

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Petra Darebná

Využití kyselých proteáz z láčkovek pro účely vodík/deuteriové
výměny

Application of acid proteases from *Nepenthes* in
hydrogen/deuterium exchange

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Man, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Alan Kádek

Praha 2013

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Manovi, Ph.D. a konzultantu Mgr. Alanu Kádkovi, za velkou pomoc, trpělivost a veškerý čas, který mi věnovali.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Vlastimilu Rybkovi, Ph.D. z Botanické zahrady Praha za umožnění sběru trávicích šťáv láčkovek a veškerý čas, který nám věnoval a skvělému kolektivu Laboratoře charakterizace molekulární struktury MBÚ AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Dále děkuji Mgr. Tomáši Kučerovi za poskytnutí proteinu HPP a Vyacheslavu Tretyachenkovi za rekombinantní nepenthesin I.

Další poděkování patří mé rodině a nejbližším, především Michalu Rosůlkovi, za poskytnutí zázemí a opory, díky které jsem mohla tuto práci napsat a dokončit.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Petra Mana, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

Petra Darebná

Abstrakt

Využití kyselých proteáz z láčkovek pro účely vodík/deuteriové výměny

Petra Darebná

*(Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta,
Univerzita Karlova v Praze, Česká republika)*

Láčkovky (*Nepenthes*), vyskytující se převážně na Borneu a Sumatře, jsou jedny z mála masožravých rostlin produkujících si své vlastní proteolytické enzymy (nepenthesin I a nepenthesin II), zajišťující rostlině náhradní zdroj dusíku a dalších živin v případě růstu na půdách tyto živiny postrádajících. Tyto aspartátové proteázy jsou schopné proteolýzy při nízkém pH, které je ustaveno v trávicí láčkové tekutině po odchytu hmyzu a ve spolupráci s dalšími proteiny se účastní digesce kořisti.

Předkládaná práce se zabývá zpracováním trávicí tekutiny, izolované z láček masožravých rostlin rodu *Nepenthes* a jejím možným použitím jako nástroje při studiu proteinů pomocí vodík/deuteriové výměny. Izoláty trávicích tekutin byly očištěny od hrubých nečistot centrifugací, aktivovány okyselením a ultrafiltračně koncentrovány. U získaných preparátů byl sledován obsah proteinů, jejich proteinový profil a byla u nich enzymatickou esejí stanovena aktivita kyselých proteáz. Následně byly u preparátů na modelových proteinech pomocí hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií studovány preference štěpení za podmínek vhodných pro experimenty vodík/deuteriové výměny. Vybrané preparáty byly srovnávány jak vzájemně, dle rodu rostlin a parametrů šťáv při odběru, tak i s pepsinem, coby standardní proteázou nejběžněji využívanou pro experimenty vodík/deuteriové výměny.

U studovaných preparátů byla pozorována zajímavá odlišnost ve štěpných preferencích nepenthesinů ve srovnání s pepsinem, spočívající ve štěpení za bazickými aminokyselinami a prolinem, jakož i vysoká enzymatická aktivita preparátů. Tyto vlastnosti předurčují nepenthesiny jako vhodného kandidáta pro uplatnění při experimentech vodík/deuteriové výměny.

Klíčová slova: nepenthesin, hmotnostní spektrometrie (MS), vodík/deuteriová výměna

Abstract

Application of acid proteases from *Nepenthes* in hydrogen/deuterium exchange

Petra Darebná

(Department of Biochemistry, Faculty of Science,
Charles University in Prague, Czech Republic)

Nepenthes are mostly found in Borneo and Sumatra. They are one of a few carnivorous plants which produce its own proteolytic enzymes (nepenthesin I and nepenthesin II), which provide an alternative source of nitrogen and other nutrients in case that these plants grow in a soil which lacks such nutrients. These aspartate proteases are capable of proteolysis at a very low pH of a digestive gastrovascular cavity fluid after catching insects and in a cooperation with other proteins participating in digestion process.

Processing of a digestive fluid, isolated from a digestive gastrovascular cavities of carnivorous plants of the *Nepenthes* genus and its possible application as a tool in a protein study using hydrogen/deuterium exchange were done in this thesis. Isolates of the digestive fluids were purified from coarse-grained impurities by centrifugation, activated by acidification and concentrated by ultrafiltration. The amount of proteins and their protein profile were monitored and an activity of acidic proteases was determined by enzymatic assay. Consequently, using LC-MS/MS and model proteins, the cleavage preferences of the preparations were studied under conditions applicable for experiments using hydrogen/deuterium exchange. Selected preparations were compared to each other and also by the genus and parameters of the fluids during sampling. A comparison to pepsin, the most common protease used in hydrogen/deuterium experiments, is also provided.

Interesting slight distinctions were observed in the cleavage preferences of nepenthesin compared to pepsin, they lie in the cleavage after the basic amino acids and proline and also in the high enzymatic activity of the proteases in isolates. These attributes predetermine nepenthesines as a fitting candidate for application in hydrogen/deuterium experiments. (In Czech)

Keywords: nepenthesin, mass spectrometry (MS), hydrogen/deuterium exchange

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
1.1 Studium interakcí a strukturních změn proteinů pomocí vodík/deuteriové výměny	9
1.2 Aspartátové proteázy	11
1.2.1 Pepsin A	11
1.2.2 Aspartátové proteázy vhodné pro použití při studiu proteinů technikou vodík/deuteriové výměny	12
1.3 Láčkovky (<i>Nepenthes</i>)	13
1.3.1 Struktura a funkce pastí láčkovek	13
1.3.2 Složení a charakter trávicí tekutiny	14
1.4 Pepsinu podobné proteázy Nepenthesin I a II	15
2 Cíl práce	18
3 Experimentální část	19
3.1 Seznam použitého materiálu a přístroje	19
3.1.1 Přístroje a pomůcky	19
3.1.2 Chemikálie	20
3.1.3 Pufry a solventy	21
3.1.4 Software	21
3.2 Experimentální metody	22
3.2.1 Příprava šťáv z pastí láčkovek	22
3.2.1.1 Sběr šťáv z láčkovek (<i>Nepenthes</i>)	22
3.2.1.2 Odstranění hrubých nečistot	22
3.2.1.3 Aktivace proteáz v nízkém pH, čištění roztoků od jemných nečistot a koncentrování aktivovaných roztoků proteáz	22
3.2.2 SDS-PAGE (diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného)	24
3.2.3 Hmotnostní spektrometrie	25
3.2.3.1 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	26
3.2.3.2 Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií	26
3.2.4 Proteinový profil šťáv	28
3.2.4.1 SDS-PAGE (diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného)	28
3.2.4.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů za pomoci kyseliny bicinchoninové	28
3.2.4.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	29

3.2.5	Testování aktivity.....	29
3.2.5.1	SDS-PAGE (diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného).....	29
3.2.5.2	Spektrofotometrické stanovení aktivity.....	30
3.2.5.3	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	30
3.2.5.4	Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií.....	31
3.2.6	Purifikace roztoku proteáz na kolonce s pepstatin A-Agarosou	31
4	Výsledky	33
4.1	Příprava šťáv.....	33
4.2	Analýza proteinových profilů a enzymové aktivity pomocí SDS-PAGE	34
4.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů a stanovení enzymové aktivity	35
4.4	Analýza proteinových profilů a enzymové aktivity pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	36
4.5	Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií	41
5	Diskuze	45
6	Závěr	49
	Použité prameny.....	50

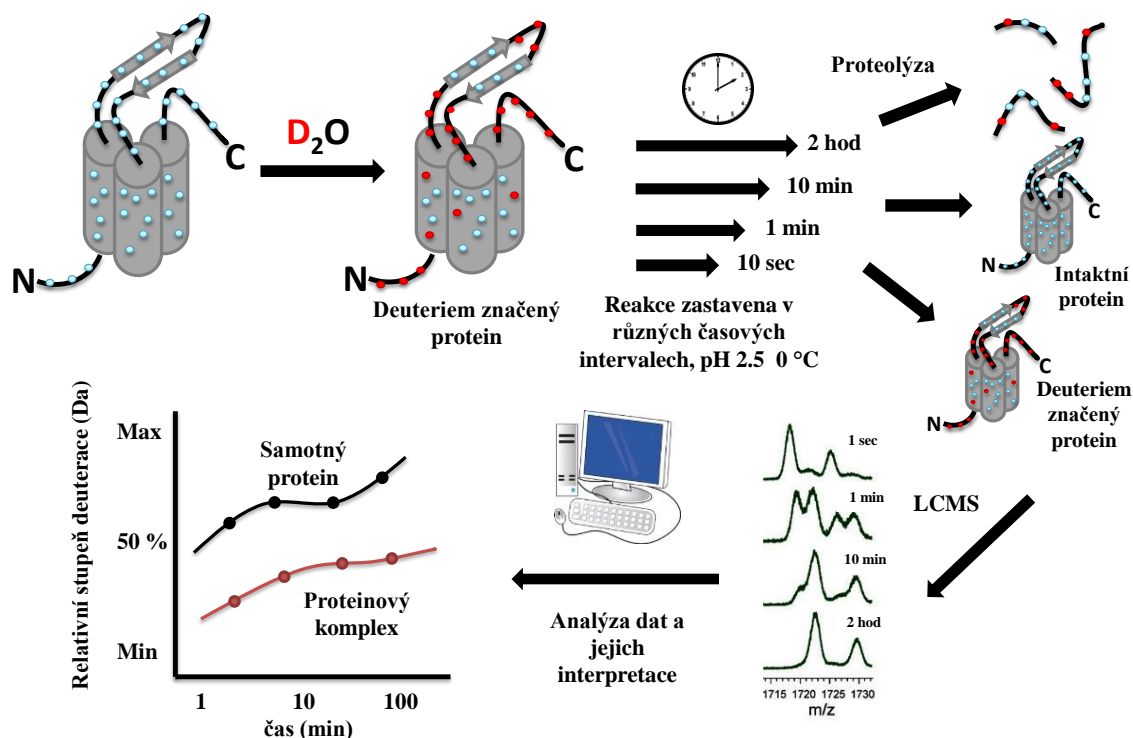
Seznam zkratek

APS	peroxodisíran amonný (Ammonium Persulfate)
BCA	kyselina bicinchoninová (Bicinchoninic Acid)
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)
CCA	kyselina p-hydroxy- α -kyanoskořicová
cDNA	komplementární DNA (complementary DNA)
CID	indukovaná kolizní disociace (Collision-Induced Dissociation)
CytC	cytochrom C
DT	translokační doména záškrťového toxinu (Diphtheria Toxin translocation domain)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (Ethylenediaminetetraacetic acid)
ESI	ionizace sprejem (Electrospray Ionization)
FT-ICR	iontově cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier transform ion cyclotron resonance)
HPLC	vysokoúčinná kapalinná chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography)
HPP	hydrogenosomální procesující peptidáza
kDa	kilodalton
LC	kapalinná chromatografie (Liquid Chromatography)
MALDI	ionizace/desorpce laserem za asistence matrice (Matrix Assisted Laser Ionization/Desorption)
Mb	myoglobin
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NADPH	redukováná formy nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)
NAP	nepenthesinový-typ aspartátové proteázy (Nepenthesin-like Aspartic Protease)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (polyacrylamide gel electrophoresis)
PSI	specifický rostlinný segment (Plant Specific Insert)
RP	obrácená fáze (Reverse Phase)
SA	kyselina 4-hydroxy-3,5-dimethoxyskořicová
SDS	dodecylsíranu sodného (Sodium Dodecyl Sulfate)
SlyD	peptidyl-prolyl cis-trans isomeráza
TCA	kyselina trichloroctová (Trichloroacetic acid)
TEMED	tetramethylethylenediamin
TOF	analyzátor doby letu (Time Of Flight)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

1 Úvod

1.1 Studium interakcí a strukturálních změn proteinů pomocí vodík/deuteriové výměny

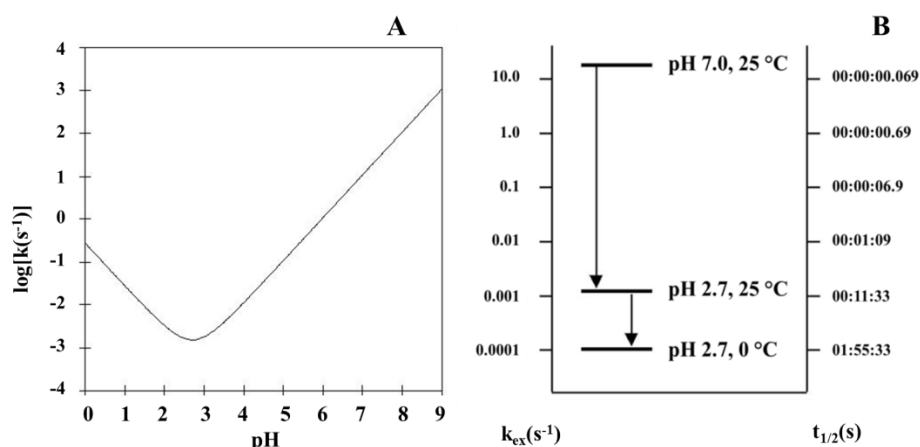
Vodík/deuteriová výměna (H/D) je technika umožňující sledovat strukturální změny proteinů prostřednictvím změn v přístupnosti solventu a v uspořádání vodíkových můstků. Tyto změny mohou být indukované interakcí s ligandem (protein, DNA, lipidová dvojvrstva, nízkomolekulární látky, atd.) nebo změnou prostředí (např. teplota, pH, iontová síla). Hlavním principem je zaznamenání kinetiky výměny amidických vodíků za deuterium, kterou je možno sledovat pomocí nukleární magnetické rezonance nebo hmotnostní spektrometrií. Multidimenzionální nukleární magnetická rezonance (NMR) nám dává náhled na jednotlivé amidické vodíky, ale její nevýhodou je potřeba velkého množství proteinu, který musí být připraven ve vysoké koncentraci. NMR má také limitaci na velikost studovaných molekul a interpretace dat je obtížná a časově náročná.



Obrázek 1. Typické schéma H/D experimentu v uspořádání tzv. kontinuálního značení, analýza dat a jejich interpretace. Izotopová výměna je iniciována převedením analytu do pufru připraveného v D_2O . V různých časových intervalech jsou odebírány vzorky a po proběhnutí značení je reakce zastavena převedením analytu do pufru o nízkém pH při nízké teplotě. Následuje proteolýza a separace vzniklých peptidů pomocí kapalinné chromatografie následované analýzou hmotnostní spektrometrií. Míra deuterace je extrahována z hmotnostních spekter a interpretace je provedena v kontextu známé struktury a jiných biofyzikálních dat.

Spojení vodík/deuteriové výměny s analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie (HXMS) poskytuje citlivou detekci i malých množství analytu, není omezeno velikostí molekul a zpracování dat je jednoduché. Limitací této metody je malé prostorové rozlišení, dané použitím kyselé proteázy při štěpení analyzovaného proteinu.

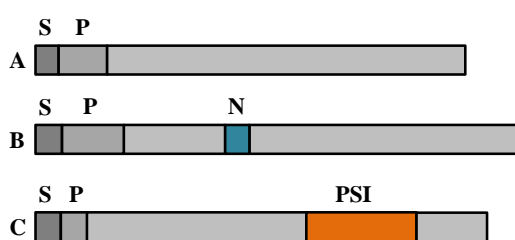
Nejjednodušším provedením experimentu je tzv. kontinuální značení (obr. 1, str. 9), kdy protein, který je v nativním stavu, vyředíme do pufru, jehož složení je totožné, ale pro přípravu byla použita D₂O. Značení probíhá při libovolném pH, nejčastěji však pH 7. Při HXMS analýze jsou v definovaných časových bodech (vteřiny-hodiny) odebírány vzorky a výměna v nich je výrazně zpomalena skokovým snížením pH roztoku analytu na hodnotu kolem pH 2,5 a snížením teploty až k hodnotě 0 °C (obr. 2), případně jsou vzorky zmrazeny v kapalném dusíku [1]. Za podmínek minimální H/D výměny je v následujícím kroku protein proteolyticky štěpen vhodnou proteázou a jednotlivé peptidy jsou separovány vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na obrácené fázi (RP) a analyzovány hmotnostní spektrometrií. Vyplyvající nároky na proteázu jsou schopnost štěpit při nízkém pH (kolem hodnoty ~ 2,5) a nízké teplotě v co nejkratším možném čase. Běžně používanou kyselou proteázou je prasečí pepsin [2], který je používán buď v roztoku v poměru 1/1 (w/w) pepsin vůči substrátu při časových intervalech v řádech minut nebo imobilizovaný na kolonce při časových intervalech v řádech vteřin. Použitím proteázy s odlišnou specifitou než je specifita pepsinu je možné získat lepší prostorové rozlišení a peptidové pokrytí proteinu. Proteázy lze kombinovat nebo používat zvlášť pro stejný protein pro dosažení co nejlepších výsledků [3, 4].



Obrázek 2. A - graf závislosti rychlosti izotopové výměny na pH; B - graf závislosti poločasu zpětné výměny vodíku za deuterium $t_{1/2}(s)$ na pH a teplotě. (převzato z <http://www.hxms.com/>)

1.2 Aspartátové proteázy

Aspartátové proteázy (EC 3.4.23) jsou velká rodina proteolytických enzymů zastoupených od retrovirů, bakterií [5] a rostlin [6, 7] až po obratlovce. Společným znakem jsou dva zbytky kyseliny asparagové, Asp³² a Asp²¹⁵ (podle číslování pepsinu), v aktivním centru. Detailní rentgenostrukturní analýza čtyř enzymů, jmenovitě pepsinu a tří houbových enzymů, penicillopepsinu (EC 3.4.23.20), endothiapepsinu (EC 3.4.23.22) a rhizopuspepsinu (EC 3.4.23.21) ukázaly velice podobnou třídímenzionální strukturu těchto proteáz. Patří do all- β proteinové třídy a do superrodiny kyselých proteáz, která je dále rozdělena do pěti rodin, z nichž dvě hlavní jsou pepsinu-podobná a retrovirální rodina [8].



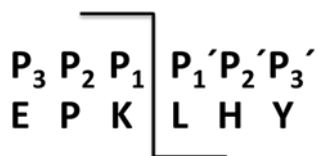
Obrázek 3. Schéma sekvence prasečího pepsinu (A), nepenthesinů (B) a rostlinných vakuolárních proteáz (C). Na obrázku je vyznačen signální peptid (S), propeptid (P), pro rostlinné vakuolární proteázy je oranžově vyznačen specifický rostlinný segment (PSI) a modře je zvýrazněn NAP-specifický segment pro sekvenci nepenthesinů (N).

Aspartátové proteázy jsou syntetizovány v podobě neaktivního enzymu obsahujícího signální peptid o velikosti 20-25 aminokyselinových zbytků, který je odštěpen během maturace proteinu. Dalším segmentem je propeptid, zajišťující spuštění aktivity proteázy až po doputování na místo své funkce, kde je po okyselení autokatalyticky odštěpen. Aktivovaná proteáza má přibližně 325 aminokyselinových

zbytků, které jsou uspořádány do dvou domén s aktivním centrem umístěným mezi nimi. Rostlinné proteázy obsahují navíc ještě saposinu-podobnou doménu neboli specifický rostlinný segment (PSI) (obr. 3). Geometrie aktivního místa je sice silně konzervována přes různé proteázy, ale štěpné preference vykazují širokou variabilitu [9].

1.2.1 Pepsin A

Pepsin A (EC 4.3.3.1) je typickým zástupcem aspartátových proteáz. Jeho prekurzorem je pepsinogen (371 aminokyselin), který je v žaludku aktivován nízkým pH (<3.0) na pepsin. Aktivní enzym je složený z 327 aminokyselin v jednom polypeptidovém řetězci a obsahuje šest cysteinových zbytků, tvořících tři disulfidové můstky. Z celkového počtu 327 aminokyselinových zbytků je 41 kyselých (12,5 %) a čtyři bazické [10]. Pro aktivitu je nutné, aby všechny kyselé zbytky byly deprotonovány a v aktivním centru jeden zbytek deprotonován a jeden protonován. Běžně popisovaná specifita pepsinu v pozici P₁ (obr. 4,



Obrázek 4. Příklad nomenklatury štěpení. Štěpné pozice P_1 až P_3 jsou situovány před místem štěpení. Pozice P_1' a P_3' jsou za místem štěpení.

str. 12) zahrnuje štěpení za aromatickými a kyselými aminokyselinami. Pro imobilizovaný pepsin za podmínek H/D výměny, tedy nízká teplota (<1 °C) a krátký čas štěpení (v řádech vteřin) se ukázalo následující. Preferované aminokyselinové zbytky v pozicích P_1 jsou fenylylalanin, leucin a methionin. Popsáno bylo také štěpení za cysteinem nezapojeným do disulfidu, kyselinou glutamovou, tryptofanem a tyrosinem. Za aminokyselinovými zbytky nesoucími při nízkém pH náboj (histidin, lysin, arginin) bylo štěpeno výjimečně, za cyklickou aminokyselinou prolinem nebylo pozorováno vůbec. Problematické jsou také alifatické aminokyselinové zbytky isoleucinu a valinu či aminokyselina glycin. Vzdálenější aminokyseliny mají na štěpení malý nebo žádný vliv [11]. Z výše uvedeného je zřejmé, že např. bazické části proteinů působí pepsinu problémy, a proto je vhodné hledat proteázy schopné štěpit i pro tyto pozitivně nabitě oblasti.

1.2.2 Aspartátové proteázy vhodné pro použití při studiu proteinů technikou vodík/deuteriové výměny

Mezi aspartátové proteázy popsané jako další možný nástroj pro HXMS patří například aspergillopepsin I (EC 3.4.23.18) z mikroorganismu *Aspergillus saitoi* [4, 12, 13], rhizopuspepsin (EC 3.4.23.6) izolovaný z houby *Rhizopus chinensis* [4, 12, 14], plasmepsin 2 (EC 3.4.23.39) z prvoka zimničky (*Plasmodium falciparum*) a proteáza z žaludku úhoře druhu *Monopterus albus* žijícího na rýžových polích [15].

Aspergillopepsin I (EC 3.4.23.18) je monomerní protein patřící do rodiny pepsinu-podobných proteáz preferující hydrofobní aminokyseliny na P_1 pozici s možností štěpit i za lysinem. Tato jeho vlastnost je využívána při aktivaci trypsinogenu rozštěpením vazby Lys⁶-Ile⁷ [13]. Rhizopuspepsin (EC 3.4.23.6) je stejně jako aspergillopepsin houbovou aspartátovou proteázou a sdílí i specifitu pro lysin v P_1 pozici [14]. Nevýhodou zmíněných proteáz je potřeba většího množství enzymu pro efektivní proteolytické štěpení. Dalším problémem obou výše uvedených proteáz je poměrně velká autodigestce, která ve spojení s velkým množstvím dané proteázy generuje velké pozadí pokusu.

Peptidy produkované plasmepsinem 2 vznikají štěpením za osmi různými aminokyselinovými zbytky například za fenylylalaninem, kyselinou asparagovou, threoninem, serinem, leucinem a lysinem, které má tato proteáza, obdobně jako

aspergillopepsin a rhizopuspepsin, navíc oproti zjištěným P₁ štěpným pozicím pepsinu [15]. Aktivita plasmepsinu 2 je za podmínek vodík/deuteriové výměny malá a proto nebývá vůbec využíván.

Srovnáním aspartátové proteázy z žaludku úhoře *Monopterus albus* Zuiew a pepsinu byla zjištěna odlišnost ve specifitě na P₁ pozici, spočívající ve štěpení za lysinem a argininem, tedy opět za aminokyselinami, za kterými pepsin neštěpí. Díky této odlišnosti vznikají jiné peptidy, než po proteolytickém štěpení pepsinem a to nám dává možnost lepšího pokrytí a prostorového rozlišení při vodík/deuteriové výměně [16].

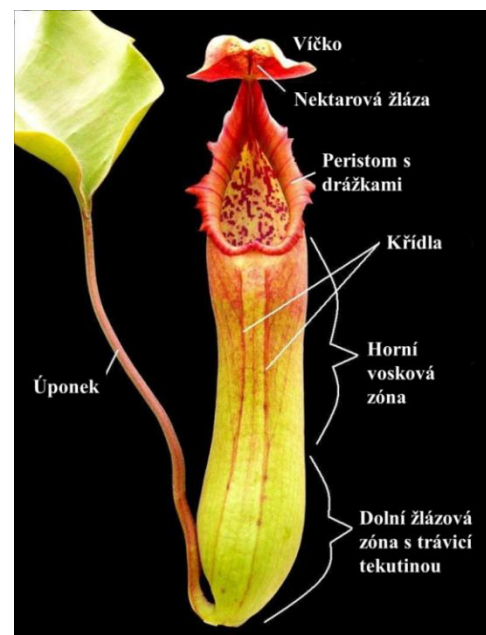
1.3 Láčkovky (*Nepenthes*)

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád:	hvozdíkotvaré (<i>Caryophyllales</i>)
Čeleď:	láčkovkovité (<i>Nepenthaceae</i>)
Rod:	láčkovka (<i>Nepenthes</i>)

Rod láčkovka zahrnuje více než 100 druhů masožravých rostlin vyskytujících se především v tropických krajích s největší druhovou rozmanitostí na Borneu a Sumatře. V menší míře jsou láčkovky rozšířené také na Srí Lance, v Austrálii, v Nové Kaledonii, na Madagaskaru a na Seychelách [17]. Možnost sekundárního zdroje živin v podobě natráveného hmyzu umožňuje láčkovkám osidlovat území s půdami chudými na živiny, především dusík, fosfor a draslík. K nalákání, chycení a trávení hmyzu využívají specializovaných listových orgánů, láček.

1.3.1 Struktura a funkce pastí láčkovek

Láčka, vytvářená na konci listu, se skládá z několika částí (obr. 5), které se odlišují mezi druhy, a v některých případech je rostlina zcela postrádá. Láčky jsou dvojího typu a to pozemní nebo také láčky „dolního“ typu vyskytující se u mladých rostlin menšího věku a láčky vzdušné „horní“, které lze nelézt u starších popínavých rostlin. Odlišnost spočívá



Obrázek 5. Fotografie láčky s popisem hlavních částí.

pouze v umístění a tvaru láčky, na funkci však vliv nemá. V horní části láčky se nachází peristom neboli lem, který může být různě zbarven a povrch má pokryt voskem znesnadňujícím hmyzu pohyb po láčce. Jeho charakteristické radiální drážky opět přispívají k větší klouzavosti a snadnějšímu odchytu kořisti. Lem bývá protažen až na vnitřní stěnu láčky, směrem dolů a směrem nahoru je prodloužen ve víčko, které chrání otvor láčky před deštěm. U některých druhů je však víčko redukováno, nebo vyvráceno mimo otvor láčky. Lákadlem pro hmyz je kromě barvy rostliny také extraflorní tekutina sekretovaná žlázami ve spodní části víčka a pokrývající peristom u vyvinuté otevřené láčky. Stejná šťáva je sekretována na vnější stěně láčky a na úponku a to v období, kdy je láčka nevyvinutá a uzavřená.

Vnitřní stěna láčky je rozdělena na horní voskovou a dolní žlázovou část. Vosková část stejně jako peristom slouží jako kluzká stěna, která zabraňuje hmyzu v útěku z láčky [18], [19]. Dolní žlázová část pastí je trávicí oblastí. Její stěna je pokryta multienzymovými žlázami, které vylučují do vnitřku pastí viskózní trávicí tekutinu. Tato tekutina hmyz zadrží a zároveň natráví. Funkcí žláz je nejen sekrece trávicí tekutiny do spodní části láčky ale také vnímání chemických stimulů, udržování optimálního pH, pomocí protonových pump či vstřebávání živin z natrávené kořisti. Sekrece trávicí tekutiny je podpořena ve chvíli, kdy je do pastí chycen hmyz, jelikož chitin přítomný v kutikule hmyzu je signálem pro okyselení trávicí tekutiny a sekreci mnohých dalších proteinů [20].

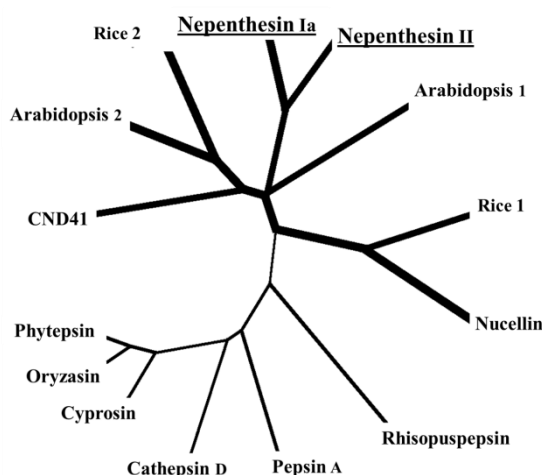
Pro hmyz je lákadlem nejen nektar, barva a čichové podněty, ale byla také zjištěna emise modrého světla vlnových délek mezi 430 a 480 nm, situovaná především do vnitřní části láčky a na peristom. Mravenci, mýry, pavouci a jiný hmyz lákaný rostlinou mají vizuální maximum v UV a viditelné oblasti (modrá, zelená) a je pro ně tudíž toto emitované záření viditelné [21].

1.3.2 Složení a charakter trávicí tekutiny

Trávicí tekutina je směsí různých proteinů a její složení je rozdílné v uzavřené láčce a v láčce již „aktivované“ chyceným hmyzem. Chycení kořisti způsobí jak kolísání v hodnotě pH od 5,5 do 3,0, tak rozdíly v proteinovém složení. Okyselení je způsobeno H^+ ionty sekretovanými žlázami ve spodní části láčky a jako protiionty obsahuje šťáva ionty chloridové sekretované a absorbované stejnými žlázami [22]. Láčka obsahuje nepenthesin I a II, což jsou hlavní proteázy odpovědné za trávení kořisti a před okyselením trávicí

tekutiny se nacházejí v neaktivním stavu. Studium trávicí tekutiny neotevřených láček a srovnáním s tekutinou z otevřených pastí bylo prokázáno, že proteolytická aktivita u láčkovek nepochází z vnějšího zdroje například z mikroorganismů nebo natráveného hmyzu a lze ji přičítat pouze enzymům sekretovaným rostlinou [23]. Kromě proteáz štáva obsahuje například chitinázu III a IV a β -1,3-glukanázu, které jsou odpovědné za trávení kořisti hydrolýzou chitinu tvořícího kutikulu hmyzu a mimo to společně s peroxidázou zajišťují antibakteriální prostředí v lácce [17, 24]. Rostlina usnadňuje trávení potravy také přes volné radikály produkované v trávicí šťávě rozkladem peroxidu vodíku, který si sama vytváří, pravděpodobně působením NADPH-oxidázy [25].

1.4 Pepsinu podobné proteázy nepenthesin I a II



Obrázek 6. Phylogenetický strom pro Nepenthesiny a příbuzné aspartátové proteázy. Širší linka představuje větev nepenthesinu-podobných proteáz; tenká linka představuje pepsinu-podobné proteázy. Porovnávanými proteázami jsou: nepenthesin Ia, *N.gracilis* (NEP1_NEPGR); nepenthesin II, *N.gracilis* (NEP2_NEPGR); Arabidopsis1, *A. thaliana* (AF37029); Arabidopsis 2, *A. thaliana* (AY088536); nucellin, *H. vulgare* (C3SBD6_HORVD); rice 1, *O. sativa* (AK068348); rice 2, *O. sativa* (AK165097); CND41, *N. tabacum* (tobacco) (O23792_TOBAC); cyprosin, *Cynara caldunclis* (CYPR1_CYNCA); oryzasin, *O. sativa* (ASPR1_ORYSJ); phytepsin, *H. vulgare* (ASPR_HORVU); cathepsin D, porcine cathepsin D (CATD_PIG); pepsin A, porcine pepsin A (PEPA_PIG) and Rhisopuspepsin, *Rhizopus chinensis*.(CARP_RHICH). Převzato a upraveno z [26].

Poprvé byly nepenthesin I a nepenthesin II izolovány z trávicí šťávy láčkovky *N. distillatoria*. Jedná se o enzymy patřící do rodiny pepsinu-podobných aspartátových proteáz (obr. 6). Kompletní aminokyselinová sekvence (obr. 7, str. 16) prekurzoru nepenthesinu I, získaná pomocí sekvenování cDNA kódující enzym z rostliny *N. gracilis*, obsahuje 437 aminokyselinových zbytků.

Signální peptid obsahuje 24 aminokyselinových zbytků a propeptid, který je odštěpen v kyselém prostředí, obsahuje dalších 56 aminokyselinových zbytků. Aktivovaná proteáza se skládá z 359 aminokyselinových zbytků a vykazuje z velké části sekvenční homologii s běžnými aspartátovými proteázami. Nepenthesin I obsahuje 6 potenciálních N-glykosylačních

míst a 12 cysteinových zbytků, které pravděpodobně tvoří 6 disulfidických můstků. Sekvence nepenthesinu II je obdobná s výjimkou glykosylačních míst, které enzym neobsahuje. Obě proteázy postrádají specifický rostlinný segment (obr. 3, str. 11), který je u rostlinných vakuolárních aspartátových proteáz umístěn mezi Asn³⁴⁰ a Leu³⁴¹ (číslování

podle pepsinu). Nicméně bylo ukázáno, že mají přibližně 22-aminokyselinový segment předcházející pohyblivému tyrosinovému zbytku. Tento segment obsahuje 4 z 12 cysteinových zbytků a byl nazván NAP-specifický segment (NAP = nepenthesinový-typ aspartátové proteázy).

```

NEP1 MASSLYSFLIALSIVYIFVAPTHS TSR-TALNHRHEAKVTGFOIMLEHVDSGKNLTKFQL 59
NEP2 MASPLYSVVLGLAIVSAIVAPTSS TSRGTL LHHGQKRPOPGLRVDLEQVDSGKNLTKYEL 60

NEP1 LERAIERGSRRLEAMLN GPSGVETS VYAGDGEYLMNLS IGTPAQPFSAIMDTGSDLI 119
NEP2 IKRAIKRGERRMRSINAMLQ SSSGIETPVYAGDGEYLMNVAIGTPDSSFSAIMDTGSDLI 120

NEP1 WTQCQPCTQCFNOSTPIFNPOGSSSFST LPCS SQLCQALSSPTCSNNFCQY TYGYGDGSE 179
NEP2 WTQCEPCCTQCFSQPTPIFNPDSSSFST LPE SQY CQDLPSETC NNNECQY TYGYGDGST 180

NEP1 TQGSMTETLTFGSVSIP NITFG GENNQFGQNGAGLVGMGRGPLSLPSQLDVTKFSY 239
NEP2 TQGYMATETFTFETSSVPNIAFG GEDNQFGQNGAGLIGMGWGPLSLPSQLGVGQFSY 240

NEP1 CMTPIGSSTPSNLLLGLSLANSVTAGSP NITLIQSSQIPTFYITLNGLSVGSTRLPIDPS 299
NEP2 CMTSYGSSSPSTLALGSAASGVPEGSPSTTLIHSSLNPTYYYITLQGITVGGDNLGIPSS 300

NEP1 AFALNSNNGTGGIIIDS GTTLTYFVNNA YQSVRQEFISQINLPV VNGSSGFDL CFQTPS 359
NEP2 TFQLQ-DDGTGGMIIDS GTTLTYLPQDAYNAVAQAFTDQINLP TVDESSSGLST CFQQPS 359

NEP1 DPSNLQIPTFVMHFDGGDLELPSENYFISPSNGLI CLAMGSSSQ-GMSIFGNIQQQNMLV 418
NEP2 DGSTVQVPEISMQFDGGV LNLGEQNILISPAEGVI CLAMGSSSQLGISIFGNIQQQETQV 419

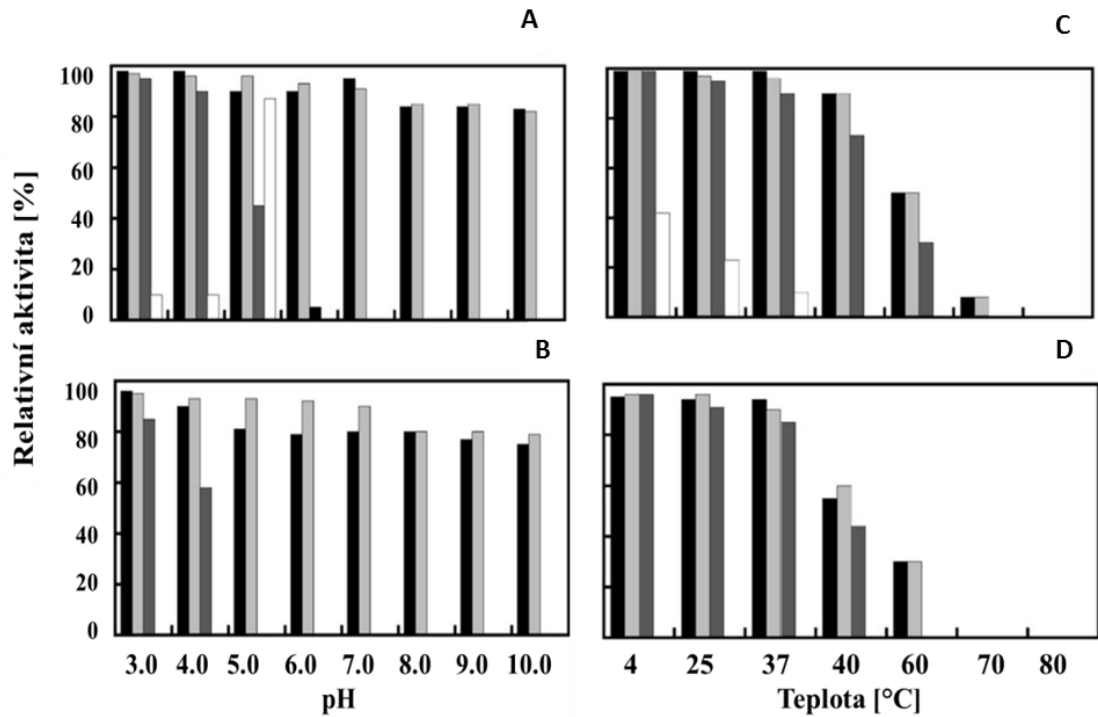
NEP1 VYDTGNSVVSFASAQCGAS 437
NEP2 LYDLQNLAVSFVPTQCGAS 438

```

Obrázek 7. Aminokyselinová sekvence nepenthesinu I (NEP1_NEPGR) (A) a nepenthesinu II (NEP2_NEPGR) (B) z *N. gracilis*. Signální peptid o velikosti 24 aminokyselin pro nepenthesin I i II je označen zeleně, propeptid o velikosti 56/55 aminokyselin je označen červenou barvou. Potenciální N-glykosylační místa nepenthesinu I jsou označena fialově. Modrou barvou jsou znázorněny cysteiny. Specifický NAP-segment je znázorněn oranžovou barvou a pro nepenthesin Ia zahrnuje aminokyseliny 148-169 a pro nepenthesin II 149-170 v místě před pohyblivým tyrosinovým zbytkem (znázorněným šedou barvou).

Pozoruhodné jsou zejména pH a teplotní stability nepenthesinů ve srovnání s prasečím pepsinem. Optimální teplota pro nepenthesin I je 55 °C a pro nepenthesin II 45 °C a pH optimum obou enzymů se pohybuje kolem hodnoty 2,6. Nepenthesin I i II izolované z rostlin vykazují při porovnání s pepsinem A pozoruhodně širší teplotní a pH stabilitu (obr. 8, str.17).

Inhibice pepstatinem při nízkém pH byla pro nepenthesin I i II podobná jako v případě pepsinu A. Ke kompletní inhibici došlo při koncentraci pepstatinu 0,1mM v ekvimolárním poměru k enzymu. Inhibice byla zaznamenána také v hrubém extraktu z rostlin při stejných podmínkách [26].



Obrázek 8. Stabilita nepenthesinů a surové trávicí šťávy pro různé pH (A, B) a různé teploty (C, D) ve srovnání s pepsinem A. Aktivita byla měřena po 7 (A) a 30 (B) denní inkubaci při 37 °C při různém pH. Černá znázorňuje surovou trávicí šťávu láčkovek, světle šedá nepenthesin I, tmavě šedá nepenthesin II a bílou je zobrazen pepsin. Pro různé teploty byla aktivita měřena opět po 7 (C) a 30 (D) denní inkubaci při pH 3.0. Černá znázorňuje surovou trávicí šťávu láčkovek, světle šedá nepenthesin I, tmavě šedá nepenthesin II a bílou je zobrazen pepsin A. Převzato a upraveno z [26].

2 Cíl práce

Primárním cílem této bakalářské práce bylo nabohatit kyselé proteázy z trávicích šťáv láčkovek (*Nepenthes*) a otestovat jejich použití pro štěpení proteinů v experimentech proteinové vodík/deuteriové výměny.

- příprava proteáz ze šťáv posbíraných z rostlin v Botanické zahradě v Praze-Troji
- ověření vhodných reakčních podmínek
- testování proteáz na vybraných proteinech při podmínkách vhodných pro HXMS
- určení štěpných preferencí na testovaných proteinech pomocí peptidového mapování

3 Experimentální část

3.1 Seznam použitého materiálu a přístroje

3.1.1 Přístroje a pomůcky

- analytické váhy ML104 *Mettler, Švýcarsko*
- aparatura na vertikální gelovou elektroforesu Mighty Small *Hoefler, USA*
- automatické pipety *Gilson, Francie / Thermo Scientific, USA*
- blokový ohříváč BTD *Grant Instruments, UK*
- centrifuga J-6M (výkyvný rotor JS-5.2) *Beckman-Coulter, USA*
- centrifuga Z 233 MK-2 (úhlový rotor 220.87 VO5/6) *Hermle, SRN*
- centrifuga Avanti J-26-XP (úhlový rotor JLA 16,250) *Beckman-Coulter, USA*
- HPLC pumpa Shimadzu LC-20AD *Shimadzu, USA*
- HPLC systém Agilent 1200 *Agilent Technologies, SRN*
- hlubokomrazicí box $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ C585-86 *New Brunswick Scientific, USA*
- hmotnostní spektrometr QeApex Ultra *Bruker Daltonics, SRN*
- hmotnostní spektrometr UltraFlex III *Bruker Daltonics, SRN*
- jednorázové plastové Pasteurovy pipety Kartell *Elisabeth Pharmacon, ČR*
- koncentrační cela Amicon 8200 200 ml s membránou Amicon PM10 *Merck, SRN*
- mikrostřikačky Hamilton 100 μl *Hamilton, Švýcarsko*
- pH elektroda Biotrode *Hamilton, Švýcarsko*
- pH metr Orion2 Star *Thermo Scientific, USA*
- předvážky PCB 1600-2 *Kern, SRN*
- sonikátor Sonorex RK52H *Bandelin, SRN*
- UV/VIS spektrofotometr NanoDrop 2000c/2000 *Thermo Scientific, USA*
- stolní centrifuga 5415R (úhlový rotor F45-24-11) *Eppendorf, SRN*
- stolní centrifuga MiniSpin (úhlový rotor F45-12-11) *Eppendorf, SRN*
- stolní mikrocentrifuga Spektrafuge 16M (úhlový rotor) *Labnet, USA*
- třepačka Boekel BFR 25 *Grant, UK*
- ultrafiltrační koncentrátoary Amicon-Ultra 0,5 10K *Merck, SRN*
- ultrafiltrační koncentrátoary Amicon-Ultra 15 10K *Merck, SRN*
- univerzální indikátorové papírky *Lachner, ČR*
- vodní lázeň WB10 *Memmert, SRN*

- vortex Wizard *Velp Scientifica, Itálie*
 - zdroj napětí PowerPac Universal *Bio-Rad, USA*
- 3.1.2 Chemikálie**
- acetonitril, Lichrosolv LC-MS hypergrade *Merck, SRN*
 - Bicinchoninic Acid Kit *Sigma, USA*
 - Coomassie Brilliant Blue R250 *Fluka, SRN*
 - Cytochrom C *Sigma, USA*
 - dusičnan stříbrný, p.a. *Fluka, SRN*
 - ethanol, p.a. *Lachner, ČR*
 - formaldehyd $\geq 37\%$, p.a. *Fluka, SRN*
 - glycin *Sigma, USA*
 - H₂O, Lichrosolv LC-MS hypergrade *Merck, SRN*
 - hovězí sérový albumin *Serva, SRN*
 - kyselina 4-hydroxy-3,5-dimethoxyskořicová *Bruker Daltonics, SRN*
 - kyselina octová, p.a. *Lachner, ČR*
 - kyselina p-hydroxy- α -kyanoskořicová *Bruker Daltonics, SRN*
 - MALDI peptidový kalibrační standard II *Bruker Daltonics, SRN*
 - MALDI proteinový kalibrační standard I a II *Bruker Daltonics, SRN*
 - methanol, p.a. *Lachner, ČR*
 - monohydrát ethylendiamintetraoctanu sodného, p.a. *Fluka, SRN*
 - myoglobin *Sigma, USA*
 - pepstatin A-agarosa *Sigma, USA*
 - peroxidisíran amonný *Bio-Rad, USA*
 - proteinový standard pro elektroforézu SeeBlue Prestained *Invitrogen, USA*
 - tetramethylethylenediamin *Bio-Rad, USA*
 - thiosíran sodný pentahydrát, p.a. *Sigma, USA*
 - Tris base *Fluka, SRN*
 - uhličitan sodný monohydrát, p.a. *Fluka, SRN*
 - 10% roztok dodecylsulfátu sodného *Bio-Rad, USA*
 - 30% (v/v) akrylamid:N,N'-methylen-bis-akrylamid (29:1) *Bio-Rad, USA*
 - 32% kyselina chlorovodíková *Fluka, SRN*

- 0,5M Tris-Cl pH 8,8 *Bio-Rad, USA*
- 1,5M Tris-Cl pH 6,8 *Bio-Rad, USA*
- 10× koncentrovaný Tris-glycin-dodecylsulfátový pufr *Bio-Rad, USA*

3.1.3 Pufry a solventy

- **50mM glycin-Cl pufr pH 2,5:** 3,75 g glycin, do 1000 ml H₂O, pH upraveno 200mM kyselinou chlorovodíkovou
- **50mM Tris-Cl pH 10:** 30,3 mg Tris base, do 5 ml H₂O, pH upraveno 200mM kyselinou chlorovodíkovou
- **2× vzorkový pufr pro SDS-PAGE:** 100mM Tris-Cl pH 6,8, 4% dodecylsulfát sodný, bromfenolová modř, 20% glycerol
- **Coomassie Brilliant Blue barvicí roztok pro SDS-PAGE gely:** 1,25 g CBB-R250, 450 ml H₂O, 50 ml ethanol
- **odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely:** 10% kyselina octová, 35% ethanol, 55% H₂O
- **fixační roztok pro barvení gelů stříbrem:** 50% methanol, 10% kyselina octová, před použitím přidáno 25 µl 37% formaldehydu na 50 ml roztoku
- **impregnační roztok pro barvení gelů stříbrem:** 0,1 g AgNO₃ v 50 ml H₂O, bezprostředně před použitím přidáno 37,5 µl 37% formaldehydu
- **vyvolávací roztok pro barvení gelů stříbrem:** 3 g Na₂CO₃.H₂O v 50 ml H₂O, bezprostředně před použitím přidáno 25 µl 37% formaldehydu a 100 µl 0,2% roztoku Na₂S₂O₃
- **solvent A pro chromatografii na obrácené fázi (z LC-MS hypergrade solventů):** 2% acetonitril, 0,4% kyselina mravenčí ve vodě
- **solvent B pro chromatografii na obrácené fázi (z LC-MS hypergrade solventů):** 95% acetonitril, 0,4% kyselina mravenčí, 4,6% H₂O

3.1.4 Software

- mMass 5.4.0 *<http://www.mmass.org/> [27]*
- Mascot 2.2 *Matrix Science, UK*
- Data Analysis 4.0 *Bruker Daltonics, SRN*
- MSTools *<http://ms.biomed.cas.cz/MSTools/> [28]*
- Microsoft Excel 2010 *Microsoft*

3.2 Experimentální metody

3.2.1 Příprava šťáv z pastí láčkovek

3.2.1.1 Sběr šťáv z láčkovek (*Nepenthes*)

Vzorky (šťávy) z pastí láčkovek pěstovaných ve skleníku pražské Botanické zahrady v Troji ve dvou oddělených částech (skleník hory/nížiny) byly vybírány plastovými pipetami do kónických zkumavek (objem 14/50 ml) a mikrozkušavek. U každého vzorku bylo změřeno pH univerzálním pH papírkem a přednostně byly vybírány pasti s kyselým pH. Vzorky z rostlin byly drženy druhově oddělené u obou sběrů (první a druhý sběr).

3.2.1.2 Odstranění hrubých nečistot

Šťávy posbírané v botanické zahradě do kónických zkumavek (14 a 50 ml) a mikrozkušavek byly odstředěny na centrifuze Beckman Coulter Avanti J-26-XP s úhlovým rotorem JLA 16,250 při 10 000 rpm, 4 °C po dobu 10 minut. Pro menší objemy v mikrozkušavkách byla použita stolní Mikrocentrifuga Z 233 M-2 Hermle s rotorem 220.87 VO 5/6 a šťávy byly odstředovány po dobu 10 minut při 15 200 rpm a 4 °C. Supernatant byl přenesen do čistých zkumavek a u všech šťáv byla zaznamenána barva, přibližná hodnota pH (univerzálním pH papírkem), objem a viskozita, které byly zaneseny do přehledné tabulky. U prvního sběru byly šťávy horských resp. nížinných druhů nepenthesinů slity a dále děleny jen na horské (přibližný objem šťáv 90 ml) a nížinné (přibližný objem šťáv 120 ml). U druhého sběru byly šťávy drženy druhově oddělené pro sledování možných mezidruhových rozdílů a vytipování vhodných druhů pro další testování. Takto hrubě očištěné šťávy zbavené hmyzu a napadaných nečistot byly zamraženy při -80 °C.

3.2.1.3 Aktivace proteáz v nízkém pH, čištění roztoků od jemných nečistot a koncentrování aktivovaných roztoků proteáz

U prvního sběru byly šťávy doplněny 1:1 1M glycin-Cl puforem pH 2,5, pH bylo překontrolováno univerzálním pH papírkem a roztoky byly ponechány inkubovat přes noc ve tmě při 21 °C. Z aktivovaných vzorků bylo odebráno 5 ml u prvního sběru a zamraženo při -80 °C pro pozdější testování aktivity a proteinové stanovení. Pro velkoobjemovou koncentraci byla použita aparatura Amicon 8200 s polyethersulfonovou membránou Amicon PM 10 do které byly přelity vzorky aktivovaných proteáz a při tlaku dusíku

4,5 bar byly koncentrovány na objem přibližně 25 ml. Tento objem byl posléze doplněn 1M glycin-Cl pufrem pH 2,5 do 100 ml a znovu zakoncentrován na 25 ml. Tento postup byl opakován 5× a po pátém doplnění byl roztok zakoncentrován do 10 ml. Filtrát byl jímán a zamražen pro testy aktivity. Koncentrované vzorky o objemu 10 ml byly přelity do Amicon Ultra-15 centrifugačních ultrafiltračních koncentrátorů s celulosovou membránou s nominální propustností 10 kDa, zkumavky byly vloženy do centrifugačních adaptérů a vyváženy. Koncentrování bylo prováděno v centrifuze Beckman J6-M s výkyvným rotorem J-S 5.2 při 4000 rpm a 4 °C po dobu 5-15 minut a pro jemné redukce objemu byly otáčky sníženy na 2000 rpm a průběh koncentrování byl kontrolován po 5 minutách. Výsledný objem 250 µl byl přenesen automatickou pipetou do mikrozkušavek Eppendorf a koncentráty byly zamraženy při -4 °C.

U druhého sběru byly vybrány 3 druhy nížinné a 3 druhy horské podle kyselosti (roztoky neutrální vs. kyselé) a viskozity (roztoky nezředěné vs. viskózní), od každého byly odebrány 3 ml a v kónických zkumavkách o objemu 50 ml doplněny 1:4 50mM glycin-Cl pufrem pH 2,5. U všech šťáv bylo proměřeno pH universálním pH papírkem. Takto připravené roztoky byly nechány inkubovat přes noc ve tmě při 21 °C. Z aktivovaných vzorků bylo odebráno 0,5 ml a opět zamraženo při -80 °C pro pozdější testování aktivity a proteinové stanovení. Aktivované vzorky byly přelity do Amicon Ultra-15 centrifugačních ultrafiltračních koncentrátorů s celulosovou membránou s nominální propustností 10 kDa, zkumavky byly vloženy do centrifugačních adaptérů a vyváženy. Koncentrování bylo prováděno v centrifuze Beckman J6-M s výkyvným rotorem J-S 5.2 při 4000 rpm a 4 °C po dobu 5-15 minut a pro jemné redukce objemu byly otáčky sníženy na 2000 rpm a průběh koncentrování byl kontrolován po 5 minutách. Koncentrované šťávy byly opakovaně ředěny a při dosažení objemu 1 ml do 10 ml 50mM glycin-Cl pufrem pH 2,5 a postup byl opět opakován pětkrát. Výsledné zakoncentrování z objemu 250 µl bylo provedeno v Amicon Ultra-0,5 ml ultrafiltračních koncentrátorech pro purifikaci a koncentrování proteinů s nominální propustností 10 kDa na konečný objem 50 µl ve stolní mikrocetrifuze Spektrafuge 16M Labnet s úhlovým rotorem o poloměru 7,3 cm při 9000 rpm a po 3-5 minutách byly roztoky kontrolovány a pro jemnější dokoncentrování byly otáčky sníženy na 6000 rpm. Takto zakoncentrované proteázy byly přeneseny automatickou pipetou do mikrozkušavek Eppendorf a zamraženy při -4 °C.

3.2.2 SDS-PAGE (diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného)

Byl připraven 10% separační polyakrylamidový gel s 5% zaostřovacím gelem, podle protokolu (viz tab. 1). Mezi připravená skla byl nanesen nejprve 10% separační polyakrylamidový gel a převrstven 1 ml destilované vody. Po 30 minutách byla voda odlita a zpolymerovaný gel byl převrstven 5% zaostřovacím gelem, do kterého byl vložen hřeben a gel byl ponechán polymerovat 30 minut. Připravený gel byl umístěn do aparatury pro vertikální gelovou elektroforézu Mighty Small. Po nanesení vzorků do jamek v 5% zaostřovacím gelu bylo spuštěna elektroforéza, která probíhala v Tris-glycin-dodecylsulfátovém elektrodozem pufru při napětí 90 V až do doputování barevného čela elektroforézy do 10% dělicího gelu a poté bylo napětí zvýšeno na 140 V. Při tomto napětí probíhalo dělení 40-60 minut (podle postupu barevného čela nanesených vzorků).

Tabulka 1. Složení roztoků pro přípravu SDS-PAGE gelů. Objemy v 1. a 3. sloupci představují složení roztoků pro 2 gely tloušťky 1,5 mm, v 2. a 4. sloupci složení roztoků pro 2 gely tloušťky 0,75 mm.

	10% separační gel [ml]		5% dělicí gel [ml]	
H ₂ O	8,0	4,0	4,2	2,1
30% akrylamid:bisakrylamid mix	6,6	3,3	1,0	0,5
1,5M Tris-Cl, pH 8,8	5,0	2,5	-	-
0,5M Tris-Cl, pH 6,8	-	-	0,76	0,38
10% SDS	0,2	0,1	0,06	0,03
10% APS	0,2	0,1	0,06	0,03
TEMED	0,008	0,004	0,006	0,003

Po ukončení elektroforézy byly proteiny v gelu vizualizovány barvením roztokem Coomassie Brilliant Blue R250 po dobu 30 minut a poté odbarvením gelů pomocí odbarvovacího roztoku. Pro vizualizaci vzorků proteinového stanovení byly gely barveny stříbrem. Gely byly hodinu oplachovány v 50 ml (každý gel zvlášť) fixačního roztoku. Poté byly za stálého míchání na třepačce 3× propláchnuty 5 minut v 50 ml 50% ethanolu dále 1 minutu v 50 ml 0,2% roztoku thiosíranu sodného a 3× opláchnuty 20 sekund destilovanou vodou. Následně byly 20 minut za stálého míchání ponechány v 50 ml impregnačního roztoku. Po inkubaci s impregnačním roztokem byly gely 2× propláchnuty 20 sekund destilovanou vodou a ke gelům bylo přidáno 50 ml vyvolávacího roztoku. Po 3-5 minutách byl vyvolávací roztok odmyt 2×50 ml destilované vody a reakce byla zastavena 50 ml 1,5% roztoku EDTA.

3.2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je citlivá, rychlá a specifická metoda pro měření hmotností různých látek. Ve spojení s měkkými ionizačními technikami, mezi které patří ionizace/desorpce laserem za asistence matrice (MALDI) a ionizace elektrosprejem (ESI), ji lze využít pro práci například s peptidy, proteiny, nukleovými kyselinami a sacharidy.

Při ionizaci MALDI je analytu smíšenému s vhodnou matricí udělen náboj a je převeden do plynné fáze pomocí laserového pulzu. Tímto způsobem vznikají jednonásobně nabitě pseudomolekulární ionty ($M+H^+$). Jako matrice jsou používány aromatické kyseliny absorbující záření o vlnové délce použitého laseru a přenášející proton na molekulu analytu. Podmínkou pro použitou matrici je stabilita ve vakuu, matrice musí být netěkavé a snadno mísitelné s analytem. Příprava vzorků je rychlá a jednoduchá díky relativní toleranci k detergentům a solím a lze analyzovat i neodsolené vzorky. Spojením s průletovým analyzátozem (TOF = Time Of Flight) získáme instrumentaci MALDI-TOF, mající neomezený hmotností rozsah měření, vysoké rozlišení, přesnost a umožňující rychlou analýzu i interpretaci dat.

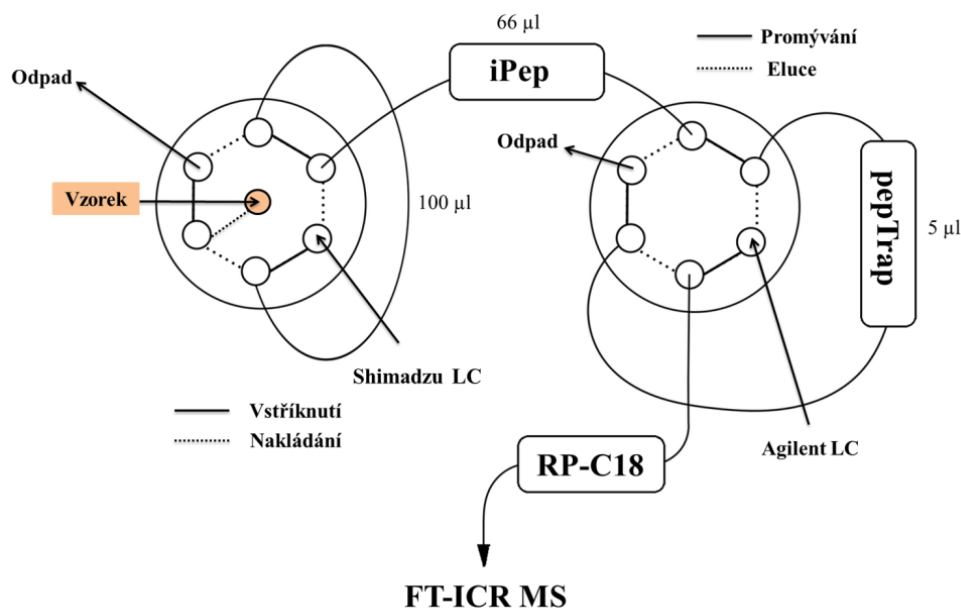
Při ionizaci elektrosprejem (ESI) je roztok analytu veden kapilárou s vloženým napětím (~ 5 kV), na jejímž konci je rozprašován a kapičky nabitého analytu jsou vysoušeny proudem ohřátého dusíku. V tomto okamžiku dochází ke zmenšování povrchu jednotlivých kapének, k repulzi náboje a nakonec ke Coulombické explozi. Tímto způsobem vznikají mnohonásobně nabitě ionty. Výhodou použití elektrospreje je také možnost přímého propojení s vysokotlakou kapalinovou chromatografií. Nejčastěji používaná je chromatografie na obrácené fázi, která slouží jak k odsolení analytu, tak k jeho separaci. V našem případě bylo využito spojení HPLC na obrácené fázi s hmotnostním spektrometrem pracujícím na principu iontově cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) vybaveného ESI zdrojem. V tomto analyzátozu jsou ionty vystaveny působení silného magnetického pole, a vybuzený cyklotronový pohyb indukuje signál, který je amplifikován a detekován. Signál je poté vyhodnocen pomocí Fourierovy transformace a výstupem je spektrum závislosti intenzity signálu na m/z iontu. Tento přístroj byl používán v módu data-dependentní analýzy a byly na něm prováděny kolizní experimenty, konkrétně kolizně indukovaná disociace (CID), které umožňují strukturní analýzu dané látky. V našem případě se jednalo o určení primární sekvence peptidů prostřednictvím porovnávání kolizních spekter s proteinovými databázemi.

3.2.3.1 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Měření hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF probíhala následovně. Z připravených reakcí a roztoků bylo odebráno 0,5 μ l, naneseo na MALDI desku a následně převrstveno 0,5 μ l matrice, kyseliny 4-hydroxy-3,5-dimethoxyskořicové (SA) (nasycený roztok v 50% acetonitrilu). Stejně vzorky byly po 0,5 μ l opět naneseo na MALDI desku a po zaschnutí převrstveny 0,5 μ l matrice, kyseliny p-hydroxy- α -kyanoskořicové (CCA) (1:1:1 H₂O:acetonitril:nasycený roztok CCA v methanolu). Na různé kalibrační pozice byl naneseo vždy 1 μ l proteinových kalibračních směsí ProtMix I (6,7-16,9 kDa) nebo ProtMix II (22,3-66,5 kDa) a převrstven 1 μ l matrice SA. Jako peptidový kalibrační roztok bylo naneseo 0,5 μ l peptidového kalibračního standardu II a po zaschnutí převrstveno 0,5 μ l roztoku matrice CCA. Po zaschnutí matrice byla MALDI deska vložena do instrumentu. Všechna měření byla prováděna v pozitivním iontovém módu. Byla provedena externí kalibrace na naneseo standardy a energie laseru byla experimentálně nastavena dle intenzit, odstupu signálu od šumu a rozlišení kalibračních píků. Data byla sbírána v rozsahu m/z 700 – 4500 pro peptidy a pro proteiny v rozsahu m/z 5000 – 45000. Výsledné hmotnostní spektrum bylo získáno akumulací spekter z jednotlivých laserových pulsů, které byly manuálně zaměřeny na různá místa pozice se vzorkem. Data byla vyhodnocena v programu Data Analysis 4.0 nebo programu mMass v. 5.0.4.

3.2.3.2 Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Analýza pomocí HPLC-ESI-MS/MS probíhá nastříknutím analyzované směsi na systém skládající se z nástřikového a přepínacího ventilu, předkolony a analytické kolony, případně kolony s imobilizovaným pepsinem (obr. 9, str. 27). Celý tento systém je navíc ponořen do lázně voda-led, mající teplotu ~ 0 °C pro vytvoření podmínek shodných s podmínkami používanými při HXMS experimentech. Pro menší proteiny produkující po digesci méně peptidů byla v našem případě použita metoda NepTest_HD_MSMS_N.m trvající 30 minut a pro větší proteiny byla použita delší metoda HPP_HD_MSMS_N-Nep-test.m trvající 45 minut s gradienty solventu viz tab. 2 (str. 28). Data byla zpracovávána v programu Data Analysis 4.0 kde byla nastavena metoda LCMSMS.m. Spektra byla vyhlazena a přiřazeny hodnoty m/z k jednotlivým signálům.



Obrázek 9. Schéma zapojení HPLC systému. Systém se sestává z nástřikového ventilu se 100 µl smyčkou. Z něj je vzorek pomocí isokratické eluce (Shimadzu LC) eluován na předklonu (pepTrap) zapojenou na druhém, přepínacím ventilu. V případě on-line digesce vzorek ještě před zachycením na předkloně prochází přes kolonku s imobilizovaným pepsinem (iPep – POROS 20AL + pepsin, 66 µl). Peptidy zachycené na předkloně jsou zakonzentrovány a odsoleny. Následně je přepnutím ventilu zařazena předklonová do průtoku z druhého HPLC (Agilent LC) a je provedena gradientová eluce a separace na analytické koloně s obrácenou fází (RP-C18 – Jupiter C18, 0,5*50 mm, 300 Å, 5 µm). Výstup z kolony je přímo napojen do ESI zdroje hmotnostního spektrometru. Celý systém je chlazen ponořením do lázně voda-led a pH solventu je nastaveno na hodnotu 2,5.

Soubor byl exportován ve formátu podporovaném programem Mascot 2.2, kterým byl posléze porovnán s databází tvořenou sekvencí příslušného proteinu. V nastavení nebyly uváděny fixní ani variabilní modifikace, pouze pro cytochrom C bylo zadáno do variabilních modifikací možné zapojení cysteinů do disulfidických můstků a modifikace cysteinu hemovou skupinou. Další nastavení bylo následující: chyba měření prekurzoru 10 ppm a fragmentových iontů 0,05 Da; žádné enzymové štěpení, monoizotopická hmotnost. Z výsledků identifikace byla do programu Microsoft Excel 2010 vložena pořadová čísla prvních a posledních aminokyselin příslušných peptidů a název proteázy, kterou byl protein štěpen a soubor byl uložen ve formátu txt. Ten byl zpracován za pomoci MSTools konkrétně programem pro kreslení proteinových map (Draw Map).

Z map nakreslených v programu Draw Map byly určeny štěpné preference nepenthesinů (P_1 , P_1') a srovnány se štěpnými preferencemi imobilizovaného pepsinu testovaného na stejné sadě proteinů. Pro analýzy byly použity následující proteiny: myoglobin – Mb, translokační doména záškrtového toxinu – DT, peptidyl-prolyl cis-trans isomeráza - SlyD, cytochrom C – CytC, hydrogenosomální procesující peptidáza – HPP. Štěpné preference

byly vyneseny do grafu pro každou aminokyselinu jako procenta z celkového počtu štěpných míst.

Tabulka 2. Profil gradientu pro separaci peptidů na koloně s obrácenou fází pro obě použité metody. Data byla sbírána v případě metody HPP_HD_MSMS_N-Nep-test.m v čase 3 až 33 minut a pro metodu NepTest_HD_MSMS_N.m v rozmezí 3 až 20 minut.

HPP_HD_MSMS_N-Nep-test.m			NepTest_HD_MSMS_N.m		
t [min]	Solvent A [%]	Solvent B [%]	t [min]	Solvent A [%]	Solvent B [%]
0,00	90,0	10,0	0,00	90,0	10,0
3,00	90,0	10,0	3,00	90,0	10,0
33,00	65,0	35,0	15,00	55,0	45,0
33,10	1,0	99,0	20,00	55,0	44,0
38,00	1,0	99,0	20,10	1,0	99,0
38,10	90,0	10,0	25,00	1,0	99,0
44,90	90,0	10,0	25,10	90,0	10,0
45,00			29,90	90,0	10,0
			30,00		

3.2.4 Proteinový profil šťáv

3.2.4.1 SDS-PAGE (diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného)

Pro vizualizaci obsahu proteinů v prvním sběru bylo smícháno vždy 10 µl 1M glycin-Cl pufru pH 2,5 bylo přidáno 10 µl vzorku (zakoncentrované nebo nezakoncentrované šťávy, filtrát). K takto zředěným roztokům proteáz bylo přidáno 10 µl Tris-Cl pH 8,8 pro upravení pH. Pro druhý sběr byly smíchány vždy 2 µl vzorku (zakoncentrované nebo nezakoncentrované šťávy) 5 µl 50mM glycin-Cl pufru a poté byl přidán 1 µl Tris-Cl pH 8,8 pro upravení pH. Připravené vzorky byly smíchány v poměru 1:1 se vzorkovým pufrům a zahřáty na 85 °C po dobu 10 minut a posléze v objemu 25 µl pro první sběr a 14 µl pro druhý sběr naneseny do jamek na 10% separační polyakrylamidový gel s 5% zaostřovacím gelem. Spolu se vzorky byl na gel nanesen proteinový standard SeeBlue v objemu 7,5 µl pro první sběr 5 µl pro druhý sběr. Průběh elektroforézy a příprava gelů viz. 3.2.2.

3.2.4.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů za pomoci kyseliny bicinchoninové

Nejprve byla připravena ředící řada BSA o koncentracích 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 a 2 mg/ml v destilované vodě ze zásobního roztoku o koncentraci 10 mg/ml. Poté byla

smíchána reakční činidla v poměru 1:50 (roztok síranu měďnatého:BCA) v celkovém objemu 1020 μ l. Do čistých mikrozkušavek byly pipetovány 2 μ l vzorků z druhého sběru dělených druhově a v případě kalibrační řady 2 μ l roztoků BSA o koncentracích uvedených výše a k těmto objemům bylo přidáno 40 μ l připraveného reakčního činidla. Takto připravené vzorky byly ponechány inkubovat při 37 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí reakční doby byla na UV/VIS spektrofotometru NanoDrop 2000c/2000 změřena absorbance vzorků. Byla použita metoda „Protein BCA“, kdy je měřena absorbance vzorků při 562 nm a normalizační měření probíhá při 750 nm. Nejprve byla proměřena absorbance kalibrační řady o známých koncentracích BSA, ze které přístroj vypočítal koncentraci proteinů ve vzorcích z naměřené absorbance. Všechna měření byla prováděna v triplicátech a do přístroje byly nanášeny 2 μ l vzorků. Optická dráha byla přístrojem upravována na 1 mm a hodnoty koncentrace byly uvedeny v jednotkách mg/ml.

3.2.4.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Proteinový profil proteáz byl měřen u roztoků proteáz prvního a druhého sběru připravených odebráním 2 μ l vzorku (koncentrované nebo nekoncentrované šťávy) a smícháním s 15 μ l 50mM glycin-Cl pufru pH 2,5. Roztok pepsinu i myoglobinu byl připraven smícháním 1 μ l roztoku pepsinu/myoglobinu o koncentraci 5 mg/ml s 15 μ l 50mM glycin-Cl pufru pH 2,5. Dále bylo se vzorky nakládáno podle 3.2.3.1.

3.2.5 Testování aktivity

3.2.5.1 SDS-PAGE (diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného)

Reakce pro testování aktivity za pomoci elektroforézy byly prováděny pro první sběr smícháním 5 μ l hovězího sérového albuminu o koncentraci 2 mg/ml s 5 μ l 1M glycin-Cl pufrům pH 2,5. K takto připraveným roztokům proteinu bylo přidáno 10 μ l vzorků (koncentrovaných nebo nekoncentrovaných šťáv či filtrátu) a směsi byly ponechány reagovat při 10 °C ve vodní lázni s ledem po dobu 10 minut. Ke kontrolnímu vzorku bylo místo vzorku proteáz přidáno stejné množství 1M glycin-Cl pufru pH 2,5. Po uplynutí reakční doby bylo k reakcím přidáno prvního sběru 10 μ l pufru Tris-Cl pH 8,8 pro zastavení reakce a úpravu pH. Poté byly vzorky smíchány 1:1 s vzorkovým pufrům a byly zahřáty na 85 °C po dobu 10 minut. Vzorky byly v objemu 25 μ l naneseny do jamek na

10% separační polyakrylamidový gel s 5% zaostřovacím gelem. Příprava gelů a průběh elektroforézy viz 3.2.2.

3.2.5.2 Spektrofotometrické stanovení aktivity

Nejprve byl připraven roztok myoglobinu o koncentraci 20 mg/ml v 50mM glycin-Cl pufru pH 2,5. Do mikrozkušavek bylo pipetováno 10 μ l tohoto roztoku myoglobinu a poté byly přidány 2 μ l vzorků (*N. ramispina*, *N. ventricosa*, *N. fusca*, *N. globosa*, *N. ampullaria*, *N. reinwardtiana* - koncentrovaných). Reakce byla inkubována při 37 °C po dobu 30 minut. Po uplynutí reakční doby bylo k reakcím přidáno 20 μ l 5% TCA pro sražení neštěpeného proteinu a po jemném míchání za pomoci vortexu byla reakce inkubována při 37 °C po dobu 5 minut. Slepé vzorky ke každé reakci byly pipetovány v následujícím pořadí složek: 10 μ l myoglobinu koncentrace 20 mg/ml, inkubace při 37 °C po dobu 30 minut, 20 μ l 5% TCA, jemné míchání za pomoci vortexu, inkubace po dobu 5 minut, 2 μ l vzorků proteáz (*N. ramispina*, *N. ventricosa*, *N. fusca*, *N. globosa*, *N. ampullaria*, *N. reinwardtiana* - koncentrovaných). K odstředění vzorků byla použita stolní centrifuga Eppendorf 5415R s úhlovým rotorem F 45-24-11. Vzorky byly odstředovány při 13 200 rpm a 20 °C po dobu 5 minut. Do čistým mikrozkušavek bylo odebráno 20 μ l supernatantu odstředěných vzorků. Ve vzorcích byla posléze měřena absorbance při 280 nm UV/VIS spektrofotometrem NanoDrop 2000c/2000 za použití metody „Protein A280“. Normalizační měření bylo prováděno při 340 nm a zvoleno standardní nastavení 1 Abs = 1 mg/ml. Před každým vzorkem byl proměřen příslušný slepý vzorek, na který byl přístroj vynulován a poté byla 3 \times proměřena absorbance vzorku.

3.2.5.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Měření aktivity pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie je prováděno analýzou reakční směsi proteinu s roztokem studované proteázy. Pro každý vzorek je změřeno jak peptidové tak proteinové spektrum, které je porovnáno se spektrem stejného proteinu o totožné koncentraci ovšem bez přidané proteázy. Je sledován úbytek intenzity signálu v případě reakční směsi a zároveň tvorba peptidů po proteolýze. Aktivita studovaných proteáz byla v našem případě srovnávána pro různé druhy a zároveň s pepsinem A, jako běžně používanou aspartátovou proteázou při vodík/deuteriové výměně. Peptidová spektra byla měřena s matricí CCA, pro proteinová spektra byla použita matrice SA.

Pro test aktivity bylo smícháno vždy 15 μ l 50mM glycin-Cl pufru pH 2,5 a 1 μ l myoglobinu o koncentraci 5 mg/ml. K takto připraveným roztokům byly přidány 2 μ l vzorků z prvního a druhého sběru (koncentrovaných nebo nekoncentrovaných extraktů z pastí láčkovek) popřípadě pepsin v poměru 1/1 (w/w) vůči substrátu a reakce byla inkubována při 10 °C ve vodní lázni po dobu 10 minut pro vzorky proteáz a po dobu 2 minut na ledu pro vzorek pepsinu. Dále bylo se vzorky nakládáno podle 3.2.3.1.

3.2.5.4 Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

Štěpení vybraných proteinů pro stanovení aktivity (myoglobin – Mb, translokační doména záškrtového toxinu – DT, peptidyl-prolyl cis-trans isomeráza – SlyD, cytochrom C – CytC, hydrogenosomální procesující peptidáza – HPP) bylo prováděno při podmínkách stanovených pomocí předchozího testování na proteinu Sly D. Proteiny HPP, SlyD a DT jsou rekombinantně připravené. HPP obsahuje podjednotku alfa a beta a na jeho alfa-podjednotce je připojena histidinová kotva pro purifikaci proteinu. Do každé reakce bylo smícháno 100 μ l 50mM glycin-Cl pufru pH 2,5, 2 μ l koncentrovaných proteáz (*N. ramispina*, *N. ventricosa*, NH-horské nepenthesiny prvního sběru) a 300 pmol proteinů Mb, SlyD, CytC, DT a v případě HPP bylo přidáno 400 pmol. Štěpení probíhalo po dobu 10min za teploty 10 °C. V případě štěpení proteinů pepsinem, nebyly přidávány proteázy a roztok byl přímo nanesen na kolonu s pepsinem imobilizovaným na nosiči POROS-20 AL a dále bylo postupováno podle 3.2.3.2.

3.2.6 Purifikace roztoku proteáz na kolonce s pepstatin A-Agarosou

Pepstatin, specifický inhibitor kyselých proteáz, je nízkomolekulární hexapeptid původně izolovaný z kultur různých druhů aktinomycet (*Actinomyces*) [29]. Jeho extrémně vysoká účinnost na kyselé proteázy je vysvětlována disociační konstantou, jejíž hodnota se pro prasečí pepsin pohybuje okolo 1×10^{-10} M. K inhibici dochází již při pikomolárních koncentracích pepstatinu přičemž hlavními strukturními elementy odpovědnými za inhibici jsou dva neobvyklé aminokyselinové zbytky 4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanové kyseliny (statinu) [30]. Specifické vazby aspartátových proteas na pepstatin lze využít i k jejich purifikaci. Za tím účelem je využíván pepstatin imobilizovaný na nosiči.

Pro purifikaci za pomoci pepstatin A-Agarosy byl vybrán druh *N.ventricosa*. Bylo odebráno 7,5 ml šťávy zamražené při –80 °C a smícháno 1:4 s 50mM glycin-Cl puftrem

pH 2,5 a ponecháno inkubovat přes noc ve tmě při 21 °C. Po ukončení inkubace byl aktivovaný vzorek koncentrován podle protokolu 3.2.1.3 pro druhý sběr na konečný objem 0,5 ml. Byly vyrobeny 2 centrifugační kolonky ze špiček na pipety 200 µl a mikrozkušavek o objemu 1,5 ml zploštěním konců špiček a následným vložením takto zploštělých špiček do mikrozkušavek s vyříznutým otvorem ve víčku. Každá kolonka byla naplněna 60 µl pepstatin A-Agarosy a vložena do Mini-centrifugy LX-200. V prvním kroku byl pepstatin okyselen nanáškou 2×50 µl 50mM glycin-Cl pufru pH 2,5. Ze zakoncentrovaného vzorku šťáv bylo odebráno 100 µl a poté bylo na obě kolony nanášeno 200 µl zbylých šťáv po 50 µl krocích. Odstředěný roztok nenavázaných proteáz byl jímán a uschován. Kolonky byly opláchnuty 2×50 µl 50mM glycin-Cl pufru pH 2,5 a v dalším kroku byly proteázy uvolněny z pepstatin A-Agarosy 10×50 µl 50mM Tris-Cl pufrům pH 10. Eluát byl opět jímán a převeden za pomoci Amicon Ultra-0,5 ml centrifugačních mikrozkušavek pro purifikaci a koncentrování proteinů s nominální propustností 10 kDa do 50 mM glycin-Cl pufru pH 2,5 (zakoncentrování a doplnění bylo provedeno 3×300 µl pufru) a eluát byl poté zakoncentrován na 50 µl. Oplach prováděný do 50 mM glycin-Cl pufrům byl zakoncentrován na 30 µl. Se zakoncentrovaným eluátem byl proveden test aktivity viz 3.2.5.3 s následným měřením hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF viz 3.2.3.1.

4 Výsledky

4.1 Příprava šťáv

Pro provedení experimentů (proteinové stanovení, stanovení aktivity apod.) bylo nutné roztoky nejprve koncentrovat, protože výchozí objemy byly velké a předpokládali jsme, podle informací z dostupných publikací, že izoláty z rostlin nejsou na proteázy bohaté. První sběr byl po aktivaci přes noc úspěšně koncentrován na aparatuře Amicon 8200 s membránou Amicon PM 10 při tlaku dusíku 4,5 bar na 10 ml nížinných a horských proteáz. Během koncentrace bylo sledováno, jestli koncentrovaný roztok nemění svou viskozitu v důsledku koncentrace. Tento proces měl zároveň zbavit roztoky nízkomolekulárních látek, převést proteázy do 1M glycin-Cl pufru pH 2,5 opakovaným vyředováním koncentrovaného roztoku se zbavit viskozity. Filtrát byl jímán a uschován, pro otestování aktivity. Bylo možné pozorovat rostoucí viskozitu retenátu při zmenšování objemu při koncentrování, která se po jednotlivých ředěních koncentrátu vytrácela. Roztoky ztrácely v průběhu koncentrace svou barvu, která ulpívala na membráně.

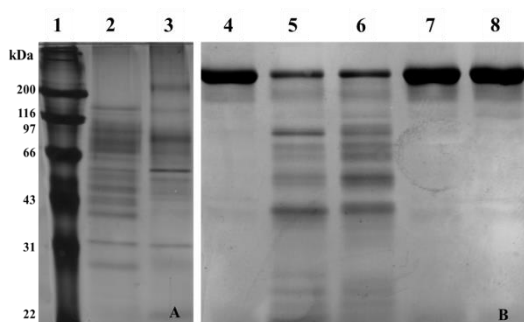
Při další koncentraci prvního a vybraných druhů druhého sběru (viz tab. 3) v centrifugačních zkumavkách Amicon Ultra-15 s celulosovou membránou s nominální propustností 10 kDa byla opět sledována měnící se viskozita v průběhu koncentrování, roztoky proteáz druhého sběru byly převáděny do 50mM glycin-Cl pufru pH 2,5 a zbavovány nízkomolekulárních nečistot. Barva ulpívala na membráně koncentrátorů stejně jako v případě koncentrování prvního sběru a koncentrování bylo postupem času pomalejší u obou sběrů.

Tabulka 3. Vybrané druhy láčkovek (rod *Nepenthes*) pro testování. Viskozita: (0) není viskozní, (*) slabě viskozní, (**) středně viskozní, (***) viskozní (posuzováno subjektivně při pipetování vzorků). pH: (0) neutrální 6-7, (*) slabě kyselé 5, (**) středně kyselé 4, (***) kyselé 2-3 (pH odhadováno/číslováno podle univerzálních pH papírků).

Katalogové označení	Latinský název	Viskozita	pH	Barva
Horské druhy				
N66	<i>N. ramispina</i>	***	***	žlutá
N83	<i>N. ventricosa</i>	**	**	červeno-hnědá
N26	<i>N. fusca</i>	**	**	žlutá
Nížinné druhy				
N107	<i>N. globosa</i>	0	*	oranžová
N67	<i>N. reinwardtiana</i>	0	0	bezbarvé
N05	<i>N. ampullaria</i>	**	0	bezbarvé

V případě druhého sběru byly objemy 250 µl přeneseny do Amicon Ultra-0,5 ml centrifugačních ultrafiltračních koncentrátů pro purifikaci a koncentrování proteinů s nominální propustností 10 kDa a výsledné objemy 250/50 µl byly v mikrozkuvkách zamrazeny pro další experimenty. U prvního sběru bylo před koncentrací odebráno 5 ml a u druhého 0,5 ml nekoncentrovaného roztoku pro porovnání testů aktivity a proteinových profilů.

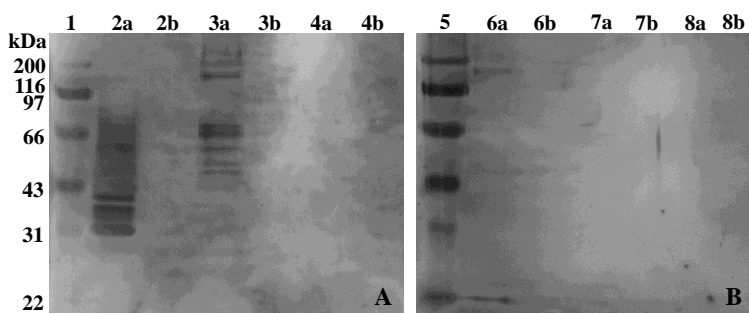
4.2 Analýza proteinových profilů a enzymové aktivity pomocí SDS-PAGE



Obrázek 10. Proteinový profil (A) a aktivní test (B) koncentrovaných nepenthesinů prvního sběru. 1 – standard molekulových hmotností; 2 – koncentrát horských nepenthesinů; 3 – koncentrát nížinných nepenthesinů; 4 – BSA; 5 – aktivita retenátu horských a 6 – nížinných nepenthesinů; 7 – aktivita filtrátu horských a 8 – nížinných nepenthesinů.

S koncentráty prvního sběru byly provedeny testy aktivity způsobem popsaným v části 3.2.2, abychom zjistili, zda jsme během koncentrace neztratili námi požadované proteázy nepenthesin I a II, tedy jestli aktivita, která by měla být výhradně v retenátu, není i ve filtrátu. Na obr. 10A je patrný rozdílný proteinový profil nížinného a horského koncentrátu a proteinová rozmanitost trávicích šťáv. Jak je vidět na gelu (obr. 10B), hovězí sérový albumin byl proteolyticky rozštěpen pouze ve vzorcích s koncentrátem (dráhy 2 a 3) a v dráhách 4 a 5, kde byla testována aktivita filtrátu, zůstal nenaštěpen.

Vzorky druhého sběru byly opět otestovány pomocí elektroforézy podle 3.2.2 (obr. 11). Na gelu jsou vidět proteinové profily pouze u koncentrovaných šťáv z *N. ramispina* a *N. ventricosa* (obr. 11, dráhy 2a a 3a). Nížinné druhy a horský druh *N. fusca* obsahovaly tak malé množství proteinů, že nebylo možné je vizualizovat. Gely byly barveny stříbrem, protože barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue R250 bylo



Obrázek 11. Proteinový profil koncentrovaných (A) a nekoncentrovaných (B) nepenthesinů druhého sběru. Gel A zobrazuje šťávy z *N. ramispina* (2), *N. ventricosa* (3) a *N. fusca* (4). Gel B zobrazuje šťávy z *N. globosa* (6), *N. reinwardtiana* (7) a *N. ampullaria* (8). Pozice 1 a 5 jsou proteinové standardy.

neúčinné. Jak je vidět na standardu prvního gelu (obr. 11, str. 34) bylo nutné gely přeexponovat a i přesto jsou proteiny ve vzorcích velice slabě viditelné a nevýrazné, což je způsobeno malým množstvím těchto proteinů.

4.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace proteinů a stanovení enzymové aktivity

Množství proteinů v koncentrovaných roztocích druhého sběru bylo určeno pomocí kalibrační přímky vytvořené na základě ředící řady hovězího sérového albuminu o koncentracích 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 a 2 mg/ml, která byla po reakci provedené podle 3.2.4 změřena spektrofotometrem NanoDrop 2000c/2000 UV/VIS za použití metody Protein BCA. Hodnoty koncentrace jsou uvedeny v tabulce č. 4 spolu se změřenými aktivitami, které byly testovány podle 3.2.5 a výsledné reakční směsi byly opět proměřeny spektrofotometrem NanoDrop 2000c/2000 UV/VIS metodou Protein A280, kdy je při 280 nm měřeno množství peptidů (nesoucích aromatické aminokyseliny) přítomných v roztoku po proteolýze myoglobinu. Jelikož proteázy nebyly purifikovány, ale bylo pracováno s trávicími šťávami obsahujícími nejen enzymy nepenthesin I a II ale i veškeré další proteiny vylučované rostlinou, pocházející z hmyzu či bakterií, neodpovídají koncentrace v tabulce č. 4 koncentracím pouze těchto enzymů, ale celkovému množství všech proteinů, které se v trávicí tekutině nacházejí.

Tabulka 4. Proteinové a aktivní stanovení pro vybrané druhy 2. sběru. Červeně jsou vyznačeny 2 druhy, které byly vybrány pro další experimenty, kvůli jejich vysoké aktivitě. Křížky u nížinných druhů znamenají nulovou aktivitu změřenou pomocí výše uvedené metody.

		Proteinové stanovení BCA	Stanovení aktivity
Horské	Druh	c/mg/ml	$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
N66	<i>N.ramispina</i>	1,39	22,0.10 ⁻³
N83	<i>N.ventricosa</i>	0,67	13,9.10 ⁻³
N26	<i>N.fusca</i>	0,32	4,0.10 ⁻³
Nížinné			
N67	<i>N.reinwardtiana</i>	0,14	x
N107	<i>N.globosa</i>	0,21	x
N04	<i>N.ampullaria</i>	0,68	x

To lze odvodit porovnáním koncentrace proteinů ve vzorcích s jejich aktivitou, kdy druh *N. ampullaria* s množstvím proteinů téměř shodným s *N. ventricosa*, nevykazoval aktivitu měřitelnou touto metodou, stejně jako zbylé nížinné druhy, na rozdíl od zmíněného druhu *N. ventricosa*, jehož aktivita byla $13,9\cdot 10^{-3} \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$. Není jasné, jaký je poměr

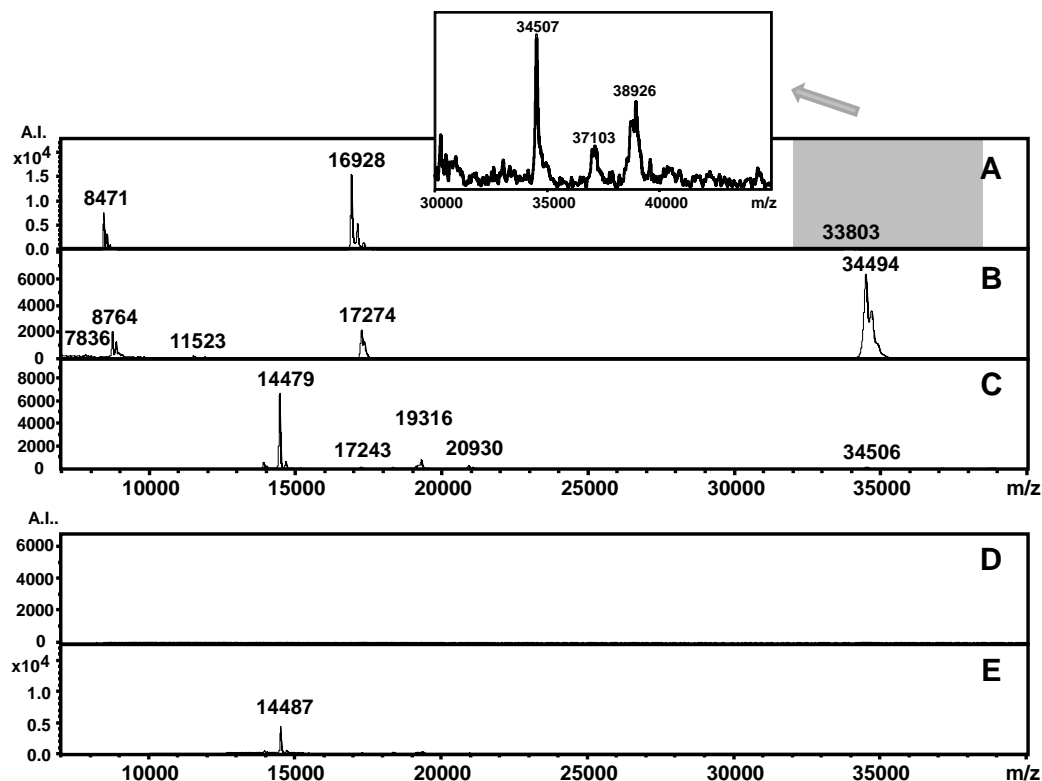
vlastních proteáz k ostatním proteinům ve směsi. Na základě určení aktivit jednotlivých druhů byly pro další experimenty vybrány dva druhy, jmenovitě *N. ramispina* a *N. ventricosa*.

4.4 Analýza proteinových profilů a enzymové aktivity pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

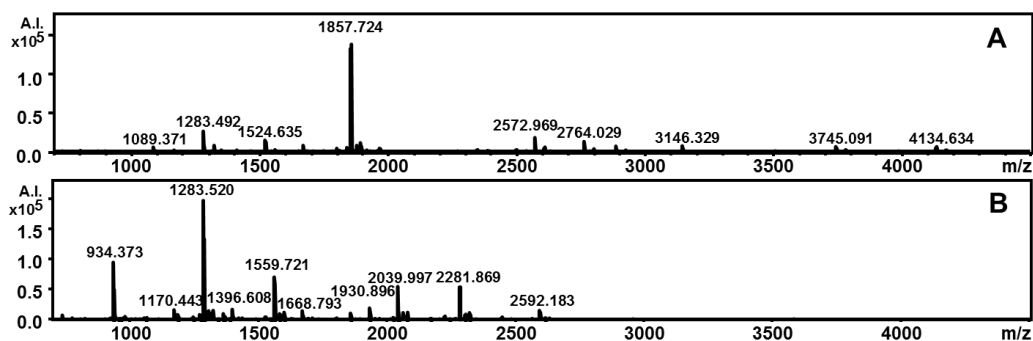
Pro ověření výsledků z elektroforézy byly proteinové profily šťáv a aktivitní testy sledovány pomocí hmotností spektrometrie technikou MALDI-TOF. Proteinové spektrum myoglobinu, na kterém byla aktivita testována, pepsinu, se kterým byly koncentráty srovnávány a koncentrátů šťáv prvního sběru jsou ukázány na obr. 12 A, B, C (str. 37) spolu s aktivitami pepsinu A a koncentrovaných horských šťáv měřených pro proteiny (obr. 12 D, E, str. 37). Myoglobin byl použit, protože nemá disulfidické můstky a je malý, díky čemuž je dobře měřitelný touto technikou. Na profilu horského koncentrátu (obr. 12 C, str. 37) z prvního sběru jsou patrné dva slabé signály kolem m/z 37 000 až 40 000 pravděpodobně odpovídající nepenthesinu I a II. Signál blíže m/z 40 000 je široký a neostrý což bývá typické pro glykosylované proteiny a mohlo by jít o Nepenthesin I. Nepenthesin II postrádá glykosylační místa a mohl by být představován signálem na 34 kDa.

Aktivitu lze zaznamenat pomocí MALDI tak, že je pozorován úbytek myoglobinu a společně s tím jsou sledovány přibývající peptidy. Na profilu peptidového spektra je možné pozorovat odlišnosti ve štěpných preferencích. Je-li vzorek nanesen za stejných podmínek a měřen se stejným nastavením, je možný semikvantitativní odhad. Po proteolýze pepsinem A u testů aktivity (obr. 12 D, str. 37) je myoglobin zcela rozštěpen a to platí také pro spektrum šťáv (obr. 12 E, str. 37). Ale je nutné brát v úvahu, že pepsin byl použit v poměru 1/1 (w/w) k substrátu a v případě šťáv byly přidány 2 μ l roztoku koncentrátů. Pro představu je možné odhadem vypočítat množství proteáz porovnáním gelu a proteinového stanovení pomocí BCA. Na gelovou elektroforézu byly nanášeny v případě druhého sběru 2 μ l koncentrovaných šťáv, celková koncentrace proteinů ve šťávě z *N. ramispina* byla podle proteinového stanovení 1,39 mg·ml⁻¹ a na gelu (obr. 11A, str. 34) je v oblasti nepenthesinů zóna odpovídající přibližně 5 % z celkových proteinů. Přepočtem se dostaneme k hodnotě přibližně 140 ng proteáz přidávaných do reakce. Je nutné brát také v úvahu přebarvení gelů, a tak celkové množství proteáz v reakci bude

asi ještě menší. Peptidová spektra (obr. 13) ukazují rozdílnost vznikajících fragmentů po proteolýze pepsinem A a koncentrátem horských šťáv. U pepsinu zůstávají větší fragmenty nerozštěpeny, zatímco koncentrát proteáz větší fragmenty štěpí a zůstávají pouze malé peptidy. Jsou patrné i některé shodné peptidy, jako například peptid s m/z 1283,5.



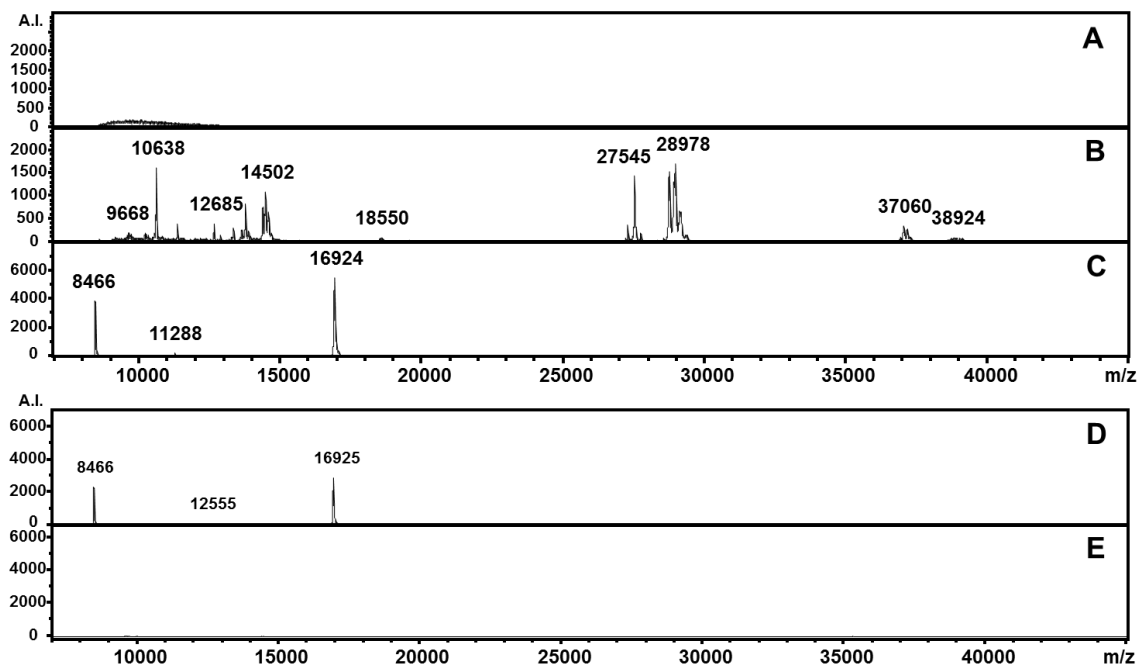
Obrázek 12. Srovnání proteinových spekter myoglobinu (A), pepsinu A (B), koncentrovaných horských šťáv (C) a jejich aktivit. Spektrum (D) představuje aktivitní test pepsinu A a spektrum (E) aktivitní test horských šťáv v roztoku s myoglobinem.



Obrázek 13. Peptidové spektrum aktivity pepsinu A (A) a koncentrovaných horských šťáv (B) v roztoku v myoglobinu.

Proces koncentrace druhého sběru je ukázán na spektrech (obr. 14, str. 38), kdy na proteinovém profilu nekoncentrovaného (A) a koncentrovaného (B) roztoku horského druhu *N. ramispina* je jasně viditelné nabohacení koncentrátu na proteiny a vystupují opět dva signály mezi m/z 37 000 až 40 000 představující pravděpodobně nepenthesin I a II.

Nekonzentrovaný vzorek je příliš zředěný a malé množství proteáz nebylo měřitelné, což koreluje s výsledky z gelové elektroforézy, kdy bylo možné vidět pouze proteinový profil koncentrovaných šťáv z *N. ramispina* a *N. ventrisoca*. Spektrum myoglobinu (obr. 14C) a následně spektra aktivity nekonzentrované šťávy (obr. 14D) v porovnání s koncentrovanou šťávou (obr. 14E) z *N. ramispina* ukazují, že nekonzentrovaná šťáva sice myoglobin naštěpila, jak je vidět na poklesu intenzity signálu, ale značná část proteinu zůstala nedotčena.

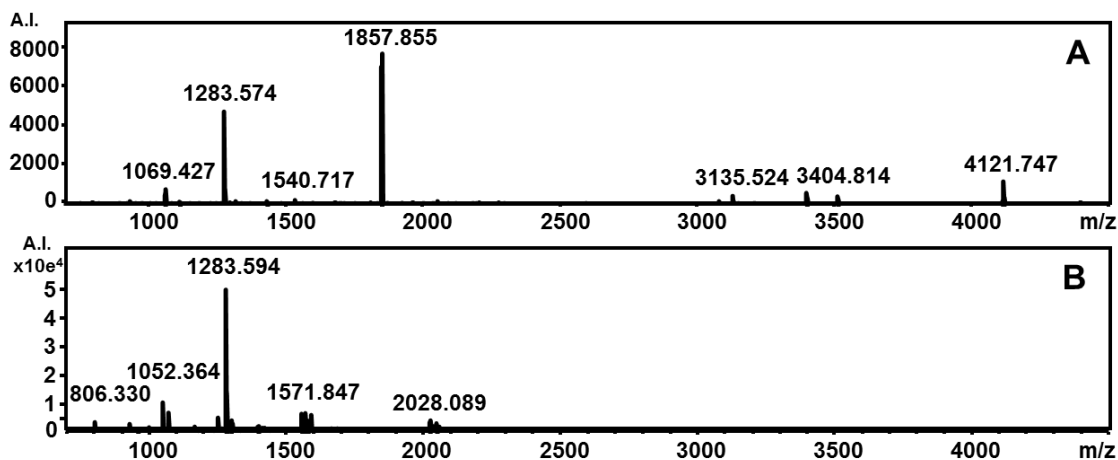


Obrázek 14. Srovnání proteinových profilů *N. ramispina* před (A) a po koncentrování a aktivní testy koncentrovaného (D) a nekonzentrovaného (E) vzorku. Spektrum C náleží myoglobinu, na kterém byla aktivita testována.

Spektrum aktivity šťáv ukazuje vymizení veškerého přidaného myoglobinu, který se poté objeví na peptidovém spektru (obr. 15, str. 39), kde jsou patrné větší štěpy po proteolýze pepsinem A (obr. 15A, str. 39), některé shodné peptidy ve spektrech pepsinu a nepenthesinů a větší intenzita signálu pro peptidy generované nepenthesiny. Podobně dopadl experiment také pro *N. ventricosa* kdy peptidové spektrum bylo opět odlišné od spektra aktivity pepsinu A, ale také od spektra aktivity pro nepenthesiny z *N. ramispina*. Pro *N. fusca* nebyly výsledky tak dobré, i když aktivita proteáz byl viditelná. Vznikající peptidy a nízká intenzita signálu se spíše podobaly aktivitě nižších nepenthesinů.

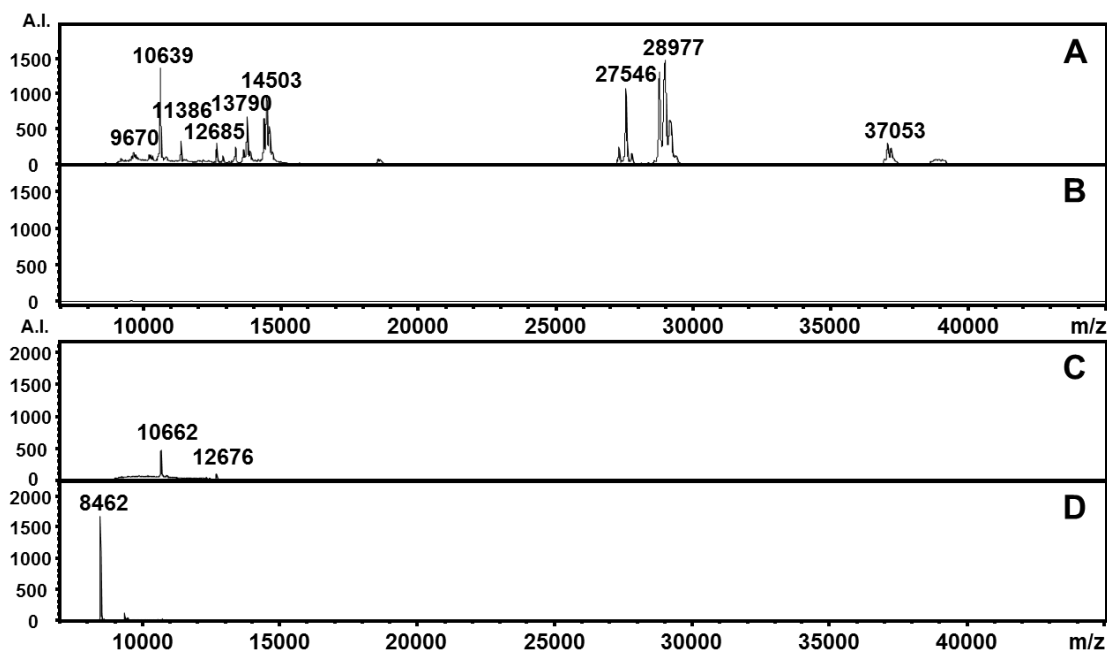
Na spektrech nižších šťáv, u kterých byl proveden stejný experiment, bylo u všech vybraných druhů (*N. reinwardtiana*, *N. globosa*, *N. ampullaria*) patrné menší množství celkových proteinů ve směsi a testy aktivity na myoglobinu vykazovaly pouze velice

slabou aktivitu, kdy intenzita myoglobinu po proběhnutí reakcí s nížinnými nepenthesiny téměř neklesla a i peptidové spektrum obsahovalo méně štěpů myoglobinu.

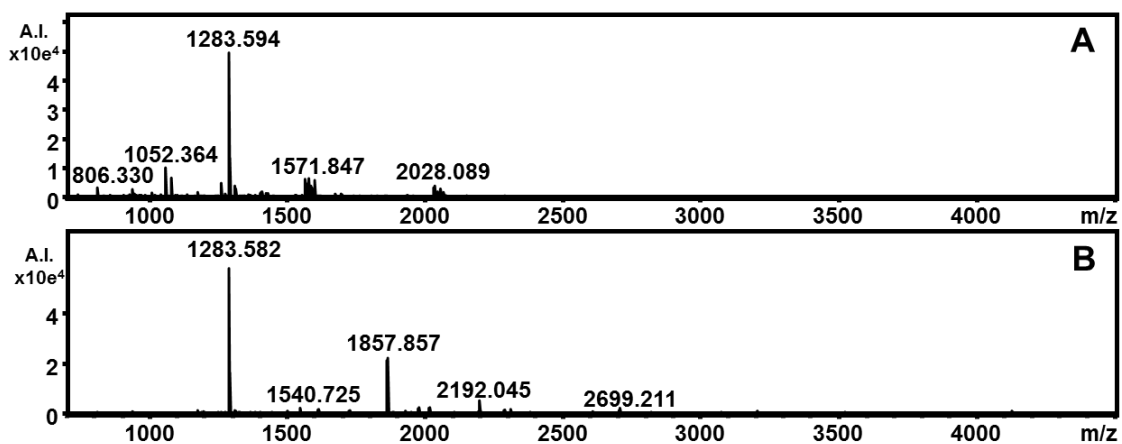


Obrázek 15. Peptidové spektrum testů aktivity nekoncentrovaného (A) a koncentrovaného (B) vzorku nepenthesinů z *N. ramispina*.

Na následujícím souboru spekter (obr. 16) je ukázáno srovnání proteinových profilů šťáv z *N. ramispina* (obr. 16A) a z *N. globosa* (obr. 16C), na kterých je rozdíl mezi horskými a nížinnými druhy jasně viditelný. Proteinový profil pro nížinný druh *N. globosa* byl téměř neměřitelný kvůli malému množství proteinů a také aktivita na myoglobinu je pro nížinný druh slabší než u šťáv druhu horského (obr. 16B, D). Opět je ukázáno peptidové spektrum aktivitních testů pro oba druhy (obr. 17, str. 40). Vzorek šťáv z *N. globosa* vybrán jako nejlepší zástupce nížinných druhů. Zbylé dva nížinné druhy vykazovaly mnohem menší aktivitu při stejných podmínkách.

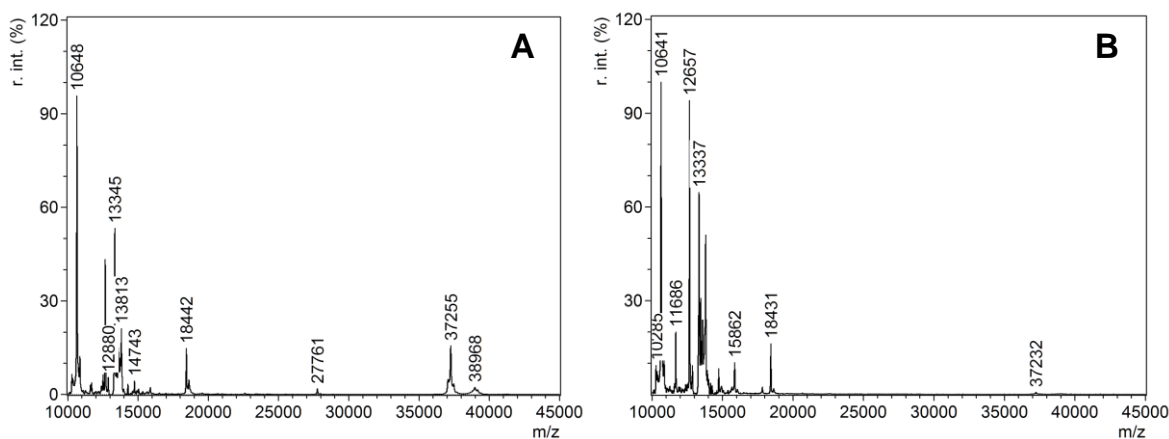


Obrázek 16. Srovnání proteinového profilu a testů aktivity horských a nížinných šťáv. Proteinový profil horských šťáv z *N. ramispina* (A) a nížinných šťáv z *N. globosa* (C) spolu s aktivitním testem pro horský (B) a nížinný (D) druh.



Obrázek 17. Peptidová spektra aktivitních testů *N. ramispina* (A) a *N. globosa* (B) na myoglobinu.

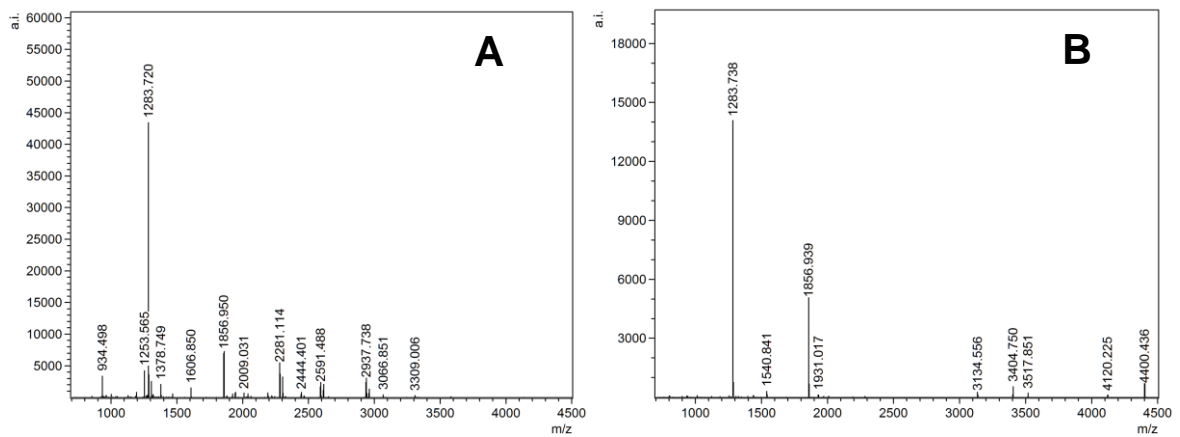
Po dobrých výsledcích testů aktivity provedených hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF jsme se rozhodli vyzkoušet purifikaci proteáz pomocí pepstatin A-agarosy na připravených centrifugačních kolonkách. Proteinový profil koncentrovaných šťáv *N. ventricosa* z druhého sběru je ukázán na obrázku 18A, kde jsou viditelné signály m/z 37 255 a 38 968, odpovídající pravděpodobně nepenthesinu I a II. Po nanesení koncentrovaného roztoku nepenthesinů na centrifugační kolonku s pepstatin A-agarosou bylo opět změřeno proteinové spektrum proteklého roztoku (obr. 18B), na kterém byl jasně viditelný pokles intenzity signálů pro m/z 37 255 a 38 968. Tím se potvrdila naše hypotéza, že dané signály odpovídají nepenthesinům.



Obrázek 18. Proteinové spektrum koncentrovaných nepenthesinů z *N. ventricosa* před (A) a po (B) nanesení na kolonku s pepstatin A-agarosou .

Pro ověření, zda byly proteázy uvolněny z pepstatin A-agarosy po eluci 50mM Tris-Cl puftrem pH 10 byly provedeny testy aktivity s koncentrovaným vzorkem nepenthesinů před nanesením na kolonku (obr. 19A, str. 41) a po eluci puftrem o vysokém pH (obr. 19B,

str. 41). Eluát, oproti původnímu roztoku, produkuje méně peptidů, ponechává větší fragmenty a celková intenzita signálu je nižší.

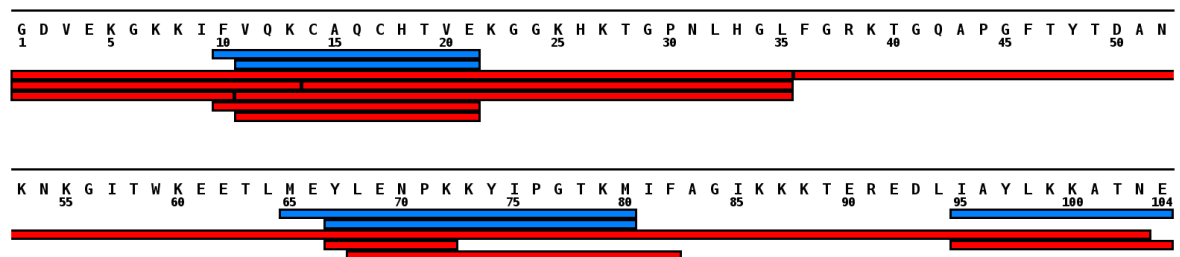


Obrázek 19. Aktivitní testy šťáv z *N. ventricosa* před nanesením na kolonku s pepstatinem (A) a po následné eluci 50mM Tris-Cl puřrem pH 10(B).

4.5 Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

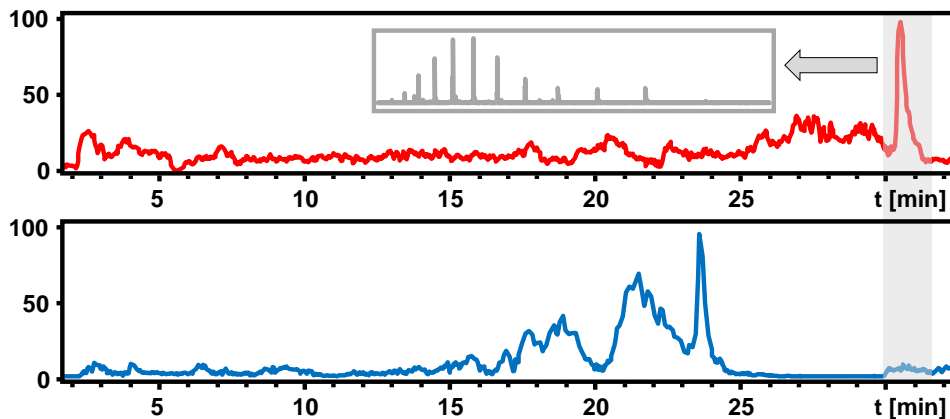
Pomocí LC-MS/MS analýz bylo možné identifikovat sekvence peptidů generovaných vybranými roztoky proteáz. Díky tomu, jsme byli schopni porovnat štěpné preference nepenthesinů a pepsinu A, popřípadě sledovat sekvenční pokrytí, které poskytují nepenthesiny v porovnání s pepsinem A na různých proteinech. Veškeré experimenty byly prováděny za podmínek identických s podmínkami HXMS experimentu (chlazení, pH 2,5).

Prvním experimentem bylo ověření podmínek pro štěpení pomocí nepenthesinů. Na základě předchozích pokusů v laboratoři byly vytipovány podmínky digesce za mírně zvýšené, avšak stále HXMS-kompatibilní, teploty 10 °C po dobu přibližně 10min. Na proteinu SlyD byly testovány kombinace teplot 2 °C a 10 °C s časy 2, 5 a 10 minut. Jak je vidět na sadách peptidů generovaných za uvedených podmínek (Příloha 1), jsou podmínky štěpení za 10 °C po dobu 10min skutečně nejlepší a proto byly dále využívány.



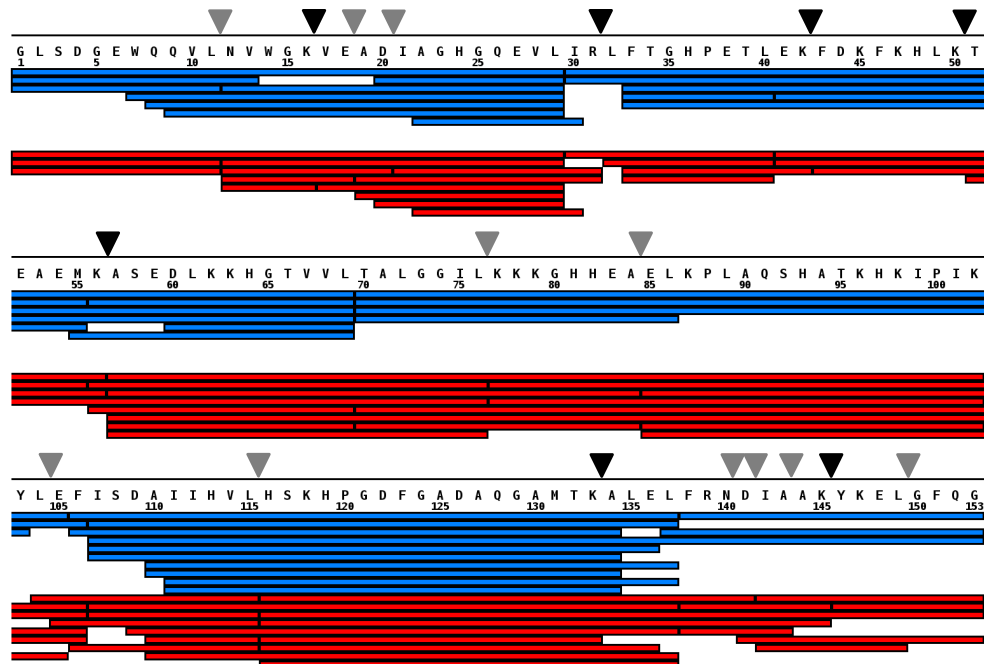
Obrázek 20. Peptidy cytochromu C, identifikované hmotnostní spektrometrií, vzniklé po proteolýze imobilizovaným pepsinem A (modrá) s pokrytím šťávami *N. ramispina* (červená) s pokrytím 100 %.

Na obrázku 20 (str. 41) jsou ukázány peptidy vzniklé po proteolýze cytochromu C imobilizovaným pepsinem a šťávami *N. ramispina*, kdy šťávy poskytují 100% pokrytí oproti pepsinu A, který má pokrytí pouze 36 %. Například na peptidech 10 – 22 a 11 – 22 jsou vidět shodné štěpné preference pepsinu A a šťáv, ale šťávy mají navíc ještě štěpy za lysinem, leucinem, fenylalaninem a kyselinou glutamovou.



Obrázek 21. Chromatogram cytochromu C po proteolýze imobilizovaným pepsinem (červeně) a šťávami *N. ramispina* (modře). Cytochrom C eluovaný po 30 minutě a jeho proteinová obálka jsou znázorněny šedou barvou.

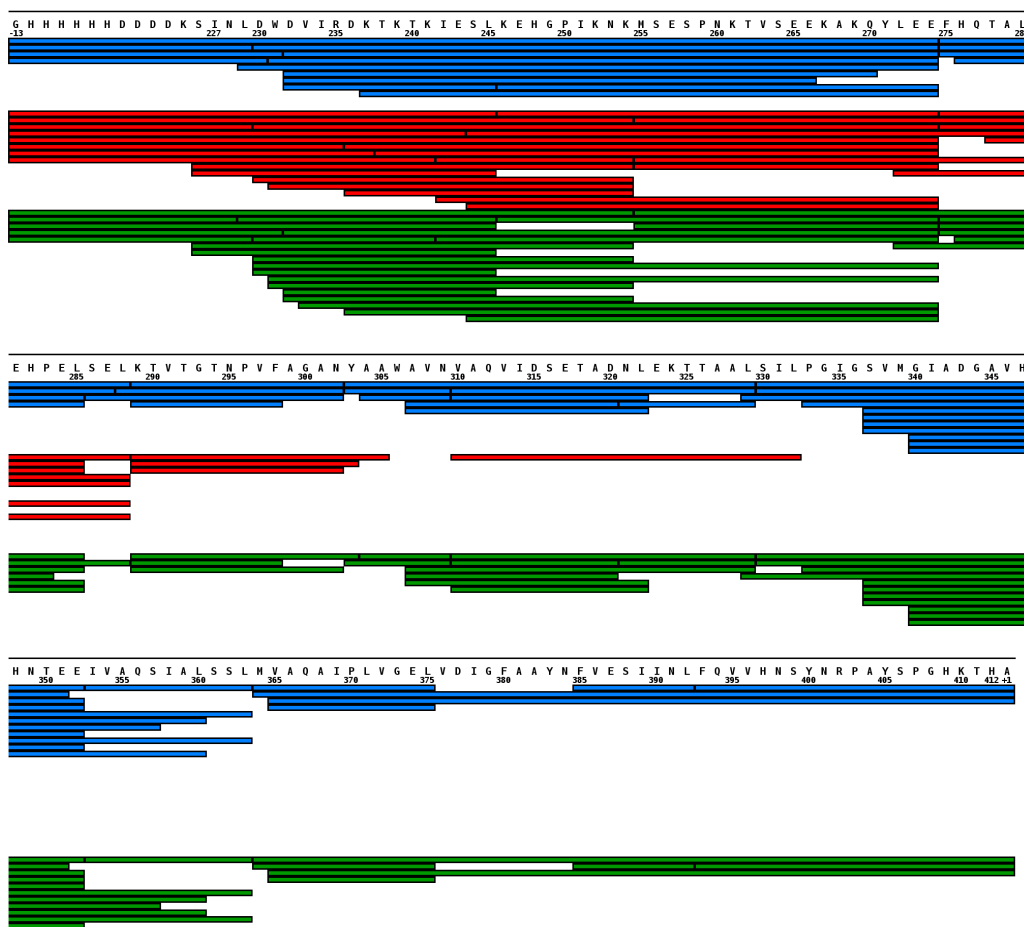
Na chromatogramu cytochromu C (obr. 21) je po neúspěšné proteolýze imobilizovaným pepsinem viditelný celý protein eluovaný po 30. minutě. V případě šťáv je veškerý cytochrom rozštěpen a zároveň je viditelný nárůst intenzity v oblasti, kde se eluují peptidy (15 – 25 min).



Obrázek 22. Peptidy myoglobinu vzniklé po proteolýze imobilizovaným pepsinem (modrá) a koncentrovanými nepenthesiny z *N. ramispina* (červená). Obě proteázy poskytly 100% pokrytí sekvence. Štěpy za aminokyselinami lysinem a argininen jsou označeny černými trojúhelníky. Šedé trojúhelníky představují ostatní štěpná místa, která mají nepenthesiny navíc oproti imobilizovanému pepsinu.

Na peptidech vzniklých po proteolýze myoglobinu (obr. 22, str. 42) je vidět rozdílnost štěpných preferencí proteáz, kdy šťávy štěpí (resp. nepenthesiny), oproti pepsinu A, navíc za argininem a lysinem, tedy aminokyselinami, které jsou pro pepsin A v P₁ pozici problematické. Tyto rozdíly ve štěpení zvětšují prostorové rozlišení při vodík/deuteriové výměně. Navíc se objevují štěpy za leuciny kyselinou glutamovou, alaninem, kyselinou asparagovou a asparaginem v místech, kde pepsin neštěpil.

Proteolýza translokační domény záškrtového toxinu (obr. 23) byla provedena nepenthesiny z *N. ramispina*, imobilizovaným pepsinem a následně jejich kombinací.

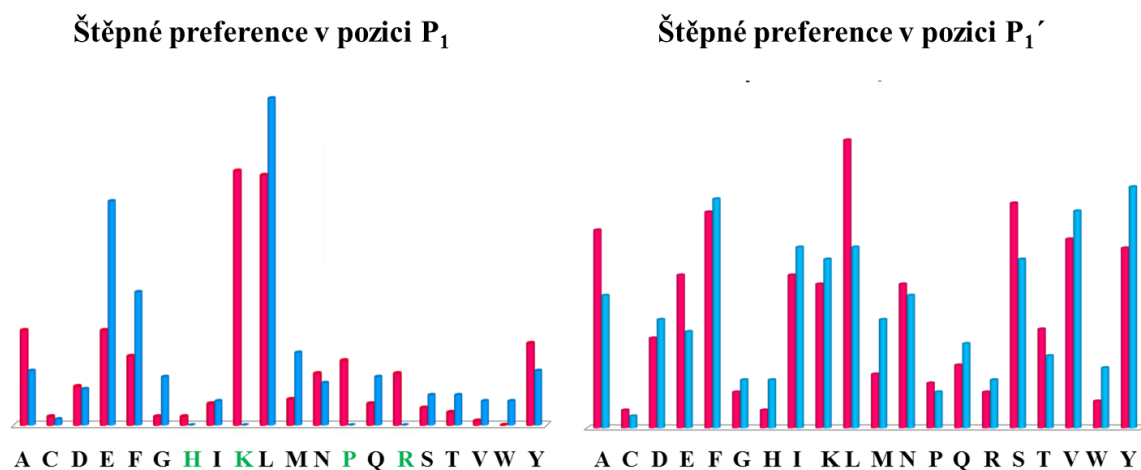


Obrázek 23. Peptidy translokační domény záškrtového toxinu, identifikované hmotnostní spektrometrií, vzniklé po proteolýze imobilizovaným pepsinem (modrá) se 100% pokrytím, nepenthesiny (červená) poskytujícími 57% pokrytí a jejich kombinací (zelená) poskytující 100% pokrytí sekvence.

Na peptidové mapě je patrné, že v případě štěpení pouze nepenthesiny je pokrytí na C-konci domény záškrtového toxinu velice špatné. Peptidy v této části proteinu zcela chybí. V případě pepsinu je peptidové pokrytí 100 %, ale rozlišení na N-konci je lepší po proteolýze nepenthesiny, které generují více rozličných peptidů. Kombinací nepenthesinů a imobilizovaného pepsinu došlo ke zlepšení rozlišení na N-konci proteinu díky

nepenthesinům a zároveň je proteolyzován i C-konec vlivem pepsinu a tím je dosaženo 100% pokrytí proteinu a zlepšení prostorového rozlišení. Tato pozorování jsou ve shodě s publikovanými daty [31], kde bylo nejlepších výsledků dosaženo kombinací pepsinu a rhizopuspepsinu. Nevýhodou použití rhizopuspepsinu však byla nutnost použít velké množství proteázy. V našem případě bylo množství proteázy potřebné pro dosažení velmi obdobného výsledku digesce řádově menší.

Pomocí LC-MS/MS analýz vybraných proteinů uvedených v kapitole 3.2.3.2 byly sestrojeny grafy štěpných preferencí v pozici P_1 (obr. 24A) a P_1' (obr. 24B) pro šťávy a byly porovnány s imobilizovaným pepsinem, testovaným na stejných proteinech. Z grafů je patrná rozdílnost ve štěpení šťáv za argininem, histidinem, prolinem a lysinem oproti imobilizovanému pepsinu, který za těmito aminokyselinami neštěpí. Pozice P_1' je pro šťávy i pepsin velice podobná a nepřevažují výrazné preference pro určitou aminokyselinu.



Obrázek 24. Štěpné preference imobilizovaného pepsinu (modře) a šťáv z láčkovek (červeně). Zeleně jsou vyznačeny aminokyseliny, za kterými štěpí pouze nepenthesiny.

Šťávy izolované z rostlin *N. ventricosa* a *N. ramispina* byly porovnány s rekombinantně připraveným nepenthesinem I z *N. gracilis* a imobilizovaným pepsinem na alfa-podjednotce hydrogenosomální procesující peptidázy (HPP) (Příloha 2). Rekombinantně připravený protein a imobilizovaný pepsin produkují méně peptidů a poskytují slabší pokrytí než šťávy z láček rostlin, které mají v obou případech peptidové pokrytí téměř 100 %.

5 Diskuze

Studium strukturních změn proteinů pomocí techniky HXMS je stále více využívaná metoda aplikovaná na stále větší a složitější proteiny a proteinové systémy. Hlavním cílem této práce bylo nalezení vhodného postupu přípravy enzymu či extraktu z rostlin, otestování za HXMS podmínek a sledování specifit pro vytipování druhů vhodných pro detailní studium.

První izolace šťáv byla jakousi pilotní studií mající za úkol otestovat navržený protokol pro úpravu šťáv. Při první izolaci šťáv bylo, na základě publikovaných prací zabývajících se izolací a testováním nepenthesinů [26], předpokládáno, že množství proteáz v trávicí tekutině je velice malé a proto byly vzorky děleny pouze na základě lokace na horské a nížinné. Již při sběru byly patrné rozdíly ve viskozitě a kyselosti šťáv mezi horskými a nížinnými druhy, kdy horské rostliny měly šťávy viskóznější a kyselé oproti nížinným, které měly trávicí šťávy naředěné zálivkou. Překvapivě však enzymová aktivita získaných šťáv byla velmi vysoká. Jelikož se i postup přípravy ukázal vhodný a dostatečný, byly upravené postupy použity pro druhý sběr, kde již byly šťávy sbírány a testovány druhově oddělené.

Proteinové profily šťáv provedené pomocí SDS-PAGE, potvrdily přítomnost mnoha proteinů obsažených v trávicích šťávách láčkovek [17, 24], které jsou však přítomny ve velice malém množství. Vizualizace pomocí Coomassie Brilliant Blue R250 nebyla možná a proto byly gely barveny stříbrem. I poté bylo nutné gely přeexponovat, pro zviditelnění přítomných proteinů. Při využití MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie pro analýzu proteinového profilu připravených roztoků z láček bylo u prvního sběru měřitelné pouze spektrum horských druhů. Druhý sběr, který byl koncentrován z menších objemů, kvůli druhovému dělení rostlin, ukázal, že nížinné druhy *N. globosa*, *N. reinwardtiana* a *N. ampullaria* obsahovaly tak malé množství proteinů, že nebylo možné je na gelech vizualizovat ani po barvení stříbrem. Totéž nám potvrdila hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, kdy byla pozorována pouze proteinová spektra dvou horských druhů, a to *N. ramispina* a *N. ventricosa*, kde byly zaznamenány dva signály příslušející pravděpodobně nepenthesinu I a II v oblasti m/z 37 000 – 40 000. Poté bylo provedeno spektrofotometrické stanovení obsahu celkových proteinů v koncentrovaných šťávách pomocí kyseliny bicinchoninové, kdy bylo potvrzeno, že množství celkových proteinů

neodpovídá množství proteáz v trávicí tekutině, což je viditelné například na druhu *N. ventricosa* a *N. ampullaria*, kdy oba druhy mají téměř stejný obsah proteinů, ale aktivita nižinného druhu *N. ampullaria* byla tak nízká, že nebylo možné ji spektrofotometricky změřit. Naproti tomu *N. ventricosa* byla díky své vysoké aktivitě vybrána pro další testování.

Po měření obsahu proteinů ve šťávách byla u druhů *N. ventricosa* a *N. ramispina* vyzkoušena purifikace pomocí pepstatin A-agarosy na základě publikace z roku 2004 [26], kdy byly nepenthesiny z trávicích šťáv úspěšně purifikovány. V našem případě došlo k vazbě nepenthesinů na pepstatin, ale nebyla provedena úspěšná eluce, kdy po aktivních testech provedených na myoglobinu vykazoval eluát aktivitu srovnatelnou s aktivitou nižinných nepenthesinů. Velmi silná vazba proteáz a pepstatinu (K_D v subnanomolární oblasti) pravděpodobně znemožnila kvantitativní eluci enzymů a také mohlo dojít k ireverzibilní degradaci proteáz vysokým pH, které bylo použito k eluci z imobilizovaného pepstatinu. Tuto teorii jsme si ověřili inkubací koncentrátu *N. ventricosa* ve stejném pufru, jaký byl použit pro eluci (pH 10). Po dvouhodinové inkubaci byly proteázy převedeny zpět do glycin-Cl pufru pH 2,5, zakoncentrovány na objem odpovídající výchozímu množství a byla změřena aktivita hmotnostní spektrometrií. Na získané peptidové mapě byla jasně viditelná ztráta aktivity oproti původnímu koncentrátu proteáz. Při použití většího množství trávicích šťáv pro purifikaci je tedy pravděpodobně možné proteázu purifikovat, ale na úkor nízkého výtěžku způsobeného silnou vazbou na pepstatin a ztrátou aktivity způsobenou působením vysokého pH. Porovnáním proteinových spekter naneseného koncentrátu a roztoku prošlého přes imobilizovaný pepstatin, jsme si nepřímou ověřili, že signály v okolí 37 000 až 39 000 m/z jsou skutečně nepenthesin I a II přičemž signál s m/z 39 735 odpovídá nepenthesinu I, který je nejspíše glykosylovaný (protein obsahuje potenciální glykosylační místa), což se na hmotnostním spektru projeví jako široký signál. Po těchto výsledcích bylo v dalších experimentech pokračováno s koncentrovanými roztoky proteáz.

Sledování enzymové aktivity proběhlo spektrofotometricky, pomocí SDS-PAGE a hmotnostní spektrometrií. Aktivita proteáz prvního sběru byla na gelové elektroforéze zaznamenána u horských i nižinných šťáv a proto bylo pro testování druhého sběru vybíráno jak z horských tak z nižinných druhů. Při testování enzymové aktivity šťáv druhého sběru pomocí hmotnostní spektrometrie byly viditelné výrazné rozdíly, spojené

pravděpodobně s množstvím proteáz obsažených v trávicí šťávě, kdy nížinné nepenthesiny nevykazovaly aktivitu téměř žádnou. Spektra vznikající po proteolýze myoglobinu nížinnými nepenthesiny obsahovala malé množství velkých peptidů, které byly v případě horských nepenthesinů *N. ramispina* a *N. ventricosa* rozštěpeny na malé peptidy. Měření aktivity spektrofotometrickou metodou bylo možné pouze pro horské druhy *N. ramispina*, *N. ventricosa* a *N. fusca*. Nížinné druhy *N. ampullaria*, *N. globosa* a *N. reinwardtiana* měly aktivitu neměřitelnou. Může se jednat o poměr, v jakém rostlina proteiny produkuje, což může být závislé na podmínkách, v jakých se nachází a také na ročním období. Je možné, že pěstováním rostlin ve standardizovaných podmínkách by bylo dosaženo produkce stejných poměrů proteáz k ostatním proteinům a rozdíly mezi jednotlivými druhy by byly eliminovány. Dále je ale možné předpokládat, že druhové rozdíly nejsou způsobeny množstvím a poměrem proteáz sekretovaných do láčky, ale že jde o rozdíly odvíjející se od sekvence a struktury proteinů, které jsou mezi jednotlivými druhy rozdílné. Sekvenční shoda druhu *N. gracilis* a *N. distillatoria* je 94 % [26] nejde tedy o shodu kompletní. Rostlinné extrakty byly srovnávány s rekombinantním nepenthesinem I v *N. gracilis*, kdy výsledky pro rekombinantní protein byly velice slabé v porovnání s extrakty druhu *N. ramispina*, *N. ventricosa* i přes větší množství rekombinantního proteinu použitého do reakce. Pro druhové srovnání by bylo nutné připravit rekombinantní formu nepenthesinů z *N. ramispina*, *N. ventricosa* a srovnávat proteázy ve stejných množstvích za stejných podmínek. Šťávy z láček navíc obsahují obě proteázy, nepenthesinu I i II, a je možné, že výborných výsledků v oblasti aktivity dosahují rostlinné izoláty díky jejich kombinaci a proto rekombinantní protein, ochuzen o přítomnost nepenthesinu II, vykazuje nižší aktivitu.

Experimenty se šťávami z *N. ventricosa* a *N. ramispina* prováděné za podmínek pro vodík/deuteriovou výměnu ukázaly možnosti využití proteáz nepenthesinu I a II pro tuto metodu. Na peptidových mapách několika proteinů byly viditelné rozdílné štěpné preference nepenthesinů a pepsinu což potvrdilo výsledky publikované v roce 1969 [32] a také v publikaci Rey M. et al, publikované v průběhu vypracování této práce [33]. Nepenthesiny produkují peptidy štěpením i za argininem, prolinem, histidinem a lysinem což jim poskytuje možnost tvorby odlišných peptidů v porovnání s pepsinem a tím mohou poskytovat větší prostorové rozlišení v HXMS experimentech. Aktivita nepenthesinů ve srovnání s pepsinem je úžasná vezmeme-li v úvahu množství proteáz použitých pro

testování. Pepsin byl používán v poměru 1/1 (w/w) k substrátu nebo imobilizovaný, zatímco nepenthesinů byly nanášeny 2 μ l o neznámé koncentraci enzymů (můžeme však učinit přibližný odhad, že nepenthesinů bylo až 35×méně než pepsinu – porovnání nanášek na MALDI). Jak bylo ukázáno na translokační doméně záškrtového toxinu, je někdy nutné kombinovat použité proteázy pro dosažení lepších výsledků.

Z uvedeného vyplývá, že izolovanými šťávami z láček rostlin rodu *Nepenthes*, jejichž příprava pro použití za podmínek HXMS experimentu je velice jednoduchá ve srovnání s přípravou rekombinantního proteinu, je dosahováno lepších výsledků, než s použitím rekombinantní proteázy. Upravené šťávy s proteázami nepenthesinem I a II lze využít jako nástroj pro metodu značení proteinů pomocí vodík/deuteriové výměny, jak samotné tak v kombinaci s jinými aspartátovými proteázami, pro dosažení lepšího prostorového rozlišení a peptidového pokrytí při proteinovém mapování. Cílem dalšího studování by mohlo být testování standardizované produkce za kontrolovaných podmínek a reprodukovatelnost štěpných preferencí šťáv z různých izolací.

6 Závěr

- byly připraveny nabohacené roztoky proteáz ze šťáv posbíraných z láček rostlin rodu *Nepenthes* v Botanické zahradě v Troji
- byly ověřeny vhodné podmínky pro digesci proteinů pomocí připravených extraktů/šťáv
- proteázy byly otestovány na vybraných proteinech za podmínek HXMS experimentu
- byly určeny štěpné preference proteáz pomocí peptidového mapování

Použité prameny

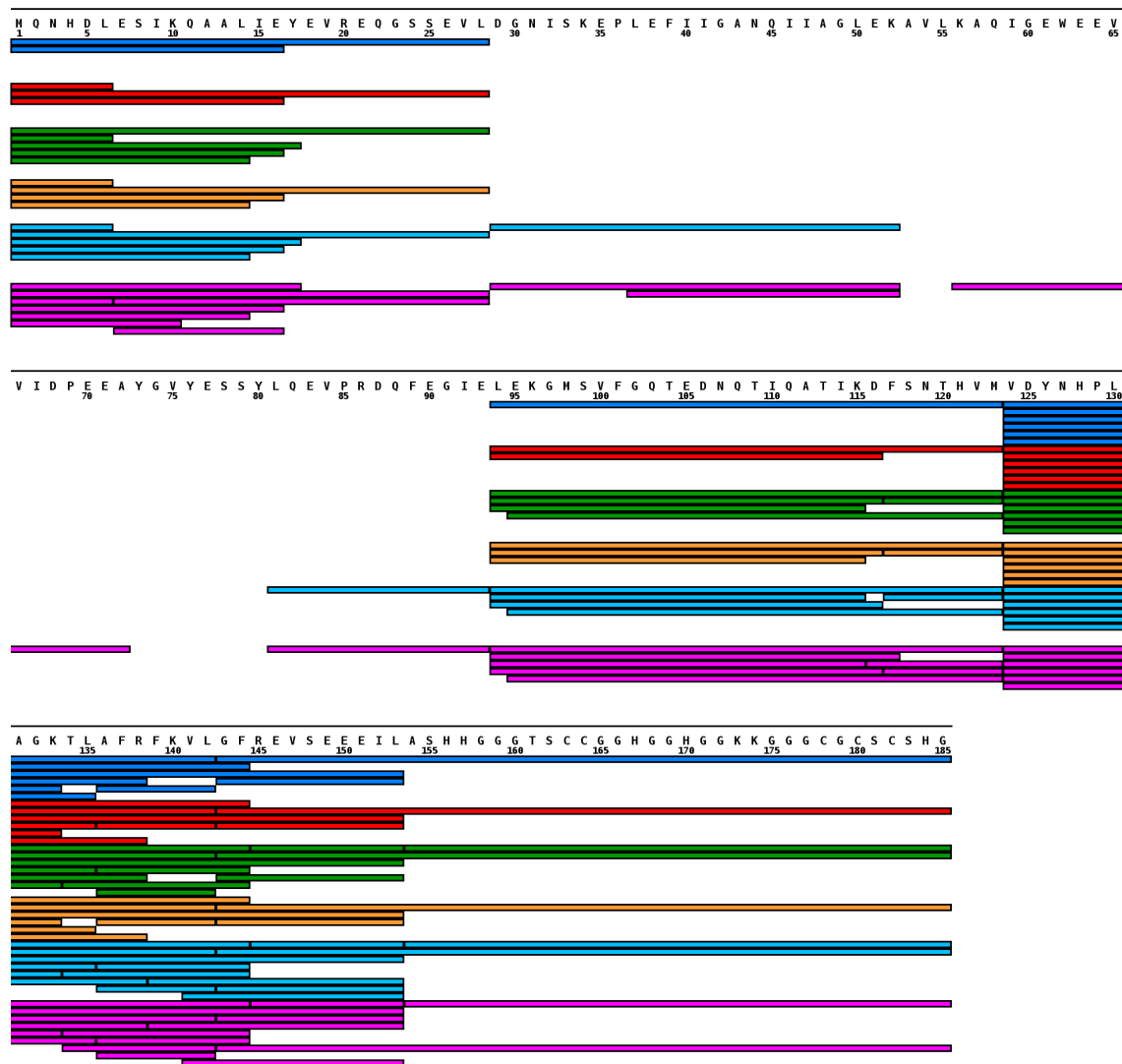
- [1] Brock, A. *Protein Expres. Purif.* 2012, **84**: 19-37.
- [2] Wang, L., Pan, H., Smith, D. L. *Mol. Cell. Proteomics* 2002, **1**: 132-138
- [3] Engen, J. R. *Anal. Chem.* 2009, **81**: 7370-7875.
- [4] Cravello, L., Lascoux, D., Forest, E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, **17**: 2387-2393.
- [5] Simo, I., Faro, R., Bur, D., Kay, C. F., *T. FEBS J.* 2011, **278**: 3177-3186.
- [6] Lufrano, D., Faro, R., Castanheira, P., Parisi, G., Verissimo, P., Vairo-Cavalli, S., Simões, I., Faro, C. *Phytochemistry.* 2012 **81**: 7-18.
- [7] Almeida, C. M., Pereira, C., Costa, D. S., Pereira, S., Pissarra, J., Simoes, I., Faro, C. *Planta* 2012, **236**: 283-296.
- [8] Andreeva, N. S., Rumsh, L. D. *Protein Sci.* 2001, **10**: 2439-2450.
- [9] Prasad, B., Suguna, K. *Acta Crystallogr. F* 2002, **58**: 250-259.
- [10] Kubota, K., Metoki, Y., Athauda, S. B., Shibata, C., Takahashi, K. *Biosci. Biotech. Bioch.* 2010, **74**: 2323-2326.
- [11] Hamuro, Y., Coales, S. J., Tuske, S. J., Molnar, K. S., Morrow, J. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, **22**: 1041-1046.
- [12] Zhang, H.-M., Kazazic, S., Schaub, T. M., Tipton, J. D., Emmett, M. R., Marshall, A. G. *Anal. Chem.* 2008, **80**: 9034-9041.
- [13] Shintani, T., Kobayashi, M., Ichishima, E. *J. Biochem.* 1996, **120**: 974-981.
- [14] Rey, M., Man, P., Brandolini, G., Forest, E., Pelos, L. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, **23**: 3431-3438.
- [15] Marcoux, J., Thierry, E., Vivès, C., Signo, L., Fieschi, F., Forest, E. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009, **21**: 76-79.
- [16] Ahn, J. , Cao, M.-J. , Yu, Y. Q., Engen, J. R. *Biochim. Biophys. Acta* 2012, **1834**: 1222-1229.
- [17] Hatano, N., Hamada, T. *J. Proteomics* 2012, **75**: 4844-4852.
- [18] Giusto, B., Grosbois, V., Fargeas, E., Marshall, D. J., Gaume, L. *J. Biosciences* 2008, **33**: 121-136.
- [19] Ulrike Bauer, W. F. *Plant Signal. Behav.* 2009, **11**: 1019-1023.
- [20] Mithöfer, A. *Phytochemistry.* 2011, **72**: 1678-1682.
- [21] Kurup, R., Johnson, A. J., Sankar, S., Hussain, A. A., Kumar, C. S., Baby, S. *Plant Biol.* 2013, **15**: 611-615.
- [22] Adlassnig, W., Peroutka, M., Lendl, T. *Ann. Bot.* 2011, **107**: 181-194.
- [23] Amagase, S. *J. Biochem.* 1972, **72**: 73-81.
- [24] Naoya Hatano, T. H., *J. Proteomics* 2008, **7**: 809-816.
- [25] Chia, T. F. , Aung, H. H., Osipov, A. N., Goh, N. K., Chia, L. S. *Redox Rep.* 2004, **9**: 255-260.
- [26] Athauda, S. B. P., Matsumoto, K., Rajapakshe, S., Kuribayashi, M., Kojima, M., Kkunomura-Yoshida, N., Iwamats, A., Shibata, C., Inoue, H., Takahashi, K. *Biochem. J.* 2004, **381**: 295-306.
- [27] Strohalm, M., Kavan, D., Novák, P., Volný, M., Havlíček, V. *Anal. Chem.* 2010, **82**: 4648-4651.

- [28] Kavan, D., Man, P. *Int. J. Mass Spectrom.* 2011, **1-3**: 53-58.
- [29] Umezawa, H., Aoyagi, T., Morishima, H., Hamada, M. *J. Antibiot.* 1970, **23**: 259-262.
- [30] Marciniszyn, J., Hartsuck, J. A., Tang, J. *J. Biol. Chem.* 1976, **251**: 7088-7094.
- [31] Marcoux, J., Man, P., Castellan, M., Vivies, C., Forest, E., Fieschi, F. *FEBS Lett.* 2009, **4**: 835-840.
- [32] Amagase, S., Nakayama, S., Tsugita, A. *J. Biochem.* 1969, **66**: 431-439.
- [33] Rey, M., Yang, M., Burns, K., Yu, Y., Lees-Miller, S. P., Schriemer, D. C. *Mol. Cell. Proteomics* 2013, **12**: 464-472.

Přílohy

Příloha 1

Peptidy proteinu SlyD identifikované po proteolýze koncentrátem šťáv z lúčkovek. Testování a identifikace ideálních podmínek pro proteolýzu šťávami izolovanými z rostlin. Aktivita proteáz byla testována při různých podmínkách a pro různé reakční doby. Tmavě modrá: 2 minuty, 2 °C; červená: 5 minut, 2 °C; zelená: 10 minut, 2 °C; oranžová: 10 °C, 2 minuty; světle modrá: 10 °C, 5 minut; růžová: 10 °C, 10 minut.



Příloha 2

Peptidy alfa-podjednotky hydrogenosómalní procesující peptidázy, identifikované hmotnostní spektrometrií, vzniklé po proteolýze imobilizovaným pepsinem (modrá), šťávami z *N. ramispina* (červená), *N. ventricosa* (zelená) a rekombinantním nepenthesinem I z *N. gracilis* (oranžová).

