

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

**Katedra biochemie**

---

EXPRESE C-TERMINÁLNÍHO FRAGMENTU PROPEPTIDU  
HEXOSAMINIDASY A JEHO POUŽITÍ PRO ENZYMOVOU  
REKONSTITUCI

Bakalářská práce  
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2008

Martina Háková



**UNIVERZITA KARLOVA v Praze**  
Přírodovědecká fakulta  
Oborová knihovna chemie  
Albertov 6, 128 43 Praha 2  
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208  
UK 22

*pr.č. 52b/08 stud  
(biok)*

---

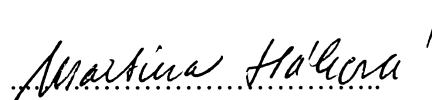
Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620808.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DSc., 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 28. května 2008.



Martina Háková

## Obsah:

SEZNAM ZKRATEK .....	5
<b>1 TEORETICKÝ ÚVOD .....</b>	<b>6</b>
1.1 PLÍŠŇOVÉ HEXOSAMINIDASY A JEJICH SPECIFICKÉ POSTAVENÍ V RODINĚ GLYKOSYLHYDROLAS 20.....	6
1.1.1 ENZYMOVÉ FUNKCE PLÍŠŇOVÝCH HEXOSAMINIDAS .....	6
1.1.2 ENZYMOVÁ RODINA GLYKOSYLHYDROLAS 20.....	7
1.2 REKONSTITUCE ENZYMOVÉ AKTIVITY A JEJÍ ZÁVISLOST NA PROPEPTIDU .....	8
1.3 ANALÝZA GLYKOSYLACE PLÍŠŇOVÝCH HEXOSAMINIDAS .....	9
<b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIÁLY A METODY .....</b>	<b>13</b>
3.1 SEZNAM POUŽITÝCH MATERIÁLŮ .....	13
3.1.1 CHEMIKÁLIE .....	13
3.1.2 KOMPLEMENTÁRNÍ OLIGONUKLEOTIDY .....	14
3.1.3 ENZYMY .....	14
3.1.4 BAKTERIÁLNÍ KMENY .....	15
3.1.5 VEKTORY .....	15
3.1.6 ROZTOKY A PUFRY .....	15
3.2 SEZNAM POUŽITÝCH PŘÍSTROJŮ .....	16
3.3 PŘÍPRAVA INSERTU POMOCÍ VZÁJEMNÉ HYBRIDIZACE DVOU OLIGONUKLEOTIDŮ .....	17
3.4 LIGACE INSERTU DO VEKTORU, A TRANSFORMACE DNA DO AMPLIFIKAČNÍCH BAKTERIÍ .....	17
3.5 PŘÍPRAVA PLASMIDOVÉ DNA METODOU „EASYPREP“ A JEJÍ RESTRIKČNÍ ANALÝZA .....	18
3.6 PŘÍPRAVA ČISTÉ PLASMIDOVÉ DNA METODOU „MAXIPREP“ .....	18
3.7 DNA SEKVENOVÁNÍ .....	19
3.8 PRODUKCE FÚZNÍHO PROTEINU .....	19
3.9 ŠTĚPENÍ FÚZNÍHO PROTEINU A ISOLACE CÍLOVÉHO PEPTIDU .....	20
3.10 POTVRZENÍ PRIMÁRNÍ STRUKTURY CÍLOVÉHO PEPTIDU C-TERMINÁLNÍM SEKVENOVÁNÍM A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ .....	20
3.11 GLYKOSYLACE PEPTIDU <i>IN VITRO</i> .....	21
3.12 REKONSTITUČNÍ EXPERIMENTY .....	21
<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>22</b>
4.1 PŘÍPRAVA EXPRESNÍHO VEKTORU .....	22
4.2 LIGACE, TRANSFORMACE, SELEKCE TRANSFORMANTŮ, PŘÍPRAVA PLASMIDU A SEKVENOVÁNÍ .....	23
4.3 PŘÍPRAVA FÚZNÍHO PROTEINU, JEHO ŠTĚPENÍ A ISOLACE CÍLOVÉHO PEPTIDU .....	25
4.4 <i>IN VITRO</i> GLYKOSYLACE NA CYSTEINOVÉM ZBYTKU .....	26
4.5 SEZNAM LÁTEK POUŽITÝCH PRO REKONSTITUCE ENZYMOVÉ AKTIVITY .....	28
4.6 REKONSTITUCE ENZYMOVÉ AKTIVITY .....	29

---

<b>5</b>	<b>DISKUSE .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>34</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>35</b>
	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>37</b>

---

## Seznam zkratek

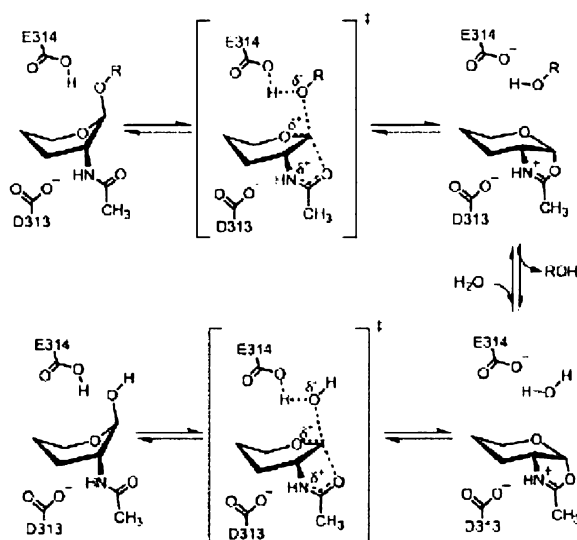
ATP	adenosintrifosfát
CCF	sbírka kultur hub
CNBr	kyanobromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
GlcNAc	<i>N</i> -acetyl- $\beta$ -D-glukosamin
HAc	kyselina octová
HPAEC-PAD	vysokoučinná anionová výměnná chromatografie s pulsní amperometrickou detekcí
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
IUB	mezinárodní unie biochemie
KSI	ketosteroidisomerasa
LB	název média dle Luria-Bertaniho
MALDI - MS	hmotnostní spektrometrie s použitím ionizace laserem za přítomnosti matrice
Man	mannosa
Met	methionin
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylendiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan

# 1 TEORETICKÝ ÚVOD

## 1.1 Plísňové hexosaminidasy a jejich specifické postavení v rodině glykosylhydrolas 20

### 1.1.1 Enzymové funkce plísňových hexosaminidas

Dle systematického zařazení lze hexosaminidase jako enzymu přiřadit kódové číslo: EC 3.2.1.52. Dle oficiálních databází je doporučeným názvem  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa a systematickým názvem  $\beta$ -*N*-acetyl-D-hexosaminid-*N*-acetylhexosaminohydrolasa [1]. Obecně  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasa hydrolyzuje koncové neredukující *N*-acetyl-D-hexosaminové zbytky v *N*-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidech [2]. Plísňová hexosaminidasa katalyzuje hydrolyzu chitobiosy na její základní monosacharidy. Obecně se jedná o nukleofilní substituci na nasyceném anomerním uhlíku, jak je znázorněno na obrázku 1. [3].



**Obrázek 1**

Předpokládaný katalytický mechanismus  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy ze *Streptomyces plicatus*. Kyselina glutamová ( $Glu^{314}$ ) a asparagová ( $Asp^{313}$ ) jsou primárně zodpovědné za stabilizující kladný náboj na oxazoliniovém iontu jako intermediátu [4].

Plísňový enzym hexosaminidasa je fyziologicky důležitý během životního cyklu plísně pro vytvoření přepážky, hyf a plodnice [5]. Hexosaminidasy jako takové byly široce studovány u vyšších obratlovců (včetně lidí) a u bakterií [6]. V poslední době  $\beta$ -*N*-

acetylhexosaminidasy z vláknitých plísní upoutaly značnou pozornost pro svou důležitost v biologii těchto organismů a pro své jedinečné enzymatické vlastnosti. Velmi zajímavým je jistě studium lidské formy hexosaminidasy, která se vyskytuje jako dimerní lysozomální enzym tvořený dvěma podjednotkami,  $\alpha$  a  $\beta$ . Variace těchto dvou podjednotek umožňují výskyt tří isoform tohoto enzymu, hexosaminidasa A, B, a C. Pokud se u lidské formy hexosaminidasy vyskytnou alelické variace u genu hexosaminidasy A nebo B pak dojde ke vzniku vrozených defektů metabolismu, známých jako Tay-Sachsova choroba a Sandhoffova choroba [6].

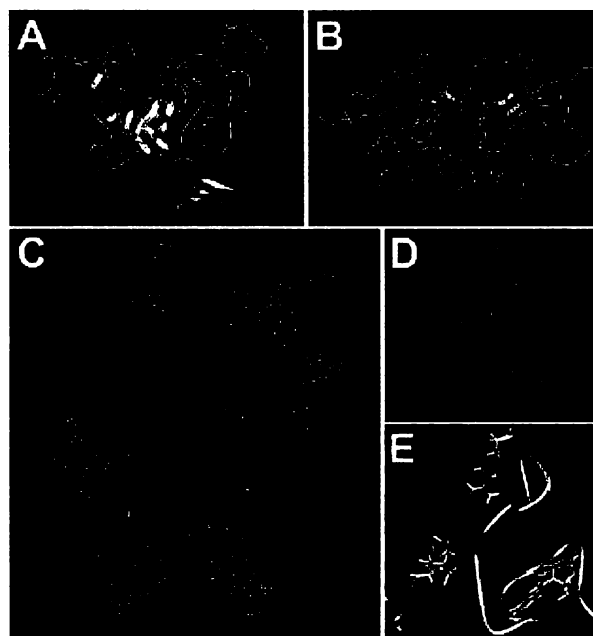
### 1.1.2 Enzymová rodina glykosylhydrolas 20

Glykosylhydrolasy jsou klíčové enzymy sacharidového metabolismu. Mezinárodní enzymové názvosloví IUB je založeno na typu reakce, které enzym katalyzuje, a na substrátové specifitě. Glykosylhydrolasam odpovídá kódové číslo EC 3.2.1.x, kde poslední číslice značí druh substrátu, popřípadě odráží molekulární mechanismus. Ale tato klasifikace u glykosylhydrolas dostatečně neodráží strukturní charakteristiky enzymů. Dalším problémem EC klasifikace je, že není patřičná pro enzymy vykazující rozsáhlou specifitu. Ukázalo se užitečným použít klasifikaci, která odráží sekvenci enzymu, díky tomu tak lépe odráží strukturní charakteristiky těchto enzymů a pomáhá odhalovat evoluční vztahy mezi těmito enzymy [7]. Tímto rozřazením doposud vzniklo 112 rodin glykosylhydrolas [8].

Hexosaminidasu lze najít ve více rodinách glykosylhydrolas v závislosti na původu enzymu. Obecně lze říci, že většina hexosaminidas náleží do rodiny 20. Charakteristickým strukturním rysem této rodiny je přítomnost  $(\beta, \alpha)_8$ -barelu, na jehož C-terminálním konci se nachází aktivní místo enzymu [8-9].

Při klonování a sekvenování  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasy z vláknité plísně *Aspergillus oryzae* se ukázalo, že se skládá ze signálního peptidu, neobvykle velkého propeptidu (78 aminokyselin), Zincin-like domény a katalytické podjednotky náležící k glykosylhydrolasové rodině 20 [10]. Také se již podařilo díky počítačovému modelování, Ramanově spektroskopii a biochemickým studiím modelovat strukturu  $\beta$ -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (obr. 2 na str. 8) [5].





**Obrázek 2**

Molekulární model  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*. Model ukazuje tvar katalytické podjednotky z bočního pohledu (A) a ze svrchního pohledu (B) s aktivním místem na *C*-terminálním čele ( $\beta$ ,  $\alpha$ )<sub>8</sub>-barelu a uspořádání těchto podjednotek v plně aktivním *N*-glykosylovaném dimeru (C). Velká přizpůsobivá smyčka (D: boční pohled, E: svrchní pohled, zobrazeno v žluté barvě) zeleného monomeru je pouze okolo 1 nm nad aktivními místy zbytků (šedá barva) červeného monomeru. [5]

## 1.2 Rekonstituce enzymové aktivity a její závislost na propeptidu

Propeptid vyskytující se v plísňových hexosaminidasách je, narozdíl od lidské formy vázané disulfidickými můstky, vázán nekovalentními interakcemi na monomerní či dimerní katalytickou podjednotku [6,10]. V nedávné době byl popsán nový mechanismus, který plísňové hexosaminidasy zapojují pro regulaci své enzymové aktivity. Tento mechanismus je založen na formování a sekreci dvou rozdílných forem molekuly enzymu, jedné plně aktivní a jedné s poloviční aktivitou. Je zajímavé, že toto je naprosto odlišný mechanismus regulace aktivity od mechanismu alosterických enzymů. Bylo prokázáno, že propeptidy u plísňových hexosaminidas udržují enzym aktivní, což je činí odlišné od jiných vnitrobuněčných chaperonů. Jediným příkladem podobných vlastností může být propeptid lidské hexosaminidasy B. Zajímavostí také je, že ačkoliv jsou propeptidy plísňových hexosaminidas vázány nekovalentně, jejich spojení s katalytickými podjednotkami je za fyziologických podmínek velmi stabilní po celou délku života

molekuly enzymu. Důležité je, že kromě velmi těsné vazby ke katalytické podjednotce je propeptid nepostradatelný pro svou katalytickou funkci, jak ukázaly rekonstituční experimenty provedené u plísně *Aspergillus oryzae*.

Rekonstituční experimenty, které byly doposud provedeny ukázaly, že propeptid  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy musí být uvolněn ze zbytku polypropeptidu, aby byl schopný účastnit se enzymové aktivace. Toto chování je jedinečné a probíhá opačně než u většiny studovaných propeptidů třídy I, které zprostředkovávají sbalení polypeptidu, ke kterému zůstávají kovalentně vázány. Toto je specifický mechanismus, který umožňuje plísňovým buňkám regulovat koncentraci propeptidu nezávisle na katalytické podjednotce. Jednou hypotézou je, že regulací koncentrace volného propeptidu buňka kontroluje množství a aktivitu sekretované hexosaminidasy v závislosti na svých metabolických potřebách. Takto popsaný mechanismus regulace aktivity enzymu u  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidasy byl popsán vůbec poprvé naší laboratoří. Propeptid se ale kromě aktivace enzymu podílí také na dalších dějích životního cyklu enzymu. Nejdůležitější z těchto funkcí jsou spojené s enzymovou dimerizací a sekrecí.

Nejběžnějším uspořádáním hexosaminidasy je forma s dvěma nekovalentně vázanými propeptidy na enzymový dimer a ta se ukázala být dominantní jak ve vnitrobuněčných tak i mimobuněčných enzymech. Jakkoliv je kinetika pojení propeptidu s katalytickou podjednotkou rychlejší než formování dimeru, tak se zdá, že pár dvou katalytických podjednotek s propeptidem dimerizuje o něco rychleji než pár s jednou katalytickou podjednotkou.

Velmi zajímavý je podíl propeptidu na sekreci hexosaminidasy. Výsledky pokusů ukázaly, že molekuly hexosaminidasy neobsahující propeptid nemohou být sekretovány. Molekuly hexosaminidasy, obsahující dva propeptidy na jeden dimer katalytických podjednotek, jsou nejen více enzymově aktivní než druhy s polovičním obsahem, ale jsou také rychleji sekretovány [6].

### 1.3 Analýza glykosylace plísňových hexosaminidas

Glykosylace je jedna z nejvýznamnějších posttranslačních modifikací, ke které dochází u řady proteinů. Výsledkem glykosylace je tedy vznik glykoproteinů. K samotnému procesu dochází v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Proces je uskutečňován pomocí vysoce specifických enzymů – glykosyltransferas, které rozlišují nejen substrát, ale

i strukturu, na níž má být substrát vázán. Substrátem těchto enzymů jsou cukerné nukleotidy. Sacharidy jsou k polypeptidovému řetězci kovalentně připojeny *N*-glykosidovou vazbou přes volnou amidovou skupinu asparaginu, nebo *O*-glykosidovou vazbou na hydroxy skupinu threoninu či serinu. Mezi běžně se vyskytujícími sacharidy v glykoproteinech patří:  $\alpha$ -L-fukosa (Fuc),  $\beta$ -D-galaktosa (Gal), *N*-acetyl-  $\beta$ -D-galaktosamin (GalNAc), *N*-acetyl-  $\beta$ -D-glukosamin (GlcNAc),  $\alpha$ -D-mannosa i  $\beta$ -D-mannosa (Man) a *N*-acetylneuraminová kyselina (Sia). [11]

U propeptidu i u katalytické podjednotky hexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* bylo předpovězeno několik míst glykosylace (obr. 3).

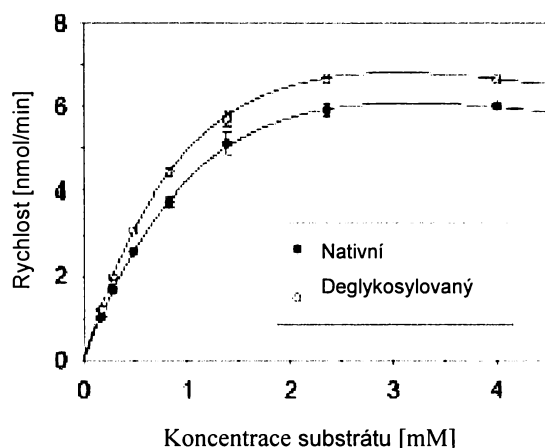


**Obrázek 3**

Předpovězené strukturní domény hexosaminidasy a jejich glykosylace [10].

U hexosaminidas z *Aspergillus oryzae* a *Penicillium oxalicum* již byla glykosylace detailně studována. Analýza pomocí metody MALDI-MS, *C*-terminální části propeptidu, potvrdila substituci hexosami, což ukazuje na možnost *O*-mannosylace. Při jiné analýze byl zkoumán oligosacharid ze separované katalytické podjednotky, pomocí HPAEC-PAD,  $\alpha$ -mannosidasového štěpení a MALDI-MS, přičemž se ukázala přítomnost *N*-glykanů vysoce mannosového typu připojených ve všech šesti předpovězených místech glykosylace [10].

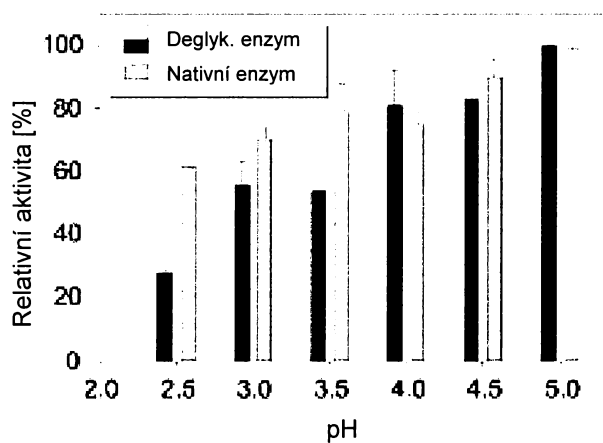
Při jiných experimentech byl zkoumán vliv deglykosylace enzymu za nativních podmínek. Při těchto pokusech byly k deglykosylaci použity dvě metody, které jsou založeny na užití buď *N*-glykanasy nebo endoglykosidasy H. Základním vyplývajícím výsledkem bylo zjištění, že deglykosylovaný enzym zůstává úplně aktivní a vykazuje kinetické parametry k nerozeznání od hodnot nativní hexosaminidasy (obr.4 na str. 11).



**Obrázek 4**

Srovnání enzymových parametrů nativní a deglykosylované hexosaminidasy [5].

Dalším výsledkem pokusů s použitím štěpení endoglykosidasou H byl poznatek, že deglykosylace u hexosaminidasy má pouze omezený vliv na enzymovou aktivitu, ale znatelně ovlivňuje enzymovou stabilitu při kyselých hodnotách pH (obr.5). Tato role *N*-glykosylace je v souladu s poznatkem, že enzym zcela deglykosylovaný pomocí *N*-glykanasy má nízkou stabilitu a má sklony precipitovat [5].



**Obrázek 5**

Vliv deglykosylace hexosaminidasy na stabilitu při různých hodnotách pH [5].

---

## 2 CÍLE PRÁCE

- **Příprava expresního vektoru pro rekombinantní produkci C-terminálního nonadekapeptidu hexosaminidasy a potvrzení jeho správnosti DNA sekvenováním**

Při tomto kroku bude třeba nalézt vhodný expresní systém pro produkci požadovaného peptidu a následovat bude snaha o jeho úspěšné použití. Úspěch se pak bude ověřovat pomocí DNA sekvenování plasmidové DNA.

- **Produkce a izolace fúzního proteinu obsahujícího ketosteroidisomerasu následovanou produkovaným peptidem a C-terminální histidinovou kotvou**

Po úspěšné přípravě expresního vektoru by měla následovat produkce a izolace fúzního proteinu. Bude třeba najít co nejlepší podmínky pro co nejvyšší výtěžek proteinu.

- **Štěpení fúzního proteinu CNBr a izolace čistého C-terminálního peptidu**

Expresní systém jako výsledek poskytuje požadovaný peptid ve formě fúzního proteinu. Z fúzního proteinu bude třeba pomocí afinitní chromatografie odstranit histidinovou kotvu a pomocí štěpení CNBr odstranit KSI.

- **Rekonstituční experimenty s hexosaminidasou z plísně *Penicillium oxalicum***

Na závěr budou provedeny rekonstituční experimenty, které budou zkoumat aktivitu hexosaminidasy v závislosti na přítomnosti různě modifikovaných fragmentech propeptidu, které byly během práce připraveny. V tomto kroku bude též použit N-terminální fragment propeptidu hexosaminidasy poskytnutý kolegyní Hanou Mikyskovou.

### 3 MATERIÁLY A METODY

#### 3.1 Seznam použitých materiálů

##### 3.1.1 Chemikálie

- 4-nitrofenyl- $\beta$ -D-GlcNAc Lachema, ČR
- acetonitril Merck, SRN
- agar Oxoid, Anglie
- agarosa Jersey Lab Supply, USA
- akrylamid Sigma, USA
- ampicilin Jersey Lab Supply, USA
- ATP New England Biolabs, USA
- bromfenolová modř Sigma, USA
- Coomassie Brilliant Blue R-250 Serva, Německo
- DTT Fluka, Švýcarsko
- EDTA Fluka, Švýcarsko
- ethanol Lachema, ČR
- ethidiumbromid Jersey Lab Supply, USA
- fenol Sigma, USA
- GlcNAc Lachema, ČR
- glukosa Lachema, ČR
- glycerol Sigma, USA
- glycin Fluka, Švýcarsko
- chlorid sodný Lach-ner, ČR
- chloroform Lachema, ČR
- isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid Sigma, USA
- kvasničný autolyzát Imunapharm, SR
- kyanobromid Sigma, USA

---

▪ kyselina mravenčí	Lachema, ČR
▪ kyselina octová	Lachema, ČR
▪ manganistan draselný	Lachema, ČR
▪ mannosá	Lachema, ČR
▪ methanol	Lachema, ČR
▪ močovina	Sigma ,USA
▪ Ni-NTA Sepharosa	Qiagen, Německo
▪ pepton	Imunapharm, SR
▪ peroxidisíran amonný	Sigma, USA
▪ polyethylenglykol 8000	Sigma, USA
▪ SDS	Serva, Německo
▪ TEMED	Serva, Německo
▪ tetracyklin	Léčiva, ČR
▪ trifluorocotvá kyselina	Lachema, ČR
▪ Tris	Serva, Německo
▪ uhličitan sodný	Lachema, ČR
▪ 10 x koncentrovaný ligační pufr	New England Biolabs, USA

### 3.1.2 Komplementární oligonukleotidy

5'-TGGGTGCCGGCGGCGATTGAAGCGCCGATTCCGTGCTTTCGTCCGTTTCCGTTTCCGATG-3'  
 5'-CGGAAACGGAAACGGACGAAAGCACGGATTTCGCGCTTCAATCGCCGCCGGCACCACAT-3'

Tyto dva komplementární oligonukleotidy byly vyrobeny na zakázku firmou Generi Biotech v Hradci Královém.

### 3.1.3 Enzymy

▪ alkalická fosfatasa	Sigma, USA
▪ ribonukleasa A	Sigma, USA
▪ restrikční endonukleasa Xba I	New England Biolabs, USA
▪ restrikční endonukleasa Xho I	New England Biolabs, USA

- 
- restriktasa AwaNI New England Biolabs, USA
  - T4 DNA ligasa Fermentas, Litva

### 3.1.4 Bakteriální kmeny

- kompetentní buňky *Escherichia coli* NovaBlue Novagen, USA
- produkční buňky *Escherichia coli* BL-21 Stratagene, USA (DE3) Gold

### 3.1.5 Vektory

- pET 31b Novagen, USA

### 3.1.6 Roztoky a pufrů

- LB médium  
1% pepton; 0,5% kvasničného autolyzátu; 1% NaCl; ddH<sub>2</sub>O
- Agarosový gel 1%  
0,5 g agarosy , 50 ml TAE pufru , 2 µl ethidiumbromidu
- LB agar  
15 g agaru na 1000 ml LB média
- TE pufr  
10 mM Tris (pH 7,5 ); 0,5 mM EDTA
- TAE pufr  
40 mM Tris; 20 mM CH<sub>3</sub>COOH; 1 mM EDTA
- Fixační a odbarvovací roztok pro AA SDS elektroforézu:  
35% Ethanol, 10% HAc
- Barvicí roztok pro SDS elektroforesu:  
45% Methanol, 10% HAc, 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250
- Elektrodový pufr pro SDS elektroforesu:  
250 mM glycin, 10 mM Tris, 0,1% SDS, pH = 8,3
- Vzorkový pufr pro SDS elektroforesu:  
50 mM Tris pH = 6,8; 100 mM DTT; 2% SDS; 0,01% bromfenolová modř;  
10% glycerol
- Sodnitrátový pufr 50 mM, pH 5,0



### 3.2 Seznam použitých přístrojů

- automatické pipety Gilson, USA
- automatický DNA sekvenátor ABI Prism 3100 Applied Biosystems, USA
- bakteriální třepačka na Erlenmayerovy baňky Gallenkamp Ltd., UK
- bakteriální orbitální třepačka Bigger Bill Thermolyne, USA
- centrifuga J2-2I Beckman Coulter, USA
- centrifuga J-6M Beckman Coulter, USA
- centrifuga stolní Spectrofuge 16M Edison, USA
- dialyzační střevo Spectrum Laboratories, USA
- hmotnostní spektrometr Biflex III Bruker (SRN)
- Hmotnostní spektrometr Biflex III Bruker, SRN
- chladnička Whirpool, USA
- chladnička Skandiluxe, Dánsko
- kolona Vydac C-18 *Grace Vydac*, USA
- kolona Vydac C-4 *Grace Vydac*, USA
- pH metr Beckman, Německo
- proteinový sekvenátor Procise Applera (USA)
- předvážkové váhy HF – 1200 G AND, USA
- rotační vakuová odparka Jouan RC 1010 Trigon-plus, ČR
- souprava pro elektroforesu Sigma, USA
- souprava Sequelon AA Millipore, USA
- spektrofotometr SAFIRE<sup>2</sup> Tecan-Schoeller Instruments, Rakousko
- spektrofotometr SPEKTROMOM 195D MOM, Maďarsko
- sterilní box Jouan, Francie
- sušárna WTB Binder, SRN
- ultrazvuková sonda Ultrasonic Homogenizer 4710 Cole-Parmer Instrument Co., USA
- vařič Eta, ČR

- vortexový mixér VELP Scientifica, Itálie
- zdroj deionizované vody Milli Q Millipore, USA
- zdroj napětí EPS 500/400 Pharmacia, USA

### 3.3 Příprava insertu pomocí vzájemné hybridizace dvou oligonukleotidů

Na základě požadované aminokyselinové sekvence byly navrženy dlouhé oligonukleotidy, a to na základě tabulky použití kodonů bakterií *Escherichia coli*, která je dostupná na internetu. Požadována byla konzervovaná sekvence C-terminálního fragmentu propeptidu hexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF3438 nesoucího místo O-glykosylace na zbytku Ser<sub>66</sub>. Tento serin byl v exprimované sekvenci nahrazen cysteinem umožňujícím následnou glykosylaci *in vitro*. Aminokyselinová sekvence tedy byla WVPAIEAIP**C**FRPFPPF, odpovídající sekvence na kódujícím vlákně byla 5'-TGGGTGCCGCGCGGCGATTGAAGCGCCGATTCCGTGCTTTCGTCCGTTTCCGTTTCCGATG-3' a sekvence na komplementárním vlákně byla 5'-CGGAAACGGAAACGGACGAAAGCACGGATTCCGCGCTTCAATCGCCGCCGGCACCCACAT-3'.

Oligonukleotidy byly připraveny na základě zakázkové syntézy firmou Generi Biotech v Hradci Králové. Dodané oligonukleotidy ve formě suchého odparku byly nejprve rozpuštěny ve sterilní vodě dle instrukce dodané výrobcem, a to na koncentraci 0,1 mM. Takto připravené roztoky obou nukleotidů byly poté stonásobně ředěny a 5 µl naředěných roztoků obou nukleotidů bylo smícháno, zahřáto na teplotu 95°C ve vodní lázni a směs byla pomalu ochlazená až na laboratorní teplotu, a krátce centrifugována.

### 3.4 Ligace insertu do vektoru, a transformace DNA do amplifikačních bakterií

8 µl směsi oligonukleotidů popsané v předchozí kapitole bylo použito ve standardní ligační reakci [12] obsahující dále 1 µl (0,1 µg) vektoru pET-31b linearizovaného restriktasou AwlN I a opracovaného alkalickou fosfatasou, 1 µl 10 x koncentrovaného ligačního pufru s ATP, a 1 µl (1 Weissovu jednotku) T4 DNA ligasy (Fermentas, Litva). Ligace probíhala při laboratorní teplotě 2 hodiny, a poté byla veškerá ligační směs přidána ke 100 µl kompetentních buněk *Escherichia coli* NovaBlue (Novagen, USA). Po inkubaci

na ledu trvající asi 20 minut byla zkumavka zahřáta 1 min na 42°C (teplotní šok), znovu ochlazená na ledu, a poté bylo přidáno 400 µl média LB, a zkumavka byla inkubována při 37 °C nejméně 30 min, aby mohly transformované bakterie začít projevovat odolnost vůči ampicilinu. Po 30 minutách byla směs rozetřena na misky s LB agarem obsahující ampicilin (150 µg/ml) a tetracyklin (5 µg/ml) a misky byly inkubovány dnem vzhůru v bakteriálním inkubátoru přes noc.

### **3.5 Příprava plasmidové DNA metodou „Easyrep“ a její restriční analýza**

Kolonie buněk *Escherichia coli* rezistentní na ampicilin byly přeneseny do 1 ml kapalného média LB a ampicilinem (150 µg/ml) a byla připravena „noční“ stacionární kultura třepáním v bakteriální třepačce po dobu nejméně 20 hodin. S 0,8 ml této kultury byla provedena minipreparační příprava plasmidové DNA metodou tzv. „Easyrepu“ podle publikované metody [13]. Získá se cca 30 µl plasmidové DNA, z níž 9 µl bylo použito na restriční štěpení pomocí restričních endonukleas Xba I a Xho I v 10 µl štěpící reakci za standardních podmínek. Restriční štěpení probíhalo 1 h při 37 °C a bylo ukončeno přidáním 3 µl vzorkového pufru pro agarosovou gelovou elektroforesu. Výsledek restričního štěpení byl poté analyzován elektroforesou na 1 % agarosovém gelu.

### **3.6 Příprava čisté plasmidové DNA metodou „Maxiprep“**

Byl použit standardní protokol pro přípravu velkých množství plasmidové DNA [12] v modifikaci publikované ve firemním manuálu firmy Promega [14], a to v níže uvedené modifikaci. 2 ml kapalné kultury bylo zaočkováno 200 ml média LB a ampicilinem, a kultura byla třepána v 1 l Erlenmayerových baňkách v bakteriální třepačce přes noc. Ráno byla stacionární kultura stočena ve 250 ml kyvetách při 2000 x g 20 minut při 4°C. Médium bylo vyhozeno, usazené bakterie byly resuspendovány ve 20 ml roztoku s glukosou [12] a přeneseny do 30 ml centrifugačních kyvet. Následovala alkalická lýza a extrakce plasmidové DNA podle publikovaného standardního protokolu [12]. Směs sražené RNA a plasmidové DNA byla štěpena ribonukleasou A a plasmidová DNA selektivně srážena pomocí polyethylenglykolu 8000 [14]. Takto získaná plasmidová DNA byla rozpuštěna v roztoku TE [12], extrahována fenolem a chloroformem, precipitována

ethanolem, a promyta 70 % ethanolem. Poté byla rozpuštěna v 50  $\mu$ l roztoku TE a koncentrace a čistota plasmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky. Nakonec byla koncentrace plasmidové DNA upravena na hodnotu 1  $\mu$ g /  $\mu$ l a vzorky plasmidů byly zmrazeny a uchovávány pro další použití při -20°C.

### 3.7 DNA sekvenování

Po identifikaci pozitivních klonů obsahujících EcoRI insert správné délky (viz. kapitola 3.5) byly bakteriální buňky *Escherichia coli* kmene NovaBlue transformované příslušným plasmidem rozetřeny na čerstvou misku obsahující médium LB s ampicilinem (150  $\mu$ g/ml), a miska byla inkubována přes noc při 37°C. Druhý den byla miska s narostlými koloniemi předána do DNA sekvenační laboratoře MBÚ AV ČR v.v.i. dr. Jurgenu Felsbergovi, který zajistil přípravu plasmidové DNA s použitím purifikačního kitu firmy Genomed, a dále DNA sekvenování insertů v obou směrech zahájené z míst specifických primerů obsažených v klonovacím vektoru, M13 přímého a M13 zpětného primeru. K vlastnímu sekvenování byla použita Sangerova dideoxynukleotidová metoda v provedení vhodném pro automatický DNA sekvenátor firmy Applied Biosystems ABI Prism 3100. Výsledky sekvenování byly zaslány ve formě úplných chromatogramů (soubory .ab1), k jejichž vyhodnocení byl využit volně dostupný program Chromas verze 1.45 (Griffith University, Southport, Queensland, Austrálie).

### 3.8 Produkce fúzního proteinu

Pro produkci fúzního proteinu ketosteroidisomerasa – Met – propeptid – Met – histidinová kotva byl sekvenovaný plasmid transformován do produkčního bakteriálního kmene *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Gold, pozitivní transformanty byly opět selektovány na misce s médiem LB agar, ampicilinem a tetracyklinem. Kolonie byly poté očkovány do 100 ml kapalného média stejného složení a byla připravena startovní kultura inkubací přes noc při 37°C. 4 ml této stacionární kultury bylo poté očkováno do 400 ml média LB s ampicilinem a tetracyklinem ve dvou 2 l Erlenmayerových baňkách. Kultury byly třepány v orbitální bakteriální třepačce při 260 ot/min a v odebíraných 1 ml vzorcích byla měřena optická hustota při 550 nm. Jakmile dostoupila hodnoty cca 0,8; byla provedena indukce tvorby proteinu přidáním 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosidu jako

induktoru. Poté byla kultura třepána ještě 4 hodiny, přičemž bakterie většinou dorostly do optické hustoty asi 2,0 při 550 nm. Bakterie byly centrifugovány v centrifuze Beckman J-6M při 2000 x g asi 30 minut. Fúzní protein byl poté připraven podle publikovaného postupu [15,16] za denaturujících podmínek na sloupci Ni-NTA Sepharosy (Qiagen). Isolovaný protein byl intenzivně dialyzován proti 2 l destilované vody po doby 4 x 8 hodin, sraženina proteinu byla centrifugována a poté sušena pod vakuem.

### **3.9 Štěpení fúzního proteinu a izolace cílového peptidu**

Tato část práce byla provedena podle dostupné literatury [15,16]. 100 mg suchého fúzního proteinu bylo rozpuštěno v 950  $\mu$ l 70 % kyseliny mravenčí a poté byl přidán stonásobný molární nadbytek CNBr rozpuštěný v 50  $\mu$ l acetonitrilu. Reakční směs byla umístěna do temna a reakce probíhala 24 hodin při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs odpařena na rotační vakuové odparce a odpařený CNBr zachycený ve vymrazovače byl likvidován pomocí nasyceného roztoku  $\text{KMnO}_4$ . Odpařená reakční směs byla opět rozpuštěna v 70 % kyselině mravenčí a poté přímo nastříkována do semipreparativní kolony Vydac C-4 o rozměrech 10 x 250 mm ekvilibrovanou směsí 80 % vody a 20 % acetonitrilu obsahující 0,1 % TFA. Látky byly separovány pomocí půlhodinového lineárního gradientu do 5 % vody a 95 % acetonitrilu v přítomnosti 0,1 % TFA při eluční rychlosti 2 ml/min. Eluce byla monitorována pomocí průtokového absorbančního detektoru při 280 nm. Během gradientové eluce došlo k vymytí tří frakcí s retenčními maximy při 17. min, 19. min a 22. min. Byly odebrány 0,5 ml frakce, které byly odpařeny a uschovány pro další analýzu.

### **3.10 Potvrzení primární struktury cílového peptidu C-terminálním sekvenováním a hmotnostní spektrometrií**

Analýzy byla prováděny v proteinovém sekvenátoru Procise firmy Applera (USA), a na hmotnostním spektrometru Biflex III firmy Bruker (SRN) s použitím ionizace MALDI v režimu opožděné extrakce a s použitím reflektoru. Tyto analýzy byly prováděny proškolenými operátory Prof. K. Bezouškou a Mgr. P. Pompachem podle protokolů dodaných výrobcem zařízení. Pro analýzu propeptidů v proteinovém sekvenátoru byla provedena kovalentní C-terminální imobilizace pomocí soupravy Sequelon AA (Millipore).

### 3.11 Glykosylace peptidu *in vitro*

Glykosylace peptidů *in vitro* byla prováděna podle publikované metody [17] s použitím iodoacetamidových derivátů obsahujících  $\beta$ -glykosidicky vázaný *N*-acetyl-D-glukosamin nebo  $\alpha$ -glykosidicky vázanou D-mannosu. Po skončení reakce, která se provádí v silně denaturujícím prostředí, byla celá reakční směs nanesena na kolonu Vydac C-18 za podmínek uvedených v kapitole 3.8. Za těchto podmínek byl peptid glykosylovaný pomocí GlcNAc eluovaný asi v 15. minutě, peptid glykosylovaný mannosou dokonce již ve 13. minutě, zatímco nezreagovaný peptid asi v 17. minutě. Průběh glykosylace byl též potvrzen pomocí analytických technik popsanych v kapitole 3.9

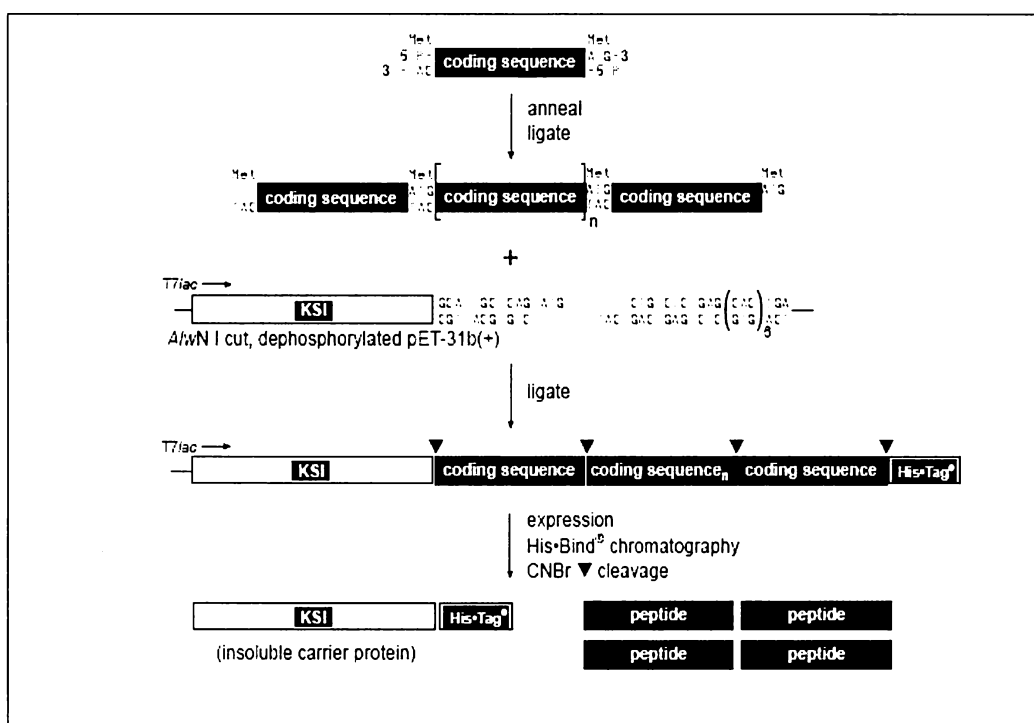
### 3.12 Rekonstituční experimenty

Do mikrotitrační destičky s jamkami s kulatým dnem bylo pipetováno 30  $\mu$ l 50 mM sodno citrátového pufru pH 5,0; 10  $\mu$ l roztoku testované látky ve vodě a nakonec 10  $\mu$ l roztoku katalytické podjednotky hexosaminidasy ve 4 M močovně a 50 mM sodno citrátového pufru pH 5,0. Po smíchání všech komponent byla destička inkubována 1 hodinu při 4°C v lednici, poté bylo přeneseno všech 50  $\mu$ l směsi do jamek mikrotitrační destičky s plochým dnem a přidáno 50  $\mu$ l chladného (4°C) substrátového roztoku obsahujícího 5 mM 4-nitrofenyl- $\beta$ -D-GlcNAc v 50 mM sodno citrátovém pufru pH 5,0. Destičku byla umístěna do sušárny vyhřáté na 30 °C a následovala inkubace při této teplotě přesně 30 minut. Poté byla deska vyndána a veškeré reakce byly okamžitě zastaveny přidávkem 100  $\mu$ l 2 M roztoku Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Byly změřeny hodnoty absorbance při 400 nm a aktivita v jednotlivých experimentech byla vyjádřena jako procento aktivity v kontrolních jamkách obsahující nativní propeptid hexosaminidasy.

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Příprava expresního vektoru

Pro bakteriální expresi peptidů a menších proteinů do celkové délky cca 100 aminokyselin doporučuje firma NovaGen, jeden z hlavních dodavatelů bakteriálních expresních systémů, použít expresní systém založený na vektoru pET31b. Strategie experimentu je uvedena na obrázku 6 převzatém z firemní literatury.



Obrázek 6

Strategie produkce krátkých peptidových sekvencí s použitím expresního vektoru pET31b linearizovaného restriční endonukleasou *AlwNI*.

Rozštěpením produkčního vektoru restriční endonukleasou *AlwNI* dojde k linearizaci plasmidové DNA za současné tvorby jednovláknového překryvu ATG, který kóduje aminokyselinu methionin umístěnou ve správném čtecím rámci za genem pro enzym ketosteroidisomerasu (hojně produkovaný bakteriální protein). Tento enzym obsahuje ve své přirozené podobě interní methioninové zbytky, tyto však byly již u genu použitého v daném expresním vektoru mutovány na jiné aminokyselinové zbytky (většinou chemicky

blízce příbuzný isoleucin) [18]. Cílový produkovaný peptid je do linearizovaného vektoru většinou zanesen jako DNA insert obsahující požadovanou sekvenci aminokyselin ohraničenou na obou koncích též ATG methioninovým kodonem. Takovým postupem se připraví souvislý DNA fragment, v němž sekvence kódující ketosteroidisomerasu je následována jednou nebo několika sekvencemi produkovaného peptidu oddělenými vzájemně na obou stranách methioninovým zbytkem a dále C-terminální histidinovou kotvou nezbytnou pro izolaci fúzního proteinu.

Prvním krokem pro získání expresního vektoru, produkujícího C-terminální nonadekapeptid plísňové hexosaminidasy *Penicillium oxalicum* CCF 3438, je návrh a syntéza obou oligonukleotidů. Při jeho návrhu pro překlad aminokyselinové sekvence do nukleotidové sekvence byla použita statistická tabulka četnosti výskytu kodonů u bakterie *Escherichia coli*, přičemž pro kódování konkrétních aminokyselin byl použit vždy pouze nejčastěji se vyskytující kodon. K devatenácti C-koncovým aminokyselinám propeptidu byly ještě přidány oba methioninové zbytky, přičemž jednonukleotidová extenze byla přidána na 3' konec.

#### **4.2 Ligace, transformace, selekce transformantů, příprava plasmidu a sekvenování**

Oba navržené oligonukleotidy, jeden pro kódující a jeden pro komplementární DNA vlákno, byly syntetizovány zakázkově a hybridizovány na sebe za standardních podmínek, a poté ligovány do expresního vektoru pET31b otevřeného AlwN I restriktrasou. Byl použit desetinasobný molární nadbytek insertu oproti vektoru a množství vektoru cca 100 ng bylo zvoleno, aby bylo získáno dostatečné množství transformovaných bakteriálních kolonií. Tři kolonie byly podrobeny restrikční analýze s použitím restrikčních endonukleas Xba I a Xho I, zásahová místa pro tyto enzymy se nacházejí po obou stranách AlwN I místa (obr. 6 na str. 22). Pokud tedy byl oligonukleotidový fragment o délce cca 60 pb opravdu do tohoto místa ligován, musí dojít k prodloužení délky Xba I / Xho I restrikčního fragmentu o tuto velikost, což by mělo být na gelu dobře pozorovatelné ve srovnání s kontrolním štěpením samotného vektoru. Výsledek na obrázku 7 na str. 24 ukazuje, že v daném případě byl úspěšný klon číslo 11.





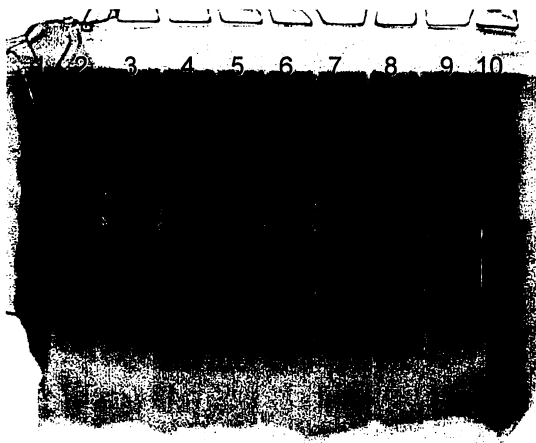
**Obrázek 7**

Výsledek restričního štěpení plasmidové DNA izolované ze tří bakteriálních kolonií transformovaných ligační směsí. V dráze 5 je uvedeno kontrolní štěpení samotného vektoru, v dráze 11 úspěšný klon (označený červeným rámečkem), v drahách 10 a 12 klony neúspěšné.

Bakteriální kultura obsahující úspěšně nakombinovaný klon byla namnožena ve 200 ml kapalného média a použita pro přípravu plasmidové DNA ve větším množství. Tento plasmid byl označen jako pCTERM a bylo ho získáno asi 100  $\mu\text{g}$ . Plasmid byl sekvenován v DNA sekvenační laboratoři na MBÚ AV ČR v.v.i. vedené dr. Jurgenem Felsbergem. Výsledek této sekvenace je uveden v příloze A ve formě originálního elektroforeogramu, jehož zobrazení je kritické pro posouzení kvality získané sekvence. Z obrázku je patrné, že na počátku získané sekvence se vyskytly určité technické problémy, je nicméně dobře čitelné (v pozici 95) restriční místo pro enzym Nde I, které zároveň definuje iniciační methionin ATG. Poté následuje sekvence 315 pb definující 105 aminokyselin nosičové ketosteroidisomerasy, tato sekvence je ukončená dalším methioninem definovaným ATG v poloze 475 (znázorněno čarou přes chromatogram). Poté následuje sekvence 19 požadovaných aminokyselin ukončená opět methioninem, celý úsek je tedy 60 nukleotidů dlouhý. Na úplném konci sekvence se nalézá histidinová kotva – jedná se o sekvenci 6 histidinových zbytků CAC-CAC-CAC-CAC-CAC-CAC následovaná stop kodonem (TGA), v tomto místě sekvence produkovaného fúzního proteinu končí. DNA sekvenování tedy ukázalo, že se tak podařilo úspěšně vložit DNA insert kódující fúzní protein se strukturou ketosteroidisomerasa – Met – C -terminální úsek propeptidu – Met – histidinová kotva.

### 4.3 Příprava fúzního proteinu, jeho štěpení a izolace cílového peptidu

Sekvenovaný produkční plasmid pCTERM byl transformován do produkčního bakteriálního kmene *Escherichia coli* BL-21 (DE3) Gold (Stratagene), a byl proveden indukční pokus, jehož výsledek je znázorněn na obrázku 8.



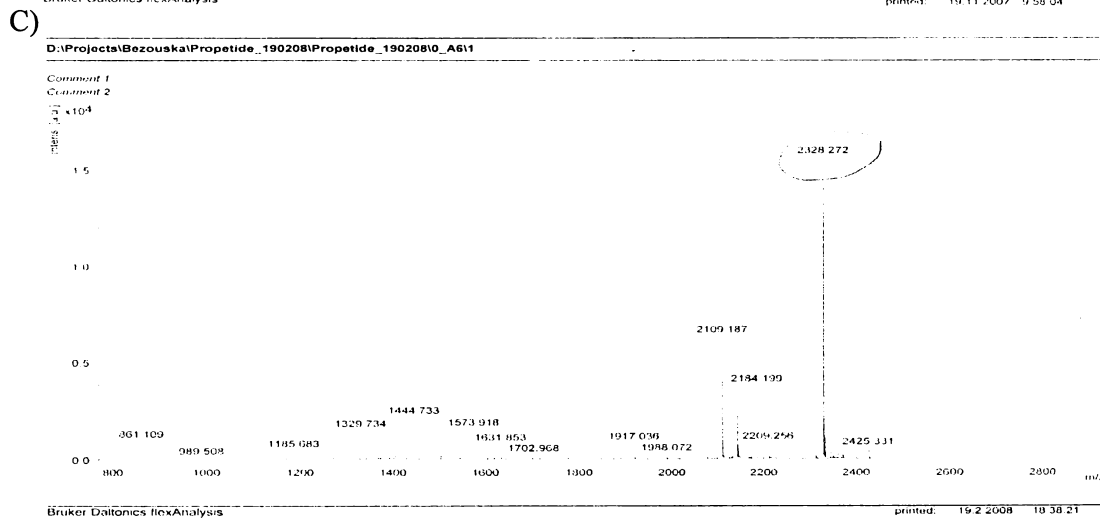
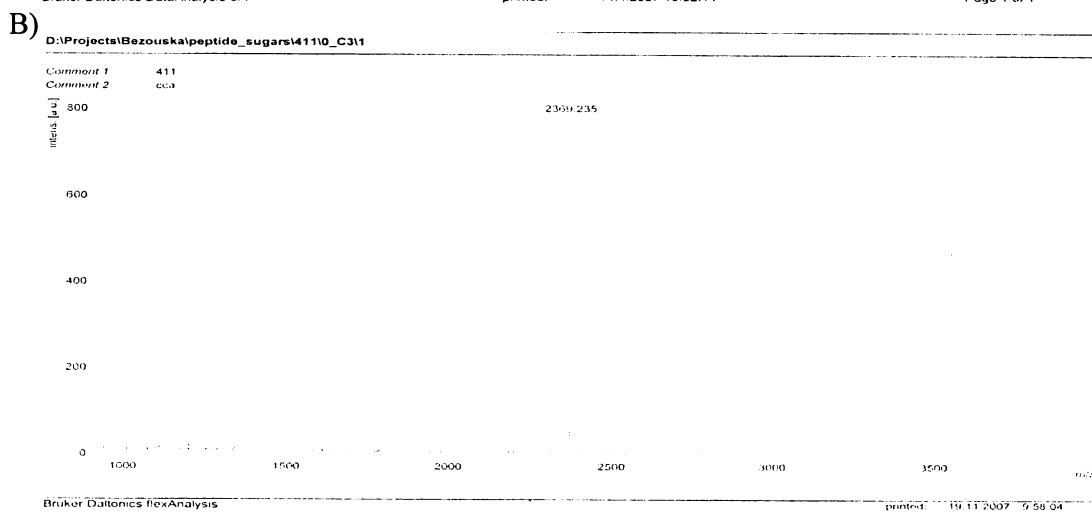
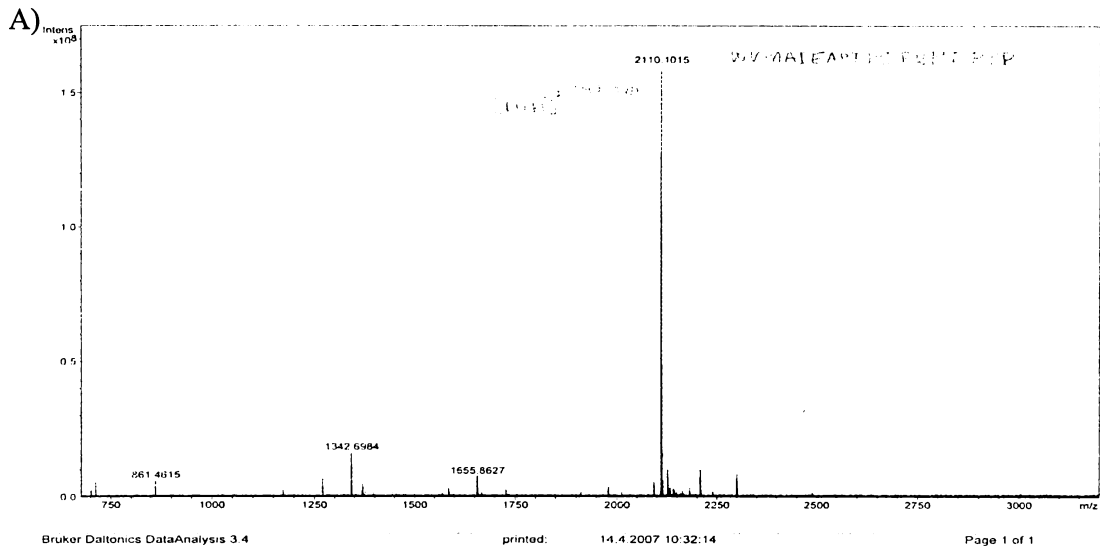
**Obrázek 8**

Pokusná indukce produkce proteinu 1mM IPTG ve dvou bakteriálních klonech. Dráhy číslo 7 a 9 obsahují indukované bakterie rozvařené ve vzorkovém pufru, dráhy číslo 6 a 8 potom neindukované kontroly.

V drahách číslo 7 a 9 jsou pozorovatelné proteiny indukované přidáním 1mM IPTG, velikost těchto proteinů (cca 16 kDa) odpovídá vlastní ketosteroidisomerase (12 kDa) zvětšené o velikost produkovaného peptidu a histidinové kotvy. Klon číslo 2 ve dráze 9 (označen černým rámečkem v obrázku 8) byl poté vybrán pro velkobjemovou produkci proteinu. Purifikace proteinu z bakterií byla prováděna za denaturujících podmínek afinitní chromatografií na nosiči s imobilizovaným niklem, Ni-NTA agarosou. Takto připravený protein byl poté dialyzován proti několika výměnám destilované vody, přičemž došlo k jeho vysrážení. Sražené proteinové residuum bylo štěpeno CNBr, který štěpí polypeptid za aminokyselinou methioninem – oddělí tedy ve fúzním proteinu vedoucí ketosteroidisomerasu od produkovaného peptidu a od histidinové kotvy. Jednotlivé komponenty byly poté separovány chromatografií na obrácené fázi a byl získán propeptid vysoké čistoty, jak bylo prokázáno hmotnostní spektrometrií (Obr.9 na str. 27).

#### 4.4 *In vitro* glykosylace na cysteinovém zbytku

Pro potřeby projektu sledujícího vliv glykosylace propeptidu na jeho aktivitu v rekonstitučních experimentech bylo třeba C-terminální fragment propeptidu glykosylovat, k čemuž lze výhodně využít publikovaného protokolu pro vazby sacharidu na reaktivní –SH skupině cysteinu s využitím jodoacetamidových derivátů jednotlivých sacharidů. Tyto deriváty byly syntetizovány ing. Karlem Křenkem v Laboratoři biotransformací MBÚ AV ČR v.v.i., a reakce s nimi byla provedena na základě publikovaného protokolu. Navázání cukerných zbytků na propeptid způsobí zvýraznění jeho hydrofilního charakteru, v důsledku čehož jsou sacharidové deriváty eluovány dříve při chromatografii na obrácené fázi. V tomto případě použití chromatografického systému se nemodifikovaný peptid eluoval v 17. minutě, zatímco peptid glykosylovaný pomocí GlcNAc asi v 15. minutě, a peptid glykosylovaný mannosou dokonce již ve 13. minutě. S použitím daného chromatografického systému bylo tedy možné glykosylované peptidy dokonale separovat od nemodifikovaných a získat je ve vysoké čistotě (obr. 9 na str. 27). Pro potvrzení toho, že sacharid je opravdu umístěn na cysteinovém zbytku, bylo použito několik dalších analýz, včetně fragmentární hmotnostní spektrometrie a analýzy v proteinovém sekvenátoru. Obě výše uvedené techniky společně s hmotnostně spektrometrickou analýzou MALDI potvrdily, že jediným místem vazby sacharidu na nonadekapeptid je cystein v pozici 12.



### Obrazek 9

MALDI spektra nonadekapeptidu (A), a jeho sacharidových derivátů obsahujících na cystein vázaný GlcNAc (B) a mannosu (C).

#### 4.5 Seznam látek použitých pro rekonstituce enzymové aktivity

Seznam všech látek použitých pro rekonstituci enzymové aktivity je uvedený v tabulce 1 na str. 29. Experiment byl prováděn ve spolupráci s kolegyní Hanou Mikyskovou, s ní byly též sdíleny některé použité látky. Výběr látek byl proveden na základě předcházejících rekonstitučních experimentů [6,10]. Jako negativní kontrola byl vzat použitý citrátový pufr, jako pozitivní kontrola pak přirozený propeptid izolovaný ze stejného zdroje jako katalytická podjednotka. Neglykosylovaný propeptid produkovaný bakterií *Escherichia coli* byl též použit jako negativní kontrola, protože neglykosylovaný propeptid mívá v rekonstitučních experimentech velmi nízkou aktivitu. Dále se zkoušela rekonstituce aktivity hexosaminidasy různými fragmenty propeptidu, ať již generovanými náhodně (po štěpení enzymem trypsinem (vzorek 18), nebo na základě více systematického přístupu, při němž byly použity evolučně konzervované *N*-terminální a *C*-terminální propeptidové fragmenty (Příloha B) o délce 19 aminokyselin. Tyto fragmenty byly též použity buď v neglykosylované podobě, nebo v podobě reflektující jejich přirozenou glykosylaci (Příloha B).

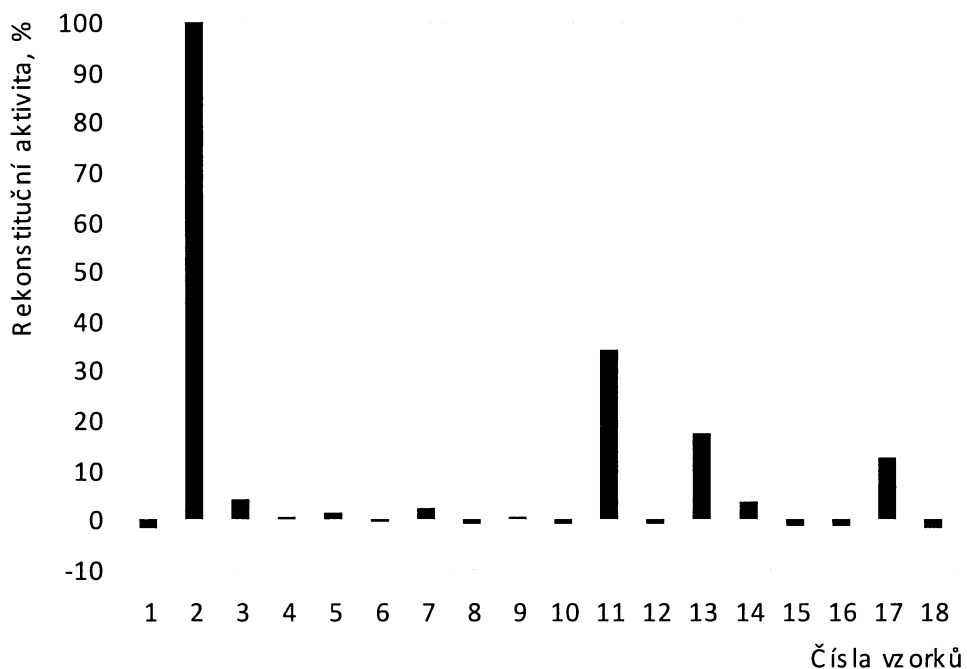
**Tabulka 1. Popis látek používaných v rekonstitučních experimentech s plísňovou hexosaminidasou z *Penicillium oxalicum* CCF3438.**

Číslo vzorku	Chemické složení	Původ a analýza
1	Citrátový pufr (negativní kontrola)	
2	Nativní propeptid z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF3438	Isolace [6]
3	Neglykosylovaný propeptid z <i>Escherichia coli</i>	M. Vysoká [19]
4	<i>N</i> -terminální neglykosylovaný fragment	H.Mikysková [20]
5	<i>C</i> -terminální neglykosylovaný fragment	Tato práce
6	Ekvimolární směs neglykosylovaného <i>N</i> -terminálního a neglykosylovaného <i>C</i> -terminálního fragmentu	
7	<i>N</i> -terminální fragment + GlcNAc	H.Mikysková [20]
8	<i>C</i> -terminální fragment + Man	Tato práce
9	<i>N</i> -terminální fragment + Man	H.Mikysková [20]
10	<i>C</i> -terminální fragment + GlcNAc	Tato práce
11	Ekvimolární směs <i>N</i> -term.GlcNAc + <i>C</i> -term.Man	
12	Ekvimolární směs <i>N</i> -term.Man + <i>C</i> -term.GlcNAc	
13	Ekvimolární směs <i>N</i> -term.Man + <i>C</i> -term.Man	
14	Ekvimolární směs <i>N</i> -term.GlcNAc + <i>C</i> -term.GlcNAc	
15	<i>N</i> -terminální peptid, mutant Asn <sub>11</sub> ->Tyr <sub>11</sub>	Xaia, Švédsko
16	<i>C</i> -terminální peptid, mutant Ser <sub>xxx</sub> ->Tyr	Xaia, Švédsko
17	<i>N</i> -terminální Tyr mut. + <i>C</i> -terminální Tyr mut.	
18	Trypstické štěpy nativního propeptidu, vzorek 2	K. Bezouška [21]

#### 4.6 Rekonstituce enzymové aktivity

Výsledky rekonstitučních aktivit jsou uvedeny na obrázku 10 na str. 30. Bez přítomnosti propeptidu k rekonstituci enzymové aktivity nedochází a naopak v přítomnosti přirozené formy propeptidu došlo k velmi účinné rekonstituci (vzorek 2) v souladu s literaturou [6,10]. Tato úroveň rekonstituované enzymové aktivity byla proto vzata jako 100 % rekonstituce, a na ní byly vztahovány ostatní výsledky. Celkově je možno shrnout, že rekonstituce enzymové aktivity fragmenty propeptidů jsou poměrně málo účinné. Na druhou stranu je zajímavé, že přesto i po zrušení celistvosti propeptidu k určitému

obnovení enzymové aktivity docházelo, a to výlučně v přítomnosti směsí obsahujících jak *N*-terminální tak i *C*-terminální glykosylované fragmenty (vzorky 11 a 13), nebo fragmenty, u nichž byla glykosylace v poloze 11 nahrazena tyrosinovými zbytky. Naopak u směsí neglykosylovaných fragmentů k rekonstituci aktivity nedocházelo (vzorek 6).



**Obrázek 10**

Rekonstituční aktivity použitých látek sledované v hexosaminidasovém rekonstitučním systému. Úroveň rekonstituce dosahovaná pomocí přirozeného propeptidu je vzata jako 100 %, a na ní jsou potom vztahovány ostatní experimenty. Označení vzorků obsahuje tabulka 1 na str. 29

## 5 DISKUSE

Propeptid plísňové hexosaminidasy je jedinečnou strukturní doménou typickou právě pro tento enzym. Je to struktura, která je v celkové architektuře enzymu nepostradatelnou, jelikož, jak potvrzují předchozí studie, je přítomnost propeptidu nezbytná pro správnou a úplnou funkci enzymu. Studie hovořící jak o propeptidu hexosaminidasy tak o hexosaminidase byly uskutečněny v Laboratoři architektury proteinů v MBÚ AV ČR v.v.i. a další studie i nadále probíhají. Právě pro další studie je třeba dostatek vhodného materiálu. K tomu právě přispívá i má práce, jejímž výsledkem takový materiál je.

Pro přípravu C – terminálního fragmentu propeptidu hexosaminidasy byl vybrán expresní systém pET 31-b, který je vhodný pro přípravu peptidů a menších proteinů do celkové délky asi 100 aminokyselin, přičemž požadovaný fragment měl délku 19 aminokyselin. Tento výběr se během experimentu ukázal jako vhodný, jelikož průběh práce s vektorem byl bez větších problémů, navíc firma Novagen poskytuje i přesný protokol a vhodné doplňky pro práci s tímto vektorem. V tomto expresním systému byl původní gen pro nosičový enzym mutovaný, aby z něj byly eliminovány přirozené methioninové zbytky, a nedocházelo k tvorbě velkého množství obtížně separovatelných produktů [18].

Ligace do vektoru proběhla bez větších problémů. Buňky transformované vektorem s úspěšně zaligovaným insertem se zdařilo vybrat pomocí restrikční analýzy, které byly podrobeny tři klony narostlých kolonií bakterií transformovaných ligační směsí. Po vyhodnocení restrikční analýzy byl ze tří klonů jeden úspěšný. Tento úspěšný klon byl o 60 pb větší než klony neúspěšné, tedy obsahoval zaligovanou sekvenci požadovaného nonadekapeptidu. Kolonie bakterií s úspěšným klonem pak byla vybrána jako vhodná k produkci většího množství plasmidové DNA. Celkově pak bylo dosaženo požadovaného výsledku, tímto výsledkem byla správná aminokyselinová sekvence odpovídající požadované sekvenci C-terminálního fragmentu propeptidu. Tento výsledek byl ověřen pomocí automatického DNA sekvenování

Krok samotné produkce fragmentu propeptidu byl indukován pomocí IPTG. Nastartování produkce v expresních hostitelských buňkách bylo ověřováno pomocí indukčního pokusu, kdy byly dvě kultury bakterií indukovány přidáním IPTG a byly srovnávány s dvěma neindukovanými kulturami bakterií. Ověření, zda skutečně došlo k indukci exprese fúzního proteinu, proběhlo pomocí SDS elektroforesy, kde by podle



teorie měl být patrný rozdíl ve velikosti bakteriálních proteinů. Indukované kultury bakterií by měly obsahovat proteiny o 16 kDa větší, tento rozdíl právě odpovídá velikosti požadovaného fúzního proteinu. Tento pokus, jak dokazují výsledky, dopadl podle očekávání.

Dosavadní studie možnosti glykosylace propeptidu hexosaminidasy z *Penicillia oxalicum* předpověděly 2 možná místa glykosylace, a to jedno pro *N*-glykosylaci (GlcNAc) a druhé pro *O*-glykosylaci obsahující mannosu. Pro potřebu prováděných rekonstitučních pokusů byla provedena glykosylace *in vitro* a to se dvěma různými cukernými zbytky – GlcNAc a mannosou. Výsledkem vazby cukerných zbytků na propeptid je zvýraznění hydrofilního charakteru propeptidu, což při chromatografii na obrácené fázi znamenalo velmi dobrou separaci, a vysokou čistotu jednotlivých odlišně modifikovaných fragmentů propeptidu a neglykosylovaného fragmentu propeptidu. Správné a očekávané místo glykosylace bylo úspěšně ověřeno pomocí několika analytických technik.

V samotných rekonstitučních pokusech byla použita široká škála látek, která poskytla mnoho rekonstitučních variant. V těchto různých variantách se vyskytly: Nativní propeptid, neglykosylovaný propeptid, *C*-terminální a *N*-terminální fragmenty ve třech formách – glykosylované GlcNAc, glykosylované mannosou a neglykosylované, a různé náhodné fragmenty propeptidu.

Výsledky ukázaly, že přítomnost propeptidu je nezbytná pro enzymovou aktivitu hexosaminidasy, což pouze potvrzuje poznatky z literatury [6,10]. Celková úspěšnost jednotlivých rekonstitucí nebyla příliš vysoká, ale přinesla nové zajímavé poznatky.

Zajímavé je, že pro enzymovou aktivitu enzymu není nutné, aby byl propeptid celistvý. Pro úspěšnou rekonstituci enzymové aktivity postačuje přítomnost pouze *C*-terminálního a *N*-terminálního fragmentu, ovšem nezbytnou podmínkou je buď jejich glykosylace, nebo může být glykosylace nahrazena navázáním tyrosylových zbytků. Nejvyšší úspěšnosti rekonstituce pak bylo dosaženo, když byly oba fragmenty glykosylovány takovým způsobem, jak je tomu u nativních enzymů. Ale ukázalo se také, že varianta glykosylace jednotlivých fragmentů, jako je tomu u nativní formy enzymu není jedinou, která zaručuje enzymovou aktivitu, protože k úspěšné rekonstituci došlo i v případě, kdy byly oba fragmenty glykosylovány mannosou. Bohužel však při této rekonstituci nebylo dosaženo takové úspěšnosti jako u prvně zmíněné varianty.

Jak bylo výše zmíněno, pro enzymovou aktivitu hexosaminidasy není nutná celistvost propeptidu, ale je nutné doplnit podmínku, že nestačí, aby byly přítomny pouze náhodně generované fragmenty propeptidu, jak dokazují provedené experimenty. Ale musí se tedy jednat o zcela konkrétní fragmenty, odpovídající pravděpodobně strukturně uspořádaným doménám propeptidu.

## 6 Závěr

V této práci se úspěšně podařilo použít vhodný expresní systém, přičemž výsledkem celé exprese bylo připravení poměrně velkého množství požadovaného C – terminálního fragmentu hexosaminidasy. Zdařilé rovněž byly výsledky následných pokusů, ke kterým byl připravený materiál použit. Při těchto rekonstitučních pokusech se zdařilo jak ověřit dosud známá fakta, tak i dojít k novým zajímavým poznatkům. A celkově bylo dosaženo všech vytyčených cílů.

## 7 LITERATURA

1. [http://www.brenda-enzymes.org/php/result\\_flat.php4?ecno=3.2.1.52](http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.52) [cit. 8.4. 2008]
2. <http://www.expasy.ch/enzyme/3.2.1.52> [cit. 9.4. 2008]
3. Sinnott, M.L.: Chem. Rev. **90**, 1171-1202 (1990). Catalytic mechanism of enzymic glycosyl transfer.
4. Mark, B.L., Vocadlo, D.J., Knapp, S., Triggs-Raine, B.L., Withers, S.G., James, M.N.: J. Biol. Chem. **276**, 10330-10337 (2001). Crystallographic Evidence for Substrate-assisted Catalysis in a Bacterial  $\beta$ -Hexosaminidase.
5. Rüdiger, E., Kopecký Jr, V., Hofbauerová, K., Baumruk, V., Novák, P., Pompach, P., Man, P., Plíhal, O., Kutý, M., Kulik, N., Sklenář, J., Ryšlavá, H., Křen, V., Bezouška, K.: BMC Struct. Biol. **7**, 32 (2007). Structure of the dimeric *N*-glycosylated form of fungal  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase revealed by computer modeling, vibrational spectroscopy, and biochemical studies.
6. Plíhal, O., Sklenář, J., Hofbauerová, K., Novák, P., Man, P., Pompach, P., Kavan, D., Ryšlavá, H., Weignerová, L., Charvátová- Pišvejcová, A., Křen, V., Bezouška, K.: Bioch. **46**, 2719-2734 (2007). Large propeptides of fungal  $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidases are novel enzyme regulators that must be untracellularly processed to kontrol aktivty, dimerization, and secretion into extracellular enviroment.
7. Henrissat, B.: Biochem. J. **280**, 309-316 (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.
8. [http://www.cazy.org/fam/acc\\_GH.html](http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html) [cit. 9.4. 2008]
9. Tews I, Perrakis A, Oppenheim A, Dauter Z, Wilson KS, Vorgias CE.: Nat. Struct. Biol. **3**, 638-648 (1996). Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease.
10. Plíhal, O., Sklenář, J., Kmoníčková, J., Man, P., Pompach, P., Havlíček, V., Křen, V., Bezouška, K. : Bioch. Soc. Trans. **32**, 764-765 (2004). *N*-glycosylated catalytic unit meets *O*-glycosylated: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase.
11. Kolektiv autorů: Biochemie, Základní kurz, Karolinum Praha (2005)
12. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
13. Berghammer, H., Auer, B.: Biotechniques **14**, 524-528 (1993). „Easypreps“: fast and easy plasmid minipreparation for analysis of recombinant clones in *Escherichia coli*.
14. Promega Protocols and Applications Guide, 2. vydání, Promega Corporation (1991).
15. Kuliopulos, A., Walsh, C.T.: J. Am. Chem. Soc. **116**, 4599-4607 (1994). Production, purification, and cleavage of tandem repeats of recombinant peptides.
16. Rodríguez, J.C., Wong, L., Jennings, P.A.: Protein Expres. Purif. **28**, 224-231 (2003). The solvent in CNBr cleavage reactions determines the fragmentation efficiency of ketosteroid isomerase fusion proteins used in the production of recombinant peptides.
17. Macmillan, D., Bill, R.B., Sage, K.A., Fern, D., Flitsch S.: Chem. Biol. **8**, 133-144 (2001). Selective *in vitro* glycosylation of recombinant proteins: semi-synthesis of novel homogenous glycoforms of human erythropoietin.

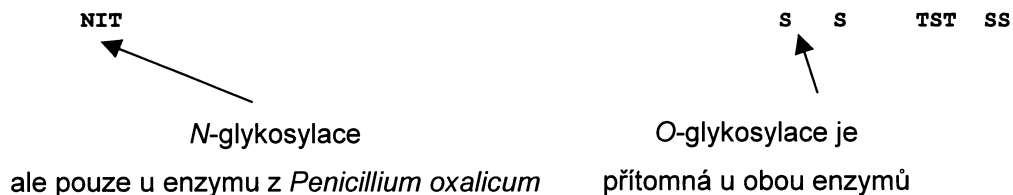
- 
18. Kuliopulos, A., Shortle, D., Talalay, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8893-8897 (1987). Isolation and sequencing of the gene encoding  $\Delta^5$ -3-ketosteroid isomerase from *Pseudomonas testosteroni*: overexpression of the protein.
  19. Vysoká, M., vypsáno z bakalářské práce, Katedra biochemie UK PřF 2008
  20. Mikysková, H., vypsáno z bakalářské práce, Katedra biochemie UK PřF 2008
  21. Bezouška, K.: osobní sdělení



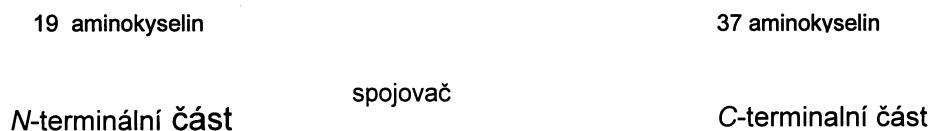
**Příloha B** – Srovnání aminokyselinových sekvencí a glykosylace u propeptidů izolovaných z plísňových hexosaminidas získaných ze sbírkových kmenů *Aspergillus oryzae* CCF1066 (znázorněno zelenou barvou), a *Penicillium oxalicum* CCF3438 (znázorněno žlutou barvou), a výsledek analýzy glykosylace těchto propeptidů.

A)

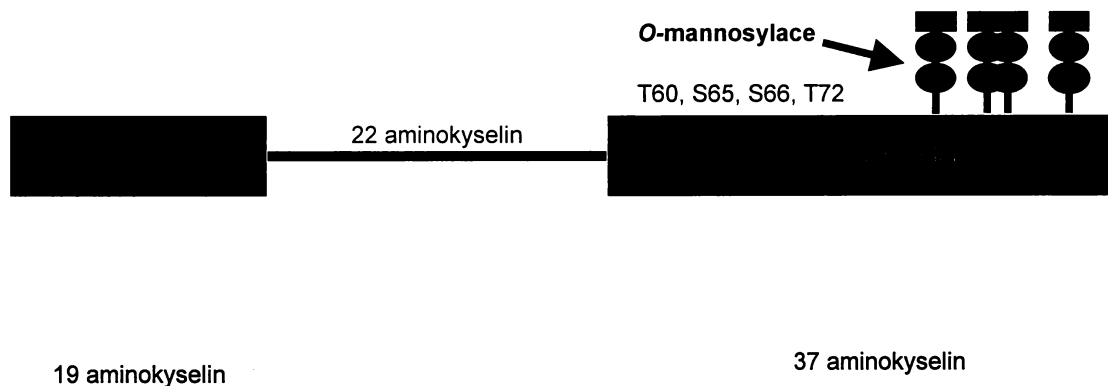
VGVNPLPAPREISWGSSGPKSIAGELQLRTDSDSADGIVADAWNRAWETIVALRWVPAATEAPISSFEFPPTPTAGAS



B)



C)



A) Aminokyselinová sekvenční podobnost kmene *Aspergillus oryzae* CCF1066 (zelená sekvence) a *Penicillium oxalicum* CCF3438 (žlutá sekvence).

B) Schéma jednotlivých částí propeptidu.

C) Experimentálně zjištěná glykosylace u obou kmenů.

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

<b>Jméno a příjmení Adresa</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>