



**ZBORNÍK PRÍSPEVKOV**

**3. KONFERENCIE**

**CENTRA EXCELENTNOSTI**

Aplikácia OMICS nástrojov v štúdiu vzniku chorôb a ich prevencie



Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, Bratislava

30. november 2022

**Recenzent**

RNDr. Jana Bellová, PhD.

[chemjbel@savba.sk](mailto:chemjbel@savba.sk)

**Editor**

Mgr. Mária Šedivá, PhD.

[chemsedm@savba.sk](mailto:chemsedm@savba.sk)

Ing. Mária Kopáčová

[chemmari@savba.sk](mailto:chemmari@savba.sk)

**ISBN 978 – 80 – 971665 – 4 - 0**

# Čiastočná biochemická charakterizácia proteínu UniProtKB Q75XT0

Barbora Stratilová, Sergej Šesták, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-84538 Bratislava

## Úvod

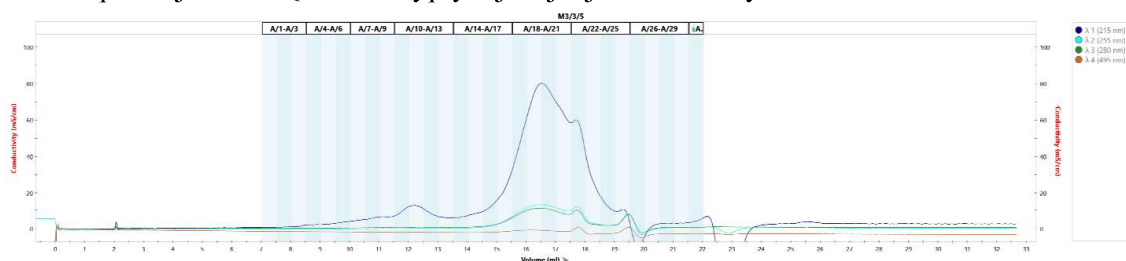
Prudký rozvoj nukleotidových a proteínových databáz spojený s vývojom výpočtovej techniky viedol k významným zmenám v metódach práce s neznámymi bielkovinami, ktorá sa prejavila napr. v čiastočnom nahradení ich komplikovaných purifikácií zo surových prírodných materiálov s cieľom stanoviť ich kompletnú štruktúru a charakteristiky, na prácu s databázami, prípravu syntetických génov a expresiu cieľových proteínov na základe ich čiastočnej biochemickej charakterizácie. Na otestovanie spôsobilosti takejto metódy sme z databázy UniprotKB [1] vybrali proteín Q75XT0, ktorý by mal na základe štruktúry reprezentovať glykozidhydrolázu (GH) z rodiny 28 [2].

## Materiál a metódy

Na základe bioinformatickej analýzy [3] sme potvrdili, že hypotetický proteín Q75XT0 vykazuje prítomnosť aminokyselín esenciálnych pre viazanie a hydrolýzu substrátov typických pre enzýmy rodiny GH 28. V databázach sme vyhľadali jeho nukleotidovú štruktúru (ENA, BAC87792), komerčnou cestou dali pripraviť syntetický gén (ProteoGenixSAS) a transformovali ho do *Pichia pastoris* GS115 [4]. Cieľový proteín bol získaný rovnakým postupom ako proteín A0A161ZKU8 [5] a rovnako bol následne čiastočne charakterizovaný. Expresia proteínu Q75XT0 bola v kultivačnom médiu potvrdená hmotnostnou spektrometriou (Orbitrap Elite, ThermoScientific) [6], pričom boli súčasne stanovené kontaminujúce proteíny pochádzajúce z *P. pastoris*.

## Výsledky a diskusia

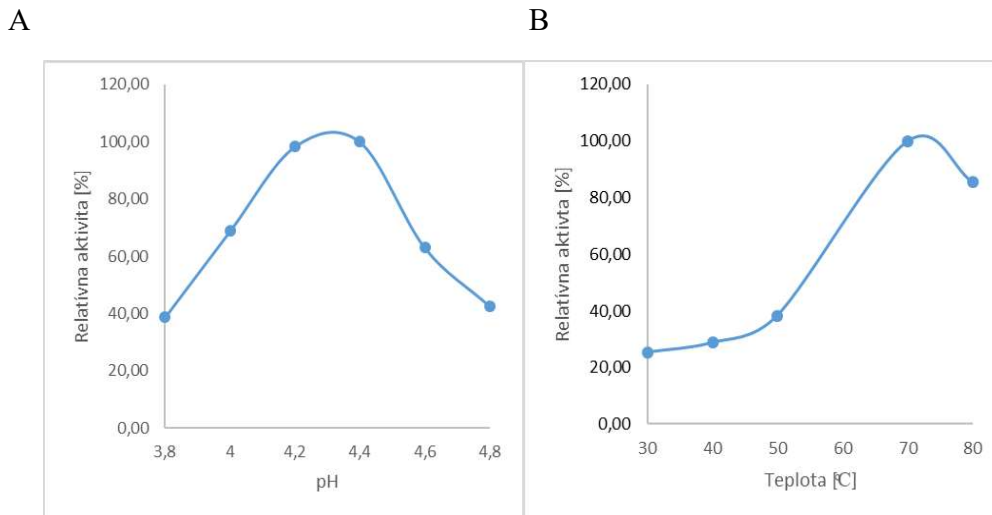
Bioinformatická analýza ukázala, že žiaden z kontaminujúcich proteínov, ktoré pochádzajú z produkčného kmeňa *P. pastoris*, neobsahuje aminokyseliny, ktoré sú esenciálne pre katalytickú aktivitu rodiny GH 28, t.j. nemôže ovplyvňovať výsledky zistené na základe stanovenia enzýmovej aktivity Q75XT0. Proteínový profil prezrážaných proteínov separovaných podľa ich molekulovej hmotnosti (Mh) je zobrazený na **Obr. 1**. Najvyššia enzýmová aktivita sa zistila vo frakcii 12,5 ml, ktorá korešponduje s Mh Q75XT0 vyplývajúcej z jeho štruktúry.



**Obr. 1.** Proteínový profil prezrážaného kultivačného média na kolóne Superose 1 zapojenej do zariadenia NGC (Bio-Rad).

Stanovenie aktivity na polysacharid a jeho pentamér ukázalo, že aktivita na polysacharid je približne 2,7 x vyššia ako na pentamér. V porovnaní s izoformou A0A161ZKU8 bol tento pomer rádovo nižší, keďže v prípade A0A161ZKU8 bol tento pomer v prospech polyméru vyšší viac ako 20x.

Ďalší rozdiel medzi týmito dvomi formami sa zistil pri stanovení pH optima, ktoré mala izoforma Q75XT0 približne 4,3 na rozdiel od pH optima A0A161ZKU8, ktoré bolo okolo pH 4,0 (**Obr. 2A**). Teplotné optimum mali rovnako vysoké, 70 °C (**Obr. 2B**), čo je hodnota typická pre tieto enzýmy [7].



**Obr. 2.** Charakterizácia Q75XT0. A - pH optimum, B – teplotné optimum

### **Záver**

Proteín Q75XT0 je rovnako ako proteín A0A161ZKU8 [4] typickou glykozidhydrolázou, ktorá patrí do GH rodiny 28. Má preferenciu pre vysokomolekulárne substráty, od A0A161ZKU8 sa líši pH optimum, kým teplotné optimum majú identické. Ide o prvú čiastočnú charakterizáciu tohto enzýmu na úrovni jeho experimentálne stanovenej aktivity.

### **PodĎakovanie**

Tento príspevok vznikol 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.

### **Literatúra**

- [1] The UniProt Consortium (2019) Nucleic Acid. Res. 47, p. D506.
- [2] Drula E., Garron M.-L., Dogan S., a kol. (2022) Nucleic Acid. Res. 50, p. D571.
- [3] Stratilová B., Horváthová A., Kozmon, S., et al. (2021) Zborník ŠVK, Prif UK, p. 767.
- [4] Stratilová B., Firáková Z., Klauďiny J., a kol. (2019) Plant Mol. Biol. 100, p.181.
- [5] Stratilová B., Šesták S., Lukáčová V., a kol. (2022) Zborník ŠVK, Prif UK, p. 949.
- [6] Lukáčová V., Danchenko M., Šesták S., a kol. (2022) Zborník ŠVK, Prif UK, p. 860.
- [7] Stratilová E., Markovič O., Dzúrová M., a kol. (1998) Biologia, Bratislava 53, p. 731.