

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Buněčná a vývojová biologie

Fyziologie buňky



Bc. Lucie Marečková

Sekretované aspartátové proteázy kvasinky *Candida parapsilosis*

The secreted aspartic proteases of *Candida parapsilosis*

Diplomová práce

Školitel: Ing. Jiří Dostál, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Dr. Jiřímu Dostálovi za cenné rady, připomínky, metodické vedení práce a trpělivost. Dále bych poděkovala Dr. Olze Hruškové-Heidingsfeldové za diskuzi a inspiraci při sepisování této práce. Zároveň děkuji Dr. Jiřímu Bryndovi za spolupráci při řešení struktur, Dr. Zuzaně Demianové za pomoc při měření na hmotnostním spektroskopu a Dr. Zdeňkovi Voburkovi za N-koncovou sekvenaci. Velký dík patří i mému příteli za jeho velkou podporu.

Abstrakt

Candida parapsilosis je oportunistický patogen člověka způsobující řadu infekcí. Mezi nejvíce ohroženou skupinu pacientů patří jedinci s oslabenou imunitou. Narůstající četnost infekcí spojená se vznikem rezistentních kmenů se stala hlavním důvodem pro hledání nových metod léčby. Jedním z možných řešení mohou být přístupy zabývající se inhibicí sekretovaných aspartátových proteáz, které jsou považovány za jeden z virulentních faktorů kandid. Genom *C. parapsilosis* obsahuje tři geny kódující sekretované aspartátové proteázy *SAPP1*, *SAPP2* a *SAPP3*. Zatímco izoenzym Sapp1p byl dobře biochemicky i strukturně charakterizován, izoenzymům Sapp2p a Sapp3p byla doposud věnována jen malá pozornost. První část této diplomové práce je zaměřena na rentgenostrukturní analýzu vazby vybraných peptidových inhibitorů do aktivního místa izoenzymu Sapp1p a na vazbu známého inhibitoru aspartátových proteáz Pepstatinu A do aktivního místa izoenzymu Sapp2p.

Druhá část této práce je spjata se zjištěním, že *C. parapsilosis* patří mezi kandidy, jež překládají standartní leucinový kodón CUG majoritně serinem. Ačkoliv se jedná o nekonzervativní záměnu hydrofobní aminokyseliny za hydrofilní, je tato unikátní schopnost některými druhy kandid udržována více jak 170 mil. let. Přestože se již některé studie věnovaly selekčním výhodám a důsledkům alternativního překladu na celkový fenotyp kvasinek, údajů o vlivu na funkci a strukturu konkrétních proteinů nalezneme málo. Cílem druhé části diplomové práce je objasnit vliv alternativního překladu CUG kodónu na strukturu a funkci proteázy Sapp1p, jejíž nukleotidová sekvence obsahuje jeden CUG triplet. Dosazený serin se ve struktuře proteázy nachází ve smyčce poblíž aktivního místa.

Klíčová slova: Alternativní překlad; aspartátové proteázy; *Candidaparapsilosis*; krystalová struktura; peptidomimetický inhibitor; Pepstatin A; Sapp2p; Sapp1p

Abstract

Candida parapsilosis is an opportunistic fungal pathogen of humans causing a variety of infections. Immunocompromised individuals represent the most threatened group of patients. The increasing frequency of infections and occurrence of drug resistant strains are the main reasons for research focused on novel antimycotic compounds. Inhibition of secreted aspartic proteases (Sap) of pathogenic *Candida* spp. appears to be a potential target of therapeutic intervention. The genome of *C. parapsilosis* contains at least three genes coding for secreted aspartic proteases, denominated SAPP1-3. Protease Sapp1p has been well biochemically and structurally characterized, whereas Sapp2p and Sapp3p have been given less attention. The first part of the thesis is focused on structural analysis of Sapp1p complexes with selected peptidomimetic inhibitors binding to the active site of the enzyme. In addition, complex of the isoenzyme Sapp2p with the well-known secreted aspartate inhibitor Pepstatin A has been analyzed.

The second part is related to the fact that *C. parapsilosis* belongs to the *Candida* spp. with the unique ability to translate standard leucine CUG codon mostly as serine. Even though it is a non-conservative substitution of hydrophobic amino acids for a hydrophilic one, this unique ability is maintained for more than 170 million years. Some studies have focused on selective advantages and consequences of alternative CUG codon usage to the overall phenotype of the yeast. However the effect on the structure and function of specific proteins is less known. The second part of the thesis aims to clarify the impact of alternative CUG codon usage on the structure and function of protease Sapp1p whose nucleotide sequence includes one CUG triplet. The resulting serine is located in a loop near the active site in the structure of Sapp1p.

Keywords: Alternative codon usage; aspartic proteinase; crystal structure; *Candida parapsilosis*; peptidomimetic inhibitor; Pepstatin A; Sapp2p; Sapp1p

Obsah

1.	Charakteristika kvasinek rodu <i>Candida</i>	- 1 -
1.1.	Taxonomické zařazení rodu <i>Candida</i>	- 1 -
1.2.	Obecná charakteristika rodu <i>Candida</i>	- 1 -
1.3.	Patogenita kandid	- 3 -
1.4.	Virulentní faktory	- 4 -
1.5.	<i>Candida parapsilosis</i>	- 6 -
2.	Aspartátové proteázy.....	- 7 -
2.5.	Obecná charakteristika aspartátových proteáz	- 7 -
2.6.	Sekretované aspartátové proteázy (Sap) patogenních kandid	- 9 -
2.7.	Aktivace a regulace sekretovaných aspartátových proteáz.....	- 12 -
2.8.	Role sekretovaných aspartátových proteáz ve virulenci.....	- 13 -
2.9.	Sekretované aspartátové proteázy <i>C. parapsilosis</i>	- 15 -
2.10.	Struktura sekretovaných aspartátových proteáz.....	- 16 -
2.11.	Inhibitory Sap	- 22 -
3.	Genom kandid	- 24 -
3.5.	Geny spojené s virulencí	- 24 -
3.6.	Alternativní překlad CUG kodonu	- 25 -
3.7.	Důsledky dvojznačného překladu CUG kodonu	- 26 -
3.8.	Vliv alternativního překladu na funkci a strukturu proteinů kandid.....	- 28 -
4.	Cíle diplomové práce.....	- 30 -
5.	Experimentální část.....	- 31 -
5.5.	Materiály a přístrojové vybavení	- 31 -
5.5.1.	Použité chemikálie	- 31 -

5.5.2.	Přístrojové vybavení.....	- 32 -
5.5.3.	Ostatní materiál	- 34 -
5.6.	Metody.....	- 35 -
6.	Výsledky a Diskuze	- 43 -
6.1.	Rengenostрукturní analýza izoenzymů Sapp1p a Sapp2p	- 43 -
6.1.1.	Expres a izolace autentické Sapp1p a Sapp2p	- 43 -
6.1.2.	Krystalizace izoenzymu Sapp1p se souborem inhibitorů.....	- 47 -
6.1.2.1.	Vyhodnocení naměřených dat pro komplexy se Sapp1p.....	- 54 -
6.1.3.	Krystalizace izoenzymu Sapp2p s inhibitorem Pepstatinem A	- 56 -
6.1.3.1.	Vyhodnocení naměřených dat pro komplex Sapp2p s Pepstatinem A.....	- 57 -
6.2.	Alternativní překlad CUG kodónu u <i>C. parapsilosis</i>	- 61 -
6.2.1.	Expres, izolace a aktivace rekombinantní proSapp1p.....	- 62 -
6.2.2.	Hmotnostně spektroskopická analýza zastoupení jednotlivých variant Sapp1p vzniklých vlivem alternativního překladu ve vzorcích z klinických izolátů	- 67 -
6.2.3.	Vliv alternativního překladu CUG kodónu na strukturu a funkci proteázy Sapp1p ..	- 69 -
7.	Závěr.....	- 72 -
8.	Literatura.....	- 74 -
9.	Seznam použitých zkratk.....	- 81 -
10.	Přílohy	- 84 -

1. Charakteristika kvasinek rodu *Candida*

1.1. Taxonomické zařazení rodu *Candida*

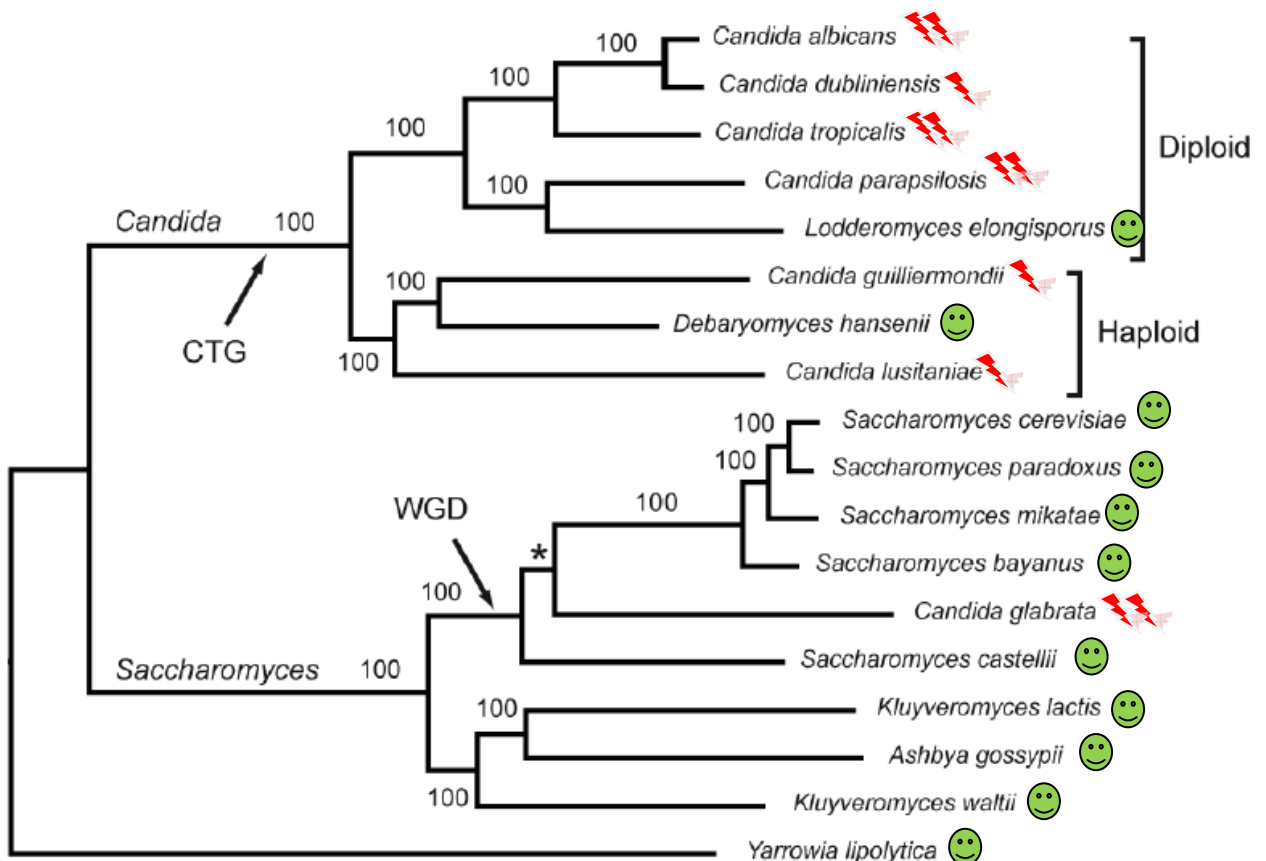
Říše:	<i>Eukaryota</i>
Podříše:	<i>Fungi</i>
Kmen:	<i>Ascomycota</i>
Třída:	<i>Hemiascomycetes</i>
Řád:	<i>Saccharomycetales</i>
Rodina:	<i>Candidaceae</i>
Rod:	<i>Candida</i>

1.2. Obecná charakteristika rodu *Candida*

Kvasinky rodu *Candida* jsou velmi heterogenní skupina organismů, jež zahrnuje téměř čtvrtinu všech druhů kvasinek. Široké pojmenování „kandidy“ původně označovalo kvasinky, u nichž nebyl pozorován žádný sexuální cyklus. Malý výsek z této obrovské skupiny patří mezi patogeny člověka. Ke klinicky nejvýznamnějším patogenním druhům patří *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*, které dohromady zapříčiňují přibližně 95 % identifikovaných infekcí způsobených kandidami. Ostatní druhy kandid, včetně *C. krusei*, *C. lusitaniae* a *C. guilliermondii*, mohou za méně jak 5 % invazivních kandidóz. *C. albicans* je stále nejčastějším patogenním druhem, ovšem frekvence výskytu dalších druhů významně roste. Vzhledem k medicínskému významu některých druhů byla hemiascomycetám věnována velká pozornost i z evolučního hlediska. Velká část patogenních druhů kandid, s výjimkou *C. glabrata* a *C. krusei*, patří do jedné vývojové větve, označené CTG (obr. 1.). Členové této větve mají jedinečnou vlastnost překládat leucinový kodón CUG serinem. Haploidní a diploidní druhy CTG větve tvoří dvě samostatné skupiny. Kvasinky patřící do vývojové větve WGD (Whole genom duplication, např. *S. cerevisiae*), spojuje událost, že v minulosti podstoupili genomovou duplikaci (Parra-Ortega et al., 2009, Butler et al., 2009).

Životní cyklus a biologie *C. albicans* byly předmětem rozsáhlého výzkumu. Tento výzkum byl značně usnadněn kompletní sekvenací genomu *C. albicans* (Braun et al., 2005) a rozvojem různých molekulárních nástrojů pro genové manipulace. *C. albicans* je schopna růst jak v kvasinkové morfologické formě, tak i ve formě pseudohyfy a pravých hyf. Existuje celá řada zásadních rozdílů v režimu růstu a organizace buněčného cyklu mezi formou blastosporu a formou hyfy a pseudohyfy. Růst hyf, který je považován za jeden z důležitých faktorů virulence, je podporován různými

podmínkami prostředí, jako je růst při 37°C, přítomnost séra, neutrální pH, vysoký obsah CO₂. Kvasinková forma je zvýhodňována při teplotě 30°C a kyselém pH (pH 4,0). Růst pseudohyf nastává za posunu podmínek zvýhodňujících kvasinkovou formu směrem ve prospěch růstu hyf, jako je teplota 35°C a pH 5,5 (Kim and Sudbery, 2011).



- 😊 nepatogenní
- ⚡ mírně patogenní
- ⚡⚡ velmi patogenní

Obr. 1.: Fylogenetický strom příslušníků rodu *Candida* a *Saccharomyces*. Členové CTG větve překládají leucinový kodón CUG serinem. Haploidní a diploidní druhy CTG větve tvoří dvě samostatné skupiny. Kvasinky patřící do vývojové větve WGD podstoupili genomovou duplikaci (převzato a upraveno podle Butler et al., 2009).

1.3. Patogenita kandid

Hlavní důvod pro studium patogenních kandid souvisí v první řadě s potřebou účinně léčit osoby s oslabenou imunitou nebo poruchami imunitního systému, kterých v současné době přibývá. Od roku 1980 se kvasinky ukázaly jako hlavní příčina komplikací u hospitalizovaných pacientů po lékařských zákrocích vyžadujících imunosupresivní léčbu (např. pacienti po transplantaci) a jedinců se závažnými zdravotními problémy. V důsledku toho došlo k značnému vývoji v oblasti základního výzkumu patogenních kvasinek, převážně rodu *Candida*, *Cryptococcus* a *Aspergillus* (Naglik et al. 2003). Zdraví lidé hostí kandidy jako neškodné komenzály kůže a sliznic, kde jsou součástí stálé mikroflóry. Zastoupení jednotlivých druhů v různých částech těla se liší a závisí mimo jiné i na pH prostředí. *C. glabrata* a *C. tropicalis* jsou nejčastěji nacházeny v prostředí vagíny a ústní dutiny a v gastrointestinálním traktu, zatímco *C. guilliermondii* a *C. parapsilosis* kolonizují nejčastěji kůži (Hedderwick et al., 2000, Calderone, 2002). I když kandidy perzistují v organismu většinou jako neškodný komenzál, u osob se sníženou imunitou mohou být zodpovědné za různá onemocnění počínaje lehkými povrchovými infekcemi, lokálními infekcemi a konče závažnými život ohrožujícími infekcemi krevního řečiště a vnitřních orgánů (Kim and Sudbery, 2011).

Kolonizaci a infekci kandidami brání přirozená bakteriální flóra epiteliálních sliznic, epitelové vrstvy buněk a funkční imunitní systém. Nicméně kandidy mohou za některých podmínek přerůst mikrobiální flóru a způsobit povrchové infekce a poškození epitelu. Mezi povrchové infekce můžeme zařadit různé mykózy. Jedním z příkladů mohou být onychomykózy, tj. mykózy nehtů. Podle některých studií, tvoří onychomykózy až 30 % všech povrchových plísňových infekcí a až polovinu všech onemocnění nehtů (Segal et al., 2000).

Jedním z častých lokálních onemocnění způsobených kandidami je vulvovaginální kandidóza (VVC) u žen. Až 75 % všech žen mělo alespoň jednou za život zkušenost s akutní VVC (Sobel, 1992; Calderon, 2002). K dalším častým lokálním infekcím patří např. keratitis - invazivní oční onemocnění způsobené zejména pooperační infekcí (Trofa et al., 2008). Lokální infekce jsou běžné u pacientů trpících AIDS, kde se pacienti setkávají s vážnými orofaryngálními kandidózami (OPC) (Panagoda et al., 1999).

V závažných případech mohou kvasinky proniknout přes epitelové vrstvy do hlubších tkání a způsobit vážná onemocnění. Nebezpečným systémovým onemocněním je infekce krevního řečiště. Kandidy jsou v současné době jeho čtvrtou nejčastější příčinou. U normálních zdravých jedinců zajišťuje přiměřenou ochranu proti infekcím krevního řečiště působení neutrofilů. Infekce mohou

propuknout u pacientů, kteří mají mimořádně nízký počet neutrofilů v důsledku krevních nádorů nebo imunosupresivní léčby. Další rizikové faktory jsou operace, které porušují zažívací trakt a umožňují tak šíření kvasinek z jeho prostoru krevním řečištěm k dalším orgánům (Kim and Subbery, 2011). K výraznému nárůstu těchto infekcí došlo zejména druhem *C. glabrata* ve Spojených státech a *C. tropicalis* a *C. parapsilosis* v Evropě, Kanadě a Latinské Americe (Almirante et al., 2006; Trofa et al., 2008). Některé nové druhy jsou na vzestupu hlavně díky stoupající rezistenci vůči fungicidním lékům jako je flukonazol (Calderon, 2002).

1.4. Virulentní faktory

Všechny patogenní organismy si vyvinuly mechanismy a specifické strategie, pomocí nichž jsou schopny kolonizovat hostitelské tkáně a překonávat obranný systém hostitele. Patogenita kandid je multifaktoriální proces, který je regulován více jak jedním virulentním faktorem. Studie hodnotící vliv jednotlivých virulentních faktorů kandid si mohou vzájemně odporovat, jelikož exaktní definice toho, co je to virulentní faktor, je stále otázkou diskuze. Je zřejmé, že existuje skupina virulentních faktorů, jež je zapojena do infekčního procesu, ale ne všechny virulentní faktory se musí účastnit určité fáze infekce. Virulentní faktory kandid byly určeny na nejintenzivněji studovaném druhu *C. albicans* a vycházejí z jejího chování. Přestože se často o virulentním faktoru mluví jako o obecné vlastnosti všech patogenních kandid, musíme mít na paměti, že jednotlivé druhy kandid se mohou významně lišit. Např. pro patogenní druh *Candida albicans* mohou hrát při infekci hostitele zásadní roli sekretované aspartátové proteázy, druh *Candida glabrata* si zřejmě vyvinul jiné mechanismy. Mezi virulentní faktory kandid se obecně řadí schopnost adherence, tvorba hyf, tvorba biofilmů, přepínání mezi fenotypy a produkce extracelulárních hydrolytických enzymů. Mezi nejvýznamnější hydrolytické enzymy patří sekretované aspartátové proteázy, fosfolipázy a lipázy (Cutler et al., 1991; Naglik et al. 2003, Parra-Ortega et al., 2009).

Adherence

Úspěšná kolonizace a následná infekce je spojená se schopností kvasinek přilnout k povrchu hostitelských tkání, a to zejména k sliznicím. Kandidy mohou pronikat do epitelových buněk dvěma různými mechanismy: pomocí vyvolané endocytózy, podobně jako fakultativně intracelulární bakterie, nebo aktivní penetrací. K oběma strategiím potřebují specializované povrchové molekuly. K nejlépe charakterizovaným patří adheziny, mezi které patří rodina proteinů buněčné stěny ALS (agglutinin-like sequence). *C. albicans* vlastní 8 genů pro ALS, jejichž sekvence jsou rozdílné

u jednotlivých kmenů. Liší se počtem tandemových opakování, jež se odráží ve schopnosti kvasinky přilnout k povrchům hostitelských tkání. Podobné doménové uspořádání jako mají *ALS* má protein buněčné stěny hyf Hwp1 (hyphal wall protein) (Braun et al., 2005). Další proteiny účastníci se buněčných interakcí jsou antigeny (např. Mp65, Pra1, Csa1). Ostatní proteiny důležité pro adhezi sdílejí podobné sekvenční motivy: N-terminální signální peptid, serin-threonin bohatou C-terminální doménu a glycosylphosphatidylinositolovou (GPI) kotvu (Alberti-Segui et al., 2004).

Tvorba biofilmů

Biofilmy jsou společenství mikroorganismů spojených extracelulární matrix a jsou častým typem růstu mikroorganismů. Biofilmy tvořené *C. albicans* jsou spojeny s dimorfním přechodem blastosporu do formy hyf a jejich význam spočívá v znesnadnění penetrace léků (Laffey et al., 2005).

Sekretované enzymy

Funkcí sekretovaných enzymů je nejen degradace molekul a získání potřebných živin, ale hrají klíčovou roli při interakci s hostitelem. Pomáhají kvasině při vstupu do hostitelské tkáně, rozrušují buněčné membrány, ničí povrchové molekuly a usnadňují adhezi. Dále jsou schopné degradovat některé molekuly imunitního systému. V posledních letech si získaly pozornost jako možné cíle pro konstrukci syntetických inhibitorů k léčbě infekcí (Schaller et al., 2005).

Fosfolipázy jsou schopné hydrolyzovat jednu nebo více esterových vazeb v glycerofosfolipidech. Extracelulární fosfolipázy jsou spojeny s virulencí u mnoha prokaryotických i eukaryotických patogenů. Některé studie ukazují, že vyšší produkce fosfolipáz je spojena s vyšší patogenitou, přičemž největší roli ve virulenci pravděpodobně hraje fosfolipáza B (*PLB1*). Funkce fosfolipáz během infekce není dobře objasněna. Pravděpodobně se podílejí na rozrušení membrán hostitelské buňky. *C. albicans* vlastní široký repertoár fosfolipáz: fosfolipázu A (*PLA1-2*), fosfolipázu B (*PLB1-5*), fosfolipázu C (*PLC1-3*) a fosfolipázu D (*PLD1*). Pouze u *PLB1* a *PLB2* byla prokázána extracelulární lokalizace (Ghannoum, 2000; Schaller et al., 2005; Hrušková-Heidingsfeldová, 2008).

Lipázy katalyzují hydrolýzu a syntézu triacylglycerolů a vyznačují se stabilitou při vysokých teplotách, v organických rozpouštědlech a odolností vůči proteolýze. Mezi funkce mikrobiálních extracelulárních lipáz patří degradace tuků pro získání živin, vzájemné synergické působení s dalšími enzymy a zahájení zánětlivých procesů (Trofa et al., 2008). U *C. albicans* bylo identifikováno deset genů pro lipázy *LIP1-LIP10*. Jejich produkty sdílejí vysoce podobné motivy. Expresí genů pro lipázy

C. albicans nemusí být regulována přítomností lipidů v médiu. Některé lipázy jsou kvasinkou produkovány nezávisle na jejich obsahu v médiu, což poukazuje na jejich široký repertoár funkcí (Hube et al., 2000).

Aspartátové proteázy: Sekretované aspartátové proteázy jsou významnou a doposud nejlépe charakterizovanou skupinou sekretovaných hydrolytických enzymů u kandid a bude jim věnována kapitola č. 2.

1.5. *Candida parapsilosis*

Modelovým organismem této diplomové práce je *Candida parapsilosis*. Tento druh byl prvně izolován Ashfordem ze stolice pacienta v Puerto Ricu roku 1928 a popsán jako *Monilia parapsilosis*, *Monilia* neschopná fermentovat maltózu (Ashford, 1928). Roku 1995 byly kvasinky *C. parapsilosis* na základě genetických odlišností klinických izolátů rozděleny do tří skupin I-III (Lin et al., 1995). Později na bázi bližších genetických srovnání byly vymezeny tři blízkce příbuzné separované druhy a pojmenovány *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* a *Candida metapsilosis*. Ovšem jen některé studie mezi těmito druhy rozlišují (Tavanti et al., 2005).

C. parapsilosis patří mezi oportunní patogeny člověka. Výskyt invazivních onemocnění způsobených *C. parapsilosis* se liší geograficky a je významně ovlivněn zdravotním stavem pacienta. Ve srovnání s ostatními patogenními druhy kandid není *C. parapsilosis* jen obligátní patogen člověka, ale má poměrně vysoké zastoupení v přírodě. Izolována byla např. z domácích zvířat, z hmyzu, z půdy a z prostředí mořských savců. Je typickým komenzálem lidské kůže a nejčastějším druhem izolovaným z rukou. *C. parapsilosis* je známá pro svou schopnost tvořit biofilmy na nemocničních nástrojích, např. na nitrožilních katetrech. Z toho důvodu jsou pacienti vyžadující dlouhodobé užívání centrálního žilního katetru ohroženou skupinou. Obecně jsou vysokému riziku infekce *C. parapsilosis* vystaveni imunokompromitovaní jedinci, jako jsou pacienti s AIDS a pacienti po operaci. Zajímavou skutečností je výskyt onemocnění zapříčiněných *C. parapsilosis* u novorozenců vyžadujících lékařskou poporodní péči. Tato riziková skupina pacientů trpí častěji kandidózami způsobenými právě druhem *C. parapsilosis* (Trofa et al., 2008).

Na rozdíl od *C. albicans* a *C. tropicalis*, které se mohou vyskytovat v různých morfologických formách, *C. parapsilosis* netvoří pravé hyfy a existuje buď ve stádiu kvasinky, nebo tvoří pseudohyfy (Laffey et al., 2005).

2. Aspartátové proteázy

2.5. Obecná charakteristika aspartátových proteáz

Proteázy (nebo též proteinázy či peptidázy) jsou enzymy katalyzující hydrolýzu peptidové vazby (CO-NH) v proteinech. Liší se ve specifitě a mechanismu účinku (Barrett and Rawlings, 1991). Proteázy jsou klasifikovány na základě jejich katalytického mechanismu a podle aminokyselinových zbytků účastnících se hydrolýzy. Enzymová nomenklatura rozlišuje čtyři třídy proteáz: **serinové** (např. trypsin, chymotrypsin, podrodina subtilisinu), **cysteinové** (např. proteázy streptokoků, papain), **metaloproteázy** (např. collagenázy, proteázy microvilla) a **aspartátové proteázy**. Mezi historicky nejznámější aspartátové proteázy patří prasečí pepsin, který se stal modelovou proteázou celé skupiny aspartátových proteáz. V současnosti je velká pozornost věnována také jiným druhům aspartátových proteáz hlavně díky jejich významné roli při lidských chorobách. Např. úloha reninu u hypertenzi, katepsinu D u metastáz rakoviny prsu, β -sekretázy u Alzheimerovy choroby, plasmepsinu u malárie, HIV-1 proteázy u syndromu selhání imunity a úloha sekretovaných aspartátových proteáz patogenních kvasinek rodu *Candida* při vzniku mykóz (Barrett et al., 1994; Dash et al., 2003).

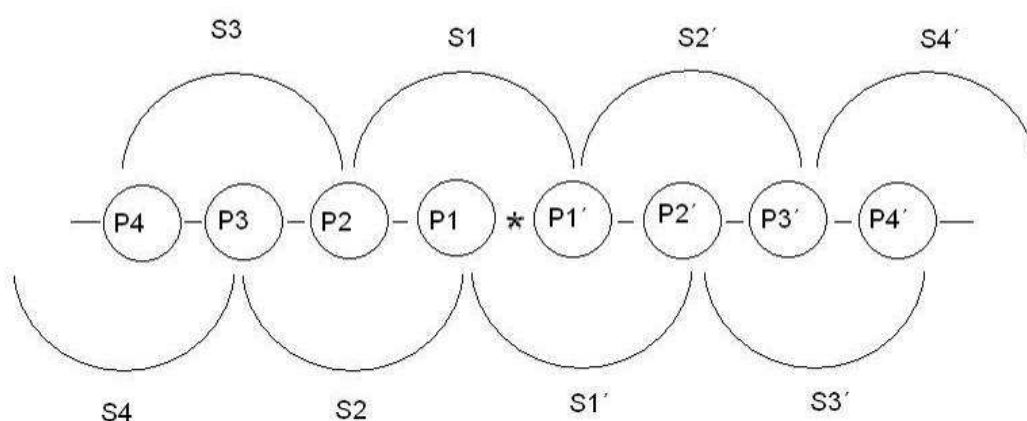
Charakteristická pro aspartátové proteázy je jejich biochemická aktivita při nízkém pH. Dále sdílejí katalytický mechanismus, inhibici Pepstatinem A (hexapeptid ze Streptomycet) a vysokou strukturní příbuznost.

Aspartátové proteázy jsou v přírodě časté a jsou zapojené do nesčetných biochemických procesů. Nalezneme je u eukaryot, virů a velice nedávno byly objeveny také u bakterií (Rawlings et al., 2009). Rozeznáváme tři rodiny aspartátových proteáz: A1- pepsiny, A2- Retropepsiny a A3- Enzymy pararetrovirů.

Eukaryotické aspartátové proteázy patří do rodiny A1 a jsou složené z jednoho polypeptidového řetězce formujícího globulární protein obsahující dvě domény - C-koncovou a N-koncovou doménu. Přechod mezi doménami tvoří dutina pro vazbu substrátu, v jejímž centru se nachází aktivní místo enzymu. Hydrolýza substrátu v aktivním místě je zprostředkována dvěma katalytickými zbytky aspartátů, přičemž každá doména přispívá jedním katalytickým aspartátem. Tyto dva aspartáty koordinují molekulu vody, která funguje při hydrolýze substrátu jako nukleofilní činidlo. Do aktivního místa aspartátových proteáz se váže většinou 6-10 aminokyselin substrátu, přičemž množství kontaktů mezi substrátem a proteázou určuje její specifitu. Aminokyselinové zbytky vázajícího se substrátu jsou obvykle označovány jako P4-P3-P2-P1 * P1'-P2'-P3'-P4' " se štěpenou peptidovou vazbou mezi P1 a P1' označenou "*" . Odpovídající místa v aktivním místě enzymu jsou

označována jako S4-S3-S2-S1-S1'-S2'-S3'-S4' (nomenklatura podle Berger and Schechter, 1967) (Obr. 2.). Aktivní místo je vybaveno různými aminokyselinovými zbytky, jež udělují aspartátovým proteázám odlišnou specifitu. V pozici P1 a P1' jsou většinou preferovány hydrofobní aminokyseliny (Fusek et al., 1994). Substrátová specifita sekretovaných aspartátových proteáz patogenních kandid vzhledem k jejich struktuře bude podrobněji probrána v samostatné kapitole.

Jelikož jsou si jednotlivé domény hlavně v okolí aktivního místa strukturně velmi podobné, předpokládá se, že proteázy vznikly genovou duplikací ancestrálního proteinu, který byl podobný jedné z domén. Původní proteáza se mohla podobat současným virovým aspartátovým proteázám ze skupiny A2 a A3. Retropepsiny a aspartátové proteázy pararetrovirů jsou syntetizovány jako monomerní jednotky a pro jejich enzymatickou aktivitu je nutná jejich dimerizace, jelikož každý monomer disponuje jen jedním katalytickým aspartátem (Dash et al., 2003).



Obr. 2.: Znárodnění vazby substrátu do aktivního místa enzymu.

Aminokyselinové zbytky vázajícího se substrátu jsou označeny jako P4-P3-P2-P1 * P1'-P2'-P3'-P4' " se štěpenou peptidovou vazbou označenou "*" . Odpovídající místa v aktivním místě enzymu jsou označována jako S4-S3-S2-S1-S1'-S2'-S3'-S4' (nomenklatura podle Berger and Schechter, 1967).

2.6. Sekretované aspartátové proteázy (Sap) patogenních kandid

Sap patogenních kandid jsou aspartátové proteázy, které vykonávají svojí enzymatickou funkci extracelulárně. Produkce sekretovaných aspartátových proteáz byla prokázána u druhů *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* a *Candida lusitaniae*. Jednotlivé druhy kandid se liší v počtech genů SAP (Tab. 1.) (Pichová et al., 2001; Monod et al., 1994). Počet a rozmanitost genů SAP způsobená duplikacemi je důležitá pro adaptaci, přežívání a virulenci kvasinky. Posun od komenzála k oportunistickému patogenu koreluje se zvýšením počtu genů pro Sap (Schaller et al., 2005).

Tab. 1.: Počet SAP identifikovaných u nejznámějších patogenních druhů kandid (Pichová et al., 2001, Monod et al., 1994)

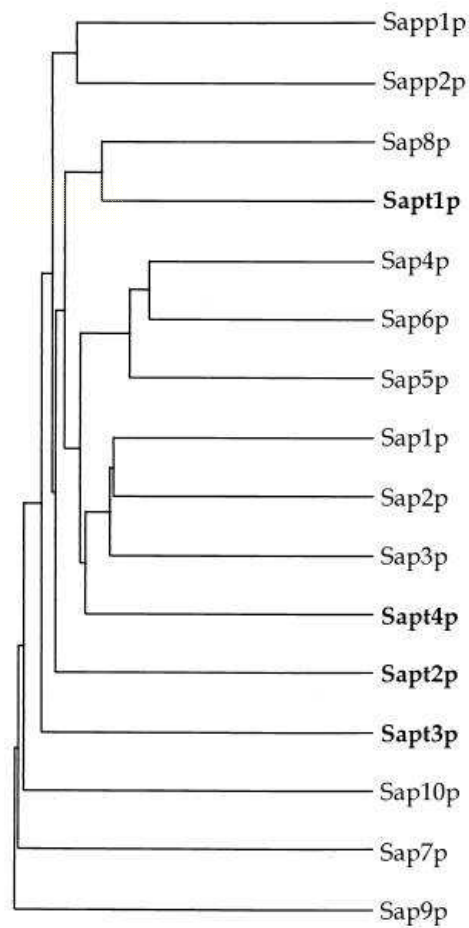
Druh kandid	Počet genů SAP	Název produktu
<i>Candida albicans</i>	10	Sap1p-Sap10p
<i>Candida tropicalis</i>	4	Sapt1p-Sapt4p
<i>Candida dubliniensis</i>	8	Sapd1-Sapd4p; Sapd7-Sapd10p
<i>Candida parapsilosis</i>	3	Sapp1p-Sapp3p
<i>Candida lusitaniae</i>	1	Sapl1p

Větší pozornost byla prozatím věnována sekretovaným aspartátovým proteázám nejvíce frekventovaného druhu kandid – *C. albicans*. Předpokládalo se, že Sap ostatních druhů budou mít podobné vlastnosti. Ukázalo se, že se vlastnosti Sap liší nejen mezi různými druhy kandid, ale odlišnosti najdeme i mezi izoenzymy Sap jednoho druhu. Jednotlivé izoenzymy Sap se liší např. v molekulové hmotnosti, pH optimu, izoelektrickém bodě, regulaci exprese apod. Izoenzymy Sap9p a Sap10p *C. albicans* mají na svém C-konci sekvenci pro GPI (glycosylphosphatidylinositol) kotvu a jsou podobné yapsinům – kovalentně kotveným aspartátovým proteázám vyskytujících se např.

u *S. cerevisiae*. U patogenní kvasinky *C. glabrata* nebyly identifikovány žádné typické Sap. Avšak podobně jako *S. cerevisiae* produkuje yapsiny (Schild et al., 2011).

Mezi Sap *C. albicans* byly objeveny těsné fylogenetické vztahy. Na základě těchto poznatků bylo vytvořeno 6 skupin Sap – Sap1-3p; Sap4-6p, Sap7p, Sap8p, Sap9p a Sap10p (obr. 3.) (Hube et al., 1994). Zřetelný rozdíl mezi skupinami nalezneme v jejich pH optimu (rozmezí aktivity mezi pH 2 až 7). Sap1-Sap3p mají nejvyšší aktivitu při nižších hodnotách pH, zatímco Sap4-Sap6p mají nejvyšší aktivitu při hodnotách pH vyšších. Izoenzymy Sap9p a Sap10p preferují neutrální pH. Enzymatická aktivita Sap v různých hodnotách pH může být důležitá pro úspěch *C. albicans* jako patogena tím, že mu umožňují přežít a způsobit infekci v mnoha různých tkáních s odlišným pH, jako jsou sliznice, kůže a vnitřní orgány. *SAP5* a *SAP6* patří mezi nedávno odvozené geny, jež vznikly pravděpodobně duplikací ancestrální *SAP4*. Sap4-6p obsahují RGD motif (aminokyselinová sekvence arginin, glycin, aspartát) důležitý pro interakci s receptory buněčného povrchu. Izoenzymy Sap4-6p jsou produkovány kvasinkou ve více adherentní morfologické formě – formě hyfy.

Širší pohled na vztahy mezi izoenzymy Sap přineslo porovnání aminokyselinových sekvencí Sap *C. albicans* se sekvencemi Sap jiných významných patogenních druhů kandid (obr. 3.). Sapt1-4p *C. tropicalis* nejsou separovány do skupin jako Sap *C. albicans* a tvoří odlišné větve. Sapt4p je blíže příbuzná skupině Sap1-Sap3p, Sapt1p je nejbližší Sap8p. Izoenzymy *C. parapsilosis* Sapp1p a Sapp2p tvoří skupinu vzdálenou od všech ostatních (Zaugg et al., 2001). *C. dubliniensis* a *C. albicans* mají ortologní geny *SAP* s více jak 90% podobností, s výjimkou *SAP5-6* *C. albicans*, jejichž analogy u *C. dubliniensis* nenajdeme. Velice detailně se vztahům mezi Sap věnuje studie Parra-Ortega et al., 2009, jež podrobně znázorňuje vztahy mezi Sap šesti patogenních druhů kandid.

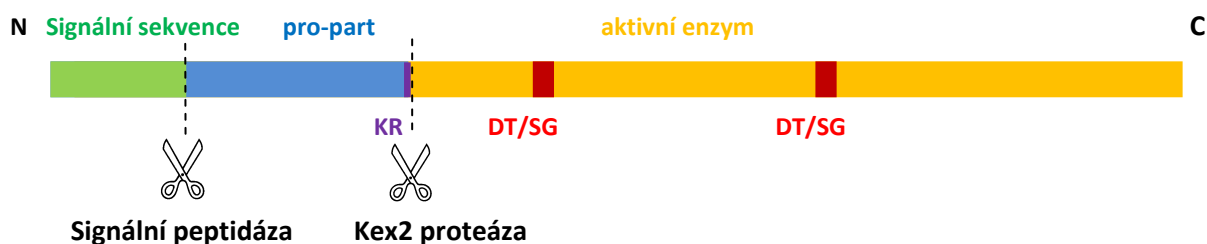


Obr. 3.: Dendrogram znázorňující vztahy mezi izoenzymy Sap z *C. albicans*, *C. tropicalis* a *C. parapsilosis*

Dendrogram zobrazuje sekvenční homologii izoenzymů Sap z *C. albicans* (*Sap1-10p*), *C. tropicalis* (*Sapt1-4p*) a *C. parapsilosis* (*Sapp1-2p*). Podobné rodiny Sap existují i v *C. dubliniensis*. Délky větví jsou úměrné podobnosti mezi sekvencemi aminokyselin jednotlivých Sap (Převzato a upraveno z Zaugg et al., 2001).

2.7. Aktivace a regulace sekretovaných aspartátových proteáz

K regulaci produkce Sap dochází především na úrovni mRNA. Na postranlační úrovni je jednou z důležitých forem regulace samotný proces aktivace sekretovaných aspartátových proteáz. Sap jsou syntetizovány v podobě neaktivního prekursoru pre-pro-enzymu (obr. 4.). Pre-pro-enzym bývá zhruba o 60 aminokyselin delší než aktivní enzym. V průběhu sekrece je štěpen do konečné podoby aktivního enzymu. Proces aktivace zahrnuje štěpení N-terminální signální sekvence signální peptidázou. Signální sekvence (přibližně 20 aminokyselin dlouhý peptid na N-konci) je nezbytná pro nasměrování proteinu do lumen endoplazmatického retikula. Dále je proenzym zbavován propartu (někdy též nazývaného aktivační peptid). Úlohou propartu je fyzické bránění přístupu do aktivního místa a znemožnění předčasné aktivaci proenzymu. Jeho přítomnost je zároveň nezbytná pro správné sbalení proteinu do aktivní formy. Štěpení propartu může být zprostředkováno třemi různými mechanismy. Rozeznáváme autoaktivaci, asistovanou autoaktivaci a plně asistovanou aktivaci. U Sap patogenních kandid pozorujeme nejčastěji asistované štěpení membránovou Kex2 proteázou. Kex2 proteáza je serinová proteáza podobná trypsinu, jež rozeznává aminokyseliny lysinu a argininu (KR motif), za nimiž specificky štěpí. Jednotlivé sekretované aspartátové proteázy se liší v počtu KR míst (Richter et al., 1998). U některých izoenzymů Sap byla v laboratorních podmínkách vyzorována schopnost autoaktivace při nízkém pH. Tato alternativní aktivace bez asistence Kex2 proteázy zahrnuje jak intra tak i intermolekulární interakce závislé na přítomnosti lysinu v místě štěpení (Newport et al., 1997; Dostál et al., 2005). V posledním kroku je enzym balen do sekrečních váčků a dopravován k plazmatické membráně. Tam buď zůstane kovalentně připojen pomocí GPI kotvy (Sap9 a Sap10), nebo je sekretován ven z buňky.



Obr. 4.: Zjednodušený náčrt obecného pre-pro-enzymu sekretovaných aspartátových proteáz

2.8. Role sekretovaných aspartátových proteáz ve virulenci

Role proteáz v infekčních onemocněních byla studována především u *C. albicans*. Existují studie, jež hodnotí Sap jako významný virulentní faktor kandid. Najdeme ovšem výsledky prací, jež takový význam sekretovaným aspartátovým proteázám nepřisuzují. Nesoulad v názorech vyplývá už ze samotné nejednotné definice virulentního faktoru (viz. Kapitola Virulentní faktory). Níže si dovoluji shrnout nejčastější důvody, proč jsou sekretované aspartátové proteázy brány jako virulentní faktor.

1. Vztah mezi produkcí Sap *in vitro* a virulencí kandid

Virulence kmenů *C. albicans* koreluje s úrovní aktivity Sap *in vitro* a může korelovat s počtem genů SAP. Pomocí nepřímé imunofluorescenční mikroskopie byla prokázána přítomnost Sap v buněčné stěně kvasinek a hyf ve všech orgánech imunokompromitovaných pacientů, kteří podlehli systémové infekci *C. albicans* (Rüchel et al., 1991). Pacienti trpící kandidózou hostili kmeny *C. albicans*, které měly výrazně vyšší repertoár proteolytických enzymů než asymptomatických nosiči. Studie s použitím ústních (Bernardis et al., 1996) a vaginálních klinických izolátů (Bernardis et al., 1999) ukázala pozitivní korelaci mezi úrovní produkce Sap *in vitro* a virulencí *C. albicans*. Méně běžné klinické izoláty kandid, jako je *C. kefyr* a *C. guilliermondii* se zdají být proteolyticky neaktivní při testování v kultivačním médiu s hovězím sérovým albuminem (BSA) jako jediným zdrojem dusíku (Naglik et al., 2003).

2. Korelace mezi degradovanými lidskými proteiny během infekce a analýzou substrátových specifit Sap

Substrátová specifita Sap2p je velmi široká. Substráty Sap2p jsou např. albumin, fibronectin, hemoglobin, laktoferrin, mucin, sekretované IgA, těžké řetězce IgG, α_2 -makroglobulin, koagulační faktory, prothrombin, molekuly extracelulární matrix jako je keratin, kolagen a vimentin. Štěpení sekretovaného IgA pomocí Sap2p je zvláště pozoruhodné, protože IgA je výrazně odolnější vůči proteolýze než jsou monomerní nebo sérové imunoglobuliny (Naglik et al., 2003). Wu a Samaranyake došli k zjištění, že snížení celkové koncentrace proteinů obsažených ve slinách pacientů koreluje s mírou aktivity Sap, což naznačuje, že Sap rozkládají proteiny slin v dutině ústní (Wu and Samaranyake, 1999; Naglik et al., 2003).

3. Asociace produkce Sap s virulentními procesy a s imunitní odpovědí hostitele

Sap2p umí aktivovat prozánětlivý cytokin interleukin-1 β z jeho prekursoru, což může hrát roli při aktivaci a udržování zánětlivé reakce (Hube et al., 1996). Za určitých podmínek může Sap2 také

aktivovat Hagemanův faktor (serinová proteáza kallikrein-kininového systému), který může způsobit zvýšenou propustnost cév. Sap2p může také působit na systém srážení krve aktivací koagulačního faktoru X, koagulačního faktoru XII, nebo protrombinu. Aktivace této kaskády může nepřímo podpořit schopnost infikovat hostitele (Naglik et al., 2003).

4. Exprese genů SAP v průběhu infekce

Zjištění, že *C. albicans* vlastní velké množství genů SAP, které jsou exprimovány rozdílně v různých podmínkách *in vitro*, vedl k myšlence, že různé izoenzymy mohou být produkovány různě také během infekce (Hube et al., 1994). Tato myšlenka, spolu se skutečností, že *C. albicans* obývá rozmanité množství hostitelských nik, byla hnací silou pro studium genové exprese SAP *C. albicans* při infekci hostitele (Calderon, 2002). Studie Schaller et al. analyzovala expresi SAP1-6 a SAP8 u pacientů s ústní kandidózou. Výsledkem experimentu bylo zjištění, že se geny SAP během infekce exprimují v různém pořadí (SAP1 a SAP3 -> SAP6 -> SAP2 a SAP8, zatímco transkripty genů SAP4 a SAP5 nebyly detekovány vůbec) (Schaller et al., 1998). Rozdílné pořadí exprese genů SAP bylo pozorováno u pacientek s vaginální kandidózou (SAP2, SAP9 a SAP10 -> SAP1, SAP4 a SAP5 -> SAP6 a SAP7) (Schaller et al., 2003). Pacienti s kožní kandidózou měli také odlišný vzorec exprese SAP (SAP1 a SAP2 -> SAP8 -> SAP6 -> SAP3) (Schaller et al., 2000). Existují studie, jež popisují odlišnou expresi genů SAP při kolonizaci a při propagaci nemoci (Cui Hong Lian, 2007).

5. Modulace virulence pomocí inhibitorů proteáz

Podávání inhibitorů proteáz v některých případech redukovalo schopnost kvasinek adherovat na epitelální buňky (Borg-von Zepelin et al., 1999). Pepstatin A, specifický inhibitor aspartátových proteáz, blokuje počáteční pronikání *C. albicans* a *C. parapsilosis* přes sliznice (Trofa et al., 2008). Inhibitory tedy mohou zasahovat do rozvoje infekce v jeho počátečních stádiích. Bylo vyzorováno, že pacientům s AIDS, kterým byla podávána HAART (highly active antiretroviral therapy), ustoupila zároveň infekce způsobená kandidami. Zjištění vedlo k domněnce, že směs inhibitorů HIV proteáz by mohl zároveň inhibovat také Sap (Cauda et al., 1999; Calderon, 2002).

6. Využití delečních mutantů ke studiu ztráty virulence

Studie Hube et al., 1997 prokázala, že všechny tři geny SAP1-3 *C. albicans* jsou zapojeny do infekčních procesů, jelikož při jejich vyřazení došlo ke snížení virulence kvasinky (Hube et al., 1997). Mnohem patrnější pokles ve virulenci *C. albicans* byl pozorován u delečních mutantů SAP4-6 (Sanglard et al.,

1997). Mutanty bez *SAP4-SAP6* byly výrazně náchylnější k fagocytóze makrofágy než původní divoký kmen (Borg-von Zepelin et al., 1998).

Z výše uvedených informací vyplývá, že sekretované aspartátové proteázy mohou být v případě *C. albicans* účinným virulentním faktorem. Objevy učiněné na tomto druhu nám mohou pomoci k porozumění funkci Sap u ostatních blízce příbuzných druhů kandid.

2.9. Sekretované aspartátové proteázy *C. parapsilosis*

Candida parapsilosis vlastní nejméně tři geny kódující sekretované aspartátové proteázy, z nichž dva zůstávají do značné míry necharakterizované. De Viragh et al. identifikoval pomocí próby ACP (kyselá proteáza) z *C. tropicalis* v genetické knihovně *C. parapsilosis* dva geny pro sekretované aspartátové proteázy a pojmenoval je *ACPR* a *ACPL* (De Viragh et al., 1993). Fusek et al. izoloval dvě sekretované aspartátové proteázy o podobné molekulové hmotnosti, s různými N-koncovými sekvencemi a různými izoelektrickými body a popsal je jako Cpap1 a Cpap2. Později byly *ACPR* a *ACPL* pojmenovány podle nové nomenklatury jako *SAPP1* a *SAPP2* a jejich produkty Sapp1p a Sapp2p. De Viragh předpokládal, že Sapp2p je pseudogen nebo protein s dosud neidentifikovanou funkcí produkovaný za odlišných podmínek. Svoji domněnku opíral o experiment, kdy u *C. tropicalis* (*C. tropicalis -acp*) nahradil gen pro kyselou proteázu *ACP* postupně genem *SAPP1* a *SAPP2* a pouze izoenzym Sapp1p byl schopen nahradit funkci původní Acp. Třetí gen *SAPP3* byl identifikován pomocí PCR a jeho produkt nebyl doposud charakterizován (Trofa et al., 2008).

Izoenzymu Sapp1p byla věnována značná pozornost jak z biochemického, tak strukturního hlediska (Fusek et al., 1994; Pichová et al., 2001; Dostál et al., 2005; Hrušková-Heidingsfeldová et al., 2009). Žádná studie se doposud úžeji nevěnovala *SAPP3* nebo Sapp3p. Popis izolace Sapp2p z média kultury *C. parapsilosis* byl zveřejněn již v roce 1993 (Fusek et al., 1993). Ovšem nízké zastoupení Sapp2p ve směsi se Sapp1p bylo možným hlavním důvodem, proč nebyla izolace Sapp2p dlouho reprodukována jinými laboratořemi. Více informací o biochemických vlastnostech izoenzymu Sapp2p přinesla až studie M. Merkerové 2006, která pracovala s rekombinantní Sapp2p exprimovanou v *E. coli*. Srovnání biochemických vlastností izoenzymů Sapp1p a Sapp2p ukázalo několik rozdílů. Jedním z nich byl způsob aktivace. Proenzym Sapp1p je schopen využít autokatalýzy ke své aktivaci, přičemž vzniká o 1 aminokyselinu delší produkt, jehož proteolytické vlastnosti se neliší od enzymu aktivovaného Kex2 proteázou. Na rozdíl od pro-Sapp1p byla autoaktivace pro-Sapp2p v kyselém prostředí neefektivní a vedla k proteinu o osm aminokyselin delšímu na N-konci (Sapp2p (+8)). Plně

aktivní, správně seštěpené formy Sapp2p bylo dosaženo asistovaným štěpením trypsinem nebo membránovou Kex2 proteázou z *C. parapsilosis*. Aktivita asistovaně štěpené Sapp2p byla více než dvojnásobně vyšší než u autokatalyticky zpracované formy Sapp2p (+8). Mezi další rozdíly Sapp2p patří její substrátová specifita, teplotní optimum, pH optimum a způsob regulace (Merkerová et al., 2006). Optimální pH Sapp2p je v okolí hodnoty pH 2,5. Její proteolytická aktivita prudce klesá zvýšením pH nad hodnotu 3,5. Naopak Sapp1p má své pH optimum v okolí pH 3,0 a pokles její aktivity po zvýšení pH není tak dramatický. Regulaci exprese autentické Sapp2p se věnuje studie Hrušková-Heidingsfeldová et al., 2009. Ta ukazuje, že izoenzym Sapp2p byl transkribován a translatován za všech testovaných podmínek, zatímco Sapp1p pouze v případě použití proteinu jako jediného zdroje dusíku. Výsledky naznačují, že regulace produkce Sapp2p na rozdíl od Sapp1p nezávisí na typu použitého zdroje dusíku (Hrušková-Heidingsfeldová et al., 2009). Rozdíly v enzymologických vlastnostech a mechanismu aktivace mohou odrážet to, že oba izoenzymy mohou být produkovány kvasinkou za jiných podmínek, v jiném prostředí a v různých fázích infekce.

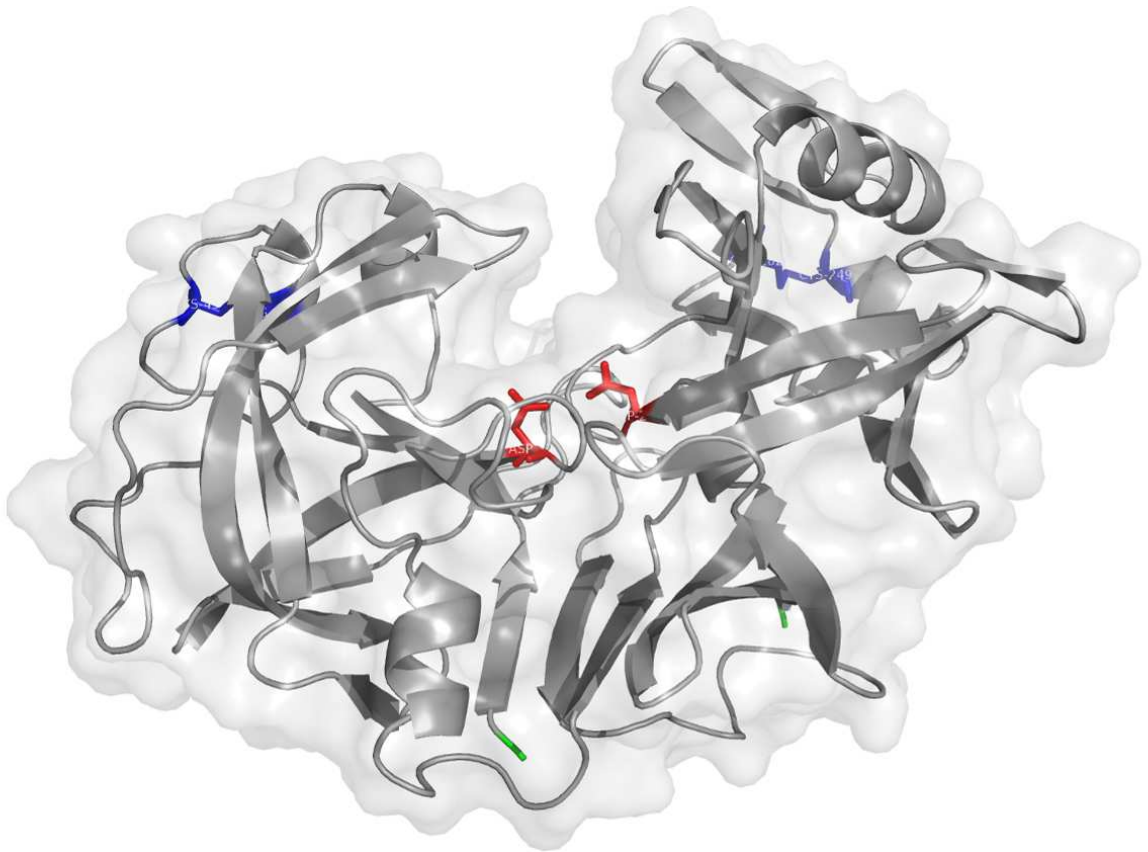
2.10. Struktura sekretovaných aspartátových proteáz

Většina druhů kandid produkující sekretované aspartátové proteázy vlastní jeden dominantní izoenzym Sap, který je v laboratorních podmínkách produkován majoritně. Jeho produkce je vyvolána složením média, které obsahuje exogenní protein jako jediný zdroj dusíku. Pro jejich snadnou izolaci byly tyto enzymy brzo biochemicky popsány a posléze byla určena i jejich proteinová struktura. U *C. albicans* byly kromě majoritně produkováného Sap2p vyřešeny také proteinové struktury některých dalších Sap. Proteinové struktury byly publikovány u následujících izoenzymů: Sap2p, Sap3p, Sap5p z *C. albicans*, Sapt1p z *C. tropicalis* a Sapp1p z *C. parapsilosis* (Tab. 2.) (Cutfield et al., 1995; Abad-Zapatero et al., 1996; Symersky et al., 1997; Borelli et al., 2007; Borelli et al., 2008; Dostál et al., 2009). U většiny izoenzymů Sap známe většinou jen jejich sekvenci, popř. biochemické vlastnosti a byla jim věnována menší pozornost.

Tab. 2.: Vyřešené struktury Sap patogenních druhů kandid *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*

Druh kandidy	Počet identifikovaných genů SAP	Vyřešené struktury Sap	Citace	PDB kód
<i>C. albicans</i>	10 (SAP1-10)	Sap2p	Cutfield et al., 1995, Abad-Zapatero et al., 1996, Behnen et al., 2012, Koester et al., 2012	1EAG, 3PVK, 3Q70, 1ZAP
		Sap3p	Borelli et al., 2007	2H6S, 2H6T
		Sap1p a Sap5p	Borelli et al., 2008	2QZW, 2QZX
<i>C. tropicalis</i>	4 (SAPT1-4)	Sapt1p	Symersky et al., 1997	1J71
<i>C. parapsilosis</i>	3 (SAPP1-3)	Sapp1p	Dostál et al., 2009	3FV3

Celková architektura sekretovaných aspartátových proteáz je velmi podobná a je blízká klasické struktuře prasečího pepsinu (Obr. 5.). Sekundární struktura je tvořená převážně β -listy. U doposud vyřešených struktur Sap byly nalezeny čtyři cysteinové zbytky tvořící dva konzervované disulfidické můstky důležité pro zachování správné třidimenzionální struktury. Enzym je tvořen dvěma doménami, mezi nimiž se nachází velká vazebná dutina pro vazbu substrátu. V centru vazebné dutiny je aktivní místo enzymu, do něhož obě domény přispívají jedním katalytickým aspartátem. Důležitým prvkem aktivního místa všech Sap je flexibilní struktura podobající se smyčce složená ze zbytků aminokyselin 74-86 (pepsin), jež tvoří tzv. chlopeň aktivního místa (obr. 6.). Tato struktura je klíčová pro interakci se substrátem/inhibitorem, neboť vytváří ideální pozici pro tvorbu vodíkových můstků mezi enzymem a substrátem/inhibitorem (Obr. 6.). Srovnáním s ostatními členy skupiny aspartátových proteáz mají Sap delší dobře definovanou dutinu aktivního místa, což poukazuje na jejich širokou substrátovou specifitu (Cutfield et al., 1995; Abad-Zapatero, 1996).



Obr. 5.: Struktura prasečího pepsinu, červeně jsou zvýrazněny katalytické zbytky aspartátů, modře 4 cysteiny (Sielecki, 1990, PDB ID: 4PEP)

Tab. 3.: Přehled aminokyselin aktivního místa tvořících vodíkové můstky s inhibítorem Pepstatinem A u sekretovaných aspartátových proteáz *C. albicans*, *C. parapsilosis* a lidského pepsinu

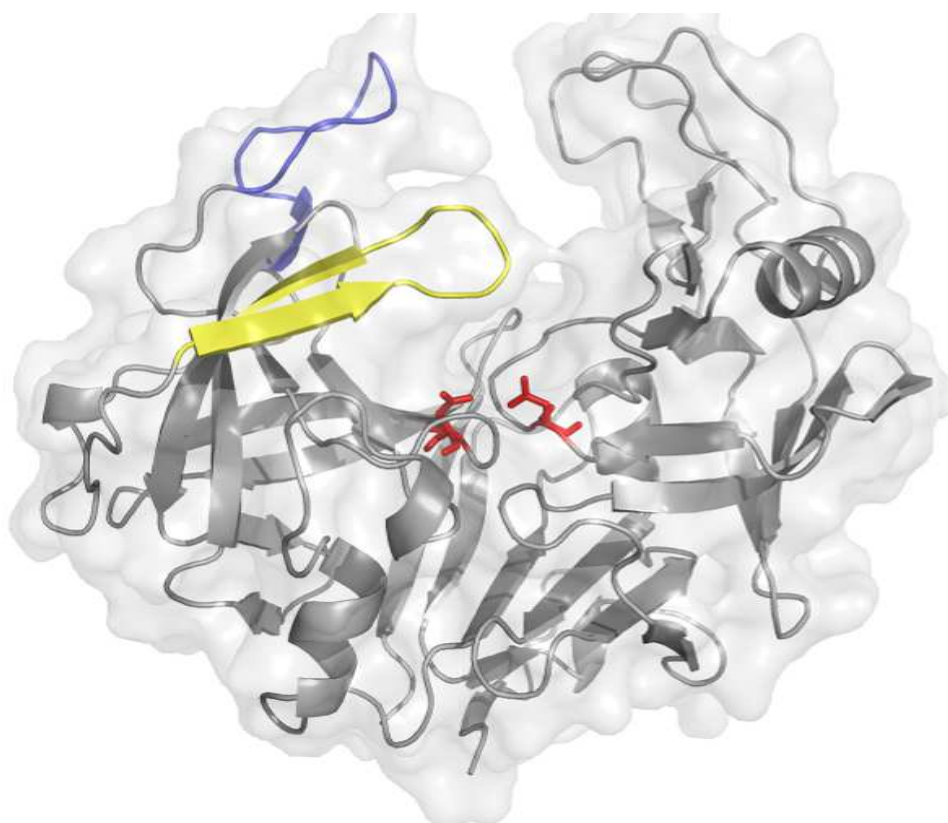
Submísta	Sap2p	Sapp1p	Pepsin
S1	Asp32	Asp32	Asp32
S1'	Gly34	Gly34	Gly34
S1'	Asp218	Asp220	Asp215
S2		Tyr78	Thr77
S2	Gly85	Gly79	Gly76
S2	Asp86	Asp80	
S2'			Tyr189
S3	Gly220	Gly222	Gly217
S3		Thr223	
S3'			Thr74
S4	Thr222	Thr224	Ser 219

Významné strukturální rozdíly nalezneme i mezi jednotlivými izoenzymy Sap. Nejvýznamnější změny se týkají struktury okolí aktivního místa enzymu, jež určuje specifitu vazby pro substrát.

Sap *C. albicans*

Zatímco celková struktura Sap2p odpovídá typické struktuře aspartových proteáz (vztaženo ke struktuře prasečího pepsinu), několik inzercí a delecí v primární sekvenci mění strukturu aktivního místa. Dlouhá inserce mezi Cys 47 a Cys 59 tvoří širokou smyčku, která vyčnívá směrem k aktivnímu místu a tak ovlivňuje vstup do vazebného místa. Tato smyčka je stabilizována interakcí Gln 54 se zbytky 50 a 51 hlavního řetězce. Delece 7 aminokyselin mezi Ser118 a Gln121 rozšiřuje kapsu S3. Na C-konci má Sap2p oproti pepsinu 12 aminokyselinovou inserci.

Srovnání čtyř dostupných struktur Sap *C. albicans* poukazuje na odlišnost Sap5p od Sap1-3p. Celkový náboj povrchu aktivního místa je u všech izoenzymů negativní. Srovnáme-li ovšem náboj celkového povrchu enzymu, zjistíme, že se liší. Celkový povrch Sap1-3p je negativní, zatímco povrch Sap5p je naopak pozitivní. Významné rozdíly najdeme ve struktuře vnější části kapsy vázající substrát (S4, S3, S2') (Tab. 3.). Dále je odlišná šíře vstupu do aktivního místa, kdy na rozdíl od užšího vstupu Sap5p vykazují Sap1-3 otevřenější strukturu (Borelli et al., 2008). Koelsch et al. studovali substrátové specifity čtyř izoenzymů Sap *C. albicans* Sap1-3p a Sap6p. Sap1p, 2 a 6 preferují na pozici P2 a P1 substrátu Phe a Leu, Tyr a Ala. Sap3 naopak preferuje na stejném místě Leu následovaný Arg. Na P1' pozici substrátu mají všechny čtyři izoenzymy široké specifity s vyšší preferencí pro hydrofobní aminokyseliny.



Obr. 6.: Struktura Sap2p, žlutě je zvýrazněna chlopeč aktivního místa, modře inserce mezi Cys 47 a Cys 59 tvořící smyčku, červeně katalytické zbytky aspartátů (Abad-Zapatero, 1996; PDB ID: 1ZAP)

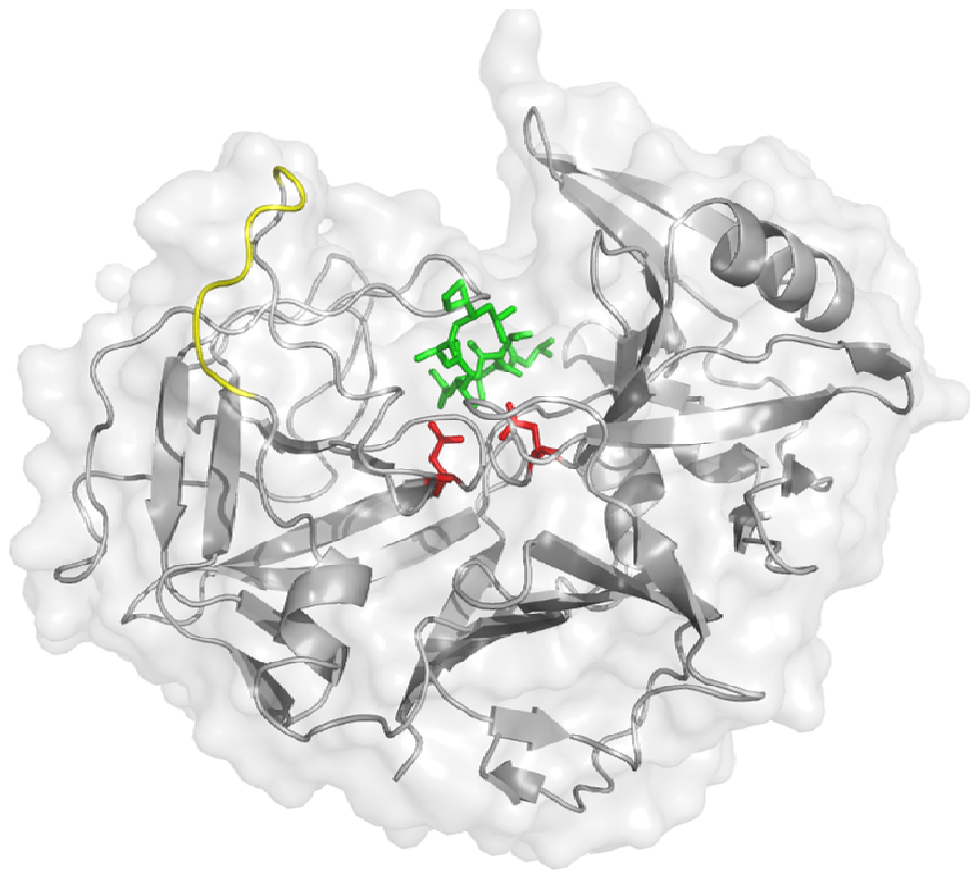
Sap *C. tropicalis*

Proteinová struktura sekretované aspartátové proteázy Sapt1p *C. tropicalis* byla určena Symersky et al. v rozlišení 1,8 Å. Strukturální srovnání s pepsinem naznačují, že inserce a delece v primární sekvenci vedly k vytvoření prostornější dutiny pro vazbu substrátu (Symersky et al., 1997). Studie substrátových specifit ukázaly, že je Sapt1p senzitivní vůči acidobazickému charakteru aminokyseliny substrátu v pozici P2. Nejvyšší katalytické hodnoty byly v pozici P2 naměřeny pro Lys a Arg, pro Ala byly pětkrát nižší a v případě Asp až desetkrát. Preference zásaditých aminokyselin v pozici P2 souhlasí s kyselým charakterem S2 aktivního místa (Gly74) (Fusek et al., 1994).

Sap *C. parapsilosis*

Proteinová struktura Sapp1p s inhibitorem Pepstatinem A vyřešená Dostál et al. 2009 představuje první strukturu Sap z *C. parapsilosis* a celkově druhou strukturu proteinu z *C. parapsilosis* vůbec. Srovnáním struktury Sapp1p s ostatními známými Sap odhalilo rozdíly ve struktuře smyčky kolem aktivního místa, jež vysvětluje odlišnou substrátovou specifitu a různé afinity k testovaným inhibitorům. Sapp1p má o mnoho negativnější povrch aktivního místa než výše zmíněné izoenzymy Sap *C. albicans* a *C. tropicalis*, což v jeho případě vede k větší senzitivitě vůči inhibitoru Pepstatinu A. V primární sekvenci Sapp1p byla nalezena inzerce v pozici 130-137, ovšem struktura vzniklá touto inzercí se nachází vzdáleně od aktivního místa (Obr. 7.) (Dostál et al., 2009).

Z biochemických studií hodnotících substrátovou specifitu a katalytickou aktivitu štěpení izoenzymů Sapp1p a Sapp2p vyplývá, že je Sapp2p méně efektivní proteáza než Sapp1p (Merkerová et al., 2006; Hrušková-Heidingsfeldová, 2009). Jelikož struktura Sapp2p nebyla prozatím vyřešena, pokusila se studie Hruškové-Heidingsfeldové o srovnání pomocí teoretických strukturních modelů. V primární sekvenci Sapp2p se nachází pro aspartátové proteázy častá inzerce 293-296, jež může mít na základě teoretické struktury modelu různá strukturální uspořádání vzhledem k aktivnímu místu. V konzervované sekvenci aktivní smyčky najdeme lysin v pozici 81 a inzerci Arg75. Na rozdíl od klasického počtu dvou disulfidických můstků u všech doposud vyřešených struktur Sap byl ve struktuře Sapp2p predikován další třetí disulfidický můstek. Odlišné je i aminokyselinové složení C-koncové části obsahující aromatické a nabitě aminokyseliny, jež nenalezneme u žádných známých Sap (Hrušková-Heidingsfeldová, 2009).



Obr. 7.: Struktura Sapp1p *C. parapsilosis*, zeleně je znázorněn inhibitor Pepstatin A, červeně katalytické aspartáty aktivního místa, žlutě inserce 130-137 (Dostál et al., 2009; PDB ID: 3FV3).

2.11. Inhibitory Sap

Vzrůstající rezistence kandid vůči klasickým antimykotikům se stala podnětem pro vývoj nových léků. Jedním z možných řešení mohou být inhibitory sekretovaných aspartátových proteáz. Tradičně jsou inhibitory proteáz vyvíjeny na základě nalezeného přírodního produktu s cílem najít inhibiční složku s následnou optimalizací, či pomocí empirických metod vazby substrátu. Optimalizace u inhibitorů peptidové povahy zahrnuje záměnu hydrolyzovatelné amidové vazby za nehydrolyzovatelnou a další strukturní změny zvyšující afinitu inhibitoru k enzymu (Dash et al., 2003).

Nejznámějším z inhibitorů aspartátových proteáz je hexapeptid ze Streptomycet Pepstatin A (PepA), který inhibuje Sap již při nanomolárních koncentracích. Hexapeptid obsahuje centrální zbytek statinu s neštěpitelnou vazbou (-CHOH-CH₂-), která tvoří vodíkové můstky s hydroxylovými skupinami dvou katalytických aspartátů v aktivním místě. O tom, že by PepA mohl být potenciálně účinným

lékem, svědčí studie Ruchel et al., která popisuje pozitivní efekt Pepstatinu A při infekci břišní dutiny myši druhem *C. albicans*. Naopak při nákaze nitrožilně byl PepA neúčinný (Ruchel et al., 1990). Vliv Pepstatinu A byl pozorován spíše při počátečních stádiích infekce a v případě povrchových infekcí, kdy snižoval schopnost kvasinky adherovat na hostitelskou tkáň (Fallon et al., 1997). Alternativou Pepstatinu A mohou být jeho peptidové varianty (tzv. peptidomimetika) se selektivním inhibičním účinkem. Inhibiční konstanty peptidomimetik Pepstatinu A liší se typem neštěpitelné vazby a C-koncovými modifikacemi byly stanoveny pro Sap2p, Sapt1p, Sapp1p a Saplp (Pichová et al., 2001).

Inhibitor Sap2p A-70450, peptidový analog Pepstatinu A, byl původně navržen jako inhibitor reninu. Později bylo zjištěno, že funguje jako neselektivní inhibitor Sap *C. albicans*. Inhibitor A-70450 obsahuje (S)-hydroxyethylen isoester s hydroxylovou skupinou vázající se do struktury mezi dva katalytické aspartáty. Od ostatních peptidových inhibitorů Sap se liší pozicí P3, kde je amid v P3 uzavřen do ketopiperazinového kruhu (Abad-Zapetero et al., 1996; Dash et al., 2003).

Inhibitory HIV proteázy jako je Ritonavir, saquinavir, indinavir a nelfinavir, jež jsou součástí vysoce aktivní antiretrovirální terapie (HAART) pro léčbu pacientů s AIDS, byly testovány také jako inhibitory Sap. Při podávání HAART byly zaznamenány pozitivní účinky u pacientů, kteří zároveň trpěli ústními kandidózami. Bylo prokázáno, že některé inhibitory HIV proteázy inhibují Sap v mikromolárních koncentracích (Pichová, 2001). Patrná inhibice byla pozorována u izoenzymů Sap1-3, zatímco téměř žádný inhibiční efekt nebyl pozorován u izoenzymů Sap4-6 (Monod et al., 1999, Borelli et al., 2008). Strukturní pohled na způsob vazby Ritonaviru do aktivního místa Sapp1p přinesla až krystalová struktura Sapp1p s Ritonavirem publikována Dostál et al., 2012.

3. Genom kandid

3.5. Geny spojené s virulencí

C. albicans je blízce příbuzná kvasinca *S. cerevisiae*, která je široce využívána jako modelový organismus buněčné biologie a genetiky. Genetické manipulace jsou ovšem u *C. albicans* složitější než u *S. cerevisiae* hlavně díky absenci pohlavního cyklu, obligátnímu diploidnímu stavu genomu, nižší frekvenci homologní rekombinace a nestandardnímu genetickému kódu (Kim, Sudbery 2011). *C. albicans* byla nicméně první eukaryotický patogen, jehož genom byl kompletně přečten (Jones et al., 2004) a anotován (Braun et al., 2005). DNA haploidního genomu *C. albicans* je uspořádána do 8 chromozómů a obsahuje 6109 genů kódující proteiny (Scherer et al., 1998).

Přečtení genomu *C. albicans* umožnilo komparativní genomové analýzy mezi kvasinkou *C. albicans* a *S. cerevisiae*. I když přibližně 90 % všech genů *S. cerevisiae* mají protějšek v *C. albicans*, 6 až 7 % genů *C. albicans* v genomu *S. cerevisiae* nenajdeme. Zajímavé je, že geny, které pravděpodobně nemají žádný ekvivalent v *S. cerevisiae*, mají tendenci se soustřeďovat do proteinových rodin a jsou spojovány s virulencí *C. albicans*. Příkladem mohou být sekretované aspartátové proteázy (*SAP*) nebo rodina povrchových glykoproteinů *ALS* (Naglik et al. 2003). Rozdíly mezi *C. albicans* a *S. cerevisiae* najdeme také v genech účastnících se respirace, jelikož *C. albicans* roste primárně aerobně, zatímco *S. cerevisiae* odráží fermentační způsob života. Mitochondriální genom *C. albicans* vlastní geny pro NADH dehydrogenázový komplex, který nenajdeme u *S. cerevisiae*. Ta kóduje pouze jediný peptid NADH dehydrogenázy. NADH dehydrogenázový komplex neslouží *C. albicans* jen pro respiraci, ale může hrát důležitou roli také při tvorbě filament (Braun et al., 2005). Další rozdíly odrážející jiný způsob života v rozdílném prostředí najdeme v signální transdukcii, regulačních drahách a metabolismu. Pozoruhodným rysem genomu kandid je přítomnost MRS (major repeat sequence) opakujících se elementů, jež umožňují vznik translokací (Naglik et al. 2003).

Navzdory tomu, že je *C. albicans* lidským patogenem, je populací přenášena většinou bezpříznakově. Jaké jsou tedy rozdíly mezi populací kandid žijících jako komenzál a populací kandid z klinických izolátů? Jsou určité geny pod negativní nebo pozitivní selekcí? Ke zjištění, zdali existují geny typické pro patogenní kmeny kandid, by posloužily sekvenace genomů některých dalších kmenů patogenních a nepatogenních kandid a jejich porovnání.

Cenným přínosem je srovnání genomů dvou blízce příbuzných druhů kandid - velmi patogenní *C. albicans* a mírně patogenní *C. dubliniensis*. Přestože jsou si oba druhy evolučně velmi

blízké, jejich patogenita se významně liší. Fenotypově jsou si obě kvasinky velmi podobné a je těžké klinické izoláty mezi sebou rozlišit. Klíčovým rozdílem je, že *C. albicans* je dominantní lidský patogen. *C. albicans* je příčinou 50-65 % systémových infekcí kandid. *C. dubliniensis* byla identifikována v krevních vzorcích jen zřídka (Tortorano et al., 2004). Jejich geny mají 89-98% identitu. Rozdíly byly nalezeny v genech *ALS* (*ALS* *C. dubliniensis* mají odlišnou délku a složení 3' konce). Z rodiny *SAP4-6* sekretovaných aspartátových proteáz vlastní *C. dubliniensis* pouze *SAP4*. Rodina *SAP4-6* je u *C. albicans* exprimovaná hlavně ve formě hyfy a je spojována se schopností kvasinky snadno adherovat na hostitelskou tkáň (Jackson et al., 2009; Moran et al., 2012).

Rozdíly objevené na genomové úrovni dvou blízkých druhů s rozdílnou patogenitou nám mohou pomoci k identifikaci některých genů pravděpodobně se účastnících virulence. Zároveň je ale důležité mít na paměti, že i když se homolog genu *C. albicans* nachází u *C. dubliniensis*, neznamená to, že je exprimovaný se stejnou silou, podléhá stejné regulaci, má stejnou aktivitu apod.

3.6. Alternativní překlad CUG kodónu

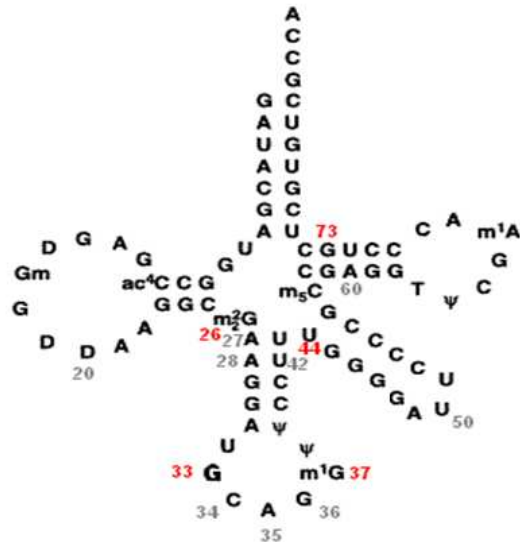
Některé kvasinky rodu *Candida* (více jak 75 druhů) a *Debaryomyces* překládají standardní leucinový kodón CUG častěji serinem. Četnost dosazení serinu se liší u jednotlivých druhů. Příkladem může být CUG kodón *C. cylindracea*, jež změnil svou identitu úplně na serin. Jiné druhy jako jsou *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *C. lusitaniae* a *C. tropicalis* překládají CUG kodón dvojznačně. *C. glabrata*, jež je více příbuzná kvasince *S. cerevisiae* než ostatním kandidám, překládá CUG kodón standartně leucinem (Santos et al., 1995; Sugita et al., 1999).

Ukázalo se, že dvojí specifita CUG kodónu se vyvíjela pomocí mechanismu zahrnujícího dvojznačné kódování zprostředkované unikátní tRNA_{CAG}, která je častěji aminoacylována serinem než leucinem. Rozdíly v četnosti překladu serinem místo leucinu způsobují rozdíly ve struktuře tRNA_{CAG}^{Ser}, respektive různé determinanty pro rozpoznání Ser-tRNA-syntetázou (SerRS) a Leu-tRNA-syntetázou (LeuRS) (Obr. 8.).

Determinanty pro seryl-tRNA-syntetázu: Guanin na pozici 73, kde je záměna guaninu za adenin dostačující ke změně leu-tRNA na serinový akceptor (Breitschopf, et al., 1994).

Determinanty pro leucyl-tRNA-syntetázu: Methyl-1-guanin v pozici 37 a adenin v pozici 35 (Tuite et al., 1996).

Příkladem dvojznačné tRNA_{CAG} je tRNA_{CAG} *C. albicans*, jež obsahuje methyl-1-guanin v pozici 37 a adenin v pozici 35 v antikodónu, což jsou prvky pro LeuRS, ale guanin v pozici 73 je specifický pro SerRS (Obr. 7.).



Obr. 8.: Struktura tRNA_{CAG} *C. albicans*

Methyl-1-guanin v pozici 37 a adenin v pozici 35 jsou prvky rozeznávané LeuRS. Guanin v pozici 73 je specifický pro SerRS (Převzato a upraveno podle Santos et al., 1993).

3.7. Důsledky dvojznačného překladu CUG kodónu

Práce Gomesse et al., 2007 studovala pravděpodobnost inkorporace leucinu za serin u druhu *C. albicans* při různých stresových podmínkách. Výsledkem bylo zjištění, že pravděpodobnost překladu CUG kodónu leucinem se zvýšila po expozici kvasinky mírnému stresu až na 4,95 % (stres byl vyvolán snížením pH prostředí). Experiment, kde byl kvasinice *C. albicans* inkorporován plasmid s genem pro tRNA_{CAG}Leu ze *S. cerevisiae* překládající CUG kodón pouze leucinem ukázal, že *C. albicans* toleruje až 28,1 % leucinových mis-inkorporací. V haploidním genomu *C. albicans* se nachází 13 074 CUG kodónů rozložených mezi 66 % genů s frekvencí 1-38 CUG kodónů na gen. Důsledkem dvojznačného překladu může být skutečnost, že každá kvasinka může mít individuální kombinaci proteinů. Dvojznačnost CUG kodónu potencionálně rozšiřuje proteom kvasinky a umožňuje ji vytvářet důležitou fenotypovou diverzitu (Gomes et al., 2007).

Dvojznačnost CUG kodónu byla tolerována některými kandidami více jak 170 miliónů let (Miranda, 2007; Santos, 1995). Nestandartní kódování zřejmě ovlivnilo zastoupení kodónů pro leucin

v otevřených čtecích rámcích. Rodina kodónů CUN, do které patří CUG, je u kandid s nestandardním překladem užívána zřídka. Nízké zastoupení CUG kodónu dobře koreluje s nízkým zastoupením tRNA_{CAG}Ser (Santos et al., 1993; Santos et al., 1995). Srovnání genomů *C. albicans* a *S. cerevisiae* ukázalo jak je všech 17 000 CUG kodónů z *C. albicans* representováno v *S. cerevisiae*. Zjištěním bylo, že většina současných CUG kodónů přítomných v genomu *C. albicans* odpovídá kodónům pro serin v *S. cerevisiae*, tudíž se pravděpodobně vyvinula nedávno z kodónů pro serin. Pouze malá frakce CUG kodónů (0,2 %) z *C. albicans* existuje analogicky v *S. cerevisiae* jako kodón pro leucin. To znamená, že většina původních CUG z genomu *C. albicans* vymizela. Původní CUG u *C. albicans* mutovaly na leucinové kodóny UUA a UUG (Santos et al., 1995). Výjimkou je druh *C. cylindracea*. CUG kodón kvasinky *C. cylindracea* je na rozdíl od CUG kodónu *C. albicans* hojně využívaný. Vysvětlením je pravděpodobně skutečnost, že *C. cylindracea* překládá CUG kodón výhradně serinem nikoli dvojznačně (Santos et al., 1993; Santos et al., 1995).

Dvojznačnost překladu CUG kodónu nebyla zřejmě konstantní po celou dobu evoluce genetického kódu. Byla vysoká v počátečních fázích změny identity a postupně se snižovala díky vymizení genu pro tRNA_{CAG}Leu z genomu předka. O rekonstrukci situace, kdy byla dvojznačnost na vysoké úrovni, se pokusila studie Miranda et al., 2007. Umožnila tak pohled na genetický chaos vytvořený na počátku změny identity. Zvýšení frekvence dosazování leucinu bylo dosaženo zavedením genu pro tRNA_{CAG}Leu ze *S. cerevisiae* do genomu *C. albicans*. Tyto tRNA_{CAG}Leu soutěžily o místo na ribozomu s tRNA_{CAG}Ser. Předpokladem bylo, že tyto genetické manipulace zvýší CUG dvojznačnost a odhalí fenotypy spojené s dvojznačností CUG kodónů v *C. albicans*. Výsledkem exprese tRNA_{CAG}Leu v *C. albicans* byla morfogeneze kvasinky. Klony jevíly rozsáhlé morfologické variace a produkovaly velmi heterogenní buněčné populace obsahující protáhlé vejčité buňky, pseudohyphy i pravé hyfy. Zvýšila se adheze buněk v kapalných i pevných médiích. Zvýšení adheze souhlasí s faktem, že více než 50 % genů spřažených se schopností buňky adherovat, obsahuje kodóny CUG (např. *ALS* rodina genů). Nahrazení původního serinu leucinem na pozicích CUG v genech pro adhezi *ALA1*, *EAP1*, *ALS1* a *ALS5* zvyšovalo přilnavost kvasinky. Výsledkem byla také zvýšená exprese genů *HWP1* a *WOR1* (Hwp1p zprostředkovává připojení buněk *C. albicans* k lidským endoteliálními a epiteliálními buňkám, Wor1p je spojován s lepší přilnavostí na polystyren). Významná byla také zvýšená exprese genu *HGC1* (protein spřažený s cyklinem G1), který hraje roli při morfogenezi hyf. Z pozorování kolonií testovaných klonů vyplynulo, že došlo také k zvýšení počtu ploidií a chromozomálních přestaveb (ty mohou vést ke vzniku rezistence vůči antimykotikům, k adaptaci na alternativní zdroje uhlíku apod.). Výše zmíněné výsledky naznačují, že vzniklá

dvojznačnost mohla zrychlit proces vzniku variability genomu a tím umožnit vznik nových fenotypů (Miranda et al., 2007).

3.8. Vliv alternativního překladu na funkci a strukturu proteinů kandid

Existují studie, jež se zabývaly vlivem alternativního překladu CUG kodónu na funkci nebo strukturu konkrétních proteinů. Jednou z nich je studie z laboratoře Cutfielda z roku 2000, jež se věnuje důsledku alternativního překladu CUG kodónu na strukturu exo-1,3-glukanázy kvasinky *C. albicans*. Exo-1,3-glukanáza je enzym buněčné stěny účastnící se metabolismu glukanu. V sekvenci genu *EXG* se nachází dva CUG triplety. V pre-pro-signální části (pozice -17) a na povrchu struktury enzymu v pozici 64. Předpokladem bylo, že záměna polární aminokyseliny za vysoce hydrofobní aminokyselinu bude doprovázena změnou ve struktuře nebo změnou povrchového charakteru proteinu. Výsledkem studie bylo, že obě místa tolerují záměnu Ser za Leu bez významných změn ve struktuře proteinu (Cutfield et al., 2000).

Další prací zabývající se vlivem alternativního překladu CUG kodónu byla studie na translačním iniciačním faktoru 4E *C. albicans*. Translační iniciační faktor 4E je u všech eukaryotních organismů vysoce konzervovaný a nepostradatelný protein zastávající důležitou funkci při iniciaci translace jako součást komplexu vázajícího strukturu čepičky mRNA. V sekvenci genu se CUG kodón nachází v pozici 116 a ve struktuře se jeho překladem Ser/Leu vyskytuje ve smyčce, která může hrát klíčivou roli při regulaci iniciace translace. Varianty translačního iniciačního faktoru 4E *C. albicans* 4ELeu116 a 4ESer116, které se přirozeně v kvasince vyskytují díky dvojznačnému kódování, jevíly odlišnou citlivost na zvýšenou teplotu. Varianta 4ESer116 byla více odolná vůči zvýšené teplotě. Mezní teplotní hodnota pro kvasinku s 4ELeu116 variantou byla 35-35,5°C a zároveň u ní byla vyzorována nižší schopnost růstu v semi-tolerantní teplotě 34°C. Doba zdvojení se prodloužila na 6 hodin z původních 2,5. Kvasinky obsahující 4ESer116 byly schopné růst i při 37°C. Alternativní překlad CUG kodónu může v tomto případě zapříčinit produkci proteinů 4E s různou aktivitou při různých teplotách. Jednou z možných selekčních výhod by mohla být optimalizace syntézy proteinů v různých podmínkách (Feketová et al., 2010).

Studie Asleson et al., 2001 věnovala pozornost genu *CaSLA2* *C. albicans*. Produkt genu *CaSLA2* slouží *C. albicans* pro přepínání mezi formou blastospor a formou hyfy. Kódující sekvence

CaSLA2 obsahuje jeden CUG kodón (pozice 161). V tomto případě neměl alternativní překlad CUG kodónu vliv na funkci proteinu (Asleson et al., 2001).

Z předkládaných studií vyplývá, že je doposud poměrně málo známo o vlivu alternativního překladu CUG kodónu na funkci a strukturu konkrétních proteinů. Výsledný efekt zřejmě závisí na pozici CUG kodónu ve struktuře. Zdá se dosazovaný serin/leucin vyskytuje ve smyčce a ta interaguje s dalšími proteiny, nebo poblíž aktivního místa, či na povrchu proteinu.

4. Cíle diplomové práce

Má diplomová práce se věnuje izoenzymům sekretovaných aspartátových proteáz Sapp1p a Sapp2p z kvasinky *Candida parapsilosis*.

První část byla zaměřena na řešení proteinových struktur Sapp1p a Sapp2p. Cílem bylo nalézt vhodné podmínky krystalizace izoenzymu Sapp1p ve vazbě se souborem peptidových inhibitorů a izoenzymu Sapp2p v komplexu s Pepstatinem A.

Druhým cílem bylo přispět k objasnění vlivu alternativního překladu CUG kodónu na funkci a strukturu izoenzymu Sapp1p. Výchozím podnětem byla skutečnost, že nukleotidová sekvence genu *SAPP1* obsahuje jeden CUG triplet, jehož alternativní překlad serinem/leucinem se ve struktuře proteázy nachází ve smyčce poblíž aktivního místa (Obr. 24.).

Cíle diplomové práce v bodech:

1) Rentgenostrukturní analýza izoenzymů Sapp1p a Sapp2p

- a) Srovnání vazby vybraných inhibitorů do aktivního místa ve struktuře izoenzymu Sapp1p
- b) Krystalizace izoenzymu Sapp2p v komplexu s Pepstatinem A

2) Vliv alternativního překladu CUG kodónu u izoenzymu Sapp1p

- a) Výskyt jednotlivých variant Sapp1p-193Leu a Sapp1p-193Ser vzniklých vlivem alternativního překladu ve vzorcích z klinického izolátu *C. parapsilosis* – Hmotnostně spektroskopická analýza
- b) Vliv alternativního překladu CUG kodónu na strukturu Sapp1p
- c) Porovnání biochemických vlastností rekombinantní Sapp1p a autentické Sapp1p ve vztahu k alternativnímu překladu CUG kodónu

5. Experimentální část

5.5. Materiály a přístrojové vybavení

5.5.1. Použité chemikálie

Agar	HiMedia	Indie
Akrylamid	Fluka	Švýcarsko
Ampicilin	Spofa	ČR
bromfenolová modř	Lachema	ČR
Coomassie Brilliant Blue	Serva	Německo
Dimethylsulfoxid	Fluka	Švýcarsko
dusičnan stříbrný	Lachema	ČR
Formaldehyd	Lachema	ČR
hydroxid sodný	Lachema	ČR
hovězí sérový albumin	Imuna	Slovensko
chlorid sodný	Lachema	ČR
JCSG Core I Suite	Qiagen	USA
kyselina chlorovodíková	Lachema	ČR
kyselina octová	Lachema	ČR
kyselina fosforečná	Lachema	ČR
LB médium	Sigma	USA
Lysozym	Sigma	USA
Methanol	Penta	ČR
2-merkптоethanol	Fluka	Švýcarsko

Močovina	Lachema	ČR
PEGs Suite	Qiagen	USA
Pepstatin	Sigma	USA
PMSF	Sigma	USA
Savo	Bochemie	ČR
SDS	Sigma	USA
Skim Milk Powder	Becton Dickinson	USA
Tris-HCl	Sigma	USA
TEMED	Fluka	Švýcarsko
TFA	Fluka	Švýcarsko
Trypsin	Fluka	Švýcarsko
Yeast Carbon Base	Sigma	USA

5.5.2. Přístrojové vybavení

Analytické váhy	Mettler AE 163	Švýcarsko
Blotovací zařízení	Semi-Phor, Hoefer Scientific Instruments	USA
Centrifugy	Beckman J2-MI	USA
	Beckman J-30I	USA
	Eppendorf 5415C	Německo
FPLC kolony	Mono P™ 5/200 GL, GE Healthcare	ČR
	Hi load™ 16/60 Superdex™ 75 pg	ČR
	GE Healthcare	

Fotoaparát	Olympus E-620	Japonsko
FPLC	Akta Explorer, GE Healthcare	ČR
Hmotnostní spektroskop	AB SCIEX TripleTOF™ 5600 s HPLC systémem Dionex ULTIMATE 3000	
HPLC	Agilent 1200, Agilent Technologies	USA
HPLC kolona	SB-C18 1,8 µm, Agilent Technologies	USA
Ionexový nosič	SP Sepharose fast flow, Sigma-Aldrich	USA
Inkubátor	Merck	Německo
Krystalizační robot Gryphon	Art Robbins, Sunnyvale	USA
Optický mikroskop	Olympus SZX10	Japonsko
Předvážky	AND HL-400	Korea
pH metr	inoLab	ČR
Rotační třepačky	Brunswick-Innova 4300	USA
	Memmert	Německo
Sonikátor	Soniprep 150, Sanyo	Japonsko
Spektrofotometr	Tecan Infinite M1000, Schoeller Instruments	ČR
Termostat	Thermomix BM, B.Braun Biotech International	Německo
X-ray zdroj - rotační anoda	Nonius FR591, Bruker-Nonius	
X-ray detektor	Image plate Mar345, Marresearch	
X-ray optical system	Double mirrors, Bruker-Nonius	
X-ray chladicí zařízení	Nitrogen Gas Low Temperature Cryostat	

Oxford Cryosystems

Zařízení na elektroforézu Bio-Rad USA

5.5.3. Ostatní materiál

dialyzační membrány	Union Carbide	USA
EasyXtal Tool	Qiagen	USA
endonukleáza Glu-C	Roche	Německo
endonukleáza Lys-N	U-Protein Express BV	Nizozemsko
Intelli plate	Art Robbins Instruments	USA
mikrotitrační destičky	Nunc	ČR
molekulové standardy	Serva	Německo
PVDF membrána	Millipore	USA
SE-Sephadex	Pharmacia	Švédsko
Stericup	Millipore	USA
ultrafiltrační membrána	Millipore	USA
Inhibitory trypsinu PMSF, TPLC	Sigma	USA

Plasmid pSIT-pro-Sapp1p, poskytnut Jiřím Dostálem, ÚOCHB AV ČR

Chromogenní substrát KPAEFNphAL, poskytnut Jiřím Dostálem, ÚOCHB AV ČR

Soubor peptidomimetických inhibitorů, poskytnuta Jiřím Dostálem, ÚOCHB AV ČR

Kmeny bakterií a kvasinek

Candida parapsilosis, kmen CP 69, mykologická sbírka Lékařské fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci

Escherichia coli, kmen BL21 (DE3), DH5α

5.6. Metody

5.6.1. Uchovávání kvasinek *C. parapsilosis*

Kmen CP 69 byl uchováván v médiu 18% Skim Milk s přidavkem 15% glycerolu. Kvasinky se v tomto médiu skladují při -70°C . Pro krátkodobé uchování byl kmen přeočkován na Petriho misky se Sabouraudovým agarem a skladován při teplotě 4°C .

5.6.2. Transformace kompetentních buněk *E. coli*

Suspenze kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) byla rozmrazena na ledu a následně do ní byly přidány 4 μl plasmidové DNA (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Po 30 min inkubaci na ledu byly buňky vystaveny 1 min teplotnímu šoku 42°C . Poté byl přidán 1 ml LB média a směs byla kultivována 1 h při 37°C . 200 μl této kultury bylo rozetřeno na Petriho misku s LB agarovou půdou s přidavkem ampicilinu (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Po kultivaci přes noc při 37°C narostly pouze kolonie buněk transformovaných plasmidem.

5.6.3. Exprese rekombinantního proteinu

Koloníí buněk *E. coli* BL21(DE3) transformovaných expresním plasmidem bylo zaočkováno 500 ml LB média s ampicilinem (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Kultivace probíhala na třepačce při 37°C do doby, kdy optická hustota měřená při 550 nm dosáhla hodnoty $\text{OD}_{550} \sim 0,9$. Poté byla indukována exprese proteinu přidavkem 500 μl 1 M IPTG. Kultivace probíhala ještě 3 hodiny a poté byla ukončena odstředěním buněk (4 000 g, 15 min, 4°C).

5.6.4. Izolace a rozpuštění inkluzních tělísek

Buňky obsahující rekombinantní protein byly resuspendovány v TN pufru (50 ml/500 ml kultury). Po přidavku lysozymu (1 mg/g biomasy) probíhala 30 min lyze, která byla ukončena zmražením a následným rozmražením buněk. Vzniklý lyzát byl homogenizován sonikací a poté inkubován s 0,5 g MgCl_2 a 100 μl DNasy (10 mg/ml). Po inkubaci (30 min, 4°C) a odstředění (9 500 g, 15 min, 4°C) byl sediment obsahující inkluzní tělíška třikrát promyt: rozpuštěním pelety v 50 ml promývacího pufru, sonikací a odstředěním (9 500 g, 15 min, 4°C). Promyté inkluze byly resuspendovány v 50 ml

rozpuštěcího pufru vytemperovaného na 42 °C. Nerozpuštěné buněčné zbytky byly odstraněny centrifugací (100 000 g, 30 min, 4 °C).

TN pufr: 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl

promývací pufr: 100 mM Tris-HCl pH 7,0, 2 M močovina, 5 mM EDTA, 2% triton

rozpuštěcí pufr: 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M močovina, 1 mM glycin, 1 mM EDTA, 100 mM merkaptoethanol

5.6.5. Dialýza v gradientu močoviny

Dialýza probíhala v dialyzačním střeově (SpectraPor, cut-off 6-8 kDa) v nádobě s pufrem o nízké iontové síle (0,1 M tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2) při 4°C za stálého míchání. Při dialýze v gradientu močoviny dochází k postupné renaturaci proteinu. Intervaly mezi jednotlivými kroky byly 6 hodin.

Gradient pufrů:

1. 8 M močovina, 0,1 M tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2

2. 4 M močovina, 0,1 M tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2

3. 2 M močovina, 0,1 M tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2

4. 0 M močovina, 0,1 M tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2

5.6.6. Chromatografické metody

Izolace rekombinantních proteinů byla prováděna pomocí FPLC (Akta Explorer, GE Healthcare) na komerčních kolonách. V průběhu chromatografie byla měřena absorbance při 280 nm. Jímané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a Western blotu.

Ionexová chromatografie na katexu

Pro chromatografii byl použit nosič SP Sepharose fast flow. Průtok pufru kolonou byl nastaven na 1 ml/min. Po ekvilibraci ionexu promývacím pufrém (čtyřnásobek objemu kolony) byl na kolonu aplikován vzorek. Po navázání proteinu na nosič následovala eluce gradientem elučního pufru. Proteiny obsažené v roztoku byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

promývací pufr: 15 mM citrátový pufr, pH 4.0

eluční pufr: 1 M NaCl, 15 mM citrátový pufr, pH 4.0

Gelová chromatografie

Gelová chromatografie byla prováděna na komerční koloně Hi load™ 16/60 Superdex™ 75 pg pomocí FPLC. Průtok byl nastaven na 1 ml/min. Po ekvilibraci pufrém byl na kolonu aplikován vzorek dialyzovaný do stejného pufru a zahuštěný na objem 5 ml. Frakce byly jímány po 10 ml.

Pufr: 100 mM Tris-HCl, pH 7,2 (pro izolaci rekombinantního proteinu)

20 mM BisTris, pH 6,2 (pro izolaci autentického proteinu)

Chromatofokusace

Chromatofokusace probíhala na komerční koloně Mono P™ 5/200 GL pomocí FPLC. Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Po ekvilibraci pufrém A byl na kolonu aplikován vzorek (max. 4 mg proteinu na kolonu). Po 10 min byl spuštěn gradient pufru B (100 % za 10 min). Frakce byly jímány po 10 ml.

Pufr A: 20 mM BisTris, pH 6,2

Pufr B: 20% polybuffer™74, pH 4

5.6.7. Zahušťování proteinů

Pro zahušťování proteinů byla použita cela s ultrafiltrační membránou Amicon UM 30, která propouští pouze částice s molekulovou hmotností menší než 30 kDa.

5.6.8. Elektroforéza v SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Pro analýzu proteinů byla použita SDS-PAGE s 5% zaostřovacím a 12% separačním gelem. Vzorky byly rozpuštěny ve vzorkovém pufru a po 3 min denaturace varem nanášeny dle potřeby (cca 5 - 10 µg bílkoviny) do jamek v zaostřovacím gelu. Pro určení velikosti analyzovaných bílkovin byl použit komerční hmotnostní standard Kaleidoscope™ od firmy Bio-Rad. Elektroforéza probíhala v Tris-glycinovém pufru za konstantního napětí 200 V přibližně 45 min. Polyakrylamidový gel byl po ukončení elektroforézy barven stříbrem.

vzorkový pufr: 3 ml 0,5M Tris-HCl, pH 6,8, 2 ml 80% glycerol, 1 ml β-merkaptoethanol, 4 ml 10% SDS, 2 ml 0,1% bromfenolové modři v 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

10x tris-glycinový pufr: 30,2 g Tris báze, 188 g glycin, 100 ml 10% SDS na 1 l vody

Postup pro barvení stříbrem (předpisy na 0,5 l roztoku):

- | | |
|---|------------------|
| 1. 5,7 ml kys. octové, 32 ml methanolu, 0,5 ml 37% formaldehydu | 60 min |
| 2. 250 ml methanolu | 3x15 min |
| 3. 0,1 g Na ₂ S ₂ O ₃ | 1 min |
| 4. H ₂ O | 3x20 s |
| 5. 1 g AgNO ₃ , 0,38 ml 37% formaldehydu | 20 min |
| 6. H ₂ O | 3x20 s |
| 7. 30 g Na ₂ CO ₃ , 2 mg Na ₂ S ₂ O ₃ , 0,25 ml 37% formaldehydu | do vybarvení zón |
| 8. 32 ml methanolu, 5,7 ml kys. Octové | 10 min |
| <i>sušící roztok:</i> 15 ml glycerolu, 200 ml methanolu, 50 ml kys. Octové | 30 min |

5.6.9. Blot pro N-koncovou sekvenaci

Po provedení SDS-PAGE byly gel a filtrační papíry (6 ks) o velikosti gelu 5 min ekvilibrovány v transferovém pufru. PVDF membrána byla ekvilibrována 2-3 s v methanolu, následně 2 min v H₂O a 5 min v transferovém pufru. Po ekvilibraci byly navrstveny do blotovacího přístroje Trans-Blot v pořadí: anoda, 3 filtrační papíry, membrána, gel, 3 filtrační papíry, katoda. Přenos probíhal 20 min za konstantního napětí 15 V. Po ukončení transferu byla membrána obarvena roztokem Coomassie blue. Následovalo odbarvení roztokem 25% methanolu s 10% kys. octovou. Po promytí vodou a vysušení byl proužek s proteinem vystřižen z membrány. Sekvence byla provedena Ing. Zdeňkem Voburkou (ÚOCHB AV ČR) pomocí automatického Edmanova odbourávání na ABI Procise sekvenátoru.

transferový puf: 39 mM glycin, 48 mM Tris-HCl, 0,037% SDS, 20% methanol

roztok Coomassie blue: 10% kyselina octová, 0,006% Coomassie brilliant blue G-250

5.6.10. Stanovení koncentrace bílkovin dle Bradfordové

20 µl analyzovaného vzorku bylo smícháno s 200 µl barevného činidla a inkubováno 5 min na mikrotitrační destičce při laboratorní teplotě. Absorbance vzniklého barevného komplexu bílkoviny s Coomassie Brilliant Blue obsaženým v činidle byla měřena spektrofotometricky na přístroji Tecan Infinite M1000 (Schoeler Instruments) při vlnové délce 595 nm. Ke kalibraci byl použit standardní roztok BSA (1 mg/ml) a koncentrace vzorku byla získána odečtením z kalibrační křivky.

činidlo: 70 mg Coomasie Brilliant Blue G-250, 50 ml 95% ethanolu, 100 ml 85% kys. fosforečné, 850 ml H₂O

5.6.11. Stanovení inhibičních konstant

Kinetické parametry pro studovanou proteázu byly určeny pomocí HPLC (Agilent 1200, Agilent Technologies) s použitím chromogenního substrátu KPAEFNpHAl. Množství substrátu přidávaného do reakce bylo 20 µl ze zásobního roztoku o koncentraci 4mM. Štěpení peptidů pro stanovení inhibičních konstant probíhalo v 150mM citrátovém pufru pH 3,5 při teplotě 37°C. Inhibitory byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu. Množství proteázy, inhibitoru a doba štěpení byly

zvoleny tak, aby konverze substrátu nepřesáhla 30 %. Štěpení bylo zastaveno přidavkem 50 µl 20% trifluoroctové kyseliny (TFA). Reakční směs byla aplikována na HPLC kolonu SB-C18 (Agilent Technologies). Separace probíhala v gradientu methanol/voda (s přidavkem 0,1% TFA) podle elučního programu:

Čas (min)	Procento methanolu (%)
0	5
0,5	5
5	100
5,5	100
6	5
6,5	5

Produkty štěpení byly detekovány při vlnových délkách 220, 280 a 305 nm. Výpočet parametrů K_i byl stanoven z velikosti píků štěpných produktů pomocí rovnice pro kompetitivní inhibici podle Williamse a Morissona:

$$(v_i/v_0)^2[E]_0 + ([E]_0 + [I]_0 - K_i')v_i/v_0 - K_i' = 0$$

K_i' - zdánlivá inhibiční konstanta

v_0 - počáteční rychlost štěpení substrátu

v_i - počáteční rychlost štěpení substrátu v přítomnosti inhibitoru

$[E]_0$ - počáteční koncentrace enzymu

$[I]_0$ - počáteční koncentrace inhibitoru

Přepočet zdánlivé inhibiční konstanty K_i' na skutečnou K_i byl prováděn podle vztahu:

$$K_i = K_i' / (1 + [S]/K_m)$$

$[S]$ - koncentrace substrátu

K_m - Michaelisova konstanta substrátu

5.6.12. Hmotnostní Spektroskopie

Příprava vzorku

Z Coomassie barveného SDS-PAGE byly vyřezány části obsahující požadovaný protein. Ke kouskům gelu bylo přidáno 200 μ l odbarvovacího pufru. Vzorek byl odbarvován 2 x 30 min při teplotě 30°C. Po odbarvení byl gel vysušen pomocí 200 μ l acetonitrilu (ACN). Po zbělení gelu byl ACN odstraněn. K vysušenému gelu bylo přidáno 20 μ l štěpícího pufru s přísadkou 1 μ l 100 mM DTT. Redukční krok probíhal při 65°C po dobu 30 min. Gel byl poté opět vysušen pomocí ACN. Následovala alkylace proteinu. Ke gelu bylo přidáno 1 μ l iodacetamidu (IAA). Kvůli světelné nestabilitě IAA byl vzorek skladován ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 30 min. Po vysušení vzorku pomocí ACN následovalo štěpení enzymem (trypsinem, chymotrypsinem, Asp-N). Ke gelu bylo přidáno 19 μ l štěpícího pufru a 1 μ l roztoku s trypsinem (resp. chymotrypsinem, Asp-N). Vzorek byl štěpen 10 h při 37°C. Po naštěpení vzorku byl roztok odebrán do nové zkumavky a z gelu byly extrahovány zbylé peptidové štěpy. Ke gelu bylo přidáno 50 μ l extračního roztoku 1. Reakce probíhala na ledu v sonikátoru po dobu 15 min. Poté byl roztok odebrán a přidán k předešlému roztoku peptidových štěpů. Ke gelu bylo přidáno 50 μ l extračního roztoku 2. Reakce probíhala na ledu v sonikátoru po dobu 15 min. Poté byl roztok odebrán a přidán ke zbylému roztoku peptidových štěpů. Ke gelu bylo přidáno 50 μ l extračního roztoku 3. Reakce probíhala na ledu v sonikátoru po dobu 15 min. Poté byl roztok odebrán a přidán ke zbylému roztoku s peptidy a vysušen ve vakuové centrifuzě. Po vysušení bylo k peptidům přidáno 30 μ l 0,1% kyseliny mravenčí.

Odbarvovací pufr: 25 mM hydrogenuhličitan amonný v 50% ACN

Štěpící pufr: 10 mg hydrogenuhličitanu amonného rozpuštěného v 2,5 ml H₂O na konečnou koncentraci přibližně 50 mM.

Roztok s trypsinem: trypsin rozpuštěný ve 250 μ l roztoku kyseliny octové (3 μ l kys. octové v 1 ml H₂O) a skladovaný při 70°C

Extrakční roztok 1: 40% (2% TFA a 60% ACN)

Extrakční roztok 2: 60% (2% TFA a 60% ACN)

Extrakční roztok 3: 2% TFA a 60% ACN

Sběr a vyhodnocení dat

Hmotnostně spektrometrické analýzy byly provedeny na zařízení AB SCIEX TripleTOF™ 5600 s HPLC systémem Dionex ULTIMATE 3000 v laboratoři hmotnostní spektroskopie, ÚOCHB AV ČR. Naměřená hmotnostní spektra byla zpracována a interpretována ve spolupráci s Dr. Zuzanou Demianovou, ÚOCHB AV ČR. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí ProteinPilot™ Software.

6. Výsledky a Diskuze

6.1. Rentgenostrukturní analýza izoenzymů Sapp1p a Sapp2p

6.1.1. Exprese a izolace autentické Sapp1p a Sapp2p

Základním krokem každé rentgenostrukturní analýzy proteinů je jejich příprava v dostatečném množství a čistotě. Tyto požadavky je potřeba zohlednit při výběru vhodného expresního systému. V našem případě, kdy cílem byla izolace enzymů Sapp1p a Sapp2p z *C. parapsilosis*, jsme využili přirozené vlastnosti této kvasinky produkovat oba enzymy do média, které obsahovalo jako jediný zdroj dusíku bílkovinu (hovězí sérový albumin, BSA). Studované izoenzymy Sapp1p a Sapp2p byly postupně izolovány z klinického kmene CP 69, získaného z mykologické sbírky Lékařské fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

Prvním krokem izolace byla kultivace *C. parapsilosis* (CP69) v kultivačním médiu o složení (1,2% YCB, 0,2% BSA, pH 4,0). Výchozí objem kultivačního média (4 l) byl zaočkován 5 ml inokula rozrostlé kultury *C. parapsilosis*. Kultivace probíhala v rotační třepačce (220 rpm) při stálé teplotě 30 °C. Po 5 dnech kultivace, kdy byla dosažena největší míra degradace zdroje dusíku (BSA) a současně kultura dosáhla své stacionární fáze, byla kultivace ukončena. Buňky byly od zbytku média odděleny odstředěním (4 000 g, 15 min, 4°C). Supernatant byl následně filtrován přes filtrační zařízení (Stericup- Millipore) s velikostí pórů 22 µm, aby byla zaručena jeho ne-infekčnost. Získaný supernatant, který obsahoval směs izoenzymů Sapp1p, Sapp2p a zbytků BSA byl dále zpracován.

Ionexová chromatografi na katexu

Prvním chromatografickým krokem byla ionexová chromatografie. Cílem bylo zahustit a částečně načistit proteinové složky obsažené v supernatantu. Sterilní supernatant o nízké vodivosti (2-3 mS) a pH 4 byl nanesen na kolonu s výplní SP Sepharose fast flow (Sigma-Aldrich) ekvilibrovanou 15 mM citrátovým pufrům, pH 4. Pro eluci byl použit gradient iontové síly vytvořený 1 M NaCl. Výsledkem chromatografie byl získán cca. 40 ml směsi izoenzymů Sapp1p, Sapp2p a zbytků BSA o průměrné koncentraci 3 mg/ml.

Gelová chromatografie

Vzorky získané z ionexové chromatografie byly následně zahuštěny pomocí ultracentrifugací AMICON Ultra-30 (Millipore, cut-off 30 kDa) na objem 5 ml. Poté následovala gelová chromatografie, která sloužila k oddělení zbylého BSA (66,5 kDa) z média od směsi Sapp1p a Sapp2p. Dělení probíhalo

na koloně Hi load™ 16/60 Superdex™ 75 pg (GE Healthcare), která byla ekvilibrována 20 mM Bis-Tris puforem o pH 6,2. Průtok kolonou byl nastaven na 1 ml/min. Jednotlivé frakce byly jímány po 10 ml. Frakce s vysokou hodnotou A₂₈₀ byly analyzovány pomocí SDS-PAGE a následně zpracovány. Průběh gelové chromatografie společně SDS-PAGE analýzou je znázorněn na obr. 10.

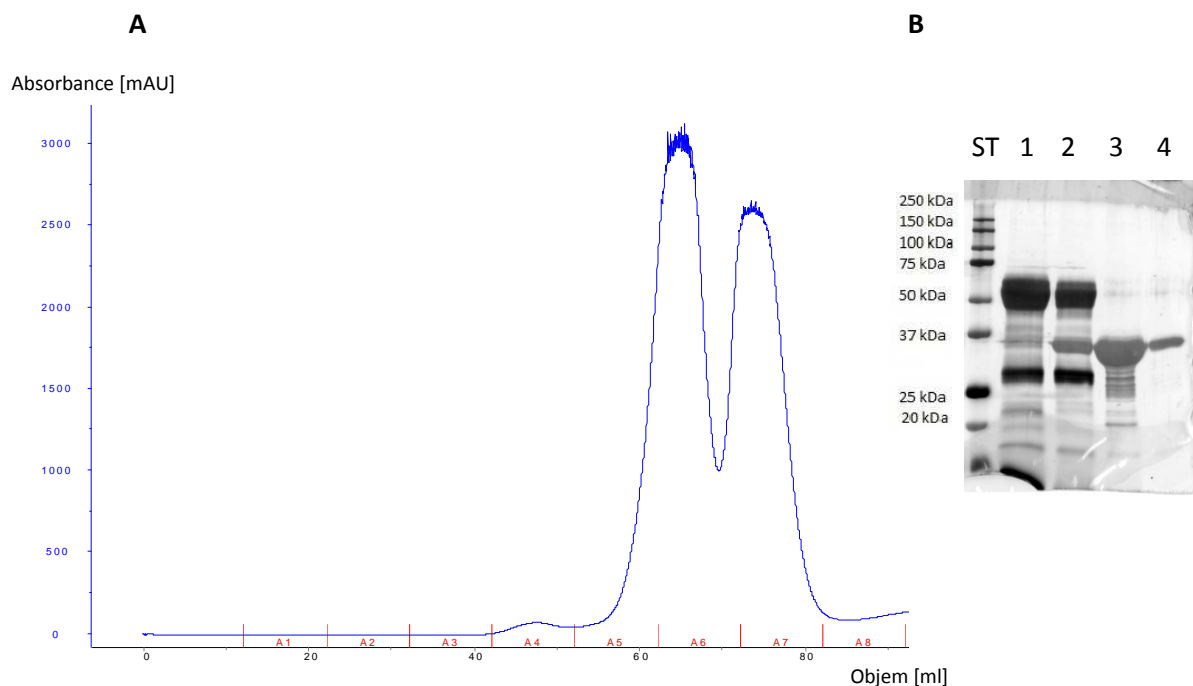
Chromatofokusace

Závěrečným krokem izolace byla chromatofokusace využívající rozdílných izoelektrických bodů izoenzymu Sapp1p (pI 4.5) a Sapp2p (pI 5.2). Frakce získané po gelové chromatografii zbavené BSA byly nanášeny na chromatografickou kolonu Mono P™ 5/200 GL (GE Healthcare) ekvilibrovanou puforem 20 mM Bis-Tris o pH 6,2. Průtok byl nastaven na 0,5 ml/min. Eluce proteinů probíhala klesajícím gradientem pH (20% polybuffer™⁷⁴, pH 4). Frakce byly jímány po 10 ml. Průběh separace je dokumentován na záznamu chromatofokusace (obr. 11. A.). Z něj je patrné, že docházelo k úspěšné separaci obou izoenzymů. Nejdříve se z kolony uvolňoval izoenzym Sapp2p s vyšší hodnotou pI a poté následoval izoenzym Sapp1p. Analýza frakcí s vysokou hodnotou A₂₈₀ byla provedena pomocí SDS-PAGE (Obr. 11. B.). Jelikož mají izoenzymy Sapp1p a Sapp2p podobné molekulové hmotnosti, byla pro jasnou identifikaci provedena N-koncová sekvenace. Ta potvrdila, že počáteční sekvenace produktu prvního píku chromatofokusace odpovídá publikované sekvenci Sapp2p (Obr. 9.). Výsledek N-koncové sekvenace je součástí Příloh (Příloha č. 3.)

Sapp1p: **DSISLSLINE...**

Sapp2p: **SSPSSPLYFE...**

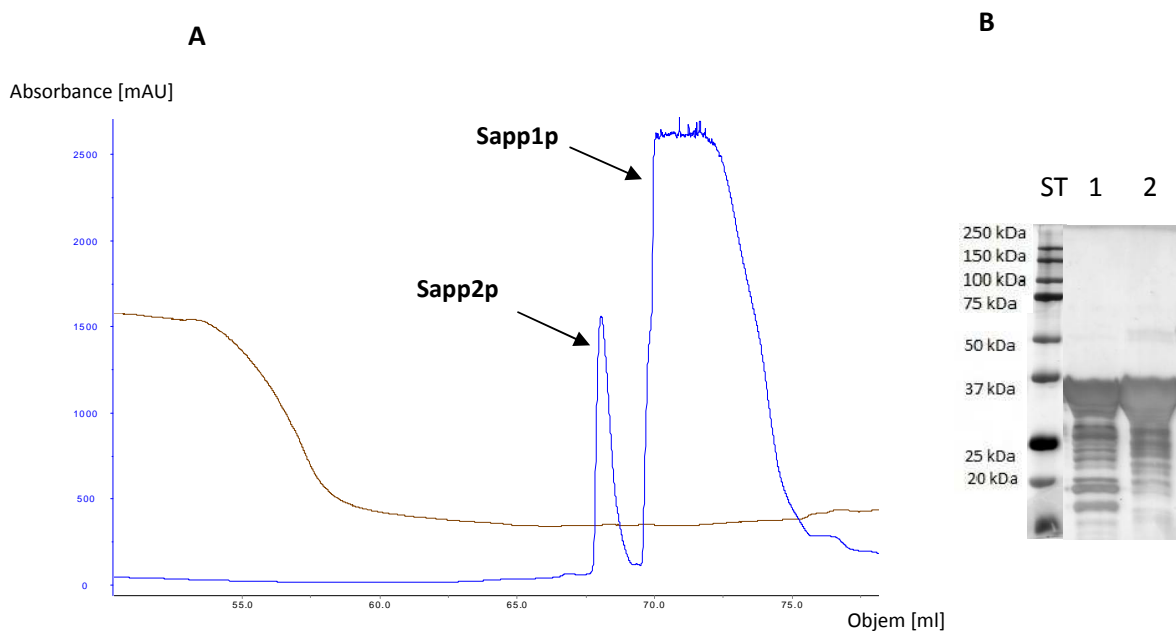
Obr. 9.: Prvních deset aminokyselin sekvenace proteázy Sapp1p a Sapp2p



Obr. 10.:A. Chromatografický záznam gelové chromatografie směsi Sapp1p se Sapp2p

B. SDS-PAGE frakcí z gelové chromatografie směsi Sapp1p a Sapp2p

ST. Molekulový standart, 1. Frakce A5 - hlavně BSA, 2. Frakce A6 - směs BSA, Sapp1p a Sapp2p, 3. Frakce A7 - směs Sapp1p a Sapp2p, 4. Frakce A8 - směs Sapp1p a Sapp2p



Obr. 11.: A. Chromatografický záznam chromatofokuse směsi Sapp1p se Sapp2p

B. SDS-PAGE frakcí z chromatofokuse směsi Sapp1p a Sapp2p

ST. Molekulový standart, 1. Izoenzym Sapp2p, 2. Izoenzym Sapp1p

Průměrná účinnost jednotlivých izolačních kroků je dokumentována v následující tabulce (Tab. 4.). V prvním kroku izolace pomocí ionexové chromatografie se dosahovalo 68% výtěžku (81 mg). Výsledná proteinová složka byla směsí zbytkového BSA, izoenzymů Sapp1p a Sapp2p. V následující gelové chromatografii došlo k oddělení směsi izoenzymů Sapp1p a Sapp2p od zbylého BSA. Průměrný výtěžek u frakcí po gelové chromatografii, které obsahovaly směs izoenzymů Sapp1p a Sapp2p byl 12% (13 mg). Frakce (Obr. 10. B., dráha 2), které vedle Sapp1p a Sapp2p obsahovaly ještě zbytky BSA, tvořily po gelové chromatografii průměrně 7 % (8 mg) výchozího množství. Z důvodu zefektivnění celého procesu byly takto kontaminované vzorky spojeny a použity v dalším kole nové izolace. Závěrečným krokem izolace bylo oddělení izoenzymu Sapp1p od Sapp2p pomocí chromatofokusace. Celkový průměrný výtěžek izoenzymu Sapp2p a izoenzymu Sapp1p jednoho kola izolace byl 1 % (1,2 mg) a 10 % (12 mg). Na rentgenostrukturní analýzu bylo zapotřebí přibližně 10-20 mg proteinu, proto bylo kvůli nízkému výtěžku izoenzymu Sapp2p nutné izolaci několikrát opakovat.

Tab. 4.: Průměrné výtěžky a ztráty v průběhu izolace autentické Sapp1p a Sapp2p

VZORKY	Koncentrace proteinu (mg/ml)	Objem (ml)	Celková hmotnost proteinu (mg)	Výtěžek (%)
ionexová chromatografie				
Supernatant	0,03	4000	120	100
frakce po eluci	2,5	40	100	83
frakce po zahuštění	10,1	8	81	68
gelová chromatografie				
frakce 1 (Sapp1/2p+BSA)	1,1	5	5,5	5
frakce 2 (Sapp1/2p+BSA)	1,8	5	8	7
frakce 3-(Sapp1/2p)	1,2	10	12	10
chromatofokusace				
frakce 1 -Sapp2p	0,6	2	1,2	1
frakce 2-Sapp1p	0,7	17	12	10

6.1.2. Krystalizace izoenzymu Sapp1p se souborem inhibitorů

Základním cílem předkládané rentgenostrukturní studie byla snaha, co nejlépe popsat pomocí strukturních dat vazbu jednotlivých vybraných inhibitorů do aktivního místa izoenzymu Sapp1p a porovnat je s výsledky naměřených inhibičních konstant *in vitro*. Takto získané informace by do budoucna měly pomoci při racionálním návrhu účinnějších a specifitějších inhibitorů Sap. Soubor inhibitorů vybraných k zmapování aktivního místa izoenzymu Sapp1p je zobrazen v Tab. 5. Důvodem pro volbu následujících inhibitorů byla jejich strukturní blízkost se známým inhibitorem aspartátových proteáz Pepstatinem A. Návrh struktur těchto inhibitorů vycházel z cílené substituce některých funkčních skupin ve struktuře Pepstatinu A ve snaze zlepšit jeho inhibiční schopnosti. Současně, díky systematičnosti, poskytoval výsledný soubor přehled o příspěvku jednotlivých funkčních skupin na inhibiční vlastnosti jednotlivých inhibitorů. Dalším důvodem, proč byl vybrán výše zmíněný soubor inhibitorů, byl fakt, že tato série byla již použita pro *in vitro* studie některých sekretovaných aspartátových proteáz z kandida a jsou známy jejich inhibiční konstanty (Pichová et al., 2001).

Posledním vybraným inhibitorem, který jsme zahrnuli do naší studované série, byl inhibitor HIV proteázy Ritonavir. Výběr Ritonaviru pro krystalizaci se Sapp1p byl podnícen studiemi, jež přisuzují Ritonaviru schopnost redukovat infekce způsobené kandidami u pacientů s AIDS léčenými pomocí HAART (vysoce aktivní antiretrovirální terapie). Dříve naměřená a publikovaná inhibiční konstanta Ritonaviru pro Sapp1p je milimolární tzn., že je tisíckrát slabším inhibitorem než peptidomimetické analogy Pepstatinu A. Přesto, s ohledem na výše popsany fakt, by nám mohl detailní pohled způsobu vazby Ritonaviru do aktivního místa izoenzymu Sapp1p poskytnout nové informace a přispět do diskuze o vlivu Ritonaviru při léčbě kandidóz u HIV pozitivních pacientů.

Tab. 5.: Soubor vybraných inhibitorů pro krystalizaci v komplexu se Sapp1p

No.	Inhibitor	Ki (nM)	Strukturní vzorec
KB4 6	BocValValStaAlaStaOH	0,3±0,05	
KB3 2	BocValValPstAlaPstOH	6,6±0,8	
KB7 0	BocValValPstAlaPstNH2	0,1±0,06	
KB7 5	BocValValPstAla(3R,4R)PstOMe	0,4±0,08	
KB7 4	BocValValPstAlaOMe	14,6±1,6	
KB7 1	BocValValPstAlaPstOMe	44±3,7	
KB3 4	BocValVal(3R,4R)PstAlaPstOMe	174±24	
	Ritonavir	1900	

Sta - statinový isoster, Pst - fenylstatinový isoster, Boc - butoxykarbonyl, lva - isovaleryl, OMe - methoxykarbonyl


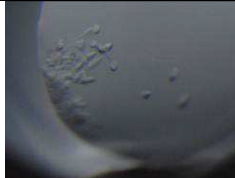




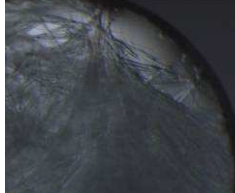
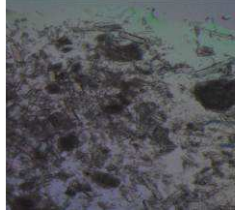
Příprava vzorku

Komplex Sapp1p-inhibitor byl připraven smícháním enzymu s pětinasobným molárním nadbytkem inhibitoru rozpuštěného v dimethylsulfoxidu (DMSO). Směs byla poté zahuštěna pomocí ultrafiltračních cel Amicon Ultra30 (Millipore, cut-off 30 kDa, 10 x 4 min, 13 000 g, 4°C) na koncentraci 13-25 mg/ml.

Krystalizace

Při hledání a optimalizaci krystalizačních podmínek byly použity komerčně dodávané soupravy precipitačních roztoků PEGs suite a JCSG Core I Suite (QIAGEN). Krystalizační podmínky byly hledány pomocí techniky difúze par (vapor diffusion technique). K nalezení vhodných výchozích podmínek byla použita metoda sedící kapky. Pomocí krystalizačního robotu Crystal Gryphon (Art Robbins) byly na 96-jamkovou destičku Intelli-plate (QIAGEN) nanášeny krystalizační kapky. Destičky Intelli-plate umožňovaly testování tří různých koncentrací proteinu. Krystalizační kapka obsahovala 0,2 μ l roztoku komplexu enzym-inhibitor a 0,2 μ l precipitačního roztoku. Objem precipitačního roztoku v rezervoáru byl 50 μ l. Po nanášení kapek byly destičky překryty průhlednou páskou kvůli oddělení od vnějšího prostředí a skladovány při teplotě 18°C. Proces krystalizace byl průběžně jednou denně sledován a vyhodnocován pomocí optického mikroskopu (Olympus ZX10). K tvorbě prvních krystalů docházelo již po 2-4 dnech a to v závislosti na určitém typu komplexu enzym-inhibitor a krystalizačních podmínkách. V následující tabulce (Tab. 6.) jsou shrnuty nalezené krystalizační podmínky pro komplex Sapp1p-KB75. Obdobným způsobem byly hledány krystalizační podmínky i u ostatních komplexů (viz. Příloha č. 1.).

Tab. 6.: Přehled krystalizačních podmínek pro jednotlivé komplexy enzym-inhibitor nalezených metodou sedící kapky v destičce Intelli-plate

Komplex enzym/inhibitor	Krystalizační podmínka	Poloha v destičce	Obrázek krystalu
Sapp1p/KB75	0,1M MES pH 6,5 30% PEG 300	A8	
	0,1M MES pH 6,5 30% PEG 400	A9	
	0,1M MES pH 6,5 25% PEG 550 MME	A10	
	0,1M octan sodný pH 4,6 25% PEG 4000	C2	
	0,1M octan sodný pH 4,6 25% PEG 6000	C3	
	0,1M octan sodný pH 4,6 25% PEG 8000	C4	
	0,2M chlorid lithný 20% PEG 3350	E4	
	0,2M fosfit amonný 25% PEG 4000	H7	

V následujícím kroku bylo nutné z nalezených podmínek vybrat ty, u kterých jsme se domnívali, že povedou k zisku krystalů vhodných pro sběr difrakčních dat. Hlavním kritériem zde byl tvar a velikost krystalu. Preferovány byly proteinové krystaly vykazující co největší souměrnost ve třech prostorových osách (hranoly) před jehlicovitými strukturami. Dalším kritériem pro volbu podmínky bylo složení precipitačního roztoku, kde byly upřednostněny roztoky s vyšším kryoprotektivním účinkem (s vysokým obsahem nízkomolekulárních polyethylenglykolů). Zvolené krystalizační podmínky, které jsme vybrali pro další optimalizaci pro jednotlivé inhibitory, jsou shrnuty v tabulce Tab. 7.

Tab. 7.: Souhrn nalezených krystalizačních podmínek komplexu Sapp1p s inhibitory

No.	Inhibitor	koncentrace Sapp1p (mg/ml)	podmínky krystalizace
KB46	BocValValStaAlaStaOH	18	0.1 M MES pH 6.5, 25% PEG 550MME
KB32	BocValValPstAlaPstOH	16	0.1M MES pH 6.5, 40% PEG 200
KB70	BocValValPstAlaPstNH ₂	17	0.1M MES pH 6.5, 40% PEG 200
KB75	BocValValPstAla(3R,4R)PstOMe	18	0.1 M MES pH 6.5, 30% PEG 400
KB74	BocValValPstAlaOMe	25	0.1 M MES pH 6.5, 30% PEG 400
KB71	BocValValPstAlaPstOMe	13	0.1M MES pH 6.5, 40% PEG 200
KB34	BocValVal(3R,4R)PstAlaPstOMe	15	0.1 M MES pH 6.5, 25% PEG 550MME
	Ritonavir	20	0.1 M MES pH 6.5, 30% PEG 400

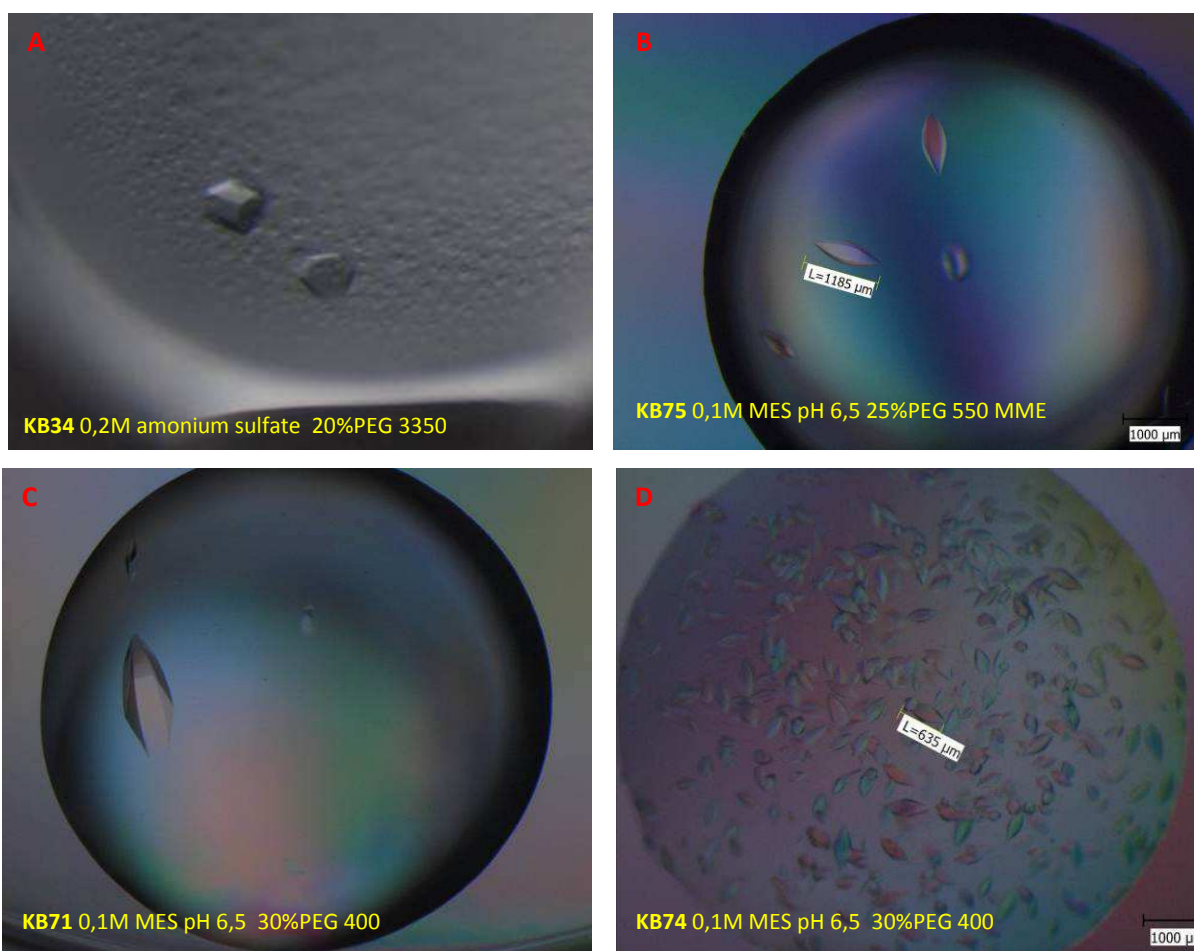
Sta - statinový isoster, Pst - fenylstatinový isoster, Boc - butoxykarbonyl, Iva - isovaleryl, OMe - methoxykarbonyl

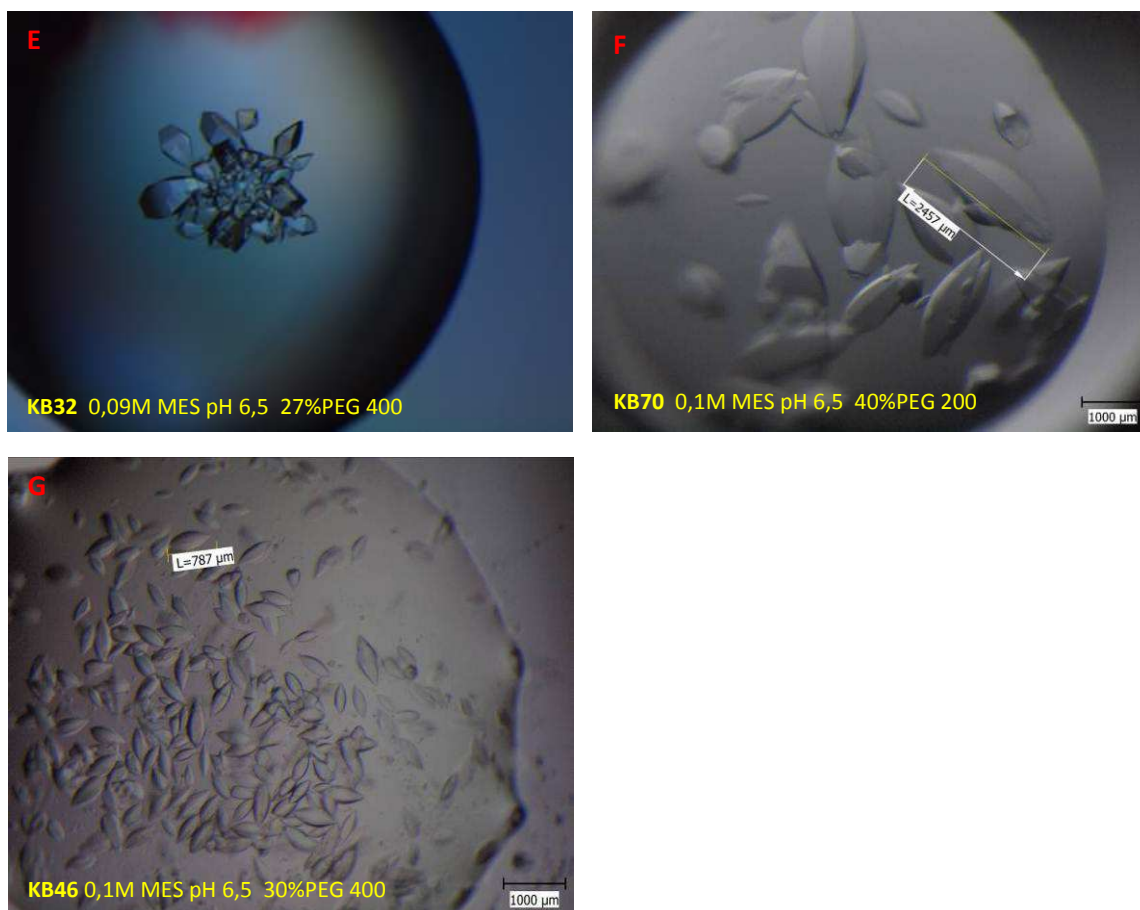
Krystalizační podmínky, jež byly vybrány na základě podmínek získaných pomocí metody sedící kapky, byly dále optimalizovány metodou visící kapky. Při této metodě bylo do 24-jamkových destiček EasyXtal Tool (QIAGEN) nanášeno 1-3 μ l příslušného precipitačního roztoku a 1-3 μ l roztoku komplexu enzym-inhibitor, přičemž poměry komplex:precipitační roztok se lišily u jednotlivých inhibitorů. Testované poměry komplex:precipitační roztok ve výsledné kapce o objemu 4 μ l byly 1:3, 1:1 a 3:1. Objem precipitačního roztoku v rezervoáru byl 500 μ l. V případě, že jsme nebyli schopni získat dostatečně velký krystal pro sběr difrakčních dat, byla pro optimalizaci podmínek využita metoda očkování krystalů (makroseedng). Metoda spočívala v zachycení krystalizačních jader z kapky kočičím vousem a následné přenesení do nové kapky s roztokem s koncentrací proteinu nižší než v původní kapce. Destička byla opět skladována při teplotě 18°C a mikroskopicky kontrolována. Po 1-3 dnech docházelo k tvorbě prvních pozorovatelných krystalů, jež dosáhly konečné velikosti po 5-7 dnech. Po této době už se krystaly nezvětšovaly, a pokud nebyly zmrazeny do tekutého dusíku, začaly stárnout. Výsledné krystaly vhodné pro rentgenostrukturní

analýzu jsou zobrazeny na Obr. 12. Pro uchování a další manipulace byly krystaly zmrazeny v tekutém dusíku (100 K) a uchovávány izolovaně v přeprávkách s tekutým dusíkem.

Analýza krystalů

Průběh krystalizace byl sledován pomocí mikroskopu Olympus SZX10. Fotografie krystalů byly získány fotoaparátem Olympus E-620 a zpracovány softwarem QuickPhoto CAMERA 2.3. Analýza krystalů pomocí optického mikroskopu s polarizačním filtrem nám sloužila k prvotnímu hrubému rozlišení, zda námi pozorovaný krystal je proteinové povahy nebo se jedná pouze o anorganickou sůl. Zde jsme využili přirozené vlastnosti proteinů měnit v rovině polarizovaného světla své zabarvení (Obr. 12.).





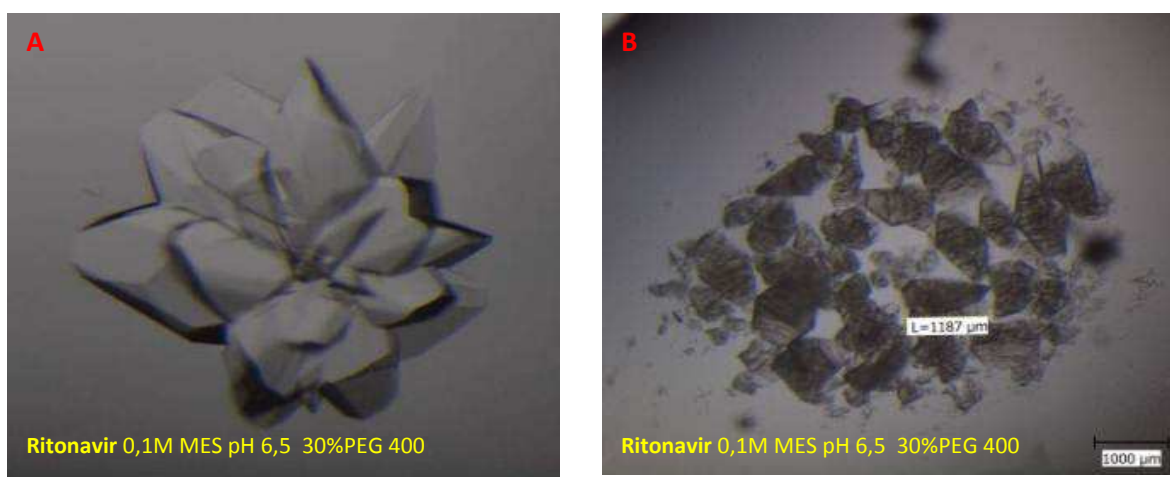
Obr. 12. A: Krystaly komplexů Sapp1p s inhibitory vhodné pro rentgenostrukturní analýzu. Uveden je název inhibitoru a krystalizační podmínka.

Komplex Sapp1p s inhibitorem: **A.** KB34 po 3 dnech, **B.** KB75 po 2 dnech, **C.** KB71 po 2 dnech, **D.** KB74 po 4 dnech, **E.** KB70 po 2 dnech, **F.** KB32 po 5 dnech, **G.** KB46 po 4 dnech

Z obrázků je patrné, že krystaly komplexů zaujímaly různé tvary a velikosti. Komplex s inhibitorem KB34 tvořil krystaly ve tvaru šestiúhelníkového hranolu. Komplex s inhibitorem KB75 tvořil oddělené hladké krystaly ve tvaru mandle průměrné velikosti 1000 μm . Komplex s KB71 formoval krystaly obdobných tvarů jako KB75 s tím rozdílem, že se podařilo získat krystaly větších velikostí. Komplex s KB74 vytvářel velké množství malých krystalků o průměrné velikosti 600 μm . Shluky krystalů soustřeďujících se do středu kapky tvořil komplex s inhibitorem KB32. Krystaly největších rozměrů tvořil komplex s inhibitorem KB70, jehož krystaly dosahovaly délky až 2500 μm . Komplex s KB46 vytvářel mandlovité krystaly o průměrné velikosti 700 μm .

Komplex Sapp1p s Ritonavirem byl z celé série poslední. Krystalizace v tomto případě probíhala téměř obdobným způsobem jako u předcházejících komplexů. Ke tvorbě krystalů Sapp1p-ritonavir v prostředí precipitantu (0.1 M MES pH 6.5, 30% PEG 400) docházelo během 24 hodin. Krystaly vyrůstaly do podoby růžice, kdy maximální velikosti dosahovaly po 48 hodinách od začátku

kultivace. Na rozdíl od předchozích krystalů (Sapp1p-inhibitor) v případě Sapp1p a Ritonaviru docházelo u vzniklých krystalů k jejich poměrně rychlé degradaci. Po 5 dnech se začalo projevovat rychlé stárnutí krystalů a docházelo k postupnému rozpadání (Obr. 13.). Z tohoto důvodu bylo nezbytné vybrané krystaly pro sběr difrakčních dat co nejdříve zmrazit. Z řůžice krystalů (Sapp1p-Ritonavir) byly jednotlivé krystaly pod mikroskopem vypreparovány a okamžitě zmrazeny. Předběžná rentgenostrukturní analýza takto získaných krystalů odhalila zajímavou skutečnost. Všechny námi získané krystaly byly podrobeny rentgenostrukturní analýze na domácím pracovišti ÚOCHB AV ČR, kde se ukázalo, že většina testovaných krystalů obsahovala pouze enzym Sapp1p bez přítomnosti Ritonaviru. Přesto se u dvou námi získaných krystalů podařilo úspěšně nalézt kompletní komplex Sapp1p-ritonavir. Možnou příčinou nízkého zastoupení komplexů Sapp1p s navázaným Ritonavirem může být jeho slabá inhibiční konstanta ($K_i = 1900 \text{ nM}$).



Obr. 13.: Krystaly komplexů Sapp1p s Ritonavirem. Uveden je název inhibitoru a krystalizační podmínka. **A.** Krystaly po 48 hodinách růstu. **B.** Krystaly po 6 dnech růstu

6.1.2.1. Vyhodnocení naměřených dat pro komplexy se Sapp1p

Sběr difrakčních dat a následné řešení struktur bylo provedeno ve spolupráci s Dr. Jiřím Bryndou a Dr. Jiřím Dostálem, ÚOCHB AV ČR. Základní analýza krystalů byla provedena na přístroji Mar345 (Marresearch), ÚOCHB AV ČR. Smyslem bylo otestovat kvalitu krystalů a získat informaci, zda enzym obsahuje v aktivním místě navázaný inhibitor. Na základě získaných výsledků byly krystaly vhodné pro sběr difrakčních dat na synchrotronu uskladněny v tekutém dusíku při 100 K. Samotné měření na synchrotronu v Berlíně paprskem MX14.2 při teplotě 100 K provedli Dr. Jiří Brynda a Dr. Jiří Dostál, ÚOCHB AV ČR. Získaná difrakční data byla integrována a redukována s využitím softwarů MOSFILM a SCALA. Struktura byla následně řešena pomocí molekulového nahrazení s využitím

programu Molrep, což provedl Dr. Jiří Brynda. Jako výchozí model sloužila struktura Sapp1p s Pepstatinem A (PDB ID: 3FV3). Struktura byla upřesněna pomocí programů REFMAC 5.2. a Coot. Kvalita výsledného modelu byla vyhodnocena s využitím programu Molprobity. Obrázky struktur v této diplomové práci, jež sloužily k vyhodnocení výsledků, byly zpracovány pomocí programu PyMOL.

Porovnání vazby vybraných inhibitorů s vazbou Pepstatinu A do aktivního místa Sapp1p je zobrazeno v přílohách (Příloha č. 2.). V následující tabulce (Tab. 8.) je uvedena statistika naměřených dat jednotlivých komplexů. Strukturu Sapp1p s inhibitorem KB34 se nepodařilo změřit, jelikož výsledkem krystalizace byly pouze prázdné proteinové struktury Sapp1p bez navázaného inhibitoru. Vzhledem k jeho nízké inhibiční konstantě k Sapp1p (174 ± 24 nM) se lze domnívat, že se inhibitor do aktivního místa neváže s dostatečnou silou. Komplex Ritonavir se Sapp1p krystalizoval do shluku krystalů připomínajícího růžici, z níž jen jedna vypreparovaná část obsahovala Sapp1p s navázaným Ritonavirem. Skutečnost, že je v aktivním místě Ritonavir navázaný, bylo možno usuzovat před vlastním sběrem kompletních difrakčních dat už z naměřených parametrů mřížky. Komplex Sapp1p s Ritonavirem měl charakteristické parametry mřížky: 62; 62; 158, na rozdíl od prázdného proteinu Sapp1p: 87,8; 87,8; 158,8.

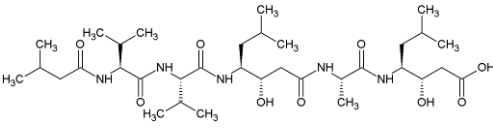
Tab. 8.: Statistika naměřených dat komplexů Sapp1p s inhibitory

	KB32	KB46	KB70	KB71	KB74	KB75	Ritonavir
Sběr dat							
Prostorová grupa	P222	P622	P622	P622	P4	P622	P4
Parametry mřížky							
a (Å)	86,8	171	173,6	173,6	123,8	172	62
b (Å)	87,1	171	173,6	173,6	123,8	172	62
c (Å)	158,3	257	253,7	253,7	157,9	253	158
Difrakční data							
Rozlišení (Å)	1,3	1,95	1,7	1,8	1,4	1,95	2,5
Počet reflexí	307331	72343	221557	199217	242528	192080	22587
Úplnost dat	96,41	98,33	97,48	100	95,17	99,18	92,5
Upřesnění							
R _{free} (%)	18,6	26,7	23,7	24,5	18,0	20,0	31,2
R (%)	17,14	22,9	21,4	20,8	15,0	17,6	24,9
Počet atomů	12200	10553	11091	10590	12503	11794	10124
Ramachandran (%)							
Upřednostněné	98,4	96,5	97,72	94,81	98,31	97,65	94,5
Povolené	99,8	99,6	99,9	98,65	100	99,85	99,1
Nepovolené	0,2	0,4	0,1	1,35	0	0,15	0,9

6.1.3. Krystalizace izoenzymu Sapp2p s inhibitorem Pepstatinem A

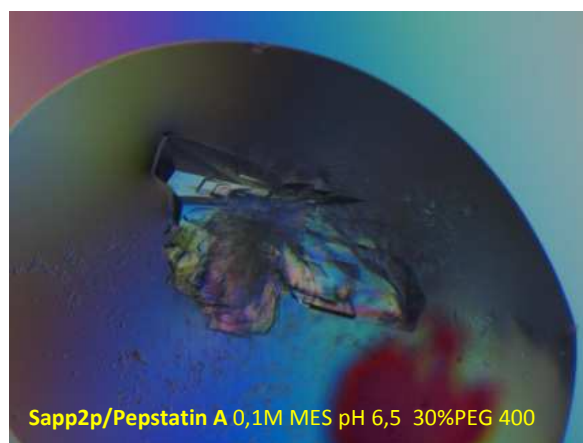
C. parapsilosis vlastní tři izoenzymy sekretovaných aspartátových proteáz. Zatímco struktura izoenzymu Sapp1p je známá (PDB ID: 3FV3), struktura izoenzymů Sapp2p a Sapp3p nebyla doposud vyřešena. Cílem této části diplomové práce bylo najít vhodné podmínky krystalizace izoenzymu Sapp2p s inhibitorem. Aby bylo možné popsat nejenom celkovou strukturu, ale i detailněji porovnat strukturu aktivního místa Sapp2p s ostatními Sap, byl pro krystalizaci se Sapp2p jako vhodný inhibitor vybrán Pepstatin A (Tab. 9.). Pepstatin A je hojně používaný inhibitor aspartátových proteáz a převážná většina struktur aspartátových proteáz byla vyřešena právě s tímto inhibitorem. Inhibiční konstanta pro Sapp2p je v případě Pepstatinu nanomolární, což dávalo předpoklad, že v případě úspěšné krystalizace Sapp2p-Pepstatin A bude inhibitor navázán v aktivním místě enzymu.

Tab. 9.: Inhibitor Pepstatin A

No.	Inhibitor	Ki (nM)	Strukturní vzorec
KB92	IvaValValStaAlaStaOH	0,4±0,04	

Příprava vzorku, hledání a optimalizace podmínek probíhala podobně jako u izoenzymu Sapp1p. Komplex izoenzymu Sapp2p s Pepstatinem A v pětinasobném molárním nadbytku byl zahuštěn pomocí ultrafiltračních cel Amicon Ultra30 (Millipore, cut-off 30 kDa, 10 x 4 min, 13 000 g, 4°C) na koncentraci 18 mg/ml. Při hledání krystalizačních podmínek byly opět použity komerčně dodávané soupravy precipitačních roztoků PEGs suite a JCSG Core I Suite (QIAGEN). Na 96-jamkové krystalizační destičky Intelli-plate byly obdobným způsobem jako v případě Sapp1p naneseny kapky, které obsahovaly 0,2 µl roztoku komplexu enzym-inhibitor a 0,2 µl precipitačního roztoku. Ke vzniku krystalů Sapp2p-Pepstatin A docházelo za stejných podmínek jako u komplexů Sapp1p-inhibitor. Na základě pozorování byl jako nejvhodnější pro další práci vybrán precipitační roztok o složení 0,1M MES pH 6,5 30% PEG 400. V těchto podmínkách a v provedení visící kapky na 24-jamkových destičkách EasyXtal Tool byla provedena krystalizace Sapp2p s Pepstatinem A. Ke tvorbě krystalů docházelo během 3 dnů a maximální velikosti bylo dosaženo během 7 dnů. Komplex Sapp2p s Pepstatinem krystalizoval ve srovnání s komplexy inhibitorů se Sapp1p pomaleji a úspěšnost

krystalizace úzce závisela na koncentraci zahušťovaného komplexu. Při koncentracích pod 15 mg/ml krystaly komplexu Sapp2p s Pepstatinem nerostly v žádných z testovaných podmínek. Při koncentraci nad 24 mg/ml naopak docházelo k precipitaci proteinu. Jako optimální se ukázala koncentrace kolem 20 mg/ml. Krystal vhodný pro rentgenostrukturní analýzu byl získán po 7 dnech v podmínkách 0,1M MES pH 6,5 30% PEG 400 při koncentraci komplexu 18 mg/ml. Svým tvarem a povrchovou strukturou byl krystal Sapp2-Pepstatin A odlišný od předešlých krystalů Sapp1p-ihibitor (Obr. 14.). Díky jeho velikosti a tvaru bylo nutné před tím, než byla provedena rentgenostrukturní analýza, rozdělit krystal na menší části. Pod mikroskopem jsme pomocí skalpelu, rozdělili krystal na tři části a následně zmrazili pomocí tekutého dusíku. Jednotlivé kusy krystalu jsme poté podrobili předběžné rentgenostrukturní analýze na ÚOCHB AV ČR. Ta ukázala, že námi získané krystaly jsou vhodné pro měření difrakčních dat s vysokým rozlišením a obsahují ve struktuře Sapp2p navázaný Pepstatin A. Další měření již bylo provedeno na zdroji s vyšší intenzitou rentgenového záření (Synchrotron-Berlín, Dr. Jiří Bryndou a Dr. Jiří Dostálem).



Obr. 14.: Krystal komplexu Sapp2p s Pepstatinem A po 7 dnech

6.1.3.1. Vyhodnocení naměřených dat pro komplex Sapp2p s Pepstatinem A

Statistika naměřených difrakčních dat je uvedena v následující tabulce (Tab. 10.). Výsledkem měření byla struktura komplexu izoenzymu Sapp2p s Pepstatinem A v rozlišení 0,83 Å. Toto vysoké rozlišení řadí strukturu Sapp2p mezi prvních 60 nejlepších doposud publikovaných struktur v PDB

(protein data bank) databázi. Zároveň umožňuje mnohem detailnější pohled na způsob vazby inhibitoru do aktivního místa proteázy, než je tomu u struktur s horším rozlišením.

Tab. 10.: Statistika naměřených dat proteinového komplexu Sapp2p s Pepstatinem A ve srovnání se statistikou naměřených dat komplexu Sapp1p – Pepstatin A

Sapp2p – Pepstatin A		Sapp1p – Pepstatin A *	
Sběr dat		Sběr dat	
Prostorová grupa	P622	Prostorová grupa	P2
Parametry mřížky		Parametry mřížky	
a (Å)	48,2	a (Å)	86,5
b (Å)	57,8	b (Å)	194,2
c (Å)	54,4	c (Å)	97,2
Difrakční data		Difrakční data	
Rozlišení (Å)	0,83	Rozlišení (Å)	1,85
Počet reflexí	248399	Počet reflexí	269660
Úplnost dat	92,07	Úplnost dat	99,9
Upřesnění		Upřesnění	
R _{free} (%)	12,8	R _{free} (%)	19,0
R (%)	12,3	R (%)	16,6
Počet atomů	3081	Počet atomů	23536
Ramachandran (%)		Ramachandran (%)	
Upřednostněné	96,72	Upřednostněné	91,6
Povolené	99,1	Povolené	100
Nepovolené	0,9	Nepovolené	0

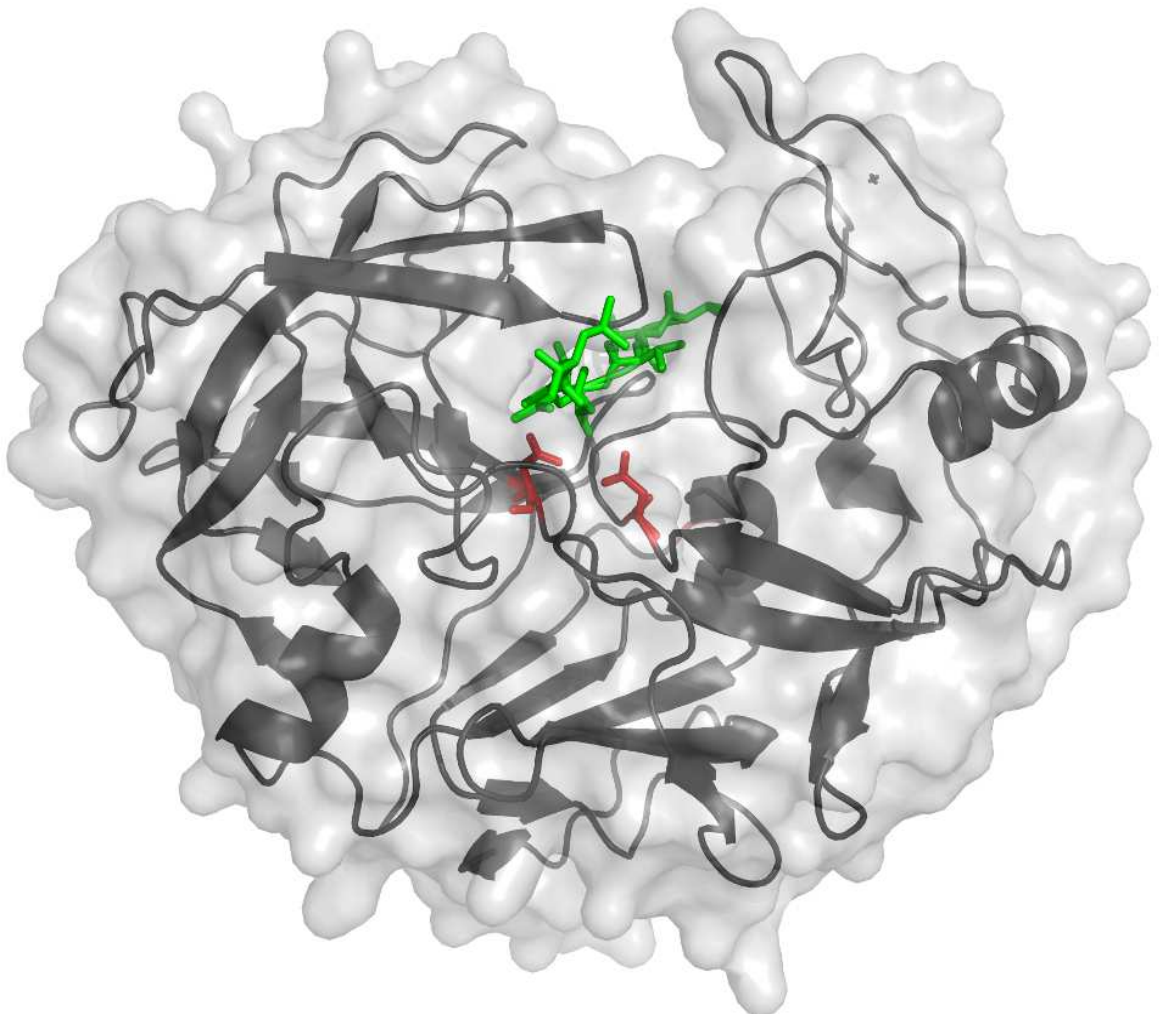
* Dostál et al., 2009

Struktura Sapp2p s navázaným Pepstatinem A je zobrazena na Obr. 15. A. Z pohledu na celkovou strukturu a topologii Sapp2p je patrné, že se podobá klasické struktuře aspartátových proteáz. Protein je složený ze dvou domén, na jejichž rozhraní se nachází vazebné místo pro substrát. Každá z domén disponuje jedním katalytickým aspartátem. Stejně jako Sapp1p a jiné aspartátové proteázy má také Sapp2p chlopeň aktivního místa tvořenou dvěma antiparalelními β -listy. Tato chlopeň, kdy je v aktivním místě navázaný Pepstatin A, zaujímá tzv. uzavřenou konformaci.

Z porovnání struktur Sapp2p a Sapp1p vyplývá, že i s ohledem na celkovou sekvenční identitu 57 % jsou si struktury velice podobné. V sekundární struktuře Sapp2p stejně jako ve struktuře Sapp1p převládají β -listy (Obr. 15. B.). I přes vysokou strukturní podobnost byly při porovnání struktur obou

izoenzymů objeveny následující rozdíly. Sapp2p obsahuje delecí aminokyselin 131-138, jež u Sapp1p tvoří smyčku interagující s chlopní aktivního místa. Inzerce 302-305 v sekvenci Sapp2p způsobuje prodloužení smyčky a tím užší vstup do aktivního místa. Další rozdíl najdeme ve smyčce tvořené aminokyselinami 244-256 u Sapp1p, která ve struktuře Sapp2p není formována do dvou antiparalelních β -listů. Podobně je tomu u sekvence aminokyselin Sapp2p 284-299, která rovněž neformuje strukturu antiparalelních β -listů jako u Sapp1p. Dále se liší N-konce obou izoenzymů. N-konec Sapp2p není tvořen β -listem jako je tomu u Sapp1p.

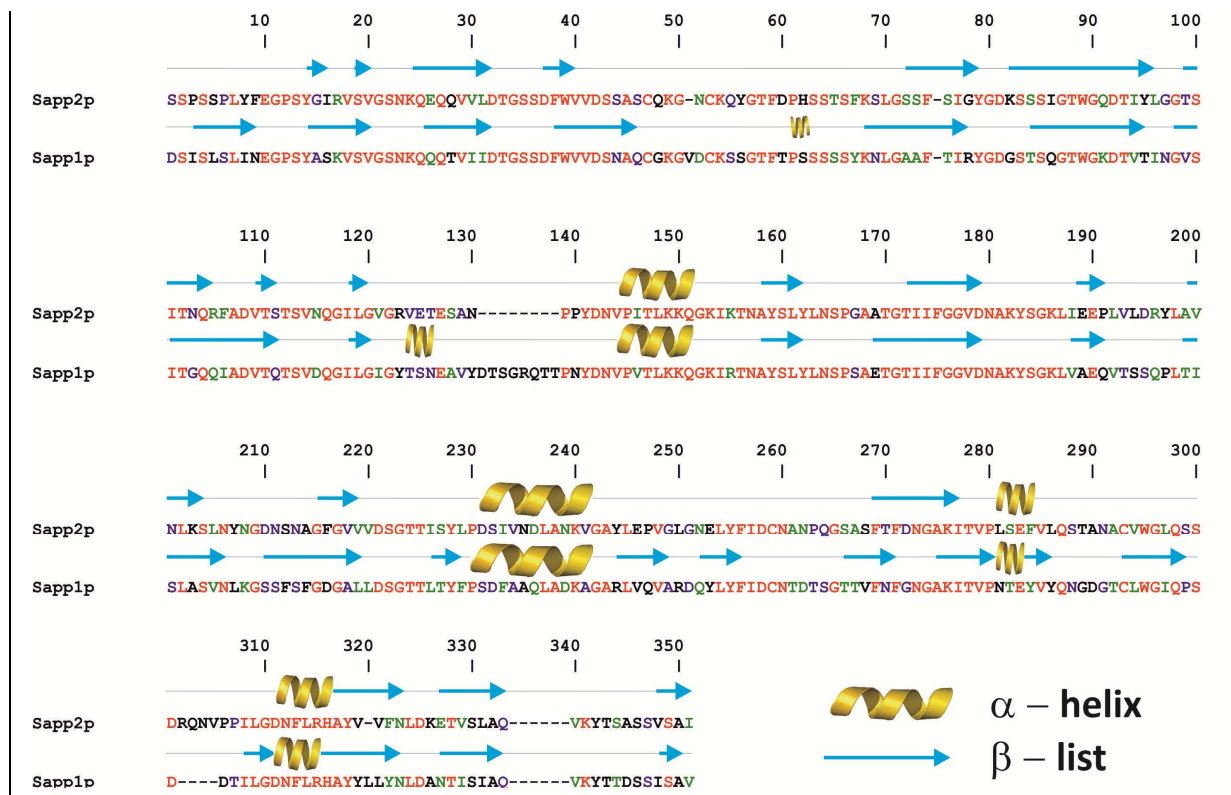
A



Obr. 15. A.: Komplex Sapp2p s inhibitorem Pepstatinem A v aktivním místě

Zeleně je znázorněný Pepstatin A, červeně katalytické aspartáty.

B



15. B.: Alignment aminokyselinových sekvencí Sapp2p a Sapp1p se znázorněnými sekundárními strukturami

Tabulka 11. srovnává, jaké aminokyseliny aktivního místa Sapp1p a Sapp2p se účastní vazby Pepstatinu A. Pro vazebné místo S4 je konzervovanou aminokyselinou threonin, pro místo S2 jsou to aminokyseliny glycin a aspartát. Místo S2 izoenzymu Sapp2p disponuje ještě jedním glycinem, kde se v S2 u Sapp1p na jeho místě nachází tyrosin. Místa S1 a S1' jsou u obou izoenzymů zastoupená stejnými interagujícími aminokyselinami, třemi aspartáty. Největší rozdíly najdeme ve vazebném místě S3, kde v případě Sapp1p s inhibitorem interagují glycin a threonin, zatímco u Sapp2p je to jedna aminokyselina, tyrosin. Shrňme-li informace plynoucí z tabulky č. 11., můžeme konstatovat, že aktivní místa obou enzymů jsou si strukturně podobná. Na vazbě substrátu se u obou enzymů podílejí v řadě případů stejné aminokyseliny. Toto tvrzení podporuje i fakt, že hodnoty naměřených inhibičních konstant pro Sapp2p - Pepstatin A (0,4 nM) a pro Sapp1p - Pepstatin A (0,3 nM) jsou si velmi blízké.

Tab. 11.: Porovnání vazby Pepstatinu A do aktivního místa Sapp1p a Sapp2p. Aminokyseliny aktivního místa interagující s Pepstatinem A. Zvýrazněny jsou shodné aminokyseliny pro oba izoenzymy.

Submísta	Sapp1p*		Sapp2p	
S4	Thr	224	Thr	215
S3	Gly	222		
S3	Thr	223	Tyr	218
S2	Gly	79	Gly	78
S2	Tyr	78	Gly	76
S2	Asp	80	Asp	79
S1	Asp	32	Asp	32
S1'	Asp	220	Asp	211
S1'	Gly	34	Gly	34
S2'			Tyr	87

* Dostál et al., 2009, PDB ID: 3FV3

6.2. Alternativní překlad CUG kodónu u *C. parapsilosis*

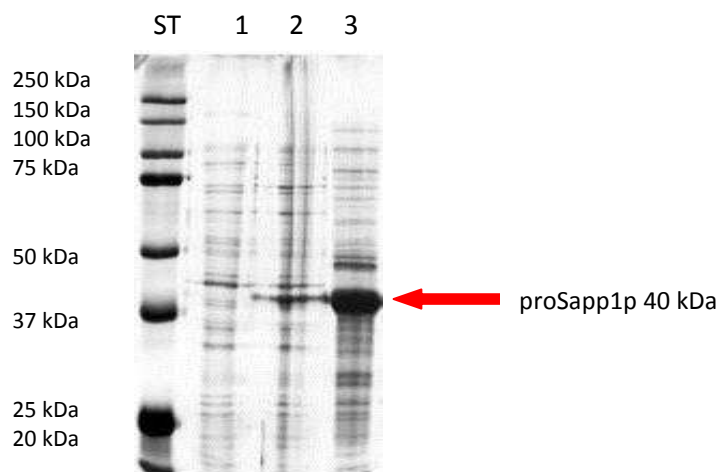
C. parapsilosis je schopna překládat standartní leucinový kodón CUG majoritně serinem. Procentuální zastoupení dosažení serinu nebo leucinu za kodón CUG bylo studováno hlavně u *C. albicans*, kde bylo zjištěno, že se inkorporace leucinu může zvyšovat společně s kultivací kvasinky za stresových podmínek (viz. Kap. 3.3.). Doposud se však žádná studie nezabývala přesným poměrem dosazování serinu místo leucinu za kodón CUG u *C. parapsilosis*. Tato část diplomové práce se věnuje alternativnímu překladu kodónu CUG u *C. parapsilosis* a sleduje jeho vliv na konkrétní enzym - proteázu Sapp1p. K analýze byl použit vzorek izoenzymu Sapp1p izolovaného z kmene CP69 pocházejícího z klinického izolátu FN Olomouc (izolace viz. Kap. 6.1.1.). Tento enzym obsahuje jeden CUG kodón, jehož překladem se inkorporovaný serin/leucin nachází v pozici aminokyseliny 193. Jako standart, kde k alternativnímu překladu nedocházelo, jsme použili v *E. coli* rekombinantně připravený izoenzym Sapp1p. DNA použitá jako templát pro přípravu inzertu enzymu Sapp1p do expresního vektoru byla izolována rovněž z kmene CP69.

Expres, izolace a aktivace rekombinantní proSapp1p

Pro experimenty, jež se zabývají alternativním překladem CUG kodónu u *C. parapsilosis*, bylo nutné získat izoenzym Sapp1p, který bude v pozici aminokyseliny 193 obsahovat pouze leucin. Tento protein bude využit ke srovnání s autentickým proteinem Sapp1p, jehož CUG kodón je kvasinkou překládán majoritně serinem. Pro tento účel byl zvolen expresní systém *E. coli*, jelikož translační aparát bakterie překládá CUG kodón standardně leucinem. Po zvolení expresního systému následovala exprese a izolace dostatečného množství purifikovaného rekombinantního proSapp1p.

Prvním krokem byla transformace kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3) plasmidem pSIT-pro-Sapp1p s ampicilinovou rezistencí (poskytnut Dr. Jiřím Dostálem, ÚOCHB AV ČR). Kmen BL21(DE3) slouží k expresi genů klonovaných do bakteriálních expresních plasmidů. Transformované buňky byly inkubovány v LB médiu při teplotě 37°C po dobu 1h. Kolonie obsahující plasmid byly vyselektovány na agarových miskách s ampicilinem. Kultivace transformovaných buněk *E. coli* BL21(DE3) obsahující vnesený plasmid probíhala v selekčním LB médiu s přidavkem ampicilinu za stálé aerace při teplotě 37 °C a 220 rpm až do $OD_{550\text{ nm}} \sim 0,8$, kdy byl ke kultuře pro indukci exprese proSapp1p přidán analog laktózy IPTG. Po třech hodinách od indukce byla kultivace ukončena. Buňky byly od média odděleny odstředěním (8000 g, 15 min).

Dalším krokem byla izolace a rozpouštění inkluzních tělísek. Ke sklizeným buňkám byl pro rozrušení buněčných stěn přidán lysozym. Pro zefektivnění rozrušení buněk byla buněčná suspenze sonikována. Pomocí SDS-PAGE analýzy bylo prokázáno, že je rekombinantní proSapp1p produkován do inkluzních tělísek. Inkluze oddělené od buněčných zbytků odstředěním byly promyty promývacím pufrem. Přečištěná inkluzní tělíška byla rozpuštěna v denaturačním pufru obsahujícím 8 M močovinu. Nerozpuštěné zbytky byly odstraněny odstředěním (6000 g, 10 min). Denaturovaný protein byl postupně renaturován. Podle předešlých pokusů s proenzymy jiných kandidových proteáz byla renaturace proSapp1p prováděna do roztoků s pH pohybujícím se okolo fyziologického pH 7,2, aby nedocházelo k předčasné aktivaci proenzymu. Renaturace byla prováděna postupnou dialýzou přes dialyzační střevo (cut-off 6-8 kDa), při které byla koncentrace denaturačního činidla v dialyzačním pufru postupně snižována z 8 M močoviny přes 6 M, 4 M a 2 M močovinu k pufru bez močoviny. Dialýza byla prováděna při 4 °C a každý krok trval přibližně 6 h. Jednotlivé kroky izolace proSapp1p byly sledovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 16.).

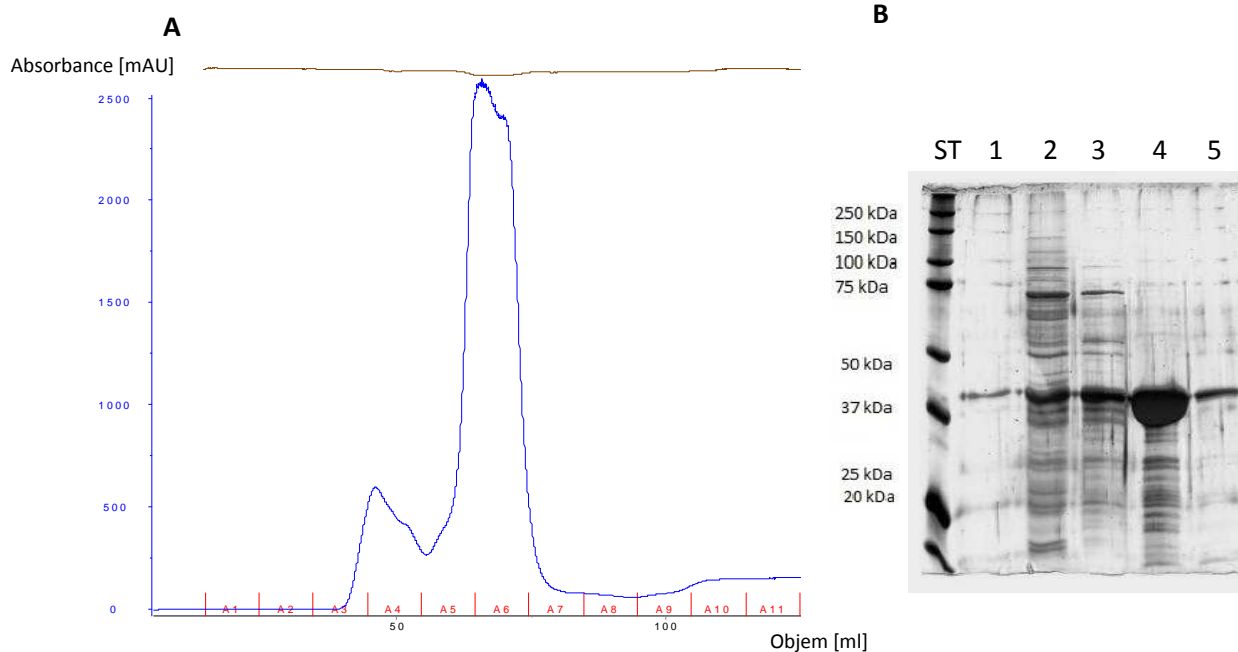


Obr. 16.: SDS-PAGE průběhu purifikace proSapp1p

ST. Molekulový standart, 1. Buňky před indukcí, 2. Buňky po indukcí, 3. Suspenze rozpuštěných inkluzních tělísek

Gelová chromatografie

Jelikož v předešlém kroku izolace došlo k naředění roztoku, bylo nutné dialyzovaný roztok zahustit. K tomuto účelu byla použita cela s ultrafiltrační membránou AMICON Ultra-30 (Millipore, cut-off 30 kDa). Vzorky byly odstředěny (4 x 20 min, 4000 g) z objemu přibližně 40 ml na 5 ml s průměrnou koncentrací 4 mg/ml. Takto připravený roztok obsahoval ještě značný podíl znečišťujících látek, hlavně proteiny o vyšší molekulové hmotnosti než je proSapp1p. Pro izolaci proSapp1p od znečišťujících proteinů s jinou molekulovou hmotností byla využita gelová chromatografie na FPLC Akta Explorer (GE Healthcare). Kolona Hi load™ 16/60 Superdex™ 75 pg byla ekvilibrována 100 mM Tris-HCl pufrém o pH 7,2 a průtok byl nastaven na 1 ml/min. Jednotlivé frakce byly jímány po 10 ml. Frakce s vysokou hodnotou A_{280} byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. Chromatografický záznam purifikace je znázorněn na Obr. 17. A. a analýza frakcí s vysokou hodnotou A_{280} pomocí SDS-PAGE na Obr. 17. B.



Obr. 17.: A. Chromatografický záznam izolace proSapp1p

B. SDS-PAGE průběhu chromatografie proSapp1p

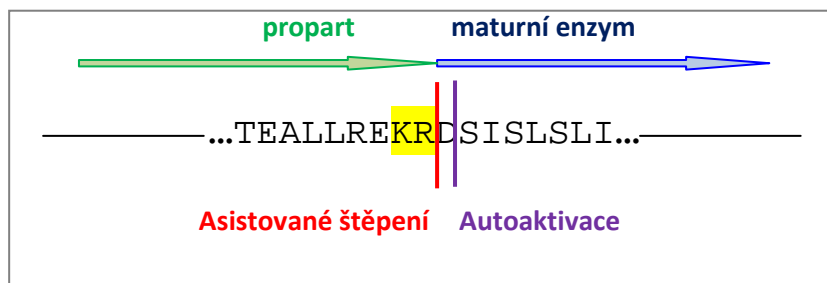
ST. Molekulový standart, 1. Frakce A3, 2. Frakce A4, 3. Frakce A5, 4. Frakce A6, 5. Frakce A7.

Výsledkem izolace byla čtvrtá a pátá frakce obsahující proenzym proSapp1p (40 kDa) izolovaný od znečišťujících proteinů. Výsledný objem získaného proenzymu byl 20 ml o průměrné koncentraci 0,4 mg/ml. Celkové množství proSapp1p získaného z výchozího objemu 4 l kultivačního média jednoho kola izolace činilo 8 mg/ml.

Aktivace proSapp1p

Pro aktivaci nativní proteázy Sapp1p bylo nutné z izolovaného proenzymu proSapp1p odštěpit N-koncovou sekvenci (propart). Jeho přítomnost je nezbytná pro zabránění předčasné aktivaci proteázy a zároveň pro správné sbalení proteinu do aktivní formy. Z předešlých studií zabývajících se studiem aktivace Sapp1p bylo známo, že k procesu aktivace u Sapp1p může dojít dvojím způsobem (Dostál et al., 2005). Za první autoaktivací za nízkého pH, kdy výsledkem je produkt o 1 aminokyselinu kratší než publikovaná sekvence Sapp1p (Obr. 18.), nebo za druhé asistovanou aktivací za pomoci KEX2 proteázy. Protože cílem experimentální části zabývajících se vlivem alternativního překladu CUG kodónu na funkci izoenzymu Sapp1p bylo porovnat enzymatické aktivity

dvou variant proteáz lišící se záměnou pouze jedné aminokyseliny (serin193 za leucin193), bylo nutné získat rekombinantní Sapp1p s úplnou délkou sekvence. Tudíž autoaktivace rekombinantní proSapp1p nebyla vhodnou alternativou a bylo nutné pro aktivaci využít procesu asistované aktivace.

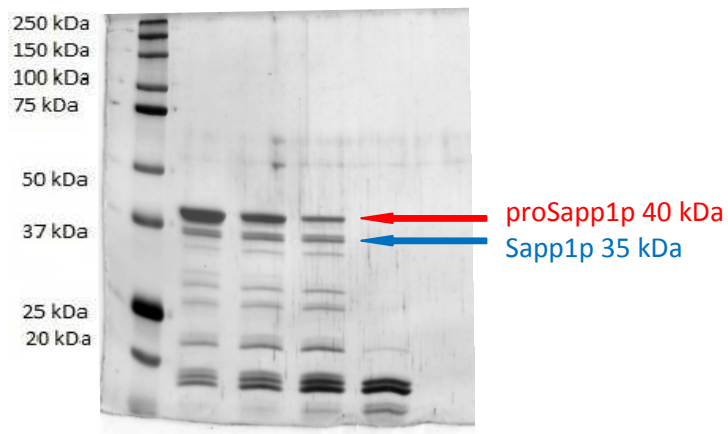


Obr. 18.: Část aminokyselinové sekvence proSapp1p. Znázornění štěpného místa při asistované aktivaci a autoaktivaci. Žlutě je zvýrazněna sekvence Arg-Lys, potenciální místo pro štěpení trypsinem

Asistovaná aktivace trypsinem

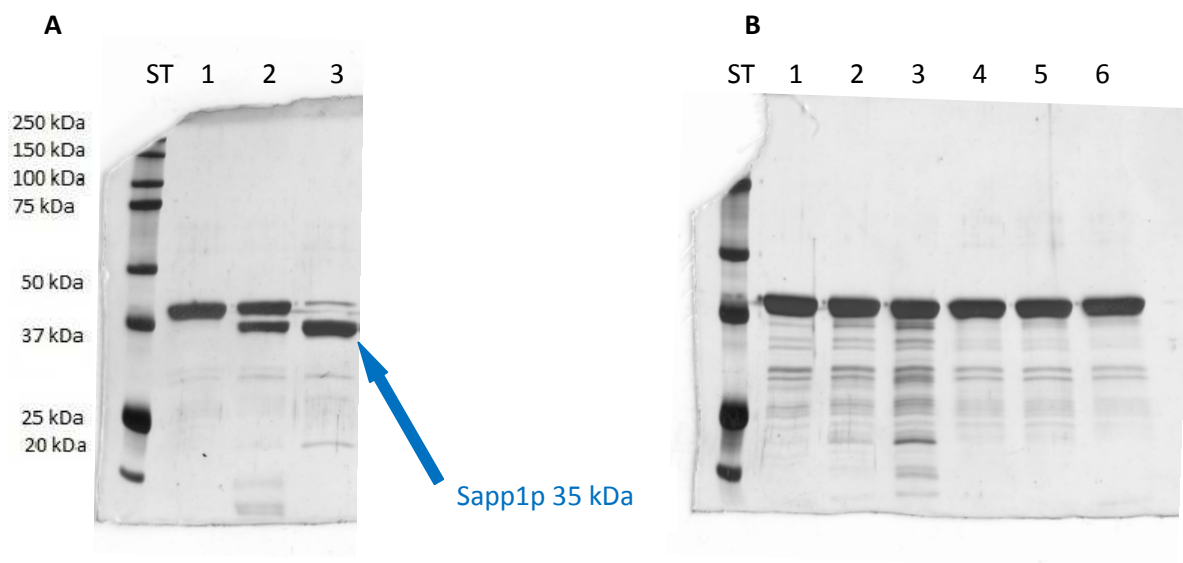
Trypsin je serinová proteáza s podobnou substrátovou specifitou jako některé processingové Kex2 proteázy a byl již s úspěchem využit k aktivaci rekombinantního proenzymu Sapt1p (Lin et. al., 1993) a k aktivaci rekombinantního proSapp2p (Merkerová et al., 2006). Z tohoto důvodu byl zvolen jako vhodný enzym pro simulaci asistované aktivace proSapp1p. Prvním krokem bylo nalézt vhodné podmínky aktivace, tak abychom ve výsledku získali dostatečné množství aktivního enzymu Sapp1p pro další analýzy. K purifikovanému proSapp1p (0,7 mg/ml, 20 mM Tris-HCl pH 7,2) byl přidán trypsin tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 0,5 µg/ml. Tato reakční směs byla inkubována při laboratorní teplotě a po určité době byla pomocí SDS-PAGE provedena analýza velikosti produktů reakce (Obr. 19.). Seštěpený produkt byl získán v pH 7,2 již po 5 min štěpení trypsinem a úplně degradován byl už po 1 h inkubace. Takové rychlé štěpení bylo nežádoucí, proto bylo pro štěpení zvoleno nižší pH. Po snížení pH ze 7,2 na 6 nedocházelo k autoaktivaci proteázy a zároveň došlo ke snížení účinku štěpení (obr. 20. A.). Tímto postupem byla posléze nalezena vhodná doba inkubace proenzymu s trypsinem. Degradací účinek trypsinu byl zastaven snížením pH na 3,5 a inhibicí vhodným inhibitorem (TPLC nebo PMSF). Výsledná koncentrace inhibitoru byla 0,5 µg/ml. Testované podmínky inhibice trypsinu byly sledovány pomocí SDS-PAGE a jsou zobrazeny na obr. 20. B. Z výsledků inhibice plyne, že neefektivněji inhiboval inhibitor trypsinu TPLC.

Pro potvrzení, že dochází k odštěpení celého propartu a nedochází k autoaktivaci, byl určen N-konec štěpeného produktu. Výsledek N-koncové sekvenace (DSISL) byl porovnán s publikovanou sekvencí Sapp1p (viz. Příloha č. 3.). N-koncová sekvence potvrdila, že pomocí trypsinu za výše zmíněných podmínek bylo dosaženo úplného odštěpení propartu v požadovaném místě. Trypsin je tedy vhodný pro asistované štěpení proSapp1p.



Obr. 19.: SDS-PAGE průběhu štěpení proSapp1p trypsinem v 20mM Tris-HCl, pH 7,2, laboratorní teplota.

ST. Molekulový standart, 1. Směs proSapp1p s trypsinem po 5 min, 2. Směs proSapp1p s trypsinem po 15 min, 3. Směs proSapp1p s trypsinem po 30 min, 4. Směs proSapp1p s trypsinem po 1 h



Obr. 20.: SDS-PAGE průběhu inhibice směsi proSapp1p s trypsinem za laboratorní teploty.

A. ST. Molekulový standart, **1.** proSapp1p s trypsinem pH 6, 5 min, **2.** proSapp1p s trypsinem pH 6, 30 min, **3.** proSapp1p s trypsinem pH 6, 1 h

B. ST. Molekulový standart, **1.** proSapp1p s trypsinem s PMSF, 10 min, **2.** proSapp1p s trypsinem s PMSF, 1 h, **3.** proSapp1p s trypsinem s PMSF, 24 h, **4.** proSapp1p s trypsinem s TPLC, 10 min, **5.** proSapp1p s trypsinem s TPLC, 1 h, **6.** proSapp1p s trypsinem s TPLC, 24 h

6.2.1. Hmotnostně spektroskopická analýza zastoupení jednotlivých variant Sapp1p vzniklých vlivem alternativního překladu ve vzorcích z klinických izolátů

Pro zjištění zdali se alternativní překlad CUG kodónu projeví na proteinové úrovni u Sapp1p z kultury *C. parapsilosis* jsme použili HPLC chromatografii s hmotnostním detektorem.

Vzorky rekombinantní Sapp1p a autentické Sapp1p byly izolovány pomocí SDS-PAGE. Rekombinantní Sapp1p byla použita jako standard pro leucinovou formu enzymu. Po obarvení Coomassie blue byly proužky o molekulové hmotnosti odpovídající proteázám vyřezány z gelu a zpracovány podle metody 6.1.1. Pro štěpení proteinů byly použity proteázy trypsin, chymotrypsin a endopeptidáza Asp-N.

Získané štepy byly poté analyzovány na hmotnostním spektroskopu AB SCIEX TripleTOF™ 5600 s HPLC systémem Dionex ULTIMATE 3000. Interpretace hmotnostních spekter byla provedena ve spolupráci s Dr. Zuzanou Demianovou z laboratoře hmotnostní spektroskopie ÚOCHB AV ČR.

Výsledkem měření bylo neúplné pokrytí sekvence Sapp1p pomocí štěpů vzniklých štěpením trypsinem a chymotrypsinem. Tyto enzymy se ukázaly pro účely naší práce jako nevhodné, protože neposkytovaly štepy s místem výskytu aminokyseliny v pozici 193 (Leu/Ser). Úplné pokrytí sekvence štepy (100 %) přineslo až štěpení pomocí endopeptidázy Asp-N (Obr. 21.). Ze získaných dat vyplývá, že ve vzorku rekombinantního enzymu (standart pro leucin 193) se nacházela pouze leucinová forma štěpu. Ve vzorku autentické Sapp1p byly nalezeny pouze peptidové štepy se serinem 193. Jelikož ve vzorku autentické Sapp1p nebyla pomocí hmotnostní spektroskopie zjištěna přítomnost leucinové formy, lze usoudit, že při kultivaci kmene provedeným postupem (Kap. 6.2.1.) překládá *C. parapsilosis* CUG kodón pouze serinem, nebo ho překládá leucinem v tak malém množství, že jeho celkové zastoupení ve vzorku bylo pod detekčním limitem použité metody.

Protein Group 1: Candidapepsin 1 OS-Candida parapsilosis GN-SAPP1 PE-1 SV-1

Proteins in Group					Peptides in Group											
N	Unused	Total	Accessio...	Name	Species	Contro	Conf	Sequence	Modifications	Cleavages	ΔMass	Preo MW	z	Sc	Spectrum	Type
1	218.00	218.00	spP3285...	Candidapepsin 1 OS...	Ser_CANPA	0.00	80	DTGSDDPKVQ		missed S-Q	0.0041	1111.40	2	11	1.1.1.3471.2	Win...
4	2.00	16.00	spP3285...	Candidapepsin 1 OS...	D_CANPA	0.00	80.0	DTGRSDFKVV		missed S-Q	0.0241	1111.40	2	9	1.1.1.3470.2	Win...
2	19.21	20.70	gi477042	protease ACPL (EC...	Sapp2) A. asp...	0.00	94.6	DARTTSIQVRYTTSISLS	Cation:K(D)@16	missed T-D...	-0.9167	2221.04...	3	12	1.1.1.3368.5	Win...
						0.00	40.8	DARTTSIQVRYTTSISLS	Cation:K(D)@16	missed T-D...	-0.9049	2221.04...	4	9	1.1.1.3368.2	Win...
						0.00	94.0	DARTTSIQVRYTTSISLS	Cation:K(D)@16	missed T-D...	-0.9049	2221.04...	4	12	1.1.1.3368.2	Win...
						2.00	99	DARTTSIQVRYTTSISLS		missed T-D...	-0.9173	2163.07...	2	25	1.1.1.3368.8	Win...
						0.00	50	DARTTSIQVRYTTSISLS		missed T-D...	-0.9051	2163.06...	3	18	1.1.1.3362.10	Win...
						0.00	89	DARTTSIQVRYTTSISLS		missed T-D...	-0.9051	2163.06...	3	27	1.1.1.3361.2	Win...
						0.00	99	DARTTSIQVRYTTSISLS		missed T-D...	-0.9051	2163.06...	3	26	1.1.1.3368.4	Win...
						0.00	50	DARTTSIQVRYTTSISLS		missed T-D...	-0.9051	2163.06...	3	26	1.1.1.3361.9	Win...
						0.00	40	DSNAQCGRVDCRSQCTFT	Dimethyl((I)@5) Carbamidomethyl(C) @6 Carbamidomethyl(C) @12 Carbamidomethyl(K) @13	missed V-D...	0.0370	4062.06...	6	14	1.1.1.3188.10	Win...
						0.00	60.8	DSNAQCGRVDCRSQCTFT	Carbamidomethyl(C) @6 Carbamidomethyl(C) @12 Carbamidomethyl(K)	missed V-D...	0.0370	4062.06...	6	12	1.1.1.3200.8	Win...

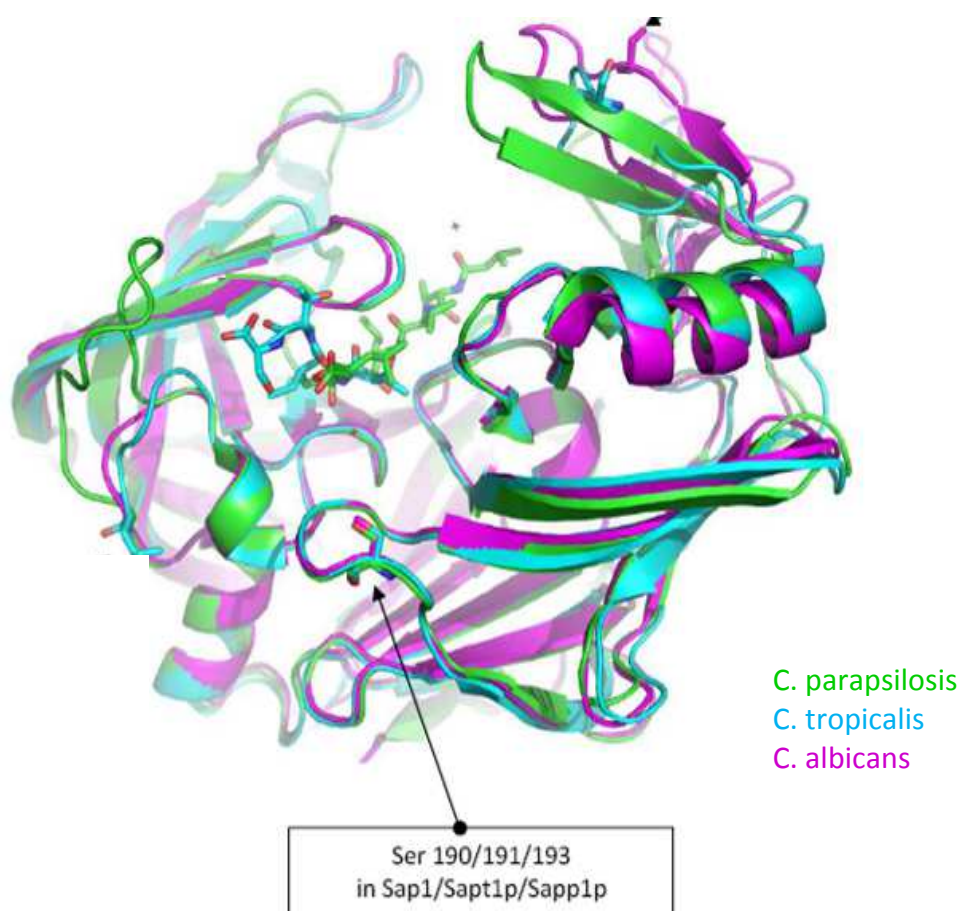
Protein Sequence Coverage: Candidapepsin 1 OS-Candida parapsilosis GN-SAPP1 PE-1 SV-1

HVALVILLKQLLITLALALFYSDALPKLAKSDDNFVYALDTVLRFLSUTLALSLKSDSISLINDQFSVSRVYVSGNKKQQTVLIDTSSDTPVVDSDMQRVDCRSQCTFTSSSSVDDLGAAPTIRVDDGSTSQETNGRDTVTINQVSIIVKQLADVTQTSDVQGLISIGYISMAVYDPTSRQTTENDVY
 PVTLRQDQRTIRNAYSILYINSPSARTQTIIPQYFNARYSGRLVAPQPTSQPLTYSLASVNLKDSFSFGDGLLDGCTPLTVFSPFAAQIADKACARLVQVARDQVLYFIDQNTDYSCTVFNFGNAKRTVFNTRVYVQNDQTCILKSGIQCSDTILQDNFLDBAVYLLVNLDAWTSIQVRYTTSISLSAV

Obr. 21.: Ukázka výstupu z programu ProteinPilot™ Software. Pokrytí sekvence autentické Sapp1p pomocí štěpů Asp-N je označena zeleně.

6.2.2. Vliv alternativního překladu CUG kodónu na strukturu a funkci proteázy Sapp1p

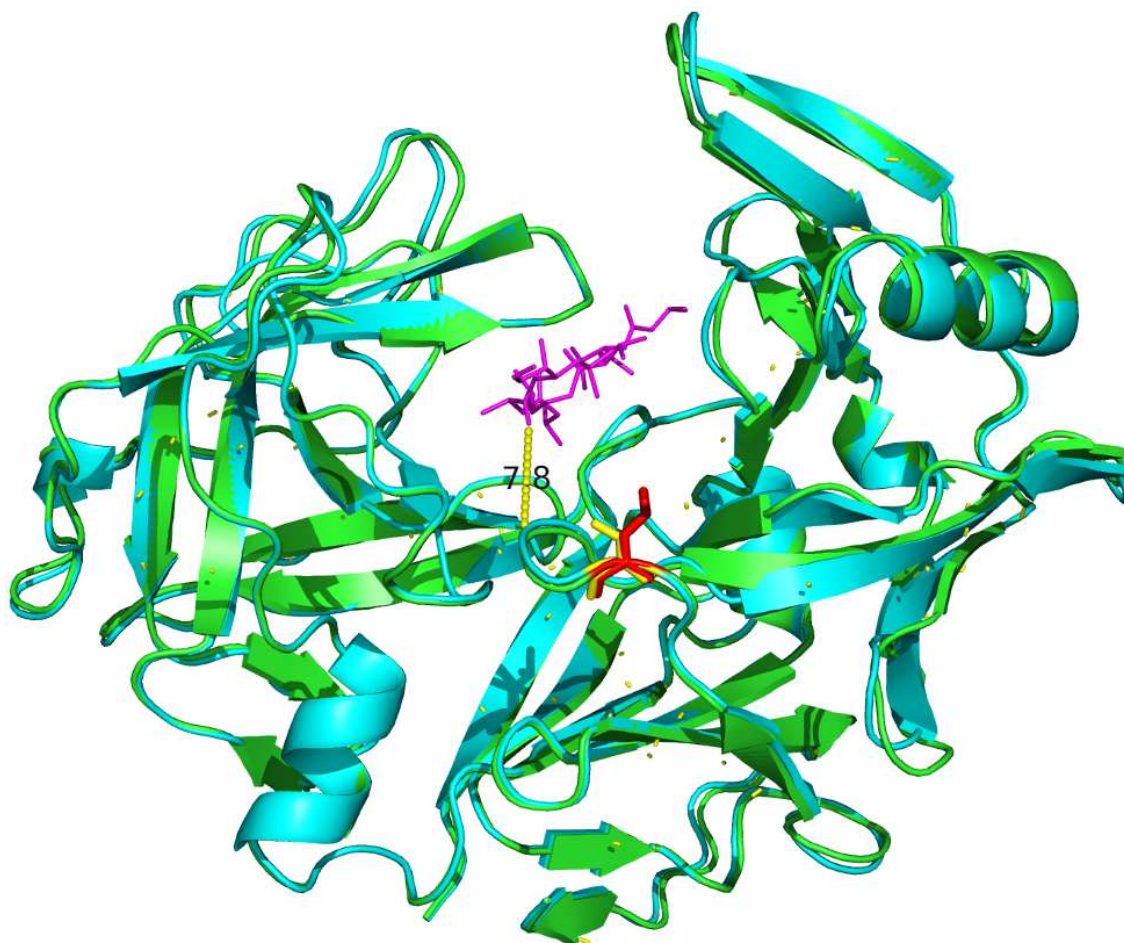
Gen *SAPP1* obsahuje jeden CUG kodón, jehož překladem se inkorporovaný serin (serin 193) nachází ve struktuře proteázy Sapp1p ve smyčce poblíž aktivního místa. Porovnáním struktur Sapp1p se strukturami Sap třech klinicky významných druhů kandid se ukázalo, že je tato smyčka strukturně konzervovaná (obr. 22.). Ovšem pouze u Sapp1p je serin v této smyčce kódován CUG kodónem. Seriny v analogické pozici u Sap1p a Sapt1p jsou kódovány klasickými kodóny pro serin. Smyčka neinteraguje se substrátem-inhibitorem přímo, ale nachází se v jeho těsné blízkosti. Rozhodli jsme se porovnat strukturu rekombinantní Sapp1p s autentickou Sapp1p, abychom zjistili, zdali má záměna leucinu za serin vliv na strukturu smyčky a na celkovou strukturu proteázy.



C. parapsilosis:	GGVDNAKYSG KLVAEQVTSS QALTIISLASV
C. tropicalis:	GGVDNAKYTG TLTALPVTSS VELRVHLGSI
C. albicans:	GGVDNAKYTG SLTALPITSS NELRVQLSTI

Obr. 22.: Srovnání struktur sekretovaných aspartátových proteáz Sapt1p, Sap1p a Sapp1p třech klinicky významných druhů kandid. Zobrazen je rovněž alignment částí aminokyselinových sekvencí Sapt1p, Sap1p a Sapp1p odpovídající smyčce se serinem 191/190/193 zvýrazněného červeně.

Struktura rekombinantní Sapp1p s Pepstatinem A byla vyřešena Dr. Jiřím Dostálem, ÚOCHB AV ČR (struktura není publikována). Struktura autentické Sapp1p s Pepstatinem A pochází z databáze PDB, ID: 3FV3. Ze srovnání struktur rekombinantního izoenzymu Sapp1p (193 leucin) a autentického izoenzymu Sapp1p (193 serin) je patrné, že se struktury od sebe významně neliší (Obr. 23.). Ze srovnání plyne, že alternativní překlad CUG kodónu nemá vliv na strukturu Sapp1p.



Obr. 23.: Srovnání struktur rekombinantní Sapp1p a autentické Sapp1p. **Zelená** = Rekombinantní Sapp1p, **Modrá** = Autentická Sapp1p, **Červeně** = leucin, **Žlutě** = serin, **Fialově** = Pepstatin A

Smyčka s aminokyselinou 193 se nachází na povrchu struktury ve vzdálenosti 7,8 Å od Pepstatinu A. Tato smyčka je formována mezi dvěma β -listy (β -list S12 a S13 ve struktuře Sapp1p publikované Dostál et al., 2009). Abychom potvrdili zjištění ze strukturního srovnání, rozhodli jsme se

otestovat možný vliv záměny serinu 193 za leucin 193 pomocí měření inhibičních konstant se sadou inhibitorů. Základem pokusu bylo měření štěpení chromogenního substrátu KPAEFNphAL inhibovaného sadou 8 peptidových inhibitorů včetně Pepstatinu A pomocí kapalinové chromatografie na přístroji Agilent 1200 (Agilent Technologies)(viz. Tab. 8.).

Analyzovaná reakční směs obsahovala 200 μ l 150 mM citrátového pufru o pH 3,5, 20 μ l chromogenního substrátu KPAEFNphAL, 6 μ l enzymu ($c = 0,2$ mg/ml) a určité množství inhibitoru volené podle velikosti očekávané inhibiční konstanty (2-80 μ l). Reakce probíhala 5 min při 37°C a zastavena byla přidávkem 50 μ l 20% TFA. Směs byla poté nanášena na HPLC kolonu (SB-C18, Agilent Technologies). Měření probíhalo v gradientu metanol/voda. Každý inhibitor byl měřen třikrát a výsledná hodnota byla průměrem tří naměřených hodnot. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno podle metody uvedené v kapitole 5. 2. 10.

Naměřené inhibiční konstanty pro všechny inhibitory uvedené v tabulce Tab. 8. jsou nanomolární tzn., že tyto inhibitory mají velmi dobré inhibiční účinky. Nejslabším inhibitorem je v porovnání s ostatními KB34. Z porovnání hodnot K_i pro rekombinantní a autentickou Sapp1p vyplývá, že hodnoty se od sebe v rámci chyby měření neliší, tudíž že záměna leucinu za serin v pozici 193 nemá vliv na schopnost proteázy interagovat s inhibitorem. Společně s informacemi získanými ze strukturního srovnání autentické a rekombinantní Sapp1p lze usoudit, že alternativní překlad CUG kodónu nemá za námi testovaných podmínek vliv na strukturu a funkci Sapp1p.

Tab. 8.: Naměřené inhibiční konstanty pro rekombinantní Sapp1 v porovnání s inhibičními konstantami autentické Sapp1p. Uveden je vzorec inhibitoru, naměřená hodnota K_i a směrodatná odchylka dK_i .

No.	Inhibitor	Autentická Sapp1p*	Rekombinantní Sapp1p
		$K_i \pm dK_i$ (nm)	$K_i \pm dK_i$ (nm)
KB92	IvaValValStaAlaStaOH	$0,3 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,071$
KB46	BocValValStaAlaStaOH	$0,3 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,034$
KB32	BocValValPstAlaPstOH	$6,6 \pm 0,8$	$6,7 \pm 0,98$
KB70	BocValValPstAlaPstNH ₂	$0,1 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,07$
KB34	BocValVal(3R,4R)PstAlaPstOMe	174 ± 24	201 ± 36
KB75	BocValValPstAla(3R,4R)PstOMe	$0,4 \pm 0,08$	$0,38 \pm 0,125$
KB74	BocValValPstAlaOMe	$14,6 \pm 1,6$	$17,03 \pm 1,9$
KB71	BocValValPstAlaPstOMe	$44 \pm 3,7$	$51 \pm 5,1$

Sta - statinový isoster, Pst - fenylistatinový isoster, Boc - butoxykarbonyl, Iva - isovaleryl, OMe - methoxykarbonyl

* Pichová et al., 2001

7. Závěr

- Izolací autentických izoenzymů Sapp1p a Sapp2p sekretovaných *C. parapsilosis* do média bylo získáno dostatečné množství enzymů pro rentgenostrukturní analýzy.
- Hledáním a optimalizací krystalizačních podmínek metodou difúze par byly nalezeny vhodné podmínky pro krystalizaci izoenzymu Sapp1p s vybranými inhibitory a izoenzymu Sapp2p s Pepstatinem A. Krystaly byly získány již během prvních krystalizačních pokusů. Optimalizací byly následně získány krystaly vhodné pro rentgenostrukturní analýzy.
- Podařilo se získat rentgenostrukturní data komplexů Sapp1p s inhibitory s rozlišením 1,95 Å pro KB46, 1,3 Å pro KB32, 1,7 Å pro KB70, 1,95 Å pro KB75, 1,4 Å pro KB74, 1,8 Å pro KB71 a 2,5 Å pro Ritonavir. Strukturu Sapp1p s inhibitorem KB34 se nepodařilo změřit, jelikož výsledkem krystalizace byly pouze prázdné proteinové struktury Sapp1p bez navázaného inhibitoru. Vzhledem k jeho nízké inhibiční konstantě k Sapp1p (174 ± 24 nM) se lze domnívat, že se inhibitor do aktivního místa neváže s dostatečnou silou.
- Byla vyřešena struktura izoenzymu Sapp2p v komplexu s Pepstatinem A s rozlišením 0,83 Å. Toto vysoké rozlišení řadí strukturu Sapp2p mezi prvních 60 nejlepších doposud publikovaných struktur na světě a umožňuje detailní pohled na způsob vazby inhibitoru do aktivního místa proteázy. Z porovnání struktur Sapp1p a Sapp2p vyplynulo, že i přes nízkou sekvenční identitu jsou aktivní místa obou izoenzymů velice podobná.
- Pro izolaci rekombinantního izoenzymu Sapp1p s aminokyselinou leucin v pozici 193 pro experimenty studující vliv alternativního překladu CUG kodónu byl úspěšně využit expresní systém *E. coli*. Byl vypracován a optimalizován postup pro získání aktivní proteázy z jejího prekurzoru proSapp1p pomocí asistovaného štěpení trypsinem. Získaný aktivní Sapp1p byl využit pro experimenty týkající se alternativního překladu CUG kodónu.
- Pomocí Hmotnostní spektroskopie byla provedena analýza výskytu leucinové formy Sapp1p ve vzorku z klinického izolátu. Touto metodou nebyla ve vzorku s autentickou Sapp1p zjištěna přítomnost leucinové formy. Výsledkem analýzy bylo zjištění, že při kultivaci kmene provedeným postupem (Kap. 6.2.1.) překládá *C. parapsilosis* CUG kodón pouze serinem, nebo ho překládá leucinem v tak malém množství, že jeho celkové zastoupení ve vzorku je pod detekčním limitem metody.

- Vliv alternativního překladu CUG kodónu na funkci proteázy byl testován pomocí srovnání inhibičních konstant série peptidomimetických inhibitorů autentické a rekombinantní Sapp1p. Z naměřených hodnot inhibičních konstant pro autentickou a rekombinantní Sapp1p vyplývá, že hodnoty se od sebe v rámci chyby měření neliší. Závěrem je, že záměna leucinu za serin v pozici 193 nemá vliv na schopnost proteázy interagovat s inhibitorem.
- Bylo provedeno srovnání struktur rekombinantní a autentické Sapp1p ve vztahu k alternativnímu překladu CUG kodónu. Ze srovnání vyplynulo, že leucin193 nijak nepozměnil celkovou strukturu rekombinantní Sapp1p vzhledem ke struktuře autentické Sapp1p.
- Závěrem provedených experimentů zabývajících se alternativním překladem CUG kodónu bylo, že alternativní překlad nemá za námi testovaných podmínek vliv na strukturu a funkci izoenzymu Sapp1p.

8. Literatura

Abad-Zapatero et al., 1996. Structure of a secreted aspartic protease from *C. albicans* complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents

Alberti-Segui, C., Morales, A. J., Xing, H., Kessler, M. M., Willins, D. A., Weinstock, K. G., Cottarel, G., Fichtel, K., Rogers, B. 2004. Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. *Yeast*. 21(4):285-302

Asleson, C. M., Bensen E. S., Gale, C. A., Melms, A. S., Kurischko, C., Berman, J. 2001. *Candida albicans* INT1-induced filamentation in *Saccharomyces cerevisiae* depends on Sla2p. *Mol Cell Biol*. 21(4):1272-84

Barrett, A. J., and N. D. Rawlings. 1991. Types and families of endopeptidases. *Biochem Soc Trans*. 19(3):707-15

Barrett, A. J. 1994. Classification of peptidases. *Methods Enzymol*. 244:1-15

Behnen, J., Köster, H., Neudert, G., Craan, T., Heine, A., Klebe, G. 2012. Experimental and computational active site mapping as a starting point to fragment-based lead discovery. *ChemMedChem*.7(2):248-61

Borelli, C., Ruge, E., Schaller, M., Monod, M., Korting, H. C., Huber, R., Maskos, K. 2007. The crystal structure of the secreted aspartic proteinase 3 from *Candida albicans* and its complex with pepstatin A. *Proteins*. 68(3):738-48

Borelli, C., Ruge, E., Lee, J. H., Schaller, M., Vogelsang, A., Monod, M., Korting, H. C., Huber, R., Maskos, K. 2008. X-ray structures of sap1 and sap5: structural comparison of the secreted aspartic proteinases from *Candida albicans*. *Proteins*. 72:1308

Borg-von Zepelin, M. S., Beggah, K., Boggian, D., Sanglard, and Monod, M. 1998. The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages. *Mol. Microbiol*. 28:543-554

Borg-von Zepelin, M., Meyer, I., Thomssen, R., Würzner, R., Sanglard, D., Telenti, A., Monod, M. 1999. HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases. *J Invest Dermatol*. 113(5):747-51

Braun, B. R., van Het Hoog, M., d'Enfert, C., Martchenko, M., Dungan, J., Kuo, A., Inglis, D. O., Uhl, M.A., Hogues, H., Berriman, M., Lorenz, M., Levitin, A., Oberholzer, U., Bachewich, C., Harcus, D., Marcil, A., Dignard, D., Iouk, T., Zito, R., Frangeul, L., Tekaiia, F., Rutherford, K., Wang, E., Munro, C.A., Bates, S., Gow, N. A., Hoyer, L. L., Köhler, G., Morschhäuser, J., Newport, G., Znaidi, S., Raymond, M., Turcotte, B., Sherlock, G., Costanzo, M., Ihmels, J., Berman, J., Sanglard, D., Agabian, N., Mitchell, A. P., Johnson, A. D., Whiteway, M., Nantel, A. 2005. A human-curated annotation of the *Candida albicans* genome. *PLoS Genet.* 1(1):36-57

Breitschopf, K., Gross, H. J. 1994. The exchange of the discriminator base A73 for G is alone sufficient to convert human tRNA(Leu) into a serine-acceptor in vitro. *EMBO J.* 13(13):3166-9

Butler, G., Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, Rheinbay E, Grabherr M, Forche A, Reedy JL, Agrafioti I, Arnaud MB, Bates S, Brown AJ, Brunke S, Costanzo MC, Fitzpatrick DA, de Groot PW, Harris D, Hoyer LL, Hube B, Klis FM, Kodira C, Lennard N, Logue ME, Martin R, Neiman AM, Nikolaou E, Quail MA, Quinn J, Santos MC, Schmitzberger FF, Sherlock G, Shah P, Silverstein KA, Skrzypek MS, Soll D, Staggs R, Stansfield I, Stumpf MP, Sudbery PE, Srikantha T, Zeng Q, Berman J, Berriman M, Heitman J, Gow NA, Lorenz MC, Birren BW, Kellis M, Cuomo CA. 2009. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* 459(7247):657-62

Calderone, R. A. 2002. *Candida* and candidiasis. ASM Press, Washington, DC

Cutfield, S. M., Dodson, E. J., Anderson, B. F., Moody, P. C., Marshall, C. J., Sullivan, P. A., Cutfield, J. F. 1995. The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from *Candida albicans* in complexes with two inhibitors. *Structure.* 3(11):1261-71

Cutfield, J. F., Sullivan, P. A., Cutfield, S. M. 2000. Minor structural consequences of alternative CUG codon usage (Ser for Leu) in *Candida albicans* exoglucanase. *Protein Eng.* 13(10):735-8

Cutler, J. E. 1991. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol.* 45:187-218

De Bernardis, F., Chiani, P., Ciccozzi, M., Pellegrini, G., Ceddia, T., D'Offizzi, G., Quinti, I., Sullivan, P. A., Cassone, A. 1996. Elevated aspartic proteinase secretion and experimental pathogenicity of *Candida albicans* isolates from oral cavities of subjects infected with human immunodeficiency virus. *Infect Immun.* 64(2):466-71

- De Bernardis**, F., Mondello, F., Scaravelli, G., Pachi, A., Girolamo, A., Agatensi, L., Cassone, A. 1999. High aspartyl proteinase production and vaginitis in human immunodeficiency virus-infected women. *J. Clin. Microbiol.* 5: 1376-1380
- De Viragh**, P. A., Sanglard, D., Togni, G., Falchetto, R., Monod, M. 1993. Cloning and sequencing of two *Candida parapsilosis* genes encoding acid proteases. *J Gen Microbiol.* 139(2):335-42
- Dostál**, J., Dlouhá, H., Maloň, P., Pichová, I., Hrušková-Heidingsfeldová, O. 2005. The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. *Biological Chemistry.* 386 (8): 791–799
- Dostál**, J., Brynda, J., Hruskova-Heidingsfeldova, O., Sieglova, I., Pichova, I., Rezacova, P. 2009. The crystal structure of the secreted aspartic protease 1 from *Candida parapsilosis* in complex with pepstatin A. *J.Struct.Biol.* 167:145
- Dostál**, J., Brynda, J., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Pachel, P., Pichová, I., Rezáčová, P. 2012. The crystal structure of protease Sapp1p from *Candida parapsilosis* in complex with the HIV protease inhibitor Ritonavir. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 27(1):160-5
- Dash**, C., Kulkarni, A., Dunn, B., Rao, M. 2003. Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 38(2):89-119
- Dunn**, B. M., 2002. Structure and mechanism of the pepsin-Like Family of Aspartic Peptidases. *Chem. Rev.* 102:4431-4458
- Fallon**, K., Bausch, K., Noonan, J., Huguenel, E., Tamburini, P. 1997. Role of aspartic proteases in disseminated *Candida albicans* infection in mice. *Infect Immun.* 65(2):551-6
- Feketová**, Z., Masek, T., Vopálenký, V., Pospíšek, M. 2010. Ambiguous decoding of the CUG codon alters the functionality of the *Candida albicans* translation initiation factor 4E. *FEMS Yeast Res.* 10(5):558-69
- Fusek**, M., Smith, E. A., Monod, M., Foundling, S. I. 1993. *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. *FEBS Lett.* 327(1):108-12

- Fusek, M.,** Smith, E. A., Monod, M., Dunn, B. M., Foundling, S. I. 1994. Extracellular aspartic proteinases from *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and *Candida parapsilosis* yeasts differ substantially in their specificities. *Biochemistry*. 33(32):9791-9
- Ghannoum, M. A.** Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. 2000. *Clin Microbiol Rev*. 13(1):122-43
- Gomes, A. C.,** Miranda, I., Silva, R. M., Moura, G. R., Thomas, B., Akoulitchev, A., Santos, M. A. 2007. A genetic code alteration generates a proteome of high diversity in the human pathogen *Candida albicans*. *Genome Biol*. 8(10):206
- Hedderwick, S. A.,** Lyons, M. J., Liu, M., Vazquez, J. A., Kauffman, C. A. 2000. Epidemiology of yeast colonization in the intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 19(9):663-70
- Hrušková-Heidingsfeldová, O.** 2008. Secreted proteins of *Candida albicans*. *Front Biosci*. 13:7227-42
- Hrušková-Heidingsfeldová, O.,** Dostál, J., Majer, F., Havlíková, J., Hradilek, M., Pichová, I. 2009. Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. *Biol Chem*. 390(3):259-68
- Hube, B.,** Monod, M., Schofield, D. A., Brown, A. J. P. and Gow, N. A. R. 1994. Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 14:87–99
- Hube, B.,** Sanglard, D., Odds, F. C., Hess, D., Monod, M., Schafer, W., Brown, A. J., Gow, N. A. 1997. Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun*. 65:3529-3538
- Jackson, A. P.,** Gamble, J. A., Yeomans, T., Moran, G. P., Saunders, D., Harris, D., Aslett, M., Barrell JF, Butler G, Citiulo F, Coleman DC, de Groot PW, Goodwin TJ, Quail MA, McQuillan J, Munro CA, Pain A, Poulter RT, Rajandream MA, Renauld H, Spiering MJ, Tivey A, Gow NA, Barrell B, Sullivan DJ, Berriman M. 2009. Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Genome Res*. 19(12):2231-44
- Jones, T.,** Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S., Magee, B. B., Newport, G., Thorstenson, Y. R., Agabian, N., Magee, P. T., Davis, R. W., Scherer, S. 2004. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 11;101(19):7329-34.

- Koelsch, G., Tang, J., Loy, J. A., Monod, M., Jackson, K., Foundling, S. I., Lin, X.** 2000. Enzymic characteristics of secreted aspartic proteases of *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*. 1480(1-2):117-31
- Kim, J., Sudbery, P.** 2011. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol*. 49(2):171-7
- Laffey, S. F., Butler, G.** 2005. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. 151(4):1073-81
- Lian, C. H., Liu, W. D.** 2007. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*. 50(5):383-90
- Lin, D., Wu, L. C., Rinaldi, M. G., Lehmann, P. F.** 1995. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. *J Clin Microbiol*. 33(7):1815-21
- Lin X., Tang J., Koelsch G., Monod M., Foundling S.** 1993. Recombinant candidropsin, an extracellular aspartic protease from yeast *Candida tropicalis*. *Escherichia coli* expression, purification, zymogen activation, and enzymic properties. *J. Biol. Chem*. 268(27):20143-7
- Merkerová, M., Dostál, J., Hradilek, M., Pichová, I., Hrusková-Heidingsfeldová, O.** 2006. Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. *FEMS Yeast Res*. 6(7):1018-26
- Miranda, I., Rocha, R., Santos, M. C., Mateus, D. D., Moura, G. R., Carreto, L., Santos, M. A.** 2007. A Genetic Code Alteration Is a Phenotype Diversity Generator in the Human Pathogen *Candida albicans*. *PLoS One*. 2(10):e996
- Monod, M., Togni, G., Hube, B., Sanglard, D.** 1994. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol*. 13(2):357-68
- Monod, M., Borg-von Zepelin, M., Telenti, A., Sanglard, D.** 1999. The inhibition of *Candida-albicans*-secreted aspartic proteases by three different HIV protease inhibitors. *Dermatology*. 198(4):412-414
- Moran, G., Coleman, D., and Sullivan, D.** 2012. *Candida albicans* versus *Candida dubliniensis*: Why Is *C. albicans* More Pathogenic? *Int J Microbiol*. 2012: 205921
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., Hube, B.** 2003. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*.67(3):400-28

- Newport**, G., Agabian, N. 1997. KEX2 Influences *Candida albicans* Proteinase Secretion and Hyphal Formation. *J. Biol. Chem.* 272:28954–28961
- Panagoda**, G. J., Samaranayake, L. P. 1999. A new, semi-automated technique for quantification of *Candida* adherence to denture acrylic surfaces. *Mycoses.* 42(4):265-7
- Parra-Ortega**, B., Cruz-Torres, H., Villa-Tanaca, L., Hernández-Rodríguez, C. 2009. Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(3):505-12
- Pichová**, I., Pavlíčková, L., Dostál, J., Dolejší, E., Hrusková-Heidingsfeldová, O., Weber, J., Ruml, T., Soucek, M. 2001. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem.* 268(9):2669-77
- Rawlings**, N. D., Bateman, A. 2009. Pepsin homologues in bacteria. *BMC Genomics.* 10:437
- Richter**, C., Tanaka, T. and Yada, R. Y. 1998. Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. *Biochem J.* 335(3): 481–490
- Rüchel**, R., Zimmermann, F., Boning-Stutzer, B. and Helmchen, U. 1991. Candidiasis visualised by proteinase-directed immunofluorescence. *Virchows Arch. Ser. A* 419:199-202
- Sanglard**, D., Hube, B., Monod, M., Odds, F. C., Gow, N. A. 1997. A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence. *Infect Immun.* 65:3539-3546
- Santos**, M. A., Keith, G., Tuite, M. F. 1993. on-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *EMBO J.* 12(2):607-16
- Santos**, M. A., Tuite, M. F. 1995. The CUG codon is decoded in vivo as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleic Acids Res.* 23(9):1481-6
- Schaller**, M., Borelli, C., Korting, H. C., Hube, B. 2005. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. 48(6):365-77
- Schaller**, M., Schäfer, W., Korting, H. C., Hube, B. 1998. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol.* 29(2):605-15

- Scherer, S., Magee, P. T.** 1998. Genetics of *Candida albicans*. *Microbiol Rev.* 54(3):226-41
- Schild, L., Heyken, A., de Groot, P. W., Hiller, E., Mock, M., de Koster, C., Horn, U., Rupp, S., Hube, B.** 2011. Proteolytic cleavage of covalently linked cell wall proteins by *Candida albicans* Sap9 and Sap10. *Eukaryot Cell.* 10(1):98-109.
- Segal, R., Kimchi, A., Kritzman, A., Inbar, R., Segal, Z.** 2000. The frequency of *Candida parapsilosis* in onychomycosis. An epidemiological survey in Israel. *Mycoses.* 43(9-10):349-53
- Sielecki, A. R., Fedorov, A. A., Boodhoo, A., Andreeva, N. S., James, M. N.** 1990. Molecular and crystal structures of monoclinic porcine pepsin refined at 1.8 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 214:143
- Sobel, J. D.,** 1992. Vulvovaginitis. *Dermatol Clin.* 10(2):339-59
- Sugita, T., Nakase, T.** 1999. Non-universal usage of the leucine CUG codon and the molecular phylogeny of the genus *Candida*. *Syst Appl Microbiol.* 22(1):79-86
- Symersky, J., Monod, M., Foundling, S. I.** 1997. High-resolution structure of the extracellular aspartic proteinase from *Candida tropicalis* yeast. 36(42):12700-10
- Tavanti, A., Davidson, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C., Odds, F. C.** 2005. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol.* 43(1):284-92
- Tortorano, A. M., Caspani, L., Rigoni, A. L., Biraghi, E., Sicignano, A., Viviani, M. A.** 2004. Candidosis in the intensive care unit: a 20-year survey. *J Hosp Infect.* 57(1):8-13
- Trofa, D., Gácsér, A., Nosanchuk, J. D.** 2008. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 21(4):606-25
- Tuite, M. F., Santos, M. A.** 1996. Codon reassignment in *Candida* species: an evolutionary conundrum. *Biochimie.* 78(11-12):993-9
- Wu, T., Samaranayake, L. P.** 1999. The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. *J Med Microbiol.* 48(8):711-20
- Zaugg, C., Borg-Von Zepelin, M., Reichard, U., Sanglard, D., Monod, M.** 2001. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun.* 69(1):405-12

9. Seznam použitých zkratk



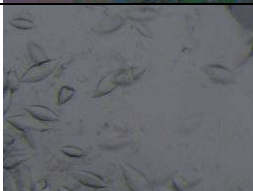
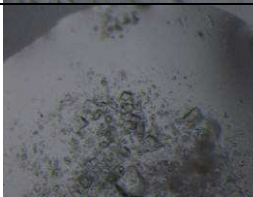
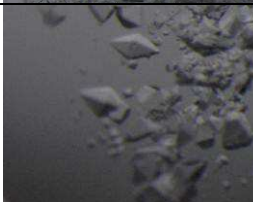
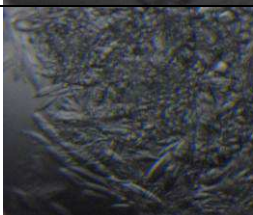
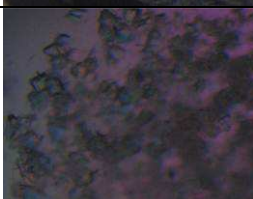
ACN	acetonitril
ACP	kyselá proteáza
AIDS	syndrom získané imunitní nedostatečnosti
ALS	agglutinin-like sequence
Boc	terc. Butoxykarbonyl
BSA	hovězí sérový albumin
dKi	směrodatná odchylka
DMSO	dimethylsulfoxid
DTT	dithiothreitol
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraacetát sodný
FPLC	angl. fast protein liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HAART	vysoce aktivní antiretrovirální terapie
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
HPLC	angl. high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Hwp1	protein buněčné stěny 1
IAA	iodacetamid
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G

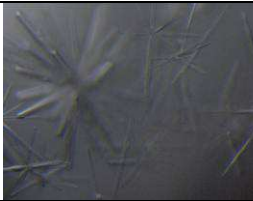
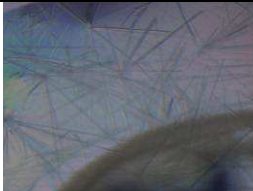
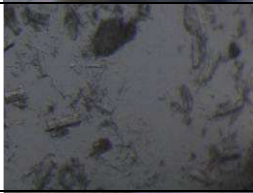

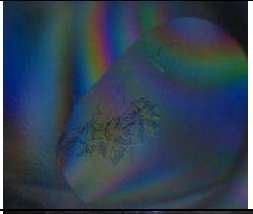
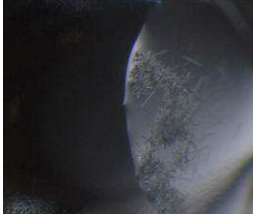


Iva	isovaleryl
Ki	inhibiční konstanta
Km	Michaelisova konstanta
KPAEF(Nph)AL	chromogenní substrát obsahující (Nph) = 4-nitrofenylalanin
LIP	lipáza
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
mRNA	mediátorová ribonukleotidová kyselina
Nph	p-nitrofenylalanin
NADH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
OPC	orofaryngální kandidóza
PDB	databáze proteinových struktur, angl. protein data bank
PEG	polyethylenglykol
PL(A,B,C,D)	fosfolipáza (A,B,C,D)
Pst	fenylstatinový isoster
PVDF	polyvinylendifluoridová membrána
RNA	ribonukleotidová kyselina
tRNA _{CAG}	transferová RNA s antikodónem nukleotidové sekvence CAG
SAP	sekretované aspartátové proteázy
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
Sta	statinový isoster
TEMED	tetramethylethylendiamin



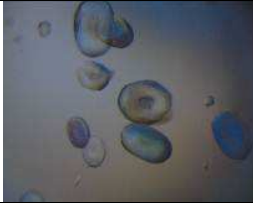

TFA	trifluoroctová kyselina
Vo	počáteční reakční rychlost
VVC	vulvovaginální kandidóza
WGD	celogenomová duplikace, angl. Whole genome duplication
YCB	angl. yeast carbon base

10. Přílohy

Příloha č. 1.: Dodatečné podmínky, v nichž se nacházely krystaly komplexů enzym-inhibitor

Komplex enzym/inhibitor	Krystalizační podmínka	Poloha v destičce	Obrázek krystalu
Sapp1p/KB70	0,1M octan sodný pH 4,6 25% PEG 1000	A5	
	0,1M octan sodný pH 4,6 25% PEG 2000 MME	A6	
	0,1M MES pH 6,5 40% PEG 200	A7	
	0,1M HEPES pH 7,5 40% PEG 200	B1	
	0,1M octan sodný pH 4,6 20% PEG 10000	C5	
	0,2M chlorid amonný 20% PEG 3350	E9	
	0,2M dusičnan sodný 20% PEG 3350	F5	

	0,2M fosfit sodný 20% PEG 3350	H3	
	0,2M citrát draselný 20% PEG 3350	H5	
	0,2M citrát lithný 20% PEG 3350	H11	
Sapp1p/KB34	0,1M octan sodný pH 4,6 40% PEG 200	A1	
	0,1M octan sodný pH 4,6 25% PEG 550 MME	A4	
	0,1M MES pH 6,5 25% PEG 2000 MME	A12	
	0,1M MES pH 6,5 15% PEG 20000	C12	
	0,1M HEPES sodný pH 7,5 25% PEG 4000	D2	

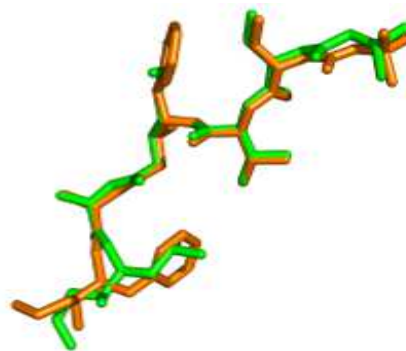
	0,1M HEPES sodný pH 7,5 25% PEG 3000	D5	
	0,1M HEPES sodný pH 7,5 25% PEG 4000	D6	
Sapp1p/KB71	0,2M fluorid sodný 20% PEG 3350	E1	
	0,2M sulfát amonný 20% PEG 3350	G11	

Příloha č. 2.: Srovnání vazby vybraných inhibitorů s vazbou Pepstatinu A do aktivního místa Sapp1p

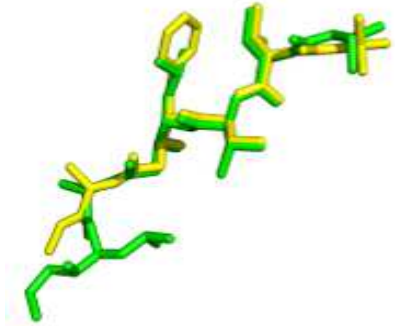
KB46 vz **Pepstatin A**



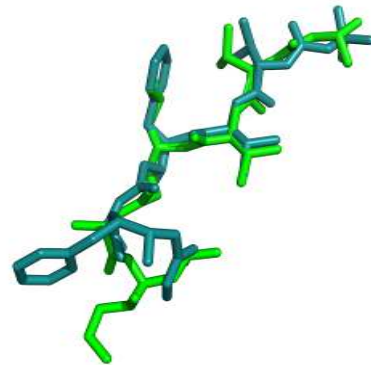
KB32 vz **Pepstatin A**



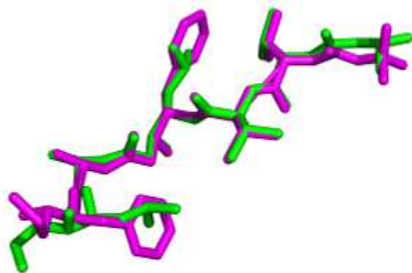
KB74 vz Pepstatin A



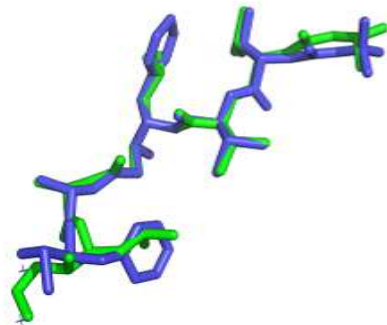
KB75 vz Pepstatin A



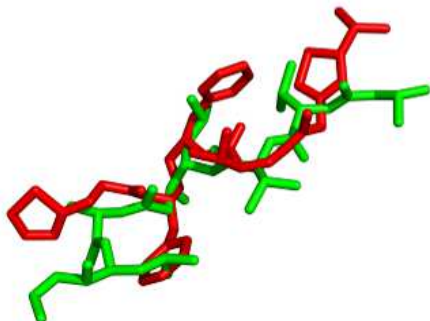
KB70 vz Pepstatin A



KB71 vz Pepstatin A



Ritonavir vz Pepstatin A



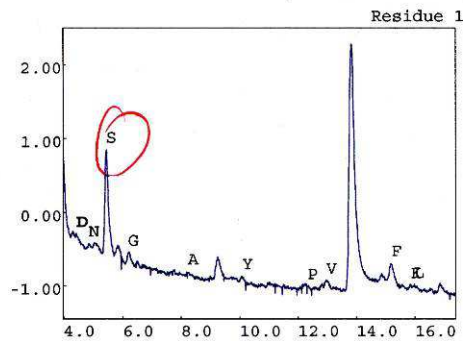
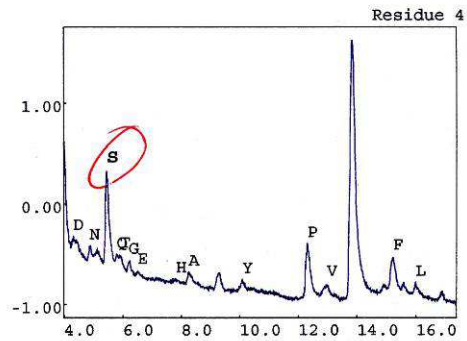
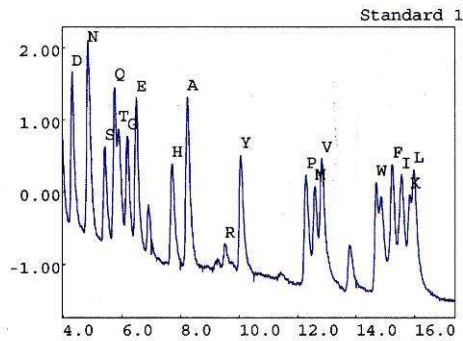
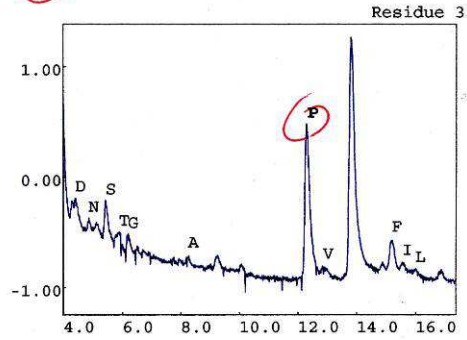
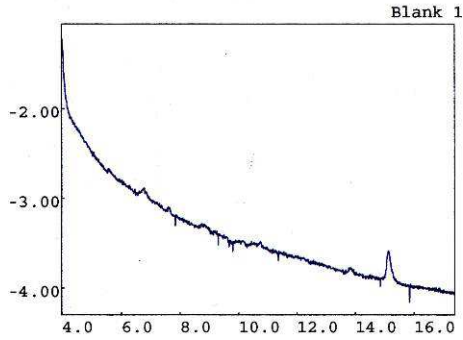
Příloha č. 3: Výsledek N-koncové sekvenace první frakce chromatofokusace pro ověření, že se jedná o izoenzym Sapp2p

27.1.2012 15:15

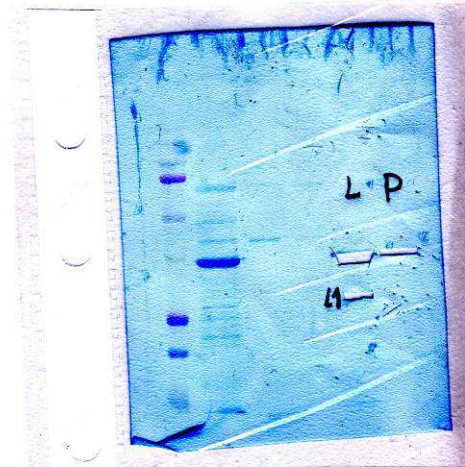
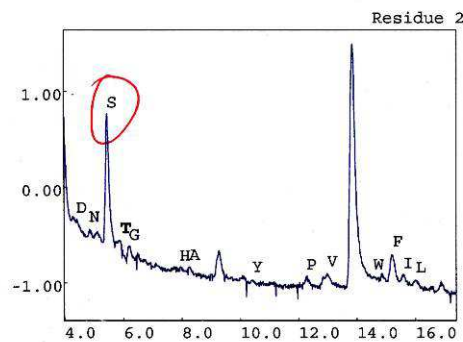
26.01.12-JD-L

24/1/12

1



QSTPS



Applied Biosystems Procise - PROCISE

Výsledek N-koncové sekvenace průběhu aktivace pro-Sapp1p pro ověření, že se jedná o nezkrácenou variantu Sapp1p

