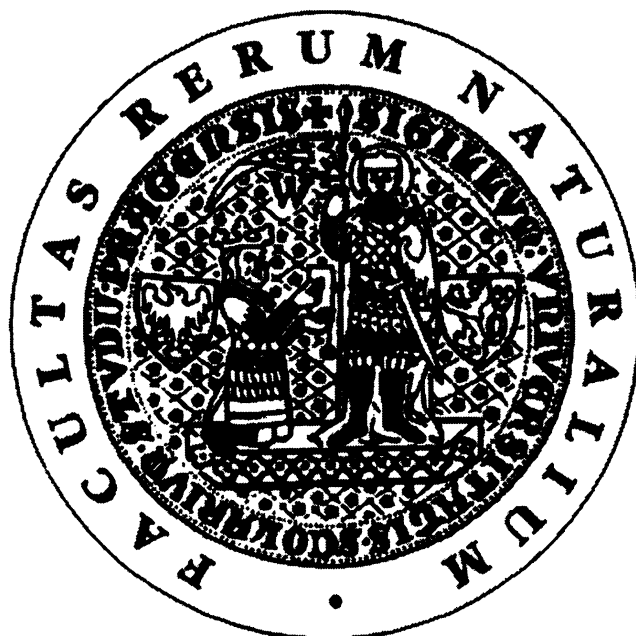


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta



Studium rostlinných β -hexosaminidas

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

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

V Praze dne 6. června 2006

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Ryšlavá', written in a cursive style.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc. za vstřícný přístup, neocenitelné rady a všestrannou pomoc při zpracování této bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat také Mgr. Veronice Doubnerové a Ing. Karlu Müllerovi za vytvoření skvělého pracovního prostředí, obětavou pomoc při provedení experimentální části a pomoc při řešení zdánlivě neřešitelného.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

a	aktivita
bis-akrylamid	N, N-methylen-bis-akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin
DMSO	dimethylsulfoxid
GalNAc	N-acetyl- β ,D-galaktosamin
GlcNAc	N-acetyl- β ,D-glukosamin
β -hexosaminidasa	β -N-acetylhexosaminidasa
K_M	Michaelisova konstanta
naftol-AS BI-GlcNAc	naftol-AS BI -N-acetyl- β ,D-glukosaminid
p-NP	p-nitrofenol
p-NP-GalNAc	p-nitrofenyl-N-acetyl- β ,D-galaktosamin
p-NP-GlcNAc	p-nitrofenyl-N-acetyl- β ,D-glukosamin
p-NP-(GlcNAc) ₂	p-nitrofenyl- β ,D-diacetylchitobiosid
p-NP-(GlcNAc) ₃	p-nitrofenyl- β ,D-triacetylchitotriosid
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin
V_{max}	maximální rychlost enzymové reakce

OBSAH

1. ÚVOD	3
1.1 Přehled literatury	3
1.2 Vlastnosti β -hexosaminidasy.....	4
1.3 Princip stanovení enzymové aktivity.....	5
1.4 Výskyt β -hexosaminidasy v rostlinách	7
1.5 Izolace a purifikace β -hexosaminidasy z rostlinných materiálů	7
1.6 Vlastnosti rostlinných β -hexosaminidas.....	8
1.6.1 Substrátová specifita rostlinných β -hexosaminidas	8
1.6.2 Michaelisovy konstanty a maximální reakční rychlosti pro rostlinné β -hexosaminidasy.....	9
1.6.3 Vliv některých látek na aktivitu rostlinných β -hexosaminidas	11
1.6.4 Vliv teploty a pH na aktivitu β -hexosaminidasy.....	12
1.7 Struktura molekuly β -hexosaminidasy.....	13
1.8 Funkce β -hexosaminidasy v rostlinách	14
2. CÍL PRÁCE	16
3. MATERIÁL A METODY	17
3.1 Použité přístroje.....	17
3.2 Použité chemikálie.....	17
3.3 Metody a pracovní postupy	18
3.3.1 Příprava emulzinu z mandlí.....	18
3.3.2 Měření aktivity glykosidas v emulzinu	18
3.3.3 Časový průběh štěpení p-NP-GlcNAc β -hexosaminidasou	19
3.3.4 Stanovení optimálního pH pro β -hexosaminidasu	19
3.3.5 Vliv pH na stabilitu β -hexosaminidasy	20
3.3.6 Stanovení Michaelisovy konstanty.....	20
3.3.7 Vliv GlcNAc a GalNAc na rychlost reakce katalyzované β -hexosaminidasou	21
3.3.8 Separace β -hexosaminidasy elektroforézou za nativních podmínek.....	21

3.3.9 Separace bílkovin emulzinu elektroforézou v denaturujícím prostředí.....	22
3.3.10 Stanovení obsahu bílkovin	22
4. VÝSLEDKY	23
4.1 Příprava emulzinu z mandlí.....	23
4.2 Stanovení obsahu bílkovin	23
4.3 Separace bílkovin emulzinu elektroforézou v denaturujícím prostředí.....	24
4.4 Zastoupení glykosidas v emulzinu	24
4.5 Časový průběh štěpení p-NP-GlcNAc β -hexosaminidasou	25
4.6 Stanovení optimálního pH pro β -hexosaminidasu	26
4.7 Vliv pH na stabilitu β -hexosaminidasu	27
4.8 Stanovení Michaelisovy konstanty.....	28
4.9 Vliv GlcNAc a GalNAc na rychlost reakce katalyzované β -hexosaminidasou	30
4.10 Separace β -hexosaminidasu elektroforézou za nativních podmínek.....	35
5. DISKUZE.....	36
6. SOUHRN.....	38
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39

1. ÚVOD

1.1 Přehled literatury

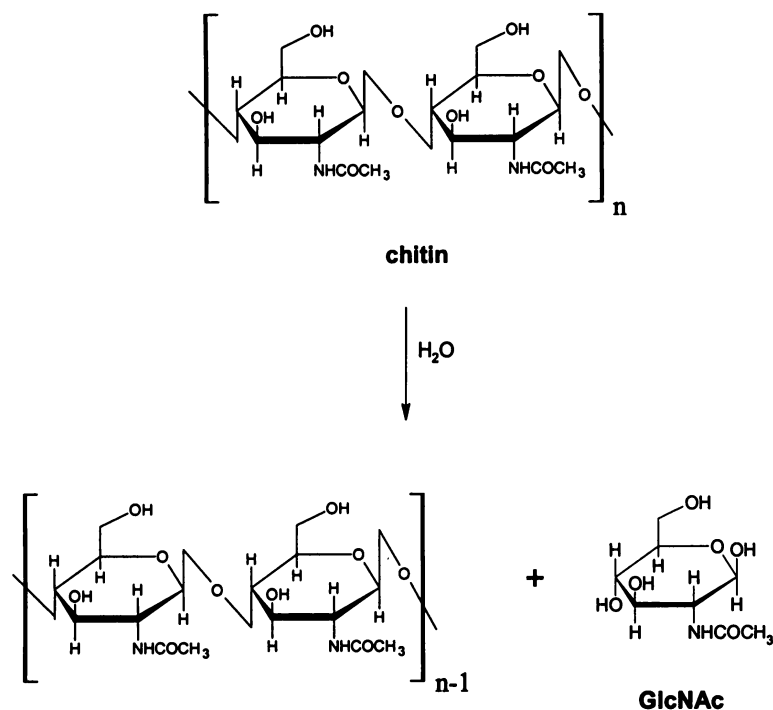
1. Barber, M. S.; Pride, J. P.: *Plant Sci.* 60, 163-172 (1989).
2. Jin, Y. L.; Jo, Y. Y.; Kim, K. Y.; Shim J. H.; Kim, Y. W.; Park, R. D.: *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 313-319 (2002).
3. Harley, S. M.; Beevers, L.: *Plant Physiol.* 85, 1118-1122 (1987).
4. Jagadeesh, B. H.; Prabha, T. N.: *Phytochemistry* 61, 295-300 (2002).

1.2 Vlastnosti β -hexosaminidasy

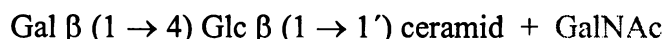
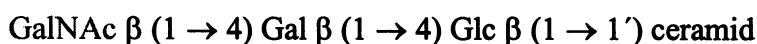
β -hexosaminidasa (N-acetyl- β ,D-hexosaminid-N-acetylhexosamino hydrolasa, EC 3.2.1.52) je enzym, který se vyskytuje v mikroorganismech, rostlinách i živočiších. Patří do skupiny hydrolas a je schopen katalyzovat odštěpení koncového neredukujícího N-acetylglukosaminu, resp. N-acetylgalaktosaminu z glykoproteinu, glykolipidu (obr. 2, str. 5) či polysacharidu. Je rovněž schopen katalyzovat štěpení chitinových oligomerů (obr. 1).

Přestože β -hexosaminidasa katalyzuje ve všech organismech stejnou reakci, může se lišit v afinitě k substrátům, struktuře, molekulové hmotnosti, optimálním pH a dalších vlastnostech.

Nejvíce prozkoumány zatím byly β -hexosaminidasy bakteriální a živočišné. V posledních letech se objevily práce popisující izolační postupy a vlastnosti β -hexosaminidasy z vyšších rostlin [8]. Tyto práce by mohly přispět ke konečnému objasnění funkce tohoto enzymu v rostlinách.



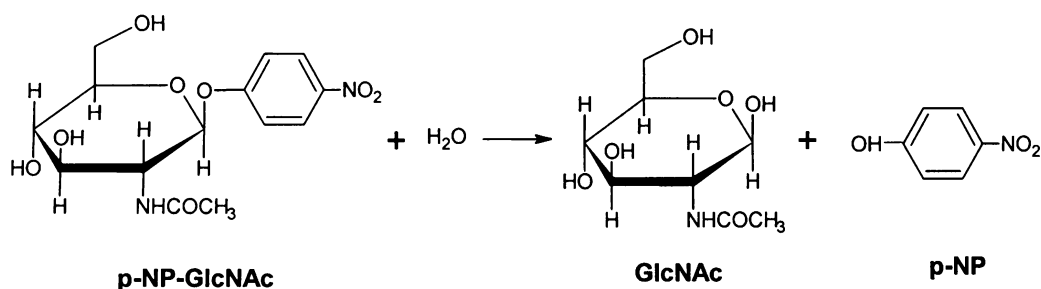
Obr. 1: Štěpení chitinu β -hexosaminidasou



Obr. 2: Štěpení glykolipidu β -hexosaminidasou [29]

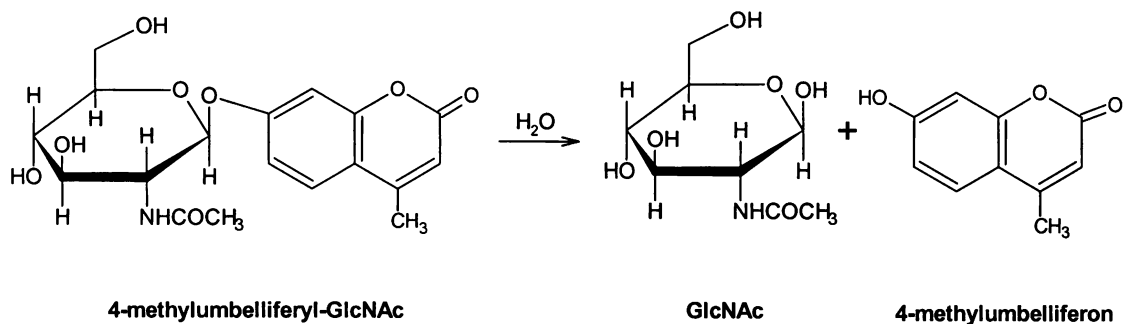
1.3 Princip stanovení enzymové aktivity

Pro stanovení aktivity β -hexosaminidasy se používají uměle připravené substráty. Nejčastěji používány jsou p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc. Přeměnu těchto substrátů lze snadno sledovat, protože β -hexosaminidasa katalyzuje štěpení glykosidické vazby za vzniku GlcNAc, resp. GalNAc a p-NP, který vytváří v alkalickém prostředí žluté zbarvení (obr. 3). Množství uvolněného p-NP lze stanovit spektrofotometricky, měřením absorbance při absorpčním maximu p-NP (405 nm). Aktivita β -hexosaminidasy je pak úměrná množství uvolněného p-NP.



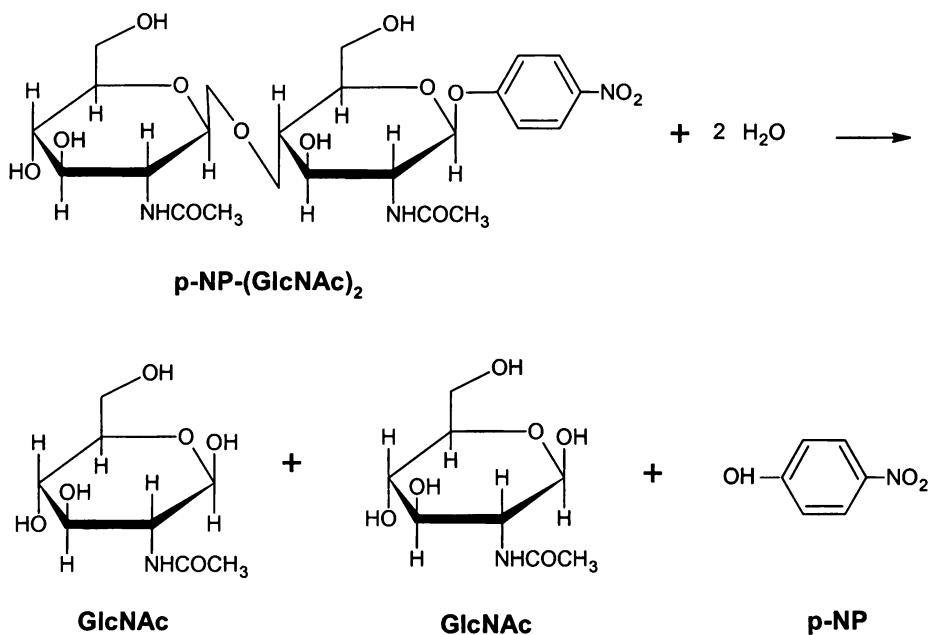
Obr. 3: Štěpení p-NP-GlcNAc β -hexosaminidasou

4-methylumbelliferyl-GlcNAc a 4-methylumbelliferyl-GalNAc jsou další uměle připravené substráty používané ke stanovení enzymové aktivity. Princip reakce je podobný jako pro p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc – hydrolytickým štěpením glykosidické vazby vzniká 4-methylumbelliferon, který má v alkalickém prostředí fluorescenční vlastnosti (obr. 4, str. 6).



Obr. 4: Štěpení 4-methylumbelliferyl-GlcNAc β -hexosaminidasou

Další umělý substrát, který je využíván při sledování schopnosti β -hexosaminidasy štěpit chitooligosacharidy, je p-NP-(GlcNAc)₂, popř. p-NP-(GlcNAc)₃. Oba substráty fungují na stejném principu jako předešlé p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc (obr. 5).



Obr. 5: Štěpení p-NP- β ,D-chitobiosidu β -hexosaminidasou

Hydrolyzu chitinu nebo chitinových oligosacharidů β -hexosaminidasou lze sledovat i dalšími způsoby bez použití uměle připravených substrátů. Nejčastěji se reakční směs se substrátem (chitin nebo chitinový oligomer) inkubuje a poté se obsah uvolněných chitinových oligomerů a GlcNAc stanoví kolorimetricky [1], [2].

Dnes již méně používanou metodou je způsob, kdy se v pravidelných časových intervalech během inkubace i po ní odebírala část reakční směsi, která se aplikovala na

gelový sloupec. Gelovou filtrací se uvolněné GlcNAc a (GlcNAc)₂ velmi dobře oddělily od dalších chitinových oligosacharidů a jímaný eluát byl analyzován na obsah redukujících sacharidů metodou Park-Johnson (1949) [3].

Jiným způsobem je nanesení části reakční směsi na tenkou vrstvu gelu (chromatografie na tenké vrstvě). Případné změny ve struktuře sacharidu se zjistí porovnáním vypočítaných retardačních faktorů se známými hodnotami [4].

1.4 Výskyt β -hexosaminidasy v rostlinách

β -hexosaminidasa byla studována v různých stádiích vývoje v různých částech rostlin, a to konkrétně v semenech rostlin (hrách, kukuřice, rýže) [5], [6], [2], listech (pšenice, zelí, salát) [1], [7], [8], plodech (rajče, paprika) [9], [8] a kořenech (paprika) [8].

Aktivita β -hexosaminidasy je v jednotlivých částech rostliny různá.

1.5 Izolace a purifikace β -hexosaminidasy z rostlinných materiálů

Izolace enzymu z rostlinného materiálu je několikastupňový proces, kterým lze získat velmi čistý enzymový preparát. V této části jsou uvedeny některé hlavní kroky, které byly při izolacích z rostlinných materiálů použity.

Materiál určený pro izolaci (semena, listy, plody, atd.) je vždy nejdříve důkladně homogenizován a poté extrahován v pufru o vhodném složení a pH. Dále se používají precipitační metody, nejčastěji precipitace síranem amonným (NH₄)₂SO₄ [1] - [5], [7], [8], [11] - [14] nebo alkoholy [1], [3].

Postupem další purifikace je kombinace po sobě následujících chromatografií. Obvykle se jako první provádí gelová filtrace [1] - [3], [5], [6], [13], [14] následovaná iontově výměnnou chromatografií [1] - [4], [8], [9], [11], [14]. Nejúčinnější pro purifikaci enzymu je afinitní chromatografie, zde je ale problémem vhodný afinitní nosič pro β -hexosaminidasu. Většina postupů uvádí Concanavalin A-Sepharose [1], [5], [11] - [13], což ovšem není nosič specifický pouze pro β -hexosaminidasu, ale pro většinu glykosidas, tudíž neoddelíme β -hexosaminidasu ze směsi glykosidas. Další použité nosiče jsou např. p-aminofenyl-N-acetyl- β -D-thioglukosaminid na Affigelu 200 [5] nebo GlcNAc na

Sepharose [14]. Afinitní nosiče nejsou běžně v nabídce chemických společností, je nutné je nejdříve syntetizovat a poté vhodně navázat na stacionární fázi.

1.6 Vlastnosti rostlinných β -hexosaminidas

Mezi studované vlastnosti enzymu patří:

- substrátová specifita enzymu
- hodnota Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti reakce pro různé substráty
- vliv některých látek na aktivitu enzymu
- vliv teploty a pH na aktivitu enzymu

1.6.1 Substrátová specifita rostlinných β -hexosaminidas

Vedle umělých substrátů používaných pro sledování aktivity má β -hexosaminidasa ve svém přirozeném prostředí přirozené substráty, kterými jsou např. polysacharidy, glykoproteiny a glykolipidy. Schopnost β -hexosaminidasy hydrolyzovat chitin nebyla dosud ve všech sledovaných rostlinách potvrzena a objasnění této funkce by mohlo napomoci k objasnění funkce β -hexosaminidasy v rostlinách.

V následující tabulce (tab. 1, str. 10) je uvedena schopnost jednotlivých β -hexosaminidas hydrolyzovat umělé i přirozené substráty. Ve všech případech je enzym schopen hydrolyzovat umělé substráty p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc (pouze u β -hexosaminidasy z fazole Mungo a sladového ječmene nebyla schopnost hydrolyzovat p-NP-GalNAc zkoumána). Co se týče chitinu, je hydrolyzován pouze některými β -hexosaminidasami, spíše jsou lépe hydrolyzovány chito oligosacharidy. Hydrolyza chitinu je časově i enzymově náročnější než hydrolyza umělých jednoduchých substrátů [1].

V tomto ohledu je výjimečná β -hexosaminidasa z kukuřice, protože lépe hydrolyzuje chito oligomery než umělé substráty [6].

1.6.2 Michaelisovy konstanty a maximální reakční rychlosti pro rostlinné β -hexosaminidasy

Michaelisova konstanta charakterizuje afinitu enzymu k substrátu a je rovna hodnotě koncentrace substrátu při polovině maximální rychlosti enzymové reakce. Čím je konstanta nižší, tím má substrát vyšší afinitu vůči enzymu.

Tabulka 2 (str. 11) uvádí hodnoty K_M a V_{max} pro substráty p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc. Údaje jsou doplněny informacemi o optimálním pH, při kterém byla daná reakce prováděna.

Z uvedených hodnot vyplývá, že při reakci se substrátem p-NP-GlcNAc je maximální rychlost vyšší než se substrátem p-NP-GalNAc. Situace ovšem není jednoznačná pro K_M . Ve více než polovině případů je ale K_M pro p-NP-GlcNAc nižší než pro p-NP-GalNAc.

Tabulka 1: Substrátová specifita rostlinných β -hexosaminidas

ZDROJ β -HEXOSAMINIDASY	SUBSTRÁT		
	p-NP-GlcNAc	p-NP-GalNAc	chitooligosacharidy, chitin
Pšenice - listy (<i>Triticum aestivum</i> L.) [1]	+	+	Má nízkou aktivitu k chitinovým oligomerům. Při hydrolýze (GlcNAc) _n vzniká přednostně (GlcNAc) _{n-1} a GlcNAc.
Paprika - plod (<i>Capsicum annuum</i>) [8]	+	+	/
Jablka "Golden delicious"- plod (<i>Malus domestica</i>) [6]	+	+	/
Kukuřice - sazenice (<i>Zea mays</i>) [6]	+	+	Má 15 krát vyšší aktivitu pro p-NP-(GlcNAc) ₂ než pro p-NP-GlcNAc nebo p-NP-GalNAc. Při hydrolýze (GlcNAc) _n vzniká přednostně (GlcNAc) _{n-1} a GlcNAc.
Rýže - semena (<i>Oryza sativa</i>) [2]	+	+	-
Fazol obecný - semena (<i>Phaseolus vulgaris</i>) [16]	+	+	/
Zelí – listy (<i>Brassica oleracea</i>) [7]	+	+	chitooligosacharidy + chitin -
Lupinus luteus - semena (<i>Lupinus luteus</i> L.) [4]	+	+	-
Kanaválie - semena (<i>Canavalia ensiformis</i>) [3]	+	+	chitooligosacharidy + chitin -
Fikus (<i>Ficus glabrata</i>) [12]	+	+	/
Pískavice - semena (<i>Trigonella foenum graecum</i>) [13]	+	+	chitobiosid +
Hrách - semena (<i>Pisum sativum</i> L.) [5]	+	+	/
Fazole Mungo - semena (<i>Vigna radiata</i>) [17]	+	/	/
Bavlna - semena (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) [10]	+	+	chitin +
Sladový ječmen (<i>Hordeum vulgare</i>) [14]	+	/	/
Třešeň srdcovka - semena (<i>Prunus serotina</i>) [18]	+	+	/

Pozn.: β -hexosaminidasa štěpí daný substrát (+), neštěpí daný substrát (-), aktivita k tomuto substrátu nebyla sledována (/).

Tabulka 2: Michaelisovy konstanty (K_M), maximální reakční rychlosti (V_{max}) a optimální pH (pH opt) pro rostlinné β -hexosaminidasy

ZDROJ β -HEXOSAMINIDASY	p-NP-GlcNAc			p-NP-GalNAc		
	K_M [mM]	v_{max}	pH opt	K_M [mM]	v_{max}	pH opt
Pšenice - listy (<i>Triticum aestivum</i> L.) [1]	0,29	154 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	5,2	0,27	150 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	4,4
Paprika - plod (<i>Capsicum annuum</i>) [8]	3,0-1,75	/	4,6 - 5,0	Obě izoformy přeměňují, ale s nižší aktivitou (33,5 %).		
Jablka "Golden delicious"- plod (<i>Malus domestica</i>) [11]	0,23	0,008 $\mu\text{mol}/\text{min}$	/	1,49	0,011 $\mu\text{mol}/\text{min}$	/
Rýže - semena (<i>Oryza sativa</i>) [2]	1,65	0,08 $\mu\text{mol}/\text{min}$	5,0	0,17	0,007 $\mu\text{mol}/\text{min}$	4,0
Lupinus luteus - semena (<i>Lupinus luteus</i> L.) [4]	0,94	2,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	/	0,51	1,92 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	/
Kanaválie - semena (<i>Canavalia ensiformis</i>) [3]	0,64	137,2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	5,0 - 6,0	0,31	70,9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	3,5 - 4,5
Pískavice - semena (<i>Trigonella foenum graecum</i>) [13]	0,04 - 0,4	0,144 – 19,4 $\mu\text{mol}/\text{min}$	4,8 - 6,0	0,09 - 0,6	0,09 – 2,9 $\mu\text{mol}/\text{min}$	4,4 - 5,5
Hrách - semena (<i>Pisum sativum</i> L.) [5]	0,49-0,76	/	4,5	0,27-1,71	/	4,5
Bavlna - semena (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) [10]	0,625	$228 \cdot 10^6$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	5,6	2,5	$178 \cdot 10^6$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	5,0
Sladový ječmen (<i>Hordeum vulgare</i>) [14]	0,25	/	5,0	/	/	/
Třešeň srdcovka - semena (<i>Prunus serotina</i>) [18]	0,49	/	4,5	0,63	/	4,0
Fazol obecný - semena (<i>Phaseolus vulgaris</i>) [16]	0,47	7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	4,6	/	/	/

Pozn.: Pokud je uvedeno rozmezí hodnot, např. $K_M = 3 - 1,75$ mM, pak se enzym vyskytuje v několika izoformách a hodnoty daných charakteristik se pohybují v uvedeném rozmezí. Symbolem / jsou označeny charakteristiky, které nebyly sledovány.

1.6.3 Vliv některých látek na aktivitu rostlinných β -hexosaminidas

Aktivita většiny rostlinných β -hexosaminidas je inhibována přítomností iontů Ag, Hg, Cu [1] - [3], [5], [6], [8], [10], [13]. Pouze β -hexosaminidasa z třešně není inhibována žádným z uvedených iontů kovů [18].

Dále inhibiči β -hexosaminidasy způsobuje acetát, acetamid, iodoacetát (listy pšenice, semena kanaválie, fikus) [1], [3], [12], chloramin T (semena rýže) [2]. Naopak β -hexosaminidasu ze semen třešně iodoacetát neinhibuje, rychlost reakce snižuje přítomnost fenantrolinu a dipyridylu [18].

Na aktivitu β -hexosaminidasy mají negativní vliv i laktony, např. 2-acetamido-2-deoxyglukonolakton (listy pšenice) [1], 2-acetamido-2-deoxy-D-galaktono-1,4-lakton (semena *Lupinus luteus*) [4], N-acetylglukosamino-1,5-lakton (semena kanaválie) [3].

Jako inhibitory β -hexosaminidasy se projeví i GlcNAc a GalNAc v těchto rostlinách: semena bavlny [10], fikus [12], semena kanaválie [3], jablko (plod) [11] a listy pšenice [1]. β -hexosaminidasa ze semen *Lupinus luteus* byla inhibována thiofenyl-N-acetyl- β -D-glukosaminidem, derivátem GlcNAc [4]. U jiných rostlinných extraktů nebyl vliv GlcNAc a GalNAc na aktivitu β -hexosaminidasy sledován.

Co se týče aktivace rostlinných β -hexosaminidas pomocí některých látek, byl zjištěn nárůst aktivity β -hexosaminidasy II pouze u semen hrachu za přítomnosti iontů Mg a Mn [5]. Také přítomnost Fe^{3+} iontů pozitivně ovlivňuje aktivitu β -hexosaminidasy I ze semen pískavice [13]. V jiných případech aktivace pomocí chemických sloučenin zjištěna nebyla.

1.6.4 Vliv teploty a pH na aktivitu β -hexosaminidasy

Některé rostlinné β -hexosaminidasy mají své teplotní optimum až kolem 50 °C, což je teplota, při které už může dojít k denaturaci bílkovin. Např. β -hexosaminidasa ze semen kanaválie [3], z listů zelí [7], z papriky (plodu) [8], semen rýže [2] a kukuřice [6] má teplotní optimum v rozmezí 50 – 60 °C. Při teplotě vyšší než laboratorní byla sledována aktivita β -hexosaminidasy i z dalších zdrojů: semena bavlny 37 °C [10], sladový ječmen 30 °C [15], semena hrachu 30 °C [5], semena *Lupinus luteus* 37 °C [4].

Pro dosažení maximální aktivity β -hexosaminidasy je třeba určit optimální pH pro danou reakci (tab. 2, str. 11). U rostlinných β -hexosaminidas je to vždy kyselá oblast, v rozmezí hodnot 4 – 5. β -hexosaminidasa z kanaválie má optimální pH 3,5; tedy ještě nižší [3].

1.7 Struktura molekuly β -hexosaminidasy

Struktura jednotlivých rostlinných β -hexosaminidas se liší. Všechny rostlinné β -hexosaminidasy (podobně jako enzym živočišný, bakteriální i z hub) obsahuje jedno aktivní místo pro konjugáty p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc [1] - [4], [11], [12], [18].

β -hexosaminidasa se vyskytuje ve formě monomeru v listech salátu (M_r 65 kDa) [8], v semenech *Lupinus luteus* (M_r cca 69 kDa) [4], v sazenicích kukuřice (M_r 70 kDa) [6], v semenech sladového ječmene (M_r 92 kDa) [14], v semenech kanaválie (M_r 100 kDa) [3], v semenech skočce obecného (M_r 120 kDa) [5], v semenech bavlny (M_r 125 kDa) [10].

Ve formě homodimeru se β -hexosaminidasa vyskytuje v semenech fazolu obecného. Homodimer se skládá ze dvou podjednotek o molekulové hmotnosti 53 kDa, celý enzym má molekulovou hmotnost 112 kDa [16]. Jablko (plod) obsahuje β -hexosaminidasu ve formě oktameru, složenou z 8 stejných podjednotek o molekulové hmotnosti 29 kDa. Celý oktamer má molekulovou hmotnost 235 kDa. β -hexosaminidasa z listů zelí je trimer složený ze tří různých podjednotek o molekulových hmotnostech 64; 57 a 51 kDa. Celý trimer má molekulovou hmotnost 150 kDa [7]. Žádná z rostlin dosud uvedených v této kapitole neobsahuje izoformy β -hexosaminidasy.

V listech pšenice je β -hexosaminidasa obsažena ve formě pěti izoenzymů, jejichž molekulová hmotnost nebyla stanovena. Všechny ochotně hydrolyzují p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc a některé i chitin [1].

V listech pšenice byly pozdější studií nalezeny dvě formy β -hexosaminidasy (A a B), které mají molekulovou hmotnost 167 ± 23 kDa [19].

Izoenzymy obsahuje i plod papriky, a to tři (I, II, III). Molekulová hmotnost 85 kDa byla stanovena pro formu II, která má monomerní strukturu [8].

Nejpřekvapivější zjištění poskytla β -hexosaminidasa ze semen rýže, protože se v nich vyskytuje sedm izoenzymů (F1 až F7). Dál purifikována a sledována byla pouze forma F6, která má molekulovou hmotnost stanovenou pomocí elektroforézy 52 kDa a 37,4 kDa stanovenou gelovou chromatografií [2].

Čtyři izoformy obsahují semena pískavice (I, II, III, IV), přičemž formy I a II byly izolovány z dělohy, formy III a IV ze zárodku. Molekulové hmotnosti jsou 84 kDa pro formu I, 72 kDa pro formu II, 180 kDa pro formu III a 150 kDa pro formu IV. SDS elektroforézou jednotlivých izoform byla zjištěna přítomnost podjednotek o

molekulových hmotnostech 28; 24; 30,5; resp. 30 kDa pro izoformy I; II; III; resp. IV. Z toho vyplývá, že každá izoforma je pravděpodobně složena ze tří až šesti identických podjednotek. Veškeré molekulové hmotnosti izoforem pískavice jsou stanoveny s přesností ± 10 kDa [13].

Semena hrachu obsahují také čtyři izoformy (I, II, III, IV), všechny byly izolovány z dělohy a každá má molekulovou hmotnost 210 kDa. Forma II se skládá ze dvou párů heterogenních podjednotek 62 a 64 kDa [5].

Z výše uvedeného vyplývá, že struktura rostlinných β -hexosaminidas je rozmanitá. Přesto lze říci, že molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 50 – 200 kDa, výskyt izoforem není vyloučen a molekula enzymu se může skládat z několika podjednotek.

1.8 Funkce β -hexosaminidas v rostlinách

Role β -hexosaminidas v rostlinách není dosud zcela objasněna. Bakteriální a živočišné β -hexosaminidas se uplatňují při přenosu signálu, buněčném dělení [8], obraně bakterie před napadením jiným kmenem – buněčná stěna je složena z peptidoglykanů, které může β -hexosaminidasa společně s chitinasami štěpit, a tak zničit patogenní kmen [20]. Odštěpený GlcNAc či GalNAc může být také bakterií využit jako zdroj dusíku [21].

β -hexosaminidasa je i u rostlin, podobně jako u bakterií, spojována s obrannou funkcí ve spolupráci s chitinasami [1]. Z výzkumů ale vyplývá, že ne všechny rostlinné β -hexosaminidas mají schopnost degradovat chitin, proto obranná funkce není potvrzena.

V posledních letech se objevily práce popisující nárůst aktivity β -hexosaminidas během vývoje a dozrávání plodu rajčete a papriky. Tento nárůst je pravděpodobně spojen se štěpením glykoproteinů, které se tohoto procesu účastní a vznikem volných N-glykanů [8], [9]. Během dozrávání byl také zaznamenán výskyt několika nových izoforem β -hexosaminidas [8].

Podobná tendence byla zaznamenána i u klíčících semen bavlny [10], *Lupinus luteus* [4] a kukuřice [6]. Předpoklad, že β -hexosaminidasa v semenu štěpí hlavně oligosacharidové části rezervních glykoproteinů nebyl potvrzen (*Lupinus luteus*) [4], nebyla nalezena žádná přímá souvislost mezi enzymem a rezervními glykoproteiny. Vysoká aktivita β -hexosaminidas byla zjištěna i ve tkáních, které neobsahují žádné rezervní proteiny [2].

Kromě fyziologického významu jsou rostlinné β -hexosaminidasy efektivním nástrojem pro výzkum sacharidových částí glykoproteinů a glykolipidů [2].

2. CÍL PRÁCE

- 1) Literární přehled přítomnosti β -hexosaminidasy v rostlinách
- 2) Příprava emulzinu z mandlí
- 3) Stanovení kinetických parametrů β -hexosaminidasy z mandlí

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Použité přístroje

analytické váhy 100 A – Denver Instrument Company, USA

pH metr Ultrabasic UB 10 – Denver Instrument Company, USA

spektrometr Ultrospec 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech, Anglie

elektroforetická souprava Whatman – Biometra, Německo

centrifuga Univerzal 32 R – Hettich, Německo

3.2 Použité chemikálie

akrylamid (Sigma, USA)

bis-akrylamid (Sigma, USA)

Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma, USA)

Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma, USA)

Fast Blue B (Lachema, ČR)

Fast Blue BB (Lachema, ČR)

Fast Red Violet LB (Sigma, USA)

N-acetyl- β ,D-galaktosamin (Sigma, USA)

N-acetyl- β ,D-glukosamin (Sigma, USA)

β -N-acetylhexosaminidasa ze semen kanaválie (Sigma, USA)

naftol-AS BI-N-acetyl- β ,D-glukosaminid (Sigma, USA)

persíran amonný (Sigma, USA)

p-NP- α ,D-galaktopyranosid (Sigma, USA)

p-NP- β ,D-galaktopyranosid (Sigma, USA)

p-NP-N-acetyl- β ,D-galaktosamin (Sigma, USA)

p-NP-N-acetyl- β ,D-glukosamin (Sigma, USA)

p-NP- α ,D-glukopyranosid (Sigma, USA)

p-NP- β ,D-glukopyranosid (Sigma, USA)

p-NP- α ,D-mannopyranosid (Sigma, USA)

SDS (Sigma, USA)

standard pro určení molekulových hmotností při SDS elektroforéze (Sigma, USA)

TEMED (Serva, Německo)

ostatní chemikálie (Lachema, ČR)

Pufry

0,1 M citrátový pufr (pH 4,0; 4,1 a 4,6)

0,1 M borátový pufr (pH 9)

0,1 M McIlvaneův pufr (pH 2,8 až 7,8)

3.3 Metody a pracovní postupy

3.3.1 Příprava emulzinu z mandlí

Emulzin jsem z mandlí připravila následujícím postupem [23]: 800 g jemně rozemletých mandlí jsem extrahovala toluenem pro zbavení tuku po dobu několika dnů. Vzniklou suspenzi jsem zfiltrovala a nechala sušit při laboratorní teplotě. 275 g vysušených mandlí jsem smíchala s 1240 ml 1,1 % (m/m) roztoku $ZnSO_4$. Tento roztok jsem ponechala stát při teplotě 5 °C po dobu asi 24 hodin. Takto vzniklou suspenzi jsem filtrovala přes gázu a důkladně vymáčkala. Z filtrátu jsem vysrážela frakci přidávkem 138 ml 0,3 % (m/m) roztoku taninu, vzniklou sraženinu jsem oddělila centrifugací 15 min při 2210 g. V supernatantu jsem vysrážela směs glykosidas (emulzin) pozvolným přidáváním 138 ml 2,9 % (m/m) roztoku taninu. Vzniklou sraženinu jsem opět oddělila 15 min centrifugací při 2210 g a následně třikrát promyla na fritě asi 200 ml acetonu. Promytou sraženinu jsem nechala sušit v eksikátoru nad koncentrovanou kyselinou sírovou dva dny. Suchý emulzin jsem rozetřela a uchovávala při teplotě 4 °C.

3.3.2 Měření aktivity glykosidas v emulzinu

V připraveném emulzinu jsem stanovila aktivitu β -hexosaminidasy, α -mannosidasy, α -galaktosidasy, β -galaktosidasy, α -glukosidasy a β -glukosidasy. Jako substráty jsem použila p-NP-GlcNAc pro β -hexosaminidasu, p-NP- α ,D-mannopyranosid pro α -mannosidasu, p-NP- α ,D-galaktopyranosid pro α -galaktosidasu, p-NP- β ,D-

galaktopyranosid pro β -galaktosidasu, p-NP- α ,D-glukopyranosid pro α -glukosidasu a p-NP- β ,D-glukopyranosid pro β -glukosidasu. Reakční směs obsahovala 50 μ l 0,1 M citrátového pufru o pH 4,1; 50 μ l 2 mM substrátu pro příslušný enzym a 100 μ l roztoku enzymu [27]. Tento roztok jsem připravila rozpuštěním 1 mg emulzinu v 1 ml destilované vody a oddělením pevných částí. Reakce jsem prováděla při laboratorní teplotě. Reakce jsem zastavila po 10 min přidávkem 800 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Množství uvolněného p-NP jsem určila měřením absorbance při 405 nm proti slepému vzorku. Koncentraci p-NP jsem vypočítala z Lambert-Beerova zákona [28].

3.3.3 Časový průběh štěpení p-NP-GlcNAc β -hexosaminidasou

Zjišťovala jsem množství uvolněného produktu (p-NP) vzniklého za dobu 5 až 30 min při reakci katalyzované β -hexosaminidasou.

Reakční směs obsahovala 50 μ l 0,1 M citrátového pufru o pH 4,1; 50 μ l 2 mM p-NP-GlcNAc a 100 μ l roztoku enzymu [27]. Tento roztok jsem připravila rozpuštěním 1 mg emulzinu v 1 ml destilované vody a oddělením pevných částí. Reakce, probíhající za laboratorní teploty, jsem zastavila postupně po 5, 10, 15, 20, 25 a 30 min přidávkem 800 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Množství uvolněného p-NP jsem určila měřením absorbance při 405 nm proti slepému vzorku. Koncentraci p-NP jsem vypočítala z Lambert-Beerova zákona [28].

3.3.4 Stanovení optimálního pH pro β -hexosaminidasu

Připravila jsem dvanáct roztoků 0,05 M McIlvaneova pufru v rozmezí pH 2,80 až 7,81. Tyto pufrы jsem postupně použila k přípravě reakčních směsí. Reakční směs tedy obsahovala 50 μ l 0,05 M McIlvaneova pufru o daném pH; 50 μ l 2mM p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc a 100 μ l roztoku enzymu [27]. Tento roztok jsem připravila rozpuštěním 1 mg emulzinu v 1 ml destilované vody a oddělením pevných částí. Reakce, probíhající za laboratorní teploty, jsem zastavila po 10 min 800 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Množství uvolněného p-NP jsem určila měřením absorbance při 405 nm proti slepému vzorku. Koncentraci p-NP jsem vypočítala z Lambert-Beerova zákona [28].

Rychlost reakce jsem vyjádřila jako látkové množství uvolněného p-NP za 1 min na 1 mg emulzinu.

3.3.5 Vliv pH na stabilitu β -hexosaminidasy

100 μ l roztoku enzymu připraveného z 10 mg emulzinu na 1 ml destilované vody jsem smíchala s 1,5 ml 0,05 M McIlvaineova pufru o daném pH. Tímto způsobem jsem vytvořila 12 zásobních roztoků enzymového extraktu, přičemž v každém je enzym uchovávan v pufru o jiném pH v rozmezí 2,8 až 7,81. Tyto zásobní roztoky enzymového extraktu jsem uchovávala při teplotě 4 °C a sledovala jsem v nich aktivitu enzymu. Reakční směs obsahovala 50 μ l 2 mM p-NP-GlcNAc; 50 μ l 0,1 M citrátového pufru o pH 4,6 a 100 μ l zásobního roztoku enzymového extraktu [27]. Reakce, probíhající za laboratorní teploty, jsem zastavila po 10 min přidavkem 800 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Množství uvolněného p-NP jsem určila pomocí absorbance při 405 nm proti slepému vzorku. Koncentraci p-NP jsem vypočítala z Lambert-Beerova zákona [28]. Rychlost reakce jsem vyjádřila jako látkové množství uvolněného p-NP za 1 min na 1 mg emulzinu.

3.3.6 Stanovení Michaelisovy konstanty

Sledovala jsem množství uvolněného p-NP při různých koncentracích substrátu. Reakční směs tedy obsahovala p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc o koncentracích 0 až 0,87 mM; 50 μ l 0,1 M citrátového pufru o pH 4,6; resp. 4,0 a 100 μ l roztoku enzymu. Reakční směsi jsem doplnila destilovanou vodou tak, aby celkový objem byl 200 μ l. Roztok enzymu jsem připravila rozpuštěním 1 mg emulzinu v 1 ml destilované vody a oddělením pevných částí. Reakce, probíhající za laboratorní teploty, jsem zastavila po 10 min přidavkem 800 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Množství uvolněného p-NP jsem určila měřením absorbance při 405 nm proti slepému vzorku. Koncentraci p-NP jsem vypočítala z Lambert-Beerova zákona [28]. Rychlost reakce jsem vyjádřila jako látkové množství uvolněného p-NP za 1 min na 1 mg emulzinu.

Michaelisovu konstantu a maximální rychlost reakce jsem určila pomocí nelineární regrese podle rovnice Michaelise a Mentenové.

3.3.7 Vliv GlcNAc a GalNAc na rychlost reakce katalyzované β -hexosaminidasou

Zjišťovala jsem vliv 5 a 10 mM GlcNAc a 1 a 5 mM GalNAc na rychlost reakce katalyzované β -hexosaminidasou. Připravila jsem tedy několik řad reakčních směsí. První obsahovala p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc o koncentracích 0 až 1 mM, 50 μ l 0,1 M citrátového pufru o pH 4,6; resp. 4,0; 50 μ l roztoku enzymu a destilovanou vodu tak, aby objem reakční směsi byl 200 μ l [27]. Druhá, třetí a čtvrtá řada se lišily tím, že obsahovaly 50 μ l 1 nebo 5 nebo 10 mM GlcNAc, resp. GalNAc. Roztok enzymu jsem připravila rozpuštěním 2 mg emulzinu v 1 ml destilované vody a oddělením pevných částí. Reakce jsem zastavila po 10 min přidávkem 800 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Množství uvolněného p-NP jsem určila měřením absorbance při 405 nm proti slepému vzorku. Koncentraci p-NP jsem vypočítala z Lambert-Beerova zákona [28]. Rychlost reakce jsem vyjádřila jako látkové množství uvolněného p-NP za 1 min na 1 mg emulzinu.

3.3.8 Separace β -hexosaminidasy elektroforézou za nativních podmínek

Nativní elektroforézu jsem provedla v polyakrylamidovém gelu metodou podle Lee a Lee [24]. Použila jsem 3 % zaostřovací gel obsahující destilovanou vodu; akrylamid; Tris-HCl; glycerol; TEMED a persíran amonný. Separační gel jsem použila 6 %, který obsahuje destilovanou vodu; akrylamid; Tris-HCl; glycerol; TEMED a persíran amonný.

Roztok enzymu jsem připravila rozpuštěním 60 mg emulzinu v 1 ml destilované vody a centrifugovala jsem jej 15 min při 16 600 g. Sediment jsem oddělila a k supernatantu jsem přidala 0,1 g sacharózy. Do každé jamky jsem dávkovala 25 μ l extraktu, což odpovídá 0,23 mg bílkovin v každé jamce (viz. kap. 3.3.10 Stanovení bílkovin, str. 22).

Elektroforéza probíhala při počátečním napětí 70 V, po dosažení separačního gelu jsem zvýšila napětí na 140 V.

Po skončení elektroforézy jsem gel inkubovala v 20 ml citrátového pufru o pH 4,60 při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Poté jsem do lázně přidala 1 ml 8 mM substrátu naftol-AS BI-GlcNAc v dimethylsulfoxidu. Po dalších 10 min jsem části gelu barvila Fast Blue B, Fast Blue BB a část Fast Red Violet LB. Dávkovala jsem vždy 20 mg barviva na

20 ml citrátového pufru. Po několika hodinách barvení jsem gel odbarvovala přes noc v lázni 7 % CH_3COOH .

3.3.9 Separace bílkovin emulzinu elektroforézou v denaturujícím prostředí

Elektroforézu v denaturujícím prostředí SDS jsem provedla v polyakrylamidovém gelu metodou podle Laemmliho [25]. Použila jsem stejný postup jako při nativní elektroforéze (kap. 3.3.8) s tím, že zaostřovací i separační gely obsahovaly SDS místo glycerolu.

Enzymový extrakt jsem připravila rozpuštěním 2,5 mg emulzinu v 50 μl destilované vody a 50 μl vzorkového pufru. Do jamky jsem pipetovala 25 μl .

Vzniklý gel jsem barvila několik hodin v barvicím roztoku složeném z Coomassie Brilliant Blue R 250, G 250, ethanolu, methanolu, CH_3COOH a redestilované vody. Poté jsem obarvený gel odbarvovala přes noc v odbarvovacím roztoku složeném z vody, ethanolu a CH_3COOH .

3.3.10 Stanovení obsahu bílkovin

Stanovení obsahu bílkovin v emulzinu jsem provedla metodou podle Bradfordové [26]. Ke 33,3 μl enzymového extraktu jsem přidala 1 ml Bradfordova činidla a nechala 20 min volně reagovat. Po 20 min jsem změřila absorbanci při 595 nm proti slepému vzorku. Koncentraci bílkovin jsem odečetla z kalibrační křivky pro sérový hovězí albumin 0 až 1,4 mg/ml.

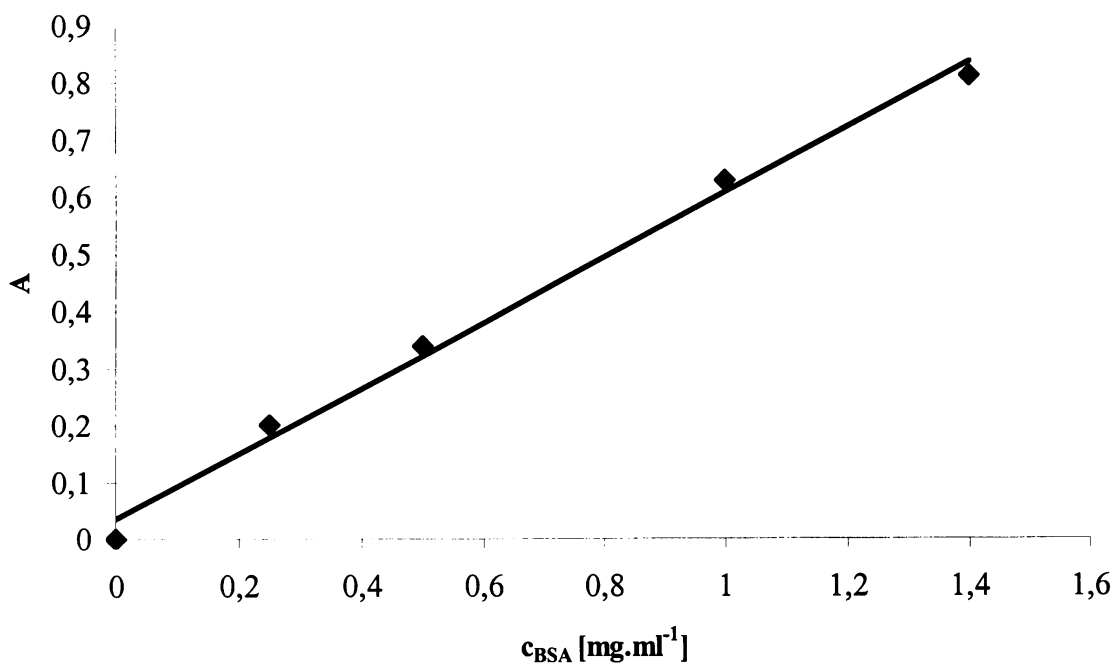
4. VÝSLEDKY

4.1 Příprava emulzinu z mandlí

Postupem uvedeným v kap. 3.3.1 (str. 18) jsem z 800 g rozemletých mandlí získala 275 g odtučněných mandlí. Z odtučněných mandlí jsem připravila 4,43 g emulzinu ve formě světle béžového jemného prášku. Rozetřený emulzin jsem uchovávala v uzavřené skleněné lahvičce v lednici.

4.2 Stanovení obsahu bílkovin

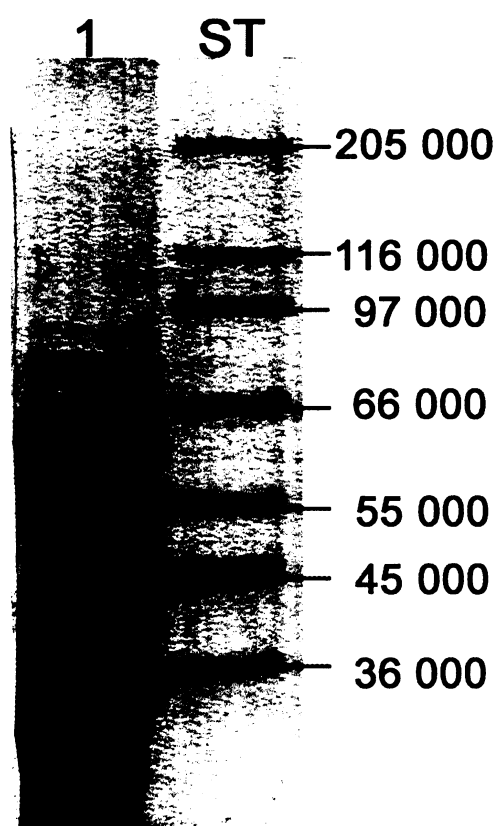
Stanovení bílkovin v emulzinu jsem provedla metodou podle Bradfordové (kap. 3.3.10, str. 22). Z kalibrační křivky pro hovězí sérový albumin (obr. 6) jsem odečetla koncentraci bílkovin v emulzinu. Zjistila jsem, že 60 mg emulzinu obsahuje 9,2 mg bílkovin, což odpovídá 15 % bílkovin v emulzinu.



Obr. 6: Kalibrační graf pro stanovení bílkovin dle Bradfordové (standard BSA)

4.3 Separace bílkovin emulzinu elektroforézou v denaturujícím prostředí

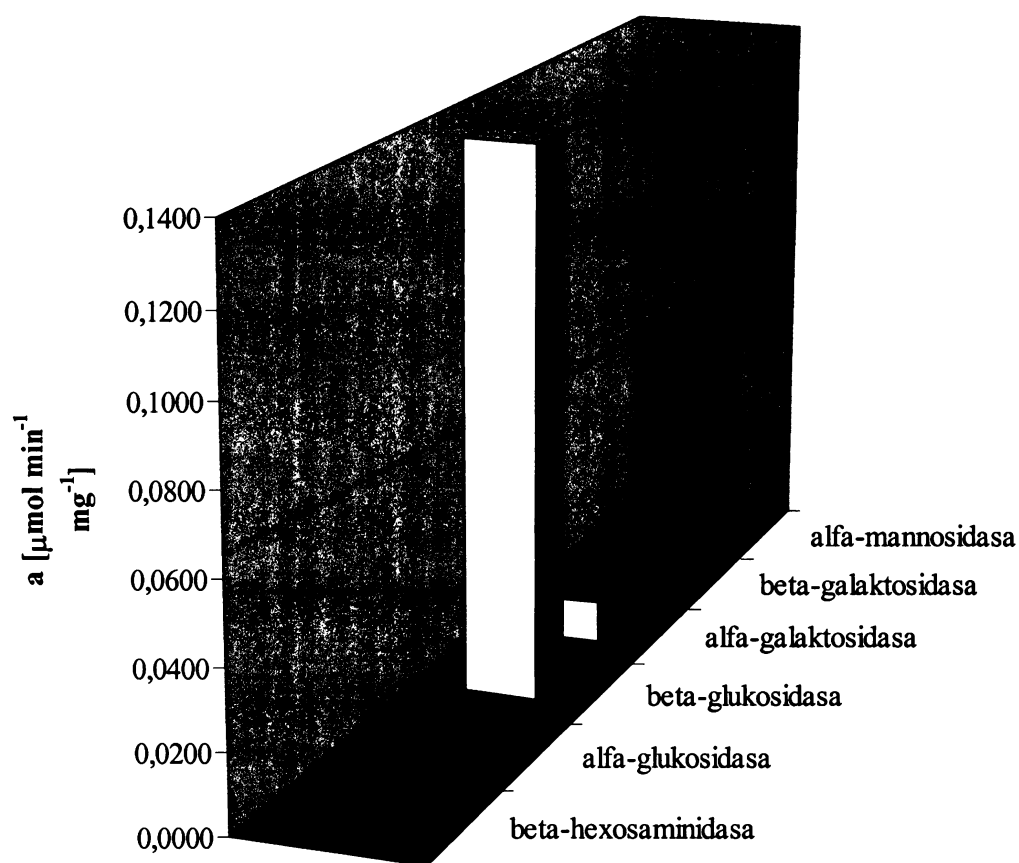
Po elektroforéze v denaturujícím prostředí SDS jsem na gelu obarvila proteiny pomocí Coomassie Brilliant Blue. Na obr. 7 je vidět, že připravený emulzin obsahuje majoritně zastoupený protein o molekulové hmotnosti asi 60 000 a řadu menších proteinů. Jsou přítomny i proteiny o vyšší molekulové hmotnosti než majoritní protein.



Obr. 7: Separace bílkovin emulzinu elektroforézou v denaturujícím prostředí SDS: emulzin (1), standard molekulových hmotností (ST).

4.4 Zastoupení glykosidas v emulzinu

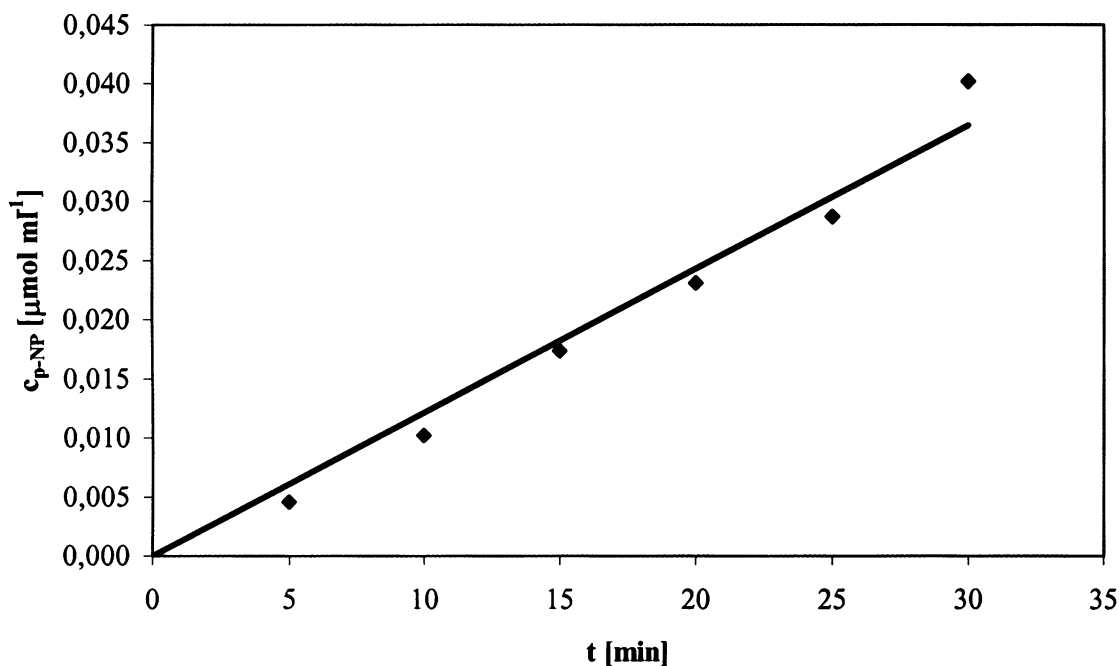
V připraveném emulzinu jsem zjišťovala aktivitu glykosidas postupem uvedeným v kap. 3.3.2 (str. 18). Z naměřených hodnot vyplývá, že největší zastoupení v emulzinu má β -glukosidasa, druhou nejvíce zastoupenou je α -mannosidasa (obr. 8, str. 25). Vzhledem ke β -glukosidase (100 %) je aktivita α -mannosidasy 35 %; α -galaktosidasy 7,5 %; β -galaktosidasy 7,1 %; β -hexosaminidasy 5,5 % a α -glukosidasy 1,8 %.



Obr. 8: Zastoupení jednotlivých glykosidas v emulzinu

4.5 Časový průběh štěpení p-NP-GlcNAc β -hexosaminidasou

V další části práce jsem se věnovala charakterizaci β -hexosaminidasy. Sledovala jsem časový průběh štěpení p-NP-GlcNAc katalyzovaný β -hexosaminidasou (obr. 9, str. 26). Z uvedeného grafu vyplývá, že množství uvolněného produktu, měřené v pětiminutových intervalech po dobu 30 min, lineárně vzrůstá s časem. Pro další měření lze tedy použít jakoukoliv reakční dobu z daného intervalu.



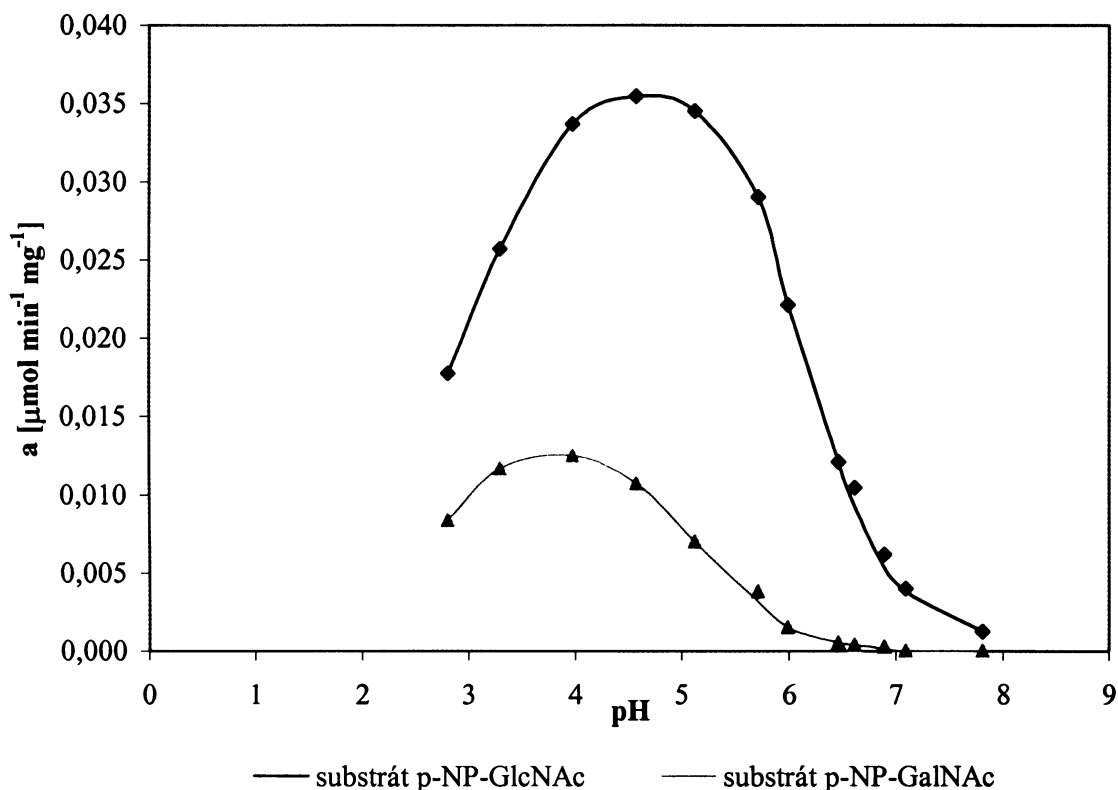
Obr. 9: Časový průběh štěpení p-NP-GlcNAc β -hexosaminidasou

4.6 Stanovení optimálního pH pro β -hexosaminidasu

Zkoumala jsem vliv pH reakční směsi na aktivitu β -hexosaminidasu s použitím substrátů p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc.

Z obrázku 10 (str. 27) vyplývá, že při použití substrátu p-NP-GlcNAc je aktivita β -hexosaminidasu vysoká v kyselém pH, v rozmezí 3,5 – 5,5. Naopak při pH zásaditějším, a to už při 7,8; se aktivita β -hexosaminidasu blíží nule. Maximální aktivitu jsem naměřila při pH 4,6; a proto jsem toto pH použila i pro další měření.

Při použití substrátu p-NP-GalNAc je situace podobná (obr. 10, str. 27). Aktivita β -hexosaminidasu je vysoká v kyselém prostředí, a to při pH 3,5 až 5. Při neutrálním pH je aktivita nulová, v bazickém prostředí reakce neprobíhá. Maximální aktivitu jsem naměřila při pH 4,0; což je pH, které jsem použila pro další stanovení.

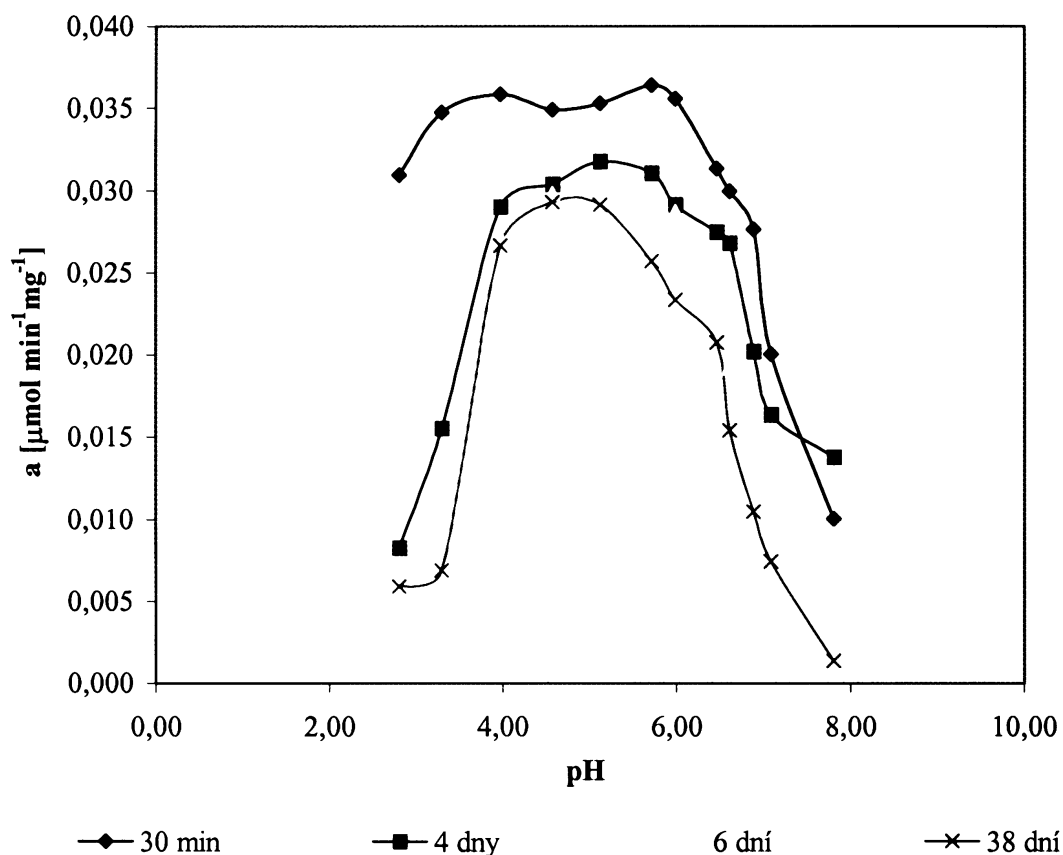


Obr. 10: Stanovení optimálního pH pro hexosaminidasu (substráty p-NP-GlcNAc; p-NP-GalNAc)

4.7 Vliv pH na stabilitu β -hexosaminidasy

Studovala jsem změny v aktivitě β -hexosaminidasy při jejím dlouhodobém uchování v pufrch o různém pH.

Při určování aktivity β -hexosaminidasy jsem používala substrát p-NP-GlcNAc. Z obr. 11 (str. 28) vyplývá, že aktivita β -hexosaminidasy klesá, nejvíc se pokles projeví při pH nižším než 4 a vyšším než 7. Naopak v oblasti pH 4 až 5 je enzym poměrně stabilní, za 38 dnů klesla aktivita o 20 %.

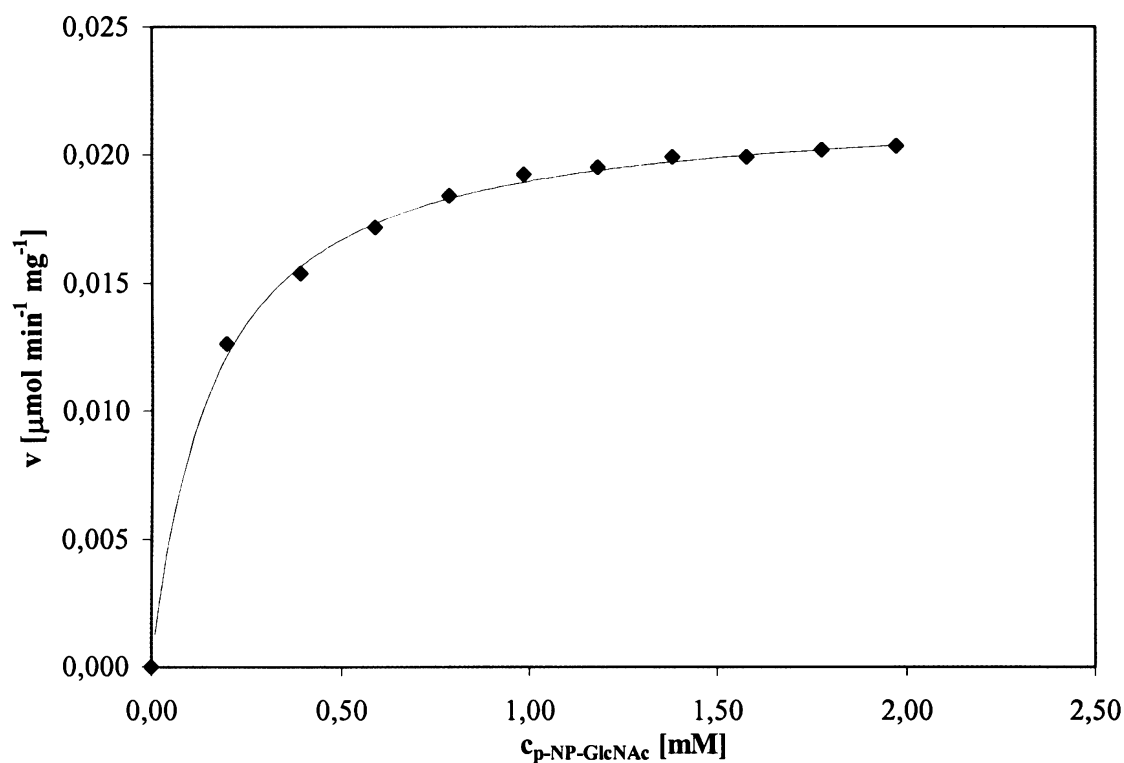


Obr. 11: Vliv pH na stabilitu b-hexosaminidasy

4.8 Stanovení Michaelisovy konstanty

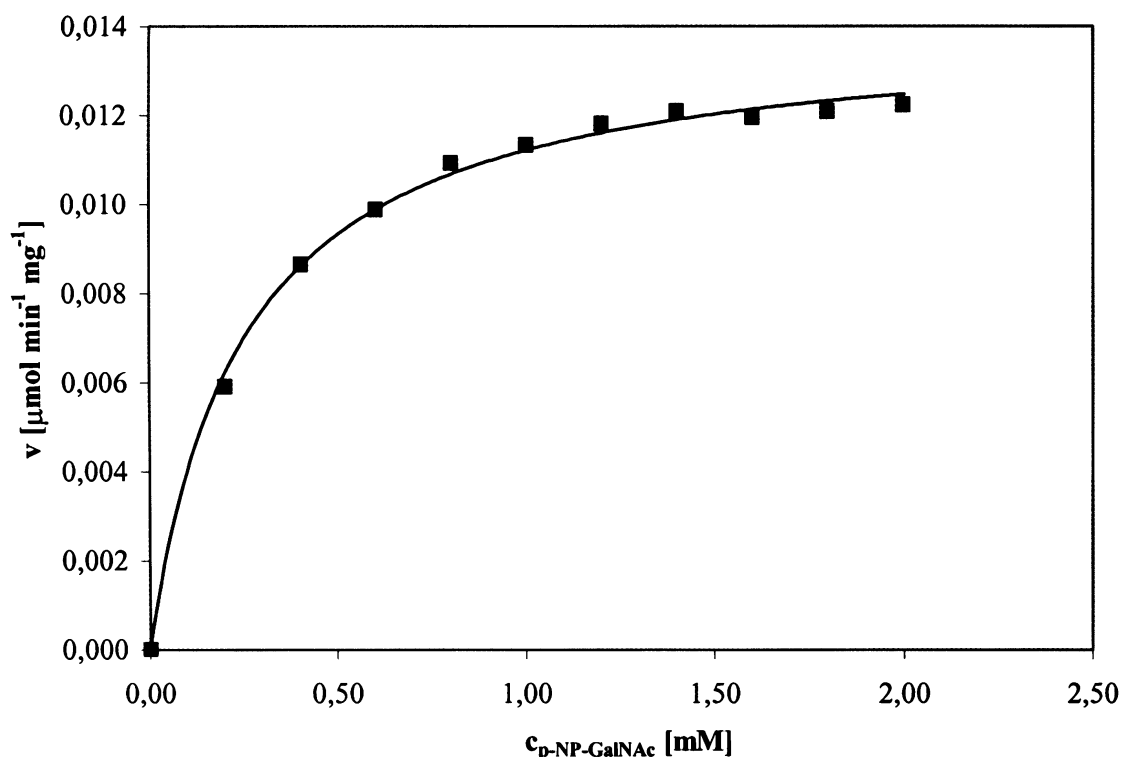
Sledovala jsem závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátů p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc. Z provedeného měření jsem stanovila Michaelisovu konstantu jak pro substrát p-NP-GlcNAc (obr. 12, str. 29), tak pro p-NP-GalNAc (obr. 13, str. 30). Obě stanovení byla provedena při pH optimu pro daný substrát, tj. 4,6 pro p-NP-GlcNAc a 4,0 pro p-NP-GalNAc.

Michaelisova konstanta pro substrát p-NP-GlcNAc má hodnotu $K_M = 0,2$ mM; maximální rychlost reakce je $V_{max} = 0,022$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (vztaženo na hmotnost emulzinu). Maximální rychlost reakce vztažená na hmotnost proteinu má hodnotu $V_{max} = 0,15$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.



Obr. 12: Závislost rychlosti reakce katalyzované β -hexosaminidasou na koncentraci (substrát p-NP-GlcNAc)

Pro substrát p-NP-GalNAc má Michaelisova konstanta hodnotu $K_M = 0,3 \text{ mM}$; tedy vyšší než pro p-NP-GlcNAc. Maximální rychlost reakce je $V_{\text{max}} = 0,014 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (vztaženo na hmotnost emulzinu). Maximální rychlost vztažená na hmotnost proteinu má hodnotu $V_{\text{max}} = 0,09 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.



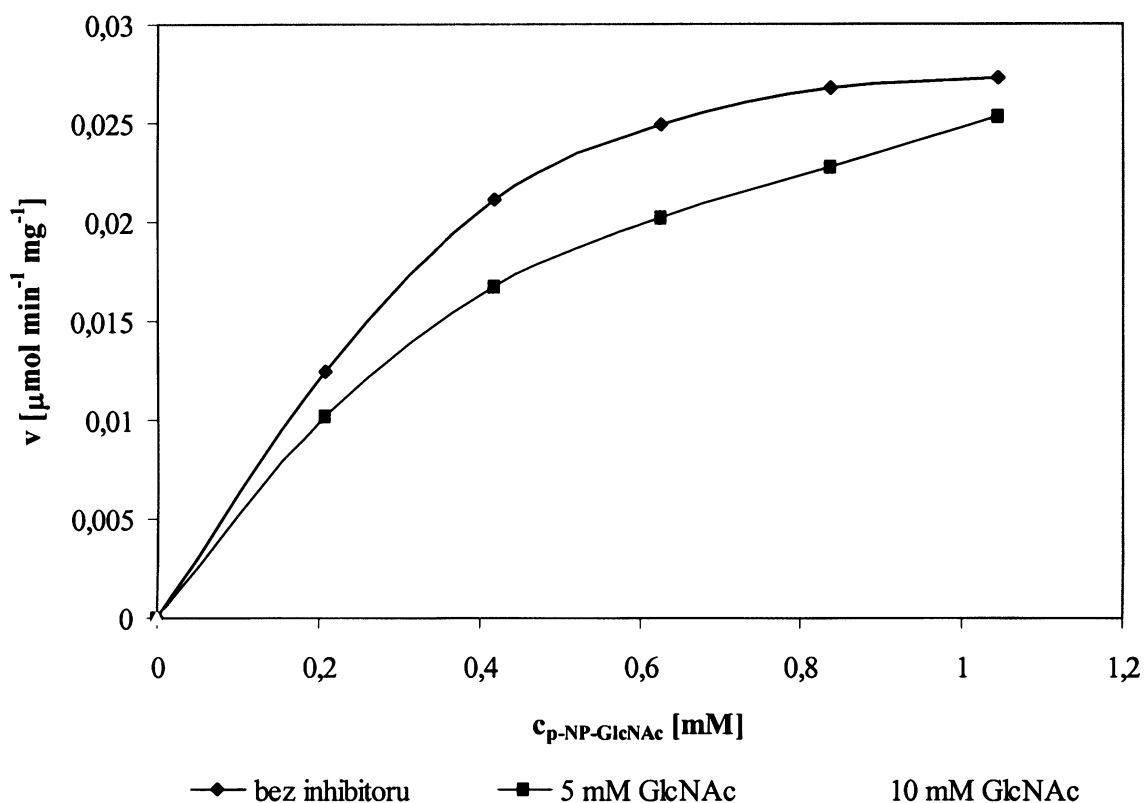
Obr. 13: Závislost rychlosti reakce katalyzované β -hexosaminidasou na koncentraci p-NP-GalNAc)

4.9 Vliv GlcNAc a GalNAc na rychlost reakce katalyzované β -hexosaminidasou

V prvním případě jsem sledovala vliv přítomnosti GlcNAc o různých koncentracích v reakční směsi (obr. 14, str. 31) na rychlost reakce katalyzované β -hexosaminidasou (substrát p-NP-GlcNAc).

Modrá křivka popisuje reakci β -hexosaminidasy bez přítomnosti GlcNAc. Růžová křivka popisuje reakci β -hexosaminidasy za přítomnosti 5 mM GlcNAc. Je zde patrný významný pokles reakční rychlosti oproti případu bez GlcNAc. Žlutá křivka znázorňuje reakci za přítomnosti 10 mM GlcNAc. Zde je patrný ještě významnější pokles rychlosti reakce katalyzované β -hexosaminidasou.

Z měření vyplývá, že β -hexosaminidasa je inhibována GlcNAc, a to tím víc, čím vyšší je jeho koncentrace.

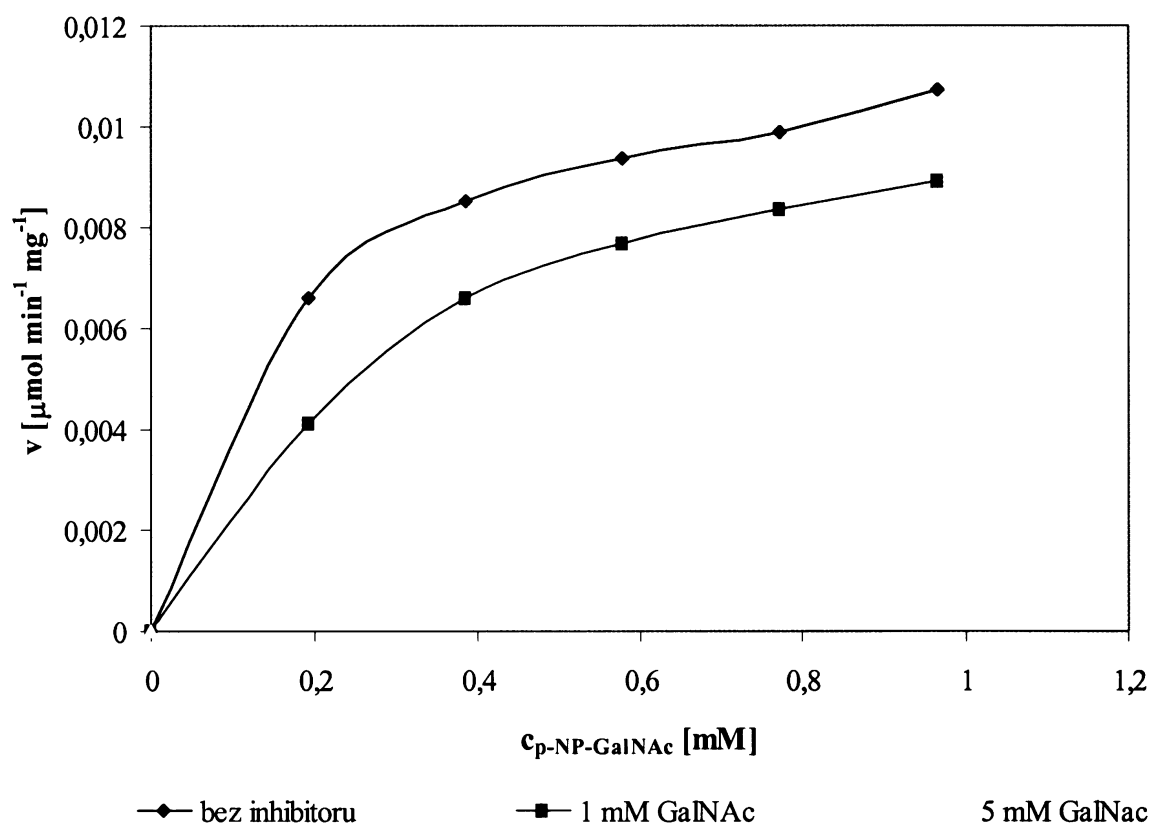


Obr. 14: Vliv GlcNAc na aktivitu β -hexosaminidasy (substrát p-NP-GlcNAc)

Ve druhém případě jsem sledovala vliv přítomnosti GalNAc o různých koncentracích v reakční směsi (obr. 15, str. 32) na aktivitu β -hexosaminidasy (substrát p-NP-GalNAc). Modrá křivka znázorňuje průběh reakce bez přítomnosti GalNAc, růžová křivka znázorňuje průběh reakce za přítomnosti 1 mM GalNAc a žlutá 5 mM GalNAc.

β -hexosaminidasa je inhibována také GalNAc, a to tím víc, čím vyšší je jeho koncentrace v reakční směsi.

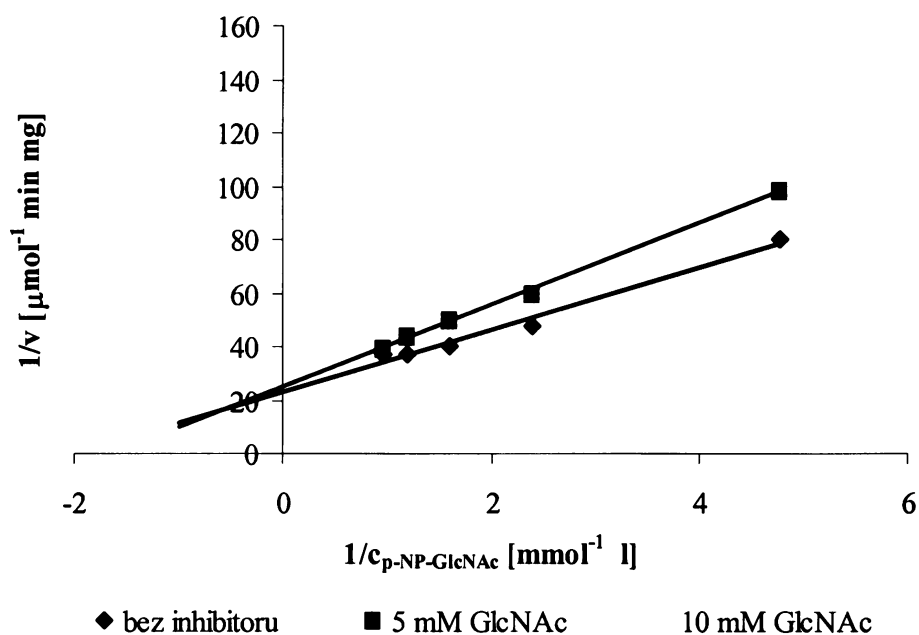
Z provedeného měření vyplývá, že GalNAc je silnějším inhibitorem než GlcNAc.



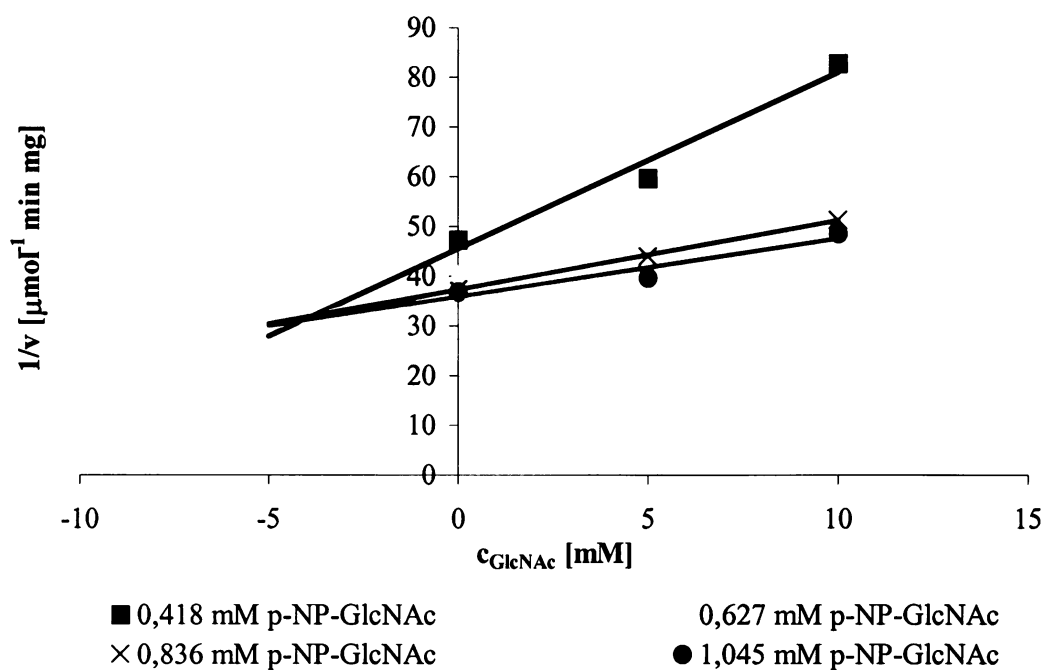
Obr. 15: Vliv GalNAc na aktivitu β -hexosaminidasy (substrát p-NP-GalNAc)

Obr. 16 (str. 33) znázorňuje závislost reciproké rychlosti reakce na reciproké koncentraci substrátu p-NP-GlcNAc, vynesené podle Lineweavera a Burka. Z obrázku vyplývá, že se pravděpodobně jedná o kompetitivní inhibici. Ze závislosti reciproké rychlosti na koncentraci inhibitoru GlcNAc (obr. 17, str. 33), vynesené podle Dixona, lze odečíst inhibiční konstantu, která má hodnotu $K_i = 4 \text{ mM}$.

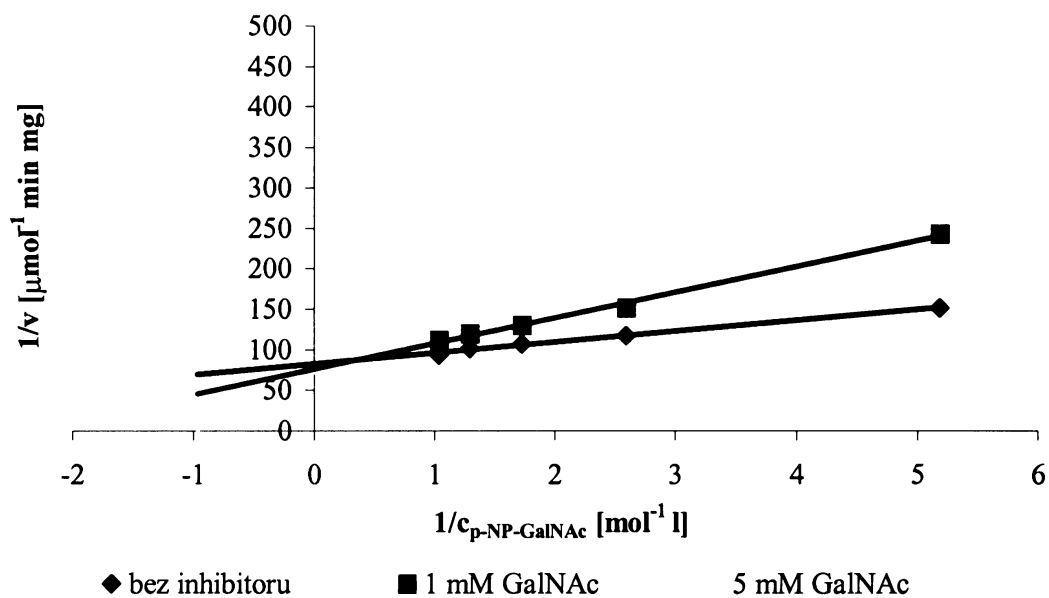
Obr. 18 (str. 34) ukazuje závislost reciproké rychlosti reakce na reciproké koncentraci substrátu p-NP-GalNAc, vynesené podle Lineweavera a Burka. Z průběhu křivek vyplývá, že se jedná o kompetitivní inhibici. Na obr. 19 (str. 34) je závislost reciproké rychlosti na koncentraci inhibitoru GalNAc, vynesená podle Dixona. Inhibiční konstanta, odečtená z tohoto grafu, má hodnotu $K_i = 1,4 \text{ mM}$.



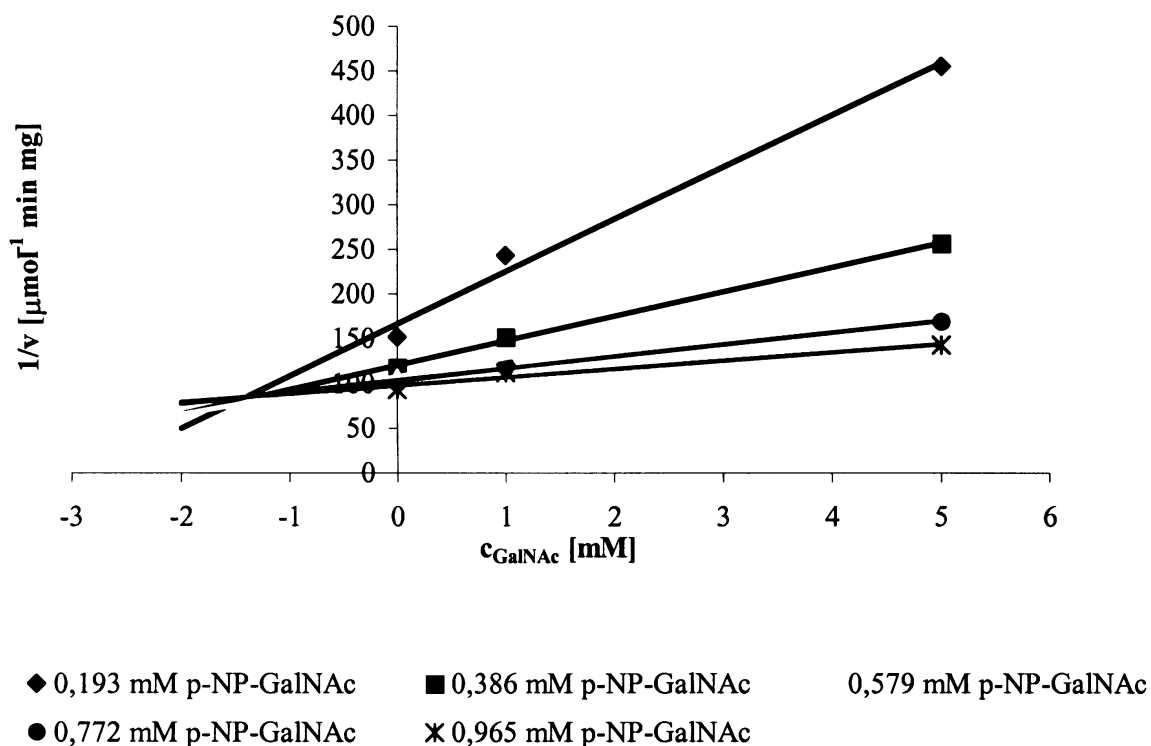
Obr. 16: Vliv GlcNAc na aktivitu β -hexosaminidasy (substrát p-NP-GlcNAc) ve dvojitém reciprokém vynesení



Obr. 17: Vliv GlcNAc na aktivitu β -hexosaminidasy (substrát p-NP-GlcNAc) vynesení podle Dixona



Obr. 18: Vliv GalNAc na aktivitu β -hexosaminidasy (substrát p-NP-GalNAc) ve dvojitém reciprokém vynesení



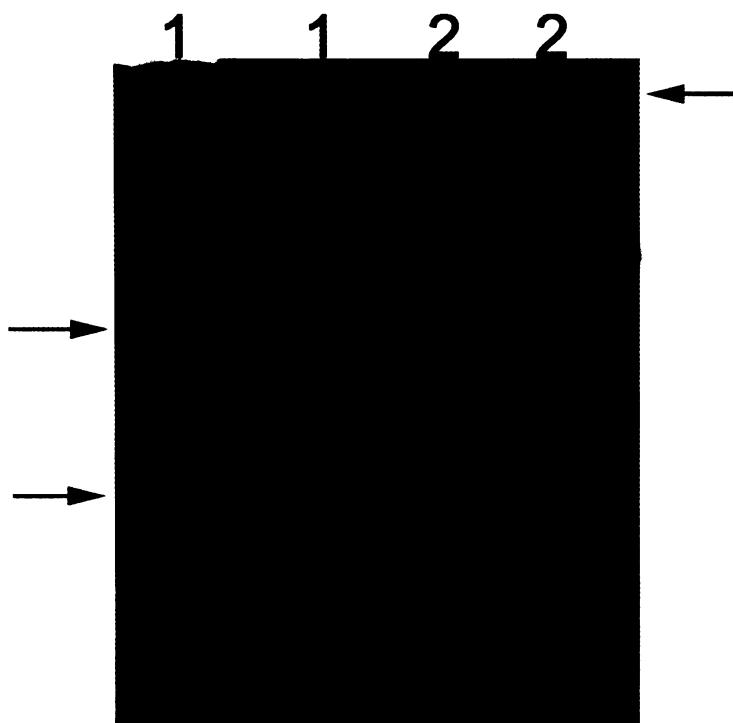
Obr. 19: Vliv GalNAc na aktivitu β -hexosaminidasy (substrát p-NP-GalNAc) vynesení podle Dixona

4.10 Separace β -hexosaminidasy elektroforézou za nativních podmínek

Gel byl po elektroforetické separaci detekován na přítomnost aktivity β -hexosaminidasy. Substrátem byl naftol-AS BI-N-acetyl- β ,D-glukosaminid, který poskytuje nerozpustný produkt reagující s barvivem Fast Red Violet LB za vzniku fialového proužku. Po barvení gelu vznikly ve čtyřech drahách vínové proužky (obr. 20). V prvních dvou drahách (označeny symbolem 1) byla aplikována β -hexosaminidasa ze semen kanaválie (*Canavalia ensiformis*). V každé z těchto drah vznikly dva proužky, což odpovídá tomu, že β -hexosaminidasa je v kanaválii obsažena ve dvou izoformách.

V dalších dvou drahách (označeny symbolem 2) byl aplikován roztok emulzinu (0,23 mg bílkovin v každé dráze). Na začátku každé dráhy byl obarven jeden proužek, což odpovídá jedné formě β -hexosaminidasy v mandlích.

β -hexosaminidasu lze obarvit všemi použitými barvivy Fast Blue B, Fast Blue BB i Fast Red Violet LB, nejlepší výsledky ale poskytuje Fast Red Violet LB.



Obr. 20: Separace β -hexosaminidasy z kanaválie (*Canavalia ensiformis*) (1) a z mandlí (2) elektroforézou za nativních podmínek.

5. DISKUZE

Emulzin připravený z mandlí je směsí glykosidas, v němž je majoritně zastoupena β -glukosidasa. Z ostatních glykosidas je nejvíce zastoupena α -mannosidasa, dále pak α -galaktosidasa, β -galaktosidasa, β -hexosaminidasa a α -glukosidasa (obr. 8, str. 25). Vzhledem k aktivitě β -glukosidasy (100 %) činí aktivita β -hexosaminidasy 5,5 %.

β -hexosaminidasa z mandlí nebyla dosud v dostupné literatuře charakterizována. Je schopna hydrolyzovat substráty p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc. Do společného aktivního centra se pravděpodobně vážou oba substráty, podobně jako v β -hexosaminidasach z jiných zdrojů [1]-[4], [11], [12], [18].

Všechny rostlinné β -hexosaminidasy jsou aktivní v kyselé oblasti pH, nejčastěji v rozmezí 4 – 5. Pro β -hexosaminidasu z mandlí je optimální hodnota pH 4,6 pro hydrolyzu p-NP-GlcNAc, stejně jako pro semena fazolu obecného [16], semena třešně [18], semena hrachu [5] a papriku (plod) [8]. Pro hydrolyzu p-NP-GalNAc je optimální pH 4,0 stejně jako pro semena třešně [18] a semena rýže [2] (tab. 2, str. 11). V alkalické oblasti dochází u všech rostlinných β -hexosaminidas k úplnému zastavení reakce. β -hexosaminidasa z mandlí je stabilní při pH 4 - 5.

Michaelisova konstanta a maximální rychlost reakce má pro β -hexosaminidasu z mandlí hodnotu $K_M = 0,2$ mM a $V_{max} = 0,022$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (vztaženo na hmotnost emulzinu) pro p-NP-GlcNAc (obr. 12, str. 29); resp. $K_M = 0,3$ mM a $V_{max} = 0,014$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (vztaženo na hmotnost emulzinu) pro p-NP-GalNAc (obr. 13, str. 30). Hodnota Michaelisovy konstanty pro p-NP-GlcNAc je nižší a při hydrolyze tohoto substrátu lze dosáhnout vyšší maximální rychlosti. Stejně vlastnosti mají i semena pískavice [13] a semena bavlny [10], podobné pak semena rýže [2], *Lupinus luteus* [4], semena kanaválie [3] a jablka (plody) [11]. Hodnota Michaelisovy konstanty pro p-NP-GlcNAc je téměř stejná jako pro β -hexosaminidasu z jablka ($K_M = 0,23$ mM) [11] a ze sladového ječmene ($K_M = 0,25$ mM) [14]. Michaelisova konstanta pro p-NP-GalNAc je totožná s konstantou pro β -hexosaminidasu z kanaválie ($K_M = 0,31$ mM) [3] a s β -hexosaminidasou IB z hrachu ($K_M = 0,34$ mM) [5] (tab. 2, str. 11).

Maximální rychlost reakce vztažená na hmotnost proteinu je pro substrát p-NP-GlcNAc $V_{max} = 0,15$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, resp. $V_{max} = 0,09$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ pro p-NP-GalNAc. Poměr maximálních rychlostí p-NP-GalNAc a p-NP-GlcNAc je 0,64; což

je poměr obvyklý i u dalších rostlinných β -hexosaminidas, např. pískavice (0,63) [13], *Lupinus luteus* (0,77) [4], kanaválie (0,51) [3].

GlcNAc a GalNAc působí jako inhibitory β -hexosaminidasy z mandlí (obr. 14 a 15; str. 31 a 32) i z dalších rostlin [1], [3], [10]-[12]. V mandlích se v obou případech jedná o kompetitivní inhibici, stejně jako v listech pšenice [1], semena kanaválie [3]. Inhibiční konstanta má hodnotu $K_i = 4$ mM pro hydrolyzu p-NP-GlcNAc inhibovanou GlcNAc (obr. 17, str. 33), pro listy pšenice má tato konstanta hodnotu $K_i = 15$ mM [1]. Pro hydrolyzu p-NP-GalNAc inhibovanou GalNAc je $K_i = 1,4$ mM (obr. 19, str. 34), pro listy pšenice pak $K_i = 2,5$ mM [1]. GalNAc je silnějším inhibitorem β -hexosaminidasy z mandlí, pšenice [1], kanaválie [3]. Jako účinné inhibitory působí i některé laktony [1], [4], [3], což je pravděpodobně způsobeno jejich strukturální podobností s GlcNAc nebo GalNAc.

Aktivace β -hexosaminidasy byla pozorována u jedné z izoform hrachu [5] a semen pískavice [13] pomocí iontů kovů. V jiných případech aktivace zjištěna nebyla.

Elektroforézou v nativním prostředí bylo zjištěno, že β -hexosaminidasa se v mandlích vyskytuje v jedné formě.

Ve srovnání s bakteriálními a živočišnými β -hexosaminidasami není funkce rostlinných zcela prozkoumána a objasněna. Nejdiskutovanější je obranná úloha rostlinných β -hexosaminidas, kdy společně s chitinasami působí proti bakteriálním patogenům. Tato úloha není dosud potvrzena.

Další diskutovanou rolí rostlinné β -hexosaminidasy je její vysoká aktivita během vývoje a dozrávání ovoce, což je pravděpodobně spojeno s nutností degradace glykoproteinů, které jsou zodpovědné za měknutí ovoce [8], [9], [15]. Podobná tendence byla zaznamenána i u klíčících semen bavlny [10], *Lupinus luteus* [4] a kukuřice [6]. Předpoklad, že β -hexosaminidasa v semenu štěpí hlavně oligosacharidové části rezervních glykoproteinů nebyl potvrzen [4].

Funkce rostlinných β -hexosaminidas tedy zůstává prozatím neobjasněna. Vzhledem ke své schopnosti specifického hydrolytického štěpení je ale přínosná při studiu glykoproteinů a glykolipidů [2].

6. SOUHRN

V této práci byl připraven emulzin z mandlí, který obsahuje majoritní podíl β -glukosidasy, druhou nejvíce zastoupenou glykosidasou je α -mannosidasa. β -hexosaminidasa je v emulzinu zastoupena minoritně, vzhledem k aktivitě β -glukosidasy (100 %) je její aktivita 5,5 %.

Pomocí substrátů p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc bylo stanoveno optimální pH pro reakci katalyzovanou β -hexosaminidasou, a to 4,6 pro p-NP-GlcNAc a 4,0 pro p-NP-GalNAc. Enzym je stabilní při pH 4 až 5.

Michaelisova konstanta a maximální reakční rychlost má pro p-NP-GlcNAc hodnotu $K_M = 0,2$ mM a $V_{max} = 0,022$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (vztaženo na hmotnost emulzinu), což odpovídá $V_{max} = 0,15$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (vztaženo na hmotnost proteinu), pro substrát p-NP-GalNAc $K_M = 0,3$ mM a $V_{max} = 0,014$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (vztaženo na hmotnost emulzinu), což odpovídá $V_{max} = 0,09$ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (vztaženo na hmotnost proteinu). Poměr maximálních rychlostí p-NP-GalNAc a p-NP-GlcNAc je 0,64.

GlcNAc a GalNAc působí jako inhibitory β -hexosaminidasy z mandlí i z dalších rostlin. Inhibiční konstanta má hodnotu $K_i = 4$ mM pro hydrolýzu p-NP-GlcNAc inhibovanou GlcNAc, resp. $K_i = 1,4$ mM pro hydrolýzu p-NP-GalNAc inhibovanou GalNAc. Významnější inhibiční efekt byl zjištěn u GalNAc.

Elektroforézou v nativním prostředí bylo zjištěno, že β -hexosaminidasa je v mandlích obsažena v jedné formě.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Barber, M. S.; Pride, J. P.: *Plant Sci.* **60**, 163-172 (1989).
2. Jin, Y. L.; Jo, Y. Y.; Kim, K. Y.; Shim J. H.; Kim, Y. W.; Park, R. D.: *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 313-319 (2002).
3. Li, S. C.; Li, Y. T.: *J. Biol. Chem.* **245**, 5135-5160 (1970).
4. Pócsi, I.; Kiss, L.; Nánási, P.: *Biochim. Biophys. Acta* **1039**, 110-118 (1990).
5. Harley, S. M.; Beevers, L.: *Plant Physiol.* **85**, 1118-1122 (1987).
6. Oikawa, A.; Itoh, E.; Ishihara, A.; Iwamura, H.: *J. Plant Physiol.* **160**, 991-999 (2003).
7. Chang, C. T.; Young, F. P.; Chang, M. H.; Sung, H. Y.: *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**, 371-380 (1998).
8. Jagadeesh, B. H.; Prabha, T. N.: *Phytochemistry* **61**, 295-300 (2002).
9. Jagadeesh, B. H.; Prabha, T. N.; Srinivasan, K.: *Plant Sci.* **166**, 1451-1459 (2004).
10. Yi, C. K.: *Plant Physiol.* **67**, 68-73 (1981).
11. Choi, S. Y.; Gross, K. C.: *Phytochemistry* **36**, 1-6 (2001).
12. Orlacchio, A.; Maffei, C.; Emiliani, C.; Reinosa, J. A.: *Phytochemistry* **24**, 659-662 (1985).
13. Bouquelet, S.; Spik, G.: *Eur. J. Biochem.* **84**, 551-559 (1978).
14. Mitchell, E. D.; Houston, C. W.; Latimer, S. B.: *Phytochemistry* **15**, 1869-1871 (1976).
15. Jagadeesh, B. H.; Prabha, T. N.; Srinivasan, K.: *Plant Sci.* **166**, 1451-1459 (2004).
16. Bahl, O. P.; Agrawal, K. M. L.: *J. Biol. Chem.* **243**, 98-102 (1968).
17. Dey, P. M.: *Phytochemistry* **23**, 257-260 (1984).
18. Poulton, J. E.; Thomas, M. A.; Ottwell, K. K.; Mc Cormick, S. J.: *Plant Sci.* **42**, 107-114 (1985).
19. Jordan, N. D.; Barber, M. S.: *Plant Sci.* **107**, 41-48 (1995).
20. Nanjo, F.; Katsumi, R.; Sakai, K.: *J. Biol. Chem.* **265**, 10088-10094 (1990).
21. Geimba, M. P.; Riffel, A.; Brandelli, A.: *J. Appl. Microbiol.* **85**, 708-715 (1998).
22. Pócsi, I.; Kiss, L.; Nánási, P.: *Biochim. Biophys. Acta* **1039**, 119-122 (1990).
23. Barthová, J.; Sofrová, D.; Tichá, M.: *Základní praktikum z biochemie, skriptum* PřF UK Praha, str. 163-164 (1984).
24. Lee, D. H.; Lee, C. B.: *Plant Sci.* **159**, 75-85 (2000).
25. Laemmli, U. K.: *Nature* **227**, 680 – 685 (1990).

26. Bradford, M. M: Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976).
27. Skočdopol, P.: Studium β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra analytické chemie (2004).
28. He, S.; Withers, S. G.: J. Biol. Chem. 272, 24864-24867 (1997).
29. Voet, V; Voet, J. G.: Biochemistry (3rd edition), John Wiley and Sons, Hoboken, USA, str. 977-978 (2004).

