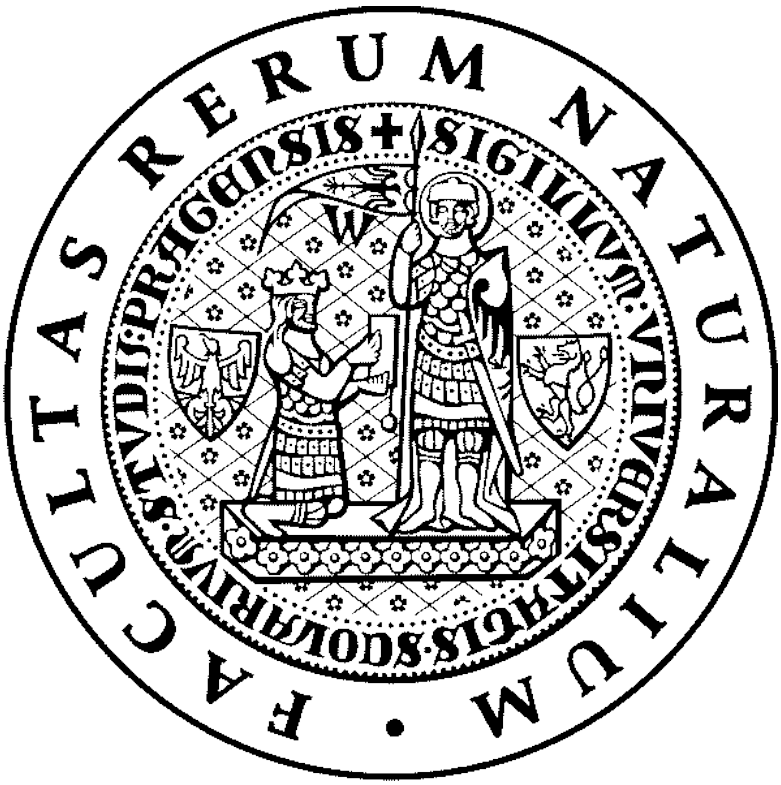
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



Kinetické vlastnosti β-N-acetylhexosaminidasy z rostlin tabáku

Kinetic properties of β-N-acetylhexosaminidase from tobacco plants

Diplomová práce

Školitelka: doc. RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

Robert Valenta

Praha 2013

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

V Praze dne: ..... Podpis: .....

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své školitelce doc. RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za inspiraci, vedení a shovívavost. Děkuji RNDr. Veronice Hýskové, Ph.D. za pomoc při řešení všedních problémů v laboratoři a za pomoc při odvození rovnice smíšené inhibice reakce současně inhibované nadbytkem substrátu. Děkuji RNDr. Jiřímu Liberdovi, Ph.D. za pomoc při stanoveních pomocí nativní elektroforézy a izoelektrické fokusace. Děkuji RNDr. Tomáši Křížkovi, Ph.D. za pomoc a odborné vedení při stanovení pomocí kapilární elektroforézy.

A děkuji také své rodině a přátelům za podporu i pochopení.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

β-NAHA	β-N-acetylhexosaminidasa
a	aktivita
a_{sp}	specifická aktivita
GalN	D-galaktosamin
GlcN	D-glukosamin
GalNAc	N-acetyl-D-galaktosamin
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
$(GlcNAc)_2$	N,N'-diacetylchitobiosa
$(GlcNAc)_3$	N,N',N''-triacetylchitotriosa
$(GlcNAc)_n$	chitooligomer
p-NP	p-nitrofenol
p-NP-GlcNAc	p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glukosaminid
p-NP-GalNAc	p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-galaktosaminid
p-NP-$(GlcNAc)_2$	p-nitrofenyl-N,N'-diacetylchitobiosid
PVP	poly(vinylpolypyrrolidon)
BSA	hovězí sérový albumin
RuBisCO	ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa
NADP-ME	malát dehydrogenasa (oxaloacetát-dekarboxylační) ($NADP^+$)
PEPC	fosfoenolpyruvátkarboxylasa
DMF	N,N-dimethylformamid
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Bis-Tris	bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
V_e	elační objem
K_M	Michaelisova konstanta
v	rychlost reakce
V_{MAX}	maximální rychlost reakce
V^*_{MAX}	fiktivní maximální rychlost reakce
M_R	relativní molekulová hmotnost

ABSTRAKT

Částečnou purifikací z listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) byla získána β-N-acetylhexosaminidasa o specifické aktivitě 1,72 μmol · min^{-1} · mg^{-1} se substrátem p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glukosaminid. Izoelektrická fokusace a nativní elektroforéza odhalila jedinou izoformu enzymu. Byla stanovena relativní molekulová hmotnost gelovou chromatografií (M_R 275 000) a nativní elektroforézou (M_R 285 000). Dále byl stanoven izoelektrický bod (pI 5,3). Aktivita β-N-acetylhexosaminidasy byla stanovena se substráty p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-galaktosaminid i p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glukosaminid, a dále se substráty N,N'-diacetylchitobiosa, p-nitrofenyl-N,N'-diacetylchitobiosid a N,N',N''-triacetylchitotriosa, pro které byla optimalizována metoda stanovení pomocí kapilární elektroforézy. S jednotlivými substráty bylo stanoveno pH (4,3-5,0) i teplotní optimum (50-55 °C), byl zdokumentován průběh reakce a identifikovány produkty reakcí. Aktivita β-N-acetylhexosaminidasy byla nejvyšší se substrátem p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glukosaminid a nejnižší se substrátem N,N',N''-triacetylchitotriosa (35% při relativním srovnání). Se substráty p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glukosaminid, p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-galaktosaminid a N,N'-diacetylchitobiosa byla stanovena maximální rychlost reakce a Michaelisova konstanta β-N-acetylhexosaminidasy. Se substrátem p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glukosaminid byla pozorována inhibice β-N-acetylhexosaminidasy nadbytkem substrátu, která u rostlinných β-N-acetylhexosaminidas dosud nebyla popsána, a byla stanovena konstanta inhibice nadbytkem substrátu. Byl stanoven typ inhibice a inhibiční konstanty β-N-acetylhexosaminidasy pro sacharidy D-galaktosamin, D-glukosamin, N-acetyl-D-galaktosamin a N-acetyl-D-glukosamin.

Klíčová slova:

β-N-acetylhexosaminidasa, kapilární elektroforéza, inhibice nadbytkem substrátu, N,N'-diacetylchitobiosa, p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid, N,N',N''-triacetylchitotriosa

ABSTRACT

β-N-acetylhexosaminidase from tobacco leaves (*Nicotiana tabacum* L.) was partially purified to final specific activity 1,72 μmol · min^{-1} · mg^{-1} using p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glucosaminide as substrate. The enzyme exhibited one band after both isoelectric focusing and native electrophoresis. Molecular mass of native enzyme was determined by gel chromatography (M_R 275000) and native electrophoresis (M_R 285000). Isoelectric point pI 5.4 was determined by isoelectric focusing. Activity of β-N-acetylhexosaminidase was measured using substrates p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-galactosaminide, p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glucosaminide, N,N'-diacetylchitobiose, p-nitrofenyl-N,N'-diacetylchitobioside and N,N',N''-triacetylchitotriose. For substrates N,N'-diacetylchitobiose, p-nitrofenyl-N,N'-diacetylchitobioside and N,N',N''-triacetylchitotriose an enzyme assay of β-N-acetylhexosaminidase using capillary zone electrophoresis was developed. Optimal pH and temperature of β-N-acetylhexosaminidase were determined with individual substrates, as well as products of hydrolysis. Activity of β-N-acetylhexosaminidase was highest using p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glucosaminide as substrate and lowest using N,N',N''-triacetylchitotriose (35% in relative comparison). Maximum velocity and Michaelis constant of β-N-acetylhexosaminidase were determined with substrates N-acetyl-D-galactosaminide, p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glucosaminide and N,N'-diacetylchitobiose. Substrate inhibition of β-N-acetylhexosaminidase by p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glucosaminide was observed, for the first time in plant β-N-acetylhexosaminidase studies. The inhibition effects of D-galactosamine, D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine and N-acetyl-D-glucosamine on the activity of β-N-acetylhexosaminidase were determined.

(In Czech)

Keywords:

β-N-acetylhexosaminidase, capillary zone electrophoresis, substrate inhibition, N,N'-diacetylchitobiose, p-NP-N,N'-diacetylchitobioside, N,N',N''-triacetylchitotriose

OBSAH

1. Úvod 1
1.1. Vlastnosti β-N-acetylhexosaminidasy 1
1.1.1. Substrátová specifita β-N-acetylhexosaminidasy 1
1.1.2. Mechanismus reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou 3
1.1.3. Funkce β-N-acetylhexosaminidasy 5
1.1.3.1. Funkce houbových, bakteriálních a lidských β-N-acetylhexosaminidas 5
1.1.3.2. Funkce rostlinných β-N-acetylhexosaminidas 6
1.2. Geny rostlinných β-N-acetylhexosaminidas 7
1.3. Glykosylace proteinů 9
1.3.1. O-glykosylace 11
1.3.2. N-glykosylace 13
1.4. Význam β-NAHA při syntéze glykoproteinů 18
1.5. Kapilární elektroforéza 19
2. Cíl práce 23
3. Materiál a metody 24
3.1. Přístroje a pomůcky 24
3.2. Analytický software 24
3.3. Rostlinný materiál 25
3.4. Chemikálie 25
3.5. Metody a pracovní postupy 27
3.5.1. Částečná purifikace β-N-acetylhexosmanidasy z rostlin tabáku 27
3.5.1.1. Extrakce 27
3.5.1.2. Precipitace síranem amonným 27
3.5.1.3. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 (I) 27
3.5.1.4. Afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy 28
3.5.1.5. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 (II) 29
3.5.1.6. Extrakce β-N-acetylhexosaminidasy vyšší iontovou silou 29
3.5.1.7. Centrifugační filtrace enzymového preparátu 29
3.5.2. Stanovení koncentrace bílkovin 30
3.5.2.1. Stanovení koncentrace bílkovin měřením absorbance 30

3.5.2.2. Stanovení koncentrace bílkovin metodou dle Bradfordové 30
3.5.2.3. Stanovení koncentrace bílkovin metodou dle Lowryho.....31
3.5.3. Elektroforetická separace a izoelektrická fokusace 31
3.5.3.1. Elektroforetická separace za denaturujících podmínek.....31
3.5.3.2. Elektroforetická separace za nativních podmínek 32
3.5.3.3. Izoelektrická fokusace β-N-acetylhexosaminidasy 33
3.5.3.4. Barvení bílkovin v gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue.....33
3.5.3.5. Barvení bílkovin v gelu dusičnanem stříbrným 34
3.5.3.6. Detekce aktivity β-N-acetylhexosaminidasy v gelu.....34
3.5.4. Kinetické vlastnosti β-N-acetylhexosaminidasy.....35
3.5.4.1. Stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy za použití substrátů p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc.....35
3.5.4.2. Stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy za použití substrátů stanovovaných pomocí kapilární elektroforézy.....35
3.5.4.3. Sledování průběhu reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou 36
3.5.4.4. Stanovení základních kinetických parametrů β-N-acetylhexosaminidasy 37
3.5.4.5. Stanovení inhibičních konstant β-N-acetylhexosaminidasy.....38
3.5.5. Charakterizace β-N-acetylhexosaminidasy.....41
3.5.5.1. Stanovení relativní molekulová hmotnosti β-N-acetylhexosaminidasy gelovou chromatografií.....41
3.5.5.2. Teplotní optimum β-N-acetylhexosaminidasy.....41
3.5.5.3. pH optimum β-N-acetylhexosaminidasy.....42
3.5.5.4. Stabilita β-N-acetylhexosaminidasy v čase 42
3.5.6. Studium glykosylace β-N-acetylhexosaminidasy 43
3.5.6.1. Enzymová deglykosylace β-N-acetylhexosaminidasy enzymem Endo H.....43
3.5.6.2. Enzymová deglykosylace β-N-acetylhexosaminidasy enzymem PNGasa F 44
4. Výsledky 45
4.1. Částečná purifikace β-N-acetylhexosaminidasy z listů tabáku 45
4.1.1. Extrakce a precipitace síranem amonným (I) 45
4.1.2. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 (I).....45
4.1.3. Afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy 46
4.1.4. Precipitace síranem amonným (II).....47
4.1.5. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 (II).....48
4.1.6. SDS-elektroforéza.....49

4.1.7. Extrakce β-N-acetylhexosaminidasy vyšší iontovou silou 50
4.2. Studium glykosylace β-N-acetylhexosaminidasy 51
4.2.1. Deglykosylace β-N-acetylhexosaminidasy enzymem Endo H 51
4.2.2. Deglykosylace β-N-acetylhexosaminidasy enzymem PNGasa F 51
4.3. Charakterizace β-N-acetylhexosaminidasy 53
4.3.1. Molekulová hmotnost β-N-acetylhexosaminidasy 53
4.3.1.1. Stanovení molekulové hmotnosti β-N-acetylhexosaminidasy pomocí gelové chromatografie 53
4.3.1.2. Stanovení molekulové hmotnosti β-N-acetylhexosaminidasy pomocí červené nativní elektroforézy 54
4.3.2. Izoelektrický bod β-N-acetylhexosaminidasy 56
4.3.3. Stabilita β-N-acetylhexosaminidasy v čase 56
4.3.3. Studium substrátové specifity β-N-acetylhexosaminidasy 57
4.4. Optima β-N-acetylhexosaminidasy 63
4.4.1. pH optimum β-N-acetylhexosaminidasy 63
4.4.2. Teplotní optimum β-N-acetylhexosaminidasy 65
4.5. Kinetické parametry β-N-acetylhexosaminidasy 67
4.5.1. Stanovení kinetických parametrů β-N-acetylhexosaminidasy 67
4.5.2. Inhibiční studie β-N-acetylhexosaminidasy 69
5. Diskuze 75
6. Závěr 80
7. Reference 82

1. ÚVOD

1.1. Vlastnosti β-N-acetylhexosaminidasy

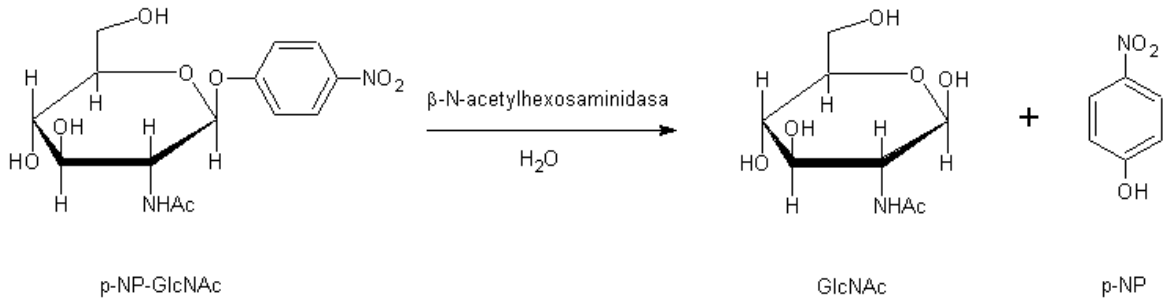
1.1.1. Substrátová specifita β-N-acetylhexosaminidasy

Enzym β-N-acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) patří do skupiny glykosid hydrolas a katalyzuje odštěpení N-acetyl-D-glukosaminu (GlcNAc) nebo N-acetyl-D-galaktosaminu (GalNAc) z neredukujících konců oligosacharidů, polysacharidů, cukerných složek glykoproteinů a glykolipidů či jejich syntetických derivátů. Mezi β-N-acetylhexosaminidasy se v současnosti řadí i několik původně samostatně klasifikovaných glykosidas (chitobiasy, β-N-acetylglukosaminidasy a β-N-acetylhexosaminidasy) [1].

β-N-acetylhexosaminidasy jsou schopné odštěpovat koncový neredukující GlcNAc nebo GalNAc z většiny v přírodě se vyskytujících molekul, ale i syntetických substrátů značených p-nitrofenolem (obrázek 1, str. 2), 4-methylumbelliferonem apod. [2]. Kromě toho byla u mnoha houbových β-N-acetylhexosaminidas prokázána jejich schopnost štěpit substráty bez C4 hydroxylu s účinností řádově srovnatelnou s hydrolýzou GlcNAc substrátů [3]. Dále byla u celkem 24 houbových β-N-acetylhexosaminidas zkoumána schopnost štěpit substráty modifikované sulfátovou skupinou na uhlíku C2, C3, C4 a C6. Většina β-N-acetylhexosaminidas byla schopná štěpit substráty modifikované 4- a 6-sulfátem, ve třech případech byla prokázána hydrolýza 3-sulfátu a hydrolýza 2-sulfátu (bez acetylové skupiny) nebyla prokázána u žádné β-N-acetylhexosaminidasy [4].

Obzvláště u houbových β-N-acetylhexosaminidas je důležitá jejich schopnost štěpit oligomery odvozené od chitinu (chitooligosacharidy). Názvosloví těchto látek je ale v současnosti nejednoznačné a v literatuře je pro označení dimeru GlcNAc používáno termínů chitobiosa a N,N'-diacetylchitobiosa (a analogicky i v případech

vyšších chitooligosacharidů). Kromě toho je termínem chitobiosa označován i dimer GlcN odvozený od chitosanu.

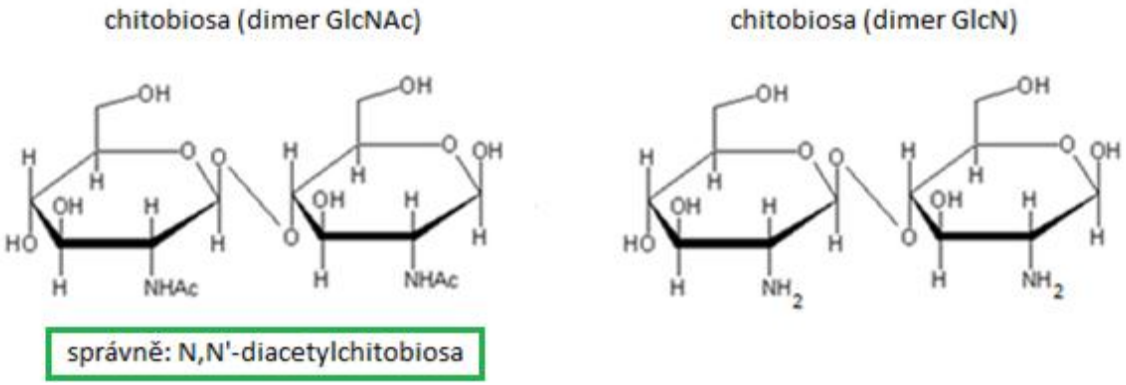


Obrázek 1: Hydrolýza p-NP-GlcNAc β-N-acetylhexosaminidasou.

K této nejednoznačnosti názvosloví došlo v důsledku experimentu, při kterém byl v roce 1931 chitin podroben kyselé acetolýze. Takto vznikl dimer GlcN ve formě oktaacetátu, přičemž podobně jako v případě celulosy se předpokládalo, že původní disacharid nebyl vůbec acetylován. Za základní jednotku chitinu byl tedy považován glukosamin a $(GlcN)_2$ za dimer odvozený z chitinu, tedy chitobiosu. V průběhu následujícího roku se podařilo lépe objasnit základní strukturu chitinu a zjistilo se, že N-acetylovaná skupina molekuly glukosaminu nepochází z kyselé acetolýzy, ale že je součástí základní jednotky chitinu, tedy N-acetyl-D-glukosaminu. Následně došlo k opravě původních výsledů a skutečnou chitobiosou, tedy dimerem odvozeným z chitinu, byl nazván $(GlcNAc)_2$. Od té doby je ale termínu chitobiosa používáno k označení jak původního (chybně stanoveného) dimeru GlcN, tak i skutečného dimeru chitinu, tedy dimeru GlcNAc (obrázek 2, str. 3) [5].

V roce 1984 vydala IUBMB doporučení, podle kterého je chitobiosa označení pro dimer GlcN (odvozený z chitosanu), kdežto dimer GlcNAc (odvozený z chitinu) by se měl nazývat semi-systematickým názvem N,N'-diacetylchitobiosa (a analogicky i vyšší chitooligosacharidy) [5]. Toto doporučení obvykle není dodržováno a termínu

chitobiosa je v odborné literatuře používáno jako nejčastější označení pro dimer GlcNAc, ale i méně zkoumaný dimer GlcN.



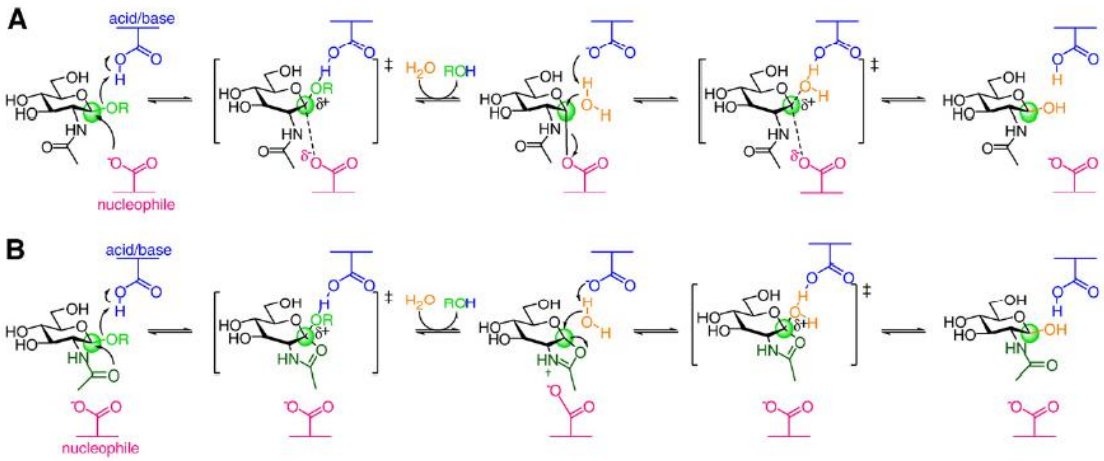
Obrázek 2: Vzorce obou molekul, pro které se v literatuře používá označení chitobiosa. V této práci nazývám dimer GlcNAc (odvozený z chitinu) N,N'-diacetylchitobiosa, v souladu s doporučením IUBMB.

V této práci postupuji v souladu s doporučením IUBMB a pro dimer GlcNAc, odvozený z chitinu, používám označení N,N'-diacetylchitobiosa, stejně jako i v případě vyšších chitooligosacharidů.

1.1.2. Mechanismus reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou

β-N-acetylhexosaminidasy se řadí do CAZy (Carbohydrate Active enZYmes [6]) rodin glykosid hydrolas 3, 20 a 84. Do rodiny 3 a 84 patří výhradně enzymy nalezené v bakteriích. Rodina 20 je nejpočetnější a zahrnuje jak bakteriální, tak eukaryotní β-N-acetylhexosaminidasy. Enzymy všech rodin si jsou podobné strukturou a reakčním mechanismem, ale ne sekvenční homologií a patří mezi glykosidasy, které katalýzou nemění konfiguraci na anomerním uhlíku [7].

Reakční mechanismus v rodině 3 zahrnuje kovalentní vazbu enzymu se substrátem, zatímco rodiny 20 a 84 využívají mechanismus katalýzy za asistence substrátem, při kterém vzniká oxazolinový ion [8]. Schéma obou reakčních mechanismů je zobrazeno na obrázku 3 (str. 4). V případě rodiny 3 (A) je prvním krokem reakce nukleofilní atak (nukleofilem v aktivním centru) na anomerní uhlík substrátu za tvorby intermediátu s kovalentní vazbou enzym-substrát. Dalším krokem je atak kyselým zbytkem v aktivním centru, který způsobí rozrušení kovalentní vazby enzym-substrát a uvolnění aglykonu či cukerného řetězce. Následně dochází k ataku substrátu molekulou vody (v anomerním centru) vedoucího k tvorbě konečného produktu. V případě rodin 20 a 84 (B) slouží jako nukleofil acetylová skupina substrátu (nukleofilním atakem vzniká oxazolinový ion).



Obrázek 3: Schéma reakčního mechanismu β-N-acetylhexosaminidas [8]:

A) rodina glykosid hydrolas 3

B) rodiny glykosid hydrolas 20 a 84.

1.1.3. Funkce β-N-acetylhexosaminidasy

β-N-acetylhexosaminidasy katalyzují ve všech organismech stejnou reakci, ale jejich funkce je rozdílná. Nejlépe prozkoumány jsou houbové, bakteriální a živočišné β-N-acetylhexosaminidasy.

1.1.3.1. Funkce houbových, bakteriálních a lidských β-N-acetylhexosaminidas

Buněčná stěna hub je tvořená chitinem a chitinasy i β-N-acetylhexosaminidasy (intra- i extracelulární) hrají klíčovou roli při růstu a morfogenezi. Kromě toho mohou sloužit i ke konkurenčnímu boji, kdy jsou s jejich pomocí napadány ostatní houby [9].

Bakteriální β-N-acetylhexosaminidasy se podílejí na výživě, růstu a v případě patogenních bakterií také na interakci s hostitelskou buňkou, kdy napomáhají adhezi na povrch hostitelské buňky modifikacemi extracelulárních glykoproteinů [10].

Lidská β-N-acetylhexosaminidasa existuje ve 3 izoformách, označovaných jako A, B a S, které jsou složené z podjednotek α a β. Izoenzym A je heterodimer složený z obou typů podjednotek, izoenzym B je homodimer podjednotky β a izoenzym S je homodimer podjednotky α. Mutace v genech podjednotky α nebo β mohou vést k vážným neurodegenerativním chorobám. Narušení funkce podjednotky α a tím i β-N-acetylhexosaminidasy A (homodimer β-N-acetylhexosaminidasy S má i při správné funkci nízkou aktivitu, její význam je proto zanedbatelný) vede k rozvoji Tay-Sachsovy choroby. Ta existuje ve 3 klinických variantách (podle věku, ve kterém dojde k nástupu onemocnění), přičemž akutní dětská forma se projevuje do 6 měsíců věku a obvykle vede k úmrtí před 5. rokem života. Při pozdějším nástupu je pak nemoc charakterizována omezením celé řady funkcí mozku [11]. Mutace podjednotky β a tím i narušení funkčnosti β-N-acetylhexosaminidas A i B vede k rozvoji Sandhoffovy choroby, která je klinicky nerozeznatelná od Tay-Sachsovy choroby [12].

1.1.3.2. Funkce rostlinných β-N-acetylhexosaminidas

Rostlinné β-N-acetylhexosaminidasy a chitinasy byly zpočátku považovány za proteiny související s obranou před stresem a patogeny. Aktivita chitinas roste např. u rostlin vystavených těžkým kovům [13], ale i virovým a houbovým infekcím [14].

Zvláštní postavení zaujímají β-N-acetylhexosaminidasy rostliny huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*). Huseníček rolní je vůbec první rostlina, u které se podařilo zmapovat úplnou sekvenci genomu (v roce 2000). Pro tento účel byl vybrán díky svým vlastnostem, např. krátké generační době a malé velikosti genomu (přibližně 125 miliónů páru bází), a dnes se používá jako modelový organismus v molekulární genetice rostlin [15]. V roce 2007 byl genom této rostliny podroben analýze sekvenční homologie vůči známé sekvenci β-N-acetylglukosaminidasy z octomilky *Drosophila melanogaster* [16]. Byly nalezeny 3 domnělé sekvence β-N-acetylhexosaminidasy, jejichž transkripce byla ověřena v různých pletivech huseníčku rolního, a dále byly všechny 3 sekvence heterologně exprimovány v hmyzích buňkách. Enzymy pojmenované HEXO1-3 byly všechny schopné štěpit syntetické substráty p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc atd. Kromě toho také byly jednotlivé enzymy exprimovány v rostlině *Nicotiana benthamiana* a byla u nich stanovená buněčná lokalizace (HEXO1 - vakuola, HEXO2 a HEXO3 - plazmatická membrána) [17].

Současný výzkum rostlinných β-N-acetylhexosaminidas je zaměřen převážně ve dvou směrech. První směr zkoumá souvislost mezi rostlinnými β-N-acetylhexosaminidasami a vývojem plodů. Aktivity β-N-acetylhexosaminidasy a α-mannosidasy se zvyšují v průběhu zrání rajčat (*Solanum lycopersicum*) a podílejí se na změnách jejich struktury v průběhu měknutí plodů. Geneticky modifikované rostliny s omezenou aktivitou β-N-acetylhexosaminidasy nebo α-mannosidasy vykazují několikanásobně delší trvanlivost plodů, a to bez negativního vlivu na růst, vývoj a dobu zrání, kvalitu semen či velikost úrody [18]. Významný nárůst aktivity β-N-acetylhexosaminidasy v období zrání byl pozorován také u papriky (*Capsicum annuum*) [19]. Těchto poznatků je možné využít pro vývoj plodin s delší trvanlivostí a snížení ztrát v zemědělství.

Druhý směr zkoumá úlohu rostlinných β-N-acetylhexosaminidas při glykosylaci, čemuž se budu podrobně věnovat v následujících kapitolách.

1.2. Geny rostlinných β-N-acetylhexosaminidas

Proteinová databáze UniProtKB eviduju celkem 130 sekvencí proteinů s předpokládanou aktivitou β-N-acetylhexosaminidasy u celkem 30 zástupců z podříše zelených rostlin [20]. Existence mnoha proteinů ale nebyla prokázána na žádné úrovni, vymykají se typické velikosti proteinů rostlinných β-N-acetylhexosaminidas (M_R kolem 62000) a jsou evidovány jako "necharakterizované" proteiny. Tabulka 1 (str. 8) shrnuje počty proteinů s předpokládanou aktivitou β-N-acetylhexosaminidas, jejich molekulovou hmotnost a délku proteinu vyjádřenou počtem aminokyselin ve vybraných rostlinách.

Geny huseníčku rolního kódující β-N-acetylhexosaminidasy 1, 2 a 3 jsou tvořeny 1626, 1743 a 1608 páry bází. HEXO1 je protein o 541 aminokyselinách, s vypočtenou relativní molekulovou hmotností 61230 a šesti potenciálními glykosylačními místy. HEXO2 je protein o 580 párech bází, vypočtenou relativní molekulovou hmotností 64911 a pěti potenciálními glykosylačními místy. HEXO3 je protein o 535 aminokyselinách, s vypočtenou relativní molekulovou hmotností 60014 a pěti potenciálními glykosylačními místy [17].

V případě japonské rýže seté (*Oryza sativa* subsp. *japonica*), u které eviduje UniProtKB celkem 8 sekvencí proteinů s předpokládanou aktivitou β-N-acetylhexosaminidasy, jsem provedl srovnání sekvencí aminokyselin těchto proteinů s HEXO1-3 (huseníček rolní) a výsledky vyjádřil jako míru vzájemné identity sekvencí. Srovnání shrnuje tabulka 2 (str. 9) [20].

Tabulka 1: Počet proteinů odpovídajících β-N-acetylhexosaminidasam, rozsah molekulových hmotností a počtu aminokyselin ve vybraných rostlinách [20].

Organismus	**Počet proteinů**	**M_R**	**počet aminokyselin**
Čínské zelí (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*)	3	60197 - 64756	534 - 582
Paprika setá (*Capsicum annuum*)	1	63961	574
Sója (*Glycine max*)	6	61297 - 65351	543 - 586
Ječmen setý (*Hordeum vulgare*)	4	57964 - 65546	521 - 598
Rýže setá (*Oryza sativa* subsp. *japonica*)	8	58574 - 66319	524 - 605
Broskvoň obecná (*Prunus persica*)	2	63558 - 65792	562 - 594
Skočec obecný (*Ricinus communis*)	2	59744 - 65755	527 - 597
Vraneček (*Selaginella moellendorffii*)	7	59113 - 66004	516 -
Bér italský (*Setaria italica*)	6	58467 - 65915	519 - 598
Rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*)	4	55727 - 64023	497 - 575
Lilek brambor (*Solanum tuberosum*)	2	59577 - 64287	531 - 575
Čirok dvoubarevný (*Sorghum vulgare*)	3	60655 - 63796	546 - 584
Réva vinná (*Vitis vinifera*)	3	61530 - 63846	541 -576
Kukuřice setá (*Zea mays*)	6	58563 - 66151	525 - 599

Tabulka 2: Vlastnosti proteinů s předpokládanou funkcí β-N-acetylhexosaminidasy z japonské rýže seté a srovnání jejich sekvencí s HEXO1-3 (huseníček rolní). Hodnoty největší identity jsou podtrženy [17], [20].

Protein	Gen nebo lokus (délka sekvence)	M_R	počet AK	Identita s (%)		
				HEXO1	HEXO2	HEXO3
Q5WMR0	Os05g0415700 (1596)	58964	531	50,8	27,6	61,5
Q5JLX3	OsJ_04367 (1581)	59024	526	52,2	27,6	62,3
Q6AT83	OsJ_18555 (1,584)	58594	527	51,0	27,3	61,6
Q10PW1	Os03g0219400 (1818)	66319	605	29,0	52,5	25,6
Q6ZL33	OsI_26587 (1782)	64305	593	29,6	53,7	28,0
Q65XA2	Os05g0115900 (1626)	60179	541	63,0	29,4	50,3
B9FY22	OsJ_24848 (1680)	61144	559	29,4	53,4	27,2
B9FM55	OsJ_16891 (1575)	58574	524	61,6	29,5	50,5

1.3. Glykosylace proteinů

Glykosylace je jednou z forem post-translačních modifikací proteinů, při které dochází k vazbě sacharidů na řetězec polypeptidu. Ačkoliv se vyskytuje napříč celou živou přírodou, jednotlivé organismy (i tkáně v rámci jednoho organismu) se mohou složením glykanů značně lišit. Glykosylace má pro organismy zásadní význam a glykany plní celou řadu funkcí, i když obecně je lze rozdělit do několika základních

skupin: strukturní (např. kolagen, zásobní glykoproteiny), fyzikálně ochranné (např. glykoproteiny glykokalyxu) a rozpoznávací (např. třídění glykoproteinů v Golgiho aparátu). Role jednotlivých glykanů se však mohou překrývat, a stejně tak i totožný motiv glykosylace může vést k rozdílným funkcím glykoproteinů v různých částech organismu, nebo v různých stádiích vývoje [21].

Glykokonjugáty jsou součástí glykokalyxu, ochranné vrstvy na povrchu buněk, která ovlivňuje prostupnost některých látek, slouží jako ochranná bariéra před vnějším prostředím a také zajišťuje mechanickou ochranu buněk [22]. Kromě toho také významně přispívá k adhezi buněk a interakci s okolím buňky. Symbiotické a patogenní organismy jsou často schopné napodobovat specifické signály hostitelského organismu, což jim umožňuje vyhnout se imunitní odpovědi [23]. Glykanová složka glykokonjugátů významně ovlivňuje vlastnosti celé molekuly, mimo jiné rozpustnost, náboj, hmotnost, velikost a viskozitu. Dále ovlivňuje degradaci, skládání a konformaci glykoproteinů. V případě strukturních makromolekul jako je kolagen ovlivňuje adhezi na okolní tkáň, prostupnost apod. [24].

Glykosylace se také může významně podílet na regulaci biologické aktivity lektinů, hormonů, enzymů apod. - lidská lysosomální β-glukosidasa ztrácí po úplné deglykosylaci aktivitu [25], kyselá fosfatasa z kvasinek ztrácí vlivem deglykosylace aktivitu i konformaci, stává se náchylnější k působení proteas a denaturaci z chemických i fyzikálních příčin [26]. Lidský hormon choriogonadotropin se je schopen i po úplné deglykosylaci navázat na svůj receptor, nicméně ztrácí schopnost stimulovat adenylátcyklasu [27].

Virulence mnoha patogenních organismů je přímo podmíněna přítomností specifických sacharidů, které jsou rozpoznávány adhesiny nebo hemaglutininy bakterií, virů či toxinů. Například bakteriální cholera toxin vyžaduje pro svůj účinek vazbu na pentasacharid gangliosidu přítomného na epiteliálních buňkách trávicího traktu [28]. Díky těmto požadavkům je také například výskyt bakterie *Escherichia coli* za normálních okolností omezen pouze na tlusté střevo, jelikož se zde nachází nutný receptor, zatímco v tenkém střevě ne [29].

Poprvé byla glykosidová vazba na protein (konkrétně GlcNAc-β-Asn) popsána u ovalbuminu v roce 1961 [30]. Glykosylace proteinů byla zpočátku považována za specifikum eukaryotních organismů, ale v roce 1976 byly glykoproteiny popsány u archaebakterií [31] a v roce 1989 i u eubakterií [32]. Do současnosti bylo popsáno již 13 monosacharidů a 8 aminokyselin, které napříč živou přírodou umožňují vazbu sacharidu na protein celkem 41 různými způsoby - celkem 4 různé monosacharidy se mohou vázat na dusík asparaginu, dále Glc na dusík argininu, 10 různých monosacharidů se může vázat na kyslík alespoň jedné z aminokyselin serin, threonin, tyrosin, hydroxyprolin a hydroxylysin. Dále je možná vazba mannosy přímo na atom uhlíku v tryptofanu (C-mannosylace), vazba monosacharidu přes fosfátovou skupinu na serin (fosfoglykosylace) a vazba GPI (glykosylfosfatidylinositolu) přes ethanolamin fosfát na mannosu (glypiace) [33].

Vazba sacharidu na atom kyslíku aminokyselinového zbytku (O-glykosylace) je nejrozmanitější a byla popsána v mnoha případech u prokaryotních [34] i eukaryotních organismů. Vazba sacharidu na atom dusíku aminokyselinového zbytku (N-glykosylace) je nejčastější. N-glykosylace byla prokázána u eukaryotních organismů a archaebakterií, ale u eubakterií pouze v ojedinělých a nedostatečně zdokumentovaných případech [35], [36].

1.3.1. O-glykosylace

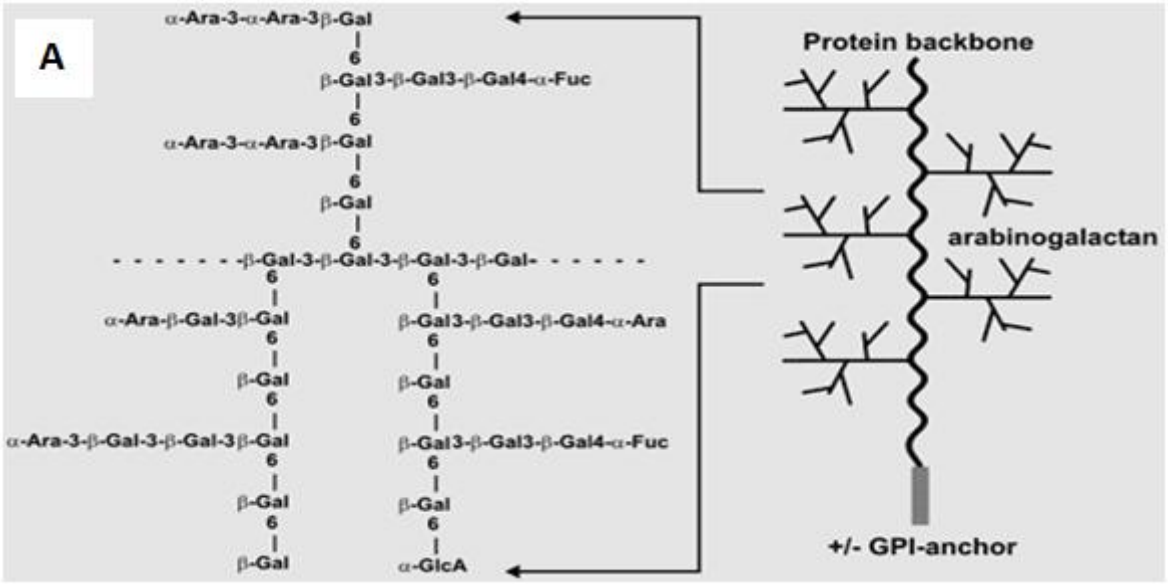
Nejrozšířenější typ O-glykosylace vyskytujícím se u savců je vazba GlcNAc na hydroxylové skupiny serinu nebo treoninu. Takovéto glykoproteiny, které jsou obecně glykosylované velkými řetězci sacharidů na několika místech, se také nazývají muciny [37]. Muciny jsou schopné vázat velké množství vody a zajišťovat tak ochranu před vnějším prostředím - vyskytují se hojně na povrchu epitelových buněk trávicího traktu apod. Kromě toho se savčí O-glykany významně podílí na antigenicitě, interakci s lektiny, hormony a cytokiny [38], přičemž podle vazby dalšího sacharidu existuje osm základních struktur.

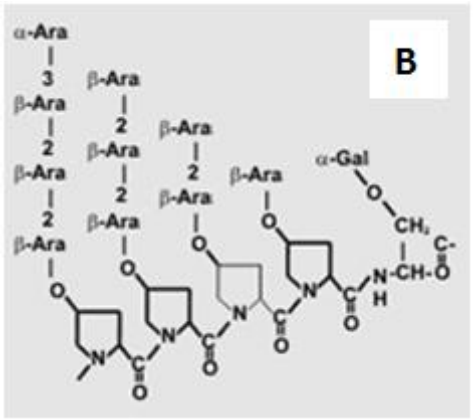
V rostlinách jsou O-glykany tvořeny stejně jako u živočichů vazbou na hydroxylové skupiny serinu a treoninu, ale významnou skupinu zde tvoří také O-glykany, ve kterých je častá vazba sacharidu na hydroxyprolin (tzv. "Hyp-rich glycoproteins"). Do této skupiny patří i významní zástupci rostlinných O-glykanů: extensiny a arabinogalaktanové proteiny (obrázek 4, str.13) [39]. K hydroxylaci prolinu dochází v endoplazmatickém retikulu, odkud je protein transportován do Golgiho aparátu. Zde dochází k vlastní O-glykosylaci některých hydroxyprolinů. V případě extensinů je glykosylována většina míst, a to vazbou arabinosy na hydroxyprolin a vazbou galaktosy na serin. V případě arabinogalaktanových proteinů jsou na hydroxyprolin navázány buď arabinogalaktany, nebo kratší a nevětvené arabinooligosacharidy. O-glykany a obzvláště ty s vysokým podílem hydroxyprolinu se v rostlinách podílejí na regulaci vývoje a růstu (na úrovni jednotlivých buněk i celé rostliny), odpovědích na poranění či vliv patogenů a regulaci buněčné smrti [21].

Speciálním případem vyskytujícím se napříč celou přírodou je pak modifikace β-vázaným GlcNAc na specifické zbytky serinu nebo treoninu. Vyskytuje se v jádře a cytoplazmě a obecně zde nedochází k následné vazbě dalších sacharidů na GlcNAc. Od ostatních forem glykosylace se tato modifikace liší také tím, že je reverzibilní. Glykosylace a deglykosylace pro tuto modifikaci může probíhat ve velmi rychlém sledu, má regulační funkci a v mnohém se podobá spíše fosforylaci proteinů [40]. Glykosylaci zajišťuje enzym O-GlcNAc transferasa (EC 2.4.1.255), deglykosylaci pak enzym O-GlcNAcasa (EC 3.2.1.169). Jejich funkce v rostlinách není příliš prozkoumána, ale souvisí s regulací růstu. Úplný knock-out genů kódujících tyto enzymy je pro rostlinu letální [21].

Obecně je přítomností O-GlcNAc bráněno fosforylaci proteinu a tím přispívá k regulaci signálních drah a transkripce. Kromě toho je touto modifikací možné přímo regulovat například transkripci genu pro proinsulin a mnoha dalších transkripčních faktorů. Právě nadměrná O-GlcNAcylace je považována za jeden z hlavních důsledků zvýšené hladiny glukosy při diabetu, která narušuje rovnováhu přirozené O-GlcNAcylace a fosforylace proteinů - zvýšená aktivita O-GlcNAc transferasy je tedy jedním z projevů toxicity glukosy [21], [41]. Dále tato modifikace ovlivňuje rychlost degradace proteinů, lokalizaci proteinů v buňce a souvisí s odpovědí organismu na

stres. V neposlední řadě je zkoumán její vliv na rozvoj nemocí mozku a nervového systému, jako je Parkinsonova choroba a amyotrofická laterální skleróza [42].





Obrázek 4: A) Struktura arabinogalaktanového proteinu. V tomto případě je vázán na GPI (glykofosfatidylinositol) a ukotvený v plazmatické membráně. B) Struktura extensinu. Ara - arabinosa, Gal - galaktosa. [39]

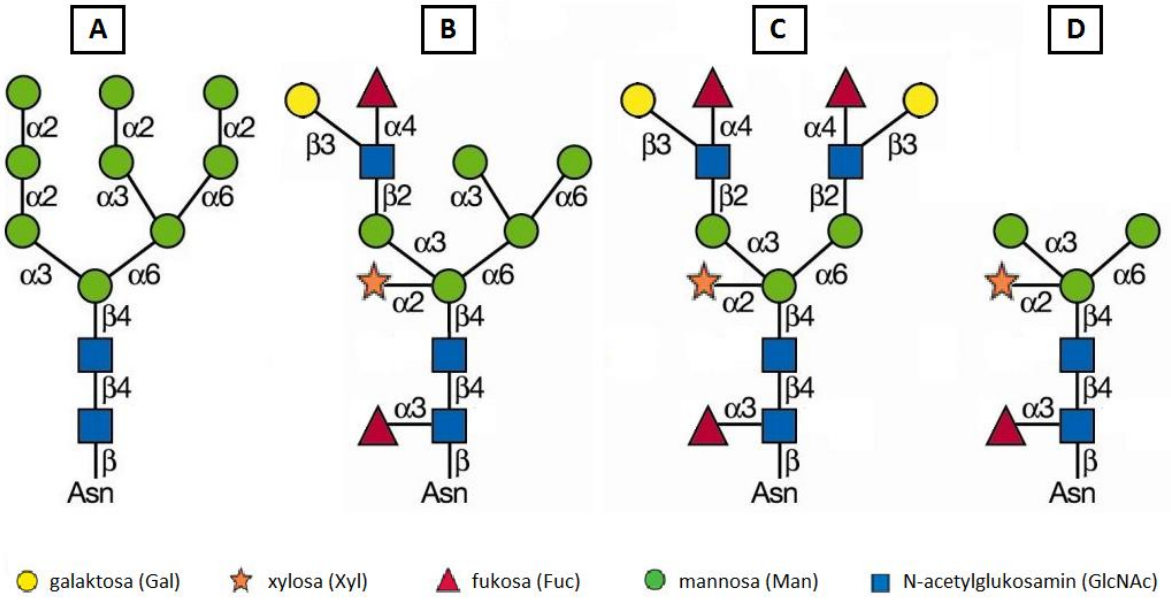
1.3.2. N-glykosylace

K N-glykosylaci proteinů dochází v endoplazmatickém retikulu a na rozdíl od O-glykosylace neprobíhá v jednotlivých krocích vazbou monosacharidů, ale vyžaduje přenesení oligosacharidového prekurzoru z lipidového přenašeče, který je až následně upraven do požadované podoby. Tento průběh je společný pro většinu eukaryotních organismů a zahrnuje přenesení oligosacharidového prekurzoru (složeného ze 3

molekul glukosy, 9 molekul mannosy a 2 molekul GlcNAc) z molekuly dolichol fosfátu na amidovou skupinu asparaginu v sekvenci proteinu Asn-X-Ser/Thr (kde X značí jakoukoliv aminokyselinu kromě prolinu) enzymovým komplexem oligosacharyltransferasy [33], [43]. V dalším kroku dochází k postupnému odstranění molekul glukosy ze sacharidového řetězce. K odstranění koncové (katalyzovaného glukosidasou I) a druhé glukosy (katalyzovaného glukosidasou II) dochází v rychlém sledu. Monoglukosylovaný sacharidový řetězec pak slouží jako jeden ze signálů správného skládání proteinů. Takto značené proteiny jsou rozpoznány membránově vázaným lektinem (calnexin), nebo jeho rozpustným homologem (calreticulin), a takto vzniklý komplex protein-lektin pak napomáhá správnému skládání proteinu a brání předčasnému vzniku složitějších struktur, dalších modifikací a opuštění endoplazmatického retikula. Další aktivitou glukosidasy II je odštěpen poslední zbytek glukosy a protein je uvolněn z komplexu s lektinem. Nesprávná konformace proteinu je poté zaznamenána glykoprotein glukosyltransferasou, které v takovém případě znovu naváže signální molekulu glukosy. Celý cyklus reakcí zahrnující úplnou deglukosylaci (glukosidasa II), monoglukosylaci proteinů s nesprávnou konformací (glykoprotein glukosyltransferasa) a interakci s lektiny endoplazmatického retikula (calnexin a calreticulin) se opakuje, dokud není dosaženo správné konformace proteinu [44]. Následně dochází aktivitou α-mannosidas k postupnému odštěpení mannosy za vzniku finálního struktury $Man_{3-9}GlcNAc_2$-Asn (nejčastěji $Man_5GlcNAc_2$-Asn) a glykoprotein je sekretován z endoplazmatického retikula do Golgiho aparátu.

Zatímco první kroky N-glykosylace probíhající na cytosolární a vnitřní straně membrány endoplazmatického retikula jsou evolučně konzervované a shodné pro většinu eukaryotních proteinů, následné úpravy v Golgiho aparátu jsou již specifické pro jednotlivé říše (i jednotlivé typy buněk). Častou úpravou typickou pro kvasinky je vazba dodatečných molekul mannosy za vzniku tzv. hypermannosylovaných glykoproteinů, které mohou obsahovat i více než 100 molekul mannosy na 1 místo glykosylace [45]. Jednotlivé typy N-glykanů (vzniklých v Golgiho aparátu následnými modifikacemi) dělíme do 4 skupin: mannosový, hybridní, komplexní a paucimannosidový typ [46]. Zatímco mannosový, hybridní a komplexní typy N-glykanů jsou známé již mnoho desítek let a dobře prostudované, paucimannosidový

typ N-glykanů byl popsán až v posledních letech a jedná se o specifikum rostlinné a hmyzí glykosylace [46], [47], [48], [49], [50]. Struktura všech typů N-glykanů v rostlinách je zobrazena na obrázku 5 (str. 15).



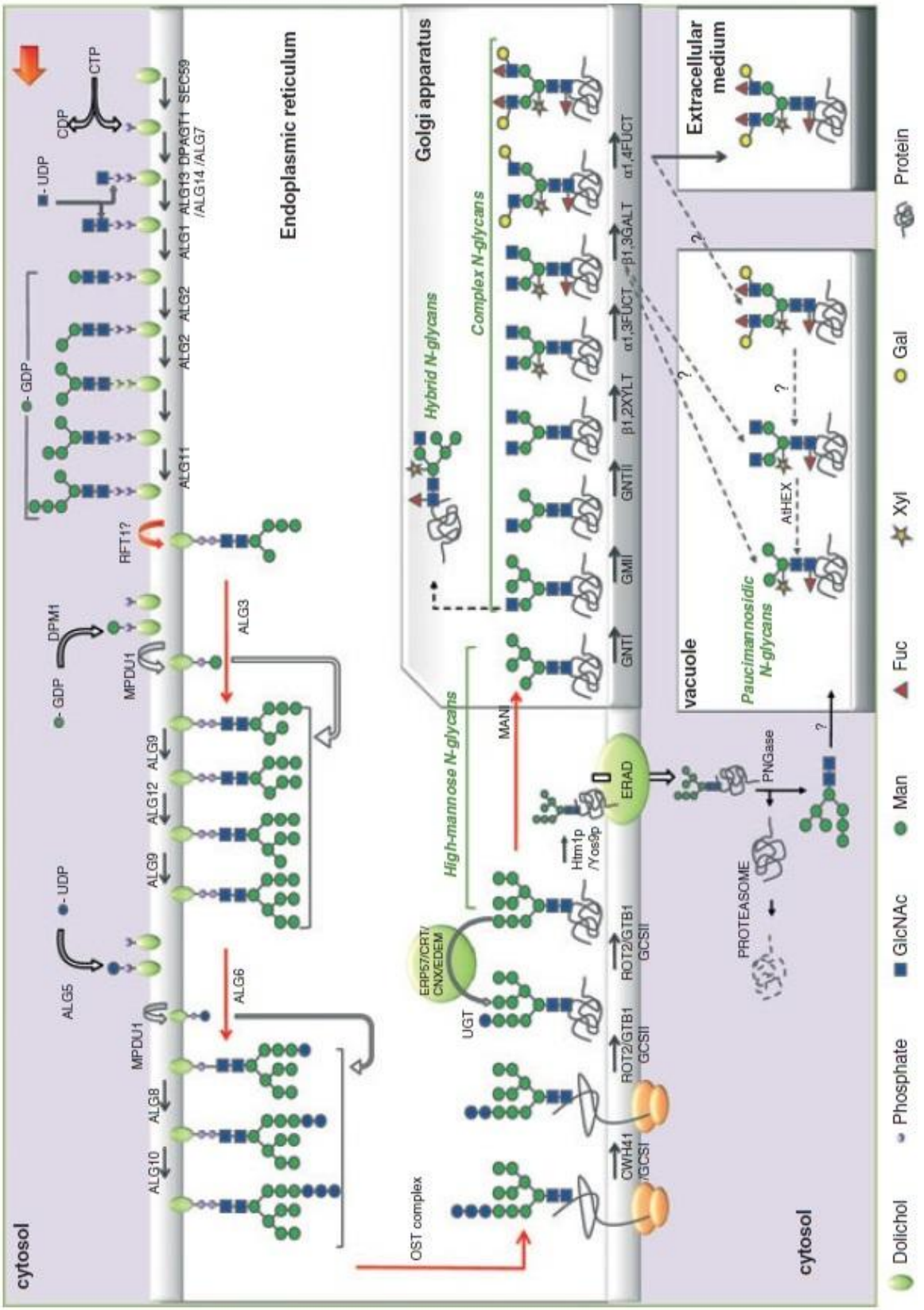
Obrázek 5: Struktura N-glykanů v rostlinách: A) mannosový typ, B) hybridní typ, C) komplexní typ a D) paucimannosidový typ.

N-glykany s vysokým obsahem mannosy (též "oligomannosidic" nebo "high-mannose" typ) vzniká již v endoplazmatickém retikulu, a k finálnímu zkrácení mannosových větví dochází už zde, nebo dodatečně v Golgiho aparátu. Tento typ N-glykanů má u živočichů i rostlin stejnou strukturu, bez dalších sacharidů a s obecným vzorcem $Man_{5-9}GlcNAc_2$ [46].

Hybridní typ vzniká následnou úpravou mannosového typu, kdy je aktivitou α-mannosidas zkrácena α1,3 větev, na kterou je následně GlcNAc transferasou navázán GlcNAc. Hybridní N-glykan je tedy charakterizován zkrácením jedné mannosové větve (přednostně se jedná vždy o α1,3 větev), vazbou jednoho nebo více GlcNAc a

současným zachováním alespoň jedné koncové mannosy. Zkrácením i α1,6 větve a další vazbou GlcNAc vzniká komplexní N-glykan, který již postrádá jakoukoliv koncovou mannosu. Takto navázaný GlcNAc může být dále modifikován, přičemž tyto modifikace jsou v případě rostlin a savců rozdílné. Ačkoliv v obou případech dochází k fukosylaci GlcNAc přímo vázaného na aspargin, v případě savčích N-glykanů je to vazbou α1,6-fukosy, zatímco pro rostliny je typická vazba α1,3-fukosy. Další typ substituce, která nebyla nikdy prokázána u savčích N-glykanů, je vazba β1,2-xylosy na β-mannosu oligosacharidového jádra. Pro rostliny je typická tzv. Lewisova struktura, tedy substituce koncového GlcNAc β1,3-galaktosou a α1,4-fukosou, zatímco pro savce je typická substituce koncového GlcNAc β1,4-galaktosou a případně i kyselinou sialovou. Odstraněním sacharidových modifikací koncových GlcNAc i samotných GlcNAc dochází k tvorbě paucimanosidových N-glykanů z komplexního typu [46], [51].

Obrázek 6 (str. 17): Souhrnné schéma N-glykosylace v rostlinách [46]. Schéma N-glykosylace začíná v pravém horním rohu tvorbou oligosacharidového prekurzoru na cytosolární straně endoplazmatického retikula. Na vnitřní straně membrány endoplazmatického retikula pokračuje přenosem oligosacharidového prekurzoru na nascentní protein enzymovým komplexem oligosacharyltransferasy (OST), calnexin/calreticulin cyklem (označeným jako ERP57/CRT/CNX/EDEM) a tvorbou mannosového typu N-glykanů. V Golgiho aparátu pokračuje tvorbou hybridního a komplexního typu N-glykanů. Tvorba paucimannosidového typu N-glykanů je na schématu v dolním rámečku náležícímu vakuole, stejně jako β-N-acetylhexosaminidasa označená symbolem AtHEX. Čárkované šipky naznačují teoretický průběh reakcí, který ale není dosud dostatečně objasněný.



Obrázek 6: Souhrnné schéma N-glykosylace v rostlinách [46]. Popis obrázku na předchozí straně.

1.4. Význam β-NAHA při syntéze glykoproteinů

Paucimannosidový typ N-glykanů má jádro podobné mannosovému typu N-glykanů, ale na GlcNAc oligosacharidového jádra je navázána fukosa a na β-mannosu xylosa (obrázek 5, str. 15). Studiem substrátové specifity rostlinných fukosyltransferas a xylosyltransferas bylo zjištěno, že tyto enzymy jsou schopné katalyzovat substituci N-glykanu fukosou nebo xylosou pouze v případě vazby koncového GlcNAc na alespoň α1,3 mannosové větvi [52], [53]. Fukosylace ani xylosylace N-glykanů neprobíhá u substrátů bez koncového GlcNAc, ale ani u substrátů s koncovým GlcNAc pouze na α1,6 mannosové větvi (tato konfigurace se přirozeně nevyskytuje). Předchozí fukosylace či xylosylace N-glykanu nemá významný vliv na aktivitu druhého enzymu, s největší pravděpodobností se tedy jedná o dva na sobě nezávislé kroky [54]. Jelikož modifikace fukosou a xylosou vyžaduje hybridní či komplexní typ N-glykanu, bylo navrženo schéma, ve kterém paucimannosidový typ N-glykanů vzniká až dodatečnou aktivitou β-N-acetylhexosaminidasy [52].

K ověření tohoto schématu bylo připraveno několik mutantů rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) s vyřazenými (knocked out) geny, které kódují β-N-acetylhexosaminidasy HEXO1-3. Potvrdilo se, že HEXO1 a HEXO3 jsou společně odpovědné za tvorbu paucimannosidových N-glykanů v kořenech přibližně stejnou měrou, zatímco v listech je příspěvek HEXO3 významnější. U HEXO2 nebyl zaznamenán žádný vliv [55]. Komplexní N-glykany s galaktosou a fukosou modifikovanými koncovými GlcNAc jsou pak typické pro extracelulární proteiny, paucimannosidové N-glykany se vyskytují hlavně u vakuolárních proteinů a N-glykany zásobních proteinů semen jsou svojí strukturou druhově specifické [46], [47], [56].

Při studiu mutantů huseníčku rolního s vyřazenými geny pro xylosyltransferasu a (α1,3-)fukosyltransferasu bylo zjištěno, že komplexní N-glykan $GlcNAc_2Man_3GlcNAc_2$ se u takovýchto rostlin vyskytuje s četností přesahující 40%. Fukosylace a xylosylace N-glykanu tedy mají vliv na aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy [57].

Syntéza paucimannosidových N-glykanů tedy začíná po vazbě GlcNAc na α1,3 mannosovou větev za tvorby hybridního typu, po kterém následuje zkrácení α1,6

mannosové větve. Následně může být vazbou druhého GlcNAc tentokrát na α1,6 větev zformován komplexní N-glykan, ale tento krok není potřebný. K vazbě β1,2-xylosy na β-mannosu a vazbě α1,3-fukosy na GlcNAc přímo vázaný na aspargin dochází ve dvou na sobě nezávislých krocích bez pevného pořadí. Následně β-N-acetylhexosaminidasa odstraní koncový GlcNAc za vzniku N-glykanu paucimannosidového typu. Schéma tvorby komplexních a paucimannosidového typu N-glykanů v rostlinách je vyobrazeno na obrázku 6 (str. 17). Možnost tvorby paucimannosidových N-glykanů odstraněním sacharidů modifikujících koncový GlcNAc, tedy z již plně rozvinutého komplexního typu, a přechod jednotlivých typů mezi sebou doposud není objasněn [46].

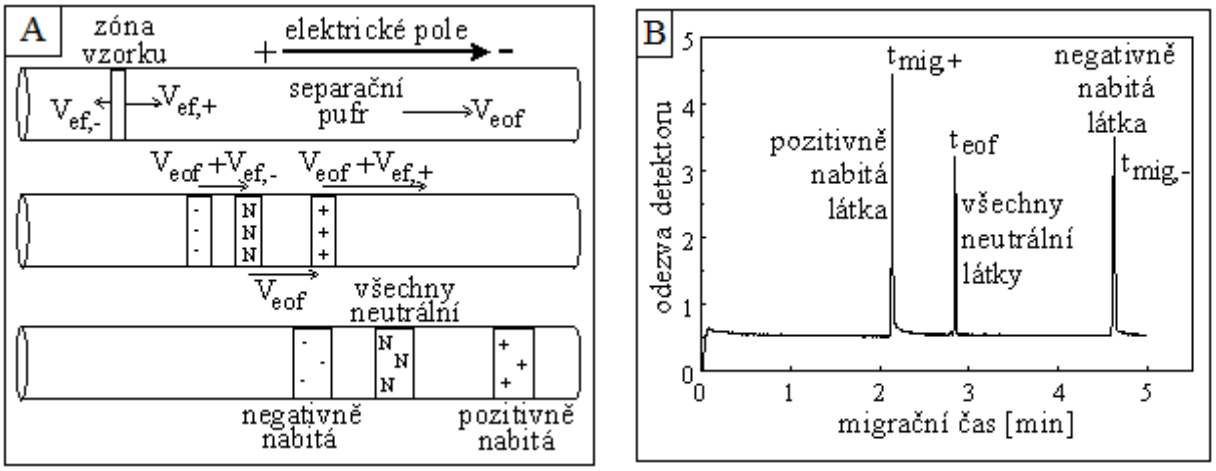
Vlivem přítomnosti specifických modifikací koncového GlcNAc, stejně jako substituci β1,2-xylosou a α1,3-fukosou, jsou rostlinné glykoproteiny antigenní, což znesnadňuje použití rostlin při přípravě rekombinantních proteinů k terapeutickým účelům [46], [58]. Výše zmíněné studie prováděné na modifikovaných rostlinách huseníčku rolního (bez funkční β-N-acetylhexosaminidasy [55], nebo bez funkčních xylosyltransferasy a (α1,3-)fukosyltransferasy [57]) neovlivňují životaschopnost rostlin a nejsou provázeny fenotypovými změnami, avšak mohou vést ke vzniku pro člověka neantigenních glykoproteinů.

1.5. Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je jednou z moderních analytických metod, umožňujících miniaturizaci vědeckého výzkumu. Oproti starším metodám analýzy nabízí nižší náklady na provoz, nižší spotřebu analyzovaného materiálu a obecně i zkrácení času měření. K provozu potřebuje převážně běžné substance, a tím snižuje i dopad na životní prostředí. Kapilární elektroforéza zahrnuje několik technik, které se liší principem separace: kapilární zónová elektroforéza (CZE), kapilární gelová elektroforéza (CGE), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC), kapilární isoelektrická fokusace (CEIF) a isotachoforéza (ITP). Uspořádání umožňuje detekci absorbance, fluorescence i pomocí hmotnostní spektrometrie [59].

Kapilární zónová elektroforéza je základní a nejjednodušší technika kapilární elektroforézy, při které probíhá separace analyzovaného materiálu výhradně v závislosti na elektroforetické pohyblivosti jednotlivých složek. Využívá se zde dvou transportních jevů: elektroosmotického toku kapaliny a elektroforetické pohyblivosti iontů. Působením vnitřního povrchu kapiláry (nejběžnější je křemenná kapilára modifikovaná např. pomocí silanových skupin) dochází k vytvoření koncentračních zón jednotlivých iontů uvnitř kapiláry. Aplikací vysokého napětí (v řádu desítek kV) v kapiláře dochází ke vzniku elektroosmotického proudu, při kterém se kladná vrstva (nejblíže povrchu kapiláry) pohybuje směrem ke katodě a vlivem viskozity s sebou strhává i ostatní zóny roztoku. Modifikací vnitřního povrchu kapiláry a volbou vhodného pufru lze elektroosmotický tok regulovat. Elektroforetická pohyblivost závisí na náboji, velikosti, solvatační sféře atd. Směrem ke katodě urychluje kladně nabité a zpomaluje záporně nabité látky, čímž je umožněna separace a vlastní analýza [59], [60]. K separaci neutrálních molekul je třeba k elektroforetickému pufru přidat tenzid, například SDS [61], který vytváří micely a umožňuje separaci neutrálních látek na základě jejich hydrofobicity. Zvolený detektor pak zaznamenává odezvu signálu a ze získaných dat je možné sestrojit elektroferogram, tedy graf závislosti detekovaného signálu na migračním čase. Obrázek 7 (str. 21) zobrazuje schéma separace při kapilární zónové elektroforéze a tomu odpovídající elektroferogram.

Nevýhodou kapilární zónové elektroforézy je omezená reprodukovatelnost. Křemenná kapilára zajišťuje svými vlastnostmi elektroosmotický tok, ten je ale značně kolísavý a mění se mezi jednotlivými měřeními, nebo i v rámci jednoho měření [62]. Zpřesnění kvalitativní analýzy a reprodukovatelnosti lze dosáhnout vhodnou úpravou vnitřního povrchu kapiláry vedoucí ke zmírnění nebo odstranění elektroosmotického toku, ale za cenu prodloužení doby analýzy. Také s miniaturizací a malým množstvím vzorku jsou spojené další komplikace, neboť přesné nadávkování vzorku o objemu v řádu pikolitrů až nanolitrů je i přes různé metody aplikace obtížné, což znesnadňuje kvantitativní analýzu [63].



Obrázek 7: A) Schéma separace analytu při kapilární zónové elektroforéze a B) tomu odpovídající elektroferogram [59].

V současnosti se kapilární elektroforéza používá mimo jiné ke stanovení enzymové aktivity, kinetiky, substrátové specifity, inhibičních studií a ke studiu metabolických drah [64]. Poprvé byla kapilární elektroforéza použita k enzymovému stanovení v případě měření aktivity alkalické proteasy v roce 1991 [65].

Základním rozdělením při měření enzymových reakcí je pak tzv. offline a online uspořádání [64]. Při offline uspořádání dochází k reakci mimo analytický systém a je ukončena před nebo samotnou aplikací do kapiláry. Výhodou tohoto uspořádání je možnost opakovaného měření jedné reakční směsi. Online uspořádání je častěji označováno jako EMMA (elektroforeticky zprostředkovaná mikroanalýza). V tomto případě jsou jednotlivé složky reakční směsi aplikovány do kapiláry samostatně a k jejich smísení a tím i nastartování reakce dochází až vlivem elektroforetické migrace nebo difúze v kapiláře. Tímto je možné měření plně automatizovat a také je snížena spotřeba materiálu [66].

Do dnešního dne byla kapilární elektroforéza využita ke studiu enzymových reakcí ve stovkách případů [64], [66], [67], [68], mimo jiné také k učení enzymové aktivity u směsí dosud necharakterizovaných proteinů [69].

Pomocí kapilární elektroforézy byla u hmyzí chitinasy organismu *Tenebrio molitor* (potemník moučný) studována kinetika hydrolýzy krátkých chitooligosacharidů a stanoveny produkty reakce (bez modifikací substrátů) [70]. Online metodou měření (EMMA) byly s pomocí kapilární elektroforézy stanoveny kinetické parametry β-N-acetylhexosaminidasy z telecí ledviny (spolu s houbovou α-glukosidasou a β-galaktosidasou) [71]. Offline metodou pak byla stanovena aktivita β-N-acetylhexosaminidasy v moči ke studiu patologických změn v organismu, s využitím 4-methylumbelliferonem značeného substrátu a měření fluorescence bez jakékoliv další úpravy biologického materiálu [72]. Nové metody přímého značení chitooligosacharidů posouvají limity detekce z koncentrací v řádu jednotek $\mu mol \cdot l^{-1}$ do řádu $nmol \cdot l^{-1}$ a umožňují tak stále přesnější analýzu s menšími objemy vzorků [73].

Také v naší laboratoři již bylo stanovení chitooligosacharidů pomocí kapilární elektroforézy využito ke studiu houbové β-N-acetylhexosaminidasy organismu *Aspergillus oryzae*, při kterém byl sledován průběh reakce, působení inhibitorů a dále bylo stanoveno pH optimum β-N-acetylhexosaminidasy se substráty N,N'-diacetylchitobiosa a N,N',N''-triacetylchitotriosa [74].

2. CÍL PRÁCE

- Purifikace β-N-acetylhexosaminidasy z listů tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)
- Charakterizace β-N-acetylhexosaminidasy
- Optimalizace metody ke stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy se substráty N,N'-diacetylchitobiosa, p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid a N,N',N''-triacetylchitotriosa pomocí kapilární elektroforézy
- Studium substrátové specifity β-N-acetylhexosaminidasy
- Stanovení teplotního a pH optima β-N-acetylhexosaminidasy
- Kinetické a inhibiční studie β-N-acetylhexosaminidasy
- Studium glykosylace β-N-acetylhexosaminidasy

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Přístroje a pomůcky

Analytické váhy 100A … Denver Instrument Company, USA

Centrifuga Universal 32R … HettichZentrifugen, Německo

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

Magnetická míchačka s ohřívačem RH basic … Labortechnik, Německo

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

Spektrofotometr Ultrospec 2100 Pro … Biochrom, Velká Británie

Elektroforetická aparatura … Biometra, Německo

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

Přístroj pro izoelektrickou fokusaci FBA 3000 … Pharmacia, Švédsko

Zdroj pro izoelektrickou fokusaci ECPS 3000/150 … Pharmacia, Švédsko

Centrifugační filtrační systém Microcon YM-30 … Sigma-Aldrich, USA

3.2. Analytický software

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

3.3. Rostlinný materiál

Pro studium β-N-acetylhexosaminidasy jsem použil rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1) laskavě poskytnuté Dr. Helenou Synkovou, CSc, Ústav experimentální botaniky, AV ČR. Listy byly použity čerstvé, nebo byly po sklizení zmraženy v tekutém dusíku a skladovány při -80 °C.

3.4. Chemikálie

Endo H … New England Biolabs, USA

PNGasa F … New England Biolabs, USA

BSA … Sigma-Aldrich, USA

RuBisCO … Sigma-Aldrich, USA

Glutamát dehydrogenasa … Serva Electrophoresis GmbH, USA

PageRuler Plus … Thermo Fisher Scientific, USA

Serva IEF Markers 3-10 … Serva Electrophoresis GmbH, USA

Poly(vinylpolypyrrolidon) … Sigma-Aldrich, USA

p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-glukosaminid … Sigma-Aldrich, USA

p-nitrofenyl-β-N-acetyl-D-galaktosaminid … Sigma-Aldrich, USA

N,N'-diacetylchitobiosa … Sigma-Aldrich, USA

N,N',N''-triacetylchitotriosa … Sigma-Aldrich, USA

p-nitrofenyl-N,N'-diacetylchitobiosid … Sigma-Aldrich, USA

Naftol AS-BI N-acetyl-β-D-glukosaminid … Sigma-Aldrich, USA

N-acetyl-D-glukosamin … Sigma-Aldrich, USA

N-acetyl-D-galaktosamin … Sigma-Aldrich, USA

D-glukosamin … Lachema, ČR

D-galaktosamin … Lachema, ČR

N,N-dimethylformamid … Lachema, ČR

Methyl-α-D-glukopyranosid … Sigma-Aldrich, USA

Bradfordovo činidlo … Sigma-Aldrich, USA

N,N,N',N'-Tetramethyl ethylendiamin … Serva Electrophoresis GmbH, USA

Coomassie Brilliant Blue G … Sigma-Aldrich, USA

Coomassie Brilliant Blue R250 … Sigma-Aldrich, USA

Ponceau Red S … Sigma-Aldrich, USA

Dodecylsulfát sodný … Sigma-Aldrich, USA

Fast Violet B Salt … Sigma-Aldrich, USA

Nitro Blue Tetrazolium … Sigma-Aldrich, USA

Fenazin methosulfát … Sigma-Aldrich, USA

NAD^+ … Sigma-Aldrich, USA

$NADP^+$ … Sigma-Aldrich, USA

L-malát sodný … Sigma-Aldrich, USA

Tris(hydroxymethyl)aminomethan … Fluka, USA

Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan … Fluka, USA

Sephacryl S-300 … Pharmacia Fine Chemicals, Švédsko

ConA-Sepharosa 4B … Pharmacia Fine Chemicals, Švédsko

3.5. Metody a pracovní postupy

3.5.1. Částečná purifikace β-N-acetylhexosmanidasy z rostlin tabáku

3.5.1.1. Extrakce

K purifikaci β-N-acetylhexosmanidasy jsem použil 60 g listů tabáku. Listy jsem homogenizoval v mixéru s dvojnásobným množstvím 0,1 M citrátového pufru pH 6,0 a nechal 30 min extrahovat. Poté jsem směs přefiltroval přes čtyřvrstevnou gázu a k filtrátu přidal přibližně 10 mg PVP na 1 ml filtrátu, abych odstranil fenolické sloučeniny. Takto připravenou směs jsem centrifugoval 30 min při 4 °C a 9400 × g. Pro další krok purifikace jsem použil supernatant.

3.5.1.2. Precipitace síranem amonným

Bílkoviny obsažené v supernatantu jsem srážel síranem amonným ve dvou krocích. První srážení jsem provedl v rozmezí 0-30% nasycení, abych se zbavil balastních proteinů. Roztok jsem centrifugoval 30 min při 4 °C a 9400 × g.

K druhému kroku jsem použil supernatant, srážení jsem provedl v rozmezí 30-65% nasycení. Roztok jsem centrifugoval 30 min při 4 °C a 9400 × g. Po skončení centrifugace jsem sediment resuspendoval v 0,1 M citrátovém pufru pH 6,0.

3.5.1.3. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 (I)

Enzymový preparát po precipitaci síranem amonným jsem nanesl na sloupec Sephacrylu S-300 o průměru 2,4 cm a výšce 8 cm, abych jej odsolil před následujícím

krokem purifikace. Eluci jsem prováděl s 0,1 M citrátovým pufrem pH 6,0. U jímaných frakcí jsem sledoval koncentraci bílkovin (způsobem popsaným v kapitole 3.5.2.1., str. 30) a měřil aktivitu β-N-acetylhexosmanidasy (způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1., str. 35). K dalšímu kroku purifikace jsem spojil frakce s nejvyšší aktivitou β-N-acetylhexosmanidasy.

3.5.1.4. Afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy

K enzymovému preparátu jsem přidal $CaCl_2$ a $MnCl_2$, tak aby výsledné koncentrace v preparátu byly 5 mM. Enzymový preparát jsem nanesl na sloupec ConA-Sepharosy o průměru 1,2 cm a výšce 5 cm. Eluci jsem prováděl s 0,5 M NaCl, 5mM $CaCl_2$ a 5 mM $MnCl_2$ v 0,1 M citrátovém pufru pH 6,0. U jímaných frakcí jsem sledoval koncentraci bílkovin (způsobem popsaným v kapitole 3.5.2.1., str. 30) a měřil aktivitu β-N-acetylhexosmanidasy (způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1., str. 35).

Jakmile v jímaných frakcích poklesla koncentrace bílkovin, provedl jsem eluci zachycených glykoproteinů s 0,2 M methyl-α-D-glukopyranosidem a 0,5 M NaCl v 0,1 M citrátovém pufru pH 6,0. Pokračoval jsem ve stanovení koncentrace bílkovin a aktivity β-N-acetylhexosmanidasy.

Frakce s nejvyšší aktivitou β-N-acetylhexosmanidasy jsem spojil dohromady. Takto získaný enzymový preparát jsem srážel síranem amonným v rozmezí 0-65% nasycení a centrifugoval postupem popsaným v kapitole 3.5.1.2. (str. 27). Pro následující krok purifikace jsem použil sediment resuspendovaný v 0,1 M citrátovém pufru pH 6,0.

3.5.1.5. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 (II)

Enzymový preparát jsem nanesl na sloupec Sephacrylu S-300 o průměru 1,2 cm a výšce 8 cm. Eluci jsem prováděl s 0,1M citrátovým pufrem pH 6,0. U jímaných frakcí jsem sledoval koncentraci bílkovin (způsobem popsaným v kapitole 3.5.2.1., str. 30) a měřil aktivitu β-N-acetylhexosmanidasy (způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1., str. 35). Finální enzymový preparát jsem získal spojením frakcí s nejvyšší aktivitou β-N-acetylhexosmanidasy.

3.5.1.6. Extrakce β-N-acetylhexosaminidasy vyšší iontovou silou

Alternativní metodu extrakce jsem zvolil pro důkaz nerozpustné (membránově vázané) formy β-N-acetylhexosaminidasy v listech tabáku.

Sediment vzniklý centrifugací hrubého extraktu (kapitola 3.5.1.1., str. 27) jsem resuspendoval v 3 ml 0,1 M citrátového pufru pH 6,0 a vzniklou směs centrifugoval 15 min při 4 °C a 13500 × g. Následně jsem odlil supernatant a sediment jsem resuspendoval v 1 ml 1 M NaCl v 0,1 M citrátovém pufru pH 6,0. Směs jsem znovu centrifugoval 15 min při 4 °C a 9400 × g. V supernatantu jsem stanovil aktivitu membránově vázané β-N-acetylhexosaminidasy.

3.5.1.7. Centrifugační filtrace enzymového preparátu

K zahuštění nebo snížení koncentrace solí v enzymovém preparátu jsem použil centrifugační filtrační systém Microcon YM-30. Celkem 500 µl enzymového preparátu jsem podle návodu výrobce centrifugoval 15 min při 4 °C a 13 500 x g. Tímto jsem získal přibližně 35 µl enzymového preparátu o přibližně 15x vyšší koncentraci proteinů, který jsem použil pro další stanovení. Pro snížení koncentrace solí jsem

koncentrovaný enzymový preparát promyl destilovanou vodou a v případě potřeby opakováním postupu znovu zahustil.

3.5.2. Stanovení koncentrace bílkovin

3.5.2.1. Stanovení koncentrace bílkovin měřením absorbance

V průběhu purifikace jsem koncentraci bílkovin v jednotlivých jímaných frakcích orientačně stanovoval měřením absorbance při vlnové délce 280 nm, kdy A_{280} = 1 průměrně odpovídá koncentraci bílkovin 1 mg · ml^{-1} [75]. Jako slepý vzorek jsem používal 0,1 M citrátový pufr pH 6,0.

3.5.2.2. Stanovení koncentrace bílkovin metodou dle Bradfordové

Přesnější stanovení koncentrace bílkovin jsem prováděl metodou dle Bradfordové [76]. Kalibrační závislost jsem sestrojil pro rozsah koncentrací 0-1,4 mg/ml, přičemž jako standard jsem použil BSA.

K 33 µl vhodně naředěného enzymového preparátu jsem přidal 1 ml vytemperovaného činidla a nechal 25 min reagovat při laboratorní teplotě. Stanovil jsem absorbanci při vlnové délce 595 nm proti slepému vzorku, který obsahoval 33 µl 0,1 M citrátového pufru pH 6,0 a 1 ml činidla. Koncentraci bílkovin jsem poté odečetl z kalibrační závislosti.

3.5.2.3. Stanovení koncentrace bílkovin metodou dle Lowryho

Při nižší koncentraci bílkovin v enzymovém preparátu jsem použil stanovení Lowryho metodou [77]. Tato metoda spočívá v redukci Folin-Ciocalteuova činidla (směs fosfowolframové a fosfomolybdenové kyseliny) bílkovinami, přičemž vznikající komplex molybdenové modři je možné spektrofotometricky stanovit při vlnové délce 500-750 nm.

K 200 µl enzymového preparátu jsem přidal 1 ml činidla vzniklého smícháním roztoku 2% Na_2CO_3 v 0,1 M NaOH a roztoku 0,5% $CuSO_4$ v 1% vinanu sodném, a to v poměru 50:1. Reakční směs jsem nechal inkubovat 10 min při laboratorní teplotě. Následně jsem přidal 100 µl Folinova činidla zředěného 1:1 destilovanou vodou, směs jsem promíchal a nechal inkubovat dalších 30 min při laboratorní teplotě. Absorbanci jsem změřil při 500 nm proti slepému vzorku, který místo enzymového preparátu obsahoval 0,1 M citrátový pufr pH 6,0. Koncentraci bílkovin jsem poté odečetl z kalibrační závislosti, kterou jsem sestrojil pro BSA v rozmezí koncentrací 0-0,5 mg/ml.

3.5.3. Elektroforetická separace a izoelektrická fokusace

3.5.3.1. Elektroforetická separace za denaturujících podmínek

Čistotu enzymového preparátu v průběhu izolace a průběh deglykosylace jsem sledoval pomocí elektroforetické separace v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti SDS [78]. SDS-PAGE jsem provedl s 5% zaostřovacím a 10% separačním gelem. Zaostřovací gel obsahoval 5% akrylamid/bis-akrylamid, 0,1% peroxosíran amonný, 0,1% SDS, 0,15% TEMED a 0,125 M Tris HCl pufr pH 6,8. Separační gel obsahoval 10% akrylamid/bis-akrylamid, 0,1% peroxosíran amonný, 0,1% SDS, 0,05% TEMED a 0,38 M Tris HCl pufr pH 8,8.

Jednotlivé vzorky jsem smísil v poměru 1:1 se vzorkovým pufrem o složení 0,005% bromfenolová modř, 70 mM SDS, 100 mM DTT, 20% glycerol a 0,13 M Tris HCl pufr pH 6,8. Vzorky jsem krátce povařil a pomocí Hamiltonovi stříkačky nadávkoval do jednotlivých jamek, v množství odpovídajícímu přibližně 5 μg bílkovin na jamku.

Elektrodový pufr obsahoval 1 g SDS, 3 g Tris a 18,8 g glycinu v 1 litru destilované vody. Elektroforetickou separaci jsem prováděl zpočátku při napětí 70 V a jakmile se zóna vzorků dostala na rozhraní mezi zaostřovacím a separačním gelem, zvýšil jsem napětí na 140 V.

Po ukončení separace jsem bílkoviny v gelu obarvil roztokem Coomassie Brilliant Blue metodou popsanou v kapitole 3.5.3.4. (str. 33), nebo dusičnanem stříbrným metodou popsanou v kapitole 3.5.3.5. (str. 34).

3.5.3.2. Elektroforetická separace za nativních podmínek

Elektroforetickou separaci za nativních podmínek jsem provedl metodou červené nativní elektroforézy [79]. Jako standardy jsem použil BSA (mono- až trimer, M_R 67 000 - 201 000), laktát dehydrogenasu (M_R 140 000), glutamát dehydrogenasu (M_R 369 000) a RuBisCO (M_R 540 000).

Elektroforetickou separaci jsem provedl s 6% separačním gelem. Gel obsahoval 6% akrylamid/bis-akrylamid, 12,5 mM BisTris, 0,012% Ponceau Red S, 0,1% peroxosíran amonný a 0,05% TEMED. Elektrodový pufr obsahoval 50 mM Tricin, 15 mM BisTris a 0,012% Ponceau Red S.

Enzymový preparát jsem smísil v poměru 1:1 se vzorkovým pufrem, který obsahoval 15% glycerol, 50 mM BisTris/HCl pufr 7,0 a 0,02% Ponceau Red S. Takto připravený vzorek jsem nanesl do připravených jamek. Separaci jsem nechal probíhat při napětí 140 V po dobu 2 hodin.

Po ukončení separace jsem gel určený ke stanovení bílkovin obarvil roztokem Coomassie Brilliant Blue metodou popsanou v kapitole 3.5.3.4. (str. 33) a dusičnanem stříbrným metodou popsanou v kapitole 3.5.3.5. (str. 34). Část gelu ke stanovení aktivity laktát dehydrogenasy jsem stanovil metodou optimalizovanou pro biochemické praktikum katedry biochemie PřF UK [80]. Část gelu ke stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy jsem obarvil metodou popsanou v kapitole 3.5.3.6. (str. 34).

3.5.3.3. Izoelektrická fokusace β-N-acetylhexosaminidasy

Stanovení jsem provedl na přístroji FBA 3000 s použitím zdroje ECPS 3000/150. Na gel Servalyt Precotes jsem nanesl standard Serva IEF Markers 3-10 a vzorky enzymového preparátu ke stanovení bílkovin a aktivity β-N-acetylhexosaminidasy. Nanášel jsem 1 - 6 μl koncentrovaného enzymového preparátu se sníženou koncentrací solí (přibližně 6,5 mM koncentrace citrátového pufru pH 6,0), připraveného postupem uvedeným v kapitole 3.5.1.7. (str. 29). Při stanovení jsem postupoval dle návodu výrobce, přičemž vzhledem k velikosti β-N-acetylhexosaminidasy jsem fokusaci nechal probíhat déle, než trvalo zaostření indikátoru standardu (po dobu 6 hod). Po ukončení izoelektrické fokusace jsem část gelu určené ke stanovení bílkovin obarvil dusičnanem stříbrným metodou popsanou v kapitole 3.5.3.5. (str. 34) a část gelu určené ke stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy jsem obarvil metodou pospanou v kapitole 3.5.3.6. (str. 34).

3.5.3.4. Barvení bílkovin v gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue

Detekci bílkovin v gelu jsem provedl obarvením pomocí barvícího roztoku Coomassie Brilliant Blue, který obsahoval 2 g/l Coomassie Brilliant Blue R250, 0,5 g/l Coomassie Brilliant Blue G, 42,5% ethanol, 5% methanol a 10% kyselinu octovou v destilované vodě. Barvení probíhalo přes noc a odbarvení jsem provedl

mnohonásobným promytím odbarvovacím roztokem, který byl až na Coomassie Brilliant Blue stejného složení jako barvící roztok.

3.5.3.5. Barvení bílkovin v gelu dusičnanem stříbrným

Detekci bílkovin v gelu jsem provedl obarvením dusičnanem stříbrným. Bílkoviny jsem v gelu zafixoval roztokem 50% methanolu, 12% trichloroctové kyseliny a 2% $CuCl_2$ (20 min). Poté jsem gel 10 min promýval roztokem 10% ethanolu a 5% kyseliny octové (roztok A), inkuboval v 0,01% $KMnO_4$ (10 min), promyl roztokem A (10 min), opláchl destilovanou vodou a promyl v 10% ethanolu (10 min), opláchl destilovanou vodou a inkuboval v 0,1% $AgNO_3$ (10 min), opláchl destilovanou vodou a alkalizoval v 10% K_2CO_3 (1-2 min). Poté jsem provedl vyvíjení pomocí 0,1% formaldehydu v 10% K_2CO_3 (2-5 min). Nakonec jsem gel ustálil promytím v roztoku A (1-2 min), opláchl a ponořil do destilované vody.

3.5.3.6. Detekce aktivity β-N-acetylhexosaminidasy v gelu

Gel jsem ponořil do barvící směsi ke stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy, kterou jsem připravil smísením roztoků 3 mg substrátu AS-BI N-acetyl-β-D-glukosaminid v 0,5 ml DMF a 20 mg Fast Violet B Salt ve 20 ml 0,1 M citrátového pufru pH 5,0 [81]. Gel jsem inkuboval při laboratorní teplotě. Jakmile byla intenzita zbarvení vzniklého reakcí dostačující, odebral jsem gel z reakční směsi a pozadí jsem odbarvil roztokem 7% kyseliny octové.

3.5.4. Kinetické vlastnosti β-N-acetylhexosaminidasy

3.5.4.1. Stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy za použití substrátů p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc

Připravil jsem roztoky 0,025 M citrátového pufru pH 6,0 a 0,1 M citrátového pufru pH 4,75 a p-NP v rozsahu koncentrací 0-0,5 mM. K 200 µl roztoku o dané koncentraci p-NP jsem poté přidal 800 µl 0,1M borátového pufru pH 9,2. Změřil jsem absorbanci při 405 nm proti slepému vzorku s nulovou koncentrací p-NP. Ze získaných dat jsem sestrojil kalibrační závislost absorbance při 405 nm na koncentraci p-NP v reakční směsi vzniklého hydrolýzou syntetických chromogenních substrátů p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc.

Reakční směs ke stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy v případě substrátů p-NP-GlcNAc resp. p-NP-GalNAc obsahovala 50 µl (1/4 objemu) enzymového preparátu, 1 mM koncentraci příslušného substrátu a 0,1 M citrátový pufr s příslušným optimálním pH. Všechny složky reakční směsi byly vytemperovány na reakční teplotu. Reakce probíhala 10 min při teplotě 25 °C a byla zastavena přidáním 800 µl 0,1 M borátového pufru pH 9,2. Stanovil jsem absorbanci při 405 nm proti slepému vzorku, kam byl 0,1 M borátový pufr přidán před započetím reakce. Odečtením z kalibrační závislosti jsem stanovil množství uvolněného p-NP a určil aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy, kterou jsem vyjádřil jako látkové množství p-NP uvolněného v reakční směsi za 1 min reakce, vztažené na 1 mg bílkovin ve vzorku [µmol min^{-1} mg^{-1}].

3.5.4.2. Stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy za použití substrátů stanovovaných pomocí kapilární elektroforézy

Pomocí kapilární elektroforézy jsem stanovoval aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy se substráty N,N'-diacetylchitobiosa,

p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid a N,N',N''-triacetylchitotriosa. Separaci směsí chitooligosacharidů a kvantifikaci produktů jsem prováděl pomocí kapilární elektroforézy na přístroji ^{3D}CE. Jako migrační pufr jsem použil 25 mM borátový pufr pH 9,2 (N,N'-diacetylchitobiosa) a 25 mM borátový pufr pH 10,25 (p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid a N,N',N''-triacetylchitotriosa). Použitá kapilára byla z křemenného skla s vnitřním průměrem 50 nebo 75 μm, čemuž odpovídalo použité napětí 30 kV nebo 15 kV. Délka kapiláry byla 65 cm, z toho efektivní délka 58,5 cm. Vzorek byl dávkován elektrokineticky. Podle použité kapiláry a stanovované reakce trvalo vlastní měření 6-18 min. Detekce probíhala měřením absorbance v UV oblasti při 200, 214 a 254 nm, k vyhodnocení jsem použil hodnot naměřených při 200 nm.

Reakční směs měla celkový objem 40 μl a obsahovala 12-18 μl enzymového preparátu, substrát o koncentraci 1-1,5 mM a 0,05 M citrátový pufr s příslušným optimálním pH. Reakce probíhala stanovenou dobu při teplotě 25 °C a byla zastavená nadávkováním do kapiláry.

Vyhodnocení probíhalo pomocí softwaru 3D CE ChemStation. Množství vzniklého produktu reakce jsem manuálně odečetl z plochy pod píkem naměřené při 200 nm a stanovil podle kalibrační závislosti.

Pro sestrojení kalibrační závislosti jsem proměřil roztoky se složením odpovídajícím reakčním směsím, kde pouze enzymový preparát byl nahrazen čistým 0,1 M citrátovým pufrem pH 6,0. Kalibrační závislost byla sestrojena pro rozsah koncentrací produktů reakce 0-0,5 mM.

3.5.4.3. Sledování průběhu reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou

Pro jednotlivé substráty jsem studoval průběh reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou. Připravil jsem násobek objemu reakční směsi pro měření aktivity, směs jsem vytemperoval na požadovanou teplotu a započal reakci. Ve stanovený čas jsem odebíral potřebné množství reakční směsi, ve kterém jsem stanovil

aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy (kapitola 3.5.4.1., str. 35 a kapitola 3.5.4.2., str. 35). Z naměřených hodnot jsem poté sestavil graf průběhu reakce v čase.

3.5.4.4. Stanovení základních kinetických parametrů β-N-acetylhexosaminidasy

Stanovil jsem základní kinetické parametry β-N-acetylhexosaminidasy, tedy Michaelisovu konstantu K_M a maximální rychlost reakce V_{MAX}, v případě substrátů p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc a N,N'-diacetylchitobiosa.

V případě chromogenních substrátů p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc jsem postupoval způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1. (str. 35), pouze s tím rozdílem, že koncentrace substrátu byla v rozmezí 0,025-2,5 mM. V případě substrátu N,N'-diacetylchitobiosa jsem postupoval postupem popsaným v kapitole 3.5.4.2. (str. 35), opět pouze s tím rozdílem, že koncentrace substrátu byla v rozmezí 0,1-2 mM.

Získané hodnoty jsem vynesl do grafu závislosti rychlosti reakce na koncentraci substrátu. Experimentální data jsem proložil rovnicí Michaelise a Mentenové (I):

$$v = \frac{V_{MAX} S}{K_M + S} \qquad \text{(I)}$$

kde v je rychlost reakce, V_{MAX} je maximální rychlost reakce, S je koncentrace substrátu a K_M Michaelisova konstanta. Parametry K_M a V_{MAX} jsem vypočítal pomocí nelineární regrese v programu Excel.

V případě substrátu p-NP-GlcNAc jsem experimentálně zjistil, že reakce je inhibována nadbytkem substrátu. Použil jsem proto rovnici (II) (str. 38) upravenou pro tento případ [82], kde V^*_{MAX} je fiktivní maximální rychlost reakce (tedy V_{MAX}, které by

bylo dosaženo v případě, že by enzym nebyl inhibován substrátem) a K_{SS} značí konstantu inhibice nadbytkem substrátu:

$$v = \frac{V^*_{MAX} S}{K_M + S + \frac{S^2}{K_{SS}}} \qquad \text{(II)}$$

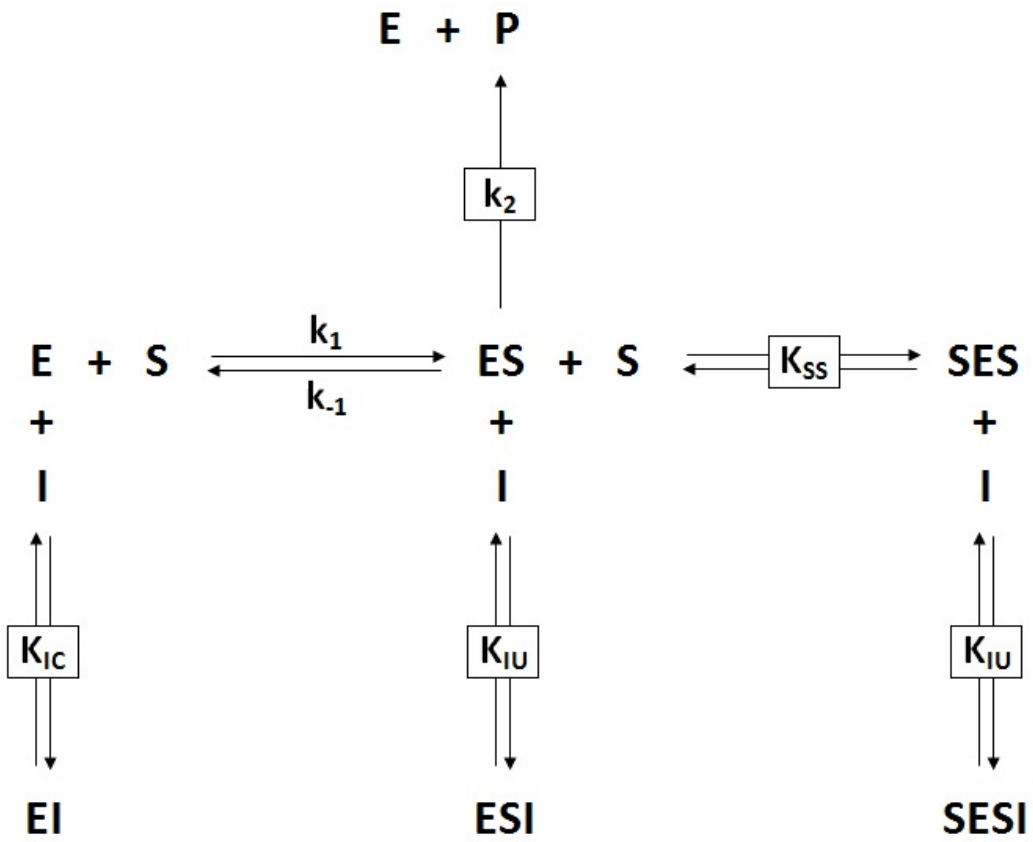
3.5.4.5. Stanovení inhibičních konstant β-N-acetylhexosaminidasy

Při inhibičních studiích jsem použil čtyři předpokládané inhibitory β-N-acetylhexosaminidasy: GalN, GalNAc, GlcN a GlcNAc. Studoval jsem inhibici hydrolýzy substrátů p-NP-GlcNAc (kde je reakce současně inhibovaná nadbytkem substrátu) a p-NP-GalNAc. Postupoval jsem způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1. (str. 35), pouze koncentrace substrátu byla v rozmezí 0,25-1,25 mM a reakční směs navíc obsahovala zvolený inhibitor o vhodné koncentraci.

Účinky každého inhibitoru jsem zkoumal při třech různých koncentracích inhibitoru a pěti různými koncentracemi substrátu, přičemž celé měření jsem opakoval třikrát ke statistickému vyhodnocení.

V případě substrátu p-NP-GalNAc jsem experimentální data proložil rovnicemi popisujícími jednotlivé standardní typy inhibice, a pomocí nelineární regrese v programu Excel jsem získal příslušné inhibiční konstanty.

V případě substrátu p-NP-GlcNAc se jednalo o inhibici reakce současně inhibované nadbytkem substrátu. V tomto případě jsem k proložení experimentálních hodnot použil příslušné rovnice pro kompetitivní (rovnice III, str. 40) a nekompetitivní inhibici (rovnice IV, str. 40) [82]. Rovnici pro smíšenou inhibici (rovnice V, str. 40) jsem odvodil na základě schématu zobrazeného na obrázku 8 (str. 39).



Obrázek 8: Schéma pro smíšenou inhibici reakce současně inhibované nadbytkem substrátu.

Při odvození schématu a vlastní rovnice jsem předpokládal všechna zjednodušení, která byla použita při odvození rovnic pro kompetitivní a nekompetitivní inhibici [82]. V důsledku toho jde z rovnice pro smíšenou inhibici při vhodně zvolených hodnotách inhibičních konstant ($K_{IU} \rightarrow \infty$ pro kompetitivní, $K_{IC} = K_{IU}$ pro nekompetitivní inhibici) přejít na níže uvedené tvary.

Rovnice pro kompetitivní inhibici reakce současně inhibované nadbytkem substrátu [82]:

$$v = \frac{V^*_{MAX} S}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_{IC}}\right) + \left(S + \frac{S^2}{K_{SS}}\right)} \quad \text{(III)}$$

Rovnice pro nekompetitivní inhibici reakce současně inhibované nadbytkem substrátu [82]:

$$v = \frac{V^*_{MAX} S}{\left(K_M + S + \frac{S^2}{K_{SS}}\right)\left(1 + \frac{I}{K_I}\right)} \quad \text{(IV)}$$

Rovnice pro smíšenou inhibici reakce současně inhibované nadbytkem substrátu:

$$v = \frac{V^*_{MAX} S}{K_M \left(1 + \frac{I}{K_{IC}}\right) + \left(S + \frac{S^2}{K_{SS}}\right)\left(1 + \frac{I}{K_{IU}}\right)} \quad \text{(V)}$$

kde *v* je rychlost reakce, V^*_{MAX} je fiktivní maximální rychlost reakce (tedy V_{MAX}, které by bylo dosaženo v případě, že by enzym nebyl inhibován substrátem), S je koncentrace substrátu, K_M je Michaelisova konstanta, I je koncentrace inhibitoru, K_{SS} je konstanta inhibice nadbytkem substrátu, K_{IC} je kompetitivní inhibiční konstanta, K_{IU} je nekompetitivní inhibiční konstanta a K_I je inhibiční konstanta.

3.5.5. Charakterizace β-N-acetylhexosaminidasy

3.5.5.1. Stanovení relativní molekulová hmotnosti β-N-acetylhexosaminidasy gelovou chromatografií

Relativní molekulovou hmotnost β-N-acetylhexosaminidasy jsem stanovil pomocí gelové chromatografie na sloupci Sephacrylu S-300 o průměru 1,1 cm a výšce 55 cm.

Enzymový preparát jsem zahustil precipitací síranem amonným v rozmezí 0-65% nasycení a centrifugoval 30 min při 4 °C a 9400 ×g. Peletu jsem resuspendoval v 0,1 M citrátovém pufru pH 6,0. Takto připravený enzymový preparát jsem nanesl kolonu Sephacrylu S-300. Eluci jsem prováděl 0,1 M citrátovým pufrem pH 6,0. U jímaných frakcí jsem sledoval koncentraci bílkovin (způsobem popsaným v kapitole 3.5.2.1., str. 30) a měřil aktivitu β-N-acetylhexosmanidasy (způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1., str. 35).

Jako standardy jsem použil BSA a enzymy NADP-ME (M_R 254 000) a PEPC (M_R 440 000) získané z listů tabáku. BSA jsem stanovil měřením absorbance při 280 nm. Izolaci i stanovení NADP-ME a PEPC jsem provedl metodami optimalizovanými v naší laboratoři [83], [84].

3.5.5.2. Teplotní optimum β-N-acetylhexosaminidasy

Stanovil jsem teplotní optimum β-N-acetylhexosaminidasy u jednotlivých substrátů, a to proměřením závislosti rychlosti reakce na teplotě reakční směsi v rozmezí teplot 25-65 °C. Postupoval jsem způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1. (str. 35) a v kapitole 3.5.4.2. (str. 35), pouze jednotlivé složky reakční směsi byly vytemperované na požadovanou teplotu ještě před započetím reakce. V případě substrátů p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc byla směs po ukončení reakce před vlastním

měřením absorbance nechána vychladnout na laboratorní teplotu. V případě měření se substráty stanovovanými pomocí kapilární elektroforézy udržoval přístroj při separaci a měření konstantní teplotu 25 °C. Ze získaných hodnot jsem poté sestavil graf závislosti rychlosti reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou na teplotě.

3.5.5.3. pH optimum β-N-acetylhexosaminidasy

Stanovil jsem pH optimum β-N-acetylhexosaminidasy u jednotlivých substrátů, a to proměřením závislosti rychlosti reakce na pH reakční směsi.

Připravil jsem 0,2 M citrátové pufry o pH v rozmezí 1,85-8,37. Z těchto jsem připravil ekvivalenty reakčních směsí o složení jako v kapitolách 3.5.4.1. (str. 35) a 3.5.4.2. (str. 35), pouze s vybraným reakčním pufrem o zvoleném pH a 0,1 M citrátovým pufrem pH 6,0 místo enzymového preparátu. V takto připravených roztocích jsem změřil pH ekvivalentu reakční směsi, které se lišilo od pH reakčního pufru. Konečné pH reakční směsi při stanovení substrátů p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc se pohybovalo v rozmezí pH 2,95-6,69. Konečné pH reakční směsi při stanovení substrátů měřených pomocí kapilární elektroforézy se pohybovalo v rozmezí pH 3,65-6,42.

Poté jsem způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1. (str. 35) a v kapitole 3.5.4.2. (str. 35) stanovil rychlost reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou v jednotlivých reakčních směsích. Ze získaných dat jsem sestrojil závislost reakční rychlosti na pH reakční směsi.

3.5.5.4. Stabilita β-N-acetylhexosaminidasy v čase

Enzymový preparát jsem uchovával v lednici při 4 °C. Ve zvolených intervalech jsem měřil aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy enzymovém preparátu způsobem

popsaným v kapitole 3.5.4.1. (str. 35). Naměřené hodnoty jsem následně vynesl do grafu závislosti aktivity β-N-acetylhexosaminidasy na čase.

3.5.6. Studium glykosylace β-N-acetylhexosaminidasy

3.5.6.1. Enzymová deglykosylace β-N-acetylhexosaminidasy enzymem Endo H

Deglykosylaci proteinů v enzymovém preparátu jsem prováděl pomocí enzymu Endo H (EC 3.2.1.96), a to za nativních i denaturujících podmínek. Součástí balení enzymu je i vlastní Endo H reakční a Endo H denaturující pufr (10x koncentrované).

Reakční směs k provedení deglykosylace za nativních podmínek obsahovala 450 µl enzymového preparátu, 50 µl Endo H reakčního pufru a 5 µl Endo H. Reakci jsem nechal probíhat po dobu 24 h při teplotě 37 °C. Výsledek deglykosylace jsem prověřil pomocí afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy o objemu přibližně 250 µl, způsobem popsaným v kapitole 3.5.1.4. (str. 28), a pomocí elektroforetické separace za denaturujících podmínek způsobem pospaným v kapitole 3.5.3.1. (str. 31).

V případě deglykosylace za denaturujících podmínek jsem k 400 µl enzymového preparátu přidal 45 µl Endo H denaturujícího pufru a směs nechal vařit při 100 °C po dobu 10 min. Následně jsem do reakční směsi přidal 50 µl Endo H reakčního pufru a 5 µl enzymu. Reakci jsem nechal probíhat po dobu 4 h při teplotě 37 °C. Výsledek deglykosylace jsem prověřil pomocí elektroforetické separace za denaturujících podmínek způsobem pospaným v kapitole 3.5.3.1. (str. 31).

3.5.6.2. Enzymová deglykosylace β-N-acetylhexosaminidasy enzymem PNGasa F

Deglykosylaci proteinů v enzymovém preparátu jsem prováděl také pomocí enzymu PNGasa F (EC 3.5.1.52), avšak pouze za denaturujících podmínek. Součástí balení enzymu je i vlastní PNGasa F reakční pufr a PNGasa F denaturující pufr (10x koncentrované), a dále Nonidet P-40 (octylphenoxypolyethoxyethanol), který brání vlastní PNGasu F před účinkem denaturujícího pufru.

K 8 µl enzymového preparátu zahuštěného postupem pospaným v kapitole 3.5.1.7. (str. 29) jsem přidal 2 µl denaturujícího pufru a 10 µl vody. Vzorek jsem 10 min povařil při 100 °C. Následně jsem do reakční směsi přidal 4 µl 10% Nonidetu P-40, 4 µl reakčního pufru a 3 µl PNGasy F. Reakční směs jsem inkuboval 4 hod při 37 °C. Výsledek deglykosylace jsem prověřil pomocí elektroforetické separace za denaturujících podmínek způsobem pospaným v kapitole 3.5.3.1. (str. 31).

4. VÝSLEDKY

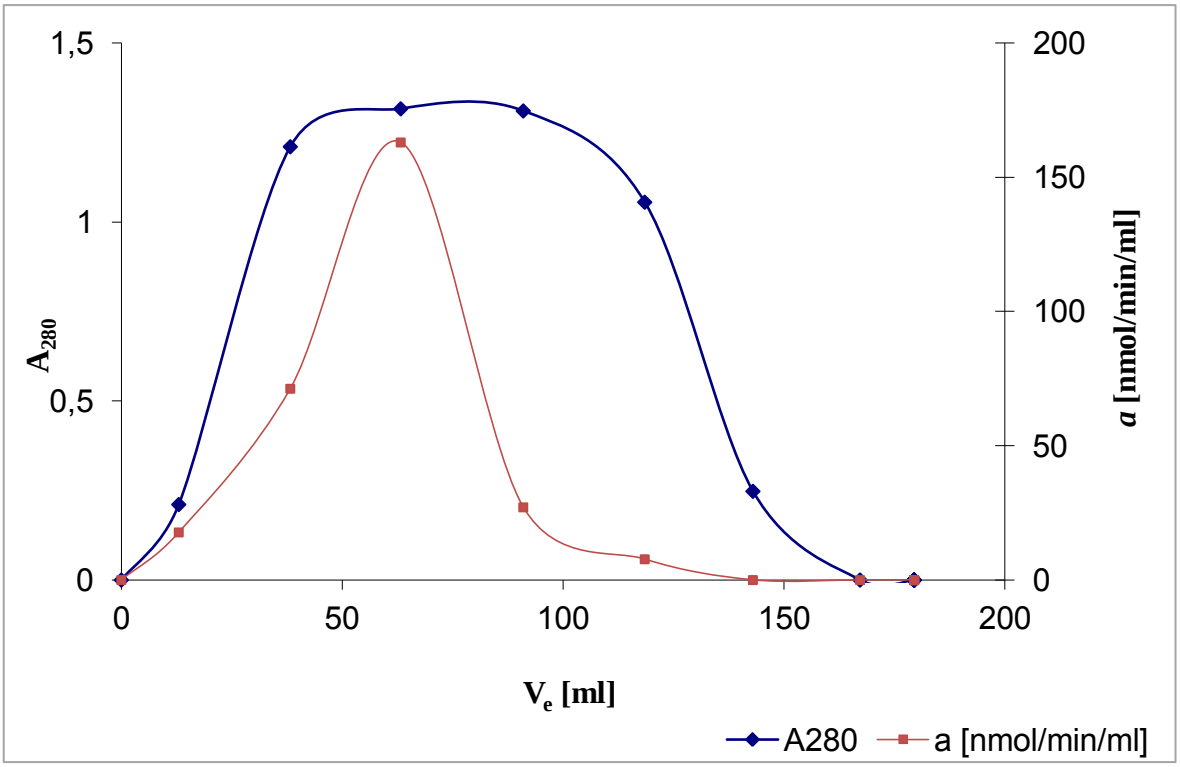
4.1. Částečná purifikace β-N-acetylhexosaminidasy z listů tabáku

4.1.1. Extrakce a precipitace síranem amonným (I)

Homogenizoval jsem 50 g listů tabáku s 100 ml 0,1 M citrátového pufru pH 6,0 způsobem popsaným v kapitole 3.5.1.1. (str. 27). Tímto jsem získal 100 ml hrubého extraktu o specifické aktivitě 0,07 μmol · min^{-1} · mg^{-1}. Následovala precipitace síranem amonným ve dvou krocích (0-30% a 30-65%) způsobem popsaným v kapitole 3.5.1.2. (str. 27). Tímto jsem získal enzymový preparát o objemu 1,6 ml a specifické aktivitě 0,08 μmol · min^{-1} · mg^{-1}.

4.1.2. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 (I)

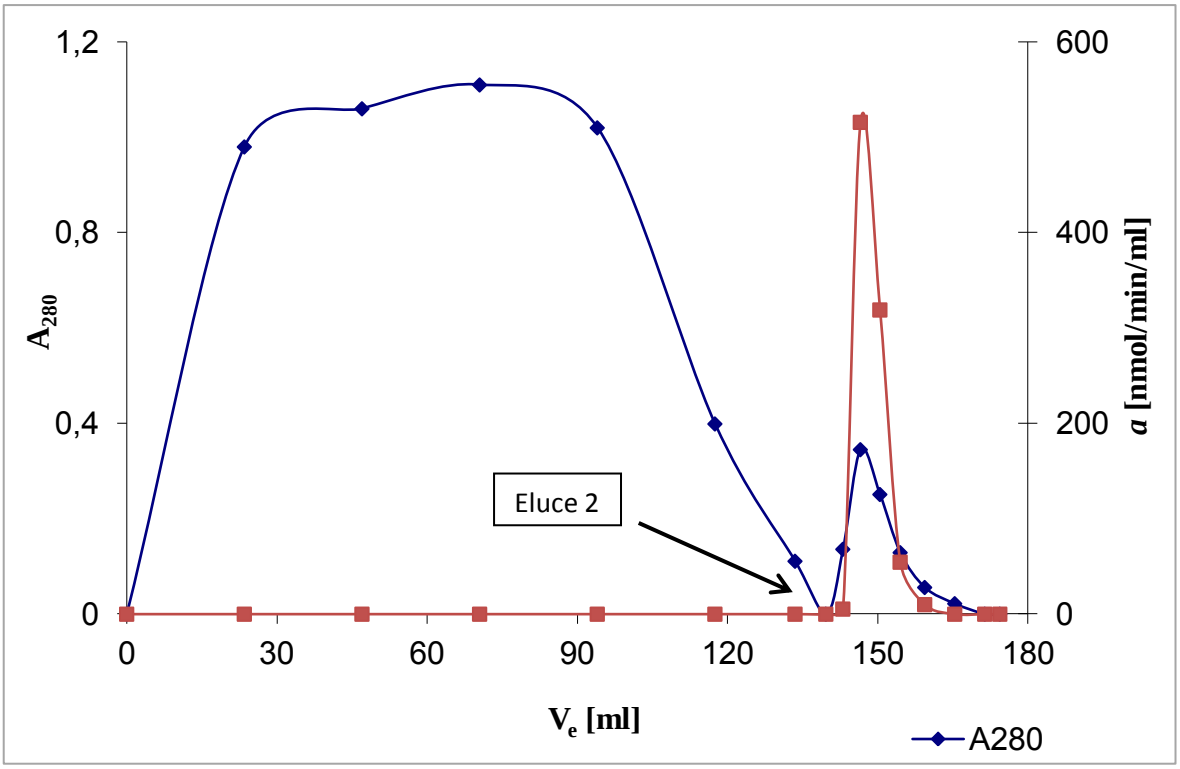
Tímto krokem jsem enzymový preparát zbavil síranu amonného a připravil na další krok separace. Postupoval jsem způsobem popsaným v kapitole 3.5.1.3. (str. 27). U jímaných frakcí jsem stanovoval koncentraci bílkovin (metodou popsanou v kapitole 3.5.2.1., str. 30) a aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy s pomocí p-NP-GlcNAc substrátu metodou popsanou v kapitole 3.5.4.1. (str. 35). Tímto jsem získal enzymový preparát o objemu 75 ml a specifické aktivitě 0,10 μmol · min^{-1} · mg^{-1}. Průběh gelové chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 je zaznamenán na obrázku 9 (str. 46).



Obrázek 9: Záznam gelové chromatografie na koloně Sephacrylu S-300, prvního chromatografického kroku purifikace β-N-acetylhexosaminidasy. Pravá svislá osa znázorňuje aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy.

4.1.3. Afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy

Enzymový preparát jsem nanesl na kolonu ConA-Sepharosy a dále jsem postupoval způsobem popsaným v kapitole 3.5.1.4 (str. 28). V průběhu eluce jsem stanovoval aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy i koncentraci bílkovin. Ve frakcích nezachycených bílkovin nebyla zjištěna žádná aktivita β-N-acetylhexosaminidasy. Eluci zachycených bílkovin pomocí 0,2 M methyl-α-D-glukopyranosidu vedla k zisku enzymového preparátu o objemu 6,4 ml a specifické aktivitě 1,13 μmol · min^{-1} · mg^{-1}. Průběh afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy shrnuje obrázek 10 (str. 47).



Obrázek 10: Průběh afinitní chromatografie na koloně ConA-Sepharosy, druhého chromatografického kroku purifikace β-N-acetylhexosaminidasy. Pravá svislá osa znázorňuje aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy. Eluce 2 značí počátek eluce 0,2 M methyl-α-D-glukopyranosidem.

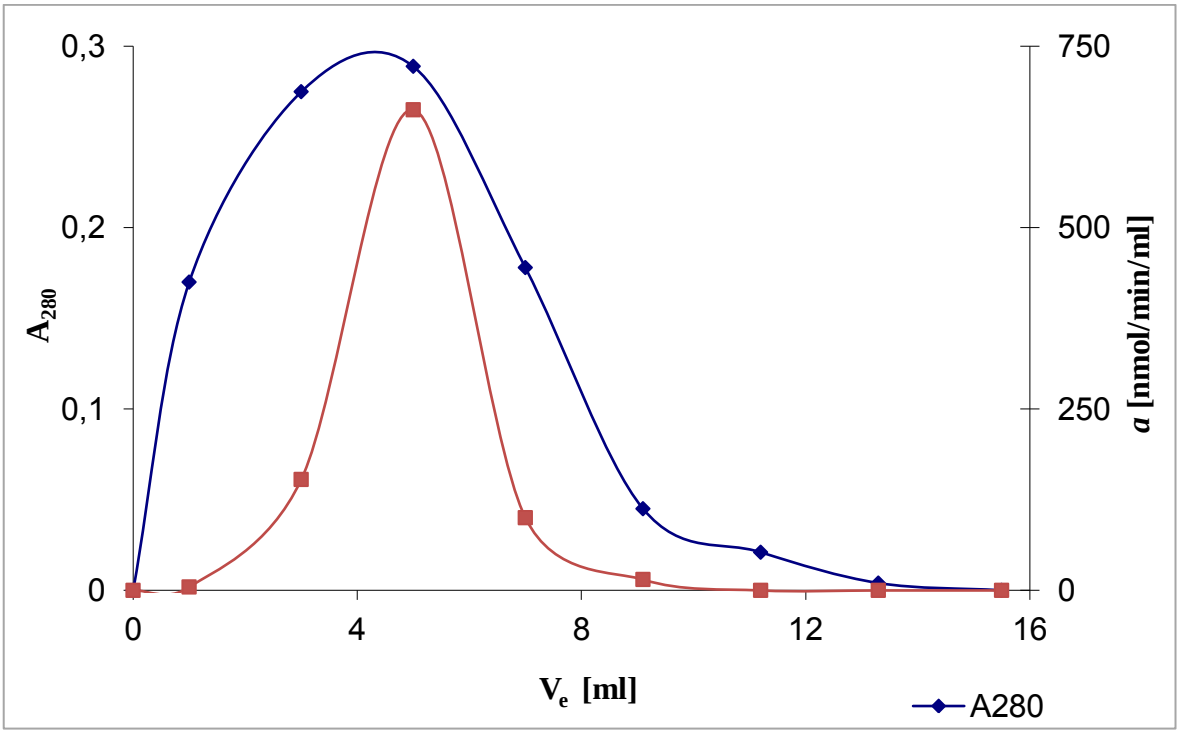
4.1.4. Precipitace síranem amonným (II)

Enzymový preparát jsem dále srážel síranem amonným způsobem popsaným v kapitole 3.5.1.2. (str. 27). Tímto jsem získal 100 µl vzorku enzymu o specifické aktivitě 1,24 µmol · min^{-1} · mg^{-1}. Tento krok sloužil ke koncentraci enzymového preparátu na následující krok gelové chromatografie, která byla nutná k odstranění methyl-α-D-glukopyranosidu.

4.1.5. Gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 (II)

Finálním krokem izolace byla druhá gelová chromatografie na koloně Sephacrylu S-300. Postupoval jsem způsobem popsaným v kapitole 3.5.1.5. (str. 29). Průběžně jsem stanovoval koncentraci bílkovin i aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy a na závěr jsem slil frakce s nejvyšší aktivitou. Tímto jsem získal konečný enzymový preparát o specifické aktivitě 1,72 μmol · min^{-1} · mg^{-1}. Finální enzymový preparát již neobsahoval síran amonný ani methyl-α-D-glukopyranosid a byl využit k dalšímu stanovení.

Průběh druhé gelové chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 je zobrazen na obrázku 11 (str. 48) a průběh celé izolace β-N-acetylhexosaminidasy shrnuje tabulka 3 (str. 49).



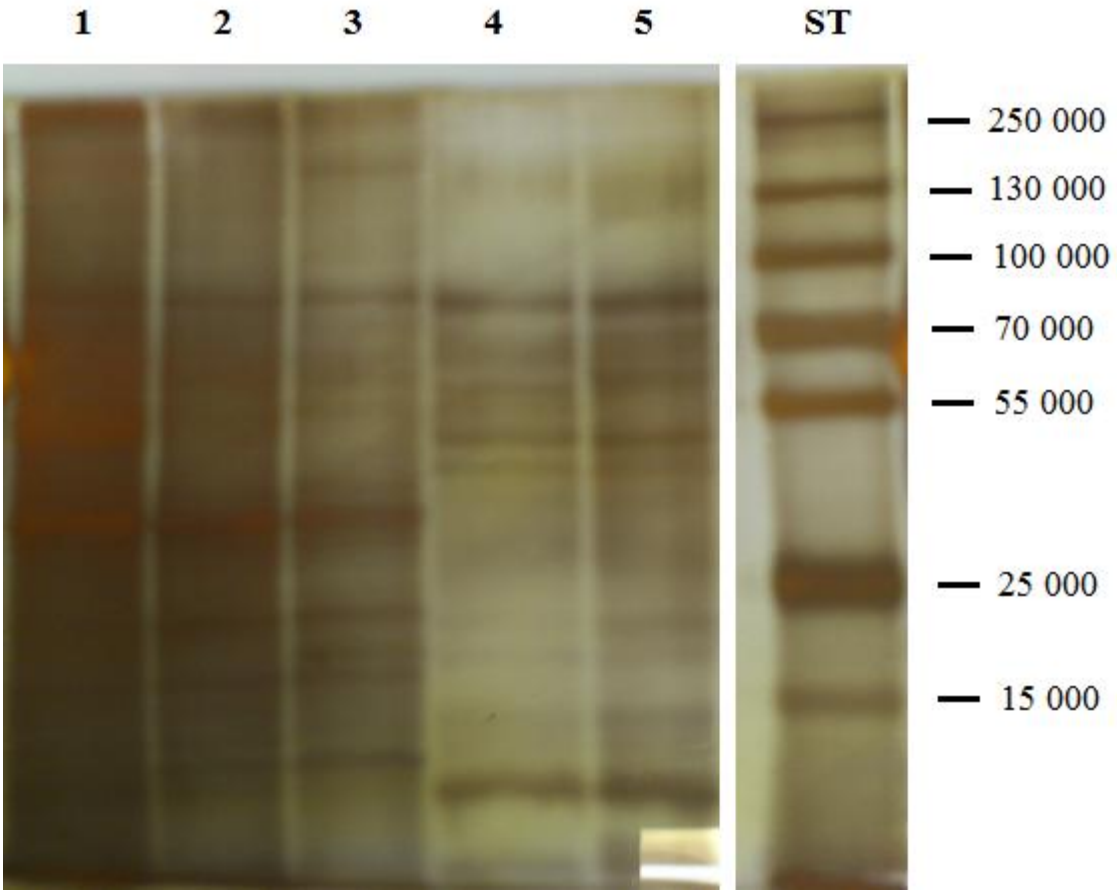
Obrázek 11: Průběh druhé gelové chromatografie na koloně Sephacrylu S-300, třetího chromatografického kroku purifikace β-N-acetylhexosaminidasy. Pravá svislá osa znázorňuje aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy.

Tabulka 3: Shrnutí celkové aktivity, obsahu bílkovin, specifické aktivity, načištění a výtěžku jednotlivých kroků v průběhu purifikace β-N-acetylhexosaminidasy.

Frakce	***a* [µmol · min^{-1}]**	**obsah bílkovin [mg]**	**a_{sp} [µmol · min^{-1} · mg^{-1}]**	**Stupeň načištění**	**Výtěžek [%]**
Hrubý extrakt	8,5	114,0	0,07	1,0	100
Síranová frakce (I)	6,3	76,2	0,08	1,1	73,7
Gelová chromatografie (I)	4,9	52,0	0,10	1,2	56,9
Con-A afinitní chromatografie	3,4	3,0	1,13	15,1	39,8
Síranová frakce (II)	2,6	2,1	1,24	16,5	30,4
Gelová chromatografie (II)	2,1	1,2	1,72	23,0	24,6

4.1.6. SDS-elektroforéza

Čistotu enzymového preparátu v průběhu purifikace jsem sledoval elektroforetická separací za denaturujících podmínek v prostředí SDS (kapitola 3.5.3.1., str. 31). Obrázek 12 (str. 50) shrnuje stanovení.



Obrázek 12: Elektroforetická separace v prostředí SDS dokumentující průběh purifikace β-N-acetylhexosaminidasy. 1) hrubý extrakt, 2) gelová chromatografie I, 3) proteiny nezachycené na ConA-Sepharose, 4) proteiny zachycené na ConA-Sepharose, 5) finální enzymový preparát (gelová chromatografie II), ST) standard v rozmezí M_R 15000-250000.

4.1.7. Extrakce β-N-acetylhexosaminidasy vyšší iontovou silou

Důkaz nerozpustné (membránově vázané) formy β-N-acetylhexosaminidasy jsem provedl způsobem popsaným v kapitole 3.5.1.6. (str. 29). Promytím sedimentu z purifikace jsem získal vzorek β-N-acetylhexosaminidasy o aktivitě 15,2 nmol $\cdot$ min^{-1} $\cdot$ ml^{-1}. Po centrifugaci a extrakci vyšší iontovou silou jsem nestanovil

žádnou aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy Existenci nerozpustné (membránově vázané) formy β-N-acetylhexosaminidasy jsem tedy v listech tabáku vyloučil.

4.2. Studium glykosylace β-N-acetylhexosaminidasy

4.2.1. Deglykosylace β-N-acetylhexosaminidasy enzymem Endo H

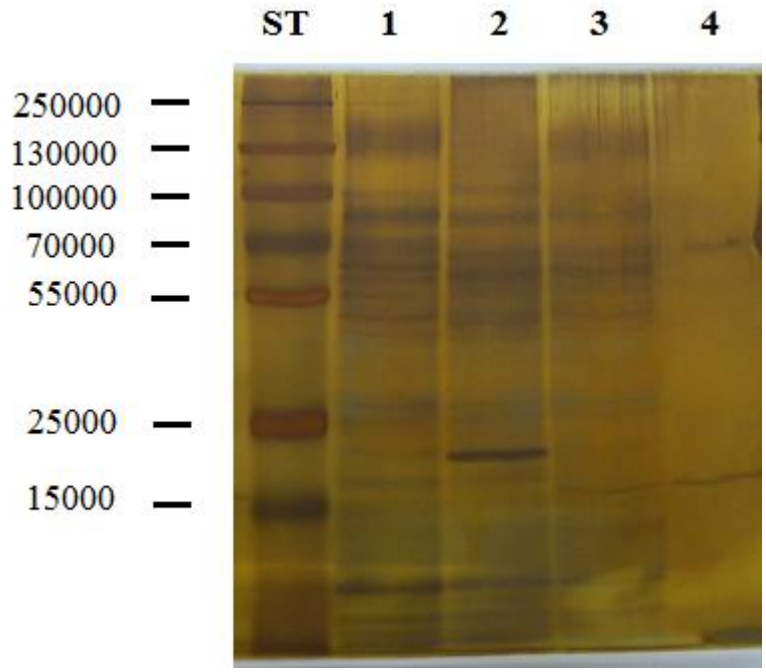
Při deglykosylaci proteinů obsažených v enzymovém preparátu pomocí enzymu Endo H jsem postupoval způsobem popsaným v kapitole 3.5.6.1. (str. 43). Úspěšné proběhnutí deglykosylace za nativních podmínek jsem ověřil pomocí kolony ConA-Sepharosy, výsledek byl ale negativní a veškerá β-N-acetylhexosaminidasa se i po reakci s Endo H stále vázala na kolonu.

Výsledek deglykosylace za nativních i denaturujících podmínek jsem ověřil elektroforetickou separací za denaturujících podmínek způsobem popsaným v kapitole 3.5.3.1. (str. 31). Obrázek 13 (str. 52) zobrazuje záznam elektroforetické separace. Tento záznam dokazuje účinnou deglykosylaci části proteinů v enzymovém preparátu za denaturujících podmínek deglykosylace v okolí M_R 70000, ale vzhledem k čistotě preparátu nelze určit, o jaké proteiny se jedná. Příčinu absence proužků ve sloupci znázorňujícímu výsledek deglykosylace Endo H za nativních podmínek se nepodařilo objasnit.

4.2.2. Deglykosylace β-N-acetylhexosaminidasy enzymem PNGasa F

Při deglykosylaci proteinů obsažených v enzymovém preparátu pomocí enzymu PNGasa F jsem postupoval způsobem popsaným v kapitole 3.5.6.2. (str. 44). V tomto případě jsem deglykosylaci provedl pouze za denaturujících podmínek.

Výsledek deglykosylace jsem ověřil elektroforetickou separací za denaturujících podmínek způsobem popsaným v kapitole 3.5.3.1. (str. 31). Obrázek 13 (str. 52) zobrazuje záznam elektroforetické separace. Tento záznam dokazuje účinnou deglykosylaci části proteinů v enzymovém preparátu v okolí M_R 70000, pravděpodobně se tedy jedná o stejné proteiny jako v případě deglykosylace za denaturujících podmínek pomocí Endo H.



Obrázek 13: Elektroforetická separace v prostředí SDS dokumentující enzymovou deglykosylace enzymy Endo H a PNGasa F. ST) Standard, 1) referenční vzorek, 2) PNGasa F (denaturující podmínky), 3) Endo H (denaturující podmínky), 4) Endo H (nativní podmínky).

1

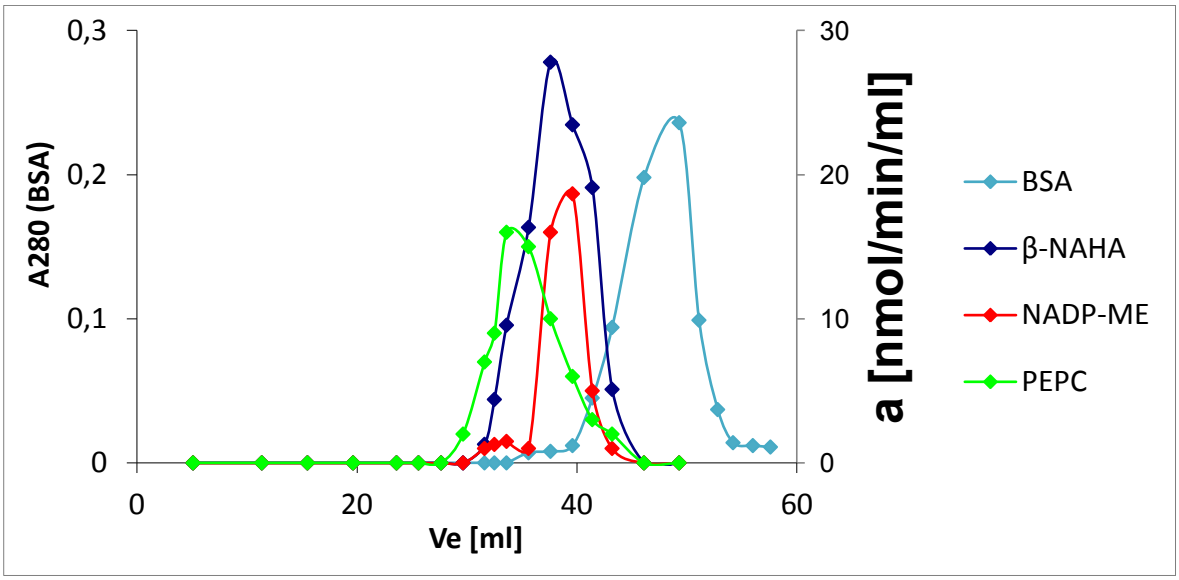
4.3. Charakterizace β-N-acetylhexosaminidasy

4.3.1. Molekulová hmotnost β-N-acetylhexosaminidasy

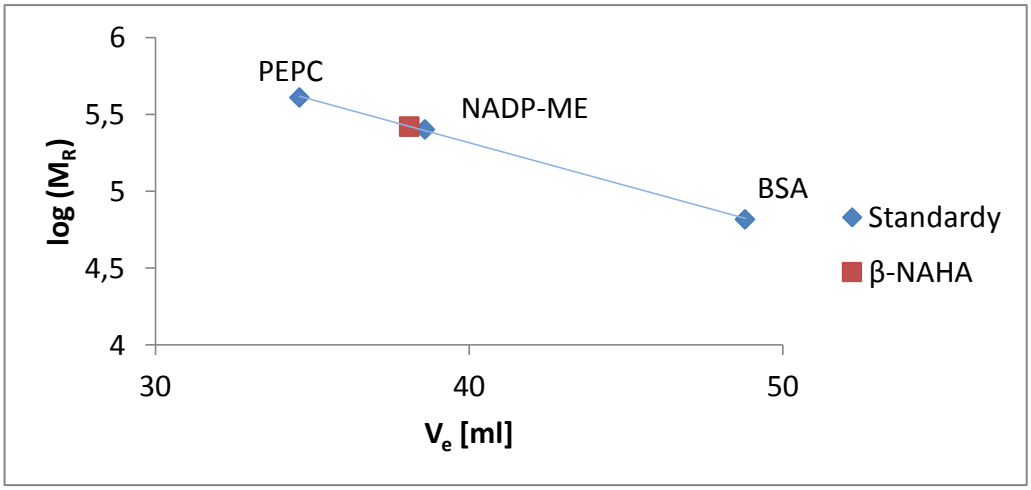
4.3.1.1. Stanovení molekulové hmotnosti β-N-acetylhexosaminidasy pomocí gelové chromatografie

Relativní molekulovou hmotnost β-N-acetylhexosaminidasy jsem stanovil pomocí gelové chromatografie na koloně Sephacrylu S-300 způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1. (str. 35). Jako standard jsem použil BSA (M_R 67 000), NADP-ME (M_R 254 000) a PEPC (M_R 440 000).

Obrázek 14 (str. 54) shrnuje průběh gelové chromatografie. Na obrázku 15 (str. 54) je vynesena kalibrační závislost logaritmu M_R na elučním objemu, ze které jsem stanovil molekulovou hmotnost β-N-acetylhexosaminidasy na M_R 275 000.



Obrázek 14: Chromatogram shrnující průběh stanovení relativní molekulové hmotnosti na koloně Sephacrylu S-300. Pravá svislá osa znázorňuje aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy, NADP-ME a PEPC.

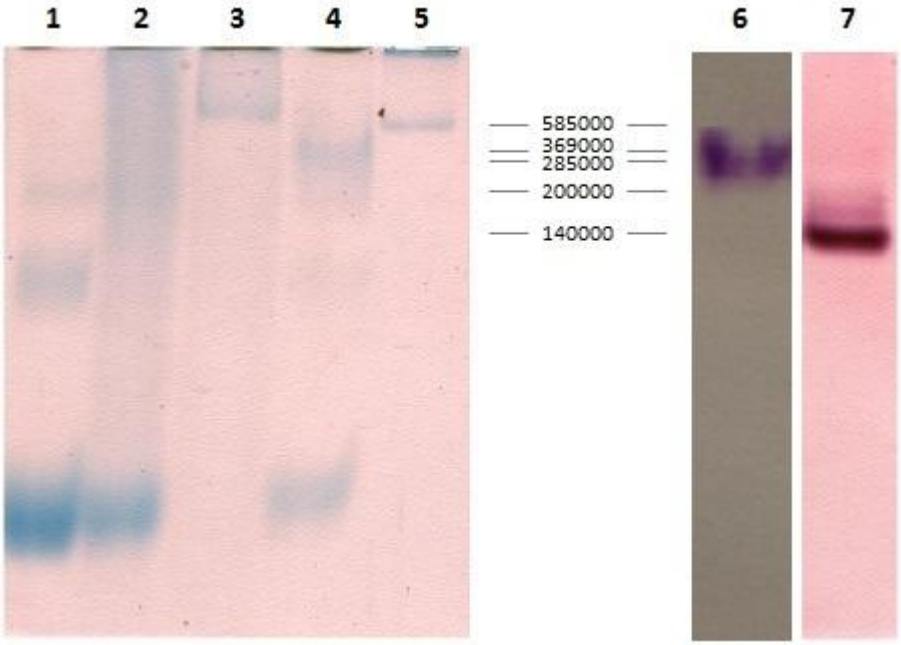


Obrázek 15: Závislost logaritmu relativní molekulové hmotnosti na elučním objemu při stanovení molekulové hmotnosti β-N-acetylhexosaminidasy pomocí gelové chromatografie na koloně Sephacrylu S-300. Standardy: BSA (M_R 67 000), NADP-ME (M_R 254 000) a PEPC (M_R 440 000). Molekulovou hmotnost β-N-acetylhexosaminidasy jsem stanovil na M_R 275 000.

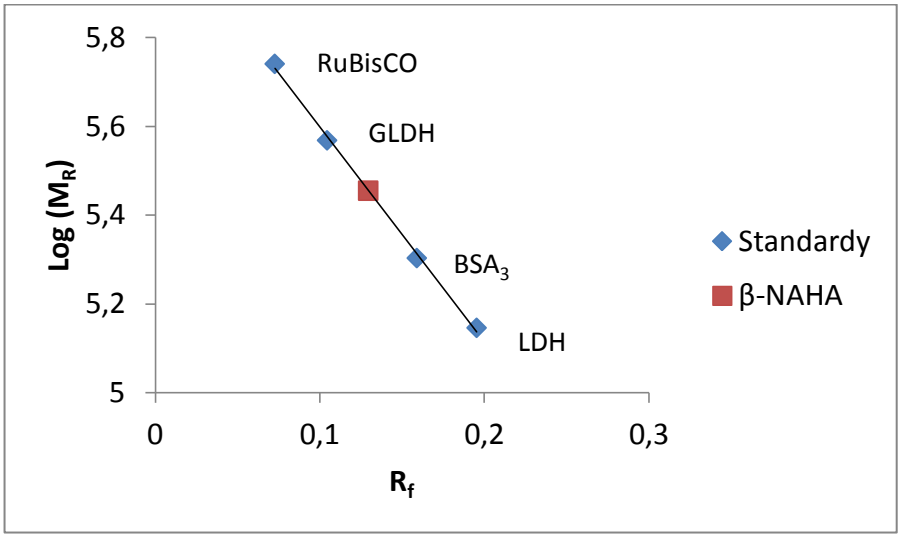
4.3.1.2. Stanovení molekulové hmotnosti β-N-acetylhexosaminidasy pomocí červené nativní elektroforézy

Molekulovou hmotnost β-N-acetylhexosaminidasy jsem stanovil pomocí červené nativní elektroforézy způsobem popsaným v kapitole 3.5.3.2. (str. 32). Jako standard jsem použil BSA (mono-, di- a trimer; M_R 67 000 - 201 000), laktát dehydrogenasu (LDH, M_R 140 000), glutamát dehydrogenasu (GLDH, M_R 369 000) a RuBisCO (M_R 540 000).

Závislost logaritmu molekulové hmotnosti na retenčním faktoru R_f byla lineární v rozmezí LDH, trimer BSA, GLDH a RuBisCO, nikoliv však v případě monomeru a dimeru BSA. Relativní molekulovou hmotnost β-N-acetylhexosaminidasy jsem pomocí červené nativní elektroforézy stanovil na M_R 285 000. Obrázky 16 a 17 (str. 55) dokumentují průběh nativní elektroforézy a vyhodnocení výsledků.



Obrázek 16: Gel po červené nativní elektroforéze. Bílkoviny barvené pomocí CBB: 1) BSA_{1-3}, 2) LDH, 3) RuBisCO, 4) GLDH, 5) RuBisCO. Enzymy stanovené pomocí aktivity: 6) β-N-acetylhexosaminidasa (M_R 285 000), 7) LDH.

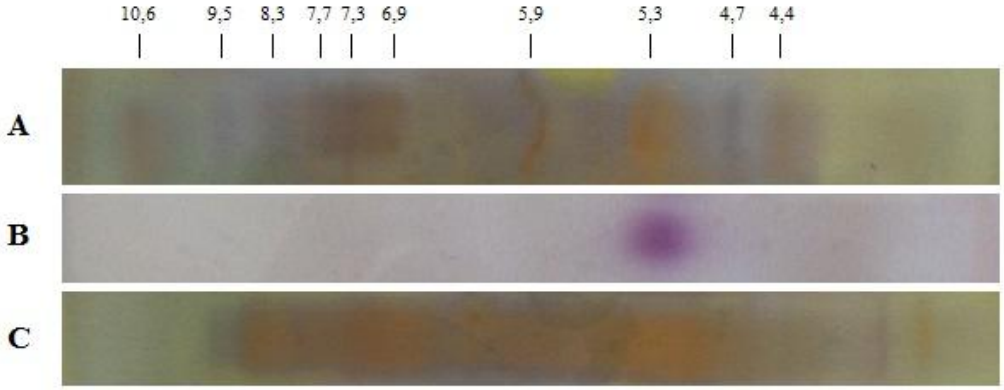


Obrázek 17: Závislost logaritmu relativní molekulové hmotnosti na retenčním faktoru při stanovení molekulové hmotnosti β-N-acetylhexosaminidasy pomocí nativní elektroforézy.

4.3.2. Izoelektrický bod β-N-acetylhexosaminidasy

Ke stanovení izoelektrického bodu β-N-acetylhexosaminidasy (pI) a k určení počtu izoforem β-N-acetylhexosaminidasy v enzymovém preparátu jsem provedl izoelektrickou fokusaci způsobem popsaným v kapitole 3.5.3.3. (str. 33).

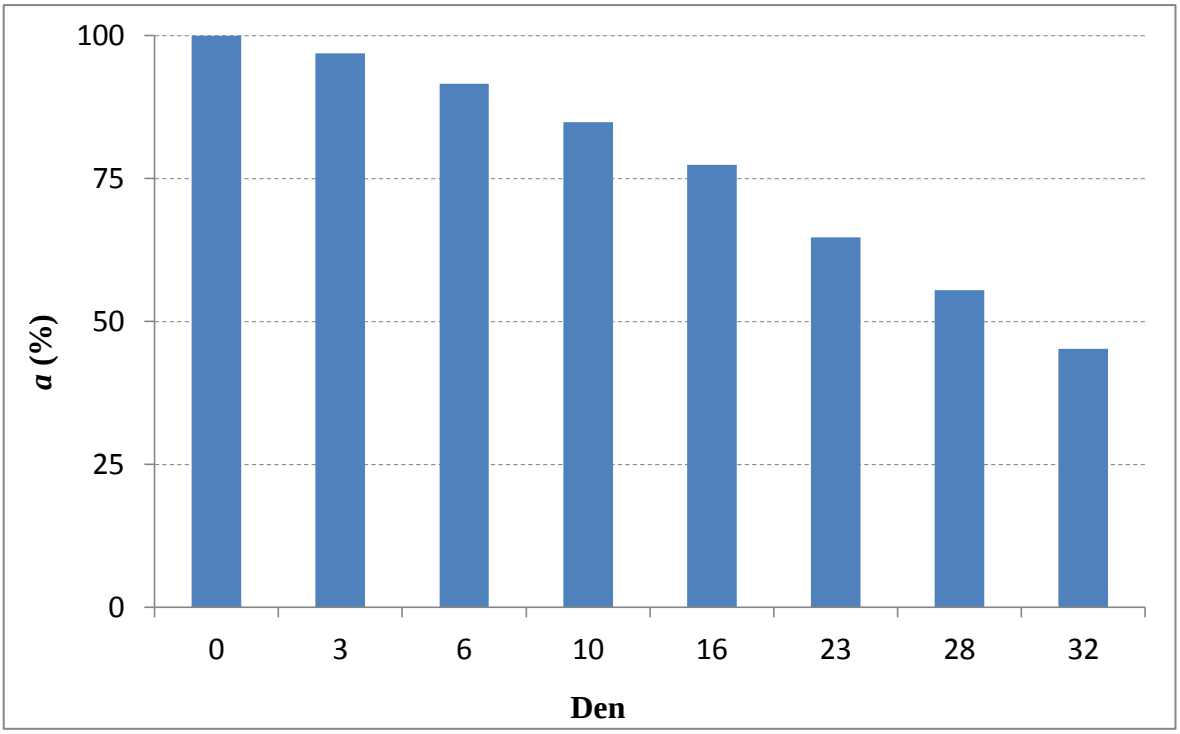
Obrázek 18 (str. 56) shrnuje stanovení. Výsledky potvrzují přítomnost jediné izoformy β-N-acetylhexosaminidasy v listech tábáku, jejíž hodnota izoelektrického bodu byla stanovena na pI 5,3.



Obrázek 18: Izoelektrická fokusace β-N-acetylhexosaminidasy. A) Standard a hodnoty pI standardu, B) β-N-acetylhexosaminidasa (aktivita), C) proteiny v enzymovém preparátu.

4.3.3. Stabilita β-N-acetylhexosaminidasy v čase

Postupoval jsem způsobem popsaným v kapitole 3.5.5.4. (str. 42). Ve zvolených časových intervalech jsem měřil aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy ve finálním enzymovém preparátu uchovávaném při 4 °C. β-N-acetylhexosaminidasa z listů tabáku je velice stabilní enzym, který ztrácí 50% aktivity po přibližně 30 dnech uchovávání, jak dokumentuje obrázek 19 (str. 57).

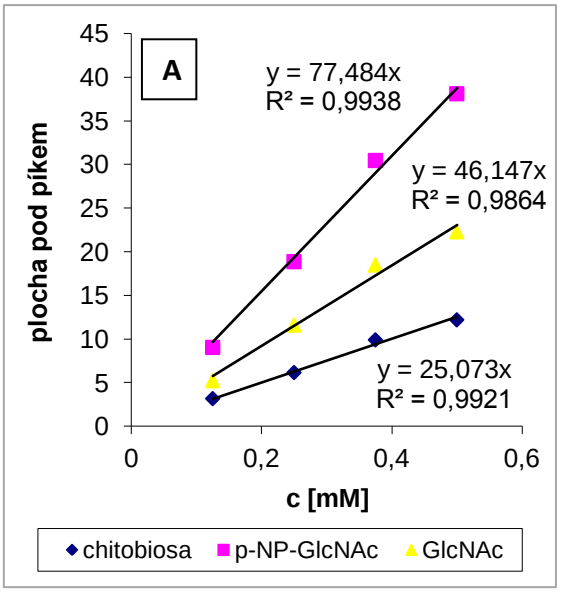


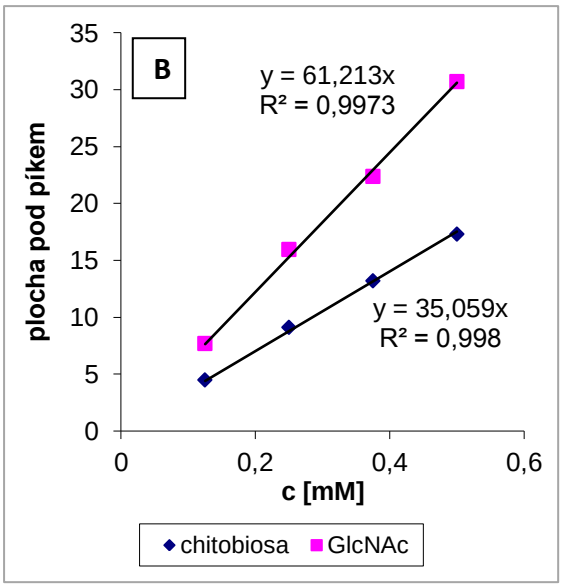
Obrázek 19: Stabilita β-N-acetylhexosaminidasy ve finálním enzymovém preparátu v čase. Aktivita β-N-acetylhexosaminidasy je vyjádřena v procentech, vztažená k aktivitě naměřené po ukončení izolace (0. den).

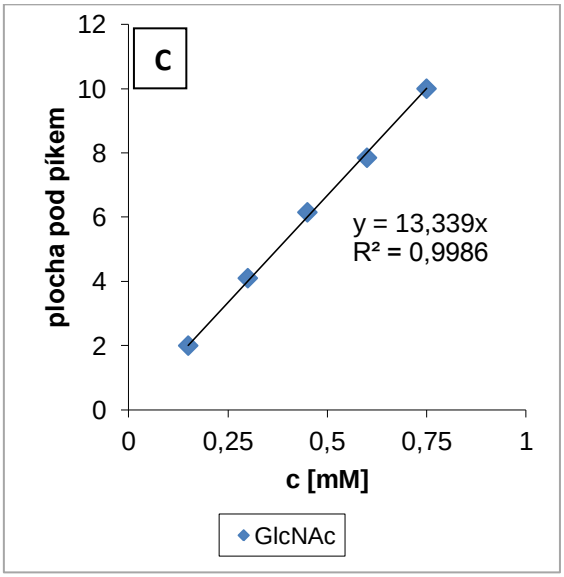
4.3.3. Studium substrátové specifity β-N-acetylhexosaminidasy

Studoval jsem průběh reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou v případě celkem pěti substrátů: p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc, N,N'-diacetylchitobiosa, p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid a N,N',N''-triacetylchitotriosa.

Optimalizací metody ke stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy v případě substrátů měřených pomocí kapilární elektroforézy (kapitola 3.5.4.2., str. 35) jsem ve všech případech dosáhl lineární závislosti plochy pod píkem na koncentraci produktů reakce, jako dokumentuje obrázek 20 (str. 58).



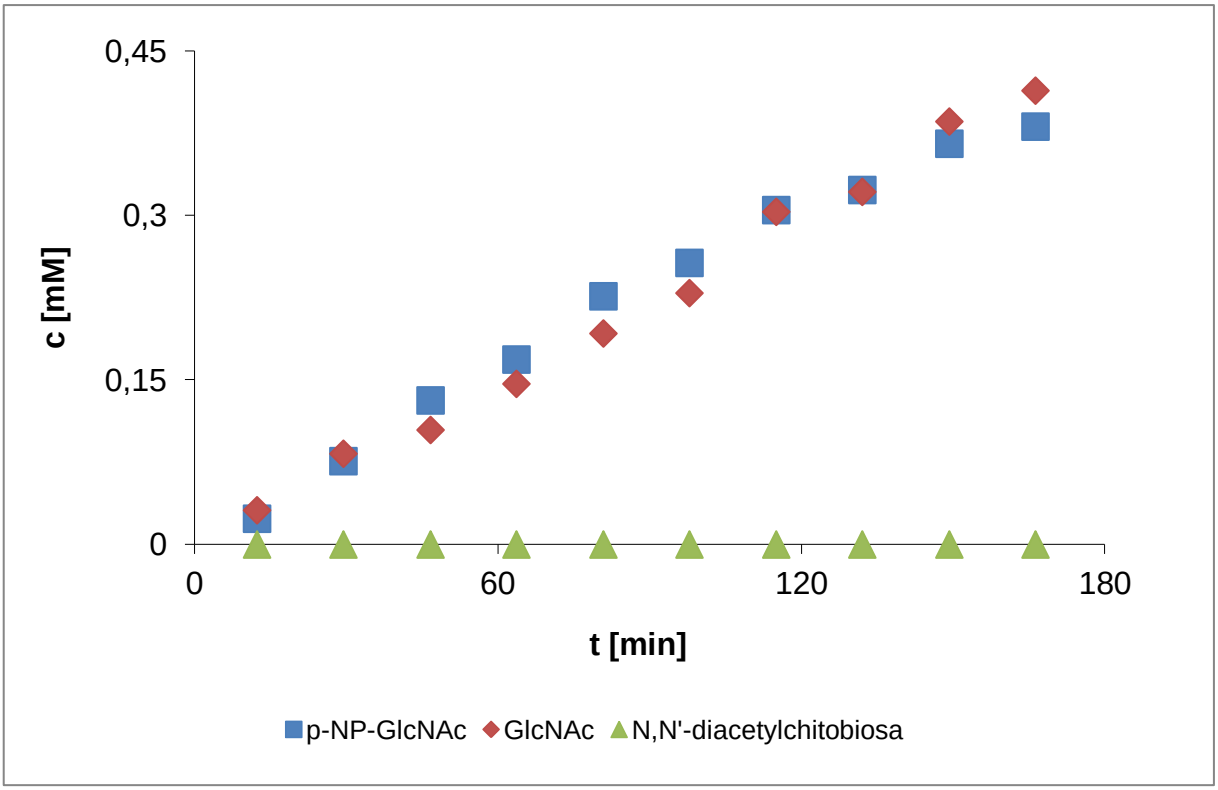




Obrázek 20: Kalibrační závislost ke stanovení produktů reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou při měření pomocí kapilární elektroforézy.

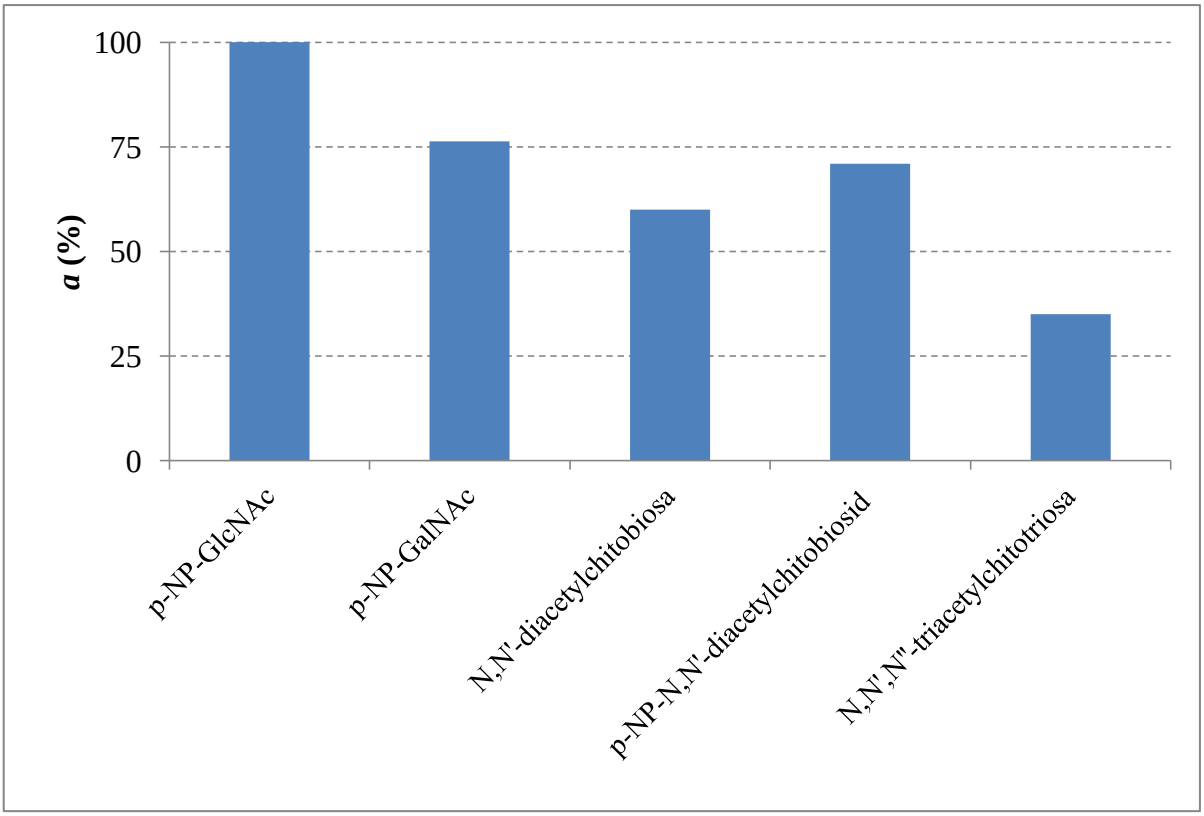
A) Hydrolýza p-NP-N,N'-diacetylchitobiosidu
B) Hydrolýza N,N',N''-triacetylchitotriosy
C) Hydrolýza N,N'-diacetylchitobiosy

Obrázek 21 (str. 59) dále dokumentuje průběh hydrolýzy katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou v případě substrátu p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid. Je zde patrný nárůst koncentrace produktů reakce p-NP-GlcNAc a GlcNAc v čase a zároveň nulová koncentrace N,N'-diacetylchitobiosy v průběhu celého měření. Produktem hydrolýzy p-NP-N,N'-diacetylchitobiosidu katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou tedy nikdy není p-NP a N,N'-diacetylchitobiosa.



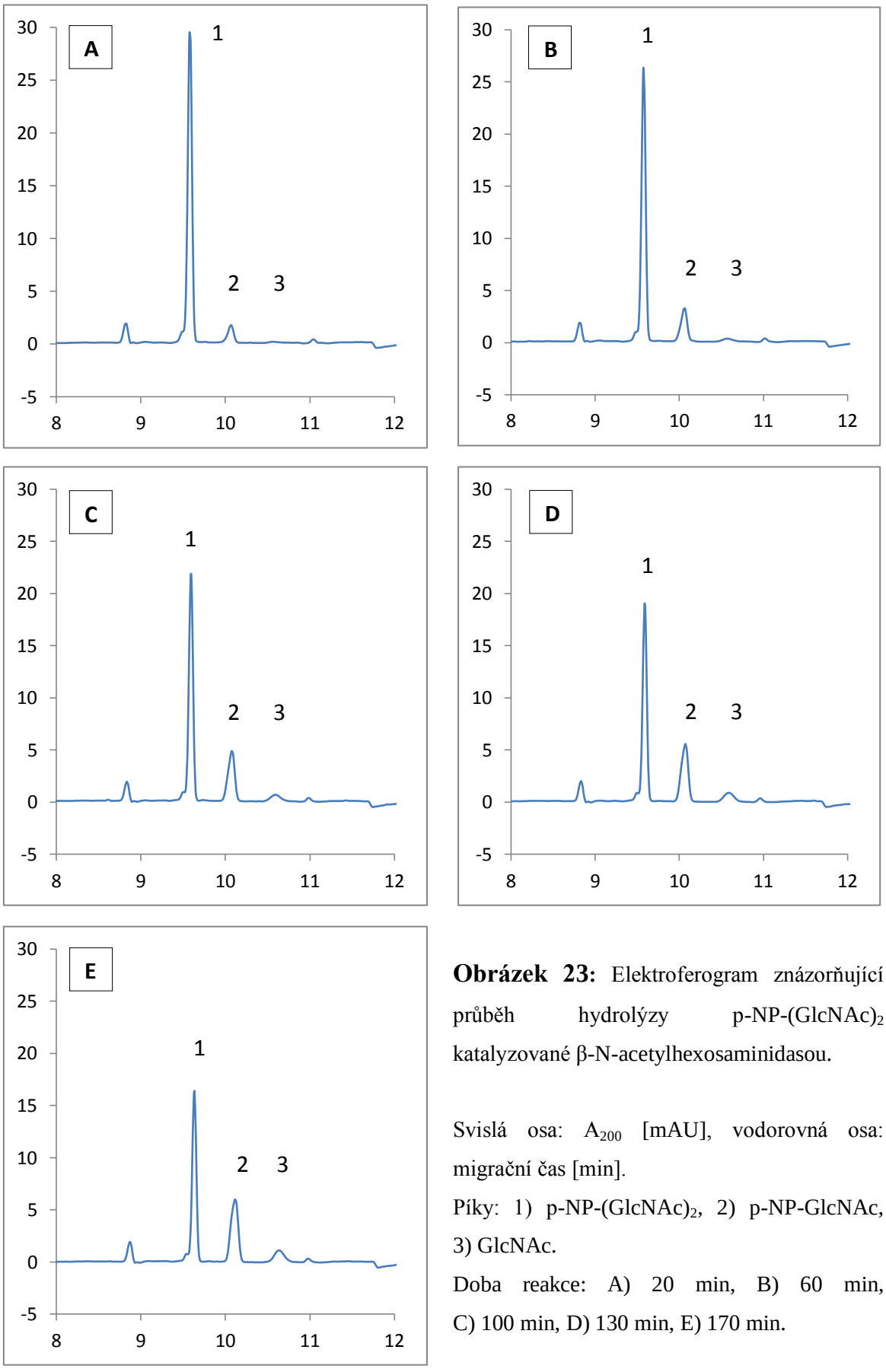
Obrázek 21: Průběh hydrolýzy p-NP-N,N'-diacetylchitobiosidu katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou. Nulová koncentrace N,N'-diacetylchitobiosy v průběhu celého měření je důkazem substrátové specifity β-N-acetylhexosaminidasy, která hydrolyzuje p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid za vzniku p-NP-GlcNAc a GlcNAc.

Na obrázku 22 (str. 60) je zobrazeno relativní srovnání aktivity β-N-acetylhexosaminidasy s jednotlivými substráty. Z výsledků je patrné, že β-N-acetylhexosaminidasa z listů tabáku snadněji hydrolyzuje syntetické substráty, z nichž je nejlepší p-NP-GlcNAc. N,N'-diacetylchitobiosa je lepším substrátem než N,N',N''-triacetylchitotriosa. Dále p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid a p-NP-GalNAc hydrolyzuje β-N-acetylhexosaminidasa přibližně stejně efektivně a p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid je lepším substrátem i v porovnání s N,N'-diacetylchitobiosou.



Obrázek 22: Relativní srovnání aktivity β-N-acetylhexosaminidasy stanovené s jednotlivými substráty.

Obrázky 23 a 24 (str. 61 a 62) zobrazují sérii elektroferogramů dokumentujících průběh hydrolýzy katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou v případě substrátů p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid a N,N',N''-triacetylchitotriosa. Elektroferogramy zobrazují odezvu detektoru (v jednotkách mAU, kdy A = 1000 mAU odpovídá A = 1) mezi 8 a 12 minutou v průběhu separace reakční směsi při zvolené době reakce.

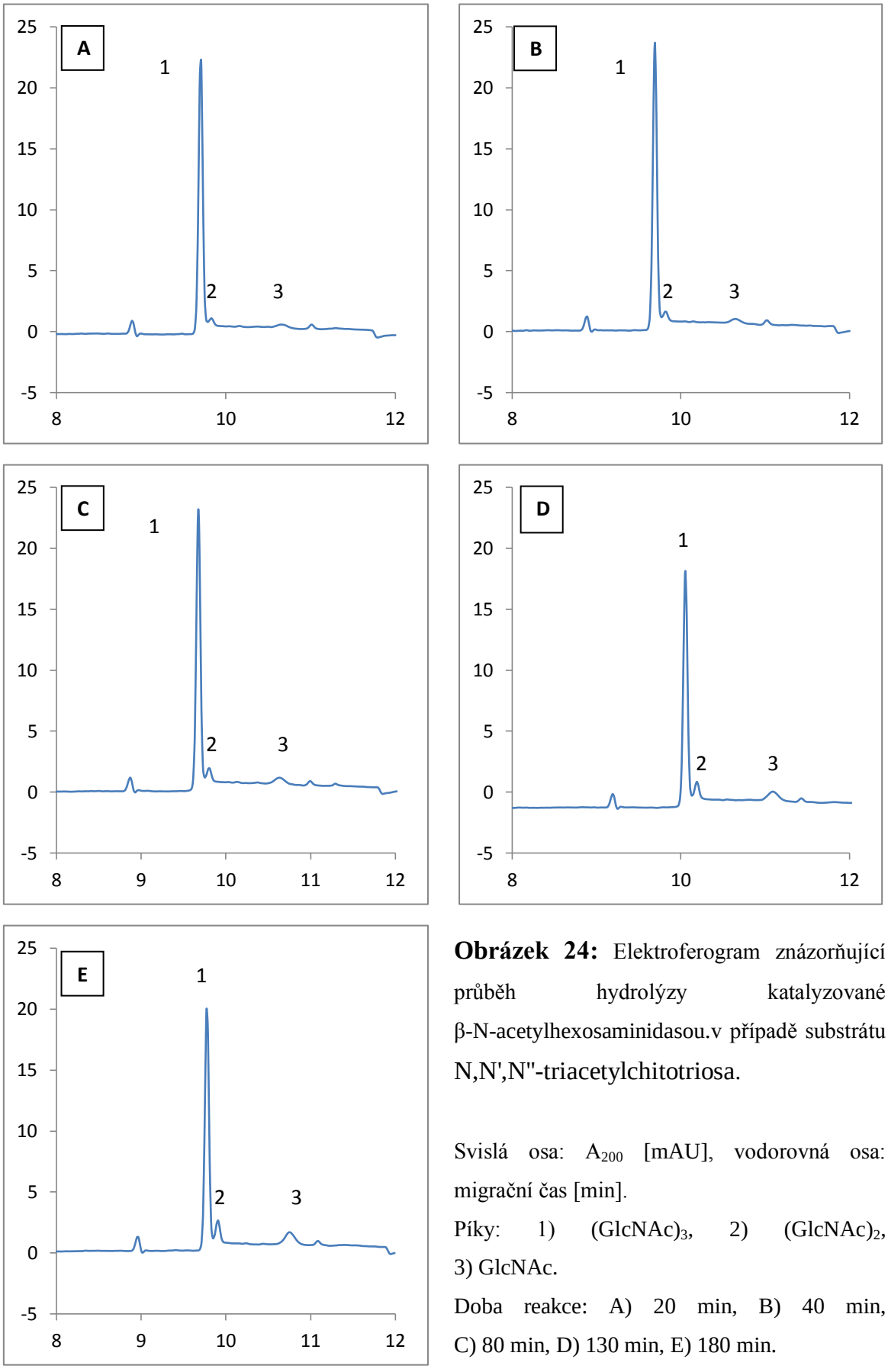


Obrázek 23: Elektroferogram znázorňující průběh hydrolýzy p-NP-$(GlcNAc)_2$ katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou.

Svislá osa: A_{200} [mAU], vodorovná osa: migrační čas [min].

Píky: 1) p-NP-$(GlcNAc)_2$, 2) p-NP-GlcNAc, 3) GlcNAc.

Doba reakce: A) 20 min, B) 60 min, C) 100 min, D) 130 min, E) 170 min.



Obrázek 24: Elektroferogram znázorňující průběh hydrolýzy katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou.v případě substrátu N,N',N''-triacetylchitotriosa.

Svislá osa: A_{200} [mAU], vodorovná osa: migrační čas [min].

Píky: 1) $(GlcNAc)_3$, 2) $(GlcNAc)_2$, 3) GlcNAc.

Doba reakce: A) 20 min, B) 40 min, C) 80 min, D) 130 min, E) 180 min.

4.4. Optima β-N-acetylhexosaminidasy

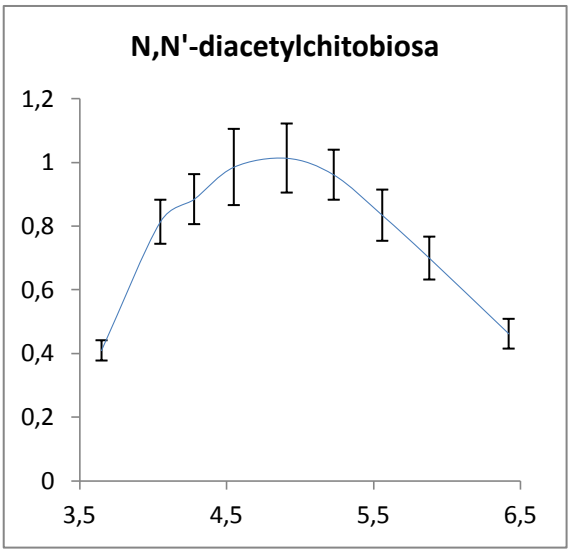
4.4.1. pH optimum β-N-acetylhexosaminidasy

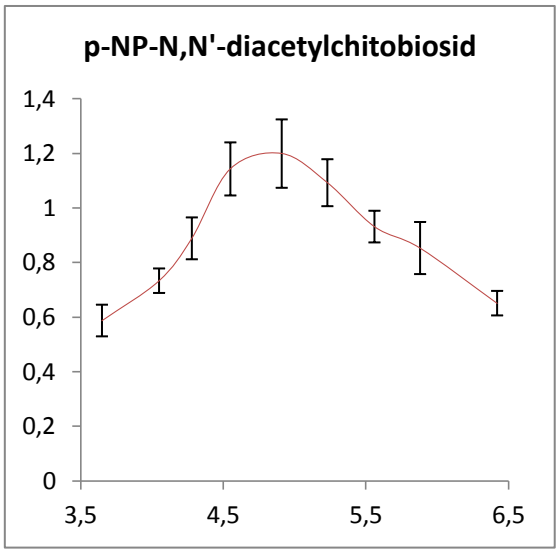
Při stanovení pH optima β-N-acetylhexosaminidasy s jednotlivými substráty jsem postupoval způsobem popsaným v kapitole 3.5.5.3. (str. 42), přičemž aktivitu s p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc jsem stanovoval způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1. (str. 35) a aktivitu se substráty stanovovanými pomocí kapilární elektroforézy způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.2. (str 35).

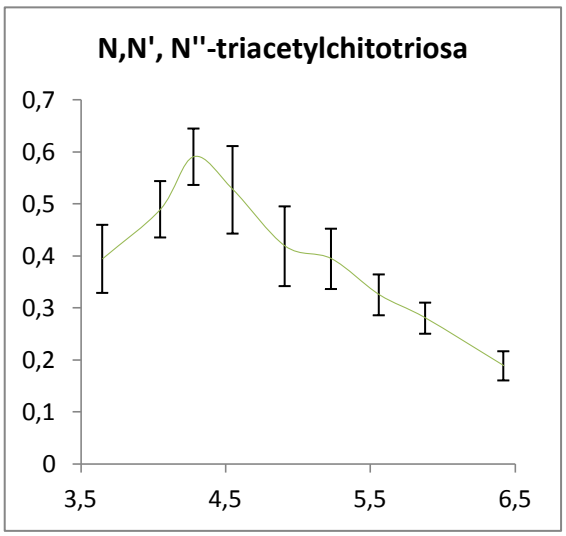
V případě stanovení pomocí kapilární elektroforézy jsem délku inkubace volil tak, aby množství vzniklého produktu bylo ve všech případech zhruba stejné. Všechna měření jsem provedl 3x pro statistické vyhodnocení. Se všemi substráty bylo použito stejných pufrů, ale jejich zastoupení v reakční směsi bylo rozdílné. Proto jsem v rámci vyhodnocení sledoval závislost aktivity na skutečném pH reakční směsi. Obrázek 25 (str. 64) shrnuje stanovení závislosti aktivity β-N-acetylhexosaminidasy na pH reakční směsi a tabulka 4 (str. 63) shrnuje stanovené hodnoty pH optima β-N-acetylhexosaminidasy s jednotlivými substráty.

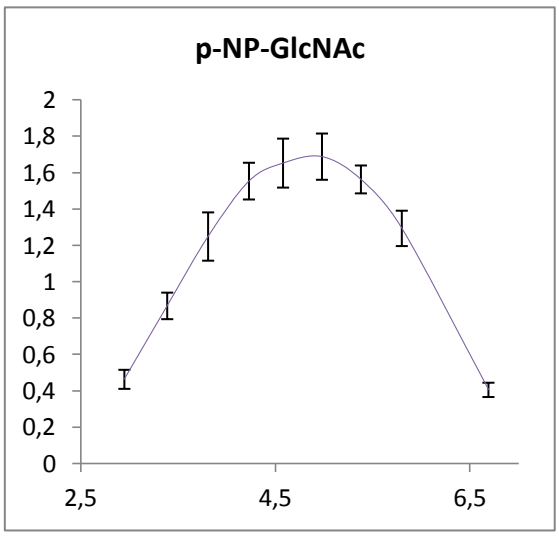
Tabulka 4: Stanovená pH optima β-N-acetylhexosaminidasy s jednotlivými substráty.

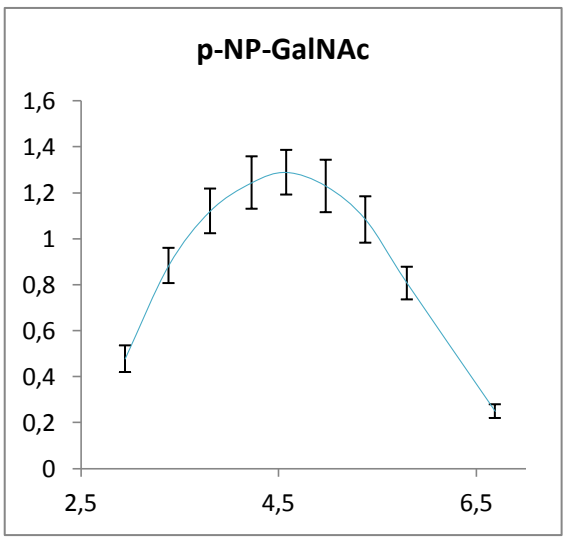
Substrát	pH optimum
N,N'-diacetylchitobiosa	4,9
p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid	4,9
N,N', N''-triacetylchitotriosa	4,3
p-NP-GlcNAc	4,6
p-NP-GalNAc	5,0











Obrázek 25: Grafy pH optima β-N-acetylhexosaminidasy s jednotlivými substráty. Horizontální osa zobrazuje vždy pH, vertikální osa rychlost reakce (v jednotkách $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$).

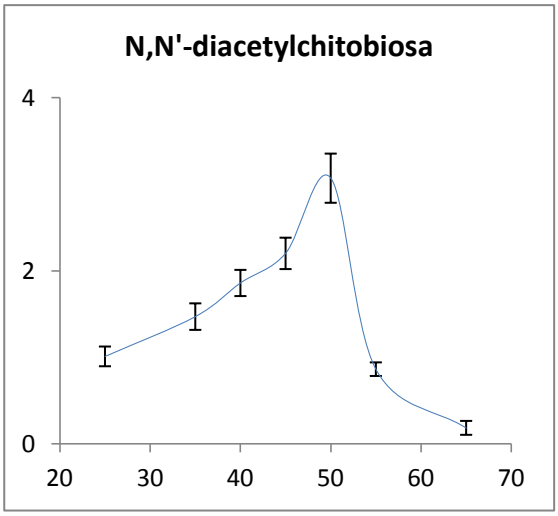
4.4.2. Teplotní optimum β-N-acetylhexosaminidasy

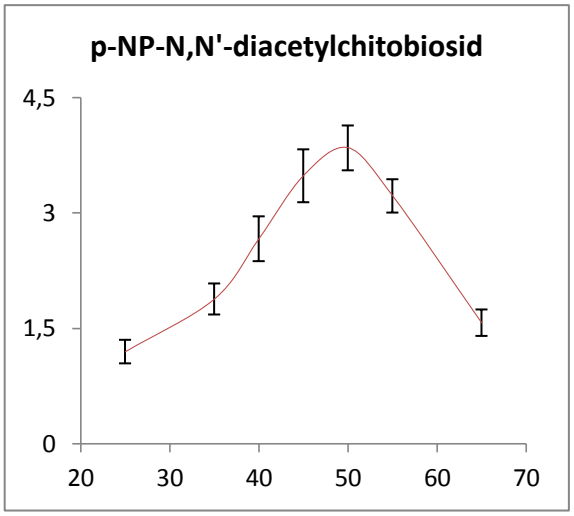
Při stanovení teplotního optima β-N-acetylhexosaminidasy s jednotlivými substráty jsem postupoval způsobem popsaným v kapitole 3.5.5.2. (str. 41), aktivitu s p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc jsem stanovoval způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.1. (str. 35) a aktivitu se substráty stanovovanými pomocí kapilární elektroforézy způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.2. (str. 35).

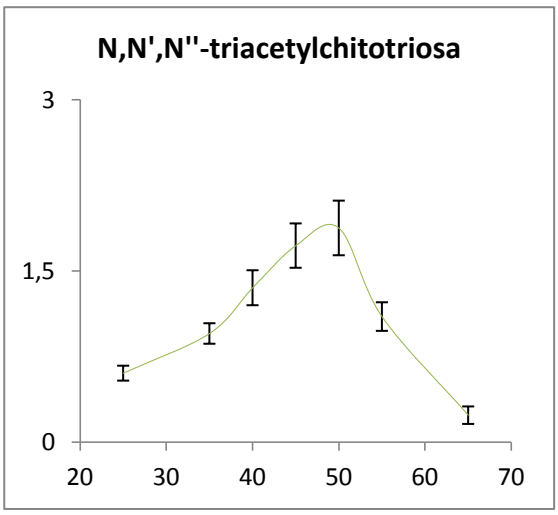
Obrázek 26 (str. 66) dokumentuje průběh stanovení závislosti aktivity β-N-acetylhexosaminidasy na reakční teplotě a tabulka 5 (str. 65) shrnuje stanovené hodnoty teplotního optima β-N-acetylhexosaminidasy s jednotlivými substráty.

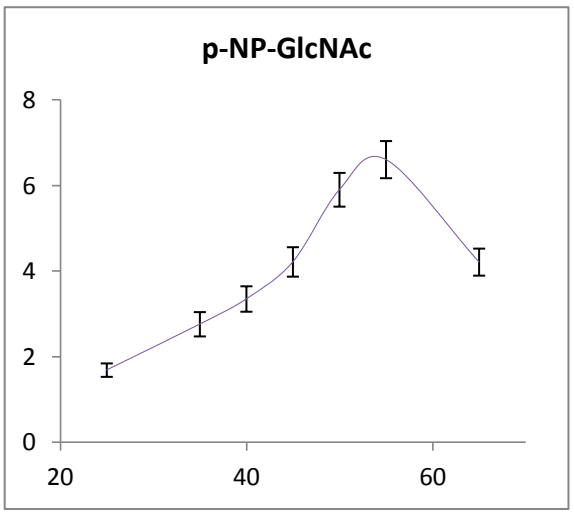
Tabulka 5: Stanovené hodnoty teplotního optima β-N-acetylhexosaminidasy s jednotlivými substráty.

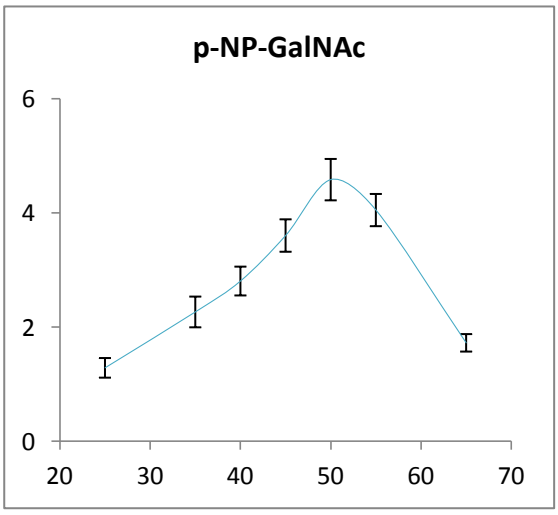
Substrát	Teplotní optimum [°C]
N,N'-diacetylchitobiosa	50
p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid	50
N,N',N''-triacetylchitotriosa	50
p-NP-GlcNAc	55
p-NP-GalNAc	50











Obrázek 26: Teplotní optimum β-N-acetylhexosaminidasy pro jednotlivé substráty. Horizontální osa zobrazuje vždy teplotu (v jednotkách °C), vertikální osa rychlost reakce (v jednotkách $\mu mol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$).

4.5. Kinetické parametry β-N-acetylhexosaminidasy

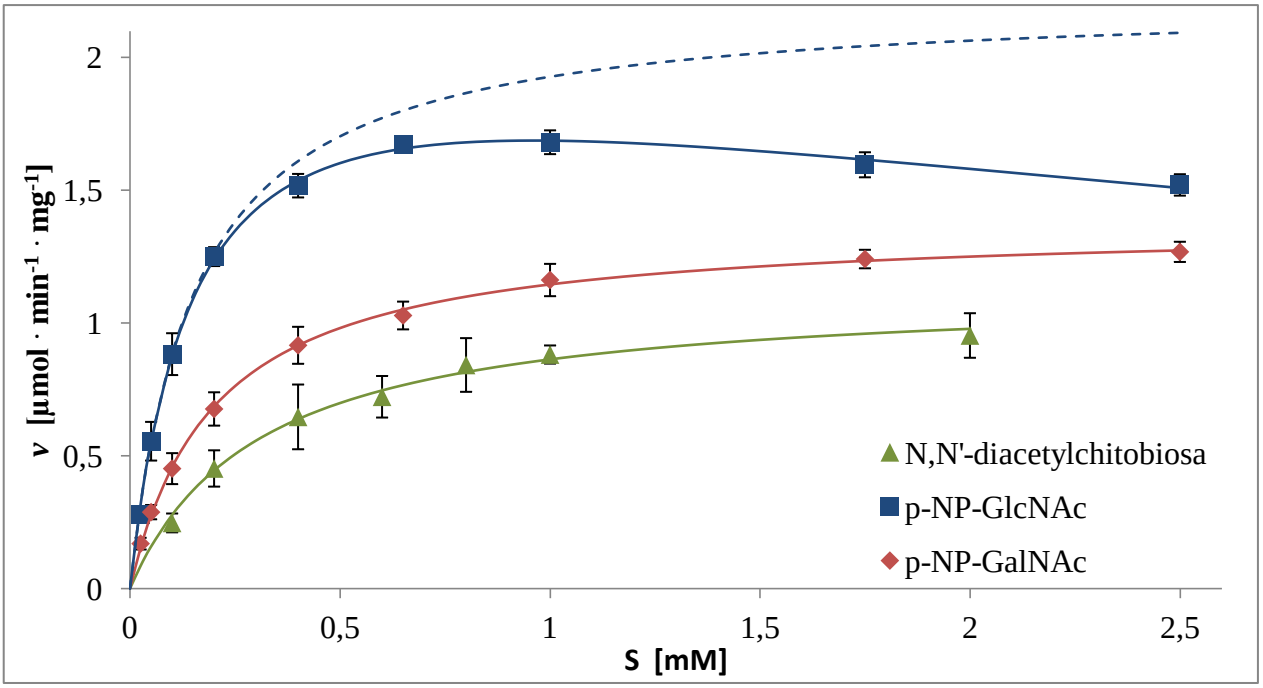
4.5.1. Stanovení kinetických parametrů β-N-acetylhexosaminidasy

Stanovil jsem základní kinetické parametry β-N-acetylhexosaminidasy, V_{MAX} a K_M, v případě substrátů p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc a N,N'-diacetylchitobiosa.

V případě substrátu p-NP-GlcNAc jsem pozoroval také inhibici nadbytkem substrátu, což je vlastnost, které dosud u rostlinných β-N-acetylhexosaminidas nebyla popsána. Stanovil jsem tedy i příslušnou konstantu inhibice nadbytkem substrátu (K_{SS}). Při stanovení jednotlivých veličin jsem postupoval způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.4. (str. 37).

V důsledku pozorované inhibice nadbytkem substrátu je stanovená VMAX β-N-acetylhexosaminidasy v případě substrátu p-NP-GlcNAc pouze fiktivní (V^*_{MAX}). Jedná se o vypočtenou rychlost, s jakou by reakce probíhala bez přítomnosti inhibice nadbytkem substrátu. Maximální rychlosti reakce dosahuje β-N-acetylhexosaminidasa při 1 mM koncentraci p-NP-GlcNAc, kdy v (1 mM) = 1,69 μmol $\cdot$ min^{-1} $\cdot$ mg^{-1}, tedy zhruba 76% V^*_{MAX}.

Na obrázku 27 (str. 68) je zobrazen graf závislosti rychlosti reakce na koncentraci jednotlivých substrátů. Tabulka 6 (str. 68) shrnuje stanovené hodnoty kinetických parametrů β-N-acetylhexosaminidasy.



Obrázek 27: Závislost rychlosti reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou na koncentraci jednotlivých substrátů. Přerušovanou čarou je zobrazen vývoj rychlosti reakce v případě, kdy by nebyla uplatněna inhibice nadbytkem substrátu.

Tabulka 6: Stanovené hodnoty kinetických parametrů β-N-acetylhexosaminidasy pro jednotlivé substráty: V_{MAX}, K_M a K_{SS} v případě inhibice substrátem (pozorované pouze u p-NP-GlcNAc).

Substrát	**V_{MAX} [µmol · min^{-1} · mg^{-1}](+)**	**K_M [mM]**	**K_{SS} [mM]**
N,N'-diacetylchitobiosa	1,12 ± 0,13	0,308 ± 0,037	—
p-NP-GlcNAc	2,21 ± 0,11	0,152 ± 0,008	6,08 ± 0,64
p-NP-GalNAc	1,37 ± 0,10	0,201 ±0,015	—

+) V případě substrátu p-NP-GlcNAc je stanovená maximální rychlost reakce pouze hypotetická, V^*_{MAX}. Maximální rychlosti reakce dosahuje β-N-acetylhexosaminidasa při 1 mM koncentraci p-NP-GlcNAc, kdy v (1 mM) = 1,69 µmol · min^{-1} · mg^{-1}, tedy zhruba 76% V^*_{MAX}.

4.5.2. Inhibiční studie β-N-acetylhexosaminidasy

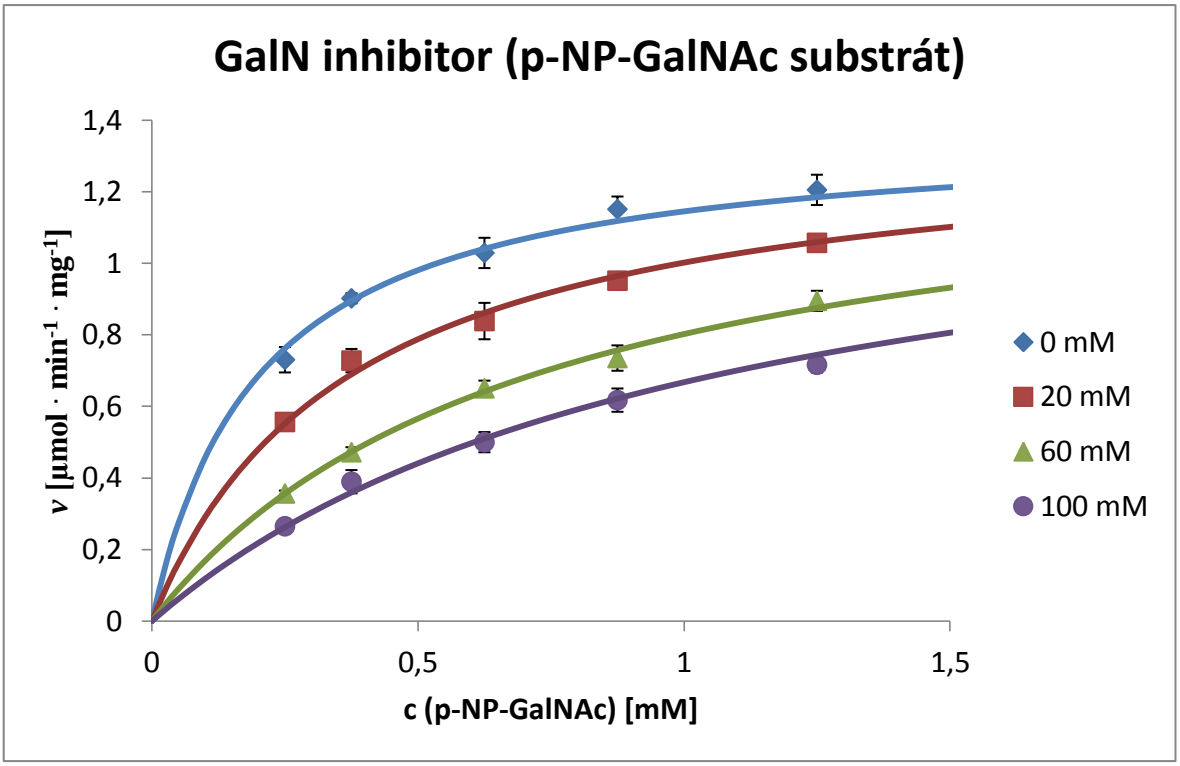
Studoval jsem působení čtyř předpokládaných inhibitorů (GlcN, GlcNAc, GalN a GalNAc) na rychlost reakce katalyzované β-N-acetylhexosaminidasou s použitím substrátů p-NP-GalNAc nebo p-NP-GlcNAc. V případě substrátu p-NP-GlcNAc byla reakce zároveň inhibována i substrátem (K_{SS} = 6,08 ± 0,64 mM), čemuž byly přizpůsobeny příslušné rovnice. Postupoval jsem způsobem popsaným v kapitole 3.5.4.5. (str. 38) a jednotlivé inhibiční konstanty jsem pomocí nelineární regrese v programu Excel.

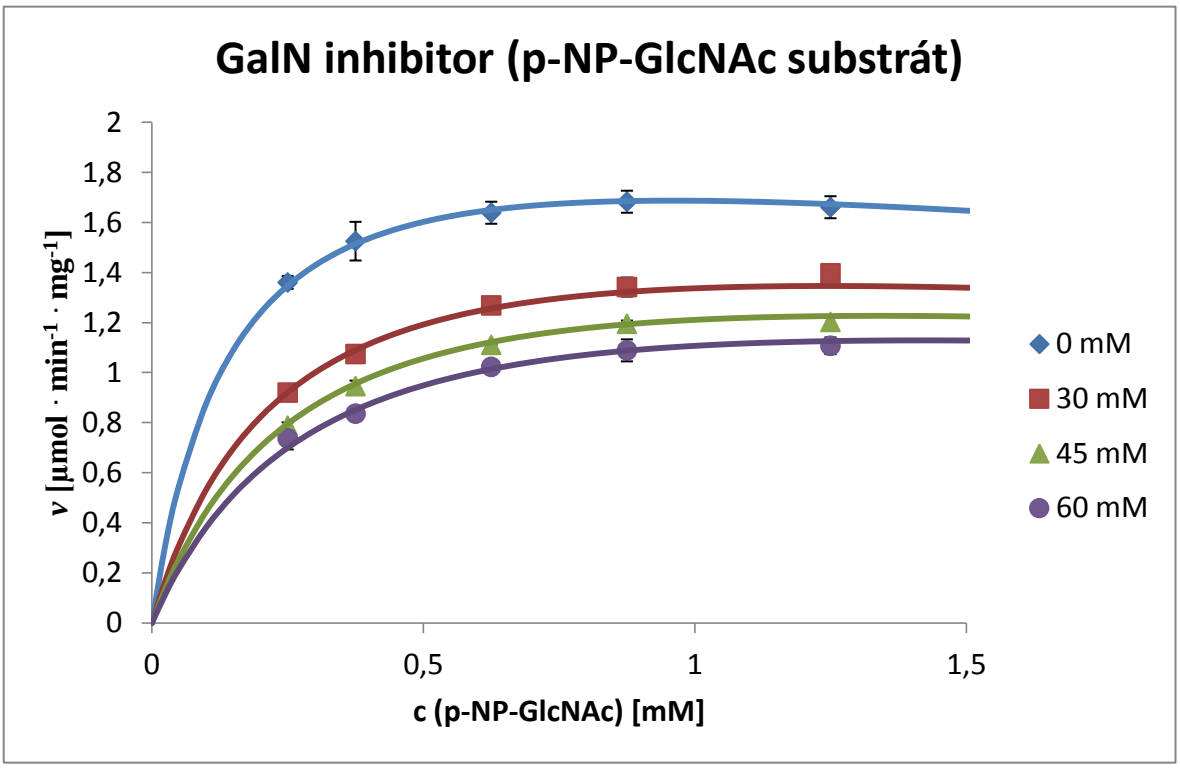
Tabulka 7 (str. 70) shrnuje stanovené hodnoty inhibičních konstant β-N-acetylhexosaminidasy. V případě použitého substrátu p-NP-GlcNAc vykazují inhibitory GalN a GalNAc inhibici smíšeného typu (uvedena K_{IC} i K_{IU}, tedy kompetitivní a nekompetitivní inhibiční konstanta), ve všech ostatních případech vykazují jednotlivé inhibitory inhibici čistě kompetitivního typu (uvedena pouze K_{IC}). Dále jsem stanovil inhibiční konstantu β-N-acetylhexosaminidasy v případě kompetitivního inhibitoru DMF s použitím substrátu p-NP-GlcNAc, kdy K_{IC} = 88,8 ± 10,5 mM. Obrázky 28-31 (str. 70-74) dokumentují jednotlivá stanovení.

Tabulka 7: Hodnoty inhibičních konstant β-N-acetylhexosaminidasy v případě jednotlivých inhibitorů a s použitím substrátů p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc.

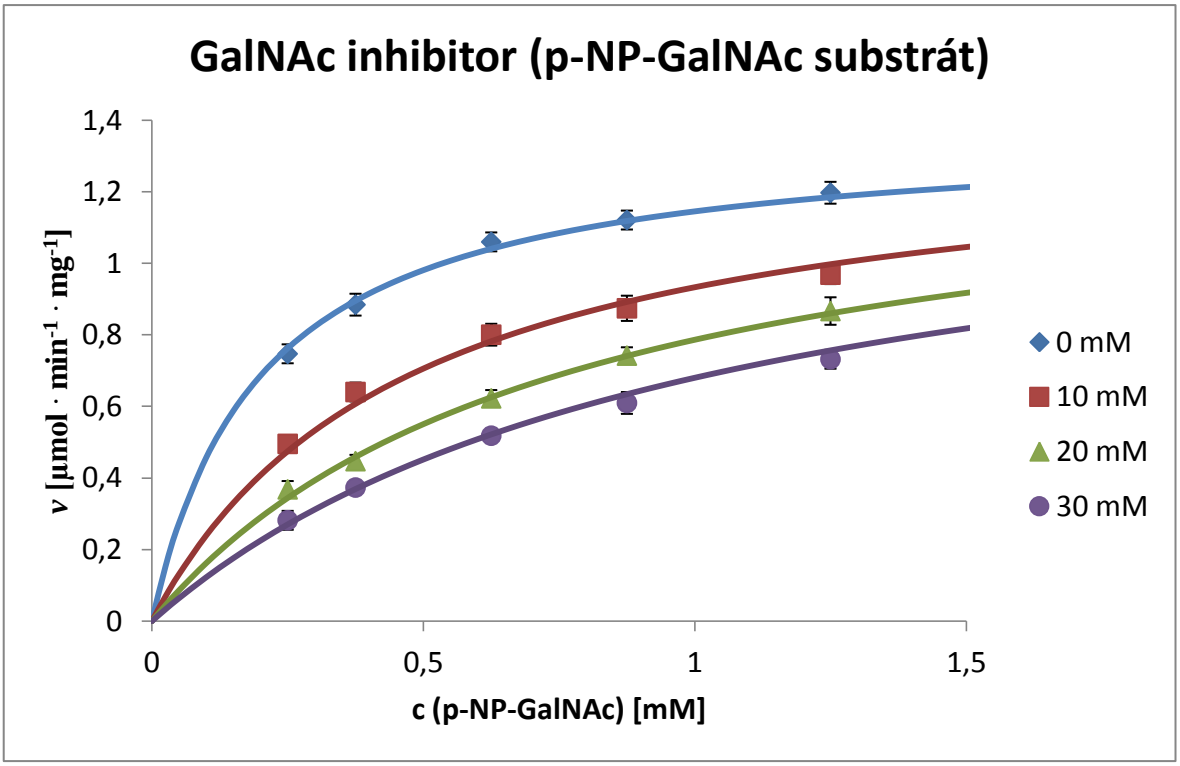
inhibitor \ substrát	**p-NP-GalNAc**	**p-NP-GlcNAc**
GalN [mM]	K_{IC} = 23,43 ± 2,53	K_{IC} = 31,15 ± 3,76 K_{IU} = 176,7 ± 14,3
GalNAc [mM]	K_{IC} = 7,33 ± 0,73	K_{IC} = 12,33 ± 1,85 K_{IU} = 89,5 ± 10,4
GlcN [mM]	K_{IC} = 4,95 ± 0,16	K_{IC} = 5,00 ± 0,08
GlcNAc [mM]	K_{IC} = 3,02 ± 0,17	K_{IC} = 3,38 ± 0,11

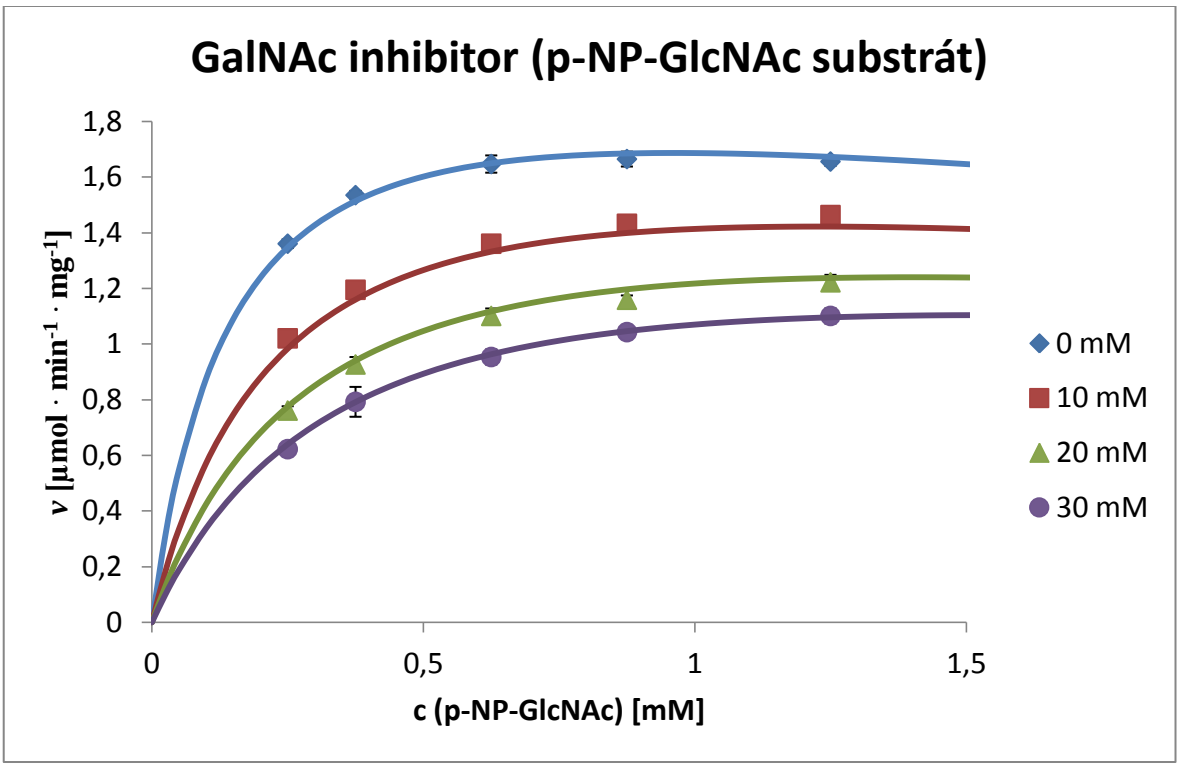
K_{IC} - kompetitivní inhibiční konstanta, K_{IU} - nekompetitivní inhibiční konstanta. Pokud jsou uvedeny K_{IC} i K_{IC}, jedná se o smíšenou inhibici, v opačném případě o čistě kompetitivní inhibici.



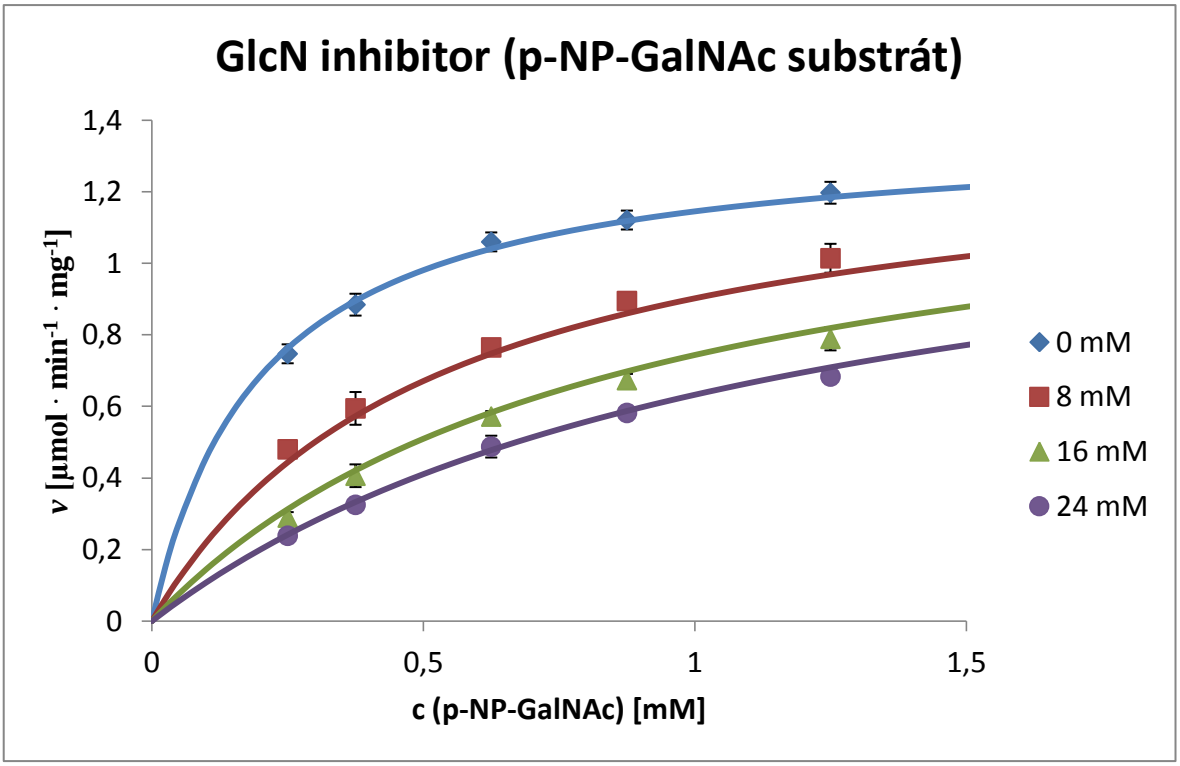


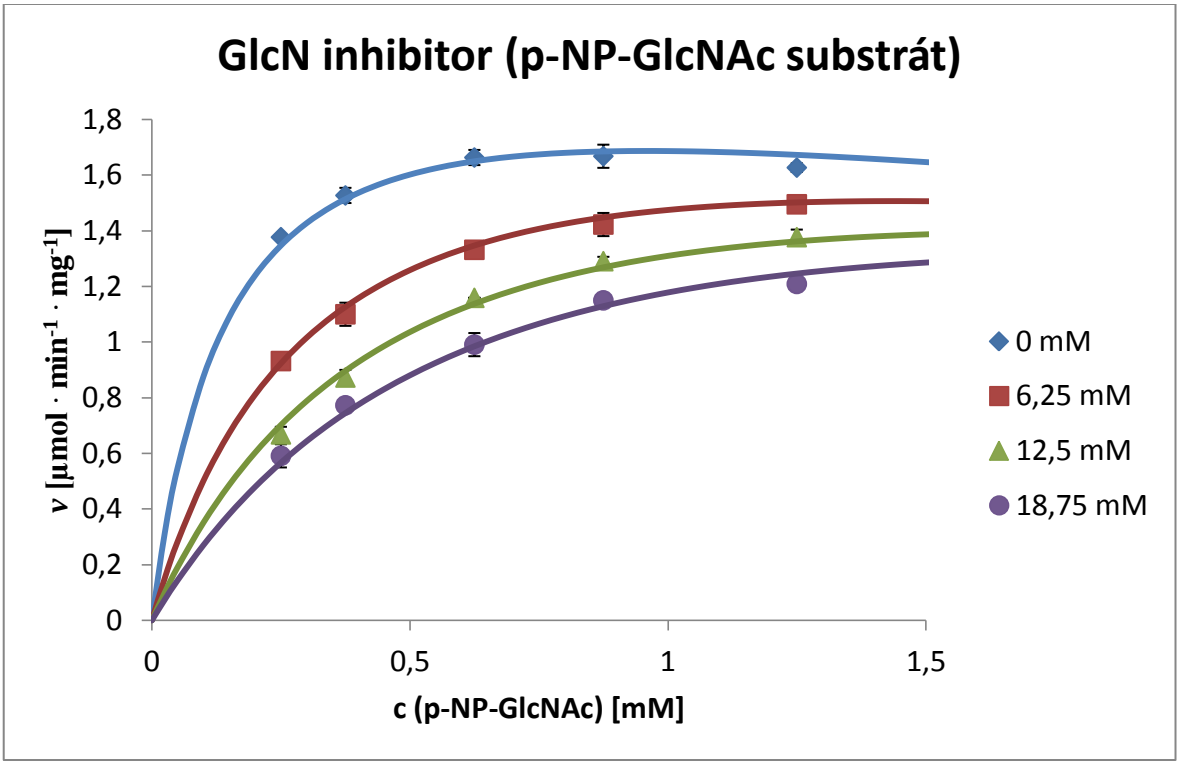
Obrázek 28: Inhibiční účinek GalN na β-N-acetylhexosaminidasu s použitím substrátů p-NP-GalNAc (kompetitivní inhibice) a p-NP-GlcNAc (smíšená inhibice reakce současně inhibované nadbytkem substrátu). Modré (0 mM) křivky odpovídají reakcím bez inhibitoru.



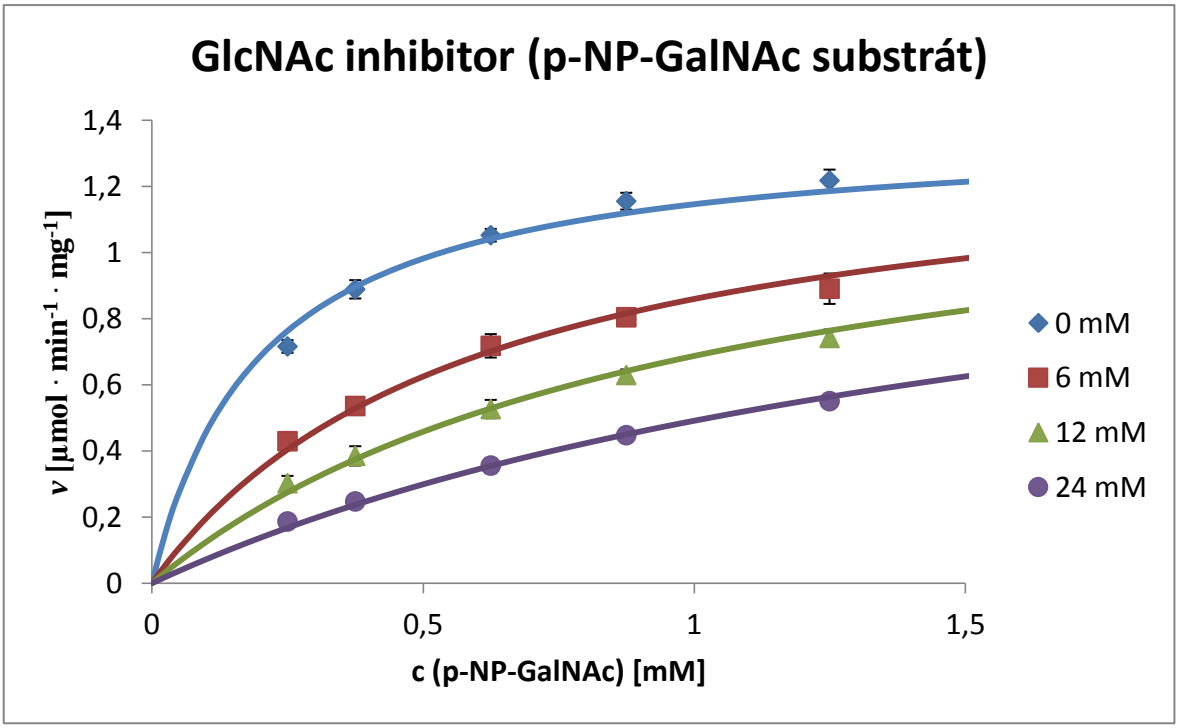


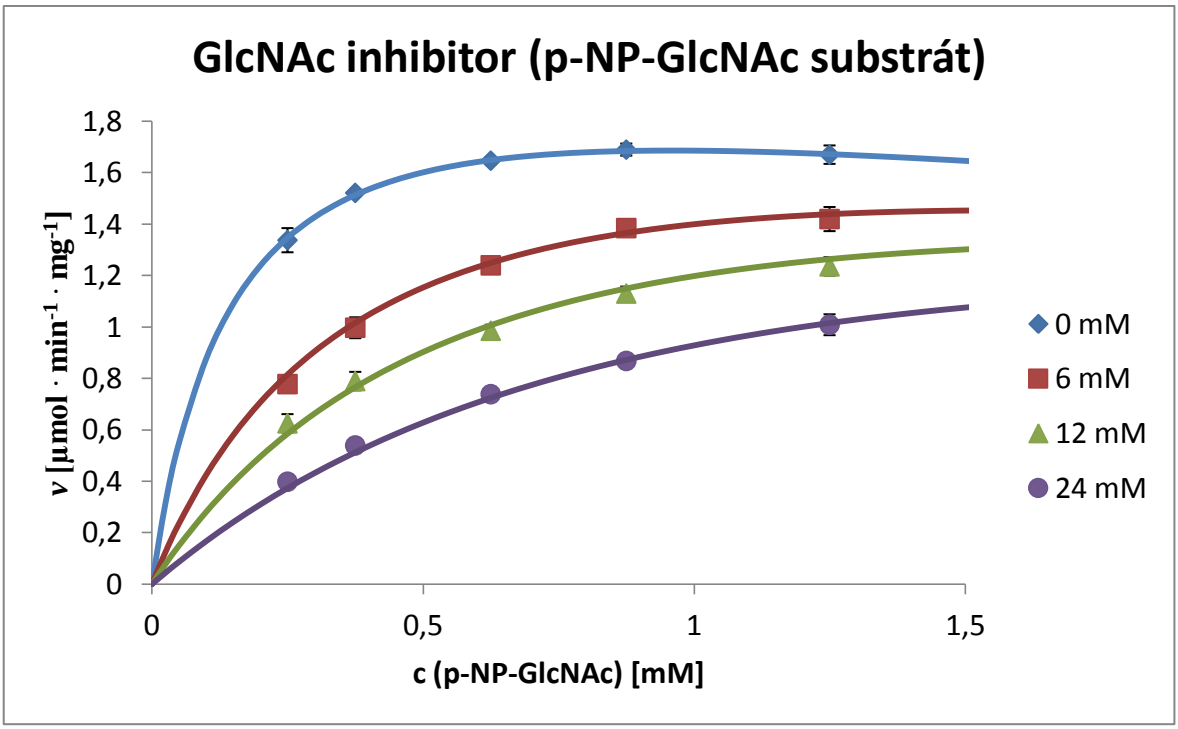
Obrázek 29: Inhibiční účinek GalNAc na β-N-acetylhexosaminidasu s použitím substrátů p-NP-GalNAc (kompetitivní inhibice) a p-NP-GlcNAc (smíšená inhibice reakce současně inhibované nadbytkem substrátu). Modré (0 mM) křivky odpovídají reakcím bez inhibitoru.





Obrázek 30: Inhibiční účinek GlcN na β-N-acetylhexosaminidasu s použitím substrátů p-NP-GalNAc (kompetitivní inhibice) a p-NP-GlcNAc (kompetitivní inhibice reakce současně inhibované nadbytkem substrátu). Modré (0 mM) křivky odpovídají reakcím bez inhibitoru.





Obrázek 31: Inhibiční účinek GlcNAc na β-N-acetylhexosaminidasu s použitím substrátů p-NP-GalNAc (kompetitivní inhibice) a p-NP-GlcNAc (kompetitivní inhibice reakce současně inhibované nadbytkem substrátu). Modré (0 mM) křivky odpovídají reakcím bez inhibitoru.

5. DISKUZE

Rostlinné β-N-acetylhexosaminidasy patří do skupiny enzymů s rozmanitými vlastnostmi. Jsou schopné hydrolyzovat většinu substrátů s vázaným GlcNAc nebo GalNAc, ať už v izolovaných sacharidech nebo glykokonjugátech, a stejně tak i synteticky značené substráty. S takto širokou substrátovou specifitou se aktivita rostlinných β-N-acetylhexosaminidas při srovnání poměrů hydrolýzy jednotlivých substrátu často liší až o několik řádů. I v oblasti pH optim, izoelektrických bodů, kvartérní struktury nativních proteinů a dalších vlastnostech se rostlinné β-N-acetylhexosaminidasy také liší, byť zdaleka ne v takové míře jako v oblasti substrátové specifity. Podobnost například v případě molekulových hmotností neglykosylovaných proteinů, která se v naprosté většině případů pohybuje v úzkém rozmezí kolem M_R 62 000, je spíše výjimečná [20].

Molekulová hmotnost β-N-acetylhexosaminidas se zdá být univerzální i v živočišné a houbové říši. Například podjednotka α lidské β-N-acetylhexosaminidasy má M_R 61 000 a podjednotka β M_R 63 000 [11]. Houbová β-N-acetylhexosaminidasa organizmu *Penicillium oxalicum* má M_R 65 000 (v tomto případě je přítomný i propeptid s regulační funkcí a M_R 15 000) [85]. Houbové a živočišné β-N-acetylhexosaminidasy se ale vyskytují téměř výhradně ve formě dimerů, zatímco rostlinné enzymy nejsou v tomto ohledu takto jednotné.

V této práci jsem stanovil molekulovou hmotnost β-N-acetylhexosaminidasy z listů tabáku na M_R 275 000 pomocí gelové chromatografie a M_R 285 000 pomocí nativní elektroforézy. Za předpokladu (který se mi vzhledem k čistotě finálního enzymového preparátu nepodařilo dokázat), že protein β-N-acetylhexosaminidasy má typickou velikost kolem M_R 62 000, se tedy jedná pravděpodobně o homotetramer.

Výsledky získané při nativní elektroforéze, a dále i výsledky izoelektrické fokusace nasvědčují přítomnosti jediné izoformy β-N-acetylhexosaminidasy v listech tabáku. Doplňkovým zpracováním hrubého extraktu při izolaci jsem nedokázal ani přítomnost membránově vázané izoformy β-N-acetylhexosaminidasy. Přitom u ostatních rostlin se na základě analýzy DNA a sekvenční homologie s potvrzenými β-N-acetylhexosaminidasami huseníčku rolního předpokládá až šest (kukuřice setá, sója), sedm (vraneček), nebo i osm (japonská rýže setá) izoforem β-N-acetylhexosaminidasy. Stanovený izoelektrický bod pI 5,3 se pohybuje v rozmezí typickém pro rostlinné β-N-acetylhexosaminidas (pI 5,0 - 8,4 [20]). Konkrétně v případě HEXO1-3 huseníčku rolního je vypočtené pI 6,20 a 6,37 a 8,27 [17]. V případě kukuřice seté byl v roce 2003 experimentálně stanoven pro β-N-acetylhexosaminidasu pI 6,45 [86]. K dnešnímu dni je známá sekvence kukuřičného genomu a pro celkem šest proteinů β-N-acetylhexosaminidasy v kukuřici seté je známa vypočtená hodnota pI 5,04 a 5,36 a 5,78 a 5,94 a 6,44 a 6,47 [20].

Všechna stanovení tedy nasvědčují přítomnosti jediné izoformy β-N-acetylhexosaminidas v listech tabáku, pravděpodobně vakuolární tak jako v případě HEXO1 huseníčku rolního [17].

Optimum pH se u rostlinných β-N-acetylhexosaminidas obvykle pohybuje v mírně kyselé oblasti. Například všechny tři β-N-acetylhexosaminidasy huseníčku rolního mají pH optimum v rozmezí pH 4 - 5 se substráty p-NP-GlcNAc, rostlinnými N-glykoproteiny i značenou $(GlcNAc)_3$ [17]. V případě kukuřice seté bylo pH optimum stanovené na pH 4,5 se substrátem $(GlcNAc)_2$ [86] a v případě pšenice seté bylo stanovené optimální pH 4,0 (nespecifikovaný substrát) [87].

V případě β-N-acetylhexosaminidasy v listech tabáku jsem stanovil pH optimum při použití jednotlivých substrátů v poměrně úzkém rozmezí pH 4,3 - 5,0. Konkrétně s použitím substrátů p-NP-GlcNAc, $(GlcNAc)_2$ a p-NP-$(GlcNAc)_2$ byla hodnota optimálního pH 4,9-5,0. V mírně kyselejší oblasti se pohybovalo pH optimum se substráty p-NP-GalNAc (pH 4,6) a $(GlcNAc)_3$ (pH 4,3). Za zmínku zde stojí i to, že díky pokročilejší metodě stanovení došlo k mírnému zpřesnění

předchozích hodnot, které byly v naší laboratoři dříve stanoveny jako pH optimum β-N-acetylhexosaminidasy se substráty p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc [88].

Substrátová specifita rostlinných β-N-acetylhexosaminidas je také značně variabilní. Rostlinné β-N-acetylhexosaminidasy zpravidla štěpí p-NP značené substráty lépe než chitooligomery a jiné v přírodě se vyskytující substráty, přičemž aktivita β-N-acetylhexosaminidasy se substrátem p-NP-GlcNAc je často řádově vyšší, než se substrátem p-NP-GalNAc. Například HEXO1 a HEXO3 huseníčku rolního obě hydrolyzují p-NP-GlcNAc více než 10x efektivněji než p-NP-GalNAc, a více než 20x efektivněji než rostlinné N-glykoproteiny a (pyridylaminovanou) PA-$(GlcNAc)_2$ a PA-$(GlcNAc)_3$. Na druhou stranu v případě HEXO2 je hydrolýza p-NP-GlcNAc pouze asi 2,5x efektivnější v porovnání s p-NP-GalNAc, a pouze 4x efektivnější v porovnání s PA-$(GlcNAc)_3$, přičemž PA-$(GlcNAc)_2$ hydrolyzuje o několik řádů hůře [17].

Aktivita β-N-acetylhexosaminidasy izolované z kukuřice seté byla se substrátem p-NP-GlcNAc téměř 20x nižší v porovnání s $(GlcNAc)_2$. V tomto případě enzym dokonce hydrolyzoval i p-NP-GalNAc asi o 25% efektivněji než substrát p-NP-GlcNAc [86]. Dvě β-N-acetylhexosaminidasy izolované z pšenice seté byly schopné štěpit chitooligomery $(GlcNAc)_{2-5}$, byť s účinností o 1-2 řády nižší v porovnání se substrátem p-NP-GlcNAc. Zajímavé v tomto případě bylo to, že se nepodařilo stanovit žádný lineární vztah aktivity β-N-acetylhexosaminidasy v závislosti na délce chitooligomerního substrátu a rychlost reakce klesala náhodně v řadě $(GlcNAc)_3 > (GlcNAc)_5 > (GlcNAc)_4 > (GlcNAc)_2$ [87].

Substrátová specifita β-N-acetylhexosaminidasy z listů tabáku se nepodobá žádnému z výše zmíněných příkladů. Tento enzym hydrolyzuje p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc ve srovnatelné míře, stejně jako substráty $(GlcNAc)_{2-3}$ a p-NP-$(GlcNAc)_2$. Svůj nejlepší substrát p-NP-GlcNAc hydrolyzuje β-N-acetylhexosaminidasa pouze asi 3x efektivněji než substrát nejhorší, tedy $(GlcNAc)_3$. Kromě toho zde s rostoucí délkou oligosacharidů klesá aktivita, a to jak v případě $(GlcNAc)_2$ a $(GlcNAc)_3$, tak i v případě p-NP-(GlcNAc) a p-NP-$(GlcNAc)_2$. V případě hydrolýzy p-NP-$(GlcNAc)_2$ se podařilo prokázat, že jako produkt reakce

vzniká pouze p-NP-GlcNAc a GlcNAc, a β-N-acetylhexosaminidasa nikdy neštěpí vazbu mezi p-NP a $(GlcNAc)_2$. Dále je zajímavé i to, že β-N-acetylhexosaminidasa hydrolyzuje p-NP-$(GlcNAc)_2$ efektivněji než $(GlcNAc)_2$ i $(GlcNAc)_3$.

Jak jsem naznačil již výše, tyto výsledky neumožňují odhadnout funkci β-N-acetylhexosaminidasy v listech tabáku na základě porovnání substrátové specifity s jinými enzymy.

Unikátním a u rostlinných β-N-acetylhexosaminidas dosud nepopsaným jevem je vlastní inhibice reakce substrátem p-NP-GlcNAc. V naší laboratoři byla dříve popsána houbová β-N-acetylhexosaminidasa izolovaná z *Penicillium oxalicum*, která je rovněž inhibována nadbytkem substrátu p-NP-GlcNAc [85]. Na základě inhibičních studií se předpokládala existence druhého vazného místa pro substrát, a tato hypotéza byla později prokázána a její mechanismus vysvětlen pomocí molekulárního modelování enzymu.

V případě mnou zkoumané β-N-acetylhexosaminidasy z listů tabáku jsem při inhibičních studiích (s inhibitory GalN, GalNAc, GlcN a GlcNAc) prokázal kompetitivní typ inhibice pro všechny čtyři inhibitory s použitím substrátu p-NP-GalNAc. V případě substrátu p-NP-GlcNAc se s inhibitory GlcN a GlcNAc jednalo také o kompetitivní inhibici, přičemž hodnota inhibičních konstant byla prakticky totožná s použitím obou substrátů.

S použitím substrátu p-NP-GlcNAc a inhibitory GalN (K_{IC} 31,2 a K_{IU} 176,7 mM) a GalNAc (K_{IC} 12,3 a K_{IU} 89,5 mM) se ale jednalo o smíšenou inhibici. Toto jsou velice odlišné výsledky od výše zmíněné houbové β-N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*, která byla inhibovaná inhibitorem GlcNAc nekompetitivně bez ohledu na substrát, a inhibitorem GalNAc kompetitivně bez ohledu na substrát [85]. Příčinu tohoto jevu nejsem v tuto chvíli schopen uspokojivě vysvětlit, ale napomoci pochopit jeho mechanismus by mohly substráty bez C4 hydroxylu [3]. Kinetika reakce β-N-acetylhexosaminidasy s těmito substráty může objasnit, jestli je Glc orientovaný C4 hydroxyl potřebný pro inhibici nadbytkem substrátu (v tomto případě by se inhibice

substrátem neměla projevit), nebo jestli je Gal orientovaný C4 hydroxyl pouze překážkou k uplatnění inhibice nadbytkem substrátu (v tomto případě by se inhibice substrátem měla projevit).

Optimalizace izolace β-N-acetylhexosaminidasy a optimalizace stanovení chitooligomerů pomocí kapilární elektroforézy v budoucnu umožní skutečně spolehlivé stanovení kinetických parametrů β-N-acetylhexosaminidasy v listech tabáku u všech v současnosti zkoumaných substrátů. A při povzbudivých výsledcích umožní také další kinetické studie s využitím rostlinných N-glykoproteinů.

Znalost kinetiky reakcí, vysvětlení široké substrátové specifity, relativně vysoké aktivity se substrátem p-NP-GalNAc a popis mechanismu inhibice substrátem p-NP-GlcNAc patří mezi klíčové otázky, jejichž zodpovězení povede k objasnění funkce β-N-acetylhexosaminidasy v listech tabáku.

6. ZÁVĚR

- Částečnou purifikací β-N-acetylhexosaminidasy z listů tabáku jsem získal 23x načištěný enzymový preparát o specifické aktivitě 1,72 μmol . min^{-1} . mg^{-1} (se substrátem p-NP-GlcNAc).
- Nativní elektroforéza a izoelektrická fokusace odhalily přítomnost jediné izoformy β-N-acetylhexosaminidasy v listech tabáku.
- Stanovil jsem relativní molekulovou hmotnost β-N-acetylhexosaminidasy gelovou chromatografií (M_R 275 000) a nativní elektroforézou (M_R 285 000).
- Izoelektrický bod β-N-acetylhexosaminidasy jsem stanovil na hodnotu pI 5,3.
- β-N-acetylhexosaminidasu z listů tabáku nebylo možné deglykosylovat enzymem Endo H za nativních podmínek. Deglykosylaci β-N-acetylhexosaminidasy enzymy Endo H a PNGasa F za denaturujících podmínek se nepodařilo prokázat.
- Optimalizoval jsem metodu ke stanovení aktivity β-N-acetylhexosaminidasy se substráty N,N'-diacetylchitobiosa, p-NP-N,N'-diacetylchitobiosid a N,N',N''-triacetylchitotriosa pomocí kapilární elektroforézy.
- Při studiu substrátové specifity se substráty p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc, $(GlcNAc)_2$, p-NP-$(GlcNAc)_2$ a $(GlcNAc)_3$ jsem stanovil aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy s jednotlivými substráty, zdokumentoval průběh reakce a definoval produkty reakce.
- Stanovil jsem pH optimum β-N-acetylhexosaminidasy se substráty p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc, $(GlcNAc)_2$, p-NP-$(GlcNAc)_2$ a $(GlcNAc)_3$, které se pohybuje v úzkém rozmezí pH 4,3 - 5,0. Zpřesnil jsem dosavadní hodnoty stanovené naší laboratoří.

- Stanovil jsem teplotní optimum β-N-acetylhexosaminidasy se substráty p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc, $(GlcNAc)_2$, p-NP-$(GlcNAc)_2$ a $(GlcNAc)_3$ na hodnotu 50 - 55 °C.

- Stanovil jsem kinetické parametry K_M a V_{MAX} pro β-N-acetylhexosaminidasu se substráty p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc, N,N'-diacetylchitobiosa. V případě substrátu p-NP-GlcNAc jsem dokázal inhibici reakce nadbytkem substrátu, dosud nepopsanou u rostlinných β-N-acetylhexosaminidas, a stanovil jsem příslušnou inhibiční konstantu K_{SS}.

- Stanovil jsem typ inhibice a inhibiční konstantu inhibitorů GalN, GalNAc, GlcN a GlcNAc na aktivitu β-N-acetylhexosaminidasy při použití substrátů p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc.

7. REFERENCE

[1] http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/52.html (14/3/2013)

[2] Duo-Chuan L: Mycopathologia 161, 345-360 (2006)

[3] Slámová K, Gažák R, Bojarová P, Kulik N, Ettrich R, Pelantová H, Sedmera P, Křen V: Glycobiology 20, 1002-1009 (2010)

[4] Loft KJ, Bojarová P, Slámová K, Křen V, Williams SJ: ChemBioChem 10, 565-576 (2009)

[5] http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/newsletter/misc/chitob.html (25/3/2013)

[6] http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html (14/3/2013)

[7] Mark BL, James MNG: Can. J. Chem. 80, 1064–1074 (2002)

[8] Slámová K, Bojarová P, Petrásková L, Křen V: Biotechnol. Adv. 28, 682-693 (2010)

[9] Adams DJ: Microbiology 150, 2029-2035 (2004)

[10] Scigelova M, Crout DHG: Enzyme Microb. Technol. 25, 3-14 (1999)

[11] Staretz-Chacham O, Choi JH, Wakabayashi K, Lopez G, Sidransky E: Am. J. Med. Genet., Part B 153, 1253–1265 (2010)

[12] Gaignard P, Fagart J, Niemir N, Puech J-P, Azouguene E, Dussau J, Caillaud C: Gene 512, 521-526 (2013)

[13] Békésiová B, Hraška Š, Libantová J, Moravčíková J, Matušíková I: Mol. Biol. Rep. 35, 579–588 (2008)

[14] Van Loon LC, Van Strien EA: Physiol. Mol. Plant Pathol. 55, 85-97 (1999)

[15] The Arabidopsis Genome Initiative: Nature 408, 796-815 (2000)

[16] Léonard R, Rendić D: J. Biol. Chem. 281, 4867-4875 (2006)

[17] Strasser R, Bondili JS, Schoberer J, Svoboda B, Liebminger E, Glössl J, Altmann F, Steinkellner H, Mach L: Plant Physiol. 145, 5-16 (2007)

[18] Meli VS, Ghosh S, Prabha TN, Chakraborty N, Chakraborty S, Datta A: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 2413-2418 (2010)

[19] Jagadeesh BH, Prabha TN: Phytochemistry (Elsevier) 61, 295-300 (2002)

[20] http://www.uniprot.org/uniprot/?query=beta-hexosaminidase+AND+ taxonomy:"Viridiplantae+[33090]" (15/6/2013)

[21] Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G, Marth J: Essentials of Glycobiology (2nd Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1999)

[22] van den Berg BM, Vink H, Spaan JAE: Circ. Res. 92, 592-594 (2003)

[23] Costerton JW, Irvin RT: Annu. Rev. Microbiol. 35, 299-324 (1981)

[24] Lis H, Sharon N: Eur. J. Biochem. 218, 1-27 (1993)

[25] Grace ME, Grabowski GA: Biochem. Biophys. Res. Commun. 168, 771-777 (1990)

[26] Barbarić S, Mrša V, Ries B, Mildner P: Arch. Biochem. Biophys. 234, 567-575 (1984)

[27] Matzuk MM, Keene JL, Boime I: J. Biol. Chem. 264, 2409-2414 (1989)

[28] Merritt EA, Sarfaty S, van den Akker F, L`Hoir C, Martial JA, Hol WGJ: Protein Sci. 3, 166-175 (1994)

[29] Sokurenko EV, Chesnokova V, Dykhuizen DE, Ofek I, Wu XR, Krogfelt KA, Struve C, Schembri MA, Hasty DL: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 8922-8926 (1998)

[30] Johansen PG, Marshall RD, Neuberger A: Biochem. J. 78, 518-527 (1961)

[31] Mescher MF, Strominger JL: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2687-2691 (1976)

[32] Lechner J, Wieland F: Annu. Rev. Biochem. 58, 173-194 (1989)

[33] Spiro RG: Glycobiology 12, 43R-56R (2002)

[34] Messner P: Glycoconjugate J. 14, 3-11 (1997)

[35] Erickson PR, Herzberg MC: J. Biol. Chem. 268, 23780-23783 (1993)

[36] Pfannenstiel MA, Muthukumar G, Couche GA, Nickerson KW: J. Bacteriol. 169, 796-801 (1987)

[37] Kishimoto T, Watanabe M, Mitsui T, Hori H: Arch. Biochem. Biophys. 370, 271-277 (1999)

[38] Lisowska E: Cell. Mol. Life Sci. 59, 445-455 (2002)

[39] Johnson KL, Jones BJ, Schultz CJ a Bacic A: Non-enzymic cell wall (glyco)proteins, v knize The Plant Cell Wall (Rose JKC ed.), Blackwell UK, Oxford, Velká Británie, 111-154 (2003)

[40] Wells L, Vosseller K, Hart GW: Science 291, 2376-2379 (2001)

[41] Hu Y, Belke D, Suarez J, Swanson E, Clark R, Hoshijima M, Dillmann WH: J. Am. Heart Assoc. 96, 1006-1013 (2005)

[42] Cole RN, Hart GW: J. Neurochem. 79, 1080-1089 (2001)

[43] Kornfeld R, Kornfeld S: Annu. Rev. Biochem. 54, 631-664 (1985)

[44] Parodi AJ: Annu. Rev. Biochem. 69, 69-93 (2000)

[45] Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, Davidson RC, Li H, Mitchell T, Nett JH, Rausch S, Stadheim TA, Wischnewski H, Wildt S, Gerngross TU: Science 301, 1244-1246 (2003)

[46] Gomord V, Fitchette AC, Menu-Bouaouiche L, Saint-Jore-Dupas C, Plasson C, Michaud D, Faye L: Plant Biotechnol. J. 8, 564-587 (2010)

[47] Rayon C, Lerouge P, Faye L: J. Exp. Bot. 49, 1463-1472 (1998)

[48] Ailor E, Betenbaugh MJ: Curr. Opin. Biotechnol. 10, 142-145 (1999)

[49] Altmann F: Trends Glycosci. Glycotechnol. 8, 101-114 (1996)

[50] Altmann F: Glycoconjugate J. 14, 643-646 (1997)

[51] Lerouge P, Cabanes-Macheteau M, Rayon C, Fischette-Lainé AC, Gomord V, Faye L: Plant Mol. Biol. 38, 31-48 (1998)

[52] Johnson KD, Chrispeels MJ: Plant Physiol. 84, 1301-1308 (1987)

[53] Tezuka K, Hayashi M, Ishihara H, Akazawa T, Takahashi N: Eur J. Biochem. 203,401 -413 (1992)

[54] Zeng Y, Bannon G, Thomas VH, Rice K, Drake R, Elbein A: J. Biol. Chem. 272, 31340-31347 (1997)

[55] Liebminger E, Veit C, Pabst M, Batoux M, Zipfel C, Altmann F, Mach L, Strasser R: J. Biol. Chem. 286, 10793-10802 (2011)

[56] Gutternigg M, Kretschmer-Lubich D, Paschinger K, Rendić D, Hader J, Geier P, Ranftl R, Jantsch V, Lochnit G, Wilson IBH: J. Biol. Chem. 282, 27825-27840 (2007)

[57] Strasser R: FEBS Lett. 561, 132-136 (2004)

[58] Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Chrispeels MJ, Armentia A, Salcedo G, Gomez L: Glycobiology 6, 471-477 (1996)

[59] http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html (20/3/2013)

[60] Gordon MJ, Huang X, Pentoney SL, Zare RN: Science 242, 224-228 (1988)

[61] Chang TT, Lay JO Jr., Francel RJ: Anal. Chem. 56, 111-113 (1984)

[62] Coufal P, Štulík K, Claessens HA, Cramers CA: J. High Resolut. Chromatogr. 17, 325-334 (1994)

[63] Coufal P, Claessens HA, Cramers CA: J. Liq. Chromatogr. 16, 3623-3652 (1993)

[64] Fan Y, Scriba GKE: J. Pharm. Biomed. Anal. 53, 1076-1090 (2010)

[65] Banke N, Hansen K, Diers I: J. Chromatogr. A 559, 325-335 (1991)

[66] Zhang J, Hoogmartens J, Schepdael AV: Electrophoresis 29, 56-65 (2008)

[67] Glatz Z: J. Chromatogr. B 841, 23-37 (2006)

[68] Bao JJ, Fujima JM, Danielson ND: J Chromatogr. B 699, 481-497 (1997)

[69] Saito N, Robert M, Kitamura S, Baran R, Soga T, Mori H, Nishioka T, Tomita M: J. Proteome Res. 5, 1979-1987 (2006)

[70] Blanes L, Saito RM, Genta FA, Donegá J, Terra WR, Ferreira C, do Lago CL: Anal. Biochem. 373, 99-103 (2008)

[71] Kanie Y, Kanie O: Carbohydr. Res. 337, 1757-1762 (2002)

[72] Friedberg M, Shihabi ZK: J Chromatogr. B 695, 187-191 (1997)

[73] Wolff MW, Bazin HG, Lindhardt RJ: Biotechnol. Tech. 13, 797-801 (1999)

[74] Křížek T, Doubnerová V, Ryšlavá H, Coufal P a Bosáková Z: Anal. Bioanal. Chem. 405, 2425-2434 (2013)

[75] Aitken A, Learmonth M: The protein protocols handbook str. 3-6, Humana Press, New York (1996)

[76] Bradford MM: Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)

[77] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

[78] Laemmli UK: Nature 227, 680-685 (1970)

[79] Dráb T, Kračmerová J, Tichá I, Hanzlíková E, Tichá M, Ryšlavá H, Doubnerová V, Maňásková-Postlerová P, Liberda J: Electrophoresis 32, 3597–3599 (2011)

[80] Ryšlavá H, Liberda J, Doubnerová V, Weignerová L, Martínek V, Dračínská H, Man P, Novák P: Návody biochemických praktik I, skriptum PřF UK, 40-41 (2012)

[81] Hayashi M: J. Histochem. Cytochem. 13, 355-360 (1965)

[82] Kotyk A, Horák J: Enzymová kinetika, Academia, Praha (1977)

[83] Ryšlavá H, Doubnerová V, Muller K, Baťková P, Schnablová R, Liberda J, Synková H, Čeřovská N: Collect. Czech. Chem. Commun. 72, 1420-1434 (2007)

[84] Müller K: Regulace fosfoenolpyruvátkarboxylasy v rostlinách tabáku během virové infekce. Disertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2008)

[85] Ryšlavá H, Kalendová A, Doubnerová V, Skočdopol P, Kumar V, Kukačka Z, Pompach P, Vaněk O, Slámová K, Bojarová P, Kulik N, Ettrich R, Křen V a Bezouška K: FEBS J. 278, 2469-2484 (2011)

[86] Oikawa A, Itoh E, Ishihara A a Iwamura H: J. Plant Physiol. 160, 991-999 (2003)

[87] Jordan ND, Barber MS: Plant Science 107, 41-48 (1995)

[88] Jana Trefancová: Studium β-N-acetylhexosaminidasy rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2009)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka