



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Rekombinantní exprese a charakterizace synteticky zajímavé
 β -N-acetylhexosaminidasy v *Pichia pastoris***

**Recombinant expression and characterization of a synthetically
interesting β -N-acetylhexosaminidase in *Pichia pastoris***

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

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

Iveta Andreasová

Kladno, květen 2019

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Andreasová** Jméno: **Iveta** Osobní číslo: **456423**
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:

Rekombinantní exprese a charakterizace synteticky zajímavé β -N-acetylhexosaminidasy v *Pichia pastoris*

Název bakalářské práce anglicky:

Recombinant Expression and Characterization of a Synthetically Attractive β -N-acetylhexosaminidase in *Pichia Pastoris*

Pokyny pro vypracování:

β -N-Acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum* byla identifikována jako enzym s širokou substrátovou specifitou vůči strukturně modifikovaným substrátům, což umožňuje efektivní vnášení vybraných funkčních skupin do oligosacharidových řetězců. Kvasinka *Pichia pastoris* je rekombinantním producentem houbových glykosidas ve vysokém výtěžku a čistotě. Cílem práce je rekombinantní exprese β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* v *Pichia pastoris* a její charakterizace. Teoretická část práce bude zahrnovat charakteristiku enzymů β -N-acetylhexosaminidas a jejich použití pro enzymovou syntézu. V praktické části práce bude plazmid nesoucí syntetický gen tohoto enzymu transformován do kompetentních buněk *Pichia pastoris* a bude proveden screening exprese enzymu. Bude optimalizována produkce enzymu a budou porovnány biochemické vlastnosti původního fungálního a rekombinantního enzymu.

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] Bojarová, P., Rosencrantz, R. R., Elling, L., Křen V., Enzymatic glycosylation of multivalent scaffolds. , *Chem. Soc. Rev.*, číslo 42(11), 2013, 4774-4797 s., ISSN 0306-0012
- [3] Slámová, K., Krejzová, J., Marhol, P., Kalachova, L., Kulik, N., Pelantová, H., Cvačka, J., Křen V., Synthesis of derivatized chitooligomers using transglycosidases engineered from the fungal GH20 β -N-acetylhexosaminidase, *Adv. Synth. Catal.*, číslo 357(8), 2015, 1941-1950 s., ISSN 1615-4169

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 vedoucí(ho) katedry



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

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Rekombinantní exprese a charakterizace synteticky zajímavé β -*N*-acetylhexosaminidasy v *Pichia pastoris* 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 16.05.2019

.....
podpis

Poděkování

V této části práce bych ráda poděkovala RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D. za její trpělivost, velkou ochotu a cenné rady při praktické i teoretické části. Dále bych ráda poděkovala prof. Ing. Vladimírovi Křenovi, DrSc. za umožnění práce v Laboratoři biotransformací a cenné rady, Ing. Lucii Petráskové, Ph.D. a RNDr. Heleně Pelantové, Ph.D. za speciální analýzy vzorků a také všem pracovníkům laboratoře za ochotu a skvělý kolektiv.

Abstrakt

β -N-Acetylhexosaminidasa je enzym patřící mezi glykosidasy, které ve volné přírodě glykosidovou vazbu pouze hydrolyzují, ovšem při vhodné úpravě reakčních podmínek jsou schopny ji syntetizovat. β -N-Acetylhexosaminidasy z vláknitých hub jsou inducibilní extracelulární enzymy. Jsou známé pro svou fyziologickou roli v chitinolytickém systému buněk rostoucích hub – zodpovídají za kontrolu lýzy chitinové buněčné stěny a regulují rekonstrukci buněk. V biotechnologii mají potenciální využití v syntéze oligosacharidů díky svým dobrým transglykosylačním schopnostem.

K rekombinantní expresi β -N-acetylhexosaminidas z vyšších organismů, např. hub a plísní, se s výhodou využívá expresního systému kvasinek, např. *Pichia pastoris* nebo *Saccharomyces cerevisiae*. Houbová β -N-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum* je zajímavým enzymem pro případné biotechnologické využití díky své vysoké GalNAcasové aktivitě, široké substrátové specifitě a dobré pH stabilitě.

V této práci byl rekombinantní expresí produkován enzym β -N-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum* za využití expresního systému kvasinek *Pichia pastoris*. Rekombinantní enzym byl produkován ve větším množství i čistotě než původní houbový enzym i díky tomu, že postačovala jednkroková purifikace na rozdíl od tříkrokového procesu purifikace z houbového média. Enzym byl charakterizován a jeho vlastnosti byly porovnány s β -N-acetylhexosaminidasou z původního houbového producenta. Byl porovnán výtěžek a čistota enzymu, pH optimum, pH stabilita, teplotní optimum a kinetické parametry.

Klíčová slova

β -N-Acetylhexosaminidasa; glykosidasa; *Penicillium oxalicum*; *Pichia pastoris*; rekombinantní exprese; transglykosylace.

Abstract

β -N-Acetylhexosaminidase is an enzyme belonging to glycosidases, which hydrolyze glycosidic bonds in nature, but are able to synthesize it under suitable reaction conditions. β -N-Acetylhexosaminidases from filamentous fungi are inducible extracellular enzymes. They are known for their physiological role in the chitinolytic system of the cells of growing fungi – they are responsible for controlling the lysis of chitin cell wall and regulate cell reconstitution. In biotechnology they have potential use in the synthesis of oligosaccharides thanks to their good transglycosylation abilities.

For recombinant expression of β -N-acetylhexosaminidases from higher organisms, such as fungi and mold, it is advantageous to use yeast expression systems such as *Pichia pastoris* or *Saccharomyces cerevisiae*. The β -N-acetylhexosaminidase from the fungus *Penicillium oxalicum* is an attractive enzyme for possible biotechnological application due to its high GalNAcase activity, wide substrate specificity and good pH stability.

In this thesis, the β -N-acetylhexosaminidase enzyme from *Penicillium oxalicum* was produced by recombinant expression in the expression system of the yeast of *Pichia pastoris*. The recombinant enzyme was produced in higher amount and purity than the original fungal enzyme – also because its one-step purification was sufficient to reach high purity in contrast to the three-step purification process from the fungal medium. The enzyme was characterized and its abilities were compared to the original fungal β -N-acetylhexosaminidase concerning the yield and purity of enzyme, pH optimum, pH stability, temperature optimum and kinetic parameters.

Keywords

β -N-Acetylhexosaminidase; glycosidase; *Penicillium oxalicum*; *Pichia pastoris*; recombinant expression; transglycosylation.

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Úvod | 10 |
| 2 | Současný stav | 11 |
| 2.1 | Glykosidasy | 11 |
| 2.1.1 | Charakteristika, klasifikace | 12 |
| 2.1.2 | Glykosylace pomocí glykosidas | 13 |
| 2.1.3 | Katalytický mechanismus glykosidas | 14 |
| 2.2 | β -N-Acetylhexosaminidasy | 16 |
| 2.2.1 | Struktura β -N-acetylhexosaminidas | 17 |
| 2.2.2 | Fyziologická a funkční role β -N-acetylhexosaminidas | 19 |
| 2.2.3 | Rekombinantní exprese | 21 |
| 2.2.4 | Syntetické aplikace β -N-acetylhexosaminidas | 22 |
| 2.3 | β -N-Acetylhexosaminidasa z <i>Penicillium oxalicum</i> | 23 |
| 2.3.1 | Charakterizace β -N-acetylhexosaminidas z <i>Penicillium oxalicum</i> | 23 |
| 2.3.2 | Produkce β -N-acetylhexosaminidas v houbovém producentu a purifikace | 25 |
| 2.3.3 | Molekulární model | 25 |
| 3 | Cíl práce | 27 |
| 4 | Metodika | 28 |
| 4.1 | Použité materiály a přístroje | 28 |
| 4.1.1 | Materiály | 28 |
| 4.1.2 | Média a roztoky | 30 |
| 4.1.3 | Přístroje | 32 |
| 4.2 | Produkce plasmidu v <i>Escherichia coli</i> | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.2.1 | Transformace do <i>Escherichia coli</i> | 33 |
| 4.2.2 | Izolace plasmidu..... | 33 |
| 4.2.3 | Štěpení plasmidu a elektroforéza v agarosovém gelu..... | 35 |
| 4.3 | Příprava kompetentních buněk <i>Pichia pastoris</i> | 36 |
| 4.3.1 | Elektroporace | 36 |
| 4.3.2 | Screening exprese β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy | 37 |
| 4.3.3 | Stanovení aktivity β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy | 38 |
| 4.3.4 | SDS-PAGE elektroforéza | 39 |
| 4.3.5 | Kryokonzervace buněčných kultur | 39 |
| 4.4 | Exprese β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy v <i>Pichia pastoris</i> | 40 |
| 4.5 | Zpracování kultury a purifikace..... | 40 |
| 4.6 | Biochemická charakterizace β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy | 41 |
| 4.7 | Transglykosylační reakce s β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasou | 43 |
| 4.7.1 | Tenkvrstvá chromatografie..... | 43 |
| 4.7.2 | Analýza reakční směsi (HPLC, LC-MS)..... | 44 |
| 4.7.3 | Příprava <i>N,N'</i> -diacetylchitobiosy..... | 44 |
| 5 | Výsledky..... | 45 |
| 5.1 | Příprava plasmidu s genem <i>Pohex</i> | 45 |
| 5.2 | Screening exprese <i>PoHex</i> v <i>Pichia pastoris</i> | 45 |
| 5.3 | Produkce <i>PoHex</i> v <i>Pichia pastoris</i> a purifikace..... | 48 |
| 5.4 | Výběr kultury pro charakterizaci | 49 |
| 5.5 | Charakterizace <i>PoHex</i> | 50 |
| 5.5.1 | pH optimum | 51 |
| 5.5.2 | Teplotní optimum..... | 53 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.5.3 | Kinetické parametry..... | 53 |
| 5.6 | Transglykosylační reakce s <i>PoHex</i> | 55 |
| 5.6.1 | Analytické reakce | 55 |
| 5.6.2 | Preparativní reakce | 56 |
| 6 | Diskuze..... | 58 |
| 7 | Závěr | 61 |
| 8 | Seznam použitých zkratk..... | 62 |
| 9 | Seznam použité literatury..... | 64 |
| 10 | Seznam použitých obrázků | 68 |
| 11 | Seznam použitých tabulek..... | 69 |
| 12 | Seznam použitých grafů..... | 70 |
| 13 | Seznam příloh..... | 71 |

1 ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá rekombinantní expresí a produkcí β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* (*P. oxalicum*) z kmenu CCF 1959 (*Culture Collection of Fungi*) v kvasince *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) a její charakterizací.

β -*N*-Acetylhexosaminidasy patří mezi glykosidasy, jejichž potenciál v syntéze je značný a stále málo využitý. V syntetickém módu umožňují glykosylaci β -*N*-acetylglukosaminovým nebo β -*N*-acetylgalaktosaminovým zbytkem celé škály akceptorových molekul – oligosacharidů, peptidů, lipidů či přírodních látek. Přitom využívají na rozdíl od glykosyltransferas levné a dobře dostupné substráty, jako např. fenyl-glykosidy. Velkou výhodou pro jakoukoliv biotechnologickou aplikaci je jednoduchá a výtěžná produkce enzymu. Houbové β -*N*-acetylhexosaminidasy s vysokým syntetickým potenciálem jsou eukaryotní enzymy s poměrně složitou architekturou. Pro jejich heterologní expresi nelze proto využít nejjednodušší bakteriální producenty jako *Escherichia coli* (*E. coli*). Dobrých výsledků bylo dosaženo za použití kvasinkových expresních systémů, např. *P. pastoris*.

β -*N*-Acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum* lze produkovat v přirozeném fungálním producentu. Délka kultivace a následná purifikace enzymu je ovšem příliš dlouhá a složitá, především vinou neselektivní exprese požadovaného enzymu a velkým množstvím dalších produkovaných proteinů. Produkce tohoto enzymu by měla být efektivnější při využití expresního systému *P. pastoris*. Získaný rekombinantní enzym by měl mít zachovány všechny výhodné vlastnosti přirozeného enzymu, zvláště substrátovou specifitu, kinetické parametry a využitelnost pro enzymovou syntézu oligosacharidů.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Glykosidasy

V přírodě existují dvě skupiny enzymů, kterými lze v laboratoři dosáhnout syntézy glykosidové vazby. Jsou to glykosyltransferasy (EC 2.4) a glykosidasy (EC 3.2.1) [1]. Ačkoliv jsou glykosyltransferasy enzymy přirozeně syntetizujícími glykosidovou vazbu *in vivo* a dosahujícími kvantitativních syntetických výtěžků [2], při použití v laboratoři se střetáváme s řadou nevýhod. Je to např. vysoká cena substrátů glykosyltransferas (cukerných nukleotidů, např. UDP-GlcNAc či UDP-GalNAc), nižší stabilita těchto enzymů a také poměrně striktní regioselektivita dle pravidla „jeden enzym – jedna vazba“, která v mnohých případech omezuje flexibilitu jejich použití v reakcích [3;4]. Naproti tomu glykosidasy, které v přírodě glykosidovou vazbu pouze hydrolyzují, jsou při vhodné úpravě reakčních podmínek schopny ji syntetizovat s dobrým výtěžkem a mnohem větší substrátovou flexibilitou [3]. Tyto enzymy se využívají k syntézám kvůli jejich absolutní stereoselektivitě, často ovšem nastává problém v omezené stabilitě a dostupnosti [5].

První syntéza s glykosidasou je zaznamenána již v roce 1898, kdy Arthur Croft Hill použil extrakt z kvasnic k přípravě disacharidů. Glykosidasy hrály také velkou roli při formulaci enzymové teorie „zámku a klíče“ Emilem Fischerem v roce 1894. Fischer popsal rozdíl mezi „emulsinem“, který hydrolyzuje především β -glukosidy, a „invertinem“, specifickým pro α -glukosidy [5;6].

V roce 1913 popsali Bourquelot a Bridel syntézu glukosidu za přítomnosti methanolu a ethanolu ve vysoké koncentraci. Dále roku 1916 prokázali Nelson a Griffin imobilizaci kvasinkové β -fruktofuranosidasy v dřevěném uhlí. Počátek většího rozmachu enzymových syntéz nastal v 50. letech 20. století. Od 70. let bylo již několik glykosidas izolováno z přírodních zdrojů, na trhu bylo k dispozici

několik hrubých komerčních vzorků glykosidas a také byly popsány jejich substrátové specifity. Na konci 80. let se tématem syntéz glykosidasami zabývalo mnoho vědců, mezi něž patřili např. Nilsson, Ajisaka, Larsson, Bucke nebo Crout [5;6].

V dnešní době se výzkum zaměřuje převážně na rozšíření repertoáru glykosidasových reakcí, čehož by se mělo dosáhnout hledáním nových zdrojů enzymových aktivit, na rozšiřování či změnu substrátové specifity a na zvyšování syntetického výtěžku. Zvýšené syntetické účinnosti reakcí lze dosáhnout použitím modifikovaných analogů přírodních substrátů, použitím vhodného reakčního média (např. s kosolventy) a zejména genetickým inženýrstvím [6;7;8]. Také je kladen důraz na vysoce selektivní reakce s mutantními enzymy nebo derivatizovanými substráty, často s přímou aplikací v medicíně či biotechnologii [5].

2.1.1 Charakteristika, klasifikace

Glykosidasy neboli glykosidhydrolasy (EC 3.2.1.) patří do skupiny hydrolas [5]. Jsou klasifikovány do rodin v databázi enzymů CAZy (*Carbohydrate-Active EnZymes database*; <http://www.cazy.org/>), která je neustále aktualizována a doplňována. Enzymy jsou v této databázi řazeny nikoliv na základě typu katalyzované reakce, ale na základě jejich primární sekvence, s níž souvisí i reakční mechanismus a podobnost architektury enzymu. Z toho důvodu patří např. β -*N*-acetylhexosaminidasy, které jsou v rámci klasifikačního systému EC (*Enzyme Commission Number*) na základě shodného typu katalyzované reakce řazeny pod stejným kódem EC 3.2.1.52, do několika CAZy skupin (viz. 2.2.1) [6;9].

Základní třídění glykosidas souvisí s jejich schopností hydrolyzovat sacharidový řetězec pouze na jeho neredukujícím konci, nebo i v jiné části řetězce. V tomto ohledu rozlišujeme *exo*-glykosidasy a *endo*-glykosidasy [6].

Endo-glykosidasy štěpí glykosidovou vazbu uprostřed oligosacharidového řetězce a odštěpují (případně v syntetickém módu přesouvají) celý oligosacharidový fragment, a to nejčastěji na peptidový nebo monosacharidový akceptor. Používají se při transglykosylaci i reverzní hydrolýze (viz 2.1.2). Při syntetických reakcích byly využity především *endo*- β -*N*-acetylglukosaminidasy z *Flavobacterium meningosepticum*, z *Mucor hiemalis* a z *Arthrobacter protophormiae*, *endo*- α -*N*-acetylgalaktosaminidasa z *Diplococcus pneumoniae* a také některé *endo*-glykoceramidasy [6].

K syntetickým účelům se ale častěji využívají univerzálnější *exo*-glykosidasy, mezi něž patří i enzym studovaný v rámci této práce. Ty přenášejí výlučně terminální monosacharidovou jednotku z neredukujícího konce oligosacharidového substrátu. Stejně jako *endo*-glykosidasy je lze využít při transglykosylaci i reverzní hydrolýze [6]. *Exo*-glykosidasam jsou věnovány následující kapitoly této práce.

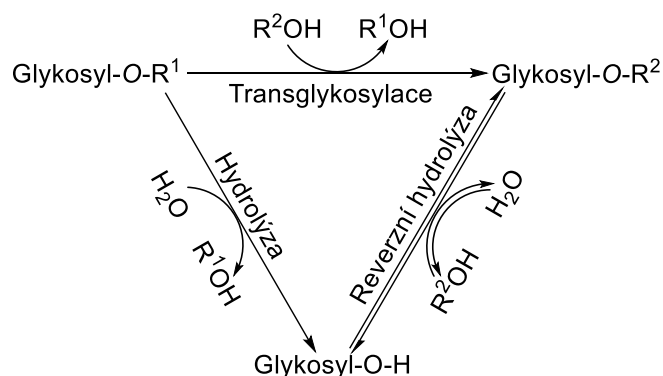
2.1.2 Glykosylace pomocí glykosidas

Za vhodně nastavených podmínek jsou glykosidasy schopny tvořit glykosidovou vazbu – pokud se akceptorový hydroxyl v molekule akceptoru chová jako efektivnější nukleofil než voda. Je třeba zdůraznit, že ne všechny glykosidasy jsou schopny provádět syntetické reakce. Tato schopnost např. zcela chybí glykosidasam z bakteriálních zdrojů. Syntéza glykosidické vazby pomocí glykosidas probíhá dvěma možnými mechanismy, tzv. reverzní hydrolýzou nebo transglykosylací. To, jakým způsobem proběhne syntéza, závisí na reakčním uspořádání, na struktuře substrátu a na použitém reakčním médiu. Nejčastěji využívané strategie zahrnují redukci aktivity vody v reakčním médiu a použití vhodných odstupujících skupin k aktivaci donorů glykosylu [5;6].

Reverzní hydrolýza je v podstatě kondenzační reakce. Je to termodynamicky kontrolovaný rovnovážný proces, kdy volný monosacharid je spojen s vhodným nukleofilem (nejčastěji alkoholem nebo jiným sacharidem) za uvolnění

molekuly vody. Aby syntéza probíhala, musí být rovnováha reakce posunuta tak, že je upřednostněn proces hydrolýzy před vznikem glykosidů. Toho lze dosáhnout několika způsoby: snížením aktivity vody vysokou koncentrací reaktantu v reakční směsi, přidáním solí či odstraněním produktu z reakční směsi. Reverzní hydrolýza se obvykle využívá ke glykosylaci alkoholů [6].

Transglykosylace je kineticky kontrolovaná reakce, kdy glykosidasa katalyzuje přenos glykosylu z aktivovaného glykosidu na akceptor, přičemž se zachovává anomerní konfigurace [1]. Transglykosylaci provádějí pouze glykosidasy s tzv. retenujícím reakčním mechanismem (viz. 2.1.3). Jako donor glykosylu se používají např. fenyglykosidy, akceptorem může být v podstatě jakákoliv cukerná nebo necukerná sloučenina, která na sobě nese hydroxyl [3]. Pro transglykosylaci je důležitý správný výběr tzv. odstupující skupiny donoru glykosylu (např. nitrofenyl) i zmíněná redukce aktivity vody [6]. Důležitou roli hraje při této syntéze i čas, jelikož příliš dlouhé trvání reakce může snižovat výtěžek vzniklého produktu, který je zároveň substrátem glykosidasy [3].



Obrázek 1 - Reakce katalyzované glykosidasami (převzato z [6], upraveno v programu ChemDraw)

2.1.3 Katalytický mechanismus glykosidas

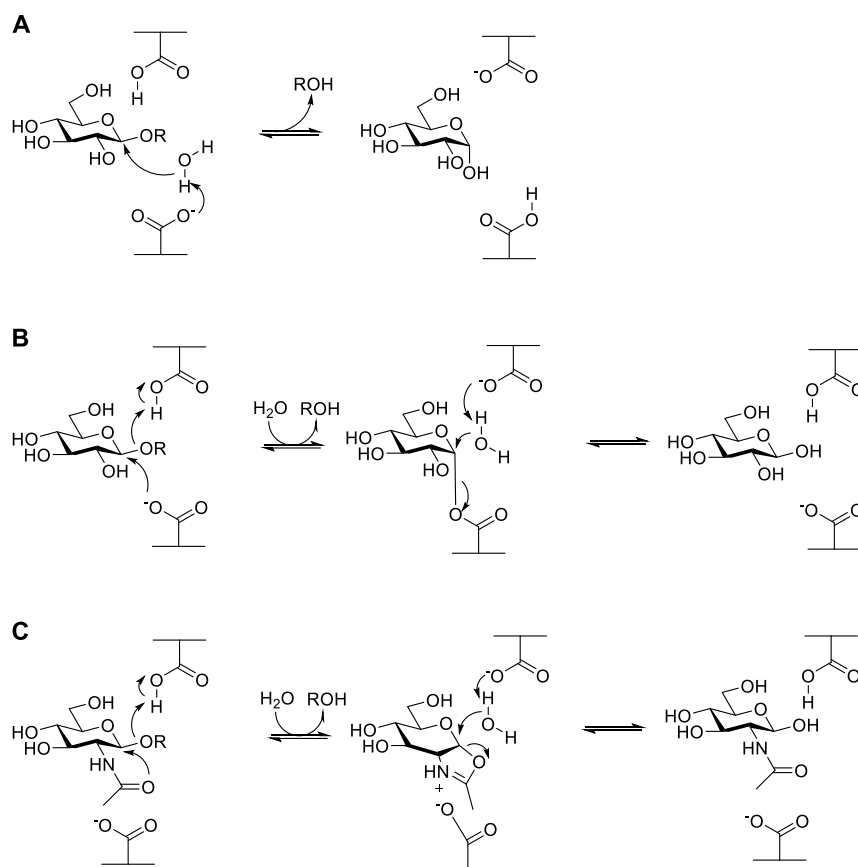
Glykosidasy využívají tři katalytické mechanismy. Řadí se mezi retenující ($\alpha \rightarrow \alpha$, či $\beta \rightarrow \beta$) nebo invertující ($\alpha \rightarrow \beta$, či $\beta \rightarrow \alpha$) enzymy. U β -N-acetylhexosaminidas (2-acetamido-2-deoxy- β -D-hexopyranosid-acetamidodeoxyhexohydrolas), skupiny

retenujících glykosidas, probíhá katalýza zvláštním mechanismem se zapojením molekuly substrátu [6].

Zachování či změna anomerní konfigurace na cukerném donoru jsou tedy dva možné výsledky katalytického mechanismu glykosidas [10]. Inverze na anomerní pozici probíhá jedнокrokovým mechanismem, při kterém dochází k protonaci glykosidového kyslíku aminokyselinovým zbytkem, který zastává funkci obecné kyseliny. Současně dochází k odštěpení odstupující skupiny, což je doprovázeno nukleofilním napadením molekulou vody, která byla deprotonována katalytickou bází enzymu (Obr. 2A) [11].

Retenující mechanismus glykosidas je dvoukrokový a zahrnuje vznik kovalentního meziprojektu. Během prvního kroku dochází k protonaci glykosidového kyslíku pomocí aminokyselinového zbytku zastávajícího funkci katalytické kyseliny, což napomáhá odštěpení odstupující skupiny. Souběžně dochází k napadení uhlíku na C-1 katalytickým nukleofilem, což vede ke vzniku kovalentního meziprojektu mezi glykosylem a enzymem. Následně aminokyselinový zbytek s funkcí katalytické báze deprotonuje nukleofilní molekulu vody (Obr. 2B) [11].

U β -N-acetylhexosaminidas se uplatňuje katalytický mechanismus s asistencí substrátu (*Substrate-Assisted Catalysis*, SAC), druh retenčního mechanismu. Přítomnost acetamidové nebo jiné vhodné skupiny v molekule substrátu, přijatelné z mechanické, strukturní i stereochemické stránky, je nutnou podmínkou pro úspěšný průběh katalýzy [12]. Za asistence 2-acetamidové skupiny substrátu vzniká oxazolinový meziprojekt (Obr. 2C) [6].



Obrázek 2 – Invertující (A), retenující (B) a SAC (C) mechanismus (převzato z [6], upraveno v programu ChemDraw)

2.2 β -N-Acetylhexosaminidasy

První publikace s detailní charakteristikou těchto enzymů vyšly začátkem 70. let 20. století, kdy Yamamoto zkoumal β -N-acetylhexosaminidasu izolovanou ze surového komerčního přípravku Takadiastase® [13]. β -N-Acetylhexosaminidasy patří mezi glykosidhydrolasy. Na základě jejich chování je řadíme mezi *exo*-glykosidasy. Katalyzují štěpení terminálních N-acetyl- β -D-glukosaminových a N-acetyl- β -D-galaktosaminových jednotek v N-acetyl- β -D-hexosaminových strukturách [9].

β -N-Acetylhexosaminidasy jsou schopny štěpit substráty jak v gluko-konfiguraci, tak i v galakto-konfiguraci. Obě tyto aktivity se vždy vyskytují společně a nelze je rozdělit. Je to také typická vlastnost pro tuto skupinu enzymů. Přirozeně β -N-acetylhexosaminidasy preferují většinou substráty v gluko-konfiguraci,

příčemž GlcNAcasová (β -*N*-acetylglukosaminidasová) aktivita je vyšší než GalNAcasová (β -*N*-acetylgalaktosaminidasová) aktivita. Poměr těchto aktivit závisí na původu β -*N*-acetylhexosaminidas, reakčním médiu a kultivačních podmínkách [9].

Poměr obou aktivit (GlcNAcasa/GalNAcasa) se obvykle pohybuje mezi hodnotami 1,5-4,0. Výjimkou je např. β -*N*-acetylhexosaminidasa z *Xenopus laevis*, u které je GlcNAcasová aktivita 167krát vyšší než GalNAcasová aktivita; některé další glykosidasy, např. z *Aspergillus versicolor*, mají též silně potlačenou GalNAcasovou aktivitu ve prospěch GlcNAcasy [11]. Naopak β -*N*-acetylhexosaminidasy z *P. oxalicum* vykazují vyšší GalNAcasovou aktivitu [9].

2.2.1 Struktura β -*N*-acetylhexosaminidas

β -*N*-Acetylhexosaminidasy jsou v databázi CAZy řazeny do tří rodin glykosidhydrolas (GH 3, GH 20 a GH 84). Tyto tři rodiny obsahují funkčně velmi podobné enzymy, přestože jejich sekvence stejné nejsou. Společné mají základní vlastnosti a katalytické mechanismy. Nejpočetnější skupina je rodina GH 20, která je také nejvíce studována [9].

β -*N*-Acetylhexosaminidasy patřící do rodiny GH 3, které zahrnují β -*N*-acetylhexosaminidasy a β -glukosidasy, jsou malá skupina bakteriálních enzymů. Prozatím byla popsána pouze část krystalových struktur těchto enzymů, např. u bakterie *Vibrio cholerae* v rámci genu *nagZ* kvůli její rezistenci na některá β -laktamová antibiotika. Tato β -*N*-acetylhexosaminidasa zaujímá uspořádání TIM barelu, kde vlákna α/β -domény tvoří několik smyček na C-terminálním konci, který ohraničuje aktivní centrum. Toto uspořádání se skládá z osmi paralelních β -listů oklopených osmi α -šroubovicemi [9]. β -*N*-Acetylhexosaminidasy rodiny GH 3 mají oproti β -*N*-acetylhexosaminidasám z rodin GH 20 a GH 84 větší vazebnou kapsu v oblasti *N*-acetamidové skupiny substrátu. Tento prostor navíc je obsazen molekulou vody. Taková struktura aktivního centra zabraňuje navázání

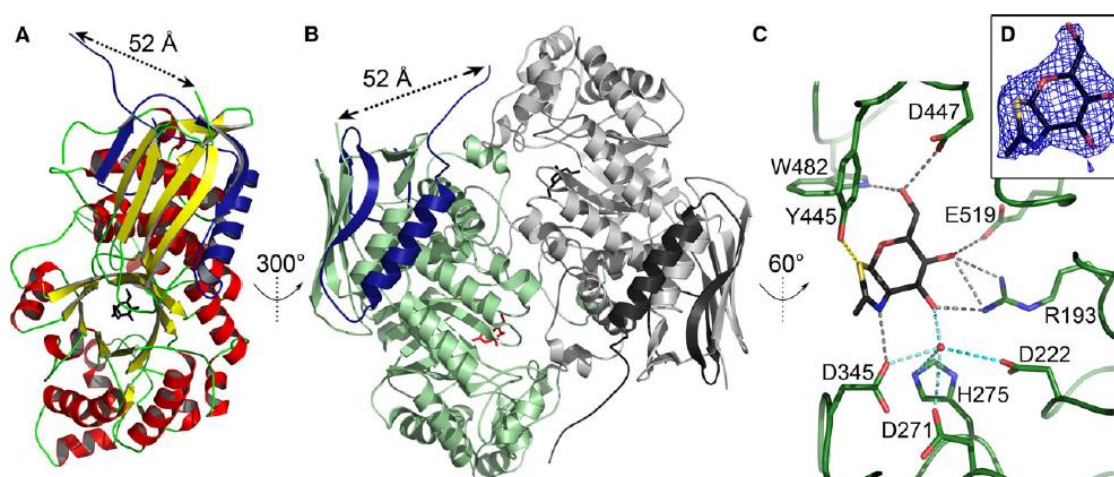
2-acetamidové skupiny substrátu na C-1 a vzniku oxazolinového meziprojektu katalytického mechanismu SAC, a tak tyto enzymy využívají klasický mechanismus retenujících glykosidas (viz. 2.1.3) [9].

β -N-Acetylhexosaminidasy z rodiny GH 20 jsou největší skupinou glykosidas štěpících zbytky GlcNAc a GalNAc. Z lidských enzymů jsou popsány β -N-acetylhexosaminidasy z lidské placenty: lysozomální β -N-acetylhexosaminidasa A (HexA) a β -N-acetylhexosaminidasa B (HexB) [9].

Obecně mají β -N-acetylhexosaminidasy rodiny GH 20 stejnou základní strukturu jako ty z rodiny GH 3, a to uspořádání TIM barelu. Aktivní centrum je umístěno mezi smyčkami vedoucími od TIM barelu. Bakteriální enzymy se od těch lidských liší ve dvou hlavních rysech. Bakteriální enzymy jsou monomerní, kdežto lidské tvoří aktivní dimery se dvěma katalytickými místy. Dále pak u lidských enzymů jsou posttranslačně štěpeny α - a β -podjednotky, kdy výsledkem jsou dva a tři polypeptidové řetězce [9].

Velkou pozornost přitahují též houbové β -N-acetylhexosaminidasy (GH 20) a jejich trojrozměrná struktura díky jejich syntetickému potenciálu. První vyřešená krystalová struktura z této skupiny enzymů byla struktura β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (AoHex), publikovaná v PDB databázi krystalových struktur (*Protein Data Bank*) pod identifikačním číslem 5OAR (Obr. 3) [14]. Aktivní secernovaná forma houbové β -N-acetylhexosaminidasy se skládá ze dvou katalytických podjednotek, z nichž na každou je nekovalentně navázaný propeptid (viz. 2.3.2), který se štěpí za katalýzy specifickou peptidasou. Nekovalentní reasociace propeptidu s katalytickou podjednotkou je nezbytná pro aktivitu tohoto enzymu. Houby jsou schopné aktivně regulovat koncentraci zpracovaného propeptidu v endoplasmatickém retikulu, a tím pádem i specifickou aktivitu produkované hexosaminidasy [9].

β -*N*-Acetylglukosaminidasy z rodiny GH 84 jsou studovány především pro lidskou β -*N*-acetylhexosaminidasu označovanou jako *O*-GlcNAcase, která má velký význam v mechanismu (de)glykosylace glykoproteinů v lidském organismu, a v důsledku toho je zásadní pro studium onemocnění jako např. Alzheimerovy choroby [1]. Z této rodiny byly strukturně popsány další dva bakteriální enzymy. Jsou to β -*N*-acetylglukosaminidasa z patogenu *Clostridium perfringens* a β -*N*-acetylglukosaminidasa z lidského střevního symbiontu *Bacteroides thetaiotaomicron* [9].



Obrázek 3 – Krystalová struktura AoHex. A – Celková struktura AoHex; B – struktura dimeru AoHex, monomer A (zeleně) s propeptidem (modře) a monomer B (šedě) s propeptidem (černě), thiozolin odvozený od *N*-acetylglukosaminu (červeně, černě); C – vazba thiazolinu do aktivního místa AoHex; D – mapa vodíkových vazeb thiazolinu s aminokyselinovými zbytky v aktivním centru AoHex [14].

2.2.2 Fyziologická a funkční role β -*N*-acetylhexosaminidas

β -*N*-Acetylhexosaminidasy se vyskytují ve většině živých organismů, v prokaryotech i eukaryotech. Tyto enzymy mají širokou škálu funkcí. Záleží na organismu, ve kterém se nacházejí, a také na tom, kde přesně jsou lokalizovány [15].

β -*N*-Acetylhexosaminidasy z vláknitých hub jsou extracelulárně produkované inducibilní enzymy známé pro svou fyziologickou roli v chitinolytickém systému v buňkách rostoucích hub. Tzv. tandemové binární systémy se skládají z chitinas

a β -*N*-acetylhexosaminidas a zodpovídají za kontrolu lýzy chitinové buněčné stěny. Současně regulují rekonstrukci buněk a zabraňují jejich poničení [9].

Byla popsána úloha β -*N*-acetylhexosaminidas při rozpadu buněčné stěny během autolýzy stárnoucích houbových kultur u fermentačního procesu. Kromě toho β -*N*-acetylhexosaminidas v houbách usnadňují uvolnění živin během saprofytické a mykoparazitické fáze růstu a jsou také zapojeny do patogeneze hmyzu [9].

Funkce β -*N*-acetylhexosaminidas v rostlinách není zatím do detailu objasněna, přestože jich již několik bylo izolováno a charakterizováno [9].

V rámci zvířecí říše bylo identifikováno již mnoho fyziologických funkcí β -*N*-acetylhexosaminidas. Jsou přítomny například na povrchu spermií savců, nižších obratlovců a bezobratlých. Díky nim dochází k interakci gamet během oplození oocyty. Spermiální β -*N*-acetylhexosaminidas jsou plasmatické membránové glykoproteiny a jsou svou enzymovou aktivitou zapojeny do procesu penetrace do zony pellucidy. Vzhledem k tomu, že se tyto enzymy částečně chovají jako lektinové receptory, účastní se také primárního připojení spermií k extracelulárnímu obalu vajíčka [9].

Fyziologický účinek β -*N*-acetylhexosaminidas v organismu je nejvíce studován u savců, především u člověka. Nedostatečné množství těchto enzymů může vést k různým chorobám. V buňkách savců se vyskytují tři druhy β -*N*-acetylhexosaminidas: lysozomální HexA a HexB, nukleocytoplasmatická *O*-GlcNAcasa a nukleoplasmatická β -*N*-acetylhexosaminidasa D (HexD). Enzym HexD upřednostňuje *N*-acetylgalaktosaminidy jako substráty a patří do rodiny GH 20. Jeho biologický význam není zatím známý [9].

O-GlcNAcasa je β -*N*-acetylhexosaminidasa patřící do rodiny GH 84 se specifitou pouze pro *N*-acetylglukosaminové (GlcNAc) jednotky. Exprese tohoto enzymu probíhá ve všech typech buněk savců a je lokalizovaná převážně v cytoplasmě. Její

hlavní rolí je reverze činnosti glykosylačního enzymu *N*-acetylglukosaminyltransferasy, a tím udržování glykosylační rovnováhy v organismu. Ve vyšších eukaryotech jsou plasmatické a jaderné proteiny modifikovány jednotkou *O*-GlcNAc připojenou k aminokyselinovým zbytkům serinu či threoninu [9].

Lysozomální β -*N*-acetylhexosaminidasy jsou dimerní enzymy patřící do rodiny GH 20, skládající se ze dvou podjednotek (α , β). Tyto dvě podjednotky jsou kódovány geny *hexA* a *hexB* a jsou syntetizovány jako prekurzorové proteiny. Existují tři izoformy: HexA ($\alpha\beta$), HexB ($\beta\beta$) a HexD ($\alpha\alpha$). Všechny tři izoenzymy jsou schopné štěpit β -vázané GalNAc a GlcNAc jednotky ze substrátů jako jsou oligosacharidové struktury proteinů, neutrální glykolipidy a mukopolysacharidy [9].

α -Podjednotka izoformy HexA je schopná štěpit gangliosid, který nese negativně nabitou sialovou kyselinu. HexA je také schopna odštěpovat jednotky 6-sulfo-GlcNAc z keratansulfátu a dalších sulfatovaných glykokonjugátů [9].

2.2.3 Rekombinantní exprese

Výhodným přístupem k rekombinantní expresi β -*N*-acetylhexosaminidas z vyšších organismů, např. hub a plísní, je využití expresního systému kvasinek, např. *P. pastoris* nebo *Saccharomyces cerevisiae*. Důvodem je, že tyto dimerní enzymy jsou v nativní formě glykosylovány, což exprese v bakteriálních expresních systémech neumožňuje [16;17]. Příkladem je rekombinantní exprese β -*N*-acetylhexosaminidas z *Talaromyces flavus* v *P. pastoris*. Gen tohoto enzymu byl zaklonován do expresního vektoru pPICZ α A za použití restričních míst *EcoRI* a *KpnI*. Vektor byl transformován do kompetentních buněk *P. pastoris* metodou elektroporace bez původní signální sekvence houbového enzymu, protože byl pro extracelulární expresi využit kvasinkový signální α -faktor. Exprese vloženého inzertu byla indukována methanolem [16]. Methanol je pro methylotrofní kvasinky

(*P. pastoris*, *Hansenula polymorpha*) zdrojem uhlíku, který získávají během oxidačního procesu. Oxidační proces je součástí katalytické reakce, při které z methanolu vzniká formaldehyd [18].

2.2.4 Syntetické aplikace β -*N*-acetylhexosaminidas

β -*N*-Acetylhexosaminidasy mají výhodu v široké substrátové specifitě, robustnosti, snadné dostupnosti a také v levných substrátech. K syntetickým aplikacím se využívají především β -*N*-acetylhexosaminidasy z rodiny GH 20, které mají transglykosylační schopnosti, na rozdíl např. od bakteriálních enzymů. Pro své příznivé katalytické vlastnosti jsou houbové extracelulární enzymy hlavními katalyzátory potenciálně využitelnými pro enzymovou syntézu v biotechnologiích. Využívání β -*N*-acetylhexosaminidas z jiných zdrojů než z plísní je spíše vzácné [9].

Syntetický potenciál a regioselektivita β -*N*-acetylhexosaminidas byly intenzivně zkoumány v 90. letech 20. století za použití velkého množství akceptorů, jako jsou chitooligosacharidy, ergotové alkaloidy, α - a β -methyl glykosidy, primární alkoholy, vitamíny a cukerné nukleotidy. Výtěžek těchto transglykosylačních reakcí se pohyboval mezi 5-30 % [9].

Široká substrátová specifita a transglykosylační potenciál houbových β -*N*-acetylhexosaminidas byly demonstrovány na použití substrátů modifikovaných na *N*-acylamidové skupině. Ačkoliv je *N*-acetamidová skupina považována vzhledem ke specifickému katalytickému mechanismu SAC (viz. 2.1.3) za nezbytnou v reakcích těchto enzymů, určité změny na C-2 jsou tolerovány. Substituenty o vysoké elektronegativitě nebo s nábojem vedou však k destabilizaci oxazolinového meziprojektu, takže reakce neproběhne. Glykosylace se substráty *p*-nitrofenyl-2-deoxy-2-formamido- β -D-glukopyranosid, *p*-nitrofenyl-2-deoxy-2-glykoloylamido- β -D-glukopyranosid a *p*-nitrofenyl-2-deoxy-2-propionamido- β -D-glukopyranosid za katalýzy β -*N*-acetylhexosaminidasami

z vláknitých hub dala selektivně vznik modifikovaným disacharidům obsahující $\beta(1\rightarrow4)$ vazby v dobrém výtěžku [9].

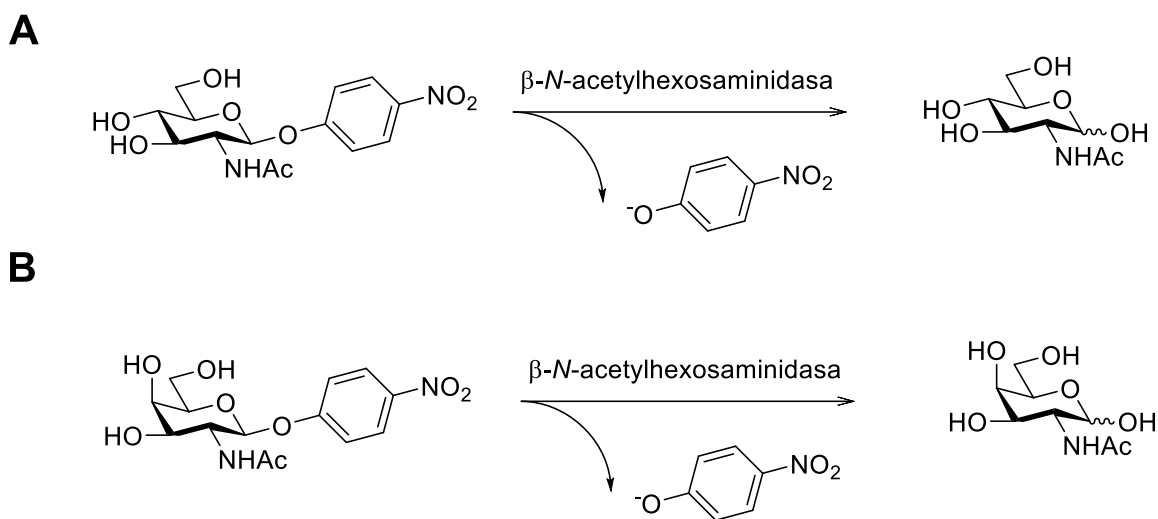
Substrátová flexibilita β -*N*-acetylhexosaminidas byla také demonstrována na hydrolýze a transglykosylaci 4-deoxycukrů. Tolerance k hydroxyly jak v ekvatoriální, tak v axiální pozici na C-4 substrátu je typickou vlastností těchto enzymů. Nicméně přítomnost tohoto hydroxyly není rozhodující pro aktivitu, jelikož fenyl-2-acetamido-2,4-dideoxy- β -D-*xylo*-hexopyranosid a příslušný aldehyd byly též hydrolyzovány houbovou β -*N*-acetylhexosaminidasou [9].

2.3 β -*N*-Acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum*

Houbová β -*N*-acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum* (*PoHex*) má unikátní katalytické vlastnosti navzdory jejímu blízkému evolučnímu vztahu k jiným houbovým hexosaminidasám. Má vysokou GalNAcasovou aktivitu, širokou substrátovou specifitu, např. vůči substrátům modifikovaným na acetamidové skupině, substrátům substituovaným na C-6 a dokonce 4-deoxy-substrátům (viz. 2.2.4). V neposlední řadě má tento enzym neobvyklou pH stabilitu a pH optimum [16].

2.3.1 Charakterizace β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*

PoHex z kmenů CCF 1959 a CCF 3438 vykazuje široké pH optimum mezi hodnotami 2-4, přičemž maximum je při pH 3 za použití substrátů *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosidu (*p*NP-GlcNAc) a *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosidu (*p*NP-GalNAc) (Obr. 4) [16].



Obrázek 4 – Štěpení pNP-GlcNAc (A) a pNP-GalNAc (B) za katalýzy PoHex (vytvořeno v programu ChemDraw)

PoHex je stabilnější spíše v neutrálním než v kyselém pH. Aktivita tohoto enzymu se lineárně zvyšuje v rozmezí 15-50 °C, při vyšších teplotách se aktivita rapidně snižuje. Aktivitu PoHex ovlivňují soli. Přítomnost solí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a MgSO_4 snižuje GlcNAcasovou aktivitu a mírně zvyšuje GalNAcasovou aktivitu [16].

Byla také studována kinetika PoHex. Závislost rychlosti reakce na koncentraci pNP-GalNAc jako substrátu je klasická hyperbola dle Michaelise a Mentenové, zatímco při použití pNP-GlcNAc dochází k inhibici reakce přebytkem substrátu. Michaelisova konstanta K_m u reakce PoHex z kmenu CCF 1959 se substrátem pNP-GlcNAc je 0,14 mM, což je sedmkrát nižší než při reakci se substrátem pNP-GalNAc, kde je hodnota konstanty K_m rovna 1,01 mM. Katalytická účinnost enzymu v reakci se substrátem pNP-GlcNAc je tedy $721 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ a se substrátem pNP-GalNAc $224 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. Při vyšších koncentracích hydrolytického produktu GlcNAc v reakční směsi dochází k inhibici hydrolytické reakce. GlcNAc je silnější inhibitor než GalNAc, přičemž GlcNAc inhibuje nekompetitivně a GalNAc kompetitivně [16].

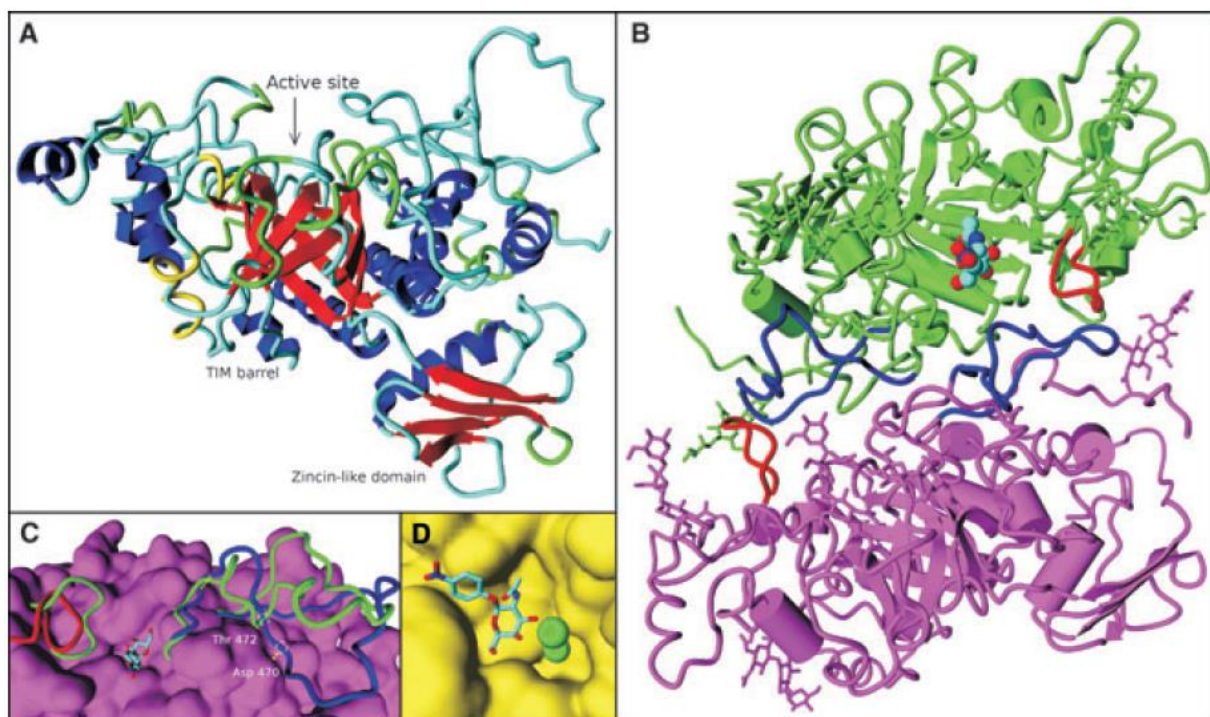
2.3.2 Produkce β -*N*-acetylhexosaminidasy v houbovém producentu a purifikace

Sekrece β -*N*-acetylhexosaminidasy nativním houbovým producentem do média je obvykle dvoufázový proces. Pro *P. oxalicum* CCF 1959 byla nejvyšší dosažená úroveň specifické aktivity po 12 dnech kultivace. Purifikace *PoHex* do vysoké čistoty lze dosáhnout kombinací hydrofobní, aniontové a gelové chromatografie. Takto purifikovaný enzym nevykazuje žádné aktivity jiných kontaminujících glykosidas a jeví se jako homogenní na elektroforéze v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE elektroforéza). Specifická aktivita enzymu po purifikaci byla 10,8 U/mg⁻¹ [16].

Katalytická podjednotka má hmotnost 65 kDa a propeptid má hmotnost 15 kDa. Celková molekulová hmotnost tetrameru *PoHex* se dvěma katalytickými podjednotkami a dvěma propeptidy je 160 kDa [16].

2.3.3 Molekulární model

Vysoká homologie primární sekvence *PoHex* s enzymy z bakterie *Serratia marcescens*, *Streptomyces plicatus* a s lidskými enzymy, od nichž je známa krystalová struktura, umožnila sestavení homologního trojrozměrného molekulárního modelu *PoHex* (Obr. 5) [16].



Obrázek 5 – Molekulární model PoHex. A – Obecný molekulární model PoHex; B – dimerní struktura enzymu s navázaným substrátem pNP-GlcNAc na jednom monomeru, dlouhá smyčka specifická pro houbové PoHex **modře**, kratší typická smyčka Pro301-Pro310 **červeně**; C – porovnání PoHex a β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* se substrátem pNP-GlcNAc v aktivním centru, smyčka Pro301-Pro310 **červeně**, dlouhá smyčka **modře** na pozadí jednoho monomeru PoHex **fialově**, smyčky enzymu z *A. oryzae* **zeleně**; D – povrch aktivního centra s navázaným substrátem pNP-GalNAc po 5 ns molekulární dynamiky s chloridovým iontem [16].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je rekombinantní exprese β -*N*-acetylhexosaminidasy z *P. oxalicum* v kvasince *P. pastoris* a produkce tohoto enzymu ideálně ve větším množství a čistotě oproti β -*N*-acetylhexosaminidase produkované houbovým producentem.

U rekombinantního enzymu budou stanoveny tyto biochemické parametry: výtěžek a čistota enzymu po purifikaci, pH optimum, pH stabilita, teplotní optimum a kinetické vlastnosti enzymu.

Na závěr práce budou provedeny transglykosylační reakce enzymu s vybranými látkami a bude sledován vznik produktů glykosylace. Bude provedena jedna vybraná transglykosylační reakce v preparativním měřítku a produkt bude izolován.

4 METODIKA

V této kapitole budu popisovat jednotlivé postupy a metody, které jsem v praktické části využila. Použité metody nejsou v této podobě přesně publikovány, jelikož se průběžně mění a inovují na základě předchozích zkušeností pracovníků laboratoře a upravují se pro každou konkrétní aplikaci.

4.1 Použité materiály a přístroje

4.1.1 Materiály

- Acetonitril (VWR chemicals, Česká republika)
- Agar (Sigma-Aldrich, USA)
- Agarosa (NZYTech, Portugalsko)
- Akrylamid (VWR chemicals, Česká republika)
- Amoniak (Lach-Ner, Česká republika)
- Biotin (Sigma-Aldrich, USA)
- Bradfordovo činidlo, ředěno 1:4 s destilovanou vodou – *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA)
- Bromfenolová modř (SERVA, USA)
- Buňky *Escherichia coli* Top10 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Coomassie Brilliant Blue (USB Corporation, USA)
- Cyklohexanol (Lachema, Česká republika)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Dithiotreitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Extrakt z kvasnic (Oxoid, Velká Británie)
- Enzym β -*N*-acetylhexosaminidasa z *Talaromyces flavus* (TfHex), (produkce v laboratoři)
- D-Galaktosa (Sigma-Aldrich, USA)
- GalNAc (GLYCON Biochemicals GmbH, Německo)
- Gel-Red (Biotium, USA)

- GlcNAc (Acros Organics, USA)
- D-Glukosa (Lach-Ner, Česká republika)
- Glycerol (VWR chemicals, Česká republika)
- Glycin (Lach-Ner, Česká republika)
- *High Pure Plasmid Isolation Midi Kit* (Roche, Švýcarsko)
- Hydrogenfosforečnan sodný (VWR Chemicals, Česká republika)
- Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Isopropanol (2-propanol), (Sigma-Aldrich, USA)
- Kompetentní buňky *Pichia pastoris* KM71H (Invitrogen, USA)
- Koniferylalkohol (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina boritá (Lachema, Česká republika)
- Kyselina citronová (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina fenylactová (Lachema, Česká republika)
- Kyselina fosforečná (Lachema, Česká republika)
- Kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyvety Amicon® Ultra (Merck Millipore, USA)
- *6× DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Methanol (ISOLAB, Německo)
- *N,N'*-Methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Molekulový marker: Amersham LMW (*Low Molecular Weight marker*)
Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, Velká Británie)
- Pepton (Oxoid, Velká Británie)
- *p*NP-GalNAc (Gold Biotechnology, USA)
- *p*NP-GlcNAc (Gold Biotechnology, USA)
- Rekombinantní enzym *PoHex* (produkce v laboratoři)
- Restrikční endonukleasa NEBuffer 1.1 (New England Biolabs, Velká Británie)

- Restriční endonukleasa ze *Streptomyces achromogenes* (*SacI*), (New England Biolabs, Velká Británie)
- *SacI* kit (BioLabs, NEB, USA)
- Sada JetQuick (GenoMed, USA)
- SDS (SERVA, USA)
- Sorbitol (Lach-Ner, Česká republika)
- Syntetický plasmid pPICZ α A se zaklonovaným genem *PoHex*, restriční místa *EcoRI* a *KpnI* (Generay, Čína)
- Tekutý dusík (Maneko, Česká republika)
- Tris (Sigma-Aldrich, USA)
- Trypton (Oxoid, Velká Británie)
- Uhličitan sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- YNB (*Yeast Nitrogen Base*), (Carl Roth, Německo)
- Zeocin (InvivoGen, USA)

4.1.2 Média a roztoky

- Agarosový gel 1%: 1 g agarosa; 2 ml 50 \times TAE pufr (Tris-acetát-EDTA); 98 ml H₂O
- Akrylamidový mix 30%: 29% akrylamid; 1% *N,N'*-methylenbisakrylamid
- Barvicí roztok: 0,25 g Coomassie Brilliant Blue; 45 ml methanol; 45 ml H₂O; 10 ml 99% CH₃COOH
- Britton-Robinsonův pufr: 40mM kyselina fosforečná; 40mM kyselina fenyloctová; 40mM kyselina boritá; 200mM hydroxid sodný; pH 2-12
- Citrát-fosfát 50mM (pH 5): 50mM kyselina citronová; 100mM Na₂HPO₄
- Draselnofosfátový pufr 1M (pH 6): 1M K₂HPO₄; 1M KH₂PO₄
- Elektrodový pufr pro elektroforézu v agarosovém gelu: 20 ml 50 \times TAE pufr; 980 ml H₂O
- Elektrodový pufr pro SDS-PAGE: 3 g/l Tris; 18,8 g/l glycin; 1 g/l SDS

- Gel na SDS-PAGE - 10% polyakrylamidový gel: 10% separační gel (4,0 ml H₂O; 3,3 ml 30% akrylamid; 2,5 ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8; 100 µl 10% SDS; 100 µl 10% (NH₄)₂S₂O₈; 5 µl TEMED) a 5% zaostřovací gel (3,4 ml H₂O; 830 µl 30% akrylamid; 630 µl 1,0M Tris-HCl pH 6,8; 50 µl 10% SDS; 50 µl 10% (NH₄)₂S₂O₈; 5 µl TEMED)
- Kyselina sírová (5%) v ethanolu
- Luria-Bertani (LB) agar: 10 g/l trypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l extrakt z kvasnic; 15 g/l agar
- LB médium: 10 g/l trypton; 10 g/l NaCl; 5 g/l extrakt z kvasnic
- McIlvaine pufr: 0,1M kyselina citronová; 0,2M Na₂HPO₄; pH 5,0
- Minimální glycerolové médium: 700 ml H₂O; 100 ml 10% glycerol; 100 ml 1M draselnofosfátový pufr pH 6; 100 ml YNB (134 g/l); 2 ml 0,02% biotin
- Minimální methanolové médium: 140 ml H₂O; 20 ml 1M draselnofosfátový pufr pH 6; 20 ml YNB (134 g/l); 20 ml 5% methanol; 400 µl 0,02% biotin
- Mobilní fáze na TLC: 175 ml isopropanol; 50 ml H₂O; 25 ml amoniak
- Odbarvovací roztok: 350 ml ethanol; 100 ml CH₃COOH; 550 ml H₂O
- Plné glycerolové médium: 70 ml H₂O; 10 ml 10% glycerol; 10 ml 1M draselnofosfátový pufr pH 6; 10 ml YNB (134 g/l); 0,2 ml 0,02% biotin
- Plné methanolové médium: 20 ml YP médium; 3 ml 1M draselnofosfátový pufr pH 6; 3 ml YNB (134 g/l); 3 ml 5% methanol; 60 µl 0,02% biotin
- Pufr A: 10mM kyselina citronová; 20mM Na₂HPO₄ (pH 3,5)
- Pufr B: 10mM kyselina citronová; 20mM Na₂HPO₄; 1M NaCl (pH 3,5)
- TAE pufr – 50×TAE: 242 g/l Tris; 57,1 ml/l CH₃COOH; 14,6 g/l EDTA
- Uchovávací roztok pro gely SDS: 10 ml CH₃COOH; 990 ml H₂O
- Vzorkový pufr (5 ml): 0,151 g Tris; 0,3855 g dithiotreitol; 0,5 g SDS; 0,025 g bromfenolová modř; 1,25 ml glycerol
- YP médium (*Yeast extract peptone*): 10 g/l extrakt z kvasnic; 20 g/l pepton
- YPD médium (*Yeast extract peptone dextrose*): 10 g/l extrakt z kvasnic; 20 g/l pepton; 100 ml/l 20% D-glukosa

4.1.3 Přístroje

- ÄKTA Prime Plus (Amersham Biosciences, Velká Británie)
- Aparatura pro elektroforézu v agarosovém gelu: Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad, USA)
- Aparatura pro SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)
- Centrifugy: Centrifuge MiniSpin® (Eppendorf, USA), Centrifuge 5804 R (Eppendorf, USA), Sorvall™ RC 6 Plus Centrifuge (Thermo Scientific™, USA)
- Elektroporátor: MicroPulser™ (Bio-Rad, USA)
- Kolona Biogel P2 pro gelovou permeační chromatografii sacharidů (Amersham Biosciences, Velká Británie)
- Kolona Fractogel EMD SO₃⁻ pro iontově výměnnou chromatografii proteinů (Merck, Německo)
- Laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie)
- Lyofilizátor: Lyovac GT2 (Leybold, Německo)
- Magnetická míchačka: Jenway 1000 Hotplate & Stirrer (Jenway, USA)
- Mikroskop s fotoaparátem: Olympus Microscope CX41 (Olympus Corporation, Japonsko)
- pH-metr: pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Česká republika)
- Spektrofotometr Sunrise Tecan (Tecan, Švýcarsko)
- Spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Japonsko)
- SuperFrac (Pharmacia Biotech, USA)
- Termomixer (Thermomixer comfort; Eppendorf USA)
- Třepačka IKA KS 4000 ic control (Schoeller, Česká republika)
- UV lampy: UV 240 (A. Krüss Optronik, Německo); lampa (UVitec, Velká Británie)
- Váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)
- Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)

4.2 Produkce plasmidu v *Escherichia coli*

Namnožení plasmidu s genem *Pohex* pro následnou elektroporaci do kvasinky *P. pastoris* a expresi enzymu proběhlo v bakterii *E. coli*. V této kapitole budu popisovat produkci plasmidu v *E. coli*; expresi v *P. pastoris* se budu věnovat v kapitole 4.4.

4.2.1 Transformace do *Escherichia coli*

První den jsme připravili Petriho misky s LB agarem, do kterých jsme sterilně přidali antibiotikum zeocin (100 µg/ml). Po ztuhnutí jsme misky uložili do lednice.

Druhý den jsme provedli transformaci plasmidu do buněk *E. coli*. Nejprve jsme lyofilizát plasmidu pICZαA-*Pohex* (4 µg) rozpustili ve sterilní vodě (10 µl). Kryokonzervované kompetentní buňky *E. coli* (100 µl) jsme nechali rozmrazit na ledu. V laminárním boxu jsme přidali 0,5 µl plasmidu k suspenzi kompetentních buněk, směs jsme lehce promíchali a nechali inkubovat na ledu po dobu 20 min. Následně jsme provedli teplotní šok (buňky přijmou plasmid), kdy jsme inkubovali suspenzi v předehřátém termomixeru při 42 °C na dobu 1 min a 15 s. Poté jsme v laminárním boxu přidali k roztoku 1 ml LB média a 1 hod jsme roztok nechali inkubovat při 37 °C a 350 otáček/min (regenerace buněk).

Po inkubaci jsme roztok stočili při 12 °C a 13 500 otáčkách/min po dobu 10 min. V laminárním boxu jsme ze stočené buněčné suspenze odebrali 800 µl supernatantu (odpad), zbytek suspenze jsme opatrně promíchali pipetou a zaočkovali 150 µl, 50 µl a 25 µl na jednotlivé misky s LB agarem. Misky jsme nechali přes noc inkubovat při 37 °C.

4.2.2 Izolace plasmidu

Následující den jsme z misek vybrali dvě samostatné narostlé kolonie a v laminárním boxu jsme je sterilně přenesli do dvou předem připravených baněk

s LB médiem s obsahem 100 µg/ml zeocinu. Inkubace probíhala přes noc při 37 °C a 250 otáčkách/min.

K izolaci plasmidu jsme použili komerční sady. Narostlé buňky *E. coli* v médiu jsme stočili po dobu 18 min při 9 °C a 5 000 otáčkách/min. Ke stočeným buňkám jsme přidali 8 ml suspenzačního pufru (*Suspension Buffer*) a buňky jsme resuspendovali. Následně jsme přidali 8 ml lyzačního pufru (*Lysis Buffer*) a jemně promíchali. Pak jsme roztok nechali inkubovat 2 min při laboratorní teplotě (rozbití buněk a vylití jejich obsahu do roztoku). Následně jsme přidali 8 ml neutralizačního pufru (*Neutralization Buffer*), promíchali jsme lyzát a nechali inkubovat 5 min na ledu (vysrážení zbytků buněk).

V mezičase jsme ekvilibrovali purifikační kolonku ekvilibračním pufrem (*Equilibration Buffer*) a nanесли buněčný lyzát do kolonky přes filtrační papír. Pak jsme kolonku promyli 2×4 ml promývacího pufru (*Wash Buffer*). Poté jsme vyměnili odpadní nádobu za sterilní centrifugační zkumavku. Do kolony jsme přidali 2×2,5 ml elučního pufru (*Elution Buffer*) předehřátého na 50 °C (uvolnění plasmidu z kolony). K eluovanému roztoku plasmidu jsme přidali 3,6 ml isopropanolu, který vysráží plasmid. Roztok jsme nechali inkubovat do druhého dne při 4 °C.

Druhý den jsme roztok se sraženou peletkou plasmidu po malých objemech stočili vždy po dobu 30 min při 8 °C a 15 000 otáčkách/min. Supernatant jsme opatrně odpipetovali a peletku plasmidu jsme opláchli 1 ml sterilního 70% ethanolu. Poté jsme odpipetovali ethanol a nechali jsme plasmid sušit přes víkend při laboratorní teplotě.

Dalším krokem bylo stanovení koncentrace plasmidu pomocí spektrofotometru. K vysušené peletě jsme přidali 100 µl sterilní vody a nechali jsme ji rozpustit. Dále jsme si připravili roztok obsahující 498 µl NANO-vody a 2 µl rozpuštěného plasmidu. Koncentraci plasmidu jsme stanovili spektrofotometricky ve dvou

paralelních stanoveních jako absorbanci při dvou vlnových délkách: 260 nm a 280 nm. Po změření absorbací jsme z průměru dvou paralelních stanovení vypočetli čistotu plasmidu:

$$\text{Čistota plasmidu} = \frac{ABS_{260}}{ABS_{280}}$$

Dále jsme vypočítali koncentraci plasmidu pomocí rovnice, kde K je tabelovaný extinkční koeficient dvouřetězcové DNA s hodnotou 50 $\mu\text{g/ml}$:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{ředění} \cdot K \cdot ABS_{260}$$

Ideální hodnota čistoty je 1,5-2,0. Menší hodnota značí vyšší znečištění proteinem. Obvyklá koncentrace plasmidu je 500-3 000 $\mu\text{g/ml}$.

Posledním krokem této části byla příprava vzorku na sekvenaci komerční firmou SEQme s.r.o. Vzorek připravený na sekvenaci obsahoval 1 μl plasmidu (přibližně 500 ng), 4 μl sterilní NANO-vody a 5 μl 20 \times naředěného zásobního roztoku komerčního sekvenačního primeru (5'-AOX nebo 3'-AOX, Generi Biotech, ČR).

4.2.3 Štěpení plasmidu a elektroforéza v agarosovém gelu

Pro štěpení (linearizaci) plasmidu jsme použili komerční sadu. Reakční směs obsahující 24 μl plasmidu (31 μg), 3 μl NEBuffer 1.1 a 3 μl restričního enzymu *SacI* jsme nechali inkubovat přes noc při 37 °C a 300 otáčkách/min. Druhý den jsme provedli horizontální elektroforézu v 1% agarosovém gelu. Do jedné dráhy jsme napipetovali kontrolní vzorek obsahující 0,5 μl plasmidu, 4,5 μl destilované vody, 2 μl barvy 6 \times *DNA Loading Dye* a 1 μl barvy *Gel-Red*. Do druhé dráhy jsme nanесли celou reakční směs s přídatkem 6 μl barvy 6 \times *DNA Loading Dye* a 1 μl barvy *Gel-Red*. Gel jsme vložili do aparatury, zalili elektrodovým pufrém a připojili ke zdroji napětí. (90 V). Po 1 hod jsme pod UV světlem sterilně vyřízli z gelu linearizovaný plasmid.

Pro izolaci plasmidu jsme využili komerční sadu. K vyříznutému gelu s plasmidem jsme přidali 1,2 ml L1 pufru (*Gel Solubilization Buffer*) a nechali jsme jej rozpouštět při 50 °C po dobu 15 min za pravidelného míchání.

Rozpuštěný gel jsme přenesli do kolonky vložené do mikrozkušavky a roztok jsme stočili při 12 000 otáčkách/min po dobu 1 min. Poté jsme slili odpad a přidali jsme do kolonky 0,5 ml L2 pufru (*Wash Buffer*) obsahujícího ethanol. Opět jsme roztok stočili (1 min, 12 000 otáček/min), následně jsme slili odpad a stočili ještě jednou po dobu 1 min při 14 500 otáčkách/min pro vysušení frity. Poté jsme kolonku vložili do čisté mikrozkušavky, přidali jsme 30 µl sterilní vody zahřáté na 65 °C a nechali jsme roztok inkubovat 1 min při laboratorní teplotě pro eluci plasmidu. Nakonec jsme kolonku stočili po dobu 2 min při 12 000 otáčkách/min a získali čistý naštěpený plasmid.

4.3 Příprava kompetentních buněk *Pichia pastoris*

Do Erlenmeyerovy baňky s 50 ml YPD média jsme zaočkovali 50 µl předem připravené kryokonzervované kultury kompetentních buněk *P. pastoris* KM71H a nechali kultivovat přes noc při 28 °C a 120 otáčkách/min.

Druhý den jsme narostlou kulturu buněk *P. pastoris* stočili po dobu 10 min při 3 500 otáčkách/min. Po stočení jsme slili médium, buňky jsme resuspendovali ve 25 ml sterilní ledové vody a opět stočili (10 min, 3 500 otáček/min). Tento krok jsme opakovali ještě jednou s ledovou vodou a následně ještě dvakrát s 25 ml ledového 1M sorbitolu. Po posledním stočení a slití sorbitolu jsme resuspendovali buňky v 1 ml ledového 1M sorbitolu a ihned provedli elektroporaci.

4.3.1 Elektroporace

Elektroporace je metoda, kdy se elektrickým impulsem naruší buněčná stěna kvasinek, přes kterou následně projde plasmid. Pro elektroporaci jsme smíchali

na ledu 80 μ l čerstvě připravených kompetentních buněk a 20 μ l linearizovaného přečištěného plasmidu. Roztok jsme nechali 5 min inkubovat na ledu. Po inkubaci jsme celý roztok přenesli do namražené elektroporační kyvety, kterou jsme následně vložili do elektroporátoru. Vystavili jsme buněčnou suspenzi jednorázovému elektrickému impulsu a okamžitě jsme přidali 1 ml ledového 1M sorbitolu. Buňky jsme nechali regenerovat po dobu 2 hod při 28 °C. Pak jsme zaočkovali buňky ve třech různých koncentracích (50 μ l, 75 μ l, 150 μ l) na misky s YPD agarem s přidaným zeocinem (100 μ g/ml) a nechali inkubovat 3 dny při 28 °C.

4.3.2 Screening exprese β -N-acetylhexosaminidasy

Dalším krokem byl screening kultivace jednotlivých kultur kvasinek s transformovaným plasmidem v tekutém médiu pro produkci enzymu. Dvanáct vybraných kultur jsme zaočkovali z misek do dvanácti Erlenmeyerových baněk s plným glycerolovým médiem (100 ml) a nechali jsme je kultivovat do druhého dne při 28 °C a 220 otáčkách/min.

Druhý den jsme noční kultury stočili po dobu 10 min při 20 °C a 5 000 otáčkách/min. Pelety jsme sterilně resuspendovali v předem připraveném plném methanolovém médiu (30 ml). Kultury v Erlenmeyerových baňkách jsme kultivovali 3 dny, přičemž jsme každý den přidávali 150 μ l methanolu do každé baňky pro indukci exprese enzymu (viz. 2.2.3).



Obrázek 6 – Exprese PoHex v *P. pastoris*

4.3.3 Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy

U β -N-acetylhexosaminidas jsme stanovovali GlcNAcasovou a GalNAcasovou aktivitu se substráty *p*NP-GlcNAc a *p*NP-GalNAc (viz. 2.2).

Reakční směs pro měření GlcNAcasové či GalNAcasové aktivity obsahovala 2mM substrát *p*NP-GlcNAc nebo *p*NP-GalNAc v pufru McIlvaine pH 5. Reakce byla zahájena přidáním 10 μ l enzymu, který byl naředěn tak, aby po ukončení reakce po 10 min byla výsledná absorbance roztoku mezi 0,10-0,35, a závislost hydrolýzy produktu na čase byla tak stále lineární. Reakční směs byla inkubována při 35 °C a 850 otáčkách/min a reakce byla ukončena přidáním 1 ml 0,1M Na₂CO₃. Následně byla změřena absorbance při vlnové délce 420 nm. Aktivity byly měřeny ve třech paralelních stanoveních proti negativní kontrole bez přítomnosti enzymu. Pro výpočet enzymové aktivity byl použit vztah:

$$Aktivita[U/ml] = \frac{ABS \cdot V_{rs} \cdot \text{\textit{ředění}}}{K \cdot t \cdot V_{enzym}}$$

ABS značí naměřenou absorbanci, *V_{rs}* je objem reakční směsi [μ l], *ředění* značí ředění enzymu ze zásobního roztoku, *K* je kalibrační koeficient závislosti absorbance na koncentraci *p*-nitrofenolu pro použitý spektrofotometr [mM^{-1}], *t* je čas reakce [min] a *V_{enzym}* je objem přidaného naředěného enzymu [μ l].

Při interpretaci výsledků jsme využívali též hodnotu pro specifickou aktivitu, která se udává v jednotkách U/mg a byla zjištěna jako poměr aktivity enzymu a koncentrace proteinu v 1 ml vzorku. Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí Bradfordova činidla. Reakční směs obsahovala 1 ml činidla a 100 μ l naředěného enzymu (výsledná absorbance byla v rozmezí 0,1-0,6 pro zachování lineární závislosti). Reakční směs byla inkubována 15 min při laboratorní teplotě a poté byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Koncentrace proteinu ve vzorku byla vypočítána ze vztahu:

$$c[\text{mg/ml}] = K \cdot ABS \cdot \text{\textit{ředění}}$$

c značí vypočítanou koncentraci proteinu, K je kalibrační koeficient závislosti absorbance na koncentraci kalibračního standardu hovězího γ -globulinu [mg/ml], a $\text{\textit{ředění}}$ značí ředění enzymu ze zásobního roztoku.

4.3.4 SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza byla prováděna v 10% polyakrylamidovém gelu. Do první dráhy jsme napipetovali 4 μl markeru LMW. Do dalších drah jsme pipetovali vlastní vzorky s přidaným vzorkovým pufrem (5-10 μl). Vzorky jsme před nanesením na gel denaturovali (5 min, 99 °C). Vertikální elektroforéza probíhala v aparatuře na SDS-PAGE s elektrodovým pufrem po dobu cca 1 hod při 130 V.

Gel jsme barvili pomocí barvicího roztoku po dobu 10 min. Poté jsme gel odbarvovali v odbarvovacím roztoku, dokud nebylo pozadí čiré, a ponechali v uchovávacím roztoku (složení roztoků viz. 4.1.2).

4.3.5 Kryokonzervace buněčných kultur

Na misky s LB agarem a zeocinem (10 $\mu\text{g/ml}$) jsme zaočkovali vybrané kultury *P. pastoris* s transformovaným plasmidem. Nechali jsme je inkubovat po dobu 3 dnů při 28 °C.

Následně jsme z každé misky odebrali po jedné kultuře, kterou jsme zaočkovali do 100 ml YPD média. Kulturu jsme nechali inkubovat přes noc při 28 °C a 220 otáčkách/min.

Narostlé buňky jsme stočili po dobu 10 min při 12 °C a 5 000 otáčkách/min, přičemž odebrali vzorek pro kontrolu čistoty kultury pod mikroskopem. Po stočení

jsme buňky resuspendovali v 5 ml YPD média s 15% glycerolem, buněčnou suspenzi jsme rozdělili do mikroskopických po 100 μ l a zmrazili na -80 °C.

4.4 Expresa β -N-acetylhexosaminidasy v *Pichia pastoris*

Pro preparativní produkci jsme vždy dvě kryokonzervované kultury rozmrazili a zaočkovali každou do 15 ml YPD média se zeocinem (10 μ g/ml). Prekultury jsme nechali kultivovat 4 hod při 28 °C. Pak jsme je zaočkovali do Erlenmeyerových baněk s minimálním glycerolovým médiem (1 000 ml). Kultivovali jsme 24 hod při 28 °C a 220 otáčkách/min.

Pak jsme kultury stočili po dobu 10 min při 12 °C a 5 000 otáčkách/min. Pelety jsme resuspendovali v minimálním methanolovém médiu (200 ml). Nechali jsme kultivovat 3 dny při 28 °C a 220 otáčkách/min. Každý den jsme přidali 1 ml methanolu pro indukci exprese enzymu.

4.5 Zpracování kultury a purifikace

Třetí den kultivace jsme kultury stočili po dobu 20 min při 12 °C a 5 000 otáčkách/min. K další práci jsme si ponechali supernatant obsahující extracelulárně produkovaný enzym. Supernatant jsme 3 \times zředili ultračistou vodou, přefiltrovali jsme jej na Büchnerově nálevce a upravili na pH 3,5 pomocí 0,5M kyseliny citronové.

Purifikaci enzymu jsme prováděli iontově výměnnou chromatografií na přístroji ÄKTA Prime Plus s připojenou kolonou Fractogel SO_3^- . Nejprve jsme kolonu promyli ultračistou vodou (150 ml), pufrů B (100 ml) a A (100 ml) rychlostí 10 ml/min (složení pufrů viz. 4.1.2). Poté jsme nanесли supernatant (15 ml/min) nechali promývat pufrům A (100 ml, 10 ml/min) pro vymytí nespecificky navázaných proteinů. Pak jsme čistý enzym eluovali gradientem pufru B s obsahem 1M NaCl (60 ml, 2 ml/min). Eluci enzymu jsme sledovali pomocí UV detekce (280 nm).

Eluovaný enzym jsme jímali do centrifugační zkumavky. Po ukončení eluce jsme kolonu promyli roztoky (po 100 ml) v tomto pořadí: 1M NaOH, ultračistá voda, 1M NaCl, ultračistá voda, 20% ethanol. Purifikovaný enzym jsme ultracentrifugací (kyvety Amicon® Ultra, Obr. 7) při 12 °C a 3 600 otáčkách/min převedli do pufru McIlvaine pH 5,0 a zakoncentrovali na 2-3 ml. Koncentrace enzymu byla maximálně 50 mg/ml. Enzym byl v téhle podobě skladován při 4 °C po dobu několika měsíců.



Obrázek 7 – Zakoncentrování enzymu ultracentrifugací (kyvety Amicon® Ultra)

4.6 Biochemická charakterizace β -N-acetylhexosaminidasy

Biochemická charakterizace zahrnovala stanovení pH optima, pH stability, teplotního optima a kinetických parametrů. Při všech těchto stanoveních bylo používáno stanovení aktivity enzymu, jak je popsáno v kapitole 4.3.3.

Nejprve jsme stanovovali pH optimum. Připravili jsme si Britton-Robinsonův roztok v rozmezí pH 2-9 po půl jednotkách pH. Ve všech pH jsme změřili GlcNAcasovou i GalNAcasovou aktivitu enzymu. Měřili jsme ve čtyřech paralelních stanoveních ze dvou paralelních ředění pro maximalizaci správnosti výsledku. Hodnotili jsme závislost specifické aktivity enzymu na pH.

Stabilitu enzymu jsme stanovovali v pH 4, pH 4,5 a v pH 5. Připravili jsme si zásobní roztoky 50× ředěného enzymu v daném pH. Roztoky jsme nechali inkubovat (35 °C, 850 otáček/min) po dobu 24 hod. V pravidelných časových intervalech (0 min, 20 min, 1 hod, 2 hod, 4 hod, 24 hod) jsme z roztoku odebrali vzorek a změřili GlcNAcasovou i GalNAcasovou aktivitu v duplikátu. Vyhodnotili jsme závislost specifické aktivity na čase.

Teplotní optimum jsme stanovovali při teplotě 20-80 °C v rozmezí po pěti stupních. Pro každou teplotu jsme měřili GlcNAcasovou i GalNAcasovou aktivitu v pH 5 (McIlvaine pufr) ve třech paralelních stanoveních. Hodnotili jsme závislost specifické aktivity na teplotě.

Poslední biochemickou charakterizací bylo měření kinetických parametrů. Opět byla měřena aktivita enzymu, tentokrát v reakčních směsích s různou koncentrací substrátu. Reakční směs jsme si připravili v množství 400 µl pro odběr celkem 7×50 µl vzorků pro zjištění časové závislosti hydrolýzy produktu. Reakční směs jsme odebírali do mikrotitrační destičky, kde jsme měli v každé jamce připraveno 100 µl 1M Na₂CO₃ pro zastavení reakce. V první fázi jsme vybrali tři rozdílné koncentrace substrátu, abychom zjistili přibližnou hodnotu Michaelisovy konstanty K_m (viz. 2.3.1). V další fázi jsme vybrali devět koncentrací substrátu v rozmezí 0,1-5,0 mM. Měření jsme provedli ve třech paralelních stanoveních. Měření absorbancí v mikrotitrační destičce proběhlo na spektrofotometru Sunrise Tecan.

Nejprve jsme hodnoty absorbancí zanesli do grafu (každé paralelní stanovení dané koncentrace zvlášť) v závislosti na čase, kde jsme vyhodnotili počáteční reakční rychlost pro každou koncentraci substrátu jako směrnici přímky této závislosti. Kinetické parametry (K_m a k_{cat}) jsme získali ze závislosti počátečních rychlostí na koncentraci substrátu v programu GraphPad Prism 7.0 dle vztahu:

$$v_0 = \frac{k_{cat} \cdot c_E \cdot c_S}{K_m + c_S}$$

v_0 značí rychlost hydrolytické reakce [mM/min], k_{cat} je číslo přeměny [min^{-1}], c_E je koncentrace enzymu [mM], c_S je koncentrace substrátu [mM] a K_m je Michaelisova konstanta [mM].

4.7 Transglykosylační reakce s β -N-acetylhexosaminidasou

Reakční směs (200 μl pro analytickou reakci, 1 000 μl pro preparativní reakci) se skládala z donoru (30 mM), akceptoru (300 mM), pufru (McIlvaine pH 5, případně s obsahem 0-40 % acetonitrilu jako kosolventu) a purifikovaného enzymu PoHex-7. Jako akceptory byly použity tyto sloučeniny: kyselina skořicová (0,025 U enzymu), kyselina ferulová (0,025 U enzymu), GlcNAc (1 U enzymu), GalNAc (0,009 U enzymu), D-glukosa (0,015 U enzymu), D-galaktosa (0,015 U enzymu), koniferylalkohol (0,025 U enzymu), cyklohexanol (0,025 U enzymu); uvedené optimální množství enzymu bylo zvoleno optimalizací na základě několika experimentů. Reakce byly zahájeny přidávkem enzymu a inkubovány při 35 °C a 850 otáčkách/min. Reakční směs byla v pravidelných intervalech analyzována TLC (viz. 4.7.1) a HPLC (viz. 4.7.2)

4.7.1 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (*Thin Layer Chromatography*, TLC) je založena na distribuci nanesené látky mezi mobilní a stacionární fázi. Umožňuje sledování průběhu transglykosylačních reakcí porovnáním se známými standardy.

V pravidelných intervalech od počátku reakce jsme odebírali z reakční směsi vzorky pomocí kapiláry. Vzorek jsme nanesli na start TLC destičky a vyvinuli v mobilní fázi. Destičku jsme analyzovali pod UV světlem pro vizualizaci UV aktivních látek (donor a aromatické akceptory) a pak detekovali ostatní látky sacharidového charakteru karbonizací v 5% kyselině sírové v ethanolu při 350 °C.

4.7.2 Analýza reakční směsi (HPLC, LC-MS)

Z reakční směsi jsme po 3 hod odebrali 10 μ l, zastavili jsme reakci vysokou teplotou (99 °C, 2 min, 350 otáček/min) a nechali jsme vzorek zanalyzovat pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Analýza molekulových hmotností jednotlivých látek ve směsi byla provedena metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS). Tyto metody jsem sama neprováděla, pouze jsem připravovala vzorky. Vzorky analyzovala Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.

4.7.3 Příprava *N,N'*-diacetylchitobiosy

Příprava *N,N'*-diacetylchitobiosy (2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa) probíhala ve třech mikrozkuvkách (po 1 ml) obsahujících donor *p*NP-GlcNAc (30 mM), akceptor GlcNAc (300 mM), pufr McIlvaine pH 5 a purifikovaný enzym *PolHex-7* (1 U). Reakce jsme ukončili na základě analýzy TLC po 5 hod a 15 min od zahájení reakce, kdy byla spotřebována většina donoru. Reakci jsme ukončili povařením na 99 °C po dobu 2 min při 350 otáčkách/min (denaturace enzymu). Denaturovaný enzym jsme odstranili centrifugací (13 500 otáček/min, 10 min) a spojené supernatanty jsme nanesli na kolonu gelové chromatografie (Biogel P2) s vodou jako mobilní fází o průtoku 7 ml/hod. Pomocí automatického sběrače byly jímány frakce o velikosti 2 ml. Na základě analýzy TLC jsme frakce obsahující produkt spojili, zmrazili tekutým dusíkem a lyofilizovali. Struktura produktu byla ověřena pomocí metody nukleární magnetické resonance (NMR), kterou provedla RNDr. Helena Pelantová, Ph.D. Metoda NMR využívá radiofrekvenčního záření, které je propouštěno vzorkem v silném magnetickém poli.

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava plasmidu s genem *Pohex*

Pro expresi genu β -*N*-acetylhexosaminidasy z *P. oxalicum* (sekvence viz. Příloha 1) v kvasince *P. pastoris* byl zvolen komerční plasmid pICZ α A, jež se ukázal jako vhodný pro expresi tohoto typu enzymů v předchozích studiích [7]. Plasmid, dodaný komerční firmou Generay (Čína), byl namnožen expresí v kompetentních buňkách *E. coli* Top10 (viz. 4.2 a 4.2.1). Namnožený plasmid byl přečištěn pomocí metody midi prep za použití komerční sady. Byly vyprodukovány paralelně dva vzorky plasmidu označené jako *Pohex-1* a *Pohex-2*. Jejich koncentrace a čistota byly stanoveny spektrofotometricky (viz. 4.2.2). Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1 – Koncentrace a čistota plasmidů *Pohex-1* a *Pohex-2*

| | ABS ₁₂₆₀ | ABS ₂₆₀ | ABS ₁₂₆₀ | ABS ₂₆₀ | Koncentrace [μ g/ml] | Čistota |
|----------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------------|---------|
| <i>Pohex-1</i> | 0,074 | 0,085 | 0,054 | 0,059 | 993 | 1,40 |
| <i>Pohex-2</i> | 0,106 | 0,100 | 0,078 | 0,073 | 1291 | 1,36 |

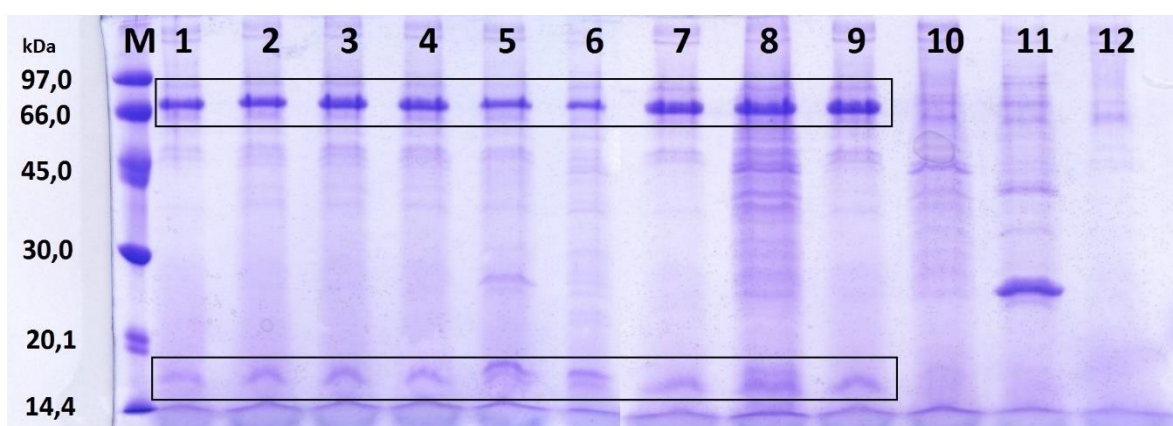
V Tab. 1 vidíme, že koncentrace plasmidu je vyšší v *Pohex-2* a oba vzorky mají srovnatelnou čistotu. Správná sekvence vloženého genu byla ověřena komerční sekvenací (firma SEQme s.r.o.). Pro další práci jsme vybrali *Pohex-2* z důvodu vyšší koncentrace DNA.

5.2 Screening exprese *PoHex* v *Pichia pastoris*

Vzorek plasmidu *Pohex-2* byl linearizován naštěpením restriktasou *SacI* a po přečištění použit pro elektroporaci do kompetentních buněk *P. pastoris* (viz. 4.2.3). Zaelektroporované buňky byly zaočkovány na misky s YPD agarem pod selekčním tlakem zeocinu (viz. 4.3.1). Po třech dnech kultivace narostlo celkem dvanáct kolonií. Tyto kolonie jsme zaočkovali do tekutého média

a provedli screeningovou kultivaci (5 dní, viz. 4.3.2), abychom zjistili, která z těchto kolonií je nejvhodnější pro rekombinantní expresi *PoHex*.

Screening probíhal na dvou úrovních. Jednak jsme provedli analýzu vzorků zakoncentrovaných médií ze všech dvanácti vzorků pomocí SDS-PAGE a posoudili přítomnost a čistotu exprimovaného proteinu srovnáním s LMW markerem (viz. 4.3.4). β -*N*-Acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum* je v nativní formě složena ze dvou podjednotek o velikosti cca 65 kDa a dvou propeptidů o velikosti 15 kDa (viz. 2.3). Na Obr. 8 vidíme, že kolonie 1-9 obsahují protein odpovídající velikostí katalytické podjednotce a propeptidu. Kolonie 10-12 požadovaný protein neobsahovaly.



Obrázek 8 – Screening exprese *PoHex* v *P. pastoris* pomocí SDS-PAGE. Marker LMW (označen M) a kolonie 1-12. V rámečku jsou označeny proteiny odpovídající katalytické podjednotce a propeptidu.

Dále jsme u každého vzorku média stanovili GlcNAcasovou i GalNAcasovou aktivitu a jejich poměr (viz 4.3.3). Měřili jsme ve třech paralelních stanoveních. Výsledky screeningu aktivit jsou uvedeny v Tab. 2-4.

Tabulka 2 – Screening exprese PoHex v *P. pastoris*, GlcNAcasová aktivita

| Kolonie | ABS1 | ABS2 | ABS3 | Průměr | Aktivita [U/mg] |
|---------|-------|-------|-------|--------|-----------------|
| 1 | 0,205 | 0,227 | 0,207 | 0,213 | 3,7 |
| 2 | 0,243 | 0,254 | 0,248 | 0,248 | 4,3 |
| 3 | 0,323 | 0,347 | 0,334 | 0,335 | 5,8 |
| 4 | 0,282 | 0,299 | 0,298 | 0,293 | 5,1 |
| 5 | 0,201 | 0,231 | 0,210 | 0,214 | 3,7 |
| 6 | 0,203 | 0,224 | 0,199 | 0,209 | 3,6 |
| 7 | 0,267 | 0,278 | 0,266 | 0,270 | 4,7 |
| 8 | 0,273 | 0,289 | 0,292 | 0,285 | 4,9 |
| 9 | 0,261 | 0,272 | 0,271 | 0,268 | 4,7 |

Tabulka 3 – Screening exprese PoHex v *P. pastoris*, GalNAcasová aktivita

| Kolonie | ABS1 | ABS2 | ABS3 | Průměr | Aktivita [U/mg] |
|---------|-------|-------|-------|--------|-----------------|
| 1 | 0,237 | 0,231 | 0,229 | 0,232 | 4,0 |
| 2 | 0,312 | 0,316 | 0,304 | 0,311 | 5,4 |
| 3 | 0,354 | 0,317 | 0,366 | 0,346 | 6,0 |
| 4 | 0,328 | 0,342 | 0,331 | 0,334 | 5,8 |
| 5 | 0,308 | 0,319 | 0,294 | 0,307 | 5,3 |
| 6 | 0,292 | 0,307 | 0,310 | 0,303 | 5,3 |
| 7 | 0,378 | 0,389 | 0,354 | 0,374 | 6,5 |
| 8 | 0,350 | 0,377 | 0,367 | 0,365 | 6,3 |
| 9 | 0,328 | 0,352 | 0,320 | 0,333 | 5,8 |

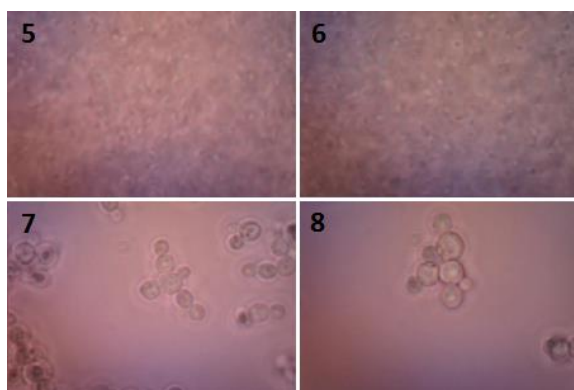
Tabulka 4 – Screening exprese PoHex v *P. pastoris*, poměr aktivit

| Kolonie | GalNAcasa/GlcNAcasa |
|---------|---------------------|
| 1 | 1,09 |
| 2 | 1,25 |
| 3 | 1,03 |
| 4 | 1,14 |
| 5 | 1,43 |
| 6 | 1,45 |
| 7 | 1,38 |
| 8 | 1,28 |
| 9 | 1,24 |

Kolonie 10-12 nevykazovaly žádnou aktivitu, což koreluje s nepřítomností požadovaného proteinu v médiu dle SDS-PAGE. V tabulce 4 vidíme poměr GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity, což je jeden z faktorů, na jehož základě jsme

vybírali nejvhodnější kulturu pro další práci. Dle předchozí studie má β -*N*-acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum* CCF 1959 z houbového producenta poměr těchto aktivit roven 1,60 [19]. Pro následnou kryokonzervaci jsme proto vybrali kolonie 5-8, protože vykazovaly vysokou aktivitu enzymu v médiu a zároveň poměr aktivit byl nejbližší hodnotě 1,60.

Při přípravě kultur pro kryokonzervaci jsme kontrolou v mikroskopu zjistili, že kolonie 5 a 6 jsou kontaminované, zatímco kultury 7 a 8 byly v pořádku (Obr. 9). Proto byly kryokonzervovány kultury 7 (*PoHex-7*) a 8 (*PoHex-8*) (viz. 4.3.5).



Obrázek 9 – Vzorok kultury 5-8 pod mikroskopem. Zvětšení 1 000x. Kultury 5 a 6 jsou kontaminované jiným mikroorganismem, kultury 7 a 8 obsahují pouze buňky *P. pastoris*.

5.3 Produkce *PoHex* v *Pichia pastoris* a purifikace

Pro další charakterizaci jsme z kryokonzervovaných kultur (*PoHex-7* a *PoHex-8*) vyprodukovali *PoHex* ve větším množství pro purifikaci. Enzym z obou kultur jsme produkovali ve 400 ml kultivačního média.

Purifikace enzymu *PoHex* z kultivačních médií proběhla pomocí iontové výměnné chromatografie na přístroji Äkta Prime Plus za použití kolony Fractogel SO_3^- při pH 3,5 (katex; viz. 4.5). Po purifikaci z každé kultury jsme získali 20 ml purifikovaného enzymu o koncentraci 0,5-0,6 mg/ml proteinu. Enzym byl zakonzentrován ultracentrifugací a převeden do pufru McIlvaine pH 5, který je

vhodný pro dlouhodobé skladování (viz. 4.5). Čistota výsledných purifikovaných vzorků *PoHex* byla analyzována pomocí SDS-PAGE (Obr. 10). Průběh purifikace a výtěžek proteinu jsou uvedeny v Tab. 5. V nepurifikovaném médiu byla koncentrace proteinu pod hranicí detekce, proto není uvedena.

5.4 Výběr kultury pro charakterizaci

Kromě SDS-PAGE byly purifikované vzorky rekombinantního enzymu ve standardním pufru McIlvaine pH 5 analyzovány ohledně množství proteinu, GlcNAcasové a GalNAcasové aktivity a jejich poměru. Výsledky byly porovnány se vzorky β -N-acetylhexosaminidasy z *P. oxalicum* CCF 1959 produkovanými houbovými producenty (produkováno v laboratoři; produkce nebyla předmětem této práce).

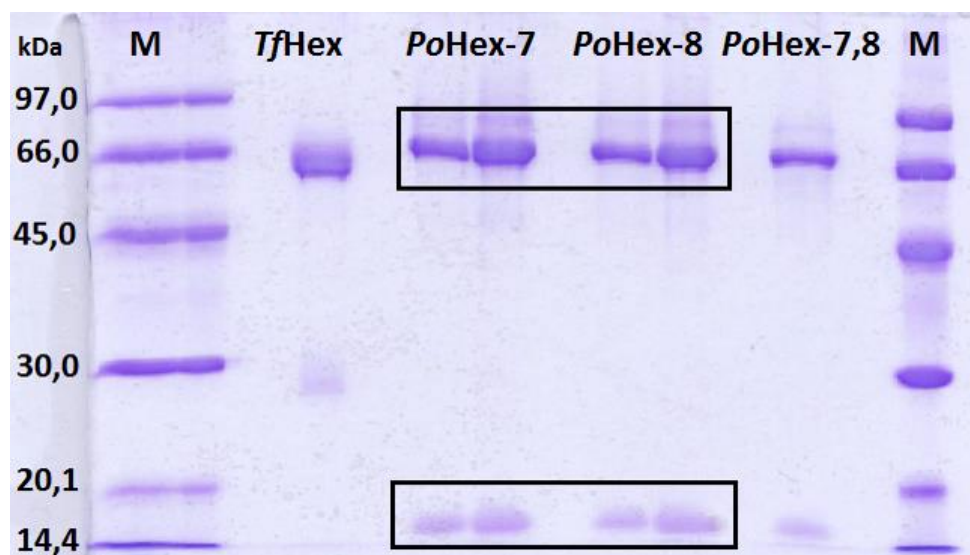
Tabulka 5 – Průběh purifikace *PoHex* iontově výměnnou chromatografií. GalNAcasové aktivity a koncentrace proteinu jsou uvedeny pro vzorky pro *PoHex-7* a *PoHex-8*

| | Protein [mg] | Aktivita [U] | Specifická aktivita [U/mg] | Výtěžek [%] |
|----------------------------|--------------|--------------|----------------------------|-------------|
| <i>PoHex-7 - GalNAcasa</i> | | | | |
| Médium | | 5160 | | 100 |
| Purifikovaný vzorek | 10 | 582 | 58 | 11 |
| Koncentrovaný vzorek | 8 | 590 | 76 | 11 |
| <i>PoHex-8 - GalNAcasa</i> | | | | |
| Médium | | 4960 | | 100 |
| Purifikovaný vzorek | 12 | 936 | 78 | 19 |
| Koncentrovaný vzorek | 9 | 622 | 73 | 13 |

Tabulka 6 – Poměr aktivit purifikovaných rekombinantních enzymů *PoHex-7*, *PoHex-8* a tří vzorků *PoHex* CCF 1959 z houbového producenta (*PoHex-HP*)

| | GlcNAcasová aktivita [U/ml] | GalNAcasová aktivita [U/ml] | GalNAcasa/GlcNAcasa | Průměrný poměr |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------|----------------|
| <i>PoHex-HP1</i> | 16 | 25 | 1,55 | |
| <i>PoHex-HP2</i> | 59 | 102 | 1,73 | |
| <i>PoHex-HP3</i> | 30 | 38 | 1,26 | 1,51 |
| <i>PoHex-7</i> | 192 | 295 | 1,54 | |
| <i>PoHex-8</i> | 147 | 249 | 1,69 | 1,62 |

Srovnání poměru GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity purifikovaného rekombinantního enzymu (vzorky *PoHex-7* a *PoHex-8*) a *PoHex* z houbového producenta CCF 1959 jsou uvedeny v Tab. 6. Je vidět, že poměry aktivit u rekombinantního enzymu ($\text{GalNAc} / \text{GlcNAc} = 1,62$) jsou v průměru srovnatelné se zjištěnými poměry aktivit enzymu z houbového producenta ($\text{GalNAc} / \text{GlcNAc} = 1,51$) i s literaturou [19].



Obrázek 10 – Čistota purifikovaných vzorků *PoHex-7* a *PoHex-8* dle SDS-PAGE. Zleva marker LMW (značeno M), *TfHex*, *PoHex-7*, *PoHex-8*, směs *PoHex-7* a *PoHex-8* (*PoHex-7,8*) a marker LMW (M).

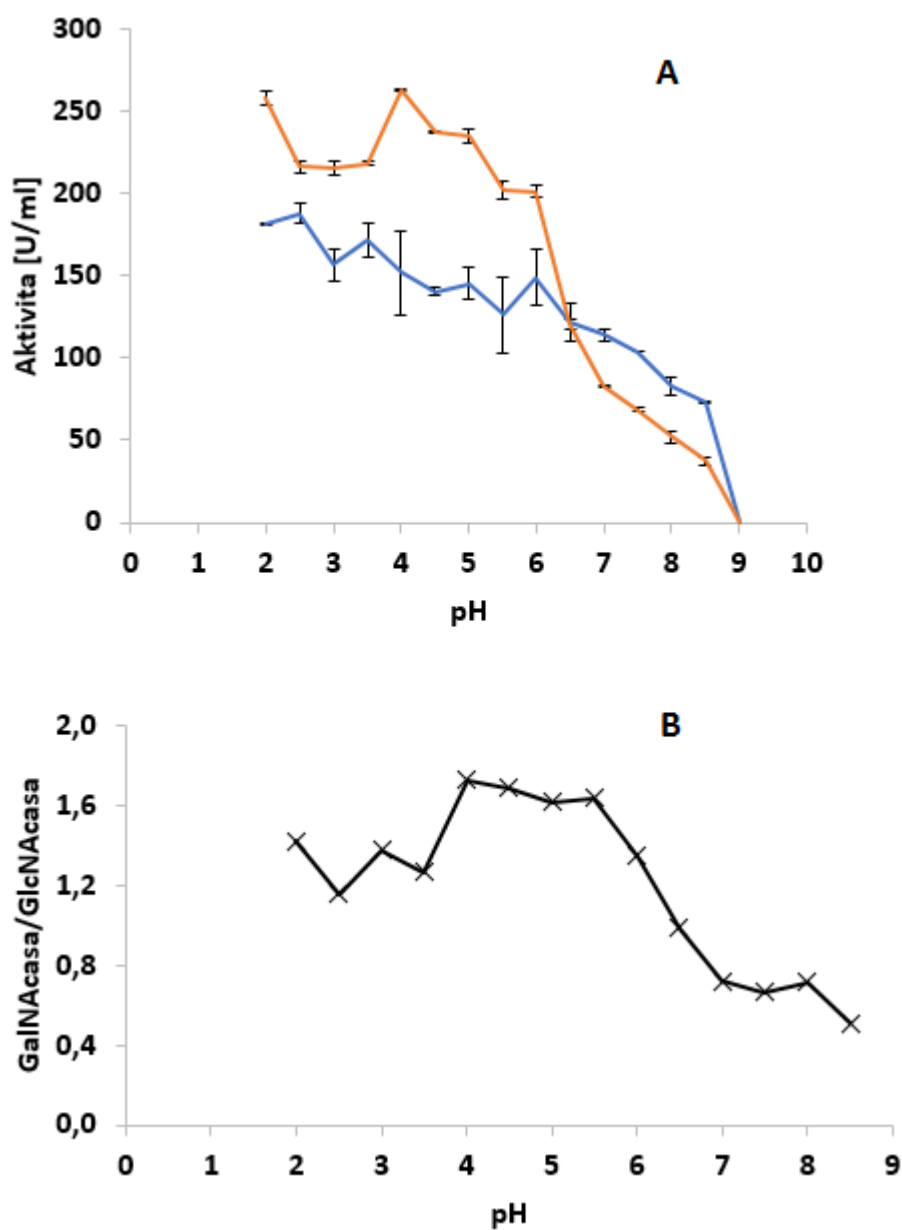
Na základě získaných výsledků jsme pro další charakterizaci vybrali vzorek *PoHex-7*. Žádné zásadní rozdíly mezi oběma vzorky nebyly identifikovány. Vzorek *PoHex-7* má pouze nepatrně vyšší koncentraci proteinu a specifickou aktivitu a poměr $\text{GalNAc} / \text{GlcNAc}$ má bližší výsledkům pro *PoHex* z houbového producenta.

5.5 Charakterizace *PoHex*

V následujících kapitolách se budu věnovat biochemické charakterizaci rekombinantního enzymu *PoHex-7*. Přesné postupy k následujícím metodám jsou popsány v kapitole 4.6.

5.5.1 pH optimum

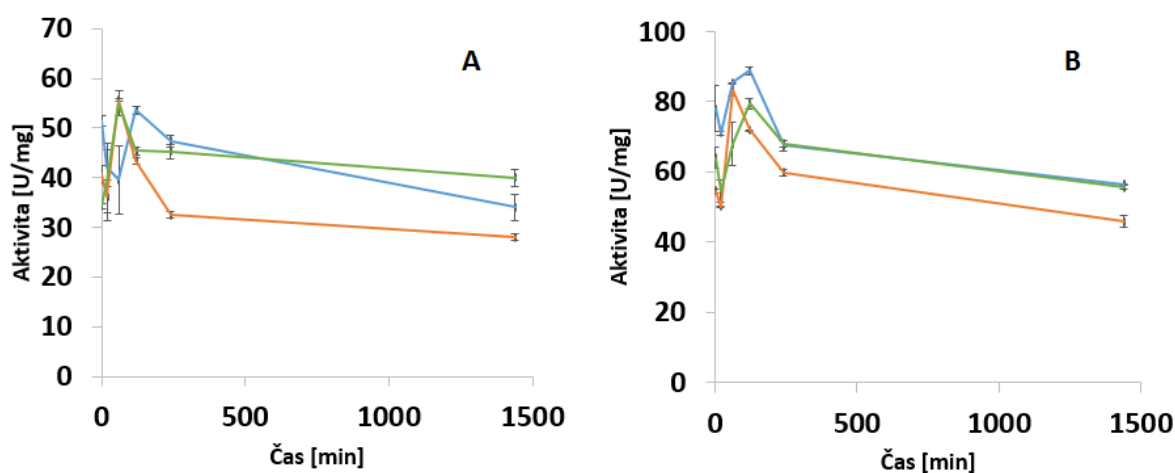
pH optimum enzymu PoHex-7 bylo stanoveno proměřením závislosti GlcNAcasové a GalNAcasové aktivity na pH v intervalu 2-9 po půl jednotkách pH. Z průměrných absorbancí v daném pH jsme vypočetli aktivitu v jednotkách U/ml a zanesli jsme tyto hodnoty do grafu v závislosti na pH (Graf 1A).



Graf 1 – pH optimum. A – Závislost aktivity PoHex-7 na pH, GlcNAcasa znázorněna modře, GalNAcasa oranžově; B – Poměr aktivit (GalNAcasa/GlcNAcasa) PoHex-7 v závislosti na pH. Měření bylo provedeno ve čtyřech paralelních stanoveních.

Obě aktivity PoHex-7 jsou vyšší v kyselém pH; v intervalu pH 6,5-8,5 obě aktivity rapidně klesaly a v pH 9 byl již enzym prakticky neaktivní. pH optimum bylo relativně ploché v rozmezí cca 4-6. Ze závislosti poměru GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity na pH (Graf 1B) vyplývá, že poměr aktivit nejbližší cílové hodnotě 1,60 byl v pH 4-5,5, kdy v pH 5,5 už aktivita enzymu poněkud klesala.

Na základě stanovení pH optima byla studována stabilita enzymu PoHex-7 při pH 4; 4,5 a 5. Naměřené hodnoty aktivit jsme zanesli do grafu v závislosti na čase (0-24 hod). Měřili jsme ve dvou paralelních stanoveních pro GlcNAcasu (Graf 2A) a GalNAcasu (Graf 2B). Výsledky jsou shrnuty v Tab. 7.



Graf 2 – pH stabilita. A – Závislost GlcNAcasové aktivity PoHex-7 na čase; B – závislost GalNAcasové aktivity PoHex-7 na čase pH 4 modře, pH 4,5 oranžově, pH 5 zeleně.

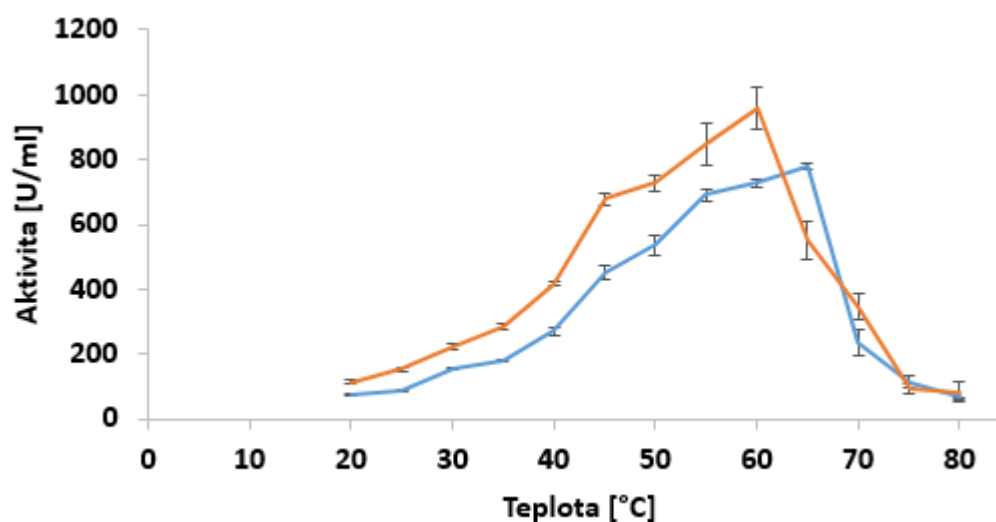
Tabulka 7 – Časová závislost aktivit PoHex-7 v 0-24 hod

| Čas [min] | Aktivita GlcNAcas (pH 4) [%] | Aktivita GalNAcas (pH 4) [%] | Aktivita GlcNAcas (pH 4,5) [%] | Aktivita GalNAcas (pH 4,5) [%] | Aktivita GlcNAcas (pH 5) [%] | Aktivita GalNAcas (pH 5) [%] |
|-----------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 20 | 82 | 91 | 89 | 92 | 114 | 85 |
| 60 | 77 | 109 | 137 | 153 | 161 | 106 |
| 120 | 104 | 114 | 107 | 132 | 132 | 124 |
| 240 | 92 | 86 | 80 | 110 | 132 | 106 |
| 1440 | 66 | 72 | 69 | 84 | 117 | 87 |

Z grafů i tabulky 7 je patrné, že ve všech sledovaných pH je enzym stabilní minimálně po dobu 24 hod. Při pH 5 měl enzym po 24 hod procentuálně nejvyšší hodnoty aktivit ve srovnání s pH 4 a 4,5 (GalNAcasa 87 %).

5.5.2 Teplotní optimum

Teplotní optimum jsme měřili v rozmezí 20-80 °C po pěti stupních ve třech paralelních stanoveních pro GlcNAcasovou i GalNAcasovou aktivitu. Výsledné hodnoty jsme zpracovali jako závislost aktivity enzymu na teplotě (Graf 3).



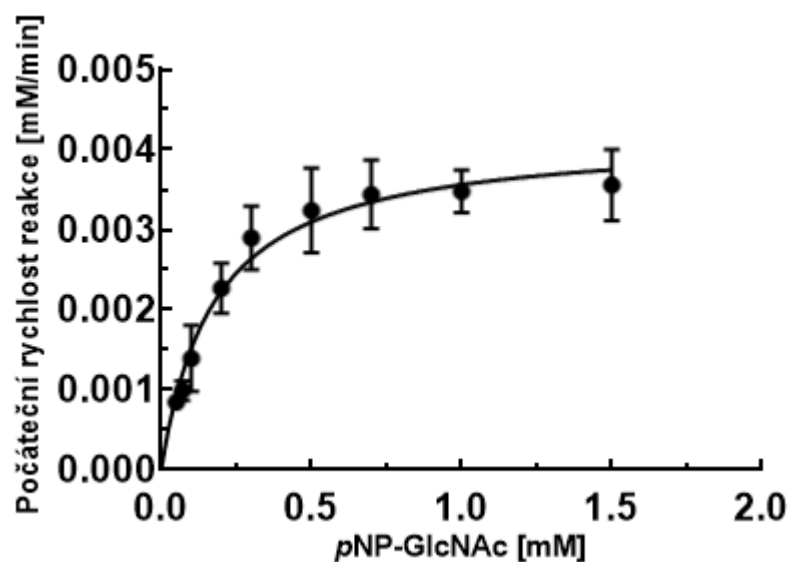
Graf 3 – Teplotní optimum. Závislost aktivity PoHex7 na teplotě; GlcNAcasa *modře*, GalNAcasa *oranžově*.

Z Grafu 3 vyplývá, že teplotní optimum enzymu bylo při 60 °C. Tato teplota se ovšem pro reakce nevyužívá, jelikož při vyšších teplotách nebývá dlouhodobě stabilní ani enzym, ani substrát. Při vyšší teplotě bývá v reakcích i větší podíl hydrolýzy. Z těchto důvodů jsme transglykosylační reakce prováděli při teplotě 35 °C.

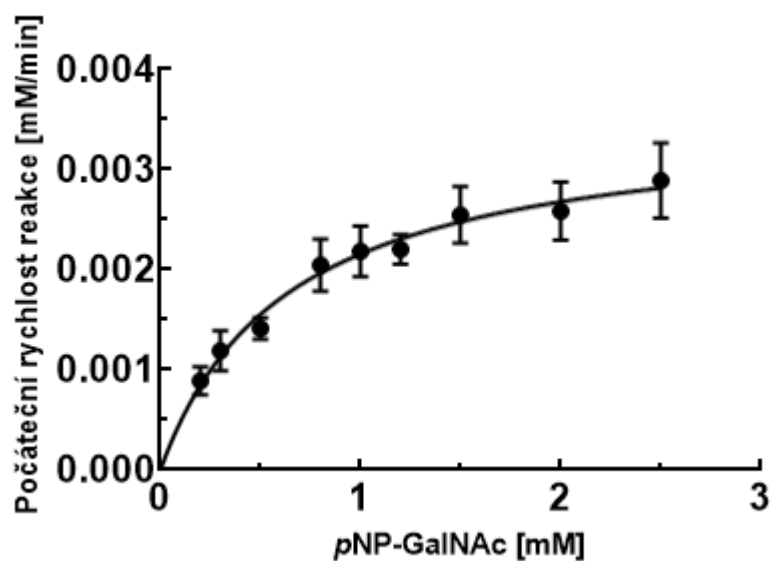
5.5.3 Kinetické parametry

Poslední biochemickou charakterizací PoHex-7 bylo stanovení kinetických parametrů. Byla stanovena aktivita enzymu ve třech paralelních stanoveních pro koncentrace substrátu v rozmezí 0,05-3,00 mM. Získané hodnoty počátečních

rychlostí reakce jsme vynesli do grafu v závislosti na koncentraci substrátu *p*NP-GlcNAc a *p*NP-GalNAc. Kinetické křivky byly analyzovány pomocí programu GraphPad Prism dle vztahu v kapitole 4.6 (Graf 4 a 5).



Graf 4 – Kinetická křivka hydrolyzy substrátu *p*NP-GlcNAc enzymem PoHex-7. $K_m = 0,18 \pm 0,06 \text{ mM}$, $k_{cat} = 21 \pm 2 \text{ s}^{-1}$



Graf 5 – Kinetická křivka hydrolyzy substrátu *p*NP-GalNAc enzymem PoHex-7. $K_m = 0,6 \pm 0,2 \text{ mM}$, $k_{cat} = 35 \pm 4 \text{ s}^{-1}$

Ze stanovení kinetických parametrů vyplývá, že enzym má nižší katalytickou účinnost pro *p*NP-GlcNAc ($k_{\text{cat}}/K_m = 117 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) než pro *p*NP-GalNAc ($k_{\text{cat}}/K_m = 175 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$), což odpovídá zjištěnému poměru aktivit.

5.6 Transglykosylační reakce s *PoHex*

5.6.1 Analytické reakce

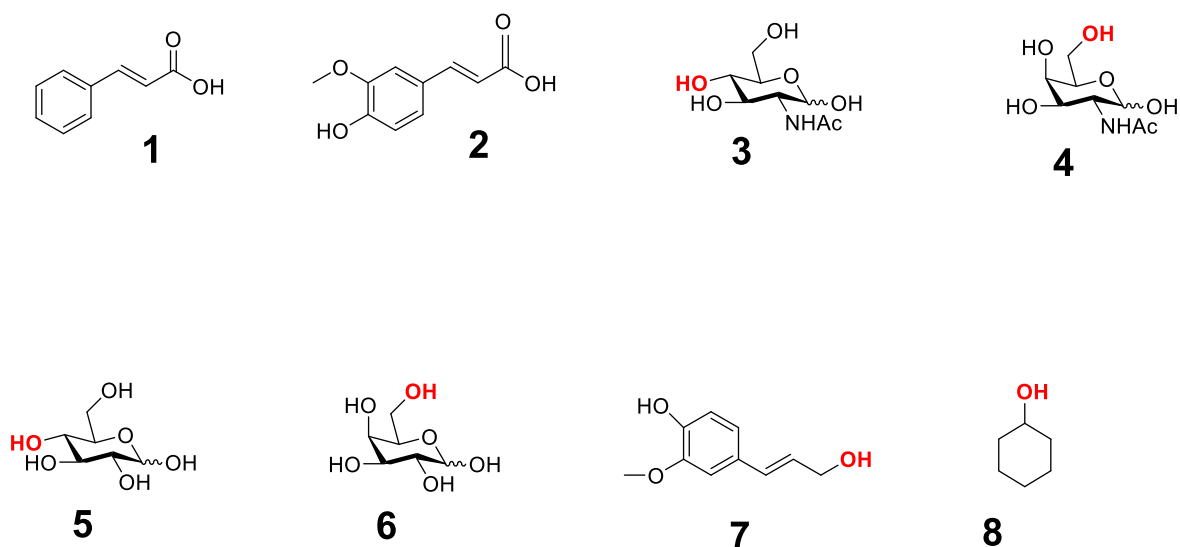
V této části práce byl studován transglykosylační potenciál *PoHex*-7 (Tab. 8). Donorem v reakci byl vždy *p*NP-GlcNAc nebo *p*NP-GalNAc. Akceptory byly různé sloučeniny, jejichž struktury jsou uvedeny na Obr. 11. Reakce byly prováděny při 35 °C a 850 otáčkách/min v pufru McIlvaine pH 5,0 nebo v pufru s obsahem 40 % acetonitrilu, v případě omezené rozpustnosti akceptoru ve vodě.

Průběh reakcí jsme sledovali pomocí TLC, HPLC a LC-MS. Kromě reakcí I a II byl ve všech reakcích potvrzen vznik produktu o odpovídající molekulové hmotnosti.

Tabulka 8 – Analytické transglykosylační reakce s *PoHex*-7.

| Reakce | Donor (30 mM) | Akceptor (300 mM) | Reakční médium (0,2 ml) | Produkt ¹ |
|--------|--------------------|------------------------|--|----------------------|
| I. | <i>p</i> NP-GlcNAc | kyselina skořicová (1) | 40 % CH ₃ CN/pufr McIlvaine pH 5 | - |
| II. | <i>p</i> NP-GlcNAc | kyselina ferulová (2) | 40 % CH ₃ CN/pufr McIlvaine pH 5 | - |
| III. | <i>p</i> NP-GlcNAc | GlcNAc (4) | pufr McIlvaine pH 5 | ++ |
| IV. | <i>p</i> NP-GalNAc | GalNAc (3) | pufr McIlvaine pH 5 | + |
| V. | <i>p</i> NP-GalNAc | D-glukosa (6) | pufr McIlvaine pH 5 | + |
| VI. | <i>p</i> NP-GalNAc | D-galaktosa (5) | pufr McIlvaine pH 5 | + |
| VII. | <i>p</i> NP-GalNAc | koniferylalkohol (7) | 40 % CH ₃ CN/pufr McIlvaine pH 5 | + |
| VIII. | <i>p</i> NP-GalNAc | koniferylalkohol (7) | pufr McIlvaine pH 5 | + |
| IX. | <i>p</i> NP-GalNAc | cyklohexanol (8) | pufr McIlvaine pH 5 | + |

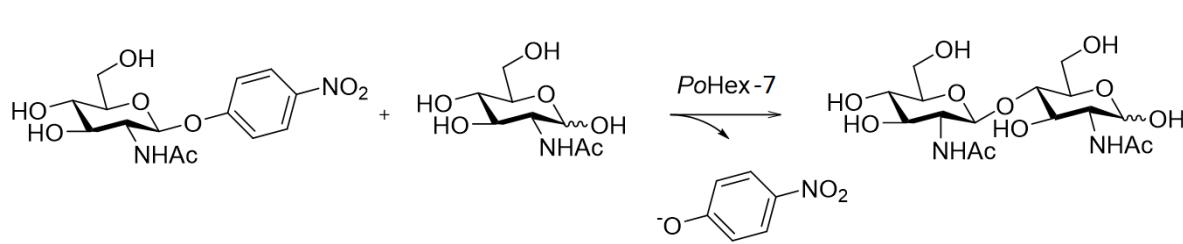
¹ Použité symboly: – značí, že produkt v reakční směsi nebyl detekován dle HPLC; + značí vznik produktu v množství 1-5 % dle HPLC; ++ značí vznik produktu v množství >10 % dle HPLC.



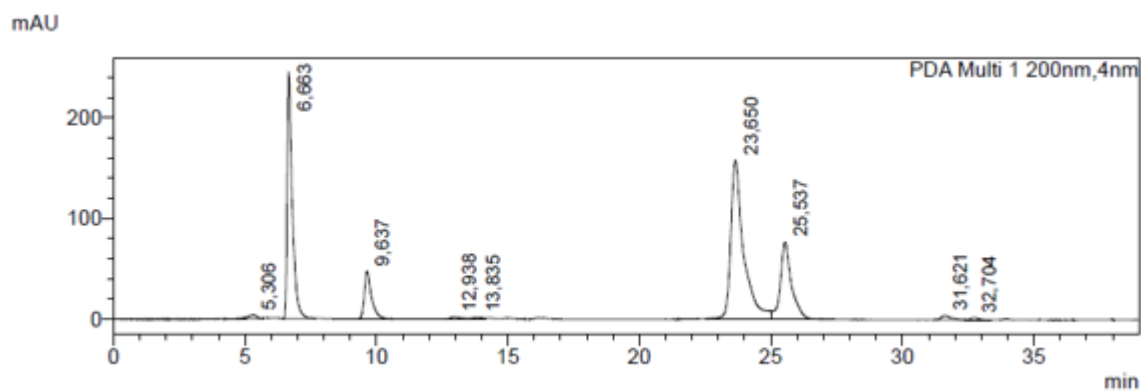
Obrázek 11 – Struktury akceptorů v analytických transglykosylačních reakcích (vytvořeno v programu ChemDraw); **červeně** jsou označena předpokládaná glykosylační místa (s akceptory 1 a 2 nevznikal produkt, proto neobsahují červené značení). Kyselina skořicová (1); kyselina ferulová (2); GlcNAc (3); GalNAc (4); D-glukosa (5); D-galaktosa (6); koniferylalkohol (7); cyklohexanol (8). U akceptorů 1 a 2 nebyla detekována žádná glykosylace.

5.6.2 Preparativní reakce

N,N'-Diacetylchitobiosa (2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa), jejíž přítomnost byla detekována v analytické reakci, byla připravena v dostatečném množství pro izolaci pomocí gelové chromatografie a strukturní charakterizaci. Preparativní reakce proběhla ve třech mikrozkuvkách s obsahem 10 mg *p*NP-GlcNAc (30 mM), 66 g GlcNAc (300 mM), 1000 μ l pufru McIlvaine pH 5 a 5 μ l *Po*Hex-7 (1 U) při 35 $^{\circ}$ C a 850 otáčkách/min (Obr. 12). Po 3 hod od zahájení reakce jsme odebrali vzorek na LC-MS (Obr. 13). Reakce byla ukončena po 5 hod a 15 min. Produkt byl izolován pomocí gelové chromatografie (Biogel P2).



Obrázek 12 – Příprava *N,N'*-diacetylchitobiosy z donoru *p*NP-GlcNAc a akceptoru GlcNAc za katalýzy *Po*Hex-7.



Obrázek 13 – Chromatogram reakční směsi pro přípravu N,N' -diacetylchitobiosy, LC-MS. Měření bylo provedeno na TSK-gel Amide 80 (5 μ m, 4,6 \times 250 mm), Ing. Lucie Petrášková, Ph.D. Retenční časy: pNP, 6,7 min; pNP-GlcNAc 9,6 min, GlcNAc (α a β) 23,7 min a 25,5 min, N,N' diacetylchitobiosa (α - a β -) 31,6 min a 32,7 min.

V preparativní reakci jsme získali 5 mg N,N' -diacetylchitobiosy (výtěžek 13%).
Struktura připraveného produktu byla potvrzena pomocí NMR (Příloha 2).

6 DISKUZE

Enzym β -*N*-acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum* (PoHex) má široké využití v biotechnologických aplikacích díky své široké substrátové specifitě a výbornému transglykosylačnímu potenciálu. Toleruje též některé změny v molekule substrátu, např. substráty modifikované na acylamidové skupině. V rámci práce byl tento enzym produkován rekombinantní expresí v kvasince *P. pastoris* a jeho vlastnosti byly srovnány s enzymem z původního houbového producenta (kmen CCF 1959).

Jelikož plasmid pPICZ α A za využití restrikčních míst *EcoRI* a *KpnI*, který byl zvolen pro klonování genu *Pohex*, nese rezistenci na antibiotikum zeocin, byly všechny molekulárně biologické práce prováděny pod selekčním tlakem zeocinu (10 μ g/ml). Při screeningu narostlých kultur po elektroporaci linearizovaného plasmidu neobsahovaly tři z dvanácti analyzovaných kolonií požadovaný protein, protože selekční tlak antibiotika není vždy stoprocentně účinný. Tyto kolonie však narostly na miskách podstatně menší.

Purifikace vyprodukovaného enzymu proběhla pomocí iontové výměnné chromatografie (silný anex Fractogel SO₃⁻). Enzym je třeba pro tuto chromatografii převést do kladně nabitě formy, aby se navázal na kolonu. Toho bylo docíleno při pH 3,5, které bylo výrazně nižší než pI purifikovaného enzymu, a proto nesl enzym celkový kladný náboj. Elektrostatická interakce byla posléze zrušena elučním pufrem s přísadkem NaCl. Po purifikaci byl enzym v příliš nízkém pH, které pro provádění transglykosylačních reakcí, zvl. u citlivých substrátů. Proto jsme enzym převedli do pH 5, v němž je stabilní po dobu několika měsíců. Výtěžek purifikace cca 8 mg čistého enzymu ze 400 ml média je výrazně vyšší než výtěžky dosažené produkcí z houbového producenta a následnou purifikací [16].

V průběhu měření pro charakterizaci enzymu se zdálo, že enzym ztrácí aktivitu v příliš ředěném stavu. Z toho důvodu jsme se rozhodli pro stanovení pH stability, kdy jsme ověřili, že enzym je stabilní ve všech testovaných pH při 35 °C po dobu minimálně 24 hod.

Rekombinantní enzym připravený v rámci této práce má poměr GalNAcasové a GlcNAcasové aktivity (1,62) srovnatelný se třemi testovanými vzorky houbové *PoHex* (1,51). Tyto hodnoty odpovídají i hodnotě publikované v literatuře (1,60) [19]. Houbová *PoHex* má vysokou aktivitu v pH 2-4, přičemž pH optimum je v pH 3 [16]. Rekombinantní *PoHex* měl vysokou aktivitu v pH 2-6. Poměr aktivit nejbližší houbovému enzymu byl v pH 5; v kombinaci s pH stabilitou jsme určili pH 5 jako nejlepší pH pro uchování enzymu a transglykosylační reakce. Houbový enzym byl stabilní spíše v neutrálním než v kyselém pH, což může být způsobeno lehce odlišnou glykosylací oproti enzymu produkovanému v kvasince [16]. Teplotní optimum pro rekombinantní enzym bylo při 60 °C, přičemž aktivita rapidně stoupala v rozmezí 20-60 °C a klesala od 65 °C. Aktivita GalNAcasy klesala mnohem rychleji než GlcNAcasy. Houbový enzym měl pH optimum v bodě 50 °C, přičemž aktivita stoupala od bodu 15 °C [16]. Ve vyšších teplotách není obvykle enzym ani substrát stabilní, proto se pro syntetické aplikace využívá teplot 35-45 °C. My jsme pro další reakce zvolili teplotu 35 °C.

Michaelisova konstanta K_m houbového enzymu je pro *pNP-GlcNAc* rovna $0,14 \pm 0,01$ mM, pro *pNP-GalNAc* je rovna $1,01 \pm 0,02$ mM [16]. U rekombinantního enzymu jsme dospěli k velice podobným hodnotám: K_m pro GlcNAcasu je $0,18 \pm 0,06$ mM a pro GalNAcasu je $0,6 \pm 0,2$ mM. Hodnota K_m u GalNAcasové aktivity je u rekombinantního enzymu dokonce poněkud nižší, což u rekombinantních enzymů není obvyklé [7], protože většinou rekombinantní exprese v kvasince spíše lehce potlačuje citlivější GalNAcasovou aktivitu. V tomto případě byla u rekombinantního enzymu naopak lehce podpořena GalNAcasová aktivita.

Poslední částí této práce bylo studium transglykosylačního potenciálu enzymu pomocí analytických transglykosylačních reakcí. Analýza reakčních směsí pouze pomocí TLC je nedostačující, neboť neumožňuje blíže identifikovat vznikající produkty, nemáme-li autentické standardy. Z toho důvodu probíhala paralelně analýza vzorků reakčních směsí pomocí metody LC-MS. Tato metoda umožňuje zjistit molekulovou hmotnost výsledných produktů, a tak odhalit perspektivní reakce a optimalizovat reakční podmínky pro maximalizaci výtěžku požadovaného produktu. Preparativní reakce pak probíhá v obdobném uspořádání jako reakce analytická, pouze ve větším množství. Preparativní reakce jsou ukončeny při spotřebování donoru glykosylu enzymem. V reakcích s kyselinou skořicovou a kyselinou ferulovou nevznikal žádný produkt, což je ve shodě s předchozími pozorováními. Zdá se, že β -*N*-acetylhexosaminidasy nejsou schopny glykosylovat hydroxyl na aromatickém kruhu akceptoru ani hydroxyl, který je součástí karboxylové skupiny. V ostatních navržených reakcích byly produkty o odpovídající molekulové hmotnosti identifikovány. Pro demonstraci transglykosylačního potenciálu enzymu byla připravena *N,N'*-diacetylchitobiosa ve výtěžku 13 %. Izolace dalších produktů a jejich charakterizace budou předmětem další práce pro připravovanou publikaci (Příloha 3).

7 ZÁVĚR

V rámci práce byla připravena rekombinantní β -*N*-acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum* produkcí v kvasince *P. pastoris* s podobnými vlastnostmi jako β -*N*-acetylhexosaminidasa z původního houbového producenta. Příprava rekombinantního enzymu je časově méně náročná a má vyšší výtěžek, zvláště díky jednokrokové purifikaci pomocí iontově výměnné chromatografie. Purifikace houbového enzymu je naproti tomu tříkrokový proces (kombinace hydrofobní, aniontové a gelové chromatografie) s výslednou specifickou aktivitou v maximální hodnotě 10,8 U/mg [16]. Rekombinantní enzym dosahoval hodnot až 78 U/mg.

Poměr aktivit GalNAcasa/GlcNAcasa mají oba enzymy obdobný. V rámci biochemické charakterizace jsme zjistili, že rekombinantní enzym má širší pH optimum a teplotní optimum má o 10 °C vyšší. Kinetické parametry jsou srovnatelné. Byla potvrzena široká substrátová specifita rekombinantního enzymu s řadou akceptorů a transglykosylační schopnosti při přípravě *N,N'*-diacetylchitobiosy.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-----------------------|--|
| AoHex | β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidasa z <i>Aspergillus oryzae</i> |
| CAZy | Databáze enzymů (<i>The Carbohydrate-Active EnZymes database</i>) |
| CCF | Sbírka houbových kultur (<i>Culture Collection of Fungi</i>) |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EC | Číselný klasifikační systém enzymů (<i>Enzyme Commission Number</i>) |
| GalNAc _{asa} | β - <i>N</i> -Acetylgalaktosaminidasa (2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosidhydrolasa) |
| GalNAc | <i>N</i> -Acetylgalaktosamin (2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosa) |
| GH | Glykosidhydrolasa (<i>Glycoside Hydrolase</i>) |
| GlcNAc _{asa} | β - <i>N</i> -Acetylglukosaminidasa (2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosidhydrolasa) |
| GlcNAc | <i>N</i> -Acetylglukosamin (2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa) |
| HexA; B; D | β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidasa A; B; D |
| HPLC | Vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>) |
| LB | Luria-Bertani |
| LMW | Molekulový marker (<i>Low Molecular Weight marker</i>) |
| NMR | Nukleární magnetická resonance (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>) |
| PDB | Databáze krystalových struktur (<i>Protein Data Bank</i>) |
| <i>P. oxalicum</i> | <i>Penicillium oxalicum</i> |
| <i>P. pastoris</i> | <i>Pichia pastoris</i> |
| <i>p</i> NP | <i>p</i> -nitrofenyl |
| PoHex | β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidasa z <i>Penicillium oxalicum</i> |
| SAC | Katalytický mechanismus s asistencí substrátu (<i>Substrate-Assisted Catalysis</i>) |
| <i>SacI</i> | Restrikční endonukleasa ze <i>Streptomyces achromogenes</i> |

| | |
|--------------|--|
| SDS-PAGE | Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným |
| TAE | Tris-acetát-EDTA |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| <i>TfHex</i> | β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidasa z <i>Talaromyces flavus</i> |
| TIM | Triosafosfátizomerasa |
| TLC | Tenkovrstvá chromatografie (<i>Thin Layer Chromatography</i>) |
| UPD-GalNAc | uridin-5'-difosfát- <i>N</i> -acetyl- α -D-galaktosamin |
| UPD-GlcNAc | uridin-5'-difosfát- <i>N</i> -acetyl- α -D-glukosamin |
| UV | Ultrafialový (<i>Ultra violet</i>) |
| YNB | <i>Yeast Nitrogen Base</i> |
| YP(D) | <i>Yeast extract Peptone (Dextrose)</i> |

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BOJAROVÁ, Pavla a Vladimír KŘEN. Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. *Trends in Biotechnology* [online]. 2009, **27**(4), 199-209 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.12.003. ISSN 01677799. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779909000304>
2. BOJAROVÁ, Pavla, Ruben R. ROSENCRANTZ, Lothar ELLING a Vladimír KŘEN. Enzymatic glycosylation of multivalent scaffolds. *Chemical Society Reviews* [online]. 2013, **42**(11) [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1039/c2cs35395d. ISSN 0306-0012. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2cs35395d>
3. WEIGNEROVÁ, Lenka a Eva RAJNOCHOVÁ-HERKOMMEROVÁ. Enzymová reverzní glykosylace. *Chem. Listy*, 1999, 93: 781-787.
4. WATKINS, Winifred M. Glycosyltransferases, early history, development and future prospects. *Carbohydrate Research* [online]. 1986, **149**(1), 1-12 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)90364-1. ISSN 00086215. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621500903641>
5. BOJAROVÁ, Pavla a Vladimír KŘEN. Glycosidases in Carbohydrate Synthesis: When Organic Chemistry Falls Short. *CHIMIA International Journal for Chemistry* [online]. 2011, **65**(1), 65-70 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.2533/chimia.2011.65. ISSN 00094293. Dostupné z: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=0009-4293&volume=65&issue=1&spage=65>
6. BOJAROVÁ-FIALOVÁ, Pavla a Vladimír KŘEN. Enzymatic approaches to O-glycoside introduction: glycosidases. 2007.
7. BOJAROVÁ, Pavla, Natalia KULIK, Michaela HOVORKOVÁ, Kristýna SLÁMOVÁ, Helena PELANTOVÁ a Vladimír KŘEN. The β -N-Acetylhexosaminidase in the Synthesis of Bioactive Glycans: Protein and Reaction Engineering. *Molecules* [online]. 2019, **24**(3) [cit. 2019-04-28]. DOI:

- 10.3390/molecules24030599. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/24/3/599>
8. 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. *Advanced Synthesis & Catalysis* [online]. 2015, **357**(8), 1941-1950 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1002/adsc.201500075. ISSN 16154150. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adsc.201500075>
 9. SLÁMOVÁ, Kristýna, Pavla BOJAROVÁ, Lucie PETRÁSKOVÁ a Vladimír KŘEN. β -N-Acetylhexosaminidase: What's in a name...?. *Biotechnology Advances* [online]. 2010, **28**(6), 682-693 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.04.004. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975010000431>
 10. SLÁMOVÁ, Kristýna a Pavla BOJAROVÁ. Engineered N-acetylhexosamine-active enzymes in glycoscience. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2017, **1861**(8), 2070-2087 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.03.019. ISSN 03044165. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416517301101>
 11. GLOSTER, Tracey M., Johan P. TURKENBURG, Jennifer R. POTTS, Bernard HENRISSAT a Gideon J. DAVIES. Divergence of Catalytic Mechanism within a Glycosidase Family Provides Insight into Evolution of Carbohydrate Metabolism by Human Gut Flora. *Chemistry & Biology* [online]. 2008, **15**(10), 1058-1067 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.chembiol.2008.09.005. ISSN 10745521. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074552108003621>
 12. DALL'ACQUA, William a Paul CARTER. Substrate-assisted catalysis: Molecular basis and biological significance. *Protein Science* [online]. 2000, **9**(1), 1-9 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1110/ps.9.1.1. ISSN 09618368. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1110/ps.9.1.1>

13. YAMAMOTO, Kazuhiko. N-Acyl Specificity of Taka-N-acetyl- β -D-glucosaminidase* Studied by Synthetic Substrate Analogs. *The Journal of Biochemistry* [online]. 1973, **73**(3), 631-635 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130121. ISSN 1756-2651. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jb/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a130121>
14. 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* [online]. 2018, **285**(3), 580-598 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1111/febs.14360. ISSN 1742464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/febs.14360>
15. BOJAROVÁ, Pavla, Natallia KULIK, Kristýna SLÁMOVÁ, Martin HUBÁLEK, Michael KOTIK, Josef CVAČKA, Helena PELANTOVÁ a Vladimír KŘEN. Selective β -N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus versicolor*—a tool for producing bioactive carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2019, **103**(4), 1737-1753 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1007/s00253-018-9534-z. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-018-9534-z>
16. RYŠLAVÁ, Helena, Alžběta KALEDOVÁ, Veronika DOUBNEROVÁ, et al. Enzymatic characterization and molecular modeling of an evolutionarily interesting fungal β -N-acetylhexosaminidase. *FEBS Journal* [online]. 2011, **278**(14), 2469-2484 [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08173.x. ISSN 1742464X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2011.08173.x>
17. CREGG, James M., Thomas S. VEDVICK a William C. RASCHKE. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology* [online]. 1993, **11**(8), 905-910 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1038/nbt0893-905. ISSN 1087-0156. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nbt0893-905>

18. CREGG, James, M., Knut R. MADDEN, Kevin J. BARRINGER, Gregory P. THILL a Cathy A. STILLMAN. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* [online]. 1989, **9**(3), 1316-1323 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1128/MCB.9.3.1316. ISSN 0270-7306. Dostupné z: <http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.9.3.1316>
19. WEIGNEROVÁ, Lenka, Petra VAVRUŠKOVÁ, Andrea PIŠVEJCOVÁ, Joachim THIEM a Vladimír KŘEN. Fungal β -*N*-acetylhexosaminidases with high β -*N*-acetylgalactosaminidase activity and their use for synthesis of β -GalNAc-containing oligosaccharides. *Carbohydrate Research* [online]. 2003, **338**(9), 1003-1008 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/S0008-6215(03)00044-2. ISSN 00086215. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621503000442>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

| | |
|--|----|
| Obr. 1 - Reakce katalyzované glykosidasami | 14 |
| Obr. 2 – Invertující, retenující a SAC mechanismus..... | 16 |
| Obr. 3 – Krystalová struktura AoHex | 19 |
| Obr. 4 – Štěpení <i>p</i> NP-GlcNAc a <i>p</i> NP-GalNAc za katalýzy PoHex | 24 |
| Obr. 5 – Molekulární model PoHex | 26 |
| Obr. 6 – Exprese PoHex v <i>P. pastoris</i> | 37 |
| Obr. 7 – Zakoncentrování enzymu ultracentrifugací..... | 41 |
| Obr. 8 – Screening exprese PoHex v <i>P. pastoris</i> pomocí SDS-PAGE | 46 |
| Obr. 9 – Vzorky kultur 5-8 pod mikroskopem..... | 48 |
| Obr. 10 – Čistota purifikovaných vzorků PoHex-7 a PoHex-8 dle SDS-PAGE..... | 50 |
| Obr. 11 – Struktury akceptorů v analytických transglykosylačních reakcích | 56 |
| Obr. 12 – Příprava <i>N,N'</i> -diacetylchitobiosy | 56 |
| Obr. 13 – Chromatogram reakční směsi pro přípravu <i>N,N'</i> -diacetylchitobiosy, LC-MS..... | 57 |

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

| | |
|--|----|
| Tab. 1 – Koncentrace a čistota plasmidů <i>Pohex-1</i> a <i>Pohex-2</i> | 45 |
| Tab. 2 – Screening exprese <i>PoHex</i> v <i>P. pastoris</i> , GlcNAcasová aktivita | 47 |
| Tab. 3 – Screening exprese <i>PoHex</i> v <i>P. pastoris</i> , GalNAcasová aktivita..... | 47 |
| Tab. 4 – Screening exprese <i>PoHex</i> v <i>P. pastoris</i> , poměr aktivit..... | 47 |
| Tab. 5 – Průběh purifikace <i>PoHex</i> iontově výměnnou chromatografií. | 49 |
| Tab. 6 – Poměr aktivit purifikovaných rekombinantních enzymů <i>PoHex-7</i> , <i>PoHex-8</i> a tří vzorků <i>PoHex</i> CCF 1959 z houbového producenta..... | 49 |
| Tab. 7 – Časová závislost aktivit <i>PoHex-7</i> v 0-24 hod..... | 52 |
| Tab. 8 – Analytické transglykosylační reakce s <i>PoHex-7</i> | 55 |

12 SEZNAM POUŽITÝCH GRAFŮ

| | |
|--|----|
| Graf 1 – pH optimum..... | 51 |
| Graf 2 – pH stabilita..... | 52 |
| Graf 3 – Teplotní optimum..... | 53 |
| Graf 4 – Kinetická křivka hydrolýzy substrátu <i>p</i> NP-GlcNAc | 54 |
| Graf 5 – Kinetická křivka hydrolýzy substrátu <i>p</i> NP-GalNAc..... | 54 |

13 SEZNAM PŘÍLOH

| | |
|--|----|
| Příloha 1 – Nukleotidová sekvence genu <i>Pohex</i> | 72 |
| Příloha 2 – Výsledky NMR – <i>N,N'</i> -diacetylchitobiosa | 73 |
| Příloha 3 – Abstrakt zvaného článku do časopisu <i>Biochimica et Biophysica Acta</i> – Proteins and Proteomics (IF 2,6, submice červenec 2019)..... | 74 |

β -N-Acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum*

Vector: pPICZ α A

Cloning strategy (or cloning sites): *EcoRI* + *KpnI*

The sequence *PoHex* gene contains a single open reading frame of 1803 bp coding for 601 amino acids

GenBank: EU189026.1, contains 2496 bp

```
catatatcgggtaagactgacatagatgtccatgcatcacgatagttcttgaatgacaaagtctatcacata
cgtcaccaatttcataattctcgcgatggggtttggaagggatcatcaaattcccagtgatcattgcgctaccgcgc
tggccctcccgcgcaaatattgcgctcttgggcatcgtttgaaactgccgatatctcgcaagatggcagacacgaa
aacgagccttatggccagagggccttgaaacagcactatttcatttcagcatcaagacacacgctccaccttgaa
tggacgtcccgtatctttctgtgagcatgacgacaggatccagtagcttttaaataggctcggctcacctcgcctg
cttcataaaattgccccgttctcttccactctcccgcactcaccctctcactttctcctgatcgtgctcgcact
gattcacgacttgggttttctaccttcacgatgaagtgtaccgccttgtttgggtggcttggcgcctttccgcct
cgctagccacggccgtcaaggtgaatcccttgcccgcacctcgcaatatcacctggggctcctccgggtcccat
ttcaatcacgaagccggcgctacatctcgagaatcaccatggccagaaccaagatatcctgcaccacgcctgg
gatcggacgtgggcccaccatcaccaacctcgaatgggtgccgcgctatcgaggcgccgattccctcattcc
gaccattcccgaccctgcgaccaggtgaagcgtgacaccgcccgcgaccgccattcactccgtgcacctgtc
cgtcgtcgcgatgcggtgacagcctgcagcaggggtggacgagctctataccttggaggtcactgccgactcg
ggaccatccagattcatgcccagaccgtgtgggtgcgattcatgccatgaccacctgacgagcgtggtca
ttacggatggccatgggaacctgatcattgaacagcccgtcaagattcaggatgctccgctgtatccctaccg
gggtatcatgatcgatacgggacgaaaacttcatctctgtcccgaagatcctcgagcagattgacggcatggcc
ctctccaaactcaatgtgctgcatctggatgatacccaatcgtggcccgttcagattcgggtcgtatc
ctcagatgaccaaggacgcctactcgagccgtgaaatctacaccgagaccgacctccgcccgcgttctggccta
tgacgtgcgctggcgtccgcgtcattccagaggtcgacatgccggggcactcagcctccgggtggaaacaa
gtcgatccggacgtggtgacctgcaccgatacatggtggtccaacgatgactggccaagcacaccgcggtgg
agcctaaccccgggagttggacatcatctacaacaagacctatgaagttgtgggcaacgtctacaaagatct
gtcggccatcttcagcgcacaactggttccacgtgggtggcagcagcttcagaacaattgtttcaatttcagt
accacatcaccaagtgttccgagagatccctcgcgaacctacaacgacctgtctcagtagctggtggtgacc
acgctttgccatctttcacggaaccggagggccccagcgtcgctgatgatgtgggaagatacttcatcaa
cacggacgctgctcatcacgttccgagggacattgtgatgagctcctggaacaatggtatcgacaatatcaag
aatttgaccgcaagcggattcgacgtggtcgtctcctcagccgacttcccttatctcgactgcggtctttgcgg
gctttgtgggcaacgatccccgatacaacgtgatgagcaacccccgggggtgatgtcaccttcaactacggcgg
tagcgggtggttccctggtgcgcgcttacaagtccctggcaacgtatctacgactacgacttaccaccaacctc
actgcatcggaaagcgaagcacgtcatcgggtgccgaggtcccttgtggtcggaaacaggtcgatgatgtacca
tttccagcaagatgtggcctcgagcggccgctctcggcgaattgggtggtcaggcaaccgagacgcttctgg
ccacaagcgtaccaccagctcacacagcgcctgttgaacttccgcgagtatctggttgccaatggcgtcatg
gccaccaacctggcgcaaaagtactgcttgacgatccccatgcgtgacgactgtactacaaccagagtgtaa
tcacacctgagctgggaacttgatgtcttgaattcgaggactcgttggcggcattcatggttgggtgattct
ttttccccggaggacattcaaatagccaatgcgggcatcgtcgatctgtgctgtgactgttgattgttactc
tctgtttttctctctttatattcatcatcagcctttacttttcgataccattatcaaaccacctattgcagt
tgctttgacttttg
```

TGA – STOP codon

Příloha 2 – Výsledky NMR – N,N'-diacetylchitobiosa

NMR data byla naměřena na spektrometru Bruker Avance III 600 (600.23 MHz pro ^1H , 150.93 MHz pro ^{13}C) v D_2O při 30 °C. Signály jednotlivých glukosových jednotek byly přiřazeny pomocí 2D experimentů HSQC a HSQC-TOCSY, glykosidická vazba pak byla prokázána posunem uhlíku C-4 k 80 ppm a především HMBC korelací mezi tímto uhlíkem a anomerním vodíkem následující cukerné jednotky. Kvůli silnému překryvu signálů je většina protonových posunů odečtena z HSQC experimentu a uvedena s přesností na 2 desetinná místa.

^1H a ^{13}C NMR data (600.23 MHz pro ^1H , 150.93 MHz pro ^{13}C , D_2O , 30 °C)

Alfa

| | | δ_{C} | m | δ_{H} | n | m. | J[Hz] |
|---------------------------|----------|---------------------|---|---------------------|---|----|-------|
| GlcNAc^A | 1 | 90.68 | D | 5.211 | 1 | d | |
| | 2 | 53.86 | D | 3.90 | 1 | m | |
| | 3 | 69.54 | D | 3.90 | 1 | m | |
| | 4 | 80.12 | D | 3.65 | 1 | m | |
| | 5 | 70.21 | D | 3.90 | 1 | m | |
| | 6 | 60.3 | T | 3.81 | 1 | m | |
| | | | | 3.70 | 1 | m | |
| GlcNAc^B | 1 | 101.71 | D | 4.617 | 1 | d | 8.5 |
| | 2 | 55.86 | D | 3.77 | 1 | m | |
| | 3 | 73.71 | D | 3.60 | 1 | m | |
| | 4 | 69.99 | D | 3.50 | 1 | m | |
| | 5 | 76.14 | D | 3.52 | 1 | m | |
| | 6 | 60.8 | T | 3.94 | 1 | m | |
| | | | | 3.78 | 1 | m | |

Beta

| | | δ_{C} | m | δ_{H} | n | m. | J[Hz] |
|---------------------------|----------|---------------------|---|---------------------|---|----|-------|
| GlcNAc^A | 1 | 95.05 | D | 4.72 | 1 | m | |
| | 2 | 56.34 | D | 3.71 | 1 | m | |
| | 3 | 72.76 | D | 3.71 | 1 | m | |
| | 4 | 79.69 | D | 3.64 | 1 | m | |
| | 5 | 74.80 | D | 3.54 | 1 | m | |
| | 6 | 60.42 | T | 3.85 | 1 | m | |
| | | | | 3.67 | 1 | m | |
| GlcNAc^B | 1 | 101.7 | D | 4.608 | 1 | d | 8.4 |
| | 2 | 55.84 | D | 3.77 | 1 | m | |
| | 3 | 73.69 | D | 3.60 | 1 | m | |
| | 4 | 69.96 | D | 3.50 | 1 | m | |
| | 5 | 76.15 | D | 3.52 | 1 | m | |
| | 6 | 60.8 | T | 3.94 | 1 | m | |
| | | | | 3.78 | 1 | m | |

signály N-acetylů nebyly ze spekter extrahovány

δ_{C} : 174.99 - 174.70 (2-CO), 22.42 - 22.14 (Ac)

δ_{H} : 2.09 - 2.05 (s, Ac)

Kromě obou anomerů N,N'-diacetylchitobiosy obsahuje vzorek drobné cukerné nečistoty a signál citrátu.

β -N-Acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum* and its remarkable synthetic potential

Pavla Bojarová,^{1,2} Iveta Andreasová,^{1,2} Natalia Kulik,³ Lucie Petrásková,¹ Helena Pelantová,¹ Vladimír Křen¹

¹ Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Videňská 1083, CZ-14220 Praha 4, Czech Republic

² Faculty of Biomedical Engineering, Czech Technical University in Prague, Nám. Sítná 3105, CZ-272 01 Kladno, Czech Republic

³ Laboratory of Structure and Function of Proteins, Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Zámek 136, CZ-37333 Nové Hradky, Czech Republic

The β -N-acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum* (PoHex; EC 3.2.1.52) is a fungal glycosidase with an outstandingly high GalNAcase/GlcNAcase activity.¹ It has a remarkable synthetic capability and can process carbohydrates functionalized at various positions, especially at C-2,² C-4,³ and C-6.⁴ We present here an optimized production of this enzyme in the eukaryotic host of *Pichia pastoris*, followed by elegant one-step purification to homogeneity. The resulting recombinant enzyme has biochemical and catalytic properties comparable to the fungal wild type.¹ The good-yielding production of the recombinant enzyme (3 mg/100 mL cultivation media) greatly broadens the scope of synthetic applications. We further demonstrate the synthetic utility and broad tolerance to substrate modifications of PoHex in the preparation of a series of novel functionalized disaccharides. The synthetic results were supported by substrate docking into the molecular model of PoHex and molecular dynamics simulations.

References

1. H. Ryšlavá, A. Kalendová, V. Doubnerová, P. Skočdopol, V. Kumar, Z. Kukačka, P. Pompach, O. Vaněk, K. Slámová, P. Bojarová, N. Kulik, R. Ettrich, V. Křen, K. Bezouška: Enzymatic characterization and molecular modeling of an evolutionarily interesting fungal β -N-acetylhexosaminidase. *FEBS J.* 2011, **278**, 2469-2484.
2. P. Fialová, L. Weignerová, J. Rauvolfová, V. Přikrylová, A. Pišvejcová, R. Ettrich, M. Kuzma, P. Sedmera, V. Křen: Hydrolytic and transglycosylation reactions of N-acyl modified substrates catalysed by β -N-acetylhexosaminidases. *Tetrahedron* 2004, **60**, 693-701.
3. K. Slámová, R. Gažák, P. Bojarová, N. Kulik, R. Ettrich, H. Pelantová, P. Sedmera, V. Křen: 4-Deoxy-substrates for β -N-acetylhexosaminidases: how to make use of their loose specificity. *Glycobiology* 2010, **20**, 1002-1009.
4. P. Bojarová, K. Slámová, K. Křenek, R. Gažák, N. Kulik, R. Ettrich, H. Pelantová, M. Kuzma, S. Riva, D. Adámek, K. Bezouška, V. Křen: Charged hexosaminides as new substrates for β -N-acetylhexosaminidase-catalyzed synthesis of immunomodulatory disaccharides. *Adv. Synth. Catal.* 2011, **353**, 2409-2420.