

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Mgr. Michal Grulich

Studium enantioselektivity a syntézy β -laktamových antibiotik katalyzované penicilin-G-acylasou: biokatalýza a *in-silico* experimenty

Study of enantioselectivity and synthesis of β -lactam antibiotics catalyzed by penicilin G acylase: biocatalysis and *in-silico* experiments

Disertační práce

Vedoucí disertační práce: RNDr. Pavel Kyslík, CSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

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

V Praze.....

Podpis:.....

Mgr. Michal Grulich

Prohlašuji, že Mgr. Michal Grulich rozhodujícím způsobem (20-85 %) přispěl ke vzniku všech publikací, které jsou přílohami této disertační práce. Sám provedl většinu experimentů a významně se podílel na jejich plánování, interpretaci výsledků a na sepsání publikací.

V Praze.....

Podpis:.....

RNDr. Pavel Kyslík, CSc.

Poděkování:

Děkuji zejména svému školiteli RNDr. Pavlu Kyslíkovi, CSc, za vedení při vypracování disertační práce, RNDr. Stanislavu Bečkovi, CSc. za přínosné a užitečné rady, Mgr. Janu Brezovskému, Ph.D. za vynikající spolupráci a RNDr. Cyrilu Bařinkovi, Ph.D. za nové přínosné poznatky a diskuze. Dále také děkuji celému kolektivu Laboratoře Enzymových Technologií za podporu a příjemné pracovní prostředí. Poděkování patří také mé rodině za neutuchající podporu v průběhu celého doktorského studia.

Obsah

Seznam zkratek	8
Cíl práce	9
Abstrakt.....	10
Abstract	11
1 Úvod	12
2 Literární přehled	13
2.1 Amidohydrolasy β -laktamových antibiotik a jejich význam.....	13
2.2 Zdroje penicilin-G-acylasy	13
2.3 Struktura a maturace bakteriální PGA	15
2.4 Diverzita prepropeptidů α a β podjednotek PGA	17
2.5 Katalytické místo PGA	17
2.6 Enantiosektivita PGA.....	20
2.6.1 Enantiosektivní reverzní hydrolýzy (asymetrická syntéza nebo enantiosektivní acylace).....	20
2.6.2 Enantiosektivní hydrolýzy	21
2.6.3 Aplikace enantiosektivity PGA pro produkci čistých chirálních látek.....	21
2.6.4 Enantiosektivní reverzní hydrolýza ve vodném prostředí	21
2.6.5 Enantiosektivní reverzní hydrolýza ve dvoufázovém vodném systému nebo organické fázi.....	22
2.6.6 Enantiosektivní hydrolýza ve vodné fázi obsahující ko-solvent.....	22
2.6.7 Využívání enantiosektivity PGA v analytických zařízeních	25
2.7 PGA jako promiskuitní enzym	27
2.7.1 Markovnikova adiční reakce.....	27

2.7.2	Transesterifikace	27
2.7.3	Henryho reakce	27
2.8	Využití PGA v biosenzorech	28
2.9	Semi-syntetická antibiotika: chemie vs. bioproces	29
2.9.1	Kineticky řízená syntéza	29
2.9.2	Nukleofily pro nové generace SSBA	30
2.9.3	Vylepšování PGA z pohledu parametru S/H	33
2.9.4	Budoucí trendy aplikace PGA	33
3	Materiál a metody:	35
3.1	Chemikálie	35
3.2	Pufry	37
3.2.1	Komerční pufry pro krystalizaci	37
3.2.2	Komerční pufry pro mutagenezi	37
3.2.3	Pufry pro agarosovou elektroforézu	37
3.2.4	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)	38
3.2.5	Dialyzační pufr	39
3.2.6	Pufry pro purifikaci penicilinacylas	39
3.2.7	Pufry pro stanovení reakčních produktů	39
3.2.8	Kultivační média	39
3.3	Enzymy pro molekulární biologii	40
3.4	Speciální přístroje a příslušenství	40
3.5	Software	41
3.6	Mikroorganismy	41
3.7	Příprava hrubého extraktu PGA ^{Ec} /PGA ^A /PGA ^A Pheβ24Cys	42

3.8	Purifikace PGA ^{Ec}	42
3.9	Stanovení hydrolytické aktivity chromogenní reakcí	44
3.9.1	Orientační spektrofotometrické stanovení aktivity PGA	44
3.10	Stanovení specifické hydrolytické aktivity	44
3.11	Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS (SDS-PAGE)	44
3.12	Charakteristika PGA ^{Ec} a PGA ^A z pohledu SSBA	45
3.13	Syntéza β -laktamových antibiotik za použití imobilizovaného enzymu	46
3.14	Enantioselektivita PGA ^{Ec} a PGA ^A	46
3.14.1	Chemická syntéza N-fenylacetylovaných derivátů racemických směsí α/β -aminokyselin	46
3.14.2	Reakce pro stanovení enantioselektivity	47
3.14.3	Výpočet enantioselektivity	48
3.15	Krystalizace PGA ^A	49
3.15.1	Optimalizace krystalizace metodou visících kapek	49
3.15.2	Optimalizace krystalizace metodou sedících kapek	49
3.15.3	Optimalizace krystalizace PGA ^A po štěpení termolysinem	50
3.16	Molekulární modelování	51
3.17	Cílená modifikace PGA ^A a techniky rekombinantní DNA	66
4	Výsledky	70
4.1	Charakteristika purifikovaných PGA ^A a PGA ^{Ec} : Enantioselektivní hydrolýzy	70
4.2	Kinetické parametry PGA ^A a PGA ^{Ec} pro hydrolýzy SSBA	71
4.3	Kineticky řízené syntézy SSBA při nízkých koncentracích substrátů	72
4.4	Krystalizační experimenty nového enzymu PGA ^A	74
4.5	Homologní model PGA ^A	77

4.5.1	<i>In-silico</i> potvrzení rozdílů v enantioselektivitách PGA ^{Ec} a PGA ^A	77
4.5.2	Využití homologního modelu pro predikci nových substrátů	79
4.5.3	Molekulární modelování syntéz SSBA s 3D-strukturami PGA ^{Ec} a PGA ^A	82
4.6	<i>In-silico</i> mutageneze PGA ^A	84
4.6.1	Vylepšení syntetické aktivity záměnou vybraných aminokyselin v aktivním místě	84
4.6.2	Konstrukce zmutovaného <i>pga^A</i> kódujícího záměnu Phe24β→Cys	85
4.7	Charakterizace rekombinantní PGA ^A Pheβ24Cys	87
4.7.1	Kinetické parametry PGA ^A Pheβ24Cys pro hydrolýzy	87
4.7.2	Kineticky řízené syntézy SSBA při vysokých koncentracích substrátů	88
5	Diskuze	95
6	Souhrn	105
7	Seznam použité literatury:	107
8	Přílohy	116

Seznam zkratek

SSBA	<u>s</u> emi- <u>s</u> yntetická <u>b</u> eta-laktamová <u>a</u> ntibiotika
API	účinná látka – <u>a</u> ctive <u>p</u> harmaceutical <u>i</u> ngredients
penG	<u>p</u> enicilin <u>G</u>
cephC	cefalosporin C – <u>c</u> ephalosporin <u>C</u>
PGA	<u>p</u> enicilin- <u>G</u> - <u>a</u> cylasa
6-APA	kys. 6-aminopenicilánová - 6- <u>a</u> minopenicillanic <u>a</u> cid
7-ADCA	kys. 7-deacetoxycefalosporánová - 7- <u>a</u> mino- <u>d</u> eacetoxy <u>c</u> ephalosporanic <u>a</u> cid
7-AVCA	7-amino-3-vinylcefalosporanová kys. - 7- <u>a</u> mino-3- <u>v</u> inyl <u>c</u> ephalosporanic <u>a</u> cid
7-APRA	7-amino-3-profenylcefalosporanová kys. - 7-amino-3-prophenylcephalosporanic acid
7-ACCA	7- amino 3-chlorocefalosporanová kys. – 7- <u>a</u> mino 3- <u>c</u> hloro <u>c</u> ephalosporanic <u>a</u> cid
7-ACA	7-aminocefalosporanová kys. - 7- <u>a</u> mino <u>c</u> ephalosporanic <u>a</u> cid
7-TACA	7-amino-3-(1-metyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)thiometylcefalosporanová kys. – 7- <u>a</u> mino-3-(1-methyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl) <u>t</u> hiomethyl <u>c</u> ephalosporanic <u>a</u> cid
7-SACA	7-amino-3-(1-sulfometyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)thiometylcefalosporanová kys. 7- <u>a</u> mino-3-(1- <u>s</u> ulfomethyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl) <u>t</u> hiomethyl <u>c</u> ephalosporanic <u>a</u> cid
7-ZATA	7-amino-3-(5-metyl-1,2,3,4-thiazol-2-yl)thiometylcefalosporanová kys. 7- <u>a</u> mino-3-(5-methyl-1,2,3,4-thiazol-2-yl) <u>t</u> hiomethyl <u>c</u> ephalosporanic <u>a</u> cid
POM-6-APA	pivaloyloxymetyl 6-aminopenicilanová kys. <u>p</u> ivaloylo <u>x</u> ymetyl <u>6</u> -aminopenicillanic acid
TzAA-OMe	metyl ester tetrazolyloctové kyseliny - <u>t</u> etrazolyl <u>a</u> cetic <u>a</u> cid <u>m</u> ethyl <u>e</u> ster
N	<u>n</u> ukleofil
AD	<u>a</u> cyl- <u>d</u> onor
NIPAB	6-nitro-3-(fenylacetamido)-benzoová kys. - 6- <u>n</u> itro-3-(<u>p</u> henyl <u>a</u> cetamido)- <u>b</u> enzoic acid
<i>p</i> -DAB	<i>p</i> - <u>d</u> imemtylaminobenzaldehyd
TFA	kyselina trifluoroctová – <u>t</u> ri <u>f</u> luoracetic <u>a</u> cid
D-PGME	metyl ester fenylglycinu – <u>p</u> henylglycine <u>m</u> ethyl <u>e</u> ster
D-HPGME	metyl ester 4-hydroxyfenylglycinu – 4-hydroxyphenylglycine <u>m</u> ethyl <u>e</u> ster
D-PGA	amid fenylglycinu – <u>p</u> henylglycine <u>a</u> mide
D-HPGA	amid 4-hydroxyfenylglycinu – 4- <u>h</u> ydroxyphenylglycine <u>a</u> mide
PAA	kyselina fenylactová – <u>p</u> henyl <u>a</u> cetic <u>a</u> cid
PMSF	fenylmetylsulfonyl fluorid – <u>p</u> henyl <u>m</u> ethyl <u>s</u> ulphonyl <u>f</u> luoride
N-PhAc	N-fenylacetyl – <u>N</u> - <u>p</u> henyl <u>a</u> cetyl
CLEA	zesítěné enzymové agregáty – <u>c</u> ross- <u>l</u> inked <u>e</u> nzyme <u>a</u> ggregates

Cíl práce

Cílem této práce je charakterizovat katalytický potenciál enzymu PGA^A , pocházejícího z rodu *Achromobacter* CCM4824, který katalyzuje hydrolýzu nebo syntézu stabilní amidické vazby v rámci širokého spektra substrátů. Mezi tyto substráty můžeme zařadit např. α - a β -aminokyseliny reprezentující skupinu sloučenin se značným aplikačním využitím. Význam opticky čistých α/β -aminokyselin jako syntetických intermediátů pro syntézu opticky aktivních látek klade vysoký důraz na získání takovéhoto sloučenin ve vysokém měřítku enantiomerní čistoty.

Obdobně bylo cílem také charakterizovat enzym PGA^A z pohledu kineticky řízené syntézy semi-syntetických β -laktamových antibiotik. Tato snaha je navíc umocněna skutečností, že penicilinacylasy jsou v současnosti jedinou skupinou enzymů, které jsou využívány jako biokatalyzátory ve farmaceutickém průmyslu v průmyslovém měřítku a představují tak efektivní environmentálně šetrnou alternativu k chemickým syntetickým procesům.

Smyslem charakterizace je jednak snaha o pochopení zákonitostí mechanismu enantioselektivního rozlišení na molekulární úrovni a jednak porovnání s nejprozkoumanější a nejpoužívanější PGA^{Ec} pocházející z *E.coli*.

Disertační práce byla vypracována v Laboratoři enzymových technologií na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky, v.v.i.

Abstrakt

Penicilin-G-acylasy (PGA) se řadí mezi enantioselektivní enzymy katalyzující hydrolýzu stabilní amidické vazby v rámci širokého spektra substrátů majících často velký aplikační potenciál. PGA z mikroorganismů *Escherichia coli* (PGA^{Ec}) a *Achromobacter* sp. CCM4824 (PGA^A) byly použity pro katalýzu enantioselektivních hydrolýz sedmi vybraných N-fenylacetylovaných (N-PhAc) racemických směsí α/β -aminokyselin. Prokázali jsme, že PGA^A vykazovala vyšší stereoselektivitu pro trojici (S)-enantiomerů: N-PhAc- β -homoleucin, N-PhAc- α -terc-leucin a N-PhAc- β -leucin. Dále byl zkonstruován homologní model PGA^A, který byl použit pro molekulární modelování interakcí se stejnými substráty. *In-silico* experimenty zreprodukovaly experimentálně získaná data z enzymaticky katalyzovaných enantioselektivních hydrolýz, což potvrdilo věrohodnost připraveného homologního modelu. Stejný přístup jsme použili pro ověření enantiopreference PGA^A vůči sedmi novým substrátům s aplikačním potenciálem, přičemž pro pětici z nich byla predikována vysoká enantioselektivita PGA^A.

PGA^A byla dále použita v kineticky řízených syntézách β -laktamových antibiotik (SSBA). Enzym byl prokazatelně účinnější při syntéze ampicilinu a amoxicilinu (vyšší S/H poměr a akumulace produktu) oproti PGA^{Ec}. Analogicky k predikci enantioselektivity PGA^A vůči novým substrátům bylo molekulární modelování aplikováno na syntézy SSBA katalyzované PGA^A. Abychom zlepšili parametry syntéz SSBA, provedli jsme *in-silico* cílenou aminokyselinovou záměnu v pozicích Phe24 β a Phe146 α homologního modelu PGA^A. Jako perspektivní modifikace se jevila záměna Phe24 β →Cys, neboť vzdálenost mezi aminoskupinou nukleofilu (N) a karbonylovou skupinou acyl-donoru (AD) se zkrátila z 4,1 na 3,3 Å při syntéze amoxicilinu. Následně byl připraven expresní systém nesoucí mutovaný *pga*^A gen kódující tuto aminokyselinovou záměnu. Purifikovaná rekombinantní PGA^APhe β 24Cys vykazovala v případě syntézy amoxicilinu i ampicilinu podobné hodnoty u všech parametrů jako PGA^A.

Rekombinantní PGA^APhe β 24Cys byla dále použita pro syntézu amoxicilinu za molárního poměru AD/N 1,05 používaného v průmyslu a koncentrace nukleofilu: 1) nad 400 mM a 2) 160 mM.

Účinnost PGA^APhe β 24Cys při syntéze amoxicilinu za koncentrací nukleofilu nad 400 mM a molárního poměru AD/N 1,05 byla studována také ve své stabilizované formě, a sice v podobě CLEA. Hodnota S/H stabilizované formy vzrostla oproti rozpustné formě přibližně o 8 % (z hodnoty 4,9 na 5,0), avšak stupeň konverze se zvýšil výrazně, a to z 22 na 61 %.

Abstract

Penicillin G acylases (PGAs) belong among enantioselective enzymes catalyzing a hydrolysis of stable amide bond in a broad spectrum of substrates, often having high application potential. PGA^{Ec} from *Escherichia coli* and PGA^A from microorganism *Achromobacter* sp. CCM 4824 were used to catalyze enantioselective hydrolyses of seven selected N-phenylacetylated (N-PhAc) α/β -amino acid racemates. The PGA^A showed higher stereoselectivity for three (*S*) enantiomers: N-PhAc- β -homoleucine, N-PhAc- α -*tert*-leucine and N-PhAc- β -leucine. We have constructed a homology model of PGA^A that was used in molecular docking experiments with the same substrates. *In-silico* experiments reproduced the data from experimental enzymatic resolutions confirming validity of employed modeling protocol. We employed this protocol to evaluate enantiopreference of PGA^A towards seven new substrates with application potential. For five of them, high enantioselectivity of PGA^A was predicted for.

PGA^A was further studied in kinetically controlled syntheses of β -lactam antibiotics (SSBA). The PGA^A was significantly more efficient at synthesis of ampicillin and amoxicillin (higher S/H ratio and product accumulation) compared with PGA^{Ec} . Analogously to prediction of enantioselectivity of PGA^A towards new substrates this protocol was applied for SSBA syntheses catalyzed by PGA^A .

To improve parameters of SSBA syntheses, we performed *in-silico* directed modification of PGA^A at position Phe24 β and Phe146 α . As a promising modification appeared to be PGA^A Phe24 β →Cys. The distance between the NH₂ group of nucleophile and carbonyl group of acyl-donor dropped from 4.1 Å to 3.3 Å for amoxicillin. We subsequently constructed *pga^A* gene encoding this amino acid modification. The gene was expressed and recombinant PGA^A Phe β 24Cys was purified. The enzyme exhibited very similar values of all tested parameters in syntheses of amoxicillin and ampicillin compared with PGA^A .

The recombinant PGA^A Phe β 24Cys was further tested in the synthesis of amoxicillin under industrial conditions 1) at a concentration of nucleophile above 400 mM and the molar ratio AD / N 1.05 and 2) at a concentration of nucleophile of 160 mM and the same molar ratio.

Efficiency of stabilized Phe β 24Cys as CLEA was studied in synthesis of amoxicillin at nucleophile concentrations above 400 mM and the molar ratio AD / N 1.05. The value of S / H has increased compared with the soluble form of approximately 8% (from the value of 4.9 to 5.0). The degree of conversion increased greatly, from 22 to 61%.

1. Úvod

Penicilinacylasy řadíme mezi průmyslově nejvýznamnější enzymy, a to z toho důvodu, že umožnily velkoobjemovou průmyslovou výrobu širokého spektra účinných semi-syntetických β -laktamových antibiotik (SSBA), které dnes tvoří zhruba 20 % podíl na světovém trhu s antibiotiky, což představuje 35 000 tun roční světové produkce (1).

Technologie výroby je založena na enzymatické konverzi přírodních penicilinů G a V (PenG a PenV) enzymem penicilinacylasou na klíčové meziproducty pro výrobu SSBA, a sice kyseliny 6-aminopenicilanové a 7-aminodeacetoxycefalosporanové. Z nich se dále připravují buď chemickou nebo enzymovou syntézou SSBA, která vykazuje v porovnání s přírodními peniciliny výrazně lepší antibiotické vlastnosti, mezi něž můžeme zařadit zejména širší spektrum účinku, nižší toxicitu, lepší inhibiční účinek a vhodné farmakokinetické vlastnosti.

V dnešní době je výzkum a vývoj výrazně zaměřen na hledání postupů jak účinně posunout chemickou rovnováhu ve směru syntézy, ale také hledání nových a vhodnějších enzymů pro enzymaticky katalyzované syntézy SSBA, jež postupně nahrazují nákladné a environmentálně nepřívětivé chemické syntézy.

V poslední době nabývá na důležitosti také studium enantioselektivních vlastností penicilinacylas, zejména pak možnost jejich využití jako biokatalyzátorů při produkci opticky aktivních látek využitelných hlavně ve farmaceutickém průmyslu: více jak 70% aktivních látek (API) uvedených nově na trh v roce 2000 bylo enantiomerně čistých a v roce 2001 enantiomerně čisté látky představovaly 36% celkového množství API dostupných na světových trzích (2). Okolo roku 2007 představovalo procentuální zastoupení enantiomerně čistých látek uvedených na trh 75% (3). Biokatalýzy vedoucí k produkci základních stavebních prvků využívaných pro syntézy léčivých enantiomerně čistých látek v průmyslovém měřítku byly detailně popsány teprve nedávno (4). V souvislosti s PGA jsou popisovány zejména enantioselektivní reverzní hydrolýza a enantioselektivní hydrolýza. Obě reakce mohou být prováděny pouze ve vodném prostředí, doplněné o ko-solvent, popřípadě o vybrané elektrolyty, anebo také v samotném organickém rozpouštědle.

2. Literární přehled

2.1. Amidohydrolasy β -laktamových antibiotik a jejich význam

Amidohydrolasy β -laktamových antibiotik (EC 3.5.1.11.) je souhrnný název pro skupinu hydrolytických enzymů patřících do rodiny N-terminálních nuklofilních hydrolas (Ntn-hydrolasy) schopných hydrolyzovat stabilní amidickou vazbu penicilinů a cefalosporinů (5). Podle substrátové specifity rozlišujeme trojici evolučně příbuzných skupin penicilinacylas: 1) penicilin-G-acylasy, 2) penicilin-V-acylasy a 3) ampicilinacylasy (6). Z těchto tří skupin má průmyslový význam především penicilin-G-acylasa. Fyziologická funkce penicilin-G-acylasy v buňce nebyla doposud objasněna, ale má se za to, že se podílí na degradaci fenyloctylovaných sloučenin za vzniku fenyloctové kyseliny, která může být následně využívána specifickými mikroorganismy jako zdroj uhlíku (1, 5, 7).

2.2. Zdroje penicilin-G-acylasy

Bakteriální penicilin-G-acylasy (PGA) patří mezi nejlépe charakterizované industriální enzymy (8, 9, 10, 11) a dosud byly publikovány práce v souvislosti s PGA, které pocházejí např. z rodu *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Kluyvera*, *Providencia*, *Shigella*, *Xanthomonas* a *Xylella* (1, 12, 13, 5).

Byly připraveny rekombinantní kmeny exprimující divoký typ PGA, geneticky modifikované enzymy nebo environmentální geny kódují PGA (14). Ačkoliv bylo klonováno okolo 20 různých genů *pga* a bylo sekvenováno nejméně 14 strukturních genů, doposud byl pouze 4 PGA byly studovány s ohledem na enantiosektivitu a promiskuitu. Na rozdíl od bakteriálních hostitelů, kvasinkové expresní systémy nebyly doposud jako kmeny vhodné pro industriální použití publikovány. V roce 1960 Kaufmann a Bauer (15) demonstrovali schopnost PGA pocházející z *E. coli* (PGA^{Ec}) syntetizovat PenG z kyseliny fenyloctové (PAA) a kyseliny 6-aminopenicilanové (6-APA). Další syntetické aplikace PGA byly popsány s cephemovými jádry 7-ACA, 7-ADCA nebo jejich 3-funkcionalizovanými deriváty (tab. 1, str. 14). V roce 1962 byla reportována enzymatická syntéza prvního ze SSBA - cefalotinu a další laboratorní výzkum vedl k následné syntéze cephalexinu a cefacloru. Dosud byly studovány enzymy z divokých kmenů 10 mikroorganismů (PGA^{Ec}, *Xanthomonas citri*-PGA^{Xc}, *Alcaligenes faecalis*-PGA^{Af}, *Kluyvera cryocrescens*-PGA^{Kcr}, *Kluyvera citrophila*-PGA^{Kc}, *Providencia rettgeri*-PGA^{Pr}, *Kluyveromyces citrophila*-PGA^{Kci}, *Achromobacter sp*-PGA^{Asp}, *Arthrobacter viscosus*-

PGA^{Av} a *Bacillus megaterium* PGA^{Bm}), dále rekombinantní enzymy PGA^{Ec} (16, 17, 18, 19) nebo PGA^{Bm} (20), chimerické a metagenomické PGA (21, 14, 22, 23) v syntéze SSBA.

V současnosti jsou běžně využívány pro velkoobjemové produkce SSBA v kineticky kontrolovaných syntézách katalyzátory založené na immobilizovaných PGA^{Ec}, PGA^{Af} a PGA^{Asp}.

Tab. 1. Přehled popsaných syntéz SSBA katalyzovaných PGA

Antibiotikum	β -laktamové jádro (Nukleofil)	Acyl-donor	Citace
ampicilin	6-APA	D-PGA	24, 25, 26, 27, 14, 22, 23, 17, 28
		D-PGME	29, 25, 14, 30, 23, 18, 31
amoxicilin	6-APA	D-HPGME	25, 32, 33, 34, 28, 31
		D-HPGA	25, 26, 27, 22, 23
cefamandol	7-TACA	MAME	35, 36
cefazolin	7-ZACA	TzAA-OMe	35, 36, 37
cefonicid	7-SACA	MAME	35, 36
cefaclor	7-ACCA	D-PGME	38, 39, 40, 36, 19
cefadroxil	7-ADCA	D-HPGME	25
		D-HPGA	25, 22, 23
cephalexin	7-ADCA	D-PGME	41, 25, 38, 14, 36, 42, 43, 44, 45, 46, 19
		D-PGA	47, 48, 25, 26, 27, 21, 14, 22, 49, 20, 23, 36, 28, 19
cefalotin	7-ACA	2-TAA	50, 36
cefprozil	7-APRA	D-HPGME	19
	7-GPRA→7-APRA	D-HPGHE	51
cefaloglycin	7-ACA	D-PGME	35, 36
penicilin G	6-APA	PA	24, 22
pivampicilin	POM-6-APA	D-PGME	52

Poznámky: 6-APA 6-aminopenicilanová kyselina, 7-ACA 7-aminocefalosporanová kyselina, 7-ADCA 7-aminodeacetoxycefalosporanová kyselina, 7-ACCA 7- amino 3-chlorocefalosporanová kyselina, 7-TACA 7-amino-3-(1-metyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)thiometylcefalosporanová kyselina, 7-ZACA 7-amino-3-(5-metyl-1,2,3,4-thiazol-2-yl)thiometylcefalosporanová kyselina, 7-SACA 7-amino-3-(1-sulfometyl-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)thiometylcefalosporanová kyselina, 7-GPRA 7-fenylacetamido-3-propenylcefalosporanová kyselina, 7-APRA 7-amino-3-propenylcefalosporanová kyselina, POM-6-APA pivaloyloxymetyl 6-aminopenicilanová kyselina, PA fenylacetamid, D-PGA fenylglycin amid, D-HPGHE 4 - hydroxy-D-fenylglycin hydroxyetyl ester, D-HPGA - D- *p*-hydroxyfenylglycin amid, PGME fenylglycin metyl ester, HPGME hydroxyfenylglycin metyl ester, TzAA-OME metyl ester tetrazolyloctové kyseliny, MAME metyl ester mandlové kyseliny, 2-TAA 2-thienylacetamid. Kromě 6-APA, 7-ADCA a 7-ACA jsou ostatní nukleofily 3'- funkcionalizované.

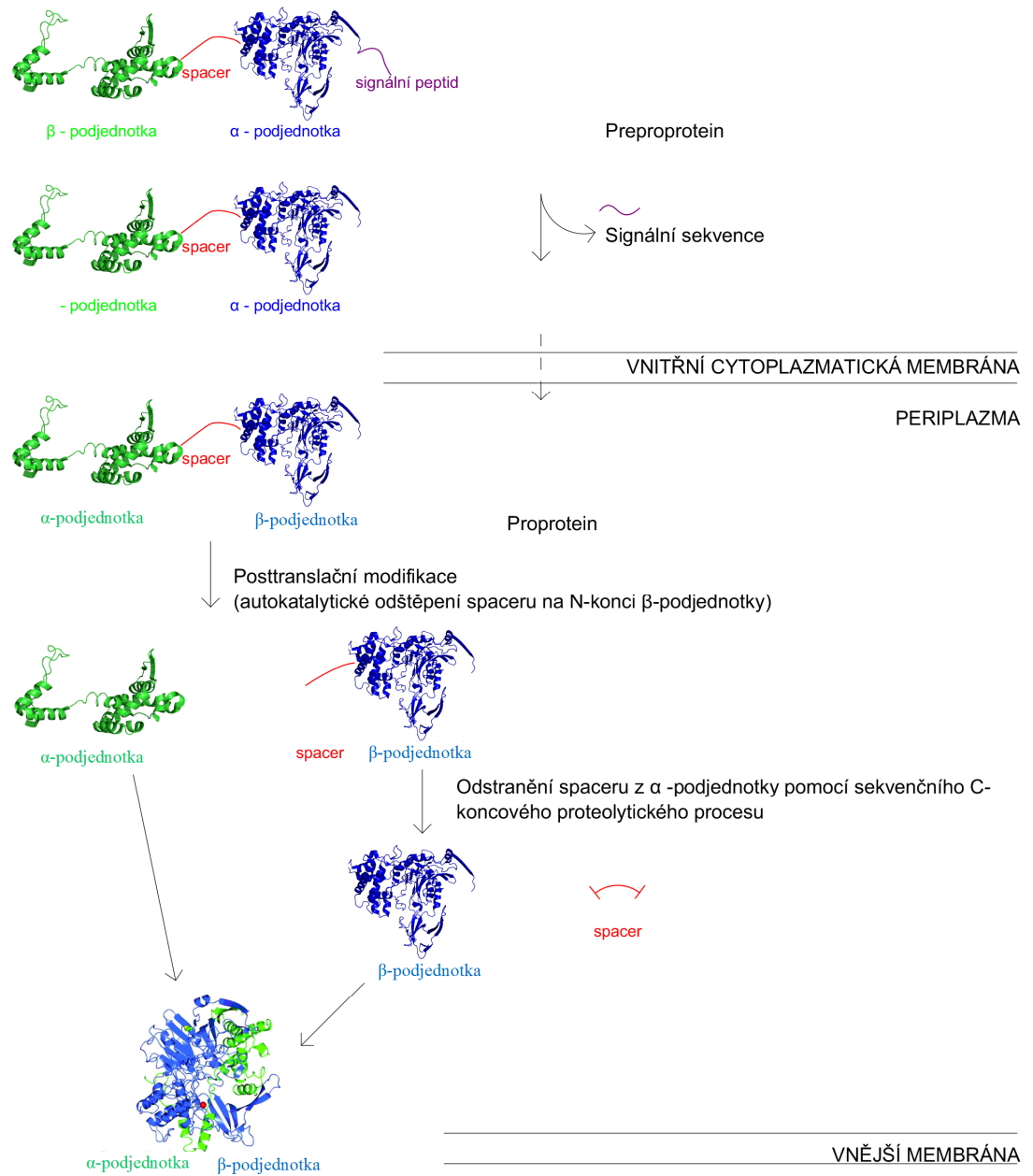
2.3. Struktura a maturace bakteriální PGA

PGA je syntetizována v cytoplasmě jako jednořetězcový prekurzor (preproprotein) skládající se z signální sekvence, α - a β - podjednotky, které jsou odděleny spojovacím peptidem (tzv. spacerem) (53, 54, 55). Signální sekvence spolu s tímto spojovacím peptidem bývá odstraněna při procesingu prekurzoru za vzniku maturovaného enzymu.

Maturovaný enzym PGA je heterodimer, v případě *E. coli* s celkovou velikostí 86 KDa. Podjednotky α a β se skládají z 209 a 557 aminokyselin (56, 57, 58).

Enzymy sdílí $\alpha\beta\alpha$ strukturní sendvičový motiv a akumulují se v periplasmatickém prostoru. Procesing PGA v *E.coli* začíná v cytoplasmě, kde je nascentní polypeptid stabilizován Ca^{2+} ionty. Signální sekvence je štěpena během průchodu přes cytoplasmatickou membránu za vzniku propeptidu a β -podjednotka je poté uvolněna intramolekulárním, autokatalytickým štěpením v periplasmatickém prostoru (54). Intermolekulární uvolnění spaceru z propeptidu (proPGA) generuje C-konec α -podjednotky (obr. 1, str. 14). PGA pocházející z G^+ bakterií, jako jsou *Bacillus megaterium* nebo *Arthrobacter viscosus* je sekretována přímo do růstového média po průchodu přes cytoplasmatickou membránu (9, 59). Maturovaný enzym pak může být nalezen i v cytosolu (60) G^- bakterií (58).

Zmiňovaný preproprotein PGA se skládá ze čtyř strukturních domén, a sice od N-konce to jsou: Signální sekvence, α -podjednotka, spacer a β -podjednotka (61, 62, 63). α -podjednotka hraje klíčovou roli při skládání prekurzoru polypeptidu: skládá se jako první a β -podjednotka se formuje na již dobře poskládané α -podjednotce překrytím jejich hydrofóbních řetězců za vzniku stabilního globulárního intermediátu (64). Správné překrytí α a β podjednotky je podmíněno přítomností Ca^{2+} iontů (54) a má se za to, že i spacer může hrát roli (65, 53) stejně tak jako celistvost C-konce β -podjednotky (obr. 1) (55).



Obr. 1. Posttranslační úpravy a vznik funkční PGA^{Ec} .

2.4. Diverzita prepropeptidů α a β podjednotek PGA

Počet aminokyselinových zbytků ve většině bakteriálních PGA převyšuje 800. Prepropeptid metagenomické PGA, tzv. PAS, je největší a čítá 874 aminokyselinových residuů. Aminokyselinová identita prepropeptidu PGA z *E.coli* v porovnání s ostatními zástupci rodiny *Enterobacteriaceae* je velmi vysoká: přes 99 % s *Shigella sp.* a okolo 83 % s *Kluyvera cryocrescens* a okolo 61 % s *Providencia rettgeri*. Ukazuje to však také na pouze 50 % identitu s prepropeptidem identifikovaným u rodu *Achromobacter* a dokonce méně než 26 % identitu se zástupci G^+ rodu *Arthrobacter* a *Bacillus*. Podobné výsledky co se týče procentuální identity aminokyselinové sekvence byly nalezeny i pro α podjednotku (délka 209-234 AMK) z různých bakterií. Naproti tomu β -podjednotka čítající přibližně 550 aminokyselin se zdá být mnohem konzervovanější a to jak ve své délce tak i vysokou mírou homologie.

2.5. Katalytické místo PGA

Aktivní místo PGA^{Ec} se sestává ze dvou částí (66): 1. Nukleofil vazebné místo preferující hydrofilní skupiny (67) a zahrnující katalytickou aminokyselinu Ser1 β . 2. Acyl vazebné místo s afinitou k hydrofobním skupinám substrátu. Detailní mechanismus hydrolýzy penG, popřípadě syntézy β -laktamových antibiotik zahrnující vznik tetrahedrálního intermediátu je znázorněn na obr. 2 (str. 19) (68).

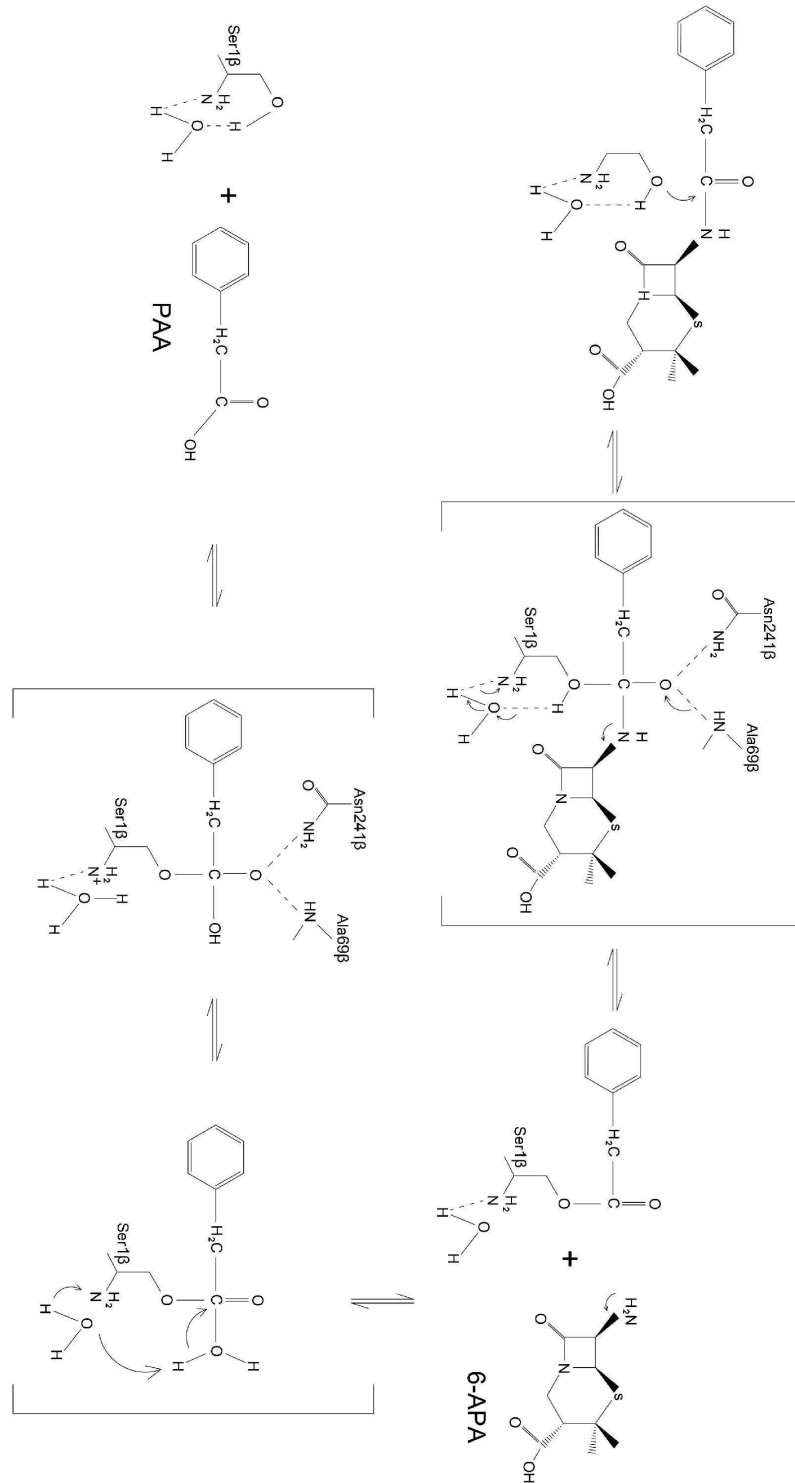
Aminokyselinové zbytky Ser1 β , Gln23 β , Ala69 β a Asn241 β (6) jsou brány jako esenciální aminokyselinová residua v nukleofil vazebném místě v 11 dosud charakterizovaných PGA. Předpokládá se že obecná topologie a kvartérní struktura aktivního centra může být konzervována napříč celou PGA rodinou (62). Lehké variace v aminokyselinových zbytcích jsou ale patrné v acyl vazebném místě, které je u PGA^{Ec} tvořeno z Met142 α , Arg145 α , Phe146 α , Phe24 β , Thr32 β , Pro49 β , Val56 β , Trp154 β a Ile177 β (6, 69). Acyl vazebné místo je zodpovědné za substrátovou specifitu enzymu a aminokyselinové zbytky lokalizované na α -podjednotce PGA jsou konzervované u všech zástupců rodu *Enterobacteriaceae* a *Alcaligenaceae*. PGA ze zástupců G^+ kmenů *Arthrobacter* a *Bacillus* postrádají residuum Arg145 α a PGA^{Av} pocházející z *A. viscosus* nese záměnu Phe146 α →Leu.

β -podjednotka PGA G^+ kmenů *Arthrobacter* a *Bacillus* nese záměny ve všech aminokyselinových pozicích (Phe24 β →Val, Thr32 β →Leu, Pro49 β →Phe, Val56 β →Met, Trp154 β →Tyr a Ile177 β →Leu), zatímco aminokyselinové zbytky u G^- bakterií jsou

nezměněny až na záměnu Val56 β →Leu u rodů *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Providencia* a γ -*Proteobacterium*.

Aminokyselinová residua zahrnutá v interakci s Ca²⁺ jsou konzervována a zahrnují Glu152 α , Asp/Asn336 β , Val/Thr338 β , Asp339 β , Pro/Ile/Glu/Asp468 β a Asp/Glu515 β (67, 70, 71). Do současné doby jsou k dispozici pouze tři trojrozměrné krystalové sktruktury PGA: *E.coli* (24 strukturních variant lišících se především v použitém ligandu) (70, 72, 73, 74, 75, 76), *Alcaligenes faecalis* (2 varianty) (77) a *Providencia rettgeri* (71).

Detailní poznání krystalové struktury PGA^{Ec} a pozic důležitých aminokyselin zahrnutých ve vazbě substrátu a katalýze odhalilo, že nukleofil vazebné místo PGA vykazuje vysokou toleranci vůči substrátu, zatímco vazebné místo pro acyl je vysoce selektivní (78).



Obr.2. Katalytický mechanismus PGA znázorňující hydrolyzu penicilinu G na 6-APA a kyselinu fenylactovou (PAA).

2.6. Enantioselektivita PGA

Enzym katalyzuje dva základní typy reakcí: enantioselektivní reverzní hydrolýzu a enantioselektivní hydrolýzu. V současné době je snaha pro studium enantioselektivity využívat výpočetní techniku za použití přístupu molekulárního modelování. Techniky molekulárního modelování byly použity k vysvětlení přechodových stavů komplexů substrát-enzym (66), rozdílných selektivit PGA^{Ec} a PGA^{Pr} (79, 80) nebo PGA^{Af} a PGA^{Ec} (81). V druhém případě byl, vzhledem k obtížným podmínkám, které doprovázejí krystalizaci tohoto heterodimerního enzymu, zkonstruován homologní model PGA^{Af} založený na již známých krystalových strukturách PGA^{Ec} a PGA^{Pr} . Struktura nově získaného homologního modelu odhalila zúženou štěrbinu PGA^{Af} , která může zvyšovat enantioselektivní vlastnosti enzymu vůči testovaným aminoesterům (81). 3D-krystalová struktura PGA^{Af} byla určena později (77).

2.6.1. Enantioselektivní reverzní hydrolýzy (asymetrická syntéza nebo enantioselektivní acylace)

V přítomnosti aktivovaného acyl-donoru a racemické směsi nukleofilu je PGA^{Ec} , oproti alifatickým, vysoce enantioselektivní vůči aromatickým aminokyselinám. Modely přechodových stavů navázaných D- a L- enantiomerů metyl esterů aromatických aminokyselin v acylační reakci odhalily možnost vzniku nové stabilizující vodíkové vazby mezi karbonylovou skupinou L-enantiomeru a Arg263 β . Celková energie tetrahedrálního intermediátu L-enantiomeru je nižší než u intermediátu s D-enantiomerem. Za využití tzv. pokročilejších dokovacích technik, molekulární dynamiky, bylo zjištěno, že jak za afinitu k ligandu tak za enantioselektivní vlastnosti PGA^{Ec} jsou v těchto reakcích zodpovědné spíše hydrofilní, než hydrofobní interakce v aktivním místě (66). Celková energie tetrahedrálních intermediátů D- a L- enantiomerů alifatických aminokyselin však byla podobná. Jako základ enantioselektivity se obecně z hlediska celkové energie považuje rozdíl obvykle kolem 5 kcal/mol z pohledu celkové energie komplexu (82).

2.6.2. Enantioselektivní hydrolýzy

Enantioselektivní hydrolýza katalyzovaná PGA byla studována kombinací enantiomerní separace na chirální stacionární fázi a molekulárního modelování (83). Stacionární chirální fáze založená na imobilizovaném enzymu PGA byla použita pro rozlišení 35 racemických směsí příbuzných látek (2-aryloxyalkanových kyselin, jejich isosterických analogů a 2-arylpropionových kyselin). Enantioselektivita enzymu se snižuje se zvětšujícím se rozměrem substituentů, a to jak na benzenovém jádře, tak na stereogenním centru. Na druhé straně, enantioselektivita vzrůstá v případě, že se na stereogenní centrum naváže aromatický kruh. Tato studie jen potvrdila důležitost přítomnosti hydrofobních interakcí pro chirální rozpoznávání racemických sloučenin katalyzované PGA (84). Experimentální výsledky chirálních separací byly také úspěšně ověřovány technikou molekulárního modelování (78).

2.6.3. Aplikace enantioselektivity PGA pro produkci čistých chirálních látek

Mnoho syntonů, základních stavebních prvků či aktivních farmaceutických látek (API), jsou povahou chirální látky. Ačkoliv enantiomery mají totožné chemické i fyzikální vlastnosti (vyjma stáčení roviny polarizovaného světla), vykazují však jiné chování v chirálním, biologickém prostředí. Bylo doloženo, že kritické fyziologické procesy jsou charakteristické až 100 % stereoselektivitou. To je důvod, proč exogenně dodávané enantiomerně čisté látky mohou vykázat rozdílné interakce s chirálními cíly jako jsou enzymy, receptory nebo iontové kanály (85). Práce pojednávající o enantioselektivní reverzní hydrolýze jsou shrnuty v tab. 2 (str. 23).

2.6.4. Enantioselektivní reverzní hydrolýza ve vodném prostředí

Od té doby, kdy Zmijewski a spol. (86) publikovali, že PGA je vhodný biokatalyzátor z hlediska kineticky řízených acylací z pohledu rozlišení racemických směsí, tak byly v těchto reakcích použity pouze PGA^{Ec} a PGA^{Af} , v případě PGA^{Ec} i jako volný enzym (87, 88, 89). PGA byla aplikována také v rozlišení racemických směsí (*RS*)-fenylylglycinonitrilu na (*R*)-fenylylglycinonitril (87) a racemických směsí α -aminokyselin (52, 89, 90, 91, 92). Souhrn PGA katalyzovaných enantioselektivních reakcí, včetně výsledných produktů a jejich uplatnění je ukázán v tab. 2 (str. 23).

2.6.5. Enantioselektivní reverzní hydrolýza ve dvoufázovém vodném systému nebo organické fázi

PGA^{Ec} katalyzovala rozlišení aromatických aminokyselin ve vysokém stupni enantiomerní čistoty, zatímco pro alifatické aminokyseliny byl tento parametr podstatně nižší (66). Basso a spol. ukázal že PGA^{Ec} katalyzoval enantioselektivní rozlišení racemických směsí 4-fenylglycin metyl esteru a 4-hydroxyfenylglycin metyl esteru (93). PGA^{Ec} taktéž katalyzuje rozlišení racemických směsí β -aminoesterů (94).

2.6.6. Enantioselektivní hydrolýza ve vodné fázi obsahující ko-solvent

Tyto reakce byly katalyzovány PGA pocházející z *E. coli*, *A. faecalis*, *A. viscosus* a *K. citrophila* a publikace pojednávající o enantioselektivní hydrolýze jsou shrnuty na str. 21 v tab. 2. Čtyři skupiny látek podléhající enantioselektivní hydrolýze jsou znázorněny na obr. 3 (str. 26). V rámci skupin byly studovány následující látky:

Alfa-amino kyseliny: racemická směs N-fenylacetyl-3-hydroxyleucinu (95), racemická směs N-fenylacetyl *terc*-leucinu (96), či racemická směs 2-chlorofenylglycinu (97).

Ketony: racemická směs N-fenylacetylovaného 3-amino-azetidin-2-onu (98), racemická směs kyseliny 4-oxocyklopent-2-en-1-yl 2-phenyloctové (99), racemická směs N-fenylacetylovaných derivátů laktonu homoserinu připraveného pomocí PGA^{Ec} (100).

Amidy a estery kyselin: racemické směsi derivátů mandlové kyseliny (101).

PGA^{Ec} katalyzovaná enantioselektivní hydrolýza byla využita také pro přípravu intermediátů využívaných při produkci dioxolanových nukleotidů nebo synthonů pro syntézu přírodních látek ve vysoké enantiomerní čistotě (102).

Alkoholy: racemické směsi N-fenylacetylovaných derivátů 3-amino-3-fenyl-1-propanolu (103).

Tab. 2. Chirální rozlišení katalyzované PGA: Enantioselektivní reverzní hydrolyzá a enantioselektivní hydrolyzá

Autor	Typ reakce	Racemická směs	Forma enzymu	Průmyslově využitelný substrát	Výtěžek (Y, %), ee (%)
87	ERH	fenylglycinonitril	SE	N-PhAc-(S)-fenylglycinonitril	E>500 v úči (S)-enantiotomeru
90	ERH	metyl ester kyseliny glutamové, glutamin		D-glutamová kyselina, D-glutamin	
89	EH	etyl ester N-PhAc-3-amino-(5-trimethylsilyl)-4-pentynové kyseliny	IE	etyl ester N-PhAc- (S)-3-amino-4-(5-trimethylsilyl)-4-pentynové kyseliny	ee = 90 %, ee = 97 %
92	ERH	α -fenylalanin and jeho deriváty	IE	D- α -fenylalanin and jeho deriváty	ee = 99 %
91	ERH	etyl ester 3-amino-4-pentynové kyseliny	IE	etyl ester (S)-3-amino-4-pentynové kyseliny	ee = 95 %
88	ERH	metyl ester fenylglycinu	SE	(R)-ampicillin	de = 98 %
79			IE		ee > 90 %
	ERH	metyl estery α -aminokyseliny		metyl ester N-PhAc-L-aminokyseliny	(pro aromatické sloučeniny)
93		metyl ester fenylglycinu	IE	metyl ester N-PhAc-L-fenylglycinu	
	ERH	metyl ester 4-hydroxyfenylglycinu		metyl ester N-PhAc-L-4-hydroxyfenylglycinu	ees = 98 %
94	ERH	β -aminoestery	IE	(S)- β -amino estery	ee > 90 %
95	EH	N-PhAc-3-hydroxy-leucin	IE	(2S, 3S)-3-hydroxy-leucin	ee = 99 %
96	EH	N-PhAc- α - <i>terc</i> -leucin	IE	L- <i>terc</i> -leucin, N-PhAc-D- <i>terc</i> -leucin	
97	EH	N-PhAc-2-chloro-fenylglycin	IE	(S)- α -amino-2-chloro-fenylglycinová kyselina	ees = 98,5 %, eep = 99 %
98	EH	N-PhAc-3-amino-azetidín-2-on	IE	(S)-3-amino-azetidín-2-on	ees = 94 %
99	EH	N-PhAc-4-oxocyclopent-2-en-1-yl 2	IE	(S)-4-hydroxycyclopent-2-en-1-yl 2-fenylglycinová kyselina	E > 100
100	EH	N-PhAc-homoserin laktón	IE	(S)-(-)- α -N-PhAc-amido- γ -butyrolaktón	ee = 99 %
101	EH	iso-propylamid N-PhAc -mandlové kyseliny	IE	(R)-mandlová kyselina	ee = 73 %, Y = 47 %
102	EH	methyl 2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-karboxylová kyselina	IE	(4R)-methyl 2,2-dimethyl-1,3-dioxan-4-karboxylová kyselina	E > 50 %, ee = 98 %
103	EH	N-PhAc-3-amino-3-etyl-1-propanol	IE	(R)-3-amino-3-etyl-1-propanol	ee > 99 %, Y > 45 %

Poznámky: ^a ERH označuje enantioselektivní reverzní hydrolýzu, EH označuje enantioselektivní hydrolýzu

^b SE vyjadřuje rozpustnou formu enzymu, IE vyjadřuje imobilizovanou formu enzymu

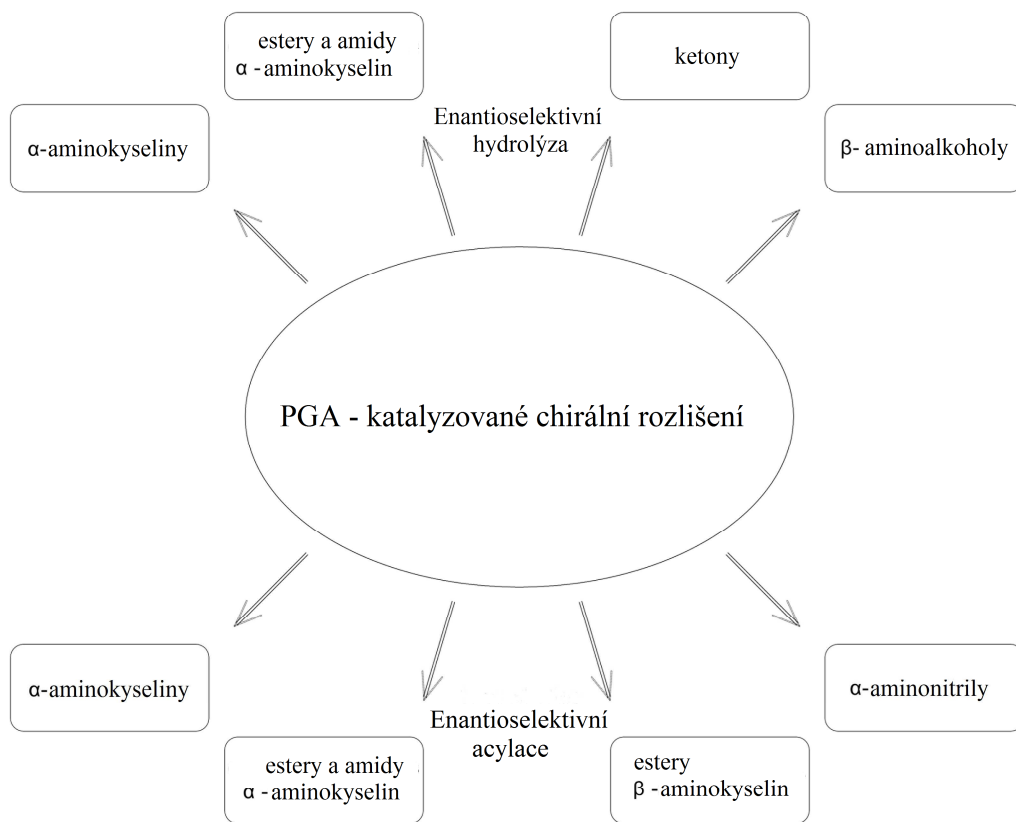
^c Y představuje procentuální výtěžek reakce, $ee_{s/p}$ enantiomerní nadbytek substrátu či produktu a E míru enantioselektivity.

2.6.7. Využívání enantioselektivity PGA v analytických zařízeních

Vysoký podíl chirálních látek na trhu s léčivými látkami je důvod proč farmaceutické a biotechnologické společnosti vyvíjejí univerzální metody pro přímou separaci čistých enantiomerů z racemických směsí. Chirální stacionární fáze založená na imobilizovaném enantioselektivním enzymu představuje účinnou a rychlou metodu pro separaci enantiomerů. Byly vyvinuty HPLC kolony nesoucí imobilizovanou PGA^{Ec} jako chirální selektor a v současnosti jsou používány jako tzv. enzymový reaktor pro rozlišení racemických směsí (104). Technika kombinuje výhody kapilární elektroforézy s možností testovat stacionární fáze různé povahy pro zlepšení procesu selektivity. Spojení s hmotnostní spektrometrií navíc umožňuje okamžitou identifikaci reaktantů. Review Calleriho a spol. z roku 2004 (105) pojednává o vývoji analytických aplikací založených na stacionární fázi obsahující PGA. V minulých letech publikovali Calleri a spol. (84) chirální rozlišení 27 z 35 racemických směsí kyselin pomocí chirální stacionární fáze založené na imobilizované PGA. Nejdůležitější parametr ovlivňující enantioselektivitu byla mobilní fáze, protože její složení určovalo retenční pořadí enantiomerů. Aplikovatelnost PGA jako chirálního selektoru byla popsána vůči 2-aryloxyalkyl a 2-aryalkyl-2-aryloxyoctovým kyselinám, sloučeninám vykazujícím farmakologický význam (106).

Různé způsoby imobilizace PGA při vývoji chirální stacionární fáze prokázaly, že enantioselektivní vlastnosti chirálního selektoru se nepozměnily (107).

V současnosti je technika založená na kovalentně imobilizované PGA na monolytické koloně obsahující křemičitou náplň s epoxydovými skupinami využívána jako vysoce selektivní mikroseparační metoda vhodná pro kvantitativní analýzu farmaceutických „přípravků“ (např. profenů) a detekci nečistot (108, 109).



Obr.3. Rozdělení substrátů do skupin pro enantioselectivní hydrolyzy a enantioselectivní reverzní hydrolyzy katalyzované PGA.

2.7. PGA jako promiskuitní enzym

Enzym schopný katalyzovat několik chemických reakcí s kompletně jiným reakčním mechanismem (110) je nazýván promiskuitním enzymem. Nedávno byl proveden výzkum s ohledem na promiskuitu PGA^{Ec} ve spojitosti s produkcí nitroalkanolů, modifikovaných APIs a N-heterocyklických derivátů. Doposud byly popsány tři reakce lišící se v mechanismu katalýzy PGA^{Ec} .

2.7.1. Markovnikova adiční reakce

Markovnikova adiční reakce představuje elektrofilní adici na dvojnou či trojnou vazbu, kdy se elektrofilnější část činidla aduje na atom uhlíku s větším počtem vodíkových atomů (111). Reakční mechanismus Markovnikovy adice se skládá z elektrofilní adice na dvojnou vazbu nukleofilu. Markovnikova adice katalyzovaná PGA (obr. 4, str. 28) byla studována s rozdílnými vinylestery jako substráty (112), s uracilem a alopurinolem (110).

2.7.2. Transesterifikace

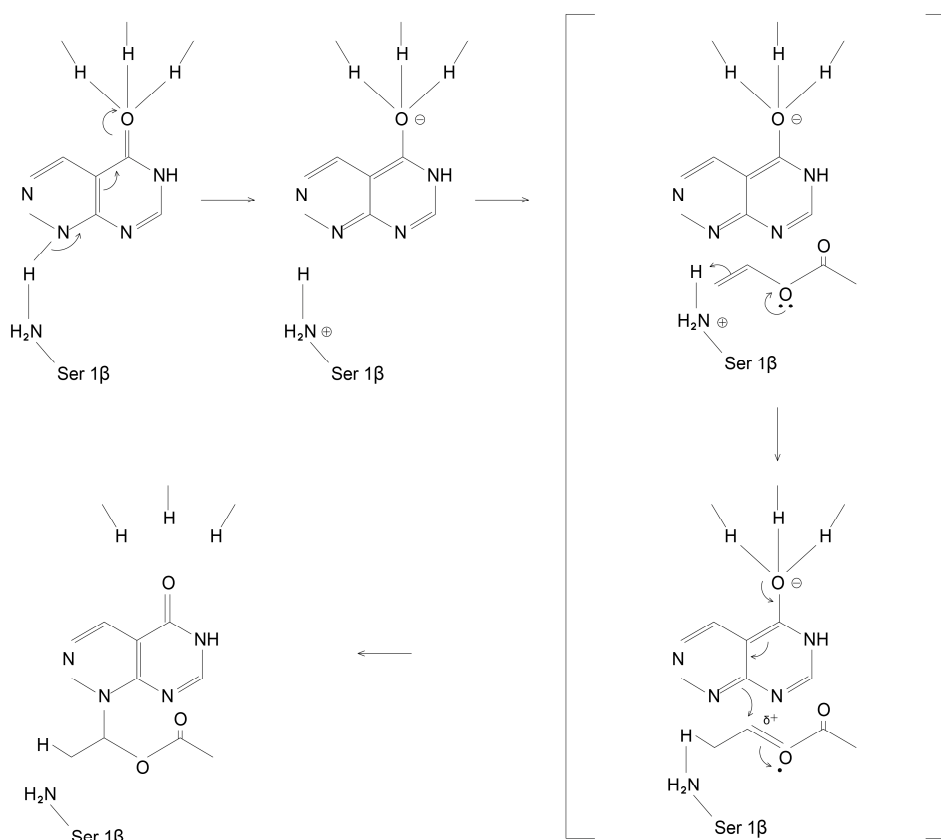
Transesterifikace je termín používaný pro reakce kde je ester transformován v jiný v důsledku výměny alkoxylové skupiny za alkoxylovou skupinu alkoholu (64, 113). Lindsay a spol. studovali PGA katalyzovanou transesterifikační reakci metyl esteru kyseliny fenoxyoctové s 1-propanolem v hexanu. Enzym navíc vykazoval, že byl více jak 750-krát reaktivnější po lyofilizaci a za přítomnosti KCl (114). Liu a spol. publikovali v roce 2012 transesterifikační reakci vinylecatátu s guaifenesinem katalyzovanou PGA. Guaifenesin je API využívaná pro přípravu anxyolytik a centrálních myorelaxans (115).

2.7.3. Henryho reakce

Reakce je dobře známá v organické chemii a představuje vznik nové C-C vazby v reakci nukleofilního nitroalkanu s elektrofilním aldehydem nebo ketonem (116). Produkty takového spojení jsou β -nitroalkanoly, které jsou užitečné pro syntézy intermediátů pro přípravu mnoha biologicky aktivních látek, jako jsou např. fungicidy (117). Milner a spol.

popsali přímou, PGA katalyzovanou Henryho reakci vedoucí k rozlišení stereisomerů (118).

Wang a spol. použil imobilizovanou PGA^{Ec} pro katalýzu syntézy β -nitroalkanolů v přítomnosti DMSO, avšak s velmi nízkým výtěžkem (119).



Obr. 4. Hypotetický mechanismus Markovnikovovy adiční reakce katalyzované PGA (110).

2.8. Využití PGA v biosenzorech

Biosenzory se sestávají z biologické komponenty, biosensitivní vrstvy a převodníku signálu z chemického na fyzikální. Imobilizované enzymy jsou používány jako biosensitivní komponenty u elektrochemických sensorů, které představují téměř polovinu publikovaných enzymových sensorů (120). Liu a spol. vyvinul biosenzor pro kontrolu fermentačního procesu založený na iontově selektivním převodníku s efektem pole, jehož biologická komponenta byla PGA. Doba odezvy biosenzoru na různé hodnoty koncentrace penG v roztoku bylo přibližně 30 sekund (121). Biosenzor vykazoval vysokou sensitivitu a dlouhodobou operační stabilitu při použití pro off-line monitoring koncentrace penG v kultivačním médiu během fermentace (122).

Analytické přístroje nazývané enzymové termistory jsou používány jako senzory průtokometrů plynů a kapalin. Yakovleva a spol. (123) vyvinuly sensitivní enzymový termistor založený na imobilizované PGA, který byl aplikován na určení koncentrace penG v rozmezí od 0,02 do 200 mM.

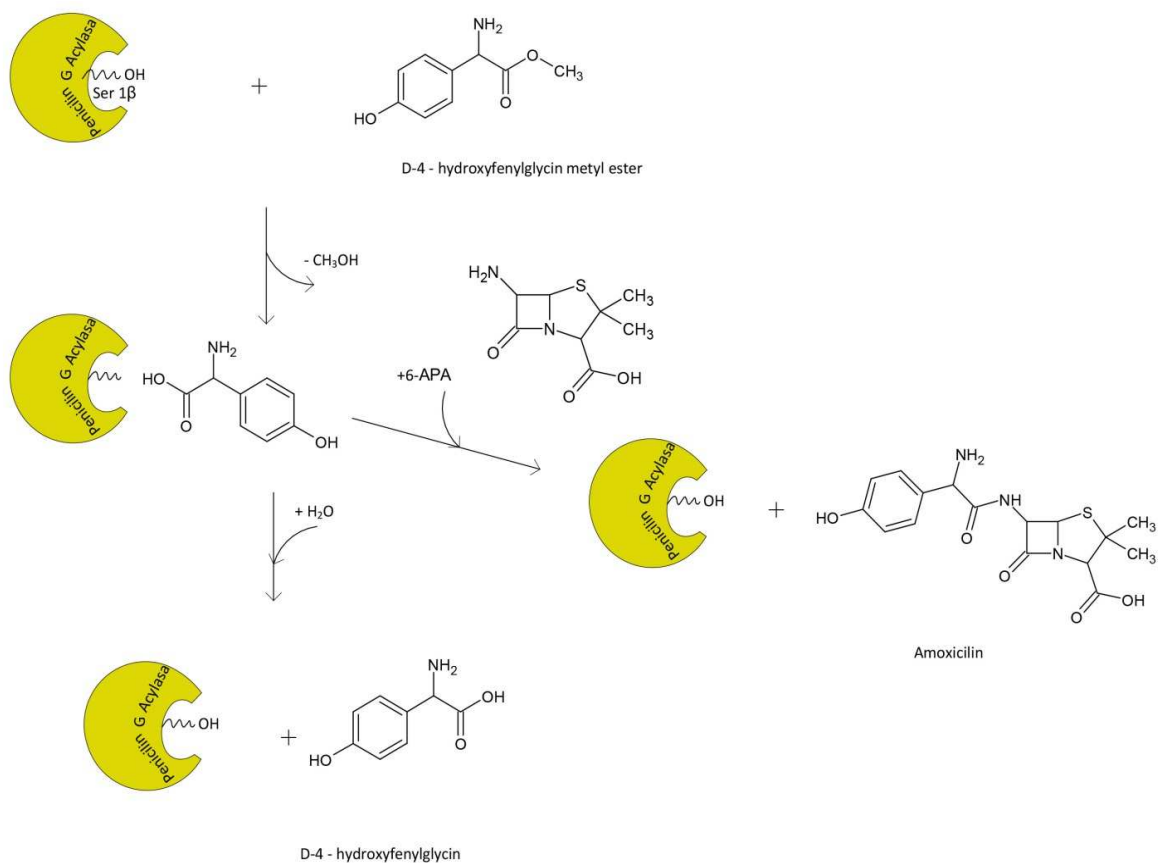
2.9. Semi-syntetická antibiotika: chemie vs. bioprocés

Ve 2. polovině minulého století byly vyvinuty laboratorní bioprocésy přípravy různých SSBA, které v současné době nahrazují chemické procésy a zahrnují dva hlavní kroky:

1. přípravu nukleofilní molekuly 6-APA, popř. 7-ADCA enzymatickou hydrolýzou acylového postranního řetězce z původních β -laktamových antibiotik, které bylo možno získat z fermentačních postupů. 2. Syntézu SSBA z nukleofila a postranního řetězce (acyl-donor) za vzniku β -laktamového antibiotika. Současným trendem je enzymatická příprava kombinovaná s minimem chemických kroků, které přetrvávají v oblasti chemické syntézy acyl-donorů. Enzymatická cesta výrazně snižuje energetické požadavky, emise CO_2 a znečištění životního prostředí obecně. Z tohoto důvodu se vývoj a výzkum přípravy nových SSBA soustředil na biokatalýzu. Ze dvou možností (termodynamicky nebo kineticky řízená syntéza) je vhodnější kineticky řízená acylace (124, 41). Za těchto podmínek v určitém okamžiku v reakční směsi vzniká kinetické maximum produktu.

2.9.1. Kineticky řízená syntéza

Při kineticky řízené syntéze se vychází z energeticky bohatší sloučeniny, aktivovaného acyl-donoru (methyl estery nebo amidy D-fenylglycinu a D-hydroxyfenylglycinu) (125). Reakční mechanismus enzymaticky katalyzované syntézy amoxicilinu je ilustrativně znázorněn na obr. 5 (str. 30).



Obr. 5. Zjednodušený reakční mechanismus enzymové syntézy amoxicilinu.

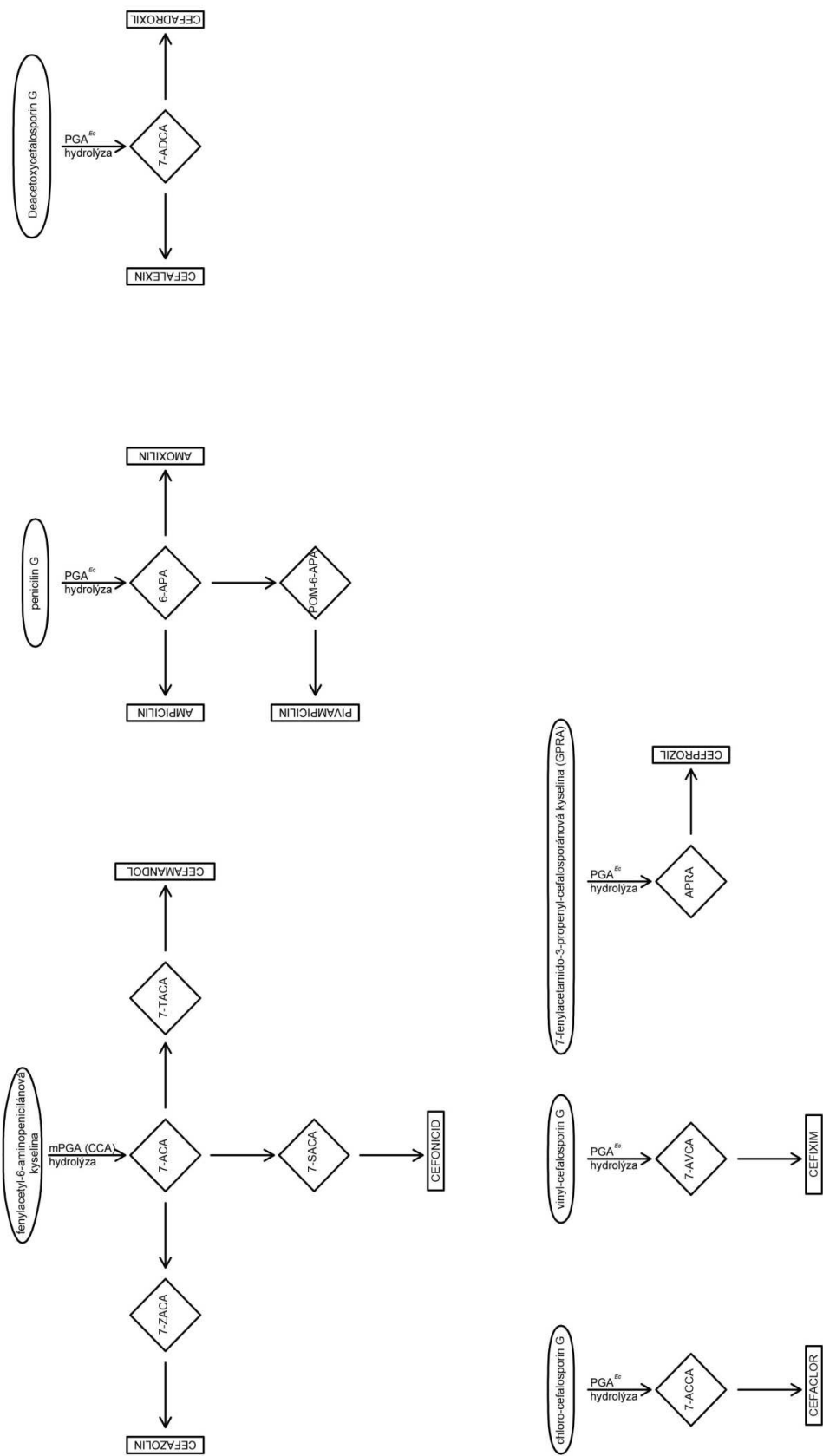
Účinnost PGA v kineticky řízené syntéze SSBA lze posuzovat dle toho, jakou hodnotu má poměr rychlosti syntetické reakce SSBA ku rychlosti hydrolytické reakce acyl-donoru. Tento S/H poměr nám říká, jestli enzym více preferuje jako nukleofilní činidlo 6-APA nebo molekulu H₂O. Hodnotu parametru S/H můžeme do určité míry snadno ovlivnit ve prospěch syntézy produktu odčerpáním produktu (126, 26, 128) a teploty reakční směsi (127), nebo také přidáním rozpouštědel mísitelných s vodou (52, 29, 129).

2.9.2. Nukleofily pro nové generace SSBA

Současné použití PGA jako katalyzátoru pro produkci nukleofilů v industriálním měřítku je ukázáno na obr. 5. Enzym je využíván pro hydrolyzu β-laktamů, běžně

produkovaných fermentacemi kvasinkových produkčních kmenů (130) na 6-APA a 7-ADCA, i chemicky modifikovaných fenylacetylovaných cefalosporinů na nukleofily 7-amino-3-vinylcefalosporanovou kyselinu (7-AVCA), 7-amino-3-prophenylcefalosporanovou kyselinu (7-APRA) a 7-amino-3-chlorocefalosporanovou kyselinu (7-ACCA). Oh a spol. studovali možnost použít PGA na přípravu kyseliny 7-aminocefalosporanové (7-ACA) z cefalosporinu C (cephC). Zavedli současně více jak 7 záměn aminokyselinových zbytků v aktivním centru, které zvýšili aktivitu PGA vůči glutaryl-7-ACA více jak 7,6-krát. Toto zlepšení bylo doprovázeno současnou redukcí aktivity vůči penG (6). Tato modifikace jasně ukázala cestu jak rozšířit portfolio hydrofobních aromatických bočních řetězců, akceptovaných PGA, o hydrofilní lineární postranní řetězce. Nicméně tato modifikace nemůže být využita pro produkci 7-ACA v průmyslovém velkoobjemovém měřítku.

PGA začala být využívána i pro syntézy β -laktamových antibiotik z jader z 7-ACA derivovaných chemickou modifikací v pozici 3'-jako 7-TACA, 7-SACA, 7-ACCA, 7-APRA a 7-ZACA (131). Chemicky modifikovaná jádra 7-ACA jsou více stabilní v kyselém prostředí, které minimalizuje hydrolýzu SSBA a udržuje postranní řetězec v pozici 7' ve své nedisociované formě, což PGA vyžaduje (132). Současné 7-enzymatické / 3-chemické derivatizace 7-ACA nebo 6/3-derivatizace 6-APA vedou k β -laktamovým antibiotikům se zlepšenými vlastnostmi. Cefamandole (7-TACA), cefazolin (7-ZACA), cefonicid (7-SACA), cephaclor (7-ACCA), cefprozil (7-APRA) jsou příklady 7/3-procesovaných cefalosporinů a pouze pivampicilin reprezentuje penicilin procesovaný v pozicích 6/3 (tab. 1, str. 14; obr. 6, str. 32).



Obr. 6. Schéma přípravy 11 základních typů SSBA.

2.9.3. Vylepšování PGA z pohledu parametru S/H

Znalost krystalové struktury PGA^{Ec} (76) umožňuje identifikovat aminokyselinová residua účastníci se enzymové katalýzy a jejich cílenou záměnu vedoucí k vylepšení syntetických parametrů (24, 16, 14, 17, 18). Očekává se, že tyto záměny pozitivně ovlivní interakce „enzym-substrát“. U chimerní PGA zkonstruované shufflingem *pac* genů PGA^{Ec}, PGA^{Kcr} a PGA^{Pr} bylo prokázáno zvýšení syntetické aktivity o 40 % v porovnání s PGA^{Pr}. Chimerní enzymy PGA^{Ec} a PGA^{Kcr} s bodovými mutacemi vykazovaly 40-90 % nárůst v relativní rychlosti transferu acylu na β -laktamové jádro během syntézy ampicilinu a vykazovaly také zlepšení při produkci ampicilinu, cephalexinu a cefadroxilu (23). Modifikace PGA^{Bm} na různých místech povrchu β -podjednotky zvyšují stabilitu enzymu v kyselém prostředí nebo v prostředí organických rozpouštědel (39).

2.9.4. Budoucí trendy aplikace PGA

Současné požadavky průmyslu na enzymovou biokatalýzu jsou: zvýšení produktivity existujících katalyzátorů a vývoj nových katalyzátorů. Tyto požadavky jsou nevyhnutelné pro vývoj ekonomického, velkoobjemového procesu. Již bylo doloženo laboratorními experimenty, že genetické inženýrství enzymů a přirozená diverzita mikroorganismů budou součástí vývoje nových bioprocusů. Díky velmi rychlému pokroku v bioinformatice, představuje molekulární modelování, včetně molekulárního dokování, s průmyslově důležitými substráty slibný přístup pro využití predikce aplikovatelnosti PGA, co se týče substrátové specifity, kinetických parametrů a stereoselektivity (81, 133).

Produktivita PGA v biokatalýze může být dále zvýšena způsobem imobilizace a aplikováním s vodou mísitelných organických solventů a bezvodých roztoků (134). Také musí být zvažována specifická aktivita katalyzátoru a operační stabilita pro daný proces či selektivita ke xenobiotikům stejně jako difúzní omezení, které redukuje výtěžnost produktu reakce (136). Omezení v přenosu hmoty v katalyzátoru je v současnosti jedna z hlavních bariér pro další zlepšování v oblasti jejich vývoje (135). PGA-aktivované membrány používané v membránových bioreaktorech nebo kombinace imobilizačních procedur a mutagenese povrchu PGA (137, 138, 19) představují tedy do budoucna slibné přístupy v přípravě účinnějších biokatalyzátorů. Náhradou nekonzervovaných aminokyselinových residuí na povrchu enzymu lysinem nebo nahromaděním 8 residuí kyseliny glutamové distribuovaných po povrchu enzymu (139) navíc nijak neovlivnilo syntetickou aktivitu

enzymu pro syntézu cephalexinu, cefprozilu a cefacloru a zdá se tedy, že toto jsou obecně aplikovatelné strategie pro zvyšování enzymové stability v organických rozpouštědlech.

3. Materiál a metody:

3.1. Chemikálie

7-ADCA.....	Fluka, Biochemica
Agarosa.....	Lonza, USA
amoxicilin.....	„Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
6-APA.....	Fluka, Biochemica
ampicilin.....	Léčiva a.s.
BCA kit pro stanov. konc. bílkovin.....	Pierce Chemical Company, USA
Boritan sodný.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
Bromfenolová modř.....	Serva, Německo
CaCl ₂	MERCI s.r.o., ČR
cefadroxil.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
CH ₃ COOH.....	Lach-Ner, ČR
cephalexin.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
Coomassie brilliant Blue R-250.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
DMSO.....	Sigma-Aldrich GmbH, Švýcarsko
EDTA.....	Lachema, N.P. Brno, Československo
Etanol.....	Lach-Ner, ČR
Ethidiumbromid.....	Serva, Německo
Etylacetát.....	Sigma Aldrich GmbH, Švýcarsko
α-fenylalanin.....	Sigma-Aldrich
Fenylacetyl chlorid.....	Sigma-Aldrich
Fe ₂ (SO ₄) ₃	Lach-Ner, ČR
Glyceralddehyd.....	Carl-Roth GmbH CO, Německo
Glycerol.....	Lach-Ner, ČR
H ₃ BO ₃	Lachema
HCl.....	Lachema, N.P. Brno, Československo
α-homofenylalanin.....	Sigma-Aldrich
β -homoleucin.....	Sigma-Aldrich
HPGA.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
KH ₂ PO ₄	Merck, Německo
α-soleucin.....	Sigma-Aldrich
Kvasničný autolyzát.....	Bionis MF, Biorigin

Kyselina citónová.....	Lachema, N.P., Československo
Kyselina fenylactová.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
α -leucin.....	Sigma-Aldrich
β -leucin.....	Sigma-Aldrich
2-merkaptoetanol.....	Fluka, BioChemica
Metanol.....	Lach-Ner, ČR
MgSO ₄	Lachema, N.P. Brno, Československo
NaCl.....	Lach-Ner, ČR
Na ₂ SO ₄	Lachema, N.P. Brno, Československo
Fosforečnan sodný.....	Merck, Německo
Na ₂ HPO ₄	Merck, Německo
NaOH.....	Lachema, N.P. Brno, Československo
(NH ₄) ₂ SO ₄	Lachema, N.P. Brno, Československo
NaHCO ₃	Lach-Ner, ČR
Penicillin G.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
Peroxodisíran amonný.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
PGA.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
PMSF.....	Fluka, Biochemica
Polyetylenglykol.....	Qiagen, Německo
<i>p</i> -DAB.....	Sigma-Aldrich GmbH, Švýcarsko
Trypton.....	Imuna Pharm, a.s.
TEMED.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
SDS.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
Sacharóza.....	Lachema
α - <i>terc</i> -leucin.....	Sigma-Aldrich
NIPAB.....	Sigma-Aldrich GmbH, Švýcarsko
Veškeré použité chemikálie byly čistoty p.a.	

3.2. Pufry

3.2.1. Komerční pufry pro krystalizaci

TRIS.....	Loba Feinchemie, Rakousko
BICINÁT.....	Qiagen, Německo
JCSG Core+.....	Qiagen, Německo
JCSG Core1.....	Qiagen, Německo
JCSG Core2.....	Qiagen, Německo
JCSG Core3.....	Qiagen, Německo
JCSG Core4.....	Qiagen, Německo
Morpheus.....	Qiagen, Německo
Midas.....	Qiagen, Německo

3.2.2. Komerční pufry pro mutagenezi

Vazebný pufr.....	Qiagen, Německo
Promývací pufr.....	Qiagen, Německo
Eluční pufr.....	Qiagen, Německo
Tango pufr.....	Qiagen, Německo
P1 pufr.....	Qiagen, Německo
P2 pufr.....	Qiagen, Německo
P3 pufr.....	Qiagen, Německo
Acetát-MOPS pufr.....	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Švýcarsko
Pufr pro polymerasu Herculasa II.....	Qiagen, Německo

3.2.3. Pufry pro agarosovou elektroforézu

TBE pufr: 0,45 M TRIS, 0,45 M H₃BO₃, 10 mM EDTA (pH = 8,0)

TE pufr

10 mM TRIS, 1 mM EDTA

Vzorkový pufr GLB IV

40 % (w/v) sacharóza, 0,25 % (w/v) bromfenolová modř

3.2.4. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

Dělicí gel pro SDS-PAGE

1,25 ml 1,5 M Tris pufru (pH = 8,8)

1,65 ml 30 % směsi akrylamidu (29 % akrylamid + 1 % bis-akrylamid)

2,0 ml deionizované vody

50 μ l 10 % vodného roztoku persíranu amonného

2 μ l TEMED

50 μ l 10 % SDS

Zaostřovací gel pro SDS-PAGE

0,125 ml 1M TRIS pufru u něhož bylo upraveno pH na hodnotu 6,8

0,17 ml 30 % směsi akrylamidu (29 % akrylamid + 1 % bis-akrylamid)

0,675 ml deionizované vody

10 μ l 10 % vodného roztoku persíranu amonného

2 μ l TEMED

10 μ l 10 % SDS

Vzorkový pufr

5 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) merkaptoetanol, 50 % (v/v) glycerol, 0,1 % (w/v) bromfenolová modř, 50 mM TRIS-HCl (pH = 6,8)

Elektrodový pufr pro SDS-PAGE

25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1 % (w/v), 0,1 % (w/v) SDS, pH = 8,3

Barvicí roztok

0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 45 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) kyselina octová

Sušící roztok

25 % (v/v) metanol, 2 % (v/v) glycerol

Odbarvovací lázeň

25 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) kyselina octová

3.2.5. Dialyzační pufr

40 mM KH_2PO_4 (pH upraveno na hodnotu 7,5 1 M HCl)

3.2.6. Pufry pro purifikaci penicilinacylas

Purifikace PGA^A :

A - 10 mM fosfátový pufr (pH = 7,5)

B - 10 mM fosfátový pufr (pH = 7,5) obsahující 0,1 M NaCl

E - 0,1 M Tris-HCl pufr, pH = 7,2

Purifikace PGA^{Ec} :

A – 5 mM fosfátový pufr (pH = 7,0)

B - 25 mM fosfátový pufr (pH = 7,0)

C - 5 mM fosfátový pufr (pH = 5,9)

D- 5 mM fosfátový pufr (pH = 5,9) obsahující 0,2 M NaCl

E - 0,1 M Tris-HCl pufr, pH = 7,2

3.2.7. Pufry pro stanovení reakčních produktů

0,01M fosfátový pufr a 10 % metanol (pH = 3,0)

0,01M fosfátový pufr a 30 % metanol (pH = 5,6)

0,01M fosfátový pufr a 40 % metanol (pH = 6,5)

vodný roztok HClO_4 , pH = 1

2mM CuSO_4 -isopropanol v poměru 95 : 5

2mM CuSO_4 -isopropanol v poměru 98 : 2

3.2.8. Kultivační média

LB medium

trypton 10 g, kvasničný extrakt 5 g, NaCl 10 g, destil. voda do 1000 ml, (pH = 6,8 -7,2)

Příprava tuhého LB média:

LB médium bylo doplněno agarem v množství 20 g agaru na 1 litr média.

Zásobní roztok kanamycinu

Bylo připraveno 10 ml antibiotika kanamycinu o koncentraci 50 mg/ml. Následně byly alikvoty antibiotika zmrazeny při -20°C a v případě potřeby použity pro přípravu média LBKm.

3.3. Enzymy pro molekulární biologii

Restrikční enzym <i>Xba</i> 1	Qiagen, Německo
T4-DNA ligasa.....	Qiagen, Německo
Polymerasa Herculasa II.....	Qiagen, Německo
Restrikční enzym <i>Pst</i> 1.....	Qiagen, Německo
Termolysin.....	Promega, USA
Lysozym.....	Sigma Aldrich GmbH, Švýcarsko
RNasa A.....	Qiagen, Německo

3.4. Speciální přístroje a příslušenství

Bioreaktor pro kultivaci mikroorganismů.....	B.Braun Biotech Int., Švýcarsko
Ultrazvuk Microson XL200.....	Microson, Misonix USA
Tessek SGX C18 5µm (4x250 mm, Tessek, Česká republika.....	Tessek, ČR
Chirální kolona Sumichiral OA-5000.....	Sumichiral, Japonsko
Chirální kolona CR(+) Crownpack.....	Daicel, Francie
Aparatura pro SDS-PAGE.....	Bio-Rad Laboratorie, USA
Chromatografická náplň (100x16 mm) Fractogel COO ⁻	Merck, Německo
Chromatografická náplň (100x16 mm) Fractogel DEAE ⁻	Merck, Německo
Chromatografická náplň (700x16 mm) Sephadex G-75.....	Amersham, Biosciences
Spektrofotometr UV-1601.....	Shimadzu, Japonsko
UV-spektrofotometr Multiskan Ascent.....	Thermo-Fischer-Scientific, USA
Vysokoúčinný kapalinový chromatograf.....	Dionex-Summit
Vysokoúčinný kapalinový chromatograf.....	Shimadzu, Japonsko
Automatický titrátor (moduly ABU-80, TTT-80 a PHM-82).....	Radiometer, ČSSR
Orbitální třepačka.....	Gallenkamp, Velká Británie
Termální PCR cycler PTC 200.....	MJ Research, USA

CCD Kamera Gel Logic 200.....	Kodak, Japonsko
Krystalizační robot.....	Art Robins Instruments, USA
Mikroskop ArtRay.....	Olympus, Japonsko
Skenovací automatická kamera Mdrive17.....	Intelligent Motion System, USA

3.5. Software

ExPaSy server.....	Ústav Bioinformatiky, Švýcarsko
H++ server.....	Univerzita Virginia, USA
Clustal Omega.....	EMBL-EBI, EU
Swiss-model.....	Ústav Bioinformatiky, Švýcarsko
Verify 3D.....	Univerzita Kalifornie, USA
PyMol.....	volně dostupný software
Avogadro.....	volně dostupný molekulární editor
AutoDock Vina plug-in modul pro PyMol.....	Scrippsův výzkumný ústav, USA
Vizualizační software Kodak Molecular Imaging.....	Kodak, Japonsko
Zobrazovací software pro prohlížení krystalizačních podmínek.....	Olympus, Japonsko
PoseView.....	BioSolveIT, Německo
RAMPAGE server.....	Univerzita Cambridge, VB

3.6. Mikroorganismy

Hostitelské kmeny:

E.coli BL21($F^{ompT hsbS_B (r_B^- m_B^-)}$ *gal dcm*, 140) a *E.coli* RE3 (prototrofní kmen nesoucí na chromosomu strukturální gen pro PGA^A, 141).

Rekombinantní kmeny:

E.coli RE3 (pKA18), produkční kmen pro PGA^{Ec} (65)

E.coli BL21 (pKX1P1), produkční kmen pro PGA^A (142)

E. coli RE3 (pMiG7), produkční kmen pro modifikovanou PGA^APhe β 24Cys

Biomasy rekombinantních kmenů *E.coli* BL21 (pKX1P1) a *E.coli* RE3 (pKA18) použité pro purifikaci byly připraveny v kontinuálně míchaném bioreaktoru Biostat MD (65, 142).

3.7. Příprava hrubého extraktu $PGA^{Ec}/PGA^A/PGA^APhe\beta 24Cys$

Rozbití buněk ultrazvukem

50 g rozmražené biomasy (suchá hmotnost přibližně 20 %) byla naředěna čtyřikrát 0,1 M roztokem NaCl. Kyveta se vzorkem biomasy byla umístěna do ledové lázně. Sonikace byla prováděna opakovaně desetkrát a probíhala vždy po dobu 60 vteřin s minutovými intervaly pro ochlazení. Teplota vzorku byla mezi jednotlivými sonikacemi udržována přibližně na 20°C. Zbytky buněk byly odděleny centrifugací (centrifuga Eppendorf 5403, rotor 16F6-38, 15 min., 11000 ot./min., T = 8°C) a takto připravený hrubý proteinový extrakt byl následně použit pro izolaci penicilinacylas.

Frakční srážení hrubého extraktu enzymu síranem amonným

Hrubý proteinový extrakt byl srážen síranem amonným do 70 % nasycení supernatantu. Na srážení PGA z 1 ml roztoku síranem amonným je potřeba 0,39 g $(NH_4)_2SO_4$, který byl přidáván po malých objemech po dobu 20 minut, za stálého míchání a chlazení v lázni ledové tříště. Srážený roztok byl míchán dalších 60 minut, centrifugací byl oddělen precipitát (centrifuga Eppendorf 5403, rotor 16F6-38, 8000 ot./min., 10 min., T = 8°C), který byl uchováván při -20°C.

Stanovení koncentrace bílkovin

Koncentrace proteinu byla stanovena chromogenní reakcí pomocí kitu BCA
Slepý vzorek: 80 μ l destilované vody + 1,6 ml činidla
Vzorek: 80 μ l vzorku (v případě neředěných vzorků) + 1,6 ml činidla. Po protřepání byl vzorek ponechán 30 minut při teplotě 37°C a na spektrofotometru byla změřena absorbance při vlnové délce $\lambda = 562$ nm.

3.8. Purifikace PGA^{Ec}

Chromatografie na koloně s náplní DEAE⁻ fractogel

Byl použit DEAE⁻ fractogelu EMD 6500(S) (17 cm x 2,5 cm). Kalibrace kolony byla provedena 5 mM fosfátovým pufrům o pH = 7,0. Před nanesením vzorku na kolonu byla dialýzou proti mobilní fázi A upravena iontová síla a pH. Po dialýze byl vzorek odstředěn, nanesen na kolonu (peristaltická pumpa, průtok činil 0,5 ml/min.) a spuštěn průtok mobilní

fáze kolonou (1 ml/min.). Vymytí navázaných proteinů bylo kontrolováno absorbancí eluátu při 280 nm.

V průběhu nanášení na kolonu byl vzorek uchovávan v ledové lázni při teplotě 0°C. Eluce byla prováděna gradientem pH:

Mobilní fáze A: 5 mM fosfátovým pufrem (pH = 7,0).

Mobilní fáze B: 25 mM fosfátovým pufrem (pH = 7,0).

Celkový objem elučního pufru činil 240 ml. Jímány byly 10 ml frakce a všechny frakce byly orientačně otestovány spektrofotometricky na aktivitu na mikrotitrační destičce. Aktivní frakce byly proměřeny na obsah proteinů a hydrolytickou aktivitu enzymu.

Chromatografie na koloně s náplní COO⁻ fractogelu

Byl použit COO⁻ fractogel EMD 6500 (S) (20 x 2,5 cm). Kalibrace kolony byla provedena 10 mM fosfátovým pufrem o pH = 7,5. Před nanesením vzorku na kolonu byla dialýzou proti mobilní fázi A upravena iontová síla a pH. Po dialýze byl vzorek odstředěn a nanesen na kolonu (průtok 0,5 ml/min.). V průběhu nanášení na kolonu byl vzorek uchovávan v ledové lázni při teplotě 0°C. Rychlost průtoku elučního pufru kolonou byla 2 ml/min. Eluce pro PGA^A byla prováděna gradientovou elucí:

Mobilní fáze A: 10 mM fosfátový pufr (pH = 7,5)

Mobilní fáze B: 10 mM fosfátový pufr (pH = 7,5), 0,1 M NaCl

Eluce pro PGA^{Ec} byla prováděna gradientovou elucí za následujících podmínek:

Mobilní fáze A: 5 mM fosfátový pufr (pH = 5,9)

Mobilní fáze B: 5 mM fosfátový pufr (pH = 5,9) obsahující 0,2 M NaCl

Celkový objem elučního pufru činil 400 ml. Jímány byly 10 ml frakce a všechny frakce byly orientačně otestovány spektrofotometricky na aktivitu na mikrotitrační destičce. Aktivní frakce byly proměřeny na obsah proteinů a hydrolytickou aktivitu enzymu.

Gelová chromatografie

Byla použita kolona Superdex 200 (75 cm x 1,6 cm), která byla ekvilibrována pufrem A (0,1 M Tris-HCl pufr, pH = 7,2). Vzorek byl na kolonu nanesen, zakoncentrován (Amicon Ultra, propustnost do molekulové hmotnosti 30 000) a promyt pufrem A. Eluce byla provedena pufrem A (0,1 M Tris-HCl pufr, pH = 7,2, průtok 1 ml/min.). Celkový objem elučního pufru činil 240 ml. Jímány byly 10 ml frakce a všechny frakce byly

orientačně otestovány spektrofotometricky na aktivitu na mikrotitrační destičce. Aktivní frakce byly proměřeny na obsah proteinů a hydrolytické aktivitou enzymu.

3.9. Stanovení hydrolytické aktivity chromogenní reakcí

Stanovení aktivity PGA (PGA^{Ec} , PGA^A , $PGA^APhe\beta 24Cys$) je založeno na hydrolytické reakci, v níž vzniká z penicilinu G 6-APA. Aldehydická skupina *p*-dimethylaminobenzaldehydu (*p*-DAB) vytváří s primární aminoskupinou 6-APA Schiffovu bázi, jejíž koncentraci lze stanovit spektrofotometricky.

3.9.1. Orientační spektrofotometrické stanovení aktivity PGA

Reakční směs byla připravena smícháním 5 μ l vzorku obsahujícím enzym s 50 μ l 2 % roztoku penG v 50 mM fosfátovém pufru (pH = 8,0) vytemperovaném na laboratorní teplotu. Reakce probíhala v mikrotitračních destičkách. Reakce byla ukončena po 15 minutách přidáním 150 μ l zastavovací směsi složené z: 20 % kyseliny octové, 50 mM NaOH a *p*-DAB rozpuštěném v metanolu (5 g/l metanolu) v poměru 2 : 1 : 1. Po 5 min. byla absorbance žlutě zabarveného roztoku změřena na spektrofotometru MultiSkan Ascent při vlnové délce 415 nm.

3.10. Stanovení specifické hydrolytické aktivity

Purifikovaná PGA^A a PGA^{Ec} vykazovaly specifickou aktivitu 60, resp. 50 U/mg proteinu. Aktivita 1U byla definována jako množství enzymu produkující 1 μ mol kyseliny fenylacetové za minutu z penG (2 % w/v) v 0,05 M fosfátovém pufru o pH = 8,0, udržovaného pomocí 0,1 M NaOH, při teplotě 37°C a za konstantního míchání. Titrační systém (Radiometer) byl vybaven pH statem, a automatickým titrátorem.

3.11. Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí SDS (SDS-PAGE)

Ke 12 μ l vzorkům s proteiny byly přidány 3 μ l vzorkového pufru. Obdobně ke 12 μ l roztoku standardu byly taktéž přidány 3 μ l vzorkového pufru. Připravené roztoky byly krátce centrifugovány, povařeny ve vodní lázni po dobu 5 minut a posléze přeneseny do

jamek v elektroforetickém gelu (složení gelu viz. 7.2.4.). Elektroforéza probíhala při vloženém napětí 80 V. Po přechodu do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 120 V.

Po ukončení elektroforézy (3,5 hodiny) byl gel na 1 hodinu vložen do barvicí lázně, a poté přenesen na 30 minut do odbarvovacího roztoku, který byl celkem třikrát až čtyřikrát vyměněn. V konečné fázi byl gel ponořen do sušicího roztoku, překryt z obou stran folií a vysušen při laboratorní teplotě.

3.12. Charakteristika PGA^{Ec} a PGA^{A} z pohledu SSBA

Kinetické parametry pro hydrolyzu substrátu (K_m , V_{max} , k_{cat})

Parametry byly určovány s purifikovanými enzymy PGA^{A} a PGA^{Ec} v 0,05 M fosfátovém pufru (pH = 7,0) při 30°C. Koncentrace reaktantů byly monitorovány pomocí HPLC. Závislost mezi počáteční rychlostí reakce a koncentrací substrátu (v rozmezí od 1 do 1000 μM) byla určena pro každý substrát ve třech nezávislých experimentech. Kinetické parametry K_m a V_{max} byly vypočítány za použití Hanes-Wolf plotu. Katalytická konstanta k_{cat} byla odvozena od V_{max} a molární koncentrace enzymu v reakci (vypočítávána z množství proteinu a molární hmotnosti PGA^{A} , která činí 89 kDa, pro PGA^{Ec} činí molární hmotnost 86 kDa). Jako substráty byly použity ampicilin, amoxicilin, cephalexin a cefadroxil.

Kinetické parametry pro syntézu β -laktamových antibiotik (S/H, P_{Smax})

Teplota reakčního roztoku obsahující aktivovaný acyl-donor (AD, 15 mM D-fenyglycin amid nebo D-4-hydroxyfenylglycin amid) a nukleofil (N, 25 mM 6-APA nebo 7-ADCA pro S/H a P_{Smax}) v 0,05 M fosfátovém pufru (pH = 7,0) byla upravena na 25°C. Reakce byla odstartována přidáním purifikovaného enzymu (5-40 μl na ml reakční směsi) a průběh reakce byl monitorován pomocí HPLC. Retenční časy jednotlivých reaktantů a vznikajícího produktu jsou uvedeny v tab. 3 (str. 64). Poté byly vypočítány počáteční rychlost vzniku antibiotika a volné aminokyseliny z hydrolyzovaného acyl-donoru (AD).

HPLC stanovení reakčních produktů

Koncentrace reakčních komponent byly určeny pomocí HPLC (Dionex-Summit) za použití kolony Tessek SGX C18 5 μm (4 x 250 mm, Tessek, Česká republika). Mobilní fáze (0,01 M fosfátový pufr a metanol) se odlišovaly pro jednotlivé substráty následovně: pH = 3,0 a 10 % metanol pro amoxicilin a cefadroxil, pH = 5,6 a 30 % metanol pro ampicilin a cephalexin.

3.13. Syntéza β -laktamových antibiotik za použití imobilizovaného enzymu

Příprava zesíťených enzymových agregátů

Supernatant po desintegraci buněk (60 ml) byl nejdříve vysrážen do 70 % nasycení pevným $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. K odstředěním oddělené peletě (Eppendorf 5403, rotor 16F6-38, 10 min., 10 000 ot./min.) byl přidán fosfátový pufr do celkového objemu 10 ml. Po následné resuspendaci byl odebrán vzorek pro stanovení aktivity PGA^A či PGA^{Ec} a koncentrace proteinů. Suspenze byla dále po dobu 2 hodin míchána na magnetické míchačce a příslušné množství roztoku glutardialdehydu (1,33 ml na 1000 mg proteinu) bylo přidáváno po kapkách. Hodnota pH směsi byla upravena a udržována na hodnotě 7,5 pomocí 40 % NaOH. Vzniklé CLEA byly poté 2 x promyty 100 ml 0,1 M fosfátovým pufrem (pH = 7,5), odstředěny a resuspendovány v témže pufru. Postup byl ještě jednou opakován. Připravené CLEA byly uchovávány v 0,1 M fosfátovém pufru při teplotě +4°C.

Syntézy antibiotika ve vysokých koncentracích substrátů za použití imobilizované PGA^A a PGA^{Ec}

Kineticky kontrolované syntézy byly prováděny v míchaném reaktoru s pracovním objemem 100 ml (400 ot/min, $T = 25^\circ\text{C}$) a pH bylo udržováno pomocí 12,5 % (w/v) vodným roztokem amoniaku. Nukleofil (6-APA nebo 7-ADCA) byl přidán do vody a rozpuštěn přidavkem vodného roztoku amoniaku (pH bylo udržováno na hodnotě pH = 7,0), aktivovaný AD (D-fenylglycin metyl ester nebo D-4-hydrofenylglycin metyl ester) byl přidán a požadované pH bylo stále udržováno pomocí vodného roztoku amoniaku. Reakce byla odstartována přidavkem katalyzátoru a hodnota pH byla i nadále udržována na stejné hodnotě. Průběh reakce byl monitorován pomocí HPLC. Retenční časy jednotlivých reaktantů a vznikajícího produktu jsou uvedeny v tab. 3 (str. 64).

3.14. Enantiosektivita PGA^{Ec} a PGA^A

3.14.1. Chemická syntéza N-fenylacetylovaných derivátů racemických směsí α/β -aminokyselin

Fenylacetyl chlorid (0,044 mol) byl po kapkách přidáván do 100 ml NaOH roztoku (10 % w/v) racemické směsi konkrétní α/β -aminokyseliny (0,04 mol) uchovávané v ledu. Reakční směs byla okyselená na pH = 2 pomocí 6 M HCl, a N-fenylacetylované

aminokyseliny byly následně třikrát extrahovány etylacetátem a rekrystalizovány z etylacetátového roztoku. Čistota produktu byla určována pomocí HPLC za použití C-8 kolony s reverzní fází. Eluent se skládal z H₂O (obsahující 0,1 % TFA) a acetonitrilu v poměru 7 : 3. Retenční časy nesyntetizovaných produktů jsou shrnuty v tab. 4 (str. 64). Výtěžek produktu, chemický posun v ¹H-NMR a ¹³C-NMR, stejně tak jako výsledky MS analýz jsou uvedeny na obr. S1-S7 (str. 54-60).

3.14.2. Reakce pro stanovení enantioselektivity

Enzymová reakce byla provedena za použití pH-statů při konstantní teplotě 30°C a za kontinuálního míchání. Vodný roztok (25 ml) obsahující 0,025 M substrát, kterým byla racemická směs N-PhAc- α/β -aminokyseliny, byl inkubován po dobu 30 minut při pH = 7,5. 50 U PGA^A nebo PGA^{Ec} bylo následně přidáno do reakční směsi a hodnota pH byla udržována na konstantní hodnotě 7,5 pomocí 2 M NH₄OH. Průběh reakce byl monitorován pomocí HPLC. Odebírány byly 100 μ l alikvoty reakční směsi v průběhu reakce a následně smíseny s příslušnou mobilní fází v poměru 1 : 2, abychom zastavili probíhající enzymatickou reakci.

HPLC analýza enantioselektivních reakcí

Koncentrace reaktantů byla analyzována pomocí HPLC obsahujícího pumpu P580 Dionex, achirální kolonu C-8 a detektor s diodovým polem PDA-100 nastaveným na vlnovou délku 215 nm. Mobilní fáze se skládala ze směsi acetonitrilu a vody v poměru 3 : 7 (obsahujícího 0,1 % TFA). Enantiomerní nadbytek produktu (*ee_p*) byl určován pomocí HPLC za využití pumpy Dionex P580, chirální kolony Sumichiral OA-5000 a UV deketoru a nastaveným na vlnovou délku 215 nm, nebo chirální kolonu Daicel Crownpak CR(+) ve spojení s detekcí produktů na detektoru s diodovým polem DPA-100 nastaveným na vlnovou délku 200 nm. Složení elučního roztoku bylo následující: Pro Sumichiral OA-5000 kolonu (průtok činil 0,4 ml/min.) - 2 mM roztok CuSO₄ obsahující 5 nebo 2 % isopropanol, pro Daicel Crownpak CR(+) kolonu (průtok činil 1 ml/min.) - vodný roztok HClO₄ (pH = 1) obsahující metanol (10 % v/v). Retenční časy enantiomerů reakčních produktů jsou shrnuty v tab. 5 (str. 65).

3.14.3. Výpočet enantioselektivity

Hodnoty E popisující enantioselektivitu PGA^{Ec} a PGA^A byly určovány za použití rovnice (1).

$$E = \frac{\ln(A/A_0)}{\ln(B/B_0)} \quad (\text{rov. 1})$$

, kde A_0 , resp., B_0 představují koncentraci rychleji, resp., pomaleji reagujícího enantiomeru ($\mu\text{mol/ml}$) v čase zahájení reakce $t = 0$; A, resp., B představují koncentraci rychleji, resp., pomaleji reagujícího enantiomeru ($\mu\text{mol/ml}$) v čase t (doba od zahájení reakce).

Enantiomerní poměr (E) byl také vypočítán nelineární regresí za použití rovnice (2), která je odvozena od Sihovy rovnice popisující závislost mezi E, stupněm konverze (c) a enantiomerním nadbytkem produktu (ee_p) (143).

$$c = 1 - ((1 + ee_p) \times (1 - ee_p)^{-E})^{1/(E-1)} \quad (\text{rov. 2})$$

3.15. Krystalizace PGA^A

Purifikovaný enzym byl zakoncentrován na finální koncentraci 20 mg/ml a uchováván v ledu. Pro prvotní experimenty krystalizace byl proveden screening krystalizačních podmínek. V rámci screeningu byly použity komerčně dostupné krystalizační sady JCSG Core+, JCSG Core1, JCSG Core 2, JCSG Core3 a JCSG Core 4 (Qiagen). Každý jeden screenovací set se skládal z 96 krystalizačních podmínek a u každé jednotlivé krystalizační podmínky byly testovány poměry objemu roztoku proteinu ku objemu srážedla, a to v poměrech 1 : 1 a 2 : 1. Jako inhibitor byla použita PAA v koncentracích 6, 25, 50 a 100 mM. Krystalizace probíhala v termostatované místnosti při teplotě 17°C.

3.15.1. Optimalizace krystalizace metodou visících kapek

Optimalizace následných krystalizačních experimentů vycházela z podmínky JCSG Core 3 A9 skládající se ze 100 mM bicinového pufru o pH = 8,5 a 5 % polyetylglykolu 6000, o celkové hodnotě pH = 9). V rámci optimalizace krystalizačního procesu byly použity 24-jamkové krystalizační destičky. Modifikovalo se pH a to po půl jednotce pH a sice v rozmezí od 3 do 9. Krystalizace byla prováděna ve formě visících kapek a to tak, že na každé překrytové sklíčko příslušné jamky byly po obvodu nanášeny celkem 4 kapky obsahující roztok srážedla a zásobní roztok proteinu s různými koncentracemi krystalizačních jader (10, 100, 1000 a 10000 x ředěný zásobní roztok drobných krystalků původního krystalu, jenž byl rozdrcen skleněnou kuličkou v mikrozkuhavce). Do středu sklíčka byla nanášena kapička směsi čistého proteinu a srážedla v poměru 1 : 1. V rezervoáru pod sklíčkem bylo vneseno 800 µl srážecího roztoku. Jako inhibitor byla použita PAA v koncentraci 6 mM. Koncentrace zásobního roztoku enzymu činila 20 mg/ml. Obdobně byla připravena i druhá optimalizační série krystalizačních podmínek, jen s tím rozdílem, že v centrální kapičce bylo oproti objemu srážecího roztoku dvojnásobné množství roztoku proteinu obsahujícího miniaturní krystalky.

3.15.2. Optimalizace krystalizace metodou sedících kapek

Modifikovalo se pH a to po půl jednotce pH a sice v rozmezí od 3 do 9. Optimalizace probíhala v 96-jamkových krystalizačních destičkách a u každé jednotlivé krystalizační podmínky byly testovány poměry množství roztoku proteinu ku množství

srážedla, a to v poměrech 1 : 1 a 2 : 1 .Obdobně bylo experimentováno i s koncentrací polyetylglykolu od 3 do 9 %. Inhibitor buď použit nebyl anebo jako inhibitor byla použita nejdříve PAA (6, 25, 50 a 100 mM) a poté fenylmetylsulfonyl fluorid (PMSF) v koncentraci 230 μ M. Optimalizace krystalizace probíhala při teplotě 17°C.

3.15.3. Optimalizace krystalizace PGA^A po štěpení termolysinem

Termolysin je uchováván v -40°C v 50 mM TRIS pufru o pH = 7,4 v koncentraci 250 μ g/ μ l (tj, 7,2 mM). 100, 500, 1000 a 10000 zředěný zásobní koncentrovaný roztok termolysinu byl aplikován na štěpení flexibilních částí našeho purifikovaného a následně zakoncentrovaného enzymu (20 mg/ml) po dobu 60 minut při laboratorní teplotě. Reakce katalyzovaná termolysinem byla ukončena přidáním PMSF coby inhibitoru a vzorky obsahující enzym byly dále přečištěny gelovou filtrací a byly odebrány vzorky pro SDS-PAGE.

Opět se vycházelo ze základního složení krystalizační podmínky. Každý jednotlivý vzorek enzymu po štěpení a následné gelové filtraci byl optimalizován. Optimalizace probíhala v 96-jamkových krystalizačních destičkách a u každé jednotlivé krystalizační podmínky byly testovány poměry množství roztoku proteinu ku množství srážedla, a to v poměrech 1 : 1 a 2 : 1, dále koncentrace polyetylglykolu v rozmezí od 3 do 9 % a hodnoty pH v rozmezí od 3 do 9. Jako inhibitor byl použit PMSF. Koncentrace PMSF činila 230 μ M. Koncentrace zásobního roztoku enzymu činila 20 mg/ml.

Optimalizace použitím kombinace dvojice screenovacích krystalizačních setů

Postupem doby byly použity také krystalizační sady Morpheus a Midas. A také kombinace JCSG Core3 a Morpheus, respkective Midas v poměru 8 : 2. Optimalizace probíhala v 96-jamkových krystalizačních destičkách a u každé jednotlivé krystalizační podmínky byly opět testovány poměry množství roztoku proteinu ku množství srážedla, a to v poměrech 1 : 1 a 2 : 1, dále koncentrace polyetylglykolu v rozmezí od 3 do 9 a hodnoty pH v rozmezí od 3 do 9. Jako inhibitor byl použit PMSF. Koncentrace PMSF činila 230 μ M. Koncentrace zásobního roztoku enzymu činila 20 mg/ml.

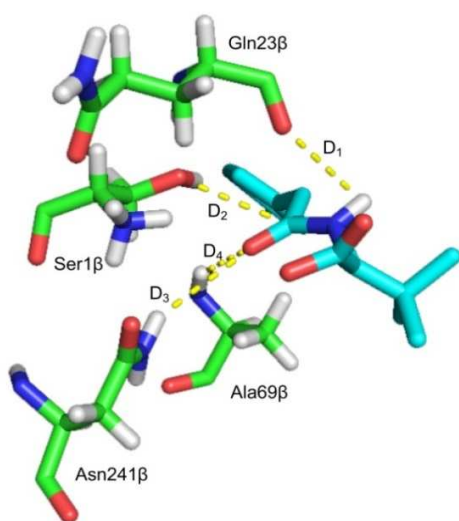
3.16. Molekulární modelování

Homologní model PGA^A byl vystavěn na základě aminokyselinové sekvence, která byla získána z databáze GenBank (AAV 25991). Abychom získali co možná nejvhodnější předlohu (templát) pro modelování, použili jsme vyhledávací algoritmus PSI-BLAST poskytnutý ExPaSy serverem, vůči aminokyselinovým sekvencím uloženým v Protein Data Bank (PDB). Výchozí aminokyselinová sekvence PGA^A byla poté přiložena k nejlepšímu templátu-PGA proteinu (PDB-ID 1GM7, PGA^{Ec} , sekvenční identita činila 49,8 %) za použití software ClustalOmega (144). Identita aminokyselinových residuů templátu a PGA^A tvořících aktivní místo byla 88 %. Vyskytly se pouze dvě substituce v rámci 17 aminokyselinových residuů tvořících aktivní místo ($\text{Val56}\beta \rightarrow \text{Leu56}\beta$ a $\text{Ser149}\alpha \rightarrow \text{Ala149}\alpha$), přičemž v rámci této sekvence nebyly pozorovány žádné inserce ani delece. Při překládání sekvencí byl kladen důraz na přesné přiložení aminokyselinového residua $\text{Ser1}\beta$ mezi aminokyselinovou sekvencí PGA^A a odpovídajícího serinového residua na templátu – PGA^{Ec} . Homologní modelování založené na vzájemném přiložení aminokyselinových sekvencí PGA^A a PGA^{Ec} bylo provedeno s pomocí veřejně dostupného serveru využívajícího výpočetní program Swiss-model (145). Samotné α a β řetězec penicilinacylasy byly připraveny zvlášť a to tak, že pro každou podjednotku byl připraven soubor energeticky minimalizovaných intermediátů modelů, které byly rozčleněny do skupin podle strukturní kvality na základě skórovací hodnoty Z. Jeden model α -řetězce a jeden model β -řetězce byly následně z těchto souborů struktur vybrány, a to nikoliv pouze na základě skórovací hodnoty Z, ale také byla vzata v úvahu vzájemná poloha obou řetězců. Kvalita výsledného modelu, skládající se již z obou podjednotek, byla ověřena srovnáním s výchozí strukturou templátu pomocí programu Verify 3D (146). Aby byla ulehčena reprodukovatelnost prováděných experimentů, byl homologní model deponován do databáze proteinových modelů (Protein Model DataBase) pod následujícím přístupovým kódem PM0080082. Analýza Ramachandranova diagramu vygenerovaná RAMPAGE serverem (147) prokázala vysokou kvalitu homologního modelu, s více než 95% aminokyselinových residuů lokalizovaných v preferované oblasti. Detailní záznam z analýzy je zobrazen na obr. S8 (str. 61). Toto zjištění bylo dále potvrzeno nízkou hodnotou Z, za využití QMEAN serveru (148-149), která vykazovala hodnotu 0,29, což indikovalo, že kvalita modelu je porovnatelná s krystalovými strukturami proteinů podobných velikostí o vysokém rozlišení. Homologní model PGA^A byl následně protonován prostřednictvím H++ serveru na hodnotu $\text{pH} = 7,5$. Bylo ponecháno výchozí nastavení a předpovězená protonace katalyticky významných

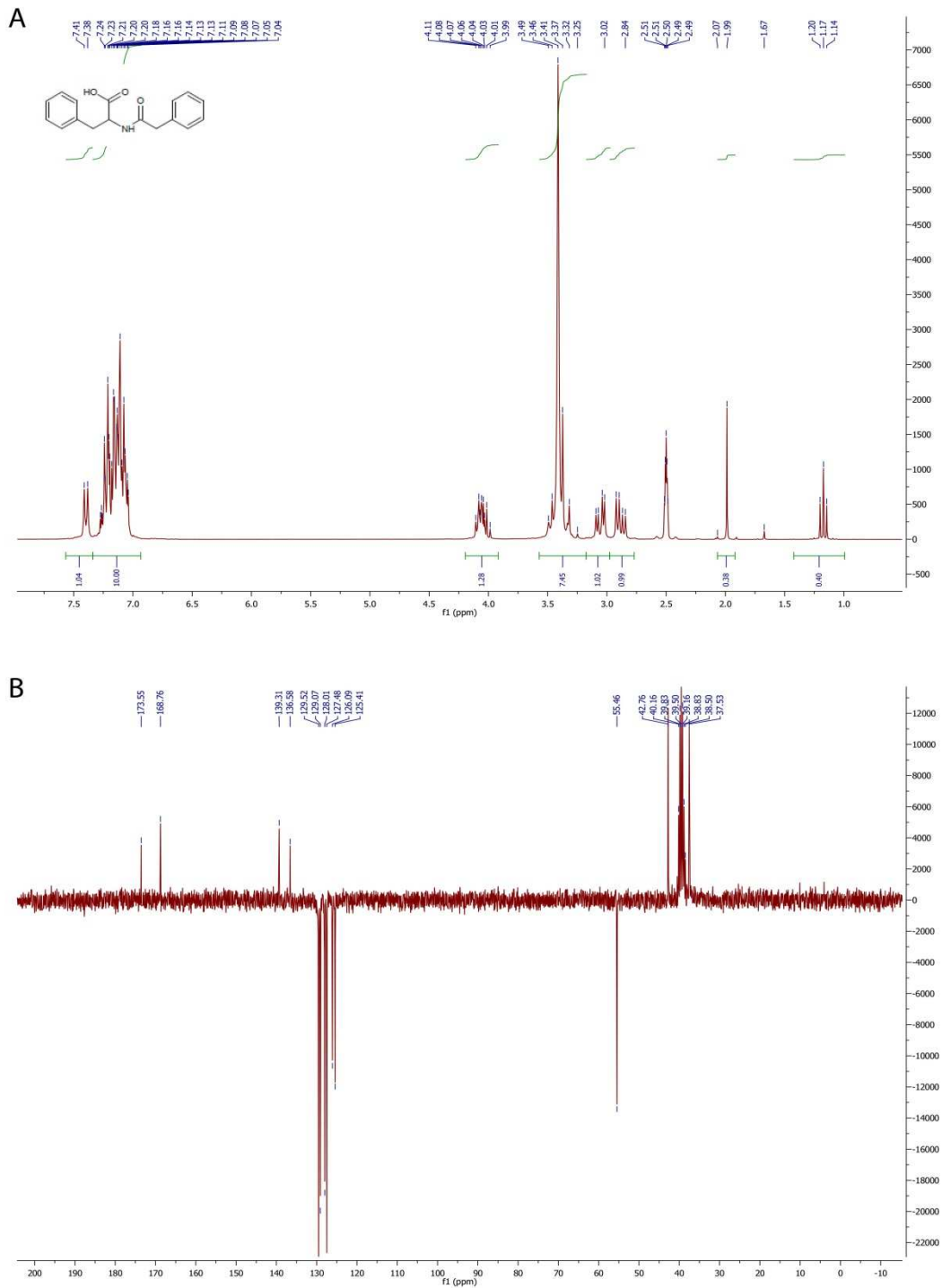
aminokyselinových zbytků byla upravena manuálně, tak abychom je přizpůsobili studovanému reakčnímu mechanismu, tj. enantioselektivní hydrolýze N-PhAc α/β -aminokyselin (96) a posléze syntéze SSBA.

Predikce trojrozměrné struktury komplexů enzym-substrát byly prováděny metodou molekulárního dokování s využitím softwaru AutoDock Vina plug-in pro PyMol (150). Struktury substrátů byly připraveny v molekulárním editoru Avogadro (151), a dále energeticky minimalizovány taktéž v programu Avogadro s použitím 4 kroků algoritmu nejprudšího spádu a silového pole MMFF94 (152). Prostor vybraný pro predikci vazebných módů substrátů v aktivním místě PGA^A byl definován pomocí mřížky o rozměrech 60 x 60 x 60 Å se středem v těžišti aminokyselinových zbytků Ser1 β , Ala69 β a Asn241 β . Jednotlivé výpočty *in-silico* molekulárního dokování byly provedeny prostřednictvím softwaru AutoDock Vina (153) za použití výchozího nastavení s výjimkou parametru "exhaustiveness", který byl navýšen na hodnotu 200. Vizualizace predikovaných vazebných módů a analýza jejich geometrií byla následně provedena v programu PyMol (154). Geometrické parametry pro predikci substrátové reaktivity byly odvozeny podle katalytického mechanismu PGA. Abychom ověřili reaktivitu konformací substrátů použitých v molekulárním dokování, byly vazebné módy posuzovány za použití následujících parametrů: (i) vzdálenost mezi nukleofilním atomem kyslíku O^y katalytického residua Ser1 β a atakovaným uhlíkem karbonylové skupiny substrátu odražející tak pravděpodobnost nukleofilního ataku, (ii) délky vodíkových vazeb mezi atomy dusíku pocházejících z aminoskupin Ala69 β a Asn241 β a atomem kyslíku karbonylové skupiny substrátu, které stabilizují negativní náboj reaktivního tetrahedrálního intermediátu, a (iii) délku vodíkové vazby mezi kyslíkovým atomem karbonylové skupiny Gln23 β a odstupující aminoskupinou substrátu, což taktéž přispívá ke stabilizaci tetrahedrálního intermediátu (obr. 7, str. 53). Abychom získali konkrétní představu o limitních vzdálenostech pro tyto naše parametry, byly analyzovány vysoce kvalitní struktury PGA v komplexu se substráty a jejich analogy (tab. 6, str. 65). Protože však takové ověření poskytuje pouze kvalitativní dvou-stavovou predikci reaktivity substrátů - reaktivní nebo nereaktivní, lze v případě enantioselektivních hydrolýz na rozdíl od syntéz SSBA predikovat přesně pouze potenciál pro vysokou míru enantioselektivního rozlišení. V takových případech jeden enantiomer je predikován jako slabě aktivní, zatímco druhý enantiomer jako dobře aktivní. Je důležité poznamenat, že drobné rozdíly v hodnotách enantioselektivity nemohou být za použití tohoto přístupu predikovány (155).

Interakce prezentované v predikovaných vazebných módech jednotlivých enantiomerů N-PhAc- α/β -aminokyselin byly ještě dodatečně analyzovány softwarem PoseView (156).



Obr. 7. Geometrické parametry vyvinuté pro ověření reaktivity substrátů použitých v molekulárním dokování v aktivním centru PGA^A . Nezbytná aminokyselinová residua jsou znázorněna zeleně. Vazebný mód (*S*)-*N*-PhAc-*terc*-leucinu je znázorněn formou modrých tyček. Analyzované vzdálenosti $\text{O}^{\text{Ser1}\beta} \rightarrow \text{C}$ (D2), $\text{O}^{\text{Gln23}\beta} \rightarrow \text{H}$ (D1), $\text{N}^{\text{Ala69}\beta} \rightarrow \text{O}$ (D4) a $\text{N}^{\text{Asn241}\beta} \rightarrow \text{O}$ (D3) jsou vyobrazeny žlutou přerušovanou čarou.

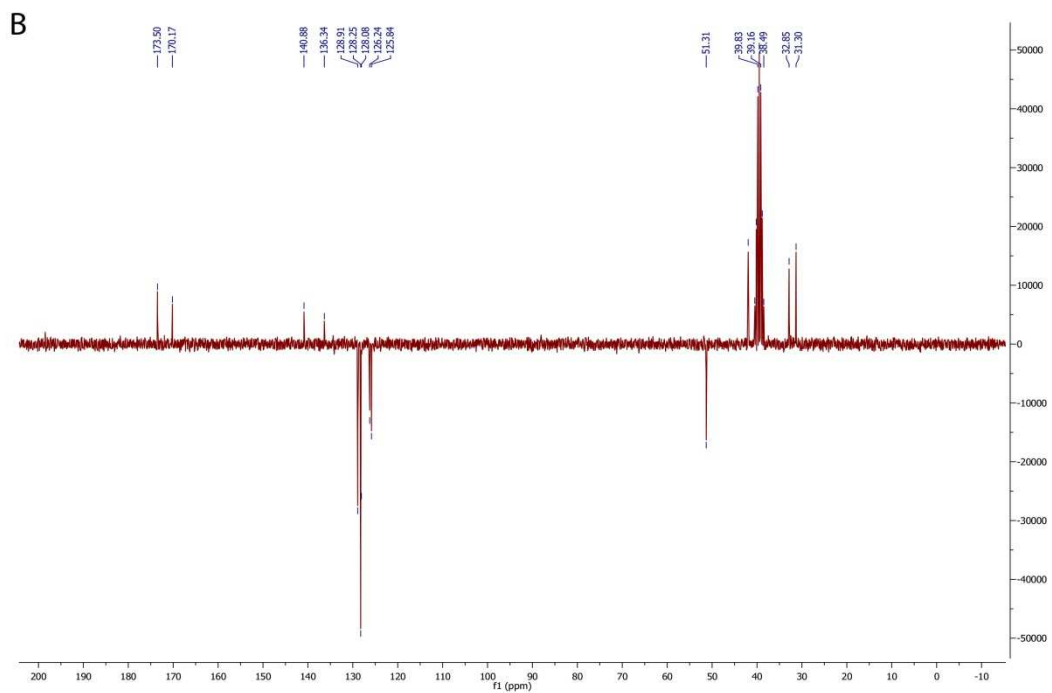
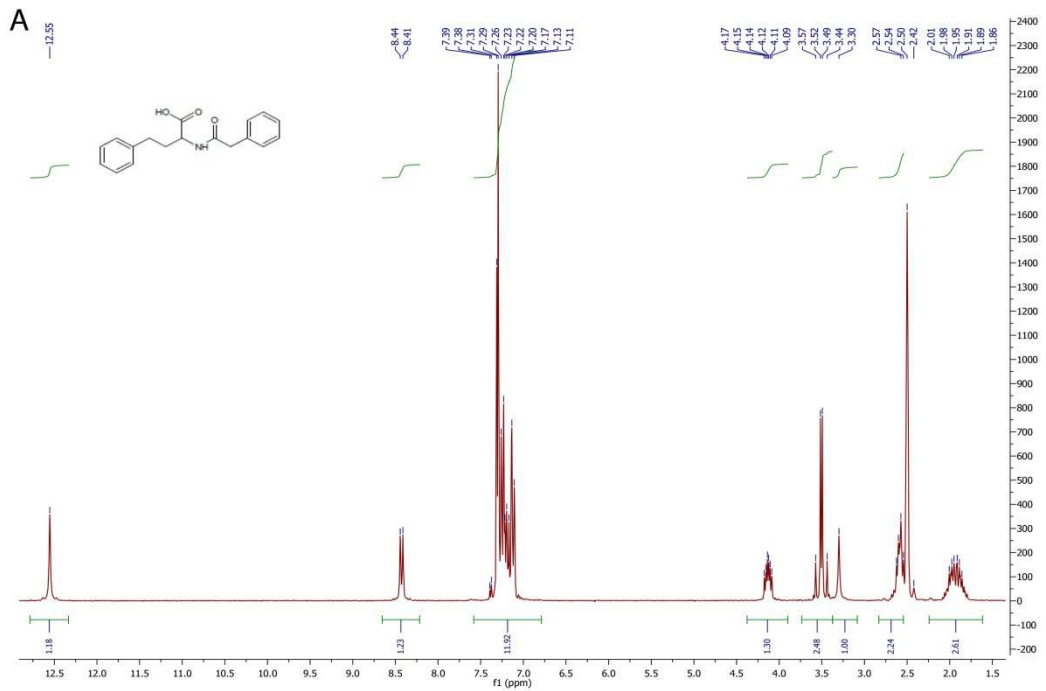


Obr. S1. N-PhAc- α -fenylalanin

^1H NMR: (DMSO) δ 7,41 (d, $J = 7,5$, 1H, NH), 7,00-7,30 (m, 10H, ArH), 3,95-4,15 (m, 1H, CH), 3,3-3,5 (m, 2H, CH_2CO), 3,0-3,10 (m, 1H, ArCH_2), 2,8-2,9 (m, 1H, ArCH_2)

^{13}C NMR: (DMSO) δ 173,55, 168,76, 139,31, 136,58, 129,52, 129,07, 128,01, 127,48, 126,09, 125,41, 55,46, 42,76, 38,50

MS (ES^+) m/z 306,1091 ($\text{M} + \text{Na}^+$) - $\text{M} = 283$ g/mol
(1g, 72 %).

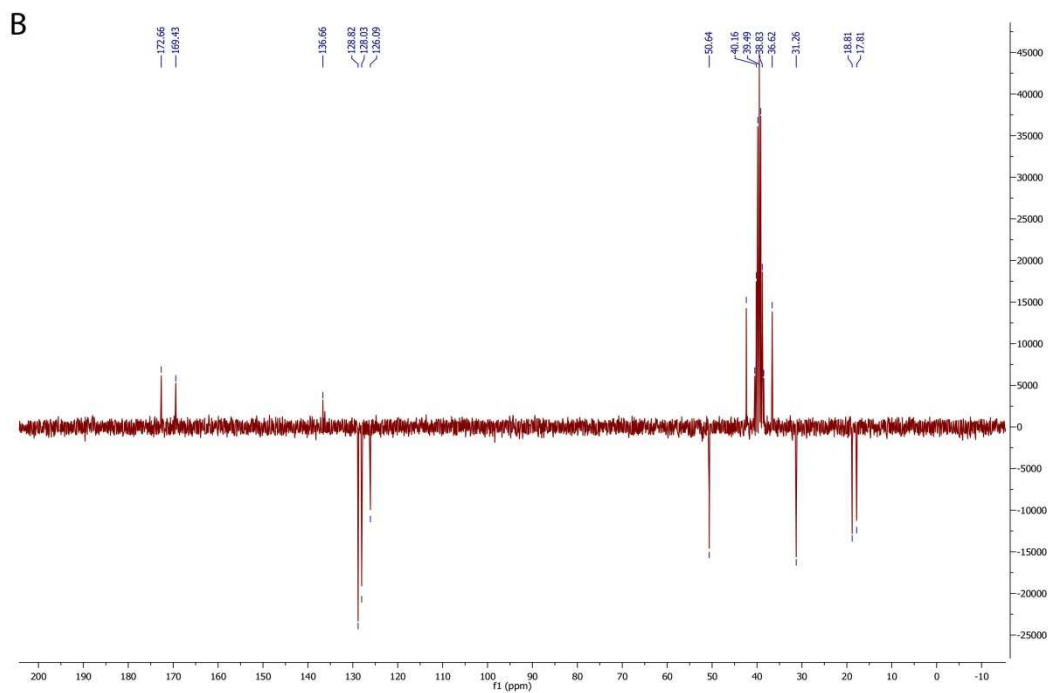
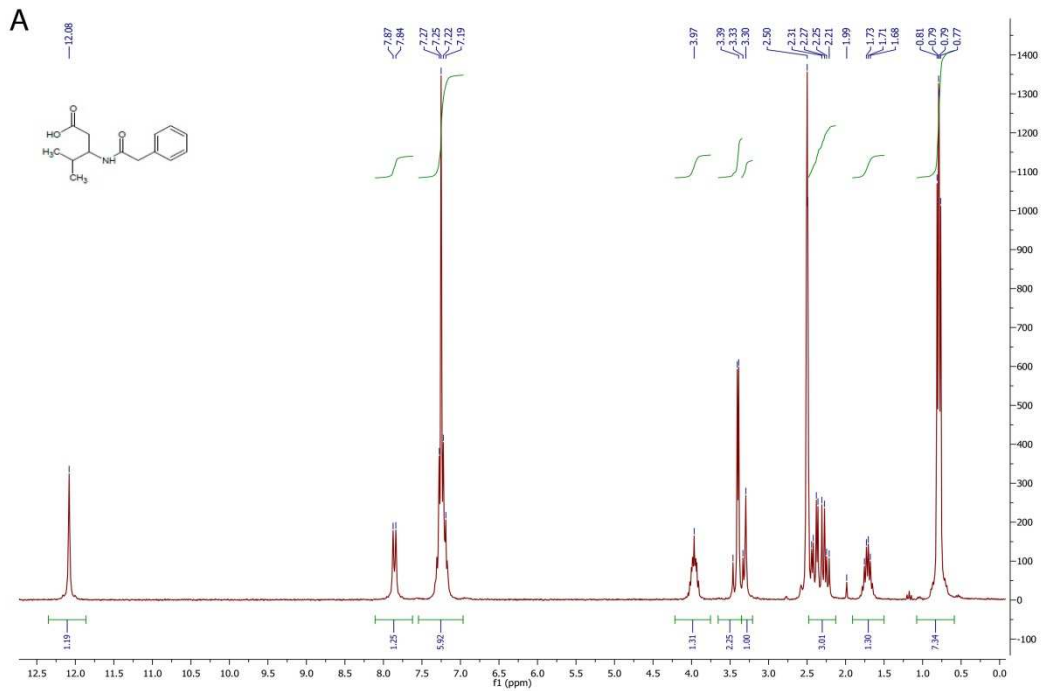


Obr. S2. N-PhAc- α -homofenylalanin

$^1\text{H NMR}$: (DMSO) δ 12,55 (s, 1H, COOH), 8,43 (d, $J = 7,5$, 1H, NH), 7,0-7,4 (m, 10H, ArH), 4,0-4,2 (m, 1H, CHN), 3,51 (d, 2H, CH_2CO), 2,5-2,7 (m, 2H, ArCH_2), 1,75-2,1 (m, 2H, CH_2), 3,3 (1H)

$^{13}\text{C NMR}$: (DMSO) δ 173,5, 170,17, 140,88, 136,34, 128,92, 128,25, 128,08, 126,24, 125,84, 51,31, 41,97, 32,86, 31,31

MS (ES^+) m/z 320,1256 ($\text{M} + \text{Na}^+$) - $\text{M} = 297$ g/mol
(1g, 79 %).

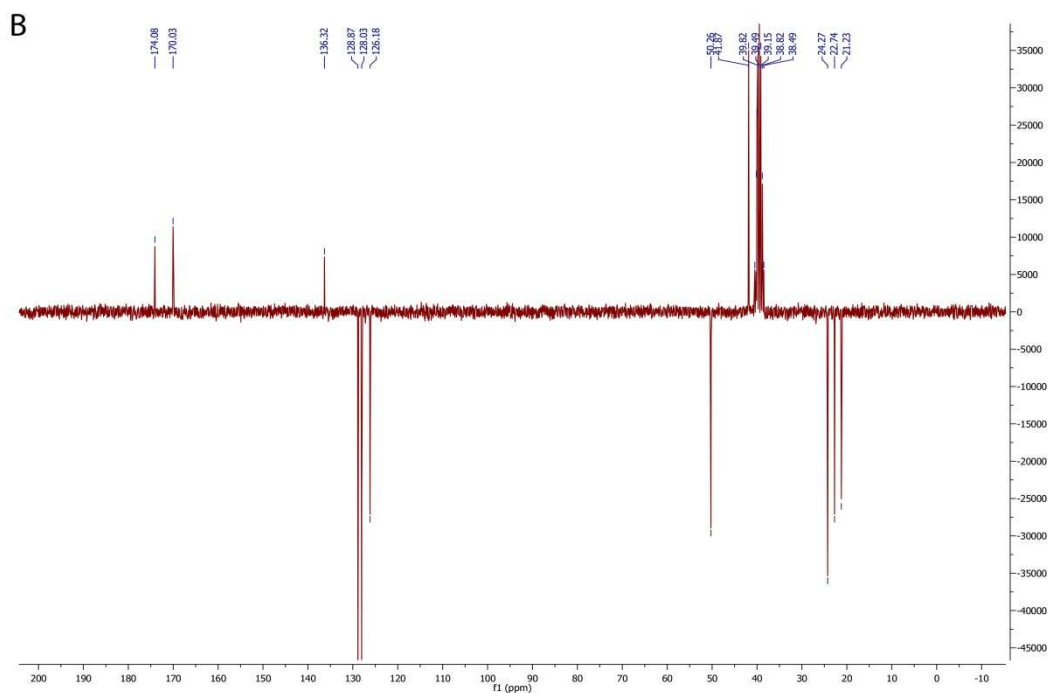
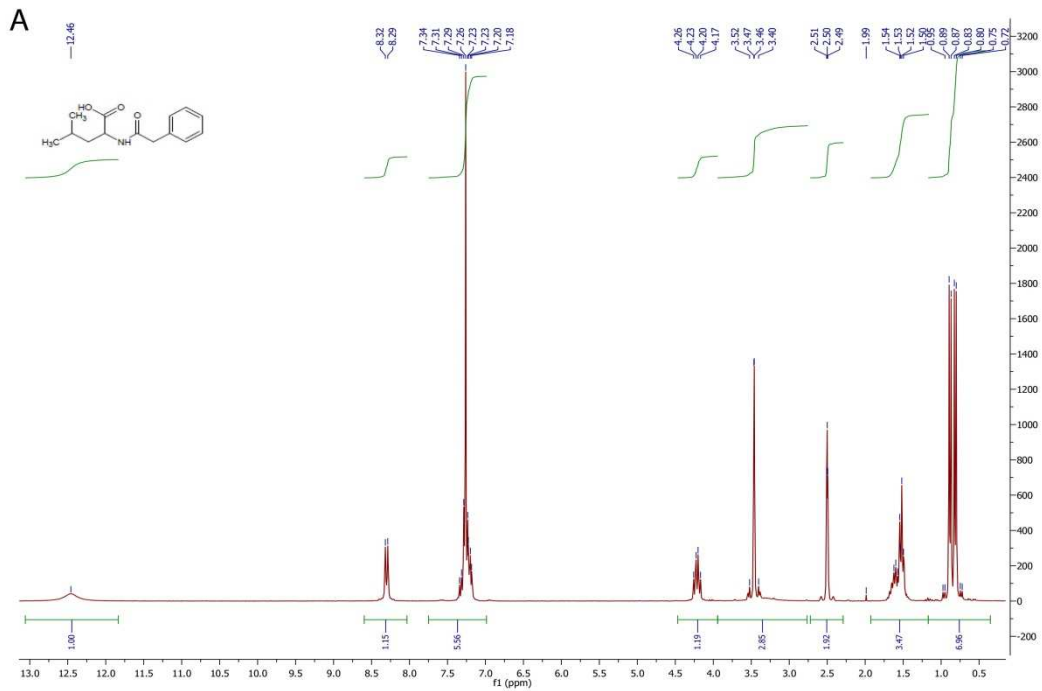


Obr. S3. N-PhAc- β -leucin

$^1\text{H NMR}$: (DMSO) δ 12,10 (s, 1H, COOH), 7,89 (d, $J = 10$, 1H, NH), 7,1-7,4 (m, 5H, ArH), 3,8-4,1 (m, 1H, CHN), 3,36 (d, 2H, CH₂CO), 3,25-3,35 (m, 2H), 2,2-2,45 (m, 2H, CH₂), 1,6-1,8 (m, 1H, CH), 0,78 (d, $J = 50$ Hz, 3H, CH₃), 0,8 (d, $J = 50$ Hz, 3H, CH₃)

$^{13}\text{C NMR}$: (DMSO) δ 172,66, 169,42, 136,23, 128,82, 128,03, 126,09, 50,63, 42,39, 36,62, 31,27, 18,82, 17,82

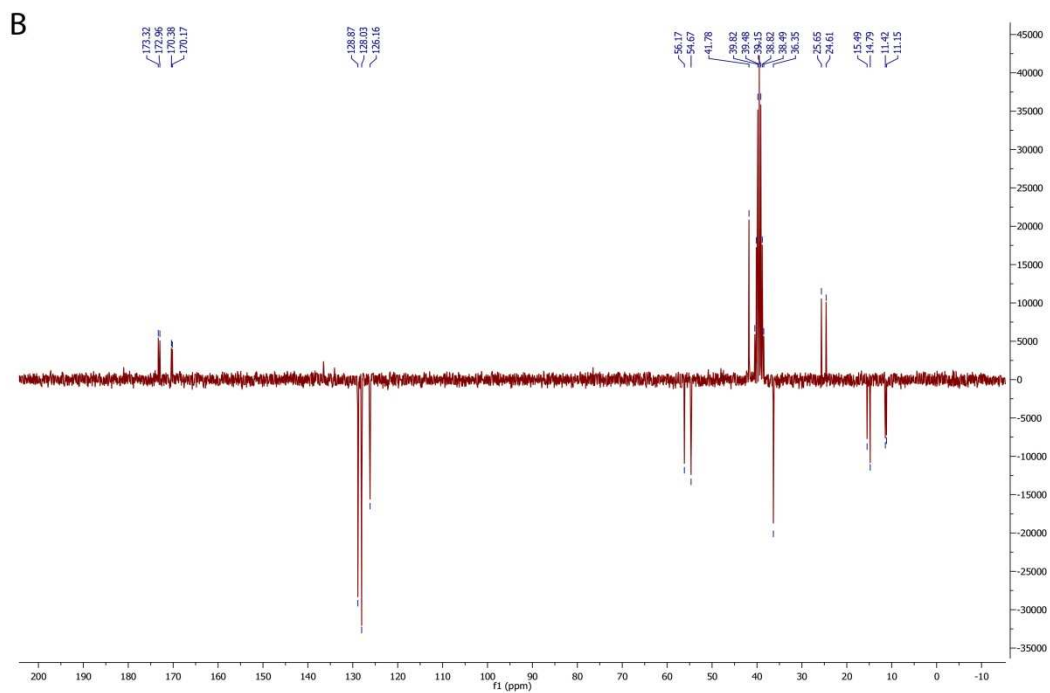
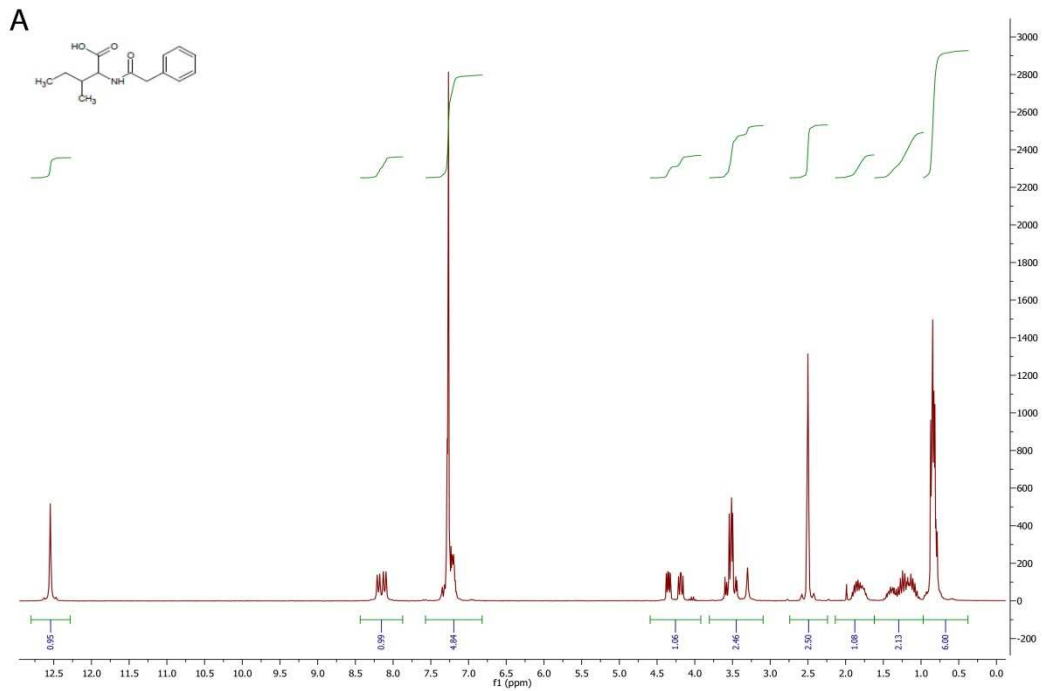
MS (ES⁺) m/z 250,1433 (M + H)⁺ - M = 249 g/mol, (1g, 69 %).



Obr. S4. N-PhAc- α -leucin

^1H NMR: (DMSO) δ 12,45 (bs, 1H, COOH), 8,30 (d, $J = 7,5$, 1H, NH), 7,15-7,3 (m, 5H, ArH), 4,26 (ddd, $J = 7,5; 7,5; 15$ Hz, 1H, CHN), 3,52 (s, 2H, CH_2CO), 1,49-1,65 (m, 3H, CH_2 , CH), 0,86 (d, $J = 15$ Hz, 3H, CH_3), 0,84 (d, $J = 17,5$ Hz, 3H, CH_3)

^{13}C NMR: (DMSO) δ 174,08, 170,03, 136,32, 128,03, 127,22, 126,19, 50,27, 41,88, 24,28, 22,75, 21,24
 MS (ES^+) m/z 250,1436 ($\text{M} + \text{H}^+$) - $M = 249$ g/mol, (1g, 76 %).

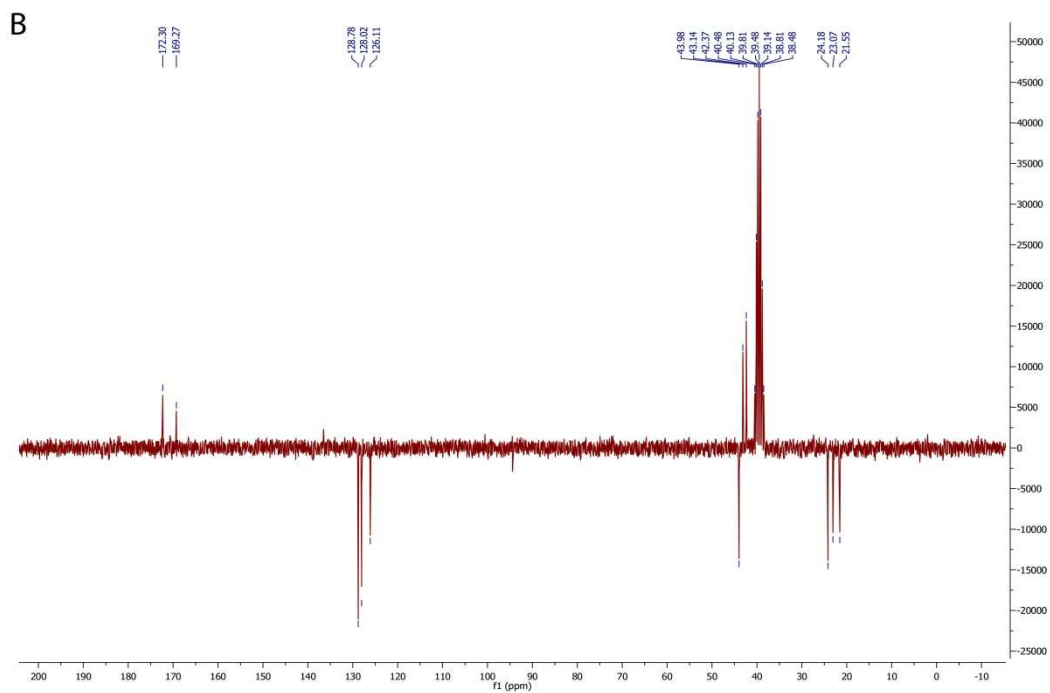
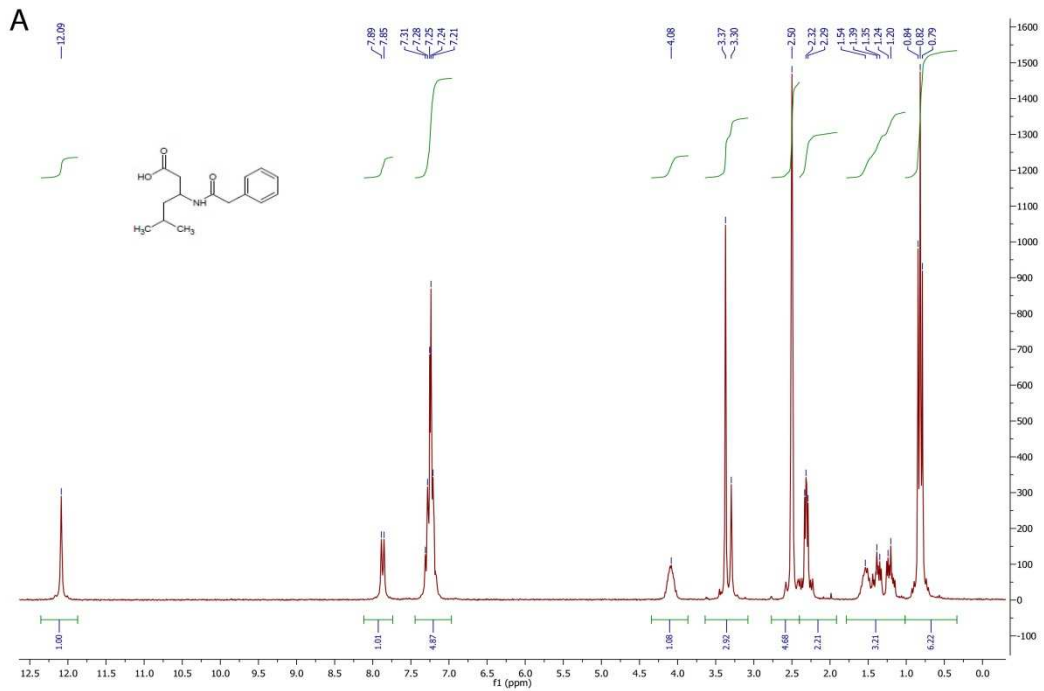


Obr. S5. N-PhAc- α -isooleucin

$^1\text{H NMR}$: (DMSO) δ 12,55 (s, 1H, COOH), 8,0-8,25 (m 1H, NH), 7,1-7,3 (m, 5H, ArH), 4,1-4,4 (m, 1H, CHN), 3,4-3,6 (m, 2H, CH₂CO), 1,7-1,9 (m, 1H, CH), 1,0-1,5 (m, 2H, CH₂), 0,75-1,0 (m, 6H, 2xCH₃)

$^{13}\text{C NMR}$: (DMSO) δ 173,32, 172,96, 170,38, 170,17, 137, 128,87, 128,03, 126,16, 56,17, 54,68, 41,78, 36,35, 25,66, 24,62, 15,49, 14,79, 11,42, 11,15

MS (ES⁺) m/z 250,1434 (M + H)⁺ - M = 249 g/mol, (1g, 77 %).

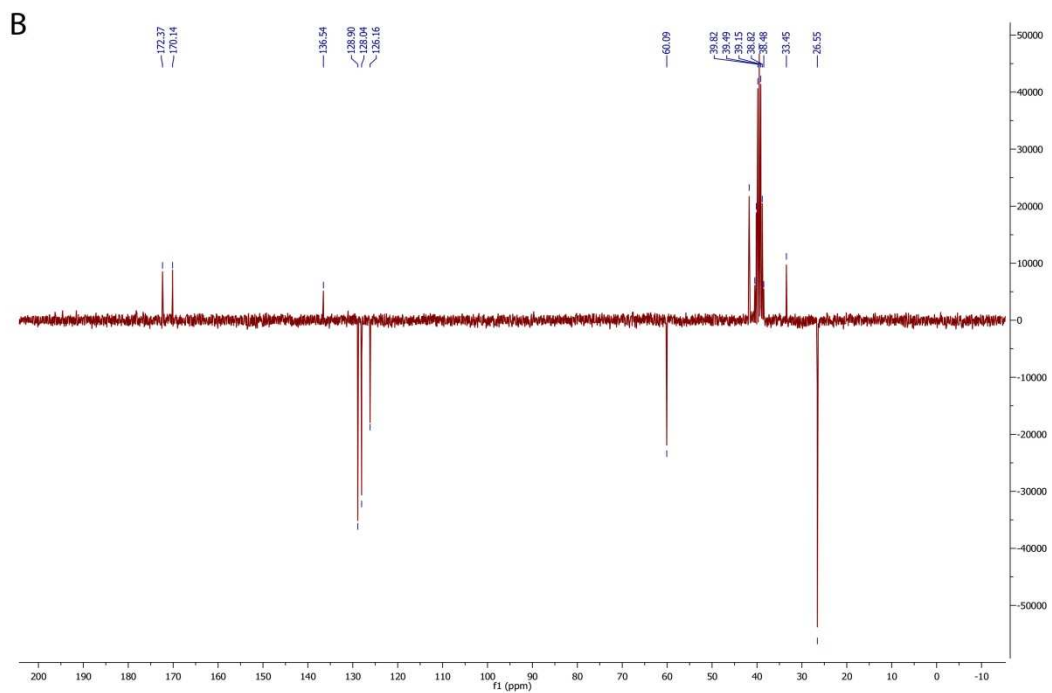
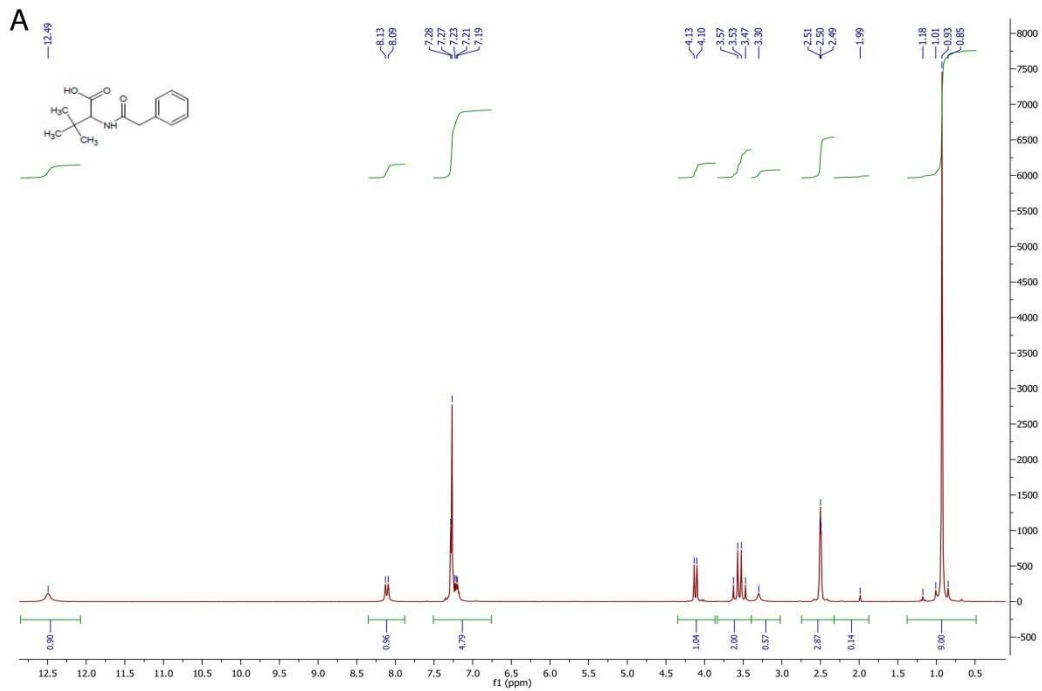


Obr. S6. N-PhAc- β -homoleucin

$^1\text{H NMR}$: (DMSO) δ 12,10 (s, 1H, COOH), 7,87 (d, $J = 7,5$, 1H, NH), 7,1-7,3 (m, 5H, ArH), 4,0-4,2 (m, 1H, CHN), 3,37 (s, 2H, CH_2CO), 3,3 (s, 1H), 2,25-2,4 (m, 2H, CH_2), 1,18-1,61 (m, 3H, $\text{CH} + \text{CH}_2$), 0,83 (d, $J = 5$ Hz, 3H, CH_3), 0,80 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C NMR}$: (DMSO) δ 172,29, 169,27, 136,49, 128,89, 128,02, 126,12, 43,99, 43,14, 42,37, 40,49, 24,19, 23,08, 21,56

MS (ES^+) m/z 264,16 ($\text{M} + \text{H}^+$) - $\text{M} = 263$ g/mol, (1g, 73 %).



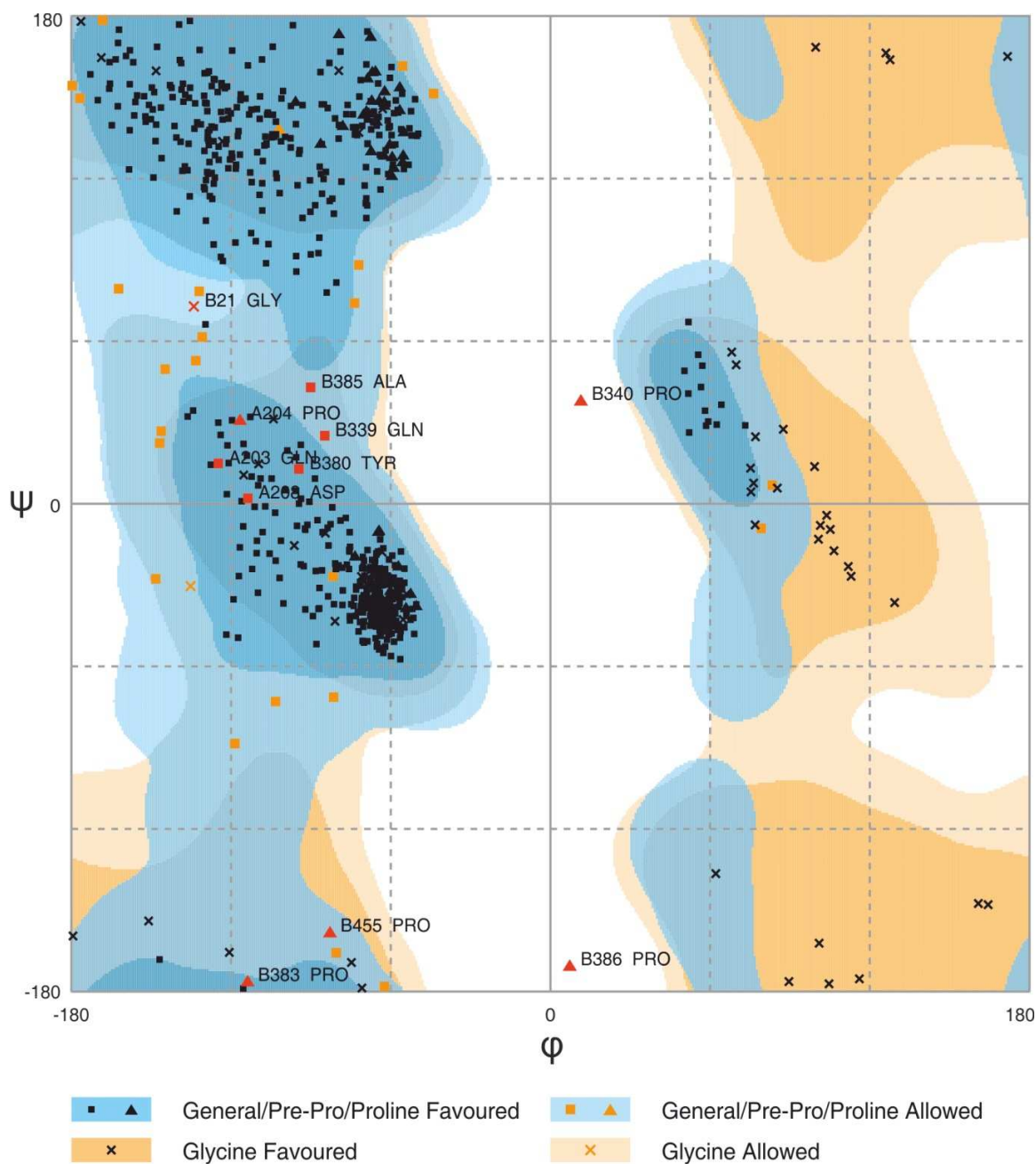
Obr. S7. *N*-PhAc- α -*terc*-leucin

$^1\text{H NMR}$: (DMSO) δ 12,49 (s, 1H, COOH), 8,11 (d, $J = 10$ Hz, 1H, NH), 7,2-7,3 (m, 5H, ArH), 4,11 (d, $J = 7,5$ Hz, 1H, CHN), 3,4-3,6 (m, 2H, CH₂CO), 0,93 (s, 9H, CH₃)

$^{13}\text{C NMR}$: (DMSO) δ 172,37, 170,14, 136,54, 128,90, 128,04, 126,16, 60,09, 41,74, 33,46, 26,56

MS (ES⁺) m/z 250,14346 (M + H)⁺ - M = 249 g/mol

(1g, 80 %).

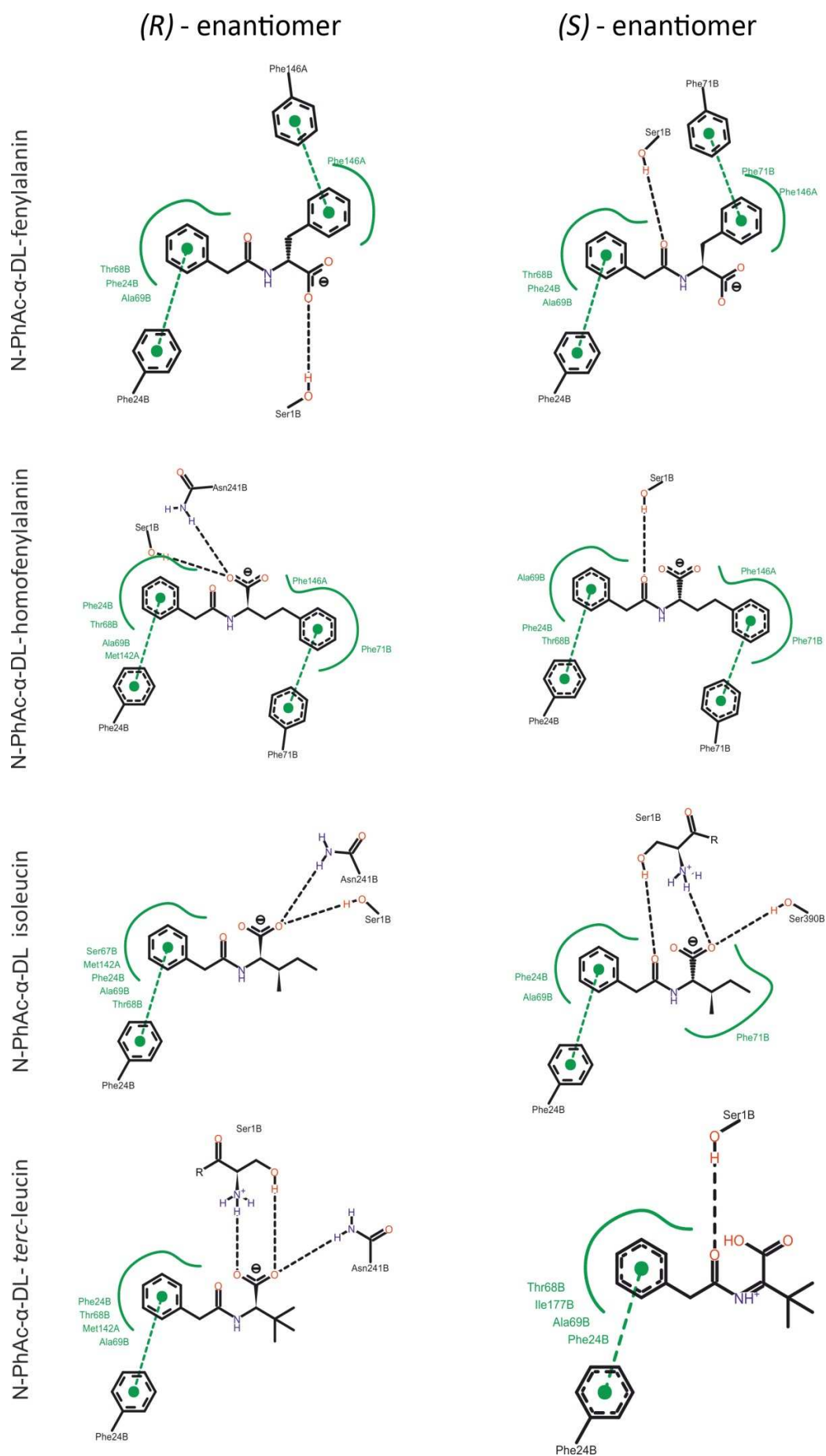


Počet aminokyselinových residuí v oblasti "přednostně zaujímaných vazebných úhlů" (98% očekáváno) : 724 (95,3%)

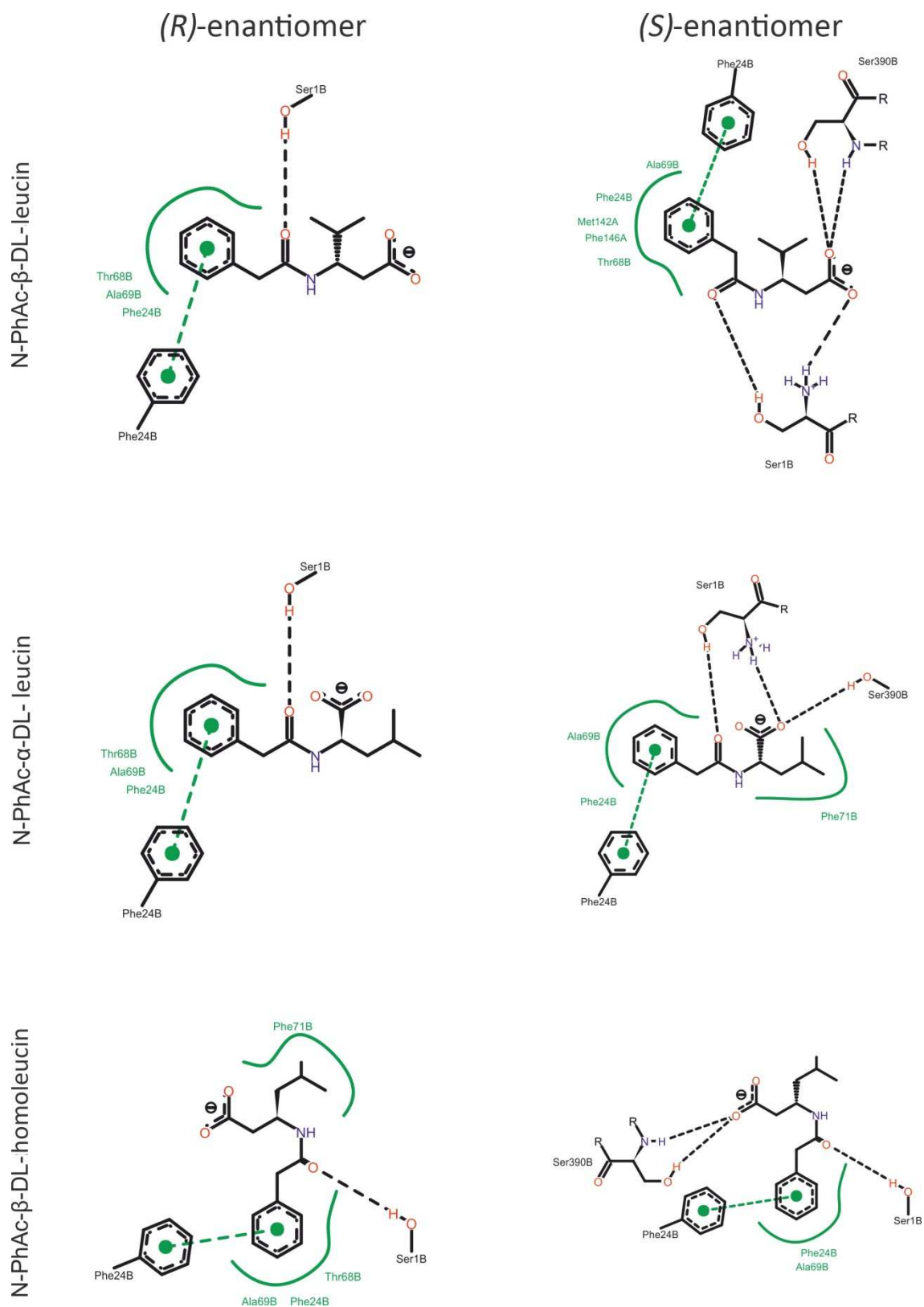
Počet aminokyselinových residuí v oblasti "povolených vazebných úhlů" (2% očekávána): 25 (3,3%)

Počet aminokyselinových residuí v oblasti "výjimečně povolených vazebných úhlů": 11 (1,4%)

Obr. S8. Ohodnocení Ramachandranova diagramu pro homologní model PGA^A vytvořený RAMPAGE serverem.



Obr. S9. Interakce PGA^A se substráty nesoucí objemnější substituenty vyhodnocené softwarem PoseView.



Obr. S10. Interakce PGA^A se substráty nesoucí méně objemné substituenty vyhodnocené softwarem PoseView.

Tab. 3. Retenční časy reaktantů a vznikajících produktů při syntéze vybraných SSBA

Acyl-donor (AD)	Retenční čas (min)	β -laktamový nukleofil	Retenční čas (min)	Antibiotikum	Retenční čas (min)
D-PGA	10,3	6-APA	6,7	ampicilin	11,7
D-HPGA	7,6	6-APA	8,7	amoxicilin	20
D-PGA	10,3	7-ADCA	6	cephalexin	10,6
D-HPGA	7,6	7-ADCA	5,9	cefadroxil	6,7

Poznámky: Stacionární fáze: Kolona Tessek SGX C18 5 μ m (4 x 250 mm, Tessek, ČR).
 Mobilní fáze: 0,01 M fosfátový pufr a metanol v poměru 9 : 1 (pH = 3,0) pro amoxicilin a cefadroxil; 0,01 M fosfátový pufr a metanol v poměru 7 : 3 (pH = 5,6) pro ampicilin a cephalixin.

HPLC stanovení reakčních produktů

Koncentrace reakčních komponent byly určeny pomocí HPLC (Dionex-Summit) za použití kolony Tessek SGX C18 5 μ m (4 x 250 mm, Tessek, Česká republika). Mobilní fáze (0,01 M fosfátový pufr a metanol) se odlišovaly pro jednotlivé substráty následovně: pH = 3,0 a 10 % metanol pro amoxicilin a cefadroxil, pH = 5,6 a 30 % metanol pro ampicilin a cephalixin.

Tab. 4. Retenční časy nasyntetizovaných substrátů pro enantioselektivní hydrolyzy

Racemické směsi substrátů	Retenční čas (min)
N-PhAc- α -fenylalanin	7,6
N-PhAc- α -homofenylalanin	8,8
N-PhAc- β -leucin	7,6
N-PhAc- α -leucin	4,6
N-PhAc- α -isoleucin	7,1
N-PhAc- β -homoleucin	7,8
N-PhAc- α - <i>terc</i> -leucin	9,9

Poznámky: Achirální stacionární fáze: kolona C-8 s reverzní fází. Mobilní fáze se skládala z vody (obsahující 0,1 % TFA) a acetonitrilu v poměru 7 : 3.

Tab. 5. Retenční časy enantiomerů, produktů reakce

Produkt	Retenční čas (min)	
	(<i>S</i>)-enantiomer	(<i>R</i>)-enantiomer
α -fenylalanin ^a	7,5	6,7
α -homofenylalanin ^a	11,5	9,1
β -leucin ^b	15,6	17,4
α -leucin ^b	57,1	30,3
α -isoleucin ^a	7,4	4,7
β -homoleucin ^a	13,6	12
α - <i>terc</i> -leucin ^c	9,2	8,4

Poznámky: ^a Chirální stacionární fáze: kolona Daicel Chropak R (+), 5 μ m - (250 x 4,0 mm I.D.), Daicel, Francie. Mobilní fáze: vodný roztok HClO₄, pH = 1, průtok 0,4 ml/min, 25°C, detekce při λ = 200 nm.

^b Chirální stacionární fáze: kolona Sumichiral OA-5000, 5 μ m - (250 x 4,0 mm I.D.), SCAS, Japonsko. Mobilní fáze: 2mM CuSO₄-isopropanol v poměru 95 : 5, průtok 1ml/min, 25°C, detekce při λ = 215 nm.

^c Chirální stacionární fáze: kolona Sumichiral OA-5000, 5 μ m - (250 x 4,0 mm I.D.), SCAS, Japonsko. Mobilní fáze: 2mM CuSO₄-isopropanol v poměru 98 : 2, průtok 1ml/min, 25°C, detekce při λ = 215 nm.

Tab. 6. Odvození geometrických parametrů pro reakce katalyzované PGA

PDB-ID komplexu	Ligand	Vzdálenost (Å)			
		O ^{Ser1β} → C	N ^{Ala69β} → O	N ^{Asn241β} → O	O ^{Gln23β} → H
1GM7	penicilin G	3,3	3,6	3,7	3,6
1GM8	penicilin sulfoxid	3,3	3,7	3,7	3,9
1GM9	penicilin sulfoxid	2,9	2,8	3,0	3,3
Maximální možné vzdálenosti		3,6	4,1	4,1	4,3

Poznánky: Pro účely analýzy, byly k ligandům přidány polární vodíkové atomy a proteinové struktury byly přiřazeny k 1GM7 za použití programu PyMol. Taktéž vzdálenosti byly měřeny v programu PyMol. V případě struktur 1GM7 a 1GM8 nesoucí mutaci Asn241 β →Ala241 β byla měřena vzdálenost N^{Asn241 β} → O k odpovídajícímu aminokyselinovému residuu pocházející ze struktury 1GM9. Maximální možné vzdálenosti byly odvozeny jako maximální pozorované vzdálenosti navýšené o 10 % své hodnoty, aby se částečně kompenzovaly možné chyby v důsledku molekulárního modelování.

3.17. Cílená modifikace PGA^A a techniky rekombinantní DNA

Příprava rekombinantního plasmidu nesoucího zmutovaný *pga^A* gen zahrnovala provedení standardní PCR reakce se specifickými DNA primery, purifikaci primárních PCR amplikonů a následnou tzv. overlap PCR. Tento výsledný PCR produkt byl podroben restrikci enzymem *Xba*I a následné ligaci s *Xba*I, *Sma*I-štěpeným vektorem pK19. Ligační směsí byl následně transformován hostitelský kmen *E. coli* a ze získaných transformantů byl vybrán PGA^A-pozitivní klon.

Tab. 7. DNA oligonukleotidy použité během PCR a jejich lokalizace vzhledem k *pga^A* genu

Specifický primer	Velikost (pb)	Nukleotidová sekvence	Lokalizace
UPACYL <i>Xba</i> I	28	CGCGGACCCATTCTAGACGGAGACAGAT	-31 ... -4
REVACYL <i>Pst</i> I	28	GTGTACTGCAGGCTTGCCAGCCACCAGG	2632 ... 2605
Fwd_mut330Cys_PGA ^A	34	GCTGAACGGCCCCGACAGTGGCTGGTGGGAATCCG	972 ... 1005
Rev_mut330Cys_PGA ^A	33	ACCAGCCGCACTGCGGGCCGTTTCAGCAGGATCG	997 ... 965

Standardní PCR

Standardní PCR byla provedena pomocí kombinací primerů (UPACYL*Xba*I a Rev_mut330Cys_PGA^A, Fwd_mut330Cys_PGA^A a REVACYL*Pst*I) a Herculasu II Fusion polymerasy v přítomnosti 4 % DMSO na chromosomálním templátu kmene *Achromobacter* sp. CCM4824 nesoucím gen pro PGA^A.

PCR reakce probíhaly v automatickém termálním PCR cycleru PTC-200 (MJ Research), a to v 0,5 ml PCR mikrozkuvkách Eppendorf v celkovém objemu reakční směsi 25 µl. Reakční směs se skládala z 0,4 µl Herculasu II Fusion polymerasy, 5 µl pufru pro Herculasu II, 1 µl DMSO, 0,5 µl reverzního primeru (tab. 7), 0,5 µl forwardového primeru (tab. 7), 16,1 µl H₂O, 0,5 µl dNTP a celkem 1 µl DNA templátu.

Vlastní polymerázové reakce sestávaly ze 30-40 opakujících se cyklů zahrnujících trojúrovňový teplotní profil (tab. 8A, str. 67).

Tab. 8A. Program automatického termálního PCR cycleru

Fáze	Kroky	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
1	Úvodní denaturace	98	180	1
2	Denaturace	98	20	30-40
	Nasedání primerů	57-61	20	
	Polymerace	72	60-120	
3	Konečná polymerace	72	300	1
4	Stop	4	600	1

Tab. 8B. Kompletní profil overlap PCR

Fáze	Kroky	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
1	Úvodní denaturace	98	180	1
2	Denaturace	98	20	5
	Nasedání primerů	59	20	
	Polymerace	72	60	
3	Denaturace	98	20	35
	Nasedání primerů	59	20	
	Polymerace	72	120	
4	Konečná polymerace	72	300	1
5	Stop	4	600	1

Po skončené amplifikaci DNA byla provedena elektroforetická analýza získaných PCR produktů.

Overlap PCR

Reakční směs pro overlap PCR byla připravena obdobně jako pro standardní PCR, pouze DNA templátem byla směs primárních PCR produktů v molárním poměru 1:1. Kompletní profil overlap PCR je uveden v tab. 8B, přičemž primery UPACYLXba1 a REVACYLPst1, amplifikující celý strukturní gen byly přidány buď ihned při zahájení PCR, či až po prvních pěti „overlap“ cyklech.

Elektroforetická analýza DNA

Rozměry používaných gelových nosičů byly: 7,5 x10 cm. Jako standard molekulových hmotností byla použita λ DNA štěpená restrikcí enzymem PstI. Jako zdroj napětí (3550 mA, 75-95V) byl používán EC 1000-90. Elektroforetogramy byly snímány fotodokumentačním systémem Kodak Gel Logic 200 Imaging system (Carestream Health, Inc.) a konvertovány do digitální podoby. Další zpracování probíhalo pomocí softwaru PhotoImpact SE.

Příprava agarosového gelu

0,5 g agarosy pro elektroforetický gel bylo za varu rozpuštěno v 30 ml 2 x ředěného TBE pufru. Po zchlazení bylo do rozpuštěné agarosy přidáno 2,3 µl zásobního roztoku EtBr a směs byla nalita do předem připravené elektroforetické aparatury.

Restrikce *Xba*I a ligace DNA molekul

Restrikce pomocí *Xba*I probíhaly po dobu 1,5 h při 37°C:

Bylo smícháno 35 µl DNA + 1 µl restrikčního enzymu *Xba*I + 4 µl pufru Tango (10 x).

Ligace DNA molekul probíhala v mikrozkušavkách Eppendorf v objemu 10 µl při teplotě 23°C po dobu 4 hod. za přítomnosti T4 DNA ligasy. Molární poměr vektor : insert byl v rozmezí 1 : 1 až 1 : 5.

Transformace kompetentních buněk *E. coli*

Ke kompetentním buňkám *E. coli* byla přidána ligační směs a takto vzniklá suspenze byla inkubována 30 min. v ledové lázni při 0°C. Po 90-s teplotním šoku při 42,5°C byly buňky opět inkubovány v ledové lázni (2 min.), a následně po přidání 400 µl LB kultivační půdy třepány cca 45 min. při 37°C. Buněčná suspenze byla vyseta na Petriho misky s pevnou LB půdou obsahující kanamycin, které byly inkubovány 16 hod. při 37°C a následně přes noc při teplotě 30°C.

Detekce PGA-pozitivních klonů pomocí NIPAB-testu

Vyhledávání PGA-pozitivních rekombinantních transformantů bylo prováděno razítkovací metodou s využitím 6-nitro-3-(fenylacetamido)-benzoové kyseliny (NIPAB) jako chromogenního substrátu. Rekombinantní kolonie *E. coli* narostlé po inkubaci při 30°C na pevné LBKm kultivační půdě byly přeneseny otiskem na sterilní filtrační papír Whatman No. 1, jenž byl posléze umístěn do sterilní Petriho misky a napuštěn 1 ml roztoku NIPAB (finální koncentrace 1,8 mg/ml, 0,05 M fosfátový pufr, pH = 8). Během 5-60 min. inkubace při 37°C vznikaly kolem PGA-pozitivních klonů žluté zóny způsobené přítomností NIPAB.

Izolace plazmidové DNA

PGA^A-pozitivní rekombinantní klony byly kultivovány v LB médiu doplněném kanamycinem (Km tekutá půda), přičemž pro izolaci plazmidové DNA byla použita modifikovaná minipreparativní metoda (157). 2 ml kultury získané po 16 hod. kultivaci na LBKm médiu v orbitální třepačce při 37°C byly odstředěny (15000 ot./min., 120 sekund, 15°C), supernatant byl vakuově odsát a k peletu bylo poté přidáno 200 µl pufru P1 s lysozymem a RNasou A. Takto připravená směs byla následně promíchána na stolní třepačce a ponechána při teplotě 37°C po dobu 10 min.

Poté bylo k izolační směsi přidáno 400 µl P2 pufru, směs byla jemně promíchána a ponechána 5 min. při laboratorní teplotě. Po přidání 300 µl P3 pufru byla směs po opětovném protřepání ponechána 15 min. při 4°C a vzniklá tvarohovitá sraženina byla odstředěna (7 min., 15000 ot./min.). K odebraným 700 µl supernatantu bylo přidáno 1500 µl EtOH, přičemž po promíchání byly mikroskopické kumavky ponechány 30 min. při +4°C. Poté byla směs opět odstředěna (7 min., 15000 ot./min.) a ihned byl odsát supernatant. Získaný pelet byl následně rozpuštěn v 200 µl acetát-MOPS pufru a lehce promíchán. Poté bylo přidáno 400 µl EtOH, směs byla promíchána a pak ponechána po dobu 15 min. v lednici při 4°C. Následně byla směs opět odstředěna (7 min., 15000 ot./min.), supernatant odsát, vysušen a rozpuštěn v 50 µl 10 mM TRIS pufru (pH = 8,5).

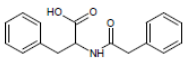
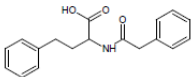
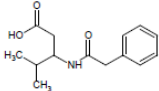
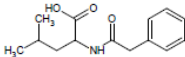
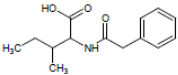
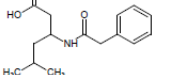
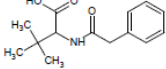
Vybrané rekombinantní plazmidy (po detekci na agarosovém gelu) byly finálně purifikovány pomocí " High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche) a podrobeny sekvenční analýze pro ověření vnesené mutace.

4. Výsledky

4.1. Charakteristika purifikovaných PGA^A a PGA^{Ec} : Enantioselektivní hydrolýzy

Racemické směsi vybraných α/β -aminokyselin (tab. 9) byly použity jako substráty v enantioselektivních hydrolytických reakcích katalyzovaných purifikovanými PGA^A a PGA^{Ec} .

Tab. 9. α/β -aminokyseliny použité v enantioselektivních reakcích

Substráty	Struktura	Využití produktu	Literární odkazy
N-PhAc- α -DL-fenylalanin		α -(<i>S</i>)-fenylalanin - přímý prekurzor neuromodulátoru fenyletylaminu	158
N-PhAc- α -DL-homofenylalanin		(<i>S</i>)-homofenylalanin - stavební blok léčivé látky pro léčbu hypertenze a kardiovaskulárních onemocnění	159
N-PhAc- β -DL-leucin		Stavební blok pro syntézu terpenoidů nebo proteinů	160
N-PhAc- α -DL-leucin		(<i>S</i>)-enantiomer - stavební blok pro syntézu proteinů	161
N-PhAc- α -DL-isoleucin		(<i>S</i>)-isoleucin - doplněk potravy	
N-PhAc- β -DL-homoleucin		Modulátor aktivity myeloperoxidasy, stavební blok biologicky aktivních tripeptidů	162, 163
N-PhAc- α -DL- <i>terc</i> -leucin		(<i>S</i>)- <i>terc</i> -leucin - stavební blok pro syntézu léčivých látek proti AIDS a chemoterapeutik	96, 164

Hydrolytické reakce katalyzované oběma enzymy za stejných podmínek byly analyzovány pomocí HPLC. Vypočtené hodnoty enantioselektivity jsou shrnuty v tab. 10 (str. 71).

Tab. 10. Hodnoty enantioselektivity (E) PGA^A and PGA^{Ec} vůči N-PhAc- α / β -aminokyselinám

Substráty	E-hodnoty	
	PGA^A	PGA^{Ec}
N-PhAc- α -DL-fenylalanin	90 ± 5	90 ± 5
N-PhAc- α -DL-homofenylalanin	80 ± 5	80 ± 5
N-PhAc- β -DL-leucin	68 ± 3	60 ± 5
N-PhAc- α -DL-leucin	80 ± 5	80 ± 5
N-PhAc- α -DL-isoleucin	80 ± 5	80 ± 5
N-PhAc- β -DL-homoleucin	85 ± 4	55 ± 5
N-PhAc- α -DL- <i>terc</i> -leucin	105 ± 5	75 ± 5

Vysoký stupeň enantioselektivity ($E = 90 \pm 5$) pro oba dva enzymy byl pozorován v enzymaticky katalyzované hydrolýze N-PhAc- α -fenylalaninu. Jak PGA^A , tak PGA^{Ec} vykazovaly podobný stupeň enantioselektivity vůči dalším substrátům N-PhAc- α -leucinu, N-PhAc- α -DL-homofenylalaninu a N-PhAc- α -isoleucinu. PGA^A vykazoval podstatně vyšší enantioselektivitu s následujícími substráty: N-PhAc- β -homoleucin, N-PhAc- α -*terc*-leucin a N-PhAc- β -leucin.

4.2. Kinetické parametry PGA^A a PGA^{Ec} pro hydrolýzy SSBA

Hodnoty kinetických konstant k_{cat} a K_m a konstanty substrátové specifity (někdy označována i jako konstanta katalytické účinnosti enzymu) k_{cat}/K_m (tab. 11, str. 72) pro PGA^A potvrdily vysokou katalytickou aktivitu pro substráty s D-4-hydroxyfenylglycyl- (amoxicilin nebo cefadroxil) nebo D-fenylglycyl- (ampicilin a cephalixin) postranními řetězci. Hodnoty k_{cat}/K_m pro PGA^A mají vůči různým SSBA klesající tendenci v následujícím pořadí: amoxicilin \rightarrow cefadroxil \rightarrow ampicilin \rightarrow cephalixin. Toto pořadí korespondovalo s klesající afinitou k acylovým residuím testovaných substrátů: D-4-hydroxyfenylglycyl \rightarrow D-fenylglycyl. Hodnoty k_{cat}/K_m pro PGA^{Ec} byly mnohem vyrovnanější, o poznání nižší a klesaly v následujícím pořadí: cefadroxil \rightarrow cephalixin \rightarrow amoxicilin \rightarrow ampicilin (tab. 11, str. 72).

Tab. 11. Kinetické parametry pro PGA^{Ec} a PGA^A katalyzované hydrolýzy vybraných antibiotik

Název substrátu	K_m (mM)		k_{cat} (s^{-1})		k_{cat}/K_m ($mM^{-1} s^{-1}$)	
	PGA^{Ec}	PGA^A	PGA^{Ec}	PGA^A	PGA^{Ec}	PGA^A
ampicilin	$3,57 \pm 0,14$	$0,45 \pm 0,02$	$21 \pm 0,8$	$22 \pm 0,8$	$6,03 \pm 0,32$	$49,1 \pm 2,6$
amoxicilin	$1,54 \pm 0,08$	$0,22 \pm 0,01$	$14 \pm 0,6$	$27 \pm 1,1$	$9,03 \pm 0,58$	$124,2 \pm 8,6$
cephalexin	$2,82 \pm 0,21$	$0,80 \pm 0,06$	$36 \pm 0,6$	$19 \pm 0,3$	$12,7 \pm 1,0$	$23,6 \pm 1,8$
cefadroxil	$0,84 \pm 0,04$	$0,55 \pm 0,02$	$25 \pm 0,8$	$39 \pm 1,2$	$29,7 \pm 1,6$	$71,1 \pm 3,8$

Reakční podmínky: 0,05 M fosfátový pufr (pH = 7,0), 37°C.

4.3. Kineticky řízené syntézy SSBA při nízkých koncentracích substrátů

Purifikované enzymy PGA^A a PGA^{Ec} byly použity v kineticky řízených syntézách antibiotik amoxicilinu, ampicilinu, cefadroxilu a cephalexinu, kdy reakční směsi obsahovaly nízké koncentrace substrátů: 15 mM aktivovaný AD (D-fenylglycin amid nebo D-4-hydroxyfenylglycin amid) a 25 mM N (6-APA nebo 7-ADCA). Poměr AD/N v reakci byl 0,6. Koncentrace vznikajícího antibiotika (P_s) a volné aminokyseliny (produktu hydrolýzy aktivovaného AD a antibiotika, P_h) byly stanovovány pomocí HPLC - vypočtený parametr S/H je uveden v tab. 12 (str. 73). Z výsledků vyplývá, že PGA^A je oproti PGA^{Ec} podstatně účinnější při syntéze amoxicilinu a ampicilinu. Oba enzymy jsou pak srovnatelné, co se týče syntéz cefadroxilu a cephalexinu: mezi PGA^A a PGA^{Ec} nebyl pozorován téměř žádný rozdíl v hodnotách P_{Smax} , které klesají pro oba dva enzymy podobně v následujícím pořadí: cephalexin \rightarrow cefadroxil \rightarrow ampicilin \rightarrow amoxicilin. P_{Smax} pro cefadroxil a cephalexin syntetizované za využití PGA^A je 2,9 resp. 3,4 mM. Tyto hodnoty pro PGA^{Ec} dosahovaly hodnot 2,3, resp. 3,3 mM (viz. výsledky uvedené v publikaci, která je uvedena jako příloha 3 disertační práce).

Tab. 12. Parametry S/H poměr a P_{Smax} pro kinetické syntézy SSBA katalyzované PGA^{Ec} a PGA^A

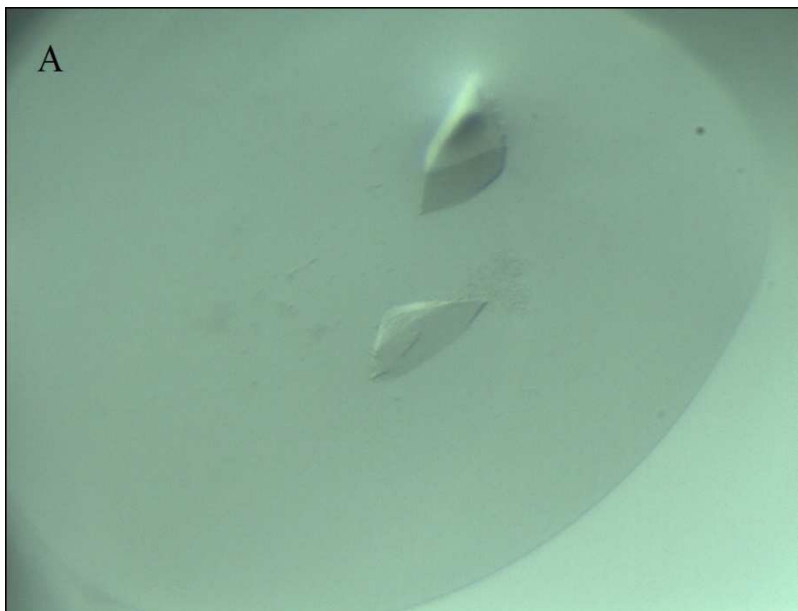
Acyl-donor (AD)	β -laktamový nukleofil	Antibiotikum	P_{Smax} (mM)		S/H	
			PGA^{Ec}	PGA^A	PGA^{Ec}	PGA^A
D-PGA	6-APA	ampicilin	1,9	2,5	0,8	3,8
D-HPGA	6-APA	amoxicilin	1,5	2,4	0,8	3,2
D-PGA	7-ADCA	cephalexin	3,3	3,4	3,9	3,7
D-HPGA	7-ADCA	cefadroxil	2,3	2,9	2,4	2,5

Reakční podmínky: Syntézy antibiotik v roztoku 15 mM AD a 25 mM β -laktamového nukleofilu v prostředí 0,05 M fosfátového pufru o pH = 7,0 a teplotě 30°C katalyzované PGA^{Ec} a PGA^A . Poměr S/H je poměr počátečních rychlostí syntézy antibiotika a hydrolýzy AD. P_{Smax} představuje maximální množství (mM) akumulovaného antibiotika v průběhu reakce.

4.4. Krystalizační experimenty nového enzymu PGA^A

Pro krystalizační experimenty jsme zvolili difúzní metody využívající visících a sedících kapek. Pilotní krystalizační experimenty byly provedeny pomocí komerčně dostupných sad nejpoužívanějších krystalizačních podmínek ve formě sedících kapek v 3 x 96-jamkových krystalizačních destičkách. Jednotlivé podmínky byly připraveny s využitím krystalizačního robota a krystalizační destičky důkladně přelepeny fólií. Jako zásobní roztok proteinu byl užíván enzym v koncentraci 20 mg/ml v 0,2 M Tris-HCl pufru (pH = 7,2), vždy čerstvě purifikovaný, krátce před krystalizačním procesem zakonzentrováný a pro krátkodobé uchování a případný transport uchovávaný v ledu. Experimenty probíhaly v krystalizační místnosti termostátované na 17°C. U každé jednotlivé krystalizační podmínky byly testovány poměry objemů roztoku proteinu ku roztoku srážedla, a to v poměrech 1 : 1 a 2 : 1. Jako inhibitor byla použita PAA v rozmezí koncentrace 6-100 mM.

Z testovaných základních screenovacích komerčně dostupných sad od společnosti Qiagen bylo nejlepších výsledků dosaženo za použití sady JCSG Core3, a sice u krystalizační podmínky skládající se z 0,1 M bicinového pufru a 5 % PEG 6000 o celkovém pH = 9,0 a 6 mM PAA. (viz obr. 8A a 8B, str. 74-75). Vzniklé krystaly měly symetrický trojúhelníkový tvar a za použití polarizačního filtru difraktovaly světlo. Při maximálním přiblížení objektivu mikroskopu byl změřen průměr krystalů, který činil přibližně 200 μm .





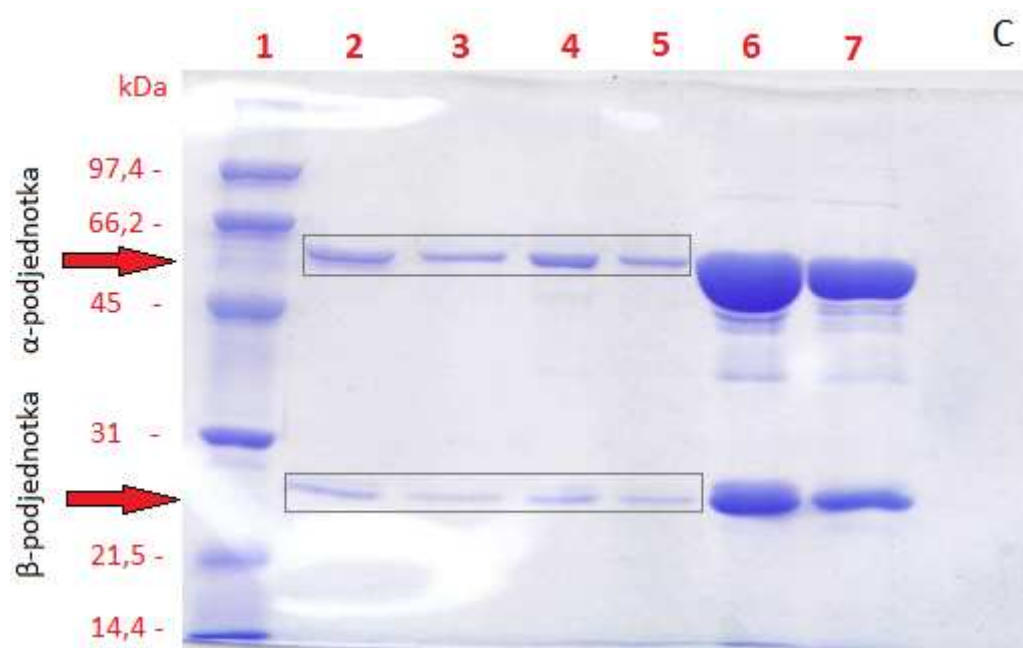
Obr.8. Proteinové krystaly enzymu PGA^4 vytvořené v 0,1 M bicinovém pufru a 5 % PEG 6000 o celkovém $\text{pH} = 9,0$. Poměr objemu roztoku proteinu ku množství srážedla činil 1 : 1 (A) a 2 : 1 (B). Jako inhibitor byla použita 6 mM PAA.

Získané proteinové krystaly byly po 9 měsících vyjmuty, přeneseny do 20 % roztoku glycerolu a zamraženy v tekutém N_2 pro transport na synchrotronovou analýzu do SRN. Během transportu však došlo k jejich fyzickému poškození a měření tak bylo znemožněno. Torza krystalů byla posléze posloužila jako krystalizační jádra při optimalizaci výše uvedené krystalizační podmínky.

Optimalizace byla prováděna jednak manuálně ve formě visících, tak i poloautomaticky formou sedících kapek. V případě visících kapek byla optimalizace provedena v kombinaci s očkovací technikou. Drobné krystaly z prvního experimentu byly použity jako templáty pro růst větších a dokonalejších krystalů. Modifikovalo se pH a to po půl jednotce pH v rozmezí hodnot od 3 do 9, přičemž poměry objemů roztoku proteinu ku roztoku srážedla byly opět 1 : 1 a 2 : 1. V jednotlivých jamkách 24-jamkové krystalizační destičky bylo přítomno vždy 800 μl roztoku srážedla. Směs proteinu a srážecího roztoku byla následně nanášena na tenké krycí sklíčko, které bylo pomocí sterilního vzduchu předem pečlivě zbaveno nečistot. Sklíčko s naneseným vzorkem bylo následně obráceno „hlavou dolů“ nad rezervoár obsahující konkrétní srážedlo. V případě optimalizace formou sedících kapek, která byla oproti prvním experimentům provedena již jen manuálně, byly

měněny hodnoty pH (po 0,5 jednotce v rozmezí hodnot od 3 do 9), koncentrace polyetylglykolu od 3 % do 9 %, objemy zásobního roztoku enzymu ku srážedlu a to v poměrech 1 : 1 a 2 : 1. Inhibitorem byla zpočátku PAA(6 mM) a poté PMSF (230 μ M). Vyzkoušeny byly také nové krystalizační sady Morpheus a Midas a manuálně připravené směsné kombinace JCSG Core3 s Morpheusem, resp. Midasem v poměru 8 : 2. V rámci optimalizace bylo dále připraveno 5 vzorků enzymu po štěpení různě koncentrovaným termolysinem (obr. 8C).

Do současnosti se však podařilo získat pouze několik menších krystalů, které však byly velmi ploché a tudíž pro jakoukoliv manipulaci a následné měření nevhodné. Získané drobné krystaly pocházely z opětovného opakování výchozí podmínky. Z optimalizovaných podmínek dosud žádné další krystaly nevznikaly. Původně získané krystaly (obr. 8A a 8B, str. 74-75) tak byly nejzdařilejšími krystaly PGA^A , které se však nepodařilo analyzovat.



Obr. 8C. SDS-PAGE elektroforéza po štěpení PGA^A různě koncentrovaným termolysinem.

- 1 – standard molekulových hmotností
- 2 – PGA^A po štěpení 72 μ M termolysinem
- 3 – PGA^A po štěpení 14,4 μ M termolysinem
- 4 – PGA^A po štěpení 7,2 μ M termolysinem
- 5 – PGA^A po štěpení 0,72 μ M termolysinem
- 6 – proteinový extrakt PGA^A po dialýze
- 7 – proteinový extrakt PGA^A před nanesením na kolono obsahující COO^- fractogel

4.5. Homologní model PGA^A

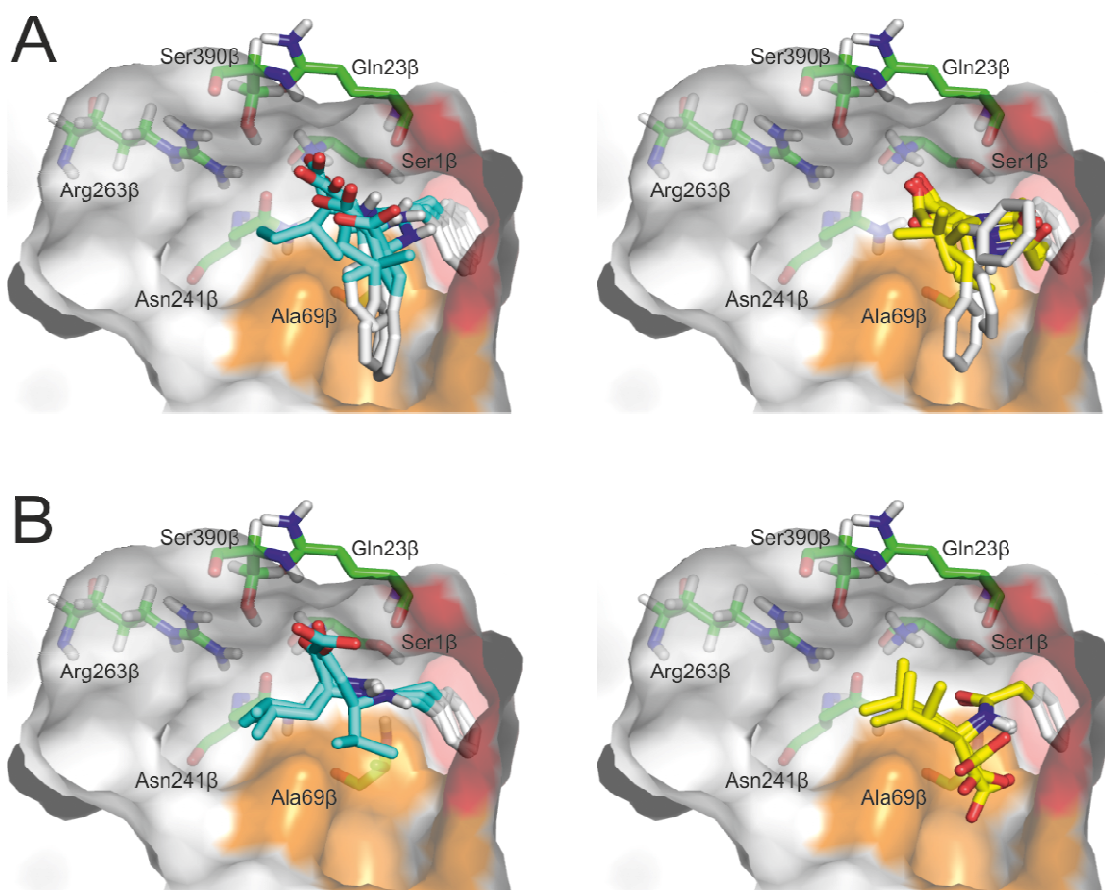
4.5.1. *In-silico* potvrzení rozdílů v enantioselektivitách PGA^{Ec} a PGA^A

Vzhledem k neúspěšné snaze krystalizovat protein PGA^A jsme se rozhodli připravit homologní model PGA^A , abychom mohli studovat molekulární mechanismus enantioselektivních reakcí. Vzniklý model PGA^A byl využit dále jako receptor v experimentech molekulárního modelování s oběma enantiomerními formami sedmi experimentálně studovaných substrátů (tab. 13, str. 78). Vazebné energie predikované molekulárním dokováním velmi dobře korelovaly ($R = -0,76$) s molekulovými hmotnostmi jednotlivých testovaných substrátů. Maximální rozdíl v predikovaných vazebných energiích mezi jednotlivými enantiomery daného substrátu byl pouze 0,7 kcal/mol. Protože takováto diference se stále nachází v rozmezí chyby skórovací funkce, pozorované rozdíly mezi vazebnými afinitami jednotlivých enantiomerů by mohly být považovány za zanedbatelné, a tedy bez významného vlivu na enantioselektivitu PGA^A . Predikované struktury komplexů byly dále analyzovány s ohledem na interakce substrátů s aminokyselinovými zbytky tvořícími nukleofil vazebné místo, tj. Ala69 β , Asn241 β , Gln23 β a Ser1 β . Pro všechny N-PhAc- α -aminokyseliny a N-PhAc- β -leucin platí, že vzdálenosti funkčních skupin důležitých aminokyselin byly zřetelně kratší pro (*S*)-enantiomery, což poukazuje na tento enantiomer jako na preferovanou formu. Naopak, co se týče N-PhAc- β -leucinu, byl preferovaným enantiomerem (*R*)-enantiomer. Acylové zbytky všech enantiomerních párů zaujímaly takový vazebný mód, který umožňoval acylovému zbytku velmi dobré zabudování do acyl vazebného místa PGA^A , ve kterém jejich fenylový kruh tvoří π - π interakce s aminokyselinovým zbytkem Phe24 β a nejčastěji také hydrofóbní interakce s Phe24 β , Thr68 β a Ala69 β , jak je ukázáno na obr S9 a S10 (str. 62 a 63). Na základě našich dokovacích experimentů jsme kromě acyl vazebného místa rozlišili také sekundární hydrofobní podmísto tvořené zejména následujícími aminokyselinovými zbytky: Ala69 β , Phe71 β , Ala149 α a Phe146 α . Vazebné módy jednotlivých enantiomerů všech sedmi testovaných substrátů do kavity aktivního centra PGA^A jsou graficky znázorněny na obr. 9 (str. 79). Z obrázku je patrné červené vyobrazení acyl vazebného místa a oranžové zobrazení sekundárního hydrofobního podmísta.

Tab. 13. Reaktivita vazebných módů α/β -aminokyselin u PGA^A

Substrát	Enantiomer	Vzdálenost (Å)				Predikován jako reaktivní	Predikovaná preference
		O ^{Ser1β} → C	N ^{Ala69β} → O	N ^{Asn241β} → O	O ^{Gln23β} → H		
N-PhAc- α -DL-fenylalanin	(<i>S</i>)	3,4	4,0	4,0	3,9	Ano	(<i>S</i>)
	(<i>R</i>)	5,2	6,3	7,9	5,4	Ne	
N-PhAc- α -DL-homofenylalanin	(<i>S</i>)	3,3	3,7	3,9	3,3	Ano	(<i>S</i>)
	(<i>R</i>)	4,6	6,2	7,4	5,2	Ne	
N-PhAc- β -DL-leucin	(<i>R</i>)	3,2	3,7	4,0	3,5	Ano	(<i>R</i>)
	(<i>S</i>)	3,4	3,9	4,0	4,4	Ne	
N-PhAc- α -DL-leucin	(<i>S</i>)	3,4	3,9	3,8	3,0	Ano	(<i>S</i>)
	(<i>R</i>)	3,4	4,0	4,1	4,6	Ne	
N-PhAc- α -DL-isoleucin	(<i>S</i>)	3,6	4,1	3,9	2,8	Ano	(<i>S</i>)
	(<i>R</i>)	4,5	6,2	7,4	5,1	Ne	
N-PhAc- β -DL-homoleucin	(<i>S</i>)	3,2	3,8	3,7	2,9	Ano	(<i>S</i>)
	(<i>R</i>)	3,4	3,8	4,0	4,4	Ne	
N-PhAc- α -DL- <i>terc</i> -leucin	(<i>S</i>)	3,3	4,0	4,1	3,3	Ano	(<i>S</i>)
	(<i>R</i>)	4,7	6,3	7,5	4,8	Ne	

Poznámka: Nevýhodné interakce za mezními hodnotami jsou zvýrazněny tučně.



Obr. 9. Predikované vazebné módy sedmi experimentálně testovaných substrátů v kavitě aktivního místa PGA^A . A) Vazebné módy enantiomerů s objemnějšími substituenty (zbytky: α -fenylalanin, α -homofenylalanin, α -isoleucin a α -terc-leucin). B) Vazebné módy enantiomerů s méně objemnými substituenty. Šedivý povrch reprezentuje kavitě aktivního místa, červený povrch představuje acyl vazebné místo, oranžový povrch sekundární hydrofobní podmísto. Klíčová katalytická aminokyselinová residua aktivního místa jsou znázorněna zeleně, preferované a nepreferované enantiomery jsou vykresleny zeleně, resp. žlutě.

4.5.2. Využití homologního modelu pro predikci nových substrátů

Protože *in-silico* molekulární dokování sedmi substrátů do homologního modelu PGA^A potvrdilo experimentální data získaná s purifikovaným PGA^A (tab. 9 a 10, str. 70 a 71), využili jsme dále tento přístup pro *in-silico* predikci enantioselektivních hydrolyz nekonvenčních racemických směsí α/β -aminokyselin, jejichž enantiomery mají aplikační potenciál (tab. 14, str. 80).

Tab. 14. Seznam substrátů použitých pro predikci enantioselektivity PGA^A

Substrát	Struktura	Využití produktu	Literární odkazy
N-PhAc-3-aminopent-4-ynová kyselina		(<i>S</i>)-enantiomer - stavební blok pro syntézu léčiva Elarofiban	165
N-PhAc-3-amino-3-pyridin-propanová kyselina		(<i>S</i>)-enantiomer - stavební blok pro syntézu léčiva Xemilofiban	166
N-PhAc-3-amino-3-benzyl-2-hydroxybutanová kyselina		(<i>S</i>)-enantiomer - stavební blok pro syntézu léčiva paclitaxel	167
N-PhAc-3-amino-3-(3-chloro-4,5-dihydroxyfenyl) propanová kyselina		(<i>S</i>)-enantiomer - stavební blok pro syntézu léčiva lidamycin	168
N-PhAc-<i>p</i>-Cl-α-DL-fenylalanin		(<i>R</i>)-enantiomer - prekurzor pro syntézu analgetika Zolmitriptanu	92
N-PhAc-<i>p</i>-F-α-DL-fenylalanin		(<i>R</i>)-enantiomer - stavební blok léčiva Abarelix	92
N-PhAc-<i>p</i>-Cl-β-DL-fenylalanin		(<i>S</i>)-enantiomer - látka využívaná pro nejrůznější laboratorní účely	Sigma-Aldrich

Výsledky z molekulárního modelování s čistými enantiomery racemických směsí sedmi N-PhAc- α/β -aminokyselin do kavity aktivního místa homologního modelu PGA^A jsou ukázány v tab. 15 (str. 81).

Experimentálně jsme postupovali analogicky jako při vyhodnocování interakcí PGA^A-enantiomer v předchozí kapitole. Nejdříve jsme se zaměřili na rozdíly v predikovaných vazebných energiích mezi jednotlivými enantiomery konkrétních substrátů a dále jsme se soustředili na ověření rozdílů v potenciální reaktivitě těchto nových substrátů pomocí týchž geometrických parametrů jako u substrátů v kapitole 4.5.1., tj. s aminokyselinovými zbytky tvořícími nukleofil vazebné místo, tedy Ala69 β , Asn241 β , Gln23 β a Ser1 β .

Tab.15. *In-silico* predikce enantioselektivních hydrolyz nových substrátů katalyzovaných PGA^A

Substrát	Enantiomer	Vzdálenost (Å)				Predikovaný jako reaktivní	Predikovaná preference
		O ^{Ser1β} → C	N ^{Ala69β} → O	N ^{Asn241β} → O	O ^{Gln23β} → H		
N-PhAc-3-aminopent-4-ynová kyselina	(<i>R</i>)	3,9	4,5	4,7	4,7	Ne	-
	(<i>S</i>)	3,5	4,4	4,3	5,3	Ne	
N-PhAc-3-amino-3-pyridin-propanová kyselina	(<i>R</i>)	3,2	3,7	3,9	3,1	Ano	(<i>R</i>)
	(<i>S</i>)	4,2	4,2	5,0	5,0	Ne	
N-PhAc-3-amino-3-benzyl-2-hydroxybutanová kyselina	(<i>S</i>)	3,3	3,8	4,0	3,4	Ano	(<i>S</i>)
	(<i>R</i>)	4,2	6,1	7,8	3,8	Ne	
N-PhAc-3-amino-3-(3-chloro-4,5-dihydroxyphenyl)propanová kyselina	(<i>R</i>)	3,1	3,6	4,0	2,9	Ano	(<i>R</i>)
	(<i>S</i>)	3,6	4,1	4,3	4,2	Ne	
N-PhAc- <i>p</i> -Cl-α-D-fenylalanin	(<i>S</i>)	3,2	3,8	3,8	2,0	Ano	(<i>S</i>)
	(<i>R</i>)	4,8	6,6	8,0	4,2	Ne	
N-PhAc- <i>p</i> -F-α-DL-fenylalanin	(<i>R</i>)	3,6	4,1	4,0	2,6	Ano	-
	(<i>S</i>)	3,4	4,0	4,1	3,7	Ano	
N-PhAc- <i>p</i> -Cl-β-DL-fenylalanin	(<i>R</i>)	3,2	3,6	4,0	3,2	Ano	(<i>R</i>)
	(<i>S</i>)	4,4	6,7	7,9	3,4	Ne	

Poznámka: Nevýhodné interakce za mezními hodnotami jsou zvýrazněny tučně.

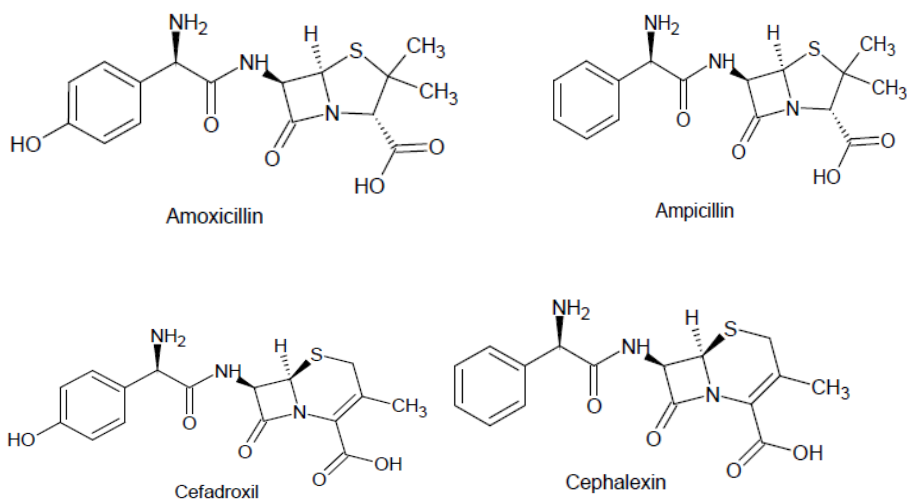
Obdobně jako u předchozí analýzy, oba enantiomery vykazovaly vždy srovnatelnou vazebnou energii zabraňující jakémukoli vyvození závěrů ohledně enantiopreference PGA^A. Na základě analýz potenciální reaktivity těchto nových substrátů jsme predikovali vysokou enatiopreferenci pro PGA^A vůči trojici (*R*)-enantiomerů a dvojici (*S*)-enantiomerů nově testovaných substrátů (tab.15). Nicméně nemůžeme zcela vyloučit možnost slabé až nízké enantioselektivity pro zbývající dvojici substrátů (viz. výsledky uvedené v publikaci, která je uvedena jako příloha č. 4 disertační práce).

4.5.3. Molekulární modelování syntéz SSBA s 3D-strukturami PGA^{Ec} a PGA^A

Analogicky s předešlými experimenty bylo provedeno molekulární dokování s oběma modely enzymů i pro syntézu SSBA, amoxicilinu, ampicilinu, cephalexinu a cefadroxilu (obr. 10, str. 83) s cílem zjistit v případě složitějších bimolekulárních reakcí korelaci *in-silico* získaných dat s experimentálně získanými výsledky naměřenými v laboratoři s PGA^{Ec} a PGA^A. Využili jsme námi vytvořený homologní model PGA^A z *Achromobacter* sp. CCM4824 a model krystalové struktury PGA^{Ec} (1GM7) získaný z PDB.

Jako první ligand byl dokován vždy AD (fenyglycin amid popř. 4-hydroxyfenyglycin amid), k jehož fenylacetylovému zbytku jsou enzymy specifické a N až jako druhý ligand v pořadí. U prvního ligandu jsme se obdobně jako v předchozích případech nejprve zaměřili na predikované vazebné energie výše zmíněných AD pro ten který enzym. Predikované struktury komplexů byly dále analyzovány s cílem ověřit rozdíly v potenciální reaktivitě AD pomocí týchž geometrických parametrů jako u substrátů v kapitole 4.5.1., tj. s aminokyselinovými zbytky tvořícími nukleofil vazebné místo, tedy Ala69 β , Asn241 β , Gln23 β a Ser1 β . Protože se však jedná o bimolekulární reakce, soustředili jsme se také měření nejkratších možných vzdáleností mezi karbonylovou skupinou AD a aminoskupinou N (R-NH₂→COO-R), coby druhého dokovaného substrátu (tab. 16 a 17, str. 83). Z tab. 16 a 17 (str. 83) lze vyčíst, že geometrické parametry pro oba testované AD jsou v případě PGA^A totožné a v případě PGA^{Ec} lehce odlišné, ovšem bez možnosti vyvodit jakékoliv závěry.

Je však patrné, že vzdálenost mezi aminoskupinou N a karbonylovou skupinou AD se zkrátila z 4,8 na 4,1 Å u simulované syntézy amoxicilinu a z 5,9 na 4,8 Å u syntézy ampicilinu. Tato data naznačují, že PGA^A by mohla být ve srovnání s PGA^{Ec} reaktivnější pro syntézy amoxicilinu a ampicilinu, což by bylo v souladu s experimentálně získanými daty, kde PGA^A byla oproti PGA^{Ec} prokazatelně účinnějším biokatalyzátorem v syntéze amoxicilinu a ampicilinu.



Obr. 10. Chemické struktury čtveřice námi použitých farmaceuticky hojně využívaných SSBA.

Tab. 16. Vazebné vzdálenosti funkčních skupin substrátů v nukleofil vazebném místě PGA^{Ec}

Substrát	Vzdálenost (Å)					Vazebná energie [kcal/mol]	Výsledný produkt
	R-NH ₂ →COO-R	O ^{Ser1β} →C	N ^{Ala69β} →O	N ^{Asn241β} →O	O ^{Gln23β} →H		
4-hydroxyfenylglycin amid 6-APA	4,8	3,5	3,3	3,7	2,8	-5,6 -4,8	amoxicilin
fenylglycin amid 6-APA	5,9	3,4	5,5	2,9	2,8	-5,6 -5,3	ampicilin
4-hydroxyfenylglycin amid 7-ADCA	5,9	3,5	3,3	3,7	2,8	-5,6 -4,8	cefadroxil
fenylglycin amid 7-ADCA	6,0	3,4	5,5	2,9	2,8	-5,6 -5,3	cephalexin

Tab. 17. Vazebné vzdálenosti funkčních skupin substrátů v nukleofil vazebném místě PGA^A

Substrát	Vzdálenost (Å)					Vazebná energie [kcal/mol]	Výsledný produkt
	R-NH ₂ →COO-R	O ^{Ser1β} →C	N ^{Ala69β} →O	N ^{Asn241β} →O	O ^{Gln23β} →H		
4-hydroxyfenylglycin amid 6-APA	4,1	3,1	5,1	3,1	2,8	-5,6 -4,8	amoxicilin
fenylglycin amid 6-APA	4,8	3,1	5,1	2,1	2,8	-5,6 -5,3	ampicilin
4-hydroxyfenylglycin amid 7-ADCA	6,1	3,1	5,1	3,1	2,8	-5,6 -4,8	cefadroxil
fenylglycin amid 7-ADCA	5,1	3,1	5,1	2,1	2,8	-5,6 -5,3	cephalexin

4.6. *In-silico* mutagenese PGA^A

4.6.1. Vylepšení syntetické aktivity záměnou vybraných aminokyselin v aktivním místě

Aminokyselinová residua Phe24 β a Phe146 α (samostatně nebo jako dvojice), lokalizovaná u vstupu do aktivního centra enzymu, byla podrobena *in-silico* mutagenezi. Navržené záměny uvádí tab. 18: celkem bylo studováno 6 variant PGA^A. Byly analyzovány vazebné vzdálenosti v acyl vazebném místě i mezi funkčními skupinami AD a N jako v případě *in-silico* simulací syntéz SSBA s původní PGA^A. Naměřená data jsou shrnuta v tab. 18.

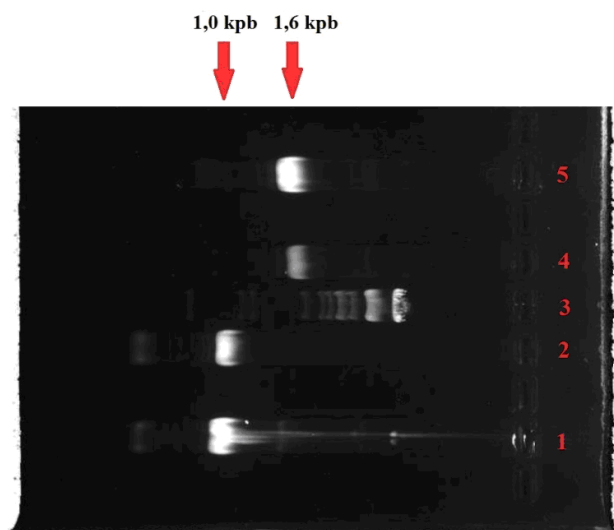
Tab. 18. *In-silico* predikce syntéz vybraných SSBA za použití *in-silico* mutovaných variant PGA^A

Mutovaná varianta	Substrát		Vzdálenost (Å)					Vazebná energie [kcal/mol]
	Nukleofil	Acyldonor	R-NH ₂ →COO-R	O ^{Ser1β} →C	N ^{Ala69β} →O	N ^{Asn241β} →O	O ^{Gln23β} →H	
Phe24 β →Cys	6-APA	4-hydroxyfenylglycin amid	3,3	4,0	5,8	5,4	2,8	-5,6
	6-APA	fenylglycin amid	4,8	3,6	3,1	4,1	2,8	-5,6
	7-ADCA	4-hydroxyfenylglycin amid	4,4	4,0	5,8	5,4	2,8	-5,6
	7-ADCA	fenylglycin amid	4,6	3,6	3,1	4,1	2,8	-5,6
Phe24 β →Ala	6-APA	4-hydroxyfenylglycin amid	3,5	4,3	4,7	5,3	3,2	-5,8
	6-APA	fenylglycin amid	3,8	3,5	3,7	4,8	3,2	-5,8
	7-ADCA	4-hydroxyfenylglycin amid	4,6	4,3	4,7	5,3	3,2	-5,8
	7-ADCA	fenylglycin amid	3,7	3,5	3,7	4,8	3,2	-5,8
Phe24 β →Leu	6-APA	4-hydroxyfenylglycin amid	4,8	4,1	4,6	3,8	3,3	-5,6
	6-APA	fenylglycin amid	5,4	3,7	3,3	3,1	3,0	-5,6
	7-ADCA	4-hydroxyfenylglycin amid	4,9	5,2	3,9	4,3	3,3	-5,6
	7-ADCA	fenylglycin amid	4,6	3,6	3,1	4,1	3,0	-5,6
Phe146 α →Gln	6-APA	4-hydroxyfenylglycin amid	4,9	4,3	4,9	3,8	3,1	-5,6
	6-APA	fenylglycin amid	6,1	3,8	4,2	4,4	3,4	-5,6
	7-ADCA	4-hydroxyfenylglycin amid	4,6	4,2	3,9	4,6	3,1	-5,6
	7-ADCA	fenylglycin amid	4,5	4,0	3,9	4	3,4	-5,6
Phe146 α →GluH	6-APA	4-hydroxyfenylglycin amid	5,1	3,9	4,4	4,1	3,5	-5,6
	6-APA	fenylglycin amid	7,5	3,5	3,0	4,2	3,2	-5,6
	7-ADCA	4-hydrox fenylglycin amid	4,5	3,9	4,1	4,0	3,5	-5,6
	7-ADCA	fenylglycin amid	5,1	3,8	4,1	4,3	3,2	-5,6
Phe24 β →Ala Phe146 α →Tyr	6-APA	4-hydroxyfenylglycin amid	3,7	3,5	4,2	4,2	2,9	-5,7
	6-APA	fenylglycin amid	5,7	3,9	5,6	3,1	2,8	-5,7
	7-ADCA	4-hydroxyfenylglycin amid	3,8	3,5	4,2	4,2	2,9	-5,7
	7-ADCA	fenylglycin amid	4,3	3,6	3,1	4,1	2,8	-5,7

Jako perspektivní varianta sejevila především ta, u níž byl v pozici 24 na podjednotce β fenylalanin nahrazen cysteinem (PGA^APhe β 24Cys). Ze srovnání výsledků plyne, že vzdálenost mezi aminoskupinou N a karbonylovou skupinou AD se zkrátila z 4,1 na 3,3 Å při simulované syntéze amoxicilinu.

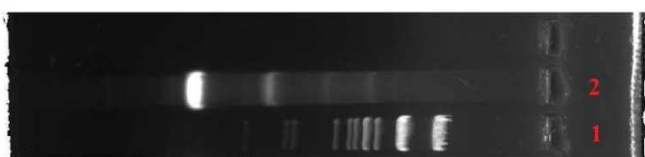
4.6.2. Konstrukce zmutovaného *pga*^A kódujícího záměnu Phe24 β →Cys

Na základě již dříve získané nukleotidové sekvence strukturního *pga*^A genu i jeho přilehlých oblastí byly navrženy koncové primery umožňující PCR amplifikaci mutované varianty strukturního genu *pga*^A s využitím chromozomální DNA kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824 jakožto templátu. Prvním krokem přípravy rekombinantního konstruktů byla optimalizace standardní PCR pomocí kombinací primerových párů UPACYL*Xba*1+Rev_mut330Cys_PGA^A či Fwd_mut330Cys_PGA^A+REVACYL*Pst*1, z nichž vždy jeden primer z páru nesl požadovanou mutaci. Fotodokumentace agarosového gelu s parciálními *pga*^A-specifickými PCR amplikony (velikost cca 1 kpb a 1,6 kpb) je uvedena na obr. 11.



Obr. 11. PCR amplikony z izolačního gelu. 1) PCR produkty získané kombinací primerů UPACYL*Xba*1+Rev_mut330Cys_PGA^A reasociujících s DNA templátem při 59°C; 2) PCR produkty získané kombinací primerů UPACYL*Xba*1+Rev_mut330Cys_PGA^A reasociujících s DNA templátem při 57°C; 3) DNA marker λ_{DNA} x *Pst*I. 4) PCR produkty získané kombinací primerů Fwd_mut330Cys_PGA^A+REVACYL*Pst*1 reasociujících s DNA templátem při 57°C; 5) PCR produkty získané kombinací primerů Fwd_mut330Cys_PGA^A+REVACYL*Pst*1 reasociujících s DNA templátem při 59°C.

Pga^A-specifické PCR produkty byly izolovány z gelu za využití purifikačního protokolu komerčně dodávaného purifikačního kitu High Pure PCR Product Purification, firmy Roche. Kombinace primerů UPACYL*Xba*1+REVACYL*Pst*1 navržená z oblastí přiléhajících ke strukturnímu genu *pga^A* a nesoucí vložená restrikční místa *Xba*I, resp. *Pst*I, nám umožnila využít techniku overlap PCR a získat z obou amplikonů směs PCR produktů, jejíž součástí byl i *pga*-specifický PCR produkt o velikosti 2,664 kpb nesoucí celý strukturní gen *pga^A*. Tato směs PCR produktů získaná po overlap PCR reakci byla nejprve přečištěna podle protokolu k „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche) a následně podrobena štěpení restrikční endonukleasou *Xba*I (cílová sekvence v primeru UPACYL*Xba*1) (obr. 12).



Obr. 12. *Xba*I restrikce směsi amplikonů po „overlap PCR“. 1) DNA marker λ_{DNA} x *Pst*I; 2) PCR produkty štěpené *Xba*I.

Délkově odpovídající *Xba*I-štěpený PCR amplikon nesoucí celý strukturní *pga^A* s potenciální mutací byl z výše uvedené restrikční směsi získán vyříznutím z gelu a přečištěn opět pomocí „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche). Tento PCR produkt byl následně vligován do vektoru pK19 štěpeného dvěma polylinkerovými enzymy *Xba*I a *Sma*I a takto vzniklou ligační směsí byly transformovány kompetentní buňky *E.coli* TOP10. Ze získaných transformantů exprimujících funkční strukturní gen pro *PGA^A* (potvrzeno detekcí funkčního produktu genu pomocí chromogenního substrátu NIPAB) byly za použití modifikované minipreparativní metody (157) izolovány rekombinantní plazmidové konstrukty. 4 z jejich zástupců byly následně purifikovány pomocí „High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche) (obr. 13, str. 87) a podrobeny finální sekvenční analýze, která prokázala, že 2 z nich (označeny pMiG7 a pMiG38) nesly požadovanou záměnu Phe → Cys v pozici 24. aminokyseliny na β -podjednotce (vyjádřeno v nukleotidech: TTC → TG₉₈₉C).



Obr. 13. Agarosový gel s purifikovanými rekombinantními plazmidy ze čtyř PGA-pozitivních transformantů. 1) kontrolní plazmid o velikosti 3,7 kpb; 2) pMiG2; 3) pMiG7; 4) pMiG35; 5) pMiG38; 6) kontrolní plazmid o velikosti 5,7 kpb.

4.7. Charakterizace rekombinantní $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$

4.7.1. Kinetické parametry $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ pro hydrolýzy

Hydrolýzy průmyslově nejžádanějších SSBA, ampicilinu a amoxicilinu, byly měřeny stejným způsobem a za stejných podmínek jako v případě původního enzymu. Hodnoty kinetických konstant k_{cat} a K_{m} a konstanta substrátové specifity $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ potvrdily vysokou katalytickou aktivitu pro substráty s D-4-hydroxyfenylglycyl- (amoxicilin nebo cefadroxil) nebo D-fenylglycyl- (ampicilin a cephalixin) postranními řetězci, tedy hodnoty velmi blízké PGA^A . Hodnoty $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ pro PGA^A klesaly v následujícím pořadí: amoxicilin \rightarrow cefadroxil \rightarrow ampicilin \rightarrow cephalixin. Toto pořadí korespondovalo s klesající afinitou k acylovým residuům obsažených v substrátech: D-4-hydroxyfenylglycyl \rightarrow D-fenylglycyl. Ve všech zmiňovaných případech byly parametry PGA^A a jeho mutované varianty $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ velmi podobné (tab. 19).

Tab. 19. Kinetické parametry pro $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ a PGA^A katalyzované hydrolýzy vybraných antibiotik

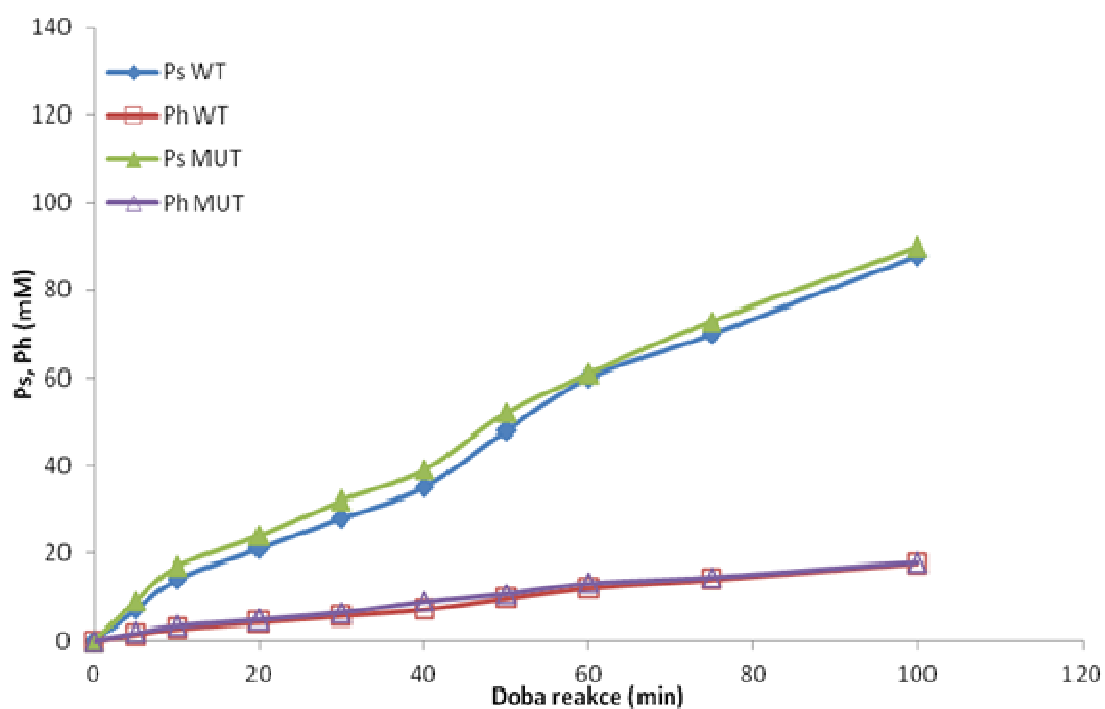
Substrát	K_{m} (μM)		k_{cat} (s^{-1})		$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)		S/H^a	
	PGA^A	$\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$	PGA^A	$\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$	PGA^A	$\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$	PGA^A	$\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$
ampicilin	395	398	19,241	19	0,049	0,048	3,4	3,36
amoxicilin	199	203	24	24,7	0,121	0,122	3	3,1

^aReakční podmínky: 15 mM AD a 25 mM N v 50 mM fosfátovém pufru (pH = 7,0, 25°C).

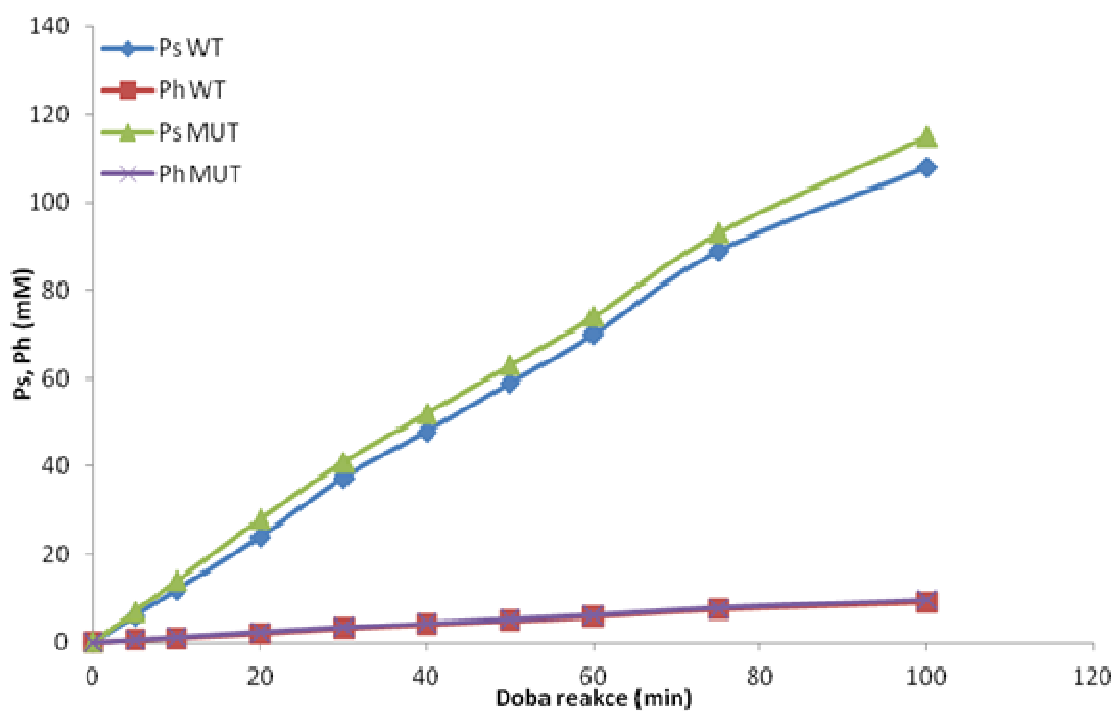
4.7.2. Kineticky řízené syntézy SSBA při vysokých koncentracích substrátů

Abychom experimentálně ověřili *in-silico* predikovaná data, srovnávali jsme syntetickou účinnost PGA^A a rekombinantní $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ při vysokých koncentracích substrátů, kdy byl jako aktivovaný AD použit ester. Experimenty byly provedeny nejdříve s purifikovanou a rozpustnou formou enzymů a posléze se stabilizovanými enzymy ve formě CLEA. Reaktanty byly použity v koncentracích odpovídajících průmyslovým syntézám. Časový průběh syntézy antibiotika, (Ps) a volné aminokyseliny (Ph) byl sledován a stanovován pomocí HPLC v průběhu celé syntézy. Experimenty byly provedeny v míchaném reaktoru s pracovním objemem 100 ml za konstantního míchání, laboratorní teploty a konstantní hodnoty pH zajištěné pomocí pH-statů a titrací s 12,5 % (w/v) vodným roztokem amoniaku.

Rozpustné formy obou enzymů vykazovaly velmi podobné hodnoty parametrů, a to jak v případě syntézy amoxicilinu, tak i ampicilinu, což je zdokumentováno na časové závislosti parametrů Ps a Ph (obr.14 a 15, str. 89). Poměr reakčních partnerů AD a N, označovaný jako AD/N byl 1,05 při následující koncentraci reaktantů: 160 mM N a 168 mM AD. V případě PGA^A činil stupeň konverze pro syntézu ampicilinu 93 % a pro amoxicilin 77 %. V případě mutované varianty $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ činil stupeň konverze pro syntézu ampicilinu rovněž 93 %, ale pro syntézu amoxicilinu 81 %. Výsledky jsou shrnuty v tab. 20 (str. 90)



Obr.14. Časový průběh kineticky řízené syntézy amoxicilinu. Syntézy amoxicilinu byly provedeny s 160 mM 6-APA a 168 mM D-HPGME. WT označuje PGA^A a MUT označuje $PGA^A Phe\beta 24Cys$. Vznikající antibiotikum (Ps) a volná aminokyselina (Ph) byly v průběhu syntéz monitorovány pomocí HPLC. Syntézy byly prováděny při pH = 6,3 a teplotě 25°C.



Obr.15. Časový průběh kineticky řízené syntézy ampicilinu. Syntézy ampicilinu byly provedeny s 160 mM 6-APA a 168 mM D-PGME. WT označuje PGA^A a MUT označuje $PGA^APhe\beta 24Cys$. Vznikající antibiotikum (Ps) a volná aminokyselina (Ph) byly v průběhu syntéz monitorovány pomocí HPLC. Syntézy byly prováděny při pH = 5,9 a teplotě 25°C.

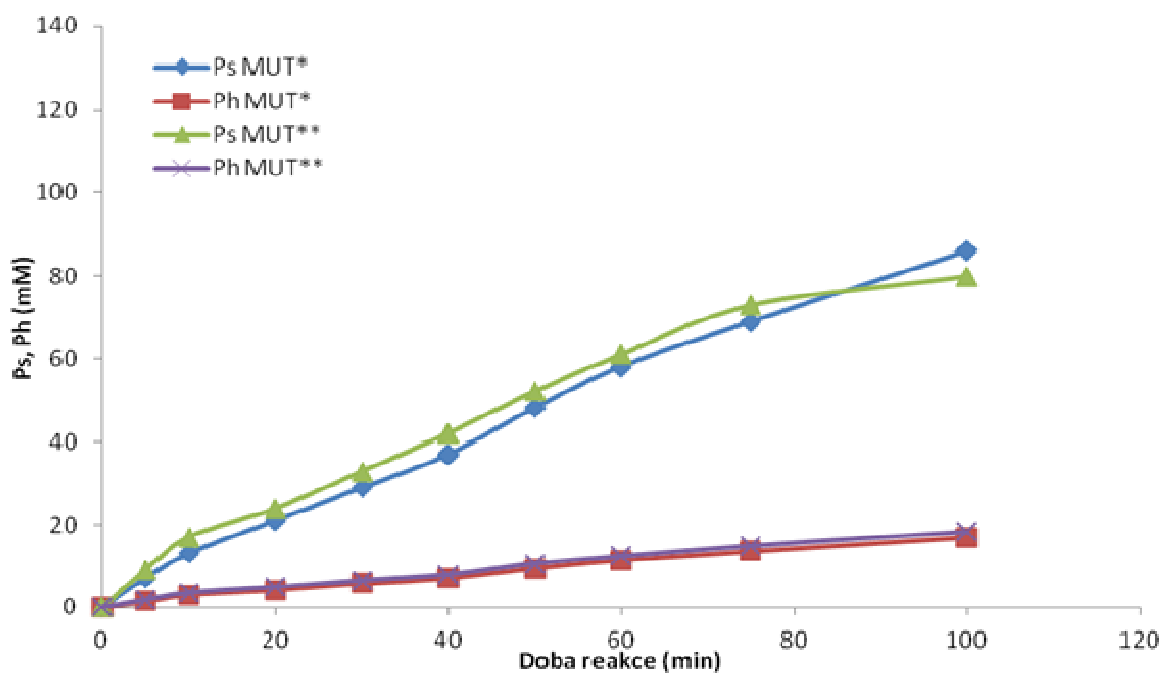
Tab. 20. Parametry S/H a stupeň konverze při syntéze SSBA rozpustnou formou PGA^A a mutovanou variantou $PGA^APhe\beta 24Cys$ za vysokých koncentrací substrátů

	6-APA (mM)	D-(H)PGME (mM)	AD/N	S/H	Konverze(%)	Reakční čas (min)	pH
Ampicilin	160	168	1,05	11,9	93	470	5,9
Amoxicilin	160	168	1,05	4,98	81	400	6,3

	6-APA (mM)	D-(H)PGME (mM)	AD/N	S/H	Konverze(%)	Reakční čas (min)	pH
Ampicilin	160	168	1,05	12	93	470	5,9
Amoxicilin	160	168	1,05	5,03	77	420	6,3

Reakční podmínky: Objem reakční směsi činil 100 ml, reakční teplota 25°C, pH hodnoty byly udržovány na hodnotách 5,9 a 6,3 (12,5 % NH_4OH). Do reakční směsi bylo přidáno 200 U PGA^A resp., $PGA^APhe\beta 24Cys$. Horní část $PGA^APhe\beta 24Cys$, dolní část PGA^A .

Rozpustná forma rekombinantní $PGA^APhe\beta 24Cys$ byla dále testována při syntéze amoxicilinu za molárního poměru AD/N 1,05 a to ve dvou úrovních: 1) v koncentracích N nad 400 mM kdy maximální stupně konverze činil 22 % a S/H poměr $PGA^APhe\beta 24Cys$ určený při syntéze amoxicilinu 4,9. 2) při koncentraci N 160 mM a snížené hodnotě pH na hodnotu 5,9. Hodnota S/H zůstala prakticky nezměněna, nicméně stupeň konverze se snížil z 81 na 73 % oproti syntéze prováděné při hodnotě pH 6,3. Časové závislosti parametrů Ps a Ph pro obě testované podmínky jsou zdokumentovány na obr. 16 (str. 91). Reakční podmínky a výsledná data jsou shrnuta v tab. 21 (str. 91)



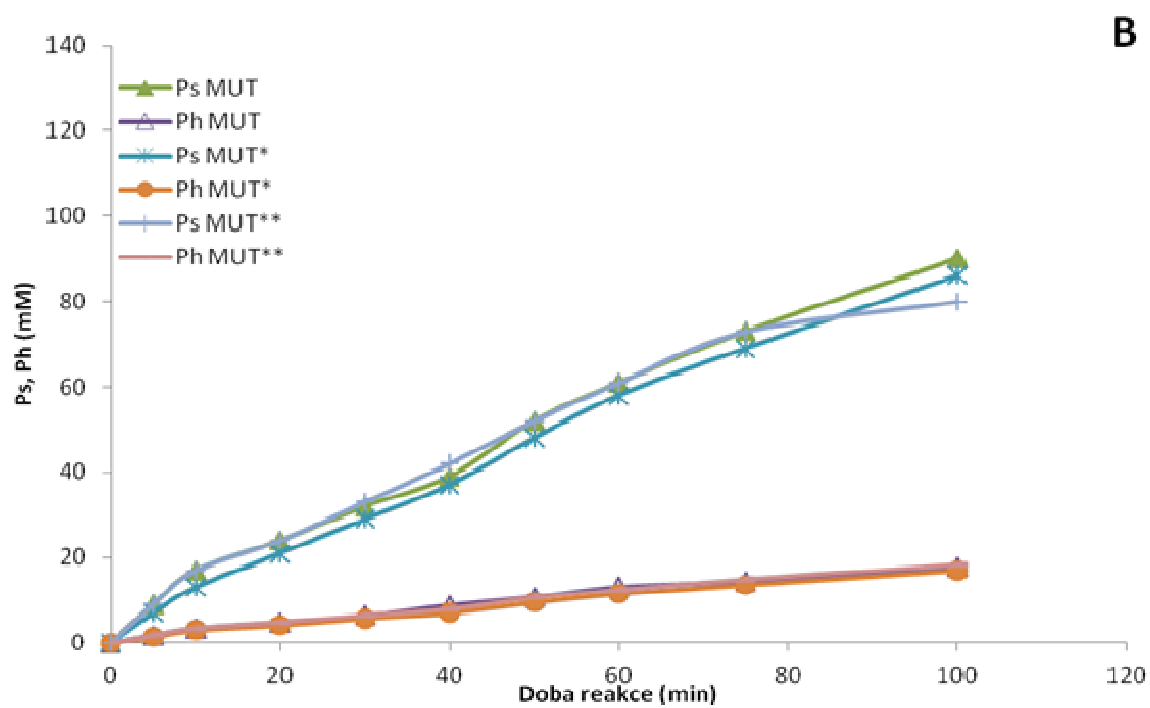
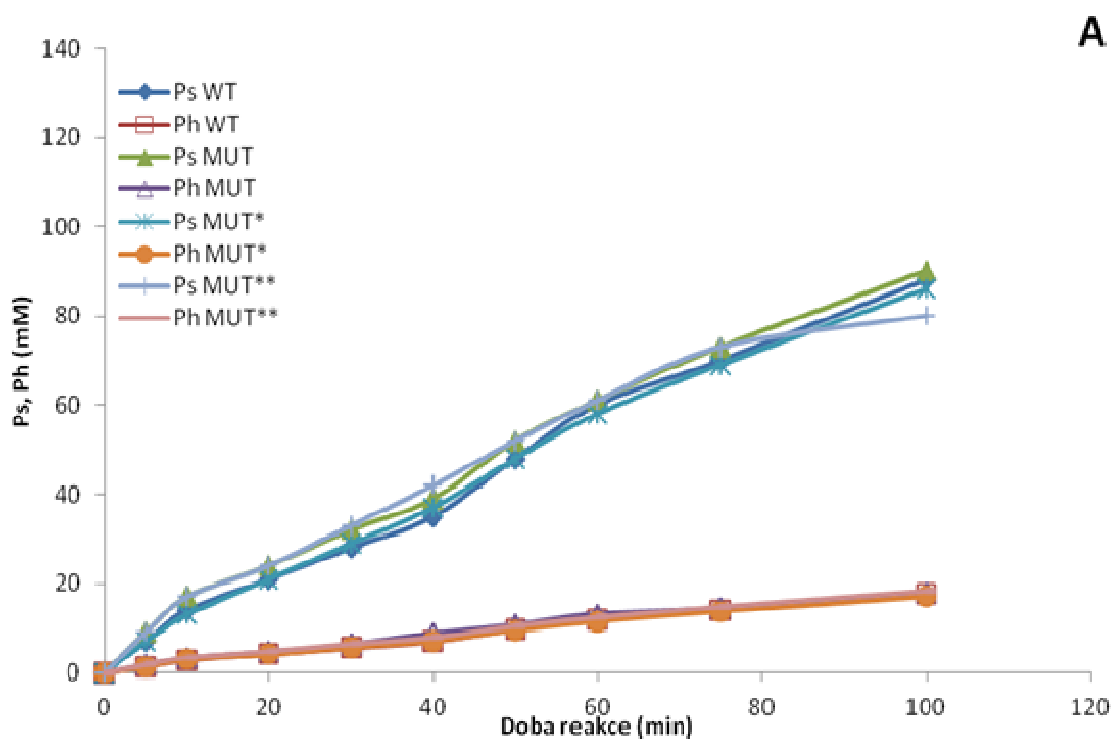
Obr. 16. Časový průběh kineticky řízené syntézy amoxicilinu katalyzované rozpustným enzymem $\text{PGA}^{\text{A}}\text{Phe}\beta\text{24Cys}$. Syntézy amoxicilinu byly provedeny s 160 mM 6-APA a 168 mM D-HPGME (MUT*), popř. s 400 mM 6-APA a 420 mM D-HPGME (MUT**).

Tab. 21. Parametry S/H a stupeň konverze při syntéze SSBA rozpustnou formou $\text{PGA}^{\text{A}}\text{Phe}\beta\text{24Cys}$

	6-APA (mM)	D-HPGME (mM)	AD/N	S/H	Konverze(%)	Reakční čas (min)	pH
Amoxicilin	160	168	1,05	5-5,1	73	460	5,9
Amoxicilin	400	420	1,05	4,90	22	120	6,3

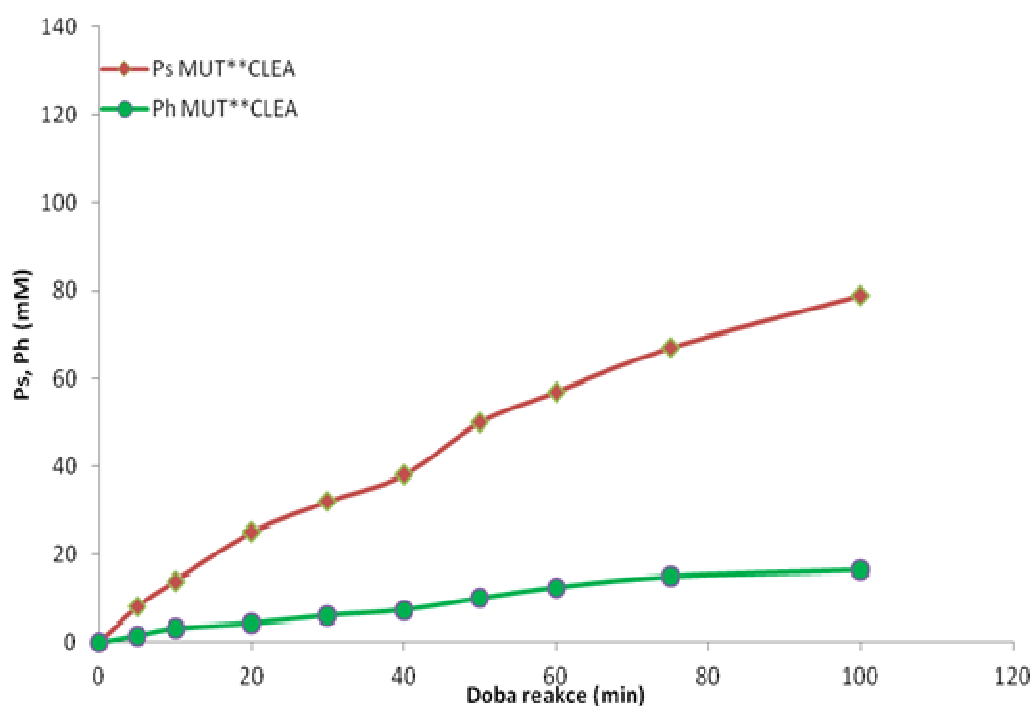
Reakční podmínky: Objem reakční směsi činil 50 ml, reakční teplota 25°C. pH hodnoty byly udržovány na hodnotách 5,9 a 6,3 (12,5 % NH_4OH). Do reakční směsi bylo přidáno 200 U $\text{PGA}^{\text{A}}\text{Phe}\beta\text{24Cys}$.

Obrázek č. 17 srovnává časovou závislost parametrů Ps a Ph v enzymaticky katalyzovaných syntézách amoxicilinu za všech podmínek uvedených v této studii (obr.17A, str. 92), a pouze pro mutovanou variantu $\text{PGA}^{\text{A}}\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ (obr.17B, str. 92)



Obr. 17. Časová závislost parametrů Ps a Ph v kineticky řízené syntéze amoxicilinu: A) pro veškeré v této studii používané podmínky, B) pouze pro mutovanou variantu $PGA^4Phe\beta 24Cys$.

Syntéza amoxicilinu byla studována také s imobilizovanou formou rekombinantní $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$. Katalyzátor byl připraven technikou zesítnění enzymových agregátů a vzniklé CLEA byly použity v reakční směsi s koncentrací N nad 400 mM a molárního poměru AD/N 1,05. Hodnota S/H se zvýšila oproti rozpustné formě přibližně o 8 %, tj. z hodnoty 4,9 na 5,0. Stupeň konverze se však zvýšil výrazně, a sice z 22 na 61 %. Časové závislosti parametrů Ps a Ph jsou zdokumentovány na obr. 18. Reakční podmínky a výsledná data jsou shrnuta v tab. 22.



Obr. 18. Časový průběh kineticky řízené syntézy amoxicilinu katalyzované imobilizovanou formou mutované varianty $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$. Reakční směs obsahovala 400 mM 6-APA a 420 mM D-HPGME.

Tab. 22. Parametry syntézy amoxicilinu imobilizovanou formou mutované varianty $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ ve vysokých koncentracích substrátů

	6-APA (mM)	D-HPGME (mM)	AD/N	S/H	Konverze(%)	Reakční čas (min)	pH
Amoxicilin	400	420	1,05	5,00	61	420	6,3

Reakční podmínky: Objem reakční směsi činil 50 ml, reakční teplotě 25°C. pH hodnoty byly udržovány na hodnotě 6,3 (12,5 % NH_4OH). Do reakční směsi bylo přidáno 200 U $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ ve formě CLEA.

Ze získaných a zpracovaných dat je patrné, že mezi mutovanou variantou $\text{PGA}^{\text{A}}\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ a původním enzymem PGA^{A} nebyly zjištěny z pohledu enzymové kinetiky a syntézy antibiotik žádné významnější rozdíly.

5. Diskuze

V této práci byla studována penicilinacylasa, enzym patřící do rodiny N-terminálních nukleofilních hydrolas (Ntn-hydrolasy, EC 3.5.1.11.), popsaná u mikroorganismu rodu *Achromobacter* (169). Po izolaci a charakterizaci tohoto enzymu (13) bylo zjištěno, že štěpí téměř dvojnásobnou rychlostí SSBA ampicilin, amoxicilin a cefalexin, oproti penG, čímž se odlišoval od dosud známých penicilin-G-acylas (13).

Enzym PGA^A byl klonován, sekvenován (142) a dále detailně studován z pohledu kineticky řízených syntéz SSBA (31), kde PGA obecně nacházejí průmyslové uplatnění.

Kromě biotransformace β -laktamů vykazují PGA další zajímavou vlastnost: jsou enantioselektivní. Tato vlastnost umožňuje přípravu chirálních látek (enantiomerů), které mohou být využity jako syntony pro organické syntézy nebo přímo představují aktivní farmaceutické látky. V předkládané doktorské disertační práci jsem se zpočátku zaměřil na enantioselektivní rozlišení racemických směsí sedmi N-PhAc- α/β -aminokyselin [(tab. 9, str. 70): N-PhAc- α -fenylalanin, N-PhAc- α -homofenylalanin, N-PhAc- β -leucin, N-PhAc- α -leucin, N-PhAc- α -isoleucin, N-PhAc- β -homoleucin, N-PhAc- α -*terc*-leucin], jejichž enantiomery v deacetylované formě mají aplikační potenciál jako stavební prvky aktivních farmaceutických látek. Abychom mohli charakterizovat PGA^A ohledně enantioselektivních vlastností a smysluplně je s něčím srovnat, zvolili jsme si PGA^{Ec} jako výchozí, referenční enzym (76), přestože PGA^{Ec} vykazuje jenom 49,8 % sekvenční identitu s PGA^A , a to alespoň ze dvou důvodů: 1) PGA^{Ec} byla modelem pro výzkum v oblasti enantioselektivity PGA již od 60. let minulého století, který se týkal zejména rozlišení racemických směsí α -aminokyselin a jejich derivátů (170, 171), avšak poskytoval zpravidla jen strohou informaci o enantiopreferenci; 2) PGA^{Ec} je běžně průmyslově užívaný a v naší laboratoři dostupný enzym.

Bakteriální biomasa pro izolaci PGA^A v dostatečném množství byla připravena již dříve provedenou přítokovanou kultivací v laboratorním kontinuálně míchaném bioreaktoru Biostat MD (142). Následná izolace a purifikace probíhala podle Škrob a spol.(13).

Racemické směsi substrátů uvedené v tab. 9 (str. 70) a zmíněné výše byly použity jako substráty v enantioselektivních hydrolytických reakcích katalyzovaných ve vodném prostředí purifikovanými PGA^A a PGA^{Ec} .

Oba enzymy vykazovaly vysoký stupeň enantioselektivity ($E = 90 \pm 5$) při hydrolýze N-PhAc- α -fenylalaninu a zároveň podobný, i když nižší stupeň enantioselektivity vůči substrátům N-PhAc- α -leucinu, N-PhAc- α -homofenylalaninu a N-PhAc- α -isoleucinu. U zbylých tří testovaných substrátů (N-PhAc- β -homoleucin, N-PhAc- α -*terc*-leucin a N-PhAc-

β -leucin.) je však patrné, že PGA^A má prokazatelně vyšší enantioselektivitu oproti PGA^{Ec} , přestože oba enzymy mají stejnou enantiopreferenci.

Doposud byly určeny 3-D struktury pouze pro PGA třech mikroorganismů [*E.coli* (16,71); *Kluyvera citrophila* (76); *Alcaligenes faecalis* (77)]. Rozhodli jsme se tedy stanovit strukturu PGA^A , která by nám umožnila blíže nahlédnout na stavbu molekuly enzymu a vazby substrátů do aktivního centra.

Pro krystalizační experimenty jsme zvolili v současnosti nejpoužívanější, difúzní metody (metoda visících a sedících kapek). Ačkoliv lze v literatuře dohledat mnoho odkazů ohledně krystalizace PGA^{Ec} a v PDB databázi nalézt přibližně tři desítky 3D struktur jak celého enzymu, tak jeho jednotlivých podjednotek (71-77), vzhledem k aminokyselinové identitě PGA^A a PGA^{Ec} , která činí necelých 50 %, jsme museli přistupovat k tomuto enzymu jako ke zcela novému individuu a pilotní krystalizační experimenty byly provedeny za použití komerčně dostupných sad nejpoužívanějších krystalizačních podmínek. Jako zásobní roztok proteinu byl vždy použit čerstvě purifikovaný enzym v koncentraci 20 mg/ml v 0,2 M Tris-HCl pufru (pH = 7,2), uchovávaný v ledu. Z testovaných základních screenovacích komerčně dostupných sad od společnosti Qiagen bylo nejlepších výsledků dosaženo za použití sady JCSG Core3, a sice u krystalizační podmínky skládající se z 0,1 M bicinového pufru a 5 % PEG 6000 o celkovém pH = 9,0 a 6 mM PAA (viz obr. 8A a 8B, str. 74 a 75). Získané proteinové krystaly byly po 9 měsících vyizolovány, nicméně během transportu došlo k jejich fyzickému poškození a nebylo tak možné získat 3-D struktury. Torza krystalů však byla posléze použita jako krystalizační jádra pro další optimalizaci krystalizačních procesů, která byla prováděna jednak manuálně ve formě visících, tak i formou sedících kapek. Bylo modifikováno pH krystalizační podmínky a také poměr objemů roztoku proteinu ku roztoku srážedla (1 : 1 a 2 : 1), a testován vliv přítomnosti inhibitoru, jímž byla buď PAA popř. PMSF. Součástí optimalizace byly i kombinace srážecích roztoků i použití různých koncentrací termolysinu pro opracování PGA^A před samotnou krystalizací. Bohužel, do konce přípravy této disertace se však podařilo získat pouze několik dalších menších krystalů, které však byly kvůli své (ne)kvalitě pro jakoukoliv manipulaci a následné měření nevhodné.

Objasnění příčiny těchto negativních výsledků je složité. Roli může hrát mnoho faktorů, neboť krystalizace proteinu je empirický proces založený na hledání vhodných činidel a fyzikálně chemických podmínek. Jako krystalizační činidla se totiž používají různé typy srážedel (polyetylglykoly, anorganické sole či organická rozpouštědla), která nutí enzym přejít do přesyceného stavu, přítomny jsou také i pufrы, které udržují stálé pH a případně různá aditiva, která usnadňují vhodné uspořádání molekul proteinu do krystalu. Vedle typu

a koncentrace srážedla zároveň krystalizaci výrazně ovlivňuje i čistota a koncentrace proteinu, pH, teplota, viskozita média a použitá technika. Jelikož navíc ke tvorbě krystalů dochází jen v přesyceném stavu, který se dále dělí na tři oblasti: metastabilní, labilní a precipitační oblast, přičemž pro tvorbu krystalizačních jader je potřeba labilního stavu, zatímco k růstu krystalů dochází jen ve stavu metastabilním, je zřejmé, že příčin může být mnoho.

Protože se nám nepodařilo připravit krystal PGA^A proteinu, rozhodli jsme se na základě dostupnosti krystalové struktury PGA^{Ec} vystavět homologní model PGA^A , použít jej pro *in-silico* molekulární dokování a pokusit se následně nalézt zákonitosti mající vypovídací hodnotu ohledně interakcí mezi komplexem substrát-enzym v jeho aktivním centru v souvislosti s enantioselektivním rozlišením racemických směsí jednotlivých aminokyselin. Z literatury víme, že residua Ser1 β , Gln23 β , Ala69 β , a Asn241 β (6) jsou nezbytné aminokyselinové zbytky nukleofil vazebného místa v 11 dosud charakterizovaných PGA (172): Ala69 β a Asn241 β participují na vytváření „oxyaniontové díry“, Gln23 β stabilizují E-S tetrahedrální intermediát a Ser1 β slouží jako katalytické residuum. Je akceptováno, že obecná topologie a kvarterní struktura kavity aktivního místa může být konzervovaná pro celou rodinu PGA (62). Nicméně existují variace v aminokyselinových zbytcích v acyl vazebném místě, které je tvořeno v *E. coli* Met142 α , Arg145 α , Phe146 α , Phe24 β , Thr32 β , Pro49 β , Val56 β , Trp154 β a Ile177 β (6, 69).

Kromě acyl vazebného místa námi *in-silico* získaná data umožnila identifikovat a popsat i sekundární hydrofobní podmísto tvořené hlavně z aminokyselinových residuí Ala69 β , Phe71 β , Ala149 α a Phe146 α .

Vazebné módy jednotlivých enantiomerů byly následně analyzovány z pohledu vazebných energií mezi jednotlivými enantiomery daného substrátu, které však nebyly větší než 0,7 kcal/mol, takže nenaznačují žádný signifikantní rozdíl mezi vazebnými afinitami jednotlivých enantiomerů (tab. 13, str. 78), neboť jsou stále v rozmezí chyby skórovací funkce.

Struktury komplexů byly dále analyzovány s ohledem na interakce substrátů s aminokyselinovými zbytky tvořícími nukleofil vazebné místo, tj. Ala69 β , Asn241 β , Gln23 β a Ser1 β .

Geometrické parametry pro predikci substrátové reaktivity byly odvozeny podle katalytického mechanismu PGA . Abychom ověřili reaktivitu konformací substrátů použitých v *in-silico* molekulárním dokování, byly vazebné módy posuzovány za použití následujících parametrů: (i) vzdálenost mezi nukleofilním atomem kyslíku O^γ katalytického residua Ser1 β a atakovaným uhlíkem karbonylové skupiny substrátu odrážející tak

pravděpodobnost nukleofilního ataku, (ii) délky vodíkových vazeb mezi atomy dusíku pocházející z aminoskupin Ala69 β a Asn241 β a atomem kyslíku karbonylové skupiny substrátu, které stabilizují negativní náboj reaktivního tetrahedrálního intermediátu a (iii) délka vodíkové vazby mezi kyslíkovým atomem karbonylové skupiny Gln23 β a odstupující aminoskupinou substrátu, což taktéž přispívá ke stabilizaci tetrahedrálního intermediátu (obr. 7, str. 53). Abychom získali konkrétní představu o limitních vzdálenostech pro tyto naše parametry, byly analyzovány vysoce kvalitní struktury PGA v komplexu se substráty a jejich analogy (tab. 6, str. 65). Protože však takové ověření poskytuje pouze kvalitativní dvou-stavovou predikci reaktivity substrátů - reaktivní nebo nereaktivní, lze predikovat přesně pouze potenciál pro vysokou míru enantioselektivního rozlišení. V takových případech je jeden enantiomer predikován jako slabě aktivní, zatímco druhý enantiomer jako dobře aktivní. Je důležité zároveň poznamenat, že drobné rozdíly v hodnotách enantioselektivity nemohou být za použití tohoto přístupu predikovány (155).

Z výsledků dokování prováděných *in-silico* vyplynulo, že podle prostorové objemnosti substituentu mohou být experimentálně zjištěné výsledky presentovány následovně: **1) Mezi substráty s objemnými substituenty lze zařadit:** N-PhAc- α -fenylalanin, N-PhAc- α -homofenylalanin, N-PhAc- α -isoleucin a N-PhAc- α -*terc*-leucin. Všechny substráty si osvojily podobný vazebný mód v nukleofil vazebném místě, a to bez výjimky. (Fig. 9A, str. 79). Objemnější, hydrofóbní nukleofilní substituenty byly všechny orientovány směrem do sekundárního hydrofóbního podmísta. V případě N-PhAc- α -fenylalaninu a N-PhAc- α -homofenylalaninu, které obsahují ve struktuře svého nukleofilního substituentu druhý aromatický kruh, byly mezi tímto kruhem a aminokyselinovými residuy Phe71 β nebo Phe146 α vytvořeny v tomto místě dodatečné π - π a hydrofóbní interakce (obr. S9 a S10, str. 62 a 63). Karboxylové zbytky všech čtyř zmiňovaných substrátů byly orientovány vůči části aktivního místa s pozitivně nabitými a hydrofilními aminokyselinovými zbytky (tj. Arg263 β , Ser390 β , Asn214 β a terminální část Ser1 β). Kyslíkové atomy karbonylové skupiny (*S*)-enantiomerů byly vždy vhodně stabilizovány aminokyselinovými zbytky „oxyaniontové díry“ v orientaci umožňující nukleofilní atak Ser1 β na uhlíkový atom karbonylu. Také vodíkové atomy aminoskupin substrátů byly vhodně stabilizovány pomocí Gln23 β . Naopak, vazebné módy (*R*)-enantiomerů měly své peptidové vazby orientovány opačným směrem (obr. 9A, str. 79). Tato orientace má za následek širší prostorovou separaci atomů kyslíku a vodíku karbonylových skupin jednotlivých substrátů, které jsou stabilizovány funkčními aminoskupinami enzymu. Takové vazebné módy také efektivně chrání atakovaný uhlíkový atom při nukleofilním ataku vedeným Ser1 β . Veškerá tato fakta dohromady naznačují, že (*R*)-enantiomery této skupiny substrátů byly v lepším případě jen

slabě reaktivní, zatímco (*S*)-enantiomery těchto sloučenin byly lépe stabilizovány pro reakce. Jelikož závěry ohledně predikované enantiopreference (tab. 13, str. 78) podporují i všechny čtyři měřené vzdálenosti, které jsou o mnoho kratší, lze tyto závěry považovat za zcela opodstatněné.

2) Substráty s méně objemnými substituenty: N-PhAc- β -homoleucin, N-PhAc- α -leucin, N-PhAc- β -leucin.

Vazebné módy (*S*)-enantiomerů N-PhAc- β -homoleucinu a N-PhAc- α -leucinu kopírovaly schéma pro substráty s objemnějšími substituenty (obr. 9B, str. 79), s výjimkou toho, že tyto substituenty nebyly orientovány vůči sekundárnímu hydrofóbnímu podmístu vazebné kavity. Predikované vazebné módy těchto dvou (*S*)-enantiomerů plně splňovaly veškeré požadavky pro reaktivitu (tab. 13, str. 78).

V případě (*R*)-enantiomerů N-PhAc- β -homoleucinu a N-PhAc- α -leucinu, směřuje karboxylová skupina vůči sekundárnímu hydrofóbnímu podmístu a současně jejich nepolární substituenty směřují vůči pozitivně nabitým a hydrofilním residuím (obr. 9B, str. 79). Tyto vazebné módy umožnily peptidovým vazbám (*R*)-enantiomerů N-PhAc- β -homoleucinu a N-PhAc- α -leucinu osvojit si podobnou orientaci jako (*S*)-enantiomery N-PhAc- β -homoleucinu a N-PhAc- α -leucinu, a tak částečně obnovit nezbytnou stabilizaci jejich karbonylových kyslíků aminokyselinovými zbytky „oxyaniontové díry“ a orientaci atakovaného uhlíku vůči katalytickému nukleofilu. (tab. 13, str. 78). Nicméně, aminoskupiny substrátů nebyly stabilizovány prostřednictvím Gln23 β a obvykle nekomplementární interakce požadované těmito vazebnými módy by mohly dále znevýhodňovat jejich vznik. V případě racemické směsi N-PhAc- β -leucinu kopírovaly vazebné módy obou enantiomerů stejný vzor jako je popsán výše, pouze s tím rozdílem, že preferovanou formou je (*R*)-enantiomer (tab. 13, str. 78).

Pro všechny N-PhAc-aminokyseliny kromě N-PhAc- β -leucinu platí, že vzdálenosti funkčních skupin důležitých aminokyselin byly zřetelně kratší pro (*S*)-enantiomer, z čehož lze předpokládat tento enantiomer jako preferovanou formu. Naopak, co se týče N-PhAc- β -leucinu, byl preferován (*R*)-enantiomer. Acylové zbytky všech enantiomerních párů zaujímaly takový vazebný mód, který umožňoval jejich velmi dobré zabudování do acyl vazebného místa PGA^A. Na základě našeho molekulárního dokování jsme kromě acyl vazebného místa rozlišili také sekundární hydrofobní podmístu tvořenou zejména následujícími aminokyselinovými zbytky: Ala69 β , Phe71 β , Ala149 α a Phe146 α .

Protože molekulární dokování potvrdilo experimentální výsledky získané s purifikovaným PGA^A (tab. 13, str. 78), využili jsme tento přístup také pro *in-silico* predikci enantioselektivních hydrolýz enantiomerů α/β -aminokyselin, které nebyly dosud předmětem

výzkumu, ačkoliv mají zjevný aplikační potenciál (tab. 14, str. 80) a z literatury je známo jen několik kusých informací ohledně stereoselektivity PGA^{Ec} s deriváty N-PhAc-3-aminopent-4-ynové kyseliny a N-PhAc-*p*-Cl- β -fenylalaninu (89, 173).

Nejprve jsme se zaměřili na větší rozdíly ve vazebných energiích určených *in-silico* predikcemi. Obdobně jako u předchozí analýzy, oba enantiomery páru vykazovaly vždy srovnatelnou vazebnou energii zabraňující rozdílnému prostorovému navázání. Byla proto následně provedena analýza geometrických parametrů vazebných módů jednotlivých enantiomerů jako v předchozím případě. *In-silico* experimenty indikovaly, že PGA^A by mohl vykazovat vysokou enantiopreferenci pro trojici (*R*)-enantiomerů a dvojici (*S*)-enantiomerů (tab.15, str. 81).

V rámci práce byla purifikovaná PGA^A podrobena také charakterizaci z pohledu hydrolýzy a kineticky řízené syntézy vybraných SSBA.

V literatuře jsou dosud popsány dva blízce příbuzné penicilinacylasu kódující *pac* geny, které byly klonovány a charakterizovány dvěma vědeckými skupinami: Cai a spol. (174) studoval $PGA650$ kódovanou *pac* genem pocházejícím z *A. xylosoxidans* a Gabor a spol. (22) PAS2 kódovanou environmentálním genem. Vzhledem k tomu, že pro PAS2 a $PGA650$ některé důležité znaky nebyly publikovány a zároveň byla snaha získat odpovídající sadu experimentálních dat obdržенých za porovnatelných podmínek, rozhodli jsme se vytvořit analogickou studii s již dříve klonovanou a v naší laboratoři dostupnou PGA^{Ec} .

Nejprve jsme enzym PGA^A charakterizovali z pohledu hydrolýzy SSBA. Hodnoty kinetických konstant k_{cat} a K_m a konstanta substrátové specifity k_{cat}/K_m potvrdily vysokou katalytickou aktivitu pro substráty s D-4-hydroxyfenylglycyl- (amoxicilin nebo cefadroxil) nebo D-fenylglycyl- (ampicilin a cephalixin) postranními řetězci. Hodnoty k_{cat}/K_m pro PGA^A klesaly v následujícím pořadí SSBA: amoxicilin→cefadroxil→ampicilin→cephalexin. Toto pořadí korespondovalo s klesající afinitou k acylovým residuím v substrátech: D-4-hydroxyfenylglycyl → D-fenylglycyl.

Purifikované enzymy PGA^A a PGA^{Ec} jsme dále porovnali v kineticky řízené syntéze antibiotik amoxicilin, ampicilin, cefadroxil a cephalixin, přičemž reakční směsi obsahovaly nízké koncentrace substrátů: 15 mM aktivovaný acyl-donor (AD, D-fenylglycin amid nebo D-4-hydroxyfenylglycin amid) a 25 mM nukleofil (N, 6-APA nebo 7-ADCA). Studium kineticky řízené syntézy katalyzované rozpustnými enzymy PGA^A a PGA^{Ec} za těchto laboratorních reakčních podmínek prokázalo, že PGA^A byla prokazatelně účinnější při syntézách ampicilinu a amoxicilinu (31). K obdobnému závěru došel i Gabor a spol. (22), kteří srovnávali PAS2 a PGA^{Ec} . PGA^A je však s PGA^{Ec} porovnatelná, co se týče syntéz

cefadroxilu a cefalexinu. Hodnoty $P_{S_{max}}$ klesají pro oba enzymy v pořadí: cephalixin→cefadroxil→ampicilin→amoxicilin.

Vzhledem k výsledkům *in-silico* molekulárního dokování s α/β -aminokyselinami (potvrzení věrohodnosti homologního modelu) a následné predikci enantioselektivity PGA^A vůči novým substrátům bylo analogicky aplikováno molekulární dokování s homologním modelem PGA^A i pro syntézu SSBA, a to s cílem ověřit v případě složitějších bimolekulárních reakcí korelaci s experimentálně získanými výsledky naměřenými v laboratoři dříve (31).

Jako první ligand byl dokován vždy AD (fenylglycin amid popř. 4-hydroxyfenylglycin amid), k jehož fenylacetylovému zbytku jsou enzymy specifické a N až jako druhý ligand v pořadí. U prvního ligandu jsme se obdobně jako v předchozích případech nejprve zaměřili na predikované vazebné energie výše zmíněných AD pro ten který enzym. Predikované struktury komplexů byly dále analyzovány s cílem ověřit rozdíly v potenciální reaktivitě AD pomocí týchž geometrických parametrů jako u substrátů v kapitole 4.5.1., tj. s aminokyselinovými zbytky tvořícími nukleofil vazebné místo, tedy Ala69 β , Asn241 β , Gln23 β a Ser1 β . Protože se však jedná o bimolekulární reakce, soustředili jsme se také na měření nejkratších možných vzdáleností mezi karbonylovou skupinou AD a aminoskupinou N ($R-NH_2 \rightarrow COO-R$), coby druhého dokovaného substrátu (tab. 16 a 17, str. 83). Z tab. 16 a 17 (str. 83) lze vyčíst, že geometrické parametry pro oba testované AD jsou v případě PGA^A totožné a v případě PGA^{Ec} lehce odlišné, ovšem bez možnosti vyvodit jakékoliv závěry. Je však patrné, že vzdálenost mezi aminoskupinou N a karbonylovou skupinou AD se zkrátila z 4,8 na 4,1 Å u simulované syntézy amoxicilinu a z 5,9 na 4,8 Å u syntézy ampicilinu. Tato data naznačují, že PGA^A by mohla být ve srovnání s PGA^{Ec} reaktivnější pro syntézu amoxicilinu a ampicilinu, což by bylo v souladu s experimentálně získanými daty, kde PGA^A byla oproti PGA^{Ec} prokazatelně účinnějším biokatalyzátorem v syntéze amoxicilinu a ampicilinu. Zde je však nutné zmínit, že zmenšení vzdáleností na hodnoty 4,1 Å, resp. 4,8 Å nemusí být zcela směrodatné, protože vzdálenosti jsou i nadále značně velké. Podobné predikce syntéz SSBA nebyly doposud prováděny, a tak naše výsledky nelze diskutovat s daty v literatuře. Abychom podpořili výše zmíněný závěr, rozhodli jsme se pro *in-silico* cílenou modifikaci PGA^A , tj. přípravu homologních modelů mutovaných variant PGA^A , a provedení molekulárního dokování. Vzhledem k průmyslovému významu enzymaticky katalyzované syntézy SSBA a na základě výsledků nedávno námi publikované práce (31) bylo naším dalším cílem zlepšit syntetickou aktivitu enzymu PGA^A . Zaměřili jsme se na oblast v okolí vstupu do aktivního centra enzymu a provedli *in-silico* záměnu aminokyselinových zbytků fenylalaninu v pozici 24 na β -podjednotce (Phe24 β) a 146 na α -

podjednotce (Phe146 α). Pomocí vizualizéru PyMol, modelu *in-silico* mutagenizovaného PGA^A a následného molekulárního dokování jsme analyzovali vliv aminokyselinových záměn na 3D-uspořádání aktivního centra a interakce katalyticky důležitých aminokyselin se substrátem (naměřená data jsou shrnuta v tab. 18, str. 84).

Jako perspektivní modifikace se jevila záměna fenylalaninu v pozici 24 na podjednotce β cysteinem (PGA^APhe β 24Cys), neboť ze srovnání výsledků plyne, že vzdálenost mezi aminoskupinou N a karbonylovou skupinou AD se u amoxicilinu zkrátila z 4,1 Å na 3,3 Å (oproti PGA^{Ec} celkově zkráceno o 31 %).

Abychom si experimentálně ověřili výsledky získané *in-silico* predikcí syntéz vybraných SSBA, byl zkonstruován mutovaný *pga*^A gen. Na základě nukleotidové sekvence z databáze GenBank (AY919310) byly navrženy koncové i vnitřní mutantní primery umožňující PCR amplifikaci strukturního genu *pga*^A. Jako výchozí templát jsme použili chromosomální DNA pocházející z *Achromobacter* sp. CCM4824. V následujícím kroku jsme optimalizovali PCR pomocí dvou kombinací primerových párů, z nichž vždy jeden primerový partner obsahoval požadovanou mutaci, abychom maximalizovali výtěžek specifických PCR produktů.

Technikou overlap PCR, která představuje jednu ze standardních metod využívaných pro *in vitro* místně cílenou mutagenezi, jsme získali směs PCR produktů obsahující i *pga*-specifický PCR amplikon o velikosti 2,664 kpb nesoucí celý strukturní očekávaný gen *pga*^A kódující modifikovanou PGA^A. Směs PCR produktů byla podrobena restričnímu štěpení a délkově specifický produkt PCR byl následně subklonován do vektoru pK19 tak, že vnesený gen byl exprimován konstitutivně z promotoru *lacZ*. Sekvence vybraného rekombinantního plazmidového konstruktů prokázala požadovanou mutaci (Phe \rightarrow Cys) v pozici 24. aminokyseliny na β -podjednotce. Této aminokyselinové záměny bylo dosaženo modifikací kodónového tripletu TTC \rightarrow TG₉₈₉C).

Rekombinantní kmen *E. coli* TOP10(pMiG7) s mutovanou PGA^APhe β 24Cys byl kultivován v míchaném bioreaktoru a enzym izolován za totožných podmínek jako v případě PGA^A.

Výtěžky obou enzymů při purifikaci byly obdobné (22 % z původní celkové aktivity). Enzym PGA^APhe β 24Cys byl charakterizován z pohledu hydrolýzy a kineticky řízené syntézy vybraných SSBA a získané parametry porovnány s parametry PGA^A (31).

Hodnoty kinetických konstant k_{cat} a K_m pro hydrolýzy i konstanta substrátové specifity k_{cat}/K_m potvrdily vysokou katalytickou aktivitu rekombinantního PGA^APhe β 24Cys pro substráty s D-4-hydroxyfenylglycyl- (amoxicilin) nebo D-fenylglycyl- (ampicilin) postranními řetězci, přičemž k_{cat}/K_m pro PGA^APhe β 24Cys pro amoxicilin byla o 250 % vyšší než pro ampicilin.

Enzymy PGA^A a $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ jsme posléze porovnali z pohledu syntetické účinnosti v kineticky řízené syntéze výše zmiňovaných antibiotik amoxicilinu a ampicilinu za podmínek používaných průmyslově: 160 mM N a 168 mM AD, neboť hodnota poměru AD/N 1,05 je považována v průmyslových syntézách za standard. Experimenty byly provedeny nejdříve s purifikovanou rozpustnou formou enzymů a posléze se stabilizovanými enzymy ve formě CLEA, k jejichž přípravě byl použit hrubý bezbuněčný extrakt. Časový průběh syntézy antibiotika (Ps, koncentrace produktu) a volné aminokyseliny (Ph) umožnil určit důležitý parametr enzymu, který charakterizuje syntetické vlastnosti enzymu a je označován jako S/H.

Rozpustné formy jak PGA^A , tak její mutované varianty, vykazovaly velmi podobné hodnoty všech parametrů, a to jak v případě syntézy amoxicilinu, tak i ampicilinu. V případě PGA^A činil stupeň konverze pro syntézu ampicilinu 93 % a amoxicilinu 77 %.

V případě varianty $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ činil stupeň konverze pro syntézu ampicilinu také 93 %, zatímco pro syntézu amoxicilinu byla konverze mírně zvýšena na 81%, což však v průmyslovém měřítku může být významné, přestože je patrné, že se $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ a PGA^A v žádném z testovaných parametrů nijak významně neliší.

Účinnost rozpustné rekombinantní $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ byla dále testována v syntézách průmyslově zajímavějšího amoxicilinu ve dvou úrovních při stejném molárním poměru AD/N 1,05: 1) v koncentracích N nad 400 mM a pH hodnotě reakční směsi 6,3, kdy maximální stupeň konverze byl 22 % a S/H poměr $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ určený při syntéze amoxicilinu činil 4,9. 2) při koncentraci N 160 mM a snížené hodnotě pH reakční směsi na 5,9, ačkoli hodnota S/H za těchto podmínek zůstala prakticky nezměněna, stupeň konverze se snížil z 81 na 73 %.

Účinnost stabilizované varianty $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ byla studována v podobě CLEA pro syntézu amoxicilinu za podmínek používaných průmyslově při koncentracích N nad 400 mM a molárního poměru AD/N 1,05. Hodnota S/H vzrostla oproti rozpustné formě přibližně o 8 % (z hodnoty 4,9 na 5,0). Stupeň konverze se však zvýšil výrazně, a to z 22 na 61 %.

Jako jednu z možných příčin, proč se rekombinantní $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta\text{24Cys}$ chovala odlišně od *in-silico* predikcí lze uvést skutečnost, že predikovaná pozitivní změna ve vzdálenosti mezi funkčními skupinami reaktantů nemusí být dostačující. Obdobné *in-silico* predikce však nebyly nikým prováděny, a tak není možné diskutovat námi získané výsledky s výsledky jiných vědeckých skupin.

Vysvětlením by bylo i to, že *in-silico* mutageneze a následné molekulární modelování realizovaná v programu PyMol nemají, a to vzhledem k potenciálnímu riziku hydrolyzy,

dostatečnou vypovídací hodnotu, a tedy výsledky poskytnuté *in-silico* predikcí nám poskytly data, která zcela nekorelují s experimentálně naměřenými kinetickými parametry pro syntézu SSBA. Je tedy možné, že skutečně mohlo dojít ke zvýšení účinnosti syntézy, nicméně souběžně s tím mohlo dojít i ke zvýšení účinnosti hydrolytické reakce, což bylo jedno z potenciálních rizik modifikace enzymu, které nešlo v rámci *in-silico* dokování a predikce eliminovat.

Jsou proto připravovány následné experimenty pro přesnější a sofistikovanější molekulární kovaletní dokování (175).

6. Souhrn

- Enantioselektivity PGA^{Ec} a PGA^A byly porovnány se skupinou sedmi N-fenylacetylovaných racemických směsí α/β -aminokyselin: PGA^A vykazoval vyšší stereoselektivitu než PGA^{Ec} pro trojici enantiomerů N-PhAc- β -homoleucinu, N-PhAc- α -*terc*-leucinu a N-PhAc- β -leucinu.
- Byl připraven homologní model PGA^A který byl využit pro *in-silico* experimenty molekulárního modelování se stejnou skupinou substrátů: Data získaná z experimentálně provedených enzymaticky katalyzovaných enantioselektivních reakcí byla úspěšně zreprodukována, což potvrdilo oprávněnost využití tohoto postupu.
- Tento protokol byl následně aplikován pro ověření enantiopreference PGA^A vůči sedmi novým substrátům s vesměs s aplikačním potenciálem: pro pět z nich byla predikována vysoká enantiopreference.
- Analogicky bylo aplikováno molekulární dokování za využití homologního modelu PGA^A i pro bimolekulární reakce syntéz SSBA. Závěry učiněné na základě *in-silico* molekulárního dokování jsou v souladu s experimentálně získanými daty, kde PGA^A byla oproti PGA^{Ec} prokazatelně účinnějším biokatalyzátorem v syntéze amoxicilinu a ampicilinu.
- S cílem podpořit výše uvedený závěr a zlepšit syntetickou aktivitu PGA^A rozhodli jsme se pro *in-silico* cílenou modifikaci PGA^A v okolí vstupu do aktivního centra enzymu. Ze srovnání výsledků molekulárního dokování plyne, že záměna fenylalaninu v pozici 24 na podjednotce β cysteinem (PGA^A Phe β 24Cys) vedla ke zkrácení vzdálenosti mezi aminoskupinou N a karbonylovou skupinou AD z 4,1 na 3,3 Å při syntéze amoxicilinu (oproti PGA^{Ec} celkově zkrácení o 31 %).
- Mutovaný *pga^A* gen kódující PGA^A Phe24 β Cys byl zkonstruován, klonován a exprimován v hostiteli *E. coli* TOP10. Rekombinantní kmen *E. coli*TOP10(pMiG7) byl kultivován v míchaném bioreaktoru a enzym purifikován.

- Enzymy PGA^A a $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta 24\text{Cys}$ byly porovnány z pohledu syntetické účinnosti v kineticky řízené syntéze antibiotik amoxicilin a ampicilin za podmínek používaných průmyslově: 160 mM nukleofil a 168 mM acyl-donor (pH = 6,3). Rozpustné formy PGA^A , i její mutované varianty vykazovaly velmi podobné hodnoty všech testovaných parametrů. V případě PGA^A činil stupeň konverze pro syntézu ampicillinu 93 % a amoxicilinu 77 %. V případě varianty $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta 24\text{Cys}$ činil stupeň konverze pro syntézu ampicilinu také 93 %, zatímco pro syntézu amoxicilinu byla konverze mírně zvýšena na 81%.
- Účinnost rozpustné rekombinantní $\text{PGA}^A\text{Phe}24\beta\text{Cys}$ byla dále testována v syntézách průmyslově zajímavějšího amoxicilinu ve dvou úrovních při témže molárním poměru AD/N 1,05: 1) v koncentracích nukleofilu nad 400 mM a při pH 6,3 (stupeň konverze byl 22 %, S/H poměr činil 4,9). 2) při koncentraci nukleofilu 160 mM a při pH 5,9. Parametr S/H zůstal nezměněn, nicméně stupeň konverze se snížil z 81 na 73 %.
- Účinnost stabilizované varianty $\text{PGA}^A\text{Phe}\beta 24\text{Cys}$ byla studována v podobě CLEA pro syntézu amoxicilinu při koncentracích nukleofilu nad 400 mM, molárním poměru AD/N 1,05 a pH 6,3. Hodnota S/H vzrostla oproti rozpustné formě přibližně o 8 %, (z hodnoty 4,9 na 5,0). Stupeň konverze se však zvýšil výrazně, a to z 22 na 61 %.

7. Seznam použité literatury:

- 1) Parmar, A., Kumar, H., Marwaha, S.S., Kennedy, J.F.: *Biotechnol. Adv.* 18, 289–301 (2000)
- 2) Gotti, R., Calleri, E., Massolini, G., Furlanetto, S., Cavrini, V.: *Electrophoresis* 27, 4746-54 (2006)
- 3) Lavecchia, A., Cosconati, S., Novellino, E., Calleri, E., Temporini, C., Massolini, G., Carbonara, G., Fracchiolla, G., Loiodice, F.: *J. Mol. Graph. Model.* 25, 773-83 (2007)
- 4) Solano, D.M., Honos, P., Hernaíz, M.J., Alcántara, A.R., Sánchez-Montero, J.M.: *Bioresour. Technol.* 115, 196-207 (2012)
- 5) Sudhakaran, V.K., Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S., Shewale, J.G.: *Process. Biochem.* 27, 131-43 (1992)
- 6) Oh, B., Kim, K., Park, J., Yoon, J., Han, D., Kim, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 486-92 (2004)
- 7) Kim, D.J., Byun, S.M.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1040, 12–18 (1990)
- 8) Arroyo, M., de laMata, I., Acebal, C., Pilar Castillon, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 507- 14 (2003)
- 9) Chandel, A.K., Rao, L.V., Narasu, M.L., Singh, O.V.: *Enzyme. Microb. Technol.* 42, 199-207 (2007)
- 10) Sio, C.F., Quax, W.J.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 349–55 (2004)
- 11) Van Langen, L.M., VanRantwijk, F., Svedas, V.K., Sheldon, R.A.: *Tetrahedron. Asymmetry.* 11, 1077- 83 (2000)
- 12) Shewale, J.G., SivaRaman, H.: *Process. Biochem.* 24, 146-54 (1989)
- 13) Škrob, F., Bečka, S., Plháčková, K., Fotopulosová, V., Kyslík P.: *Enzyme. Microb. Technol.* 32, 738-44 (2003)
- 14) Gabor, E.M., de Vries, E.J., Janssen, D.B.: *Environ. Microbiol.* 6, 948-58 (2004)
- 15) Kaufmann, W., Bauer, K.: *Naturwissenschaften.* 47, 474–475 (1960)
- 16) Alkema, W.B., Hensgens, C.M., Snijder, H.J., Keizer, E., Dijkstra, B.W., Janssen, D.B.: *Protein. Eng. Des. Sel.* 17, 473-80 (2004)
- 17) Jager, S.A.W., Shapovalova, I.V., Jekel, P.A., Alkema, W.B., Svedas, V.K., Janssen, D.B.: *J. Biotechnol.* 133, 18–26 (2008)
- 18) Deaguero, A.L., Blum, J.K., Bommarius, A.S.: *Prot. Eng. Des. Sel.* 25, 135-44 (2012)
- 19) Cecchini, D.A., Pavesi, R., Sanna, S., Daly, S., Xaiz, R., Pregnotato, M., Terreni, M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95, 1491–1500 (2012)
- 20) Wang, J., Zhang, Q., Huang, H., Yuan, Z., Ding, D., Yang, S., Jiang, W.: *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol. 74(5), 1023–30 (2007)
- 21) Zhou, Z., Zhang, A.H., Wang, J.R., Chen, M.L., Li, R.B., Yang, S., Yuan, Z.Y.: *Acta Biochimica. et Biophysica. Sinica. (Shanghai)* 35(6), 573–579 (2003)
- 22) Gabor, E.M., de Vries, E.J., Janssen, D.B.: *Enzyme. Microb. Technol.* 36, 182–190 (2005)
- 23) Jager, S.A.W., Jekel, P.A., Janssen, D.B.: *Enzyme. Microbial. Technol.* 40, 1335–1344 (2007)
- 24) Alkema, W.B.L., Prins, A.K., de Vries, E., Janssen, D.B.: *Biochem. J.* 365, 303–309 (2002)
- 25) Alkema, W.B.L., Dijkhuis, A.J., de Vries, E., Janssen, D.B.: *Eur. J. Biochem.* 269, 2093–2100 (2002b)
- 26) Youshko, M.I., Chilov, G.G., Shcherbakova, T.A., Svedas, V.K.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1599, 134–140 (2002)
- 27) Youshko, M.I., Moody, H.M., Bukhanov, A.L., Boosten, W.H., Svedas, V.K.: *Biotechnol. Bioeng.* 85, 323–329 (2004)
- 28) Marešová, H., Marková, Z., Valešová, R., Sklenář, J., Kyslík, P.: *BMC Biotechnology* 10 (7), 1472-1482 (2010)
- 29) Illanes, A., Fajardo, A.: *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 11, 587-595 (2001)
- 30) Ribeiro, M.P., Ferreira, A.L., Giordano, R.L., Giordano, R.C.: *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 33, 81–86 (2005)
- 31) Bečka, S., Štěpánek, V., Vyasarayani, R.W., Grulich, M., Maršálek, J., Plháčková, K., Dobišová, M., Marešová, H., Plačková, M., Valešová, R., Palyzová, A., Datla, A., Ashar T.K., Kyslík, P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(3), 1195-1203 (2013)
- 32) Goncalvez, L.R., Sousa, J. Jr., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M., Giordano, R.L., Giordano, R.C.: *Biotechnol. Bioeng.* 80(20), 622-631 (2002)
- 33) Bergeron, L.M., Tokatlian, T., Gomez, L., Clark, D.S.: *Biotechnol. Bioeng.* 102(2), 417-424 (2009)
- 34) Wu, Q., Chen, C.X., Du, L.L., Lin, X.F.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, 2026–2035 (2010)
- 35) Terreni, M., Ubiali, D., Bavaro, T., Pregnotato, M., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77 (3), 579-587 (2007)
- 36) Estruch, I., Tagliani, A.R., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R., Alcántara, A.R., Toma, L., Terreni, M.: *Enzyme. Microb. Technol.* 42, 121–129 (2008)
- 37) Park, C.B., Lee, S.B., Ryu, D.D.Y.: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 9, 275–281 (2000)
- 38) Wei, D., Yang, L., Song, Q.: *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* 26, 99–104 (2003)

- 39) Yang, L., Wei, D.Z.: *Biotechnol. Lett.* 25(14), 1195–1198 (2003)
- 40) Zhang, Y.W., Liu, S.L., Wei, D.Z., Liu, R.J., Xu, X.M.: *Chem. Biochem. Eng. Quarterly.* 22, 349–354 (2008)
- 41) Hernandez-Justiz, O., Fernandez-Lafuente, R., Terrini, M., Guisan, J.M.: *Biotechnol. Bioeng.* 59, 73–79 (1998)
- 42) Li, D., Zhang, Y., Cheng, S., Gao, Q., Wei, D.: *Food. Technol. Biotechnol.* 46(4), 461–466 (2008)
- 43) Illanes, A., Wilson, L., Aguirre, C.: *Appl. Biochem. Biotechnol.* 157(1), 98–110 (2009)
- 44) Bernardino, S.M., Fernandes, P., Fonseca, L.P.: *Biotechnol. J.* 4, 695–702 (2009)
- 45) Aguirre, C., Conchaa, I., Vergara, J., Riveros, R., Illanes, A.: *Process. Biochem.* 45(7), 1163–1167 (2010)
- 46) Bahamondes, C., Wilson, L., Aguirre, C., Illanes, A.: *B.B.E.* 4, 11–721 (2012)
- 47) Schroën, C.G.P.H., Nierstrasz, V.A., Kroon, P.J., Bosma, R., Janssen, A.E.M., Beeftink, H.H., Tramper, J.: *Enz. Microb. Technol.* 24(8-9), 498–506 (1999)
- 48) Schroën, C.G.P.H., Eldin, M.S.M., Janssen, A.E.M., Mita, G.D., Tramper, J.: *J. Mol. Catalysis. B. Enzymatic. C* 15(4-6), 163–172 (2001)
- 49) Cheng, T., Chen, M., Zheng, H., Wang, J., Yang, S., Jiang, W.: *Protein. Expr. Purif.* 46(1), 107–13 (2006)
- 50) Shaw, S.Y., Shyu, J.Ch., Hsieh, Y.W., Yeh, H.J.: *Enzym. Microb. Technol.* 26, 142–151 (2000)
- 51) Feng, X.F., Liang, S.H., Lou, W.Y.: *Biocatalysis and Biotransformation* 26(4), 321–326 (2008)
- 52) Kim, M.G., Lee, S.B.: *J. Mol. Catal. B.: Enzymatic.* 1, 71–80 (1996)
- 53) Sizmann, D., Keilmann, C., Bock, A.: *Eur. J. Biochem.* 192, 143–151 (1990)
- 54) Ignatova, Z., Wischnewski, F., Notbohm, H., Kasche, V.: *J. Mol. Biol.* 348, 999–1014 (2005)
- 55) Kasche, V., Lummer, K., Nurk, A., Piotraschke, E., Rieks, A., Stoeva, S., Voelter, W.: *Biophys. Acta* 17, 76–86 (1999)
- 56) Bruns, W., Hoppe, J., Tsai, H., Bruning, H.J., Maywald, F., Collins, J., Mayer, H.: *J. Mole. Appl. Genetics* 3, 36–44 (1985)
- 57) Bock, A., Wirth, R., Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G., Buckel, P.: *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 141–144 (1983)
- 58) Daumy, G.O., Danley, D., McColl, A.S., Apostolakos, D., Vinick, F.J.: *J. Bacteriol.* 163, 925–932 (1985)
- 59) Zhou, Z., Zhou, L.-P., Chen, M.-J., Zhang, Y.-L., Li, R.-B., Yang, S., Yuan, Z.-Y.: *Acta*

- Biochim. Biophys. Sin. 35, 416-22 (2003)
- 60) Xu, Y., Hsieh, M.-Y., Narayanan, N., Anderson, W.A., Scharer, J.M., Moo-Young, M., Chou, C.P.: *Biotechnol. Prog.* 5, 1357-65 (2005)
- 61) Schumacher, G., Sizmann, D., Haug, H., Buckel, P., Bock, A.: *Nucleic. Acids. Res.* 14, 5713–5727 (1986)
- 62) Barbero, J.L., Buesa, J.M., Buitrago, G.G., Méndez, E., Pérez-Aranda, A., García, J.: *Gene* 49, 69–80 (1986)
- 63) Oliver, G., Valle, F., Rosetti, F., Gomez-Pedrozo, M., Santamarée, P., Gosset, G., Bolivar, F.: *Gene* 40, 9–14 (1985)
- 64) Lindsay, C.D., Pain, R.H.: *Eur. J. Biochem.* 192, 133–141 (1990)
- 65) Sobotková, L., Štěpánek, V., Plháčková, K., Kyslík, P.: *Enzyme Microb. Technol.* 19, 389–397 (1996)
- 66) Basso, A., Braiuca, P., Clementi, S., Ebert, C., Gardossi, L., Linda, P.: *J. Mol. Catal. B.: Enzymatic* 19-20, 423-30 (2002)
- 67) Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P., Dodson, E.J., Dodson, G., Moody, P.C.E.: *Nature* 373, 264-8 (1995)
- 68) Giordano, R.C., Ribeiro, M.P., Giordano, R.L.: *Biotechnol. Adv.* 24, 27-41 (2006)
- 69) Van der Laan, J.M., Riemens, A.M., Quax, W.J.: US 5891703A (1999)
- 70) Kasche, V., Galunsky, B., Ignatova, Z.: *Eur. J. Biochem.* 270, 4721-8 (2003)
- 71) McDonough, M.A., Klei, H.E., Kelly, J.A.: *Protein. Sci.* 8, 1971-81 (1995)
- 72) Alkema, W.B.L., Hensgens, C.M.H., Kroezinga, Elz. H., de Vries, E., Floris, R., van der Laan, J.-M., Dijkstra, B.W., Janssen, D.B.: *Protein. Eng.* 13, 857-63 (2000)
- 73) Alkema, W.B.L., Hensgens, C.M.H., Snijder, H.J., Keizer, E., Dijkstra, B.W., Janssen, D.B.: *Protein. Eng. Des. Sel.* 17, 473-80 (2004)
- 74) Done, S.H., Brannigan, J.A., Moody, P.C., Hubbard, R.E.: *J. Mol. Biol.* 284, 463-75 (1998)
- 75) Hewitt, L., Kasche, V., Lummer, K., Lewis, R.J., Murshudov, G.N., Verma, C.S., Dodson, G.G., Wilson, K.S.: *J. Mol. Biol.* 302, 887-98 (2000)
- 76) McVey, C.E., Walsh, M.A., Dodson, G.G., Wilson, K.S., Brannigan, J.A.: *J. Mol. Biol.* 313(1), 139–50 (2001)
- 77) Varshney, N.K., Kumar, R.S., Ignatova, Z., Prabhune, A., Pundle, A., Dodson, E., Suresh, C.G.: *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cyst. Commun.* 68, 273-7 (2012)
- 78) Massolini, G., Temporini, C., Calleri, E.: *J Chromatogr. B.* 875, 20-9 (2008)
- 79) Basso, A., Braiuca, P., Ebert, C., Gardossi, L., Linda, P., Benedetti, F.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1601, 85-92 (2002)

- 80) Braiuca, P., Cruciani, G., Ebert, C., Gardossi, L., Linda, P.: *Biotechnol. Prog.* 20, 1025-31 (2004)
- 81) Braiuca, P., Ebert, C., Fischer, L., Gardossi, L., Linda, P.: *Chem. Bio. Chem.* 4, 615-22 (2003)
- 82) Ke, T., Tidor, B., Klibanov, A.M.: *Biotechnol. Bioeng.* 57, 741-5 (1998)
- 83) Massolini, G., Calleri, E., Lavecchia, A., Loiodice, F., Lubda, D., Temporini, C., Fracchiolla, G., Tortorella, P., Novellino, E., Caccialanza, G.: *Anal. Chem.* 75, 535-42 (2003)
- 84) Calleri, E., Massolini, G., Loiodice, F., Fracchiolla, G., Temnporino, C., Félix, G., Tortorella, P., Caccialanza, G.: *J. Chromatogr. A* 958, 131-40 (2002)
- 85) Aboul, E., Aboul, B.: *The impact of stereochemistry on drug dvelopments and use.* New York: Wiley; 1997
- 86) Zmijewski, M.J. Jr., Briggs, B.S., Thompson, A.R., Wright, I.G.: *Tetrahedron. Lett.* 32, 1621-2 (1991)
- 87) Chilov, G.G., Moody, H.M., Boosten, W.H.J., Švedas, V.K.: *Tetrahedron Asymmetry* 14, 2613-7 (2003)
- 88) Deaguero, A.L., Blum, J.K., Bommarius, A.S.: *Prot. Eng. Des. Sel.* 25, 135-44 (2012)
- 89) Topgi, R.S., Ng, J.S., Landis, B., Wang, P., Behling, J.R.: *Bioorg. Med. Chem.* 7, 2221-2229 (1997)
- 90) Carboni, Ch., Kierkel, H.G.T., Gardossi, L., Tamiola, K., Janssen, D.B., Quadflieg, P.J.L.M.: *Tetrahedron Asymmetry* 17, 245-51 (2006)
- 91) Landis, B.H., Mullins, P.B., Mullins, K.E., Wang, P.T.: *Org. Proc. Res. Dev.* 6, 539-46 (2002)
- 92) Gong, X., Su, E., Wang, P., Wei, D.: *Tetrahedron Lett.* 52, 5398-402 (2011)
- 93) Basso, A., Braiuca, P., De Martin, L., Ebert, C., Gardossi, L., Linda, P.: *Tetrahedron Asymmetry* 11, 1789-96 (2000)
- 94) Roche, D., Prasad, K., Repic, O.: *Tetrahedron Lett.* 40, 3665-8 (1999)
- 95) Fadnavis, N.W., Sharfuddin, M., Vadivel, S.K., Bhalerao, U.T.: *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1* 24, 3577-8 (1997)
- 96) Liu, S.-L., Song, Q.-X., Wei, D.-Z., Zhang, Y.-W., Wang, X.-D.: *Prep. Bioch. Biotechnol.* 36, 235-41 (2006)
- 97) Fadnavis, N.W., Devi, A.V., Jasti, L.S.: *Tetrahedron Asymmetry* 19, 2363-6 (2008)
- 98) Cainelli, G., Giacomini, D., Galletti, P., DaCol, M.: *Tetrahedron Asymmetry* 8, 3231-5 (1997)
- 99) Kumaraguru, T., Fadnavis, N.V.: *Tetrahedron Asymmetry* 23(10), 775-9 (2012)

- 100) Venkataiah, M., Reddipalli, G., Jasti, L.S., Fadnavis, N.W.: *Tetrahedron Asymmetry* 22, 1855-60 (2011)
- 101) Rocchietti, S., Urrutia, A.S.V., Pregnotato, M., Tagliani, A., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente.: *Enzym. Microb. Technol.* 31, 88-93 (2002)
- 102) Yao, Y., Lalonde, J.J.: *J. Mol. Catal. B.: Enzymatic.* 22, 55-9 (2003)
- 103) Fadnavis, N.W., Radhika, K.R., Devi, A.V.: *Tetrahedron Asymmetry* 17, 240-4 (2006)
- 104) Massolini, G., Calleri, E., De Lorenzi, E., Pregnotato, M., Terreni, M., Felix, G., Gandini, C.: *J. Chromatogr. A* 921, 147-60 (2001)
- 105) Calleri, E., Temporini, C., Massolini, G., Caccialanza, G.: *J. Pharm. Biom. Anal.* 35, 243-58 (2004)
- 106) Temporini, C., Calleri, E., Fracchiolla, G., Carbonara, G., Loiodice, F., Lavecchia, A., Tortorella, P., Brusotti, G., Massolini, G.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45, 211-18 (2007)
- 107) Gotti, R., Calleri, E., Massolini, G., Furlanetto, S., Cavrini, V.: *Electrophoresis* 27, 4746-54 (2006)
- 108) Burns, K.L., May, S.W.: *J. Chromatogr. B.* 797, 175-90 (2003)
- 109) Gotti, R., Fiori, J., Calleri, E., Temporini, C., Lubda, D., Massolini, G.: *J. Chromatogr. A.* 1234, 45-9 (2012)
- 110) Wu, W.-B., Wang, N., Xu, J.-M., Wu, Q., Lin, X.-F.: *Chem Commun* 18, 2348-50 (2005)
- 111) McMurry, J.: *Organic Chemistry*, 6th Edition, Section 6.9, 187 (2006)
- 112) Wu, W.-B., Xu, J.-M., Wu, Q., Lv, D.-S., Lin, X.-F.: *Adv. Synth. Catal.* 348, 487-92 (2006)
- 113) Otera, J.: *Chem. Rev.* 93, 1449-1470 (1993)
- 114) Lindsay, J.P., Clark, D.S., Dordick, J.S.: *Enz. Microbiol. Technol.* 31, 193-7 (2002)
- 115) Liu, B., Wu, Q., Lv, D., Lin, X.: *J. Biotechnol.* 153, 111-5 (2011)
- 116) Luzzio, F.A.: *Tetrahedron* 57, 915-945 (2001)
- 117) Mikite, G., Jakucs, K., Darvas, F., Lopata, A.: *Pest. Sci.* 13, 557-62 (1982)
- 118) Milner, S.E., Moody, T.S., Maguire, A.R.: *Eur. J. Org. Chem.*, 3059-67 (2012)
- 119) Wang, J.-L., Li, X., Xie, H.-Y., Liu, B.-K., Lin, X.-F.: *J. Biotechnol.* 145, 240-3 (2010)
- 120) Hasanzadeh, M., Shadjou, N., Eskaudari, M., de la Guardia, M.: *Trend. Anal. Chem.* 40, 106-118 (2012)
- 121) Liu, J., Liang, L., Li, G., Han, R., Chen, K.: *Biosens. Bioelectron.* 13, 1023-28 (1998)
- 122) Liu, J., Li, G.: *Sens. Actuators. B Chem.* 65, 26-31 (2000)

- 123) Yakovleva, M., Bhand, S., Danielsson, B.: *Anal. Chim. Acta.* 766, 1-13 (2013)
- 124) Bruggink, A., Roos, E.C., de Vroom, E.: *Org. Proc. Res. Dev.* 2, 128–133 (1998)
- 125) Sheldon, R.A., van Rantwijk, F., van Langen L.M., Wegman, M.A., Cao, L., Janssen, M.H.A.: Bruggink, A. (ed) *Synthesi of β -lactam antibiotics. Chemistry, Biocatalysis and Process integration.* Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands, 103-149 (2001)
- 126) Youshko, M.I., van Langen, L.M., de Vroom, E., Moody, H.M., van Rantwijk, J.K., Sheldon, R.A., Švedas, V.K.: *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10, 509-515 (2000)
- 127) van Langen, L.M., de Vroom, E., van Ratwijk, F., Sheldon, R.: *FEBS Lett.* 456, 89-92 (1999)
- 128) Youshko, M.I., van Langem, L.M., de Vroom, E., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A., Švedas, V.K. *Biotechnik. Bioeng.* 73, 426-430 (2001)
- 129) Aguirre, C., Toleda, M., Medina, V., Illanes, A.: *Process. Biochem.* 38, 351-360 (2002)
- 130) Rokem, J.S., Lantz, A.E., Nielsen, J.: *Nat. Prod. Rep.* 24(6), 1262–1287 (2007)
- 131) Terreni, M., Tchamkam, J.G., Sarnataro, U., Rocchietti, S., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J.M.: *Adv. Synth. Catal.* 347, 121–128 (2005)
- 132) Barber, M.S., Giesecke, U., Reichert, A., Minas, W.: *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 88, 175- 215 (2004)
- 133) Braiuca, P., Ebert, C., Basso, A., Linda, P., Gardossi, L.: *Trends. Biotechnol.* 24, 419–425 (2006)
- 134) Datta, S., Christena, L.R., Rajaram, Y.R.S.: *3 Biotech.* 3, 1–9 (2013)
- 135) Kallenberg, A.I., van Rantwijk, F., Sheldon, R.A.: *Adv. Synth. Catal.* 347, 905-26 (2005)
- 136) van Roon, J.L., Schroën, C.G., Tramper, J., Beeftink, H.H.: *Biotechnol. Adv.* 25(2), 137–147 (2007)
- 137) Abian, O., Mateo, C., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R.: *Biotechnol. Prog.* 20, 117–121 (2004)
- 138) Cecchini, D.A., Serra, I., Ubiali, D., Terreni, M., Albertini, A.M.: *BMC Biotechnology* 7, 54-58 (2007)
- 139) Montes, T., Grazú, V., López-Gallego, F., Hermoso, J.A., García, J.L., Manso, I., Galán, B., González, R., Fernández-Lafuente, R., Guisán, J.M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 73(1), 312–319 (2007)
- 140) Studier, F.W.: *J. Mol. Biol.* 219, 37-44 (1991)
- 141) Sobotková, L., Plháčková, K., Kyslík, P., Vojtíšek, V.: CZ278516 (1993)

- 142) Kyslík, P., Štěpánek, V., Hollerová, L., Bečka, S., Vyasarayani, W.R., Datla, A., Plháčková, K., Maršálek, J.: US 8039604 (2011)
- 143) Chen, C.S., Fujimoto, Y., Girdaukas, G., Sih, C.J.: *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 7294-7299 (1982)
- 144) Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.W.: *Nucleic Acid. s Res.* **22**, 4673-80 (1994)
- 145) Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T.: *Bioinformatics* **22**, 195-201 (2006)
- 146) Bowie, J.U., Luthy, R., Eisenberg, D.: *Science* **253**, 164-70 (1991)
- 147) Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall III, W.B., de Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S., Richardson, D.C.: *Proteins: Structure, Function & Genetics* **50**, 437-450 (2002)
- 148) Benkert, P., Künzli, M., Schwede, T.: *Nucleic Acids Res.* **37**, 510-514 (2009)
- 149) Benkert, P., Biasini, M., Schwede, T.: *Bioinformatics* **27**, 343-350 (2011)
- 150) Seeliger, D., de Groot, B.L.: *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **24**, 417-422 (2010)
- 151) Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T.M., Zurek, E., Hutchison, G.R.: *J. Cheminform.* **1**, 4-17 (2012)
- 152) Halgren, T.A.: *J. Comput. Chem.* **17**, 490-519 (1996)
- 153) Trott, O., Olson, A.J.: *J. Comput. Chem.* **31**, 455-461 (2010)
- 154) DeLano, W.L.: *The PyMOL Molecular Graphics System* DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA. <http://www.PyMOL.org> (2004)
- 155) Daniel, L., Buryska, T., Prokop, Z., Damborsky, J., Brezovsky, J.: *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 54-62 (2015)
- 156) Stierand, K., Maaß, P., Rarey, M.: *Bioinformatics* **22**, 1710-1716 (2006)
- 157) Birnboim, H.C., and Doly J.: *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523. (1979)
- 158) Berry, M.D.: *J. Neurochem.* **90**, 257-271 (2004)
- 159) Ahmad, A.L., Oh, P.C., Ahukor, S.R.A.: *Biotechnol. Adv.* **27**, 286-296 (2009)
- 160) Barrett, G.C.: *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*. Chapman and Hall (1985)
- 161) Breen, L., Churchward-Venne, T.A.: *J. Physiol.* **590** (9), 2065-2066 (2012)
- 162) Haag, W., Becquerelle, S., Valvani, S., Abril-Horpel, O.: EP 2296693 (2009)
- 163) Seebach, D., Matthews, J.L.: *Chem. Commun.* **21**, 2015-2022 (1997)
- 164) Bommarius, A.S., Schwam, M., Stingl, K., Kottenhahn, M., Huthmacher, K., Drauz, K.: *Tetrahedron-Asymmetr.* **6** 2851-2888 (1995)
- 165) Cohen, J.H., Bos, M.E., Cesco-Cancian, S., Harris, B.D., Fortenstine, J.T., Justus, M. Maryanoff, C.A., Mills, J., Muller, S., Roessler, A., Scott, L., Sorgi, K.L., Villani,

- F.J., Webster, R.R.H., Weh, Ch.: *Org. Proc. Res. Dev.* 7, 866-872 (2003)
- 166) Frederick, L.G., Suleymanov, O.D., Szalony, J.A., Taite, B.B., Salyers, A.K., King, L.W., Feigen, L.P., Nicholson, N.S.: *Circulation* 25, 813-820 (1998)
- 167) Rudat, J., Brucher, B.R., Syldatk, C.: *AMB Express* 2, 11-21 (2012)
- 168) Hu, J., Xue, Y.C., Xie, M.Y., Zhang, R., Otani, T., Minami, Y., Yamada, Y., Tarunaka, T.: *J. Antibiot.* 41, 1575-1579 (1988)
- 169) Plháčková, K., Bečka, S., Škrob, F., Kyslík P.: *Appl. Microbiol. Biotechnol* 62, 507-516 (2003)
- 170) Cole, M.: *Biochem. J.* 115: 741-745 (1969)
- 171) Lucente, G., Romeo, A., Rossi, D.: *Experientia* 21: 317-318 (1965)
- 172) Grulich, M., Štěpánek, V., Kyslík, P.: *Biotechnol Adv* 31, 1458-1472 (2013)
- 173) Soloshonok V.A., Fokina, N.A., Rybakova, A.V., Shishkina, I.P., Galushko, S.V., Sorochinsky, A.E., Kukhar, V.P., Savchenko, M.V., Švedas, V.K.: *Tetrahedron Asymmetr.* 6, 1601-1610 (1995)
- 174) Cai, G., Zhu, S., Yang, S., Zhao, G., Juany, W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2764-2770 (2004)
- 175) Ouyang, X., Zhou, S., Su, C.T., Ge, Z., Li, R., Kwh, C.K.: *J. Comput. Chem.* 34(4), 326-336 (2013)

8. Přílohy

Příloha č. 1:

Grulich, M., Štěpánek, V., Kyslík, P.: Perspectives and industrial potential of PGA selectivity and promiscuity. *Biotechnology Advances* 31; 1458-1472 (2013), IF₂₀₁₃=9,699

Příloha č. 2:

Marešová, H., Plačková, M., **Gulich, M.**, Kyslík, P.: Current state and perspectives of penicilin G acylase-based biocatalyses. *Appl Microbiol Biotechnik* 98; 2867-2879 (2014), IF₂₀₁₄=3,337

Příloha č. 3:

Bečka, S., Štěpánek, V., Vyasarayani, R.W., **Gulich, M.**, Maršálek, J., Plháčková, K., Dobišová, M., Marešová, H., Plačková, M., Valešová, R., Palyzová, A., Datla, A., Ashar T.K., Kyslík, P.: Penicillin G acylase from *Achromobacter* sp. CCM 4824. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(3), 1195-1203 (2013), IF₂₀₁₃=3,811

Příloha č. 4:

Grulich, M., Brezovský, J., Štěpánek, V., Palyzová A., Kyslíková E., Kyslík P.
Resolution of α/β -amino acids by enantioselective penicillin G acylase from
Achromobacter sp. J Mol Catal B: Enzym.
IF₂₀₁₄=2,128, Článek přijat do tisku