

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

**FAKULTA
BIOMEDICÍNSKÉHO
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ
PRÁCE**

2019

**NIKOLA
RYCHLÁ**



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Mutantní glykosidasy se změněnou substrátovou specifitou

Mutant Glycosidases with an Altered Substrate Specificity

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Nikola Rychlá

Kladno, květen 2019

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Rychlá** Jméno: **Nikola** Osobní číslo: **465758**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Mutantní glykosidasy se změněnou substrátovou specifitou

Název bakalářské práce anglicky:

Mutant Glycosidases with an Altered Substrate Specificity

Pokyny pro vypracování:

Enzymová syntéza komplexních sacharidových struktur je výhodnou alternativou organické syntézy zejména pro svou šetrnost, selektivitu a nízký počet reakčních kroků, vedoucích v součtu k dobrým celkovým výtěžkům. Glykosidasy jsou in vivo hydrolytické enzymy; jejich vlastnosti jako syntetický potenciál a substrátovou specifitu lze manipulovat cílenou mutagenézí. N-acetylhexosaminidasy jsou glykosidasy, které vykazují duální aktivitu vůči dvěma substrátům - N-acetylgalaktosaminu (GalNAc) a N-acetylglukosaminu (GlcNAc). Vyšší selektivita by u těchto enzymů byla přímo využitelná pro syntézu bioaktivních oligosacharidů. Cílem práce je příprava alespoň jedné N-acetylhexosaminidasy se změněným poměrem aktivit vůči N-acetylgalaktosaminu (GalNAc) a N-acetylglukosaminu (GlcNAc) a její charakterizace. Teoretická část práce bude zaměřena na charakterizaci enzymů glykosidas a využití genetického inženýrství ke změně jejich substrátové specifity. Praktická část práce zahrnuje PCR, izolaci a manipulaci s DNA, transformaci a kultivaci E. coli a P. pastoris, chromatografickou purifikaci enzymu, a jeho biochemickou charakterizaci.

Seznam doporučené literatury:

- [1] Slámová, K., Bojarová, P., Engineered N-acetylhexosamine-active enzymes in glycoscience. Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj., číslo 1861(8), 2017, 2070-2087 s., ISSN 0304-4165
- [2] Armstrong, Z., Withers, S. G., Synthesis of glycans and glycopolymers through engineered enzymes. Biopolymers, číslo 99(10), 2013, ISSN 666-674
- [3] Bojarová, P., Kulik, N., Slámová, K., Hubálek, M., Kotik, M., Cvačka, J., Pelantová, H., Křen V., Selective N-acetylhexosaminidase from Aspergillus versicolor - a tool for producing bioactive carbohydrates, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2018, submitted

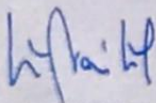
Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Pavla Bojarová, PhD.

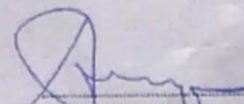
Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **28.09.2018**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2020**



prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vpodoucí(ho) katedry



prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci s názvem Mutantní glykosidasy se změněnou substrátovou specifitou vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 14.05.2019

.....
podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí mé práce RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D., za čas, trpělivost a podnětné rady při psaní práce. Za předchozí výzkum, který byl stěžejním podkladem pro mou práci, děkuji Ing. Natalii Kulik, Ph.D., a rovněž Dr. sc. nat. Michaelovi Kotíkovi, Ph.D., za teoretické i praktické rady. A v neposlední řadě vedení Laboratoře biotransformací, především prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc, a celému kolektivu laboratoře za veškerou pomoc s praktickou částí mé bakalářské práce.

Abstrakt

Glykosidasy jsou hydrolytické enzymy, které lze při vhodné úpravě reakčních podmínek využít v laboratoři při syntéze oligosacharidů. Mezi glykosidasy řadíme enzymy mikrobiálního, rostlinného i živočišného původu. V rámci této práce jsou zkoumány β -*N*-acetylhexosaminidasy patřící do skupiny glykosidas. V lidském organismu se účastní patofyziologie osteoartritidy nebo chronické myeloproliferativní nemoci. Jejich absence vede k závažným vrozeným poruchám metabolismu, jako je Tay-Sachs a Sandhoffova choroba, a v posledních studiích se prokázala i souvislost mezi mutacemi β -*N*-acetylhexosaminidas a patofyziologií Alzheimerovy choroby. Výzkum těchto enzymů by mohl napomoci budoucí léčbě právě těchto onemocnění [1; 2; 3].

Cílem teoretické části práce byla literární rešerše enzymů glykosidas a využití genetického inženýrství ke změně jejich substrátové specifity. Praktická část práce zahrnuje PCR, izolaci a manipulaci s DNA, transformaci a kultivaci *E. coli* a *P. pastoris*, chromatografickou purifikaci jedné mutantní enzymové varianty a její biochemickou charakterizaci.

V rámci této práce byla v hostiteli *Pichia pastoris* heterologně exprimována, produkována a charakterizována mutantní β -*N*-acetylhexosamidasa z *Talaromyces flavus*, *TfHex R218H*. Druhá část práce je věnována analýze sekvencí genů mutantních β -*N*-acetylhexosaminidas připravených řízenou evolucí s cílem identifikovat vnesené mutace.

Klíčová slova

β -*N*-Acetylhexosaminidasy; cílená mutagenese; enzymová syntéza; *Escherichia coli*; glykosidasy; heterologní exprese; *Pichia pastoris*; purifikace; substrátová specifita.

Abstract

Glycosidases are hydrolytic enzymes that may be used for the laboratory synthesis of oligosaccharides by appropriate adjustment of reaction conditions. They are enzymes of microbial, plant and animal origin. In the frame of this work, we focus on β -*N*-acetylhexosaminidases, belonging to the group of glycosidases. In the human organism, β -*N*-acetylhexosaminidases may be involved in the pathophysiology of osteoarthritis or chronic myeloproliferative disease. The absence of β -*N*-acetylhexosaminidases leads to severe congenital metabolic disorders, such as Tay-Sachs and Sandhoff's diseases, and recent studies have also shown a link between β -*N*-acetylhexosaminidase mutations and the pathophysiology of Alzheimer's disease. Research on these enzymes might help to treat these diseases in the future [1; 2; 3].

The aim of the theoretical part of this work is a literature review of glycosidase enzymes and the use of genetic engineering to change their substrate specificity. The practical part includes PCR, isolation and DNA manipulation, transformation and cultivation of *E. coli* and *P. pastoris*, chromatographic purification of one mutant enzyme variant and its biochemical characterization.

In this work, the mutant β -*N*-acetylhexosaminidase from *Talaromyces flavus*, *TfHex* R218H, was heterologously expressed in the *Pichia pastoris* host, produced and characterized. The second part of the work is devoted to the analysis of the sequences of the genes of β -*N*-acetylhexosaminidase mutant variants prepared by directed evolution in order to identify the introduced mutations.

Keywords

β -*N*-Acetylhexosaminidases; enzymatic synthesis; *Escherichia coli*; glycosidases; heterologous expression; *Pichia pastoris*; purification; substrate specificity.

Obsah

1	Úvod	11
2	Současný stav	12
2.1	Glykosidasy.....	12
2.1.1	Charakterizace	12
2.1.2	β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidasy.....	13
2.2	Heterologní exprese glykosidas	15
2.2.1	<i>Pichia pastoris</i>	16
2.2.2	<i>Escherichia coli</i>	18
2.3	Genetické inženýrství.....	20
2.3.1	Charakteristika	20
2.3.2	Základní molekulárně biologické metody genetického inženýrství.....	21
2.4	Syntéza pomocí glykosidas	25
2.4.1	Charakterizace	25
2.4.2	Syntéza oligosacharidů pomocí glykosidas	25
2.4.3	Mutantní glykosidasy	26
3	Cíl práce.....	28
4	Metodika.....	29
4.1	Použité přístroje a materiály.....	29
4.1.1	Přístrojové vybavení.....	29
4.1.2	Použitý materiál	29
4.2	Heterologní exprese mutantní β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy v <i>P. pastoris</i>	31
I.	Transformace do kompetentních buněk <i>E. coli</i> metodou teplotního šoku	32

4.2.2	Izolace plasmidu metodou midi prep	32
4.2.3	Charakterizace izolovaného plasmidu.....	33
4.2.4	Štěpení plasmidu restričním enzymem <i>SacI</i>	34
4.2.5	Elektroporace	35
4.2.6	Produkce mutantní β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy v <i>P. pastoris</i>	36
4.2.7	Charakterizace mutantní β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy	38
4.3	Identifikace sekvence genů mutantních β - <i>N</i> -acetylhexosaminidas <i>TfHex</i> připravených řízenou evolucí.....	40
4.3.1	Izolace chromozomální DNA pomocí zymolyasy	40
4.3.2	Polymerasová řetězová reakce (PCR) a izolace produktů	41
4.3.3	Ligace mutantních genů do vektoru pro sekvenaci	41
4.3.4	Transformace do kompetentních buněk <i>E. coli</i> metodou teplotního šoku II.....	42
4.3.5	Izolace plasmidů metodou mini prep	42
5	Výsledky.....	44
5.1	Produkce a purifikace mutantní β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy <i>TfHex</i> R218H	44
5.1.1	Výsledky purifikace.....	45
5.1.2	Biochemická stanovení	46
5.2	Identifikace sekvence genů mutantních β - <i>N</i> -acetylhexosaminidas <i>TfHex</i> připravených řízenou evolucí.....	49
5.2.1	Výsledné sekvence genů mutantních β - <i>N</i> -acetylhexosaminidas	52
6	Diskuze	53
7	Závěr.....	56
8	Seznam použitých zkratk.....	57
9	Seznam použité literatury	59

10	Seznam použitých obrázků	64
11	Seznamu použitých tabulek	65
12	Seznam Příloh	66

1 ÚVOD

Glykosidasy jsou enzymy patřící mezi hydrolasy, neboli enzymy katalyzující rozkladné reakce, kterých se účastní molekula vody. Přirozeně se vyskytují jak rostlinného, tak v živočišného původu. Jsou přítomny v mikroorganismech, houbách, vyšších organismech a mnohé jsou dostupné komerčně. Mezi glykosidasy řadíme například celulasy, chitinasy, isoamylasy, β -galaktosidasy aj. [1; 2; 4].

V rámci této práce jsou zkoumány β -*N*-acetylhexosaminidasy, enzymy patřící do skupiny glykosidas. Tyto enzymy se nacházejí napříč všemi organismy na Zemi. Jsou typické štěpením mnoha různých substrátů, jako jsou chitooligomery, chitin, glykokonjugáty a další glykopolymery. β -*N*-acetylhexosaminidasy štěpí glykosidovou vazbu β -vázaného *N*-acetyl-*D*-glukosaminu (GlcNAc) nebo *N*-acetyl-*D*-galaktosaminu (GalNAc), vyznačují se tedy duální substrátovou aktivitou. Aktivita pro oba substráty je povětšinou srovnatelná. Poměr mezi substráty se dá upravit vhodnou změnou reakčních podmínek nebo genetickým inženýrstvím [1; 2; 5].

Prozatím jsou nejvíce studovány β -*N*-acetylhexosaminidasy bakteriálního původu, zastávají funkci hlavně recyklační. Obecně patří mezi nejaktivnější lysozomální β -*N*-hexosaminidasy a v lidském organismu se podílejí například na fertilizaci oocytů, jejich absence vede ke vrozeným metabolickým poruchám jako je Tay-Sachsova a Sandhoffova choroba, nebo jejich hladina souvisí s rozvojem Alzheimerovy choroby. Studium a výzkum β -*N*-acetylhexosaminidas by mohl pozitivně přispět budoucí léčbě právě těchto onemocnění [1; 2; 3].

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Glykosidasy

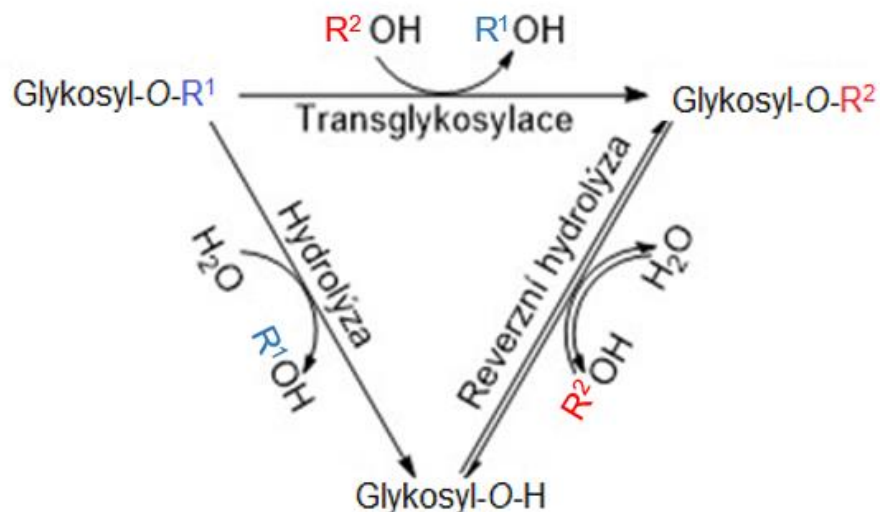
2.1.1 Charakterizace

Glykosidasy (EC 3.2.1) jsou hydrolytické enzymy schopné štěpit oligo- a polysacharidy tak, že přenášejí glykosyl (sacharidový zbytek) na molekulu vody. Pro použití v laboratoři je v mnoha směrech považujeme za výhodné, zejména díky jejich snadné dostupnosti, vysoké stereoselektivitě a stabilitě. Jsou známé svým širokým spektrem donorů a akceptorů a tolerancí k modifikacím v substrátové molekule. Ačkoliv tyto enzymy v přírodě glykosidovou vazbu štěpí, lze je vhodnou úpravou reakčních podmínek použít i k syntéze glykosidové vazby. Potenciální nevýhody při syntetické aplikaci spočívají v nízké regioselektivitě a nižším výtěžku, což může být kompenzováno např. použitím kosolventů nebo jinými metodami potlačujícími aktivitu vody v reakční směsi [1].

Mezi glykosidasy řadíme enzymy rostlinného i živočišného původu. Nacházejí se v mikroorganismech, houbách i vyšších organismech a mnohé jsou jako hrubé enzymové preparáty dostupné komerčně [1].

Příkladem glykosidasy je chitinasa štěpící chitin - polysacharid přirozeně se vyskytující v houbách, hmyzu a korýších. β -Galaktosidasa katalyzuje hydrolyzu laktosy na glukosu a galaktosu; celulasa, nacházející se jako enzymatické vybavení prvoků v trávicím systému přežvýkavců, katalyzuje hydrolyzu celulosy. Dalšími příklady jsou β -amylasy získané převážně z rostlin nebo isoamylasy, které je možno izolovat z gramnegativních bakterií [2; 4].

Řada glykosidas se běžně nachází i v lidském těle. Jedním ze zástupců jsou trávicí enzymy, např. α -amylasa vyskytující se ve dvou formách jako slinný a pankreatický izoenzym. Katalyzuje štěpení α -1,4-vazby, která se nachází v oligo- i polysacharidech přijímaných v potravě. Glykosidasy se v lidském organismu podílejí i na syntéze oligosacharidových řetězců glykoproteinů, a zároveň se účastní patologických procesů některých vrozených metabolických vad nebo neurodegenerativních onemocnění [1; 4].



Obrázek 1 Schéma reakcí katalyzovaných glykosidasami (převzato z [1]) Během reverzní hydrolyzy (kondenzace) se volný monosacharid spojuje s nukleofilem za odštěpení molekuly vody. Transglykosylace spočívá ve využití aktivovaného glykosidu s vhodnou odstupující skupinou (R²) jako donoru glykosylu [1].

2.1.2 β -N-Acetylhexosaminidasy

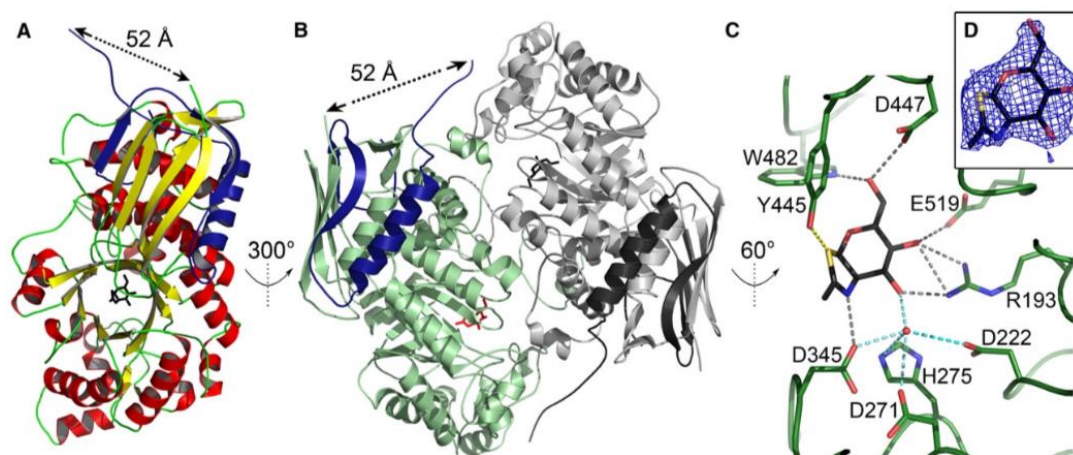
2.1.2.1 Charakteristika

β -N-Acetylhexosaminidasy (EC 3.2.1.52) jsou v systému CAZy (*Carbohydrate- Active enZymes*, <http://www.cazy.org/> [6]) zastoupeny ve třech rodinách, a to GH3, 20 a 84. Enzymy patřící do jedné rodiny jsou si funkčně podobné. Přestože nemusejí mít nutně vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci, vyskytují se u všech základní společné rysy jak strukturního charakteru, tak katalytického mechanismu [3].

β -N-Acetylhexosaminidasy jsou známé pod systematickým názvem 2-acetamido-2-deoxy- β -D-hexopyranosid-2-acetamido-2-deoxyhexahydrolasy. Patří mezi *exo*-glykosidasy, to znamená, že odštěpují koncový glykosyl z řady různých substrátů, jako je chitin, chitooligomery, glykosfingolipidy a další glykokonjugáty a glykopolymeru [1; 2; 3].

Fungální enzymy z rodiny GH 20 obsahují dvě katalytické podjednotky a dva propeptidy. Ty se účastní regulace a extracelulární sekrece. Bližší informace o struktuře synteticky nejvyužívanějších β -N-acetylhexosaminidas z rodiny GH20 nám poskytuje krystalová struktura enzymu z kropidláku rýžového (*Aspergillus oryzae*), znázorněná

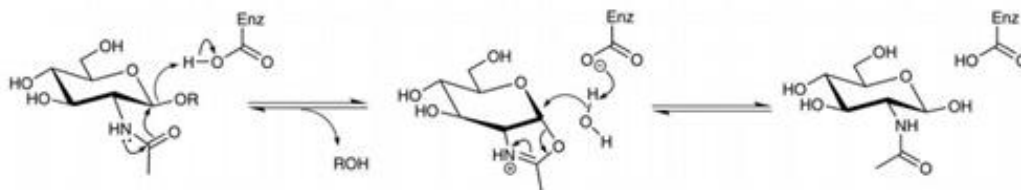
na Obr. 2. Nicméně je dostupná i krystalická struktura enzymů z gramnegativních bakterií, jako je *Serratia marcescens* nebo *Bacteroides fragilis* [7; 8].



Obrázek 2 Krystalová struktura β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (převzato z [9]), rozlišení 2,30–2,44 Å. **(A)** Celková struktura monomeru AoHex. Modře je zobrazen propeptid a místo aktivované peptidasou je označeno šipkou. Ta zároveň zobrazuje vzdálenost mezi C-koncem propeptidu a N-koncem katalytické podjednotky. **(B)** Zobrazení AoHex dimeru. Monomer A je zelený s tmavě modrým propeptidem; NGT (thiazolin odvozený od N-acetylglukosaminu) je zobrazen červeně. Monomer B je šedý s propeptidem i NGT v černé barvě. **(C)** Aktivní místo s navázaným NGT pomocí polárních interakcí. Šedě jsou označeny přímé vodíkové vazby. Vodíkové vazby tvořené prostřednictvím vody jsou označeny modře a prostřednictvím síry žlutě. **(D)** Zobrazení mapy elektronové hustoty NGT [9].

2.1.2.2 Duální substrátová specifita

β -N-Acetylhexosaminidasy katalyzují hydrolytické štěpení glykosidové vazby koncových zbytků β -vázaného N-acetyl-D-glukosaminu (GlcNAc) a N-acetyl-D-galaktosaminu (GalNAc). Tyto enzymy vykazují většinou srovnatelnou aktivitu pro oba tyto substráty, neupřednostňují hydrolyzu GlcNAc ani GalNAc. Standardní poměr mezi jednotlivými aktivitami pro oba substráty se pohybuje mezi 1,4–4 [3]. Substrátovou specifitu je možné zvýšit úpravou reakčních podmínek nebo genetickým inženýrstvím [5].



Obrázek 3 Schéma katalytického mechanismu β -N-acetylhexosaminidas (převzato z [10]). Katalytický mechanismus β -N-acetylhexosaminidas je variantou retenujícího mechanismu s dvojitou změnou anomerní konfigurace. Nedochozí zde ke vzniku kovalentního glykosyl-enzymového meziproduktu, jak je tomu u klasických retenujících glykosidas, ale meziprodukt se stabilizuje 2-acetamidovou skupinou samotného substrátu za vzniku oxazoliniového meziproduktu [1].

2.1.2.3 β -N-Acetylhexosaminidasy *in vivo*

β -N-Acetylhexosaminidasy jsou široce zastoupeny ve všech organismech žijících na Zemi. Nacházejí se v rostlinách, živočiších, houbách i mikroorganismech. Jedinou výjimku tvoří prokaryotické jednobuněčné organismy patřící do skupiny *Archea*. Funkce těchto enzymů je úzce spjata s organismem, ve kterém se nacházejí. Prozatím byly nejvíce studovány β -N-acetylhexosaminidasy bakteriálního původu, kde zastávají funkci hlavně recyklační a mají roli v degradaci buněčné stěny. Obecně patří mezi nejaktivnější lysozomální hexosaminidasy a jsou nezbytné pro metabolismus chitinu [1; 3].

V lidském organismu jsou nejvíce studovány dvě β -N-acetylhexosaminidasy, HexA ($\alpha\beta$) a HexB ($\beta\beta$). Během fertilizace oocytů zajišťují interakci gamet. Účastní se též různých modifikací proteinů podílejících se na stárnutí mozkových buněk, a jejich hladina souvisí i s rozvojem Alzheimerovy choroby. Můžeme je sledovat jako markery dalších onemocnění hlavně z oblasti pediatrie, urologie a neurologie, jako např. osteoartritidy nebo chronické myeloproliferativní choroby [1; 2; 3].

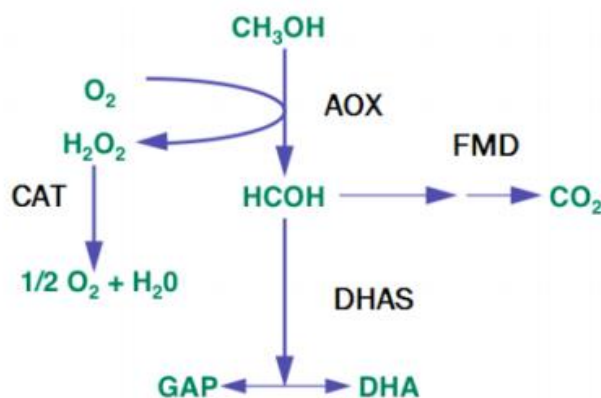
2.2 Heterologní exprese glykosidas

Heterologní exprese spočívá ve vnesení genu nebo části genu do jiného organismu, který tento gen či fragment přirozeně neobsahuje, a následné transkripci a translaci genu v hostitelském organismu. Inzerce genu je zajišťována rekombinantními DNA technologiemi. Hostitelské organismy mohou být kvasinky, bakterie, savčí nebo rostlinné buňky. K expresi glykosidas se nejčastěji využívají kvasinky, jako jsou *Pichia pastoris* nebo *Saccharomyces cerevisiae*, z bakterií to jsou *Escherichia coli* a *Streptomyces lividans* [11].

2.2.1 *Pichia pastoris*

2.2.1.1 Charakteristika

Jedním ze způsobů, jak heterologně exprimovat geny pro synteticky zajímavé houbové β -*N*-acetylhexosaminidasy, je exprese v methylotrófní kvasince *Pichia pastoris*, která využívá methanol jako zdroj uhlíku. Exprese genu vloženého ve vhodném vektoru, např. *pPICZ α* , je indukována přítomností methanolu. Indukce methanolem spouští u kvasinky novou metabolickou dráhu, která zahrnuje enzym alkoholoxidasu (AOX). V prvním kroku je methanol v peroxisomu za katalýzy AOX oxidován na formaldehyd a peroxid vodíku. Dále je vzniklý peroxid vodíku rozkládán katalasou na volný kyslík a vodu. Část formaldehydu vzniklého v první reakci uniká z peroxisomu a je oxidována na oxid uhličitý. Zbytek formaldehydu vstupuje do reakce a reaguje s xylulosou- 5- monofosfátem za vzniku glycerinaldehyd-3-fosfátu a dihydroxyacetonfosfátu. Tato reakce je katalyzována enzymem dihydroxyacetonsynthasou [7; 12].

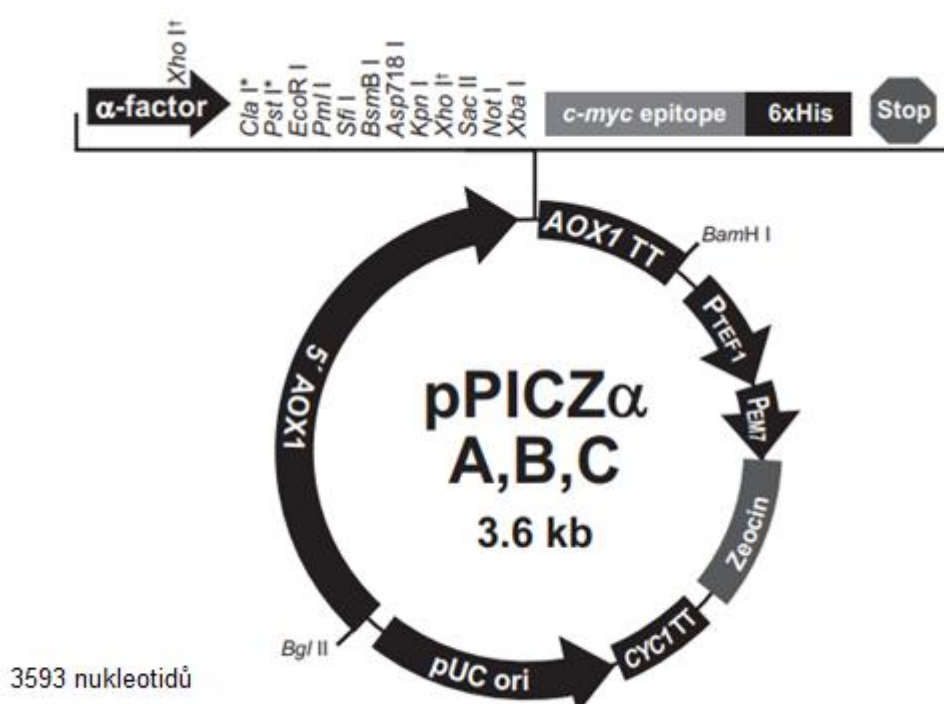


Obrázek 4 Schéma metabolické dráhy methanolu v *Pichia pastoris* (převzato z [13]). CAT – katalasa, AOX – alkoholoxidasa, FMD – formaldehyddehydrogenasa, DHAS – dihydroxyacetonsynthasa.

2.2.1.2 Heterologní exprese v *Pichia pastoris*

Řízení exprese genu námi požadovaného rekombinantního proteinu, zajišťuje *AOX₁* promotor, nacházející se na genu pro transkripci alkoholoxidasy na expresním vektoru vneseném do genomu *P. pastoris*. Přítomnost metanolu je nezbytná pro vyvolání vysoké úrovně transkripce [7].

Plasmidy neboli expresní vektory s řadou volitelných parametrů jsou v řadě případů dostupné komerčně. Pro heterologní expresi fungálních β -*N*-acetylhexosaminidas jsou vhodné vektory *pHIL-D2*, *pAO815*, *pPIC3K*, *pGAP α* , *pPICZ α A*, *B*, & *C*. Pro práci byly vybrány vektory *pPICZ α A*, *B*, & *C*. Tyto vektory mají velikost 3 500 bází, obsahují promotory *AOX₁*, sekvenci kódující rezistenci k antibiotiku zeocin, α -faktor sloužící jako signální sekvence, C-koncový peptid obsahující epitop c-myc a polyhistidin využitelný pro detekci a purifikaci rekombinantního fúzního proteinu, sadu klonovacích míst pro vložení požadovaného genu a další prvky [12; 14; 15].



Obrázek 5 Schéma vektoru *pPICZ α – A, B, C* s popisy sekvencí (převzato z [15])

K expresi je dostupných mnoho různých kmenů kvasinek. Výběr konkrétního kmenu závisí na výsledném využití. Většina z těchto kmenů má jednu nebo více auxotrofních mutací, které umožňují výběr expresních vektorů obsahující vhodný selekční markerový gen. Před transformací kmeny rostou na komplexních médiích a pro růst na minimálních médiích potřebují suplementaci živinami pro optimální růst. Často využívanými kmeny jsou např.: KM71, SMD1168, GS115, MC100-3 nebo X-33 (divoký kmen) s různými typickými genotypy [12].

Proteiny heterologně exprimované kvasinkou *P. pastoris* jsou exprimovány intracelulárně, nebo jsou vylučovány do kultivačního média. Sekrece do kultivačního média

je výhodná zejména díky tomu, že samotná kvasinka neprodukuje velké množství endogenních proteinů, a tudíž médium obsahuje převážně protein našeho zájmu. Přesto je nutné provést purifikaci k odstranění i malého množství nežádoucích proteinů [14].

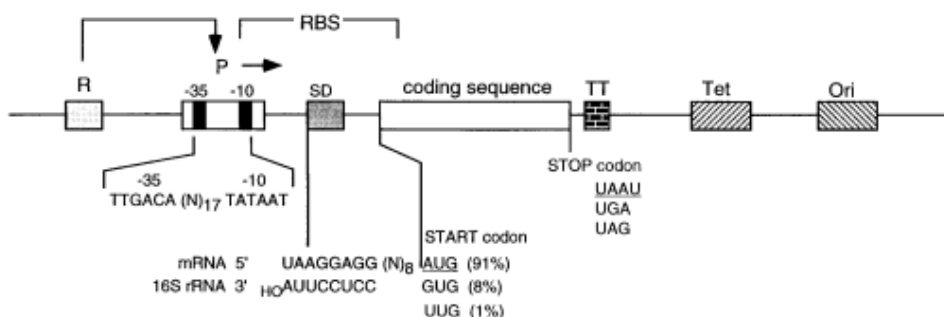
Výhody této exprese spočívají v relativně snadné produkci oproti expresi pomocí fungálních kultur a ve vysokém výtěžku enzymu produkovaného do média. Výhodou je také fakt, že k výslednému přečištění stačí pouze jeden chromatografický krok [7].

2.2.2 *Escherichia coli*

2.2.2.1 Charakteristika

V současné době existuje mnoho heterologních systémů pro expresi proteinů; přesto exprese pomocí gramnegativní bakterie *Escherichia coli* stále zůstává jednou z nejatraktivnějších možností, a to zejména díky rychlému růstu bakterie na levných a snadno dostupných substrátech, dobře charakterizovanému genomu a velkému množství komerčně dostupných vektorů a mutantních kmenů pro klonování. K produkci je taktéž nutné vybrat dobře charakterizovaný promotor. Ty se liší dle produkovaného proteinu. Bakteriální expresní systémy nejsou však vhodné pro všechny typy proteinů, neboť většina nedokáže provádět posttranskripční úpravy, jako je methylace nebo glykosylace. Z tohoto hlediska jsou výhodnější expresní systémy kvasinek, vláknitých hub nebo buňky hmyzu a savců. Další nevýhodou využití *E. coli* je akumulace lipopolysacharidu (LPS) – endotoxinu – při poškození vnější buněčné membrány. Tyto toxiny mají pyrogenní a septické účinky u lidí a zvířat. K odstranění endotoxinu je nutný purifikační krok navíc. Překážkou v expresi proteinu je i tvorba inkluzních tělísek při nadprodukcí proteinu nebo omezené možnosti sekrece proteinu do média [16; 17; 18; 19].

2.2.2.2 Heterologní exprese v *E. coli*



Obrázek 6 Schéma charakteristických vlastností a prvků prokaryotického expresního vektoru (převzato z [18]). Schéma zobrazuje hybridní tac promotor (P) skládající se z dvou částí o velikosti 35 a 10 párů bází, oddělených distanční částí o velikosti 17 párů bází. Šipka znázorňuje směr transkripce. RBS je úsek skládající se z SD (Shine-Dalgarnnova) sekvence s translační vložkou bohatou na A1T o velikosti 8 párů bází. Kódující sekvence je ohraničena START kodony (AUG, GUG, UUG) a STOP kodony (UAA, UGA, UAG). Terminátor transkripce slouží ke stabilizaci mRNA a zároveň obsahuje gen nesoucí rezistenci proti antibiotiku, zpravidla tetracyklinu. Použití plasmidu s takovým genem zajišťuje fenotypovou selekci. Represor (R) je kódován regulačním genem. Může být přítomen ve vektoru, nebo je zpravidla integrován do hostitelského chromozomu a ovlivňuje aktivitu promotoru. Sekvence Ori (origin of replication) určuje počet kopií vektoru [19; 20].

Promotory používané k expresi proteinů pomocí *E. coli* musí splňovat několik podmínek. Musí zajišťovat vysokou produkci proteinu, která by měla dosahovat alespoň 10- 30 % celkového podílu proteinů produkovaných buňkou. Úroveň hladiny bazální exprese by měla být nízká. Svou roli hraje i finanční náročnost procesu, proto by promotory a induktory měly být levné. Indukce probíhá buď teplotně nebo chemicky, typicky pomocí IPTG (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu) [18; 19].

Sekrece proteinu nejčastěji probíhá do periplazmatického prostoru nebo cytoplazmy. Výtěžky při produkci do cytoplazmy bývají vyšší, proto bývá tato forma sekrece první volbou při heterologní expresi proteinů. Pro rutinní expresi jsou využívány např. kmeny *E. coli* BL21 a K12 včetně jejich derivátů, které se vyznačují minimální bazální expesí. Výběr samotného hostitelského kmenu závisí na proteinu, který chceme exprimovat. Protein je často při nadprodukcí pro hostitele toxický [18; 19].

Výběrem vhodných kodonů lze dosáhnout rychlejší a přesnější translace u exprimovaných genů; běžně se používají synonymní kodony. Kodony lze vybrat z databáze (GenBank). V případě exprese neobvyklých kodonů se setkáváme s problémy při

transkripci a translaci. Při vložení nového kodonu do genomu hostitele může dojít k zastavení transkripce, nezačlenění kodonu pomocí *t*RNA při translaci, záměně aminokyselin či k úplnému přerušení translace. Výsledkem jsou nízké výtěžky exprimovaného proteinu. Relativní kompenzace lze dosáhnout úpravou kultivačních podmínek. Kultivační podmínky hrají velkou roli v produkci proteinu. Efektivita produkce může být zvýšena použitím různých kultivačních systémů. Mezi nejznámější patří vsádkový a kontinuální systém. Obecně jsou upřednostňovány systémy s vysokou buněčnou hustotou. Přebytek koncentrace buněk zajistí efektivní produkci rekombinantního proteinu. Složení média je variabilní a změny mohou být experimentálně testovány. Lze upravovat pH, přídavky specifických substrátů, indukci a další parametry. Následně dojde k porovnání výtěžků a eventuální optimalizaci podmínek. Závěrečnou fází exprese a indukované produkce je purifikace s charakterizací proteinu [17; 18; 19].

2.3 Genetické inženýrství

2.3.1 Charakteristika

Genetické inženýrství se zabývá úpravami a manipulací s genetickým materiálem, nejčastěji technikami molekulární biologie, genetiky nebo přirozeně selektivním výběrem. Genetické inženýrství lze také chápat jako soubor používaných technik k přímé genetické modifikaci organismů nebo populací organismů s využitím rekombinantní DNA. Zatímco selektivní výběr byl zkoumán a praktikován po tisíce let, molekulární úpravy genetického materiálu *in vitro* byly vyvinuty v 80. letech 20. století. V 70. letech došlo k revolučnímu objevu bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která je schopná přenosu fragmentů DNA do rostlinných buněk, a v průběhu 80. let byl geneticky modifikován hlodavec. Od roku 1994 se pěstují již geneticky modifikované (GMO) potraviny [20; 21; 22].

Jedná se o oblast výzkumu s mnoha potenciálními aplikacemi v medicíně, zemědělství a průmyslu. V moderní biotechnologii je tato oblast využívána především v reprodukční medicíně, k tvorbě vakcín, protilátek, enzymů aj. Je to však relativně nová oblast a má dosud většinou jeden hlavní cíl, a to izolovat a namnožit specifický fragment genetické informace z vhodného dárcovského organismu, získat jeho RNA transkript nebo proteinový produkt ve větším množství, a tím umožnit jeho studium [23].

V rámci úprav glykosidas a dalších enzymů je možné použít například postupů řízené evoluce. Řízená evoluce je silný nástroj k produkci nových proteinů se změněnými fyzikálními i chemickými vlastnostmi. Tato technika je také označovaná jako „evoluce ve zkumavce“. Napodobuje principy Darwinovy evoluce zavedením selektivního tlaku na velké populace molekul, takže sekvence s určitými žádoucími vlastnostmi jsou například pomocí PCR namnoženy. Nejčastěji využívanou metodou v rámci řízené evoluce je error-prone PCR. Princip tohoto typu PCR spočívá v provádění reakce za podmínek, které snižují přesnost *Taq* DNA polymerasy během syntézy nového vlákna, a tudíž jsou do dceřiných vláken během syntézy vneseny náhodné mutace. Náhodné mutace jsou pomocí PCR namnoženy a na základě změn v sekvenci genu kódujícího protein zájmu, jsou změněny jeho vlastnosti. Změna vlastností je poté sledována na základě biochemického screeningu enzymu [24; 25].

2.3.2 Základní molekulárně biologické metody genetického inženýrství

2.3.2.1 Izolace a štěpení DNA

Izolovat DNA lze mnoha způsoby a výběr úzce souvisí s tím, s jakým typem buňky pracujeme a jak čistou či kvalitní DNA potřebujeme pro další analýzu. Standardně se provádí enzymová izolace pomocí DNas, RNas nebo proteas. Levnou variantou je fenol- chloroformová extrakce s následnou precipitací alkoholem. Rutinně využívané jsou zejména mechanické adsorbční metody kombinované s chemickou a enzymovou izolací [26].

Po izolaci DNA, ať už mechanické, chemické či enzymové, přistupujeme k úpravám DNA štěpením na určité úseky. Štěpení se nejčastěji provádí nukleasami nebo restrikními endonukleasami, které jsou přirozeně přítomny v bakteriích a slouží jako ochrana před cizorodou DNA. Restrikní endonukleasy dělíme do dvou tříd, nejvýznamnější zástupci jsou ze třídy II a je známo asi 3500 zástupců. Štěpení se uskutečňuje v místech se specifickou sekvencí (rozpoznávací místo o 4-8 nukleotidech nejčastěji ve formě palindromu; čtecí rámec je z prava do leva a naopak totožný), po štěpení vzniká fragment o definované délce. Fragment může být zakončený kohezivním koncem nebo tupým koncem. Přechistění jednotlivých fragmentů se provádí gelovou elektroforézou, eventuální namnožení pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) [26; 27].

Tabulka 1 Vybrané restriční endonukleasy s rozpoznávacími místy (převzato z [26])

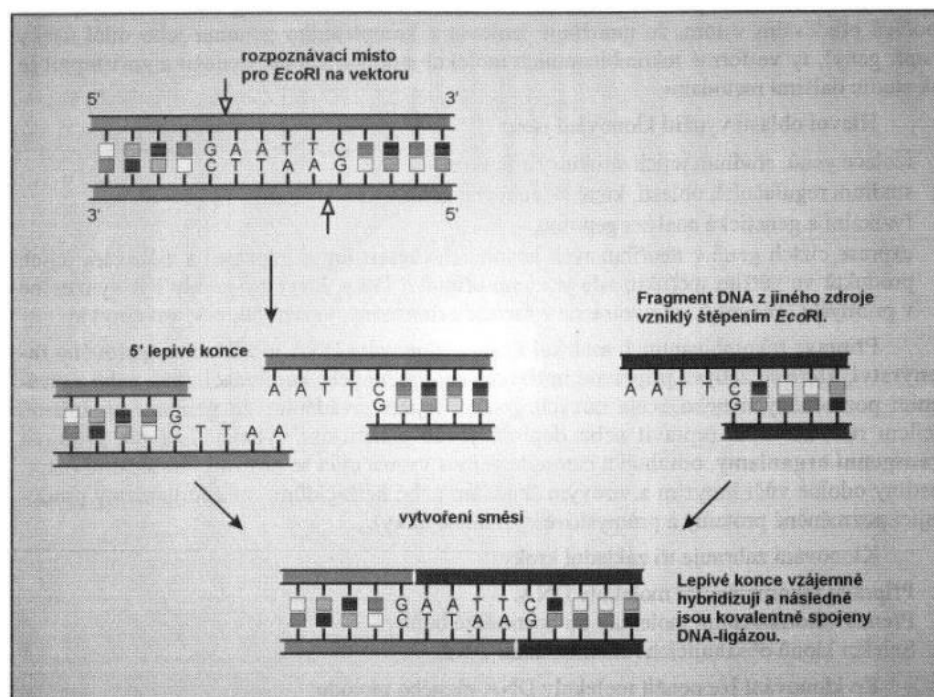
Označení enzymu	Producent enzymu	Rozpoznávací místo na sekvenci DNA 5'→3' 3'←5'
<i>Hae</i> III	<i>Haemophilus aegypticus</i>	GG↓CC CC↑GG
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY13	G↓AATTC CTTAA↑G
<i>Sau</i> 3AI	<i>Staphylococcus aureus</i> 3 A	↓GATC CTAG↑
<i>Pst</i> I	<i>Providentia stuartii</i>	CTGCA↓G G↑ACGTC
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	CCC↓GGG GGG↑CCC

2.3.2.2 Klonování a vznik rekombinantní DNA

Klonování zahrnuje tři základní kroky:

- 1) Přípravu rekombinantní DNA
- 2) Přenos rekombinantní DNA do hostitele
- 3) Selekcí klonů obsahujících rekombinantní DNA

Rekombinantní DNA vzniká spojením kohezních konců fragmentů po štěpení vlákna endonukleasami. Takto vzniklou rekombinantní DNA lze namnožit *in vivo* v hostitelské buňce (např: *E. coli*, *P. pastoris*) nebo *in vitro* pomocí PCR. Rekombinantní molekula také vzniká po spojení fragmentu DNA s klonovacím vektorem, tzv. ligací. Ligace probíhá nejčastěji *in vitro* za účasti T4-DNA ligasy [26; 27].



Obrázek 7 Spojování fragmentů DNA s lepivými konci DNA ligasou (převzato z [26])

Vektor musí být schopen samostatné reprodukce v hostiteli a je často odvozený od bakterií nebo virů. Pro klonování kratších úseků DNA jsou vhodné bakteriální plasmidy. Ty se vyznačují velikostí 2–15 kilo bází, schopností replikace v hostitelské buňce, přítomností selekčního markeru (např. pro rezistenci na antibiotikum) a klonovacího místa pro požadovaný gen (polylinker). Ke klonování lze použít izolovanou genomovou DNA, genomovou DNA vybranou z genové banky, komplementární cDNA, DNA vzniklou syntézou či DNA připravenou pomocí PCR [26; 27].

2.3.2.3 Transformace

2.3.2.3.1 Teplotní šok

V počátku samotné transformace je nutné uvedení buněk do stavu kompetence za přítomnosti CaCl_2 a nízké teploty (0–4 °C). Tím se stávají schopné přijmout cizorodou DNA. Následně je přidána samotná DNA a dojde k rychlému ohřátí na 42 °C, při kterém dochází k přenosu DNA do buňky. Náhlé zvýšení teploty vytváří póry v plazmatické membráně bakterií a umožňuje DNA proniknout do bakteriální buňky. Po transformaci jsou buňky regenerovány LB nebo SOC médiem při 26 °C. Selekcce probíhá na agarových plotnách

pomocí antibiotik a transformované kolonie lze detekovat chromogenními substráty, např. X-Gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) (viz též 2.3.2.4.) [26].

2.3.2.3.2 Elektroporace

Elektroporace probíhá tak, že kompetentní buňky spolu s vybranými molekulami jsou suspendovány ve vodivém roztoku v kovové kyvetě. Elektrický impulz s optimálním napětím je vyslán do této suspenze. Dojde k narušení fosfolipidové membrány a vytvoření dočasných pórů. Zároveň stoupá elektrický potenciál, a tím je umožněno elektricky nabitým molekulám, jako je DNA nebo proteiny, vstoupit do buňky. Tato metoda je rychlá a umožňuje transformaci velkého množství buněk. Nevýhodou je však velká smrtelnost buněk, u kterých nedojde k reparaci membrány, a proto je nutná časově náročná optimalizace podmínek a dlouhá šetrná regenerace buněk [26; 28].

2.3.2.3.3 Mikroinjekce

Tato metoda je založena na zavedení molekul DNA přes plazmatickou membránu do buňky pomocí jehly mikromanipulátoru. Tento postup se využívá především v reprodukční medicíně nebo při tvorbě savčích transgenních organismů [26].

2.3.2.4 Identifikace bakteriálních kolonií nesoucí rekombinantní plasmid

Jedním ze způsobů, jak detekovat kolonie nesoucí rekombinantní plasmid, je restriční analýza, při které se prokáže přítomnost inzertu. Jednodušším způsobem je α -komplementace. Této metody se využívá především u transformace do *E. coli*. Vektor obsahuje gen *lac Z* kódující enzym β -galaktosidasu. β -Galaktosidasa metabolizuje bezbarvý substrát X-Gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) na 5-bromo-4-chloro-indoxyl, který oxiduje na modrou barvu. Pokud je tento gen narušen inzertem, nedochází k reakci katalyzované β -galaktosidasou a transformované kolonie zůstávají bílé [26].

2.4 Syntéza pomocí glykosidas

2.4.1 Charakterizace

V současné době neexistuje univerzální platforma pro jednoduchou definovanou syntézu glykanů a oligosacharidů. Pro syntézu těchto látek je nutný komplexní přístup [29].

Obecně existují tři přístupy k syntéze oligosacharidů: chemická, chemo-enzymová a enzymová syntéza. Klasická organická syntéza je možná pomocí moderní syntetické chemie; postup vyžaduje protekční, aktivační a deprotekční kroky. Důsledkem jsou nízké celkové výtěžky, vysoká spotřeba materiálu a časová náročnost. Pro enzymovou syntézu se používají dvě skupiny enzymů, glykosyltransferasy (EC 2.4) a glykosidas (EC 3.2.1). Komplexní sacharidy mohou být syntetizovány kombinací několika enzymů v jednorázovém nebo sekvenčním režimu. Meziprodukty mohou být buď přímo zpracovány v další enzymové reakci, nebo je možné provést purifikaci meziprojektu. Tento způsob šetří jak čas, tak náklady, ale je nutné, aby enzymy byly specifické, regioselektivní a reakce probíhaly s vysokým výtěžkem [1].

Nejmodernější přístup spočívá v kombinaci obou postupů, klasické chemické syntézy a enzymové syntézy. Chemo-enzymová syntéza nabízí výhodu selektivní přípravy glykosidické vazby a zároveň umožňuje vnést do molekuly oligosacharidu požadované funkční skupiny, které mohou být využity např. pro multivalentní konjugaci, pro detekci apod. [29; 30].

2.4.2 Syntéza oligosacharidů pomocí glykosidas

Glykosidas využívají přirozeně vodu jako akceptor glykosylu. Za určitých podmínek může být tato strategie modifikována: jako akceptor lze použít molekuly nesoucí alespoň jednu hydroxylovou skupinu a vzniká nová glykosidová vazba. Tento proces lze podpořit, pokud je aktivita vody potlačena např. vysokou koncentrací reaktantů, přidávkem soli, organickým rozpouštědlem nebo eliminací produktu. Pokud je donor glykosylu redukující cukr a syntetický proces je řízen termodynamicky, nazývá se děj "reverzní hydrolýza" (kondenzace; viz Obr. 1 str. 15). V tomto případě jsou výtěžky obecně nižší než 15 %. Používá se zvláště při glykosylaci alkoholů. Oblíbenější je reakční uspořádání řízené

kineticky, které využívá donorů glykosidů aktivovaných vhodnou odstupující skupinou, jako je *p*-nitrofenyl. Tento proces se nazývá transglykosylace. Výtěžky transglykosylace jsou vyšší, cca 20-40 % [30].

2.4.3 Mutantní glykosidasy

Geny glykosidas lze modifikovat bodovými mutacemi nebo tzv. řízenou evolucí za účelem změny vlastností enzymu, jako je zejména substrátová specifita, regiosektivita a výtěžek transglykosylace. Nejvíce je prostudována právě možnost zvýšení syntetického potenciálu těchto enzymů, která bude popsána dále [30].

2.4.3.1 Glykosynthasy

První glykosynthasa vznikla z β -glukosidasy z *Agrobacterium* sp., která sama o sobě prokazovala dobrý syntetický potenciál, a tudíž byla použita jako modelový enzym pro optimalizaci glykosyntetických schopností. Mechanismus reakce katalyzované pomocí glykosyntasy je relativně jednoduchý. Pokud je katalytický nukleofil v aktivním místě (Asp nebo Glu) zaměněn za nenukleofilní zbytek jako např. alanin, vzniká mutant, který je hydrolyticky neaktivní a zároveň dokáže přenášet glykosyl z donoru s opačnou anomerní konfigurací (zde α -glykosylfluorid), a to s vysokými výtěžky (viz [30] str. 68; Schéma 3A). Typickým akceptorem je aryl-glykosid, který se dobře váže na aktivní místo, ale sám o sobě není schopný štěpení [30].

2.4.3.2 Mutantní transglykosidasy

Přírozně se vyskytující transglykosidasy se vyznačují tím, že poměr jejich hydrolytické a transglykosylační aktivity je ve větší či menší míře výrazně posunut ve prospěch syntetické reakce. V přírodě se vyskytují transglykosidasy pouze ojediněle a škála enzymových aktivit je omezená. Genetické inženýrství umožňuje připravit transglykosidasy např. z β -*N*-acetylhexosaminidas. Hydrolytické štěpení je v katalytickém centru enzymu znevýhodněné tím, že je zaměněn tyrosinový aminokyselinový zbytek, jehož funkce je stabilizace vody jako akceptoru při fázi glykosylační fázi katalytického mechanismu. Na rozdíl od glykosynthas jsou transglykosidasy schopné vytvářet autokondenzační produkty. Mutací tyrosinového zbytku na fenylalaninový, histidinový nebo asparaginový zbytek byly

vytvořeny transglykosidasy z β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus*. Dalším příkladem transglykosidasy je β -glukosidasa z *Thermus thermophilus*, do níž byly vneseny náhodně dvě mutace vedoucí k výrazně lepším transglykosylačním vlastnostem [30; 31].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je příprava alespoň jedné β -*N*-acetylhexosaminidasy se změněným poměrem aktivit vůči *N*-acetylgalaktosaminu (GalNAc) a *N*-acetylglukosaminu (GlcNAc) a její charakterizace. Teoretická část práce bude zaměřena na charakterizaci enzymů glykosidas a využití genetického inženýrství ke změně jejich substrátové specifity. Praktická část práce zahrnuje PCR, izolaci a manipulaci s DNA, transformaci a kultivaci *E. coli* a *P. pastoris*, chromatografickou purifikaci enzymu a jeho biochemickou charakterizaci.

4 METODIKA

4.1 Použité přístroje a materiály

4.1.1 Přístrojové vybavení

- Äkta Prime Plus (Amersham Biosciences, Velká Británie)
- Analytické váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)
- Biometra Thermocycler TPersonal combi (Biotech, USA)
- Bio-rad micropulser (Bio-Rad, USA)
- Centrifugy – Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin, Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, USA); Sorvall centrifuge RC G+ (Thermo Scientific, USA)
- Kolony na purifikaci (Äkta prime plus) – Fractogel EMD SO₃⁻
- Laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie)
- Magnetická míchačka Arex (VELP Scientifica, Itálie)
- pH metr – pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Česká republika)
- Qubit fluorimetr (Invitrogen, USA)
- Spektrofotometr Sunrise Tecan (Tecan, Švýcarsko)
- Spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Německo)
- Termomixér Eppendorf Thermomixer Comfort (Eppendorf, USA)
- Třepačka IKA KS 4000 ic control (Schöller, Česká republika)
- UV lampa, UV 240 (A. Krüss Optronics, Německo)
- Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)

4.1.2 Použitý materiál

- 12% separační gel na SDS-PAGE – H₂O / 30% akrylamid / 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 / 10% SDS / 10% (NH₄)₂S₂O₈ / TEMED
- 1 M sorbitol
- 5% zaostřovací gel na SDS-PAGE – H₂O / 30% akrylamid / 1,0 M Tris-HCl pH 6,8 / 10% (NH₄)₂S₂O₈ / TEMED
- 50×TAE pufr (Tris-acetát-EDTA), (Biogen, USA)

- AmpicilinTM (Invitrogen, Thermofisher Scientific, USA)
- Biotin (Fkua BioChemika, Švýcarsko)
- Bradfordovo činidlo (ředěno 1:4 s destilovanou vodou) – *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA)
- Britton-Robinsonův pufr (0,04 M H₃BO₃, 0,04 M H₃PO₄ a 0,04 M CH₃COOH; pH 2,5 – 12)
- Buňky *E. coli* TOP10
- DTT (1,55 g dithiothreitolu, 10 ml sterilní vody)
- Ekvilibrační pufr A – 10 mM citrát/ fosfátový pufr pH 3,5
- Ekvilibrační pufr B – 10 mM citrát/ fosfátový pufr pH 3,5 / 1 M NaCl pH 3,5
- Elektrodotový pufr – 25 mM Tris / 150 mM glycin / 10% SDS
- Gel Loading Dye Fast Blue (6x), (BioLabs, NEB, USA)
- GelRedTM, (Genbiotech, Francie)
- Glycerol (Lachner, Česká republika)
- High Pure Plasmid Isolation Kit (Thermofisher Scientific, USA)
- IPTG (isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid), (Sigma-Aldrich, USA)
- JETquick kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Kyselina octová (Lachner, Česká republika)
- Ligační pufr Rapid (Thermofisher Scientific, USA)
- Ligasa (Thermofisher Scientific, USA)
- Methanol (ISOLAB, Německo)
- Minimální glycerolové medium – 100 mM KH₂PO₄ pH 6,0 / 1.34% YNB / 4×10⁻⁵% biotin / 1% glycerol
- Minimální methanolové medium – 100 mM KH₂PO₄ pH 6,0 / 1.34% YNB / 4×10⁻⁵% biotin / 0.5% methanol
- Molekulový marker – Amersham LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, Velká Británie)
- Obarvovací roztok – 0,5 g Coomassie Blue Brilliant, CH₃OH / CH₃COOH / H₂O; 9 / 1 / 9
- Odbarvovací lázeň – EtOH / H₂O / CH₃COOH; 7 / 11 / 2
- Pevné LB medium (*Luria-Bertani*) – 10 g/l trypton / 0,5 g/l NaCl / 5 g/l extrakt z kvasnic / agar 15 g/l (Sigma-Aldrich, USA)

- pGEM-TEasy vektor (Promega, USA)
- Plasmid *P. pastoris* (vektor pPICZ α A), (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Plasmid Plus Midi Kit (QIAGEN, Německo)
- pNP-GalNAc (*p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosid), (Gold Biotechnology, USA)
- pNP-GlcNAc (*p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid), (Gold Biotechnology, USA)
- pufr McIlvaine – 0,1 M kyselina citronová / 0,2 M Na₂HPO₄; pH 5,0
- QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Německo)
- QubitTM Protein Assay Kit (Invitrogen, Thermofisher Scientific, USA)
- Resuspendační pufr (50 mM fosfátový pufr + 10 mM 2-merkaptoethanol)
- *Sac*I kit – (BioLabs, NEB, USA)
- T4 DNA polymerasa (Thermofisher Scientific, USA)
- Vzorkový pufr – 250 mM Tris / 500 mM DTT / 10% SDS / 0,5% bromfenolová modř / 50% glycerol
- X-gal (5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid)
- YNB (*yeast nitrogen base*), (Carl-Roth, Německo)
- YPD médium (*yeast extract peptone dextrose*, Sigma-Aldrich, USA) – 1% extrakt z kvasnic / 2% pepton / 2% glukosa
- YPD/HEPES (100 ml YPD médium, 20 ml 1 M HEPES, pH 8)
- ZeocinTM (Invitrogen, Thermofisher Scientific, USA)
- Další běžné chemikálie

4.2 Heterologní exprese mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasy v *P. pastoris*

Bodová mutace R218H β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus* (*TfHex* R218H) byla navržena na základě molekulárního modelování jako perspektivní pro změnu substrátové specifity enzymu. Gen zaklonovaný ve vektoru pPICZ α A (klonovací místa *Sac*I a *Kpn*I) byl připraven synteticky komerčním dodavatelem (Generay, Čína). V případě mutace R218H byl arginin na pozici 218 v aminokyselinové sekvenci enzymu zaměněn za histidin (viz Příloha 1). Komerčně dodaný lyofilizovaný vektor (4 μ g) byl před dalším zpracováním rozpuštěn v 10 μ l sterilní vody.

4.2.1 Transformace do kompetentních buněk *E. coli* metodou teplotního šoku I

K transformaci a namnožení vektoru nesoucí mutaci byly použity kryokonzervované kompetentní buňky *E. coli* kmen Top10, které byly před použitím nechány rozmraznout na ledu a promíchány. K 100 μ l kompetentních buněk bylo přidáno 0,5 μ l rozpuštěného plasmidu. Suspenze byla jemně promíchána a inkubována 20 min na ledu. Po 20 minutách proběhla transformace při 42 °C po dobu 75 s bez míchání. Následně bylo nutné buňky regenerovat, byl přidán 1 ml LB média a směs se nechala inkubovat při 37 °C a 350 otáčkách/min. Celá směs byla zakoncentrována centrifugací na 14 500 otáček/min po dobu 10 min, bylo odstraněno 800 μ l supernatantu a ve zbývajícím byl pelet resuspendován.

Ke kultivaci buněk byly připraveny 4 misky s pevným LB médiem (100 ml), které bylo před použitím zatepla rozpuštěno a nalito na Petriho misky. Po ztuhnutí LB agaru bylo přidáno antibiotikum ampicilin (500 μ l) a buňky nanесeny na plotny v různých koncentracích (25 μ l, 50 μ l, 150 μ l, 200 μ l), proběhla kultivace do druhého dne při 37 °C.

Druhý den byly misky přeneseny do lednice, aby byl potlačen další růst, a v druhé polovině dne byly naočkovány do 100 ml LB média (v 500 ml Erlenmayerových baňkách) obohaceného o antibiotikum zeocin (200 \times). Pomocí sterilní kličky byla přenesena do baňky jedna kolonie, růst probíhal při 37 °C a 250 otáčkách/min.

4.2.2 Izolace plasmidu metodou midi prep

Izolace proběhla pomocí kitu „Plasmid Plus Midi Kit“. V prvním kroku izolace bylo nutné zpracovat kulturu s namnoženými buňkami *E. coli*. Obsah baňky byl sterilně přenesen do 50 ml centrifugační zkumavky a 2 \times centrifugován při 5000 otáčkách/min po dobu 20 min. Mezitím byly do stojanu připevněny kolony s papírovými filtry. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a do kyvety s buňkami bylo přidáno 8 ml pufru určeného k resuspendaci buněk. Buňky byly promíchány a ke vzniklé suspenzi bylo přidáno 8 ml lyzačního pufru, který působil 2 min. Následně bylo přidáno 8 ml neutralizačního pufru a proběhla inkubace na ledu (5 min).

Kolona s filtry byla promyta 2,5 ml ekvilibračního pufru, poté byl lyzát po částech nanесen na kolonu a proteklý supernatant byl jímán do odpadní zkumavky. Na filtr bylo

naneseno 2×4 ml promývacího pufru. Zkumavka s odpadem byla vyměněna za čistou sterilní, do které byla provedena eluce. K eluci bylo použito 2×1,5 ml elučního pufru předehřátého na 50 °C. Kolony s filtry byly odstraněny a ke vzorku, který bylo nutné vysrážet a zakoncentrovat, bylo přidáno 3,6 ml isopropanolu. Vzorek byl umístěn do lednice do druhého dne. Druhého dne byl vzorek postupně stočen po 1,5 ml v mikrozkuhavce při 18 000 otáčkách/min na 30 min. Po dotočení byl důkladně odstraněn supernatant a peleta opatrně opláchnuta 1 ml 70% etanolu (centrifugace 18 000 otáček/min, 10 min, 4 °C). Ethanol byl odstraněn a peleta usušena při laboratorní teplotě. Pro další použití byl plasmid rozpuštěn v 100 µl sterilní vody.

4.2.3 Charakterizace izolovaného plasmidu

V následujícím kroku byla spektrofotometricky změřena koncentrace DNA při vlnové délce 260 nm v černých květech pro UV oblast. Výpočet probíhal dle vzorce:

$$c[\mu\text{g/ml}] = 50 \cdot \text{ředění} \cdot \text{ABS}$$

Kde 50 je tabelovaný extinkční koeficient dvou řetězcové DNA; násobí se hodnotou ředění v ultra čisté vodě a výslednou absorbancí. Standardní hodnota se pohybuje mezi 500- 3000 µg/ml.

Čistota plasmidu byla taktéž stanovena spektrofotometricky při 260 a 280 nm, kde při 260 nm absorbuje jak DNA, a při 280 nm pouze proteiny. Hodnota čistoty je tedy poměr mezi absorbancemi při jednotlivých vlnových délkách. Standardní hodnota se pohybuje mezi 1,5 – 2,0. Nižší hodnota pak signalizuje znečištění proteiny.

Po přečištění, změření koncentrace a čistoty DNA byl vzorek odeslán na sekvenaci, kde byla vnesená mutace potvrzena. Na sekvenaci byly odeslány vzorky s min. 500 ng plasmidu (odpovídá většinou 0,5–1 µl) s 5 µl ultračisté vody a 5 µl příslušného sekvenačního primeru. Sekvenování bylo provedeno komerční firmou SEQme.

4.2.4 Štěpení plasmidu restriktivním enzymem *SacI*

Pro transformaci do kompetentních buněk *P. pastoris* bylo před samotným přečištěním elektroforézou nutné plasmid rozštěpit restriktivním enzymem *SacI*. K plasmidu byly přidány 3 μ l enzymu, 3 μ l komerčního pufru s obsahem BSA (součást kitu) a 11,4 μ l sterilní vody. Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C a 300 otáčkách/min.

K přečištění a izolaci plasmidové DNA byla použita horizontální elektroforéza na agarosovém gelu. K přípravě 1% agarosového bylo použito 1,2 g agarosy, 120 ml destilované vody a 2,4 ml 50 \times TAE pufru. Takto připravený gel byl rozpuštěn zatepla, zchlazen na pokojovou teplotu a nalit do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Po zatuhnutí gelu byla celá aparatura sestavena a připojena ke zdroji. Gel byl zalit pufrem pro elektroforézu (1 \times TAE). Do jamek gelu byly nanесeny vzorky plasmidu a kontrolní marker. Do mikrozkuřavky bylo k plasmidu napipetováno 4 μ l fast blue loading barvy a 2 μ l gel red barvy. Marker byl připraven z 0,5 μ l čistého plasmidu, 2 μ l fast blue loading barvy, 2 μ l gel red barvy a 4,5 μ l vody. Elektroforéza probíhala při 90 V po dobu přibližně 1,5 h. Vyhodnocení gelu bylo provedeno na UV transluminátoru, kde dle markeru byl sterilně vyříznut požadovaný proužek s plasmidem.

Izolace proběhla pomocí kitu JETquick, metoda je založena na lyzi buněk a následné adsorpci na silikátovou kolonku obsaženou spolu s reagenty v kitu, závěrem izolace je eluce čistě DNA. Ke každým 100 mg gelu bylo přidáno 300 μ l roztoku „L1“, proběhla inkubace při 500 otáčkách/min a 50 °C, kdy došlo k rozpuštění agarosového gelu. Následně byl roztok nanесen na kolonu a proběhla centrifugace (13 500 otáček/min, 1 min). Promytí proběhlo pomocí 500 μ l promývacího pufru a kolona byla opět odstředěna (13 500 otáček/min, 1 min). Po promytí byl proteklý roztok odstraněn a kolona odstředěna naprázdno při stejných podmínkách. Dosavadní mikrozkuřavka byla nahrazena čistou sterilní a DNA byla eluována 30 μ l sterilní vodou zahřátou na 65 °C.

4.2.5 Elektroporace

4.2.5.1 Příprava kompetentních buněk *P. pastoris*

K expresi mutantu *TfHex* R218H byly použity buňky *P. pastoris* kmen KM71H. Kryokonzervovaná kultura (100 μ l) byla na ledu rozmrazena, zaočkována do 500 ml YPD média v 3 l Erlenmayerově baňce a ponechána inkubovat přes noc při 30 °C a 300 otáček/min. Následující den ráno byla narostlá kultura stočena při 4 °C a 3500 otáčkách/min po dobu 5 min a při stejných parametrech po každém oplachu. Supernatant byl odstraněn a k peletě bylo přidáno 50 ml sterilního YPD/ HEPES roztoku, ve kterém byla peleta resuspendována. Poté bylo přidáno 1,25 ml 1 M DTT, které bylo inkubováno spolu s buňkami po dobu 15 min při 30 °C. Následně bylo přidáno 200 ml ledového 1 M sorbitolu. Po odstranění supernatantu byla peleta resuspendována v 50 ml ledového 1 M sorbitolu a doplněna sorbitolem do objemu 250 ml. Po centrifugaci byla peleta resuspendována v 10 ml ledového 1 M sorbitolu a stočena. Výsledná peleta byla naředěna v 0,5 ml sterilního ledového 1 M sorbitolu, výsledný objem buněk by se měl pohybovat okolo 1,5 ml. Takto připravené kompetentní buňky jsou určeny ihned k elektroporaci.

4.2.5.2 Elektroporace

K čerstvě připraveným kompetentním buňkám KM71H (60 μ l) byl přidán izolovaný plasmid a směs byla inkubována na ledu po dobu 5 min. K samotné elektroporaci byl použit přístroj Biorad micropulser, který byl před použitím nastaven na elektroporaci kvasinek. Suspenze DNA a kompetentních buněk byla přenesena do kovové, předem vychlazené kyvety, určené k elektroporaci. Kyveta byla umístěna do kolíčky držáku přístroje a byl vyslán výboj. Po výboji byl k buňkám ihned přidán 1 ml ledového 1 M sorbitolu. Poté následovala regenerace 1-2h při 30 °C, umožňující buňkám reparovat buněčnou membránu a pojmout cizorodou DNA.

4.2.5.3 Screening kolonií po elektroporaci

Kultivace buněk proběhla na pevném YPD médiu obsahujícím agar, do něž bylo přidáno selekční antibiotikum zeocin. Transformované buňky byly naočkovány v různých koncentracích na misky (50 μ l, 100 μ l, 150 μ l, 200 μ l). Kultivace probíhala po dobu 5 dnů

při 28 °C. Šestnáct narostlých kolonií bylo naočkováno do 1 l sterilního minimálního glycerolového média (viz 4.1.2) v 3 l Erlenmayerově baňce a kultivováno za stejných podmínek. Druhý den byla kultura stočena 20 min při 5 000 otáčkách/min, pelet byl resuspendován v 30 ml sterilního kultivačního média s obsahem methanolu (minimální methanolové médium, viz 4.1.2) v 16 Erlenmayerových baňkách a inkubován při 28 °C a 220 otáčkách/min. Následující dva dny byl růst buněk indukován přidávkem 1 ml metanolu (výsledná koncentrace 0,5 obj. %).

Pátý den byly odebrány vzorky (1 ml) z každé kultury a stočeny 10 minut při 5 000 otáčkách/min. Z odebraných vzorků bylo použito k screeningu aktivit médium obsahující extracelulárně vyprodukovaný enzym. Kolonie s nejlepším poměrem enzymových aktivit (viz 4.2.7.) byly kryokonzervovány.

4.2.5.4 Kryokonzervace buněčných kultur

Vybrané kultury byly zaočkovány na pevné YPD médium s agarem, do něž bylo přidáno selekční antibiotikum zeocin. Narostlé kultury byly zaočkovány do YPD média (500 ml) a kultivovány při 28 °C. Po centrifugaci (10 min, 5 000 otáček/min) byly sterilně resuspendovány v 5 ml YPD média s 15% glycerolem a byla ověřena čistota kolonií pod mikroskopem nakapáním na podložní sklo. Následně byla buněčná suspenze alikvotována po 100 µl do mikrozkušavek a zamražena při – 80 °C.

4.2.6 Produkce mutantní β -N-acetylhexosaminidasy v *P. pastoris*

4.2.6.1 Exprese mutantní β -N-acetylhexosaminidasy v *P. pastoris*

Kryokonzervovaná kultura byla zaočkována do 15 ml YPD média a kultivována 4 h při 28 °C a 220 otáčkách/min. Takto připravená prekultura byla zaočkována do 1 l sterilního kultivačního média s obsahem glycerolu (minimální glycerolové médium, viz 4.1.2) v 3 l Erlenmayerově baňce a kultivována za stejných podmínek.

Druhý den byla kultura stočena 20 min při 5 000 otáčkách/min, pelet byl resuspendován v 200 ml sterilního kultivačního média s obsahem methanolu (minimální methanolové médium, viz 4.1.2) v 1 l Erlenmayerově baňce a inkubován při 28 °C a 220

otáčkách/min. Následující dva dny byl růst buněk indukován přidavkem 1 ml metanolu (o výsledné koncentraci 0,5 obj. %).

4.2.6.2 Purifikace mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasy

Pátý den kultivace byla provedena purifikace. Kultura byla postupně stočena při 5000 otáčkách/min a 10 °C. Médium obsahující enzym *TfHex* R218H bylo zředěno destilovanou vodou v poměru asi 1: 3, pH bylo upraveno na 3,5 pomocí kyseliny citronové a následně bylo zfiltrováno přes papírový filtr na Büchnerově nálevce.

Rekombinantní enzym *TfHex* R218H byl purifikován pomocí iontově výměnné chromatografie na silném katexu (Fractogel SO₃⁻) za použití chromatografické sestavy Äkta Prime Plus. Před nanesením vzorku byla kolona promyta 150 ml ultračisté vody (průtok 10 ml/ min) a 150 ml ekvilibračního pufru A (složení viz 4.1.2) při rychlosti průtoku 10 ml/ min. Poté byl vzorek nanesen na kolonu a proběhlo nanášení vzorku po dobu cca 1,5 h při průtoku 1 ml/ min. Po promytí kolony ekvilibračním pufrem A proběhla eluce gradientem elučního pufru B, obsahujícího 1 M NaCl (60 ml, 2 ml/min, 0-1 M NaCl). Kolona byla regenerována 100–200 ml 1 M NaOH, ultračistou vodou, 1 M NaCl a 20% etanolem (10 ml/ min).

Na závěr proběhlo zakoncentrování proteinu ultracentrifugací (centrifugační kyvety s filtrem Amicon ultra o velikosti pórů 10 kDa) při 3600 otáčkách/min po dobu 20 min a převedení do pufru McIlvaine pH 5.

4.2.6.3 SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

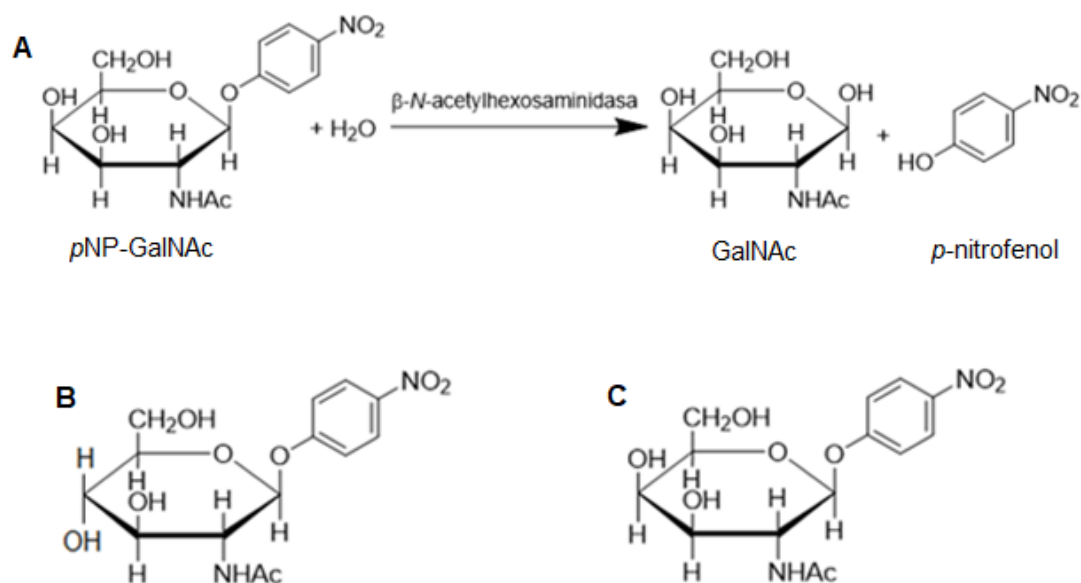
Pro ověření přítomnosti proteinu ve frakci byla provedena SDS elektroforéza, která proběhla v 12% polyakrylamidovém gelu, který byl přelit vrstvou butanolu a ponechán ztuhnout. Poté byl převrstven 5% gelem zaostřovacím. Vzorky byly napipetovány do mikrozkušavek spolu s 2 μ l vzorkového pufru (viz 4.1.2) a 3 μ l vody. Jako marker byl použit LMW zásobní roztok a jako kontrola 2 μ l enzymu divokého typu *TfHex* s 2 μ l loading blue barvy a 4 μ l vody. Všechny vzorky byly denaturovány zahřátím na 95 °C po dobu 5 min. Takto připravené vzorky byly naneseny do jednotlivých drah gelu, který byl zalit 750 ml elektrodového pufru (viz 4.1.2). Celá aparatura byla připojena ke zdroji a separace spuštěna zpočátku při napětí 90 V a poté co byly vzorky usazeny do jamek gelu asi na 1 h při 100 V.

Po vyplavení barvy z gelu byla elektroforéza zastavena a gel sejmuto ze skla. Následovalo obarvení pomocí barvicího roztoku s obsahem barvy Coomassie blue (viz 4.1.2) po dobu 10 min a odbarvení odbarvovací lázni s kyselinou octovou, vodou a ethanolem, poté byl gel uchován v 1% kyselině octové.

4.2.7 Charakterizace mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasy

4.2.7.1 Stanovení enzymové aktivity a koncentrace proteinů

Enzymová aktivita enzyme *TfHex* R218H byla stanovena v tripletu spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm, což odpovídá absorpci *p*-nitrofenolu, produktu reakce, v bazickém prostředí. Aktivita této rekombinantní β -*N*-acetylhexosaminidasy byla stanovena pro dva substráty, *p*NP-GlcNAc a *p*NP-GalNAc (viz obr. 8).



Obrázek 8 (A) Štěpení substrátu *p*NP-GalNAc β -*N*-acetylhexosaminidasou. (B) Struktura substrátu *p*NP-GlcNAc. (C) Struktura substrátu *p*NP-GalNAc.

Do mikrozkuvkavy byla napipetována reakční směs obsahující substrát *p*NP-GlcNAc nebo *p*NP-GalNAc (o výsledné koncentraci 2 mM) v McIlvaine pufru o pH 5. Směs byla zahřata na 35 °C a reakce byla zahájena přidavkem 10 μ l enzymu při 850 otáčkách/min. Po 10 min byla reakce ukončena přidavkem 1 ml 0,1 M Na₂CO₃, vzniklé žluté

zabarvení bylo kvantifikováno spektrofotometricky při 420 nm (spektrofotometr UV-mini-1240).

Výpočet výsledné aktivity z průměrné absorbance byl uskutečněn pomocí vzorce:

$$AKT [U/ml] = \frac{ABS \cdot \text{\textit{řed}} \cdot Vc}{t \cdot Ve \cdot k}$$

Kde *AKT* je aktivita enzymu v (U/ml), *ABS* je průměr absorbance, *řed* je ředění zásobního roztoku enzymu do reakce, *Vc* je celkový objem reakce (50 µl), *k* je konstanta závislosti absorbance na koncentraci *p*-nitrofenolu, *t* je reakční čas (10 min) a *Ve* je objem enzymu v reakci (10 µl). Kalibrace

Stanovení proteinů proběhlo spektrofotometrickou metodou dle Bradforda. K 1 ml Bradfordova činidla (složení viz 4.1.2) bylo přidáno 100 µl ředěného enzymu. Reakce probíhala při laboratorní teplotě 10 min. Výsledné zbarvení bylo kvantifikováno při 595 nm.

Výpočet koncentrace proteinů ve vzorku byl proveden dle vzorce, kde *k* je konstanta závislosti absorbance vzorku na koncentraci hovězího γ -globulinu, který byl použit jako kalibrační standard, *ABS* je průměr absorbance a *řed* je ředění zásobního roztoku.

$$C_{prot.} [mg/ml] = k \cdot ABS \cdot \text{\textit{řed}}$$

Kde *C_{prot.}* je koncentrace proteinu, *k* je konstanta závislosti absorbance vzorku na koncentraci hovězího γ -globulinu, který byl použit jako kalibrační standard, *ABS* je průměr absorbance a *řed* je ředění zásobního roztoku.

4.2.7.2 pH optimum

Další část biochemické charakterizace spočívala stanovení pH optima. Ke stanovení byl použit univerzální Britton-Robinsonův pufr v rozmezí pH od 2,5 do 12. (složení viz 4.1.2)

). Stanovení probíhalo obdobně jako u standardního stanovení aktivity (viz 4.2.7.1). Průměrné hodnoty absorbance byly zaneseny do grafu, ze kterého bylo pH optimum odečteno.

4.2.7.3 Teplotní optimum

K získání dat ke stanovení teplotního optima byla opět použita spektrofotometrická metoda (viz 4.2.7.1). Stanovení probíhalo od 10 °C do 99 °C po 5 °C. Výsledné hodnoty aktivit byly zaneseny do grafu, ze kterého bylo odečteno teplotní optimum.

4.2.7.4 Enzymová kinetika

Ke stanovení enzymové kinetiky byla použita upravená spektrofotometrická metoda (viz 4.2.7.1). Měření probíhalo v duplikátu u substrátu *p*NP-GalNAc a v jednom paralelním stanovení u substrátu *p*NP-GlcNAc. Byla stanovena aktivita v rozmezí koncentrací substrátů od 0,1 mM do 6,5 mM v celkovém objemu 400 μ l. Směs substrátu v pufru byla preinkubována na 35 °C při 850 otáčkách/min. Po přidání enzymu byly odebírány vzorky (50 μ l) v časech 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 min a reakce byla vždy okamžitě zastavena napipetováním do jamky mikrotitrační destičky s 1 M Na₂CO₃ (100 μ l). Následně bylo změřeno žluté zabarvení při 420 nm (Spektrofotometr Sunrise Tecan). Grafy byly vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism 7.0. Měření bylo provedeno v menším počtu paralelních stanovení z důvodu nestability enzymu, která je pravděpodobně způsobena vnesenou mutací.

4.3 Identifikace sekvence genů mutantních β -*N*-acetylhexosaminidas *TfHex* připravených řízenou evolucí

4.3.1 Izolace chromozomální DNA pomocí zymolyasy

Pro izolaci chromozomální DNA z buněk *P. pastoris* byla zvolena kombinace dvou technik, klasické adsorpční, mechanické pomocí kitu DNeasy Ultraclean Microbial kit a enzymové. Pomocí enzymu zymolyasy došlo k narušení buněčné stěny kvasinky a poté byla použita adsorpční metoda, kde došlo k navázání DNA z rozrušených buněk na silikátovou kolonku. Ke 4 ml buněčné kultury naředěné tak, aby optická hustota odpovídala 20, bylo přidáno 150 μ l 50 mM fosfátového pufru s obsahem 10 mM 2-merkaptoethanolu,

suspenze byla resuspendována a následně bylo přidáno 30 μ l zymolyasy, celá směs byla inkubována při 35 °C a 800 otáčkách/min po dobu 30 min. Po rozrušení buněčné stěny byla suspenze přenesena do zkumavky obsahující skleněné kuličky a vložena do mixeru Beadmill při frekvenci 25 Hz po dobu 8 min. V dalších krocích bylo postupováno klasickou adsorpční metodou, DNA byla navázána na silikátovou kolonku obsaženou v kitu, stočena při 10 000 otáčkách/min po dobu 1 min. Kolona byla promyta promývacím roztokem a stočena za stejných podmínek. Do čisté sterilní mikrozkušavky byla provedena eluce pomocí 50 μ l elučního pufu.

Koncentrace izolované DNA z buněk *P. pastoris* byla stanovena fluorimetrickou metodou. Vzorek byl připraven smícháním 199 μ l naředěné barvy (Red dye, kit Qubit™ Protein Assay Kit, 200 \times ředěná reakčním pufrem) s 1 μ l DNA. Měření proběhlo pomocí Qubit fluorimetru.

4.3.2 Polymerasová řetězová reakce (PCR) a izolace produktů

K namnožení genu kódujícího β -N-acetylhexosaminidasu z chromozomální DNA izolované z buněk *P. pastoris* byla použita amplifikační metoda, PCR. Byla připravena reakční směs obsahující vzorek DNA v množství až 200 μ g dle úspěšnosti předchozí izolace, dva primery, deoxyribonukleotidy, pufr, DNA DreamTaq polymerasu a vodu na doplnění konečného objemu do 25 μ l. PCR probíhalo v termocykleru po dobu 30 cyklů. Reakční podmínky: 1) 95 °C, 2 min – úvodní denaturace; 2) 95 °C, 20 s – denaturace; 3) 65,5 °C, 20 s – nasedání; 4) 72 °C, 40 s – amplifikace; 5) 72 °C, 3 min – konečná elongace.

K přečistění a izolaci chromozomální DNA namnožené pomocí PCR byla použita elektroforéza v agarosovém gelu (1 %). Izolace z gelu (viz 4.2.4).

4.3.3 Ligace mutantních genů do vektoru pro sekvenaci

Izolovaný PCR produkt obsahující gen β -N-acetylhexosaminidasu bylo nutné vložit do vhodného vektoru pro expresi v *E. coli*. K ligaci byl použit komerčně dostupný vektor pGEM-TEasy. Před samotnou ligací proběhla adenylace neboli připojení několika adeninových nukleotidů na konce řetězců DNA. K PCR produktu bylo přidáno 10 mM dATP, Dreamtaq pufr, DNA polymerasa a voda. Celá směs byla inkubována 15 min při 70 °C. Takto

upravená DNA byla precipitována pomocí 99 % etanolu (třetina objemu) a 1/10 objemu octanu sodného (3.0 M). Inkubace probíhala při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 h a poté byla směs stočena při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 14 500 otáčkách/min dobu 20 minut. Supernatant byl odstraněn a peleta opláchnuta 70% etanolem, stočena za stejných podmínek a při laboratorní teplotě nechána doschnout.

Samotná ligace do vektoru byla katalyzována T4 DNA ligasou, k směsi ligasy byl přidán ligační pufr Rapid, precipitovaný PCR produkt po adenylaci a pGEM-TEasy vektor. Směs byla inkubována přes noc při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takto připravený vektor bylo možné transformovat do hostitelského kmene *E. coli*.

4.3.4 Transformace do kompetentních buněk *E. coli* metodou teplotního šoku II

K namnožení PCR produktu, a tedy i DNA nesoucí mutaci, byl použit komerčně dostupný hostitelský kmen *E. coli* TOP10. Buňky byly rozmrazeny na ledu a k 80 μl buněk bylo přidáno 0,5 μl plasmidu obsahující gen kódující β -*N*-acetylhexosaminidasu. Inkubace probíhala 20 min na ledu a teplotní šok byl proveden při $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 75 s. Buňky byly regenerovány 1 ml SOC média 1 h při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po regeneraci bylo přidáno selekční antibiotikum ampicilin a X-Gal pro snadnou detekci na miskách.

Na Petriho misky bylo nalito rozehřáté LBA medium a po zatuhnutí byly transformované buňky v objemu od 50 do 150 μl naočkovány na plotny za indukce IPTG, které bylo přidáno k buňkám spolu s ampicilinem. Růst probíhal při laboratorní teplotě do druhého dne. Druhý den byly bílé kolonie zaočkovány do 4 ml LB média spolu s 4 μl ampicilinu a inkubovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 220 otáčkách/min.

4.3.5 Izolace plasmidů metodou mini prep

K izolaci DNA z hostitelského kmene *E. coli* byl použit kit „QIAprep Spin Miniprep kit“. Zaočované kultury byly zcentrifugovány na 4 000 otáčkách/min po dobu 10 min. Supernatant byl odstraněn a peleta resuspendována v 250 μl resuspendačního pufru s obsahem RNAasy. Lyze proběhla pomocí 250 μl lyzačního pufru, směs byla jemně promíchána převrácením a inkubována 5 min při pokojové teplotě. K lyzovanému roztoku byl přidán vychlazený pufr (350 μl) zprostředkovávající navázání DNA z lyzovaných buněk

na silikátovou kolonku uvnitř mikrozkušavky, následovala inkubace 5 min na ledu. Směs byla stočena 10 min na 13 500 otáčkách/min při 4 °C.

Sterilní silikátová kolonka byla vložena do čisté mikrozkušavky a na kolonu byl nanesen celý supernatant, proběhla centrifugace 1 min při 13 500 otáčkách/min. Proteklý supernatant byl odstraněn, kolona promyta 500 µl promývacího pufru A a odstředěna za stejných podmínek. Poté proběhlo promytí 700 µl promývacího pufru B k odstranění nežádoucích proteinů a dalších produktů lyze buněk a centrifugace za stejných podmínek. V posledním kroku bylo na kolony napipetováno 30 µl elučního pufru a provedena eluce do nové sterilní mikrozkušavky. Koncentrace izolované DNA byla stanovena fluorimetricky, přesný postup viz 4.3.1.1.

Ke zjištění mutace v genu β -*N*-acetylhexosaminidasy integrovaného do chromozomu kvasinky *P. pastoris* byla použita sekvenace komerční firmou SEQme. Na sekvenaci byly odeslány vzorky s minimálně 500 ng plasmidu.

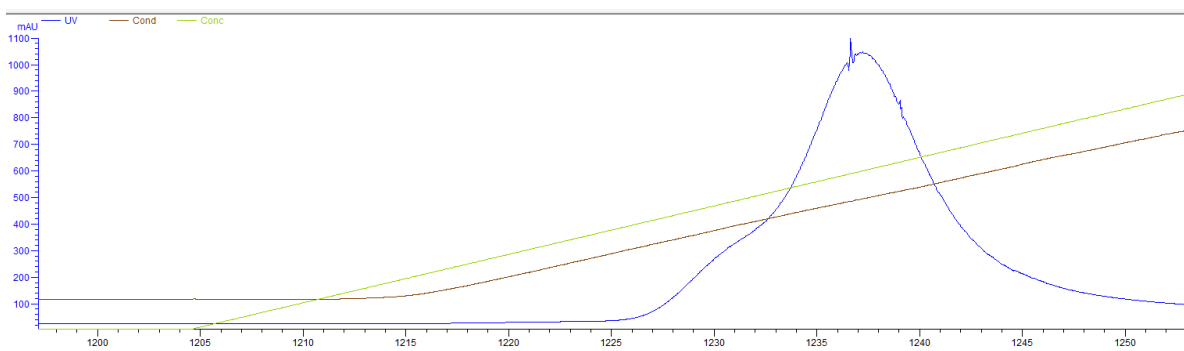
5 VÝSLEDKY

5.1 Produkce a purifikace mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasy *TfHex* R218H

Bodová mutace R218H byla vybrána na základě molekulárního modelování (prováděla Ing. Natalia Kulik, Ph.D., MBÚ AV ČR) jako perspektivní pro manipulaci poměru GalNAcasové/GlcNAcasové aktivity u β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus* (*TfHex*). Komerční syntetický vektor obsahující gen tohoto mutantního enzymu byl namnožen metodou midi prep a po ověření čistoty a správné sekvence byl transformován do kompetentních buněk *P. pastoris* KM71H metodou elektroporace. Z šestnácti narostlých kolonií byla provedena kultivace v analytickém měřítku pro zjištění přítomnosti produkovaného enzymu a poměru jeho aktivit. Ze screeningu aktivit byly vybrány tři kolonie, u kterých byly zjištěny nejvýraznější změny v poměrech mezi GalNAcasovou a GlcNAcasovou aktivitou. Konkrétně se jednalo o kolonie 4, 10 a 14. Tyto kolonie byly kryokozervovány a následně použity k preparativní produkci a purifikaci enzymu a charakterizaci jeho vlastností. Mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasa *TfHex* R218H byla produkována v *P. pastoris* na minimálním glycerolovém médiu a na minimálním methanolovém médiu za indukce methanolem po dobu 5 dní.

Extracelulární enzym, produkový do kultivačního média, byl purifikován pomocí iontově výměnné kapalinové chromatografie na silném katexu při pH 3,5. Průběh chromatografie je znázorněn na chromatogramu (Obr. 8). Pomocí SDS elektroforézy byla ověřena přítomnost a čistota enzymu (Obr. 10). Z 200 ml kultivačního média bylo získáno 1,6 mg varianty *TfHex* R218H-4, 3,2 mg *TfHex* R218H-10 a 2,2 mg *TfHex* R218H-14.

5.1.1 Výsledky purifikace



Obrázek 9 Chromatogram průběhu purifikace mutantního enzymu TfHex R218H-14 iontoměničovou chromatografií. Eluční křivka purifikovaného enzymu (UV detekce) je znázorněna modře. Zelená čára znázorňuje průběh gradientu NaCl.

5.1.1.1 Stanovení enzymové aktivity

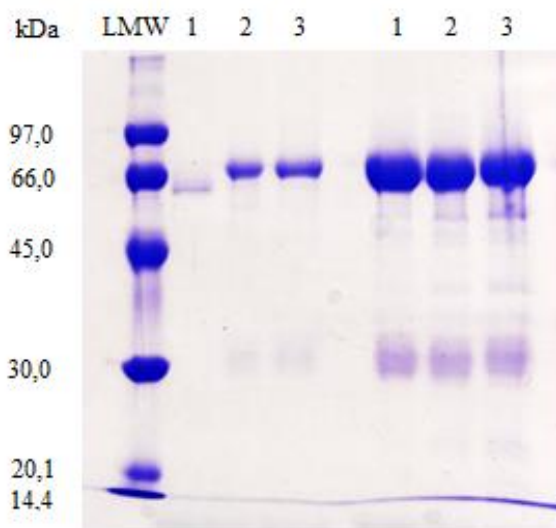
Po purifikaci byl enzym zkoncentrován ultracentrifugací a převeden do pufru McIlvaine pH 5. Bylo provedeno stanovení koncentrace proteinů dle Bradforda a enzymové aktivity (viz. 4.2.7.1) u všech vzorků, což bylo důležité k výběru enzymu pro biochemickou charakterizaci a volbu koncentrace vzorků na SDS elektroforézu.

K zjištění aktivity purifikovaného enzymu byla použita spektrofotometrická metoda. Byla stanovena koncentrace *p*-nitrofenolu - produktu štěpení substrátu *p*NP-GlcNAc nebo *p*NP-GalNAc enzymem (viz Obr. 8). Výsledné hodnoty specifických aktivit jsou uvedeny v tabulce 2. Příklad výpočtu specifické enzymové aktivity:

$$AKT, pNPGalNAc [U/mg] = \frac{ABS \cdot \text{řed} \cdot V_{celk}}{k \cdot V_{enz} \cdot t \cdot C_{prot.}} = \frac{0,314 \cdot 500 \cdot 50}{0,7196 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 2,2} = \frac{7842}{71,96} = 50 U/ml$$

Tabulka 2 Výsledné aktivity mutantních enzymů po purifikaci

Hydrolytická aktivita [U/mg]	TfHex R218H-4	TfHex R218H-10	TfHex R218H-14
<i>p</i> NP-GalNAc	103	86	50
<i>p</i> NP-GlcNAc	61	54	26
Poměr aktivit	1,68	1,59	1,92



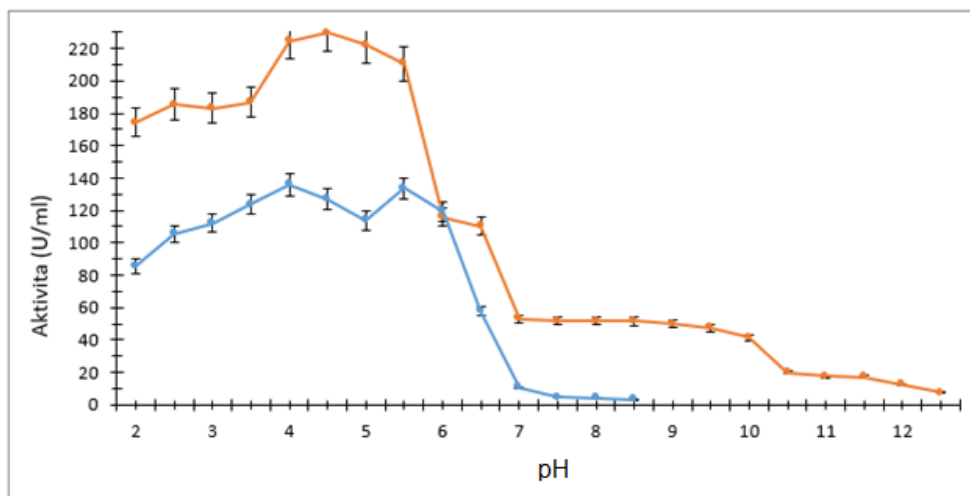
Obrázek 10 SDS gel po purifikaci varianty TfHex R218H. V první jamce zleva je LMW (low molecular weight) marker, v jamkách 1–3 byly nanášeny vzorky purifikovaných enzymů. 1 (TfHex R218H-4); 2 (TfHex R218H-10); 3 (TfHex R218H-14) v první sérii z média a v druhé sérii po purifikaci na iontové výměnné chromatografii. Z gelu lze pozorovat úspěšnou purifikaci čistých enzymů z jednotlivých kolonií 4; 10 a 14. Velikost katalytické podjednotky je 66,0 kDa.

K biochemické charakterizaci, ke stanovení pH optima, teplotního optima a enzymové kinetiky byl zvolena varianta enzymu *TfHex R218H-14*. Tento enzym se produkoval s dobrým výtěžkem a měl nejlepší výsledný poměr GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity po purifikaci (GalNAcasa/ GlcNAcasa 1,92).

5.1.2 Biochemická stanovení

5.1.2.1 pH optimum

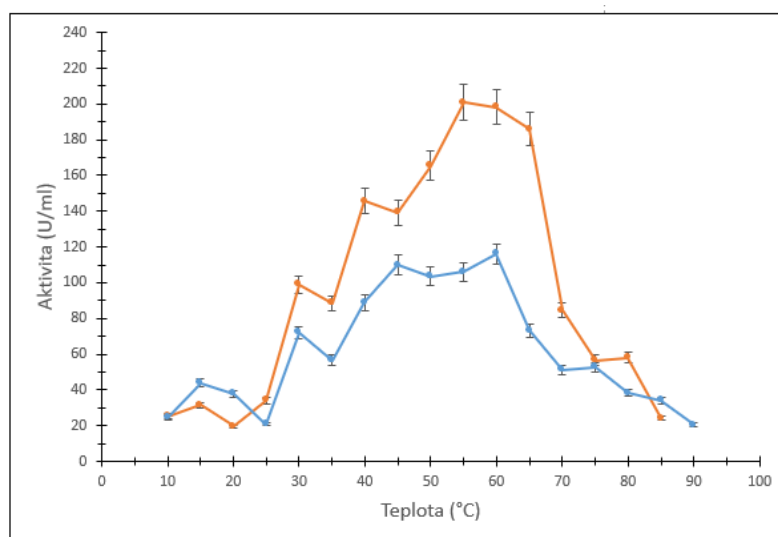
pH optimum enzymu *TfHex R18H-14* bylo stanoveno v triplicátu; hydrolytická aktivita enzymu byla měřena v jednotlivých pH v teplotě 35 °C a 850 otáčkách/min. Reakce byla ukončena po 10 min přidávkem 0,1 M Na₂CO₃. Žluté zabarvení dané uvolněným *p*-nitrofenolem (aglykonem) v bazickém prostředí bylo měřeno spektrofotometricky při 420 nm. Z naměřených hodnot absorbance byla vypočtena aktivita pro jednotlivé substráty a následně byly hodnoty zaneseny do grafu. pH optimum je ploché v rozmezí pH 4-5,5. Je zajímavé, že GalNAcasová aktivita enzymu je relativně stabilní v bazickém prostředí od pH 7 do 12,5. Oproti tomu GlcNAcasové aktivitě bazické prostředí neprospívá, aktivita rapidně klesá s pH 7, od pH 9 byla již aktivita neměřitelná.



Obrázek 11 pH optimum mutantní varianty TfHexR218H-14. Graf znázorňuje závislost hydrolytické aktivity enzymu pro oba substráty na pH, v němž reakce probíhala (pNP-GalNAc oranžově a pNP-GlcNAc modře).

5.1.2.2 Teplotní optimum

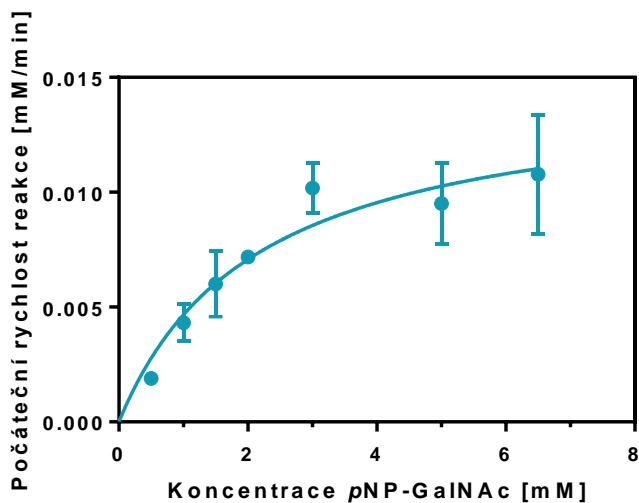
Teplotní optimum enzymu TfHex R218H bylo též měřeno v triplikátu. Proběhlo standardní stanovení hydrolytické aktivity enzymu v jednotlivých teplotách od 10 °C do 90 °C v rozmezí pěti stupňů po dobu 10 min při 850 otáčkách/min. Z naměřených hodnot byla vypočtena aktivita pro oba substráty, která byla zanesena do grafu. Pro substrát pNP-GalNAc bylo nalezeno teplotní optimum mutantní varianty TfHex R218H-14 při 55 °C a pro pNP-GlcNAc v 45 °C.



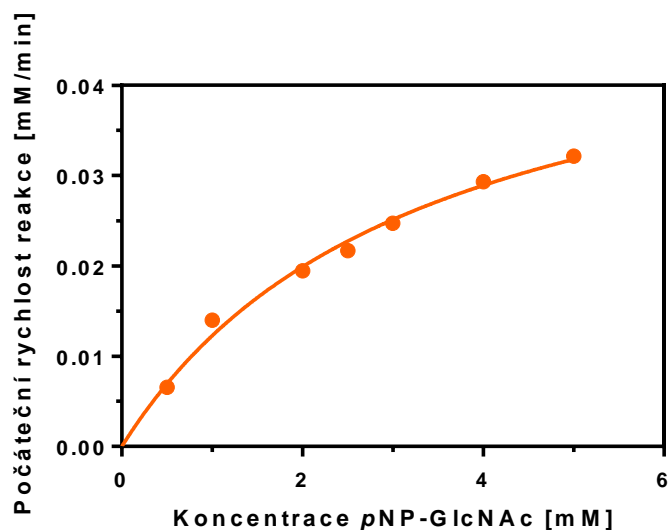
Obrázek 12 Teplotní optimum varianty enzymu TfHex R218H-14. Graf teplotního optima znázorňující oba substráty (pNP-GalNAc oranžově; pNP-GlcNAc modře) v závislosti hydrolytické aktivity na teplotě reakce. Teplotní optimum mutantu TfHex R218H bylo zjištěno pro substrát pNP-GalNAc v 55 °C a pro pNP-GlcNAc v 45 °C.

5.1.2.3 Stanovení enzymové kinetiky

Ke stanovení byla použita spektrofotometrická metoda měření množství uvolněného produktu - *p*-nitrofenolu. Hydrolyza jednotlivých substrátů ve výchozí koncentraci (od 0,10 mM do 6,5 mM) enzymem TjHexR218H-14 byla sledována při 25 °C a 850 otáčkách/min od 2 min do 14 minut od zahájení reakce. Pro každou koncentraci substrátu byla z časové závislosti množství uvolněného *p*-nitrofenolu zjištěna počáteční rychlost hydrolytické reakce. Tyto rychlosti byly vyneseny do grafu v závislosti na koncentraci substrátu. Stanovení kinetických parametrů (K_m , k_{cat} , viz Obr. 13 a 14) je v tomto případě pouze orientační. Nemohlo být provedeno dostatečné množství paralelních měření z důvodu nízké stability enzymu po dobu měření a křivky nejsou plně satureované z důvodu vysoké hodnoty K_m a omezené rozpustnosti substrátů ve vodě.



Obrázek 13 Graf enzymové kinetiky substrátu pNP-GalNAc. Substrát byl měřen v duplikátech v koncentracích od 0,1 mM do 6,5 mM. $K_m = 2,1 \pm 0,7$ mM; $k_{cat} = 6,60 \pm 0,9$ s⁻¹.



Obrázek 14 Graf enzymové kinetiky substrátu pNP-GlcNAc. Substrát byl měřen v jednom paralelním stanovení v koncentracích od 0,1 mM do 6 mM. $K_m = 3,3 \pm 0,5$ mM; $k_{cat} = 12 \pm 1$ s⁻¹.

5.2 Identifikace sekvence genů mutantních β -N-acetylhexosaminidas *TfHex* připravených řízenou evolucí

K identifikaci sekvence genů mutantních β -N-acetylhexosaminidas *TfHex* připravených řízenou evolucí (prováděl Dr. Michal Kotík z Laboratoře biotransformací) byly použity kultury buněk *P. pastoris* nesoucí gen pro β -N-acetylhexosaminidasu s potenciální mutací. Zpracováno bylo celkem 5 kultur (28, 33, 35, 38, 43), které byly vybrány na základě změny poměru výsledné GalNAcasové/ GlcNAcasové aktivity (s odlišností větší než 30 % oproti divokému kmenu). K výsledné sekvenaci byly odeslány tři vzorky (43, 35, 33). Izolace chromozomální DNA z buněk *P. pastoris* proběhla pomocí adsorpční metody v kombinaci s enzymovým štěpením buněčné stěny kvasinky enzymem zymolyasou. Chromozomální DNA z lyzovaných buněk byla navázána na silikátovou kolonku a následně eluována do sterilní mikrozkušavky. Izolovaný gen kódující β -N-acetylhexosaminidasu byl namnožen pomocí amplifikační metody – PCR, k plnému pokrytí aminokyselinové sekvence a namnožení genu byly použity dva páry primerů. Reakce proběhla úspěšně u kolonií 33, 35, 38, 43. Pár 1 měl teplotu tání $T_m = 70,5$ °C a velikost 36 párů bází (forward) a 31 párů

bázi (reverse). Pár 2 měl teplotu tání $T_m = 70,2$ °C a velikost 36 párů bází (forward) a 32 párů bází (reverse). (viz. Obr. 15). Teplota nasedání obou párů primerů byla 65,5 °C a pár 2 fungoval podstatně lépe.

Pár primerů 1: (T_m 70,5 °C)

forward: 5'-GCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGG-3'

reverse: 5'-TGGTCGACGGCGCTATTCAGATCCTCTTCTG-3'

Pár primerů 2: (T_m 70,2 °C)

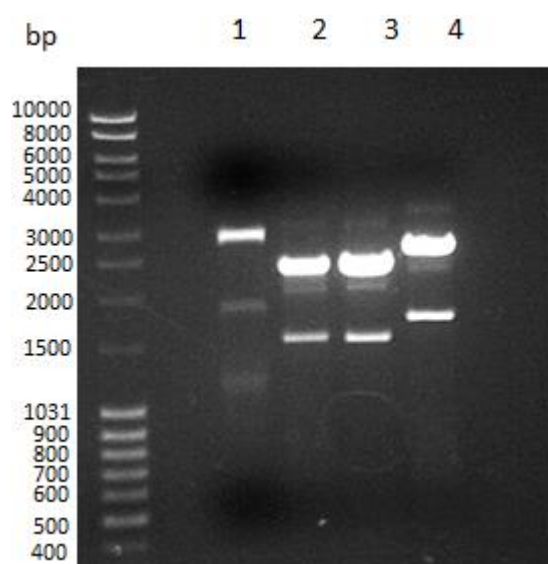
forward: 5'-GGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAAC-3'

reverse: 5'-TGATGATGGTCGACGGCGCTATTCAGATCCTC-3'

5'-TACTGCTGTTTTATTTCGAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGA
TGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTTCGAT
GTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTTATAAAATACTACTATTGCC
AGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTgaattcGTGGCC
GTCAACCCTCTCCCCGCACCGCGGTTCGATCACCTGGGGCACCTCAGGTCCCATCTCCGTGCCACA
CAACGTGGATGTCAAAGTCCCAAGAACGCGATTATCAACGACGCCTGGGAACGCGCCTGGACG
AGCATCAAGCAGTTGAGATGGGTCTCAGGCCACCGAGGCCCCCATCTCGTCGTACGAACCCTT
TCCGACCGTCGCGCCGACATCTGCGTCCACTGCCTCTCTACGCCCTTACCGTCGTCTTCGGCAG
CTGCTGTTGCGGCCAGGAGCCAGAAGCGTGGCCATCAGAAGGGCAGCCATGAGAAACGCGGCC
ATTCACAGTCAACCCTTAGAACCGTCACGGTTACAGTCTCCGACCTCAATGCGGATCTACAAGCT
GAAGTCGACGAGTCGTATAACCCTTGCTCTCGACTCCGGTTCGTCCACACTCGCGATCACCCCAA
CACCACCTGGGGTGCTTTGCACGCATTTACGACTTTGCAGCAACTCGTGATTTATCAGGACAACA
GCTTAATAATTGAGCAGCCGTTACATCGAGGATTGCGCTCTGTACCCCTGGCGCGGCGTCATG
ATTGACACGGGCTACAACCTTTACTGTCCCCAAAATCAAGGAACAGATTGATGGAATGGCGT
TGTCGAAACTCAACATCTTGCAATTGGCATTGGATGATTTCGAGTCTTGGCCGGTGCATATGGAT
ACATACCCTCAGATGACGAATGATGCGTATTCGCCGTGGCAGACGTATTCGCATGAGGATATTA
AGGATATTATTGAATATGCGCGTGCAGCGCGCTGTGCGTGTGTGCTGAAGTTGATATGCCCGGT
CATTCCGGCTGCGGGTTGGCAGCAGGTTGATCCTAGTATTGTGCGGTGTGCTCATTCTTGGTGGTC
GAATGATAACTGGCCTTACCATACTGCCGTTGAGCCTACCCCGGTCAACTCGACCCGCTCAACA
ACAAGACGTATGGAGTCGTTGAGAAGGTGTACAATGAGCTTTCGGGCATTTTCACAGATGACTT
TTCCATGTTGGTGGTGTGATGAATTGCAGACTGGTTGCTACAACCTTTAGTACCTACGTGAGCGATT
ACCTTGCTGCCGACCCGAGCCGCACATAACGACGTACGCAGTACTGGGTTGACCATGCATT
CCCTATCTTCAAGAAGATCCAAAACCGTAAACTCGTCATCTGGGAGGATCTCATCATCAACAAT
CCCCACGCACCAACGTGTCAACAGAAAACCTACTCGTCCAATCCTGGAACAACGGTCTCACCA
ACATCAACAACCTCACCAATTTGGGCTACGACGTCCTCGTCTCTTCTTCAGACTTTATGTACCTC
GACTGCGGCTACGGAGGCTTCGTACCAACGACCCCGATACGACGTAATGGTCAACCCAGACG
CCGTGACGGCCTGGCAAACCTCAACTGGGGCGGAAACGGCGGTAGTTGGTGCACACCCTACAA
GACCTGGCAACGCATCTACGACTACGATTTTACGACCAACTTGACCGACGCGCAAGCCGCGCAT
GTTAAAGGTGCTGTTGCGCCGTTGTGGTCTGAGCAGGTCGACGATACCGGATTTTCGGGTAAGA
TGTGGCCTCGTGCTGCCGCGCTTGCAGGATTGGTGTGGTTCGGGAAACAAGATCCCAAGACCGG
GGATAAGAGGACGACGTATATGACGCAGCGAATTTTGAATTTTAGAGAGTATTTGGTTGCGAAT
GGTGTGCAGGCTGCGCCGTTGGTGCCAAAGTATTGCTTGCAGCATCCTCATTCTTGCATTTGTA
CTATGATCAGACTGCGGTTGTTGAgtaccTCGAGCCGCGGCGGCCAGCTTTCTAGAACAAA
AACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATTGAGTTTGT
AGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACCTACGAGAAGACCGGTCTTGTAGAT
TCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTT
TTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTT...-3'

*Obrázek 14 Sekvence amplifikovaného genu β -N-acetylhexosaminidasy. Na obrázku je zobrazena sekvence genomu *P. pastoris* se zaklonovaným genem β -N-acetylhexosaminidasy (červeně) s vyznačenými klonovacími místy EcoRI (modře) a KpnI (zeleně). Sekvence použitých primerů (pár 1) jsou podtrženy.*

Pomocí elektroforézy v agarosovém gelu byla ověřena čistota požadovaného amplifikovaného genu kódujícího β -N-acetylhexosaminidasu. (Viz Obr. 16)



Obrázek 15 Příklad agarosového gelu PCR produktů. Zleva je marker zobrazující velikost párů bází, v drahách 1 a 2 byly naneseny PCR produkty z chromozomální DNA vzorku 35. V drahách 3 a 4 jsou PCR produkty z chromozomální DNA vzorku 43. Gel prokázal přítomnost amplifikovaného genu kódující β -N-acetylhexosaminidasu odpovídající velikosti cca 2500 párů bází, přičemž samotný gen β -N-acetylhexosaminidasu má velikost 1836 párů bází, zbylých cca 664 párů bází jsou přesahy s primery.

Geny kódující β -N-acetylhexosaminidasu namožené pomocí PCR byly z gelu sterilně izolovány a ligovány do vektoru pGEMTeasy umožňující heterologní expresi pomocí *E. coli*. Kolonie se zaligovaným vektorem obsahujícím inzertovaný gen byly kultivovány při standardních podmínkách na LBA médiu s ampicilinem a IPTG. Selektce kolonií obsahující transformovaný gen proběhla na základě α -komplementace. Po vybrání bílých kolonií obsahující transformovaný gen byly kolonie zaočkovány do LB média s ampicilinem. Po namnožení plasmidů se zaligovaným genem byly plasmidy izolovány z buněčné kultury *E. coli* pomocí metody mini prep. Izolace byla několikrát opakována, jelikož bylo obtížné izolovat dostatečné množství plasmidové DNA, přestože byly striktně dodrženy podmínky kultivace. Po úspěšné izolaci byly vzorky odeslány na sekvenaci, která byla provedena komerční firmou SEQme.

5.2.1 Výsledné sekvence genů mutantních β -N-acetylhexosaminidas

```

                                     10   20   30   40   50   60   70   80
hexosaminidase                      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
19_0384_P00_005F_43a-F -----ACSGRHGGRGNSIAVL PFSNSTNNGLLFINTT IASIAAKEEGVSL EKREAEAEFVAVNPLPAPRSITWGTSGPI

                                     90   100  110  120  130  140  150  160
hexosaminidase                      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
19_0384_P00_005F_43a-F SVPHNVDVKLPKNAIINDAWERAWTSIKQLRWVPQATEAPISSYEPFPTVAPTSASTASSTPLPSSSAAAVAARSQKRGH
SVPHNVDVKLPKNAIINDAWERAWTSIKQLRWVPQATEAPISSYEPFPTVAPTSASTASSTPLPSSSAAAVAARSQKRGH

                                     170  180  190  200  210  220  230  240
hexosaminidase                      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
19_0384_P00_005F_43a-F QKGSHEKRGHQSQSTLRTVTVTVSDLNADLQAEVDES YTVLVD SSGSSTLAITANTTWGALHAFTTLQQLVVIYQDNSLIIEQ
QKGSHEKRGHQSQSTLRTVTVTVSDLNADLQAEVDES YTVLVD SSGSSTLAITANTTWGALHAFTTLQQLVVIYQDNSLIIEQ

                                     250  260  270  280  290  300  310  320
hexosaminidase                      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
19_0384_P00_005F_43a-F PVIHIEDSPLYPWRGVMIDTGRNFITVPKIKEQIDGMALSKLNI LHWHLDDSQSWPVHMDTYPQMTNDAYSFPWQTYSHEDI
SVIHIEDSPLYPWRGVMIDTGRNFITVPKIKEQIDGMALSKLNI LHWHLDDSQSWPVHMDTYPQMTNDAYSFPWQTYSHEDI

                                     330  340  350  360  370  380  390  400
hexosaminidase                      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
19_0384_P00_005F_43a-F KDII EYARARAVRVVPEVDMPGHSAAAGWQQVDP SIVACAHSWWSNDNWPYHTAVEPTPGQLDPLNNKTYGVVEKVVNELS
KDII EYARARAVRVVPEVDMPGHSAAAGWQQVDP SIVACAHSWWSNDNWPYHTAVEPTPGQLDPLNNKTYGVVEKVVNELS

                                     410  420  430  440  450  460  470  480
hexosaminidase                      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
19_0384_P00_005F_43a-F GIFTD DFFHVGGDELQTCYNFSTYVSDYLAADPSRTYNDVTQYVWDHAFPIFKKIQRKLVIEDLIINPHAPNVSTE

                                     490  500  510  520  530  540  550  560
hexosaminidase                      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
19_0384_P00_005F_43a-F NLLVQSWNNGLTNINNLNLGVDLVSSDFMYLDCGYGGFVTNDPRYDVMVNPDAVDGLANFNWGGNGGSGWCAPIKTYQ

                                     570  580  590  600  610  620  630  640
hexosaminidase                      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
19_0384_P00_005F_43a-F RIYDYDFTTNLTDAQAAHVKGAVAPLWSEQVDDTAISGKMWPRAALAE LVWSGNKDPKTKGKRTTYMTQRIINFPREYLV

                                     650  660  670
hexosaminidase                      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
19_0384_P00_005F_43a-F ANGVQAAPLVPKYCLQHPHSCDLYYDQTAVV*
|

```

Obrázek 16 Příklad výsledné sekvence genu mutantní β -N-acetylhexosaminidasy. Na obrázku je vyobrazena aminokyselinová sekvence mutantní β -N-acetylhexosaminidasy vzorku 43. V prvním řádku s názvem „hexosaminidase“ je zobrazena aminokyselinová sekvence původního divokého kmene TfHex, v druhém řádku je zobrazena sekvence mutantního enzymu. Sekvence odhalila 2 aminokyselinové záměny, a to na 76. místě sekvence, kde tyrosin byl nahrazen alaninem, a na 241. místě, kde prolin byl nahrazen serinem.

K sekvenaci byly odeslány vzorky 43, 35 a 33. Sekvence genů ve vzorcích 35 a 33 neodhalila žádné bodové mutace, aminokyselinová sekvence se shodovala s genem divokého kmene.

6 DISKUZE

β -*N*-Acetylhexosaminidasy jsou hydrolytické enzymy patřící mezi *exo*-glykosidasy. Tyto enzymy odštěpují koncový glykosyl ze substrátů jako je chitin, glykosfingolipidy a další glykobiopolymery. β -*N*-Acetylhexosaminidasy katalyzují hydrolytické štěpení glykosidové vazby β -vázaných substrátů GlcNAc a GalNAc. V rámci lidského organismu jsou studovány převážně β -*N*-acetylhexosaminidasy HexA a HexB, jejichž absence způsobuje vážné vrozené poruchy metabolismu jako je Tay Sachs a Sandhoffova choroba. V posledních letech byla také prokázána spojitost β -*N*-acetylhexosaminidas se stárnutím mozkových buněk a rozvojem Alzheimerovy choroby. Výzkum β -*N*-acetylhexosaminidas by mohl napomoci budoucí léčbě právě těchto onemocnění [1; 2; 3].

V této práci je analyzována spojitost nukleotidové sekvence modelové β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus* s typickou vlastností těchto enzymů – schopností štěpit dva substráty lišící se v poloze hydroxyly na C-4 (ekvatoriální hydroxyl – GlcNAc či axiální – GalNAc). Tato vlastnost byla zkoumána jednak expresí a studiem vlastností enzymové varianty nesoucí bodovou mutaci R218H navržené na základě molekulárního modelování, jednak analýzou nukleotidové sekvence genů této β -*N*-acetylhexosaminidasy zmutovaných metodou řízené evoluce.

V rámci této práce byla mutantní β -*N*-acetylhexosaminidasa z *Talaromyces flavus* R218H heterologně exprimována v kvasince *P. pastoris*. Výtěžek proteinu z 200 ml kultivačního média byl 1,6 mg u kolonie 4, 3,2 mg u kolonie 10 a 2,2 mg u kolonie 14. Rozdíly v produkci byly pravděpodobně způsobeny počtem inzertovaných kopií plasmidu během elektroporace. Celkově není výtěžek proteinu příliš vysoký, což je u mutantních enzymů častý jev. U divokého kmene je možné touto metodou purifikovat 47 mg proteinu z téhož množství média [5]. Vzhledem k tomu, že při kultivacích pozorujeme jisté rozdíly v poměru aktivit i u variant se stejnou primární sekvencí [5], byly blíže analyzovány tři kolonie nesoucí tentýž gen.

Po produkci enzymu byly zkoumány hydrolytické aktivity vůči oběma substrátům v závislosti na podmínkách, jako je teplota nebo pH. Výběr kolonie k biochemické charakterizaci probíhal na základě změny poměru GalNAcasové/GlcNAcasové aktivity

mutační varianty R218H ve srovnání s divokým kmenem *TfHex*. Poměr mezi aktivitami původního kmene byl 1,2 u mutační varianty R218H-14 byl 1,92, poměr byl tedy změněn na základě vnesené mutace o 60 % ve prospěch *pNP-GalNAc*asy, což jsme predikovali i pomocí molekulárního modelování.

Stanovením pH optima obou substrátů bylo zjištěno, že pH optimum pro oba substráty je mezi pH 4 a 5,5, zároveň byla prokázána aktivita v bazickém prostředí pro substrát *pNP-GalNAc*, což je obecně pro β -*N*-acetylhexosaminidasy neobvyklé. U *pNP-GlcNAc*asy začala aktivita výrazně klesat s pH 6 (viz Obr. 4 str. 48). Zdá se tedy, že jednotlivé aktivity enzymu nemají zcela stejné vlastnosti a biochemické chování. To se potvrdilo i u stanovení teplotního optima – u *GalNAc*asy v 55 °C a *GlcNAc*asy v 45 °C. K výraznému poklesu hydrolytické aktivity došlo u teplot pod 25 °C a nad 70 °C. Odhad kinetických parametrů ukazuje u substrátu *pNP-GalNAc* hodnoty $K_m = 2,1$ mM, $k_{cat} = 6,6$ s⁻¹, což je v porovnání s divokým kmenem 3 × vyšší hodnota K_m a 5,8 × nižší hodnota k_{cat} . Je třeba podotknout, že vnesená mutace pravděpodobně způsobila nestabilitu enzymu – enzym byl při 4 °C aktivní po dobu max. deseti dnů a pak začala zvláště *GalNAc*asová aktivita výrazně klesat [5].

V druhé části práce byl optimalizován pracovní postup ke zjištění sekvencí genů kódujících mutační varianty β -*N*-acetylhexosaminidasy *TfHex* připravených řízenou evolucí, což prozatím nebylo na glykosidasch nikdy studováno. Byla optimalizována původní metoda izolace chromozomální DNA z buněk *P. pastoris* a pomocí PCR došlo k namnožení genu kódující β -*N*-acetylhexosaminidasu, který byl následně ligován do vektoru umožňujícího expresi v *E. coli*. Gen byl pak namnožen a zaslán ke komerční sekvenaci.

Kritickou částí procesu byla izolace chromozomální DNA, PCR a izolace dostatečného množství plasmidové DNA (z *E. coli*) nutné k sekvenaci. V rámci izolace chromozomální DNA z buněk *P. pastoris* byly navrženy dva postupy, adsorbční spolu s mechanickým postupem a enzymový pomocí zymolyasy. Žádný proces sám o sobě nevedl k získání dostatečného množství DNA, respektive dostatečně kvalitní DNA. Výtěžky z jednotlivých izolací se pohybovaly pouze okolo max. 4 μ g, kdy 5 μ g je hraniční množství pro PCR reakci v celkovém objemu 25 μ l. Proto byl navržen alternativní postup, kdy

ke klasické adsorbční metodě byla přidružena metoda enzymová. Před adsorpcí na silikátovou kolonku došlo k narušení stěny buněk *P. pastoris* pomocí enzymu zymolyasy. Tento postup se osvědčil, vedl k izolaci až 14 µg chromozomální DNA.

Takto získaná chromozomální DNA byla podrobena PCR reakci pomocí dvou párů primerů (viz kapitola 5.2), PCR reakce proběhla po úpravě reakčních podmínek spočívajících především v teplotě nasedání primerů, bylo navrženo 65,5 °C, což považujeme za optimální vzhledem k úspěšnosti proběhlých reakcí (4 z 5) a v množství DNA přidané do reakční směsi. PCR reakce proběhla úspěšně u 4 vzorků; obecně se nedařilo navrhnout jednotný postup pro všechny vzorky, u kolonie 28 opakovaně reakce neproběhla. Optimalizace konečné izolace plasmidové DNA z *E. coli* spočívala v navržení kultivačních podmínek vhodných pro růst buněk a opakované eluci plasmidové DNA ze silikátové kolonky na konci izolace, přesto u kolonie 38 nedošlo opakovaně k izolaci dostatečného množství plasmidové DNA k přípravě vzorku na sekvenaci.

K sekvenaci byly odeslány tři vzorky, z nichž dva (vzorky 33; 35) měly stejnou nukleotidovou sekvenci jako divoký kmen, a tudíž změna jejich poměru aktivit byla v rámci přirozené variability, či dalších vlivů při expresi a skládání enzymu. U jedné kultury (43) sekvenace prokázala přítomnost mutací, konkrétně na 76. místě aminokyselinové sekvence byl tyrosin nahrazen alaninem a na 241. místě byl prolin nahrazen serinem. Tyto mutace mohly způsobit změnu v poměrech aktivit vůči oběma substrátům. Význam těchto mutací bude dále analyzován pomocí molekulárního modelování.

7 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byla provedena literární rešerše týkající se charakterizace a klasifikace glykosidas a využití genetického inženýrství k úpravě vlastností enzymů.

V praktické části byly získány tři kolonie β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus* nesoucí bodovou mutaci R218H (*TfHex* R218H) odpovědnou za změněnou substrátovou specifitou ve prospěch GalNAcasy. Výtěžek produkce se pohyboval od 1,6-3,2 mg proteinu na 200 ml kultivačního média. Výtěžky po purifikaci se pohybovaly okolo 70%.

Ve druhé části práce jsme optimalizovali postup vedoucí ke zjištění mutantních sekvencí genů *TfHex* připravených řízenou evolucí, která prozatím nebyla uskutečněna u glykosidas. Sekvence prokázala dvě bodové mutace u vzorku 43. Mutace byla zjištěna na 76. místě aminokyselinové sekvence, kde tyrosin byl nahrazen alaninem, a na 241. místě, kde byl prolin nahrazen serinem. V rámci dalšího výzkumu lze využít poznatků získaných v této práci a význam mutací bude analyzován pomocí molekulárního modelování.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glukosamin
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galaktosamin
<i>p</i> NP- GlcNAc	<i>p</i> -Nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid
<i>p</i> NP-GalNAc	<i>p</i> -Nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosid
NGT	Thiazolin odvozený od <i>N</i> -acetylglukosaminu
<i>Ao</i> Hex	β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidasa z <i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Tf</i> Hex	β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidasa z <i>Talaromyces flavus</i>
HexA	β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidasa A
HexB	β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidasa B
CAT	Katalasa
AOX	Alkoholoxidasa
FMD	Formaldehyddehydrogenasa
DHAS	Dihydroxyacetonsynthasa
GMO	Geneticky modifikovaný organismus
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
LB	<i>Luria-Berthani medium</i>
SOC	<i>Super optimal broth medium</i>
YPD	<i>Yeast extract-peptone-dextrose</i> , médium
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonová kyselina
DTT	Dithiothreitol
TAE	Pufř tris-acetát-EDTA
BSA	Hovězí sérový albumin
dNTPs	Deoxyribonukleotidy
PCR	Polymerasová řetězová reakce
SDS – page	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným
TEMED	Tetramethylenethylendiamin
LMW	<i>Low molecular weight</i>
UV	<i>Ultraviolet</i>
ABS	Absorbance
AKT	Aktivita

Hz	Hertz
kDa	KiloDalton

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] FIALOVÁ, Pavla. *Modified Substrates in β -N-Acetylhexosaminidase-Catalyzed Synthesis*. Praha, 2009, 1-12. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, katedra biochemie. Vedoucí práce prof. Ing. Vladimír Křen, DrSc.
- [2] SLÁMOVÁ, Kristýna a Pavla BOJAROVÁ. Engineered *N*-acetylhexosamine-active enzymes in glycoscience. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2017, **1861**(8), 2070-2087. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.03.019. ISSN 03044165. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416517301101>
- [3] SLÁMOVÁ, Kristýna, Pavla BOJAROVÁ, Lucie PETRÁSKOVÁ a Vladimír KŘEN. β -*N*-Acetylhexosaminidase: What's in a name...?. *Elsevier*. 2010, **28**(6), 682-691. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.04.004. ISSN 07349750.
- [4] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4, 80-7080-124-7.
- [5] BOJAROVÁ, Pavla, Natalia KULIK, Michaela HOVORKOVÁ, Kristýna SLÁMOVÁ, et al. The β -*N*-Acetylhexosaminidase in the Synthesis of Bioactive Glycans: Protein and Reaction Engineering. *Molecules*. 2019, **24**(3). DOI: 10.3390/molecules24030599. ISSN 1420-3049. Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/3/599>
- [6] McDONALD, Andrew. EC 3.2.1.52. *Carbohydrate-Active enZymes Database* [online]. Dublin: School of Biochemistry & Immunology, Trinity College, 2019 [cit. 2019-01-01]. Dostupné z: <http://www.enzyme-database.org/query.php?ec=3.2.1.52>
- [7] SLÁMOVÁ, Kristýna, Pavla BOJAROVÁ, Daniela GERSTORFEROVÁ, Barbora FLIEDROVÁ, et al. Sequencing, cloning and high-yield expression of a fungal β -*N*-acetylhexosaminidase in *Pichia pastoris*. *Elsevier: Protein Expression and Purification*. 2012, **82**(1), 212-217. DOI: 10.1016/j.pep.2012.01.004. ISSN 10465928. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592812000058>

[8] BOJAROVÁ, Pavla, Natallia KULIK, Kristýna SLÁMOVÁ, Martin HUBÁLEK, Michael KOTIK, et al. Selective β -*N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus versicolor*—a tool for producing bioactive carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, **103**(4), 1737-1753. DOI: 10.1007/s00253-018-9534-z. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-9534-z>

[9] ŠKERLOVÁ, Jana, Jan BLÁHA, Petr PACHL, et al. Crystal structure of native β -*N*-acetylhexosaminidase isolated from *Aspergillus oryzae* sheds light onto its substrate specificity, high stability, and regulation by propeptide. *The FEBS Journal*. 2018, **285**(3), 580-598. DOI: 10.1111/febs.14360. ISSN 1742464X. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.14360>

[10] ARMSTRONG, Zachary a Stephen G. WITHERS. Synthesis of Glycans and Glycopolymers Through Engineered Enzymes. *Biopolymers*. 2013, **99**(10), 666-674. DOI: 10.1002/bip.22335. ISSN 00063525. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.22335>

[11] Heterologous Expression. *Encyclopedia of Neuroscience*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, s. 1830. DOI: 10.1007/978-3-540-29678-2_2190. ISBN 978-3-540-23735-8. Dostupné také z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-540-29678-2_2190

[12] CEREGHINO, Joan Lin a James M. CREGG. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, **24**(1), 46-48. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x. ISSN 1574-6976. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>

[13] *Heterologní exprese cryptogeinu K13V a testování jeho biologické aktivity*. Brno, 2016. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, ústav biochemie. Vedoucí práce Mgr. Jan Lochman, Ph.D.

[14] HIGGINS, David R. a James M. CREGG. Introduction to *Pichia pastoris*. *Pichia Protocols*. New Jersey: Humana Press, 1998, 1-12. DOI: 10.1385/0-89603-421-6:1. ISBN 0-89603-421-6. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1385/0-89603-421-6:1>

- [15] PPICZ α A, B, and C *Pichia* expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins. *Thermo Fisher Scientific* [online]. V195-20. Waltham, MA USA 02451: Thermo Fisher Scientific, 2010 [cit. 2019-02-01]. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/ppiczalpha_man.pdf
- [16] TERPE, Kay. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, **72**(2), 211-222. DOI: 10.1007/s00253-006-0465-8. ISSN 0175-7598. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-006-0465-8>
- [17] BANEYX, François. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Elsevier, Current Opinion in Biotechnology*. 1999, **10**(5), 411-417. DOI: 10.1016/S0958-1669(99)00003-8. ISSN 09581669. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166999000038>
- [18] MAKRIDES, Savvas C. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*. 1996, **60**(3), 513.
- [19] DOPITOVÁ, Radka. *Expresa a purifikace rekombinantních proteinů* [online]. Brno: Masarykova Univerzita, 2015, s. 1-74 [cit. 2019-02-09]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2015/C8202/um/Expresa_a_purifikace_rekombinantnich_proteinu_2015.pdf
- [20] KHATTAK, Jabar Zaman Khan, Sobiah RAUF, Anwar ZUBAIR a Hussain Mustatab WAHEDI. Recent Advances in Genetic Engineering-A Review. *Current Research Journal of Biological Sciences*. 2012, **4**(1), 82-89. ISSN 2041-0778.
- [21] ZUKER, Amir, Tzvi TZFIRA a Alexander VAINSTEIN. Genetic engineering for cut-flower improvement. *Biotechnology Advances*. 1998, **16**(1), 33-79. DOI: 10.1016/S0734-9750(97)00063-3. ISSN 07349750. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975097000633>
- [22] BRENNER, Sydney, Jeffrey H. MILLER a William BROUGHTON. *Encyclopedia of genetics*. 4. San Diego: Academic Press, 2002, 834 s. ISBN 978-0122270840.

- [23] GREENAWAY, P. J. Basic steps in genetic engineering. *International Journal of Environmental Studies*. 2008, **15**(1), 11-24. DOI: 10.1080/00207238008737419. ISSN 0020-7233. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00207238008737419>
- [24] COBB, Ryan E., Ran CHAO a Huimin ZHAO. Directed evolution: Past, present, and future. *AIChE Journal*. 2013, **59**(5), 1432-1440. DOI: 10.1002/aic.13995. ISSN 00011541. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/aic.13995>
- [25] MCCULLUM, Elizabeth O., Berea A. R. WILLIAMS, Jinglei ZHANG a John C. CHAPUT. Random Mutagenesis by Error-Prone PCR. *In Vitro Mutagenesis Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, 2010-3-19, , 103-109. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-60761-652-8_7. ISBN 978-1-60761-651-1. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-652-8_
- [26] ŠMARDÁ, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 7-29. ISBN 80-210-3841-1.
- [27] KOTRBA, Pavel, Zdeněk KNEJZLÍK a Zdeněk CHODORA. *Izolace, klonování a analýza DNA* [online]. In: . Praha: Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT, 2016, s. 1-12 [cit. 2019-03-05]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/5246952-Izolace-klonovani-a-analyza-dna.html>
- [28] Electroporation. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham, MA USA: Thermo Fisher Scientific [cit. 2019-05-05]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/electroporation.html>
- [29] DANBY, Phillip M. a Stephen G. WITHERS. Advances in Enzymatic Glycoside Synthesis. *ACS Chemical Biology*. 2016, **11**(7), 1784-1790. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00340. ISSN 1554-8929. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscchembio.6b00340>

[30] BOJAROVÁ, Pavla a Vladimír KŘEN. Glycosidases in Carbohydrate Synthesis: When Organic Chemistry Falls Short. *CHIMIA International Journal for Chemistry*. 2011, **65**(1), 65-70. DOI: 10.2533/chimia.2011.65. ISSN 00094293.

[31] SLÁMOVÁ, Kristýna, Jana KREJZOVÁ, Petr MARHOL, Lubica KALACHOVA, Natallia KULIK, Helena PELANTOVÁ, Josef CVAČKA a Vladimír KŘEN. *Synthesis of Derivatized Chitooligomers using Transglycosidases Engineered from the Fungal GH20 β -N -Acetylhexosaminidase*. 2015, **357**(8), 1941-1950. DOI: 10.1002/adsc.201500075. ISSN 16154150. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adsc.201500075>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma reakcí katalyzovaných glykosidasami (převzato z [1])	13
Obrázek 2 Krystalová struktura β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy z <i>Aspergillus oryzae</i> (převzato z [9])	14
Obrázek 3 Schéma katalytického mechanismu β - <i>N</i> -acetylhexosaminidas (převzato z [10]).....	15
Obrázek 4 Schéma metabolické dráhy methanolu v <i>Pichia pastoris</i> (převzato z [13]).....	16
Obrázek 5 Schéma vektoru <i>pPICZα</i> – A, B, C s popisy sekvencí (převzato z [15])	17
Obrázek 6 Schéma charakteristických vlastností a prvků prokaryotického expresního vektoru (převzato z [18]).	19
Obrázek 7 Spojování fragmentů DNA s lepivými konci DNA ligasou (převzato z [26]).....	23
Obrázek 8 Štěpení substrátu <i>pNP</i> -GalNAc β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasou.....	38
Obrázek 9 Chromatogram průběhu purifikace mutantního enzymu <i>TfHex R218H-14</i> iontoměničovou chromatografií.....	45
Obrázek 10 SDS gel po purifikaci varianty <i>TfHex R218H</i>	46
Obrázek 11 pH optimum mutantní varianty <i>TfHexR218H-14</i>	47
Obrázek 12 Teplotní optimum varianty enzymu <i>TfHex R218H-14</i>	47
Obrázek 13 Graf enzymové kinetiky substrátu <i>pNP</i> -GalNAc.	48
Obrázek 15 Sekvence amplifikovaného genu β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy.	50
Obrázek 16 Příklad agarosového gelu PCR produktů.....	51
Obrázek 17 Příklad výsledné sekvence genu mutantní β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy.	52

11 SEZNAMU POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Vybrané restrikční endonukleasy s rozpoznávacími místy (převzato z [26])	22
Tabulka 2 Výsledné aktivity mutantních enzymů po purifikaci	45

12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Nukleotidová sekvence vektoru obsahující gen kódující β -N-acetylhexosaminidasu *TyHex R218H*. Žlutě vyznačena mutace na pozici 218, kde byl arginin (CGA) zaměněn za histidin (CAC)

gaattcGTGGCCGTCAACCCTCTCCCCGACCGCGGTTCGATCACCTGGGGCACCTCAGGTCCCATCTCCGTGC
CACACAACGTGGATGTCAAACCTGCCAAGAACGCGATTATCAACGACGCCTGGGAACGCGCCTGGACGAG
CATCAAGCAGTTGAGATGGGTGCCTCAGGCCACCGAGGCCCCCATCTCGTCGTACGAACCCCTTCCGACCGT
CGCGCCGACATCTGCGTCCACTGCCTCCTCTACGCCCTTACCGTCGTCTTCGGCAGCTGCTGTTGCGGCCAG
GAGCCAGAAGCGTGGCCATCAGAAGGGCAGCCATGAGAAACGCGGCCATTACAGTCAACCCTTAGAAC
GTCACGGTTACAGTCTCCGACCTCAATGCGGATCTACAAGCTGAAGTCGACGAGTCGTATACCCTTGTCTC
GACTCCGGTTCGTCCACACTCGCGATCACCGCAACACCACCTGGGGTGCTTTGCACGCATTTACGACTTTG
CAGCAACTCGTGATTTATCAGGACAACAGCTTAATAATTGAGCAGCCCGTTCACATCGAGGATTCGCCTCTG
TACCCTGGCGCGCGTCATGATTGACACGGGC**CAC**AACTTTATTACTGTCCCCAAAATCAAGGAACAGATT
GATGGAATGGCGTTGTCGAAACTCAACATCTTGCAATTGGCATTGGATGATTTCGCAGTCTTGGCCGGTGCAT
ATGGATACATACCCTCAGATGACGAATGATGCGTATTGCGCGTGGCAGACGTATTTCGCATGAGGATATTAA
GGATATTATTGAATATGCGCGTGCGCGCTGTGCGTGTGCTGAAGTTGATATGCCCGGTCATTCGG
CTGCGGGTTGGCAGCAGTTGATCCTAGTATTGTCGCGTGTGCTCATTCTTGGTGGTGAATGATAACTGGC
CTTACCATACTGCCGTTGAGCCTACCCCGGTCAACTCGACCCGCTCAACAACAAGACGTATGGAGTCGTTG
AGAAGGTGTACAATGAGCTTTCGGGCATTTTCACAGATGACTTTTTCCATGTTGGTGGTGAATTGCAGA
CTGGTTGCTACAACCTTAGTACCTACGTGAGCGATTACCTTGCTGCCGACCCGAGCCGCACATACAACGACG
TCACGCAGTACTGGGTTGACCATGCATTCCCTATCTTCAAGAAGATCCAAAACCGTAAACTCGTCATCTGGG
AGGATCTCATCAACAATCCCCACGCACCCAACGTGTCAACAGAAAACCTACTCGTCCAATCCTGGAACA
ACGGTCTACCAACATCAACAACCTACCAATTTGGGCTACGACGTCCTCGTCTCTTCTCAGACTTTATGTA
CCTCGACTGCGGCTACGGAGGCTTCGTACCAACGACCCCGATACGACGTAATGGTCAACCCAGACGCCG
TCGACGGCCTGGCAAACCTTCAACTGGGGCGGAAACGGCGGTAGTTGGTGCGCACCCTACAAGACCTGGCA
ACGCATCTACGACTACGATTTTACGACCAACTTGACCGACGCGCAAGCCGCGCATGTTAAAGGTGCTGTTGC
GCCGTTGTGGTCTGAGCAGGTCGACGATACCGCGATTTCCGGGTAAGATGTGGCCTCGTGCTGCCGCGCTTG
CGGAGTTGGTGTGGTTCGGGAAACAAGATCCCAAGACCCGGGATAAGAGGACGACGTATATGACGCAGC
GAATTTTGAATTTAGAGAGTATTGGTTGCGAATGGTGTGCAGGCTGCGCCGTTGGTGCCCAAGTATTGCT
TGCAGCATCCTCATTCTTGCGATTTGACTATGATCAGACTGCGGTTGTTGAggtacc