

Charakterizácia proteínu A0A161ZKU8_DAUCS

Barbora Stratilová^{1,2}, Sergej Šesták¹, Veronika Lukáčová¹, Maksym Danchenko¹, Peter Baráth¹, Stanislav Kozmon¹, Eva Stratilová¹

¹*Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, Slovenská republika; chemstra@savba.sk*

²*Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej, výpočtovej a teoretickej chémie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika*

Abstract

Characterization of A0A161ZKU8_DAUCS protein

A0A161ZKU8_DAUCS protein defined in UniProtKB database as "uncharacterized protein inferred from homology" was obtained after commercial preparation of relevant synthetic gene, its incorporation into *Pichia pastoris* GS115, and subsequent methanol-induced production of protein into the cultivation medium. After precipitation with ammonium sulfate and ethanol, proteins from the medium were desalted and mass spectrometry-based analysis of their composition was performed. Results showed the prevalence of A0A161ZKU8_DAUCS in the precipitate without the presence of *Pichia* protein with possible competitive activity derived from the primary structure of A0A161ZKU8_DAUCS. The enzyme activity of A0A161ZKU8_DAUCS was experimentally confirmed and based on that, protein was identified as EC.3.2.1.67, a glycoside hydrolase of GH family 28. This glycoprotein was partially characterized by its pH optimum (pH 4.0) and stability, temperature optimum (70 °C) and stability and substrate specificity (preference for polymeric homogalacturonates).

Keywords: A0A161ZKU8_DAUCS; *Pichia pastoris*; synthetic gene; UniProtKB; enzyme characterization

Úvod a formulácia cieľa

Exopolygalakturonázy (exoPGázy) [poly(1,4- α -D-galakturonát)galakturonohydrolázy; E.C. 3.2.1.67] katalyzujú hydrolytické štiepenie D-galakturonánu na jeho neredukujúcom konci, pričom ako jediný produkt štiepenia je D-galaktopyranurónová kyselina [1]. ExoPGázy sa líšia navzájom preferenciou substrátov s rôznym stupňom polymerizácie (DP) a sú väčšinou produkované vo viacerých formách, ktoré sa líšia pH optimami, izoelektrickými bodmi a spomínanou preferenciou pre substráty s rôznym DP [2 – 4]. Aktuálne vedomosti o prepojení štruktúr a funkcií týchto enzýmov závisia hlavne od ich zdroja, napr. kým pre mikrobiálne exoPGázy sú už známe aj kryštalografické štruktúry [5], pre rastlinné enzýmy, napr. z *Daucus carota*, existujú len biochemické štúdie založené na stanovení katalytických vlastností [2 – 4].

Na základe informácií, ktoré sa dajú extrahovať z databáz štruktúr proteínov a metód bioinformatiky a výpočtovej chémie, bolo identifikovaných desať štruktúr, ktoré by mohli potenciálne zodpovedať exoPGázam z *Daucus carota* [6]. Homológne modelovanie ukázalo, že mikrobiálne 3D štruktúry ako templáty nie sú pre enzýmy z rastlín vhodné, a to najmä v oblasti menej usporiadaného C-terminálu, ktorým sa jednotlivé enzýmy líšia a ktorého

usporiadanie, pravdepodobne, ovplyvňuje ich spôsob účinku a substrátovú špecificitu. Toto podčiarkuje nevyhnutnosť kryštalografických štúdií pre rastlinné exoPGázy v situácii, keď nepoznáme ani ich primárne štruktúry.

Z tohto dôvodu je cieľom tejto práce ukázať, že aspoň jedna z identifikovaných štruktúr [6] označená v databáze UniProt ako necharakterizovaný proteín A0A161ZKU8_DAUCS je exoPGáza. Predkladáme aj čiastočnú biochemickú charakterizáciu tohto enzýmu.

Materiál a metódy

Syntetický gén proteínu A0A161ZKU8_DAUCS (databáza UniProtKB) na základe nukleotidovej sekvencie z ENA (European Nucleotide Archive) KZM86650.1 (*Daucus carota* subsp. sativus hypotetický proteín, 1179 bp) komerčne pripravili v ProteoGenixSAS. *Pichia pastoris* GS115 (*Komagataella phaffii*, kmeň GS115 / ATCC 20864) bola transformovaná elektroporáciou podľa manuálu pre expresiu (Invitrogen). Postup prác vrátane podmienok kultivácie transformovaného kmeňa bol opísaný Stratilovou a kol. [7] a cieľový produkt, proteín A0A161ZKU8_DAUCS, získaný prezrážaním 5-dňového kultivačného média síranom amónnym (90% sat.), etanolom (1:4) a následným odsolením proteínov na kolónke PD10 (GE Healthcare). Prítomnosť proteínu A0A161ZKU8_DAUCS bola vo vzorkách potvrdená hmotnostnou spektrometriou (Orbitrap Elite, ThermoScientific).

Obsah proteínov bol vo vzorkách stanovený súpravou na stanovenie proteínov Qubit™ (Life Technologies) s použitím Invitrogen Qubit fluorometra. 10% SDS-PAGE [8] sa robila na elektroforetickom zariadení Criterion (Bio-Rad). Ako štandard boli použité predfarbené proteíny PageRuler™ a na vizualizáciu proteínov v géli roztok na farbenie bielkovín Page-Blue™ (oba ThermoScientific).

Ako substráty na stanovenie enzýmovej aktivity boli na základe štúdií homológie databázových proteínov [6] vybrané 0,5% pektan sodný (PGA) a kyselina pentagalakturónová (GA₅, 1 μmol/ml) v 0,1 M octanových tlmivých roztokoch, pH 3,6 – 5,6. Reakčná zmes obsahovala enzým:substrát v pomere 1:1 a aktivita enzýmu sa stanovovala ako prírastok redukujúcich skupín v priebehu reakcie podľa Somogyiho [9] pri 530 nm. Ako kalibrant slúžila kyselina D-galaktopyranurónová. Teplota stanovenia sa pohybovala v rozpätí 30 – 80 °C. Tepelná stabilita bola sledovaná po 2 hod inkubácie enzýmu pri danej teplote a pH stabilita po 24 hod v určitom pH. Skladovacia stabilita bola stanovená po mesiaci státia odsolených vzoriek (vo vode) pri 4 °C. Všetky aktivity boli stanovené trikrát.

Delenie a vizualizácia produktov vznikajúcich počas reakcie katalyzovanej

A0A161ZKU8_DAUCS sa robila tenkovrstvovou chromatografiou. Na platničky Silikagel 60 (Merck) sa nanášalo 20 µl reakčnej zmesi v rôznych časových intervaloch, ako štandard sa použila kyselina D-galaktopyranurónová. Ako vyvíjacia zmes slúžil *n*-butanol:kyselina mravčia:voda (2:3:1) a ako detekčné činidlo anilínftalát.

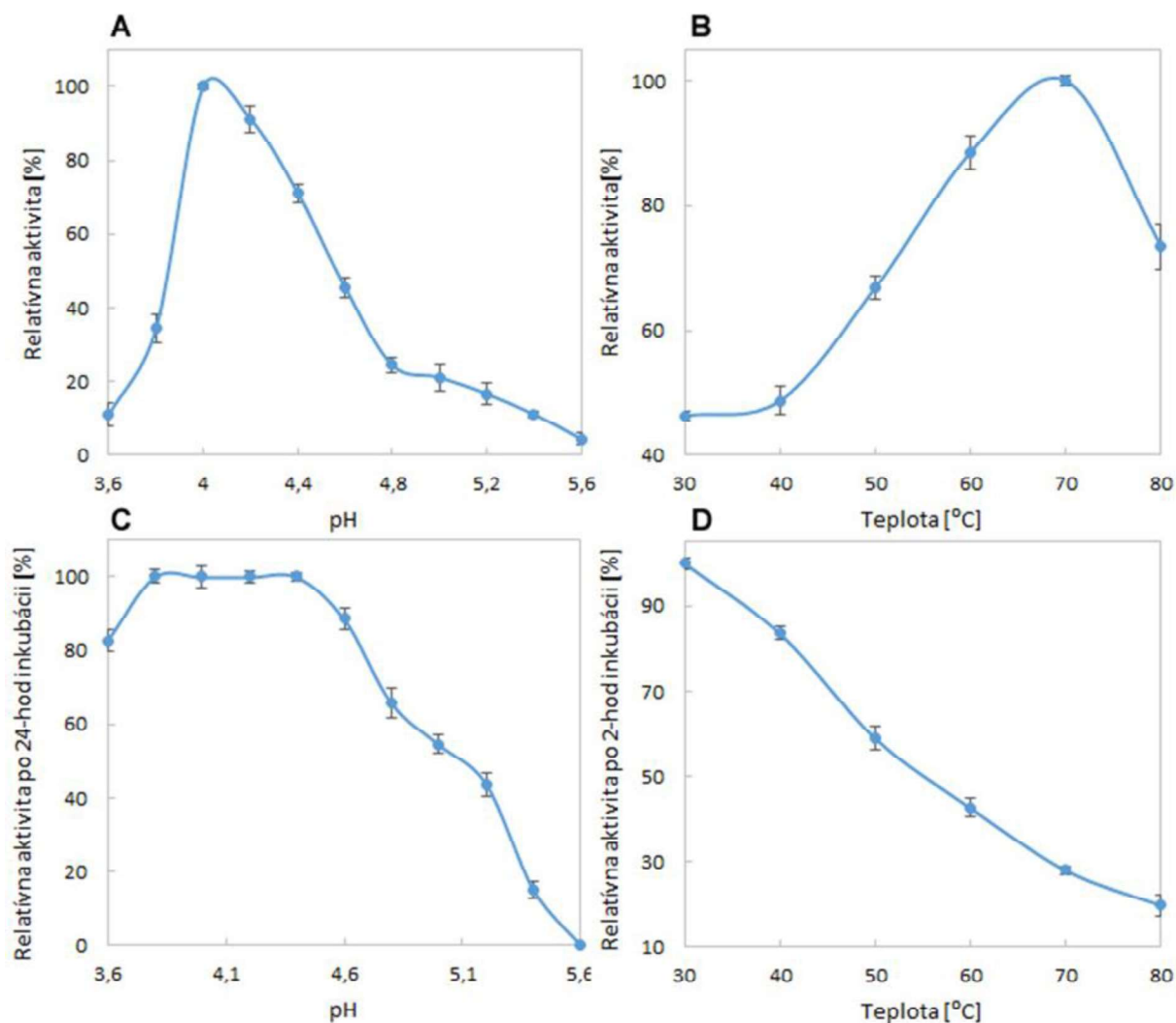
Výsledky a diskusia

Proteínová štruktúra A0A161ZKU8_DAUCS (UniProtKB) vykazovala na základe homológií potenciál katalyzovať reakciu typickú pre exoPGázy [6]. Zvolili sme aktuálne najprístupnejší spôsob, ako získať príslušný proteín – na základe informácie z ENA o poradí nukleotidov, z ktorých bola štruktúra preložená, sme dali pripraviť syntetický gén, transformovali sme ho do produčného kmeňa *Pichia pastoris* GS115 a po jeho kultivácii prezrážali kultivačné médium a odsolili získané proteíny. Prítomnosť proteínu bola dokázaná hmotnostnou spektrometriou (detekcia 94,2% sekvencie). Touto metódou bolo súčasne stanovené zloženie kontaminujúcich proteínov, z ktorých ani jedna štruktúra nemala aminokyselinové sekvencie, ktoré by umožnili viazanie PGA a jej hydrolýzu, pričom A0A161ZKU8_DAUCS bol majoritnou zložkou zmesi. Získaná zmes vykazovala aktivitu na PGA ako substrát, na základe ktorej sme A0A161ZKU8_DAUCS mohli ďalej charakterizovať. Táto aktivita aj umožnila zaradiť proteín ako hydrolázu patriacu do GH rodiny 28.

Enzým vykazoval vyše 20-krát vyššiu aktivitu na PGA ako na GA₅, t.j. mal výraznú preferenciu pre polymérne substráty, pričom primárnym produktom štiepenia PGA bola kyselina D-galaktopyranurónová. Pôvodne sa predpokladalo, že kým mikrobiálne enzýmy preferujú substráty s nízkym DP alebo DP ich aktivitu vôbec neovplyvňuje, rastlinné exoPGázy preferujú D-galakturonány s DP > 20 a sú produkované vo forme jediného izoenzýmu [10]. Zlepšenie detekčných techník exoPGázových aktivít v géloch po IEF-PAGE [2] umožnilo identifikáciu viacerých foriem tohto enzýmu produkovaných v mrkvových koreňoch [3] a ich následnú biochemickú charakterizáciu. Táto ukázala aj produkciu izoform so substrátovou špecificitou, ktorá sa predtým pripisovala výlučne mikroorganizmom [4], ale A0A161ZKU8_DAUCS môžeme považovať za typickú rastlinnú exoPGázu s preferenciou pre vysokomolekulárne substráty. Z tohto hľadiska by mohla byť zaujímavá pre kryštalografické štúdie.

Biochemická charakterizácia A0A161ZKU8_DAUCS ukázala, že pH optimum jej aktivity je 4,0 (Obr. 1A), pričom toto platí aj pre PGA aj pre GA₅ ako substrát. Teplotné optimum enzýmu je extrémne vysoké, 70 °C (Obr. 1B), ale takéto optimum bolo publikované

aj pre izoformy exoPGázy izolovanej priamo z rastlín [3] na rozdiel od polygalakturonáz, ktoré štiepia PGA náhodne a ktorých typické teplotné optimum sa pohybuje okolo 40 °C. Stabilita enzýmu skladovaného pri 4 °C v octanových tlmivých roztokoch s rôznym pH po 24 hod ukázala, že je stabilný v rozsahu pH 3,8 – 4,4 (Obr. 1C), ale v pH 5,6 už nemal žiadnu aktivitu. Tepelná stabilita bola stanovená po dvoj-hodinovej inkubácii enzýmu pri danej teplote (Obr. 1D). Aktivita enzýmu postupne klesala, pričom 50% pokles aktivity nastal pri približne 55 °C a pri teplotnom optime si zachoval len 28 % pôvodnej aktivity.

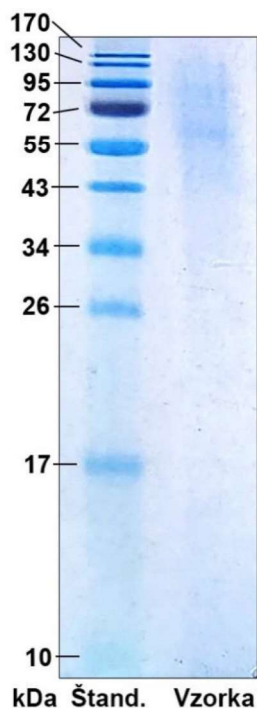


Obr. 1. Biochemická charakterizácia A0A161ZKU8_DAUCS. A – pH optimum, B- teplotné optimum, C - pH stabilita, D – tepelná stabilita

Aktivita je vyjadrená ako relatívna aktivita v %, pričom 100% zodpovedá najvyššej zistenej aktivite v súbore stanovenia. Aktivity boli stanovené na PGA ako substrát

Vypočítaná molekulová hmotnosť proteínu je 39,19 kDa [6], ale keďže má tri glykozylačné miesta, dá sa predpokladať, že niektoré z nich budú obsadené (hlavne pri

produkcii v *Pichia pastoris*), a preto bude pre glykoproteín vyššia. Ostatné potencionálne exoPGázy *Daucus carota* majú jedno glykozylačné miesto, pričom sa toto nachádza v bezprostrednej blízkosti aktívneho miesta a je konzervované aj v exo- aj v endo-PGázach [11]. Jeho obsadenie je nevyhnutné pre aktivitu enzýmu [12], keďže pravdepodobne stabilizuje aktívne miesto. SDS-PAGE ukázala prítomnosť majoritného proteínu v zmesi s molekulovou hmotnosťou okolo 60 kDa (Obr. 2.).



Obr. 2. SDS-PAGE prezrážaných proteínov produkovaných *P. pastoris*_A0A161ZKU8

Vypočítaný izoelektrický bod proteínu je 7,04 [6], ale rovnako ako v prípade molekulovej hmotnosti nevieme, ako ho ovplyvnili posttranslačné modifikácie. Experimentálne bude stanovený IEF-PAGE po prečistení enzýmu.

Skladovacia stabilita A0A161ZKU8_DAUCS bola overená po mesiaci státia odsoleného preparátu (vo vode) pri 4 °C. Enzým si zachoval približne 55% pôvodnej aktivity, čo umožňuje ďalšie experimenty, napr. ohľadom jeho purifikácie.

Do štruktúry A0A161ZKU8_DAUCS bol vložený His-tag, ale enzým sa v priebehu purifikácie na afinitnom nosiči ireverzibilne inaktivoval. Predpokladáme, že dôvodom bola jeho nestabilita v zásaditej oblasti pH (Obr. 1C), ktorá je nutná pre špecifické viazanie proteínu na nosič. Z tohto dôvodu bude potrebné na purifikáciu využiť iné analytické postupy.

Záver

Pichia pastoris GS115 transformovaná syntetickým génom s nukleotidovou sekvenciou KZM86650.1 (ENA) produkovala do kultivačného média proteín so štruktúrou zodpovedajúcou A0A161ZKU8_DAUCS (UniProtKB). Tento proteín vykazoval exoPGázovú aktivitu, t.j. katalyzoval hydrolytické štiepenie D-galakturonánu, pričom ako jediný produkt štiepenia bola D-galaktopyranurónová kyselina. Enzým má výraznú preferenciu pre polymérny substrát. Jeho pH optimum je pri 4,0 a je stabilný v rozsahu pH 3,8 – 4,4. Teplotné optimum má pri 70 °C, ale po dvoch hodinách pri tejto teplote si zachováva len 28 % pôvodnej aktivity. Ide o prvú čiastočne charakterizovanú izoformu exoPGázy z *Daucus carota* s priradenou primárnou štruktúrou. Po prečistení enzýmu bude stanovený jeho izoelektrický bod, glykozylácia a pokúsime sa pripraviť dostatočné množstvo proteínu pre kryštalografické štúdie.

PodĎakovanie

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja, ako aj vďaka podpore grantu VEGA 2/0137/20 (SK).

Zoznam použitej literatúry

- [1] Rexová-Benková L., Markovič O. (1976) Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 33, p. 323
- [2] Markovič O., Mislovičová D., Biely P., et al. (1995) J. Chromatogr. 603, p. 243
- [3] Stratilová E., Dzúrová M., Mislovičová D. (1996) In Pectin and Pectinases, Progress in Biotechnology 14 (Visser J., Voragen A.G.J. eds.). Elsevier Science, Amsterdam, p. 807
- [4] Stratilová E., Markovič O., Dzúrová M. et al. (1998) Biologia, Bratislava 53, p. 731
- [5] Abbott D. W., Boraston A. B. (2007) J. Mol. Biol. 368, p. 1215
- [6] Stratilová B., Horváthová A., Kozmon, S., et al. (2021) Zborník ŠVK, Prif UK, p. 767
- [7] Stratilová B., Firáková Z., Klauďný J., et al. (2019) Plant Mol. Biol. 100, p.181
- [8] Laemmli U. K. (1970) Nature 227, p. 680
- [9] Somogyi M. (1952) J. Biol. Chem. 195, p. 19
- [10] Heinrichová K. (1977) Collect. Czech. Chem. Commun. 42, p. 3214
- [11] Stratilová E., Mislovičová D., Kačuráková M., et al. (1998) J. Prot. Chem. 17, p. 173
- [12] Stratilová E., Mislovičová D., Dzúrová M. (1998) Biotechnol. Tech. 10, p. 363