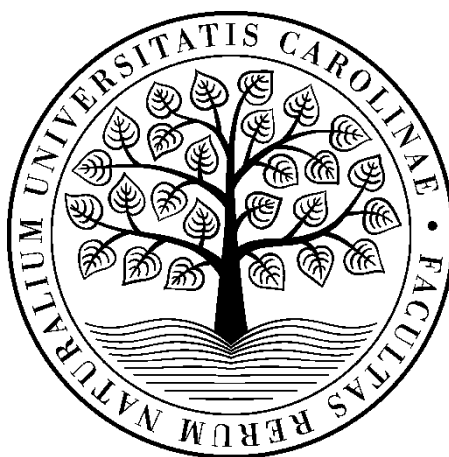


UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Kristýna Šintáková

Příprava Oryzasinu 1 pro štěpení proteinů v experimentech vodík/deuteriové výměny

Preparation of Oryzasin 1 for protein digestion in hydrogen/deuterium exchange

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Man, Ph. D.

Konzultant: Mgr. Ljubina Adámková

Praha 2019

Prohlášení

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

V Praze dne:

Kristýna Šintáková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Manovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Ljubině Adámkové za vedení bakalářské práce a veškerou pomoc, dále pak Mgr. Jiřímu Hausnerovi za cenné rady a čas, který mi věnoval, také kolektiv Laboratoře strukturní biologie a buněčné signalizace za vytvoření příjemného prostředí k práci, a svojí rodině za bezpodmínečnou podporu mého studia.

Abstrakt

Vodík/deuteriová výměna v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (HXMS) je stále populárnější technikou strukturní biologie. Její prostorové rozlišení závisí na účinnosti fragmentace nebo proteolytickém štěpení studovaného proteinu. Z toho důvodu je snaha hledat nové proteasy, které by nejen byly schopné štěpit zkoumaný protein při podmínkách HXMS, ale také poskytovaly co největší pokrytí sekvence proteinu.

Tato práce se zabývá nalezením optimálních podmínek produkce aspartátové proteasy Oryzasinu 1 pro potenciální použití v experimentech HXMS. Z dostupných plazmidů byly vybrány vhodné produkční klony, pomocí peptidového mapování byla ověřena identita produkovaného proteinu a následně byly nalezeny vhodné produkční podmínky. Na základě těchto výsledků bylo přistoupeno k produkci proteinu ve velkém objemu a k izolaci inkluzních tělísek.

Klíčová slova: Oryzasin 1, proteasy, vodík/deuteriová výměna v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (HXMS)

Abstract

Hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HXMS) is an increasingly popular technique in structural biology. Its spatial resolution strongly depends on the efficiency of the fragmentation or proteolytic cleavage of the studied protein. Therefore, it is desired to search for new proteases that would not only be able to digest the protein of interest under the HXMS conditions, but also to provide the best possible coverage of the protein sequence.

Finding optimal conditions for production of Oryzasin 1 aspartate protease for its potential use in HXMS experiments was done in this thesis. Suitable production clones were selected from available plasmids, the identity of the produced protein was verified by peptide mapping, and optimal production conditions were found. Based on these results, large-scale protein production and inclusion body isolation were undertaken. *(In Czech)*

Keywords: Oryzasin 1, proteases, hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry (HXMS)

Obsah

Seznam použitých zkratek	8
1. Úvod	10
1.1. Využití proteolýzy při studiu strukturních změn proteinů prostřednictvím vodík/deuteriové výměny	10
1.2. Aspartátové proteasy v experimentech H/D výměny	13
1.2.1. Rostlinné aspartátové proteasy	14
1.2.2. Nepenthesiny	15
1.3. Oryzasin 1	16
2. Cíl práce	17
3. Experimentální část	18
3.1. Materiál	18
3.1.1. Přístroje a pomůcky	18
3.1.2. Chemikálie	18
3.1.3. Enzymy	20
3.1.4. Vektory	20
3.1.5. Bakteriální kmeny	20
3.1.6. Pufry, roztoky a média	20
3.2. Metody	22
3.2.1. Transformace kompetentních buněk	22
3.2.2. Výběr vhodných produkčních klonů	22
3.2.3. Diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného	23
3.2.4. Ověření produkovaného proteinu	24
3.2.4.1. Identifikace proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF	25
3.2.5. Nalezení optimálních produkčních podmínek	25

3.2.6. Velkoobjemová produkce proteinu a izolace inkluzí	26
4. Výsledky.....	28
4.1. Výběr vhodných produkčních klonů na základě SDS elektroforézy	29
4.2. Ověření identity produkovaného proteinu prostřednictvím peptidového mapování 29	
4.3. Určení vhodných podmínek produkce pomocí SDS elektroforézy.....	31
4.4. Velkoobjemová produkce proteinu a izolace inkluzí.....	31
5. Diskuze	33
6. Závěr.....	36
Seznam použité literatury	37

Seznam použitých zkratek

AMBIC	hydrogen uhličitán amonný (ammonium bicarbonate)
APS	peroxodisíran amonný (amonium persulfate)
CID	kolizně indukovaná disociace (collision induced dissociation)
DTT	1,4-dithiothreitol
ECD	disociace záchytem elektronu (electron capture dissociation)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionization)
ETD	disociace přenosem elektronu (electron transfer dissociation)
GST	glutathion-S-transferasa
H/D	vodík/deuteriová výměna (hydrogen/deuterium exchange)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HvAP	aspartátová proteasa původem z ječmene (<i>Hordeum vulgare</i> aspartic proteinase)
HXMS	vodík/deuteriová výměna v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry)
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
kDa	kilodalton
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
MALDI	ionizace/desorpce laserem v přítomnosti matrice (matrix assisted laser ionization/desorption)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NAP	nepenthesinový-typ aspartátové proteasy (nepenthesin-like aspartic protease)
NMR	nukleární magnetická resonance (nuclear magnetic resonance)
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PSI	rostlinný specifický segment (plant specific insert)
SDS	dodecylsírán sodný (sodium dodecyl sulphate)
SLP	sacharosový lyzační pufr

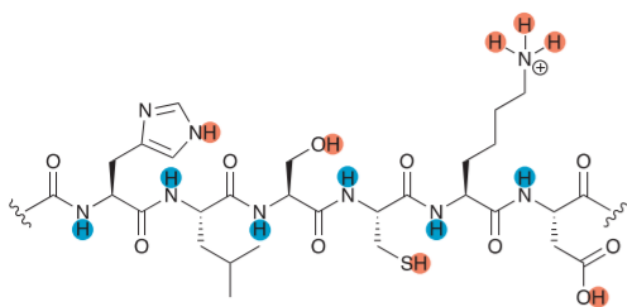
TCEP	Tris(2-karboxyethyl)fosfin
TEMED	1,2-bis(dimethylamino)-ethan (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UVPD	disociace pomocí laseru (ultraviolet photodissociation)

1. Úvod

1.1. Využití proteolýzy při studiu strukturních změn proteinů prostřednictvím vodík/deuteriové výměny

Proteasy neboli peptidázy jsou skupina enzymů, které katalyzují hydrolyzu amidových vazeb v peptidech a proteinech¹. Tato reakce se nazývá proteolýza, a kromě získávání živin je i důležitým regulačním mechanismem živých organismů. Má mnoho využití jak v průmyslu, tak v biotechnologiích. Můžeme se s ní setkat v potravinářství při výrobě sýrů² nebo fermentačních procesech³, ve farmacii se využívá například v podobě enzymatických koktejlů (Wobenzym) nebo při léčbě celiakie⁴. Proteolytické enzymy jsou také důležitým nástrojem proteomiky a metod strukturní biologie jako jsou limitovaná proteolýza⁵ nebo vodík/deuteriová (H/D) výměna⁶.

H/D výměna byla poprvé popsána Linderstrøm-Langem v roce 1954 laboratořích v Carlsbergu⁶. Rosa a Richards později ukázali, že proteiny označené tritiem je možné štěpit aspartátovou proteasou pepsinem za podmínek, které minimalizují pravděpodobnost zpětné výměny vodíku, a v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) pro separaci peptidových fragmentů tak docílit zvýšení prostorového rozlišení metody⁷. Tento přístup dále rozvedl Englander⁸ a následně Zhang a Smith popsali možnost spojení H/D výměny s metodou hmotnostní spektrometrie (MS)⁹.

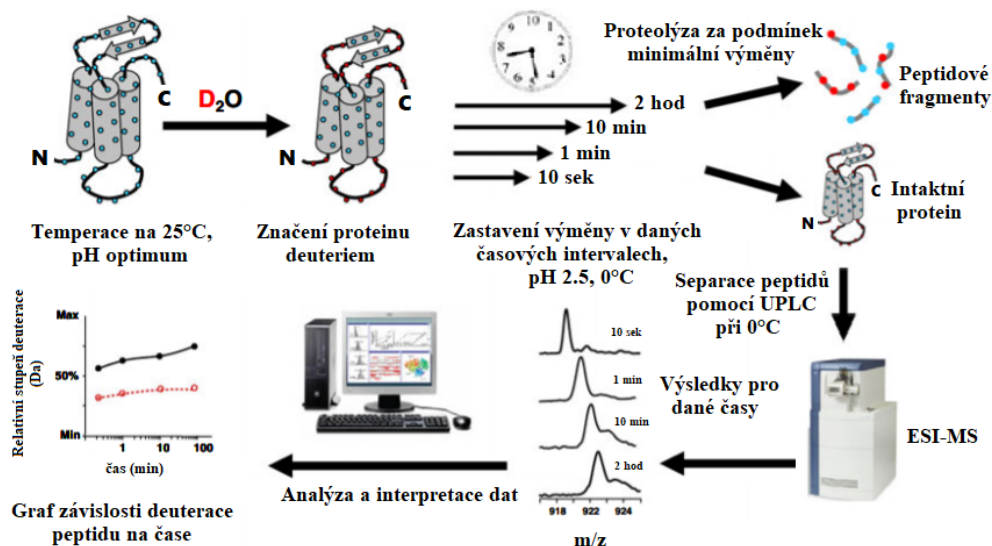


Obrázek 1: Vodíky peptidové páteře podléhající výměně za vodíky roztoku. Modře jsou zobrazeny amidové vodíky peptidové páteře, oranžově jsou vodíky postranních řetězců, vodíky navázané na uhlíky peptidové páteře nejsou zobrazeny. Převzato z Organesyan et al.: *Methods* (2018).

Samotná H/D výměna je technika strukturní biologie, která poskytuje informace o konformačních a strukturních změnách proteinů způsobených interakcemi proteinu s ligandem nebo změnou podmínek, ve kterých se protein nalézá¹⁰. Principem metody je sledování výměny amidových vodíků peptidové páteře (obr. 1) za deuterium z roztoku¹¹. Pro sledování

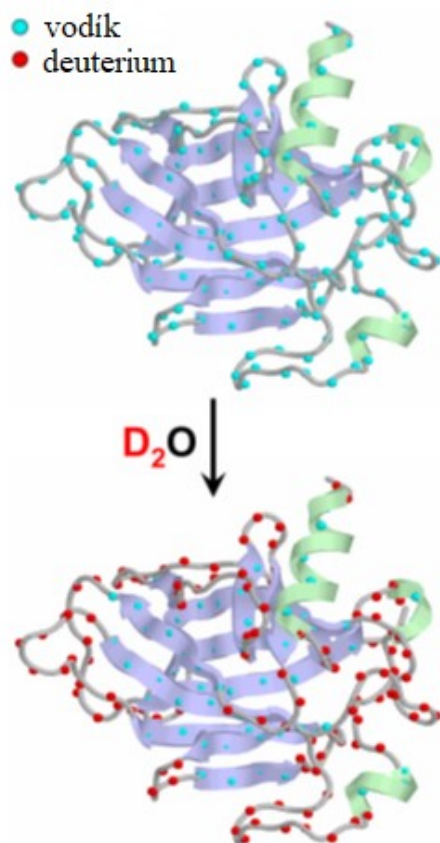
výměny se dnes využívá hmotnostní spektrometrie (MS) a nukleární magnetická resonance (NMR). NMR sice umožňuje zobrazení jednotlivých amidových vodíků, a má tedy výborné prostorové rozlišení, ale je omezena potřebou velkého množství vzorku zkoumaného proteinu, který musí mít vysokou koncentraci. Navíc je limitací velikost proteinu, neschopnost řešit větší proteinové komplexy a také nároky na složení pufru. Naproti tomu analýza pomocí MS (HXMS) vyžaduje jen malé množství vzorku, který může být i dosti ředěný (μM koncentrace), nemá prakticky limitace týkající se složení pufru ani velikosti proteinu. Nevýhodou však je menší prostorové rozlišení, jenž je určeno schopností proteolytického štěpení nebo fragmentace¹².

HXMS je vhodná pro studium proteinů, které neposkytují krystal, nebo velkých proteinových struktur jako jsou virové kapsidy¹³. Dále lze sledovat intermediáty proteinového skládání¹⁴, konformační změny proteinu při vazbě ligandů,¹⁵ mapování epitopů¹⁶, interakce mezi proteiny¹⁷, proteinů s membránou¹⁸ a proteinovou agregací nebo oligomerizací.¹⁹ Nejběžnějším provedením experimentu je kontinuální značení²⁰ (obr. 2), kdy je nejprve provedena inkubace proteinu v pufru obsahujícím D_2O při hodnotě pH vyhovující studovanému systému (nejčastěji pH 6,5 – 8,0). Ve zvolených časových



Obrázek 2: Schéma typického průběhu H/D experimentu při použití kontinuálního značení deuteriem následované analýzou a interpretací dat. Výměna je zahájena inkubací vzorku proteinu v pufru obsahujícím deuterium. V daných časových intervalech jsou odebírány alikvoty a výměna je zastavována snížením pH na hodnotu 2.5 a teploty na 0 °C, čímž dojde ke snížení rychlosti amidové výměny na minimum. Deuterovaný protein je za těchto podmínek pak buď přímo aplikován do hmotnostního spektrometru pro analýzu, nebo před hmotnostní analýzou štěpen pomocí kyselých proteasů a vzniklé peptidy separovány kapalinovou chromatografií. Převzato a upraveno z Marcisisin S.R et al.: *Anal. Bioanal. Chem.* (2010).

intervalech jsou odebírány vzorky a výměna je zastavována změnou pH na hodnotu 2,5 a snížením teploty na 0 °C nebo zmražením v tekutém dusíku. Při těchto podmínkách je provedeno proteolytické štěpení proteinu. Vzniklé peptidy jsou separovány prostřednictvím HPLC s reverzní fází (RP) a poté analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Tímto způsobem lze získat porovnání konformační dynamiky proteinu v různých stavech, jako například v přítomnosti ligandu a bez něj²¹.



Obrázek 3: Oblasti vystavené rozpouštědлу jsou deuterovány rychle, části proteinu nacházející se více uvnitř struktury jsou deuterovány pomaleji. Amidové vodíky, které nezodpovídají za tvorbu vodíkových vazeb a nacházejí se u povrchu proteinu, jsou za deuterium vyměněny rychleji než vodíky, které se podílejí na stavbě sekundární struktury. Převzato z Engen J. et al.: *Anal. Chem.* (2009).

Je několik faktorů, které H/D výměnu ovlivňují. Hodnoty pH a teploty jsou v průběhu experimentu udržovány konstantní. Proměnnými, na kterých pak výměna závisí, jsou přístupnost peptidového řetězce pro rozpouštědlo a zapojení vodíkových můstků. Pomalá rychlost výměny vypovídá o nepřístupnosti proteinu pro rozpouštědlo a/nebo přítomnosti vodíkových můstků, naopak pokud je protein dobře přístupný pro rozpouštědlo, výměna probíhá rychle (obr. 3). Vliv na rychlost H/D výměny mají také funkční skupiny postranních řetězců²².

Jak je ukázáno na obrázku 2 (str. 11), za účelem lokalizace změn na struktuře proteinu je prováděna proteolýza. To, jak je účinná a jaké fragmenty se generují, určuje prostorové rozlišení. Existují v zásadě tři způsoby fragmentace proteinového vzorku. Při použití metody fragmentace celého proteinu v plynné fázi, tzv. „top – down“ postupu, je podmínkou, aby byl zachován stav deuterace během ionizace a následné fragmentace. Při běžně používané metodě fragmentace, založené na kolizně indukované disociaci (tzv. CID), dochází k vibrační aktivaci proteinu a následkem toho k pomíchání vodíků a deuterií na proteinu (v anglickém originále jev označovaný jako scrambling). Proto není možné tuto techniku využít a je potřeba provádět disociaci pomocí

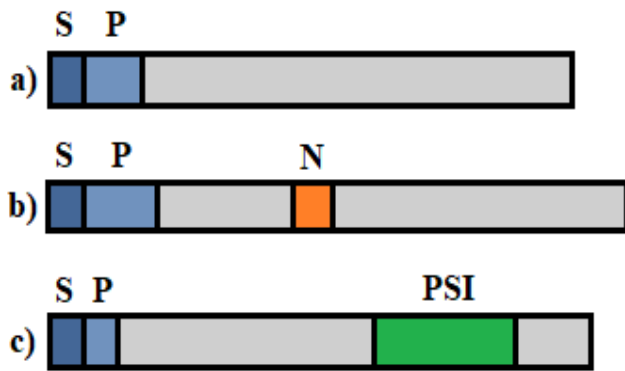
rychlých fragmentací, jako je přenos či záchyt elektronu (ETD, ECD) nebo disociaci pomocí UV laseru (UVPD). Ke zjištění, že nedochází během fragmentace k aktivaci a pomíchání vodíků a deuterií a také pro naladění „měkkých“ podmínek desolvatace a transferu iontů uvnitř spektrometru, byla vyvinuta speciální peptidová sonda s predikovatelným vzorcem deuterace²³.

Druhou možností je fragmentace proteinu na peptidy tzv. „bottom – up“ postup. Při tomto uspořádání dochází k zastavení H/D výměny, vzorek je vystaven online nebo offline štěpení následovanému separací peptidů prostřednictvím kapalinové chromatografie před vlastní hmotnostní analýzou. Offline štěpení probíhá v roztoku inkubační vzorku s proteasou za podmínek minimální výměny. Při online štěpení je proteasa imobilizována na částicích chromatografického nosiče a protein je štěpen při průchodu skrz kolonku naplněnou tímto nosičem. Tento přístup má několik výhod, jako je zvýšená stabilita použité proteasy, poměrně omezená autodigestce a v porovnání se štěpením v roztoku také větší lokální poměr enzymu ku štěpenému proteinu²⁴. Je také možné snadno měnit podmínky digestce mírnými (s HXMS kompatibilními) změnami teplot nebo změnou průtoku.

Třetím způsobem fragmentace je postup kombinující oba výše zmíněné přístupy a označovaný jako „middle – down“. Využívá proteolytické štěpení na delší fragmenty, které jsou následně podrobeny fragmentaci v plynné fázi. Obvykle je využíván pro studium proteinů, které by pro fragmentaci pomocí ETD byly příliš velké²⁵.

1.2. Aspartátové proteasy v experimentech H/D výměny

Aspartátové proteasy (EC 3.4.23) jsou široce rozšířená skupina proteolytických enzymů, které lze najít ve virech, bakteriích, kvasinkách, rostlinách, houbách a také v živočiších^{26–28}. Dle databáze MEROPS se dělí do několika rodin²⁹. Aspartátové proteasy jsou exprimovány v podobě neaktivních zymogenů. Ty obsahují signální peptid, který je odštěpen během maturace enzymu. Poté následuje autoaktivace v kyselém prostředí odštěpením prosequence³⁰. Takto aktivovaná proteasa má dvě domény, mezi nimiž se nachází aktivní místo s aspartátovými zbytky, Asp³² a Asp²¹⁵ (číslování podle pepsinu), které zodpovídají její za katalytickou aktivitu³¹. Stavba aspartátových proteas je schematicky znázorněna na obrázku 4 (str. 14).



Obrázek 4: Schéma sekvence prasečího pepsinu (a), nepenthesinu (b) a rostlinné proteasy vakuolárního původu (c). V obrázku označuje (S) signální peptid, (P) propeptid, (N) je NAP – specifický segment nepenthesinů a u vakuolární proteasy je zeleně označen (PSI) specifický insert rostlin.

míry redundance, tj. že daná oblast je pokryta více peptidy, které se vzájemně překrývají. Bohužel, ne u všech proteinů se daří s pomocí pepsinu dosáhnout všech těchto požadavků. Použitím proteas s jinou specifitou štěpení, ať už samostatně nebo v kombinaci s pepsinem lze však lepšího prostorového rozlišení a pokrytí sekvence docílit³³. Mezi již využívané proteasy patří například aspergillopepsin (proteasa typ XIII z *Aspergillus saitoi*)³⁴, rhizopuspepsin (proteasa typu XVIII z druhu *Rhizopus*)³⁵ nebo nepenthesiny³⁶ či plasmapepsin 2³⁷.

1.2.1. Rostlinné aspartátové proteasy

Aspartátové proteasy nacházející se u rostlin mají mnoho funkcí, například se podílejí na mobilizaci a degradaci proteinů při klíčení semen³⁸. Tyto proteasy byly izolovány z různých rostlin včetně ječmene³⁹, pšenice⁴⁰, a dalších. Obecně u nich lze pozorovat velkou podobnost s živočišnými proteasami. Oproti nim však mají několik specifických strukturních a sekvenčních odlišností. Zatímco prosegment o přibližné délce 40 aminokyselin je přítomen u všech aspartátových proteas a podílí se buď na jejich inaktivaci, nebo správném sbalení a na stabilitě⁴¹, pro proteasy rostlinného původu je typická přítomnost ještě specifického insertu (PSI), který má délku zhruba 100 aminokyselin⁴². Aktivace rostlinných aspartátových proteas probíhá také jinak než u živočišných. Zde začíná odštěpením signální sekvence při translokaci do lumen endoplazmatického retikula, dále dochází k odštěpení prosegmentu a úplnému nebo částečnému odstranění vnitřního PSI⁴³.

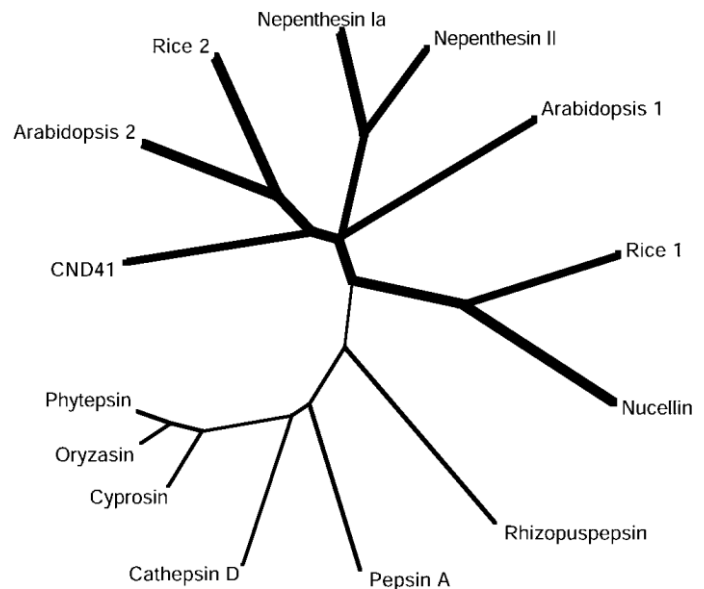
V experimentech H/D výměny je třeba provést proteolytické štěpení při podmínkách minimální výměny. Z tohoto důvodu je možné použít jen proteasy, které jsou schopné štěpit při nízkém pH a teplotě. Nejčastěji se využívá pepsin³². Cílem je získat plné pokrytí sekvence peptidy a zároveň obdržet peptidy, jejichž délka je optimálně mezi 6-12 aminokyselinami. V neposlední řadě je výhodou, pokud je dosaženo vyšší

Specifický insert rostlin se skládá z pěti amfipatických α -helixů, které jsou sbaleny do kompaktní globulární domény a navzájem propojeny pomocí tří disulfidových můstků⁴⁴. Samotná úloha insertu nebyla dosud zcela objasněna⁴⁵. Experimenty s mutantními aspartátovými proteasami bez PSI naznačují, že se insert nepodílí na katalytické aktivitě proteasy, ovšem má vliv na autolýzu⁴⁶. Také hraje roli při transportu proenzymu do vakuoly⁴⁷.

1.2.2. Nepenthesiny

Nepenthesiny (EC 3.4.23.12) patří do rodiny pepsinu podobných aspartátových proteas (obr 5.) produkovaných sekrečními žlázami v láčkách masožravých rostlin rodu *Nepenthes*⁴⁸.

U nepenthesinů se nevyskytuje PSI. Namísto toho mají tyto proteasy vlastní specifický insert, NAP-specifický segment (NAP - nepenthesinový-typ aspartátové proteasy). Díky němu jsou poměrně stabilní při různém pH a teplotě⁴⁹. Pro stabilitu nepenthesinu jsou také zásadní disulfidové můstky. Toto je

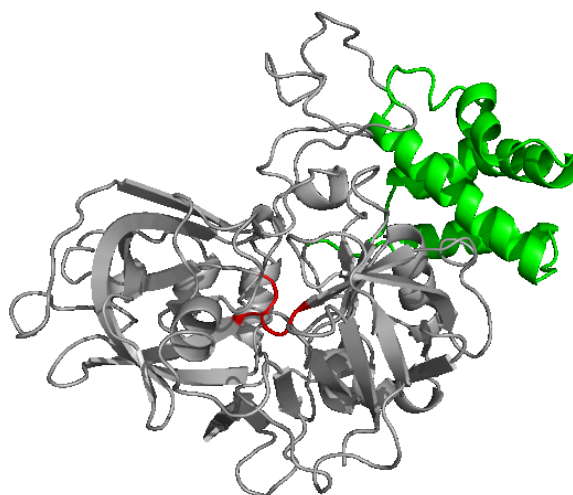


Obrázek 5: Fylogenetický strom pro nepenthesiny a příbuzné aspartátové proteasy. Tenká linka znázorňuje pepsinu podobné proteasy, širší potom proteasy podobné nepenthesinu. Převzato z S. Athauda et al.: Biochem. J. (2004).

velmi zřetelné pro Nepenthesin I, který je snadno denaturován guanidinem a v přítomnosti redukčních činidel zcela ztrácí aktivitu.^{36,49} Tomu se však dá v experimentech H/D předejít imobilizací na koloně⁵⁰. Využití Nepenthesinů pro proteolytické štěpení proteinů při H/D je vhodná alternativa k pepsinu pro proteiny, které se touto proteasou štěpí obtížně⁵¹.

1.3. Oryzasin 1

Oryzasin 1 (obr 6.) je aspartátová proteasa vakuolárního původu. Nachází se v semenech rýže, ze kterých ho lze získat ve formě extraktu. Jedná se o protein, který obsahuje 509 aminokyselin, a to včetně signálního peptidu a propeptidové sekvence, které se skládají z 20, respektive 47 aminokyselin



(obr 7). Gen pro Oryzasin 1 má 6.6 kbp a obsahuje 14 exonů a 13 intronů. Oryzasin 1 vykazuje velkou strukturní

Obrázek 6: Homologní model znázorňující strukturu Oryzasinu 1. Zeleně je označen PSI, červeně propeptid. Vytvořeno pomocí programu PyMOL.

podobnost k aspartátové protease pocházející ze semen ječmene (HvAP) a cyprosínu, což je proteasa původem z artyčoku. Stejně jako tyto proteasy rostlinného původu lze i u Oryzasinu 1 najít PSI segment poblíž C – konce proteinu. Oryzasin 1 je inhibován pepstatinem, ovšem u jiných proteasových inhibitorů nebyl pozorován žádný vliv na jeho katalytickou aktivitu. Jeho pH optimum pro hydrolýzu je 3.0⁵². Podle silné exprese mRNA Oryzasinu 1 během ranných fází klíčení rýžových semen panuje názor, že jeho katalytická aktivita souvisí s degradací zásobních proteinů za zisku energie, i když jeho cílové proteiny zatím nebyly identifikovány⁵³.

```
MGTRSVALVLLAAVLLQALLPASAAEGLVRIALKKRPIDENSRVAARLSGEEGARRLGLR 60
GANSLGGGGEGDIVALKNYMNAQYFGEIGVGTTPPQKFTVIFDTGSSNLWVPSAKCYFSI 120
ACFFHSRYKSGQSSTYQKNGKPAAIQYGTGSIAGFFSEDSVTVGDLVVKDQEFIEATKEP 180
GLTFMVAKFDGILGLGFQEISVGDAVPVWYKMVEQGLVSEPVSFWFNHSDEGEGGEIV 240
FGGMDP SHYKGNHTYVPVSQKGYWQFEMGDVLIGGKTTGFCASGCSAIA DSGT SLLAGPT 300
AIITEINEKIGATGVVSQECKTVVSQYGQQLDLLLLAETQPSKICSQVGLCTFDGKHGVS 360
AGIKSVVDDEAGESNGLQSGPMCNAEMAVVWMQNQLAQNKTDLILNYINQLCDKLPSP 420
MGESSVDCGSLASMP EISFTIGGKKFALKPEEYILKVGEGAAAQCISGFTAMDIPPPRGP 480
LWILGDVFMGAYHTVFDYGMKRVGFAKSA 509
```

Obrázek 7: Sekvence Oryzasinu 1. Šedě je na začátku označen signální peptid, červeně je propeptid, který je odštěpen při vzniku aktivní formy proteasy, katalytické Asp v triádě DTG (případně DSG) jsou žlutě, PSI je zeleně a podtržené je označeno N-glykosylační místo.

2. Cíl práce

- Zjistit optimální podmínky pro heterologní expresi Oryzasinu 1 v *E. coli*
- Připravit Oryzasin 1 v solubilní podobě nebo izolovat inkluzní tělíska pro *in vitro* renaturaci

3. Experimentální část

3.1. Materiál

3.1.1. Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy ML104/01 Mettler Toledo, Švýcarsko
- Automatické pipety Gilson, USA
- Centrifuga Avanti J-30 I Beckman Coulter, USA
- Centrifuga Spectrafuge 16M Labnet, USA
- Fotodokumentační systém ChemiDoc MP Bio-Rad, USA
- Hmotnostní spektrometr MALDI TOF/TOF Bruker Daltonics, Německo
AutoFlex
- Inkubátor s třepačkou Multitron Pro Infors HT, Švýcarsko
- Magnetická míchačka Stuart CB161 Keison, USA
- Minitřepačka MS 3 IKA, Německo
- pH metr Thermoscientific, USA
- Předvážky HF 1200G AND, USA
- Sonikační lázeň Elmasonic S 30 H Elma, Německo
- Sonikační sonda Ultrasonic Cole-Pharmer, USA
Homogeniser 4710
- Souprava pro SDS-PAGE Bio-Rad, USA
- Spektrometr DeNovix DS-11 DeNovix, USA
- Stolní centrifuga MiniSpin Eppendorf, Německo
- Termostat s třepačkou Thermomixer comfort Eppendorf, Německo
- Vakuová odparka SpeedVac Jouan, Francie
- Vortex Scientifica, Itálie
- Zdroj napětí EPS 500/400 Pharmacia, USA

3.1.2. Chemikálie

- 1,2-bis(dimethylamino)-ethan (TEMED) Sigma-Aldrich, USA
- 1,4-dithiothreitol (DTT) Sigma-Aldrich, USA
- 2-merkaptoethanol Sigma-Aldrich, USA

• Acetonitril	Merck, Německo
• Agar	Oxoid, USA
• Agarosa	Serva, Německo
• Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
• Ampicilin	Jersey Lab Supply, USA
• Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
• Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich, USA
• Dodecylsírán sodný (SDS)	Bio-Rad, USA
• Ethanol	Lach-ner, ČR
• Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, USA
• Glycerol	Lach-ner, ČR
• Hydrogen uhličitán amonný (AMBIC)	Sigma-Aldrich, USA
• Chlorid hořečnatý	Lach-ner, ČR
• Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich, USA
• Kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (CCA)	Sigma-Aldrich, USA
• Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)	Lachema, ČR
• Kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR
• Kyselina octová	Lach-ner, ČR
• Leupeptin	Sigma-Aldrich, USA
• Methanol	Lach-ner, ČR
• Peroxodisírán amonný	Sigma-Aldrich, USA
• Sacharosa	Lachema, ČR
• Tetracyklin hydrochlorid	Sigma-Aldrich, USA
• Tris	Sigma-Aldrich, USA
• Tris(2-karboxyethyl)fosfin (TCEP)	Sigma-Aldrich, USA
• Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
• TRIZMA Base	Sigma-Aldrich, USA
• Unstained Protein MW Marker	Thermo Scientific, USA
• Voda (LC/MS čistota)	Merck, Německo

3.1.3. Enzymy

- DNasa I Sigma-Aldrich, USA
- RNasa I Sigma-Aldrich, USA
- Trypsin Promega, Švýcarsko

3.1.4. Vektory

- pGEX-5X-2 obsahující gen pro Oryzasin 1 Novagen, USA
(dr. T. Asakura, Japonsko)

3.1.5. Bakteriální kmeny

- *E. coli* BL21-Gold (DE3) Stratagene, USA
Genotyp: F⁻ *ompT hsdS*(rB⁻ mB⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA* Hte

3.1.6. Pufry, roztoky a média

- **Akrylamidová směs pro SDS-PAGE (30%):** 70 % (v/v) H₂O, 29 % (w/v) akrylamid, 1 % (w/v) N,N-methylen-bis-akrylamid
- **alkylační činidlo pro identifikace proteinů z gelu:** 30 mM IAA (2- Iodoacetaamid) v 250 μl destilované vody za vzniku 300 mM roztoku, 10 μl tohoto roztoku přidáno 90 μl k 50 mM AMBIC
- **Barvicí roztok pro SDS-PAGE gely:** 45 % (v/v) methanol, 10 % (v/v) kyselina octová, 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
- **Detergentový pufř pro izolaci inkluzních tělísek:** 0,5 % (w/v) triton X-100, 50 mM Tris-HCl Base, 100 mM NaCl, 1 mM 2-merkaptoethanol, 1 mM NaN₃; pH 7,4
- **LB agar:** 1,25 % (w/v) agar v LB médiu
- **LB médium:** 1 % (w/v) trypton, 0,5 % (w/v) kvasničný extrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,4
- **Odbarvovací roztok pro SDS-PAGE gely:** 55 % H₂O, 35 % ethanol, 10 % kyselina octová
- **Pufř pro izolaci inkluzních tělísek:** 50 mM Tris-HCl Base, 100 mM NaCl, 1 mM 2-merkaptoethanol, 1 mM NaN₃; pH 7,4

- **Sacharosový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek:** 25 % (w/v) sacharóza, 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM 2-merkaproethanol, 1 mM NaN₃, pH 7,4
- **Elektrodový SDS pufr:** 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE:** 50 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) glycerol, 4 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, 100 mM DTT, pH 6,8

3.2. Metody

3.2.1. Transformace kompetentních buněk

Aby bylo možné Oryzasin 1 efektivně produkovat, bylo nejprve potřeba plazmid pGEX-5X-2 obsahující jeho genetickou informaci vnést do bakteriálních kompetentních buněk, *E. coli* BL21 – Gold(DE3). Tento proces se nazývá transformace a zde bylo využito metody tzv. tepelného šoku, kdy působením vyšší teploty dojde k destabilizaci a zvýšení propustnosti cytoplazmatické membrány.

Tři zkumavky se 100 μ l kompetentních buněk byly vyjmuty z mrazicího boxu a ponechány rozmraznout na ledu. Po jejich úplném rozmrznutí k nim bylo přidáno po 20 μ g plazmidové DNA. K dispozici byl originální plazmid získaný z laboratoře dr. Tomiko Asakury (Atomi Junior College, Tokio, Japonsko) a dvě šarže plazmidu namnoženého v laboratoři. Všechny vzorky byly inkubovány 20 minut na ledu a následně podrobeny tepelnému šoku při teplotě 42 °C po dobu 45 sekund. Poté byly vzorky vráceny zpět na led a po 2 minutách bylo ke každému přidáno 900 μ l sterilního LB média. Vzorky byly inkubovány 1 hodinu při 37 °C a 220 RPM a poté centrifugovány 5 minut při 5000 \times g na stolní centrifuze. Po odstředění bylo ze zkumavek pomocí pipety odstraněno zhruba 700 μ l supernatantu a ve zbytku byly resuspendovány získané pelety. Z tohoto objemu bylo od každého vzorku nanášeno 30 μ l na Petriho misku s agarem obsahujícím ampicilin (amp) o finální koncentraci 100 μ g/ml a tetracyklin (tet) o koncentraci 12,5 μ g/ml a rovnoměrně rozetřeno pomocí skleněné hokejky. Misky byly ponechány inkubovat přes noc při 37 °C. Z nich byly potom vybrány pro přípravu stacionárních kultur vhodně narostlé kolonie, které byly přeneseny do sterilních zkumavek obsahujících 5 ml LB média s antibiotiky (amp, tet) a opět inkubovány přes noc při teplotě 37 °C a 220 RPM.

3.2.2. Výběr vhodných produkčních klonů

Pro produkci požadovaného proteinu bylo třeba k buňkám přidat induktor exprese. Zde byl použit isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG). Jedná se o látku podobnou allolaktose, která svou vazbou na *lac* represor zabraňuje jeho vazbě na *lac* operon a RNA polymeráza tak může zahájit transkripci. Na rozdíl od allolaktosy je však IPTG nemetabolizovatelný a jeho hladina tak zůstává po celou dobu produkce konstantní.

Z kultur připravených v předchozí kapitole byla vždy vybrána jedna reprezentující jednu šarži výchozího plazmidu a tou byly v poměru 1:100 zaočkovány 2 ml LB média

obsahujícího ampicilin a tetracyklin. Od každé stacionární kultury byly připraveny dva vzorky (indukovaný a neindukovaný), které byly inkubovány při 37 °C na 220 RPM po dobu 1,5 hodiny. Poté byl ke vzorkům přidán 1 mM IPTG a všechny zkumavky (včetně neindukovaných) byly inkubovány 2 hodiny za stejných podmínek jako při předchozí inkubaci. Následně byly všechny buněčné suspenze převedeny do mikrozkuvek a centrifugovány po dobu 5 minut při 10 000× g. Pomocí vakua byl odsán supernatant a pelety resuspendovány ve 100 µl redukujícího SDS vzorkového pufru. Takto připravené vzorky byly 5 minut povařeny, vzápětí centrifugovány za stejných podmínek jako v předchozím případě a analyzovány pomocí SDS elektroforézy. Do jamek bylo aplikováno 10 µl každého vzorku.

3.2.3. Diskontinuální polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného

Fúzní protein Oryzasin 1 s glutathion-S-transferasou na N-konci má velikost zhruba 80 kDa. Proto byl použit 10 % separační polyakrylamidový gel a 5 % zaostřovací gel. Gely byly namíchány dle protokolu (tab. 1, str. 24). Nejprve byla pečlivě očištěna skla pro SDS elektroforézu, ta byla upevněna do aparatury a mezi ně nanesen separační gel, který byl převrstven destilovanou vodou. Voda pak byla odlita a gel byl převrstven roztokem pro 5 % zaostřovací gel. Do něj byl zasunut hřeben, který byl po zatuhnutí gelu odstraněn. Takto připravený gel byl přemístěn do aparatury naplněné Tris-glycinový elektrodočným pufrem a jamky byly naplněny vzorky spolu s proteinovým standardem molekulových hmotností. Separace proteinů byla zahájena připojením aparatury ke zdroji konstantního proudu, který byl ze začátku nastaven na 15 mA na jeden gel, po zaostření vzorků na hranici 10 % separačního gelu byl proud zvýšen na 25 mA na gel. Elektroforetická separace byla zastavena, když čelo doputovalo ke spodnímu okraji skel.

Tabulka 1: Složení gelů pro SDS elektroforézu. Ve všech případech se jednalo o gely o tloušťce 1,0 mm

	10% separační gel [10 ml]	5% separační gel [3 ml]
H₂O	4,0	2,1
30 % akrylamid	3,3	0,5
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5	-
0,5 M Tris, pH 6,8	-	0,38
10 % SDS	0,1	0,03
10 % APS	0,1	0,03
TEMED	0,004	0,003

Pro vizualizaci proteinů v gelu bylo provedeno barvení roztokem Coomasie Brilliant Blue R-250, které trvalo 15 minut. Gely byly následně odbarveny pomocí odbarvovacího roztoku.

3.2.4. Ověření produkovaného proteinu

Poté co bylo elektroforézou ověřeno, že dochází k produkci proteinu, bylo pomocí hmotnostní spektrometrie ověřeno, zda je protein produkován v předpokládané formě. Hmotnostní spektrometrie (MS) je velmi citlivý nástroj pro analýzu biomolekul, který poskytuje velice přesné stanovení molekulové hmotnosti zkoumaných látek. V našem konkrétním případě byla využita technika ionizace/desorpce laserem za přítomnosti matrice (MALDI) ve spojení s průletovým analyzátozem (TOF).

Pro analýzu pomocí techniky ionizace MALDI je vzorek nejprve rozpuštěn pomocí vhodného rozpouštědla a smísen s vhodnou maticí, nejčastěji s aromatickou kyselinou. Směs je nanesena na kovový MALD terčík, který je po odpaření rozpouštědla a vzniku krystalů vložen do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Molekuly proteinů jsou následně převedeny do plynné fáze pomocí laserového pulzu, při jehož vlnové délce matrice absorbuje záření. Dochází ke vzniku jednonásobně nabitých iontů analytu. Po ionizaci jsou ionty fokusovány do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány podle poměru m/z ⁵⁴.

3.2.4.1. Identifikace proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Z obou polyakrylamidových gelů z předchozího kroku (kapitola 3.2.3.) byla pomocí skalpelu vyříznuta oblast odpovídajícímu produkovanému proteinu. Tento kus gelu byl dále rozřezán na kostky o hraně přibližně 0,5 - 1 mm a ty byly přeneseny do mikrozkušavek se 100 μ l 50 mM AMBIC, pH 8,5 a 100 μ l acetonitrilu. Mikrozkušavky s gelem byly sonikovány dokud, nedošlo k jejich úplnému odbarvení. Následně byl roztok z mikrozkušavek odstraněn a kousky gelu byly vysušeny ve 100 μ l acetonitrilu. Obsah zkušavek byl pečlivě promíchán a acetonitril odebrán. Poté byla provedena redukce cysteinů pomocí redukčního činidla TCEP. Do obou mikrozkušavek bylo přidáno 50 μ l 20 mM TCEP ve 100 mM Tris pufru, pH 8,5. Tato směs byla zahřáta na teplotu 80 °C po dobu 10 minut. Roztok byl odstraněn, gel dehydratován pomocí acetonitrilu dle postupu uvedeného výše a následovalo 30 minut inkubace ve 100 μ l alkylačního činidla (30 mM IAA) ve tmě při laboratorní teplotě. Po dokončení inkubace bylo alkylační činidlo odebráno, přidáno bylo 100 μ l acetonitrilu pro dehydrataci gelu, a byl roztok opět odebrán. Gely v obou mikrozkušavkách byly promyty 200 μ l vody (LC/MS čistota), sonikovány po dobu 3 minut, a roztok byl odebrán. Následoval přidavek 200 μ l acetonitrilu a opět sonikace. Tento krok byl zopakován ještě jednou. Nakonec bylo do mikrozkušavek přidáno po 200 μ l 50 % acetonitrilu v LC/MS vodě. Opět byla provedena sonikace a odsátí roztoku, následované vysušením gelu na vakuové odparce. Pro proteolytické štěpení trypsinem bylo ke každému vzorku přidáno 30 μ l 50 mM AMBIC o pH 8,5 s 10 % acetonitrilem a 0,2 μ g trypsinu. Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C a ihned po jeho dokončení byla provedena MALDI-TOF analýza. Vzorek byl nanesen na MALDI terč a po zaschnutí převrstven v poměru 1:1 roztokem kyseliny α -kyano-4-hydroxyskořicové. Spektra byla naměřena v pozitivním iontovém módu v hmotnostním rozsahu 500-6000 Da. Data byla vyhodnocena programem mMass⁵⁵.

3.2.5. Nalezení optimálních produkčních podmínek

Nejprve byla stanovena optimální koncentrace induktoru IPTG. Do deseti sterilních zkušavek byly pipetovány 2 ml LB média (amp, tet), do nichž byla v poměru 1:100 inokulována stacionární kultura, která byla na základě testu exprese (kapitola 3.2.2.) zvolena jako vhodný produkční klon. Vzorky byly inkubovány 1,5 hodiny při 37 °C a 220 RPM. Poté k nim byl přidán induktor IPTG o různých koncentracích (0 mM; 0,1 mM; 0,2 mM;

0,5 mM a 1 mM) a byly inkubovány další 2 hodiny. Po dokončení inkubace bylo od každého vzorku odebráno 0,5 ml do mikrozkuhavky, a tento objem byl zpracován jako v případě popsaném v kapitole 3.2.2., aby mohl být nanesen na elektroforézu.

Dále byla hledána optimální doba pro produkci Oryzasinu 1. Stejným vzorkem stacionární bakteriální kultury jako v předchozím případě bylo v poměru 1:100 bylo zaočkováno 100 ml LB média (amp, tet) v Erlenmeyerově baňce. Zaočkované LB médium bylo inkubováno 1,5 hodiny při 37 °C a 220 RPM. K médiu bylo napipetováno 10 µl induktoru do finální koncentrace 0,1 mM a po krátkém promíchání byl do mikrozkuhavky odebrán 1 ml pro elektroforetickou analýzu. Bakteriální buňky s IPTG byly dále inkubovány při 37 °C a 220 RPM. Další vzorky byly odebrány po 1, 2, 4 a 5 hodinách produkce, poslední potom po inkubaci přes noc. Všechny odebrané vzorky byly dále zpracovány podle protokolu pro elektroforetickou analýzu (kapitola 3.2.3.). Nanáška byla ve všech případech 10 µl.

3.2.6. Velkoobjemová produkce proteinu a izolace inkluzí

Pro přípravu inkluzních tělísek byla použita stejná stacionární kultura jako v případě hledání optimální koncentrace a doby produkce proteinu. Z ní byly připraveny čerstvé stacionární kultury tak, že do dvou sterilních zkumavek bylo pipetováno 5 ml LB média (amp, tet), ke kterým byla poté přidána daná stacionární kultura v poměru 1:2500. takto zaočkované LB médium bylo ponecháno inkubovat přes noc při 37 °C a 220 RPM

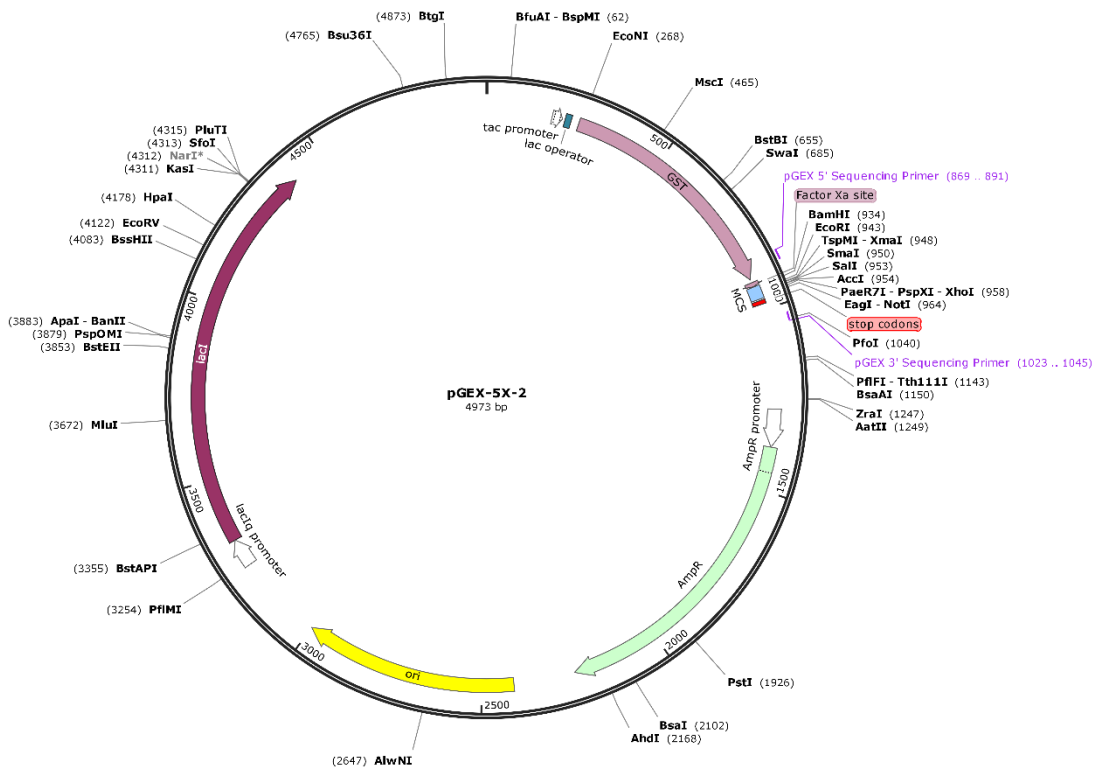
Čerstvou noční stacionární kulturou byly v poměru 1:500 zaočkovány čtyři dvoulitrové Erlenmayerovy baňky naplněné 500 ml LB média (amp, tet) a inkubovány 2 hodiny při 37 °C a 220 RPM. Po dvou hodinách, kdy optická denzita měřené při vlnové délce 660 nm dosáhla hodnoty 0,8, byl přidán induktor IPTG o finální koncentraci 0,1 mM. Následně byly kultury inkubovány po dobu dalších 5 hodin. Po dokončení produkce byly kultury stočeny na centrifuze při 14 000× g.

Po odstranění supernatantu byly rozpuštěny v sacharosovém lyzačním pufru (SLP) s přidanými inhibitory proteas, 1 µM leupeptinem a 1 mM fenylmethylsulfonyl fluoridem (PMSF). Poměr pro resuspendování pelet byl 20 ml lyzačního pufru na peletu pocházející z 0,5 l produkčního média. V tomto stavu byly vzorky zmrazeny na -80 °C, následně rozmrazeny na vodní lázni při 37 °C, a poté opět zamrazeny na -80 °C po dobu 30 minut. Tento cyklus byl opakován celkem čtyřikrát.

Do předem zvážených kyvet byl ke každému lyzátu přidán 20 mM MgCl₂, 20 μl DNasy I (zásobní koncentrace 1 U/μl) a 5 μl RNasy I (zásobní koncentrace 10 mg/ml). Kyvety byly sonikovány na ledu, každá po dobu 15 minut. Po ukončení sonikace byl z každé kyvety odebrán vzorek o objemu 10 μl. Se všemi kyvetami byla provedena centrifugace při 14 000× g a 4 °C, která trvala 20 minut. Ze stejné kyvety bylo odebráno 10 μl supernatantu do mikrokumavky a pelety následně resuspendovány ve 20 ml SLP s detergentem a s přidavkem inhibitorů proteas (leupeptin, PMSF). Obě kyvety byly sonikovány za stejných podmínek jako při sonikaci předchozí po dobu 1 minuty. Opět byl odebrán z jedné z kyvet vzorek o stejném objemu. Následovalo stočení kyvet na centrifuze za stejného nastavení, odebrán vzorek supernatantu. Na závěr byly vzniklé pelety stejným způsobem promyty ve 20 ml promývacího pufru bez detergentu s přidávanými inhibitory proteas (leupeptin, PMSF). Následovala centrifugace za totožných podmínek. Poté byl odebrán veškerý supernatant, kyvety zváženy a inkluze uskladněny v mrazicím boxu při -80 °C. Vzorky odebírané v průběhu velkoprodukce a izolace inkluzních tělísek byly pro nanesení na SDS elektroforézu zpracovány výše uvedeným způsobem.

4. Výsledky

V této práci bylo pracováno s vektorem pGEX-5X-2 (obr. 8), do kterého byla přes restriční místa *XmaI* a *XhoI* vložena sekvence pro Oryzasin 1 (přístupový kód do databáze Uniprot – Q42456). Tím vznikl fúzní protein spojující glutathion-S-transferasu (GST) a Oryzasin 1 (GST-Ory1). Vzniklý fúzní protein má zásahové místo pro faktor Xa.

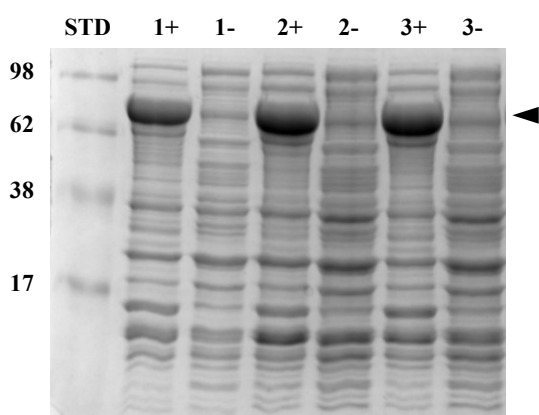


Obrázek 8: Plazmid pGEX-5X-2. Do tohoto vektoru byl vložen analyzovaný fúzní protein.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVCLT
 QSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLK M
 FEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKY
 IAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLI EGRGIPGIPGASAEGLVRIALKKRPIDENS RVAARLSGEEG
 ARRLGLRGANSLGGGGEGDIVALKNYMNAQYFGEIGVGTTPPQKFTVIFDTGSSNLWVPSAKCYFS
 IACFFHSRYKSGQSSTYQKNGKPAAIQYGTGSIAGFFSEDSVTVGDLVVKDQEFIEATKEPGLTFM
 VAKFDGILGLGFQEISVGDVAVPVWYKMVEQGLVSEPVVFSFWFNHRSDEGEGGEIVFGGMDPSHYKG
 NHTYVPVSQKGYWQFEMGDVLIGGKTTGFCASGCSAIADSGTSLLAGPTAIITEINEKIGATGVVS
 QECKTVVSQYQQIIDL LLAETQPSKIC SQVGLCTFDGKHGVSAGIKSVVDDEAGESNGLQSGPMC
 NACEMAVVWMQNQLAQNKTDLILNYINQLCDKLPSPMGESSVDCGSLASMP EISFTIGAKKFALK
 PEEYILKVGEGAAAQCISGFTAMDIPPRGPLWILGDVFMGAYHTVFDYGMKRVGFAKSA

Obrázek 9: Sekvence fúzního proteinu GST-Ory1. Modře je označena sekvence glutathion-S-transferasy (GST), tučně je vyznačen linker obsahující zásahové místo pro faktor Xa (podtrženo). Zbytek sekvence (bez označení) přísluší samotnému Oryzasinu 1.

4.1. Výběr vhodných produkčních klonů na základě SDS elektroforézy

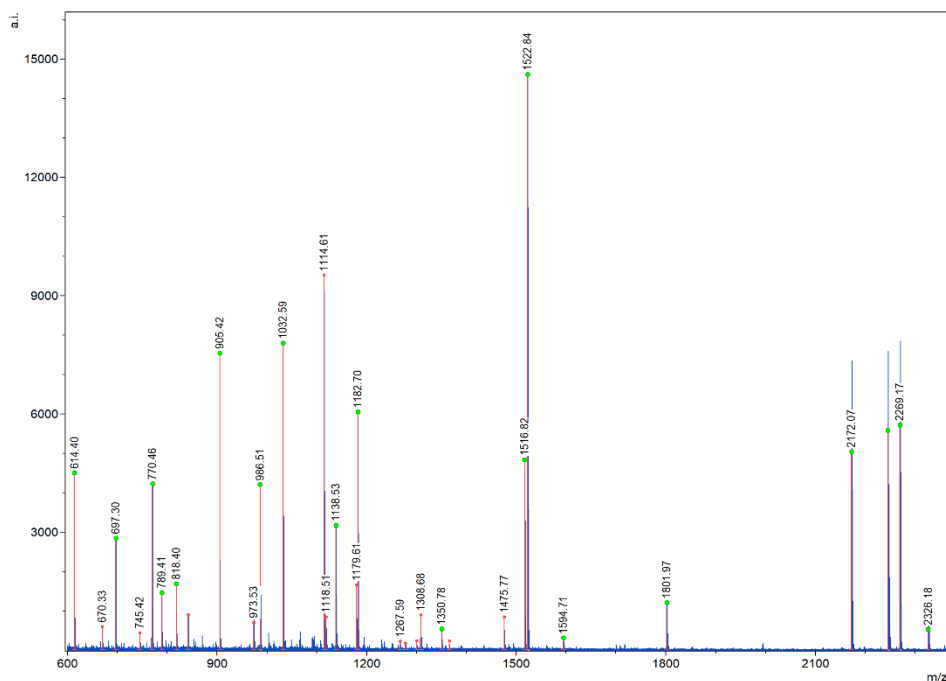


Obrázek 10: SDS elektroforéza pro výběr vhodných produkčních klonů. Dráha (STD) obsahuje standard, jeho molekulové hmotnosti (v kDa) jsou vyznačeny vlevo. Dráhy (1) až (3) potom vzorky vybraných stacionárních kultur. Označení (+) je pro vzorek s induktorem, (-) bez induktoru.

Pro výběr vhodného produkčního klonu byly vzorky zpracovány postupem uvedeným v části 3.2.2. Jednalo se o vzorky stacionárních kultur připravených z různých kolonií buněk. Z výsledků SDS elektroforézy (obr. 10) bylo zřejmé, že u indukovaných kultur byl protein produkován. V plazmidu obsažený fúzní protein má přibližně 80 kDa, čemuž odpovídají i mobility silných pruhů v drahách vzorků s přidavkem induktoru.

4.2. Ověření identity produkovaného proteinu prostřednictvím peptidového mapování

Proužek v gelu odpovídající mobilitou fúznímu proteinu GST-Ory 1 byl vyřezán, protein byl redukován a alkylován dle postupu v kapitole 3.2.4.1. a následně štěpen trypsinem. Vzniklé peptidy byly analyzovány pomocí MALDI-TOF (kapitola 3.2.4.) a spektra interpretována pomocí programu mMass (obr 11, str. 30). Bylo ověřeno výsledné pokrytí sekvence, které dokládá, že fúzní protein je produkován ve správné sekvenci i délce s GST kotvou na svém N-konci (obr. 12, str. 30). Na základě těchto výsledků bylo možné pokračovat v další práci s daným produkčním klonem a přejít k hledání optimálních podmínek pro produkci Oryzasinu 1.



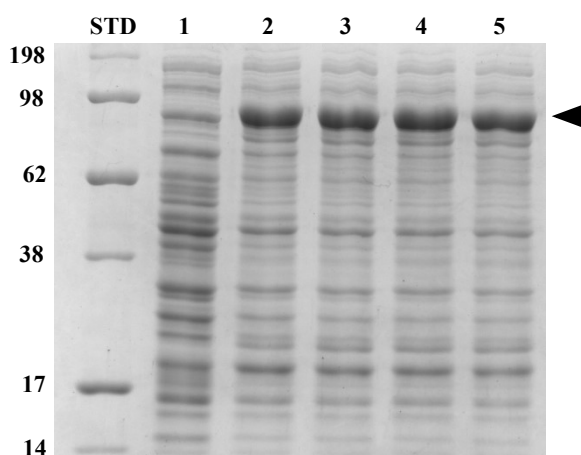
Obrázek 11: Ověření produkovaného proteinu peptidovým mapováním. MS spektrum naměřené po štěpení GST-Ory 1 trypsinem v gelu. Trypťické peptidy pocházející z GST-Ory1 jsou označeny zelenými tečkami.

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLT
QSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKM
FEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKY
IAWPLQGWQATFGGGDHPKSDLIEGRGIPGIPGASAEGLVRIALKKRPIDENSRVAARLSGEEG
ARRLGLRGANS LGGGGEGDIVALKNYMNAQYFGEIGVGTTPPQKFTVIFDTGSSNLWVPSAKCYFS
IACFFHSRYKSGQSSTYQKNGKPAAIQYGTGSIAGFFSEDSVTVGDLLVVKDQEFIEATKEPGLTFM
VAKFDGILGLGFQEISVGDAVPVWYKMEQGLVSEPVFSFWFNHSDEGEGGEIVFGMDPSHYKG
NHTYVPVSQKGYWQFEMGDVLIGGKTTGFCASGCSAIADSGTSLLAGPTAIITEINEKIGATGVVS
QECKTVVSQYGGQILDLLLAETQPSKICSQVGLCTFDGKHGVSAGIKSVVDDEAGESNGLQSGPMC
NACEMAVVWMQNQLAQNK TQDLILNYINQLCDKLPSPMGESSVDCGSLASMP EISFTIGAKK FALK
PEEYILKVGEGAAAQCSGFTAMDIPPRGPLWILGDVFMGAYHTVFDYGMRVGFAKSA

Obrázek 12: Výsledné pokrytí sekvence. Červeně je označena pokrytá sekvence, modrým podkladem je zvýrazněna GST na konci fúzního proteinu, zbytek sekvence potom náleží Oryzasinu 1.

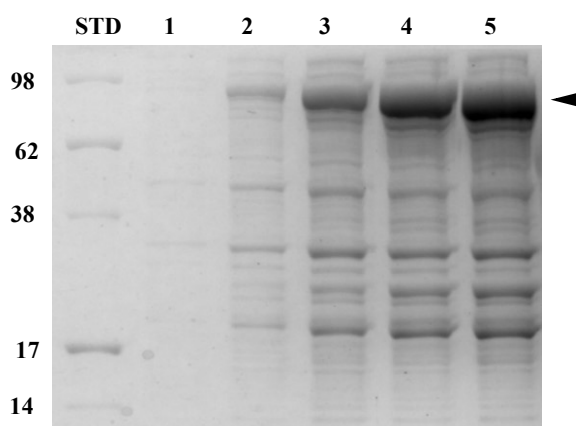
4.3. Určení vhodných podmínek produkce pomocí SDS elektroforézy

Na základě výsledků týkajících se výběru vhodného produkčního klonu byl vybrán jeden produkční kmen (obr. 10, str. 29, dráha 2), který byl následně použit pro nalezení vhodných



Obrázek 13: SDS elektroforéza vzorků s různou koncentrací induktoru.

(STD) – standard, jeho molekulové hmotnosti (v kDa) jsou vyznačeny vlevo. V dalších drahách jsou vzorky odpovídající produkční kultuře s různou koncentrací IPTG: 0 mM (1); 0,1 mM (2); 0,2 mM (3); 0,5 mM (4) a 1 mM (5).



Obrázek 14: SDS elektroforéza vzorků s různou inkubační dobou induktoru. (STD) – standard, jeho molekulové hmotnosti (v kDa) jsou vyznačeny vlevo. V dalších drahách jsou vzorky odpovídající různé době produkce: 0 h (1); 1 h (2); 2 h (3); 4 h (4) a 5 h (5).

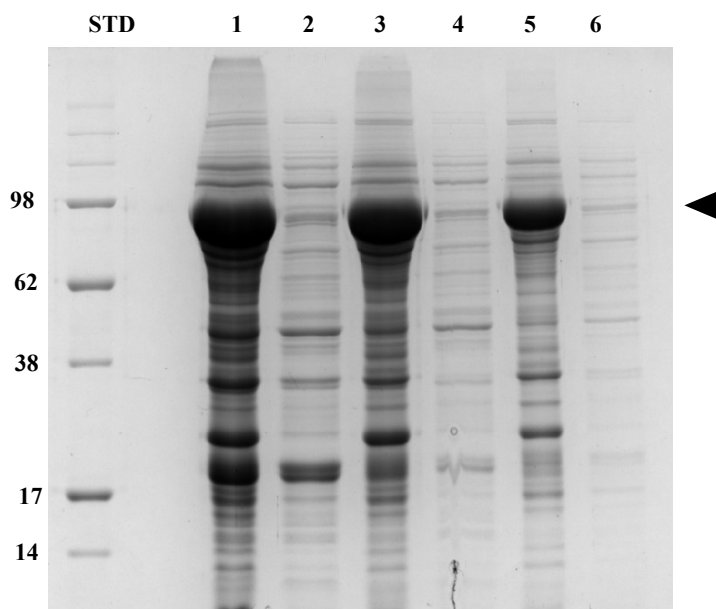
podmínek produkce podle protokolu uvedeném v kapitole 3.2.5. Byly použity různé koncentrace induktoru exprese IPTG. Konkrétně 0,1 mM; 0,2 mM; 0,5 mM a 1 mM a jeden vzorek bez induktoru. S jednotlivými vzorky byla provedena SDS elektroforéza. Ze získaného gelu (obr. 13) bylo zjištěno, že pro úspěšnou produkci proteinu je dostačující koncentrace induktoru 0,1 mM (obr. 13, dráha 2).

Pro stanovení optimální doby produkce proteinu byla použita koncentrace IPTG 0,1 mM, která byla vyhodnocena jako dostatečná. V daných časových intervalech odebírané vzorky byly poté zpracovávány pro analýzu pomocí SDS elektroforézy (obr. 14) Z dráhy obsahující vzorek inkubovaný po dobu jedné hodiny (obr. 14, dráha 2) je vidět, že tato doba inkubace je nedostačující. Optimální doba produkce se pohybuje okolo pěti hodin (obr. 14, dráha 5).

4.4. Velkoobjemová produkce proteinu a izolace inkluzí

Po velkoobjemové produkci ve 4×500 ml byla dle postupu zavedeného v laboratoři (kapitola 3.2.6.) izolována inkluzní tělíska. Ta byla zvážena, aby mohl být určen výtěžek z produkce. Ze 2 l LB média (amp, tet) bylo celkem získáno 2,4 g přečištěných inkluzí.

Se vzorky, které byly odebrány v průběhu procesu izolace inkluzí, byla provedena SDS elektroforéza za stejných podmínek, jako ve všech předchozích případech. Výsledky (obr. 15) ukázaly, že během izolace nedochází ke ztrátě produkovaného proteinu (dráhy 1, 3 a 5 na obr. 15) a také poskytly přehled o množství ostatních proteinů odmývaných během jednotlivých kroků (dráhy 2, 4 a 6 na obr. 15).



Obrázek 15: SDS elektroforéza vzorků odebraných v průběhu izolace inkluzí.

(STD) – standard, (1) – buňky lyzované v SLP, (2) – supernatant po lýze buněk,

(3) – suspenze promytá pufrem s detergentem,

(4) – supernatant po promytí pufrem s detergentem,

(5) – přečištěná inkluzní tělíska,

(6) – supernatant po promytí promývacím pufrem.

5. Diskuze

Vodík/deuteriová výměna spojená s hmotnostní spektrometrií je stále populárnější metodou využívanou pro studium strukturních změn proteinů či jejich interakcí. Prostorové rozlišení je v HXMS protokolu určeno schopností fragmentovat protein, což se nejčastěji provádí pomocí proteolýzy kyselými proteasami. Cílem této práce bylo nalezení optimálního postupu při produkci Oryzasinu 1, aspartátové proteasy původem z rýže, za účelem jejího následného využití v experimentech HXMS. Jedná se o první pokus využití Oryzasinu 1 i obecně rostlinné vakuolární proteasy pro štěpení proteinů v HXMS.

Prvním cílem bylo vybrat vhodný plazmid obsahující Oryzasin 1. Na základě výsledků z SDS elektroforézy (obr. 10, str. 29) nebyly mezi jednotlivými plazmidy pozorovány výraznější rozdíly. Z tohoto prvního experimentu je také jasně vidět, že buňky s přidavkem induktoru IPTG produkují GST-Ory1 ve všech případech, a že mobilita nejvýraznějšího pruhu v těchto drahách odpovídá velikostí očekávanému fúznímu proteinu. Díky síle pruhů nebylo nutné přistoupit k barvení stříbrem. Identita produkovaného proteinu byla ověřena pomocí metody peptidového mapování, kde bylo provedeno štěpení trypsinem a získané peptidy podrobeny analýze pomocí MALDI-TOF. Získaná spektra, interpretovaná v programu mMass, dokazují, že produkce proteinu probíhá bez problémů ve správné sekvenci i s GST kotvou. Ze tří testovaných plazmidů byl vybrán výchozí, který jsme obdrželi od dr. Asakury (Atomi Junior College, Tokio, Japonsko). Produkční klon transformovaný tímto plazmidem byl pak použit v dalších experimentech.

Při určování vhodných podmínek produkce byla sledována vhodná koncentrace induktoru a doba potřebná pro produkci. Z testovaných koncentrací induktoru IPTG, jak jsou vidět na obrázku 13 (str. 31), byla jako naprosto dostačující vyhodnocena koncentrace 0,1 mM. Z gelu je zřejmé, že mezi jednotlivými použitými koncentracemi nejsou viditelné rozdíly, což se množství produkovaného proteinu týče. Možnost použít takto nízkou koncentraci pro produkci je výhodná jak finančně kvůli ceně induktoru, tak instrumentálně, protože induktor je pro buňky toxický.

Pro zjištění optimální doby produkce bylo již pracováno se zvolenou 0,1 mM. koncentrací induktoru. Z výsledků SDS elektroforézy (obr. 14, str. 31) je patrné, že při inkubaci po dobu jedné hodiny je produkce proteinu velice nízká. Při dvou hodinách již dochází k větší produkci proteinu a velký nárůst lze bezpečně pozorovat při době produkce

po čtyři nebo pět hodin. Přestože není zobrazena, byla provedena i inkubace přes noc. Tato kultura byla ale velmi přerostlá, pravděpodobně již docházelo k degradaci proteinů. I přes opakovanou a důkladnou sonikaci a denaturaci vzorků vysokou teplotou se nepodařilo získat uspokojivou separaci tohoto vzorku na SDS elektroforéze.

Po zjištění optimálních produkčních podmínek byla provedena velkoobjemová produkce a izolace inkluzních tělísek. Přestože se jedná o fúzní protein s GST-kotvou na N-konci, a lze očekávat expresi v solubilní formě, byl protein exprimován do inkluzních tělísek. To je pravděpodobně způsobeno podmínkami produkce, přesněji teplotou, která vede k rychlému růstu bakterií i vysoké produkci proteinu. Z výsledků je patrné, že tímto způsobem bude možné získat velmi vysoké výtěžky proteinu, ale bude nezbytné jej z inkluzních tělísek izolovat. Jako možné alternativy se nabízí postupné rozpouštění pomocí vhodných nedenaturujících detergentů, jako je například N-laurylsarkosin. Pokud by tímto způsobem nebylo možné protein získat, bude přistoupeno k protokolu, který je v laboratoři zaveden pro ostatní kyselé proteasy. Při tomto postupu jsou inkluzní tělíska rozpuštěna za silně denaturujících podmínek (guanidin) a v přítomnosti redukčního činidla (DTT). Celý proces je prováděn za vysokého pH (11,5). Následně je protein dialyzován proti neredukujícímu pufru a zároveň je snižována pH. Během dialýz dochází ke sbalování proteinu a tvorbě disulfidových můstků.

Během procesu izolace inkluzních tělísek (obr. 15, str. 32) nedocházelo k výraznému odmývání kontaminujících proteinů. Za účelem purifikace proteinu by bylo po renaturaci možné využít separaci na glutathionových kolonách. Jelikož je GST kotva na N-konci proteinu, nebylo by třeba řešit jeho odstranění pomocí faktoru *Xa*. K tomuto štěpení dojde samovolně skrze mechanismus aktivace kyselých proteas za nízkého pH

Další možností, jak získat protein a vyhnout se renaturaci by bylo pokusit se nalézt podmínky produkce proteinu v solubilní podobě. Pro tento účel je možné vybrat jiné produkční buňky a/nebo snižovat teplotu produkce až k například 16 °C. Za takových podmínek je exprese výrazně zpomalena, jsou nutné delší doby produkce a výtěžky bývají nižší. Protein je ale získán v nativní podobě, a to včetně zapojení disulfidických můstků. Za zmínku stojí také fakt, že v sekvenci *Oryzasinu 1* lze nalézt dvě potenciální N-glykosylační místa (obr. 7, str. 16). Pokud by protein produkovaný v prokaryotickém systému nebyl dostatečně stabilní, byla by možnou příčinou chybějící glykosylace. Potom by bylo třeba

přejít k expresi v tabáku (v buněčné kultuře) nebo v hmyzích S2 buňkách či lidských HEK293 buňkách. Protein by se opět exprimoval v nativní formě, a to včetně veškerých posttranslačních modifikací. Opět by ale byly pravděpodobně nižší výtěžky produkce. Protože však pro účely štěpení proteinů v HXMS je plánováno proteasu imobilizovat, je důležité získat větší množství proteinu. Proto bude primárně využita prokaryotická exprese optimalizovaná v této práci a následně bude přistoupeno buď k solubilizaci inkluzních tělísek nebo k renaturaci dle zavedených postupů.

6. Závěr

Byla provedena transformace produkčních buněk *E. coli* a testována exprese rekombinantního Oryzasinu 1. Pro ověření identity produkovaného proteinu byla provedena MALDI-TOF analýza s vyhodnocením v programu mMass.

Dále byly testovány, a i úspěšně nalezeny vhodné podmínky pro produkci, tj. minimální koncentrace induktoru a optimální doba produkce, což bylo využito na velkoprodukci s následnou izolací inkluzních tělísek.

Seznam použité literatury

1. Barrett, A. J. & McDonald, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem. J.* **237**, 935–935 (1986).
2. Tavano, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **90**, 1–11 (2013).
3. Kumar, C. G. & Takagi, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol. Adv.* **17**, 561–94 (1999).
4. Serena, G., Kelly, C. P. & Fasano, A. Nondietary Therapies for Celiac Disease. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **48**, 145–163 (2019).
5. Kazanov, M. D., Igarashi, Y., Eroshkin, A. M., Cieplak, P., Ratnikov, B., Zhang, Y., Li, Z., Godzik, A., Osterman, A. L. & Smith, J. W. Structural determinants of limited proteolysis. *J. Proteome Res.* **10**, 3642–51 (2011).
6. Hvidt, A. & Linderstrøm-Lang, K. Exchange of hydrogen atoms in insulin with deuterium atoms in aqueous solutions. *BBA - Biochim. Biophys. Acta* **14**, 574–575 (1954).
7. Rosa, J. J. & Richards, F. M. An experimental procedure for increasing the structural resolution of chemical hydrogen-exchange measurements on proteins: application to ribonuclease S peptide. *J. Mol. Biol.* **133**, 399–416 (1979).
8. Englander, S. W. & Kallenbach, N. R. Hydrogen exchange and structural dynamics of proteins and nucleic acids. *Q. Rev. Biophys.* **16**, 521–655 (1983).
9. Zhang, Z. & Smith, D. L. Determination of amide hydrogen exchange by mass spectrometry: A new tool for protein structure elucidation. *Protein Sci.* **2**, 522–531 (2008).
10. Engen, J. R. Analysis of protein conformation and dynamics by hydrogen/deuterium exchange MS. *Anal. Chem.* **81**, 7870–5 (2009).
11. Englander, S. W., Mayne, L., Bai, Y. & Sosnick, T. R. Hydrogen exchange: the modern legacy of Linderstrøm-Lang. *Protein Sci.* **6**, 1101–9 (1997).
12. Oganessian, I., Lento, C. & Wilson, D. J. Contemporary hydrogen deuterium

- exchange mass spectrometry. *Methods* **144**, 27–42 (2018).
13. Wang, L., Lane, L. C. & Smith, D. L. Detecting structural changes in viral capsids by hydrogen exchange and mass spectrometry. *Protein Sci.* **10**, 1234–1243 (2002).
 14. Konermann, L. & Simmons, D. A. Protein-folding kinetics and mechanisms studied by pulse-labeling and mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **22**, 1–26 (2003).
 15. Husain, N., Tulsian, N. K., Chien, W. L., Suresh, S., Anand, G. S. & Sivaraman, J. Ligand-mediated changes in conformational dynamics of NpmA: implications for ribosomal interactions. *Sci. Rep.* **6**, 37061 (2016).
 16. Li, J., Wei, H., Krystek, S. R., Bond, D., Brender, T. M., Cohen, D., Feiner, J., Hamacher, N., Harshman, J., Huang, R. Y.-C., Julien, S. H., Lin, Z., Moore, K., Mueller, L., Noriega, C., Sejwal, P., Sheppard, P., Stevens, B., Chen, G., Tymiak, A. A., Gross, M. L. & Schneeweis, L. A. Mapping the Energetic Epitope of an Antibody/Interleukin-23 Interaction with Hydrogen/Deuterium Exchange, Fast Photochemical Oxidation of Proteins Mass Spectrometry, and Alanine Shave Mutagenesis. *Anal. Chem.* **89**, 2250–2258 (2017).
 17. Mandell, J. G., Falick, A. M. & Komives, E. A. Identification of protein-protein interfaces by decreased amide proton solvent accessibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 14705–10 (1998).
 18. Demmers, J. A., Haverkamp, J., Heck, A. J., Koeppe, R. E., Killian, J. A. & Killian, J. A. Electrospray ionization mass spectrometry as a tool to analyze hydrogen/deuterium exchange kinetics of transmembrane peptides in lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 3189–94 (2000).
 19. Chung, E. W., Nettleton, E. J., Morgan, C. J., Gross, M., Miranker, A., Radford, S. E., Dobson, C. M. & Robinson, C. V. Hydrogen exchange properties of proteins in native and denatured states monitored by mass spectrometry and NMR. *Protein Sci.* **6**, 1316–24 (1997).
 20. Deng, Y., Zhang, Z. & Smith, D. L. Comparison of continuous and pulsed labeling amide hydrogen exchange/mass spectrometry for studies of protein dynamics. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 675–684 (1999).

21. Englander, S. W. & Mayne, L. The nature of protein folding pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 15873–15880 (2014).
22. Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L. & Englander, S. W. Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins* **17**, 75–86 (1993).
23. Rand, K. D., Adams, C. M., Zubarev, R. A. & Jørgensen, T. J. D. Electron Capture Dissociation Proceeds with a Low Degree of Intramolecular Migration of Peptide Amide Hydrogens. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 1341–1349 (2008).
24. Wang, L., Pan, H. & Smith, D. L. Hydrogen exchange-mass spectrometry: optimization of digestion conditions. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 132–8 (2002).
25. Pan, J., Zhang, S., Chou, A. & Borchers, C. H. Higher-order structural interrogation of antibodies using middle-down hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Chem. Sci.* **7**, 1480–1486 (2016).
26. Davies, D. R. The Structure and Function of the Aspartic Proteinases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **19**, 189–215 (1990).
27. Hill, J. & Phylip, L. H. Bacterial aspartic proteinases. *FEBS Lett.* **409**, 357–60 (1997).
28. Dunn, B. M. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chem. Rev.* **102**, 4431–58 (2002).
29. Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **38**, D227–D233 (2010).
30. Dunn, B. Splitting image. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 969–972 (1997).
31. Khan, A. R. & James, M. N. G. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* **7**, 815–836 (2008).
32. Cravello, L., Lascoux, D. & Forest, E. Use of different proteases working in acidic conditions to improve sequence coverage and resolution in hydrogen/deuterium exchange of large proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 2387–2393 (2003).
33. Gundry, R. L., White, M. Y., Murray, C. I., Kane, L. A., Fu, Q., Stanley, B. A. & Van Eyk, J. E. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis

- in a bottom-up proteomics workflow. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **90**, 10.25.1-10.25.23 (2009).
34. Zhang, H.-M., Kazazic, S., Schaub, T. M., Tipton, J. D., Emmett, M. R. & Marshall, A. G. Enhanced digestion efficiency, peptide ionization efficiency, and sequence resolution for protein hydrogen/deuterium exchange monitored by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Anal. Chem.* **80**, 9034–41 (2008).
 35. Rey, M., Man, P., Brandolin, G., Forest, E. & Pelosi, L. Recombinant immobilized rhizopuspepsin as a new tool for protein digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 3431–3438 (2009).
 36. Yang, M., Hoepfner, M., Rey, M., Kadek, A., Man, P. & Schriemer, D. C. Recombinant Nepenthesin II for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **87**, 6681–6687 (2015).
 37. Marcoux, J., Thierry, E., Vivès, C., Signor, L., Fieschi, F. & Forest, E. Investigating alternative acidic proteases for H/D exchange coupled to mass spectrometry: Plasmepsin 2 but not plasmepsin 4 is active under quenching conditions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 76–79 (2010).
 38. Shutov, A. D. & Vaintraub, I. A. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry* **26**, 1557–1566 (1987).
 39. Törmäkangas, K., Kervinen, J., Östman, A. & Teeri, T. Tissue-specific localization of aspartic proteinase in developing and germinating barley grains. *Planta* **195**, 116–125 (1994).
 40. Belozersky, M. A., Sarbakanova, S. T. & Dunaevsky, Y. E. Aspartic proteinase from wheat seeds: isolation, properties and action on gliadin. *Planta* **177**, 321–326 (1989).
 41. Koelsch, G., Mares, M., Metcalf, P. & Fusek, M. Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. *FEBS Lett.* **343**, 6–10 (1994).
 42. An, C.-I., Fukusaki, E. & Kobayashi, A. Aspartic proteinases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes alata* Blanco. *Planta* **214**, 661–667 (2002).

43. Glathe, S., Kervinen, J., Nimtz, M., Li, G. H., Tobin, G. J., Copeland, T. D., Ashford, D. A., Wlodawer, A. & Costa, J. Transport and activation of the vacuolar aspartic proteinase phytepsin in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Biol. Chem.* **273**, 31230–6 (1998).
44. Simões, I. & Faro, C. Structure and function of plant aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.* **271**, 2067–2075 (2004).
45. Chen, X., Pfeil, J. E. & Gal, S. The three typical aspartic proteinase genes of *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed. *Eur. J. Biochem.* **269**, 4675–84 (2002).
46. Asakura, T., Matsumoto, I., Funaki, J., Arai, S. & Abe, K. The plant aspartic proteinase-specific polypeptide insert is not directly related to the activity of oryzasin 1. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5115–5122 (2000).
47. Guruprasad, K., Törmäkangas, K., Kervinen, J. & Blundell, T. L. Comparative modelling of barley-grain aspartic proteinase: A structural rationale for observed hydrolytic specificity. *FEBS Lett.* **352**, 131–136 (1994).
48. Kubota, K., Metoki, Y., Athauda, S. B. P., Shibata, C. & Takahashi, K. Stability Profiles of Nepenthesin in Urea and Guanidine Hydrochloride: Comparison with Porcine Pepsin A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**, 2323–2326 (2010).
49. Kadek, A., Tretyachenko, V., Mrazek, H., Ivanova, L., Halada, P., Rey, M., Schriemer, D. C. & Man, P. Expression and characterization of plant aspartic protease nepenthesin-1 from *Nepenthes gracilis*. *Protein Expr. Purif.* **95**, 121–128 (2014).
50. Kadek, A., Mrazek, H., Halada, P., Rey, M., Schriemer, D. C. & Man, P. Aspartic protease nepenthesin-1 as a tool for digestion in hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Anal. Chem.* **86**, 4287–4294 (2014).
51. Yang, M., Hoepfner, M., Rey, M., Kadek, A., Man, P. & Schriemer, D. C. Recombinant Nepenthesin II for Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **87**, 6681–6687 (2015).
52. Tomiko Asakura, Hirohito Watanabe, K. A. & Soichi, A. Oryzasin as an Aspartic

- Proteinase Occurring in Rice Seeds: Purification, Characterization, and Application to Milk Clotting. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1070–1075 (1997).
53. Asakura, T., Watanabe, H., Abe, K. & Arai, S. Rice aspartic proteinase, oryzasin, expressed during seed ripening and germination, has a gene organization distinct from those of animal and microbial aspartic proteinases. *Eur. J. Biochem.* **232**, 77–83 (1995).
54. Finehout, E. J. & Lee, K. H. An introduction to mass spectrometry applications in biological research. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **32**, 93–100 (2004).
55. Strohm, M., Kavan, D., Novák, P., Volný, M. & Havlíček, V. *mMass 3: A Cross-Platform Software Environment for Precise Analysis of Mass Spectrometric Data.* *Anal. Chem.* **82**, 4648–4651 (2010).

