

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Barbora Petránková

PRODUKCE A CHARAKTERIZACE NOVÝCH
ARYL-SULFOTRANSFERAS A JEJICH VYUŽITÍ
V BIOANALYTICE

*Production and characterization of novel aryl sulfotransferases and
their use in bioanalytics*

Diplomová práce

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

Konzultanti: prof. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Ing. Lucie Petrásková Ph.D.

Praha 2023

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 17. května 2023

Podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucí práce doc. RNDr. Pavel Bojarové, Ph.D. a konzultantce Ing. Lucii Petráskové, Ph.D., za trpělivost, ochotu a cenné rady při zpracování a sepisování diplomové práce. Děkuji také své konzultantce prof. RNDr. Zuzaně Bosákové CSc. Ráda bych poděkovala Ing. Katarině Brodsky za uvedení do problematiky a za její trpělivost při zpracování experimentální části. V neposlední řadě děkuji doc. Ing. Kateřině Valentové Ph.D. za umožnění práce v Laboratoři biotransformací a všem pracovníkům Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR.

Abstrakt

Polyfenolové látky jsou nejrozšířenější přírodní látky nacházející se v potravě. Největší skupinu tvoří flavonoidy, fenolové kyseliny a katecholy. Polyfenoly jsou v organismu metabolizovány v rámci II. fáze biotransformace, mohou být sulfatovány, glukuronylovány nebo methylovány. Pro studium biotransformace je potřeba mít definované standardy.

Sulfatované polyfenoly můžeme připravit pomocí enzymové sulfatace, která má mnohem mírnější reakční podmínky oproti chemické. Prokaryotické sulfotransferasy využívají k sulfataci jako donor sulfátu 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS), který je však velmi drahý a obtížně se regeneruje. Alternativou jsou bakteriální aryl-sulfotransferasy (EC 2.8.2.22), které katalyzují přenos sulfátové skupiny z fenolového donoru na fenolový akceptor. V literatuře byly doposud popsány dvě bakteriální aryl-sulfotransferasy z *Desulfitobacterium hafniense* a *Escherichia coli*.

Předkládaná práce se zabývá produkcí, purifikací a biochemickou charakterizací dvou nových bakteriálních aryl-sulfotransferas z *Desulfosporosinus* sp. HMP52 a *Salmonella bongori*. Enzymy byly heterologně exprimovány v *E. coli* a purifikovány pomocí afinitní chromatografie. V rámci biochemické charakterizace bylo stanoveno jejich pH a teplotní optimum, stabilita v organických rozpouštědlech a různých teplotách a pH. Dále byla určována jejich katalytická účinnost s donory sulfátu *para*-nitrofenylsulfát (*p*-NPS) a 4-methylumbelliferylsulfát (MUS). Jednotlivé parametry byly následně porovnávány s již dříve charakterizovaným enzymem z *Desulfitobacterium hafniense*.

Sulfatační schopnosti enzymů byly ověřeny na několika vybraných polyfenolových látkách a byly porovnávány mezi sebou. Produkty enzymové sulfatace byly analyzovány metodami TLC a optimalizovanými metodami HPLC s UV a MS detekcí.

Produkované aryl-sulfotransferasy budou využity v dalším výzkumu pro přípravu sulfatovaných metabolitů polyfenolů.

Klíčová slova: Aryl-sulfotransferasa, enzymová sulfatace, polyfenolové látky, *Escherichia coli*, *Desulfosporosinus* sp. HMP52, *Salmonella bongori*, vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Abstract

Polyphenols are the most common natural substances found in food. The largest group is represented by flavonoids, phenolic acids and catechols. Polyphenols are metabolized in the body during the biotransformation phase II, they can be sulfated, glucuronylated or methylated. To study biotransformation, it is necessary to have defined standards.

Sulfated polyphenols can be prepared by enzymatic sulfation, which needs much milder reaction conditions compared to chemical sulfation. Prokaryotic sulfotransferases use 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate (PAPS) as a sulfate donor for sulfation, which is very expensive and difficult to regenerate. An alternative is the group of bacterial aryl sulfotransferases (EC 2.8.2.22), which catalyze the transfer of a sulfate group from a phenolic donor to a phenolic acceptor. Two bacterial aryl sulfotransferases from *Desulfitobacterium hafniense* and *Escherichia coli* have been described in the literature so far.

The present thesis deals with the production, purification and biochemical characterization of two new bacterial aryl-sulfotransferases from *Desulfosporosinus* sp. HMP52 and *Salmonella bongori*. The enzymes were heterologously expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Their pH and temperature optimum, stability in organic solvents and different temperatures and pH were determined as part of biochemical characterization. Their catalytic efficiency was determined with the sulfate donors *para*-nitrophenyl sulfate (*p*-NPS) and 4-methylumbelliferyl sulfate (MUS). The individual parameters were then compared with the previously characterized enzyme from *Desulfitobacterium hafniense*.

The sulfating abilities of the enzymes were tested with several selected polyphenolic substances and compared with each other. The enzyme sulfation products were analyzed by TLC and optimized HPLC methods with UV and MS detection.

The produced aryl sulfotransferases will be used in further research for the preparation of sulfated metabolites of polyphenols.

Keywords: Aryl sulfotransferase, enzymatic sulfation, polyphenolic compounds, *Escherichia coli*, *Desulfosporosinus* sp. HMP52, *Salmonella bongori*, High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Obsah

1	Teoretická část	10
1.1	Polyfenolové látky	10
1.1.1	Flavonoidy.....	12
1.1.2	Fenolové kyseliny	13
1.1.3	Stilbeny, taniny a lignany.....	13
1.2	Metabolismus xenobiotik.....	14
1.2.1	Metabolická sulfatace.....	15
1.2.2	Chemická sulfatace	16
1.2.3	Enzymová sulfatace	16
1.3	Produkce, purifikace a charakterizace rekombinantních enzymů.....	17
1.3.1	Biochemická charakterizace enzymů.....	18
1.4	Spektrometrické metody	19
1.4.1	UV-VIS spektrofotometrie.....	19
1.4.2	Fluorimetrie.....	21
1.5	Chromatografické metody.....	22
1.5.1	Afinitní chromatografie.....	23
1.5.2	Tenkovrstvá chromatografie	24
1.5.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	25
2	Cíl práce.....	27
3	Experimentální část.....	28
3.1	Chemikálie	28
3.2	Buněčné kultury	29
3.3	Použité plasmidy.....	29
3.4	Komerční sady	30
3.5	Přístroje a pomůcky	30
3.6	Media, roztoky a gely.....	31
3.7	Metody	33
3.7.1	Transformace buněk.....	33
3.7.2	Kultivace buněk	33
3.7.3	Izolace plasmidové DNA	34
3.7.4	Purifikace enzymů.....	34
3.7.5	Elektroforéza SDS-PAGE.....	36
3.8	Biochemická charakterizace enzymů.....	36
3.8.1	Standardní stanovení enzymové aktivity.....	36

3.8.2	Stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda.....	38
3.8.3	Stanovení specifické aktivity enzymu.....	38
3.8.4	pH optimum	38
3.8.5	Teplotní optimum.....	40
3.8.6	Stabilita v pH a teplotě.....	40
3.8.7	Stabilita v rozpouštědlech.....	40
3.8.8	Enzymová kinetika <i>p</i> -NPS – fenol a katechol.....	40
3.8.9	Enzymová kinetika MUS – katechol.....	41
3.9	Enzymová sulfatace vybraných sloučenin.....	42
3.9.1	Příprava reakčních směsí flavonoidů.....	42
3.9.2	TLC analýza reakčních směsí flavonoidů.....	42
3.9.3	HPLC analýza reakčních směsí flavonoidů	42
4	Výsledky	43
4.1	Výběr bakteriálních aryl-sulfotransferas.....	43
4.2	Izolace plasmidové DNA.....	44
4.3	Purifikace rekombinantních enzymů	44
4.4	Biochemická charakterizace aryl-sulfotransferas	47
4.4.1	Stanovení pH optima.....	47
4.4.2	Stanovení teplotního optima	47
4.4.3	pH stabilita a termostabilita	49
4.4.4	Vliv rozpouštědel na enzymovou aktivitu.....	51
4.5	Enzymová kinetika.....	52
4.5.1	Kinetické parametry reakce <i>p</i> -NPS – fenol.....	53
4.5.2	Kinetika <i>p</i> -NPS – katechol.....	55
4.5.3	Kinetika MUS – katechol.....	57
4.6	Enzymová sulfatace vybraných sloučenin.....	59
4.6.1	Detekce sulfátů pomocí hmotového spektrometru (LC-MS).....	69
5	Diskuze	71
6	Závěr	78
	Seznam použité literatury	80

Příloha 1: Aminokyselinové sekvence aryl-sulfotransferas

Příloha 2: Příklady HPLC analýzy reakčních směsí katalyzovaných AST

Seznam zkratek

- API – apigenin
- APIS – apigenin-4'-*O*-sulfát
- AST – aryl-sulfotransferasa
- *CfeAST* – aryl-sulfotransferasa z *Campylobacter fetus*
- DCC – *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid
- *DhAST* – aryl-sulfotransferasa z *Desulfitobacterium hafniense*
- DMSO – dimethylsulfoxid
- *DspAST* – aryl-sulfotransferasa z *Desulfosporosinus* sp. HMP52
- *E. coli* – *Escherichia coli*
- *EcoAST* – aryl-sulfotransferasa z *Escherichia coli*
- EKDD – ekvilibrační pufr pro purifikaci *DhAST* a *DspAST*
- EKES – ekvilibrační pufr pro purifikaci *EcoAST* a *SboAST*
- EUDD – eluční pufr pro purifikaci *DhAST* a *DspAST*
- EUES – eluční pufr pro purifikaci *EcoAST* a *SboAST*
- HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* – Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
- CH – chrysin
- IMAC – *Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography* – Afinitní chromatografie s imobilizovaným iontem kovu
- IPTG – isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
- KAM – kaempferol
- KS – kaempferol-4'-*O*-sulfát
- L – luteolin
- LB médium – Luria Bertani médium
- LC-MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
- LMW – *Low Molecular Weight*
- LS – luteolinsulfát (luteolin-3'-*O*-sulfát, luteolin-4'-*O*-sulfát)
- M – myricetin

- MCAC – *Metal Chelate Affinity Chromatography* – afinitní chelatační chromatografie
- MU – 4-methylumbelliferon
- MUS – 4-methylumbelliferylsulfát
- MYRS – myricetinsulfát (myrecetin-3'-*O*-sulfát, myrecetin-4'-*O*-sulfát)
- ot./min – otáček za minutu
- PAP – 3'-fosfoadenosin-5'-fosfát
- PAPS – 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
- PMSF – fenylmethylsulfonylfluorid
- *p*-NP – *para*-nitrofenol
- *p*-NPS – *para*-nitrofenylsulfát
- Q – kvercetin
- QS – kvercetin sulfát (kvercetin-3'-*O*-sulfát, kvercetin-4'-*O*-sulfát)
- *Sbo*AST – aryl-sulfotransferasa ze *Salmonella bongori*
- SD – silydianin
- SDS-PAGE – gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného
- SULT – sulfotransferasa
- TEMED – tetramethylethyldiamin
- TLC – *Thin Layer Chromatography* – tenkovrstvá chromatografie

1 Teoretická část

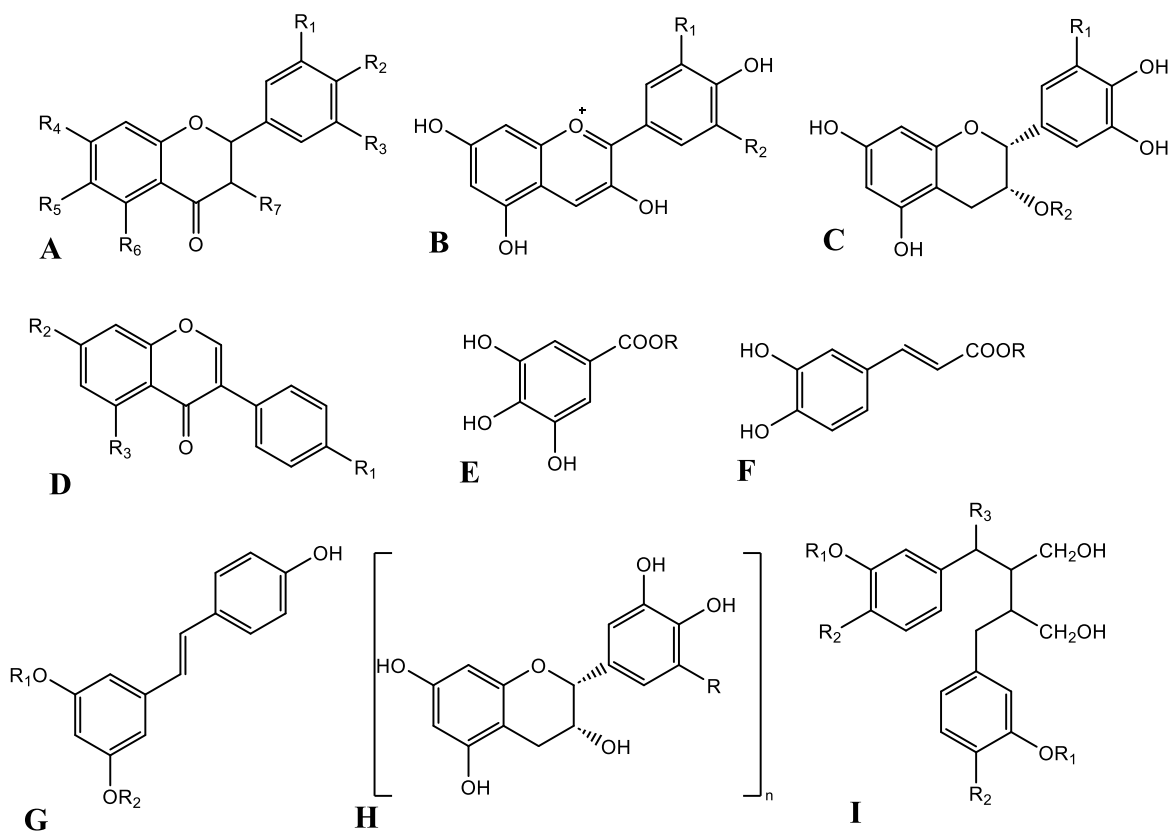
1.1 Polyfenolové látky

Polyfenolové sloučeniny jsou široce rozšířené látky v přírodě a jsou důležitou skupinou sekundárních rostlinných metabolitů. Rostlinné polyfenoly jsou řazeny do několika skupin jako například fenoly, fenolové kyseliny, stilbeny, taniny, ligniny a flavonoidy [1,2].

Polyfenolové látky jsou přítomny v ovoci a zelenině a jsou využívány jako doplňky stravy [3]. Studie prokázaly jejich terapeutické účinky, kdy působí protektivně vůči rakovině, diabetu, a mnoha metabolickým onemocněním [4].

Polyfenoly se dělí na fenolové kyseliny, flavonoidy, stilbeny, lignany a taniny [2,5]. Základní rozdělení polyfenolových látek je v tabulce 1.1, jejich základní struktury jsou uvedeny na obrázku 1.1.

Flavonoidy zahrnují skupiny látek s malou molekulární hmotností (typicky mezi 200-400 Da) a lze je rozdělit na flavonoly, flavony, flavanony, antokyany, katechiny a isoflavony (tabulka 1.1). Hlavním zdrojem flavonoidů je zelenina, ovoce, obiloviny a luštěniny. Při metabolizaci flavonoidů dochází především k jejich glykosylaci, glukuronylaci, sulfataci nebo methylaci a jsou vylučovány pomocí žluče nebo moči [1].



Obrázek 1.1: Obecné struktury polyfenolových sloučenin: A) flavonoly, flavony, flavanony; B) anthokyany; C) katechiny; D) isoflavony; E) deriváty kyseliny hydroxybenzoové; F) deriváty kyseliny hydroxyskořicové; G) stilbeny; H) taniny; I) lignany [5,6]

Tabulka 1.1: Přehled skupin polyfenolových sloučenin podle jejich základní struktury [5,6]

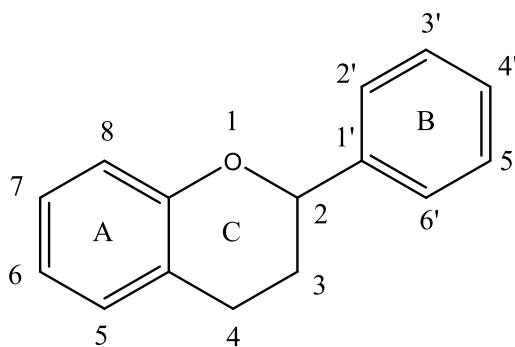
Třída	Strukturní motiv	Příklady sloučenin
Flavonoidy		
Flavonoly	C ₆ -C ₃ -C ₆	kvercetin, fisetin, rutin
Flavony		Chrysin
Flavanony		naringenin, hesperidin
Anthokyany		Kyanidin
Katechiny (flavanoly)		katechin, epikatechin
Isoflavony		Gennistein
Fenolové kyseliny		
Deriváty kyseliny hydroxybenzoové	C ₆ -C ₁	kyselina gallová
Deriváty kyseliny hydroxyskořicové	C ₆ -C ₃	kyselina kávová
Stilbeny	C ₆ -C ₂ -C ₆	Resveratrol
Taniny		
Kondenzované taniny	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Prokyanidin
Hydrolyzovatelné taniny		Theogallin
Lignany	(C ₆ -C ₃) _n	silydianin (flavonolignan), matairesinol

1.1.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou běžně rozšířeny v rostlinné říši, jsou to biologicky aktivní látky a bylo jich identifikováno více než 8000 druhů. Mnoho z nich je zodpovědných za barvy plodů a květů, některé chrání rostliny před UV zářením. Flavonoidy se nacházejí v nejrozličnějších potravinách – ovoci, zelenině, čaji, víně, hořké čokoládě, zrnech a v mnohém dalším. Často se vyskytují v glykosylované formě, odštěpením cukerné složky pak tyto těkavé látky obohacují plody a nápoje charakteristickým aromatem. Výzkumy naznačují, že by mohly mít antioxidační, hormonální, protiinfekční, protirakovinné i preventivní účinky. Jsou schopny indukovat obranné enzymy a potlačují srážení krve [4,6,7].

Flavonoidy mohou vykazovat antioxidační účinky, které souvisí s jejich strukturou, zejména s počtem hydroxylových skupin [1]. Základní struktura flavonoidů je na obrázku 1.2. Obsahují obvykle hydroxylové skupiny v poloze 3-, 5- a 7-. Flavonoidy se vyskytují i v glykosylované formě. Přítomnost cukrů a hydroxylových skupin zvyšuje

rozpustnost ve vodě a jejich biologickou dostupnost, ale v případě přítomnosti methylových skupin se naopak zvyšuje jejich lipofilita [8]. Do skupiny flavonoidů patří flavonoly, flavony, flavanony, anthokyaniny, katechiny a isoflavony [5].



Obrázek 1.2: Základní struktura flavonoidů [9]

Prospěšnost flavonoidů spočívá především v jejich antioxidačních účincích, které pomáhají neutralizovat škodlivé volné radikály, a chrání tak buňku před oxidativním stresem. Flavonoidy mají v organismu schopnost zpomalovat nebo inhibovat oxidativní procesy vyvolané volnými radikály nebo reaktivními formami kyslíku. V závislosti na poloze a počtu hydroxylových skupin a počtu konjugovaných vazeb mohou mít různé redoxní potenciály [10]. Jsou schopné měnit aktivitu některých enzymů a ovlivňovat chování mnoha buněčných systémů, mají prospěšný účinek na organismus [1]. Díky antioxidačním účinkům mohou být i účinné proti stárnutí. Mezi další výhody patří jejich protizánětlivé, kardioprotektivní a antimikrobiální účinky [1].

1.1.2 Fenolové kyseliny

Fenolové kyseliny jsou deriváty kyseliny hydroxybenzoové a hydroxyskořicové. Nejběžnější fenolové kyseliny jsou kyselina kávová, ferulová a gallová. Obvykle se vyskytují ve formě esterů, ale lze je také nalézt volné. Konjugované kyseliny jsou součástí nerozpustné složky buněčné stěny, v této formě jsou nejčastěji akumulované ve vakuolách. Fenolové kyseliny nalezneme v ovoci a zelenině, v obilí nebo semenech. Vázané fenolové kyseliny se mohou uvolnit pomocí extrakce bazickou, kyselou nebo enzymovou hydrolýzou. V potravinách se nacházejí ve velmi nízké koncentraci [5,10].

1.1.3 Stilbeny, taniny a lignany

Lignany jsou dimerní sloučeniny, obsahují 2,3-dibenzylbutanovou strukturu vzniklou dimerizací dvou koniferylových jednotek nebo derivátů kyseliny skořicové. Jsou to

fytoestrogeny nacházející se v minoritním množství v mnoha rostlinách, kde se podílejí na tvorbě buněčné stěny rostlinných buněk. Podobně jako flavonoidy mají antioxidační účinky, mohou snižovat hladiny LDL cholesterolu, mají estrogenní i antiestrogenní účinky a mohou mít protektivní účinky vůči rakovině. Patří sem například enterodiol, matairesinol, jejich deriváty jsou flavonolignany, např. silydianin [5,6].

Taniny jsou sekundární metabolity rostlin. Jedná se o vysokomolekulární látky tvořené z oligomerů a polymerů polyfenolů. I přes svou vysokou molekulovou hmotnost (500-3000 g/mol) jsou dobře rozpustné ve vodě. Se sacharidy a proteiny mohou vytvářet nerozpustné komplexy. Využívají se například jako potravinářská aditiva (čiřidla) nebo k léčbě bakteriálních infekcí (antioxidační, protizánětlivý a antiseptický účinek). Zástupci jsou například prokyanidin nebo kyselina ellagová [5,6].

Stilbeny jsou nejvíce zastoupeny v hroznech a hroznových produktech. Zástupci stilbenů je například resveratrol, nebo pterostilben, které jsou produkovány v rostlinách v reakci na houbovou infekci. Resveratrol je jednou z hlavních látek studovaných v protirakovinném výzkumu. Tyto látky jsou nicméně velmi špatně biologicky dostupné, a to hlavně z důvodu jejich rychlé metabolizace a vylučování [5,6].

1.2 Metabolismus xenobiotik

Hlavním místem biotransformace xenobiotik u savců jsou játra, konkrétně hepatocyty. Vylučování a přeměnu látek ovlivňuje mnoho faktorů, jako je velikost molekuly, polarita, ale také enterohepatická cirkulace nebo průtok krve játry [11,12].

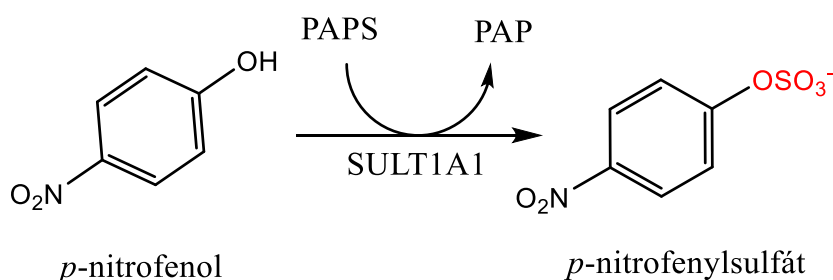
Hlavním cílem biotransformace je přeměna cizorodých látek na látky, které se snadno vyloučí z těla. Během biotransformace se mění fyzikální a chemické vlastnosti molekul, což vede ke změně jejich biologické účinnosti a dostupnosti. Především se mění schopnost průniku membránami, z látek lipofilních se stávají látky hydrofilní. To pak vede ke snadnějšímu vyloučení z těla [11,12].

Biotransformace se dělí na dvě fáze: hydroxylační a konjugační. První fáze je tvořena především oxidačními, redukčními a hydrolytickými reakcemi, které do molekul zavádějí nebo odhalují funkční skupiny, a zvyšují tak rozpustnost molekuly. Druhá fáze zahrnuje především konjugační reakce, jako je glukuronylace, sulfatace, konjugace s glutathionem, acetylace, methylace a další. Během druhé fáze opět dochází ke zvýšení hydrofility. Všechny reakce fáze biotransformace I i II jsou katalyzované enzymy [11,12].

1.2.1 Metabolická sulfatace

Jednou z nejdůležitějších konjugčních reakcí je sulfatace. Sulfataci podléhají především fenolové hydroxyly, alifatické hydroxyly a aminy. Sulfatace hraje také důležitou roli v regulaci endokrinních funkcí, reguluje konjugaci estogenů a androgenů. Reakce je katalyzována sulfotransferasami (SULT, EC 2.8.2) v cytosolu, a to za přítomnosti koenzymu 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfátu (PAPS). Touto reakcí vznikají estery kyseliny sírové, které jsou vysoce rozpustné ve vodě. Sulfatace je za fyziologických podmínek částečně regulována dostupností PAPS a transportními mechanismy. Tento typ konjugace je považován za vysoce afinitní, ale nízkokapacitní. Existuje asi 44 savčích sulfotransferas, například SULT1 (EC 2.8.2.1) katalyzuje sulfataci malých planárních fenolů, jako je estradiol, hormony štítné žlázy, přírodní xenobiotika a léky, zatímco SULT2 pak sulfatuje steroidy atd. [11,13].

Sulfotransferasy mohou být rozděleny i podle typu donoru a akceptoru sulfátu, a to na aryl-sulfotransferasy (AST, EC 2.8.2.22), které katalyzují reakce s fenolovými substráty, SULT katalyzující sulfatace primárních a sekundárních alkoholů, SULT katalyzující reakce s estrogeny a jejich metabolity, SULT esterů tyrosinu a SULT žlučových solí. Na obrázku 1.3 je příklad sulfatace *para*-nitrofenolu na *para*-nitrofenylsulfát, kterou katalyzuje SULT1A1 [11,13].



Obrázek 1.3: Sulfatace *p*-nitrofenolu enzymem SULT1A1 (EC 2.8.2.1) [11]

Polyfenolové látky, které jsou integrální částí lidské výživy, jsou velmi často špatně rozpustné. Díky sulfataci se jejich rozpustnost značně zvyšuje (změnou fyzikálně chemických parametrů, jako je velikost a náboj, to však mění jejich biologickou aktivitu [14]. Pro porozumění mechanismu jejich působení je potřeba získat dobře definované standardy těchto sulfátů [3].

Sulfatace polyfenolových látek je možná chemickou nebo enzymovou syntézou.

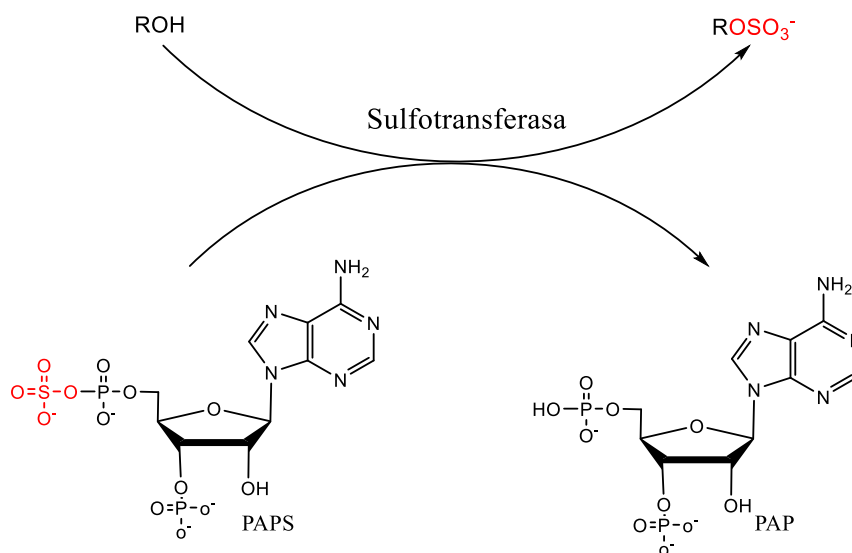
1.2.2 Chemická sulfatace

Chemická sulfatace polyfenolových látek bývá často velkou výzvou z důvodu rozdílných fyzikálně chemických vlastností sloučenin a jejich nízké rozpustnosti v organických rozpouštědlech, nízké regioselektivitě, nutnosti použít chránicí skupiny a drsné reakční podmínky v přítomnosti oxidu sírového. Pro sulfataci flavonoidů je využívána například kyselina sulfoamidová, chlorsulfonová, nebo sírová spolu s *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimidem (DCC), nebo adukty oxidu sírového [15]. Často se jedná o vícekový proces s použitím toxických chemikálií, které nelze z výsledného produktu zcela odstranit. [3,16].

1.2.3 Enzymová sulfatace

Oproti chemické sulfataci má enzymová sulfatace řadu výhod. Není nutné zavádět protekční a deprotektční kroky, předností je vysoká regioselektivita a obvykle jednokroková syntéza za mírných reakčních podmínek s následnou purifikací produktu gelovou chromatografií.

Pro sulfatace je možné využít eukaryotické aryl-sulfotransferasy. Tyto enzymy jsou substrátově specifické. PAPS-dependentní sulfotransferasy přenášejí sulfátovou skupinu z PAPS – viz obrázek 1.4.

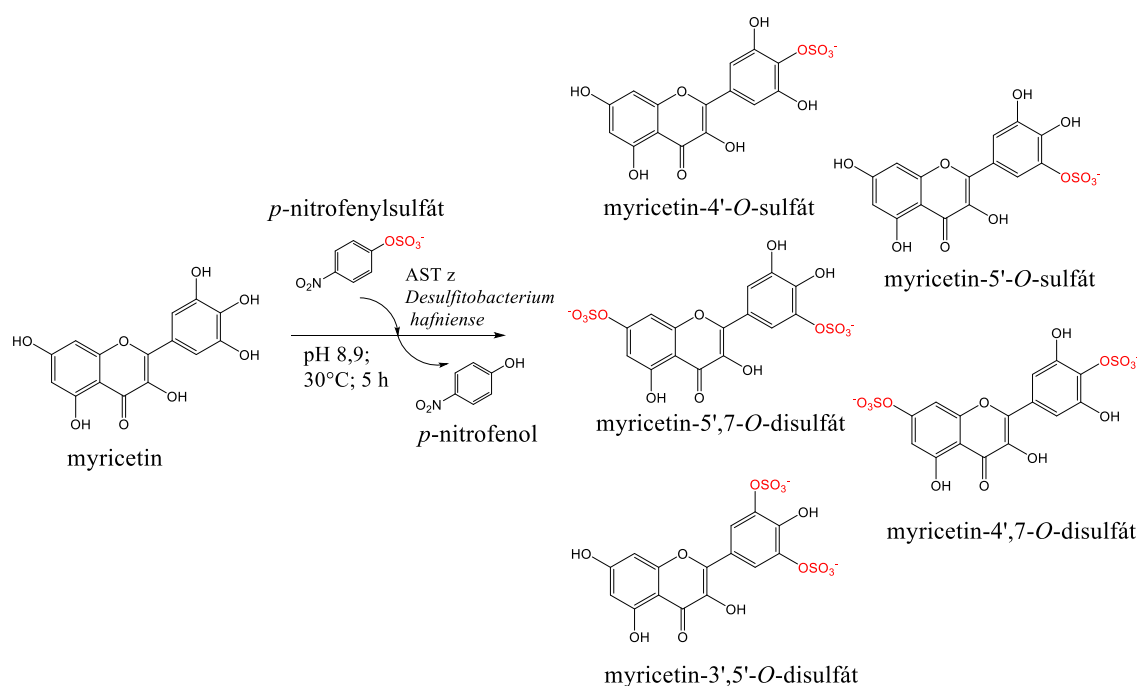


Obrázek 1.4: Enzymová sulfatace fenolových sloučenin PAPS-dependentní SULT [15]

PAPS-dependentní sulfotransferasy využívají PAPS jako donor sulfátu. Použití tohoto substrátu je však limitováno jeho vysokou cenou, inhibicí vznikajícího PAP a substrátovou specifitou. Proto byly vyvinuty regenerační systémy pro PAPS obsahující další enzymy [3].

Druhou skupinou jsou PAPS-independentní aryl-sulfotransferasy, které přenášejí sulfátovou skupinu z fenolového esteru na fenol. Aryl-sulfotransferasy jsou přítomny v mnoha bakteriích, především v patogenech [17]. Příklad enzymové sulfatace pomocí bakteriálních aryl-sulfotransferas je na obrázku 1.5.

Aryl-sulfotransferasy katalyzují přenos sulfátové skupiny na hydroxylovou skupinu nebo amino skupinu malých molekul, jako jsou například flavonoidy, některé léky, steroidy, hormony, sacharidy a proteiny [14].



Obrázek 1.5: Enzymová sulfatace myricetinu pomocí bakteriální aryl-sulfotransferasy (AST) z *Desulfitobacterium hafniense* [18]

1.3 Produkce, purifikace a charakterizace rekombinantních enzymů

Produkce proteinů probíhá v expresních systémech, nejčastějšími expresními systémy jsou prokaryotické a eukaryotické buňky. Nejpoužívanějšími eukaryotními systémy pro expresi jsou bakterie *Escherichia (E.) coli* a kvasinky *Pichia pastoris* a *Saccharomyces cerevisiae*. Dalšími expresními systémy mohou být například hmyzí a savčí buňky, u kterých bývá časově a finančně náročná kultivace, zato je ale

zabezpečena vysoká exprese proteinu a vysoká biologická aktivita. Výhodou *E. coli* je její snadná kultivace, rychlý růst, vysoké výtěžky, snadná kontrola genové exprese a nízké náklady. Kvasinky mají nižší výtěžky a je obtížnější kontrola genové exprese, naproti tomu ale neprodukují endotoxiny a jsou u nich možné posttranslační modifikace proteinu [19].

Před samotnou charakterizací rekombinantních enzymů je potřeba tyto enzymy izolovat z kultivačního média. Během purifikace dochází k přečištění žádaného proteinu od nízko- a vysokomolekulárních látek (například jiných proteinů buněčného lyzátu). Pro přečištění proteinu mohou být použity různé metody, např. srážení, centrifugace, elektroforéza nebo chromatografie. Pro zakoncentrování a stabilizaci je navíc potřeba odstranit soli nebo rozpouštědla eluentu, pak mohou následovat další kroky v podobě lyofilizace, sterilní filtrace a dialýzy. Purifikace proteinu může sestávat z více kroků, během nichž dochází ke ztrátě vzorku, z tohoto důvodu je potřeba co nejvíce optimalizovat tento proces [20]. Proces purifikace může být zjednodušen, pokud cílový protein obsahuje afinitní značku, díky níž je protein selektivně zachycen na stacionární fázi. Přečištěný protein se následně uvolní díky specifickému ligandu nebo změně pH, iontové síly nebo polaritě (kapitola 1.5.1) [19].

1.3.1 Biochemická charakterizace enzymů

Po purifikaci je důležitým krokem charakterizace enzymu, zejména z hlediska jeho specifické enzymové aktivity, koncentrace, molekulové hmotnosti, pH a teplotního optima a stability v různých podmínkách [21].

Aktivitu enzymu mohou ovlivňovat různé parametry jako pH, teplota, nebo přítomnost dalších složek, např. kosolventů. Při extrémních hodnotách pH a teploty může dojít k denuraci spojené se ztrátou enzymové aktivity. Z tohoto důvodu je potřeba určit i stabilitu enzymu v různých pH a při různých teplotách, aby bylo možné dobře navrhnout podmínky dalšího použití enzymu [21].

Teoretickou molekulovou hmotnost enzymu (vypočítanou z aminokyselinové sekvence) lze orientačně ověřit pomocí gelové elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) [21].

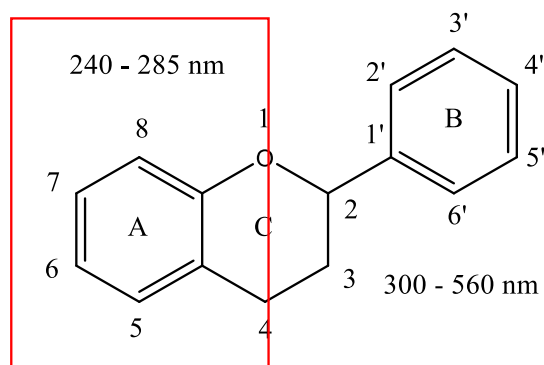
Charakterizace a purifikace enzymů se provádí analytickými metodami popsány v následujících kapitolách.

1.4 Spektrometrické metody

1.4.1 UV-VIS spektrofotometrie

UV-VIS spektrometrie je v biochemických aplikacích hojně využívána vzhledem k tomu, že většina biochemických sloučenin absorbuje v ultrafialové až viditelné oblasti. Rozsah použití se vztahuje na anorganické a organické sloučeniny, proteiny, aminokyseliny nebo nukleové kyseliny. Tato technika umožňuje stanovení mikromolárních koncentrací látek, oproti fluorimetrii (kapitola 1.4.2) je však méně citlivá. UV-VIS spektrometrie se s výhodou používá pro sledování enzymatických reakcí a měření reakční rychlosti, a to přímo pomocí stanovení vzniku reakčních produktů, nebo pomocí úbytku reakčních substrátů [22].

Pro stanovení koncentrace flavonoidů bylo vyvinuto několik spektrometrických technik s použitím ultrafialového a viditelného záření a také fluorescenční techniky. Většina flavonoidů absorbuje záření v UV oblasti. Na obrázku 1.6 jsou zobrazeny absorpční pásy flavonoidů. Pro účely stanovení koncentrace flavonoidů v rostlinách a potravinách je pak UV detekce jednoduchým a rychlým nástrojem analýzy [23].



Obrázek 1.6: Absorpční pásma flavonoidů [23]

Pomocí UV-VIS spektrofotometrie lze také určit množství DNA v roztoku. Díky přítomnosti purinových a pyrimidinových bází absorbují nukleové kyseliny v blízké UV oblasti. Avšak při kvantifikaci obsahu nukleových kyselin pomocí spektrofotometrie může docházet k výrazným změnám ve spektrech se změnou pH v důsledku ionizace základních bází. Obtížné je také určit individuální příspěvek nukleových kyselin a proteinů, protože proteinové pásy jsou maskovány silnými absorpčními pásy nukleových kyselin [22].

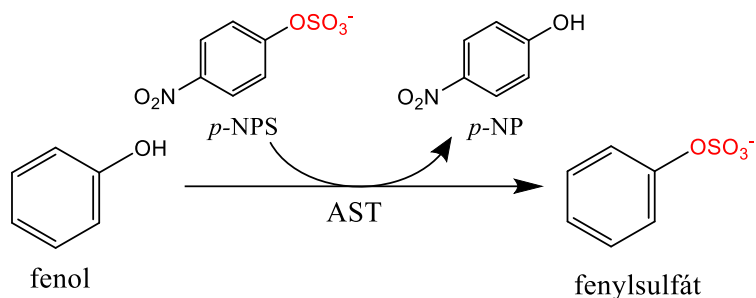
Měření nukleových kyselin a doprovodných proteinů ve vzorku se provádí při 260 nm a 280 nm. Zatímco báze v DNA a RNA absorbují v UV oblasti v rozsahu 250 – 265 nm, proteiny absorbují při 280 nm. Poměr absorbancí $A_{260}:A_{280}$ by měl být v rozsahu od 1,5 do 2,0; tato hodnota pak vypovídá o dostatečné čistotě vzorku DNA pro další molekulárně-biologické práce [22,24].

Pro stanovení koncentrace proteinu je možné použít tři kolorimetrické kvantifikační metody, založené na derivatizačních reakcích: biuretová, Lowryho a Bradfordova metoda stanovení koncentrace proteinu [22].

Bradfordova metoda je založena na absorbanci barviva *Coomassie Brilliant Blue*, jež tvoří komplex s bazickými aminokyselinami ve vzorku proteinu. To vede k posunu absorpčního spektra barviva z 465 na 595 nm, přičemž absorbance při 595 nm je pak úměrná koncentraci proteinu. Výhodou této metody je její rychlost a možnost souběžného stanovení několika vzorků. Biuretová metoda je založena na vzniku barevného komplexu peptidových vazeb v proteinech s mědí, jehož absorbance při vlnové délce 465 nm je přímo úměrná množství proteinu. Lowryho metoda je citlivější než biuretová metoda, v postupu je kromě biuretové reakce (reakce proteinů s alkalickým roztokem mědi) zahrnuta druhá reakce založená na redukci Folin-Ciocalteauova činidla tyrosinovými a tryptofanovými zbytky proteinu; absorbance se měří při 750 nm. Tyto dvě metody však mají svá omezení způsobené v případě přítomnosti amonných solí, glycinu a merkaptanu [22].

Koncentraci substrátu nebo produktu lze v reakci katalyzované enzymem stanovit buď přímým stanovením absorbance reakčního produktu po skončení reakce, nebo měřením rychlosti reakce, která je doprovázena změnou koncentrace dané látky – substrátu či produktu. Při stanovení změny koncentrace jedné komponenty reakční směsi v přítomnosti jiných by se spektra přítomných komponent měla dostatečně lišit. Měřením se tak stanovuje např. průběh, pokles absorbance reaktantu nebo zvýšení absorbance produktu v čase [22,25].

Samotná aktivita enzymu se tedy určí pomocí rychlosti, se kterou daný enzym katalyzuje přeměnu substrátu na produkt v daném časovém intervalu. Musí se zvolit vhodná koncentrace výchozích látek a ředění enzymu [21], abychom monitorovali s jistotou počáteční rychlosti enzymové reakce, tj. kdy konverze reakce nepřekročí hodnotu cca 5 %. Příklad reakce pro stanovení aktivity enzymu AST je uveden na obrázku 1.7.

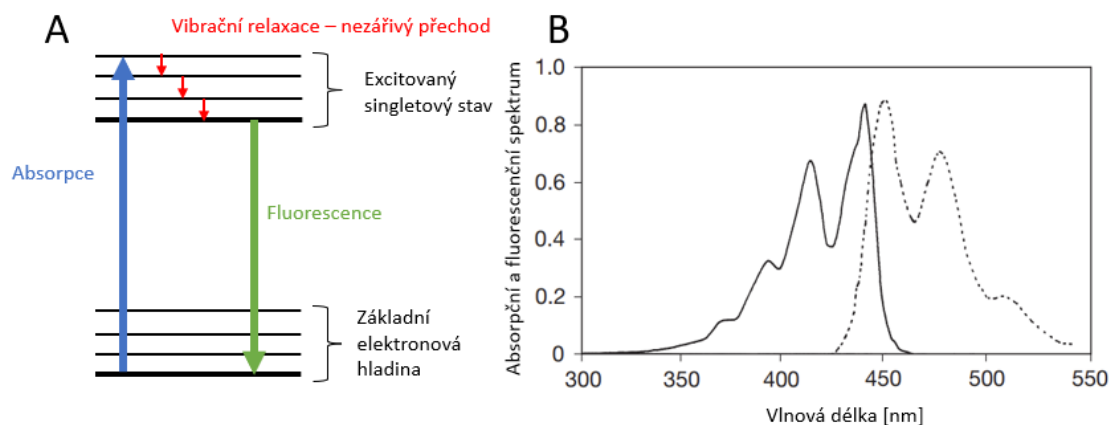


Obrázek 1.7: Sulfatace fenolu katalyzovaná bakteriální AST. Produkt reakce *p*-NP (*para*-nitrofenol) se stanovuje spektrofotometricky při 417 nm.

Tohoto principu lze pak využít i při měření různých kinetických parametrů enzymu jako stanovení Michaelisovy konstanty, nebo charakteristik enzymu jako pH a teplotní optimum [21].

1.4.2 Fluorimetrie

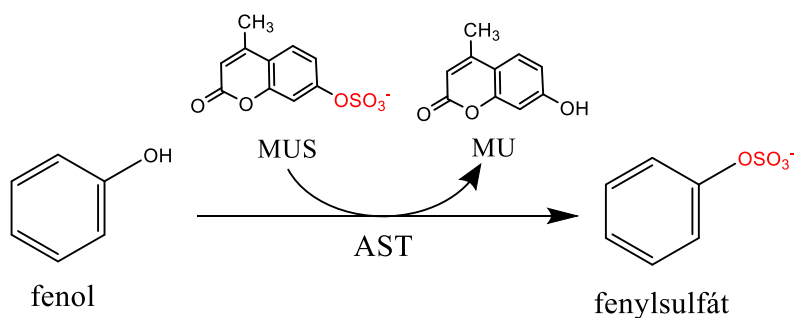
Při absorpci ultrafialového nebo viditelného světla molekulou dochází k excitaci elektronů molekuly ze základního stavu na jednu z vibračních hladin a elektrony přecházejí do stavu excitovaného. Dojde tedy k přechodu do vyšší energetické hladiny v prvním excitovaném singletovém stavu. Ve vysoké vibrační hladině elektrony rychle ztrácejí energii a přecházejí na nejnižší vibrační hladinu (vibrační relaxace). Odtud elektrony přecházejí zpět na základní elektronovou hladinu. Tento přechod je doprovázen vyzářením energie ve formě fotonu, což je fluorescence. Během přechodu mezi vibračními hladinami dochází k nezářivým přechodům, přičemž emitované záření má menší energii a větší vlnovou délku oproti absorbovanému, respektive excitačnímu záření. Tento jev se nazývá Stokesův posun [26,27]. Princip fluorescence je znázorněn na obrázku 1.8.



Obrázek 1.8: A) Jablonského zjednodušený diagram přechodu elektronů mezi energetickými hladinami [26]; B) Stokesův posun vlnových délek, vztah mezi absorpcí (—) a fluorescencí (- - -) organických sloučenin (převzato a upraveno z [28])

Fluorescenční metody jsou oproti spektrofotometrickým výrazně citlivější. Díky této citlivosti jsou často využívány v oblasti biochemie a biomedicíny.

Pro sledování kinetických parametrů aryl-sulfotransferas je možné využít donor 4-methylumbelliferylsulfát (MUS). Během reakce vzniká 4-methylumbelliferon (MU), jehož koncentrace se detekuje pomocí fluorimetru. Jeho emisní spektrum je mezi 360 až 590 nm [29,30]. Příklad této reakce je na obrázku 1.9.



Obrázek 1.9: Sulfatace katecholu katalyzovaná bakteriální AST. Koncentrace produktu reakce MU (4-methylumbelliferon) se stanovuje fluorimetricky.

1.5 Chromatografické metody

Chromatografie se řadí mezi nejvyužívanější metody pro separaci látek. Principem chromatografie je rozdělování složek směsi na základě různé afinity mezi stacionární a mobilní fází, které se mezi sebou liší fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Chromatografie se dělí na planární a kolonovou, a to podle druhu použité stacionární fáze [26].

1.5.1 Afinitní chromatografie

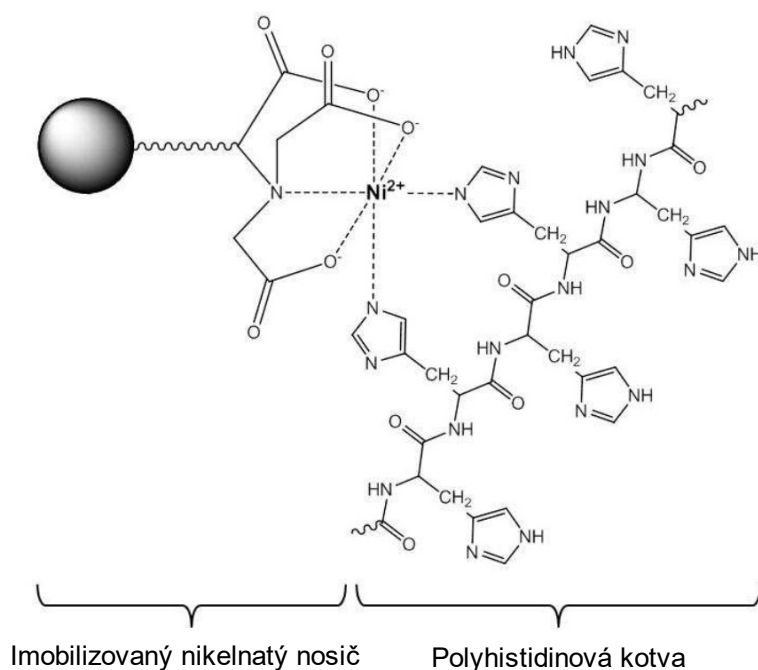
Afinitní chromatografie je typ kapalinové chromatografie, kde je na stacionární fázi specificky navázán ligand pro selektivní rozpoznání cílového proteinu ze směsi. Schopnost selektivní vazby proteinu na ligand stacionární fáze je založena na specifických reverzibilních interakcích. Tyto interakce jsou podobné vázání hormonu na receptor nebo protilátky na antigen. Stacionární fáze je obvykle agarosa nebo silikagel, na stacionární fázi je pak imobilizován jeden z dvojice interakčního páru ligand – protein. Po nástřiku vzorku na kolonu pak s tímto ligandem specificky reaguje druhá z páru sloučenin, a to za přítomnosti pufru, který upravuje podmínky vazby protein – ligand. Ve chvíli, kdy je na koloně navázán požadovaný protein a z kolony se vymyjí všechny nezachycené látky, je možné eluovat požadovaný protein elučním pufrem, který obsahuje ligand s vyšší afinitou ke stacionární fázi, a nahradí tak navázaný vzorek [19,31].

Úspěch afinitní chromatografie závisí na dostatečné selektivitě afinitní interakce oproti interakcím ostatních složek vzorku. Ligandy pro imobilizaci mohou být vysoce specifické nebo univerzální. Příkladem vysoce specifických ligandů mohou být protilátky pro vázání antigenů, substráty a inhibitory pro vázání enzymů. Příkladem univerzálních ligandů jsou lektinové nebo boronátové ligandy pro vazbu cukrů nebo proteiny A nebo G pro vazbu imunoglobulinů [31].

Existuje několik druhů afinitní chromatografie: bioafinitní, imunoafinitní, biomimetická a afinitní chromatografie s imobilizovaným iontem kovu (*IMAC – Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*) [19,31].

Metoda IMAC, nebo také MCAC (*Metal Chelate Affinity Chromatography*) je založena na specifické interakci imobilizovaného iontu kovu a aminokyselinového zbytku proteinu jako například histidinu, tryptofanu či cysteinu. Tato metoda se využívá především při detekci a purifikaci metaloproteinů, proteinů s histidinovou kotvou a fosforylovaných proteinů. Jako stacionární fáze je využívána agarosa nebo silikagel s navázaným iontem kovu [19,31].

Při eluci navázaného proteinu na kolonu je možné použít například imidazol, nebo jinou látku, která má vyšší afinitu ke stacionární fázi. Příklad afinitní chromatografie pro zachycení histidinové kotvy je na obrázku 1.10.



Obrázek 1.10: Princip afinitní chromatografie IMAC(převzato a upraveno z [32])

1.5.2 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (*TLC – Thin Layer Chromatography*) je typ planární chromatografie, kde mobilní fází je kapalina a stacionární fází je tenká destička, na které se nachází sorbent. Existuje několik druhů tenkovrstvé chromatografie a dělí se především podle mechanismu separace, a to na adsorpční, rozdělovací a iontově výměnnou. Nejčastěji používanými typy jsou pak adsorpční a rozdělovací TLC, kdy obě tyto metody jsou indukovány dipólovými a vodíkovými vazbami. Stejně jako u HPLC se zde můžeme setkat s TLC na normální a reverzní fázi [33]. V případě použití uspořádání na normální fázi se jedná o separaci látek na polární stacionární fázi s mobilní fází o nižší polaritě než stacionární; v případě uspořádání systému na reverzní fázi se jedná o nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi [34].

Nejpoužívanější TLC sorbent je silikagel (SiO_2) zachycený na hliníkové, plastové nebo skleněné destičce. Dalšími sorbenty může být například celulóza nebo polyamid [33].

Pomocí kapiláry jsou vzorky nanášeny na spodní konec destičky (start), poté je destička vložena do vyvíjecí komůrky s mobilní fází. Jednotlivé složky vzorku se rozdělují tím rychleji, čím slaběji jsou vázány na stacionární fázi [33].

1.5.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*HPLC – High Performance Liquid Chromatography*) se řadí mezi nejpoužívanější metody kvalitativní a kvantitativní analýzy, tedy pro určování neznámého analytu, dělení jednotlivých složek analytu a stanovení jejich množství. HPLC je velmi citlivou a přesnou metodou pro určování anorganických, organických látek a některých biologických materiálů [35].

Mezi nejčastějšími způsoby detekce v HPLC patří spektrofotometrická detekce (UV-VIS) a hmotnostní detekce. Spektrofotometrický detektor může mít fixní či nastavitelnou vlnovou délku, nebo lze použít detektor s diodovým polem (PDA). Tento detektor zaznamenává celé spektrum v reálném čase, což umožní detekci analytů při jakékoliv vlnové délce. Druhým nejčastějším detektorem je detektor hmotnostní, ten detekuje ionty vzniklé ionizací vzorku; musí zde tedy proběhnout přeměna analytu z kapalné fáze na ionty v plynné fázi [35].

Při analýze polyfenolových látek a jejich sulfátů je potřeba od sebe oddělit polární a vysoce polární látky. Je potřeba zvolit vhodnou stacionární a mobilní fázi a vhodný způsob separace.

Separace flavonoidů se většinou provádí na reverzní fázi. Nejčastěji jsou používány stacionární fáze C8, C18 nebo PFP (pentafluorfenyl). Jako mobilní fáze je pak obvykle používána směs formiátového pufru nebo acetátového pufru s přídavkem kyseliny mravenčí, methanolu nebo acetonitrilu jako organického modifikátoru. Naopak nejsou používány fosfátové pufrы z důvodu nekompatibility s hmotnostní detekcí. Při separaci se využívá obvykle gradientová eluce. Analýza probíhá při laboratorní teplotě, nebo se pro snížení času analýzy a tlaku na koloně může použít teplot kolem 40-60 °C (dle doporučení výrobce chromatografických kolon) [36].

Při použití stacionární fáze C18 a mobilní fáze vody a methanolu případně acetonitrilu s gradientovou elucí se často setkáváme s rozmýváním píků, s koelucí látek a s dlouhými časy separace [37,38].

Další možnou stacionární fází je HILIC kolona ve spojení s octanem amonným a acetonitrem jako mobilními fázemi, zde ale dochází při separaci k velké deformaci píků [39].

Při separaci vysoce polárních látek je také možné využít iontopárové kapalinové chromatografie (*IPLC – Ion Pairing Liquid Chromatography*). U IPLC se použije běžná reverzní fáze a mobilní fáze obohacená o iontově párové činidlo, jako například aminy. Vazba iontopárového činidla a sulfatované látky vytvoří hydrofobní pár, to pak vede ke zvýšení retence analytu. Tato metoda byla popsána při použití polyaminové kolony a dihydrogenfosforečnanu sodného jako mobilní fáze pro separaci sulfatovaných polysacharidů [40]. Použití IPLC by však opět znamenalo problém při použití hmotnostní detekce místo spektrofotometrické.

Pro separaci sulfátů flavonoidů lze použít pentafluorfenylovou (PFP) kolonu a jako mobilní fázi vodu s kyselinou mravenčí a methanolem [41–43], nebo octan amonný s kyselinou mravenčí a methanolem s gradientovou elucí [44].

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je heterologní exprese alespoň dvou nových aryl-sulfotransferas navržených z proteinové databáze v *E. coli*, jejich následná purifikace a charakterizace. Dalším krokem je stanovení jejich substrátové specifity a kinetických parametrů ve srovnání s již charakterizovanou AST z *Desulfitobacterium hafniense*.

Nové enzymy budou použity k enzymové sulfataci vybraných sloučenin, a to především přírodních polyfenolových látek a polyhydroxylovaných metabolitů flavanonů.

Produkty biotransformací budou následně analyzovány optimalizovanými metodami HPLC s UV případně MS detekcí.

- Exprese, purifikace a charakterizace minimálně dvou nových bakteriálních aryl-sulfotransferas
- Stanovení substrátové specifity a kinetických parametrů produkovaných enzymů s vybranými donory (*p*-NPS a MUS) a akceptory (fenol a katechol)
- Sulfatace a analýza vybraných přírodních polyfenolových látek: kvercetin, myricetin, chrysin, silydianin, apigenin, luteolin
- Analýza sulfatačních reakčních směsí pomocí optimalizovaných metod HPLC s UV a MS detekcí

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

- 4-Methylumbelliferylsulfát (Sigma-Aldrich, USA)
- Aceton (Sigma-Aldrich, USA)
- Agar (Oxoid, UK)
- Agarosa (Invitrogen, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)
- Apigenin 97 % (Biosynth Carbosynth, UK)
- Apigenin-4'-*O*-sulfát, čistota 96 %
- Bradfordovo činidlo – *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA)
- Bromfenolová modř (Serva, DE)
- Butanol (Sigma-Aldrich, USA)
- *Coomassie Brilliant* Blue R-250 (Serva, DE)
- Dihydrogenfosforečnan sodný (Lach-Ner, CZ)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Finnzymes, FIN)
- Ethanol (Lach-Ner, CZ)
- Ethylacetát (Lach-Ner, CZ)
- Fenol (Sigma-Aldrich, ČR)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycin (Serva, DE)
- Hydrogenfosforečnan sodný (VWR Chemicals BDH[®], Avantor, USA)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, CZ)
- Chlorid sodný (Lachema, CZ)
- Chrysin (Thermo Fischer Scientific, CZ)
- Imidazol (Sigma-Aldrich, USA)
- Isopropanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid (Biosynth, UK)
- Kaemferol (ABCR, DE)
- Kanamycin (Serva Electroporesis, Německo)
- Katechol analytický standard (Acros Organics, USA)
- Kvasničný extrakt (Oxoid, UK)

- Kvercetin (ABCR, DE)
- Kyselina mravenčí (VWR Chemicals BDH[®] Avantor, USA)
- Kyselina octová (Lach-Ner, CZ)
- Kyselina sírová (Lach-Ner, CZ)
- Luteolin (ABCR, DE)
- Luteolin-3'-*O*-sulfát
- Methanol (Lach-Ner, CZ)
- Methanol, použití pro UPLC/UHPLC (VWR Chemicals BDH[®], Avantor, USA)
- Myricetin (ABCR, DE)
- *N,N'*-Methylen-*bis*-akrylamid (Serva, DE)
- Octan amonný (Lachner, ČR)
- Persulfát amonný (Bio-Rad, USA)
- *para*-Nitrofenol, (Acros Organics, USA)
- *para*-Nitrofenylsulfát, (Acros Organics, USA)
- Silydianin
- Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Sigma-Aldrich, USA)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, MERC, DE)
- Trypton (Oxoid, UK)
- Uhličitán sodný (Chemapol, CZ)

Pokud není uvedeno jinak, byly flavonoidy a jejich sulfáty vyrobeny a jejich struktury potvrzeny MS (Ing. Lucie Petrásková Ph.D.), nebo HRMS (doc. RNDr. Josef Cvačka Ph.D. – Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR) a NMR (RNDr. Helena Pelantová Ph.D.) v Laboratoři biotransformací v Mikrobiologickém ústavu Akademie věd ČR.

3.2 Buněčné kultury

- *Escherichia coli* TOP10
- *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS

3.3 Použité plasmidy

- pET-26b(+)*_Dh*: plasmid pET-26b(+) nesoucí gen pro aryl-sulfotransferasu z *Desulfitobacterium hafniense* (klonovací místa *Nco*I/*Sac*I) se sekvencí kódující

polyhistidinovou kotvu na C-terminálním konci (Generay, CHN)

- pET-26b(+)*_Eco*: plasmid pET-26b(+) nesoucí gen pro aryl-sulfotransferasu z *Escherichia coli* (klonovací místa *NcoI/SacI*) se sekvencí kódující polyhistidinovou kotvu na C-terminálním konci (Generay, CHN)
- pET-26b(+)*_Sbo*: plasmid pET-26b(+) nesoucí gen pro aryl-sulfotransferasu ze *Salmonely bongori* (klonovací místa *NcoI/SacI*) se sekvencí kódující polyhistidinovou kotvu na C-terminálním konci (Generay, CHN)
- pET-26b(+)*_Dsp*: plasmid pET-26b(+) nesoucí gen pro aryl-sulfotransferasu z *Desulfosporosinus* sp. HMP52 (klonovací místa *NcoI/SacI*) se sekvencí kódující polyhistidinovou kotvu na C-terminálním konci (Generay, CHN)

3.4 Komerční sady

- *Genopure Plasmid Midi Kit* (Roche, USA)

3.5 Přístroje a pomůcky

- HPLC: Shimadzu Prominence LC (Shimadzu, JP)
 - odplyňovač: DGU-20A_{3R}
 - čerpadlo mobilní fáze: LC-20AB
 - autosampler s termostatem: SIL-20A HT
 - kolonový termostat: CTO-20A
 - detektor s diodovým polem: SPD-20MA
 - sběr a zpracování dat: Shimadzu Lab Solution
 - membránový filtr 45 µm (Whatman, GE Healthcare, USA)
 - filtrační zařízení pro membránovou filtraci Glassco (Gelman Sciences Corp., USA)
 - hmotnostní detektor LCMS - 2020 s jedním quadrupolem a elektrosprejem jako zdrojem iontů (Shimadzu, JP)
 - kolona: kolona Kinetex 5µm PFP 100Å, rozměry 150 × 4,60 mm, velikost částic 5 µm, velikost pórů 100 Å (Phenomenex, USA)
 - předkolonka: Kinetex 5 µm PFP, rozměry 4 × 3 mm (Phenomenex, USA)

- Spektrofotometr Sunrise (Tecan Spark[®], CH)
 - sběr a zpracování dat: Magellan[™] - *Data Analysis Software* (Tecan, CH)
- Spektrofotometr UVmini-1240 (Schimadzu, JP)
- Fluorimetr (Tecan Spark[®], CH)
- NGC[™] *Chromatography system* (Bio-Rad, USA)
- Souprava pro elektroforézu (Bio-Rad, USA)
- Kolona HisTrap, objem 5 ml, rozměry 16 × 25 mm, velikost částic 34 μm (GE Healthcare, CH)
- Termomixer (Eppendorf, USA)
- Sonikátor UP50H (Hielscher, DE)
- Třepačka IKA KS 4000 (Schoeller instruments s.r.o., CZ)
- Hliníkové destičky na tenkovrstvou chromatografii (TLC) potažené vrstvou silikagelu (MERCK, DE)
- Dialyzační membrána (Carl Roth, DE)
- Amicon Ultra – 15 ml (Ultracel 10K, Merck, DE)

3.6 Media, roztoky a gely

- **Luria Bertani (LB) médium:** 1 % tryptonu; 0,5 % kvasničného extraktu; 0,5 % chloridu sodného
- **Ekvilibrační pufr pro purifikaci *DhAST* a *DspAST* (EKDD):** 20 mmol/l NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, 500 mmol/l NaCl; pH 7,4
- **Ekvilibrační pufr pro purifikaci *EcoAST* a *SboAST* (EKES):** 20 mmol/l NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, 500 mmol/l NaCl, 100 mmol/l imidazol; pH 7,4
- **Eluční pufr pro purifikaci *DhAST* a *DspAST* (EUDD):** 20 mmol/l NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, 500 mmol/l NaCl, 100 mmol/l imidazol; pH 7,4
- **Eluční pufr pro purifikaci *EcoAST* a *SboAST* (EUES):** 20 mmol/l NaH₂PO₄/ Na₂HPO₄, 500 mmol/l NaCl, 300 mmol/l imidazol; pH 7,4
- **SDS gel 12 % na SDS-PAGE:** 12% separační gel; 3,3 ml vody; 4 ml 30% akrylamidu; 2,5 ml 1,5 mol/l Tris-Cl pH 8,8; 0,1 ml 10% SDS; 0,1 ml 10% persulfátu amonného; 0,004 ml TEMED (tetramethylethyldiamin)

- **Zaostřovací gel 5 % na SDS-PAGE:** 5% zaostřovací gel; 2,7 ml vody; 0,67 ml 30% akrylamidu; 0,5 ml 1 mol/l Tris-Cl pH 6,8; 0,04 ml 10% SDS; 0,04 ml 10% persulfátu amonného; 0,004 ml TEMED
- **Elektrodový pufr pro SDS-PAGE:** pětkrát koncentrovaný zásobní roztok; 3 g/l = 25 mmol/l Tris; 18,8 g/l = 250 mmol/l glycinu; 1 g/l = 0,1 % SDS; pH 8,3
- **Tris-Glycinový pufr:** 100 mmol/l; pH 8,9; 3,03 g Tris; 1,877 g glycinu v 250 ml destilované vody
- **Britton-Robinsonův pufr:** pH v rozsahu 2,5 – 12; různé poměry kyselé a zásadité složky; 0,2 mol/l NaOH (zásaditá složka); 0,04 mol/l H₃PO₄; 0,04 mol/l CH₃COOH; 0,04 mol/l H₃BO₃ (kyselé složka)
- **Bradfordovo činidlo:** konstanta odečtena z kalibrační křivky připravených z roztoků IgG o známé koncentraci (0-0,51 mg/ml), kalibrováno laborantkou Janou Fritschkovou
- **Mobilní fáze A pro HPLC:** 10 mM octan amonný/ 0,1 % HCOOH; 0,3850 g octanu amonného na 500 ml deionizované vody; 0,5 ml HCOOH
- **Mobilní fáze B pro HPLC:** 100% methanol
- **Barvicí roztok:** 0,25 % = 0,25 g *Coomasie Brilliant Blue*; 45 % = 90 ml methanolu; 90 ml destilované vody; 10 % = 10 ml 99% kyseliny octové
- **Odbarvovací roztok:** 40 % ethanolu; 10 % kyseliny octové; 50 % destilované vody
- **Regenerační pufr A:** 100 mmol/l NiCl₂; pH 7,4
- **Regenerační pufr B:** 20 mmol/l NaHPO₄; 0,5 mol/l NaCl; 50 mmol/l EDTA (2,2',2'',2'''-(ethan-1,2-diyl dinitrilo)tetraoctová kyselina); pH 7,4
- **Marker molekulových hmotností LMW** (*Low Molecular Weight*; 14,4 – 97,4 kDa)

3.7 Metody

3.7.1 Transformace buněk

Pro množení DNA byl do 100 μ l suspenze buněk *E. coli* TOP10 rozmražených na ledu přidán 1 μ l komerčního plazmidu pET-26(+) s genem AST ze *Salmonely bongori* (*SboAST*), *Desulfosporosinus* sp. HMP52 (*DspAST*), *E. coli* (*EcoAST*), nebo *Desulfitobacterium hafniense* (*DhAST*). Suspenze se 20 min inkubovala na ledu a následně proběhla inkubace na 75 s při 42 °C, poté se suspenze vrátila na led a byl k ní přidán 1 ml sterilního LB média pro regeneraci buněk. Regenerace buněk byla prováděna při 37 °C a 350 ot./min po dobu minimálně jedné hodiny. Po regeneraci bylo na Petriho misky s LB agarem a s 0,1 % kanamycinem rozetřeno 50 a 150 μ l suspenze transformované kultury, misky se inkubovaly při 37 °C do druhého dne.

Obdobně pak probíhala transformace buněk v *E. coli* BL21(DE3) pLysS pro expresi proteinů.

Do 100 μ l suspenze předem rozmražených buněk *E. coli* BL21(DE3) pLysS, byl přidán 1 μ l komerčního plazmidu pET-26(+) s genem AST ze *Salmonely bongori* (*SboAST*) s obsahem 0,39 μ g DNA, respektive *Desulfosporosinus* sp. HMP52 (*DspAST*) s obsahem 0,94 μ g DNA, *E. coli* (*EcoAST*) s obsahem 0,38 μ g DNA, *Desulfitobacterium hafniense* (*DhAST*) s obsahem 1,7 μ g DNA.

3.7.2 Kultivace buněk

Do 500 ml Erlenmeyerových baněk obsahujících 100 ml sterilního LB média a 100 μ l kanamycinu (0,1 mol/l) se zaočkovala vždy jedna kolonie (případně 100 μ l kryokonzervované kultury) buněk transformovaných plazmidem 26b(+) nesoucím gen *DhAST*, *DspAST*, *SboAST*, nebo *EcoAST*. Kultivace buněk probíhala při 37 °C a 220 ot./min do druhého dne. Buňky transformované v *E. coli* TOP10 byly použity za účelem namnožení plasmidové DNA a její následné izolace (kapitola 3.7.3).

V případě buněk *E. coli* BL21(DE3) pLysS transformovaných za účelem produkce byly narostlé kultury následující den přeočkovány do 3 l Erlenmeyerových baněk obsahujících 500 ml LB média a 500 μ l kanamycinu (0,1 mol/l). Kultivace probíhala při 37 °C a 120 ot./min, až optická denzita (OD_{600}) buněčné kultury dosáhla hodnoty absorbance 0,6 až 0,8 při vlnové délce 600 nm; měření probíhalo proti 1 ml destilované vody. Po dosažení absorbance $OD_{600} = 0,6 - 0,8$ se ke kultuře přidalo 960 μ l 0,5 mol/l induktoru

isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosidu (IPTG, 0,8 mmol/l) a pokračovalo se v kultivaci při 25 °C a 120 ot./min do druhého dne.

Po kultivaci byly buňky centrifugovány při 4 °C, 4500 $\times$ g, 20 min. Supernatant byl odstraněn a biomasa byla zmrazena při -20 °C, případně byla resuspendována ve 4 ml Tris-glycinového pufru se 40 μ l 0,1 mol/l fenylmethylsulfonylfluoridu (PMSF) v rámci přípravy na purifikaci enzymu (kapitola 3.7.4)

3.7.3 Izolace plasmidové DNA

Pro preparativní izolaci DNA byla použita komerční sada *Genopure Plasmid Midi Kit – Low copy number plasmid* a postupovalo se podle protokolu výrobce. Čistota plasmidové DNA byla měřena pomocí spektrofotometru UVmini-1240 s deuteriovou lampou. Čistota DNA se měřila při 260 nm a 280 nm, přičemž při 260 nm absorbují nukleové kyseliny a při 280 nm nukleové kyseliny i proteiny.

Do černých skleněných kyvet bylo napipetováno 2 μ l vzorku a 498 μ l ultračisté vody, vzorky se měřily proti 500 μ l ultračisté vody, vše v tripletu.

Čistota DNA se pak zjistila z poměru absorbancí vlnových délek $A_{260}:A_{280}$. Koncentrace DNA se vypočítala podle následujícího vztahu:

$$c_{DNA} = A_{260} \cdot k \cdot \text{ředění}$$

kde c_{DNA} je výsledná koncentrace DNA ve vzorku v jednotkách μ g/ml, A_{260} je hodnota průměrné absorbance vzorku nukleových kyselin ve vzorku, k je rovno 50 μ g/ml a ředění 250.

3.7.4 Purifikace enzymů

Čerstvá, případně zmrazená biomasa byla resuspendována v 4 ml 100 mmol/l Tris-glycinového pufru a 40 μ l 0,1 mol/l PMSF. Následovaly 4 cykly sonikace (amplituda 1,0), každý cyklus probíhal po dobu 2 min. Poté byla suspenze centrifugována po dobu 20 min při 4 °C na 13 500 $\times$ g. Supernatant (lyzát) byl šestkrát naředěn příslušným ekvilibračním pufrům vhodným pro purifikaci (z důvodu lepší sorpce analytu na kolonu a snadnou filtraci) a přefiltrován přes 0,8 μ m filtr. Takto naředěný lyzát se uchovával na ledu.

Díky navázané histidinové kotvě na C-konci studovaných enzymů bylo možné použít afinitní chromatografii s navázanými nikelnatými ionty na koloně (HisTrap, 5 ml, GE Healthcare, UK). Chromatografie probíhala na kapalinovém chromatografu NGC™ *Chromatography system* (Bio-Rad, USA). Jako mobilní fáze byl použit ekvilibrační pufr (EKDD v případě *DhAST* a *DspAST* a EKES v případě *EcoAST* a *SboAST*) a eluční pufr (EUDD v případě *DhAST* a *DspAST* a EUES v případě *EcoAST* a *SboAST*).

Před a po nanesení vzorku byla kolona promyta 50 ml ekvilibračního pufru. Poté byl nastaven gradient elučního pufru (gradient: 0-100 %; průtok 2 ml/min). Byly sbírány frakce o objemu 1 ml. Díky imidazolu, který má větší afinitu k nikelnatým iontům, se při eluci uvolnil požadovaný přečištěný protein.

Čistota nasbíraných frakcí byla ověřena pomocí SDS-PAGE, frakce s čistotou nad 90 % byly spojeny a dialyzovány.

Aby se odstranily zbytky imidazolu ze spojených frakcí, byla provedena dialýza (oddělení nízkomolekulárních látek od vysokomolekulárních) proti 100 mmol/l Tris-glycinovému pufru. Dialyzační membrána (celulosová membrána o šířce 34 mm a velikosti pórů 14 kDa) byla nejprve několik minut povařena v destilované vodě. Po vychladnutí se membrána promyla destilovanou vodou a byla naplněna vzorkem purifikovaného proteinu po chromatografii. Poté byla membrána se vzorkem vložena do 7 l 100 mmol/l Tris-glycinového pufru, dialýza probíhala přes noc. Druhý den se v případě *DhAST* a *DspAST* membrána přemístila do dalších 7 l Tris-glycinového pufru, kde probíhala dialýza 5 h, vzorek byl vyjmut a sterilně přefiltrován. K *DhAST* a *DspAST* se následně přidalo 20 % glycerolu pro větší stabilitu enzymu a zachování enzymové aktivity.

V případě *EcoAST* a *SboAST* se vzorek po první dialýze vyjmul z membrány a šestkrát se naředil sterilním 100 mmol/l Tris-glycinovým puforem (pro převedení do pufru a snadnou filtraci). Následně byl vzorek centrifugován (4 °C; 4500 × g; 10-15 min) pomocí centrifugačních filtrů Amicon Ultra – 15 ml (Ultracel 10K, MERCK, DE).

U všech enzymů byla po purifikaci a dialýze změřena enzymová aktivita, koncentrace proteinu a vypočítána specifická aktivita (kapitola 3.8.1-2). U enzymů *DhAST* a *DspAST* byly tyto parametry přeměřeny před a po přidání 20 % glycerolu.

3.7.5 Elektroforéza SDS-PAGE

Čistota enzymů se ověřovala pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). Tato metoda umožňuje rozdělení proteinů podle molekulové hmotnosti na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli.

Byl připraven 12% dělicí a 5% zaostřovací gel (kapitola 3.6). Bylo odebráno 20 μ l vzorku proteinu a k němu bylo přidáno 5 μ l bromfenolové modři. Vzorek byl následně denaturován při 99 °C 5 min a poté centrifugován 2 min na $13500 \times g$.

Do aparatury na elektroforézu byl nalit pětikrát ředěný elektroodový pufr na SDS-PAGE. Na gel se nanalo 5 μ l LMW (*Low Molecular Weight*) markeru a 7,5 μ l jednotlivých frakcí nasbíraných během purifikace. Elektroforéza probíhala nejprve při napětí 130 V a ve chvíli, kdy se vzorky dostaly na dělicí gel, bylo na gel vloženo napětí 150 V. Po ukončení elektroforézy se gel vyjmul z aparatury do Petriho misky a bylo k němu přidáno barvivo *Comassie Brilliant Blue*. Gel byl barven po dobu 7 min a následně byl odbarvován v odbarvovacím roztoku (kapitola 3.6). Po odbarvení byl gel uchován v 1% kyselině octové.

3.8 Biochemická charakterizace enzymů

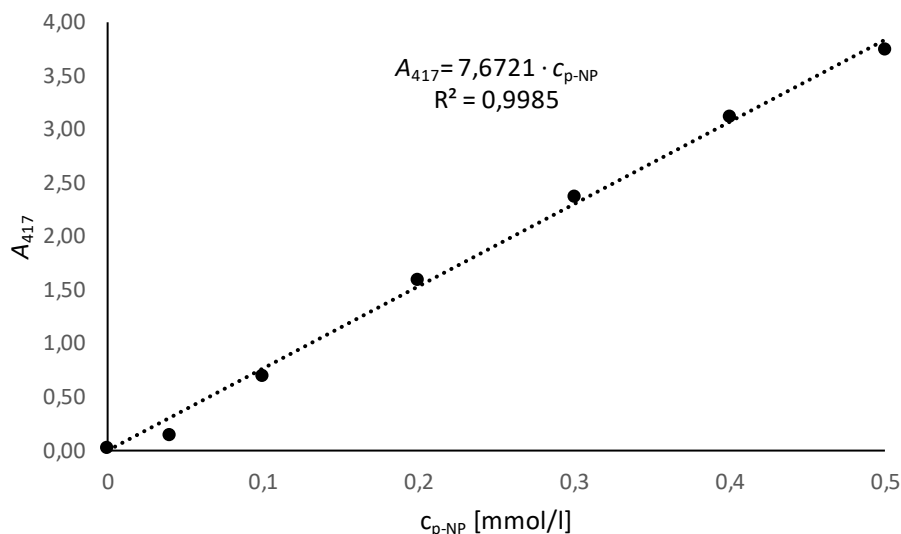
U každého enzymu byla určována specifická aktivita a bylo stanoveno pH optimum, teplotní optimum, stabilita při různém pH a teplotě, stabilita v rozpouštědle – aceton, DMSO a kinetické parametry. Enzymová kinetika byla stanovována v kombinaci *p*-NPS (jako donor sulfátu) a katechol nebo fenol (jako akceptor sulfátu) a s MUS (jako donor sulfátu) a katecholem (jako akceptor sulfátu).

3.8.1 Standardní stanovení enzymové aktivity

Stanovení enzymové aktivity u zvolených AST probíhalo pomocí *p*-NPS jako donoru sulfátu a fenolu nebo katecholu jako akceptoru sulfátu. Působením enzymu AST se přeměňuje *p*-NPS na *p*-NP, který se v zásaditém prostředí ve formě *p*-nitrofenolátu zabarvuje do charakteristické žluté barvy. Pomocí spektrometrického měření se při 417 nm detekuje vznikající *p*-NP a díky tomu můžeme určit enzymovou aktivitu.

Aktivita enzymu je zde měřena kontinuální metodou, kdy je enzymová reakce sledována po celou dobu měření, v tomto případě po dobu 5 min.

Před měřením byla stanovena směrnice závislosti absorbance vzorku na koncentraci *p*-NP pomocí kalibrační přímky. Absorbance při 417 nm byla měřena při různých koncentracích *p*-NP od 0 do 0,5 mmol/l. Měření probíhala vždy v tripletu – viz obrázek 3.1. Kalibrační konstanta *p*-NP je 7,6721 l/mmol.



Obrázek 3.1: Kalibrační závislost *p*-NP, kalibrační konstanta *p*-NP je 7,6721 l/mmol

Samotné stanovení enzymové aktivity probíhalo v 96 – jamkové mikrotitrační destičce, do které bylo napipetováno 150 μ l 100 mmol/l Tris-glycinového pufru pH 8,9, 50 μ l naředěného enzymu, 25 μ l 50 mmol/l fenolu nebo katecholu jako akceptoru a nakonec 25 μ l 50 mmol/l *p*-NPS jako donoru. Měření pak probíhalo kontinuálně při 417 nm po dobu 5 min při teplotě 30 °C na spektrofotometru.

Enzymová aktivita se vypočítala podle následujícího vztahu:

$$a = \frac{A_{417} \cdot f \cdot \text{ředění}}{K}$$

kde *a* je výsledná aktivita enzymu v jednotkách U/ml (U = takové množství enzymu které katalyzuje přeměnu 1 μ mol substrátu za minutu); A_{417} je průměrná hodnota absorbance vzorku za minutu, *f* je faktor ředění enzymu v reakční směsi rovno 5 a *ředění* udává, kolikrát byl enzym naředěn oproti zásobnímu roztoku enzymu, *K* je kalibrační konstanta závislosti *p*-NP na koncentraci.

3.8.2 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda

V kyselém prostředí se vytváří mezi barvivem *Coomassie Brilliant Blue* a proteiny komplex; na tomto principu je pak založeno stanovení koncentrace proteinu ve vzorku. Do zkušavky bylo napipetováno 100 μ l naředěného vzorku enzymu a 1 ml Bradfordova činidla. Absorbance byla měřena proti slepému vzorku, který obsahoval 100 μ l destilované vody a 1 ml Bradfordova činidla. Takto připravené vzorky se nechaly inkubovat při laboratorní teplotě po dobu 15 min. Absorbance se pak měřila v plastových kyvetách na spektrofotometru UVmini-1240 při 595 nm pomocí wolframové lampy. měření probíhalo v tripletu.

Koncentrace proteinu ve vzorku se spočítala podle následujícího vztahu:

$$c = A_{595} \cdot K \cdot \text{ředění}$$

kde c je výsledná koncentrace proteinu ve vzorku v [mg/ml], A_{595} je průměrná hodnota absorbance měřených vzorků, K [mg/ml] je kalibrační konstanta Bradfordova činidla vypočítaná z kalibrace na IgG a *ředění* vyjadřuje, kolikrát byl enzym naředěn oproti zásobnímu roztoku.

3.8.3 Stanovení specifické aktivity enzymu

Specifická aktivita enzymu se vypočítala pomocí hodnoty objemové enzymové aktivity a a koncentrace proteinu ve vzorku podle následujícího vztahu:

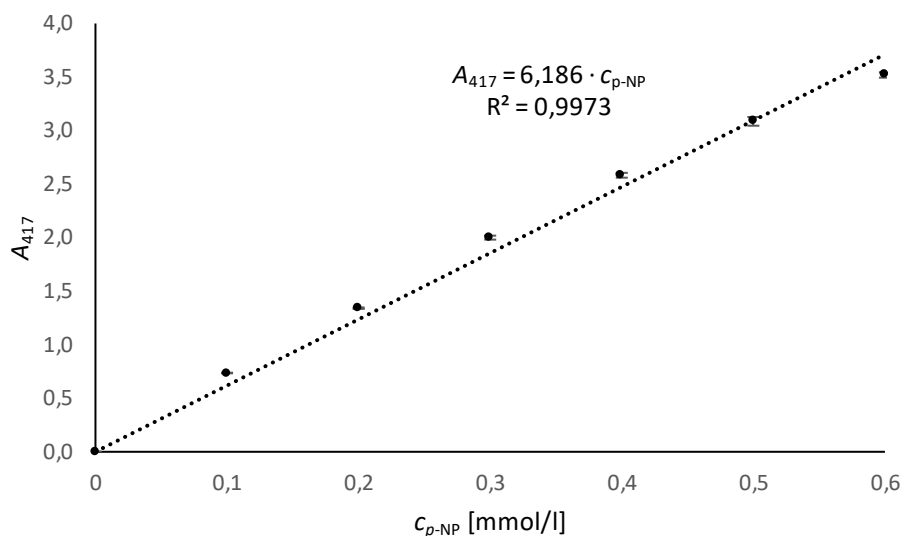
$$a_{spec} = \frac{a}{c}$$

kde a_{spec} je specifická aktivita enzymu [U/mg], a je objemová enzymová aktivita [U/ml] a c je koncentrace proteinu ve vzorku [mg/ml].

3.8.4 pH optimum

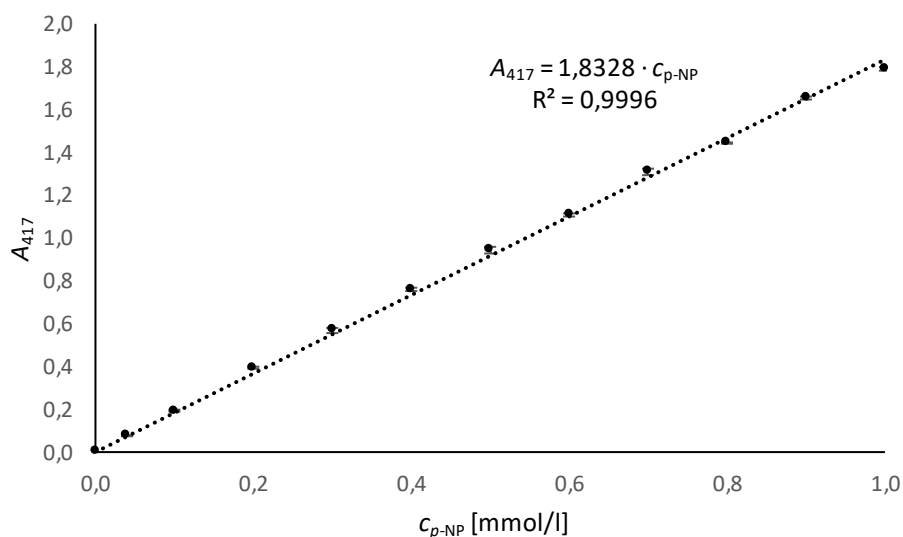
Ke stanovení pH optima byl použit Britton-Robinsonův pufr v širokém rozmezí pH 2,5 až 12. Stanovení pH optima bylo pak provedeno podobně jako klasické stanovení enzymové aktivity.

Nejprve byla stanovena kalibrační závislost p -NP v 0,1 mol/l Na_2CO_3 ; kalibrační konstanta byla 6,186 l/mmol (obrázek 3.2). Tato kalibrační konstanta platí pro *Dsp*AST a *Sbo*AST, kdy byly reakce zastavovány tepelnou inaktivací.



Obrázek 3.2: Kalibrační závislost *p*-NP o různých koncentracích v prostředí 0,1 mol/l Na₂CO₃, kalibrační konstanta je 6,186 l/mmol

U enzymu *EcoAST* byla reakce zastavována v bazickém prostředí 20 μl 1 mol/l NaOH; proto byla stanovena druhá kalibrační závislost (obrázek 3.3).



Obrázek 3.3: Kalibrační závislost *p*-NP o různých koncentracích v prostředí 0,1 mol/l Na₂CO₃ a 1 mol/l NaOH, kalibrační konstanta je 1,8328 l/mmol

Enzym se nejprve naředil pufrům o příslušném pH. Do reakční směsi se napipetovalo 150 μl Britton-Robinsonova pufru o příslušném pH, 25 μl 50 mmol/l fenolu nebo katecholu, 25 μl 50 mmol/l *p*-NPS a 50 μl naředěného enzymu. Reakce byla inkubována při 30 °C po dobu 5 min. Následně byla reakce zastavena tepelnou inaktivací enzymu při 99 °C po dobu 5 min, v případě *EcoAST* byla reakce zastavena přidávkem 20 μl

1 mol/l NaOH. Následně bylo napipetováno do mikrotitrační destičky 100 μ l 0,1 mmol/l Na_2CO_3 a 50 μ l reakční směsi a byla změřena absorbance při 417 nm. Měření probíhala v tripletu. Slepý vzorek obsahoval 50 μ l příslušného pufru místo enzymu.

3.8.5 Teplotní optimum

Stanovení teplotního optima probíhalo obdobně jako u pH optima. Bylo napipetováno 150 μ l 100 mmol/l Tris-glycinového pufru, 25 μ l 50 mmol/l fenolu/katecholu, 25 μ l 50 mmol/l *p*-NPS do mikrotitrační destičky, tato směs byla inkubována při příslušné teplotě (od 15 do 80 °C, přičemž teplota byla zvyšována vždy po 5 °C) po dobu 5 min. Následně bylo přidáno 50 μ l naředěného enzymu a byla kontinuálně měřena enzymová aktivita po dobu 5 min při 417 nm. Takto se stanovovalo pH optimum enzymu *DspAST*. U enzymů *SboAST* a *EcoAST* se teplotní optimum stanovovalo stejně jako pH optimum enzymu *EcoAST* (kapitola 3.8.4).

3.8.6 Stabilita v pH a teplotě

Stabilita enzymů byla stanovována v kombinaci různého pH a teplot. Byly voleny hodnoty pH pohybující se kolem pH optima a teploty 30 a 40 °C. Enzym se naředil Britton-Robinsonovým pufrem o příslušném pH a nechal se inkubovat při zvolené teplotě. Odběry vzorku enzymu se odebíraly po 5, 15, 30, 60 min, 5 hodin; 24 a 48 hodin. Po každém odběru byla spektrometricky měřena enzymová aktivita pomocí standardní kontinuální metody měření při 417 nm, viz kapitola 3.8.1.

3.8.7 Stabilita v rozpouštědlech

Většina flavonoidů je nerozpustných ve vodě, bylo tedy třeba stanovit stabilitu enzymů ve vhodných rozpouštědlech, kterými byl aceton a DMSO. Enzym byl naředěn 100 mmol/l Tris-glycinovým pufrem pH 8,9 a bylo k němu přidáno 20 % acetonu, nebo 5 či 10 % DMSO. Následně byl enzym inkubován při 30 °C po dobu 5 hodin. Během tohoto času se odebíraly vzorky a byla ověřována enzymová aktivita obdobně jako u stanovení stability v různých pH a teplotách.

3.8.8 Enzymová kinetika *p*-NPS – fenol a katechol

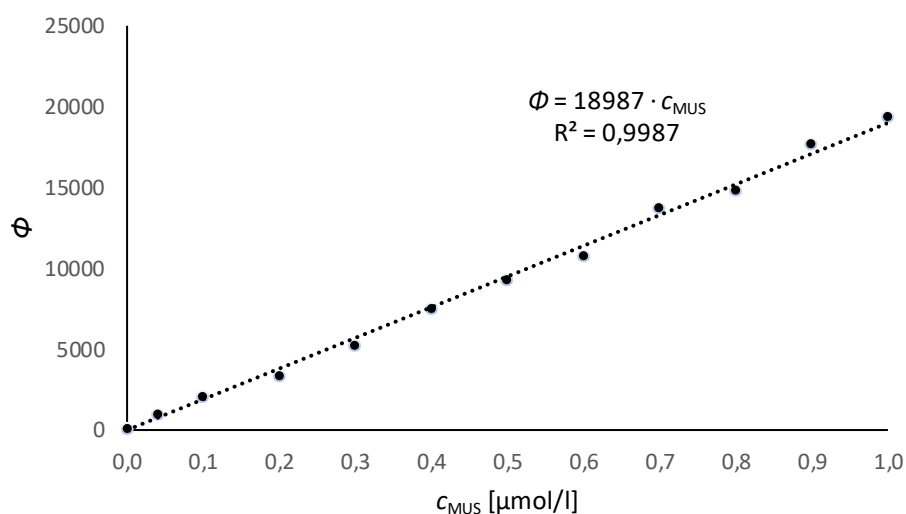
Při stanovení kinetických parametrů bylo využito kontinuálního měření na spektrometru při 417 nm. Enzymová kinetika byla nově stanovena pro enzymy *DspAST*, *SboAST* a *EcoAST*. Jako donor sulfátu byl zvolen *p*-NPS, jako akceptor byl zvolen fenol nebo katechol. Celkový objem reakční směsi byl 250 μ l a obsahovala 125 μ l 50 mmol/l fenolu

nebo katecholu, 50 μl naředěného enzymu a různé koncentrace *p*-NPS (0,02-5 mmol/l). Celá reakce pak byla doplněna 100 mmol/l Tris-glycinovým pufrem. Kontinuální měření probíhalo po dobu 5 min v tripletu. Takto byla změřena závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu, z této závislosti se nelineární regresí pomocí programu GraphPad Prism 7.0 stanovila maximální rychlost enzymové reakce V_{max} , Michaelisova konstanta K_M a číslo přeměny k_{cat} .

3.8.9 Enzymová kinetika MUS – katechol

Pro stanovení kinetických parametrů za použití MUS jako substrátu a katecholu jako akceptoru bylo využito fluorimetrického měření. Excitační vlnová délka byla 360 nm, emisní vlnová délka byla 448 nm.

Nejprve byla stanovena kalibrační závislost fluorescence na koncentraci MUS (0,1-1 $\mu\text{mol/l}$) (obrázek 3.4).



Obrázek 3.4: Kalibrační závislost MUS, kalibrační konstanta MUS je 18987 l/ μmol

Do černé mikrotitrační destičky bylo napipetováno 125 μl 50 $\mu\text{mol/l}$ katecholu, MUS o příslušné koncentraci (0,02-5 $\mu\text{mol/l}$), reakce byla doplněna do 250 μl 100 mmol/l Tris-glycinovým pufrem. Jako poslední se přidalo 50 μl naředěného enzymu. Reakce byla měřena kontinuálně, bylo měřeno 10 cyklů po 3 s (doba reakce byla 30 s), měření probíhalo při 30 °C.

3.9 Enzymová sulfatace vybraných sloučenin

3.9.1 Příprava reakčních směsí flavonoidů

Pro přípravu reakčních směsí flavonoidů byl zvolen následující postup. Bylo naváženo 10 mg zvolených flavonoidů jako akceptorů, k nim byl v molárním poměru 1:1,5 navážen donor *p*-NPS. Všechny enzymy byly přidávány v množství odpovídajícím aktivitě 0,5 U. K reakcím bylo přidáno 5 % DMSO pro zvýšení rozpustnosti flavonoidů. Reakce byly doplněny 100 mmol/l Tris-glycinovým pufrům na celkový objem reakce 4 ml. Reakční směsi byly inkubovány při 35 °C na 220 ot./min po dobu 48 hodin. Během toho času byla směs analyzována pomocí TLC v časech 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 24 hodin. Po 48 hodinách byla reakce zastavena denaturací v 100 °C po dobu 5 min. Následně byla provedena HPLC analýza po 15 min, 1, 5, 24 a 48 hodinách a sledoval se nárůst příslušných produktů v čase.

3.9.2 TLC analýza reakčních směsí flavonoidů

Jako stacionární fáze TLC analýzy byla zvolena silikagelová hliníková destička, jako mobilní fáze byl zvolen ethylacetát: methanol: kyselina mravenčí v poměru 4:1:0,1. Výsledky TLC analýzy byly nejprve vizualizovány práškovým jódem nebo pomocí 5% kyseliny sírové v ethanolu a zahřátím horkovzdušnou pistolí.

3.9.3 HPLC analýza reakčních směsí flavonoidů

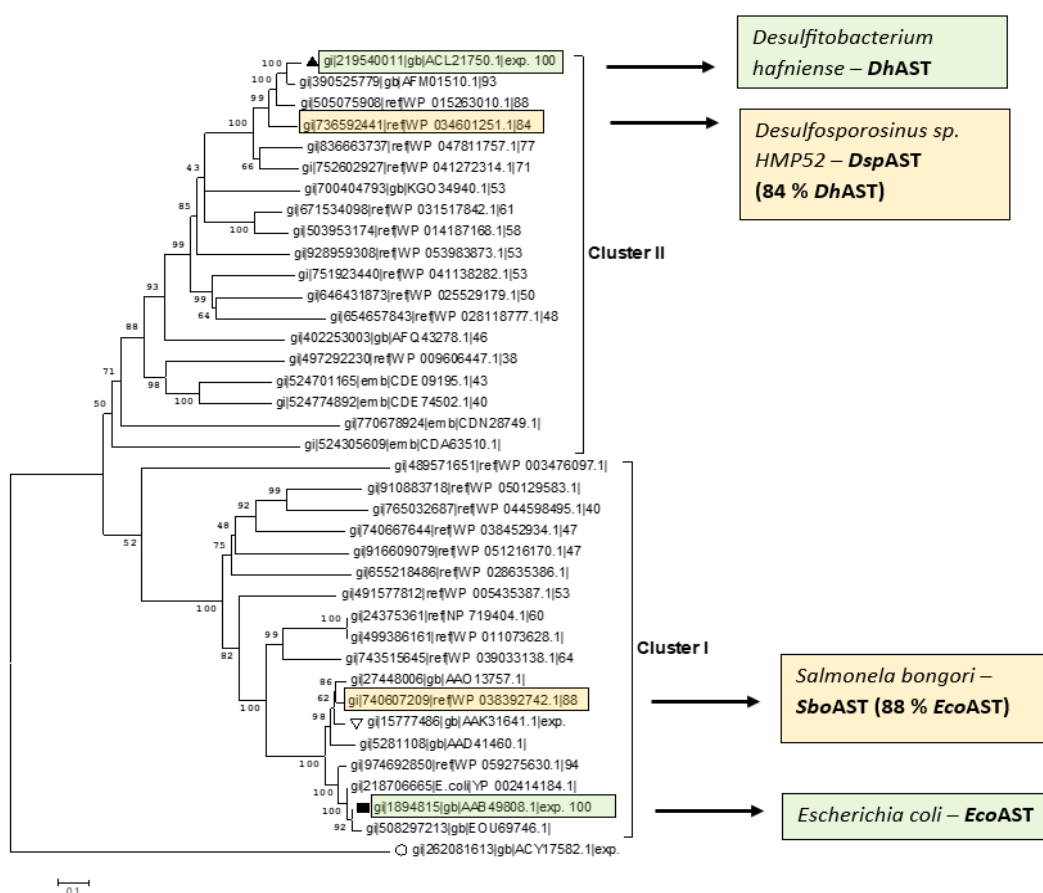
Jako stacionární fáze pro analýzu reakčních směsí pomocí HPLC flavonoidů byla zvolena PFP kolona a předkolona. Jako mobilní fáze byl zvolen 10 mM octan amonný s 0,1 % kyseliny mravenčí ve fázi A a 100 % methanolem ve fázi B. Byla zvolena gradientová eluce pro reakční směsi flavonoidů: 0-20 min 40→72 % B, 20-21 min 72→40 % B, ukončení v 24 min. Teplota byla nastavena na 45 °C, průtok 0,6 ml/min a objem nástřiku byl 1 µl.

4 Výsledky

4.1 Výběr bakteriálních aryl-sulfotransferas

Ve fylogenetickém stromě (obrázek 4.1) jsou potencionální AST rozděleny do dvou klastřů podle sekvence svých genů [45]. V obou klastrech jsou zahrnuty referenční sekvence: v klastru I je to sekvence AST z *E. coli* (*EcoAST*), v klastru II sekvence AST z *Desulfotobacterium hafniense* (*DhAST*).

Z fylogenetického stromu byly vybrány dvě nové AST (obrázek 4.1), jež jsou dále popisovány v této práci: AST z *Desulfosporosinus sp. HMP52* s 84% podobností s AST z *Desulfotobacterium hafniense* a AST ze *Salmonela bongori* s 88% podobností k AST z *E. coli*. Pro srovnání je součástí této práce i popis rekombinantního enzymu *EcoAST*, referenčního enzymu z klastu I. Charakterizace popisovaných enzymů jsou následně porovnávány s rekombinantním enzymem *DhAST* charakterizovaným v literatuře [45].



Obrázek 4.1: Fylogenetický strom s analyzovanými aminokyselinovými sekvencemi pro AST [45]. Zeleně jsou vyznačeny referenční sekvence již popsáných AST z *Desulfotobacterium hafniense* a *E. coli*. Žlutě jsou vyznačeny sekvence nově popisovaných AST. V závorce jsou vypsaná procenta podobnosti s referenčními sekvencemi.

4.2 Izolace plasmidové DNA

Plasmidy nesoucí gen kódující potencionální AST byly namnoženy v bakteriálních buňkách *E. coli* TOP10 a poté izolovány pro sekvenaci a následující produkci rekombinantních enzymů. Po izolaci plasmidové DNA byla zjišťována její čistota z poměru absorbancí při 260 nm (DNA) a 280 nm (DNA a proteiny). Koncentrace DNA jsou vypsány v následující tabulce (tabulka 4.1). Aminokyselinové sekvence jednotlivých enzymů jsou v příloze 1.

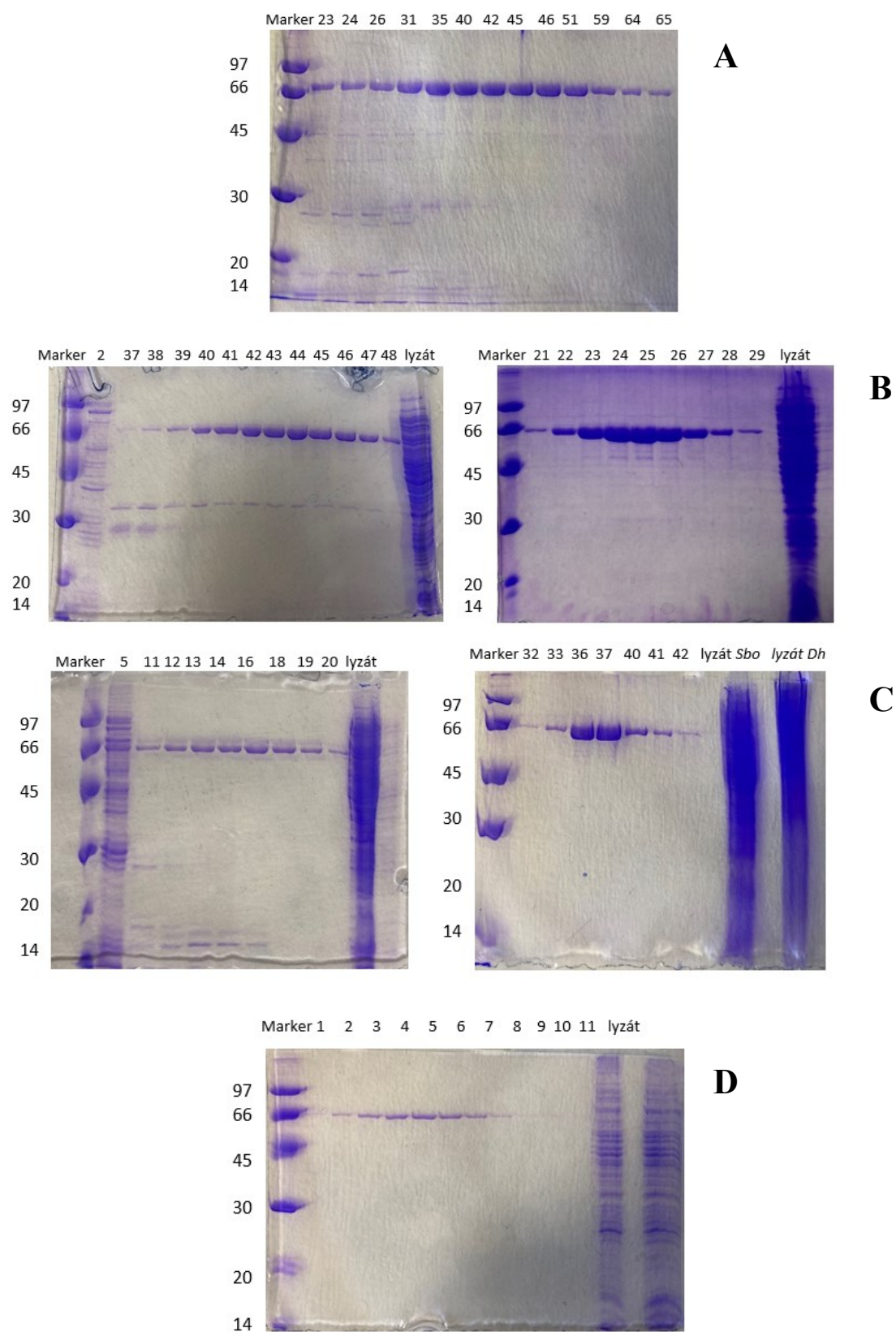
Tabulka 4.1: Koncentrace a čistota DNA

	A_{260}/A_{280}	c [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
<i>Dsp</i> AST	1,63	0,94
<i>Sbo</i> AST	2,21	0,39
<i>Eco</i> AST	1,71	0,38

4.3 Purifikace rekombinantních enzymů

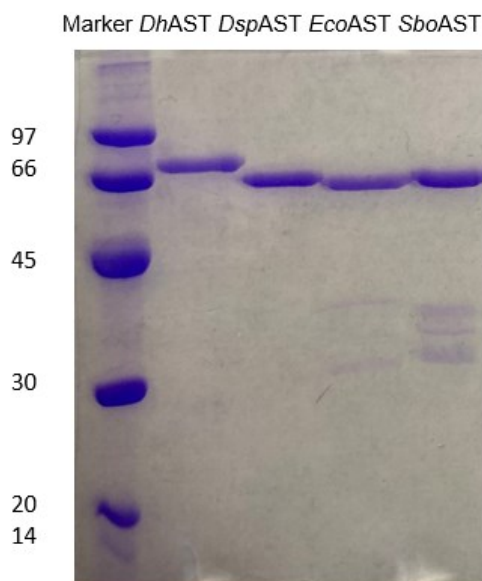
Všechny rekombinantní enzymy obsahovaly polyhistidinovou kotvu; proto byla k purifikaci použita chelatační chromatografie (IMAC) na koloně HisTrap (5 ml, GE Healthcare, UK). Po nanesení vzorku a promytí kolony bylo zkontrolováno, že se vzorek plně zachytil na koloně, a to změřením enzymové aktivity vzorku nezachyceného na koloně, který nevykazoval žádnou enzymovou aktivitu. Při eluci proteinu zachyceného na koloně byla použita lineární gradientová eluce při průtoku 2 ml/min. Při purifikaci *Dh*AST a *Dsp*AST nejprve v 50-60 % gradientu eluovaly ostatní nespecificky zachycené proteiny, enzym se následně eluoval od 80 % gradientu. Při purifikaci *Sbo*AST a *Eco*AST se nespecifické zachycení ostatních proteinů na kolonu omezilo díky použití 100 mmol/l imidazolu v ekvilibračním pufru; enzym pak následně eluoval od 50 % gradientu. Po purifikaci následovala dialýza spojených frakcí obsahujících purifikovaný enzym podle kapitoly 3.7.4.

Přečištění jednotlivých frakcí vzorků po purifikaci se sledovalo pomocí SDS-PAGE (obrázek 4.2). Na gelu byla odečtena přibližná velikost rekombinantních AST cca 70 kDa u *Dh*AST a *Dsp*AST a 66 kDa u *Sbo*AST a *Eco*AST, která odpovídá teoreticky vypočítané velikosti proteinů (Příloha 1) a byla porovnána s literaturou [14, 45].



Obrázek 4.2: Analýza frakcí z purifikace (čísla frakcí uvedena nad gelem) rekombinantních enzymů *DhAST* (A), *DspAST* (B), *SboAST* (C) a *EcoAST* (D) pomocí SDS-PAGE. Marker molekulových hmotností LMW (*Low Molecular Weight*) je nanesen v první dráze

Čistota jednotlivých enzymů po dialýze byla opět analyzována pomocí SDS-PAGE (obrázek 4.3). Z gelu byla odečtena přibližná molekulová hmotnost 70 kDa u *DhAST* a *DspAST* a 66 kDa u *SboAST* a *EcoAST*. Všechny enzymy byly izolovány o čistotě > 95 %.



Obrázek 4.3: Analýza spojených frakcí po dialýze rekombinantních enzymů *DhAST*, *DspAST*, *SboAST* a *EcoAST* pomocí SDS-PAGE. Marker molekulových hmotností LMW (*Low Molecular Weight*) je nanesen v první dráze

Po dialýze byla měřena koncentrace proteinů Bradfordovou metodou a enzymová aktivita přečištěných enzymů pomocí spektrofotometrické kontinuální metody stanovení aktivity při 417 nm. V následující tabulce (tabulka 4.2) jsou vypsány změřené hodnoty specifické enzymové aktivity jednotlivých rekombinantních enzymů AST s *p*-NPS jako donorem a fenolem nebo katecholem jako akceptory a výtěžek purifikace. Výtěžek purifikace byl 8,5 % u enzymu *DhAST*, 20,4 % u enzymu *DspAST*, 64,2 % u enzymu *SboAST* a 18,5 % u enzymu *EcoAST*. Stanovení parametrů probíhalo podle kap. 3.8.1 – 3.

Tabulka 4.2: Základní charakterizace rekombinantních AST, a_{spec} označuje specifickou enzymovou aktivitu AST

Vzorek	Aktivita [U]	$a_{\text{spec, fenol}}$ [U/mg]	$a_{\text{spec, katechol}}$ [U/mg]	Výtěžek [%]
Lyzát <i>DhAST</i>	467,1	0,8	-	100
<i>DhAST</i>	39,9	3,1	19,1	8,5
Lyzát <i>DspAST</i>	96,0	0,1	-	100
<i>DspAST</i>	19,6	3,0	11,5	20,4
Lyzát <i>SboAST</i>	77,3	0,2	-	100
<i>SboAST</i>	49,6	12,1	14,6	64,2
Lyzát <i>EcoAST</i>	92,5	0,3	-	100
<i>EcoAST</i>	17,1	24,5	31,5	18,5

4.4 Biochemická charakterizace aryl-sulfotransferas

V rámci práce byly charakterizovány purifikované rekombinantní enzymy *DspAST*, *SboAST* a *EcoAST*. Bylo stanoveno pH optimum, teplotní optimum, stabilita enzymů v různých kombinacích pH a teplotách a stabilita v rozpouštědlech, konkrétně v 5 a 10% DMSO a 20% acetonu. Tyto parametry byly porovnávány s již charakterizovaným enzymem *DhAST* [14,45].

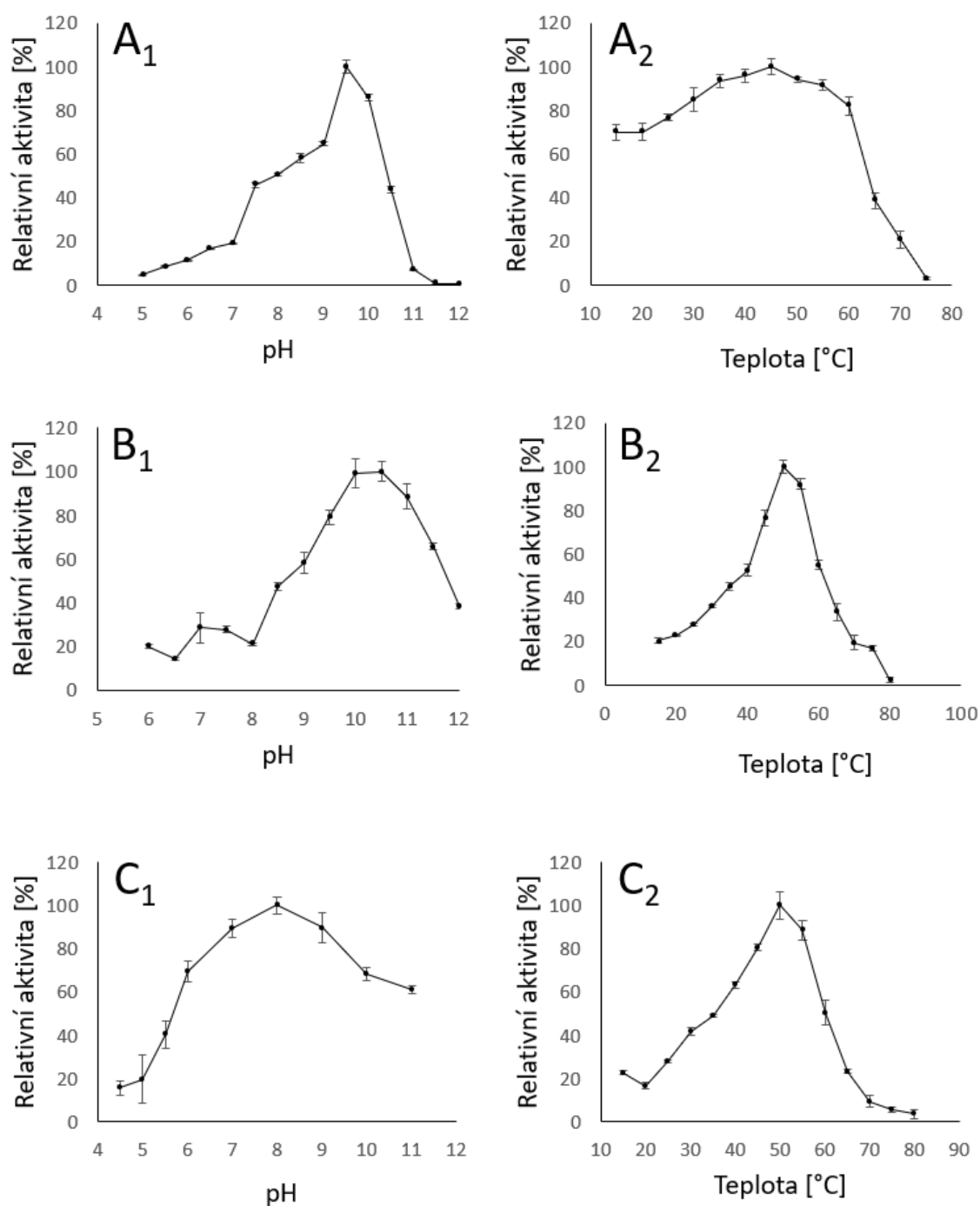
4.4.1 Stanovení pH optima

Stanovení pH optima probíhalo metodou stanovení enzymové aktivity popsané v kapitole 3.8.4. Pro rekombinantní enzymy AST bylo pH optimum určováno při 30 °C v rozmezí pH 4,5-12, kdy byly provedeny 3 paralelní stanovení proti slepému vzorku obsahujícímu pufr příslušného pH místo enzymu. Zjištěné pH optimum enzymu *DspAST* bylo úzké od pH 9 do 10, nejvyšší aktivita byla naměřena při pH 9,5; u enzymu *SboAST* bylo naměřené rozmezí pH optima od 9,5 do 11, přičemž nejvyšší aktivita byla změřena při pH 10 a 10,5; enzym *EcoAST* měl široké pH optimum 6-10, nejvyšší aktivita byla naměřena při pH 8 (obrázek 4.4).

4.4.2 Stanovení teplotního optima

Pro rekombinantní enzymy AST bylo teplotní optimum určováno pomocí kontinuální metody popsané v kapitole 3.8.4 a 3.8.5. Enzymy byly inkubovány v pH odpovídající jejich hodnotě pH optima (*DspAST* – pH 9,5; *SboAST* – pH 10; *EcoAST* – pH 8) a v rozmezí teplot 15-80 °C. Byla provedena tři paralelní stanovení proti slepému vzorku

obsahujícího pufr o příslušném pH. Zjištěné teplotní optimum enzymu *Dsp*AST bylo široké od 25 do 60 °C, nejvyšší aktivita byla naměřena při 45 °C; enzymy *Sbo*AST a *Eco*AST měly užší teplotní optimum od 45 do 55 °C, nejvyšší aktivita u obou enzymů byla naměřena při 50 °C (obrázek 4.4).



Obrázek 4.4: Závislost aktivity na pH a teplotě, stanovení pH a teplotního optima pro *Dsp*AST (graf A₁, A₂), *Sbo*AST (graf B₁, B₂) a *Eco*AST (graf C₁, C₂)

4.4.3 pH stabilita a termostabilita

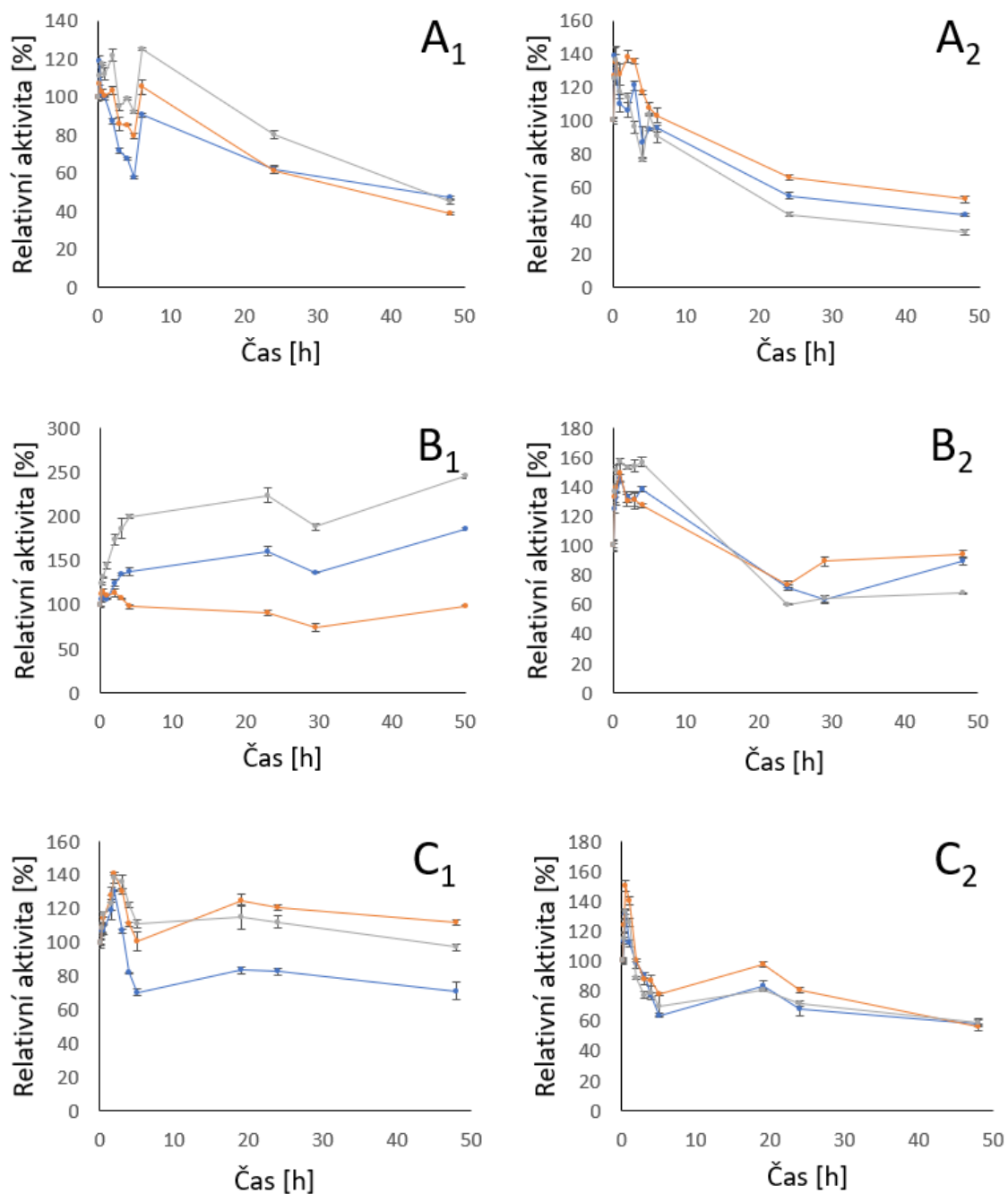
Dalším sledovaným parametrem byla stabilita při vybraných pH a teplotách. Enzymy se inkubovaly v daném pH a teplotě po dobu 48 hodin, během tohoto časového úseku byly odebírány vzorky a měřila se enzymová aktivita pomocí kontinuálního spektrofotometrického měření při 417 nm. Pro stanovení stability byly tedy zvoleny dvě teploty 30 a 40 °C a pH 7; 8 a 9. Tyto parametry byly též zvoleny vzhledem k reakčním podmínkám při sulfataci flavonoidů [18].

V průběhu 48 hodin se se odebíraly vzorky v časových úsecích: 5, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 24, 48 hodin a byla přeměřena enzymová aktivita jednotlivých odebraných vzorků. Tyto hodnoty byly následně vyneseny do grafu (obrázek 4.5).

Rekombinantní enzym *DspAST* byl inkubován při 30 °C, po 48 hodinách byly naměřeny hodnoty zbytkové enzymové aktivity oproti počáteční: pH 7 – 47 %, pH 8 – 39 %, pH 9 – 45 %. Při inkubaci při 40 °C byly po 48 hodinách naměřeny tyto hodnoty zbytkové aktivity oproti počáteční enzymové aktivitě: pH 7 – 43 %, pH 8 – 53 %, pH 9 – 33 %.

Rekombinantní enzym *SboAST* byl inkubován při 30 °C, po 48 hodinách byly naměřeny hodnoty zbytkové enzymové aktivity oproti počáteční: pH 7 – 186 %, pH 8 – 98 %, pH 9 – 245 %. Při inkubaci při 40 °C byly po 48 hodinách naměřeny tyto hodnoty zbytkové aktivity oproti počáteční enzymové aktivitě: pH 7 – 90 %, pH 8 – 94 %, pH 9 – 67 %.

Rekombinantní enzym *EcoAST* byl inkubován při 30 °C, po 48 hodinách byly naměřeny hodnoty zbytkové enzymové aktivity oproti počáteční: pH 7 – 71 %, pH 8 – 112 %, pH 9 – 97 %. Při inkubaci v 40 °C byly po 48 hodinách naměřeny tyto hodnoty zbytkové aktivity oproti počáteční enzymové aktivitě: pH 7 – 58 %, pH 8 – 56 %, pH 9 – 59 %.



Obrázek 4.5: Teplotní a pH stabilita rekombinantních AST při teplotách 30 a 40 °C a pH 7 (modře), 8 (oranžově), 9 (šedě) v průběhu 48 hodin; enzym *DspAST* (graf A₁ – 30 °C, graf A₂ – 40 °C), enzym *SboAST* (graf B₁ – 30 °C, graf B₂ – 40 °C), enzym *EcoAST* (graf C₁ – 30 °C, graf C₂ – 40 °C)

4.4.4 Vliv rozpouštědel na enzymovou aktivitu

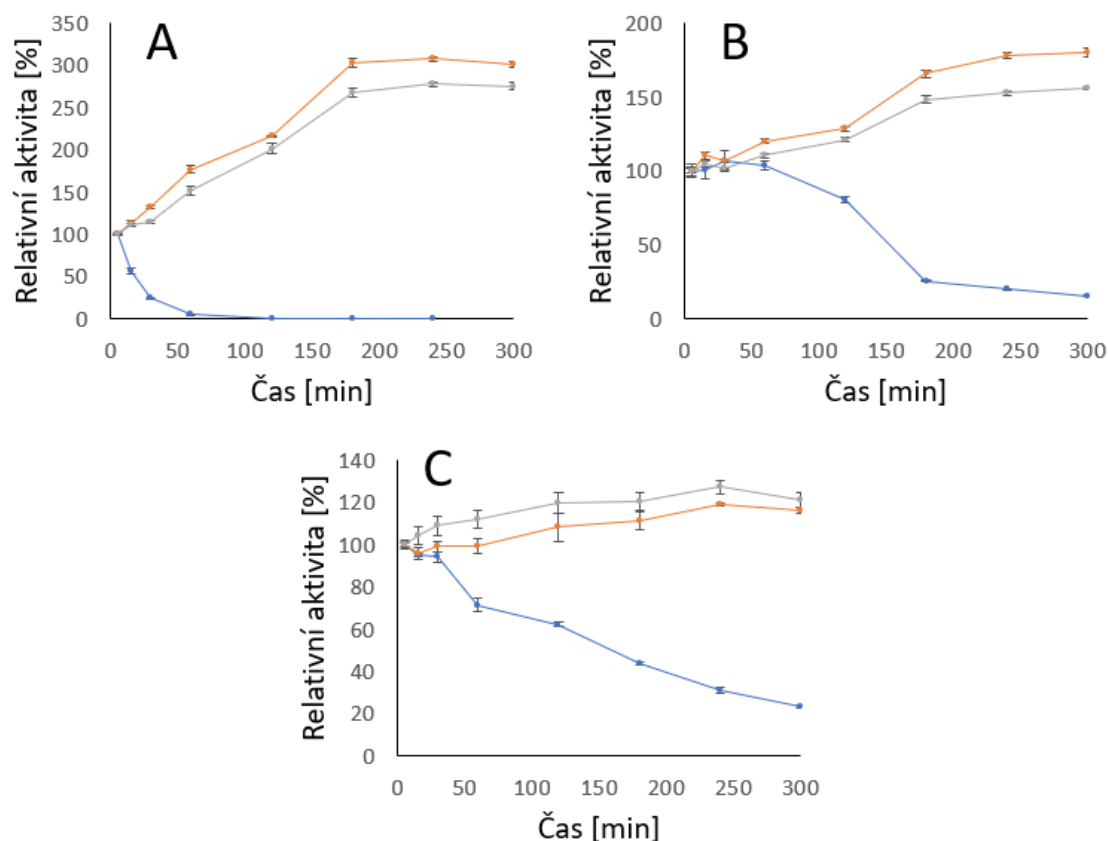
Polyfenolové látky, především pak flavonoidy, bývají špatně rozpustné ve vodě a polárních rozpouštědlech. Proto se do reakcí s polyfenolovými látkami přidává nepolární organické rozpouštědlo jako například aceton nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Přítomnost těchto rozpouštědel však může ovlivnit enzymovou aktivitu, z tohoto důvodu byl zkoumán vliv přídavku acetonu a DMSO na aktivitu rekombinantních enzymů. Zvolené koncentrace rozpouštědel byly 20 % acetonu, 5 a 10 % DMSO. Jejich vliv na enzymovou aktivitu byl pozorován v čase po dobu 4 až 5 hodin (obvyklá doba syntetických enzymových reakcí).

Rekombinantní enzymy AST byly inkubovány při 30 °C ve 100 mmol/l Tris-glycinovém pufru (pH 8,9) s přídavkem 20 % acetonu, respektive 10 % DMSO nebo 5 % DMSO. V průběhu 5 hodin byly odebrány vzorky v časových úsecích: 5, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 5 hodin a byla přeměřena enzymová aktivita jednotlivých odebraných vzorků. Tyto hodnoty byly následně vyneseny do grafu (obrázek 4.6).

Oproti počáteční enzymové aktivitě pak enzym *DspAST* vykazoval po 4 hodinách ve 20 % acetonu 0,2 % zbytkové enzymové aktivity, po 5 hodinách v 10 % DMSO 301 % a v 5 % DMSO 275 % oproti počáteční enzymové aktivitě. V 20% acetonu došlo po 4 hodinách k úplné inaktivaci enzymu, naproti tomu v DMSO došlo k výrazné aktivaci enzymu.

Enzym *SboAST* vykazoval po 5 hodinách v 20 % acetonu 16 %, v 10 % DMSO 180 % a v 5 % DMSO 156 % zbytkové enzymové aktivity oproti počáteční. Opět zde došlo z velké míry k inaktivaci enzymu při inkubaci v 20% acetonu, při inkubaci v DMSO došlo až k dvojnásobné aktivaci enzymu.

Enzym *EcoAST* vykazoval po 5 hodinách v 20 % acetonu 23 %, v 10 % DMSO 116 % a v 5 % DMSO 121 % zbytkové enzymové aktivity oproti počáteční. Došlo zde k inaktivaci enzymu z 80 % při inkubaci v 20% acetonu. Při inkubaci v DMSO byl enzym *EcoAST* poměrně stabilní a došlo pouze k mírné aktivaci.



Obrázek 4.6: Stabilita rekombinantních enzymů AST ve 20 % acetonu (modře), 10 % DMSO (oranžově) a 5 % DMSO (šedě) v průběhu 5 hodin; enzymy *Dsp*AST (graf A), *Sbo*AST (graf B) a *Eco*AST (graf C)

4.5 Enzymová kinetika

Kinetické parametry enzymů byly měřeny kontinuální metodou. Jako donory sulfátu byly zvoleny *p*-NPS nebo MUS, jako akceptory byly zvoleny fenol nebo katechol. Měření probíhalo spektrofotometricky pro kombinaci *p*-NPS a fenol, respektive katechol, v případě kombinace MUS a katechol se využilo fluorimetrického měření. Koncentrace donoru byly voleny od 0,02 do 5 mmol/l v případě spektrofotometrického měření (*p*-NPS), u fluorimetrického měření byly zvoleny koncentrace od 0,02 do 5 μ mol/l (MUS), vzhledem k citlivosti metody. Koncentrace akceptoru byla pak volena v desetinásobném nadbytku oproti donoru, aby se zabránilo jeho vyčerpání, a nedošlo tak k limitaci rychlosti reakce akceptorem během měření.

Spektrofotometrické kontinuální měření probíhalo po dobu 5 min, fluorimetrické kontinuální měření probíhalo po dobu zhruba 30 s, respektive bylo zvoleno 10 cyklů měření po 3 vteřinách. Všechny koncentrace byly měřeny ve třech paralelních

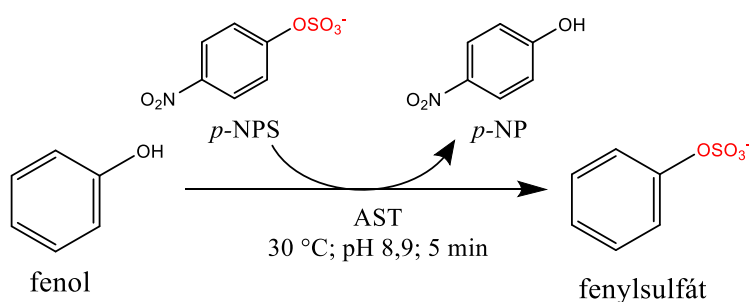
stanoveních proti slepému vzorku, který obsahoval příslušný pufr místo enzymu.

Během spektrometrického měření byl sledován nárůst koncentrace vznikajícího *p*-NP, u fluorimetrického měření byl sledován nárůst koncentrace vznikajícího MU.

Ze závislosti počáteční rychlosti reakce na výchozí koncentraci substrátu byla následně sestavena křivka dle Michaelise a Mentenové pomocí nelineární regrese v programu GraphPrism 7. Takto byla stanovena maximální rychlost enzymové reakce $V_{\max}$, Michaelisova konstanta K_M a následně vypočítáno číslo přeměny k_{cat} .

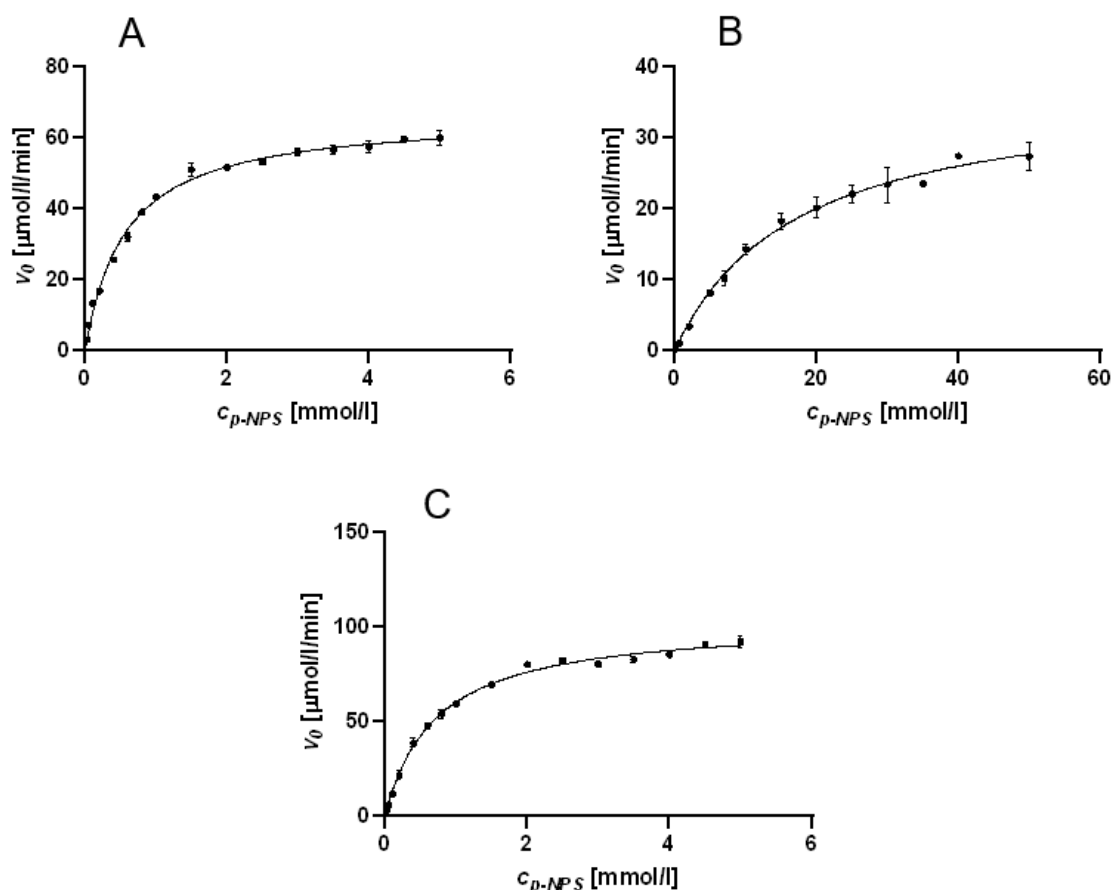
4.5.1 Kinetické parametry reakce *p*-NPS – fenol

Kinetické parametry enzymů AST s donorem sulfátu *p*-NPS a fenolem jako akceptorem byly určovány spektrometricky při 417 nm. Na obrázku 4.7 je znázorněna reakce *p*-NPS s fenolem katalyzovaná enzymem AST.



Obrázek 4.7: Sulfatace fenolu katalyzovaná bakteriální AST. Koncentrace produkt reakce *p*-NP se stanovuje spektrofotometicky při 417 nm, temperováno na 30 °C, stanovení probíhalo kontinuální metodou po dobu 5 min

Z naměřených dat byly sestaveny grafy závislosti počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu (obrázek 4.8). Následně byly vypočítány kinetické parametry pro rekombinantní enzymy AST.



Obrázek 4.8: Závislost počáteční reakční rychlosti s *p*-NPS jako donorem a fenolem jako akceptorem na koncentraci substrátu pro enzymy *DspAST* (graf A), *SboAST* (graf B) a *EcoAST* (graf C).

Pro porovnání účinnosti jednotlivých enzymů se substráty *p*-NPS a fenolem byly zvoleny parametry Michaelisova konstanta K_M , číslo přeměny k_{cat} a jejich poměr – katalytická účinnost enzymu. Čím nižší je K_M , tím vyšší je afinita enzymu k substrátu a čím vyšší je k_{cat} , tím lépe enzym katalyzuje danou reakci (tím více molekul substrátu konvertuje za jednotku času). Jednotlivé parametry a jejich porovnání jsou v následující tabulce (tabulka 4.3).

U reakce *p*-NPS s fenolem měl nejvyšší katalytickou účinnost *DspAST* a *EcoAST*, a to $k_{cat}/K_M = 56 \text{ l/mmol/s}$, nejvyšší afinitu k substrátu měl pak *DhAST* s $K_M = 0,34 \text{ mmol/l}$ a nejvyšší katalytickou konstantu měl enzym *EcoAST* s $k_{cat} = 39,9 \text{ s}^{-1}$. Nejnižší katalytickou účinnost měl enzym *SboAST*.

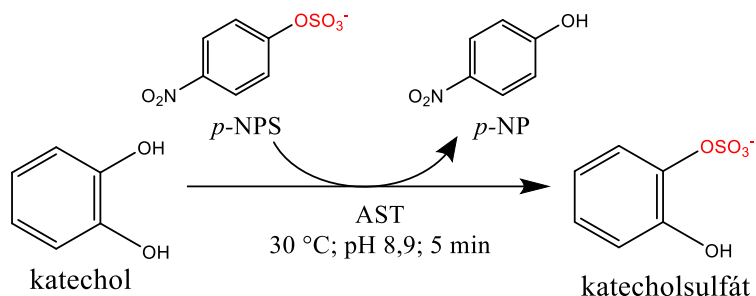
Tabulka 4.3: Porovnání parametrů K_M a k_{cat} a katalytické účinnosti enzymů v reakci *p*-NPS a fenol. Zeleně jsou vyznačeny hodnoty s nejvyšší afinitou k substrátu, respektive s nejlepší katalytickou účinností, oranžově pak hodnoty nejnižší.

Enzym	V_{max} [$\mu\text{mol/l/min}$]	K_M [mmol/l]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [l/mmol/s]
<i>DhAST</i> *	-	0,34 $\pm$ 0,03	14,5 $\pm$ 0,7	42
<i>DspAST</i>	66,4 $\pm$ 0,7	0,57 $\pm$ 0,02	31,9 $\pm$ 0,3	56
<i>SboAST</i>	37,1 $\pm$ 1,3	17 $\pm$ 1	37,1 $\pm$ 1,3	2,2
<i>EcoAST</i>	103 $\pm$ 1	0,71 $\pm$ 0,03	39,9 $\pm$ 0,4	56

*Tyto hodnoty byly porovnávány s již charakterizovaným rekombinantním enzymem *DhAST* [45].

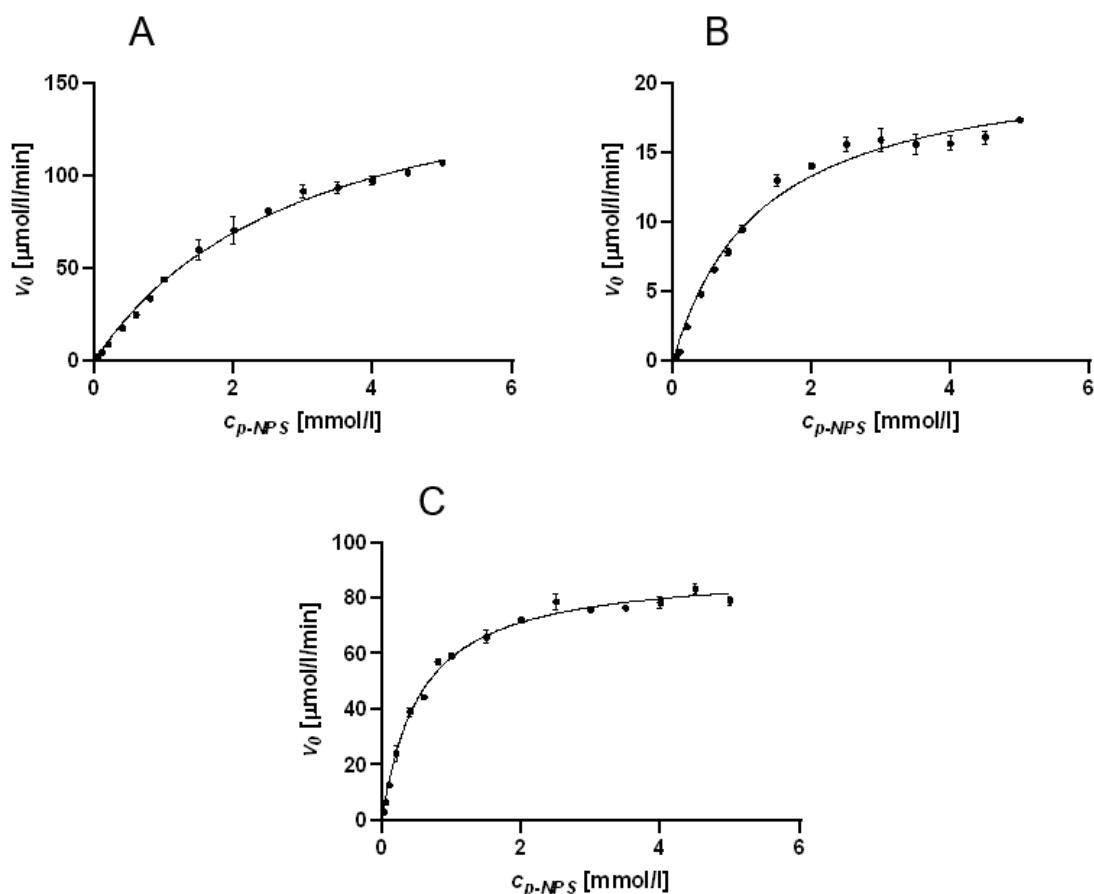
4.5.2 Kinetika *p*-NPS – katechol

Kinetické parametry enzymů AST s donorem sulfátu *p*-NPS a katecholem jako akceptorem byly určovány spektrofotometricky. Na obrázku 4.9 je znázorněna reakce *p*-NPS s katecholem katalyzovaná enzymem AST.



Obrázek 4.9: Sulfatace katecholu katalyzovaná bakteriální AST. Produkt reakce *p*-NP se stanovoval spektrofotometricky při 417 nm, temperováno na 30 °C, stanovení probíhalo kontinuální metodou po dobu 5 min

Z naměřených dat byly sestaveny grafy závislosti počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu (obrázek 4.10). Z naměřených dat byly následně vypočítány kinetické parametry pro rekombinantní enzymy AST.



Obrázek 4.10: Závislost počáteční reakční rychlosti s *p*-NPS jako donorem a katecholem jako akceptorem na koncentraci substrátu pro enzymy *DspAST* (graf A), *SboAST* (graf B) a *EcoAST* (graf C).

Jednotlivé kinetické parametry rekombinantních enzymů se substráty *p*-NPS a katecholem jsou porovnány v následující tabulce (tabulka 4.4).

U reakce *p*-NPS s katecholem měl nejvyšší katalytickou účinnost *EcoAST* s $k_{\text{cat}}/K_M = 65 \text{ l/mmol/s}$, stejně tak měl největší afinitu k substrátu $K_M = 0,54 \text{ mmol/l}$. Nejvyšší číslo přeměny měl pak enzym *DspAST* a *DhAST* s $k_{\text{cat}} = 83 \text{ s}^{-1}$. Nejnižší katalytickou účinnost měl opět enzym *SboAST*.

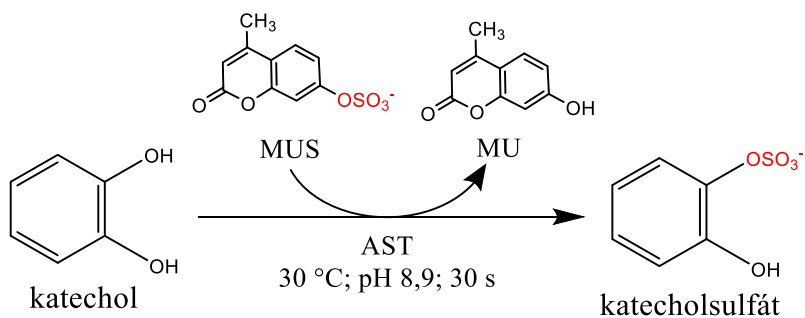
Tabulka 4.4: Porovnání parametrů K_M a k_{cat} a katalytické účinnosti enzymů v reakci *p*-NPS a katechol. Zeleně jsou vyznačeny hodnoty s nejvyšší afinitou k substrátu, respektive s nejlepší katalytickou účinností, oranžově pak hodnoty nejnižší.

Enzym	V_{max} [$\mu\text{mol/l/min}$]	K_M [mmol/l]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [l/mmol/s]
<i>DhAST</i> *	-	2,8 $\pm$ 0,3	83 $\pm$ 6	25
<i>DspAST</i>	174 $\pm$ 6	3,0 $\pm$ 0,2	83 $\pm$ 3	28
<i>SboAST</i>	21,8 $\pm$ 0,5	1,27 $\pm$ 0,09	21,8 $\pm$ 0,5	17
<i>EcoAST</i>	91 $\pm$ 1	0,54 $\pm$ 0,02	35,2 $\pm$ 0,4	65

*Tyto hodnoty byly porovnávány s již charakterizovaným rekombinantním enzymem *DhAST*. [45].

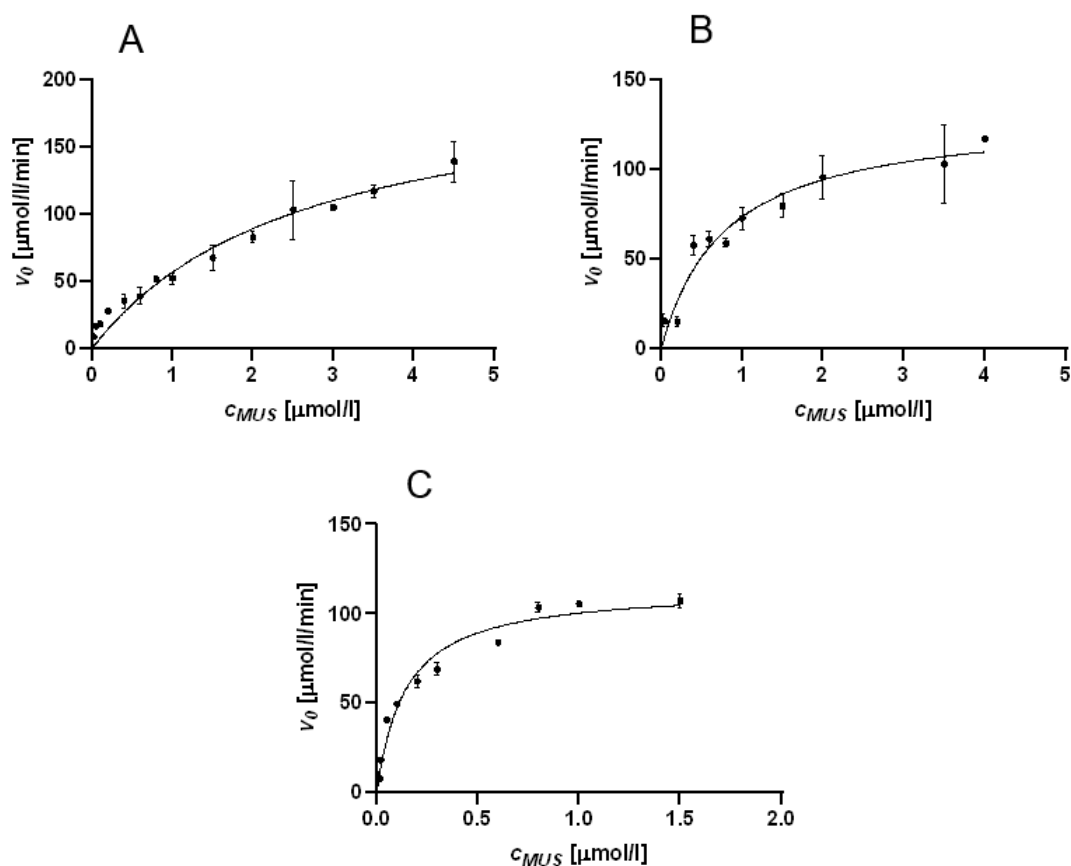
4.5.3 Kinetika MUS – katechol

Kinetické parametry enzymů AST s donorem sulfátu MUS a katecholem jako akceptorem byly určovány fluorimetricky. Na obrázku 4.11 je znázorněna reakce MUS s katecholem katalyzovaná enzymem AST.



Obrázek 4.11: Sulfatace katecholu katalyzovaná bakteriální AST. Produkt reakce MU se stanovoval fluorimetricky, temperováno na 30 °C, stanovení probíhalo kontinuální metodou po dobu 30 s

Z naměřených dat byly sestaveny grafy závislosti počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu (obrázek 4.12). Z naměřených dat byly následně vypočítány kinetické parametry pro rekombinantní enzymy AST.



Obrázek 4.12: Závislost počáteční reakční rychlosti s MUS jako donorem a katecholem jako akceptorem na koncentraci substrátu pro enzymy *DspAST* (graf A), *SboAST* (graf B) a *EcoAST* (graf C).

Jednotlivé kinetické parametry rekombinantních AST se substráty MUS a katecholem a jejich porovnání jsou v následující tabulce (tabulka 4.5).

U reakce MUS s katecholem má nejvyšší katalytickou účinnost *EcoAST* $k_{\text{cat}}/K_M = 6292 \text{ l/mmol/s}$, měl i nejvyšší afinitu k substrátu $K_M = 0,14 \text{ μmol/l}$, nejvyšší číslo přeměny měl enzym *DspAST* $k_{\text{cat}} = 4880 \text{ s}^{-1}$. Nejnižší katalytickou účinnost měl opět enzym *SboAST*. Kinetické parametry pro reakci MUS a katecholem nebyly dosud v literatuře popsány, popsána je pouze kombinace MUS a fenol [45].

Tabulka 4.5: Porovnání parametrů K_M a k_{cat} a katalytické účinnosti enzymů v reakci MUS a katechol. Zeleně jsou vyznačeny hodnoty s nejvyšší afinitou k substrátu, respektive s nejlepší katalytickou účinností, oranžově pak hodnoty nejnižší.

Enzym	V_{max} [μmol/l/min]	K_M [μmol/l]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [l/mmol/s]
<i>DspAST</i>	208 ± 19	2,7 ± 0,5	4880 ± 450	1831
<i>SboAST</i>	131 ± 8	0,79 ± 0,14	177 ± 11	225
<i>EcoAST</i>	115 ± 3	0,14 ± 0,02	888 ± 23	6292

4.6 Enzymová sulfatace vybraných sloučenin

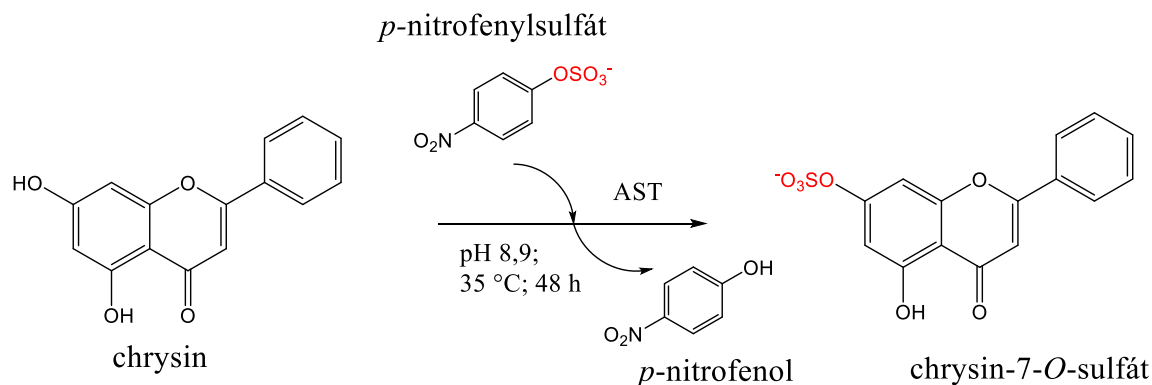
Bakteriální AST jsou vhodným nástrojem pro snadnou sulfataci polyfenolových látek. Sulfatační schopnosti vybraných enzymů byly testovány s následujícími sloučeninami: chrysin (CH), apigenin (API), luteolin (L), kaempferol (KAM), myricetin (M), kvercetin (Q) a silydianin (SD). Příprava reakčních směsí probíhala podle postupu popsaného v kapitole 3.9.1. Do každé reakční směsi byl přidáván enzym v takovém množství, aby jeho výsledná enzymová aktivita byla 0,5 U/ml reakční směsi.

Reakce byly provedeny se všemi rekombinantními enzymy, tedy s již popsaným *DhAST* [18,45] i s nově charakterizovanými *DspAST*, *SboAST*, *EcoAST*. V laboratoři byl současně produkován další rekombinantní enzym z *Campylobacter fetus* (*CfeAST*), reakce s tímto enzymem se vyskytují na TLC deskách, tento enzym však nebyl předmětem této práce.

Ze všech odebraných frakcí byla provedena analýza TLC, analýza HPLC byla provedena u frakcí odebraných v 15 min, 1, 5, 24 a 48 hodinách. U analýzy TLC byl sledován vznik *p*-NP a příslušného sulfátu, případně disulfátu. U analýzy HPLC byla sledována plocha píků a to především trend zvyšování koncentrace *p*-NP a příslušného sulfátu, případně disulfátu, nebo snižování plochy píku donoru sulfátu (*p*-NPS).

Výsledky analýzy TLC po 48 hodinách jsou na obrázcích 4.20 a 4.21. Výsledky HPLC analýzy vzniku příslušných sulfátů jsou znázorněny v grafech (obrázek 4.22). Příklady chromatogramů reakčních směsí po 48 hodinách jsou v příloze 2.

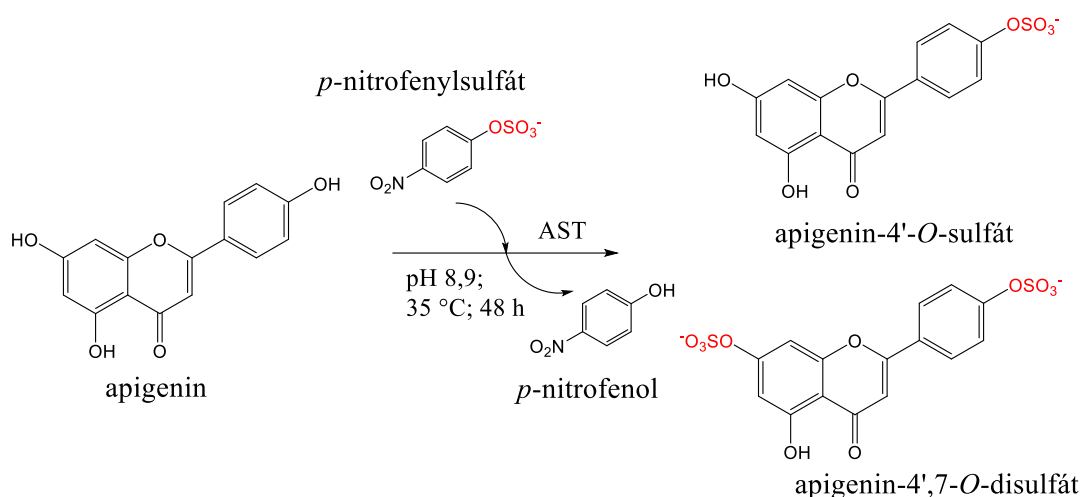
Na následujícím obrázku (obrázek 4.13) je znázorněna enzymová sulfatace chrysinu.



Obrázek 4.13: Enzymová sulfatace chrysinu katalyzovaná AST (*DhAST*, *DspAST*, *SboAST*, *EcoAST*, *CfeAST*), reakce probíhala po dobu 48 hodin při 35 °C v pH 8,9 a v 5 % DMSO, jako donor sulfátu byl zvolen *p*-NPS.

Podle TLC analýzy (obrázek 4.20) nebyl v reakční směsi s chrysinem pozorován vznik sulfátů chrysinu ani u jedné reakce katalyzované různými enzymy AST. Nebyl pozorován ani vznik *p*-NP. Byla provedena HPLC analýza po 48 hodinách, která taktéž nepotvrdila vznik produktů *p*-NP a sulfátu v těchto reakcích.

Na následujícím obrázku (obrázek 4.14) je znázorněna enzymová sulfatace apigeninu.

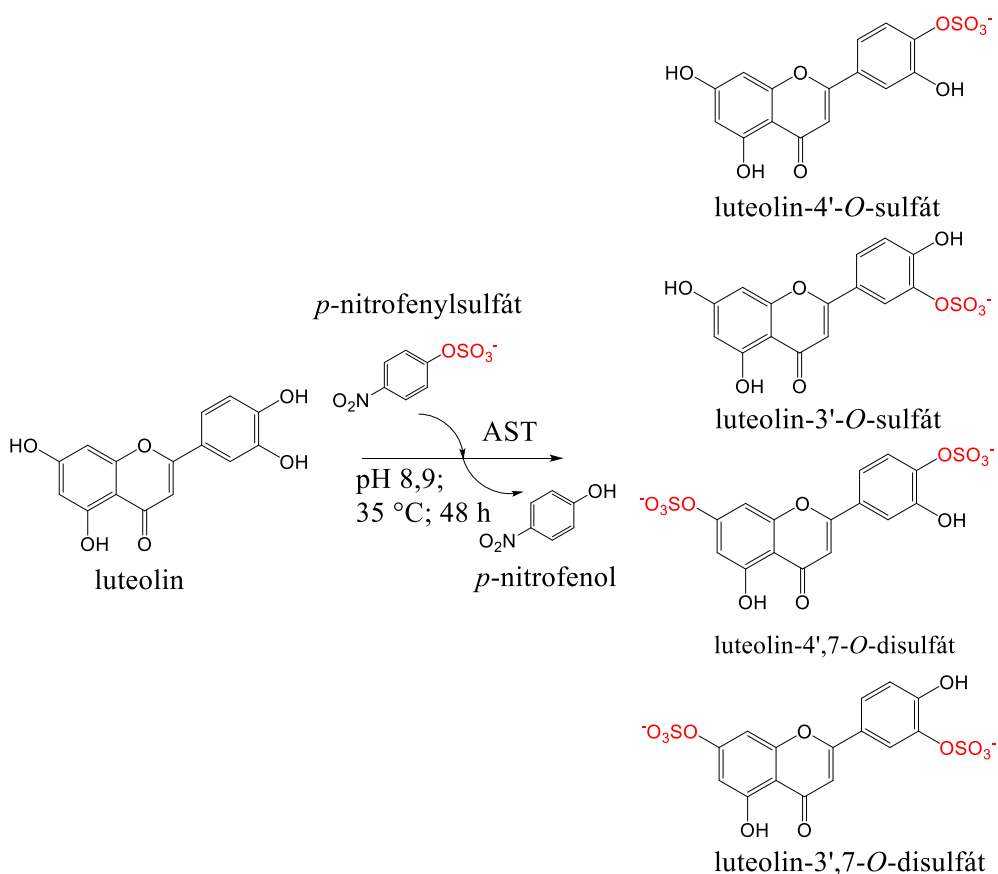


Obrázek 4.14: Enzymová sulfatace apigeninu katalyzovaná AST (*Dh*AST, *Dsp*AST, *Sbo*AST, *Eco*AST, *Cfe*AST), reakce probíhala po dobu 48 hodin při 35 °C v pH 8,9 a v 5 % DMSO, jako donor sulfátu byl zvolen *p*-NPS.

Podle TLC analýzy (obrázek 4.20) byl v reakční směsi s apigeninem pozorován vznik produktu apigeninsulfátu. Toto potvrdila i HPLC analýza provedená u odběrů v 15 min, 1, 5, 24, a 48 hodinách. Pomocí HPLC analýzy byl pak sledován jak vznik *p*-NP, tak vznik apigeninsulfátu, který byl následně potvrzen hmotnostní analýzou (v reakční směsi po 48 hodinách) (kapitola 4.6.1 - obrázek 4.23). Na grafu (obrázek 4.22) pak lze pozorovat nárůst vzniklého produktu sulfátu (APIS) s časem.

Reakci s apigeninem nejlépe katalyzoval enzym *Dsp*AST, největší nárůst produktu v reakční směsi katalyzované tímto enzymem se pozoroval mezi 5. a 24. hodinou. Nejhuře pak tuto reakci katalyzoval enzym *Eco*AST.

Na následujícím obrázku (obrázek 4.15) je znázorněna enzymová sulfatace luteolinu.

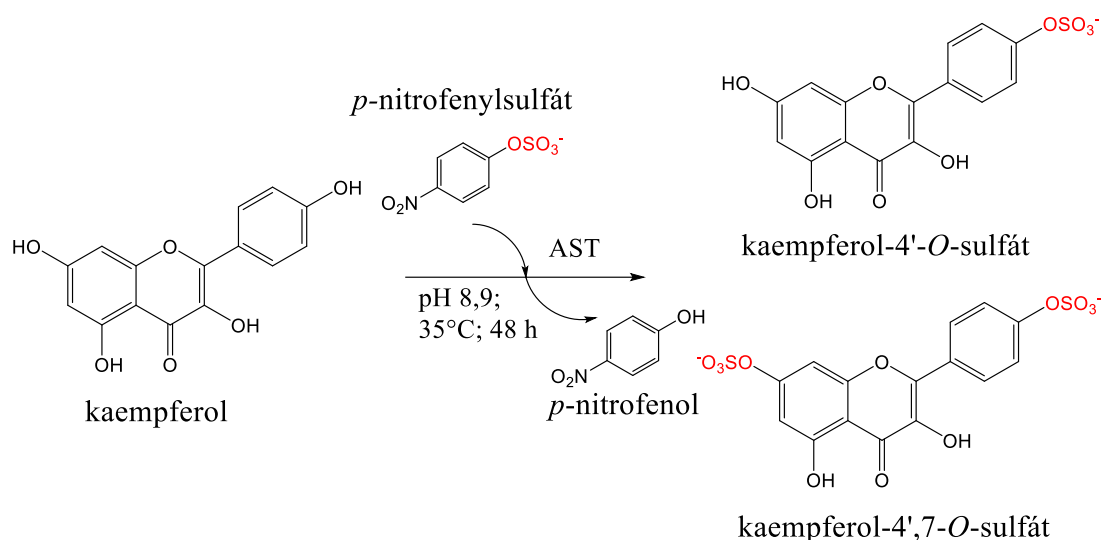


Obrázek 4.15: Enzymová sulfatace luteolinu pomocí AST (*Dh*AST, *Dsp*AST, *Sbo*AST, *Eco*AST, *Cfe*AST), reakce probíhala po dobu 48 hodin při 35 °C v pH 8,9 a v 5 % DMSO, jako donor sulfátu byl zvolen *p*-NPS.

TLC analýza (obrázek 4.20) ukázala vznik sulfátů luteolinu (LS) a *p*-NP. Toto potvrdila i HPLC analýza, která byla provedena u odběrů v 15 min, 1, 5, 24, a 48 hodinách. Následně byla provedena hmotnostní analýza, která potvrdila vznik luteolinsulfátu (kapitola 4.6.1 - obrázek 4.23). Nárůst vzniklého produktu sulfátu (LS) s časem je zobrazen v grafu (obrázek 4.22).

Reakci luteolinu s *p*-NPS opět katalyzoval nejlépe enzym *Dsp*AST, ale také *Eco*AST. U obou těchto enzymů byl pozorován největší nárůst produktu mezi 5. a 24. hodinou a na konci reakce se pozoruje zhruba stejné množství vzniklého luteolinsulfátu. U enzymu *Dh*AST pak mezi 24. a 48. hodinou nebyl zřejmý již žádný nárůst produktu – tento enzym reakci s luteolinem a *p*-NPS katalyzoval nejhůře.

Na následujícím obrázku (obrázek 4.16) je znázorněna enzymová sulfatace kaempferolu.

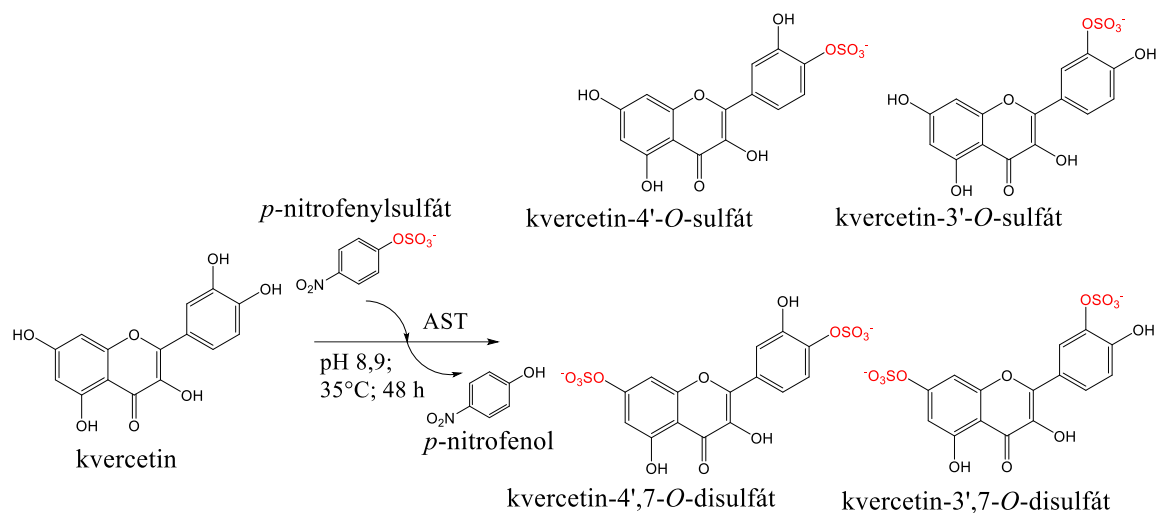


Obrázek 4.16: Enzymová sulfatace kaempferolu pomocí AST (*Dh*AST, *Dsp*AST, *Sbo*AST, *Eco*AST, *Cfe*AST), reakce probíhala po dobu 48 hodin při 35 °C v pH 8,9 a 5 % DMSO, jako donor sulfátu byl zvolen *p*-NPS.

Podle TLC analýzy (obrázek 4.20) byl v reakční směsi s kaempferolem pozorován vznik kaempferolsulfátu. Toto potvrdila i HPLC analýza provedená u odběrů v 15 min, 1, 5, 24 a 48 hodinách, kde byl pozorován nárůst produktu kaempferolsulfátu (KS) s časem (obrázek 4.22). Potvrzení vzniklého sulfátu bylo provedeno pomocí hmotnostní analýzy (kapitola 4.6.1 - obrázek 4.24).

Reakci kaempferolu s *p*-NPS katalyzoval nejlépe enzym *Sbo*AST, kdy největší nárůst produktu byl opět pozorován mezi 5. a 24. hodinou. U enzymu *Dh*AST byl pozorován mezi 24. a 48. hodinou překvapivě pokles produktu, mohlo to být způsobeno špatným promícháním a následným odebráním směsi, taktéž by zde mohl začít vznikat disulfát, tento produkt však nepotvrdila ani HPLC analýza ani hmotnostní analýza.

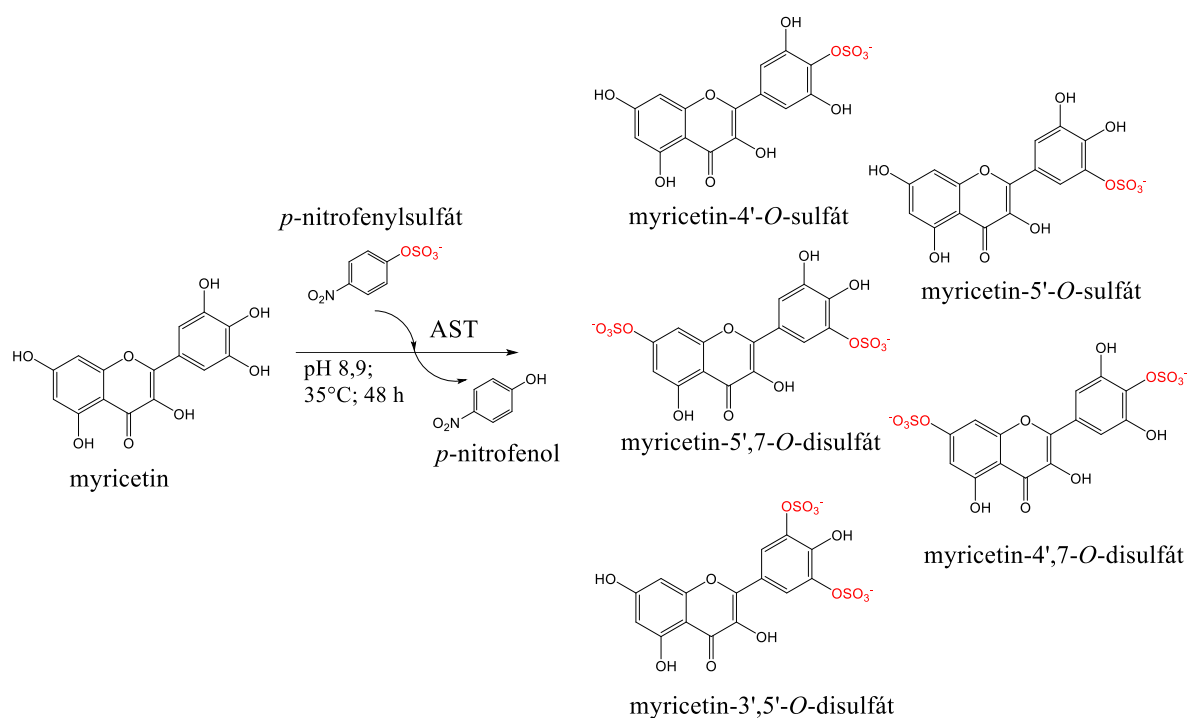
Na následujícím obrázku (obrázek 4.17) je znázorněna enzymová sulfatace kvercetinu.



Obrázek 4.17: Enzymová sulfatace kvercetinu pomocí AST (*Dh*AST, *Dsp*AST, *Sbo*AST, *Eco*AST, *Cfe*AST), reakce probíhala po dobu 48 hodin při 35 °C v pH 8,9 a v 5 % DMSO, jako donor sulfátu byl zvolen *p*-NPS.

Podle TLC analýzy (obrázek 4.21) byl v reakční směsi s kvercetinem pozorován vznik sulfátů kvercetinu. U těchto vzorků nemohlo být provedeno sledování nárůstu produktů v čase z důvodu degradace stacionární fáze v koloně. Novou kolonu se z časových důvodů nepodařilo získat. Potvrzení vzniklého sulfátu však bylo provedeno pomocí HPLC analýzy s hmotnostní detekcí u vzorku reakční směsi po 48 hodinách (kapitola 4.6.1 - obrázek 4.24).

Na následujícím obrázku (obrázek 4.18) je znázorněna enzymová sulfatace myricetinu.

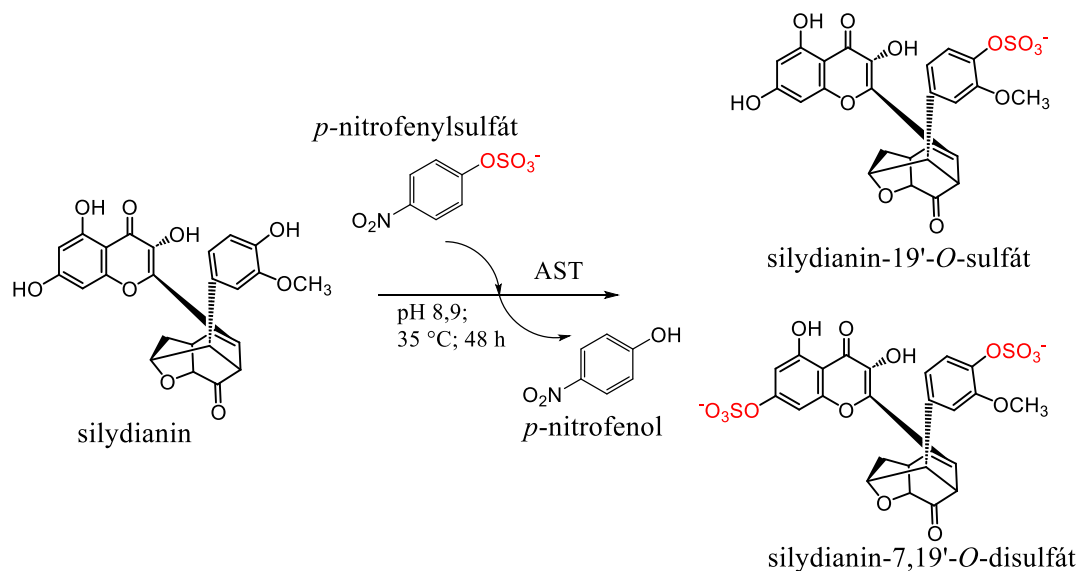


Obrázek 4.18: Enzymová sulfatace myricetinu pomocí AST (*Dh*AST, *Dsp*AST, *Sbo*AST, *Eco*AST, *Cfe*AST), reakce probíhala po dobu 48 hodin při 35 °C v pH 8,9 a v 5 % DMSO, jako donor sulfátu byl zvolen *p*-NPS.

Podle TLC analýzy (obrázek 4.21) nebyl v reakční směsi s myricetinem pozorován vznik myricetinsulfátu a *p*-NP ani u jedné reakce katalyzované různými enzymy AST. U těchto vzorků nemohlo být provedeno sledování nárůstu produktů v čase z důvodu degradace stacionární fáze v koloně. Novou kolonu se z časových důvodů nepodařilo získat.

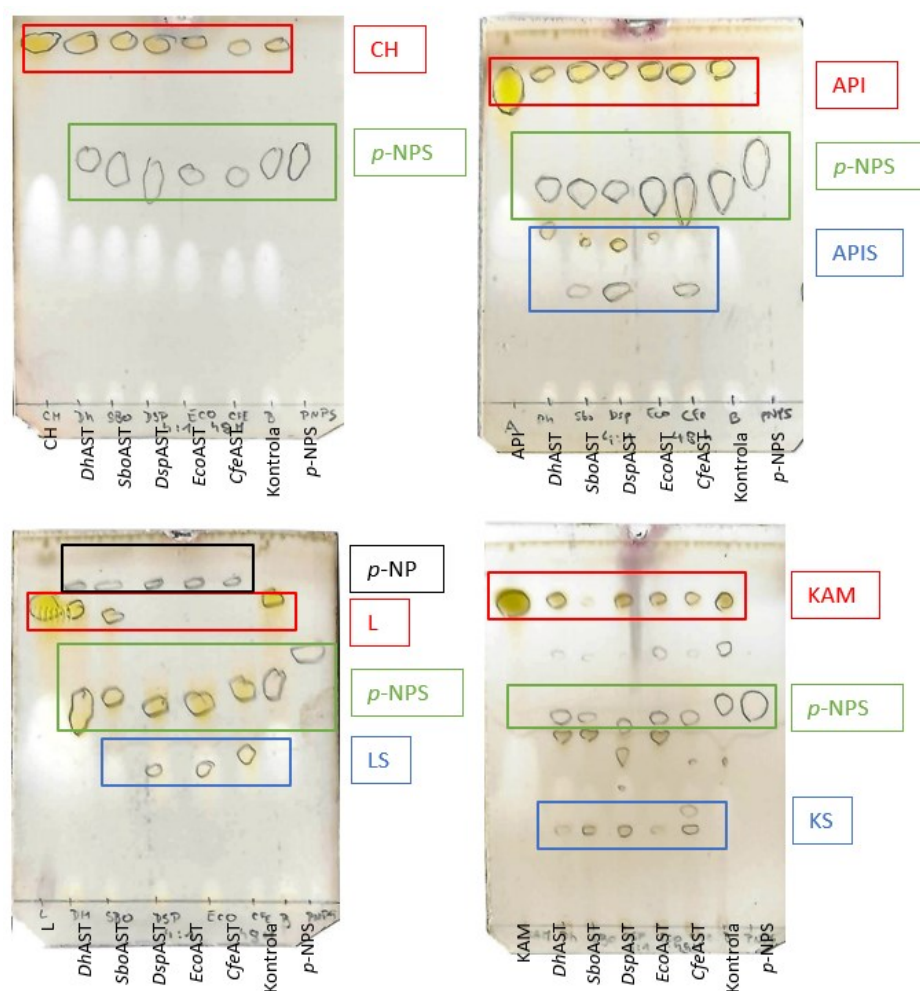
Potvrzení vzniklého sulfátu však bylo provedeno pomocí HPLC analýzy s hmotnostní detekcí u vzorku reakční směsi po 48 hodinách (kapitola 4.6.1 - obrázek 4.24).

Na následujícím obrázku (obrázek 4.19) je znázorněna enzymová sulfatace silydianinu.

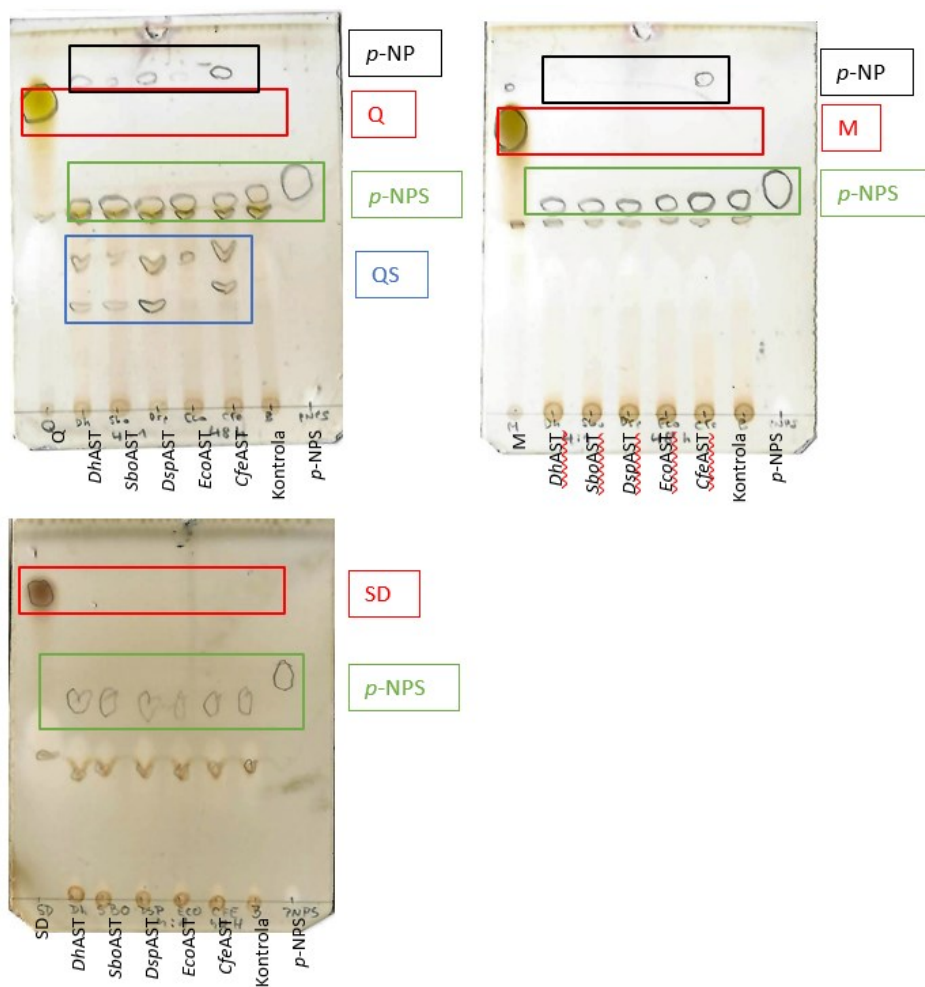


Obrázek 4.19: Enzymová sulfatace silydianinu pomocí AST (*DhAST*, *DspAST*, *SboAST*, *EcoAST*, *CfeAST*), reakce probíhala po dobu 48 hodin při 35 °C v pH 8,9 a v 5 % DMSO, jako donor sulfátu byl zvolen *p*-NPS.

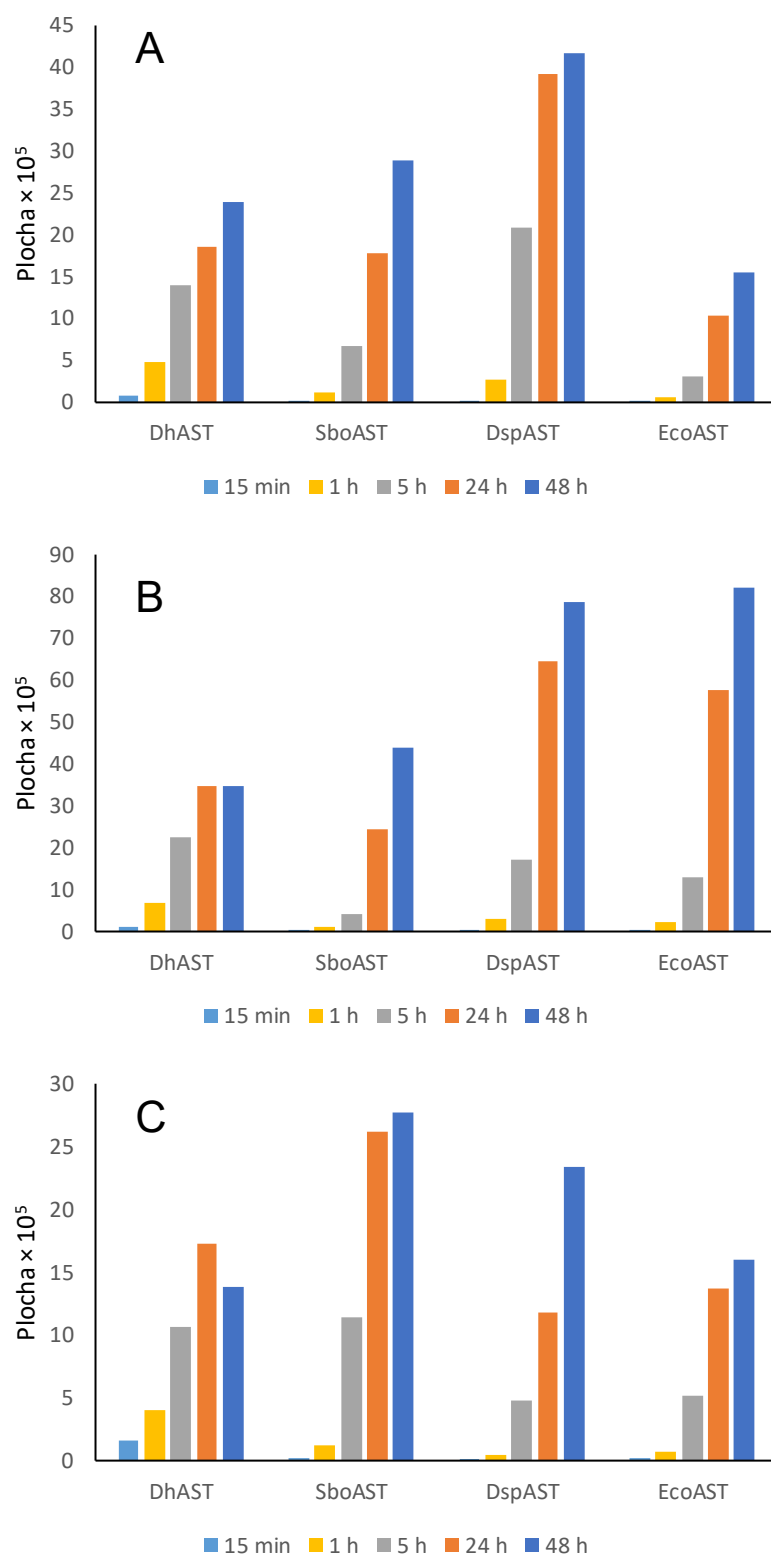
Podle TLC analýzy (obrázek 4.21) nebyl v reakční směsi se silydianinem pozorován vznik produktů sulfátů a *p*-NP ani u jedné reakce katalyzované různými enzymy AST. Byla provedena HPLC analýza po 48 hodinách, která taktéž nepotvrdila vznik produktů *p*-NP a sulfátu v těchto reakcích.



Obrázek 4.20: Analýza reakční směsi chrysinu (CH), apigeninu (API), luteolinu (L) a kaempferolu (KAM) pomocí TLC po 48 hodinách. Na destičkách jsou zobrazeny reakční směsi katalyzované enzymy AST a standardy myricetinu a p-NPS v pořadí: substrát, reakční směs katalyzovaná *DhAST*, *SboAST*, *DspAST*, *EcoAST*, *CfeAST*, slepý vzorek (negativní kontrola) a p-NPS.



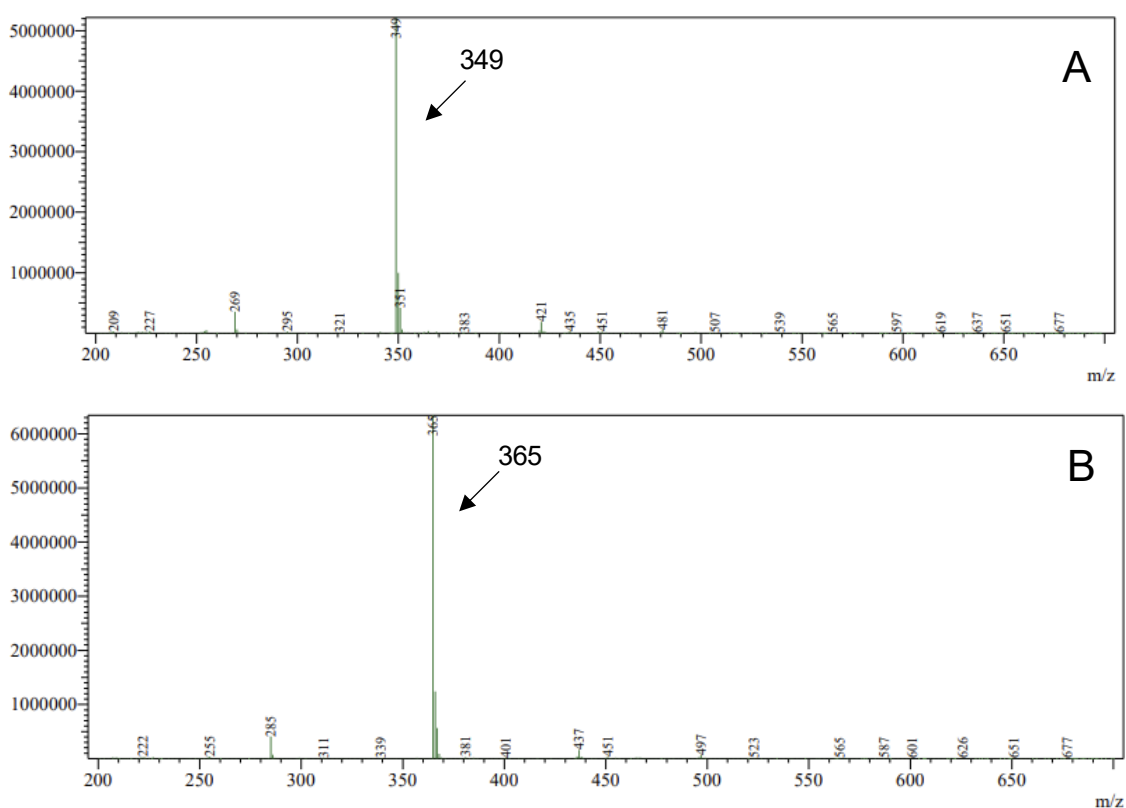
Obrázek 4.21: Analýza reakční směsi kvercetinu (Q), myricetinu (M), silydianinu (SD) pomocí TLC po 48 hodinách. Na destičkách jsou zobrazeny reakční směsi katalyzované enzymy AST a standardy myricetinu a *p-NPS* v pořadí: substrát, reakční směs katalyzovaná *DhAST*, *SboAST*, *DspAST*, *EcoAST*, *CfeAST*, slepý vzorek (negativní kontrola) a *p-NPS*.



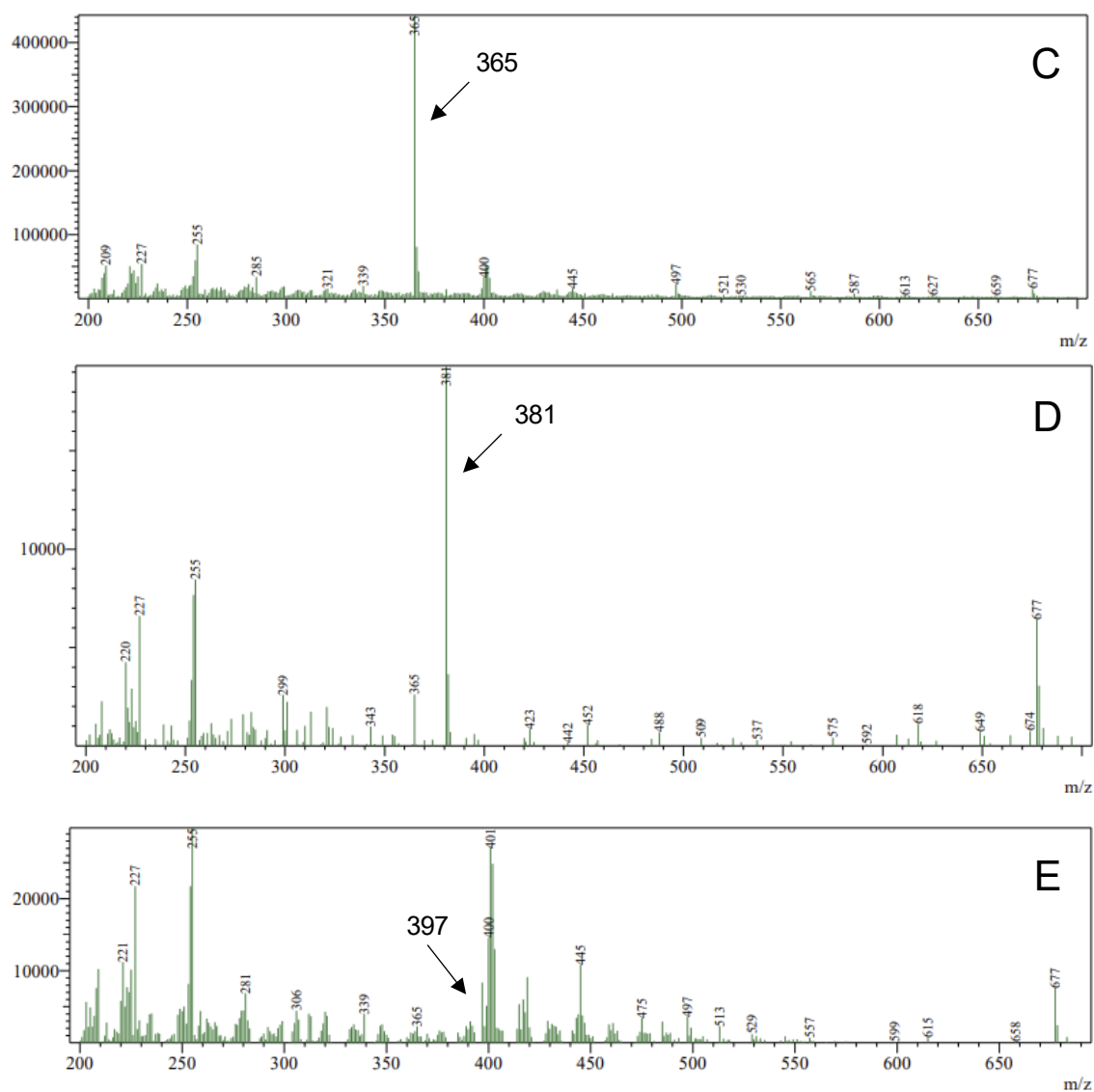
Obrázek 4.22: Nárůst produktu apigeninsulfátu (graf A), luteolinsulfátu (graf B) a kaempferolsulfátu (graf C) s časem v reakcích katalyzovaných enzymy *DhAST*, *SboAST*, *DspAST* a *EcoAST*

4.6.1 Detekce sulfátů pomocí hmotového spektrometru (LC-MS)

U reakčních směsí apigeninu, luteolinu, kaempferolu, kvercetinu a myricetinu byla pro potvrzení přítomnosti příslušných sulfátů provedena hmotnostní analýza (obrázek 4.23 a 4.24), kterou provedla Ing. Lucie Petrásková Ph.D. Byly vybrány reprezentativní vzorky těchto tří látek, které byly katalyzované enzymem *DspAST*. U všech tří vzorků se potvrdila přítomnost monosulfátů. Vypočtená hodnota m/z je pro apigeninsulfát je rovna 350,3, změřená $[M+H]^+$ byla 349. Pro luteolinsulfát byla vypočtena hodnota m/z 366,3, změřena byla $[M+H]^+$ 366. Pro kaempferolsulfát byla vypočtena hodnota m/z 365,3, změřena byla $[M+H]^+$ 365. Pro kvercetinsulfát byla vypočtena hodnota m/z 382,3, změřena byla $[M+H]^+$ 381. Pro myrecetinsulfát byla vypočtena hodnota m/z 398,3, změřena byla $[M+H]^+$ 397.



Obrázek 4.23: MS analýza příslušných monosulfátů apigeninu (graf A) a luteolinu (graf B)



Obrázek 4.24: MS analýza příslušných monosulfátů kaempferolu (graf C), kvercetinu (graf D) a myricetinu (graf E)

5 Diskuze

V literatuře byly doposud popsány dvě bakteriální aryl-sulfotransferasy (AST) z *Desulfitobacterium hafniense* [14] a *E. coli* [17,30,46]. V rámci práce byly vyhledány nové bakteriální AST, které by mohly mít větší substrátovou specifitu a regiosektivitu, lepší odolnost vůči rozpouštědlům, pH a teplotě. U *EcoAST* je známa i krystalová struktura, u *DhAST* zatím nebyla popsána, z důvodu nedostatečné čistoty po purifikaci. Nový konstrukt *DhAST*, připravený na pracovišti, by mohl být pro krystalizaci vhodnější, krystalizace však dosud nebyla provedena. Z toho důvodu se srovnání parametrů enzymů prezentovaných v této práci opírá primárně o biochemické charakteristiky (specifická aktivita s různými donory a akceptory, substrátová specifita, pH a teplotní optimum, stabilita v různých prostředích aj.). Tyto parametry, zvláště zhodnocení substrátové specifity, bylo možné provést jen s použitím pokročilých analytických metod, zvláště HPLC, ale i různých uspořádání spektrofotometrických metod, jež jsou prezentovány v této práci.

Fylogenetický strom potencionálních AST je rozdělen na dva klastry podle sekvence genů kódujících AST [45]. Nové sekvence genů potencionálních AST byly vybrány na základě podobnosti sekvencí s *DhAST* a *EcoAST*. Z klastu I byla vybrána AST z *Desulfosporosinus* sp. HMP52, která vykazuje podobnost nukleotidové sekvence 84 % k *Desulfitobacterium hafniense* (*DspAST*) a z klastu II byla vybrána AST ze *Salmonella bongori*, která vykazuje podobnost sekvence 88 % k *E. coli*. Aby mohly být dobře popsány rozdíly mezi těmito novými enzymy a již známými AST, byla tato práce rozšířena o AST z *E. coli* (*EcoAST*). Rekombinantní enzym AST z *Desulfitobacterium hafniense* (*DhAST*) byl již popsán a byl k dispozici na pracovišti [45].

Aby byla získána dostatečně silná informační platforma o vlastnostech těchto nových enzymů, byly stanoveny tyto parametry: specifická aktivita, pH a teplotní optimum, kinetické parametry s vybranými donory a akceptory sulfátu. Dále byly porovnávány jejich sulfatační schopnosti s polyfenolovými akceptory: chrysin, apigenin, luteolin, kaempferol, kvercetin, myricetin a silydianin. Parametry rekombinantního enzymu *DspAST* byly následně porovnávány s *DhAST*, rekombinantní enzym *SboAST* byl porovnáván s *EcoAST*.

Produkce nových AST vycházela již z dřívějších pokusů, kdy byla rekombinantní AST z *Desulfotobacterium hafniense* jako nativní konstrukt produkována v *E. coli* [14] a z produkce nativního konstruktu *E. coli* [47]. Tato purifikace byla poměrně náročná a vynášela malé výtěžky. Vzhledem k problémům s purifikací nativního konstrukt byl v rámci předchozí práce navržen a popsán alternativní konstrukt nesoucí polyhistidinovou kotvu [45]. Tento osvědčený postup byl aplikován analogicky při návrhu konstruktů jak AST z *E.coli*, kde byl již dříve popsán poměrně složitý postup purifikace nativního konstrukt [30], tak i nových dosud nepopsaných AST. Konstrukty rekombinantních enzymů studovaných v této práci, *DspAST*, *SboAST* a *EcoAST*, obsahovaly tedy polyhistidinovou kotvu, díky níž se proces purifikace značně zjednodušil.

Analogicky jako *DhAST* [45], produkce *DspAST*, *SboAST* a *EcoAST* byly realizovány v buňkách *E. coli* BL21 pLysS. U *DspAST* bylo produkováno přibližně 6-8 g biomasy, u *SboAST* přibližně 8-10 g biomasy a u *EcoAST* přibližně 11-14 g biomasy. U *DhAST* bylo vyprodukováno 6-10 g biomasy. Nejmenší růst buněk způsobil plasmid z *DspAST*, naproti tomu největší růst byl u *EcoAST*.

Díky přítomnosti konstruktů obsahujících polyhistidinovou kotvu byly enzymy purifikovány v jednom kroku pomocí afinitní chromatografie s použitím kolony His-Trap. Tato stacionární fáze má na sobě navázané imobilizované nikelnaté ionty, enzymy s polyhistidinovou kotvou jsou schopny se na nikelnaté ionty navázat, a tak se oddělit od ostatních proteinů v buněčném lyzátu. Pro eluci vzorku byl použit imidazol, který vytěsnil navázaný protein ze stacionární fáze.

Pro purifikaci enzymů *DhAST* a *DspAST* (klastr I) byl použit fosfátový ekvilibrační pufr a fosfátový eluční pufr se 100 mmol/l imidazolem a byla zvolena lineární gradientová eluce. Zhruba v 50 % gradientu se pak eluovaly ostatní proteiny v buněčném lyzátu, od 80 % gradientu se pak eluovaly přečištěné enzymy. Tento postup byl původně zvolen i pro enzymy *SboAST* a *EcoAST* (klastr II), avšak v tomto případě došlo v průběhu gradientové eluce k eluci pouze ostatních proteinů buněčného lyzátu, požadované enzymy se zachytily na koloně příliš silně a nepodařilo se je eluovat. Z tohoto důvodu byla zvolena vyšší koncentrace imidazolu v elučním pufru (300 mmol/l); přečištěný enzym se pak eluoval zhruba v 50-60 % gradientu. U 300 mmol/ imidazolu však došlo ke koeluci přečištěných enzymů s ostatními proteiny v buněčném lyzátu. Při další

optimalizaci s cílem maximalizovat čistotu výsledného enzymu byl do ekvilibračního pufru přidán 100 mmol/l imidazol. Tak se na koloně nezachytily žádné kontaminující proteiny a při eluci se získal požadovaný enzym ve vysoké čistotě nad 95 %.

Postup purifikace *DhAST* a *DspAST* nebyl zatím z časových důvodů nijak zásadně optimalizován, dalo by se však uvažovat, že přidáním 50 mmol/l imidazolu do ekvilibračního pufru by se eliminovalo nespecifické zachycení ostatních proteinů ve vzorku na stacionární fázi, což by eliminovalo eluci ostatních proteinů v 50-60% gradientu a eluoval by se pouze přečištěný enzym v 80 % gradientu. Byl by to tedy obdobný postup jako u *EcoAST* a *SboAST*.

Po dialýze, jež byla provedena k odstranění imidazolu z elučního pufru, musely být enzymy *DhAST* a *DspAST* stabilizovány přidavkem 20 % glycerolu [45]. Tím se jejich stabilita v zakoncentrovaném roztoku zvýšila z pouhých několika dní na dobu několika měsíců. Enzymy *SboAST* a *EcoAST* byly oproti *DhAST* a *DspAST* výrazně stabilnější a po dialýze nebylo nutno přidávat glycerol. Podle výtěžku proteinu se pak nejlépe produkoval a purifikoval enzym *SboAST*.

U enzymů byla provedena biochemická charakterizace, bylo stanoveno pH optimum, teplotní optimum a enzymová kinetika. U enzymu *DspAST* bylo pH optimum stanoveno na 9,5, stejné pH optimum má enzym *DhAST* [45]. U enzymu *SboAST* bylo pH optimum stanoveno na 10,5 a u *EcoAST* na 8, což odpovídá literatuře [17,30]. Teplotní optimum *DspAST* bylo 45 °C, což se poněkud liší od teplotního optima *DhAST* popsaného v literatuře, kde bylo stanoveno na 35 °C [45]. Teplotní optimum *SboAST* a *EcoAST* bylo stanoveno na 50 °C, profil jejich teplotního optima vypadal velmi podobně. Dá se tedy říci, že u všech studovaných enzymů je pH optimum spíše v bazické oblasti a teplotní optimum nijak nevybočuje z hodnot obvyklých pro rekombinantní proteiny.

Aby byl stanoven rozsah podmínek, za nichž lze s nově připravenými enzymy pracovat, u *DspAST*, *SboAST* a *EcoAST* byla stanovena jejich stabilita při pH 7, 8 a 9 a při teplotách 30 a 40 °C; v těchto podmínkách byly enzymy inkubovány po dobu 48 h, tento časový úsek byl vybrán vzhledem k plánovaným reakčním podmínkám při syntéze sulfátů polyfenolových látek. U enzymů *SboAST* a *EcoAST* aktivita po dobu 48 h inkubace při daných podmínkách neklesla pod 50 %, u *DspAST* klesla aktivita pod 40 % u podmínek pH 9 a 40 °C (33 %) a pH 8 a 30 °C (39 %), U enzymu *DhAST* v podmínkách

pH 9 a 35 ° klesla enzymová aktivita na 80 % oproti počáteční hodnotě [45]. Z hlediska stability se pro syntézy jeví jako nejvhodnější enzymy *SboAST* a *EcoAST*.

Pro enzym *DspAST* byly optimální reakční podmínky v pH 8 a 40 °C, kdy bylo naměřeno po 48 h 53 % původní enzymové aktivity při stanovení na začátku experimentu. U enzymu *SboAST* to pak byla kombinace pH 9 a teplota 30 °C, kdy bylo dokonce naměřeno výrazné navýšení aktivity – prakticky 2,5× oproti původní hodnotě na začátku experimentu (245 %). Pro enzym *EcoAST* byla ideální kombinace z testovaných pH 8 a 30 °C, kdy bylo naměřeno 112 % oproti počáteční enzymové aktivitě, což znamená, že enzym byl po celou dobu experimentu velmi stabilní.

Flavonoidy bývají špatně rozpustné v polárních rozpouštědlech a je potřeba do směsi přidávat organická rozpouštědla. Z toho důvodu byla sledována stabilita enzymů v 20% acetonu, 5 a 10% DMSO, která by mohla ovlivňovat aktivitu enzymů.

Přidáním 20 % acetonu se po 5 h u *SboAST* a *EcoAST* snížila enzymová aktivita na zhruba 20 %, zatímco u *DspAST* už po 4 h inkubace nebyla pozorována prakticky žádná enzymová aktivita, stejně jako bylo popsáno u *DhAST* ze stejného kladru [45]. Přidání DMSO naopak působilo na enzymy aktivačně. Enzymová aktivita se po 5 h inkubace se zvýšila u *DspAST* až třikrát oproti počáteční naměřené hodnotě aktivity, to mohlo být způsobeno jiným sbalením proteinu a následně lepším přístupem substrátu k aktivnímu místu. U enzymu *DhAST* naproti tomu nemělo přidání 10 % DMSO žádný vliv [14]. Do reakčních směsí se nicméně v literatuře přidává spíše aceton díky jeho snadnému odstranění z reakční směsi [14].

Pro stanovení kinetických parametrů se zvolily tři kombinace donorů a akceptorů sulfátů: *p*-NPS – fenol, *p*-NPS – katechol a MUS – katechol. Získané parametry Michaelisova konstanta, číslo přeměny a katalytická účinnost byly u jednotlivých enzymů následně srovnány. U reakce *p*-NPS s fenolem měl nejvyšší katalytickou účinnost *DspAST* a *EcoAST*, hodnoty byly zhruba o 25 % vyšší než u *DhAST*. U reakce *p*-NPS s katecholem měl nejvyšší katalytickou účinnost *EcoAST*; *DhAST* a *DspAST* pak vykazovaly podobné hodnoty katalytické účinnosti. U reakce MUS s katecholem měl nejvyšší katalytickou účinnost enzym *EcoAST*. Naopak u všech tří reakcí měl nejnižší katalytickou účinnost enzym *SboAST*. Je třeba poznamenat, že nižší katalytická účinnost, respektive pomalejší průběh reakce může vést při syntéze sulfátů k většímu výtěžku, reakce může být více

specifická, případně může vést ke vzniku disulfátů [45].

Protože bakteriální AST jsou vhodným nástrojem pro sulfataci polyfenolových látek, bylo zásadní částí této práce posoudit sulfatační schopnosti enzymů *DhAST*, *DspAST*, *SboAST* a *EcoAST*. Pro všechny reakční směsi s vybranými akceptory byly zvoleny stejné reakční podmínky, aby bylo možné porovnávat sulfatační schopnosti jednotlivých enzymů mezi sebou. Jako donor sulfátu byl vybrán *p*-NPS. Reakce se inkubovaly 48 h při 35 °C a pH 8,9 v přítomnosti 5 % DMSO a ve všech reakcích byl stejný molární poměr daných enzymů pro porovnání jejich účinnosti sulfatace s danými substráty. Teplota a pH byly vybrány na základě stanovení stabilit jednotlivých enzymů a srovnáním s literaturou.

Sulfatační schopnosti enzymů byly ověřeny na několika vybraných polyfenolových látkách: chrysinu, apigeninu, luteolinu, kaempferolu, kvercetin, myricetin a silydianinu. Tyto akceptory byly také vybrány z hlediska porovnání s literaturou.

Během reakce byl sledován nárůst produktů s časem. Během reakční doby se ve směsi vytvářela sraženina substrátů (*p*-NPS a akceptoru), která byla před HPLC analýzou odstředěna.

U reakční směsi chrysinu a silydianinu nebyl po analýze TLC pozorován vznik produktů, to potvrdila i HPLC analýza po 48 hodinách, kde nedošlo ani k úbytku substrátů. Enzymová sulfatace u flavonoidů většinou probíhá na benzenovém jádře – kruh B (obrázek 1.2). Ve struktuře chrysinu však na tomto jádře není přítomna hydroxylová skupina, hydroxylová skupina je přítomna pouze na kruhu A, zde však dochází ke sterickému bránění, takže sulfatace v tomto místě je obvykle obtížná. U struktury silydianinu se vedle hydroxyly pro potencionální sulfataci vyskytuje methylesterová skupina, která může zabraňovat navázání sulfátu.

U reakčních směsí s apigeninem byla provedena HPLC analýza, díky níž se sledoval nárůst produktu apigeninsulfátu s časem; nejlépe tuto reakci katalyzoval enzym *DspAST*. Reakční směs luteolinu a *p*-NPS pak nejlépe katalyzovaly enzymy *DspAST* a *EcoAST*, tyto dva enzymy katalyzovaly reakci prakticky se stejnou účinností a výtěžkem, u reakční směsi s kaempferolem to byl pak enzym *SboAST*. Reakce s luteolinem katalyzovaná enzymem *DhAST* byla popsána [18]. Všechny reakce katalyzované enzymem *DspAST* měly vyšší výtěžky oproti enzymu *DhAST*. V reakčních směsích s apigeninem a luteolinem vznikalo obdobné množství sulfátů s enzymem *DhAST* a *SboAST*. U reakční

směsi s kaempferolem vznikalo obdobné množství keampferolsulfátu jak ve směsi katalyzované enzymem *DhAST*, tak *EcoAST*. Nižší množství produktu oproti reakci katalyzované *DhAST* bylo zaznamenáno pouze u reakční směsi s apigeninem katalyzované enzymem *EcoAST*.

U reakční směsi kvercetinu a myricetinu podle analýzy TLC vznikaly v reakční směsi s kvercetinem produkty *p*-NP a sulfátů kvercetinu u všech enzymů. U myricetinu nebyl naproti tomu pozorován vznik žádných produktů. To mohlo být způsobeno vznikem sraženiny během inkubace reakčních směsí. Tyto reakce katalyzované enzymem *DhAST* byly již popsány v literatuře [18,42].

Potvrzení přítomnosti monosulfátů u apigeninu a luteolinu bylo provedeno nejprve HPLC analýzou standardů těchto látek, kdy se potvrdil retenční čas a absorpční spektrum těchto látek. Následně byla provedena hmotnostní analýza tří reprezentativních vzorků reakčních směsí apigeninu, luteolinu a kaempferolu katalyzovaných enzymem *DspAST*. U všech těchto vzorků byla potvrzena přítomnost monosulfátů.

Tyto akceptory byly zvoleny jako vhodné též vzhledem ke své struktuře: apigenin a kaempferol obsahují fenol, zatímco luteolin a kvercetin obsahují katechol. Výsledné reakce katalyzované jednotlivými enzymy AST mohly tak být porovnány i s katalytickou účinností AST reakcí *p*-NPS s fenolem a katecholem, u kterých se prováděly kinetické studie.

Podle katalytických účinností s příslušnými strukturně příbuznými akceptory zjištěných v kinetických studiích měly katalyzovat AST reakce s apigeninem a kaempferolem v pořadí *SboAST*, *DhAST* a nejlépe pak *EcoAST* a *DspAST*. Reakci s luteolinem pak v pořadí *SboAST*, *DhAST* podobně *DspAST* a nejlépe *EcoAST*. U *DspAST* se toto potvrdilo u reakční směsi apigeninu, kde vznikalo oproti ostatním enzymům nejvíce produktu apigeninsulfátu. Naopak u *EcoAST* vznikalo tohoto produktu nejméně, což ovšem neodpovídalo jeho katalytické účinnosti s *p*-NPS a fenolem. U směsi s kaempferolem to mělo být obdobné, avšak největší množství produktu bylo zaznamenáno u reakce katalyzované enzymem *SboAST*, který měl naopak nejmenší katalytickou účinnost v reakci *p*-NPS a fenolu. Podle katalytické účinnosti AST v reakci *p*-NPS a katecholu měl nejlépe reakci s luteolinem a *p*-NPS katalyzovat enzym *EcoAST*. V této reakci vznikalo nejvíce produktu luteolinsulfátu, ale stejné množství produktu

vznikalo i u reakce katalyzované enzymem *DspAST*, který měl zhruba poloviční katalytickou účinnost s *p*-NPS a katecholem oproti *EcoAST*. Podle katalytické účinnosti nebylo tedy v této práci možné predikovat syntetickou účinnost jednotlivých enzymů s různými substráty. Zatím nejsou v literatuře známy parametry, které by byly vhodnější pro predikci sulfatační kapacity AST.

V budoucnu budou vyprodukované aryl-sulfotransferasy použity pro sulfataci i dalších polyfenolových látek pro produkci příslušných sulfátů. Sulfatované sloučeniny budou využity jako standardy a umožní charakterizovat lidské metabolity.

6 Závěr

V rámci této práce byly heterologně exprimovány dvě nové aryl-sulfotransferasy (AST) navržené z proteinové databáze, jednalo se o AST ze *Desulfosporosinus* sp. HMP52 a *Salmonely bongori*. Dále byla produkována rekombinantní AST z *E. coli* pro srovnání katalytických vlastností s enzymem *SboAST* taktéž z klastru I. Získaná data byla porovnána se známou AST z *Desulfitobacterium hafniense*, která patří stejně jako enzym *DspAST* do klastru II.

Následně byla optimalizována purifikace enzymů a bylo stanoveno jejich pH optimum a teplotní optimum, včetně měření stability enzymů při různých podmínkách. Pro účely sulfatace vybraných polyfenolových látek byla určována stabilita v nepolárních rozpouštědlech – acetonu a dimethylsulfoxidu.

Dalším krokem bylo určení substrátové specifity a kinetických parametrů. Jako donor sulfátu byl vybrán *p*-NPS a MUS, jako akceptory byly vybrány látky fenol a katechol. Nejlepší katalytickou účinnost v reakci *p*-NPS a fenol měl enzym *DspAST* a *EcoAST*, v reakci *p*-NPS a katechol stejně jako v reakci MUS a katechol to pak byl enzym *EcoAST*. Nejmenší katalytickou účinnost u všech tří reakcí měl enzym *SboAST*.

Tyto parametry byly porovnávány s již charakterizovaným enzymem z *Desulfitobacterium hafniense* a enzymem z *E. coli*. Enzym *DspAST* se purifikací a svou biochemickou charakterizací podobal enzymu *DhAST*, což odpovídá předpokladu, neboť oba tyto enzymy patří do klastru I. Naproti tomu enzymy *EcoAST* a *SboAST* (klastr II) měly stejné purifikační podmínky, vykazovaly stejné chování v teplotách avšak jiné chování v pH.

Nové enzymy byly použity k enzymové sulfataci vybraných sloučenin (chrysin, apigenin, luteolin, kaempferol, kvercetin, myricetin a silydianin). Produkty enzymové sulfatace byly analyzovány metodami TLC a optimalizovanými metodami HPLC s UV a MS detekcí. Pomocí MS detekce pak byl ověřen vznik monosulfátů apigeninu, luteolinu, kaempferolu, kvercetinu a myricetinu. U reakční směsi apigeninu, luteolinu a kaempferolu byl sledován nárůst množství sulfátů s časem pomocí HPLC analýzy. Množství vzniklého sulfátu v reakčních směsích katalyzovaných enzymy *DhAST*, *DspAST*, *SboAST* a *EcoAST* u akceptorů apigenin, luteolin a kaempferol se následně porovnával s katalytickou účinností jednotlivých enzymů s *p*-NPS a fenolem/katecholem. Trend mezi

zjištěnými kinetickými parametry a těmito rekčními směsi se však nepotvrdil.

Produkované AST budou použity v dalším výzkumu pro sulfataci polyfenolových látek, ale také pro případnou krystalizaci. Sulfatované sloučeniny budou použity jako standardy, které umožní charakterizovat lidské metabolity.

Seznam použité literatury

1. Jucá, M.M., Cysne Filho, F.M.S., de Almeida, J.C., Mesquita, D. da S., Barriga, J.R. de M., Dias, K.C.F., Barbosa, T.M., Vasconcelos, L.C., Leal, L.K.A.M., Ribeiro, J.E., Vasconcelos, S.M.M.: Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural Product Research* **34**, 692–705 (2020).
2. Zhang, L., Han, Z., Granato, D.: Polyphenols in foods: Classification, methods of identification, and nutritional aspects in human health. *Advances in Food and Nutrition Research* **98**, 1–33 (2021).
3. van der Horst, M.A., Hartog, A.F., El Morabet, R., Marais, A., Kircz, M., Wever, R.: Enzymatic Sulfation of Phenolic Hydroxy Groups of Various Plant Metabolites by an Arylsulfotransferase: Enzymatic Sulfation of Phenolic Hydroxy Groups. *European Journal of Organic Chemistry* **2015**, 534–41 (2015).
4. Soto-Vaca, A., Gutierrez, A., Losso, J.N., Xu, Z., Finley, J.W.: Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 6658–77 (2012).
5. Brglez Mojzer, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., Bren, U.: Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, *Bioavailability and Anticarcinogenic Effects*. *Molecules* **21**, 901 (2016).
6. Reis Giada, M. de L.: Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In: *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases – A Role for Antioxidants*, Morales-Gonzalez, J.A. (Ed.). InTech, 2013, p. 87–112.
7. Havsteen, B.H.: The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**, 67–202 (2002).
8. Cassidy, A., Kay, C.: Phytochemicals: Classification and Occurrence. In: *Encyclopedia of Human Nutrition* Elsevier, Caballero B. (Ed.). Elsevier, 2013, p. 39–46.
9. Li, D., Sun-Waterhouse, D., Wang, Y., Qiao, X., Chen, Y., Li, F.: Interactions of Some Common Flavonoid Antioxidants. In: *Encyclopedia of Food Chemistry, Volume 2*. Melton L., Varelis P., Shahidi F. (Ed.) ,Elsevier 2019, p. 644–49.
10. Murkovic, M.: Phenolic Compounds: Occurrence, Classes, and Analysis. In:

Encyclopedia of Food and Health Caballero B., Finglas P., Toldrá F. (Ed.), Elsevier 2019, p. 346–51.

11. Cui, J.Y., Li, C.Y. (2018) Regulation of Xenobiotic Metabolism in the Liver. In: *Comprehensive Toxicology, Volume 2*. McQueen C.A. (Ed.). Elsevier 2018, p. 168–214
12. Sanchez, R.I., Kauffman, F.C.: Regulation of Xenobiotic Metabolism in the Liver In: *Comprehensive Toxicology, Volume 9*. McQueen C.A. (Ed.). Elsevier 2010, p. 109–28
13. Testa, B.: Principles of Drug Metabolism 2: Hydrolysis and Conjugation Reactions. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry II, Volume 5*. Taylor J.B., Trigg D.J. (Ed.), Elsevier, p. 133–66.
14. van der Horst, M.A., van Lieshout, J.F.T., Bury, A., Hartog, A.F., Wever, R.: Sulfation of Various Alcoholic Groups by an Arylsulfate Sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense* and Synthesis of Estradiol Sulfate. *Advanced Synthesis and Catalysis* **354**, 3501–8 (2012).
15. Correia-da-Silva, M., Sousa, E., Pinto, M.M.M.: Emerging Sulfated Flavonoids and Other Polyphenols as Drugs: Nature as an Inspiration. *Medicinal Research Reviews* **34**, 223–79 (2014).
16. Al-Horani, R.A., Desai, U.R.: Chemical sulfation of small molecules – advances and challenges. *Tetrahedron* **66**, 2907–18 (2010).
17. Malojčić, G., Owen, R.L., Glockshuber, R.: Structural and Mechanistic Insights into the PAPS-Independent Sulfotransfer Catalyzed by Bacterial Aryl Sulfotransferase and the Role of the DsbL/DsbI System in Its Folding. *Biochemistry* **53**, 1870–77 (2014).
18. Káňová, K., Petrásková, L., Pelantová, H., Rybková, Z., Malachová, K., Cvačka, J., Křen, V., Valentová, K.: Sulfated Metabolites of Luteolin, Myricetin, and Ampelopsin: Chemoenzymatic Preparation and Biophysical Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **68**, 11197–206 (2020).
19. Růčková, E., Müller, P., Vojtěšek, B.: Protein Expression and Purification. *Klinická onkologie* **27**, 92–98 (2014).
20. Giacometti, J., Josić, D.: Protein and Peptide Separations. In: *Liquid*

Chromatography. (Elsevier), Fanali S., Haddad P.R., Poole C.F., Schoenmakers P. Lloyd D. (Ed.), Elsevier 2013, p. 149–84.

21. Purich, D.L.: *Enzyme kinetics: catalysis & control a reference of theory and best-practice methods*. Amsterdam, Elsevier/Academic Press 2010.
22. Sánchez Rojas, F., Bosch Ojeda, C., Cano Pavón, J.M.: Spectrophotometry Biochemical Applications. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Worsfold P., Poole C., Townshend A., Miró M. (Ed.), Elsevier 2019, p. 205–13.
23. Sammani, M.S., Clavijo, S., Cerdà, V. (2021) Recent, advanced sample pretreatments and analytical methods for flavonoids determination in different samples. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry* **138**, 116220 (2021).
24. Scull, J.C.: Nucleic Acid Extraction Techniques. In: *Pathobiology of Human Disease*. McManus L.M., Mitchell R.N. (Ed.). Elsevier/Academic Press 2014, p. 4059–63.
25. Passos, M.L.C., Sarraguça, M.C., Saraiva, M.L.M.F.S., Prasada Rao, T., Biju, V.M. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Worsfold P., Poole C., Townshend A., Miró M. (Ed.), Elsevier 2019, p. 236–43.
26. Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. 3. přeprac. vyd. Ostrava Pavel Klouda – nakladatelství Pavko 2016.
27. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R.: *Analytická chemie* Přeložil: Nesměrák, K.; Červený, V.; Křížek, T.; Nováková, E. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2019.
28. Draxler, S., Lippitsch, M.E., Ma, K.: Fluorometry for Chemical Sensing. In: *Encyclopedia of Ocean Sciences, Volume 5*. Cochran J.K., Bokuniewicz H.J., Yager P.L. (Ed.). Elsevier 2019, p. 94–101.
29. Bardez, E., Boutin, P., Valeur, B.: Photoinduced biprotonic transfer in 4-methylumbelliferone. *Chemical Physics Letters* **191**, 142–48 (1992).
30. Malojčić, G., Owen, R.L., Grimshaw, J.P.A., Brozzo, M.S., Dreher-Teo, H., Glockshuber, R.: A Structural and biochemical basis for PAPS-independent sulfuryl

transfer by aryl sulfotransferase from uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 19217–22 (2008).

31. Hage, D.S., Anguizola, J.A., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., Pfau Miller, E., Sobansky, M., Zheng, X. In: *Liquid Chromatography*. (Elsevier), Fanali S., Haddad P.R., Poole C.F., Chankvetadze B., Riekkola M.L. (Ed.), Elsevier 2023, p. 539–561.

32. Magdeldin, S., Moser, A.: Affinity Chromatography: Principles and Applications. In: *Affinity Chromatography*, Magdeldin, S. (Ed.). InTech 2012, p. 1–28.

33. Santiago, M., Strobel, S.: Thin Layer Chromatography. In: *Methods in Enzymology, Volume 533*. Lorsch J. (Ed.) Elsevier 2013, p. 303–24.

34. Gika, H., Kaklamanos, G., Manesiotis, P., Theodoridis, G.: Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Caballero B., Finglas P., Toldrá F. (Ed.), Elsevier 2016, p. 93–99.

35. Nováková, L., Douša, M.: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha, Europrint, 2013.

36. de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U.A.Th.: Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* **1112**, 31–63 (2006).

37. Zhang, Y., Zhang, Q., Li, L., Wang, B., Zhao, Y., Guo, D.: Simultaneous determination and pharmacokinetic studies of dihydromyricetin and myricetin in rat plasma by HPLC-DAD after oral administration of Ampelopsis grossedentata decoction. *Journal of Chromatography B* **860**, 4–9 (2007).

38. Dueñas, M., González-Manzano, S., Surco-Laos, F., González-Paramas, A., Santos-Buelga, C.: Characterization of Sulfated Quercetin and Epicatechin Metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 3592–98 (2012).

39. Ji, Y., Islam, S., Mertens, A.M., Sauer, D.F., Dhoke, G.V., Jakob, F., Schwaneberg, U.: Directed aryl sulfotransferase evolution toward improved sulfation stoichiometry on the example of catechols. *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**, 3761–71 (2019).

40. Sarıbaş, A.S., Mobasser, A., Pristatsky, P., Chen, X., Barthelson, R., Hakes, D.,

- Wang, J.: Production of N-sulfated polysaccharides using yeast-expressed N-deacetylase/N-sulfotransferase-1 (NDST-1). *Glycobiology* **14**, 1217–28 (2004).
41. Valentová, K., Káňová, K., Di Meo, F., Pelantová, H., Chambers, C., Rydlová, L., Petrásková, L., Křenková, A., Cvačka, J., Trouillas, P., Křen, V.: Chemoenzymatic Preparation and Biophysical Properties of Sulfated Quercetin Metabolites. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, 2231 (2017).
42. Purchartová, K., Valentová, K., Pelantová, H., Marhol, P., Cvačka, J., Havlíček, L., Křenková, A., Vavříková, E., Biedermann, D., Chambers, C.S., Křen, V.: Prokaryotic and Eukaryotic Aryl Sulfotransferases: Sulfation of Quercetin and Its Derivatives. *ChemCatChem* **7**, 3152–62 (2015).
43. Begines, P., Biedermann, D., Valentová, K., Petrásková, L., Pelantová, H., Maya, I., Fernández-Bolaños, J.G., Křen, V.: Chemoenzymatic Synthesis and Radical Scavenging of Sulfated Hydroxytyrosol, Tyrosol, and Acetylated Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **67**, 7281–88 (2019).
44. Petrásková, L., Káňová, K., Brodsky, K., Hetman, A., Petránková, B., Pelantová, H., Křen, V., Valentová, K.: Sulfated Phenolic Substances: Preparation and Optimized HPLC Analysis. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 5743 (2022).
45. Brodsky, K., Káňová, K., Konvalinková, D., Slámová, K., Pelantová, H., Valentová, K., Bojarová, P., Křen, V., Petrásková, L.: Bacterial Aryl Sulfotransferases in Selective and Sustainable Sulfation of Biologically Active Compounds using Novel Sulfate Donors. *ChemSusChem* **15** (2022).
46. Malojčić, G., Glockshuber, R.: The PAPS-Independent Aryl Sulfotransferase and the Alternative Disulfide Bond Formation System in Pathogenic Bacteria. *Antioxidants & Redox Signaling* **13**, 1247–59 (2010).
47. Grimshaw, J.P.A., Stirnimann, C.U., Brozzo, M.S., Malojcic, G., Grütter, M.G., Capitani, G., Glockshuber, R.: DsbL and DsbI Form a Specific Dithiol Oxidase System for Periplasmic Arylsulfate Sulfotransferase in Uropathogenic Escherichia coli. *Journal of Molecular Biology* **380**, 667–80 (2008).

Přílohy

Příloha 1: Aminokyselinové sekvence aryl-sulfotransferas

Aminokyselinová sekvence *DspAST* (AST z *Desulfosporosinus* sp. HMP52)

MTNQIKHEQIAHIITKQNNLEQAMLAEFEAGNYTIDNPLVKLNPHYVCPLTAMVLFETPVMTEAAIVVKG
KEHPGDIRHTFPAGKTHILPVYGLYADYENTVEIVMANGEKNSIRIQTGPIHPDVPLATSIKTTSEYMGH
NMMFLTAAMRSPAGYDYAGDVRWYASENFAFDLKRMPNGHILIGTERLVKMPYFTTGLYEMAFSGKIFK
EYRTPSGYHHDQFVMDGNILVLSFDFYSGTVEDVCLLIDPNTGEVLKSWDYKNVLPQNVAGSGSQDEHD
WFHNNNAVWYDKKTHSLTFSGRHQDAVINLDFETGELNWILGDPEGWPQEMVEKYFFTPVGDGEFDWQYEQ
HACVILPDGDVMLFDNGHFRSKNKENYLANSKNFSRGVRYRIDTEKMTIQQIWQYGKERGAEFFSPYICN
VEYYNEGHYMVHSGGIGYENGETCEGMAVMKVMQPEFKDSITFNSITCELKDDVLMYELQVPANCYRAEK
LPLYANETAELGAGKVLGSLIETQTTKMKIKAQETGQLVPDHYEASIEEEDRMTFNAIFESGEMAQLL
LVDEAGEVRRYPINTVAQNFAQMCVGTFAQKADPRNVDVFINKTGLSGKYQVKLVAAEKIYETGVTISAHH
HHHH

Teoretické pI: 4,95; Mw: 71278,57 Da

S His-kotovou: teoretické pI: 5,12; Mw: 72101,42 Da

Aminokyselinová sekvence *SboAST* (AST ze *Salmonely bongori*)

MFHQCRKTLLAGAVALTFGLTSASIFAAGFQPAQPAQKLGAVIVDPYGNAPLTALVELDSHMISDVKVTV
HGKGEKGVFVPTYTVGQESLKYDGIPIFGLYQKFANNVTVEYKENGKAMKDDYVVHTSAIVNHYMDNRSI
SDLQQTKVIKVPAGFEDRLYLVTHTFTTPQGAEFHWHGEKDNAGILDAGPAGGALPFDIAPYTFVVDTO
GEYRWWLDQDTFYDGHDRDINKRGYLMGIRETPRGFTTAVQQGQHWYEFDMMGQILADHKLPRGFMDASHE
SIETVNGTVLLRVGKRNRYRKEDGLHVHTIRDQIEVDKSGRVVDVWDLTKILDPMRDALLGALDAGAVCV
NVDLAHAGQQAQLEPDTFPGDALGVGPGRNWAHVNSIAYDAKDDAIILSSRHQGIVKIGRDKQVKWILAP
SKGWNKPLASKLLKPVDPGQKPLTCDENGKCENTDFDFTYQTHTAWLSSKGTTLTVFDNGDGRNLEQPALP
TMKYSRFVEYKIDKKGTVQQVWEYGKERGYDFYSPITSVVEYQKDRDTMFGFGGSINLFDVGKPTVGKL
NEIDYKTKEVKVEIDVLSKPNQTHYRALLVHPQQMFKHHHHHH

Teoretické pI: 6,07; Mw: 66700,42 Da

S His-kotovou: teoretické pI: 6,23; Mw: 67523,26 Da

Aminokyselinová sekvence *EcoAST* (AST z *E. coli*)

MFDKYRKTLVAGTVAITLGLSASGVMAAGFKPAPPAGQLGAVIVDPYGNAPLTALVDLDSHVISDVKVTV
HGKGEKGVETISYPVGQESLKYDGVPIFGLYQKFANKVTVEWKENGKVMKDDYVVHTSAIVNNYMDNRSI
SDLQQTKVIKVPAGFEDRLYLVTHTFTTAQGXDLHWHGEKDNAGILDAGPATGALPFDIAPFTFIVDTE
GEYRWWLDQDTFYDGRDRDINKRGYLMGIRETPRGFTTAVQQGQHWYEFDMMGQVLEDHKLPRGFADATHE
SIETPNGTVLLRVGKSNYRRDDGVHVTITRDHILEVDKSGRVVDVWDLTKILDPKRDALLGALDAGAVCV
NVDLAHAGQQAKLEPDTFPGDALGVGPGRNWAHVNSIAYDAKDDSIILSSRHQGVVIGRDKQVKWILAP
SKGWEKPLASKLLKPVDPANGKPIITCENGLCENSDFDFTYQTHTAWISSKGTTLTFDNGDGRHLEQPALP
TMKYSRFVEYKIDKKGTVQQVWEYGKERGYDFYSPITSIEYQADRNTMFGFGGSIHLDVGQPTVGKL
NEIDYKTKEVKVEIDVLSKPNQTHYRALLVRPQQMFKHHHHHH

Teoretické pI: 5,93; Mw: 66570,45

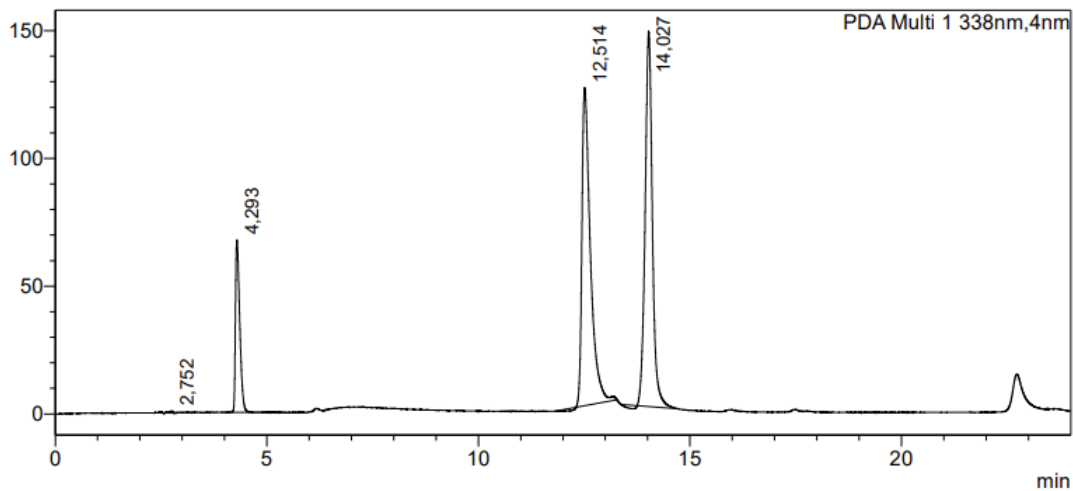
S His-kotovou: teoretické pI: 6,12; Mw: 67393,29 Da

Příloha 2: Příklady HPLC analýzy reakčních směsí katalyzovaných AST

Reakční směs s apigeninem katalyzovaná *Dsp*AST

Retenční časy látek: *p*-NPS ($t_R = 4,293$ min), APIS ($t_R = 12,514$ min), *p*-NP ($t_R = 14,027$ min), apigenin nebyl detekován

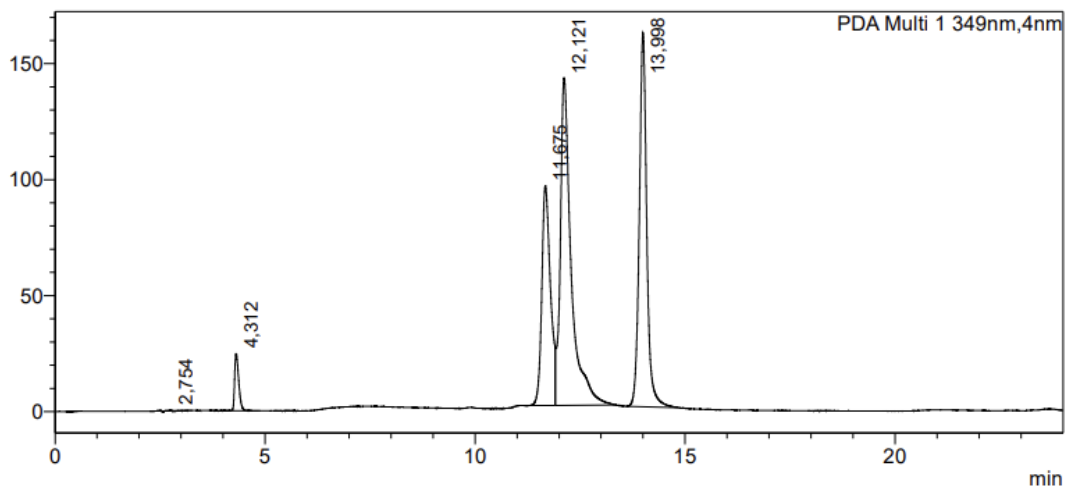
mAU



Reakční směs s luteolinem katalyzovaná *Dsp*AST

Retenční časy látek: *p*-NPS ($t_R = 4,312$ min), LS ($t_R = 11,675$ min), *p*-NP ($t_R = 13,998$ min), luteolin nebyl detekován

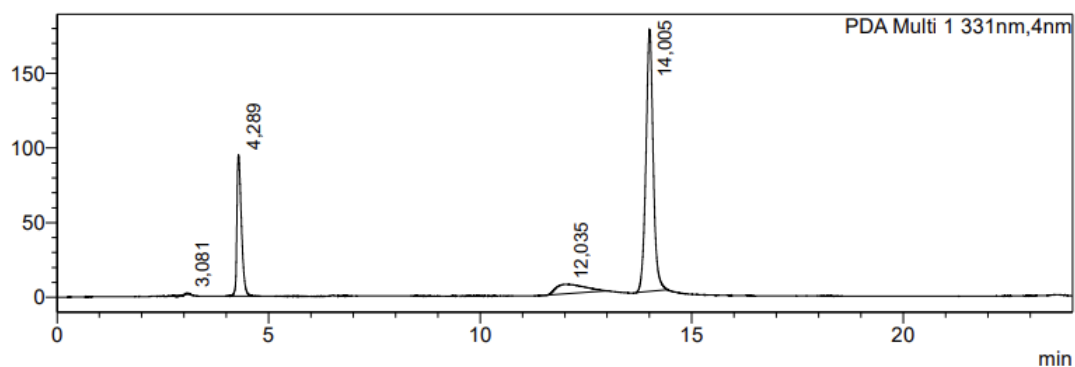
mAU



Reakční směs s kaempferolem katalyzovaná *DspAST*

Retenční časy látek: *p*-NPS ($t_R = 4,289$ min), KS ($t_R = 12,035$ min),
p-NP ($t_R = 14,005$ min), kaempferol nebyl detekován

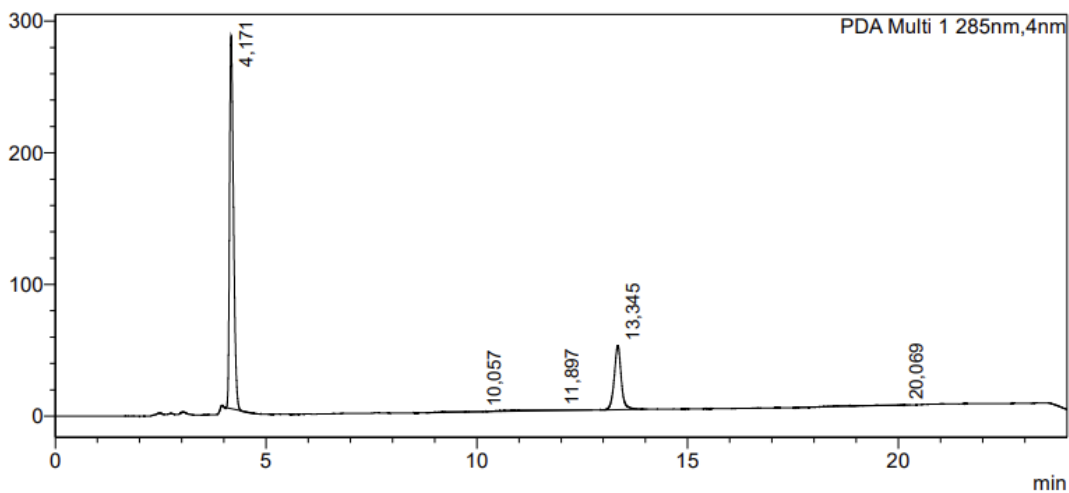
mAU



Reakční směs s kvercetinem katalyzovaná *DspAST*

Retenční časy látek: *p*-NPS ($t_R = 4,171$ min), QS ($t_R = 11,897$ min),
p-NP ($t_R = 13,345$ min), kvercetin nebyl detekován

mAU



Reakční směs s myricetinem katalyzovaná *Dsp*AST

Retenční časy látek: *p*-NPS ($t_R = 4,189$ min), MYRS ($t_R = 11,500$ min),
p-NP ($t_R = 13,373$ min), myricetin nebyl detekován

