

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Optimalizace proteinového sekvenátoru a sekvenování vybraných glykosidas

Bakalářská práce KATA

Školitel:
Prof. RNDr. Karel Bezouška CSc.

Alena Petříčková

Praha 2007

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Karla Bezoušky CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne.....29. 07.....

.....*Alena Petráková*.....

podpis

Poděkování

Práce byla podporována výzkumným záměrem MŠMT ČR MSM 21620808 a Grantovou Agenturou České Republiky (granty číslo 203/04/1045 a 203/05/0172).

Moje poděkování patří především Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi CSc., mému školiteli, za jeho cenné rady a vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům a přátelům, kteří se mnou měli trpělivost, a podporovali mě při sepisování této práce.

1. Obsah

Prohlášení	2
Poděkování	3
1. Obsah	4
2. Použité zkratky a symboly	5
3. Úvod	6
3.1. Sekvence proteinů na principu Edmanova odbourávání	6
3.2. Konstrukce proteinového sekvenátoru	8
3.3. Příprava vzorku	9
3.3.1. Příprava vzorku na filtru ze skleněných vláken	9
3.3.2. Příprava vzorku na PVDF membráně	10
4. Cíle práce	11
5. Materiály a metody	12
5.1. Použité materiály a chemikálie	12
5.2. Použité přístroje	12
5.3. Použité metody	12
5.3.1. Optimalizace sekvenátoru na β -laktoglobulinovém standardu	12
5.3.2. Stanovení N-terminální sekvence α -N-acetylgalaktosaminidasy	14
5.3.3. Stanovení interních sekvencí hexosaminidasy z <i>Penicillium oxalicum</i> ..	14
6. Výsledky	16
6.1. Optimalizace přístroje	16
6.2. Stanovení N-terminální sekvence α -N-acetylgalaktosaminidasy	19
6.3. Stanovení interních sekvencí hexosaminidasy	22
7. Diskuze	24
8. Použitá literatura	26

2. Použité zkratky a symboly

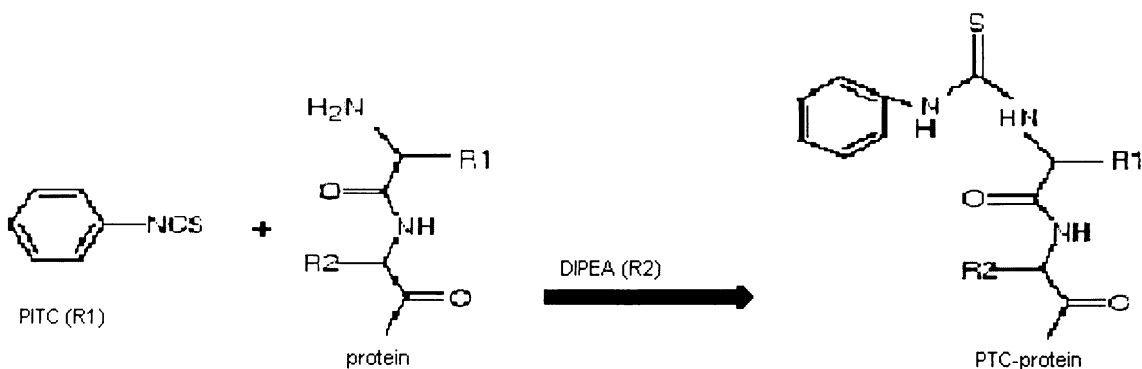
PTH	phenylthiohydantoin (fenylthiohydantoin)
AK	aminokyselina
HPLC	high-performance liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
PITC	phenylisothiocyanate (fenylisothiokyanát)
DIPEA	diisopropylethanolamin
PTC	phenylthiocarbamyl (fenylthiokarbamyl)
ATZ	anilinothiazolinon
PVDF	polyvinylidendifluorid
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodecylsulfát sodný)
DPTU	diphenylthiourea (difenylthiomočovina)
DPU	diphenylurea (difenylmočovina)
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
MALDI	matrix – assisted laser desorption ionization
A	alanin
R	arginin
N	asparagin
D	kyselina asparagová
Q	glutamin
E	kyselina glutamová
G	glycin
H	histidin
I	isoleucin
L	leucin
K	lysin
M	methionin
F	fenylalanin
P	prolin
S	serin
T	threonin
W	tryptofan
Y	tyrosin
V	valin
A ₂₃₀	Absorbance při vlnové délce 230 nm

3. Úvod

3.1. Sekvenace proteinů na principu Edmanova odbourávání

Edmanovo odbourávání proteinů je sled chemických reakcí, postupně vedoucích ke vzniku fenylthiohydantoinového derivátu aminokyseliny (PTH-AK), který je identifikován, na konci každého cyklu.¹ Separace jednotlivých PTH-AK probíhá na HPLC koloně (on-line HPLC s obrácenou fází), k detekci slouží UV/VIS detektor.

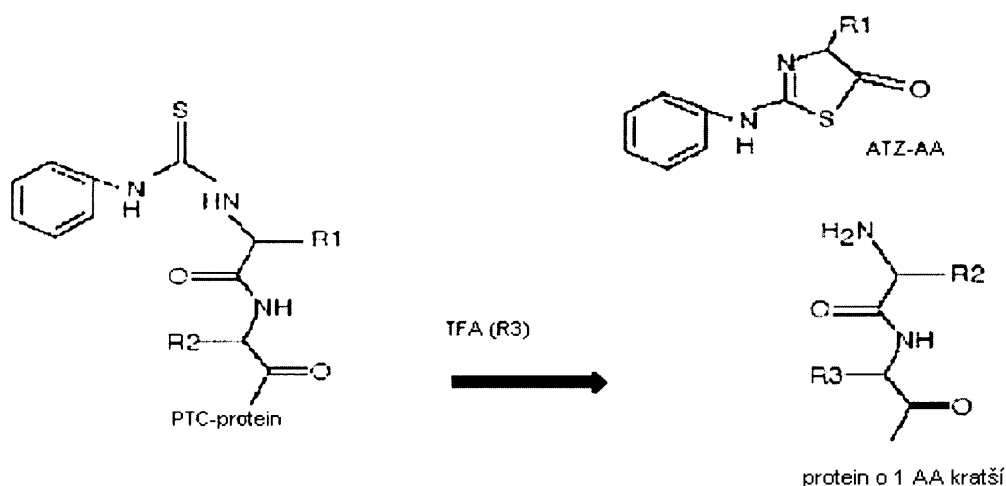
Odbourávání proteinů začíná spojením volného N-konce proteinu s fenylisothiokyanátem (PITC) v alkalickém prostředí diisopropylethanolaminu (DIPEA) za vzniku fenylthiokarbamylpeptidu (PTC-peptid) (obr. 3.1.1).



Obr. 3.1.1: Vznik fenylthiokarbamylpeptidu

V první fázi reakce dojde k dodání PITC a DIPEA (přítomnost báze zvýší pH a dojde k deprotonaci volných aminoskupin) do reakční nádoby sekvenátoru, ve druhé fázi k vysušení vzorku, které zabraňuje jeho vymytí, případně hydrolyze peptidového řetězce. V poslední fázi reakce dojde k vymytí přebytečných činidel a vedlejších produktů a k opětovnému vysušení vzorku.

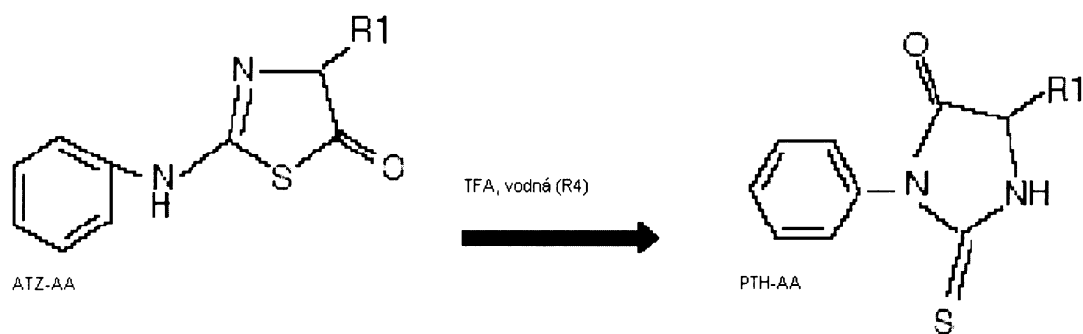
PTC-peptid se rozštěpí v prostředí bezvodé kyseliny trifluoroctové (v místě peptidové vazby nejbližší k PTC-zbytku) na cyklický derivát anilinothioazolinonu (ATZ) příslušné aminokyseliny a protein o jednu aminokyselinu kratší. (obr.3.1.2)



Obr. 3.1.2: Štěpení PTC-proteinu za vzniku ATZ

Vzorek by měl být před štěpením úplně zbaven vody, aby nedošlo k nespecifickému hydrolytickému štěpení peptidového řetězce.

ATZ-aminokyselina je extrahována butylchloridem a etylacetátem do konverzní nádoby, kde se v prostředí vodné kyseliny trifluoroctové (TFA) přemění na stabilní PTH derivát aminokyseliny (obr.3.1.3), po skončení konverze dojde k odstranění veškeré TFA ze vzorku vysušením, PTH-AK jsou následně separovány a identifikovány on-line RP-HPLC systémem.²



Obr. 3.1.3: Konverze ATZ-AK na PTH-AK

Jednou z komplikací při sekvenování může být přítomnost aminokyseliny cysteinu, který je degradován při Edmanově odbourávání, a musí být modifikován, např. alkyací pomocí polyakrylamidu. Poté je standartně sekvenován a identifikován.³

Další problém se sekvenováním proteinů od N-konce nastává tehdy, pokud má daný protein na N-konci modifikovaný aminokyselinový zbytek tak, že nereaguje s Edmanovým činidlem. Může jít např. o acetylaci, glykosylaci, formylaci, cyklizaci,

apod.⁴ Kromě chemického či enzymového odblokování modifikované koncové skupiny, lze rozštěpit protein na menší fragmenty buď enzymaticky (endopeptidasy) nebo chemicky (CNBr) a následně sekvenovat tyto fragmenty běžnou metodou.

3.2. Konstrukce proteinového sekvenátoru

Proteinový sekvenátor (obr. 3.2.1) slouží k automatickému provádění jednotlivých kroků Edmanova odbourávání proteinů popsanych v kapitole 3.1.⁵

Ve spodní části přístroje jsou umístěny nádoby s činidly a rozpouštědly, a dále láhev s odpadními rozpouštědly.

Klíčovým místem reakcí Edmanova odbourávání je reakční patrona, která se skládá ze tří segmentů, prostřední z nich je tvořen dvěma skleněnými bloky, mezi kterými je teflonové těsnění.⁶ Vzorek je vkládán buď ve formě PVDF blotu, nebo zakotven na filtru ze skleněných vláken. V reakční patroně probíhá reakce s PITC a posléze kyselá štěpení vzniklého PTC-peptidu. Shora jsou do reakční patrony přiváděny činidla a rozpouštědla, spodem jsou pak vzniklé produkty odváděny do konverzní nádoby, nebo do odpadní lahve.

Přeměna ATZ-AK na PTH-AK probíhá v konverzní nádobce, identifikace vzniklých PTH-AK pak probíhá na RP-HPLC koloně, která je součástí přístroje. Detekce je spektrofotometrická.

Součástí sekvenátoru je také tlaková láhev s argonem, který slouží k udržení inertní atmosféry ve všech částech přístroje a lahvích s činidly a rozpouštědly.

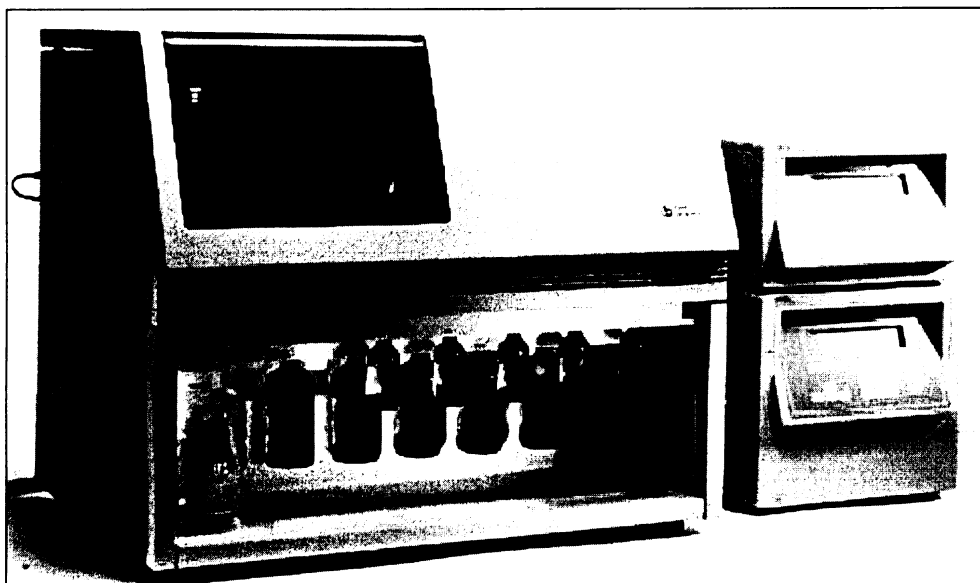
K sekvenátoru dále patří počítač s operačním systémem Windows 2000 nebo vyšším, se dvěma druhy softwaru:

a) PROCISE control software

Slouží ke kontrole a koordinaci všech operací prováděných v systému, jeho pomocí jsou spouštěny automatické funkce sekvenátoru

b) SequencePro analysis application software

Analyzuje a předkládá uživateli data ze sekvenování.



Obr. 3.2.1: Proteinový sekvenátor firmy Applied biosystems PROCISE 491⁷

3.3. Příprava vzorku

Výsledná délka získané aminokyselinové sekvence závisí na několika faktorech:⁷

1. Čistota vzorku (je nutné vyhnout se přítomnosti dalších peptidů a proteinů, aminů, volných aminokyselin, močoviny, solí, detergentů, apod.)
2. Množství vzorku (je možné získat sekvenci až 50 AK při množství vzorku na úrovni pikomolů)
3. Molekulová hmotnost vzorku
4. Konformace vzorku

3.3.1. Příprava vzorku na filtru ze skleněných vláken

Nejprve je nutno na filtr ze skleněných vláken aplikovat BioBrene, což je polymer, který zesiluje vazbu proteinu na filtr. V druhém kroku je zapotřebí filtr napuštěný BioBrenem precyklovat, aby došlo k odstranění nežádoucích příměsí, které může BioBrene obsahovat, a které by mohly rušit následné stanovení požadované sekvence vzorkového proteinu. Poté můžeme vzorek sekvenovat. Metoda sekvenování z filtru napuštěného BioBrenem obvykle poskytuje lepší výsledky, zvláště delších sekvencí aminokyselin, než sekvenování z PVDF blotu.

3.3.2. Příprava vzorku na PVDF membráně

Nejprve musí být protein separován např. dvourozměrnou elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (izoelektrická fokusace v jednom směru a SDS-elektroforéza ve směru druhém), poté je protein přenesen na PVDF membránu a obarven např. Coomassie brilliant blue, stříbrem, apod. Skvrnu patřící námi požadovanému proteinu vyřízneme, a můžeme rovnou sekvenovat v reakční nádobce, PVDF membrána je na rozdíl od nitrocelulosity hydrofobní a inertní rozpouštědlům používaných při Edmanově odbourávání⁸.

4. Cíle práce

- a) Optimalizovat činnost automatického proteinového sekvenátoru na β -laktoglobulinovém standardu
- b) Stanovit N-terminální sekvenci α -N-acetylgalaktosaminidasy z *Aspergillus niger*
- c) Stanovit interní sekvence hexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* po štěpení CNBr

5. Materiály a metody

5.1. Použité materiály a chemikálie

Činidla použitá pro sekvenování: R1 - 2,5% roztok PITC v heptanu, R2 - 5%DIPEA, 10% vody, 85% methanolu, R3 - bezvodá TF, R4 – 25% TFA vodná, R5 – PTH-aminokyselinový standard, všechna činidla byla stupně čistoty pro sekvenování („protein sequence analysis“) a získána od firmy Applied Biosystems. Rozpouštědla a chromatografická rozpouštědla: S1 – 25% acetonitril, S2B – ethylacetát, S3- 1-chlorbutan, S4 – 20% acetonitril, Solvent A - 3,5% THF ve MQ vodě+20 ml premixu (hotový acetátový pufr), Solvent B - 85% HPLC acetonitrilu+2-propanol, rozpouštědla byla stupně čistoty „sequencing grade“, kromě rozpouštědel S2B a S3, která byla stupně čistoty pro UV spektroskopii, Všechna rozpouštědla byla získána od firmy Applied Biosystems.

Modifikační činidlo BioBrene bylo získáno od firmy Applied Biosystems.

PVDF membrána 0,44 μ m byla získána od firmy PallBioScience, USA.

Souprava pro kovalentní imobilizaci proteinu Sequelon AA byla získána od firmy Millipore.

Argon o čistotě 99,998% byl získán od firmy Linde.

5.2. Použité přístroje

PROCISE 491 proteinový sekvenátor (Applied biosystems), ABI 140 pumpa (Applied Biosystems), UV/VIS detektor Series 200 (Perkin-Elmer Biosystems, dnes Applied Biosystems), RP-HPLC kolona C 18 s kontrolovatelnou teplotou 2,1 \times 220 mm (Applied Biosystems).

5.3. Použité metody

5.3.1. Optimalizace sekvenátoru na β -laktoglobulinovém standardu

Dle specifikace výrobce je přístroj optimalizovaný, jestliže dosahuje při sekvenování 10 pmol proteinového standardu opakovaného výtěžku na šestnácti prvních aminokyselinách nejméně 94 %. Sekvenovat proteiny s touto citlivostí je ovšem možné až v okamžiku, kdy se již účinnost přístroje ustálila, před tímto ustálením je často nutné pracovat s větším množstvím proteinů. Základním kritériem účinnosti proteinového sekvenátoru přitom zůstává poměr píků dvou nejhojnějších vedlejších produktů, DPTU a jeho oxidačního produktu, DPU.⁹ Pokud je pík DPU větší než pík DPTU, je účinnost sekvenátoru nízká, a musí se pokračovat s analýzami vysokých množství proteinů (500 pmol β -laktoglobulinového standardu), a to až do té doby, než dojde k obrácení tohoto poměru. Poté je možné množství standardního proteinu snižovat, například na 100 pmol a posléze na 10 pmol. Teprve v okamžiku, kdy odpovídá účinnost sekvenátoru deklarované hodnotě, je možné přistoupit k analýze neznámých vzorků.

β -laktoglobulinový standard se aplikuje ve formě roztoku v 0.1 % TFA v 20 % acetonitrilu, a to vysušením na proteinovém filtru ze skelných vláken. Před aplikací proteinu se musí tento filtr pokrýt modifikačním činidlem BioBrene, které zajišťuje dostatečně pevnou vazbu proteinu. Pracovní postup spočívá v aplikaci 30 μ l BioBrenu na skleněný filtr. Vzorek se vysuší až do bílého zabarvení, a poté následuje precyklování filtru podle programu Filter Precycle. Precyklování probíhá v 5 cyklech, nahráváme chromatogramy pro blank, PTH standard, a dva experimentální cykly. Na blanku a PTH standardu kontrolujeme hlavně správnou účinnost HPLC systému (složení solventů, kolona, UV detektor). Experimentální cykly již obsahují píky DPTU a DPU, a mohou nám posloužit k počáteční orientaci, pokud jde o účinnost sekvenátoru.

Po ukončení precyklování aplikujeme 10 μ l (10 pmolů) β -laktoglobulinového standardu, a provádíme sekvenování s použitím programu Pulsed liquid po dobu 16 – 20 cyklů. Opět zaznamenáváme veškeré chromatogramy. První aminokyselinou je leucin, který se objeví na 3. chromatogramu jako poslední aminokyselina v pozici odpovídající příslušné PTH-Leu aminokyselině ve standardu. Pokud dosáhneme v jednotlivých cyklech dobře separovaných píků, můžeme je integrovat, a použít jako

podklad pro stanovení účinnost. Píky, které nejsou rozlišené, při kalkulaci raději vynecháme. Pro vyhodnocení lze použít i komerční program, ale vždy musíme vycházet z „reálných“ údajů tak, abychom píky kontaminantů nezaměnili za píky PTH-aminokyselin.

5.3.2. Stanovení N-terminální sekvence α -N-acetylgalaktosaminidasy z *Aspergillus niger*

Výchozím materiálem pro tuto analýzu jsou frakce enzymu α -N-acetyl-galaktosaminidasy získané v průběhu purifikace tohoto enzymu chromatofokusací¹⁰. Množství proteinu pro analýzu bylo asi 10 μ g, byly vybírány frakce co nejvyšší čistoty. Vzorek byl připraven separací proteinu SDS elektroforézou na 10 % polyakrylamidovém gelu a následným elektropřenosem na PVDF membránu (0,44 μ m, PallBioScience, US). Po ukončení elektropřenosu byla PVDF membrána obarvena Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB), dobře promyta deionizovanou vodou, a vysušena. Pro analýzu v proteinovém sekvenátoru lze použít poměrně intenzivní proteinové zony odpovídající asi 10 μ g proteinu. Postup sekvenování je obdobný jako u laktoglobulinového standardu (kapitola 5.3.1), nemusí se však provádět precyklování. Zóna analyzovaného proteinu se pouze z PVDF membrány vyřízne žiletkou, popřípadě se ještě rozdělí na kousky vhodné pro umístění do sekvenční patry. Poté se provádí sekvence s použitím standardního programu Pulsed liquid. Barvivo CBB neinterferuje se sekvenčními reakcemi, naopak je dobrým indikátorem proteinu na membráně. Vyhodnocení experimentu se provádí pouze kvalitativně, a to metodou překryvu chromatogramů.

5.3.3. Stanovení interních sekvencí hexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*

Tato analýza vyžaduje na rozdíl od sekvenování z blotů vysoce přečištěný protein. Vzhledem k tomu, že vzorek α -N-acetylgalaktosaminidasy nebyl dostatečně čistý, použil se pro analýzu vzorek hexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*. Tento protein byl přečištěn do homogenního stavu kombinací síranového srážení a 3 postupných chromatografických purifikací na hydrofobním nosiči, katexu (S-Sepharosa) a anexu

(MonoQ kolona). Přečištěný vzorek byl poté chromatografií na obrácené fázi v systému 0.1 % TFA/acetonitril odsolen, a použit k CNBr štěpení.¹¹

Je známo, že CNBr štěpí polypeptidový řetězec za aminokyselinou methioninem, takže většinou dochází ke vzniku poměrně dlouhých peptidových fragmentů. Tyto fragmenty byly opět separovány na koloně s obrácenou fází C18, a čistota fragmentů v jednotlivých frakcích ověřena hmotnostní spektrometrií MALDI. Tuto část experimentu prováděl Mgr. Petr Pompach, PhD. z MBÚ AV ČR.¹²

Pro sekvenování byly vybrány pouze vzorky homogenní podle hmotnostní spektrometrie. Sekvenování krátkých peptidů menších než 8 kDa je obtížné, protože dochází většinou k rychlému vymytí vzorku ze sekvenčních médií. Proto se musí provádět kovalentní imobilizace prostřednictvím C-terminálního karboxylového zbytku, a to karbodiimidovou kondenzací na aminofenyl-PVDF membránu (souprava Sequelon AA od firmy Millipore). Po ukončení imobilizace je membrána bez jakékoliv další úpravy vložena do sekvenční patrony, a dále se postupuje stejně jako v části 5.3.2. Vyhodnocení výsledků je opět kvalitativní, na základě srovnávání chromatogramů.

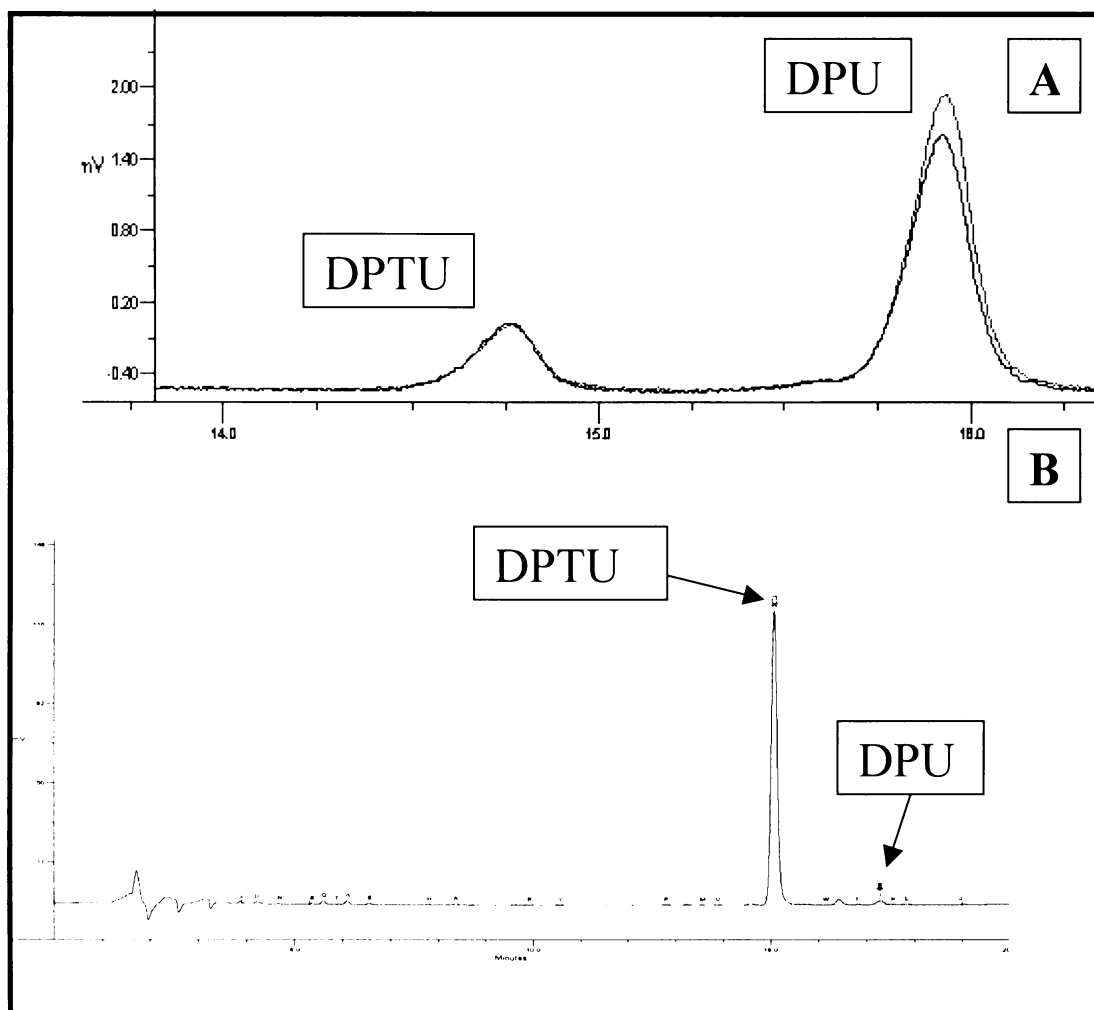
6. Výsledky

6.1. Optimalizace přístroje

Správná účinnost proteinového sekvenátoru je závislá na celé řadě faktorů. Důležitá je zejména těsnost celého systému (kyslík ze vzduchu vede k tvorbě řady vedlejších produktů a narušuje účinnost přístroje) a správná funkce dávkovacích ventilů, kterou prověříme příslušnými tlakovými zkouškami. Dalším důležitým faktorem správné účinnosti sekvenátoru proteinů je poté kvalita použitých chemikálií, rozpouštědel a inertních plynů. Sekvenátor PROCISE používá jako inertního plynu argonu o vysoké čistotě nejméně 99.998 % (argon 4.8), který je v České republice dobře dostupný (Linde) a s jeho dodávkami tak nebývají problémy. Pokud jde o ostatní použité chemikálie, je na jejich čistotu přístroj mimořádně citlivý. Jsou používány chemikálie čistoty „protein sequence analysis“, a to buď originální dodávané výrobcem přístroje Applied Biosystems (tyto chemikálie jsou ovšem extrémně drahé), nebo náhradní od firmy Fluka. V případě rozpouštědel, jako je ethylacetát a 1-chlorobutan, kterých spotřebovává přístroj vysoká množství, nejsou ani náhradní „sequencing grade“ chemikálie dostatečně ekonomické, a musíme pak sestoupit o jeden krok níže v čistotě a spokojit se s rozpouštědly označovanými jako „spektrální – pro UV spektroskopii“. Takové chemikálie již ovšem nejsou od výrobce aplikačně testované (nejsou určeny pro proteinový sekvenátor, ale pro UV, popřípadě luminiscenční měření), a mohou proto nastat problémy v případě některých šarží. Jestliže chceme přesto takové chemikálie používat, je důležité umět vyhodnotit a správně optimalizovat účinnost proteinového sekvenátoru.

Základním orientačním vyhodnocením, vhodným pro tyto účely, je měření poměru pík dvou nejdůležitějších vedlejších produktů Edmanovy chemie, DPTU a DPU (firma Applied Biosystems přidává obě tyto látky do proteinového standardu, což usnadňuje vyhodnocení). Pro optimální účinnost proteinového sekvenátoru je přitom žádoucí, aby vzájemný poměr DPTU : DPU byl co nejvyšší, ale určitě větší než 1 (tj. aby pík DPTU byl vždy vyšší než pík DPU). Vlastní provedení optimalizace spočívá buď v pouhém provádění sekvenčních reakcí „naprázno“, nebo v opakovaném zařazení proteinového standardu (u sekvenátorů firmy PROCISE je jím protein β -laktoglobulin),

zpravidla na úrovni asi 100 pmol aplikovaného proteinu. Na začátku optimalizace pozorujeme situaci znázorněnou na obr. 6.1.1 v panelu A: pík DPTU je nízký, pík DPU vysoký, píky náležející PTH aminokyselinám při špatné účinnosti přístroje zpravidla nepozorujeme. Po asi 3 – 4 neúspěšných sekvencích by se měl začít pík DPTU zvyšovat, pík DPU snižovat (někdy nemusí být na chromatogramech ani viditelný), a začínají být patrné píky PTH aminokyselin, nejprve na úrovni 100 pmol a posléze na úrovni 10 pmol. Příklad takového chromatogramu je na obr. 6.1.1 v panelu B.



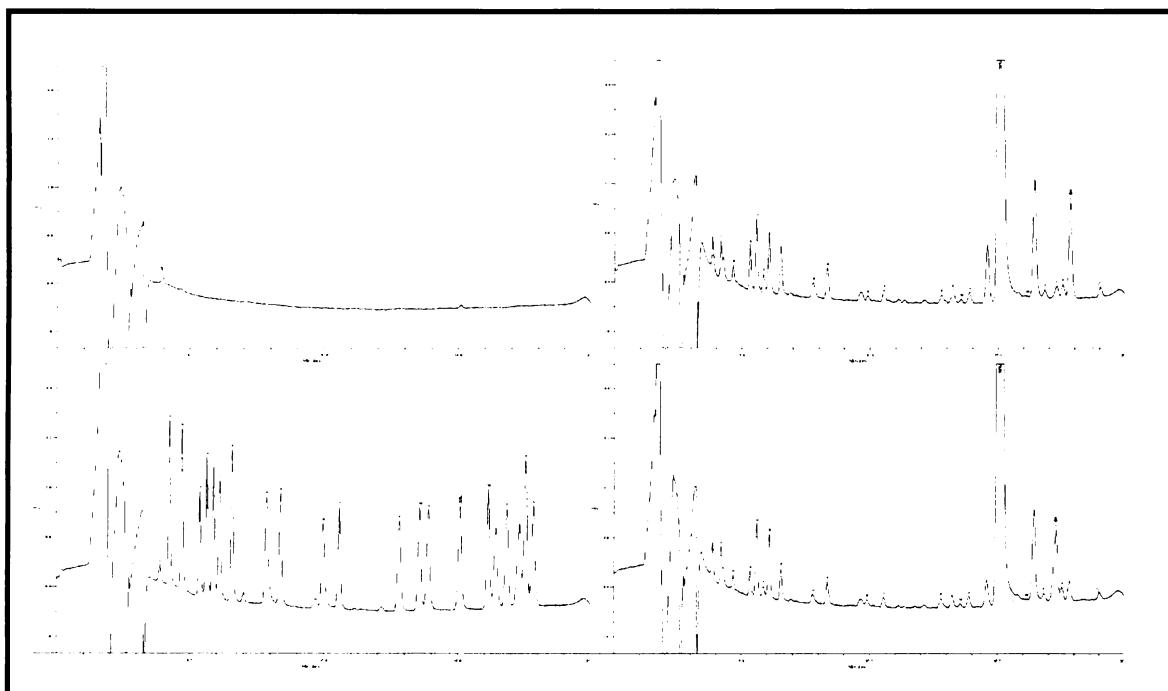
Obr.6.1.1: Optimalizace účinnosti proteinového sekvenátoru PROCISE. Píky náležící dvěma nejdůležitějším vedlejším produktům automatického Edmanova odbourávání, DPTU a DPU jsou v chromatogramech označeny. Panel A znázorňuje situaci na začátku experimentu, panel B po dosažení optimalizace.

Jakmile dojde k upravení vzájemného poměru DPTU : DPU, je možno přikročit k sekvenování proteinového standardu. Zde přitom není příliš velký prostor pro experimentování – jedná se spíše o provozní kontrolu, kterou je nutno vykonat přesně podle metodiky dodané výrobcem. V případě proteinového sekvenátoru PROCISE

výrobce garantuje opakované výtěžky aminokyselin větší než 94 % při sekvenování šestnácti N-koncových aminokyselin 10 pmolů standardního proteinu β -laktoglobulinu.

Někteří jiní výrobci sekvenátorů proteinů (kteří již ale dnes na trhu nepůsobí) garantují i jiné parametry, například tzv. počáteční výtěžek prvé aminokyseliny (který bývá zpravidla asi 50 %), popřípadě je uváděn tzv. přenos aminokyselin mezi jednotlivými cykly. Ten je způsoben tím, že účinnost Edmanovy chemie nikdy není stoprocentní, a dochází proto k výskytu aminokyseliny i v cyklu následujícím po tom cyklu, v němž by se měla aminokyselina výlučně vyskytovat.

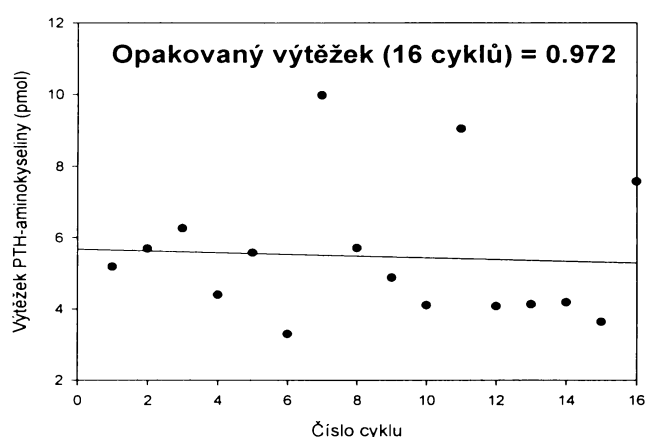
Výsledky získané při sekvenování 10 pmolů standardního proteinu dle technické specifikace výrobce proteinového sekvenátoru jsou uvedené na obr. 6.1.2, kde je uvedený tzv. prázdný nástřik (kontrola čistoty separační kolony), dále nástřik PTH - aminokyselinového standardu (kontrola separační a analytické účinnosti kolony a celého analytického systému), a dále jsou uvedené prvé dva cykly celé sekvence, ve kterých se objevují dvě první N-koncové aminokyseliny β -laktoglobulinu, leucin a isoleucin.



Obr.6.1.2: Chromatogramy získané při sekvenování 10 pmol standardního proteinu β -laktoglobulinu dle specifikace dodavatele proteinového sekvenátoru. Uveden je prázdný cyklus (nástřik samotného solventu) obr. vlevo nahoře, PTH aminokyselinový standard - obr.vlevo dole (obsahuje PTH deriváty 19 kódových aminokyselin s výjimkou Cys), a dále chromatogramy pro prvé dvě analyzované aminokyseliny, leucin a isoleucin – obr. vpravo nahoře a vpravo dole.

Věškerá analytická data z dalších cyklů jsou sekvenátorem proteinů automaticky zaznamenána, a použita pro vyhodnocení opakovaných výtěžků v prvních 16 cyklech sekvenování proteinového standardu. Takový graf je uvedený na obrázku 6.1.3, kdy opakovaný výtěžek změřený na 10 pmolech proteinového standardu činí 97.2 %, což splňuje specifikaci požadovanou výrobcem. Takto optimalizovaný sekvenátor je poté možné použít k analýze neznámých proteinových vzorků.

Sekvence prvních šestnácti aminokyselin β -laktoglobulinového standardu vyšla následující: **livtqtmkgl diqkvh**.

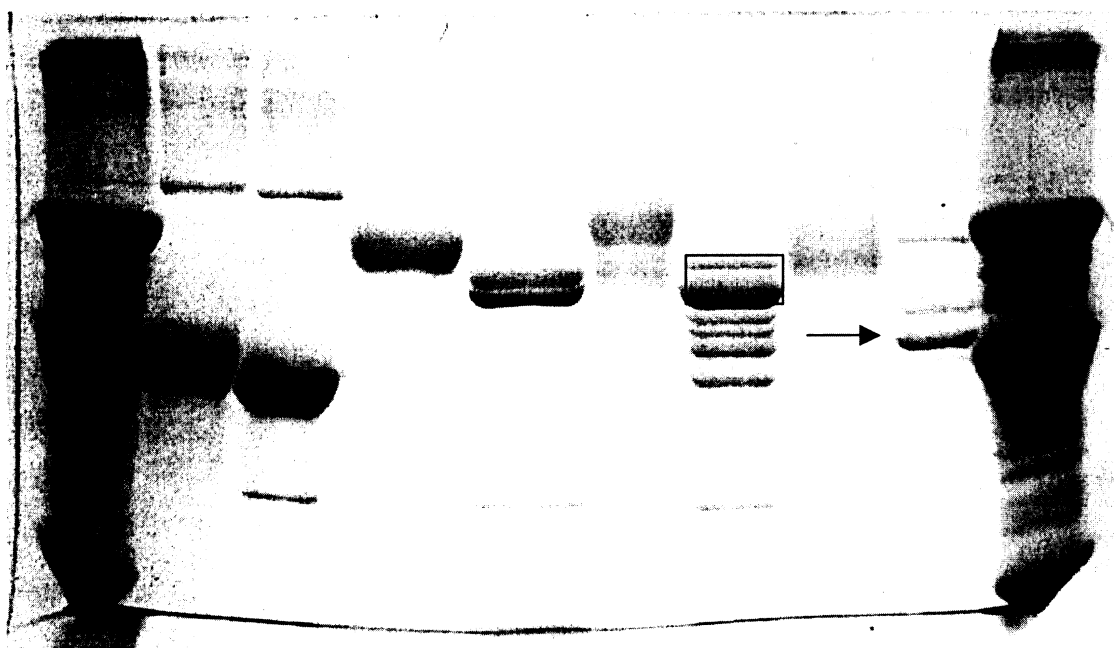


Obr.6.1.3: Stanovení opakovaných výtěžků PTH-aminokyselin v šestnácti cyklech. Výsledky byly získány při sekvenování 10 pmol β -laktoglobulinu dle technické specifikace firmy Applied Biosystems.

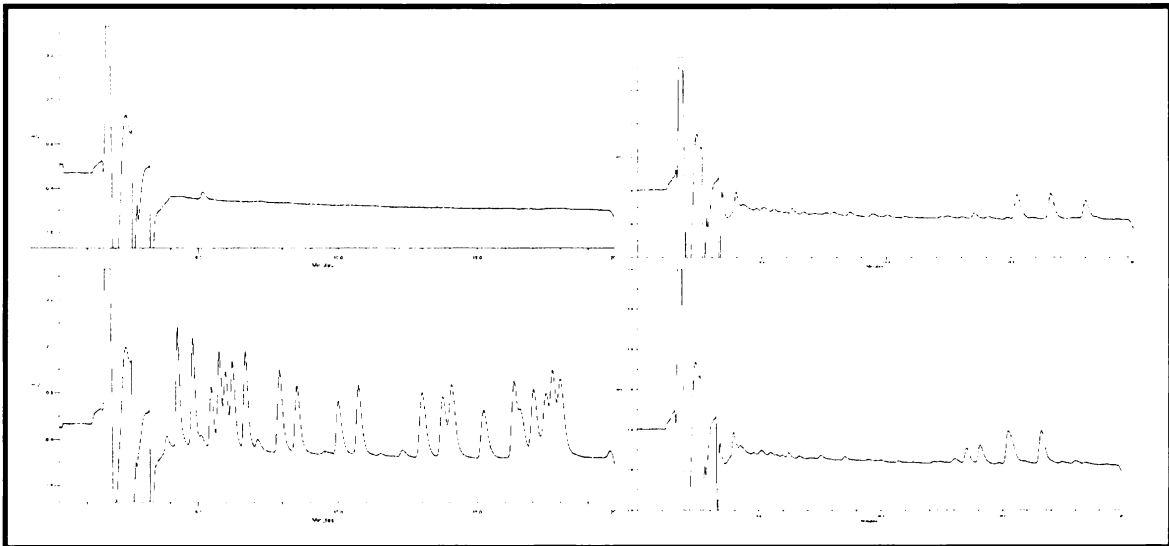
6.2. Stanovení N-terminální sekvence α -N-acetylgalaktosaminidasy

Po optimalizaci proteinového sekvenátoru bylo možno přistoupit k analýzám několika neznámých experimentálních vzorků. Analyzované vzorky vycházely z potřeb některých projektů řešených v laboratoři. V prvním projektu bylo nezbytné stanovit N-terminální sekvenci aminokyselin enzymu α -N-acetylgalaktosaminidasy, která je izolovaná a studovaná ve spolupracující Laboratoři biotransformací na MBÚ AV ČR. Pro řešení tohoto úkolu byla zvolena metoda sekvenování, při níž je vzorek proteinu elektropřenosem přenesen na PVDF membránu, na níž mohou být zóny proteinu citlivě barveny klasickými proteinovými barvivy, jako je např. Coomassie Brilliant Blue R-250. Poté je zóna proteinu i s membránou vyříznuta přímo z blotu žiletkou, a umístěna do patrony proteinového sekvenátoru. Tato metoda je velmi výhodná zejména v případech, kdy není protein ještě dokonale vyčištěný od všech kontaminujících proteinů,

od nichž ho separujeme fyzicky vyříznutím pouze určité proteinové zóny (viz. obr. 6.2.1). Na PVDF membráně je protein velmi pevně navázaný, takže nemůže dojít k jeho odmytí v průběhu reakcí Edmanova odbourávání. PVDF membrána je navíc vůči příslušným reakčním činidlům velmi odolná, a protein je pro sekvenování velmi dobře přístupný. Modré proteinové barvivo neinterferuje se sekvenčními reakcemi. Výsledek sekvenování enzymu α -N-acetylgalaktosaminidasy z PVDF blotu je znázorněn na obrázcích 6.2.1 a 6.2.2. Přestože je množství proteinu schopné navázat se na PVDF blot poněkud omezené, vzhledem k citlivosti proteinového sekvenátoru získáváme dobře viditelné píky jednotlivých aminokyselin (obr. 6.2.2).



Obr.6.2.1: PVDF membrána obsahující zóny přenesených glykosidas, a to jejich nativní (levá dráha) i deglykosylovanou (pravá dráha) formu. Dvojice drah postupně ukazuje ovalbumin (deglykosylační kontrola), hexosaminidasu, α -N-acetylgalaktosaminidasu, a α -galaktosidasu. Zóna proteinu, která byla použita pro sekvenování α -N-acetylgalaktosaminidasy, je označena v obrázku obdélníkem. Za zmínku stojí též změna vzhledu glykosidas, zejména však α -galaktosidasu po deglykosylaci, kdy z původní difúzní zóny, rozmyté v důsledku vazby oligosacharidových řetězců na protein vzniká velmi kompaktní proteinová zóna (označena šipkou) vhodná pro sekvenování.



Obr.6.2.2: Chromatogramy identifikovaných PTH aminokyselin po sekvenování enzymu α -N-acetylgalaktosaminidasy z PVDF blotu. Ukázán je prázdný nástřik – obr. vlevo nahoře, separace směsi PTH aminokyselin – obr. vlevo dole, a cykly pro prvou a druhou aminokyselinu – obr. vpravo nahoře a vpravo dole.

Celkem bylo možné přečíst sekvenci 14 koncových aminokyselin. Při vyhledávání této získané sekvence v proteinové databázi programem BLAST¹³ byl identifikován příslušný enzym, ale pouze na základě genové predikce. Mnou získané výsledky tak potvrzují tuto predikci přesnou analýzou na úrovni proteinu. Při znázornění mnou stanovené sekvence v celkové sekvenci proteinu (obr. 6.2.3) je evidentní, že jsem sekvenovala již sekretovaný zralý protein, u něhož chyběl tzv. signální peptid nezbytný pro transport přes membrány endoplasmatického retikula. Sekvence tří alaninů (aaa) těsně předcházející mnou stanovené sekvenci je právě signálem pro odštěpení signálního peptidu signální proteasou.

```
mrwlltssal lvpaaalvrv dgvgltpalg wnswnayscd idadkivtaa nevvnlglkd 61
lgyeyinidd cswvksgrnt ttkriipdpd kfpngisgva dqvhalglkl giyssagltt 121
cagypaslgy eeidaqsfae wgidylykdn cgvpntltdq ytycvpdstd gsnypngtcv
```

Obr.6.2.3: Hledání homologního proteinu k identifikované N-terminální sekvenci enzymu α -N-acetylgalaktosaminidasy. Pomocí programu BLAST, přístupného na internetovém serveru <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> se podařilo nalézt predikovanou α -N-acetylgalaktosaminidasu identifikovanou v anotovaném genomu plísně *Aspergillus niger*. Mnou stanovená sekvence je podtržená.

6.3. Stanovení interních sekvencí hexosaminidasy

V další části mé experimentální práce byla stanovována aminokyselinová sekvence několika peptidových fragmentů enzymu β -hexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*. Jak již bylo popsáno v kap. 5.3.3, bylo nejprve nutno vysoce přečištěný protein rozštěpit na jednotlivé fragmenty pomocí CNBr (ten štěpí vazbu mezi C-koncem aminokyseliny methioninu a N-koncem vedlejší aminokyseliny), které byly posléze separovány na koloně s obrácenou fází. Byly odebírány frakce s vysokou hodnotou A_{230} , které byly analyzovány hmotnostní spektrometrií MALDI. Byly vybrány tři peptidové frakce, které se při této analýze jevily jako homogenní.

U těchto tří peptidových fragmentů byly úspěšně zjištěny aminokyselinové sekvence, které jsou uvedeny v tab. 6.3.1.

Tab.6.3.1: Získané aminokyselinové sekvence peptidových fragmentů získaných štěpením hexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*

Pořadí příslušných aminokyselin v proteinu z <i>Penicillium chrysogenum</i>	Získané sekvence aminokyselin peptidových fragmentů
29-40	nitwgssgpiqv
392-406	wediatnteaahhvp
571-585	atnlfpkyxlqpha

N-terminální sekvenování peptidů v proteinovém sekvenátoru je obtížné, protože dochází k rychlému vymytí peptidu ze sekvenačních filtrů, a to i po jejich modifikaci BioBrenem. Proto se u peptidů nejčastěji provádí kovalentní imobilizace na arylamino-PVDF membráně (Sequelon AA, Millipore, USA). Po imobilizaci tří homogenních peptidů byly získány sekvence uvedené v tab. 6.3.1.

Po jejich umístění do úplné aminokyselinové sekvence modelového proteinu, kterým byla hexosaminidasa z *Penicillium chrysogenum* (obr.6.3.2), se ukázalo, že nalezené peptidové sekvence jsou velmi výhodně rozloženy v celé sekvenci této hexosaminidasy, jedna v N-terminální části, jedna uprostřed, a poslední v C-koncové části proteinu.

```

                                ni twgssgpiqv
1   mkfasvlnvl galtaasavq vnlplaprn ni twgssgpiqv nlnlningphs plltqawera
61  wetittlqvw paavespias ypafptstpv ssapkakrap sgihnvdvhv vnddadlqyg
121 vdesytlvvs dggirinsqt wgvvlqafft lqqiisdgk ggliieqpvk ikdaplyphr
181 gimidtgrnf itvrklleqi dgmalsklv  lhwhlddsqs wpmqmssype mtkdayspre
241 iytehdmrrv iayarargvr vipevdmpah sasgwqqvdp eivacaesww sndvwaeha
301 vqpnpqgldi iypktyevvn nvyqelsrif sdnlfhvgad eiqpncynys thitkwfaed
361 psrtyndlaq ywvdhsmpif rsvgdhrrlm mwedaiate sahdvpkdvi mqtwnsgege
                                wediatnte aahhvp
421 gnikkltzag ydvvvstsd f lyldcgrggy vtndarynvq sntdggvnfn yggdggswca
481 pyktwqriyd ydfltnltss eakhiigaea plwseqvddv tvssvfwpra aalgelvwsg
541 nrdaagrkrk tsftqrilnf reylvangvm atalvpkycl qhphacdlyk nqtvms
                                atnlfpsyxl qhpha

```

Obr. 6.3.2: V aminokyselinové sekvenci hexosaminidasy z *Penicillium chrysogenum* jsou znázorněny mnou získané sekvence peptidových fragmentů získaných štěpením hexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* (podtržené sekvence).

Po překladu těchto aminokyselinových sekvencí do genetického kódu bylo možno navrhnout tři degenerované oligonukleotidové primery, které byly použity k úspěšnému klonování a sekvenování celého enzymu. Této části projektu jsme se již neúčastnili, proto pouze uvádím, že sekvenování je v současnosti ukončeno asi z 85%.

7. Diskuze

Počátečním a zásadním bodem mé práce bylo optimalizovat účinnost proteinového sekvenátoru tak, aby bylo možné přistoupit k vlastním analýzám vzorků.

V první řadě šlo především o získání správného poměru píků dvou vedlejších produktů Edmanova odbourávání proteinů, DPTU a DPU, kterého nakonec bylo dosaženo po několika provedení optimalizačních cyklů popsaných v kap.6.1, a po vyřešení několika drobných závad jako např. netěsnost některých činidel či příliš vysoký tlak inertního plynu přiváděného do přístroje.

Po vlastním sekvenování β -laktoglobulinového standardu bylo možno přistoupit ke kvantitativnímu zhodnocení optimalizace. Požadavek na opakovaný výtěžek v prvých šestnácti cyklech sekvenování proteinového standardu byl nejméně 94 %. Mnou získaná hodnota tohoto výtěžku činila po dosažení optimalizace 97,2 %, čímž byla správná účinnost přístroje ověřena, a mohla jsem přejít k analýze vzorků vybraných proteinů.

V první části vlastní experimentální práce jsem stanovovala N-terminální sekvenci α -N-acetylgalaktosaminidasy z *Aspergillus niger*. Podařilo se mi získat sekvenci prvých čtrnácti aminokyselin. Díky znalosti této sekvence jsem pomocí programu BLAST našla protein, identifikován jako α -N-acetylgalaktosaminidasa, na základě genové predikce. Zjistila jsem, že protein, který jsem sekvenovala, byl již zralý a sekretovaný, protože aminokyselinová sekvence, tzv. signální peptid, potřebný ke transportu proteinu přes membránu endoplazmatického retikula, předcházela mnou stanovené sekvenci, a nebyla její součástí.

Ve druhé části experimentu jsem stanovovala aminokyselinové sekvence tří peptidových fragmentů získaných štěpením hexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* bromkyanem, jejichž čistota byla ověřena hmotnostní spektrometrií MALDI. U všech těchto tří peptidů se mi podařilo aminokyselinové sekvence získat, a po jejich dosazení do sekvence aminokyselin v modelovém proteinu (hexosaminidasa z *Penicillium chrysogenum*) jsem zjistila jejich výhodné umístění v sekvenci celého tohoto proteinu

(jedna na N-konci, jedna uprostřed a jedna na C-konci). Po překladu získaných sekvencí do genetického kódu bylo možno navrhnout degenerované oligonukleotidové primery, které byly použity ke klonování a sekvenování celého enzymu, sekvence enzymu je v současné době známá asi z 85%, tento úkol již nebyl součástí mé práce.

8. Použitá literatura

- ¹ Edman P.: Method for determination of the amino acid sequence in peptides, Acta Chem. Scand. 4, 283-293, 1950
- ² Grant G.A., Crankshaw M.W.: Identification of PTH-amino acids by HPLC, Methods in molecular biology 64: Protein sequencing protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1996
- ³ Ryšlavá H., Stiborová M., Bezouška K.: Mikrosekvenování proteinů a peptidů v Čechách, Bulletin ČSBMB 25, 1997
- ⁴ Wellner D., Panneerselvam C., Horecker B. L.: Sequencing of peptides and proteins with blocked N-terminal amino acids: N-acetylserine or N-acetylthreonine, Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 1947-1949, 1989
- ⁵ Edman P., Begg G.: A protein sequenator, Eur. J. Biochem. 1, 80-91, 1967
- ⁶ Hewick M.R., Hunkapiller M.W., Hood L.E., Dreyer W.J.: A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator, J. Biol. Chem. 256, 7990-7997, 1981
- ⁷ Applied biosystems: Procise, Procise cLC and Procise C protein sequencing systems user guide, 2003
- ⁸ Matsudaira P.: Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto PVDF membranes, J. Biol. Chem. 262, 10035-10038, 1987
- ⁹ Dunbar B.: Protein sequencer maintenance and troubleshooting, Methods in molecular biology 64: Protein sequencing protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1996
- ¹⁰ Dana Manglová: Fungální α -N-acetylgalaktosaminidasa: produkce, purifikace a charakterizace, diplomová práce, PřF UK Praha, 2007
- ¹¹ Darbre A.: Practical protein chemistry: A handbook, Wiley, New York, 1986
- ¹² Publikace v přípravě
- ¹³ Altschul S.F., Gish W., Miller G., Myers E.W., Lipman D.J.: Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215, 403-410, 1990