky píku jsem pomocí sestrojených kalibračních závislostí odečetl koncentrace diacetylchitobiosy a GlcNAc při jednotlivých měřeních. Časový průběh hydrolýzy diacetylchitobiosy katalyzovaný β -N-acetylhexosaminidasou vyhodnocený podle relativní plochy pod píkem dokumentuje obrázek 15 (str. 32). Časový průběh hydrolýzy diacetylchitobiosy katalyzovaný β -N-acetylhexosaminidasou vyhodnocený podle relativní výšky píku dokumentuje obrázek 16 (str. 32).



Obrázek 15: Časový průběh hydrolyzy diacetylchitobiosy katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou změřený pomocí kapilární elektroforézy. Koncentrace diacetylchitobiosy a GlcNAc byla odečtena z kalibrace podle relativní plochy pod píkem.



Obrázek 16: Časový průběh hydrolyzy diacetylchitobiosy katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou změřený pomocí kapilární elektroforézy. Koncentrace diacetylchitobiosy a GlcNAc byla odečtena z kalibrace podle relativní výšky píku.

Úbytek GlcNAc vykazuje při obou stanoveních zcela totožnou závislost. Aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy jsem stanovil z hodnoty úbytku GlcNAc v reakční směsi po 10 min reakce (úbytek získán z proložené exponenciály) na hodnotu $a = 3,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$. Při tom jsem respektoval molární poměr substrátu a produktu reakce 1:2, jak je zobrazeno na obrázku 1 (str. 3). Tato hodnota je ve srovnání s aktivitou, jakou β -N-acetylhexosaminidasa vykazovala pro substrát p-NP-GlcNAc, zhruba desetinová. Tabulka 3 (str. 33) dokumentuje srovnání aktivity β -N-acetylhexosaminidasy pro oba zkoumané substráty.

Tabulka 3: Srovnání aktivity β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc a diacetylchitobiosu.

Substrát	Aktivita [nmol min ⁻¹ ml ⁻¹]	Relativní aktivita
p-NP-GlcNAc	40,3	100%
diacetylchitobiosa	3,5	8,7%

5. DISKUZE

β -N-acetylhexosaminidasy jsou přítomny ve všech živých organismech, avšak jejich funkce, především v rostlinách, stále ještě není úplně vyjasněná. Jednou z pravděpodobných funkcí β -N-acetylhexosaminidas izolovaných ze semen některých rostlin je úloha při degradaci zásobních glykoproteinů [20].

V listech tabáku byla v porovnání s dalšími glykosidasami stanovena relativně vysoká aktivita β -N-acetylhexosaminidasy. Pro toto porovnání byly využity chromogenní substráty značené p-NP. Nárůst aktivity β -N-acetylhexosaminidasy byl zjištěn také při virové infekci [24], což naznačuje, že by se rostlinné β -N-acetylhexosaminidasy mohly podílet na odpovědi při napadení patogenními organismy. Mnohé studie se proto zabývají možnostmi zvýšení aktivity β -N-acetylhexosaminidas a dalších chitinas, které by vedlo ke zvýšení rezistence rostlin proti houbovým patogenům. Pěstování odolnějších rostlin by umožnilo zvýšit produkci hospodářských plodin [12]. Dalším faktorem vyvolávajícím zvýšení aktivity rostlinných chitinas je zvýšená koncentrace těžkých kovů [13].

V této práci jsem studoval β -N-acetylhexosaminidasu z listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). Při separaci tohoto enzymu došlo na koloně Con A-Sepharosy k jeho navázání, což svědčí o glykoproteinové povaze enzymu. Dále jsem stanovil kinetické parametry β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc. Michaelisova konstanta byla stanovena na hodnotu $K_m = 0,33$ mM a maximální rychlost reakce na hodnotu $V_{max} = 414$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ (vztaženo na miligram proteinů). Tato hodnota Michaelisovy konstanty je v porovnání s hodnotami u ostatních rostlinných β -N-acetylhexosaminidas poměrně nízká (tabulka 2, str. 9).

Hlavním cílem této práce bylo zjistit, zda je β -N-acetylhexosaminidasa z rostlin tabáku schopna hydrolyzovat diacetylchitobiosu. Při studiu aktivity rostlinných β -N-acetylhexosaminidas vůči chito oligomerům je obvykle používána HPLC, což je však finančně i časově náročné. V této práci jsem aktivitu tohoto enzymu vůči chitobiose stanovil pomocí kapilární elektroforézy. Na rozdíl od běžného stanovení pomocí HPLC vyžaduje tato metoda pouze nepatrné množství enzymu (řádově mikrolitry), je časově nenáročná (celé měření včetně promytí kapiláry trvá přibližně 10 min) a nevyžaduje žádnou další údržbu kolony.

Při stanovení pomocí kapilární elektroforézy jsem jako elektroforetický pufr použil borátový pufr pH 9,2; napětí 30 kV a kapiláru o délce 65 cm (efektivní délka byla 56,5 cm). Migrační čas substrátu diacetylchitobiosy byl přibližně 3 min 50 s, hodnota pro produkt GlcNAc byla přibližně 4 min 5 s. Zjistil jsem lineární závislost odezvy detektoru (v UV oblasti při 200 nm) na koncentraci obou látek v rozsahu koncentrací 0,1-1,0 mM. Při analýze vlastní reakční směsi byl k vyhodnocení využit nárůst koncentrace GlcNAc, který při stanovení podle relativní plochy pod píkem i podle relativní výšky píku vykazoval zcela stejné hodnoty. V případě diacetylchitobiosy jsem pozoroval úbytek koncentrace, avšak naměřené hodnoty podle relativní plochy a výšky píku se neshodovaly.

Stanovená aktivita β -N-acetylhexosaminidasy pro diacetylchitobiosu byla více než desetkrát nižší než pro p-NP-GlcNAc (dosahovala pouze 8,7% této aktivity). V dalším studiu β -N-acetylhexosaminidasy z rostlin tabáku by bylo jistě zajímavé sledovat, zda se aktivita tohoto enzymu s rostoucí délkou řetězce chitooligomeru zvyšuje jako je tomu u pšenice obecné [19], nebo naopak snižuje jako u kukuřice seté [17].

Stanovený poměr aktivit β -N-acetylhexosaminidasy z listů rostlin tabáku pro p-NP-GlcNAc a diacetylchitobiosu naznačuje, že diacetylchitobiosa není přirozeným substrátem tohoto enzymu. Možným substrátem by mohly být oligosacharidové řetězce glykoproteinů, jak bylo pozorováno u β -N-acetylhexosaminidasy z huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) [23].

6. ZÁVĚR

1. Byla separována β -N-acetylhexosaminidasa z listů rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) o specifické aktivitě $190 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.
2. Byly zjištěny kinetické parametry β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc. Michaelisova konstanta byla stanovena na hodnotu $K_m = 0,33 \text{ mM}$ a maximální rychlost reakce byla stanovena na hodnotu $V_{\max} = 414 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (vztaženo na miligram proteinů).
3. Byla zavedena metoda stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát diacetylchitobiosu pomocí kapilární elektroforézy. Byla zjištěna lineární závislost signálu detektoru kapilární elektroforézy při 200 nm na koncentraci diacetylchitobiosy a GlcNAc pro rozsah koncentrací 0,1-1,0 mM s hodnotou spolehlivosti $R^2 > 0,99$.
4. Byla porovnána aktivita β -N-acetylhexosaminidasy pro substráty diacetylchitobiosu a p-NP-GlcNAc. Byla zjištěna schopnost β -N-acetylhexosaminidasy z rostlin tabáku diacetylchitobiosu štěpit, ale jen s 8,7% aktivitou ve srovnání se substrátem p-NP-GlcNAc.

7. REFERENCE

1. Duo-Chuan L: *Mycopathologia* 161, 345-360 (2006)
2. Muzzarelli RAA, Ilari P, Tarsi R, Dubini B, Xia W: *Carbohydr. Polym.* 25, 45-50 (1994)
3. Yamamoto K, Tsuji Y, Matsushita S, Kumagai H, Tochikura T: *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1019-1023 (1986)
4. Patil RS, Ghormade V, Deshpande V: *Enzyme Microb. Technol.* 26, 473-483 (2000)
5. Harman GE, Hayes CK, Lorito M, Broadway RM, Di Pietro A, Peterbauer C, Tronsmo A: *Mol. Plant Pathol.* 83, 313-318 (1993)
6. Cannon RD, Niimi K, Jenkinson HF, Shepherd MG: *J. Bacteriol.* 176, 2640-2647 (1994)
7. Bassler BL, Yu C, Lee YC, Roseman S: *J. Biol. Chem.* 266, 24276-24286 (1991)
8. Tronsmo A, Harman GE: *Anal. Biochem.* 208, 74-79 (1993)
9. Yamamoto K, Lee KM, Kumagai H, Tochikura T: *Agric. Biol. Chem.* 49, 611-619 (1985)
10. Adams DJ: *Microbiology* 150, 2029-2035 (2004)
11. Mark BL, Vocadlo DJ, Knapp S, Triggs-Raine BL, Withers SG, James MNG: *J. Biol. Chem.* 276, 10330-10337 (2001)
12. Broglie R, Broglie K: *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 342, 265-270 (1993)
13. Békésiová B, Hraška Š, Libantová J, Moravčíková J, Matušíková I: *Mol. Biol. Rep.* 35, 579-588 (2008)
14. Bouquelet S, Spik G: *Eur. J. Biochem.* 84, 551-559 (1978)
15. Choi SY, Gross KC: *Phytochemistry* 36, 1-6 (1994)
16. Li SC, Li YT: *J. Biol. Chem.* 245, 5153-5160 (1970)
17. Oikawa A, Itoh E, Ishihara A, Iwamura H: *J. Plant Physiol.* 160, 991-999 (2003)
18. Jin YL, Jo YY, Kim KY, Shim JH, Kim YW, Park RD: *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 313-319 (2002)
19. Jordan ND, Barber MS: *Plant Sci.* 107, 41-48 (1995)
20. Harley SM, Beevers L: *Plant Physiol.* 85, 1118-1122 (1987)
21. Chen YC, Liu WL, Hsu HC, Lee YA, Chen CS: *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 275-283 (2004)

-
22. Jagadeesh BH, Prabha TN, Srinivasan K: *Plant Sci.* 167, 1263-1271 (2004)
 23. Strasser R, Bondili JS, Schoberer J, Svoboda B, Liebminger E, Glössl J, Altmann F, Steinkellner H, Mach L: *Plant Physiol.* 145, 5-16 (2007)
 24. Trefancová J: Studium β -N-acetylhexosaminidasy rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L.), Diplomová práce PřF UK Praha (2009)
 25. Voet D, Voetová JG: *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha, str. 752-754 (1995)
 26. Kellner RA, Mermet JM, Otto M, Widmer HM, Valcárcel M: *Analytical Chemistry* (Second Edition), WILEY-VCH, Weinheim, str. 616-619 (2004)
 27. Uthus EO: *Anal. Biochem.* 401, 68-73 (2010)
 28. Tomkova J, Friedecky D, Polynkova A, Adam T: *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 1943-1945 (2009)
 29. Stege PW, Messina GA, Bianchi G, Olsina RA: *J. Fluoresc.* 20, 517-523 (2010)
 30. Bradford MM: *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976)
 31. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/> (20. května 2010)

