

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze  
Katedra biochemie

Trávicí aspartátová proteasa  
mandelinky bramborové

Digestive aspartic protease of  
Colorado potato beetle

Jaroslav Srp

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc

Školitel-specialista: RNDr. Michael Mareš, CSc.

2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Michaela Mareše, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne: .....

Podpis: .....

Velmi rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Michaelovi Marešovi, CSc. za cenné rady, vstřícnost, ochotu a trpělivost při zpracovávání diplomové práce a také Ing. Martině Nussbaumerové, Ph.D. za obětavé vedení v praktické části této práce. Ostatním členům laboratoře bych rád poděkoval za příjemné pracovní prostředí a za ochotu vždy poradit. Za posouzení celé práce bych chtěl poděkovat Doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. Na závěr bych chtěl poděkovat své rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

## ABSTRAKT

Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) patří mezi ekonomicky významné herbivorní škůdce. Při degradaci proteinů obsažených v potravě mandelinky hraje důležitou roli aspartátová peptidasa typu kathepsinu D (LdCD). Tato práce popisuje přípravu dvou expresních systémů v *Escherichia coli* a *Pichia pastoris* pro produkci rekombinantního LdCD. Byl sestaven a optimalizován protokol pro refolding LdCD z denaturované formy proteinu. Byla popsána aktivace neaktivního zymogenu LdCD a mechanismus odštěpení propeptidu (aktivačního peptidu), které probíhá autokatalyticky v kyselém pH nebo pomocí cysteinové peptidasy legumainu. Byla charakterizována proteolytická aktivita LdCD s využitím flourogenního peptidového substrátu a proteinových substrátů a byly určeny kinetické parametry a pH optimum enzymu. Inhibiční specifita LdCD byla analyzována se sadou peptidasových inhibitorů. LdCD byl významně inhibován pomocí PDI („potato cathepsin D inhibitor“), proteinového inhibitoru produkovaného v listech brambor. To naznačuje, že PDI je přirozený obranný protein selektivně směřovaným rostlinou proti LdCD ve střevu mandelinky bramborové s cílem blokovat trávicí systém tohoto herbivorního škůdce. V práci je diskutováno potenciální využití PDI při konstrukci transgeních plodin odolných proti hmyzím škůdcům.

*Klíčová slova:* kathepsin D, peptidasy, peptidasové inhibitory, refolding, rekombinantní exprese

## ABSTRACT

Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) is an economically important herbivorous pest. Cathepsin D-like aspartic peptidase (LdCD) plays an important role during protein degradation in the midgut of Colorado potato beetle. This work describes the preparation of two expression systems, namely in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*, for the production of recombinant LdCD. The protocol for refolding of denatured LdCD was designed and optimized. Activation of the inactive LdCD zymogen and cleavage of the propeptide (activation peptide) were investigated. This process proceeds autocatalytically at acidic pH or with the assistance of the cysteine peptidase legumain. The proteolytic activity of LdCD was characterized using fluorogenic peptidic substrate and protein substrates, and kinetic parameters and pH optimum were determined. The inhibition specificity of LdCD was analyzed using a panel of peptidase inhibitors. LdCD was significantly inhibited by PDI (potato cathepsin D inhibitor), a protein inhibitor produced in potato leaves. This suggests that PDI is a natural defense protein, which is directed against LdCD in the midgut of Colorado potato beetle in order to block the digestion. The potential application of PDI in the construction of transgenic crops resistant against insects is discussed.

*Key words:* cathepsin D, peptidase, peptidase inhibitors, refolding, recombinant expression

(In Czech)

## Seznam použitých zkratek

A <sub>305</sub>	absorbance při vlnové délce 360 nm
A <sub>320</sub>	absorbance při vlnové délce 320 nm
A <sub>360</sub>	absorbance při vlnové délce 360 nm
Abz	2-aminobenzoyl
ACE	angiotensin konvertující enzym „angiotensin converting enzyme“
AIDS	syndrom získané imunodeficiencie „acquired immune deficiency syndrome“
APP	amyloidní prekursorový protein
APS	peroxodisíran amonný
bp	párů bází „base pair“
BSA	hovězí sérum albumin
CAPS	3-[cyklohexylamino]-1-propansulfonová kyselina
cDNA	komplementární DNA „complementary DNA“
DISC	„death-inducing signalling complex“
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOC	deoxycholát sodný
DTT	dithiotreitol
E-64	N-(trans-epoxysukciny)-L-Leu-4-guanidinbutylamid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	epiteliární růstový faktor „epithelial growth factor“
EtOH	ethanol
GSH	redukováná forma glutathionu
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
HIV	virus lidské imunodeficiencie „human immune deficiency virus“
HRP	křenuvová peroxidasa „horse redish peroxidase „
IC <sub>50</sub>	inhibiční koncentrace v polovině maximálního účinku
IGF-1	„insulin-like growth factor 1“
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kDa	kilodalton
K <sub>M</sub>	Michaelisova konstanta
LB	bakteriální médium Luria-Bertani
LdCD	kathepsin D mandelinky bramborové ( <i>Leptinotarsa decemlineata</i> )

LdCD C-tag .....	LdCD mající na C konci histidinovou kotvu
LdCD N-tag .....	LdCD nesoucí na N-konci histidinovou kotvu
MAP .....	mitogeny aktivovaná protein kinasa
mRNA .....	informační ribonukleová kyselina „messenger ribonucleic acid“
NADPH .....	nikotinamidadenindinukleotid fosfát
NTA .....	nitrilotrioctová kyselina
OD <sub>600</sub> .....	optická hustota při vlnové délce 600 nm
PAGE .....	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu
PDI .....	inhibitor kathepsinu D izolovaný z brambor „potato cathepsin D inhibitor“
Pefabloc .....	4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonylfluorid, hydrochlorid
pepstatin .....	isovaleryl-Val-Val-Sta-Ala-Sta
PMSF .....	fenylmethylsulfonylfluorid
PPO .....	polyfenoloxidas
proLdCD .....	proenzym LdCD
pseudoLdCD .....	pseudofорма LdCD
PVDF .....	polyvinylidendifluorid
PVP .....	polyvinylpyrrolidon
RFU .....	relativní fluorescenční jednotky
RNA .....	ribonukleová kyselina
rpm .....	otáček za minutu „rotation per minute“
SDS .....	dodecylsulfát sodný
SOC .....	"super optimal broth with catabolite repression" médium
TAE .....	Tris-acetát, EDTA pufr
TBS .....	„Tris Buffer Saline“ pufr
TEMED .....	N, N, N', N'- tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$ .....	faktor nekrotizující nádory „tumor necrosis factor“
Tris .....	tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTBS .....	TBS a 0,05% Tween
VZP .....	vzorkový pufr
YPD .....	extrakt z kvasinek, pepton, dextrosa

## Zkratky aminokyselin

Jednopísmenná zkratka .....třípísmenná zkratka..... název aminokyseliny

A	Ala	alanin
C	Cys	cystein
D	Asp	kyselina asparagová
E	Glu	kyselina glutamová
F	Phe	fenylalanin
G	Gly	glycin
H	His	histidin
I	Ile	isoleucin
K	Lys	lysin
L	Leu	leucin
M	Met	methionin
N	Asn	asparagin
	Nph	nitrofenylalanin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
	Sta	statin
T	Thr	threonin
V	Val	valin
W	Try	tryptofan
Y	Tyr	tyrosin



# OBSAH

<b>1</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>Proteolytické enzymy .....</b>	<b>12</b>
<b>1.2</b>	<b>Aspartátové peptidasy.....</b>	<b>14</b>
1.2.1	Struktura aspartátových peptidas .....	15
1.2.2	Mechanismus katalýzy u aspartátových peptidas.....	17
1.2.3	Substrátová specifita aspartátových peptidas .....	18
1.2.4	Regulace aktivity peptidas .....	19
1.2.5	Inhibitory aspartátových peptidas .....	20
<b>1.3</b>	<b>Kathepsin D .....</b>	<b>22</b>
1.3.1	Biosyntéza a transport kathepsinu D.....	22
1.3.2	Struktura kathepsinu D.....	24
1.3.3	Proenzym kathepsinu D a funkce propeptidu .....	25
1.3.4	Funkce kathepsinu D.....	27
<b>1.4</b>	<b>Nemoci spojené s aspartátovými peptidasami .....</b>	<b>28</b>
1.4.1	Renin a hypertenze .....	28
1.4.2	HIV peptidasa a AIDS.....	29
1.4.3	Mikrobiální patogeny a kandidosy.....	30
1.4.4	Plasmodium falciparum a malárie.....	31
1.4.5	Alzheimerova choroba .....	31
1.4.6	Nemoci spojené s kathepsinem D .....	33
1.4.6.1	Nádorové onemocnění prsu.....	33
<b>1.5</b>	<b>Trávení u hmyzu a proteolýza.....</b>	<b>34</b>
1.5.1	Morfologie trávicí soustavy u hmyzu.....	34
1.5.2	Trávicí peptidasy hmyzu .....	35
<b>1.6</b>	<b>Interakce rostlina – hmyz .....</b>	<b>36</b>
<b>1.7</b>	<b>Obranné mechanismy rostlin proti škůdcům .....</b>	<b>36</b>
<b>1.8</b>	<b>Signální dráhy při obraně rostlin .....</b>	<b>37</b>
<b>1.9</b>	<b>Adaptace škůdců na obranné mechanismy rostlin.....</b>	<b>38</b>
<b>1.10</b>	<b>Mandelinka bramborová.....</b>	<b>38</b>
1.10.1	Vývojová stádia mandelinky bramborové.....	40
1.10.2	Potrava mandelinky bramborové.....	40
1.10.3	Trávení proteinů u mandelinky bramborové.....	41
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁLY A EXPERIMENTÁLNÍ METODY .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Materiály .....</b>	<b>44</b>
3.1.1	Chemikálie .....	44
3.1.1.1	Peptidový substrát .....	44
3.1.1.2	Inhibitory peptidas.....	44
3.1.1.3	Komerční pufrы .....	44
3.1.1.4	Enzymy.....	44
3.1.1.5	Ostatní chemikálie.....	45
3.1.2	Biologické materiály .....	45
3.1.2.1	Materiály pro klonování .....	45

3.1.3	Přístroje a vybavení .....	46
3.1.3.1	Přístroje .....	46
3.1.3.2	Komerční soupravy .....	47
3.1.3.3	Standardy molekulových hmotností.....	47
3.1.3.4	Ostatní vybavení.....	47
<b>3.2</b>	<b>Metody.....</b>	<b>48</b>
3.2.1	Rekombinantní exprese v <i>Escherichia coli</i> .....	48
3.2.1.1	Příprava expresního vektoru pET100/D-TOPO® .....	48
3.2.1.1.1	Aplifikace DNA pomocí PCR.....	48
3.2.1.1.2	Horizontální agarosová elektroforéza .....	48
3.2.1.1.3	Izolace fragmentů DNA z agarosového gelu .....	49
3.2.1.1.4	Klonování PCR produktu do plasmidu pET100/D-TOPO® .....	49
3.2.1.1.5	Transformace kompetentních buněk .....	49
3.2.1.1.6	Výběr kolonií.....	50
3.2.1.1.7	Mini-preparace plasmidové DNA .....	50
3.2.1.1.8	Stanovení koncentrace DNA a její čistota.....	50
3.2.1.1.9	Určení sekvence DNA.....	50
3.2.1.1.10	Transformace a kultivace <i>Escherichia coli</i> .....	51
3.2.1.2	Příprava inkluzních tělísek .....	52
3.2.1.3	Afinitní purifikace proteinu po expresi .....	52
3.2.2	Rekombinantní exprese v <i>Pichia pastoris</i> .....	53
3.2.2.1	Příprava expresního vektoru pGAPZα C .....	53
3.2.2.1.1	Restrikční štěpení plasmidu .....	53
3.2.2.1.2	Ligace do plasmidu .....	54
3.2.2.1.3	Transformace kompetentních buněk .....	54
3.2.2.1.4	Mini-preparace plasmidové DNA .....	54
3.2.2.1.5	Midi-preparace plasmidové DNA .....	54
3.2.2.2	Elektroporace <i>P. pastoris</i> .....	55
3.2.2.2.1	Linearizace plasmidové DNA .....	55
3.2.2.2.2	Příprava <i>P. pastoris</i> na elektroporaci.....	55
3.2.2.2.3	Provedení elektroporace .....	56
3.2.2.3	Expresce LdCD v <i>P. pastoris</i> .....	56
3.2.3	Elektroforetické metody .....	56
3.2.3.1	Příprava vzorků pro SDS-PAGE.....	56
3.2.3.2	SDS-PAGE – elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS 57	
3.2.3.3	Přenos proteinů na membránu a imunodetekce.....	57
3.2.3.4	Acetonová precipitace proteinů.....	58
3.2.4	Určení N-koncové aminokyselinové sekvence .....	58
3.2.5	Stanovení množství proteinu .....	58
3.2.6	Aminokyselinová analýza .....	58
3.2.7	Refolding LdCD .....	58
3.2.7.1	Kyselý refolding – protokol A .....	58
3.2.7.2	Kyselý refolding – protokol B.....	59
3.2.7.3	Bazický refolding .....	59
3.2.7.4	Aktivace LdCD .....	60
3.2.7.4.1	Autoaktivace LdCD.....	60
3.2.7.4.2	Aktivace legumainem.....	60
3.2.8	Kinetická měření s peptidovým substrátem .....	60
3.2.9	Měření kinetických parametrů.....	61

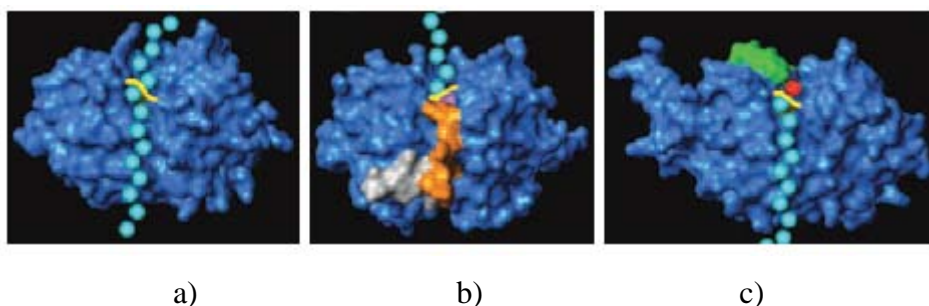
3.2.10	Měření inhibice LdCD .....	61
3.2.10.1.1	Aktivitní test v přítomnosti inhibitorů.....	61
3.2.10.2	Stanovení konstanty IC <sub>50</sub> .....	62
3.2.11	Štěpení proteinových substrátů .....	62
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>63</b>
<b>4.1</b>	<b>Rekombinantní exprese LdCD v systému Escherichia coli .....</b>	<b>63</b>
4.1.1	Klonování LdCD do plasmidu pET100/D-TOPO® .....	63
4.1.2	Expresa v E. coli.....	64
4.1.3	Purifikace rekombinantních proteinů .....	66
4.1.3.1	Příprava inkluzních tělísek .....	66
4.1.3.2	Izolace afinitní chromatografií .....	67
4.1.4	Refolding LdCD .....	68
4.1.4.1	Kyselý refolding – protokol A .....	69
4.1.4.2	Kyselý refolding – protokol B.....	70
4.1.4.3	Bazický refolding .....	72
<b>4.2</b>	<b>Rekombinantní exprese LdCD v systému Pichia pastoris .....</b>	<b>72</b>
4.2.1	Klonování LdCD do plasmidu pGAPZα C.....	72
4.2.2	Expresa v P. pastoris .....	73
<b>4.3</b>	<b>Mechanismus a podmínky aktivace zymogenu LdCD.....</b>	<b>74</b>
<b>4.4</b>	<b>Biochemické vlastnosti LdCD .....</b>	<b>78</b>
4.4.1	Určení pH optima enzymové aktivity .....	78
4.4.2	Kinetické parametry LdCD .....	78
4.4.3	Inhibiční specifita LdCD .....	79
4.4.4	Štěpení proteinových substrátů .....	80
<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>85</b>
	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>86</b>

# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 *Proteolytické enzymy*

Mezi proteolytické enzymy řadíme ty, které jsou schopné hydrolýzou štěpit peptidovou vazbu v proteinech a peptidech. Můžeme je nalézt ve všech živých organismech (bakterie, kvasinky, rostliny, živočichové) i virech, kde plní řadu biochemických funkcí od nespecifického trávení až po přísně regulované procesy (apoptosa, krevní koagulace, aktivace či degradace peptidových hormonů atd.). Proteolytické enzymy se běžně v literatuře nazývají proteasy, proteinasy nebo peptidasy. Tato nomenklatura je historicky odvozena od jejich substrátů, v dnešní době se ale doporučuje název peptidasy, jakožto enzymy hydrolyzující peptidovou vazbu (Barrett a McDonald, 1986).

Peptidasy lze podle místa štěpení rozdělit na exopeptidasy (štěpící na konci peptidového řetězce) a na endopeptidasy (štěpící uvnitř peptidového řetězce). Exopeptidasy lze dále dělit podle místa hydrolýzy na karboxypeptidasy (štěpící C-terminální aminokyselinu) a aminopeptidasy (štěpící N-terminální aminokyselinu). Exopeptidasy lze klasifikovat také podle počtu aminokyselin, které odštěpí od peptidu na např. dipeptidasy (odštěpí dipeptid), tripeptidasy (odštěpí tripeptid) atd. (Obr. 1.1).



**Obrázek 1.1: Místa štěpení peptidas.** Na obrázku jsou zástupci cysteinových peptidas. a) kathepsin L (endopeptidasa); b) kathepsin H (aminopeptidasa); c) kathepsin X (karboxypeptidasa). Světle modře jsou znázorněny štěpené peptidové řetězce, žlutě je naznačeno štěpené místo, fialové N-koncová a červeně C-koncová odštěpená aminokyselina. Šedou, oranžovou a zelenou jsou zvýrazněné strukturní segmenty zodpovědné za omezený přístup substrátu do aktivního centra a vznik exopeptidasové aktivity. Převzato z: Turk, 2006.

Původně se peptidasy řadily mezi enzymy zodpovědné za degradaci proteinů při trávení na úrovni celého organismu i na úrovni buňky. Až později práce na trypsinogenné aktivaci (Davie a Neurath, 1955; Davie a Ratnoff, 1964) nebo na mechanismu krevního srážení (MacFarland, 1964) ukázaly na koncept regulace aktivity enzymů proteolýzou a s tím spojené signální dráhy. Tyto dráhy peptidas se liší od jiných signálních drah tím, že jsou až na výjimky ireverzibilní. Proteolýzou je regulována celá řada fyziologicky klíčových dějů jako

buněčný cyklus, buněčná proliferace a apoptosa, replikace DNA, remodelace tkání, homeostáze, hojení ran nebo imunitní odpověď. Jedná se o velmi podstatné děje, které vyžadují přísnou regulaci. Chybná regulace aktivit některých regulačních peptidas může vést k celé řadě patologických stavů jako kardiovaskulární onemocnění, rakovina, osteoporóza, neurodegenerativní choroby a další (Turk, 2006).

Analýzou lidského a myšního genomu bylo nalezeno více než 500-600 peptidas (okolo 2% genomu), z nichž je většina ortologních, tj. že se vyskytují u více druhů organismů. (Puente et al., 2003; Rawlings et al., 2004).

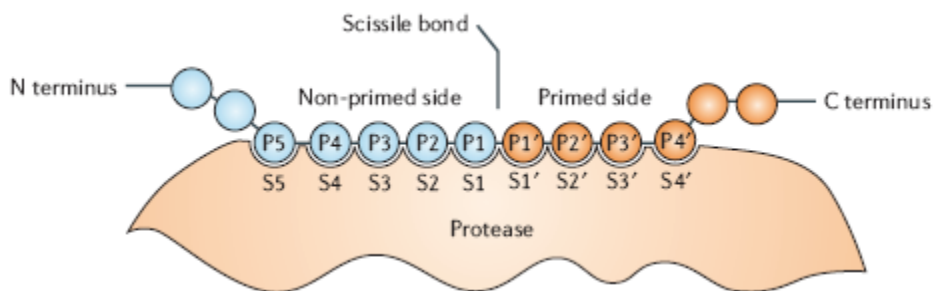
Během evoluce se peptidasy musely přizpůsobit na široké spektrum podmínek, které se v prostředí různých organismů vyskytuje (odlišnosti v pH, redukčním potenciálu apod.). Proto se u různých peptidas vyvinuly odlišné způsoby pro štěpení peptidové vazby. Takto lze peptidasy dělit podle funkční skupiny v jejich aktivním centru do osmi skupin a to na peptidasy serinové, cysteinové, aspartátové, glutamátové, threoninové, metalopeptidasy, peptidasy se smíšenou funkcí a peptidasy s neznámou funkcí (<http://merops.sanger.ac.uk/>, staženo dne: 12.3.2010). Serinové peptidasy a cysteinové peptidasy používají k nukleofilnímu ataku štěpené peptidové vazby hydroxyl resp. thiolovou skupinu aminokyseliny ve svém aktivním centru. Aspartátové peptidasy a metalopeptidasy štěpí peptidovou vazbu pomocí aktivované molekuly vody, která interaguje s aspartátovými zbytky nebo s iontem kovu (nejčastěji zinku nebo manganu) v aktivním centru enzymů (Tab. 1.1).

Třída peptidas	Struktura aktivního místa	Příklad klan / rodiny	Zástupce
Serinové	His; Asp; Ser	PA / S1	trypsin
Cysteinové	His; Cys	CD / C14	kaspasa-9
Threoninové	Thr	T / T5	ornitin acetyltransferasa
Glutamátové	Glu; Gln	GA / G1	scytalidoglutamová peptidasa
Aspartátové	Asp; Asp	AA / A1	kahepsin D
Metalopeptidasy	iont $Zn^{2+}$ ; $Mn^{2+}$ ; $Ca^{2+}$	CM / M14	karboxypeptidasa A1
Neznámá funkce	???	U / U57	yabG protein
Smíšená funkce	???	PC / S51	dipeptidasa E

**Tabulka 1.1: Rozdělení peptidas podle funkčních skupin v aktivním centru.** Peptidasy lze dělit podle katalytických aminokyselin v aktivním místě do tříd. Převzato z: <http://merops.sanger.ac.uk/>, staženo dne: 12.3.2010.

K popisu štěpeného peptidu se používá model, ve kterém jsou aminokyseliny od N-konce ke štěpené vazbě označeny  $P_n'$  až  $P_1'$  a od štěpené vazby k C-konci  $P_1$  až  $P_n$ . Analogicky se popisují podmísta v aktivním centru peptidas, které váží tento peptid, tedy  $S_n$

až  $S_1$  (od N-konece ke štěpené vazbě) a  $S_1'$  až  $S_n'$  (od štěpené vazby k C-konci). Aminokyseliny hydrolyzované vazby se váží do podmíst  $S_1$  a  $S_1'$  (Obr. 1.2).



**Obrázek 1.2: Schématické znázornění vazby substrátu do specifických vazebných podmíst peptidasy. Štěpený peptidový řetězec je pospisován  $P_n$  až  $P_1$  od N-konece ke štěpené vazbě a  $P_1'$  až  $P_n'$  od štěpené vazby k C-konci. Aktivní místo peptidasy se popisuje obdobně jako peptidový substrát, tedy  $S_n \dots S_1$  od N-konce ke štěpené vazbě a od štěpené vazby k C-konci substrátu  $S_1' \dots S_n'$ . Upraveno podle: Turk, 2006.**

Proteolytické enzymy lze také dělit do klanů a rodin podle jejich evoluční příbuznosti. Klan obsahuje peptidasy, které vznikly z jednoho původního proteinu, ale divergovaly tak široce, že nelze dokázat jejich příbuznost na základě primární struktury. Jsou zastoupeny jednou nebo více rodinami, které vykazují evidentní evoluční příbuznost v terciální struktuře nebo v uspořádání aktivního centra. Každý klan je označen dvěma písmeny, kde první písmeno ukazuje na katalytický typ peptidasy (M- pro metalopeptidasy; A- pro aspartátové peptidasy; C- pro cysteinové peptidasy; S- pro serinové peptidasy; T- pro threoninové peptidasy; G- pro glutamátové peptidasy; P- pro peptidasy se smíšenou funkcí; U- pro peptidasy s neznámou funkcí) (<http://merops.sanger.ac.uk/>, staženo dne: 12.3.2010).

Rodina peptidas je skupina enzymů, které vykazují statisticky významnou příbuznost v podobnosti terciální struktury nebo v podobě bloků konzervovaných aminokyselinových sekvencí. Rodina peptidas se vyvinula z jednoho předka. Rodina je označena písmenem podle katalytického typu peptidasy (A-, C-, S-, M-, G-, T-, U- analogicky jako u označení klanů peptidas) a přiřazeným číslem. Některé rodiny lze dále dělit na podrodiny (<http://merops.sanger.ac.uk/>, staženo dne: 12.3.2010).

## 1.2 Aspartátové peptidasy

Aspartátové peptidasy lze rozdělit do do šesti klanů (AA – AF a A-) a do patnácti rodin (např. A1, A2, A3, A22, A33). Rodina A1, nazývána také pepsinová rodina, obsahuje nejznámější zástupce aspartátových peptidas: pepsin A a gastricin obsažené v žaludeční

šťávě; renin se nachází v ledvinách a v krvi a kathepsin D je obsažen v lysosomech většiny lidských buněk. Rodina A2 obsahuje např. peptidasu z viru HIV (<http://merops.sanger.ac.uk/>, staženo dne: 12.3.2010).

Aspartátové peptidasy jsou proteolytické enzymy, pro které je typické nízké pH optimum a jsou citlivé na kompetitivní inhibici mikrobiálním peptidem pepstatinem. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje kolem 35 000 Da a jejich aktivní místo obsahuje dvě aspartátové kyseliny (Cooper, 2002).

Aspartátové peptidasy jsou širokou skupinou enzymů, vyskytují se u všech forem života od bakterií až po obratlovce, ale i u retrovirů. V živočišné říši jsou aspartátové peptidasy zodpovědné za trávení jak v trávicím traktu tak i na buněčné úrovni v lysosomech, ale i za přísně regulované procesy, jakými jsou programovaná buněčná smrt (apoptosa), řízení krevního tlaku (angiotense), řízení krevního srážení nebo se podílejí na zpracování peptidových hormonů. U parazitů jsou aspartátové peptidasy zodpovědné za štěpení proteinů získávaných z těla hostitele (např. hemoglobinu). Rostliny tyto enzymy využívají především pro štěpení zásobních proteinů při klíčení semen, účastní se i procesu opylení a reagují s patogeny (Ramalho-Santos et al., 1998). U retrovirů štěpí tzv. polyproteiny a jsou tedy zodpovědné za zrání virové částice (Cooper, 2002).

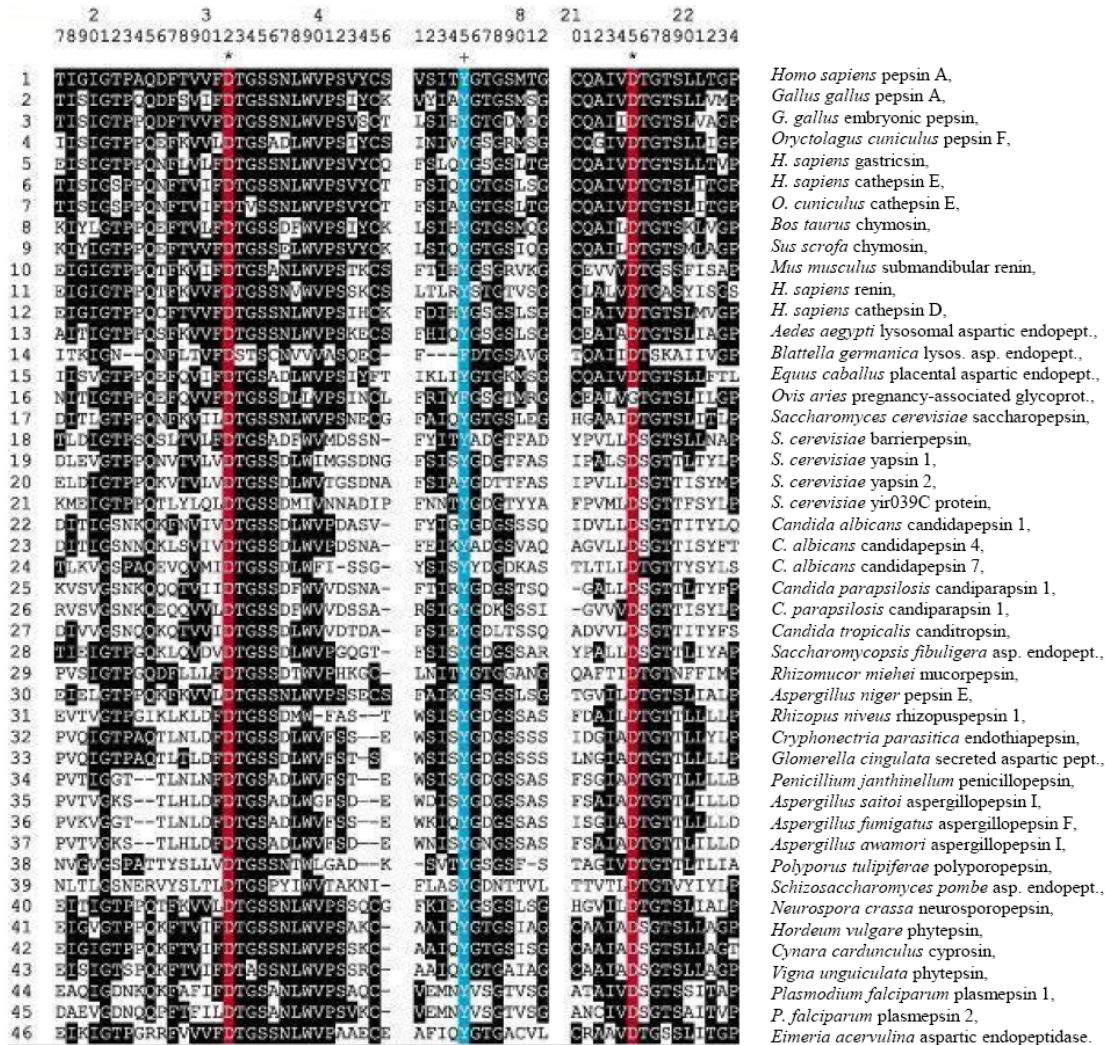
Zvláštnost aspartátových peptidas je, že mají pouze endopeptidasovou aktivitu. Není zřejmé, proč se tento způsob katalýzy nepoužívá v exopeptidasách.

### **1.2.1 Struktura aspartátových peptidas**

Eukaryotické aspartátové peptidasy mají obvykle okolo 330 aminokyselin a jsou to monomerní proteiny.

Aspartátové peptidasy sdílí celou řadu strukturních podobností: vysoký stupeň homologie v primární i terciální struktuře; katalytickou triádu Asp-Thr-Gly okolo dvou aspartátů v aktivním centru enzymu; podobnou sekvenci kolem této katalytické triády (Obr. 1.3, str. 16), pozici cysteinů a Tyr-75, okolo kterého se tvoří tzv. „chlopeň“, která je flexibilní a částečně je schopna zakrýt aktivní místo enzymu (Fusek a Vetvicka, 2005). Společné pro všechny aspartátové peptidasy je také vazebné místo pro substrát, které je tvořené hlubokou dutinou na jejímž dně jsou dva aspartáty. Peptidasy z rodiny pepsinu A1 jsou tvořeny dvěma laloky, které jsou strukturně podobné, což naznačuje, že mají společného předka, který se vyvinul genovou duplikací a fúzí v monomerní dvoulalokový enzym (Tang et al., 1978). Právě tyto laloky tvoří dutinu aktivního centra enzymu, která je schopna vázat osm aminokyselin v natažené konformaci  $\beta$ -listu (Obr. 1.4, str. 17). Tyto poznatky jsou podpořeny

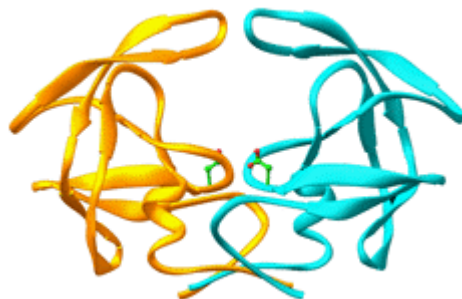
řadou vyřešených rentgenových struktur: např. pepsinogen A a pepsin A (Andreeva et al., 1984; Cooper et al., 1990; Hartsuck et al., 1992; James a Sielecki, 1986); kathepsin D (Baldwin et al., 1993; Metcalf a Fusek, 1993); renin (Rahuel et al., 1991; Sielecki et al., 1989); memapsin (Kageyama et al., 1989)).



**Obrázek 1.3:** Srovnání konzervativních sekvencí v okolí aktivního místa u vybraných aspartátových peptidas rodiny pepsinu. Tmavě jsou zvýrazněny shodné aminokyseliny, červeně jsou znázorněny katalytické aspartáty (Asp 32 a Asp 215), modře je zvýrazněn Tyr 75 (číslováno podle pepsinu). Převzato z: Barrett et al., 1998.

Aspartátové peptidasy mají obvykle tři disulfidické můstky na velmi konzervovaných místech. Kathepsin D tvoří ještě jednu disulfidickou vazbu navíc a to mezi cysteiny 27 a 96. Glykosylace není běžná u aspartátových proteas, je známá např. u kathepsinu D, kathepsinu E a memapsinu (Barrett et al., 1998).





**Obrázek 1.4:** Rentgenová struktura aspartátové peptidasy viru HIV. Zlatou barvou je zobrazena N-terminální doména (1-172 AMK) a tyrkysově C-terminální doména (173-326 AMK). Zeleně a červeně jsou znázorněny dva aspartáty, které váží molekulu vody. Převzato z: Voet a Voet, 2004.

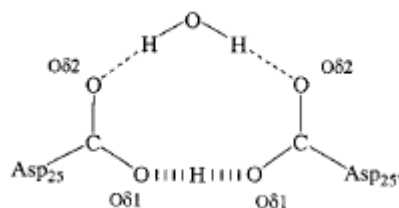
### 1.2.2 Mechanismus katalýzy u aspartátových peptidas

Peptidová vazba je termodynamicky velmi stabilní ( $\Delta G = -2$  kcal/mol). K chemické degradaci je třeba 6 M kyselina chlorovodíková, 100-120 °C po dobu 10-100 hodin v bezkyslíkatém prostředí. Další možnost kompletnímu rozštěpení peptidů je bazická hydrolyza ve 2-4 M NaOH při 100 °C po dobu 4 – 8 hodin (Voet a Voet, 2004). Enzymaticky katalyzovaná tato reakce probíhá i při fyziologické teplotě a pH rychlostí až 100 peptidových vazeb za sekundu bez spotřeby energie v podobě ATP.

Katalytický mechanismus peptidas je obecně založen na třech krocích:

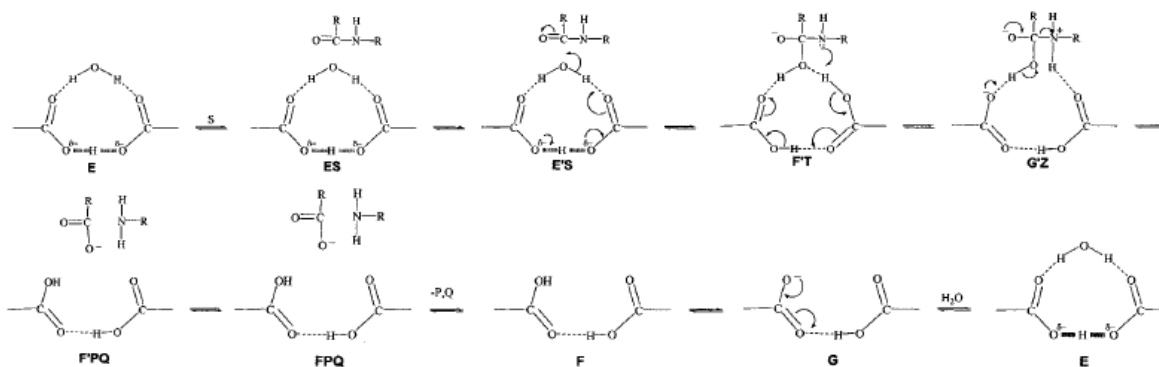
1. nukleofilní atak na karbonyl štěpené vazby a vznik tetrahedrálního intermediátu
2. elektrofilní stabilizace negativního náboje vzniklého na kyslíkovém atomu karbonylu u tetrahedrálního intermediátu
3. donace protonu pro vznik amidu na štěpené vazbě a uvolnění produktu.

K popisu mechanismu katalýzy u aspartátových peptidas se často používá jako modelový enzym pepsin (pH optimum v kyselé oblasti), který v kyselém prostředí má jeden aspartát v aktivním centru protonovaný ( $pK \sim 4,7$ ) a jeden částečně ionizovaný ( $pK \sim 1,1$ ). Ionizovaný aspartát by mohl působit jako nukleofilní činidlo na štěpenou peptidovou vazbu za vzniku tetrahedrálního intermediátu. Avšak nebyl nalezen žádný kovalentní intermediát enzym-substrát. Oba aspartáty v aktivním centru jsou tak blízko, že jsou schopny vodíkovými vazbami spolu interagovat a vázat molekulu vody, která je zodpovědná za nukleofilní atak štěpené vazby. Tato hypotéza byla potvrzena řadou vyřešených rentgenových struktur (Obr. 1.5, str. 18) (Voet a Voet, 2004).



**Obrázek 1.5:** Interakce katalytických aspartátů a vazba molekuly vody v katalytickém centru aspartátových peptidas (HIV peptidasa). V aktivním centru aspartátových peptidas katalytické jsou aspartáty spojeny vodíkovou vazbou a společně váží jednu molekulu vody. Převzato z: Piana a Carloni, 2000.

Vazbou substrátu do vazebné dutiny enzymu se zajistí správná geometrie a vzdálenost pro katalytickou reakci. Přesunem vodíku z molekuly vody ke kyslíku karbonylu Asp32 se utvoří záporně nabitý kyslík, který může nukleofilně atakovat karbonyl štěpené peptidové vazby substrátu. Druhý vodík z molekuly vody se přesouvá na dusík peptidové vazby a tímto procesem je definitivně přerušena vazba C-N a tvoří se produkty (Obr. 1.6). Záporně nabitě asparaginy pak váží novou molekulu vody a celý enzym se regeneruje a je schopen štěpit další substrát. Vzniklý N-terminální produkt nese na C-konci hydroxyl z molekuly vody a C-terminální produkt nese na amino skupině N-konce jeden vodík z molekuly vody (Northrop, 2001).



**Obrázek 1.6:** Mechanismus katalýzy u aspartátových peptidas. Na obrázku je znázorněn mechanismus katalýzy u aspartátových peptidas, nukleofilní atak aktivované molekuly vody na peptidovou vazbu navázaného substrátu, přesun elektronů a protonů, vznik produktu a regeneraci enzymu vazbou další molekuly vody. Převzato z: Northrop, 2001.

### 1.2.3 Substrátová specifita aspartátových peptidas

Aspartátové peptidasy jako endopeptidasy mají podélné aktivní místo, které je schopné interagovat s aminokyselinami substrátu po obou stranách štěpené vazby ( $P_x - P_x'$ ), což umožňuje štěpený peptid natáhnout do podobyβ -strukturní konformace a štěpenou vazbu

tak lépe zpřístupnit katalytickému místu. Substrát s více aminokyselinami umožňuje interakci s více vazebnými místy aktivního centra enzymu ( $S_x - S_x'$ ). Síla interakce mezi peptidasou a substrátem je dána interakčními schopnostmi jednotlivých aminokyselin substrátu s jednotlivými aminokyselinami enzymu. Vhodnou kombinací aminokyselin v peptidu a jeho délky je pak dosaženo optimálního substrátu s vysokými hodnotami kinetických konstant  $k_{kat}/K_m$  (Dunn a Hung, 2000; Hofmann et al., 1988).

Aspartátové peptidasy jsou schopné vázat do své vazebné dutiny substrát dlouhý až devět aminokyselin. Schechter popsal jako vazebné místo oblast  $S_5$  až  $S_3'$  okolo štěpené vazby (Schechter a Berger, 1967). Je zřejmé, že substrátová specifita se liší u různých peptidas. Například pepsin má velice širokou substrátovou specifitu, zatímco třeba renin má velice omezenou. Tyto rozdíly jsou dány funkcí těchto enzymů v organismu (Barrett et al., 1998).

Vhodné substráty pro aspartátové peptidasy rodiny pepsinu jsou ty, které v místě štěpené vazby obsahují hydrofobní aminokyseliny. Vyjimku tvoří endopeptidasy hub, které jsou schopné aktivovat trypsinogen štěpení vazby s lysinem v místě  $P_1$  (Abita et al., 1969). Studie štěpení oxidovaného B-řetězce insulínu pepsinem určily upřednostňované místo štěpení mezi aminokyselinami Phe-Phe (Ryle et al., 1968). Toto poznání umožnilo hledat vyhovující substrát pro určení sekundární specifity, tedy preferované aminokyseliny okolo štěpené vazby mezi Phe-Phe. Pomocí sekvenčních analýz pepsinových štěpů 177 různých proteinů byly určeny aminokyseliny, které nejlépe interagují s aminokyselinami v aktivním centru pepsinu, podle nichž byl jako optimální substrát navržen heptapeptid o sekvenci Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Val-Leu. Záměna Phe v pozici  $P_1'$  za p-nitrofenylalanin (Nph) umožnila spektrofotometrické sledování štěpení substrátu enzymem jako pokles absorbance při 305 nm. Tento heptapeptid byl dále upraven pro lepší rozpustnost ve vodném prostředí na oktapeptid Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Arg-Leu, který je široce používaným substrátem pro stanovení aktivit většiny aspartátových peptidas (Dunn a Hung, 2000).

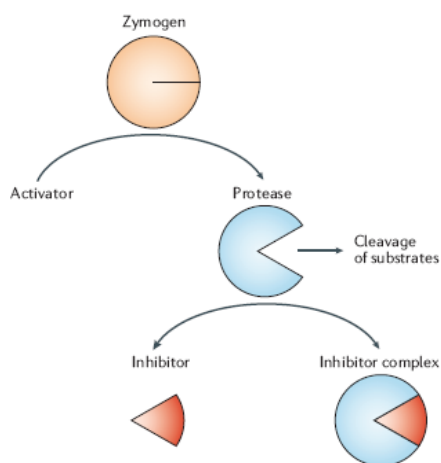
#### 1.2.4 Regulace aktivity peptidas

Regulace aktivity peptidas je vzhledem k jejich klíčovému účinku v organismu více než důležitá a probíhá jako u všech enzymů na více úrovních. Úvodní stupeň regulace je na úrovni transkripce příslušných genů a translace vzniklých mRNA, tedy mírou exprese enzymu. Pro peptidasy, které jsou syntetizovány v podobě prekursorových zymogenů, je další úroveň regulace jejich aktivace (Obr. 1.7, str. 20), která může být závislá na změně podmínek (pH u pepsinu apod.) nebo asistovaná tedy pod kontrolou jiných peptidas (takto vznikají i celé

kaskády aktivace např. při apoptose - kaspasy) nebo pomocí komplexu proteinů, který se utváří na membráně – DISC (death-inducing signalling complex), jako tomu je u iniciace proteolytické kaskády kaspas, která vede k apoptose (Turk, 2006).

Dalším možným způsobem, jak ovlivnit aktivitu peptidas je pomocí kofaktorů – proteinů, které jsou schopné se reverzibilně vázat na peptidasu, anebo inhibitorů, kteří působí nejčastěji allostericky. Dobře známý je účinek heparinu a jeho derivátů na regulaci krevního srážení. Ač se nejedná o protein a ani o klasický kofaktor, ale o glykosaminoglykan, patří mezi významné allosterické regulátory peptidas i jejich fyziologické inhibitory. V případě heparinu se jedná např. o regulaci Faktoru X kaskády krevního srážení (Turk, 2006).

Velkou skupinu látek, které ovlivňují aktivitu peptidas jsou jejich exogenní a endogenní inhibitory (Obr. 1.7; str. 20). Je zajímavé, že počet doposud objevených lidských inhibitorů (pouze 150) je menší než množství peptidas. Tento jev se vysvětluje nízkou specifitou inhibitorů, které pak mohou inhibovat celou škálu podobných peptidas. Například u lidí bylo posáno více než 180 různých metalopeptidas, zatímco inhibitory těchto enzymů známe pouze čtyři (TIMPS 1 až TIMPS 4 – tkáňové inhibitory metalopeptidas z anglického tissue inhibitor of metalloproteinases). Je běžné klasifikovat endogenní peptidasové inhibitory podle strukturního mechanismu, kterým inhibují jejich cílové peptidas (Bode a Huber, 2000; Turk, 2006).

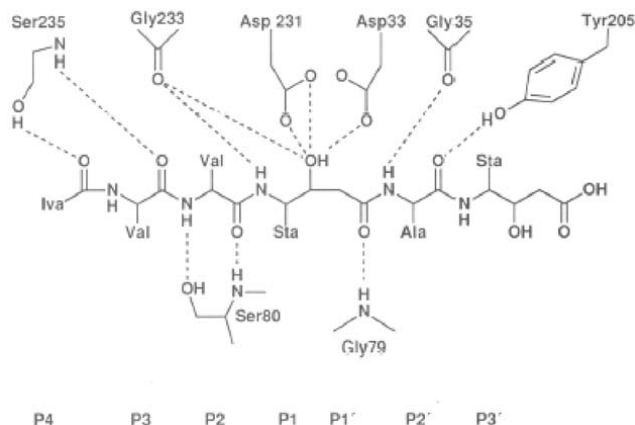


**Obrázek 1.7: Regulace aktivity peptidas.** Na obrázku jsou schématicky znázorněny možnosti regulace aktivity peptidas. Jedná se o regulaci ná úrovni samotné aktivace peptidasy z příslušného zymogenu anebo pomocí více či méně specifického inhibitoru. Převzato z: Turk, 2006.

### 1.2.5 Inhibitory aspartátových peptidas

Universální inhibitorem aspartátových peptidas je pepstatin (Aoyagi et al., 1971). Tento hexapeptid s nestandardní aminokyselinou (statin) v sekvenci je schopný zaujmout P<sub>1</sub> a

P<sub>1</sub>' podmísta v aktivním centru enzymu a vytěsnit molekulu vody, která je zapojena do mechanismu hydrolýzy peptidové vazby (Obr. 1.8). Pepstatin je účinný již při pikomolárních koncentracích a lze využít k titracím enzymu (Majer et al., 1997) nebo jako ligand při afinitních chromatografiích (Conner, 1989).



**Obrázek 1.8: Interakce inhibitoru pepstatin s kathepsinem D.** Schématicky jsou znázorněny vodíkové vazby mezi molekulou pepstatinu a kathepsinem D. V horní části obrázku jsou aminokyseliny aktivního centra enzymu a dole (Ser80 a Gly79) aminokyseliny smyčky enzymu, které se podílí na vazbě pepstatinu. Převzato z: Gacko et al., 2007.

Uměle připravené inhibitory aspartátových peptidas vycházejí ze sekvencí známých substrátů, ve kterých se štěpená vazba nahrazuje vazbou, jež nelze hydrolyzovat (redukováná amidová vazba -CH<sub>2</sub>-NH-; hydroxyesterová vazba -CHOH-CH<sub>2</sub>-) nebo je zaměněna aminokyselina vázající se do aktivního místa (např. za statin). Další možností přípravy syntetického inhibitoru aspartátových peptidas je záměnit L-aminokyselinu za D-aminokyselinu. Takto byl připraven inhibitor o sekvenci pGlu-D-Phe-Pro-Phe-Phe-Val-D-Trp, jeden z nejúčinnějších inhibitorů kathepsinu D. D-Phe zabraňuje degradaci inhibitoru jinými peptidasami a D-Trp zvyšuje intenzitu vazby inhibitoru k enzymu (Lin a Williams, 1979).

Také je známo několik inhibitorů aspartátových peptidas izolovaných z přírodních zdrojů (Tab. 1.2). U inhibitorů PI-3, IA3 a pepstatinu jsou vyřešeny i jejich struktury v komplexu s enzymem (Li et al., 2000; Ng et al., 2000).

název	struktura	zdroj	inhibované peptidasy
pepstatin	Ile-Val-Val-Sta-Ala-Sta	bakterie ( <i>Actinomyces</i> )	všechny aspartátové peptidasy
ATBI (alkalothermophilic <i>Bacillus</i> inhibitor)	Ala-Gly-Lys-Lys-Asp- Asp-Asp-Asp-Pro-Glu	bakterie ( <i>Bacillus</i> )	pepsin, F-proteasa
PDI (potato cathepsin D inhibitor)	glykoprotein o 21kDa	lilek brambor ( <i>Solanum tuberosum</i> )	kathepsin D
IA-3	$\alpha$ helikální polypeptid o 68 aminokyselinách	kvasinka ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	proteinasa A
PI-3 (pepsin inhibitor 3)	protein s 149 aminokyselinami	hlístice ( <i>Ascaris suum</i> )	pepsin
SQAPI (squash aspartic proteinse inhibitor)	polypeptid s 96 aminokyselinami	dýně ( <i>Cucurbita maxima</i> )	pepsin
equistatin	protein 21,7 kDa	mořská sasanka ( <i>Actinia equina</i> )	kathepsin D

**Tabulka 1.2: Inhibitory aspartátových peptidas izolovaných z přírodních zdrojů. V tabulce jsou uvedeny inhibitory, jejich struktura, jejich zdroj a cíl jejich inhibice.**

### 1.3 Kathepsin D

Proteolytickou aktivitu v tkáňových extraktech v kyselém pH byla popsána již na začátku 20. století. Později se pro tyto enzymy začal používat termín kathepsin (z řeckých slov *kata* - dolů a *heosein* - vařit) (Minarowska et al., 2008).

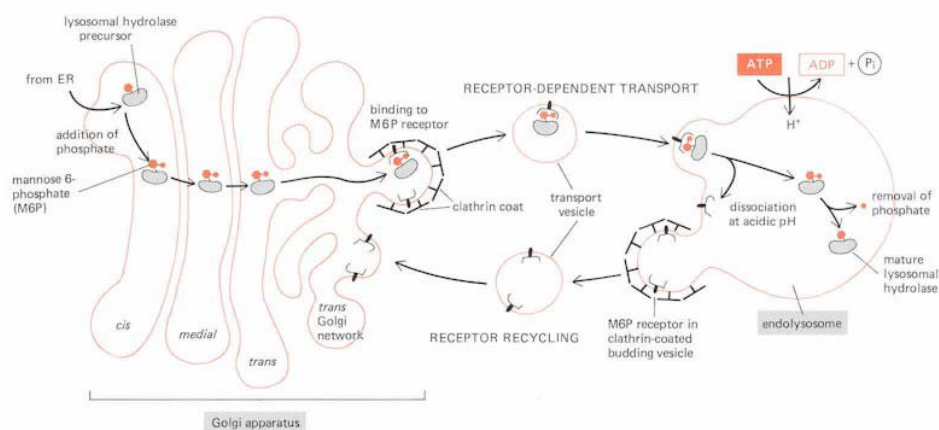
V dnešní době je kathepsin D (EC 3.4.23.5) definován jako lysosomální aspartátová endopeptidasa, která štěpí proteiny na různé polypeptidové fragmenty, které jsou dále tráveny dalšími lysosomálními endopeptidasami a exopeptidasami. Isolace mRNA, detailní studie biosyntézy, aktivace, substrátové specifity, vyřešená řada krystalových struktur dělá z kathepsinu D jednu z nejlépe prostudovaných lysosomálních peptidas savců (Minarowska et al., 2008; Zaidi et al., 2008). Jako člen aspartátových peptidas rodiny A1 sdílí řadu společných vlastností s pepsinem – katalytický mechanismus, strukturu aktivního centra enzymu, která se odvíjí od významné homologie primární struktury.

#### 1.3.1 Biosyntéza a transport kathepsinu D

Lidský gen pro kathepsin D je lokalizován na konci krátkého ramínka chromosomu 11, obsahuje devět exonů a má 11 106 párů bází (bp.) Promotor genu kathepsinu D obsahuje oblasti pro konstitutivní i indukovanou expresi. Transkripcí vzniká mRNA dlouhá 1988 bp a exprese je regulována steroidními hormony, růstovými faktory

(IGF-1, TNF- $\alpha$  a EGF) nebo vitamínem A. Naopak biosyntéza kathepsinu D je inhibována kolchicinem nebo cyklohexamidem (Minarowska et al., 2008; Zaidi et al., 2008).

Kathepsin D je rozpustná lysosomální aspartátová endopeptidasa, která je syntetizována na membráně drsného endoplasmatického retikula ve formě preprokathepsinu D. V endoplasmatickém retikulu se odštěpuje N-terminální signální peptid (signální peptidasou mezi Ala20-Leu21), prokathepsin D se sbaluje a glykosyluje na asparaginech v pozicích Asn70 a Asn199 (Fortenberry et al., 1995; Hasilik a Neufeld, 1980). Oligosacharidové řetězce jsou syntetizovány za účasti dolicholfosfátu a přeneseny na asparaginy za vzniku N-vázané glykosylace (Gieselmann et al., 1983). Studie s monoglykosylovaným a neglykosylovaným enzymem ukázaly, že cukerné zbytky nejsou nezbytné pro správné sbalení prokathepsinu D nebo aktivitu kathepsinu D, ale jsou potřebné pro cílení enzymu do lysosomu (Fortenberry et al., 1995). Tento transport prokathepsinu D je zajištěn díky fosforylaci mannosových zbytků na N-vázaných glykanech enzymu, která probíhá v cisternách endoplasmatického retikula. Vzniklý manosa-6-fosfát je rozpoznáván manosa-6-fosfátovým receptorem, který nasměruje enzym do lysosomu nebo podobných lytických trávicích organel (Obr. 1.9) (Kornfeld, 1990; von Figura a Hasilik, 1986).



**Obrázek 1.9: Transport prokathepsinu D z Golgiho aparátu do lysosomu.** Na obrázku je znázorněná glykosylace a fosforylace na manosových zbytcích prokathepsinu D, jeho vazba na manosa-6-fosfátový receptor a společný transport do endosomu. Dále je také vidět recyklace manosových receptorů zpět do endoplasmatického retikula, snížení pH endosomu pomocí protonové pumpy. Převzato z: <http://faculty.uca.edu/johnc/mannose.jpg>, staženo dne: 18.3.2010.

Jiný doposud ne plně prozkoumaný způsob transportu prokathepsinu D do intracelulárních váček není závislý na manosa-6-fosfátovém receptoru. Pravděpodobně se do

tohoto transportního systému zapojuje protein prosaposin, který tvoří s prokathepsinem D komplex a spolu putují do kyselých organel. Jedná se ovšem o minoritní způsob transportu kathepsinu D (Gopalakrishnan et al., 2004). Spekuluje se také, že by transport prokathepsinu D mohl být závislý na sortilinu – multifunkčním receptoru, který koluje mezi trans-Golgi aparátem a endosomem (Canuel et al., 2008).

V endosomu prokathepsin D podléhá celé řadě proteolytických procesů, než se z něj stane zralý kathepsin D. Nejprve v kyselém prostředí disociuje proenzym z manosa-6-fosfátového receptoru a následně jsou enzymaticky odstraněny fosfátové skupiny z N-glykanů. První proteolytický krok je odštěpení 44 aminokyselin dlouhého propeptidu, čímž vzniká 348 aminokyselin dlouhý intermediát (48 kDa) – jednořetězcová molekula. Propeptid je nezbytný pro správné sbalení enzymu, aktivaci a transport do lysosomu (Yasuda et al., 2005). Tento 48 kDa intermediát vzniká proteolytickým působením cysteinových kathepsinů, které doposud nebyly přesně identifikovány. Zrání enzymu pokračuje dalším proteolytickým vyštěpením sedmi aminokyselin, při kterém vzniká zralý dvouřetězcový kathepsin D a které probíhá za pomoci zřejmě kathepsinu B nebo L. Dvouřetězcová forma je tvořena z lehkého (14 kDa) a těžkého řetězce (34 kDa), které interagují spolu díky hydrofóbním interakcím (Erickson a Blobel, 1983; Kobayashi et al., 1992; Laurent-Matha et al., 2006).

*In vitro* studie ukázaly, že v kyselém prostředí je schopen prokathepsin D autoaktivace na katalyticky aktivní pseudokathepsin D, tedy enzym delší o 18 aminokyselin (27-44 z propeptidu). Nedávné studie naznačují, že tvorba pseudokathepsinu D není nezbytné pro správné zrání kathepsinu D v buňkách; fyziologický význam této formy není zatím znám že se jedná o pouhý artefakt (Laurent-Matha et al., 2006).

Intracelulární transport kathepsinu D je důležitý proto, že pouze v lysosomu plní svou fyziologickou funkci – degradaci proteinů. Translokace do cytoplasmy je spojovna s apoptosou a zvýšená exprese u rakoviných buněk vede k sekrece do extracelulárního prostoru, což přispívá ke tvorbě metastází.

### 1.3.2 Struktura kathepsinu D

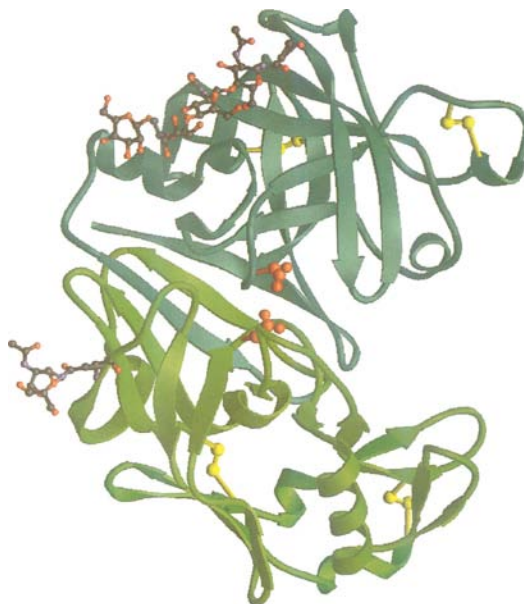
Vazebné místo kathepsinu D sdílí specifické rysy s reninem, chymosinem a pepsinem. Stejně jako pepsin a chymosin má v pozici S<sub>2</sub>' tyrosin (Tyr205), který je u reninu nahrazen menším zbytkem valinu (Val205). Tyr205 je jediný aromatický aminokyselinový zbytek v místě vazebné dutiny. S reninem jako jediným z aspartátových peptidas sdílí kathepsin D polyprolinovou smyčku (Pro312 – Pro317), která se nachází v blízkosti P3' místa. Jediným rysem, který se vyskytuje pouze u kathepsinu D, je přítomnost druhého methioninu (Met307),



který se podílí na formování podmísta S<sub>2</sub>. Ostatní aspartátové peptidasy mají v této pozici nabitě nebo polární aminokyseliny. Aminokyselinový zbytek 125, který u kathepsinu D utváří pozici S<sub>3</sub> vazebné dutiny, se mění podle organismu, ze kterého kathepsin D pochází (Metcalf a Fusek, 1993)).

Na povrchu kathepsinu D se vyskytuje třicet zbytků lysinu a argininu, zatímco u reninu jich je dvacet a u pepsinu pouze tři. Tyto nabitě aminokyseliny mají vliv na stabilitu enzymu a pH optimum jeho aktivity. Vliv na substrátovou specifitu je nejasný, ačkoliv několik těchto aminokyselinových zbytků je v blízkosti aktivního místa a mohly by mít vliv na proteolytickou aktivitu (Metcalf a Fusek, 1993). Tímto mechanismem by bylo možné vysvětlit modulaci enzymové aktivity kathepsinu D pomocí negativně nabitých polysacharidů typu glykosaminoglykanů (Beckman et al., 2009).

Molekula kathepsinu D obsahuje čtyři disulfidické můstky, které se formují mezi cysteiny v pozicích Cys27-Cys96, Cys46-Cys53, Cys222-Cys226 a Cys265-Cys302. N-glykosylace je umístěna na asparaginech Asn70 těžkého řetězce a Asn199 lehkého řetězce, kde se vyskytuje v několika variantách oligosacharidů vysokomanosového typu (Obr. 1.10) (Minarowska et al., 2008).

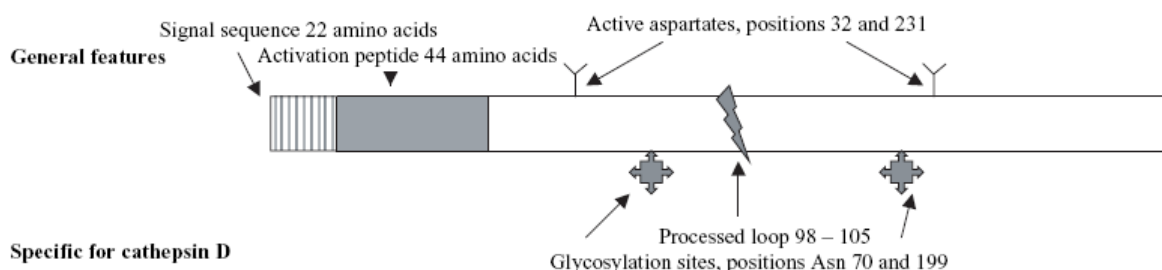


**Obrázek 1.10:** *Stužkový model lidského kathepsinu D. Modře je znázorněna N-terminální doména, zeleně C-terminální doména, červeně dva aspartáty v aktivním centru enzymu a žlutě pozice disulfidických můstků. Dále jsou znázorněna místa glykosylace kathepsinu D. Převzato z: Metcalf a Fusek, 1993.*

### 1.3.3 Proenzym kathepsinu D a funkce propeptidu

Syntéza savčích aspartátových peptidas pepsinového typu v podobě proenzymu je důležitá pro regulaci jejich aktivity, správnou biosyntézu a transport. Zrání a aktivace

kathepsinu D byla podrobněji popsána v kapitole Biosyntéza a transport kathepsinu D (str. 22) a je schématicky vyjádřena na obrázku 1.11. Plná aktivace enzymu je zajištěna intermolekulárním mechanismem pomocí proteolýzy jinou lysosomální peptidasou (Conner a Richo, 1992). Nekompletní aktivace kathepsinu D může být také dosažena autoaktivací (intramolekulárním mechanismem), kdy vzniká tzv. pseudokathepsin D (Fusek a Vetvicka, 2005).

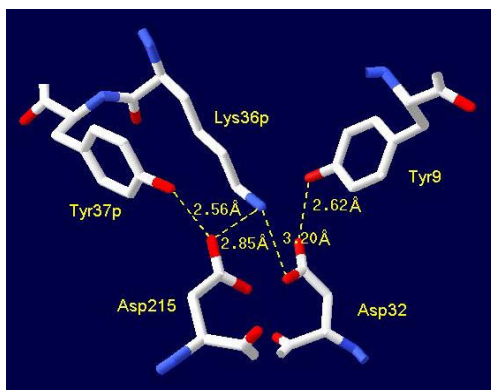


**Obrázek 1.11: Schématické znázornění struktury aspartátových peptidas a specifík pro kathepsin D.** Jsou znázorněny signální presekce, aktivační propeptid, pozice aktivních aspartátů, glykosylační místa kathepsinu D a také sekvence, která je vyštěpena při konverzi jednořetězcové formy zralého kathepsinu D na dvouřetězcovou. Převzato z: Fusek a Vetvicka, 2005.

U některých aspartátových peptidas má propeptid vliv na správné sbalení enzymu *in vivo*, má tedy vlastnost intramolekulárního chaperonu, což bylo potvrzeno experimenty s expresí mutantního kathepsinu D bez N-terminálního propartu. Takto vytvořený enzym byl intracelulárně degradován, což bylo patrně způsobeno špatným sbalením (Conner, 1992). Opačná situace existuje u jiné aspartátové peptidasy u reninu, kde enzym syntetizovaný bez propeptidu byl správně sbalen (Koelsch et al., 1994).

Dále má propeptid funkci intramolekulárního inhibitoru tím, že interaguje s aktivním místem enzymu, blokuje katalitickou aktivitu a umožňuje tak regulovat tvorbu proteolytický funkčního enzymu. Propeptid si tuto inhibiční vlastnost zachovává i po odštěpení, což bylo ověřeno kinetickým měřením synteticky připravenými propeptidy pepsinu, reninu a kathepsinu D (Baudyš et al., 1985; Fusek et al., 1991; Kay et al., 1983). Z model pepsinogenu vyplývá, že ionizovatelné aminokyselinové zbytky v propeptidové i zymogenové části enzymu přispívají k optimální interakci propeptidu s enzymem. Při změně pH se tyto aminokyselinové zbytky protonují, což má za následek nejen změnu v inhibici (Hartsuck et al., 1992; James a Sielecki, 1986), ale také změnu vzájemné konformace enzymu a propeptidu, což umožňuje odštěpení propeptidu (Foltmann, 1988). U pepsinogenu  $\epsilon$ -amino skupina Lys36p v propeptidové části směřuje do aktivního centra enzymu a vodíkovými

můstky interaguje s oběma katalytickými aspartáty. Znemožňuje jim tak vázat molekulu vody potřebnou pro štěpení peptidové vazby, jak tomu je u zralého enzymu (Richter et al., 1999). Také hydroxylová skupina Tyr37p propeptidu se váže na kyslík Asp215 v aktivním centru a aromatický kruh blokuje podmísto S<sub>1</sub>'. Podobně interaguje s kyslíkem Asp215 hydroxylová skupina Tyr9 a její aromatický kruh obsazuje podmísto S<sub>1</sub> (Davies, 1990; Masa, 2010) (Obr. 1.12).



**Obrázek 1.12:** *Interakce aminokyselin propeptidu s aktivním centrem pepsinogenu. Vodíkové interakce (přerušovaná čára) mezi aminokyselinami propeptidu (Lys36p Tyr37p) a aspartáty v aktivním centru enzymu (Asp32 a Asp215) Převzato z: Masa, 2010.*

Tento mechanismus inhibice aktivního centra enzymu mají i jiné aspartátové peptidasy aktivované v kyselém pH jako např. kathepsin D nebo proteinasa A (Davies, 1990; Masa et al., 2006). U peptidas, jejichž aktivace probíhá při vyšším pH, není zajištěn Lys-Tyr mechanismus blokování aktivního centra.

### 1.3.4 Funkce kathepsinu D

Na rozdíl od ostatních členů aspartátových peptidas, které jsou sekretovány z buňky, hlavní úloha kathepsinu D je uvnitř buňky v lysosomu, kde se podílí na degradaci proteinů a peptidů (Eder et al., 2007). V některých případech především při patofyziologických stavech opustí kathepsin D nebo jeho proenzym svou sekreční dráhu a je uvolňován i mimo buňku. Proenzym byl detekován v lidském (Vetvicka et al., 1993), hovězím (Larsen a Petersen, 1995) i myším (Benes et al., 2002) mateřském mléce nebo v séru (Zuhlsdorf et al., 1983). V potu (Zuhlsdorf et al., 1983) a v moči (Baechle et al., 2006) byl nalezen proenzym i aktivní kathepsin D. Prokathepsin D patří také mezi hlavní sekreční proteiny u celé řady rakoviných buněk (Leto et al., 2004).

Na základě schopnosti kathepsinu D štěpit některé strukturní a funkční proteiny a peptidy byly navrženy další jeho fyziologické funkce. Mezi ně patří metabolická degradace

intracelulárních proteinů, aktivace i degradace polypeptidových hormonů a růstových faktorů, řízení aktivity enzymů pomocí jejich aktivátorů i inhibitorů nebo zapojení do programované buněčné smrti (apoptosy) (Baechle et al., 2006; Benes et al., 2008; Hakala et al., 2003).

Další poznatky o funkci kathepsinu D byly získány analýzou „knock-out“ myši (s vypnutým genem pro kathepsin D), které se vyvíjely až do narození normálně, což naznačuje, že kathepsin D není pro prenatální vývin nezbytný (Saftig et al., 1995). Je pravděpodobné, že funkční překryv ostatních peptidas zajistí řádnou degradaci proteinů během embryonálního vývoje i při absenci jednoho z kathepsinů (Guicciardi et al., 2004). Myši bez kathepsinu D se ale dále po narození vyvíjejí abnormálně. Dva týdny po narození myši ztrácí na váze s postupnou atrofizací střevní sliznice, následuje střevní nekróza, thromboembolie a naprostá destrukce lymfoidních buněk ve slezině a brzlíku. V konečné fázi se objevují pokročilá retinální atrofie, což vede až k oslepnutí. Myši umírají ve stavu anorexie ve čtyřech týdnech (Guicciardi et al., 2004; Koike et al., 2003). Zvýšená apoptosa pozorovaná v brzlíku, v thalamu a v sítnici oka naznačuje, že kathepsin D je důležitý pro proteolýzu proteinů regulujících růst buněk a tkáňovou homeostázi (Koike et al., 2003).

#### **1.4 Nemoci spojené s aspartátovými peptidasami**

Aspartátové peptidas jsou rodina enzymů, která je zapojena do celé řady významných biologických procesů v organismu. Například renin se podílí v systému renin-angiotensin na regulaci krevního tlaku, retrovirální aspartátová HIV peptidasa štěpí polyprotein gag a gag-pol, což má za následek zránění a uvolnění infekční virové částice, kathepsin D se zapojuje do procesu rakovinného bujení a žaludeční enzym pepsin může způsobovat poškození tkáně a vznik vředů. Dále jsou aspartátové peptidas spojovány s amyloidními onemocněními (Alzheimerova choroba), malárií nebo běžnými houbovými onemocněními jako je třeba kandidosa. Proto jsou inhibitory aspartátových peptidas vyhledávány jako potenciální terapeutické látky (Cooper, 2002).

##### **1.4.1 Renin a hypertense**

Hypertense (zvýšení krevního tlaku) patří mezi hlavní rizikové faktory infarktu myokardu, mrtvice nebo poškození cév v oku či ledvinách. Dlouhodobě zvýšený tlak může mít za následek srdeční selhání. Jedná se o závažný problém, protože více než polovina populace západního světa starší šedesáti let má problémy právě se zvýšeným krevním tlakem. Výrazný pokles úmrtí na infarkt nebo mrvici v poslední době můžeme připsat pokroku léčbě hypertense (Cooper, 2002).

Klíčovým mediátorem krevního tlaku je oktapeptid angiotensin II, který se vyskytuje v plasmě. Tento peptid působí způsobuje vasokonstrikci a stimuluje uvolnění aldosteronu, což má za následek zvýšení krevního tlaku. Angiotensin II je produktem kaskády proteolytického štěpení známé jako renin-angiotensinový systém, ve kterém aspartátová peptidasa renin katalyzuje rychlost určující štěpení angiotensinogenu, který je produkován v játrech, na dekaeptid angiotensin I. Následným odštěpením C-terminálního dipeptidu enzymem angiotensin konvertujícího enzymu (ACE, „angiotensin converting enzyme“) vzniká oktapeptid angiotensin II. Inhibitory ACE se staly nejvíce předepisované léky na regulaci krevního tlaku (Ondetti a Cushman, 1982).

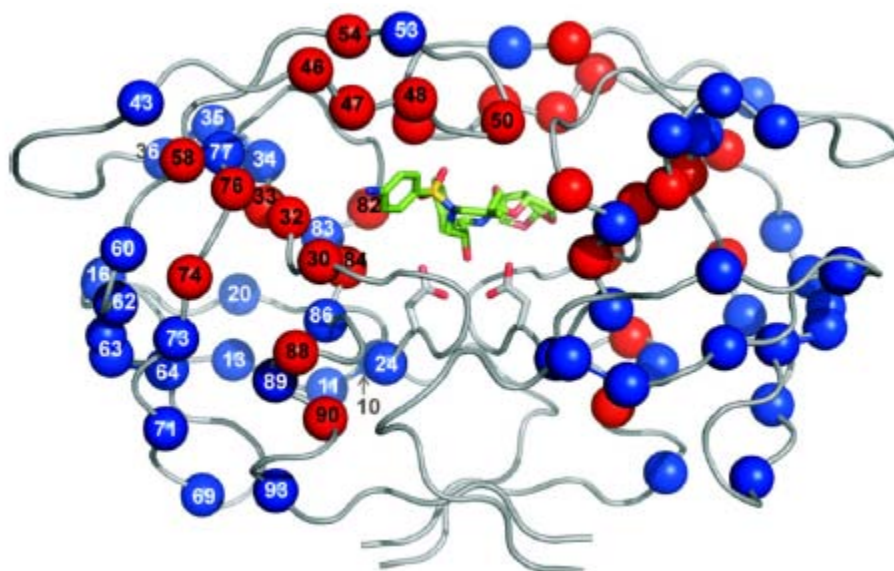
Inhibitory reninu, které by působily více specificky a neměly by tolik vedlejších účinků, jsou bohužel větší molekuly, které jsou hůře absorbovány, a podléhají proteolýze v žaludku. Jejich vývoj velkými farmaceutické firmy nevedl k významným výsledkům, ale některé z těchto látek se později využily při hledání vhodného inhibitoru HIV peptidasy (Cooper, 2002).

#### **1.4.2 HIV peptidasa a AIDS**

Současná epidemie nemoci AIDS týkající se nejen subsaharské Afriky, ale téměř všech zemí třetího světa, se stala celosvětovou tragedií, protože kvalitní léčba je dostupná pouze malému procentu postižených. Odhaduje se, že do roku 2002 bylo nakaženo HIV virem 36 miliónů lidí, 22 miliónů lidí již na chorobu AIDS zemřelo a každý den přibude okolo 15000 HIV nakažených (Cooper, 2002). Bez léčby se u nakažených do pěti let projeví symptomy nemoci AIDS. Choroba má za následek postupné oslabení imunity a nakažený se stává náchylnější na příležitostné infekce. V posledním stádiu nemoci si imunitní systém nakaženého člověka nedokáže poradit s běžnými infekcemi, které by zdravý člověk potlačil. Některá z těchto zdánlivě banálních onemocnění mohou být pro pacienta s AIDS příčinou úmrtí.

HIV peptidasa patří mezi aspartátové peptidasy, která tvoří homodimér skládající se ze dvou identických jednotek o 99 aminokyselinách (Obr. 1.13; str. 30). HIV peptidasa hraje klíčovou roli v životním cyklu viru. Její činností vzniká zralá infekční virová částice. HIV peptidasa štěpí virové gag a gagpol prekursorové proteiny na proteiny obálky viru, kapsidy, matrix a další menší proteiny a na enzymy – HIV peptidasu, reverzní transkriptasu a intergrasu. Polyprotein GagPol vzniká posunutím čtecího rámce o 1 bázi, které nastane s pravděpodobností 11%. Aspartátová peptidasa viru HIV nerozpoznává určitou aminokyselinovou sekvenci, ale spíše sekundární strukturu substrátu, která je uspořádána tak,

že zapadá do aktivního centra enzymu. Virová peptidasa štěpí polyproteinové prekursory, které se hromadí u plasmatické membrány infikované buňky, během nebo neprodleně po sestavení virové částice. Aktivita HIV peptidasy tedy není nezbytná pro vznik nebo uvolnění nových virových částic, je ale nezbytná pro zrání viru a vzniku infekční virové částice (Wensing et al., 2010).



**Obrázek 1.13:** Trojrozměrná struktura dimeru HIV peptidasy zobrazující možné primární a sekundární mutace. Primární mutace jsou znázorněny červeně a sekundární modře. Aspartáty v aktivním centru a navázaný inhibitor darunavir jsou zobrazeny tyčkovým modelem. Převzato z: Saskova et al., 2009

Detailní znalosti struktury HIV peptidasy i jejího substrátu vedly k vývoji devíti klinicky používaných peptidasových inhibitorů (sequinavir, ritanovir, indinavir, nelfinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, tipranavir a darunavir). Tyto inhibitory jsou kompetitivní inhibitory napodobující přírodní substrát virové peptidasy, které nejsou touto peptidasou štěpitelné (Wensing et al., 2010).

### 1.4.3 Mikrobiální patogeny a kandidosy

Řada eukaryotických mikrobiálních patogenů využívá produkci extracelulárních peptidas k usnadnění vniknutí do hostitelského organismu nebo k paralyzování jeho obranného systému. Proto je snaha navrhnout terapeutické inhibitory, které by bránily vniknutí mikrobiálních patogenů do organismu. V dnešní době je již dostupná celá řada informací o extracelulárních peptidasách hub, především rodu *Aspergillus* a *Candida* (Pichova et al., 2001).

Kvasinka *Candida albicans* patří mezi nejrozšířenější lidské patogeny, která se běžně vyskytuje i u zdravých jedinců a imunitní systém se s ní dokáže bez problémů vypořádat. Přesto existují situace, kdy se objeví závažná onemocnění tzv. kandidosy a to tehdy, když je imunitní systém oslaben například užíváním antibiotik nebo jiných imunosupresiv, při diabetu mellitus, onemocnění AIDS, chemoterapii nebo po transplantaci orgánů. Běžné jsou především infekce v ústní dutině a vagině. Genom *C. albicans* kóduje nejméně deset odlišných extracelulárních aspartátových peptidas a jednu intracelulární aspartátovou peptidasu. Sekrece těchto peptidas byla popsána jako klíčová pro virulentnost. Jiné druhy rodu *Candida* způsobují hlavně mykosisy (Pichova et al., 2001).

#### 1.4.4 Plasmodium falciparum a malárie

Infekce *Plasmodium falciparum* (prvok zimnička tropická) ročně způsobí stovky miliónů případů onemocnění malárií, jemuž podlehnou více než milión lidí, převážně dětí. Navzdory obrovskému úsilí se nedaří v místech epidemií chorobu potlačit, někde dokonce množství nakažených mírně roste. Onemocnění malárií je také hlavní riziko pro cestovatele do exotických zemí, protože parazité jsou stále více rezistentní vůči antimalarikům. Vývoj *Plasmodium falciparum* probíhá v erythrocytech, kde je schopen rozložit až 80% veškerého hemoglobinu buňky, který pro něj představuje hlavní zdroj energie a živin. V *P. falciparum* byly identifikovány dvě aspartátové peptidasy a to plasmepsin I a II, které začínají degrační kaskádu hemoglobinu v lysosomech parazita. To je hlavní důvod, proč se intenzivně pracuje na výzkumu plasmepsinů, jako na možných cílech terapeutického zásahu (Cooper, 2002).

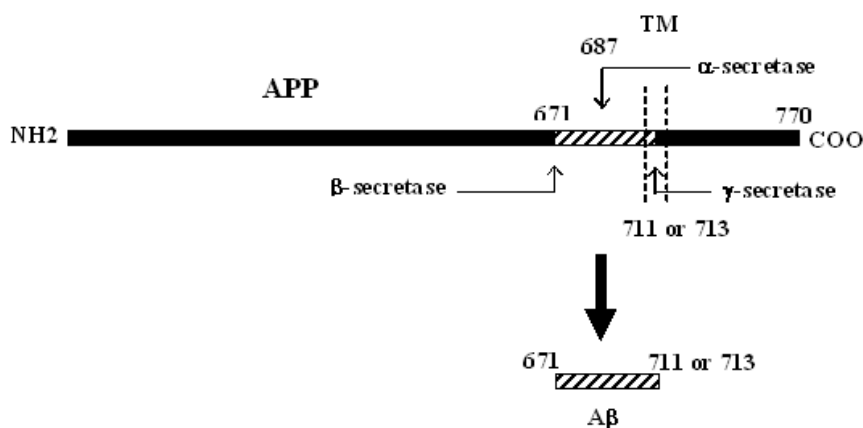
#### 1.4.5 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba je nejběžnější příčina stařecké demence. Toto onemocnění jako první popsal německý lékař A. Alzheimer, který v roce 1906 objevil změny v mozkové tkáni ženy, která zemřela na neobvyklou mentální nemoc. Průběh choroby zahrnuje destrukci buněk, které kontrolují paměť především v hipokampu a přilehlých strukturách (Fassbender et al., 2001). U pacienta se zhoršuje řeč, uvažování a je ovlivněna i mozková kůra (*cerebral cortex*). I další části mozku jsou zasaženy a pacient se stává nesamostatný, eventuálně i umírá. Alzheimerova choroba propuká buď náhodně nebo pacient zdědí predispozici. Většinou tato nemoc postihuje lidi starší 65 let, ačkoliv 10% případů jsou mladší pacienti (Cooper, 2002).

Alzheimerova choroba patří mezi širokou skupinu amyloidních onemocnění, při kterých se formují nerozpustné depozity špatně sbalených proteinů. Alzheimerova choroba je způsobena tvorbou neurotoxických plaků v mozku a neurofibrilárních zámoťků v nervech, které

jsou tvořeny abnormálními klastry mrtvých nebo umírajících neuronů, jiných mozkových buněk a fragmentů amyloidních proteinů. Pomocí elektronové mikroskopie byly v těchto placích odhaleny proteinová vlákna o různé délce. Rentgenová difrakce těchto vláken naznačuje, že jsou složena z polyproteinů v konformaci skládanéhoβ listu (Serpell et al., 2000).

V neuritických placích jsou vlákna tvořena proteinem známým jako amyloidní β-protein, který se tvoří proteolytickým štěpením transmembránového proteinu označovaného jako amyloidní prekursorový protein (APP) (Hong et al., 2000). Amyloidníβ -protein je dlouhý 40-42 aminokyselin a utváří se odštěpením velké luminální nebo extracelulární domény APP. APP má dvě místa, ve kterých může být štěpen, jedno v blízkosti membrány a druhé v transmembránové doméně. Toto štěpení je katalyzováno peptidasami známými jako β-sekretasa (štěpí APP na luminární straně membrány) a γ-sekretasa (štěpí APP v transmebránové doméně), které patří mezi aspartátové peptidasy. Další možné štěpení APP je pomocí α-sekretasy (metalopeptidasa), při které nevznikají amyloidní plaky. α-Sekretasa štěpí APP v místě amyloidníhoβ -peptidu, proto nemohou vznikat patogenní plaky (Obr. 1.14). APP je syntetizován konstitutivně pouze na neuronech, na ostatních buňkách je exprimován pouze po aktivaci. Každá sekretasa má na APP více štepných míst, která jsou velmi blízko sebe. Právě v těchto místech byly u pacientů s Alzheimerovou chorobou zjištěny mutace. Tyto mutace způsobí špatné štěpení APP a následně tvorbu vlákna amyloidního β-peptidu (Cooper, 2002).



**Obrázek 1.14:** Schématicky znázorněné štěpení amyloidního prekursorového proteinu třemi různými proteolytickými enzymy označovanými sekretasy. Při štěpeníβ -peptidu γ-sekretasou a β-sekretasou vznikají amyloidní plaky. Upraveno podle: Selkoe, 2001

Bylo zjištěno, žeβ -sekretasa patří mezi aspartátové peptidasy a inhibitor tohoto enzymu by byl potenciálním lékem na Alzheimerovu chorobu (Hong et al., 2000).



Dalším patologickým znakem Alzheimerovy choroby je tvorba hyperfosforylovaného tau proteinu, který se spolu s amyloidním  $\beta$  -proteinem hromadí v oblastech mozku zodpovědných za paměť a rozpoznávání (Selkoe, 2001). Imunoreaktivní analýza amyloidních senilních plaků a neurofibrilárních klubek v mozku ukázala na hojný výskyt kathepsinu D a jeho zvýšený výskyt byl i v cerebrospinalní tekutině (Schwagerl et al., 1995). Kathepsin D je spojen se zpracováním amyloidního prekursorového proteinu (APP) (Ladror et al., 1994), apolipoproteinu E (Zhou et al., 2006) a tau proteinu (Kenessey et al., 1997), což jsou hlavní faktory onemocnění Alzheimerovy choroby (Spires a Hyman, 2005).

Polymorfismus genu kathepsinu D Ala38pVal v populaci je spojováno s Alzheimerovou chorobou (Mariani et al., 2006), ale jeho vliv není jednoznačný (Ntais et al., 2004). Fyziologický efekt této mutace lokalizované v propeptidu není přesně znám, ale biochemická data naznačují, že může souviset s aktivací a zráním proenzymu (Masa et al., 2006).

#### **1.4.6 Nemoci spojené s kathepsinem D**

Kromě fyziologických funkcí kathepsinu D byly popsány i patofyziologické stavy, ve kterých je zapojen jak kathepsin D tak i jeho proenzym. Většina studií se soustředí na roli tohoto enzymu při rakovinném bujení, dále na Alzheimerovu chorobu nebo arteriosklerosu (Benes et al., 2008).

##### **1.4.6.1 Nádorové onemocnění prsu**

Ve vyspělém světě je rakovina prsu hlavní příčinou úmrtí u žen mezi 40-55 roky. V USA se u více než 10% žen vyvine rakovina prsu a toto číslo v poslední době stále roste. V neoplastických tkáních byla zjištěná zvýšená hladina aspartátové peptidasy kathepsinu D (Vetvicka et al., 1999). Pozdější studie se zabývaly rolí kathepsinu D nejen při rakovině prsu, ale i u jiných typů nádorů (Cooper, 2002).

Kathepsin D byl detekován v mateřském mléce řady savců, kde patrně zpracovává peptidový hormon prolaktin. Syntéza kathepsinu D je kontrolována steroidními hormony, například v rakovinných buňkách prsu je to hormon estrogen. Za normálních podmínek nejsou kathepsin D ani jeho proenzym sekretovány mimo buňky. Již v polovině osmdesátých let byly zjištěné zvýšené hladiny kathepsinu D (jak na úrovni mRNA, tak i na proteinové) v tkáních získaných z rakoviny prsu (Fusek a Vetvicka, 1994).

Dřívější studie spojovaly kathepsin D a vznik metastáz s jeho proteolytickou aktivitou. Extracelulární pH v okolí rakovinných buněk je mírně kyselé (Montcourrier et al.,

1997), proto se předpokládalo, že sekretovaný prokathesin D se přemění na aktivní pseudokathesin D. Nicméně současné studie dokumentují, že mitogenický efekt kathepsinu D u rakoviny prsu je nezávislý na aktivitě tohoto enzymu (Glondou et al., 2001). Jiné studie uvádí, že sekretovaný prokathesin D má funkci jako růstový faktor, který působí jak autokrinně, tak i parakrinně (Ohri et al., 2007). Bylo pozorováno, že propeptid zymogenu se váže na dosud neznámý receptor na povrchu buněk rakoviny prsu (Benes et al., 2008). Také bylo zjištěno, že oblast aminokyselin 27-44 propeptidu je nezbytná pro stimulační funkci prokathesinu D na buňky rakovinu prsu (Kobayashi et al., 1992).

Kathesin D je ve spojení s rakovinným bujením studován z těchto důvodů: 1) má významnou roli při vzniku a průběhu rakoviny včetně mitogenní funkce, regulace invaze, metastase, angiogeneza a apoptosy; 2) je to perspektivní marker rakovinného stavu a prognózy léčby a 3) je potencialně využitelný jako medicínální cíl při léčbě rakoviny pomocí chemoterapeutik specificky regulující jeho funkci.

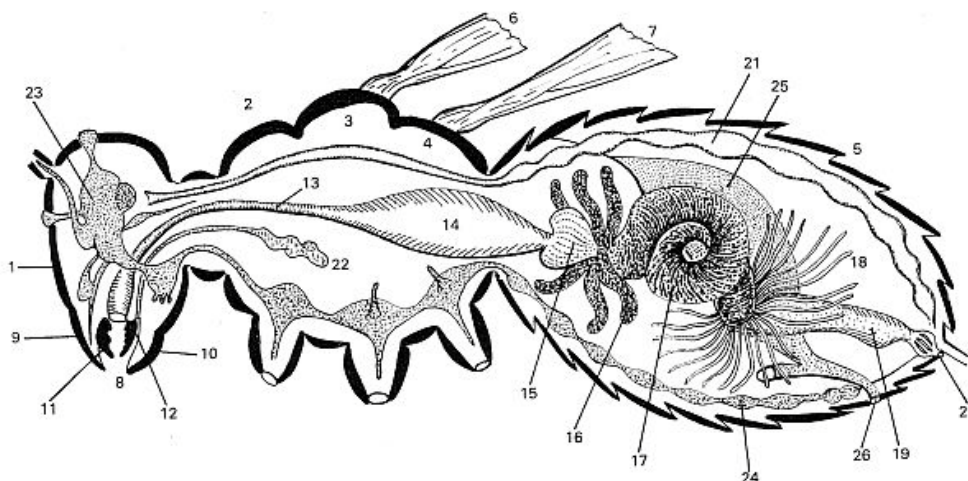
## **1.5 Trávení u hmyzu a proteolýza**

Dva hlavní důvody proč je trávení u hmyzu intenzivně studováno jsou následující: a) hmyz svou druhovou i potravní rozmanitostí a zároveň jednoduchostí jednotlivců poskytuje ideální biologický model pro molekulární analýzu fyziologie trávení; b) identifikované mechanismy funkce trávicího aparátu mají praktické využití pro vývoj nových strategií, jak kontrolovat populaci škodlivého hmyzu, ať už se jedná o herbivorní škůdce, parazity lidí a živočichů, hmyzí vektory mikrobiálních onemocnění nebo producenty alergenů. V případě herbivorního hmyzu umožňují pokroky v porozumění biochemie a fyziologie trávení konstruovat transgenní plodiny, které ve svém genomu nesou genetickou informaci pro produkci pesticidních proteinů udílejících rostlinám rezistenci proti konkrétním škůdcům.

### **1.5.1 Morfologie trávicí soustavy u hmyzu**

Trávicí ústrojí hmyzu začíná předním střevem (*stomodeum*), které tvoří dutina ústní, hltan (*pahrynx*), jícen (*esophagus*), vole (*ingluvies*) a žlaznatý žaludek (*proventriculus*). Do dutiny ústní ústí slinné žlázy, které produkují sliny. Sliny potravu zvlhčují a zároveň již mohou obsahovat některé trávicí enzymy. Vole plní funkci zásobárny potravy. Dalším orgánem je žlaznatý žaludek, který u některých druhů napomáhá trávení tím, že potravu drtí pomocí kutikulárních výběžků. Přední střevo je stejně jako zadní střevo ektodermálního původu a proto je vyztuženo kutikulou. Střední střevo je entodermálního původu a je tvořeno jednoduchou tělní dutinou (*ventriculus*), ze které mohou vybíhat slepé vaky (slepá střeva *caecum*), která se mohou dále větvit. V této části střeva probíhá hlavní část trávení a

vstřebávání živin. Epiteliální buňky zde zajišťují produkci trávicích enzymů, absorpci živin, vody a elektrolytů a exkreci nebo skladování některých látek. U většiny zástupců hmyzu je střední střevo lemováno chitinovou strukturou – peritrofickou membránou, která odděluje lumenální obsah na dvě části a to na endoperitrofický prostor (vnitřní prostor uvnitř membrány) a ektoperitrofický prostor ležící mimo membránu. Peritrofická membrána chrání buňky epitelu před enzymatickým i mechanickým poškozením. V prostoru svěrače (*pylorus*), který odděluje střední střevo od zadního, vychází Malpighické trubice, které slouží jako vyměšovací orgány. Zadní střevo (*proctodeum*) tvoří *ileum*, *colon*, *rectum* (konečník) a končí řitním otvorem (*anus*). V zadním střevě probíhá vstřebávání vody a iontů. Zadní střevo je vyztuženo kutikulou a u některých druhů hmyzu je zredukováno na jednoduchou trubici, u jiných zástupců jsou zde tzv. fermentační komory, kde dochází k dokončení trávení těžce stravitelné potravy. U některých zástupců hmyzu je zadní střevo místem výskytu mikroorganismů, které napomáhají při trávení především celulózy (Terra a Ferreira, 1994) (Obr. 1.15).



**Obrázek 1.15: Stavba těla a trávicí soustavy hmyzu.** 1-hlava, 2, 3, 4-hrudní články, 5-zadeček, 6 a 7-1. a 2. pár křídel, 8-ústní ústrojí, 9-svrchní pysk, 10-spodní pysk, 11-kusadla, 12-čelist, 13-jícen, 14-vole, 15-žaludek, 16-laloky středního střeva, 17-střední střevo, 18-Malpighické trubice, 19-zadní střevo, 20-řitní otvor, 21-trubicovité srdce, 22-slinné žlázy, 23-mozek, 24-ústřední nervová páska, 25-pohlavní žlázy (párové, vyobrazena je jen polovina), 26-vejcovod. Převzato z: Zahradník et al., 1989

## 1.5.2 Trávicí peptidasy hmyzu

Díky ohromné rozmanitosti své potravy využívá hmyz široké spektrum trávicích peptidas. Studie rozložení pH ve střevech u jednotlivých hmyzích taxonů ukázaly, že hmyz má optimální pH pro všechny proteolytické enzymy využívaných v trávení - od extrémně

kyselá oblast pH, přes mírně kyselou - neutrální oblast až po silně alkalickou oblast pH. V trávicím ústrojí hmyzu byly detekovány zástupci čtyř hlavních tříd peptidas - serinové, aspartátové, cysteinové a metalopeptidasy. Aktivita serinových peptidas převládá u druhů s alkalickým pH v trávicím traktu. Je to zejména řád motýlů, kteří mají ve střevě pH 9-11. Optimum pro aktivitu cysteinových peptidas je při pH 5-7, což odpovídá pH ve střevě, které má hmyz výrazně využívající cysteinové peptidas k trávení proteinů jako jsou například semenožravé druhy brouků patřících do čeledi zrnokazovití (Bruchidae) a potěmnikovití (Tenebrionidae) nebo herbivorní druhy brouků jako je mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) (Terra a Ferreira, 1994). Aktivita aspartátových peptidas byla popsána v homogenátu mouchy domácí (*Musca domestica*) při pH od 2,5 do 3. Ukázalo se, že tato aktivita patří enzymu typu kathepsinu D, protože vykazuje vlastnosti kathepsinu D a to: relativní stabilitu v alkalickém pH a stejný substratový a inhibiční profil. Tento závěr byl v současné době potvrzen určením cDNA sekvence několika trávicí kathepsinu D z *M. domestica* (Padilha et al., 2009). Aktivita aspartátových peptidas byla nalezena v řadě čeledí řádu brouků (Terra a Ferreira, 1994), včetně mandelinkovitých a jejich modelového zástupce mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) (viz kap. 4.3, str. 32) (Brunelle et al., 1999; Terra a Ferreira, 1994).

## **1.6 Interakce rostlina – hmyz**

Hlavním úkolem současného zemědělství je dosáhnout maximální produkce potravy tak, aby nedošlo k výrazným zásahům do životního prostředí a také, aby produkce byla ekonomicky výhodná. Ztráty na úrodě způsobené hmyzími škůdci se odhadují na 10-20% a jsou tedy významným limitujícím faktorem. Příprava plodin s endogenní rezistencí k hmyzím škůdcům patří mezi hlavní úspěchy biotechnologie přípravy geneticky modifikovaných rostlin (Ferry et al., 2004). Jako příklad lze uvést geneticky upravenou kukuřici, která nese gen pro  $\delta$ -toxin z *Bacillus thuringiensis*. Exprese tohoto genu zajišťuje rezistenci vůči škůdcům z řádu motýlů (de Maagd et al., 2001).

## **1.7 Obranné mechanismy rostlin proti škůdcům**

Přirozenou obranou rostlin proti napadení škůdci a patogeny lze rozdělit na permanentní a indukovanou, přestože se jí v obou případech účastní stejné látky a to zejména peptidasové inhibitory, repelentní a toxické molekuly. Permanentní obrana rostlin je založena na syntéze, shromažďování a uvolňování látek jako pryskyřice, repelenty nebo toxiny. Tyto molekuly se skladují v různých orgánech rostlin a slouží jako stabilní bariéra rostliny. Jako příklad lze uvést ochranu vegetativních orgánů díky vysoké koncentraci alkaloidů, saponinů a

vosků v těchto částech rostliny. V reproduktivní tkáni rostliny akumulují především antibakteriální a antifungální látky a peptidasové inhibitory. Produkce a skladování jedovatých látek (terpenů a alkaloidů) i peptidasových inhibitorů je pro rostliny energeticky náročné (Purrington, 2000), a proto si rostliny, které jsou vystaveny častému napadení, vyvinuly mechanismus indukované ochrany. Rostlina si tak dané látky utváří jen podle aktuální potřeby (Kessler a Baldwin, 2002; Wittstock a Gershenzon, 2002).

Mechanismus indukované ochrany je spuštěn v případě poranění rostliny. V místě poškození se aktivuje signální dráha, která zajistí lokální (v místě poranění) nebo systémovou (po celé rostlině) odpověď, která má za následek syntézu peptidasových inhibitorů, dalších insekticidních proteinů a polyfenoloxidas. Produkce peptidasových inhibitorů a polyfenoloxidas řadíme mezi tzv. přímé reakce rostliny na poranění (interakce rostlina-herbivor). Při požití rostlinné tkáně tyto látky potlačí metabolismus patogenů a škůdců (Gatehouse, 2002).

Výsledkem nepřímé reakce rostliny na kontakt se škůdcem je uvolnění éterických těkavých látek, jakožto signální molekuly. Nejznámější je ester kyseliny jasmonové – methyljasmonát, který se uvolňuje z místa poranění do okolí a tím dává signál ostatním tkáním napadené rostliny i rostlinám v okolí k syntéze obranných látek. Jedná se o interakci rostlina-rostlina. Jiná nepřímá obranná reakce rostlin je zprostředkována terpeny, které jsou také uvolňovány z napadené rostliny a slouží k přilákání predátora hmyzího škůdce (Ferry et al., 2004).

## **1.8 Signální dráhy při obraně rostlin**

Signálních drah zapojených při obraně rostlin se účastní čtyři hlavní signální molekuly – systemin, kyselina jasmonová, kyselina oligogalakturonová a peroxid vodíku.

Prvním krokem signální dráhy, která byla dobře popsána u likovitých rostlin, je aktivace rostlinného peptidového hormonu systeminu, který je syntetizován v podobě neaktivního prekurzoru prosysteminu, jež je lokalizován v buněčné plasmě (Ryan a Pearce, 1998). Poraněním rostliny škůdcem dochází ke styku prosysteminu s peptidasami, které ho aktivují. Vzniklý systemin se může volně pohybovat floémem rostlin, čímž je zajištěno šíření signálu v okolí poranění i do vzdálených částí rostlin. Systemin interaguje se specifickým receptorem, což vede k aktivaci kaskády proteinů a výslednému uvolnění kyseliny linolenové z membrány, která je prekurzorem pro syntézu kyseliny jasmonové (Ryan a Pearce, 2003). Kyselina jasmonová hraje klíčovou roli v obranném mechanismu jako hlavní signální molekula pro produkci obranných molekul (peptidasové inhibitory, polyfenoloxidas) a také

jako prekursor methyljasmonátu, aktivátoru dalších drah vedoucích k uvolnění obranných látek nepřímé obrany (Ryan, 2000; Weber, 2002). Detailní znalosti těchto drah mohou posloužit k přípravě transgenních rostlin se zvýšenou rezistencí ke škůdcům a onemocněním (Rojo et al., 2003).

### **1.9 *Adaptace škůdců na obranné mechanismy rostlin***

Výsledkem společné evoluce škůdců s rostlinami je důsledek, že i hmyz si vyvinul mechanismy, jak se vypořádat s obranou rostliny. Některé druhy škůdců jsou schopny reagovat na produkci rostlinných peptidasových inhibitorů syntézou jiných peptidas, které nejsou na dané inhibitory citlivé (Bolter a Jongsma, 1997; Bown et al., 1997). Schopnost škůdce přizpůsobit se specifickému peptidasovému inhibitoru je závislá na druhu hmyzu. Detailní znalosti interakce mezi enzymem a inhibitorem a odpovědí škůdce na inhibitor jsou klíčové pro nové strategie ochrany hospodářských plodin (Ferry et al., 2004).

Adaptační mechanismy, kterými hmyz reaguje na přítomnost inhibitorů trávicích peptidas, je možné dělit do tří kategorií. První z nich je indukce biosyntézy trávicích peptidas, čímž dochází k saturaci rostlinných peptidasových inhibitorů přijatých v potravě a kompenzaci blokovaných peptidas. Další obrannou strategií hmyzu je schopnost exprese trávicích peptidas z genomu hmyzu, které nejsou citlivé na určité peptidasové inhibitory a jejichž syntéza se spouští při snížení trávicí kapacity traktu vybaveného konstitutivními klasickými typy peptidas. Tento mechanismus byl poprvé popsán pro “necitlivé“ serinové peptidas (Gruden et al., 2003) a později také pro cysteinové peptidas (Jongsma et al., 1995). U některých serinových a cysteinových “necitlivých“ peptidas je známa jejich aminokyselinová sekvence (Gruden et al., 2004; Volpicella et al., 2003). Zároveň byla u hmyzu nalezena detoxikační strategie založená na produkci peptidas jiné třídy, než proti kterým jsou cíleny inhibitory (Gruden et al., 2003), Tyto peptidas jsou schopny štěpit rostlinné peptidasové inhibitory a tím je deaktivovat.

### **1.10 *Mandelinka bramborová***

Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata*) (Obr. 1.16, str 39) pochází původem z Mexika a živí se okusem listů lilkovitých rostlin (*Solanaceae*). První zmínka o jejím výskytu pochází již z roku 1811 od Thomase Nuttalla. Její téměř celosvětové rozšíření začalo koncem 20. století, kdy se tento brouk stal problémem pro pěstitele brambor v Severní Americe, Evropě, Malé Asii, Íránu, Střední Asii a západní Číně. Nynější rozsah pokrývá rozlohu 16 miliónů km<sup>2</sup> a stále se zvětšuje (Weber, 2003).

Mandelinka bramborová je nejvýznamnějším hmyzím defoliantem (zbavuje rostlinu listů) brambor (lilek brambor, *Solanum tuberosum*). Jak larvy, tak i dospělci se živí požerem listů (larvy během vývoje až 40 cm<sup>2</sup>, dospělci 10 cm<sup>2</sup> listu za den) (Ferro et al., 1985).

Taxonomické zařazení mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*):

Říše: Živočichové (*Animalia*)  
Kmen: Členovci (*Arthropoda*)  
Podkmen: Vzdušnicovci (*Tracheata*)  
Třída: Hmyz (*Insecta*)  
Řád: Brouci (*Coleoptera*)  
Čeleď: Mandelinkovití (*Chrysomelidae*)  
Rod: Mandelinka (*Leptinotarsa*)



**Obrázek 1.16: Dospělec mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*).**

Převzato:

<http://www.edupic.net/beetles.htm>, staženo dne: 23.3.2010

Mandelinka bramborová patří do řádu brouků, kteří se vyznačují tím, že mají první pár křídel přeměněný na tvrdé krovky. Brouci jsou z ekologického hlediska velice variabilní skupinou, která zahrnuje celou čtvrtinu všech druhů živočichů, využívají nejrozličnější potravní zdroje. Nalezneme mezi nimi herbivory i predátory, živí se i organickými zbytky, houbami a některé druhy i cizopasí. Evoluční úspěšnost brouků, a potažmo celé třídy hmyzu, je zajištěna díky sérii faktorů, zejména malé velikosti těla, pevné vnější kostře tvořené chitinovou kutikulou, výkonným příčně pruhovaným svalstvem, obrovskou rozmnožovací schopností a výrazným rozvojem smyslových orgánů a instinktivního chování (Papáček et al., 2000).

Mandelinka je dlouhá 7-12 mm a široká 4,5-8 mm. Polokulovité tělo je oranžovo žluté. Ostatní části těla jsou černě skvrnitě. Tykadla se skládají ze 12 článků, z nichž poslední a předposlední jsou spolu nehybně spojeny. Oči jsou fazolovité, položené na stranách hlavy.

Mandelinka má šest párů černě zbarvených nohou. Na každé krovce má pět černých proužků, pod krovkami jsou schovaná křídla. Ta jsou blanitá a jejich zbarvení přechází od kouřové až k červené.

### 1.10.1 Vývojová stádia mandelinky bramborové

Samičky mandelinek jsou velmi plodné, kladou až 800 vajíček, která jsou velká okolo 1,5 mm a mají žlutooranžovou barvu. Vajíčka tvoří většinou shluky okolo 30 kusů na spodní straně listu. Vývoj všech stádií mandelinky závisí na okolní teplotě, ale přibližně po 4-15 dnech se z vajíčka vylíhnou v rudohnědé larvy s kulovitými zády a s dvěma řadami černých teček po obou stranách těla (Obr. 1.17). Larvy se živí okusem listů brambor. Během vývoje larva vystřídá čtyři růstové fáze, během nichž vyroste z cca 1,5 mm na cca 8 mm. První tři stádia trvají podle podmínek 2-3 dny a poslední čtvrté 4-7 dní. Poté se larva zahrabe několik centimetrů pod zem, kde se zakuklí. V závislosti na teplotě, světlostních podmínkách a kvalitě hostitele se po pár týdnech vylíhne dospělec, který pokračuje v životním cyklu nebo vstoupí do diapausy a přečká až do dalšího jara. V některých oblastech mohou mandelinky vyprodukovat tři i více generací během jedné sezóny (Alyokhin, 2009).



**Obrázek 1.17:** Larvy mandelinky bramborové při požeru na listech lilku brambor.

*Převzato z: <http://www.edupic.net/beetles.htm>, staženo dne: 23.3.2010*

### 1.10.2 Potrava mandelinky bramborové

Při nekontrolovaném množení, v období teplých a slunečných dnů, požírá mandelinka listy brambor nebo jiných rostlin (rajčat, lilků, tabáku, pepře a květáku). Útočí také na blín černý, bodlák, rulík a diviznu. Dokáže se živit nejen listy, ale i jinými částmi rostlin (stonek, hlízy brambor), ačkoliv to pro ně není ideální potrava (Alyokhin, 2009). Mandelinky jsou schopny dlouhodobě hladovět, a to nejen v zimě, ale i v aktivních obdobích. Při nedostatku

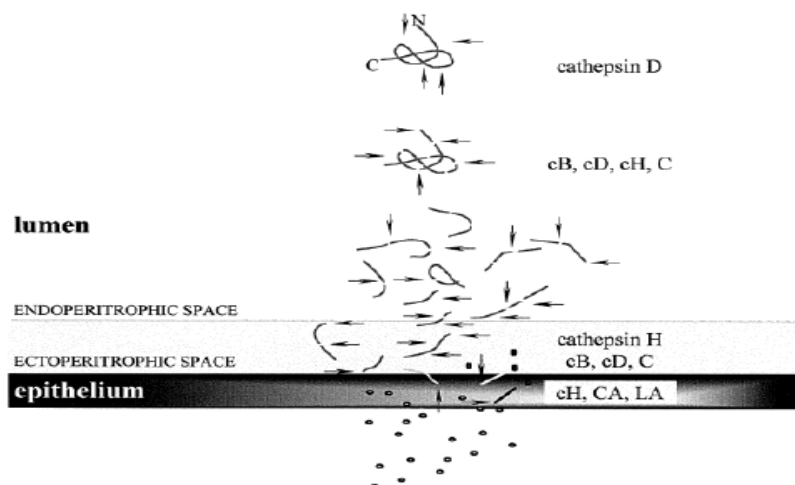


vody vydrží bez potravy až 11 měsíců. Někdy za chladného počasí požívají svá vlastní vajíčka (Alyokhin, 2009).

Použití insekticidů patří mezi hlavní zbraně při hubení mandelinky bramborové. Bohužel jsou tyto chemikálie často neúspěšné, protože na ně mandelinky získaly rezistenci. V dnešní době jsou mandelinky rezistentní na většinu hlavních insekticidů (52 různých druhů) (Alyokhin et al., 2008). Další možný boj proti mandelince je možný pomocí jejich přirozených nepřátel, jakým je například patogenní houba *Beauveria bassiana*.

### 1.10.3 Trávení proteinů u mandelinky bramborové

Nejvíce zastoupený protein v listech lilku brambor je ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa, která patří tedy i mezi hlavní zdroje energie pro mandelinku. Pomocí specifit jednotlivých skupinových inhibitorů byly v trávicím traktu mandelinky prokázány tři typy peptidas: 1) aspartátová peptidasa typu kathepsin D, která stojí na začátku hydrolyzujícího procesu; 2) cysteinové peptidasy typu kathepsin B, kathepsin H a kathepsinu L (Illner, 2008), které bývají nazývány intestainy; 3) serinová peptidasa typu chymotrypsinu, která se spolu s cysteinovými peptidasami podílí na hlubší degradaci proteinového substrátu (Obr. 1.18).



**Obrázek 1.18: Schéma degradace proteinů v trávicím traktu mandelinky bramborové.** Proteiny jsou nejprve štěpeny endopeptidasami typu kathepsin D dále kathepsin B a chymotrypsin a pravděpodobně aminopeptidasou (kathepsin H) na kratší peptidy, které interagují s epitelem střev. Zde jsou štěpeny až na aminokyseliny, které jsou absorbovány střevními buňkami. cB – kathepsin B, cD – kathepsin D, cH – kathepsin H, C – chymotrypsin, cA – karboxypeptidasa A, LA – leucin aminopeptidasa. Převzato z: Brunelle et al., 1999.

Přestože byl popsán gradient pH (v rozmezí pH 5 až pH 7) (Illner, 2008) ve střevech mandelinky bramborové a jednotlivé typy hmyzích peptidas se mimo jiné liší svým pH optimem, většina endopeptidas a exopeptidas se vyskytuje podél celé trávicí trubice a nejsou

zde patrné jasné regionální ohraničení aktivit jednotlivých typů peptidas (Brunelle et al., 1999; Gruden et al., 2004).

## 2 CÍL PRÁCE

Diplomová práce se zabývá aspartátovou peptidasou typu kathepsin D (LdCD), která funguje jako trávicí enzym mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*), ekonomicky významného škůdce. Trávicí peptidasy hmyzu jsou perspektivním cílem při vývoji nových strategií pro supresi herbivorních škůdců.

Konkrétně budou řešeny následující dílčí úkoly:

- a) rekombinatní exprese LdCD v systému *Escherichia coli* a alternativně v *Pichia pastoris* zahrnující přípravu expresních vektorů, kultivace transformovaných buněk a refolding;
- b) analýza procesu aktivace zymogenu LdCD na aktivní formu;
- c) enzymologická charakterizace aktivního LdCD – testování peptidových a proteinových substrátů, určení pH optima, stanovení kinetických konstant;
- d) analýza inhibiční specifity LdCD se sadou peptidasových inhibitorů s důrazem na proteinový inhibitor z listů brambor PDI („potato cathepsin D inhibitor“).

## 3 MATERIÁLY A EXPERIMENTÁLNÍ METODY

### 3.1 Materiály

#### 3.1.1 Chemikálie

##### 3.1.1.1 Peptidový substrát

Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu .....  
.....ÚOCHB AV ČR, v.v.i.(zakázková syntéza peptidů)

##### 3.1.1.2 Inhibitory peptidas

E-64 .....Fluka, Švýcarsko  
EDTA ..... Sigma, USA  
Lopinavir .....izolovaný na ÚOCHB AV ČR  
PDI ..... izolováno z hlíz brambor na ÚOCHB AV ČR  
Pefabloc .....Fluka, Švýcarsko  
Pepstatin A ..... Sigma, USA

##### 3.1.1.3 Komerční pufry

5x Phusion™ HF Buffer .....Finnzymes, Finsko  
6x Loading Orange Buffer ..... Fermentas, Lotyšsko  
10x ThermoPol Reaction Buffer ..... New England BioLabs, USA  
10x NEBuffer 1 ..... New England BioLabs, USA  
10x NEBuffer 3 ..... New England BioLabs, USA  
Pfu 10x Rxn. Buffer .....Promega, Velká Británie  
T4 DNA ligasa Buffer ..... New England BioLabs, USA

##### 3.1.1.4 Enzymy

Taq 2x Master Mix .....New England Bio Labs, USA  
*Pfu* polymerasa .....Promega, Velká Británie  
*Phusion Hot Start* DNA polymerasa .....Finnzymes, Finsko  
*T4* DNA ligasa .....Invitrogen, USA  
Restrikční endonukleasy *Xho I, Not I, Sac I, PmeI, BspHI* ..... New England BioLabs, USA  
*Dnpl* ..... New England BioLabs, USA

### 3.1.1.5 Ostatní chemikálie

*Bio-Rad, USA:* agarosa

*Fluka, Německo:* glutaraldehyd, methanol, N,N-methylenbisakrylamid, uhličitan sodný, dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, polyethylenglykol PEG 1500, isopropanol

*Invitrogen, USA:* „yeast nitrogen base“ (YNB), zeocin

*Lachema, ČR:* kyselina octová, kyselina citronová, ethanol, isopropanol, kyselina chlorovodíková, dusičnan stříbrný, hydroxid sodný, chlorid sodný

*Lach-Ner, ČR:* peroxid vodíku

*New England BioLabs, USA:* sada nukleotid trifosfátů (dNTP)

*Merck, Německo:* β-merkapt ethanol

*Penta, ČR:* aceton

*Pierce, USA:* SuperSignal West Pico

*Promil PML, ČR:* sušené odtučněné mléko

*Serva, Německo:* ammonium persulfat (APS)

*Sigma, USA:* akrylamid, biotin, hovězí sérový albumin (BSA), Coomassie Brilliant Blue R-250, 1,4-dithiotrietol (DTT), ethidium bromid, glycerol, Luria-Bertani agar (LB agar), Luria-Bertani médium (LB médium), polyvinylpyrrolidon (PVP), sodium docecylsulfát (SDS), sorbitol, N, N, N', N'- tetramethylethylendiamin (TEMED), Tween 20, Trizma® base, Triton X-100, YPD agar, YPD médium, zeocin, karbenicilin, isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid (IPTG), SOC médium, redukovaný glutathion (GSH), oxidovaný glutathion (GSSG), ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa oxygenasa, myší protilátka proti histidinové kotvě (His tag) v konjugátu s křenovou peroxidasou (HRP), imidazol

### 3.1.2 Biologické materiály

#### 3.1.2.1 Materiály pro klonování

Bakteriální buňky <i>E. coli</i> Top10 .....	Invitrogen, USA
Bakteriální buňky <i>E. coli</i> BL-21 Star™ .....	Invitrogen, USA
Kvasinky <i>P. pastoris</i> kmen X33 .....	Invitrogen, USA
cDNA LdCD .....	ÚOCHB, AV ČR
plasmid pGAPZα C .....	Invitrogen, USA

plasmid pET100/D - TOPO<sup>®</sup> .....Invitrogen, USA  
plasmid pET101/D - TOPO<sup>®</sup> .....Invitrogen, USA

primery syntetizované firmou Generi Biotech:

přímý primer: LdCD\_EC frd 1: caccGATTTAATCAGAATTCCTCTGACAA

reverzní primer: LdCD\_EC rev 1: TCAAACGGCAGTTGCTAAGC

přímý primer:

LdCD pGAPZ $\alpha$  C frd1: atactcgagaaaagaGATTTAATCAGAATTCCTCTGACAA

reverzní primer:

LdCD 6HpGAPZ $\alpha$  C rev: tatggccgcTCAatgatgatgatgatgAACGGCAGTTGCTAAGC

### 3.1.3 Přístroje a vybavení

#### 3.1.3.1 Přístroje

Analytické váhy AE 163 .....Mettler, Švýcarsko  
Autokláv Labo Autoclave ..... Sanyo, Japonsko  
Blotovací zařízení Power Pac HC .....Bio-Rad, USA  
CCD camera Las-4000 Biotech ..... Fujifilm, Japonsko  
Eppendorf electroporátor 2510 ..... Eppendorf, Německo  
Fluorescenční/absorpční čtečka GENios .....Tecan, Rakousko  
Inkubator Cultura Mini.....Merck, Německo  
Orbitální třepačky:  
Innova<sup>®</sup> 44 ..... New Brunswick Scientific, USA  
Innova<sup>®</sup> 4430..... New Brunswick Scientific, USA  
Lyofilizátor Freezone 6 liter .....Labconco, USA  
NanoDrop 2000 spektrofotometr ..... Thermo Scientific, USA  
GradiFrac System ..... Pharmacia Biotech, Švédsko  
Odstředivka Beckman J2-MI ..... Beckman, USA  
Odstředivka Eppendorf 5415D ..... Eppendorf, Německo  
Odstředivka Multifuge 3 S-R ,Heraeus ..... Thermo Scientific, USA  
PCR termocykler TC3000 .....Techne, USA  
pH metr pH Pracitronic MW870 ..... Pracitronic, Německo  
Rotační třepačka Innova 4300..... New Brunswick Scientific, USA  
Spektrofotometr Helios  $\alpha$  .....Unicam, USA

Souprava pro horizontální agarosovou elektroforézu EasyCast™ Mini Gel .....	Owl Separation Systems, USA
Termoblok .....	Vývojové dílny, ÚOCHB AV ČR
Typhoon 9400 Fluorescence Imager .....	GE Healthcare, Velká Británie
Vakuová odparka Speed Vac Concentrator .....	Thermosavant, USA
Vertikální elektroforéza Power Pac Basic.....	Bio-Rad, USA
UV lampa .....	UltraLum, USA

### 3.1.3.2 Komerční soupravy

QIAquick Gel Extraction Kit .....	Qiagen, USA
QIAGEN Plasmid Maxi Kit .....	Qiagen, USA
BM Blue POD Substrate .....	Roche, Německo
SuperSignal® West Pico Rabbit IgG Detection Kit .....	Pierce, USA
Zyppy Plasmid Miniprep II Kit .....	Zymo Research, USA
BCA Protein Assay Kit .....	Pierce, USA
EasySelect™ <i>Pichia</i> Expression Kit .....	Invitrogen, USA

### 3.1.3.3 Standardy molekulových hmotností

O'Gene 1kb DNA ladder .....	Fermentas, Lotyšsko
Unstained Protein Molecular Weight Marker .....	Fermentas, Lotyšsko
PageRuler® Prestained Protein Ladder Plus .....	Fermentas, Lotyšsko

### 3.1.3.4 Ostatní vybavení

Ni-NTA Superflow kolona.....	Qiagen, USA
PVDF membrána 0,45 µm .....	Millipore, USA
Mikrotitrační destičky .....	Nunc GmbH & Co. KG, Německo
Microcon® Ultracel YM10 (limit 10 kDa) .....	Millipore, USA

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Rekombinantní exprese v *Escherichia coli*

#### 3.2.1.1 Příprava expresního vektoru pET100/D-TOPO®

##### 3.2.1.1.1 Amplifikace DNA pomocí PCR

Požadované úseky DNA pro kathepsin D-like peptidasu (LdCD) byly pomocí specifických primerů amplifikovány metodou PCR. Směs pro PCR reakci o celkovém objemu 50  $\mu$ l obsahovala:

komponenta	výsl. konc.	objem ( $\mu$ l)
voda		31,5
5x Phusion HF pufr	1x	10
10 mM dNTPs	200 $\mu$ M	1
LdCD_EC frd 1	0,5 $\mu$ M	2,5
LdCD_EC rev 1	0,5 $\mu$ M	2,5
templátová DNA	1-10 ng/50 $\mu$ l	2
Phusion DNA pol	0,02 U/ $\mu$ l	0,5

**Tabulka 3.1: Směs pro PCR reakci**

templátová DNA ... cDNA izolovaná ze střeva mandelinky bramborové v laboratoři

M. Mareše na ÚOCHB AV ČR

Pro amplifikaci DNA v PCR termocykléru byl zvolen tento pracovní postup:

počáteční denaturace DNA templátu .....	98 °C, 30 s.	} 37x
denaturace DNA templátu .....	98 °C, 10 s.	
nasedání primerů .....	53 °C, 30 s.	
polymerace .....	72 °C, 1 min.	
závěrečná polymerace .....	72 °C, 10 min.	

LdCD\_EC frd 1: CACCGATTTAATCAGAATTCCTCTGACAA

LdCD\_EC rev 1: TCAAACGGCAGTTGCTAAGC

##### 3.2.1.1.2 Horizontální agarosová elektroforéza

Velikost fragmentů DNA byla analyzována horizontální agarosovou elektroforézou. Agarosa byla rozpuštěna zahřátím v TAE pufru na výslednou koncentraci 1-1,5%. Po ochlazení na 60 °C byl přidán ethidium bromid, do výsledné koncentrace 0,5  $\mu$ g/ml. Směs se nechala tuhnout v elektroforetické vaně s vloženým hřebenem. Do jamek vzniklých vyjmutím hřebenu se nanášely vzorky smíchané se vzorkovým pufrům a DNA standard. Elektroforetické dělení probíhalo při 120V po dobu 15-30 min. Fragmenty DNA byly vizualizovány pod UV lampou při vlnové délce 302 nm (příp. 365 nm).



Vzorkový pufr: 6 x Orange Loading Dye Solution

TAE pufr: 40 mM Tris- acetát, pH 8,0, 2 mM EDTA

Molekulové standardy: 100bp DNA Ladder

O'Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

### 3.2.1.1.3 Izolace fragmentů DNA z agarosového gelu

Produkty PCR reakce byly rozděleny na agarosové elektroforéze s ethidiumbromidem. Pod UV lampou byly části gelu obsahující amplifikované úseky DNA vyříznuty skalpelem. Byla provedena extrakce a purifikace DNA z gelu pomocí komerční extrakční soupravy od firmy Qiagen.

### 3.2.1.1.4 Klonování PCR produktu do plasmidu pET100/D-TOPO®

Při klonování DNA pro LdCD do plasmidu TOPO pET100/D-TOPO® se postupovalo podle návodu „Champions™ pET Directional TOPO® Expression Kits“ od firmy Invitrogen. Reakční směs byla připravena podle tabulky:

PCR produkt 1-10 ng/50uL	0,5 µl nebo 4µl
vektor pET100/D-TOPO®	1 µl
roztok solí	1 µl
sterilní voda	doplněno do celkového objemu 6 µl

**Tabulka 3.2: Směs pro PCR reakci**

Směs byla ponechána 30 min při 26 °C a poté byla ihned použita k transformaci TOP 10 kompetentních buněk.

Expresní vektor pET101/D-TOPO® s inzertem pro LdCD byl připraven M. Nussbaumerovou.

Roztok solí: 1,2 M NaCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>

### 3.2.1.1.5 Transformace kompetentních buněk

Transformace expresního vektoru do TOP 10 kompetentních buněk *E. coli* bylo provedeno podle manuálu Invitrogen „Champions™ pET Directional TOPO® Expression Kits“ Version G 2004.

25 µl suspenze buněk TOP10 *E. coli* (Invitrogen) bylo rozmrazeno na ledu a bylo k nim přidáno 6 µl vektoru pET100/D-TOPO® nesoucího požadovaný inzert pro LdCD. Směs byla inkubována 30 min na ledu. Poté byl proveden teplotní šok při 42°C po dobu 30 s. Po 30 s se okamžitě přidalo 250 µl SOC média a směs se kultivovala 1 hod při 37°C za třepání (230 rpm). Poté se směs buněk rozetřela na misku s LB/K agarem obsahujícím karbenicilin a buňky se nechaly růst při 37 °C přes noc bez třepání. Objem směsi nanášené na misku byl 50 µl a 200 µl.

SOC medium: 0,5% kvasinkového extraktu, 2% trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukóza

*LB/K agar*: LB agar, 100 µg/ml karbenicilin

### 3.2.1.1.6 Výběr kolonií

Sterilní špičkou byly odebrány vybrané kolonie a přeneseny do PCR mikrozkumavek a zbytek byl přečárkován na nové misky, které byly poté inkubovány přes noc v 37 °C bez třepání. Se vzorky v PCR mikrozkumavkách byla provedena PCR amplifikace.

Do PCR reakce bylo přidáno 10 µl Mix 15x a 10 µl Taq 2x Master Mix (New England BioLabs).

Pro amplifikaci DNA v PCR termocykléru byl zvolen tento pracovní postup:

počáteční denaturace DNA templátu .....	94 °C, 10 min.	} 37x
denaturace DNA templátu .....	94 °C, 1 min.	
nasedání primerů .....	53 °C, 1 min.	
polymerace .....	68 °C, 2 min.	
závěrečná polymerace .....	68 °C, 10 min.	

*Mix 15x*: 1 µl primeru fwd (LdCD\_EC fwd 1 10~~x~~ ředěný), 1 uL primeru rev (TF 7 reverse primer 10x ředěný), 8 uL sterilované vody

*Primery*:

LdCD\_EC fwd 1: CACCGATTTAATCAGAATTCCTCTGACAA

LdCD\_EC rev 1: TCAAACGGCAGTTGCTAAGC

### 3.2.1.1.7 Mini-preparace plasmidové DNA

10 ml LB média s karbenicilinem bylo zaočkováno samostatnou bakteriální kolonií z LB misky a kultivováno přes noc při 37°C za třepání (230 rpm). Z narostlých bakteriálních kultur bylo odebráno 700 µl kultury, přidáno 300 µl sterilního 50% glycerolu a tyto vzorky byly zamrazeny. Zbytek bakteriální kultury byl zakoncentrován odstředěním (15 min, 4000 g, 4°C) a supernatant byl odsát. Z bakteriální pelety byla izolována DNA pomocí komerční sady „Zyppy Plasmid Miniprep II Kit“. Výsledný objem získané plasmidové DNA byl 50 µl.

### 3.2.1.1.8 Stanovení koncentrace DNA a její čistota

Koncentrace a čistota DNA byly určeny měřením absorbance při 260 a 280 nm na přístroji NanoDrop 2000. Kontaminace DNA proteiny byla určena z podílu  $A_{260}/A_{280}$ . Rozmezí 1,8-2,0 udává přijatelnou čistotu DNA.

### 3.2.1.1.9 Určení sekvence DNA

Sekvenování DNA bylo prováděno v laboratoři sekvenace DNA Dr. Hrdou na PřF UK v Praze. Sekvence DNA byly vyhodnocovány porovnáváním sekvenované DNA s původní sekvencí určenou na ÚOCHB AV ČR pomocí programu DNASTAR.

### 3.2.1.1.10 Transformace a kultivace *Escherichia coli*

Transformace a kultivace v *E. coli* byla provedena podle manuálu Invitrogen „Champions™ pET Directional TOPO® Expression Kits“ Version G 2004.

Mikrozkumavka s 50 µl standardizované suspenze buněk BL21 Star™ *E. coli* byla rozmražena na ledu a bylo k ní přidáno 5 µl plazmidové DNA vektor pET100/D-TOPO® nesoucí inzert LdCD s histidinovou kotvou na N-konci (dále v textu označované jako LdCD N tag) (kap. 3.2.1.1.7). Směs byl inkubována 30 min na ledu. Poté byl proveden teplotní šok při 42 °C po dobu 30 sekund. Po 30 sekundách byla směs okamžitě zchlazena přenesením na led a ihned bylo přidáno 250 µl SOC média o teplotě 26 °C. Směs byla kultivována 30 min při 37 °C za třepání (225 rpm). Tento vzorek, byl přidán k 10 ml LB/K média obsahující antibiotikum karbenicilin a buňky byly kultivovány při 37 °C přes noc. Narostlá kultura byla druhý den přidána k 500 ml LB/K média obsahující karbenicilin a kultivace pokračovala za stejných podmínek do dosažení přibližné hodnoty  $OD_{600} = 0,5$ . Poté byla exprese indukována přidávkem IPTG do výsledné koncentraci 1 mM. Exprese probíhala 5 hod při 37 °C při 225 rpm. Následně byly buňky koncentrovány odstředěním (10 min, 3000 g, 4 °C) a získané pelety byly skladovány při -20 °C. Exprese LdCD N tag byla provedena celkem v 1 l LB/K média.

Stejným způsobem se postupovalo i při expresi vektoru pET101/D-TOPO® nesoucí inzert LdCD s histidinovou kotvou na C konci (dále v textu označované jako LdCD C tag). Tato exprese proběhla celkem ve třech litrech LB/K média.

V průběhu obou kultivací byly odebírány 0,5 ml alikvoty kultury v hodinových intervalech, které byly koncentrovány odstředěním (10 min, 10000 g, 4 °C). Pelety byly rozpuštěny v 80 µl vzorkového pufru a s 1 µl vzorku byla provedena SDS -PAGE (kap. 3.2.3.2) a následně imunoblot (kap. 3.2.3.3), který byl detekován protilátkou proti histidinové kotvě .

*SOC médium*: 2% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukosa

*LB/K médium*: 1% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 0,5% NaCl, karbenicilin (100 µg/ml) (pH 7,0)

*VZP*: 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1% SDS, 4% β-merkptoethanol, 0,02% Comassie Brilliant Blue G250, 24% glycerol

### 3.2.1.2 Příprava inkluzních tělísek

Bakteriální peleta pocházející z exprese LdCD N tag byla resuspendována ve 250 ml lyzační pufru A. Ke směsi byl přidán lysozym (1 mg/g mokré pelety), PMSF (1 mM) a  $\beta$ -merkaptoethanol (0,1%). Lyze probíhala 30 min při teplotě 26 °C, vzniklé lyzáty byly homogenizovány tyčovým sonikátorem, dále inkubovány v přítomnosti 0,1% DOC 30 min při 4°C a poté koncentrovány odstředěním (10000 g, 15 min., 4 °C). Peleta obsahující inkluzní tělíška byla promyta resuspendováním v 100 ml pufru B, odstředěna (10000 g, 15 min, 4 °C), dále resuspendována v 100 ml pufru C a odstředěna (10000 g, 15 min, 4 °C). Stejně se postupovalo i při přípravě inkluzních tělísek s LdCD C tag. Získané pelety byly skladovány při -20 °C.

*Lyzační pufr A:* 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA

*Pufr B:* 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100

*Pufr C:* 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1,5 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,1%  $\beta$ -merkaptoethanol

Poté byl odebírán alikvot supernatantu (200 $\mu$ l), který byl precipitován 80% acetonem (kap. 3.2.3.4). K precipitátům bylo přidáno 20 $\mu$ l redukčního vzorkového pufru a provedena SDS-PAGE a imunoblot, který byl vizualizován pomocí protilátek proti histidinové kotvě (kap. 3.2.3.3).

*VZP:* 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1% SDS, 4%  $\beta$ -merkaptoethanol, 0,02% Comassie Brilliant Blue G250, 24% glycerol

### 3.2.1.3 Afinitní purifikace proteinu po expresi

Inkluzní tělíška LdCD N tag získané po posledním odstředění při přípravě inkluzních tělísek (kap. 3.2.1.2) byly rozpuštěny v 50 ml rozpouštěcího pufru a inkubovány přes noc při 4 °C. Poté byl vzorek přefiltrován přes 0,45  $\mu$ m PVDF membránu. Vzorek byl postupně nanesen na afinitní Ni-NTA kolonu připojenou na nízkotlakou pumpu (průtok 0,5 ml/min). Po nanesení vzorku byla kolona promyta 10 ml rozpouštěcího pufru. Byla sebrána frakce označená jako „nenavázaný materiál“. Poté byl průtok kolony zvýšen na 1 ml/min, kolona byla promyta 25 ml promývacího pufru a sebrána frakce označená „promývací“. Následně byla kolona eluována elučním pufrům a byly sbírány tři eluční frakce podle záznamu na chromatogramu. Stejným způsobem byl zpracován vzorek z inkluzních tělísek LdCD C tag.

Průběh purifikace byl vyhodnocen kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm. Získané frakce byly skladovány při -20 °C. S alikvoty jednotlivých frakcí (20  $\mu$ l +

4 µl vzorkového pufru-VZP) byla provedena SDS-PAGE elektroforéza, proteiny na gelu byly detekovány pomocí Comassie Brilliant Blue G250 (kap. 3.2.3.2).

*Nosič:* Ni-NTA Superflow (Qiagen)

*Rozpouštěcí pufr:* 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 M močovina

*Promývací pufr:* 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 M močovina, 20 mM imidazol

*Eluční pufr:* 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 M močovina, 250 mM imidazol

*VZP:* 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1% SDS, 4% β-merkptoethanol, 0,02% Comassie Brilliant Blue G250, 24% glycerol

### 3.2.2 Rekombinatní exprese v *Pichia pastoris*

Pro expresi kathepsinu D v kvasinkách byl vybrán methylotrofní kmen *Pichia pastoris* X33, u kterého byla exprese aspartátových peptidas již dříve úspěšně použita (Yamada et al., 1995). DNA pro LdCD byla klonována do plasmidu pGAPZα C, který umožňuje expresi proteinu do média. Za tímto účelem byla použita komerční sada „EasySelect™ *Pichia* Expression Kit“ od firmy Invitrogen.

#### 3.2.2.1 Příprava expresního vektoru pGAPZα C

Požadovaný úsek DNA pro LdCD byl amplifikován metodou PCR (kap. 3.2.1.1.1) s použitím primerů frd: LdCD pGAPZα C frd1 a rev: LdCD 6HpGAPZα C rev. Takto připravená DNA byla rozdělena na horizontální agarosové elektroforéze (kap. 3.2.1.1.2), příslušné úseky DNA byly vyříznuty skalpelem a izolovány z agarosového gelu (kap. 3.2.1.1.3).

*primery:*

frd: LdCDpGAPZαC frd1: atactcgagaaaagaGATTTAATCAGAATTCCTCTGACAA

rev: LdCD6HpGAPZαC rev: atgcggccgcTCAatgatgatgatgatgAACGGCAGTTGCTAAGC

##### 3.2.2.1.1 Restrikční štěpení plasmidu

Izolovaná DNA pro LdCD z agarosové elektroforézy (kap. 3.2.1.1.3) a plasmid pGAPZα C byly selektivně štěpeny restrikčními endonukleasami *Xho I* a *Not I*, čímž se vytvořily 3' a 5' přesahy DNA. Množství DNA, plasmidu a enzymů použitých v reakci bylo vypočítáno podle návodu výrobce: 20 µl DNA, 4 µl NEBuffer 3, 0,4 µl 100x BSA, 1 µl *Xho I* a 1 µl *Not I*. Reakce byla doplněna do 40 µl sterilní vodou a inkubována v 37 °C přes noc. Poté byla DNA ze směsi izolována pomocí komerční sady „QIAquick Gel Extraction Kit“ a

resuspendována v 50 µl sterilní vody. Koncentrace a čistota DNA byla měřena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000 (kap. 3.2.1.1.8).

*10x NEBuffer 3*: 0.5 M Tris-HCl (pH 7,9), 1 M NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT

*100x BSA*: 10 mg/ml

### **3.2.2.1.2 Ligace do plasmidu**

Ligace inzertu LdCD do plasmidu pGAPZα C byla prováděna pomocí T4 DNA ligasy. 8 µl DNA bylo účinně smísáno s 1 µl plasmidu pGAPZα C, 4 µl účinného pufru (5x koncentrovaný), 1 µl T4 DNA ligasy a 6 µl sterilní vody. Směs se inkubovala 24 hod při 15°C v lázni vody s ledem. Takto připravenými vektory byly transformovány buňky Top10 *E. coli* metodou teplotního šoku (kap. 3.2.1.1.5).

### **3.2.2.1.3 Transformace kompetentních buněk**

Bylo postupováno obdobně jako v kapitole 3.2.1.1.5 s tím rozdílem, že jako expresní vektor byl použit pGAPZα C. Buňky obsahující tento vektor byly resistantní vůči antibiotiku zeocin, které bylo přidáno do kultivačního média (LB/Z médium). Část narostlých buněk byla zamrazena v 15% glycerolu v -80 °C a ze zbytku byla izolována DNA pomocí komerční sady „Zyppy Plasmid Miniprep II Kit“.

*LB/Z agar*: LB agar, 25 µg/ml zeocin

### **3.2.2.1.4 Mini-preparace plasmidové DNA**

Jednotlivé kolonie buněk, které narostly na LB/Z agaru (kap. 3.2.2.1.3), se nechaly kultivovat přes noc ve 4 ml LB/Z média při 37 °C v orbitální třepačce (200 rpm), dokud jejich OD<sub>600</sub> nebylo v rozmezí 1-1,5. Poté byly buňky koncentrovány odstředěním (10000 g, 10 min, 4 °C) a vektor pGAPZα C byl extrahován a vyčištěn pomocí komerční sady „Zyppy Plasmid Miniprep II Kit“. DNA byla extrahována 30 µl sterilní vody a její koncentrace a čistota byla stanovena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000 (kap. 3.2.1.1.8). 1 µl izolované DNA byl štěpen pomocí restričních endonukleas *Xho I* a *Not I* (celkový objem reakce 10 µl) (kap. 3.2.2.1.1), rozdělen na agarosové elektroforéze (kap. 3.2.1.1.2), přečištěn pomocí komerčního sady „QIA Quick Gel Extraction“ a tyto vzorky byly podrobeny DNA sekvenování (kap. 3.2.1.1.9).

*LB/Z media*: LB média, 25 µg/ml zeocin

### **3.2.2.1.5 Midi-preparace plasmidové DNA**

Buňky TOP 10 s vektorem pGAPZα C byly připraveny M. Štajfovou na ÚOCHB AV ČR.

20 µL TOP 10 kompetentních buněk s vektorem pGAPZα C bylo přidáno ke 100 ml LB/Z média a buňky byly kultivovány v orbitální třepačce při 37 °C, 200 rpm přes noc. Poté byly buňky koncentrovány odstředěním (20000 g, 15 min, 4 °C) a vektor pGAPZα C byl izolován z bakteriální pelety pomocí komerční sady „Qiagen Plasmid Midi Kit“. Vektor byl resuspendován v 300 µl sterilní vody a spektrofotometriky byla stanovena koncentrace a čistota vzorků NanoDrop 2000 (kap. 3.2.1.1.8). Stejně se postupovalo i v případě vektoru pGAPZα C. Výsledné materiály vektorů byly zamrazeny v -20 °C a použity na elektroporaci *P. pastoris*.

*LB/Z media*: LB média, 25 µg/ml, zeocin

### 3.2.2.2 Elektroporace *P. pastoris*

#### 3.2.2.2.1 Linearizace plasmidové DNA

Pomocí restrikčních enzymů *AvrII* a *BspHI* a komerčního pufru 10xNEBuffer 3 byl štěpen pGAPZα C plasmid. Reakční směs obsahovala:

pGAPZα C:

42 µl plasmidové DNA

5 µl 10x NEBuffer 4

2,5 µl *AvrII* nebo *BspHI*

0,5 µl sterilní vody

Tyto směsi byly inkubovány přes noc v 37 °C a získané vektory byly přečištěny pomocí sady „QIAquick Gel Extraction Kit“ a rozpuštěny v 50 µl sterilní vody. Čistota a množství DNA bylo určeno spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000 (kap. 3.2.1.1.8).

*10x NEBuffer 4*: 0.5 M Tris-HCl (pH 7,9), 1 M NaCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT

*100x BSA*: 10 mg/ml

#### 3.2.2.2.2 Příprava *P. pastoris* na elektroporaci

50 ml YPD média bylo zaočkováno vybranou kolonií *P. pastoris* (kmen X33). Buňky byly kultivovány v orbitální třepačce (220 rpm, 30 °C). Následně byly přeneseny do 500 ml YPD média a kultivovány v orbitální třepačce (220 rpm, 30 °C) dokud OD<sub>600</sub> nebyla mezi 1,3-1,5. Poté byly buňky koncentrovány odstředěním (1500 g, 5 min, 4 °C) a resuspendovány v 250 ml vychlazené vody. Odstředění a resuspendování buněk bylo za stejných podmínek dvakrát opakováno. V poslední omývací kroku byly kvasinky resuspendovány v 20 ml ledového 1 M sorbitolu, znovu koncentrovány odstředěním a na závěr byly buňky

resuspendovány v 1-2 mL vychlazeného 1 M sorbitolu. Tyto buňky byly uchovávány na ledu a použity k elektroporaci.

*YPD media*: 1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, 2% dextrosa ve vodě

### **3.2.2.2.3 Provedení elektroporace**

100 µl suspenze buněk *P. pastoris* ve vychlazeném 1 M sorbitolu (kap. 3.2.2.2.2) bylo smícháno s 15 µl linearizovaného plasmidu (5-10 ng) (kap. 3.2.2.2.1) a inkubováno 5 min na ledu v elektroporační kyvetě. Následovala elektroporace při 2000 V po dobu 5 ms v elektroporátoru Eppendorf 2510 a ihned byl přidán 1 ml ledového 1 M sorbitolu a obsah kyvety byl přenesen do sterilní 15 ml zkumavky, kde byl 2 hod inkubován v 30 °C bez třepání. Takto připravené buňky byly zaočkovány na misky s YPDS/Z agarem (50 µl a 150 µl) a inkubovány v 30 °C dokud se kolonie nerozrostly (2-3 dny). Vybrané kolonie byly poté přečárkovány na nové misky s YPDS/Z agarem.

*YPDS/Z agar*: YPD agar, 1 M sorbitol, 25 µg/ml zeocin

*YPD/Z agar*: YPD agar, 25 µg/ml zeocin

### **3.2.2.3 Expresse LdCD v *P. pastoris***

Expresse byla provedena podle návodu od firmy Invitrogen „*Pichia* expression vectors for constitutive expression and purification of recombinant proteins; Catalog nos. V200-20 and V205-20“.

YPD/Z médium bylo zaočkováno jednou kolonií (transformované *P. pastoris* s inzertem pro LdCD (kap.3.2.2.2.3 ). 50 ml YPD/Z média bylo zaočkováno a kultivováno 4 dny v 30 °C, 200 rpm. Každý den v průběhu čtyř dnů exprese byly odebírány 1 ml alikvoty média, odstředěny (5000 g, 10 min, 4 °C) a v supernatantu byla měřena aktivita s peptidovým substrátem (kap. 3.2.8 ). Reakční směs obsahovala 5 µl média po odstředění buněk.

*YPD/Z médium*: 1% kvasinkového extraktu, 2% peptone, 2% dextrosa, 25 µg/ml zeocinu

## **3.2.3 Elektroforetické metody**

### **3.2.3.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE**

K vzorkům, které byly určeny k analýze pomocí SDS-PAGE, byl přidán redukční vzorkový pufr (VZP) a denaturace proběhla ve vodní lázni (100 °C, 5 min).

*VZP*: 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1% SDS, 4% β-merkptoethanol, 0,02% Comassie Brilliant Blue G250, 24% glycerol



VZP: 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 1% SDS, 0,02% Coomassie Brilliant Blue G250, 24% glycerol

### **3.2.3.2 SDS-PAGE – elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS**

Provedení polyakrylamidové elektroforézy v přítomnosti 0,1% SDS vycházelo z postupu podle Laemmliho (Laemmli, 1970). Používaly se 10% nebo 15% polyakrylamidové dělicí gely o rozměrech 80 x 60 x 0,75 mm nebo 80 x 60 x 1,5 mm. Vlastní elektroforéza byla prováděna na přístroji Power Pac Basic Bio-Rad. Na gel se nanášelo 15 µl vzorku (kap. 3.2.3.1) ve vzorkovém pufru. Fixace probíhala 15 min ve fixačním roztoku obsahujícím 45% ethanol, 10% kyselinu octovou. K barvení byl použit roztok Coomassie Brilliant Blue R-250 (Blakesley a Boezi, 1977) a odbarvení 10% roztok kyseliny octové.

*Coomassie Brilliant Blue R-250*: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% methanol, 10% kyselina octová

### **3.2.3.3 Přenos proteinů na membránu a imunodetekce**

Po provedení SDS-PAGE byly gel, filtrační papíry a PVDF membrána o velikosti gelu 15 min ekvilibrovány v transferovém pufru. Po ekvilibraci byly navrstveny do blotovacího přístroje v pořadí: anoda, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír, katoda. Přenos probíhal 1 hod za konstantního napětí 100 V a chlazení. Poté byly proteiny na membráně obarveny roztokem Coomasie Brilliant Blue R-250 nebo detekovány pomocí protilátek.

Při detekci protilátkami byla membrána nejprve pro zablokování nespecifických interakcí inkubována v roztoku TTBS obsahujícím 10% odtučněné mléko nebo 4% BSA a 1% PVP 1 hod při 4°C. Poté byla opláchnuta v TTBS (3x 15 min). Pak byla přidána komerční protilátka proti histidinové kotvě s konjugovanou HRP v roztoku TTBS (ředění 1:5000) a probíhala inkubace 1 hod při teplotě 26 °C. Po promytí TTBS roztokem (3x 15 min) byly proteiny na membráně obarveny substrátem BM Blue POD Substrate.

*Transferový pufr*: 25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM glycin, 20% methanol

*TBS roztok*: 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,15 M NaCl

*TTBS roztok*: 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% Tween

*Coomassie Brilliant Blue R-250*: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% methanol, 10% kyselina octová

### 3.2.3.4 Acetonová precipitace proteinů

Ke vzorkům určeným k analýze pomocí SDS-PAGE byl přidán aceton na výslednou koncentrací 80%. Poté byly vzorky ponechány minimálně 30 min v -20 °C. Následně byly vzorky odstředěny (15 min, 4 °C, 10000 g), supernatant byl odstředěn a vzorky byly vysušeny na vakuové odparce Thermosavant.

### 3.2.4 Určení N-koncové aminokyselinové sekvence

Vzorky určené k analýze byly separovány pomocí SDS-PAGE (kap. 3.2.3.2) a přeneseny na PVDF membránu (kap. 3.2.3.3). Poté byla membrána obarvena roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250, odbarvena 50% methanolem a poté byla řádně promyta vodou. Určování N-koncové aminokyselinové sekvence bylo provedeno v servisní laboratoři Ing. Z. Voburky na ÚOCHB AV ČR pomocí proteinového sekvenátoru ABI Procise 491.

*Coomassie Brilliant Blue R-250*: 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 45% methanol, 10% kyselina octová

### 3.2.5 Stanovení množství proteinu

Pro stanovení obsahu bílkovin byla použita komerční sada „BCA™ Protein Assay Kit“. Kalibrační křivka byla pro každé stanovení připravena ze standardu roztoku BSA (rozsah koncentrací 0-2000 µg/ml). Do jednotlivých jamek mikroleštičky bylo pipetováno 25 µl standardu nebo vzorku a následně 200 µl činidla. Po inkubaci (30 min, 37 °C) byla změřena absorbance při vlnové délce 562 nm na fluorescenční čtečce GENios.

### 3.2.6 Aminokyselinová analýza

Aminokyselinová analýza byla provedena pí V. Himrovou na ÚOCHB AV ČR na přístroji Biochrom 20 Amino Acid Analyzer.

### 3.2.7 Refolding LdCD

#### 3.2.7.1 Kyselý refolding – protokol A

K 2 ml refoldingového pufru A bylo přidáno 25 µl eluční frakce z NiNTA kolony obsahující LdCD C tag (koncentrace proteinu 0,8 mg/ml) nebo 40 µl eluční frakce z NiNTA kolony obsahující LdCD N tag (koncentrace proteinu 0,5 mg/ml). Výsledná koncentrace proteinu v refoldingové směsi byla 10 µg/ml. Tato refoldingová směs byla inkubována 3 dny za stálého míchání při 4 °C. Poté byla směs koncentrována pomocí koncentrátoru Millipore

10000 MW na konečný objem 50  $\mu$ l (4 °C). U takto připraveného preparátu byla změřena enzymová aktivita (kap. 3.2.8).

Uvedený postup byl obměňován v následujících parametrech:

- *aditiva*: 20% glycerol, 0,5 M arginin, 1 mM resp. 10 mM peroxid vodíku, probublávání kyslíkem
- *pH*: 3; 3,5; 4 a 4,5
- *teplota*: 4 °C, 26 °C a 37 °C
- *koncentrace proteinu v refoldingové směsi*: 5; 10 a 20  $\mu$ g/ml

*refoldingový pufr A*: 50 mM Na-acetát (pH 3,5), 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG

### 3.2.7.2 Kyselý refolding – protokol B

32  $\mu$ l eluční frakce z NiNTA kolony obsahující LdCD N tag (koncentrace proteinu 0,5 mg/ml) nebo 20  $\mu$ l eluční frakce z NiNTA kolony obsahující LdCD C tag (koncentrace proteinu 0,8 mg/ml) byly přidány ke 150  $\mu$ l 67% kyseliny octové a odstředěny (15 min, 4 °C, 10000 g). Supernatant byl postupně za stálého míchání přidán k 1 ml vychlazené destilované vody. Tato směs byla za stálého míchání přidávána ke 4 ml refoldingového pufru B. Konečná koncentrace proteinu v refoldingové směsi byla 3,2  $\mu$ g/ml. Tato směs byla ponechána 3 dny ve 4 °C. Poté byla směs koncentrována pomocí koncentrátoru Millipore 10000 MW na konečný objem 50  $\mu$ l (4 °C). Po aktivaci zymogenu (kap. 3.2.7.4) byla změřena enzymová aktivita (kap. 3.2.8).

Uvedený postup byl obměňován v následujících parametrech:

- *aditiva*: 0,5 M arginin, 10% resp. 30% glycerol, 2,5 mM GSH a 1 mM GSSG, refoldingový pufr obsahující pouze komponentu pufru Tris-HCl (pH 8,0)
- *pH*: 7; 8 a 9
- *teplota*: 4 °C, 26 °C a 37 °C
- *koncentrace proteinu v refoldingové směsi*: 1,6; 3,2 a 6,4  $\mu$ g/ml

*Refoldingový pufr B*: 0,5 M Tris-HCl (pH 8), 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 15% glycerol

### 3.2.7.3 Bazický refolding

3,5  $\mu$ l eluční frakce z NiNTA kolony obsahující LdCD N tag (koncentrace proteinu 0,5  $\mu$ g) nebo LdCD C tag (koncentrace proteinu 0,8  $\mu$ g/ml) bylo přidáno k 46,5  $\mu$ l RedMix. Tato směs byla promíchána a po kapkách za stálého míchání přidána k 450  $\mu$ l RedMix s 2,5  $\mu$ l

0,1 M GSSG (konečná koncentrace GSSG 0,5 mM). Tato směs se míchala 1 hod při teplotě 26 °C a poté byla nechána 3 dny ve 4 °C. Po aktivaci (kap. 3.2.7.4) byla změřena enzymová aktivita (kap. 3.2.8).

*RedMix*: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM GSH, 8 M močovina

*RefMix*: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 30% glycerol, 0,05% PEG 1500

### **3.2.7.4 Aktivace LdCD**

#### **3.2.7.4.1 Autoaktivace LdCD**

U výsledného preparátu 50 µl LdCD (kap. 3.2.7.2) byla provedena výměna pufru na koncentrátoru Millipore 10.000 MW na výsledné desetinasobné zředění. K takto připravenému enzymu bylo přidáno 150 µl aktivačního pufru a směs byla inkubována v 37 °C přes noc. Druhý den byla měřena enzymová aktivita (kap. 3.2.8).

Dále byla provedena optimalizace doby autoaktivace v rozmezí 15 min až 48 hod a její pH optimum v rozmezí pH 3 až pH 7 (po půl jednotkách pH).

*aktivační pufr*: 0,2 M Na-citrát (pH 3 až 6) nebo citrát fosfát (pH 6 až 7)

#### **3.2.7.4.2 Aktivace legumainem**

U výsledného preparátu 50 µl LdCD (kap. 3.2.7.2) byla provedena výměna pufru na koncentrátoru Millipore 10.000 MW na výsledné desetinasobné zředění. K takto připravenému preparátu LdCD bylo přidáno 140 µl aktivačního pufru a 10 µl legumainu (70 µg/ml) a tato směs byla inkubována přes noc v termobloku při 37 °C. Druhý den byla změřena enzymová aktivita (kap. 3.2.8).

*aktivační pufr*: 0,2 M Na-citrát (pH 4,5)

### **3.2.8 Kinetická měření s peptidovým substrátem**

Enzymová aktivita LdCD byla měřena s FRET peptidovým substrátem Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph\*-Ala-Leu. Reakce byly prováděny v mikrotitračních destičkách v celkovém objemu 100 µl. Reakční směs obsahovala 12,5 µl enzymu. Měření bylo prováděno v 200 mM pufru Na-citrát (pH 5,0). Reakční směs byla inkubována 5 min při 37°C a startována přidáním substrátu, jeho finální konc. byla 100 µM. Rychlost štěpení substrátu byla kontinuálně monitorována na fluorescenční čtečce GENios při excitační vlnové délce 330 nm a emisní vlnové délce 410 nm při teplotě 37°C. Každé měření bylo prováděno v triplicátech. V případě inhibované reakce byl přidán pepstatin (výsledná koncentrace 10 µM) a reakce byla inkubována 15 min při 26 °C. Změřená data byla vyhodnocena v programu Magellan.

### 3.2.9 Měření kinetických parametrů

Michaelisova konstanta byla určena měřením počátečních rychlostí  $v_0$  při různých množstvích substrátu v reakční směsi. Vyhodnocení bylo prováděno dle Lineweaver-Burkova způsobu vynesení počátečních rychlostí v programu GraFit:

$$v_0 = \frac{V_{\max} [\text{Sub}]}{(K_M + [\text{Sub}])}$$

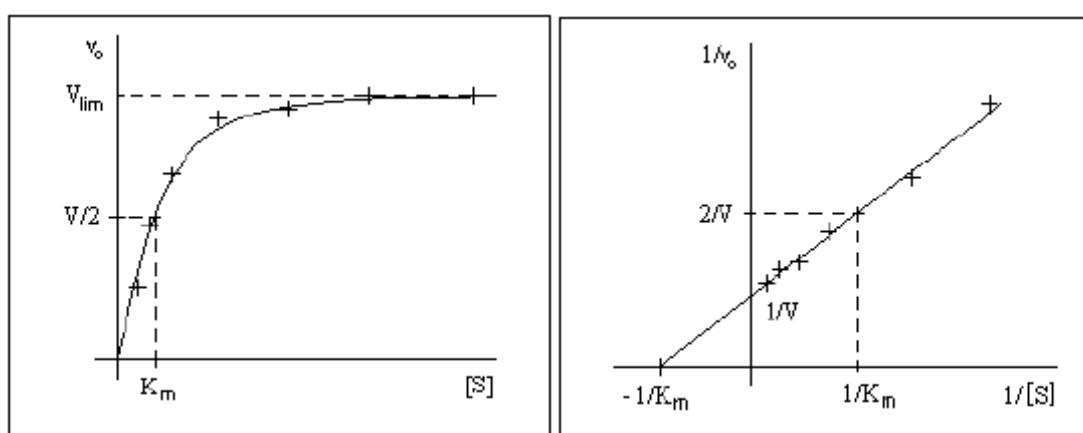
$$\frac{1}{v_0} = \left( \frac{K_M}{V_{\max}} \right) \cdot \left( \frac{1}{[\text{Sub}]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

$v_0$  ... počáteční rychlost reakce

$V_{\max}$  ... maximální rychlost reakce

$K_M$  ... Michaelisova konstanta

$[\text{Sub}]$  ... koncentrace substrátu



**Obrázek 3.1:** Závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu v reakční směsi (vlevo). Lineweaver-Burkovo vynesení kinetických dat (vpravo).

V reakci byl smíchán 10x ředěný LdCD sterilní vodou (kap. 3.2.7.1) a 67,5  $\mu\text{l}$  200 mM Na-citrátového pufru (pH 5,0). Reakce byla zahájena přidavkem 20  $\mu\text{l}$  SMix různé koncentraci substrátu: od 10  $\mu\text{M}$  do 1200  $\mu\text{M}$  koncentraci substrátu. Provedení aktivní reakce a její vyhodnocení je uvedeno v kapitole 3.2.8.

SMix: Abz substrátu pro kathepsin D rozpuštěný v Na-citrát pufru (pH 5,0)

### 3.2.10 Měření inhibice LdCD

#### 3.2.10.1 Aktivní test v přítomnosti inhibitorů

Reakční směs byla připravena z 12,5  $\mu\text{l}$  LdCD, uvedeného množství inhibitoru (viz. tabulka 3.3) a pufru Na-citrát pH 5,0, který doplnil reakční směs na 80  $\mu\text{l}$ . Tato směs byla inkubována 15 min při teplotě 26  $^{\circ}\text{C}$ . Reakce byla zahájena přidavkem 20  $\mu\text{l}$  Smix. Provedení aktivní reakce a její vyhodnocení je uvedeno v kapitole 3.2.8.

inhibitor	typ inhibované peptidasy	zásobní roztok (mM)	μl v reakci	konečná koncentrace (μM)
<b>EDTA</b>	metalopeptidasy	100	1	1000
<b>Pefabloc</b>	ser. peptidasy	100	1	1000
<b>E-64</b>	cys. peptidasy	5	0,2	10
<b>Leupeptin</b>	ser. a cys. peptidasy	2	0,5	10
<b>pepstatin</b>	asp peptidasy	1	1	10
<b>Lopinavir</b>	retrovirální asp. peptidasa z viru HIV	1	1	10
<b>PDI</b>	asp. peptidasy	0,035	5	1,75

**Tabulka 3.3: Typ, množství a konečná koncentrace inhibitorů přidaných do reakční směsi při měření inhibicí LdCD.**

*SMix*: 100 μM substrát pro kathepsin D (10 mM v DMSO) v 200 mM Na-citrátovém pufru (pH 5,0)

### 3.2.10.2 Stanovení konstanty IC<sub>50</sub>

Hodnoty IC<sub>50</sub> byly stanoveny měřením počátečních rychlostí reakce štěpení substrátu v přítomnosti různých koncentrací inhibitoru PDI. V reakci byl smíchán 10x ředěný LdCD sterilní vodou (kap. 3.2.7.1) a reakční směs byla doplněna 200 mM Na-citrátovým puftrem, (pH 5,0) na objem 80 μl. Reakce byla inkubována 15 min při 26 °C, zahájena přidávkem 20 μl *SMix*. Provedení aktivitní reakce a její vyhodnocení je uvedeno v kapitole 3.2.8. Byly testovány PDI v koncentracích od 175 nM do 1,75 μM v reakci.

*PDI*: 35 μM roztok ve vodě

*SMix*: 100 μM substrát pro kathepsin D (10 mM v DMSO) v 200 mM Na-citrátovém pufru (pH 5,0)

### 3.2.11 Štěpení proteinových substrátů

12,5 μl aktivního LdCD (kap. 3.2.7.1) bylo smícháno s 15 μl BSA (2 mg/ml ve vodě) nebo 45 μl ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasy/oxygenasy (2 mg/ml v 50 mM Tris-HCl, pH 6,8) a s 42,5 μl pufru 0,5 M Na-citrát (pH 5,0). Tato směs byla inkubována 1, 3, 6 a 18 hod. v termobloku při 37 °C. Reakce byla ukončena acetonovou precipitací (kap. 3.2.3.4) a sražené vzorky byly rozpuštěny v 50 μl vzorkového pufru pro SDS-PAGE (kap. ); zpracování vzorku a následná SDS-PAGE je podle kap 3.2.3.2.

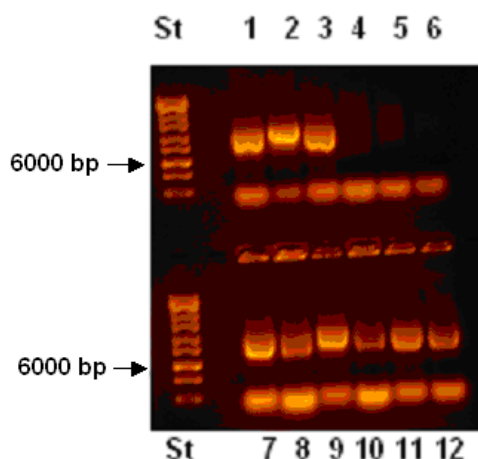
## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Rekombinantní exprese LdCD v systému *Escherichia coli*

Pro trávicí aspartátovou peptidasu mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*) typu kathepsin D (LdCD) byla na pracovišti ÚOCHB AV ČR určena cDNA sekvence a připraven vektor pET101/D-TOPO<sup>®</sup> s histidinovou kotvou na C-konci proteinu. Tento vektor při expresi v *E. coli* tvoří také alternativní kratší formu LdCD vzniklou chybným začátkem translace (sekvence - Obr. 4.13, str. 76). Produkt exprese tak tvoří na SDS-PAGE dva pásy 35 kDa a 42 kDa (Obr. 4.5, str. 68). Cílem proto bylo připravit druhý vektor pET100/D-TOPO<sup>®</sup> s inzertem LdCD, který nesl histidinovou kotvu na N-konci proenzymu a který by byl exprimován celý (42 kDa). Dále byla provedena exprese s oběma vektory (pET100/D-TOPO<sup>®</sup> i pET101/D-TOPO<sup>®</sup>) v *E. coli* a připravené rekombinantní proteiny (LdCD N-tag, resp. LdCD C-tag) byly použity pro refolding aktivního enzymu a určení biochemických vlastností této aspartátové peptidasy.

#### 4.1.1 Klonování LdCD do plasmidu pET100/D-TOPO<sup>®</sup>

Při přípravě plasmidu pET100/D-TOPO<sup>®</sup>, který tvoří umísťuje histidinovou kotvu na N-konec rekombinantního LdCD (konstrukt LdCD N-tag), byla použita sekvence cDNA pro LdCD připravená na ÚOCHB AV ČR a bylo postupováno, dle kap. 3.2.1.1. Stručně: a) požadovaná sekvence DNA byla amplifikována pomocí metody PCR a navržených primerů (LdCD\_EC frd1 a LdCD\_EC rev); b) výsledná DNA byla rozdělena pomocí horizontální agarosové elektroforézy a pruh DNA o velikosti 1107 bp byl izolován z gelu; c) tato DNA pro LdCD byla zaklonována do plasmidu pET100/D-TOPO<sup>®</sup>, transformována do TOP 10 kompetentních buněk *E. coli* teplotním šokem a tyto buňky byly rozetřeny na misku s příslušným antibiotikem; d) vybrané kolonie byly přečárkovány na nové misky a byla provedena PCR reakce (Obr. 4.1, str. 64), která amplifikovala vektor s DNA pro LdCD, z něhož byla určena koncentrace a čistota DNA a ověřena správnost začlenění inzertu LdCD do plasmidu a porovnána sekvence s původní DNA pro LdCD.



**Obrázek 4.1: PCR reakce s vybranými koloniemi TOP 10 buněk nesoucí vektor pro LdCD.**  
*St ... standardy velikostí molekul O'Gene 1kb DNA ladder*  
*1 – 12 ... vektory amplifikované PCR reakcí z vybraných kolonií TOP 10 buněk*

Teoretická velikost vektoru činí 6877 bp, jedná se tedy o pruh migrující v blízkosti standardu o velikosti 6000 bp. Pro další práci byly vybrány kolonie označené na agarosovém gelu jako 1, 3, 7 a 9 (dále v textu označované jako VZ-1, VZ-3, VZ-7 a VZ-9), u kterých byly transformované buňky kultivovány a vektorová DNA byla extrahována pomocí komerční sady „Zyppy Plastid Miniprep II Kit“ na konečný objem 50 µl roztoku DNA. U těchto vzorků byla určena koncentrace a čistota DNA na spektrometru NanoDrop 2000.

Vzorek DNA má přijatelnou čistotu, pokud jeho poměr absorbancí  $A_{260}/A_{280}$  je v rozmezí mezi 1,8-2,0. Tuto podmínku splnily vzorky označené jako VZ-1 a VZ-3, které byly poslány na sekvenování (Dr. Hrdá, PřF UK). Z výsledků sekvenování, které byly vyhodnoceny pomocí programu DNASTar, vyplývá, že oba vektory mají správnou sekvenci a byl do nich inzert LdCD správně začleněn, proto se s nimi dále pracovalo při expresi v BL21Star buňkách *E. coli*.

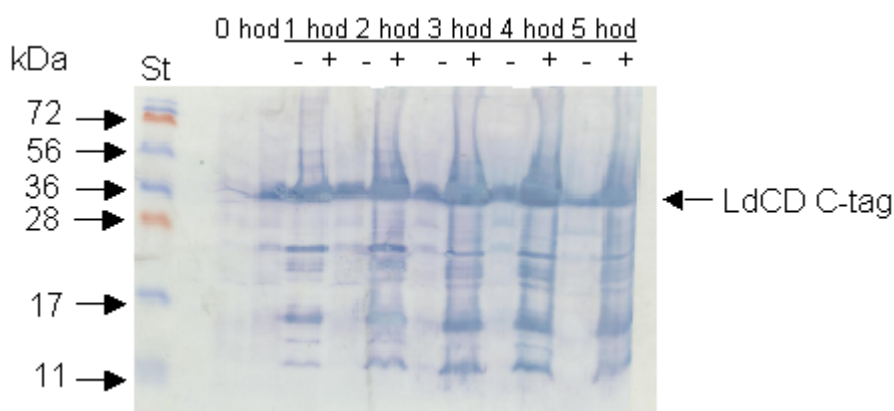
#### 4.1.2 Expresse v *E. coli*

Buňky *E. coli* BL21Star byly transformovány vektory pET100/D-TOPO<sup>®</sup> a pET101/D-TOPO<sup>®</sup>, které obsahovaly sekvenci prekurzoru LdCD s histidinovou kotvou na N-konci (LdCD N-tag) resp. C-konci (LdCD C-tag). Buňky byly transformovány teplotním šokem a kultivovány podle postupu uvedeného v kap. 3.2.1.1.5. Připravené inokulum (10 ml) bylo převedeno do většího objemu LB média (1 l s vektorem pET100/D-TOPO<sup>®</sup> a 3 l s vektorem pET101/D-TOPO<sup>®</sup>) obsahujícího karbenicilin a kultivace dále probíhala při 37 °C do požadované hodnoty  $OD_{600} = 0,5$ . Poté byla exprese indukována 1 mM IPTG a probíhala po dobu 5 hod. V pravidelných časových intervalech byly odebírány alikvoty (0,5 ml) pro



následnou analýzu kinetiky exprese. Po ukončení kultivace byly obě bakteriální kultury odstředěním a získané buněčné pelety byly skladovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

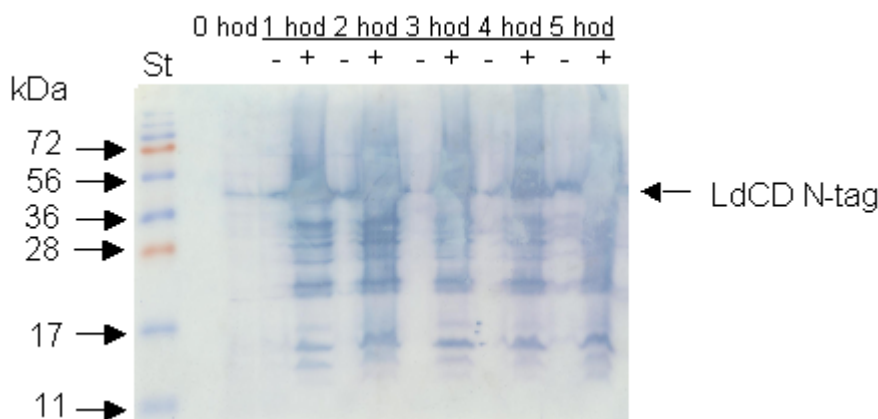
Alikvoty byly analyzovány na přítomnost rekombinantního proteinu pomocí imunoblotu vizualizovaného protilátkou proti histidinové kotvě (kap. 3.2.3.3) (Obr. 4.2 a Obr. 4.3, str. 66). Oba proteiny jsou složeny ze sekvence LdCD (371 aminokyselin) a fúzní domény s histidinovou kotvou (32/36 aminokyselin) a mají tedy teoretickou relativní molekulovou hmotnost 42 kDa. Tato hodnota je v souladu s majoritním proteinem detekovaným na obou imunoblotech (pás migrující mezi standardy molekulových hmotností 36 a 56 kDa), čímž byla prokázána funkčnost obou připravených expresních systémů.



**Obrázek 4.2:** Časová závislost exprese LdCD C-tag v kultuře *E. coli*. Vzorky byly děleny na SDS-PAGE a následně přeneseny na PVDF membránu, kde byly vizualizovány protilátkou proti histidinové kotvě.

St ... standardy molekulových hmotností PageRuler® Prestained Protein Ladder Plus

Další dráhy obsahují vzorky odebírané v průběhu kultivace v uvedených časech, vedle sebe jsou vzorky neindukované a indukované (- resp. +) pomocí IPTG.



**Obrázek 4.3: Časová závislost exprese LdCD N-tag v kultuře *E. coli*.** Vzorky byly děleny na SDS-PAGE a následně přeneseny na PVDF membránu, kde byly vizualizovány protilátkou proti histidinové kotvě.

St ... standardy molekulových hmotností PageRuler® Prestained Protein Ladder Plus

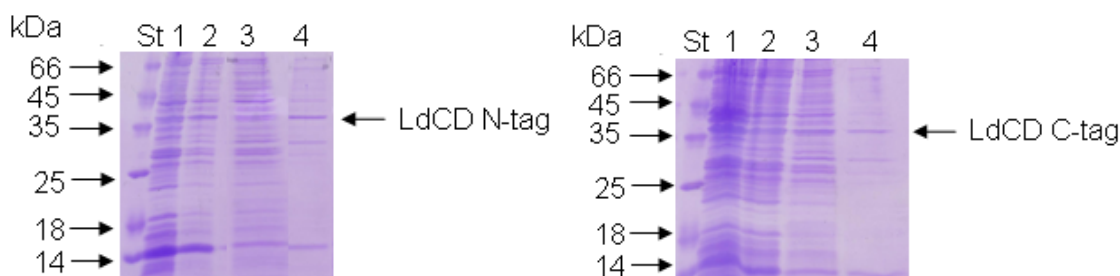
Další dráhy obsahují vzorky odebírané v průběhu kultivace v uvedených časech, vedle sebe jsou vzorky neindukované a indukované (- resp. +) pomocí IPTG.

Porovnání alikvotů odebíraných v časových intervalech ukázalo zřetelný nárůst exprese v čase a také při indukci IPTG.

### 4.1.3 Purifikace rekombinantních proteinů

#### 4.1.3.1 Příprava inkluzních tělísek

Pelety bakteriálních buněk získané po kultivaci (v kap. 3.2.1) byly použity pro izolaci inkluzních tělísek, kde byla předpokládána akumulace rekombinantního proteinu. Pro izolaci inkluzí byl použit postup uvedený v kap. 3.2.1.2. Stručně: a) buňky byly lyzovány v lyzačním pufrem v přítomnosti lysozymu, PMSF a  $\beta$ -merkaptoethanolu, b) vzniklý lyzát byl inkubován v přítomnosti DOC a odstředěn (supernatant 1), c) peleta obsahující inkluze byla dále čištěna dvěma promývacími pufrů se zvyšující se koncentrací NaCl (supernatant 2 a 3). Získané přečištěné inkluze byly skladovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Přítomnost rekombinantního proteinu v tomto výsledném produktu inkluzí byla ověřena pomocí SDS-PAGE (kap. 3.2.3.2) (Obr. 4.4, str. 67).



**Obrázek 4.4: SDS-PAGE analýza průběhu izolace inkluzních tělísek z exprese konstruktů LdCD v *E. coli*.** SDS-PAGE gel byl barven pomocí roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250.

*St ... standardy molekulových vah Unstained Protein Molecular Weight Marker*

*1 ... supernatant 1 z přípravy inkluzí*

*2 ... supernatant 2 z přípravy inkluzí*

*3 ... supernatant 3 z přípravy inkluzí*

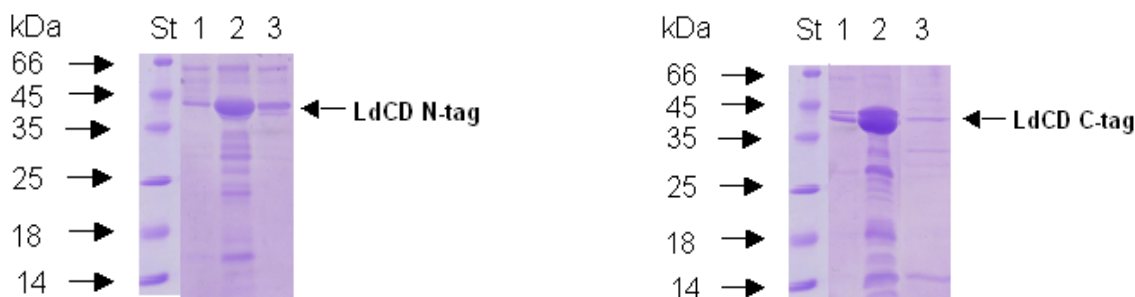
*4 ... výsledné přečištěné inkluze*

Během přípravy inkluzí dochází k postupnému odmyváni balastních proteinů a vzniká relativně čistá frakce inkluzních tělísek s majoritním obsahem LdCD, která byla dále purifikována pomocí afinitní chromatografie.

#### 4.1.3.2 Izolace afinitní chromatografií

Připravené rekombinantní proteiny LdCD N-tag a LdCD C-tag byly přečištěny pomocí afinitní kolony Ni-NTA. Tato kolona obsahuje imobilizovanou nitrilotrioctovou kyselinu (NTA) s navázanými nikelnatými ionty, se kterou specificky interaguje histidinová kotva rekombinantních proteinů.

Vzorky pro afinitní chromatografii byly připraveny rozpuštěním mokrých inkluzí v rozpouštěcím pufru: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 8 M močovina, 100 mM β-merkapt ethanol. Rozpuštěné vzorky byly odstředěny, supernatanty byly naneseny na afinitní kolonu pumpou a chromatografie byla provedena na automatickém zařízení pro nízkotlakou chromatografii (kap. 3.2.1.3). Stručně: a) kolona byla promyta rozpouštěcím puftrem (bez β-merkapt ethanolu); b) na kolonu byly naneseny vzorky; c) kolona byla promyta promývacím puftrem 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 8 M močovina, 100 mM β-merkapt ethanolu, 20 mM imidazol; a d) eluována elučním puftrem, který se od promývacího liší pouze vyšším obsahem imidazolu (250 mM) silně kompetujícího o vazbu na NTA s histidinovou kotvou rekombinantního proteinu. Průběhy purifikací byly vyhodnoceny kontinuálním měřením absorbance při vlnové délce 280 nm a získané vyčištěné proteiny LdCD N-tag a LdCD C-tag byly skladovány při -20 °C. Čistota jednotlivých chromatografických frakcí byla analyzována pomocí SDS-PAGE (Obr. 4.5, str. 68).



**Obrázek 4.5:** SDS-PAGE analýza frakcí z afinitní purifikace LdCD. SDS-PAGE gel byl barven pomocí roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250.

St ... standardy molekulových vah Unstained Protein Molecular Weight Marker

1 ... eluční frakce obsahující čistý LdCD

2 ... protein nenavázaný na kolonu

3 ... frakce získaná promýváním kolony promývacím pufrem

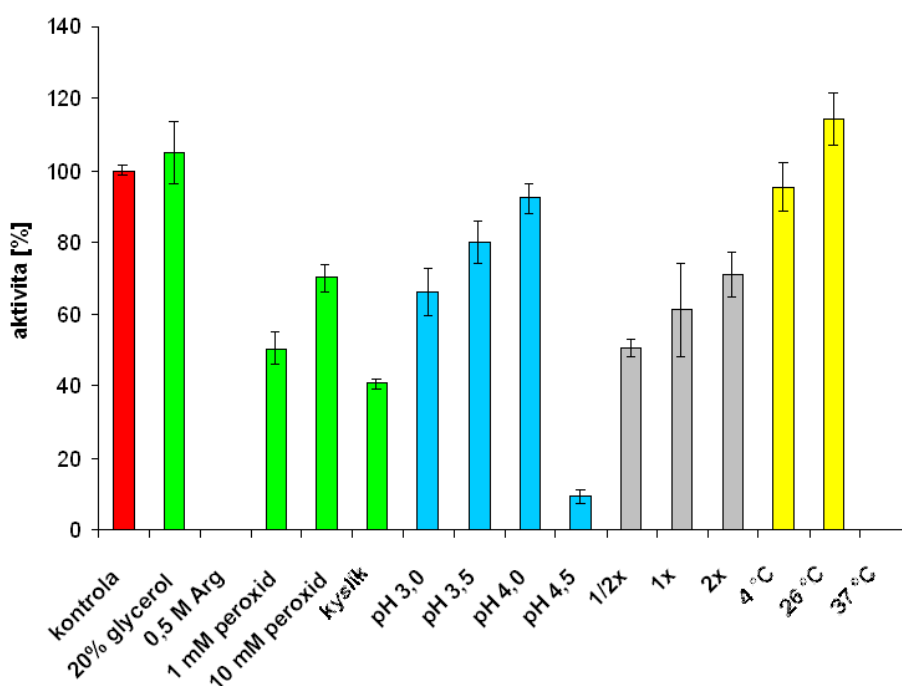
Během promývání kolony promývacím pufrem se uvolnily proteiny, které byly navázané nespecifickými interakcemi k nosiči. Eluční frakce obsahovala převážně protein LdCD. Velká část vzorku se nenavázala na kolonu a byla použita k opakované chromatografii. Tímto způsobem bylo získáno 4 mg rekombinantního proteinu LdCD N-tag a 9,6 mg LdCD C-tag (stanoveno dle kap. 3.2.5). Takto připravený materiál byl dále použit pro refolding, přípravu aktivního enzymu a určení biochemických vlastností této aspartátové peptidasy.

#### 4.1.4 Refolding LdCD

V inkluzních tělíčkách je protein ukládán obvykle v biologicky neaktivní formě (denaturovaný) s nízkým obsahem sekundárních struktur. Dalším krokem práce s takovým proteinem bylo převedení biologicky neaktivní formy na formu aktivní (tj. nativní konformaci), která se provádí postupem označovaným jako refolding. V této práci byly vyzkoušeny tři protokoly pro refolding a dva z nich byly optimalizovány. Účinnost refoldingu zymogenu LdCD byla po aktivaci (kap. 3.2.7.4) stanovena pomocí aktivního testu, jako míra štěpení peptidového fluorogeního substrátu monitorované na fluorescenční čtečce GENios (kap. 3.2.8). Výsledky byly zpracovány v programu Magellan jako relativní fluorescenční jednotky za sekundu (RFU/s) a následně graficky normalizovány na aktivitu naměřenou u kontrolního vzorku. Reakční směs obsahovalo refoldovaný enzym připravený podle protokolu A, B nebo C, 100  $\mu$ M peptidový substrát, v případě inhibované reakce 10  $\mu$ M pepstatin a objem byl doplněn 200 mM Na-citrátovým pufrem (pH 5,0) na 100  $\mu$ l.

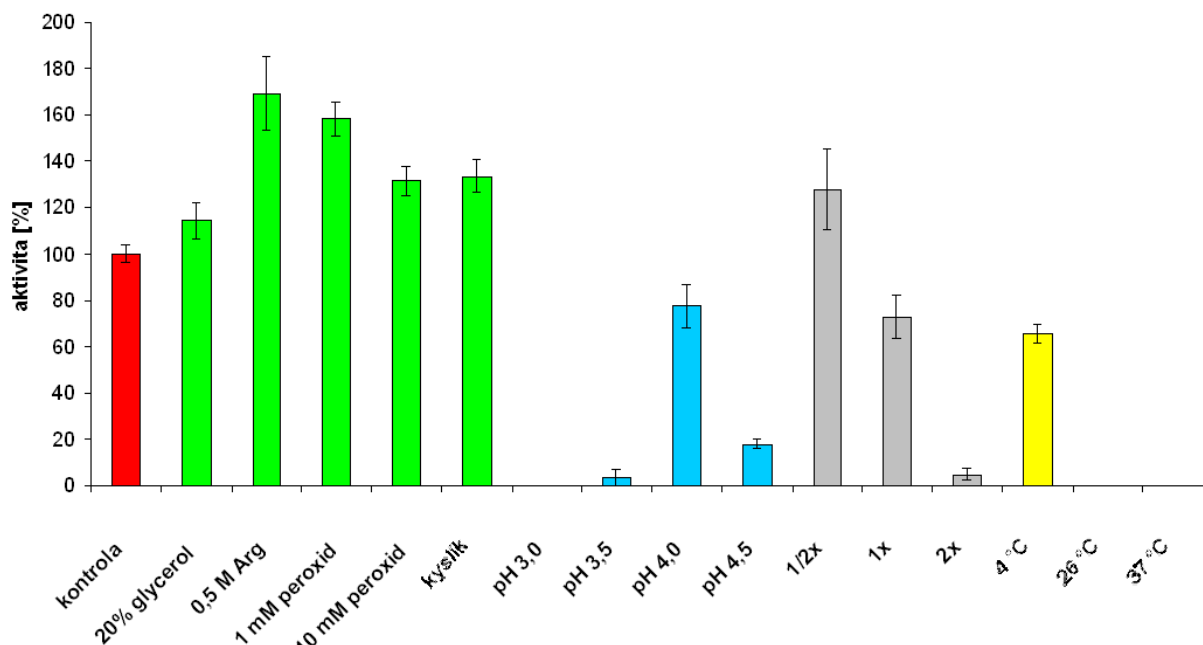
#### 4.1.4.1 Kyselý refolding – protokol A

V prvním korku byly navrženy a testovány základní podmínky pro refolding modifikované podle postupu uvedeného v referenci (Pearson et al., 2009). Tyto podmínky označované jako „kyselý refolding – protokol A“ zahrnovaly skokové ředění denaturovaného proteinu do refoldingové směsi o složení: 50 mM Na-acetátový pufr (pH 3,5), 1 mM GSH, 0,2 mM GSSG (kap. 3.2.7.1) Tyto podmínky vedly ke správně sbalenému LdCD, jak ukázalo testování aktivity refoldovaného materiálu v aktivním testu (Obr 4.6 a Obr. 4.7, str. 70, označeno jako kontrola). Ve druhé fázi byly tyto základní podmínky optimalizovány v několika parametrech: a) přidavek aditiv (20% glycerol, 0,5 M arginin, 1 mM a 10 mM peroxid vodíku, probublávání kyslíkem), b) pH refoldingového pufru (pH 3,0; pH 3,5; pH 4,0; pH 4,5); c) koncentrace proteinu (1/2x-5 µg/ml, 1x-10 µg/ml (základní podmínky), 2x-20 µg/ml); d) teplota inkubace (4 °C, 26 °C – laboratorní teplota, 37 °C). Úspěšnost refoldingu byla stanovena pomocí aktivního testu s peptidovým substrátem (kap. 3.2.8). Do 100 µl reakce bylo přidáno 12,5 µl připraveného enzymu.



**Obrázek 4.6: Optimalizace refoldingu LdCD C-tag podle protokolu A.** Při optimalizaci kyselého refoldingu podle protokolu A byly testovány různé podmínky: a) přidavek aditiv (zelená); b) pH refoldingového pufru (modrá); c) koncentrace proteinu v refoldingovém pufru (šedivá); d) teplota refoldingu (žlutá). Červeně je znázorněn kontrolní vzorek, který odpovídá základním podmínkám refoldingu. U vzorků s různou koncentrací proteinu v refoldingové směsi jsou uvedeny hodnoty 1/2x pro koncentraci 5 µg/ml, 1x pro 10 µg/ml a 2x pro 20 µg/ml. Peroxid vodíku je v tabulce označen jako peroxid. Hodnoty aktivity vyjádřené v RFU/s byly normalizovány aktivitu kontrolního vzorku (100%).

Ve vzorku s 0,5 M argininem a vzorku, který byl ponechán refoldovat při 37 °C nebyla nalezena aktivita. Největší aktivita LdCD C-tag (refolding protokol A) byla naměřena s enzymem, který byl inkubován při 26 °C nebo v přítomnosti 20% glycerolu. Nejednalo se však o významný nárůst aktivity oproti kontrolnímu vzorku.



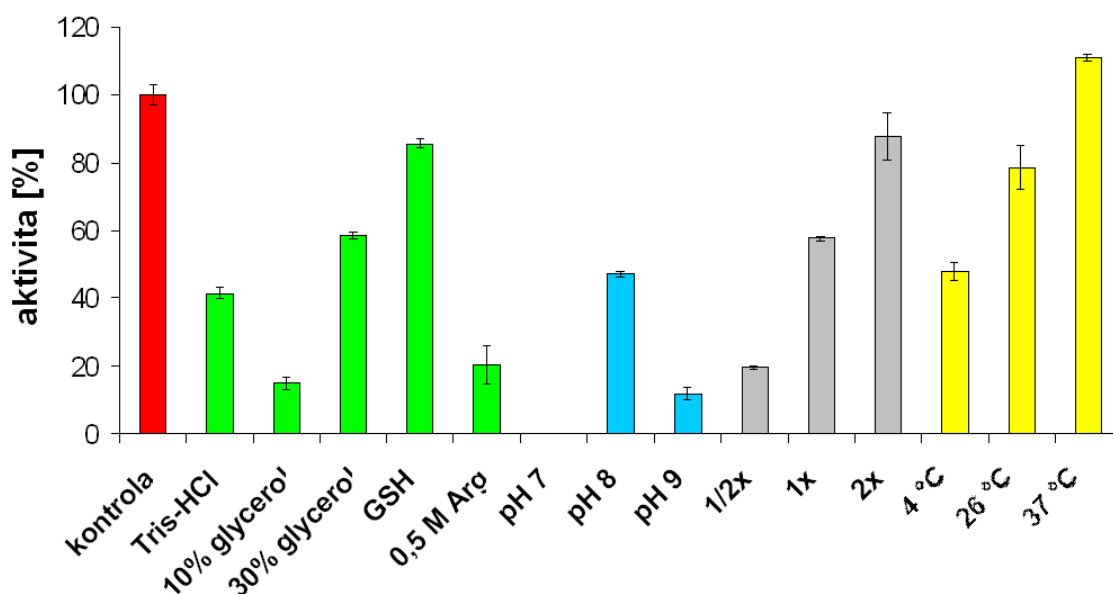
**Obrázek 4.7: Optimalizace refoldingu LdCD N-tag podle protokolu A.** Při optimalizaci tohoto protokolu byly testovány následující modifikace základních podmínek refoldingu: a) přidavek aditiv (zelená); b) pH refoldingového pufru (modrá); c) koncentrace proteinu v refoldingovém pufru (šedivá); d) teplota refoldingu (žlutá). Červeně je znázorněn kontrolní vzorek, který odpovídá základním podmínkám refoldingu. U vzorků s různou koncentrací proteinu v refoldingové směsi jsou uvedeny hodnoty 1/2x pro koncentraci 5 µg/ml, 1x pro 10 µg/ml a 2x pro 20 µg/ml. Peroxid vodíku je v tabulce označen jako peroxid. Hodnoty aktivity vyjádřené v RFU/s byly normlizovány aktivitu kontrolního vzorku (100%).

Ve vzorku, který měl pH 3 refoldingového pufru, a vzorků, které byly ponechány refoldovat při 26 °C a 37 °C nebyla nalezena aktivita. Největší aktivita LdCD N-tag (refolding protokol A) byla naměřena s enzymem, v přítomnosti 0,5 M argininu.

#### 4.1.4.2 Kyselý refolding – protokol B

V prvním korku byly navrženy a testovány základní podmínky pro refolding modifikované podle postupu uvedeného (Sadhukhan et al., 2006). Tyto podmínky označované jako „kyselý refolding – protokol B“ zahrnovaly skokové ředění denaturovaného proteinu do kyselého prostředí kyseliny octové a následně do bazické refoldingové směsi o složení: 0,5 M Tris-HCl (pH 8), 1 mM GSH, 0,5 mM GSSG, 15% glycerol (kap. 3.2.7.2). Tyto podmínky vedly u konstruktu LdCD C-tag ke správně sbalenému LdCD, jak ukázalo testování aktivity

refoldovaného materiálu v aktivitním testu (Obr 4.8, označeno jako kontrola), zatímco u konstruktu LdCD N-tag nebyla pozorována žádná aktivita. Ve druhé fázi byly tyto základní podmínky u obou konstruktů optimalizovány v několika parametrech: a) přidavek aditiv 10% glycerol, 30% glycerol, 2,5 mM GSH s 1 mM GSSG, 0,5 M arginin, refoldingový směs obsahující pouze komponentu pufru Tris-HCl (pH 8,0) – na obrázku označená jako „Tris-HCl“, b) pH refoldingového pufru (pH 7,0, pH 8,0, pH 9,0); c) koncentrace proteinu (1/2x – 1,6 µg/mL, 1x – 3,2 µg/ml, 2x 6,4 µg/ml); d) teplota inkubace (4 °C, 26 °C – laboratorní teplota, 37 °C). Úspěšnost refoldingu byla stanovena pomocí aktivitního testu s peptidovým substrátem (kap. 3.2.8). Do 100 µl reakce bylo přidáno 50 µl aktivovaného enzymu (kap. 3.2.7.4).



**Obrázek 4.8: Optimalizace refoldingu LdCD C-tag podle protokolu B.** Při optimalizaci tohoto protokolu byly testovány následující modifikace základních podmínek refoldingu: a) přidavek aditiv (zelená); b) pH refoldingového pufru (modrá); c) koncentrace proteinu v refoldingovém směsi (šedivá); d) teplota refoldingu (žlutá). Červeně je znázorněn kontrolní vzorek, který odpovídá základním podmínkám refoldingu. Refoldingová směs obsahující pouze komponentu pufru Tris-HCl (pH 8,0) je na obrázku označen jako „Tris-HCl“. U vzorků s různou koncentrací proteinu v refoldingovém směsi jsou uvedeny hodnoty 1/2x pro koncentraci 1,6 µg/ml, 1x pro 3,2 µg/ml a 2x pro 6,4 µg/ml. Hodnoty aktivity vyjádřené v RFU/s byly normlizovány aktivitu kontrolního vzorku (100%).

Ve vzorku, který měl pH 7 refoldingového pufru, nebyla nalezena aktivita. Největší aktivita LdCD C-tag (refolding protokol B) byla naměřena s enzymem, který byl inkubován

v 37 °C, nejednalo se ale o významný nárůst aktivity oproti kontrolnímu vzorku (pouze o cca 10%).

Refolding LdCD N-tag podle protokolu B byl úspěšný pouze v případě přidání 0,5 M argininu do refoldingového směsi. Naměřené aktivity byly zhruba třikrát nižší než pro konstrukt LdCD C-tag refoldovaný za stejných podmínek. U ostatních vzorků včetně kontrolního nebyla pozorována žádná aktivita (data nejsou graficky prezentována).

#### **4.1.4.3 Bazický refolding**

Dále byly navrženy podmínky pro refolding založený na skokovém ředění denaturovaného proteinu do bazického pH, které vycházely z postupu modifikovaného podle reference (Sijwali et al., 2001). Základní refolding byl proveden při pH 8,0 v přítomnosti oxidačně-redukčním prostředí systému glutathionu (kap. 3.2.7.3). V případě rekombinant LdCD C-tag i LdCD N-tag nedošlo ke správnému sbalení proteinu, který nevykazoval žádnou proteolytickou aktivitu.

### **4.2 Rekombinantní exprese LdCD v systému *Pichia pastoris***

Kvasinky *Pichia pastoris* byly zvoleny jako expresní systém pro LdCD, neboť jako eukaryotní organismus zajišťují správný proces zrání rekombinantního proteinu včetně sbalování a posttranslační modifikace. Další výhodou tohoto druhu kvasinky je nízký stupeň glykosylace rekombinantního proteinu oproti např. expresnímu systému *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **4.2.1 Klonování LdCD do plasmidu pGAPZ $\alpha$ C**

Při přípravě expresního vektoru pGAPZ $\alpha$  C bylo postupováno podle kapitoly 3.2.2. Požadovaný úsek DNA pro LdCD byl amplifikován pomocí metody PCR s využitím navržených primerů (kap. 3.2.1.1.1). Takto připravená DNA byla štěpena pomocí restričních enzymů (*Xho I* a *Not I*) a začleněna do plasmidu pGAPZ $\alpha$  C. Vzniklým vektorem byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* Top10 a byla provedena minipreparace plasmidové DNA. Koncentrace izolované DNA byla 214 ng/ul a poměrem A<sub>280</sub>/A<sub>260</sub> byl 1,94, což svědčí o dobré čistotě tohoto preparátu. Kontrola začlenění inzertu LdCD do plasmidu pGAPZ $\alpha$  C byla provedena sekvenováním (Dr. Hrdou, PřF UK). Výsledky sekvenování vyhodnocené pomocí programu DNASTar prokázaly správnost sekvence i začlenění v plasmidu (kap. 3.2.1.1.9).



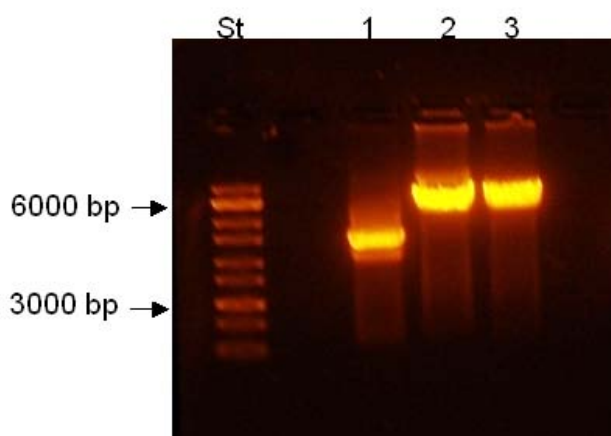
## 4.2.2 Exprese v *P. pastoris*

### Transformace buněk *P. pastoris* vektorem pPICZ $\alpha$ A:

Vektor pGAPZ $\alpha$  C byl izolován pomocí midipreparace a linearizován pomocí restričních endonukleas *Avr II* a *BspH I* (Obr. 4.9). Kvasinky *P. pastoris* (kmen X-33) byly připraveny na transformaci postupem dle kap. 3.2.2.2.2. Vektor pGAPZ $\alpha$  C byl vnesen do buněk pomocí elektroporace (2000 V, 5 ms) (kap. 3.2.2.3) a buňky byly rozetřeny na misky s antibiotikem zeocin.

### Exprese LdCD:

50 ml YPD média se zeocinem bylo zaočkováno jednou kolonií buněk a inkubováno 4 dny (30 °C, 200 rpm). Pro stanovení optimální doby kultivace byl v průběhu exprese každý den odebrán vzorek média (1 ml), ve kterém se měřila aktivita LdCD pomocí štěpení peptidového substrátu na fluorescenční spektrometru GENios (kap. 3.2.8) (Obr. 4.10, str. 73). Do aktivitního testu (100  $\mu$ l reakční směsi) byl použit alikvot 5  $\mu$ l média.



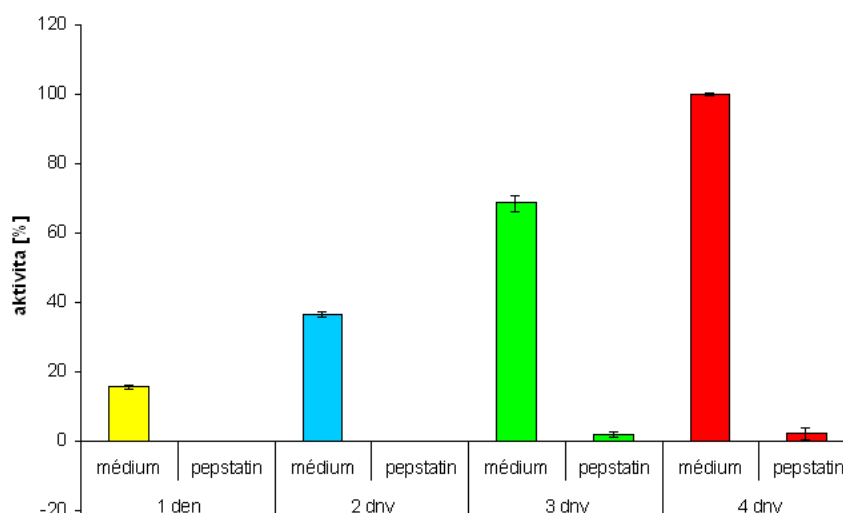
**Obrázek 4.9:** *Linearizace vektoru pGAPZ $\alpha$  C restričními endonukleasami Avr II a BspH I.*

*St ... molekulový standard (100 bp DNA Standard, New England Biolabs)*

*1 ... neštěpený vektor*

*2 ... vektor štěpený Avr II*

*3 ... vektor štěpený BspH I.*



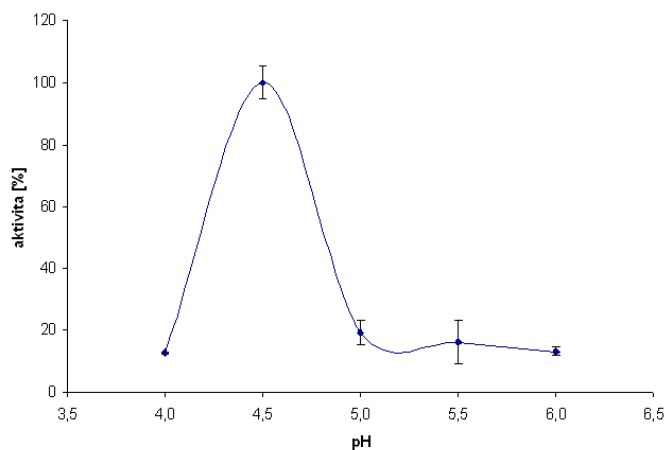
**Obrázek 4.10:** Kinetika exprese LdCD v *P. pastoris*. Proteolytická aktivita LdCD byla měřena s peptidovým substrátem a alikvotem (5  $\mu$ l) kultivačního média. Vzorky média byly odebrány v intervalu 1 až 4 dny kultivace. Kontrolní aktivní test byl proveden pro vzorek média inhibovaného pepstatinem. Aktivity byly měřeny jako relativní fluorescenční jednotky za sekundu a následně normalizovány na aktivitu naměřenou u nejvíce aktivního vzorku (100%).

Výsledky ukazují nárůst aktivity LdCD v médiu, které svědčí o postupné akumulaci sekretovaného rekombinantního proteinu v médiu během kultivace. Jako kontrola, že peptidový substrát není štěpen jinou peptidasou, sloužil vzorek média inkubovaným *in vitro* s pepstatinem, inhibitorem aspartátových proteas. Po přidavku pepstatinu do reakce došlo k úplné inhibici aktivity, což naznačuje, že aktivita měřená v médiu patří LdCD. Aby bylo vyloučena možnost, že jde o případnou kontaminující aktivitu pocházející z endogenní aspartátové peptidasy produkované buňkami *P. pastoris*, byla také provedena kontrolní kultivace. Jako kontrola byly použity buňky *P. pastoris* produkující lidský kathepsin D se zavedenou mutací v aktivním místě (tuto kulturu poskytla Mgr. I. Žebrakovská, ÚOCHB AV ČR). Takto mutovaný hCD ztrácí schopnost štěpit peptidový substrát. Aktivita v médiu kultury produkující hCD dosahovala méně než 5% hodnoty aktivity naměřené v médiu obsahujícím LdCD. Z toho experimentu vyplývá že identifikovaná aktivita v médiu konstruovaného expresního systému *P. pastoris* skutečně odpovídá LdCD.

### 4.3 Mechanismus a podmínky aktivace zymogenu LdCD

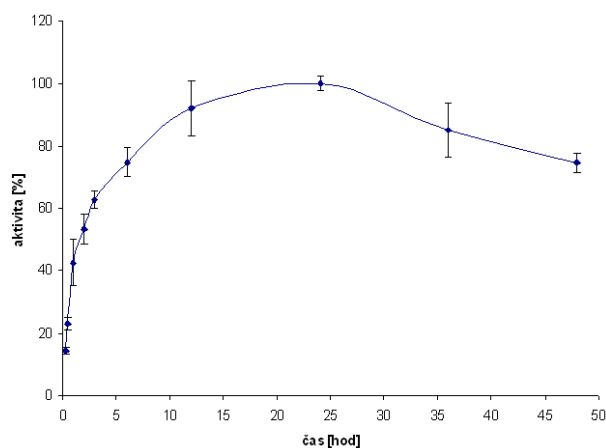
Se zymogenem LdCD C-tag (označovaném dále jako proLdCD, proenzym LdCD), který byl připraven pomocí refoldingu protokol B, byla studována aktivace na zralý enzym LdCD. Podstatou aktivace u aspartátových peptidas je proteolytické odstranění aktivačního peptidu (propeptidu), který blokuje aktivní místo enzymu. Tento proces může probíhat autokatalyticky v kyselém pH nebo účinkem jiné peptidasy.

ProLdCD byl inkubován v kyselém pH při 37 °C a po této autoktivaci byla měřena aktivita vzniklého enzymu v pH 5,0 (pH optimum LdCD) s peptidovým substrátem na flourescenční čtečce GENios (kap. 3.2.8). Bylo určeno pH optimum autoaktive testováním v rozmezí pH 4-6. (kap. 3.2.7.4.1) (Obr. 4.11).



**Obrázek 4.11: Určení pH optima autokatalytické aktivity proLdCD.** Aktivace probíhala po dobu 3 hod při 37 °C v Na-citrátovém pufru o příslušném pH a aktivita byla následně měřena s peptidovým substrátem v pH 5. Hodnoty aktivity vyjádřené v RFU/s byly normlizovány na největší aktivitu (100%).

Dále byla studována kinetika autoaktive v časech 15 min až 48 hod při pH 4,5 (Obr. 4.12), tj, pH odpovídající maximální rychlosti autoaktive zjištěné ve výše popsaném experimentu.



**Obrázek 4.12: Kinetika autokatalytické aktivity proLdCD v pH 4,5.** Aktivace proLdCD probíhala v 37 °C v Na-citrátový pufru pH 4,5 po dobu 15 min až 48 hod a výsledná aktivita byla měřena pomocí peptidového substrátu v pH 5. Hodnoty aktivity vyjádřené v RFU/s byly normlizovány na největší aktivitu (100%).

Provedená analýza jednoznačně prokázala, že zymogen LdCD je schopen autokatalytické aktive. Tento proces probíhá nejlépe při pH 4,5 a největší aktivity bylo dosaženo po cca 20 hod autokatalytické aktive, po které následuje pomalá autodegradace.

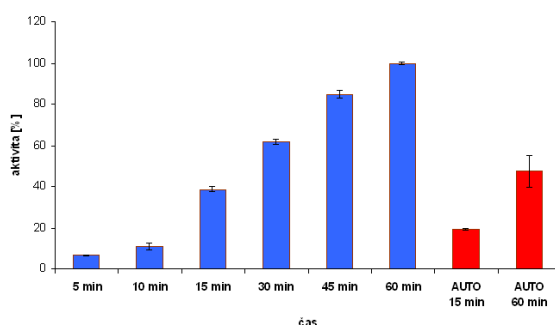
Dále byl studován postup aktivace proLdCD pomocí určení N-koncové sekvence aktivovaných forem. Za tímto účelem byl proLdCD (32 µg proteinu) aktivován při pH 4,5 v 37 °C po dobu 20 hod. Po ukončení reakce byl vzorek precipitován acetonovým srážením, dále pak rozdělen pomocí SDS-PAGE (kap. 3.2.3.2), protein přenesen na PVDF membránu a obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 (kap. 3.2.3.3). N-koncovou sekvenací produktu autoaktivace bylo zjištěno, že vzniklý protein je o 5 aminokyselin delší než zralý enzym izolovaný z extraktů střev mandelinky bramborové (Mgr. M. Štajfová, ÚOCHB AV ČR) (Obr. 4.13). Tento aktivní intermediát byl pojmenován jako pseudoLdCD, protože v literatuře jsou peptidasy s nekompletně odstraněným propeptidem často označeny jako „pseudoforma“ např. u lidského pseudokathepsinu D.

V aminokyselinové sekvenci proLdCD bylo na rozhraní mezi propeptidem a zralým enzymem nalezeno místo Asn54-Ser55, které by hypoteticky mohlo být štěpeno legumainem (cysteinovou peptidasou s asparagin endopeptidasou aktivitou) (Obr. 4.13). Proto bylo dále testováno, zda působením legumainu bude vznikat zralý enzym. ProLdCD (32 µg) byl inkubován s legumainem (0,7 µg) v pH 5,0 po dobu 2 hod při 37 °C. Tento vzorek byl precipitován acetonovým srážením, rozdělen pomocí SDS-PAGE (kap. 3.2.3.2), přenesen na PVDF membránu (kap. 3.2.3.3) a následně byla u produktu štěpení určena jeho N-koncová sekvence (kap. 3.2.4). Bylo zjištěno, že aktivitou legumainu je propeptid proLdCD kompletně odštěpen a vzniká tak zralý LdCD, který byl izolován a popsán ve střevních extraktech mandelinky bramborové (Mgr. M. Štajfová, ÚOCHB AV ČR). Dále byla v tomto vzorku nalezena i sekvence pseudoLdCD vznikající autokatalytickou aktivací.



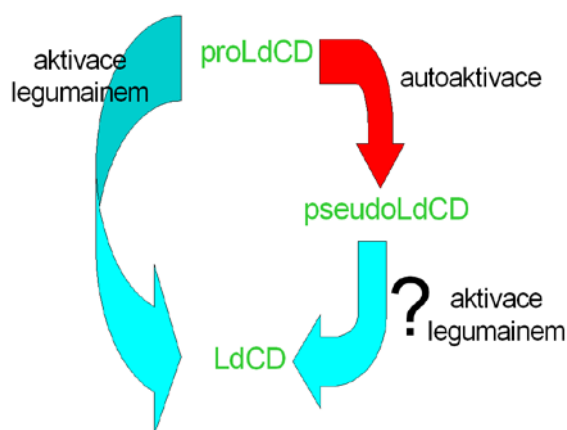
**Obrázek 4.13: Sekvence LdCD.** Šipkou jsou vyznačena místa autokatalytické aktivace, N-konec vznikajícího pseudoLdCD (podtrženo), asistované aktivace legumainem, N-konec vznikajícího zralého LdCD (žlutá) a kratší formy enzymu vzniklé alternativní chybnou translací (růžová). Světle modře je vyznačena sekvence aktivačního peptidu (propeptidu) vymezená sekvenováním izolovaného přírodního LdCD. Zbytky cysteinu jsou označeny modře.

V dalším kroku byla studována kinetika asistované aktivace proLdCD pomocí legumainu v čase 5-60 min v 37 °C. Aktivační směs obsahovala 3,2 µg proLdCD, 0,7 µg legumainu a inkubace probíhala v pH 5,0 (kap. 3.2.7.4.2). Aktivita produktů aktivace byla měřena s flourogenním peptidovým substrátem při pH 5,0 na fluorescenční čtečce Genius (kap. 3.2.8). Výsledky byly porovnány s autoaktivací provedenou v nepřítomnosti legumainu za stejných podmínek (Obr. 4.14).



**Obrázek 4.14:** Kinetika aktivace proLdCD legumainem a pozornání s autokatalytickou aktivací. Oba procesy probíhaly při pH 5,0. Modře jsou znázorněna naměřená data aktivit s LdCD aktivovaným legumainem; červeně autokatalyticky aktivovaný LdCD. Data jsou normalizována na nejvyšší aktivitu.

Sekvenační analýza N-konců dokázala, že aktivace legumainem probíhá paralelně s autoaktivací. Za předpokladu, že obě formy enzymu, pseudoLdCD (vzniklá autoaktivací) a LdCD (vzniklý působením legumainu) mají obdobnou enzymovou aktivitu lze učinit závěr, že legumain je schopen interagovat s proLdCD a štěpit celý propeptid. Z takto zjištěných dat bylo navrženo schéma aktivace proLdCD na zralý enzym (Obr. 4.15), které je komentováno v kapitole diskuze.



**Obrázek 4.15:** Schéma aktivace LdCD. Červenou šipkou je znázorněna dráha autokatalytické aktivace zymogenu LdCD (proLdCD) na aktivní intermediát pseudoLdCD; modrou šipkou je znázorněna aktivace LdCD pomocí legumainu; “?” vyznačuje dráhu, která nebyla experimentálně prokázána.

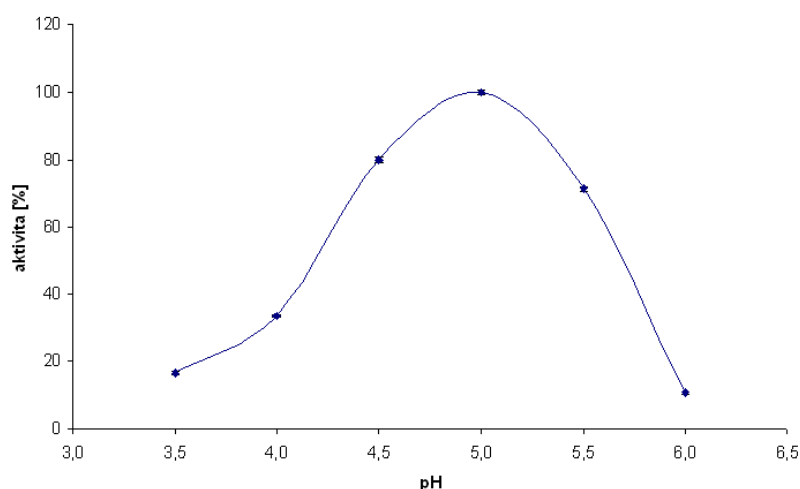
Pro doplnění schématu by bylo třeba otestovat konverzi pseudoLdCD, který by vznikl autoaktivací v kyselém pH (ověřeno N-koncovou sekvencí), na zralý LdCD pomocí legumainu.

#### 4.4 Biochemické vlastnosti LdCD

Enzymologická analýza aktivitních vlastností byla provedena s preparátem LdCD C-tag, který byl připraven v aktivní formě podle protokolu A (kap. 3.2.7.1).

##### 4.4.1 Určení pH optima enzymové aktivity

pH optimum aktivity LdCD bylo stanoveno s využitím peptidového substrátu (Obr. 4.16). Reakční směs pro toto měření obsahovala 12,5  $\mu$ l enzymového preparátu LdCD (kap. 3.2.7.1), 100  $\mu$ M peptidový fluorogenní substrát Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu a 200 mM Na-citrátový pufr (pH 3,5-6,0) v celkovém objemu 100  $\mu$ l. Rychlost štěpení substrátu byla kontinuálně monitorována pomocí fluorescenční čtečky GENios (kap. 3.2.8).



**Obrázek 4.16:** Stanovení pH optima enzymové aktivity LdCD. Aktivita byla měřena s peptidovým fluorogenním substrátem. Hodnoty aktivity vyjádřené v RFU/s byly normalizovány na největší aktivitu (100%).

Proteolytická aktivita LdCD byla detekována v rozsahu pH 3,5-6,0, maximální hodnoty dosahovala při pH 5,0; tato hodnota pH optima byla použita pro všechny další měření proteolytické aktivity LdCD.

##### 4.4.2 Kinetické parametry LdCD

Kinetické konstanty  $K_M$  a  $V_{max}$  pro LdCD byly měřeny s peptidovým fluorogenním substrátem o sekvenci Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Nph-Ala-Leu. Reakční směs pro toto měření obsahovala 1,25  $\mu$ l enzymového preparátu LdCD (kap. 3.2.7.1), substrát ve výsledné koncentraci 10  $\mu$ M-1200  $\mu$ M koncentraci a 200 mM Na-citrátový pufr (pH 5,0) v celkovém

objemu 100  $\mu\text{l}$ . Aktivita byla měřena pomocí fluorescenční čtečky GENios (kap. 3.2.8) a naměřené výsledky počátečních rychlostí byly vyhodnoceny v programu GraFit. Hodnota  $K_M$  pro dvojici LdCD a fluorogenní peptidový substrát byla stanovena na  $93,3 \pm 3,8 \mu\text{M}$  a hodnota  $V_{\max}$   $7,09 \pm 0,09 \text{ s}^{-1}$ .

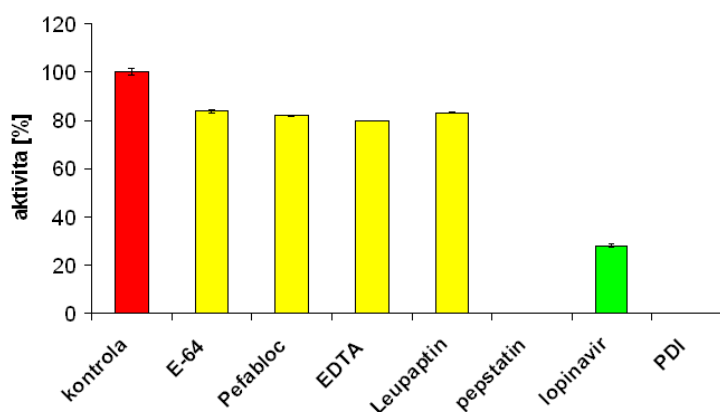
#### 4.4.3 Inhibiční specifita LdCD

Byla určena inhibiční specifita LdCD s vybranými skupinovými inhibitory peptidas a také se třemi inhibitory aspartátových peptidas. V kinetickém testu s peptidovým fluorogenním substrátem byla stanovována zbytková aktivita LdCD v přítomnosti inhibitoru a porovnána s neinhibovaným enzymem. Aktivita LdCD se stanovila v přítomnosti těchto inhibitorů:

inhibitor	typ inhibované peptidasy	Koncentrace v reakci ( $\mu\text{M}$ )
EDTA	metalopeptidasy	1000
Pefabloc	ser. peptidasy	1000
E-64	cys. peptidasy	10
leupeptin	ser. a cys. peptidasy	10
pepstatin	asp. peptidasy	10
Lopinavir	retrovirální asp. peptidasa z viru HIV	10
PDI	asp. peptidasy typu kathepsinu D	1,75

*Tabulka 4.2: Selektivní peptidasové inhibitory, se kterými byla analyzována inhibiční specifita LdCD. PDI („potato cathepsin D inhibitor“) je proteinový inhibitor LdCD izolovaný z brambor. Uvedena je výsledná koncentrace inhibitoru v reakční směsi.*

Enzym byl s příslušným inhibitorem inkubován 15 min při  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  a reakce byla zahájena přidávkem peptidového substrátu. Aktivita inhibovaných reakcí byla stanovena pomocí aktivitního testu na fluorescenční čtečce GENios (kap. 3.2.8) (Obr. 4.17, str. 80). Naměřené počáteční rychlosti byly normalizovány na aktivitu naměřenou u neinhibovaného vzorku a graficky vyhodnoceny.



**Obrázek 4.17: Měření aktivity LdCD v přítomnosti selektivních peptidasových inhibitorů**  
 Červeně je znázorněna aktivita neinhibovaného kontrolního vzorku, žlutě zbytková aktivita vzorků inhibovaných skupinovými peptidasovými inhibitory a zeleně zbytková aktivita naměřená s inhibitory aspartátových peptidas. PDI je proteinový inhibitor LdCD izolovaný z brambor („potato cathepsin D inhibitor“). Použité koncentrace inhibitorů jsou uvedeny v Tab. 4.2, str. 79. Hodnoty zbytkové aktivity vyjádřené v RFU/s byly normalizovány na aktivitu kontrolního vzorku (100%).

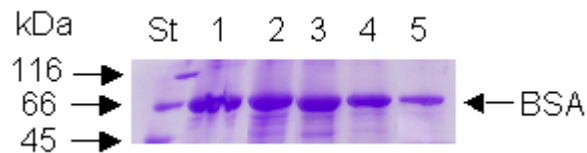
Z těchto výsledků je patrné, že LdCD je významně inhibován pouze inhibitory aspartátových peptidas (pepstatin, lopinavir, PDI). Pepstatin a PDI byly schopné v tomto uspořádání kompletně inhibovat aktivitu LdCD; u lopinaviru, inhibitoru vyvinutého proti retrovirální aspartátové peptidase z viru HIV, není při koncentraci 10  $\mu\text{M}$  dosaženo plné inhibice.

S PDI byla dále měřena inhibiční konstanta  $\text{IC}_{50}$ . Tato hodnota byla stanovena pomocí měření zbytkové aktivity LdCD v přítomnosti 1,75 nM až 1,75  $\mu\text{M}$  koncentrace PDI. Inhibiční reakce byla provedena v analogickém uspořádání jako při měření kinetických parametrů v předchozí kapitole. Hodnota  $\text{IC}_{50}$  inhibitoru PDI pro LdCD a byla stanovena na  $101,3 \pm 1,06$  nM.

#### 4.4.4 Štěpení proteinových substrátů

V dalším kroku byla testována degradace dvou modelových proteinových substrátů, hovězího sérového albuminu (BSA) (Obr. 4.18, str. 80) a ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasy/oxygenasy (RuBisCO) (Obr. 4.19, str. 80), pomocí LdCD. Reakční směs pro tyto fragmentační experimenty obsahovala 12,5  $\mu\text{l}$  enzymového preparátu LdCD (kap. 3.2.7.1), proteinový substrát (30  $\mu\text{g}$  BSA resp. 90  $\mu\text{g}$  RuBisCO) a 200 mM Na-citrátový pufr (pH 5,0) a byla inkubována 1-18 hod při 37  $^{\circ}\text{C}$ . Štěpení bylo ukončeno acetonovou precipitací (kap. 3.2.3.4) a následně byl proteinový materiál rozdělen pomocí SDS-PAGE a proteiny byly obarveny roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250 (kap. 3.2.3.2).



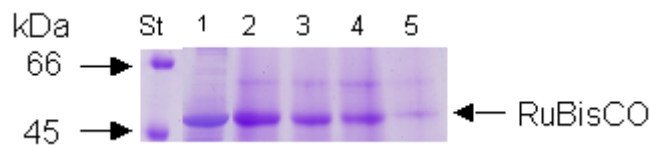


**Obrázek 4.18: SDS-PAGE analýza průběhu štěpení BSA pomocí LdCD.** Vzorky obsahující 30  $\mu\text{g}$  BSA byly štěpeny při pH 5,0 v 37 °C. SDS-PAGE gel byl barven pomocí roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250.

St ... standardy molekulových vah Unstained Protein Molecular Weight Marker

1 ... neštěpený BSA

2-5... vzorky BSA štěpené pomocí LdCD po dobu 1, 3, 6, 18 hod při pH 5,0



**Obrázek 4.19: SDS-PAGE analýza průběhu štěpení RuBisCO pomocí LdCD.** Vzorky obsahující 90  $\mu\text{g}$  RuBisCO byly štěpeny při pH 5,0 v 37 °C. SDS-PAGE gel byl barven pomocí roztoku Coomassie Brilliant Blue R-250.

St ... standardy molekulových vah Unstained Protein Molecular Weight Marker

1 ... neštěpené RuBisCO

2-5... vzorky RuBisCO štěpené pomocí LdCD po dobu 1, 3, 6, 18 hod při pH 5,0

Z této analýzy (Obr. 4.18 a 4.19) vyplývá, že LdCD je schopný zahájit fragmentaci v endopeptidasovém módu a štěpit proteinové substráty včetně majoritního proteinu listových pletiv rostlin, RuBisCO.

## 5 DISKUZE

Diplomová práce se zabývá studiem kathepsinu D (LdCD) z mandelinky bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Tento enzym patří do třídy aspartátových peptidas a jeho aminokyselinová sekvence byla analyzována na ÚOCHB AV ČR. Úkolem bylo připravit dva expresní systémy a to v *Escherichia coli* a *Pichia pastoris* pro produkci rekombinantního LdCD. Další práce byla zaměřena na refolding rekombinantního proteinu, analýzu procesu aktivace zymogenu LdCD a na biochemický popis interakce LdCD se substráty a inhibitory.

Jednotné řešení pro problematiku refoldingu aspartátových peptidas rodiny pepsinu, do které patří i studovaný LdCD, neexistuje (na rozdíl od např. cysteinových peptidas rodiny papainu, kam patří řada kathepsinů). U aspartátových peptidas byla popsána velká variabilita podmínek pro refolding, např. pro pepsinogen a aspartátovou peptidasu z hlístic (Pearson et al., 2009) byl úspěšně použit postup ředění denaturovaného proteinu do alkalického prostředí refoldingové směsi. Jiný přístup vedoucí ke správně sbalenému enzymu je založen na jednoduchém ředění denaturovaného proteinu do kyselého pH. Tento způsob byl použit při přípravě rekombinantní HIV peptidasy (Weber et al., 2002), která je ale v porovnání s eukaryotickými aspartátovými peptidasami strukturně jednodušší. Tento enzym neobsahuje žádné disulfidické můstky, proto je pro refolding vhodné i kyselé pH, které stabilizuje cysteiny v redukované formě. Nicméně u aspartátových peptidas s disulfidickými můstky byl analogický postup nalezen také jako funkční, ale jde obvykle o dlouhodobý inkubační proces trvající několik dnů; příkladem je refolding lidského kathepsinu D (Conner a Udey, 1990).

Pro refolding rekombinantního LdCD byly v této diplomové práci navrženy dva postupy označované jako protokol A a B (kap. 3.2.7). Oba jsou založeny na skokovém ředění denaturovaného LdCD do kyselého prostředí, po kterém následuje inkubace kyselém nebo bazickém pH. U obou systémů byl proces refoldingu dlouhodobý (3 dny) a v obou případech byla tvorba disulfidů podpořena systémem založeným na oxidaovaném a redukovaném glutathionu. Bylo také testováno jiné oxidační prostředí a to přítomnost peroxidu vodíku nebo kyslíku, které ale nevedly k výraznému zlepšení podmínek. Při refoldingu v bazické směsi vzniká neaktivní forma zymogenu LdCD (proLdCD), zatímco v kyselém prostředí refoldigu vzniká aktivní forma enzymu.

Dále byl v práci studován proces aktivace proLdCD tj. konverze na aktivní formu enzymu odštěpením aktivačního peptidu (propeptidu), který může probíhat u aspartátových peptidas autokatalyticky nebo působením jiné peptidasy. Děje probíhající při zrání enzymu za vzniku aktivní formy LdCD byly pozorovány pomocí měření aktivit vzniklých enzymů

s fluorogenním peptidovým substrátem a vzniklé produkty potvrzeny N-koncovým sekvenováním.

Autokatalytická konverze probíhala u LdCD optimálně v kyselém pH 4,5 za vzniku formy označené jako pseudoLdCD, na jehož N-konci byl pomocí sekvenování nalezen zbytek propeptidu o velikosti 5 aminokyselin. Dále bylo zjištěno, že k odštěpení kompletního propeptidu a vzniku zralého LdCD identického s přírodní formou LdCD dochází působením legumainu (cysteinové peptidasy s asparagin endopeptidasovou aktivitou). Zbývá ověřit, zda-li se legumain účastní aktivace proLdCD také *in vivo* nebo je jeho působení nahrazeno jinou peptidasou, která je schopna fragmentovat vazbu s Asn v P<sub>1</sub> pozici jako je např. kathepsinu B, jehož aktivita byla ve střevech mandelinky naměřena (Illner, 2008).

Na základě analýzy procesu aktivace bylo navrženo schéma aktivačních drah uvedené v obrázku 4.14 (str. 77). Provedené experimenty prokázaly, že legumain je schopen interagovat s proLdCD a odštěpovat celý propeptid. Nelze však s jistotou tvrdit, že zralý enzym může vznikat i z pseudoLdCD působením legumainu. Pro doplnění této části schématu (Obr. 4.15 str. 77) bude nutné připravit čistý pseudoLdCD a tento intermediát vystavit působení legumainu. Při popisu aktivačního schématu se vycházelo z předpokladu, že pseudoLdCD a LdCD mají stejnou enzymovou aktivitu s použitým peptidovým substrátem. Tento předpoklad je podložen studií, při které bylo zjištěno, že pseudoforma kathepsinu D, která má neodštěpenou část propeptidu (dokonce výrazně delší než bylo určeno u pseudoLdCD), má stejnou aktivitu k peptidovému substrátu jako zralý kathepsin D (Masa, 2010).

Výsledky této diplomové práce ukazují, že LdCD je schopný štěpit proteinové substráty a zahájit jejich fragmentaci v endopeptidasovém módu, což bylo testováno pomocí modelového proteinu BSA a dále majoritního proteinu listových pletiv rostlin ribulosa-1,5-bisfosfát karboxylasa/oxygenasa (RuBisCO). Iniciace štěpení proteinových substrátů byla pozorována i u kathepsinů D z jiných zdrojů, např. z krev sajícího parazita klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*), kde kathepsin D zahajuje štěpení hemoglobinu (Horn et al., 2009). Dále bylo analyzováno pH optimum aktivity LdCD, které je v souladu s mírně kyselým pH v trávicím traktu mandelinky bramborové (Illner, 2008).

Významným výsledkem získaným při řešení diplomové práce bylo určení inhibiční konstanty IC<sub>50</sub> pro interakci LdCD s proteinovým inhibitorem PDI („potato cathepsin D inhibitor). Tento inhibitor byl izolován z pletiv brambor a původně popsán jako inhibitor savčího kathepsinu D (Mares et al., 1989). Nyní byl podán první důkaz na úrovni čistých proteinů, že PDI interaguje s LdCD jako peptidasou typu kathepsinu D z ekologicky

relevantního zdroje. PDI je tak s vysokou pravděpodobností obranným proteinem tkání brambor, který je specificky cílen proti peptidase LdCD a tak proti trávicímu traktu mandelinky bramborové jako herbivorního škůdce této rostliny. Dalším důkazem, že PDI je cíleným inhibítoem při obraně rostliny je fakt, že exprese tohoto proteinu je v listech brambor indukována při mechanickým poraněním listů např. požerem herbivora (Ishikawa et al., 1994).

## 6 ZÁVĚR

Trávicí trakt larvy mandelinky bramborové obsahuje aspartátovou peptidasu typu kathepsin D (LdCD). Tento enzym byl poprvé připraven jako rekombinantní protein a biochemicky charakterizován.

### Rekombinantní exprese LdCD v *Escherichia coli*

- Sekvence kódující LdCD byla klonována do plasmidu pET100/D-TOPO<sup>®</sup>, který byl použit pro expresi v systému *E. coli*. Produkovaný protein byl izolován z inkluzních tělísek pomocí afinitní chromatografie (na základě interakce s histidinovou kotvou na fúzním rekombinantním proteinu) za denaturačních podmínek. U purifikovaného LdCD byly testovány podmínky pro refolding a výsledně optimalizován protokol založený na metodě ředění v kyselém pH v přítomnosti oxidačně-redukčním systému glutathionu.

### Rekombinantní exprese LdCD v *Pichia pastoris*

- Byl připraven alternativní systém pro expresi rekombinantního LdCD v kvasinkách *Pichia pastoris*. Sekvence kódující LdCD byla klonována do expresního plasmidu pGAPZ $\alpha$  A. Produkce LdCD do kultivačního média byla prokázána měřením aktivity LdCD v kultivačním médiu pomocí fluorogenního substrátu.

### Aktivace zymogenu LdCD

- Rekombinantní LdCD z *E. coli* systému byl produkován ve formě neaktivního prekurzoru (prokathepsin D, proLdCD) obsahující tzv. aktivační peptid (propeptid). Bylo zjištěno, že proLdCD je schopen autokatalytické aktivace v kyselém pH; takto vzniklá aktivní forma nazvaná pseudokathepsin D (pseudoLdCD) má částečně odstraněný propeptid. Bylo zjištěno, že k úplnému odštěpení propeptidu je třeba působení legumainu (cysteinové asparagin endopeptidasy). Proces aktivace byl charakterizován pomocí N-koncového sekvenování a měření pH optima.

### Biochemická charakterizace LdCD:

- S fluorogenním peptidovým substrátem bylo určeno kinetické parametry enzymu a pH optimum (pH 4,5-5,5). Bylo ověřeno, že při tomto pH jsou štěpeny proteinové substráty BSA a ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa. Dále byla analyzována inhibiční specifita LdCD se sadou peptidasových inhibitorů. LdCD byl významně inhibován pomocí PDI („potato cathepsin D inhibitor“), proteinového inhibitoru produkovaného v listech brambor. To naznačuje, že PDI je přirozený obranný protein selektivně směřovaný rostlinou proti LdCD ve střevu mandelinky bramborové s cílem blokovat trávicí systém tohoto herbivorního škůdce.

## SEZNAM LITERATURY

- 1 **Abita J. P., Delaage M., Lazdunski M.** The mechanism of activation of trypsinogen. The role of the four N-terminal aspartyl residues. *Eur J Biochem*, 1969; 8: 314-324
- 2 **Alyokhin A.** Colorado Potato Beetle Management on Potatoes: Current Challenges and Future Prospects. *Fruit, Vegetable and Cereal Sci and Biotech*, 2009; 3: 10-19
- 3 **Alyokhin A., Baker M., Monta-Sanchez D., Dively G., Grafius E.** Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides. *Am J Pot Res*, 2008; 85: 395-413
- 4 **Andreeva N. S., Zdanov A. S., Gustchina A. E., Fedorov A. A.** Structure of ethanol-inhibited porcine pepsin at 2-Å resolution and binding of the methyl ester of phenylalanyl-diiodotyrosine to the enzyme. *J Biol Chem*, 1984; 259: 11353-11365
- 5 **Aoyagi T., Kunimoto S., Morishima H., Takeuchi T., Umezawa H.** Effect of pepstatin on acid proteases. *J Antibiot (Tokyo)*, 1971; 24: 687-694
- 6 **Baechle D., Flad T., Cansier A., Steffen H., Schittek B., Tolson J., Herrmann T., Dihazi H., Beck A., Mueller G. A., Mueller M., Stevanovic S., Garbe C., Mueller C. A., Kalbacher H.** Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L. *J Biol Chem*, 2006; 281: 5406-5415
- 7 **Baldwin E. T., Bhat T. N., Gulnik S., Hosur M. V., Sowder R. C., Cachau R. E., Collins J., Silva A. M., Erickson J. W.** Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D: implications for lysosomal targeting and drug design. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; 90: 6796-6800
- 8 **Barrett A. J., McDonald J. K.** Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochem J*, 1986; 237: 935
- 9 **Barrett A. J., Rawlings N. D., Woessner J. F.** Handbook of Proteolytic Enzymes San Diego: Academic Press 1998
- 10 **Baudyš M., Pichová I., Pohl J., Kostka V.** Aspartic Proteinases and their Inhibitors. Berlin: Walter de Gruyter 1985
- 11 **Beckman M., Freeman C., Parish C. R., Small D. H.** Activation of cathepsin D by glycosaminoglycans. *Febs J*, 2009; 276: 7343-7352
- 12 **Benes P., Koelsch G., Dvorak B., Fusek M., Vetvicka V.** Detection of procathepsin D in rat milk. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2002; 133: 113-118
- 13 **Benes P., Vetvicka V., Fusek M.** Cathepsin D-many functions of one aspartic protease. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2008; 68: 12-28
- 14 **Blakesley R. W., Boezi J. A.** A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem*, 1977; 82: 580-582
- 15 **Bode W., Huber R.** Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1477: 241-252
- 16 **Bolter C., Jongsma M. A.** The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J Insect Physiol*, 1997; 43: 885-895
- 17 **Bown D. P., Wilkinson H. S., Gatehouse J. A.** Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochem Mol Biol*, 1997; 27: 625-638
- 18 **Brunelle F., Nguyen-Quoc B., Cloutier C., Michaud D.** Protein hydrolysis by colorado potato beetle, *leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: the catalytic role of cathepsin D. *Arch Insect Biochem Physiol*, 1999; 42: 88-98

- 19 **Canuel M., Korkidakis A., Konnyu K., Morales C. R.** Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008; 373: 292-297
- 20 **Conner G. E.** Isolation of procathepsin D from mature cathepsin D by pepstatin affinity chromatography. Autocatalytic proteolysis of the zymogen form of the enzyme. *Biochem J*, 1989; 263: 601-604
- 21 **Conner G. E.** The role of the cathepsin D propeptide in sorting to the lysosome. *J Biol Chem*, 1992; 267: 21738-21745
- 22 **Conner G. E., Richo G.** Isolation and characterization of a stable activation intermediate of the lysosomal aspartyl protease cathepsin D. *Biochemistry*, 1992; 31: 1142-1147
- 23 **Conner G. E., Udey J. A.** Expression and refolding of recombinant human fibroblast procathepsin D. *DNA Cell Biol*, 1990; 9: 1-9
- 24 **Cooper J. B.** Aspartic proteinases in disease: a structural perspective. *Curr Drug Targets*, 2002; 3: 155-173
- 25 **Cooper J. B., Khan G., Taylor G., Tickle I. J., Blundell T. L.** X-ray analyses of aspartic proteinases. II. Three-dimensional structure of the hexagonal crystal form of porcine pepsin at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*, 1990; 214: 199-222
- 26 **Davie E. W., Neurath H.** Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. *J Biol Chem*, 1955; 212: 515-529
- 27 **Davie E. W., Ratnoff O. D.** Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science*, 1964; 145: 1310-1312
- 28 **Davies D. R.** The structure and function of the aspartic proteinases. *Annu Rev Biophys Chem*, 1990; 19: 189-215
- 29 **de Maagd R. A., Bravo A., Crickmore N.** How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet*, 2001; 17: 193-199
- 30 **Dunn B. M., Hung S.** The two sides of enzyme-substrate specificity: lessons from the aspartic proteinases. *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1477: 231-240
- 31 **Eder J., Hommel U., Cumin F., Martoglio B., Gerhartz B.** Aspartic proteases in drug discovery. *Curr Pharm Des*, 2007; 13: 271-285
- 32 **Erickson A. H., Blobel G.** Carboxyl-terminal proteolytic processing during biosynthesis of the lysosomal enzymes beta-glucuronidase and cathepsin D. *Biochemistry*, 1983; 22: 5201-5205
- 33 **Fassbender K., Masters C., Beyreuther K.** Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets. *Naturwissenschaften*, 2001; 88: 261-267
- 34 **Ferro D. N., Logan J. A., Voss R. H., Elkinton J. S.** Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) temperature-dependent growth and feeding rates. *Environmental Entomology*, 1985; 14: 343-348
- 35 **Ferry N., Edwards M. G., Gatehouse J. A., Gatehouse A. M.** Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Curr Opin Biotechnol*, 2004; 15: 155-161
- 36 **Foltmann B.** Structure and function of propeptides in zymogens for aspartic proteinases. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1988; 369: 311-314
- 37 **Fortenberry S. C., Schorey J. S., Chirgwin J. M.** Role of glycosylation in the expression of human procathepsin D. *J Cell Sci*, 1995; 108: 2001-2006
- 38 **Fusek M., Mares M., Vagner J., Voburka Z., Baudys M.** Inhibition of aspartic proteinases by propeptide peptides of human procathepsin D and chicken pepsinogen. *FEBS Lett*, 1991; 287: 160-162
- 39 **Fusek M., Vetvicka V.** Mitogenic function of human procathepsin D: the role of the propeptide. *Biochem J*, 1994; 303: 775-780

- 40 **Fusek M., Vetvicka V.** Dual role of cathepsin D: ligand and protease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2005; 149: 43-50
- 41 **Gacko M., Minarowska A., Karwowska A., Minarowski L.** Cathepsin D inhibitors. *Folia Histochem Cytobiol*, 2007; 45: 291-313
- 42 **Gatehouse J. A.** Plant resistant towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol*, 2002; 156: 145-169
- 43 **Gieselmann V., Pohlmann R., Hasilik A., Von Figura K.** Biosynthesis and transport of cathepsin D in cultured human fibroblasts. *J Cell Biol*, 1983; 97: 1-5
- 44 **Glondou M., Coopman P., Laurent-Matha V., Garcia M., Rochefort H., Liaudet-Coopman E.** A mutated cathepsin-D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells. *Oncogene*, 2001; 20: 6920-6929
- 45 **Gopalakrishnan M. M., Grosch H. W., Locatelli-Hoops S., Werth N., Smolenova E., Nettersheim M., Sandhoff K., Hasilik A.** Purified recombinant human prosaposin forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation. *Biochem J*, 2004; 383: 507-515
- 46 **Gruden K., Kuipers A. G., Guncar G., Slapar N., Strukelj B., Jongsma M. A.** Molecular basis of Colorado potato beetle adaptation to potato plant defence at the level of digestive cysteine proteinases. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004; 34: 365-375
- 47 **Gruden K., Popovic T., Cimerman N., Krizaj I., Strukelj B.** Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, 'intestains', enable Colorado potato beetle larvae to counteract the potato defence mechanism. *Biol Chem*, 2003; 384: 305-310
- 48 **Guicciardi M. E., Leist M., Gores G. J.** Lysosomes in cell death. *Oncogene*, 2004; 23: 2881-2890
- 49 **Hakala J. K., Oksjoki R., Laine P., Du H., Grabowski G. A., Kovanen P. T., Pentikainen M. O.** Lysosomal enzymes are released from cultured human macrophages, hydrolyze LDL in vitro, and are present extracellularly in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003; 23: 1430-1436
- 50 **Hartsuck J. A., Koelsch G., Remington S. J.** The high-resolution crystal structure of porcine pepsinogen. *Proteins*, 1992; 13: 1-25
- 51 **Hasilik A., Neufeld E. F.** Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem*, 1980; 255: 4937-4945
- 52 **Hofmann T., Allen B., Bendiner M., Blum M., Cunningham A.** Effect of secondary substrate binding in penicillopepsin: contributions of subsites S3 and S2' to kcat. *Biochemistry*, 1988; 27: 1140-1146
- 53 **Hong L., Koelsch G., Lin X., Wu S., Terzyan S., Ghosh A. K., Zhang X. C., Tang J.** Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science*, 2000; 290: 150-153
- 54 **Horn M., Nussbaumerová M., Šanda M., Kovářová Z., Srba J., Franta Z., Sojka D., Bogyo M., Caffrey C. R., Kopáček P., Mares M.** Hemoglobin Digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multi-peptidase Pathway by Functional Proteomics. *Chemistry & Biology*, 2009; 16: 1053-1063
- 55 <http://faculty.uca.edu/johnc/mannose.jpg>, staženo dne: 18.3.2010
- 56 <http://merops.sanger.ac.uk/>, staženo dne: 12.3.2010
- 57 <http://www.edupic.net/beetles.htm>, staženo dne: 23.3.2010
- 58 **Illner J.** Trávicí proteazy mandelinky bramborové. Praha: Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK 2008
- 59 **Ishikawa A., Yoshihara T., Nakamura K.** Jasmonate-inducible expression of a potato cathepsin D inhibitor-GUS gene fusion in tobacco cells. *Plant Mol Biol*, 1994; 26: 403-414



- 60 **Jacks T., Power M. D., Masiarz F. R., Luciw P. A., Barr P. J., Varmus H. E.** Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*, 1988; 331: 280-283
- 61 **James M. N., Sielecki A. R.** Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature*, 1986; 319: 33-38
- 62 **Jongsma M. A., Bakker P. L., Peters J., Bosch D., Stiekema W. J.** Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995; 92: 8041-8045
- 63 **Kageyama T., Ichinose M., Miki K., Athauda S. B., Tanji M., Takahashi K.** Difference of activation processes and structure of activation peptides in human pepsinogens A and progastricsin. *J Biochem*, 1989; 105: 15-22
- 64 **Kay J, Valler MJ, Dunn BM.** Proteinase Inhibitors, Medical and Biological Aspects. Berlin: Springer 1983
- 65 **Kenessey A., Nacharaju P., Ko L. W., Yen S. H.** Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration. *J Neurochem*, 1997; 69: 2026-2038
- 66 **Kessler A., Baldwin I. T.** Plant responses to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annu Rev Plant Biol*, 2002; 53: 299-328
- 67 **Kobayashi T., Honke K., Gasa S., Fujii T., Maguchi S., Miyazaki T., Makita A.** Proteolytic processing sites producing the mature form of human cathepsin D. *Int J Biochem*, 1992; 24: 1487-1491
- 68 **Koelsch G., Mares M., Metcalf P., Fusek M.** Multiple functions of pro-parts of aspartic proteinase zymogens. *FEBS Lett*, 1994; 343: 6-10
- 69 **Koike M., Shibata M., Ohsawa Y., Nakanishi H., Koga T., Kametaka S., Waguri S., Momoi T., Kominami E., Peters C., Figura K., Saftig P., Uchiyama Y.** Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice. *Mol Cell Neurosci*, 2003; 22: 146-161
- 70 **Kornfeld S.** Lysosomal enzyme targeting. *Biochem Soc Trans*, 1990; 18: 367-374
- 71 **Ladror U. S., Snyder S. W., Wang G. T., Holzman T. F., Krafft G. A.** Cleavage at the amino and carboxyl termini of Alzheimer's amyloid-beta by cathepsin D. *J Biol Chem*, 1994; 269: 18422-18428
- 72 **Laemmli U. K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-685
- 73 **Larsen L. B., Petersen T. E.** Identification of five molecular forms of cathepsin D in bovine milk. *Adv Exp Med Biol*, 1995; 362: 279-283
- 74 **Laurent-Matha V., Derocq D., Prebois C., Katunuma N., Liaudet-Coopman E.** Processing of human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation: involvement of cathepsins L and B. *J Biochem*, 2006; 139: 363-371
- 75 **Leto G., Tumminello F. M., Crescimanno M., Flandina C., Gebbia N.** Cathepsin D expression levels in nongynecological solid tumors: clinical and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis*, 2004; 21: 91-106
- 76 **Li M., Phylip L. H., Lees W. E., Winther J. R., Dunn B. M., Wlodawer A., Kay J., Gustchina A.** The aspartic proteinase from *Saccharomyces cerevisiae* folds its own inhibitor into a helix. *Nat Struct Biol*, 2000; 7: 113-117
- 77 **Lin T. Y., Williams H. R.** Inhibition of cathepsin D by synthetic oligopeptides. *J Biol Chem*, 1979; 254: 11875-11883
- 78 **MacFarland R. G.** An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*, 1964; 202: 498-499

- 79 **Majer P., Collins J. R., Gulnik S. V., Erickson J. W.** Structure-based subsite specificity mapping of human cathepsin D using statine-based inhibitors. *Protein Sci*, 1997; 6: 1458-1466
- 80 **Mares M., Meloun B., Pavlik M., Kostka V., Baudys M.** Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett*, 1989; 251: 94-98
- 81 **Mariani E., Seripa D., Ingegni T., Nocentini G., Mangialasche F., Ercolani S., Cherubini A., Metastasio A., Pilotto A., Senin U., Mecocci P.** Interaction of CTSD and A2M polymorphisms in the risk for Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, 2006; 247: 187-191
- 82 **Masa M.** Regulace aktivity a aktivace kathepsinu D. Praha: Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UK, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR 2010
- 83 **Masa M., Maresova L., Vondrasek J., Horn M., Jezek J., Mares M.** Cathepsin D propeptide: mechanism and regulation of its interaction with the catalytic core. *Biochemistry*, 2006; 45: 15474-15482
- 84 **Metcalf P., Fusek M.** Two crystal structures for cathepsin D: the lysosomal targeting signal and active site. *Embo J*, 1993; 12: 1293-1302
- 85 **Minarowska A., Gacko M., Karwowska A., Minarowski L.** Human cathepsin D. *Folia Histochem Cytobiol*, 2008; 46: 23-38
- 86 **Montcourrier P., Silver I., Farnoud R., Bird I., Rochefort H.** Breast cancer cells have a high capacity to acidify extracellular milieu by a dual mechanism. *Clin Exp Metastasis*, 1997; 15: 382-392
- 87 **Ng K. K., Petersen J. F., Cherney M. M., Garen C., Zalatoris J. J., Rao-Naik C., Dunn B. M., Martzen M. R., Peanasky R. J., James M. N.** Structural basis for the inhibition of porcine pepsin by *Ascaris* pepsin inhibitor-3. *Nat Struct Biol*, 2000; 7: 653-657
- 88 **Northrop D. B.** Follow the protons: a low-barrier hydrogen bond unifies the mechanisms of the aspartic proteases. *Acc Chem Res*, 2001; 34: 790-797
- 89 **Ntais C., Polycarpou A., Ioannidis J. P.** Meta-analysis of the association of the cathepsin D Ala224Val gene polymorphism with the risk of Alzheimer's disease: a HuGE gene-disease association review. *Am J Epidemiol*, 2004; 159: 527-536
- 90 **Ohri S. S., Vashishta A., Vetvickova J., Fusek M., Vetvicka V.** Procathepsin D expression correlates with invasive and metastatic phenotype of MDA-MB-231 derived cell lines. *Int J Biol Macromol*, 2007; 41: 204-209
- 91 **Ondetti M. A., Cushman D. W.** Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annu Rev Biochem*, 1982; 51: 283-308
- 92 **Padilha M. H., Pimentel A. C., Ribeiro A. F., Terra W. R.** Sequence and function of lysosomal and digestive cathepsin D-like proteinases of *Musca domestica* midgut. *Insect Biochem Mol Biol*, 2009; 39: 782-791
- 93 **Papáček M., Matěnová V., Matěna J., Soldán T.** Zoologie. Praha: Scientia, spol. s r. o. pedagogické nakladatelství 2000
- 94 **Pearson M. S., Bethony J. M., Pickering D. A., de Oliveira L. M., Jariwala A., Santiago H., Miles A. P., Zhan B., Jiang D., Ranjit N., Mulvenna J., Tribolet L., Plieskatt J., Smith T., Bottazzi M. E., Jones K., Keegan B., Hotez P. J., Loukas A.** An enzymatically inactivated hemoglobinase from *Necator americanus* induces neutralizing antibodies against multiple hookworm species and protects dogs against heterologous hookworm infection. *Faseb J*, 2009; 23: 3007-3019
- 95 **Piana S., Carloni P.** Conformational flexibility of the catalytic Asp dyad in HIV-1 protease: An ab initio study on the free enzyme. *Proteins*, 2000; 39: 26-36

- 96 **Pichova I., Pavlickova L., Dostal J., Dolejsi E., Hruskova-Heidingsfeldova O., Weber J., Ruml T., Soucek M.** Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem*, 2001; 268: 2669-2677
- 97 **Puente X. S., Sanchez L. M., Overall C. M., Lopez-Otin C.** Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*, 2003; 4: 544-558
- 98 **Purrington C. B.** Costs of resistance. *Curr Opin Plant Biol*, 2000; 3: 305-308
- 99 **Rahuel J., Priestle J. P., Grutter M. G.** The crystal structures of recombinant glycosylated human renin alone and in complex with a transition state analog inhibitor. *J Struct Biol*, 1991; 107: 227-236
- 100 **Ramalho-Santos M., Verissimo P., Cortes L., Samyn B., Van Beeumen J., Pires E., Faro C.** Identification and proteolytic processing of procardosin A. *Eur J Biochem*, 1998; 255: 133-138
- 101 **Rawlings N. D., Tolle D. P., Barrett A. J.** MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, 2004; 32: D160-164
- 102 **Richter C., Tanaka T., Koseki T., Yada R. Y.** Contribution of a prosegment lysine residue to the function and structure of porcine pepsinogen A and its active form pepsin A. *Eur J Biochem*, 1999; 261: 746-752
- 103 **Rojo E., Solano R., Sanchez-Serrano J. J.** Interaction between signaling compounds involved in plant defence. *J Plant Growth Regul*, 2003; 22: 82-98
- 104 **Ryan C. A.** The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta*, 2000; 1477: 112-121
- 105 **Ryan C. A., Pearce G.** Systemin: a polypeptide signal for plant defensive genes. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998; 14: 1-17
- 106 **Ryan C. A., Pearce G.** Systemins: a functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; 100: 14577-14580
- 107 **Ryle A. P., Leclerc J., Falla F.** The substrate specificity of pepsin C. *Biochem J*, 1968; 110: 4P
- 108 **Sadhukhan R., Leone J. W., Lull J., Wang Z., Kletzien R. F., Heinrikson R. L., Tomasselli A. G.** An efficient method to express and refold a truncated human procaspase-9: A caspase with activity toward Glu-X bonds. *Protein Expr Purif*, 2006; 46: 299-308
- 109 **Saftig P., Hetman M., Schmahl W., Weber K., Heine L., Mossmann H., Koster A., Hess B., Evers M., von Figura K., et al.** Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *Embo J*, 1995; 14: 3599-3608
- 110 **Saskova K. G., Kozisek M., Rezacova P., Brynda J., Yashina T., Kagan R. M., Konvalinka J.** Molecular characterization of clinical isolates of human immunodeficiency virus resistant to the protease inhibitor darunavir. *J Virol*, 2009; 83: 8810-8818
- 111 **Selkoe D. J.** Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, 2001; 81: 741-766
- 112 **Serpell L. C., Blake C. C., Fraser P. E.** Molecular structure of a fibrillar Alzheimer's A beta fragment. *Biochemistry*, 2000; 39: 13269-13275
- 113 **Schechter I., Berger A.** On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967; 27: 157-162
- 114 **Schwagerl A. L., Mohan P. S., Cataldo A. M., Vonsattel J. P., Kowall N. W., Nixon R. A.** Elevated levels of the endosomal-lysosomal proteinase cathepsin D in cerebrospinal fluid in Alzheimer disease. *J Neurochem*, 1995; 64: 443-446

- 115 **Sielecki A. R., Hayakawa K., Fujinaga M., Murphy M. E., Fraser M., Muir A. K., Carilli C. T., Lewicki J. A., Baxter J. D., James M. N.** Structure of recombinant human renin, a target for cardiovascular-active drugs, at 2.5 Å resolution. *Science*, 1989; 243: 1346-1351
- 116 **Sijwali P. S., Brinen L. S., Rosenthal P. J.** Systematic optimization of expression and refolding of the Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2. *Protein Expr Purif*, 2001; 22: 128-134
- 117 **Spires T. L., Hyman B. T.** Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx*, 2005; 2: 423-437
- 118 **Tang J., James M. N., Hsu I. N., Jenkins J. A., Blundell T. L.** Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases. *Nature*, 1978; 271: 618-621
- 119 **Terra W. R., Ferreira C.** Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1994; 109B: 1-62
- 120 **Turk B.** Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*, 2006; 5: 785-799
- 121 **Vetvicka V., Vagner J., Baudys M., Tang J., Foundling S. I., Fusek M.** Human breast milk contains procathepsin D-detection by specific antibodies. *Biochem Mol Biol Int*, 1993; 30: 921-928
- 122 **Vetvicka V., Vetvickova J., Fusek M.** Anti-human procathepsin D activation peptide antibodies inhibit breast cancer development. *Breast Cancer Res Treat*, 1999; 57: 261-269
- 123 **Voet D., Voet J. G.** Biochemistry. 3rd ed. New Jersey: Wiley 2004
- 124 **Volpicella M., Ceci L. R., Cordewener J., America T., Gallerani R., Bode W., Jongsma M. A., Beekwilder J.** Properties of purified gut trypsin from Helicoverpa zea, adapted to proteinase inhibitors. *Eur J Biochem*, 2003; 270: 10-19
- 125 **von Figura K., Hasilik A.** Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem*, 1986; 55: 167-193
- 126 **Weber D.** Colorado beetle: pest on move. *Pesticide Outlook*, 2003; 14: 256-259
- 127 **Weber H.** Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci*, 2002; 7: 217-224
- 128 **Weber J., Mester J. R., Lepšík M., Prejdová J., Švec M., Šponarová J., Mlčochová P., Skalická K., Strížovský K., Uhlíková T., M. Souček., Machala L., Staňková M., Vondrasek J., Klimkait T., Kraeusslich H. G., Hilgenfeld R., Konvalinka J.** Unusual Binding Mode of an HIV-1 Protease Inhibitor Explains its Potency against Multi-drug-resistant Virus Strains. *J Mol Biol*, 2002; 324: 739-754
- 129 **Wensing A. M., van Maarseveen N. M., Nijhuis M.** Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiviral Res*, 2010; 85: 59-74
- 130 **Wittstock U., Gershenzon J.** Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr Opin Plant Biol*, 2002; 5: 300-307
- 131 **Yamada M., Matsuba T., Azuma T., Suzuki H., Yamamoto K., Hori H.** Expression of human cathepsin E in methylotrophic yeast, Pichia pastoris. *Adv Exp Med Biol*, 1995; 362: 319-324
- 132 **Yasuda Y., Tsukuba T., Okamoto K., Kadowaki T., Yamamoto K.** The role of the cathepsin E propeptide in correct folding, maturation and sorting to the endosome. *J Biochem*, 2005; 138: 621-630
- 133 **Zahradník J., Chvála M., Cuisin M.** La Grande Encyclopedie Des Insectes. Paris: Grund 1989
- 134 **Zaidi N., Maurer A., Nieke S., Kalbacher H.** Cathepsin D: a cellular roadmap. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008; 376: 5-9

- 135 **Zhou W., Scott S. A., Shelton S. B., Crutcher K. A.** Cathepsin D-mediated proteolysis of apolipoprotein E: possible role in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 2006; 143: 689-701
- 136 **Zuhlsdorf M., Imort M., Hasilik A., von Figura K.** Molecular forms of beta-hexosaminidase and cathepsin D in serum and urine of healthy subjects and patients with elevated activity of lysosomal enzymes. *Biochem J*, 1983; 213: 733-740