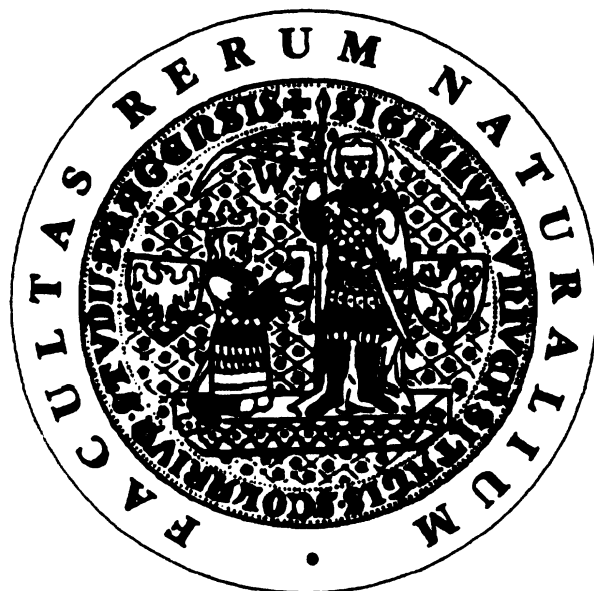


-9
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

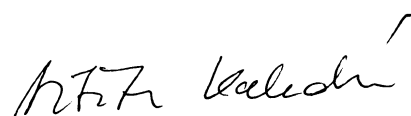


**Vlastnosti β -N-acetylhexosaminidas
z vláknitých hub**

Školitelka: RNDr. Helena Ryšlavá, CSc.

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky RNDr. Heleny Ryšlavé, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

V Praze dne 30. 4. 2008

Handwritten signature in black ink, appearing to read "Hana Kaludová".

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji své školitelce, RNDr. Heleně Ryšlavé, CSc., za vstřícný přístup, neocenitelné rady, nekonečnou trpělivost a obětavou pomoc při zpracování této diplomové práce. Dále děkuji Mgr. Veronice Doubnerové za podnětné připomínky a vytvoření kreativního pracovního prostředí.

Mé díky patří také Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DrSc. za poskytnutí nejen výchozího materiálu, ale i pracovního prostoru a příležitosti spolupráce. Děkuji i Mgr. Hynku Mrázkovi, bez něhož by purifikace nebyla úspěšná, a celému kolektivu Laboratoře proteinové architektury MBÚ AV ČR.

V neposlední řadě děkuji Prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. za poskytnutí N-acyl modifikovaných substrátů a neocenitelných zkušeností, Ing. Kristýně Slámové za pomoc při provedení experimentů a všem členům Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR za spolupráci.

SEZNAM ZKRATEK

CCF	Culture Collection of Fungi
Fast Red Violet LB	5-chloro-4-benzamido-2-methylbenzediazoniumchlorid-hemi chlorid zinečnatý
GalNAc	N-acetyl-D-galaktosamin
GalNAc-asa	aktivita β -N-acetylhexosaminidasy vzhledem k odštěpování β -D-GalNAc
Glc	D-glukosa
GlcN	D-glukosamin
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
(GlcNAc) ₂	chitobiosa
(GlcNAc) ₃	chitotriosa
GlcNAc-asa	aktivita β -N-acetylhexosaminidasy vzhledem k odštěpování β -D-GlcNAc
Man	D-mannosa
ManNAc	N-acetyl-D-mannosamin
4-MU	4-methylumbelliferon
4-MU-GlcNAc	4-methylumbelliferyl-N-acetyl- β -D-glukosaminid
MurNAc	N-acetyl-D-muramová kyselina, 2-acetamido-2-deoxy-3-O-(D-1- karboxyethyl)-D-glukopyranosa
naftol-AS BI-GlcNAc	3-[[2-(acetylamino)-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl]oxy]-7-bromo- N-(2-methoxyfenyl)-naftalenkarboxamid
NAG-thiazolin	1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glukopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazolin
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
p-NP	p-nitrofenol
p-NP-GalNAc	p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-galaktosaminid
p-NP-GlcNAc	p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-glukosaminid
p-NP-(GlcNAc) ₂	p-nitrofenyl-N,N'-diacetylchitobiosid
p-NP-GlcN-R	p-nitrofenyl-N-acyl- β -D-glukosaminid (N-acyl modifikované substráty)
PUGNAc	O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosyliden)amino-N- fenylkarbamát
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	7
1. ÚVOD	7
1.1 β -N-acetylhexosaminidasa.....	7
1.2 Vláknité houby	7
1.2 β -N-acetylhexosaminidasa a další glykosidasy s podobnou aktivitou.....	9
1.3 Začlenění β -N-acetylhexosaminidasy do skupin glykosidas.....	10
1.4 Mechanismus reakce katalyzované glykosidasami a β -N-acetylhexosaminidasou	11
1.4.1 Glykosidasy invertující anomerickou konfiguraci	11
1.4.2 Glykosidasy zachovávající anomerickou konfiguraci	11
1.4.3 Mechanismus reakce β -N-acetylhexosaminidasy	12
1.5 Struktura molekuly β -N-acetylhexosaminidasy.....	14
1.5.1 Struktura lidské a živočišné β -N-acetylhexosaminidasy.....	14
1.5.2 Struktura rostlinné β -N-acetylhexosaminidasy.....	14
1.5.3 Struktura bakteriální β -N-acetylhexosaminidasy.....	15
1.5.4 Fungální β -N-acetylhexosaminidasa	15
1.5.4.1 Stavba molekuly β -N-acetylhexosaminidasy z <i>Aspergillus oryzae</i>	15
1.5.4.2 Trojrozměrná struktura β -N-acetylhexosaminidasy z <i>Aspergillus oryzae</i> ...	18
1.6 Funkce β -N-acetylhexosaminidasy	20
1.6.1 Funkce lidské a živočišné β -N-acetylhexosaminidasy	20
1.6.2 Funkce rostlinné β -N-acetylhexosaminidasy	21
1.6.3 Funkce bakteriální β -N-acetylhexosaminidasy.....	21
1.6.4 Funkce fungální β -N-acetylhexosaminidasy	22
1.7 Substrátová specifita β -N-acetylhexosaminidasy	23
1.7.1 Přirozené substráty	23
1.7.2 Umělé substráty	24
1.7.3 Substrátová specifita fungální β -N-acetylhexosaminidasy	25
1.7.4 Inhibitory fungální β -N-acetylhexosaminidasy	26
1.8 Využití β -N-acetylhexosaminidasy	28
2. CÍL PRÁCE.....	30

3. MATERIÁL A METODY	31
3.1 Použité přístroje.....	31
3.2 Materiál.....	31
3.3 Použité chemikálie.....	31
3.4 Metody.....	32
3.4.1 Chromatografické separace	32
3.4.1.1 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci fenyl-Sepharosy	32
3.4.1.2 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci S-Sepharosy	33
3.4.1.3 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Mono Q.....	33
3.4.1.4 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Superdex 200.....	33
3.4.1.5 Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy v zachycených frakcích po chromatografické separaci	34
3.4.2 Deglykosylace β -N-acetylhexosaminidasy.....	34
3.4.3 Stanovení obsahu proteinů.....	34
3.4.4 Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy.....	34
3.4.5 Vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy	35
3.4.6 Vliv pH na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy	35
3.4.7 Stanovení kinetických parametrů pro p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc.....	35
3.4.8 Stanovení kinetických parametrů pro 4-MU-GlcNAc.....	36
3.4.9 Vliv teploty na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy	36
3.4.10 Vliv teploty na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy.....	36
3.4.11 Vliv solí na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy	37
3.4.12 Vliv GlcNAc, GalNAc a NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou.....	37
3.4.13 Elektroforetické separace	38
4. VÝSLEDKY	40
4.1 Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy	40
4.1.1 Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z <i>Aspergillus oryzae</i>	40
4.1.2 Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF 1959	44

4.2 Deglykosylace β -N-acetylhexosaminidasy z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF 3438 a <i>Aspergillus oryzae</i>	47
4.3 Vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy	48
4.4 Vliv pH na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF 3438 ..	49
4.5 Stanovení kinetických parametrů pro substráty p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc	50
4.6 Stanovení kinetických parametrů pro substrát 4-MU-GlcNAc	56
4.7 Vliv teploty na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy	58
4.8 Vliv teploty na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy	60
4.9 Vliv solí na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy	62
4.10 Vliv GlcNAc, GalNAc a NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou	65
4.10.1 Vliv GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou.	65
4.10.2 Vliv GalNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou	67
4.10.3 Vliv NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou	69
4.11 Aktivita β -N-acetylhexosaminidasy s modifikovanými substráty	71
4.12 Elektroforetická separace β -N-acetylhexosaminidasy za nativních podmínek	73
5. DISKUZE	75
5.1 Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z <i>Aspergillus oryzae</i> a <i>Penicillium oxalicum</i> CCF 1959	75
5.2 Vlastnosti β -N-acetylhexosaminidasy	76
5.2.1 Struktura molekuly β -N-acetylhexosaminidasy	76
5.2.2 pH závislosti	77
5.2.3 Substrátová specifita	77
5.2.4 Teplotní závislosti	79
5.2.5 Inhibitory β -N-acetylhexosaminidasy	80
5.2.6 GlcNAc-asová a GalNAc-asová aktivita	80
5.3 Význam oligosacharidů v molekule β -N-acetylhexosaminidasy	81
5.3 Porovnání β -N-acetylhexosaminidasy z <i>Penicillium oxalicum</i> CCF 3438 a 1959 ..	82
5.4 Porovnání β -N-acetylhexosaminidasy z <i>Penicillium oxalicum</i> a <i>Aspergillus oryzae</i>	82
6. SOUHRN	84
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	85

1. ÚVOD

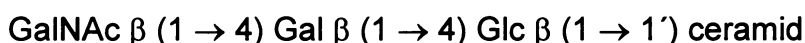
1.1 β -N-acetylhexosaminidasa

β -N-acetylhexosaminidasa (E.C. 3.2.1.52, β -N-acetyl-D-hexosaminid-N-acetylhexosaminohydrolasa) je exohydrolasa katalyzující štěpení koncového neredukujícího β -N-acetyl-D-glukosaminidu (GlcNAc, Obr. 1) nebo β -N-acetyl-D-galaktosaminidu (GalNAc, Obr. 1) z široké škály glykokonjugátů [1]. Příklad reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou probíhající v lidském organismu je uveden na obr. 2 [2].

Možné alternativní názvy pro β -N-acetylhexosaminidasu jsou β -hexosaminidasa, hexosaminidasa a N-acetyl- β -glukosaminidasa [3].



Obr. 1: D-GlcNAc (vlevo) a D-GalNAc (vpravo) v konfiguraci β vázané O-glykosidickou vazbou na aglykon (R)



Obr. 2: Štěpení glykolipidu β -N-acetylhexosaminidasou [2]

1.2 Vlákňité houby

Říše hub je rozdělena do pěti oddělení, a to: mikrosporidie (*Microsporidiomycota*), chitridiomycety (*Chitridiomycota*), zygomycety (*Zygomycota*), houby vřecovýtrusné (*Ascomycota*) a houby stopkovýtrusné (*Basidiomycota*) [4].

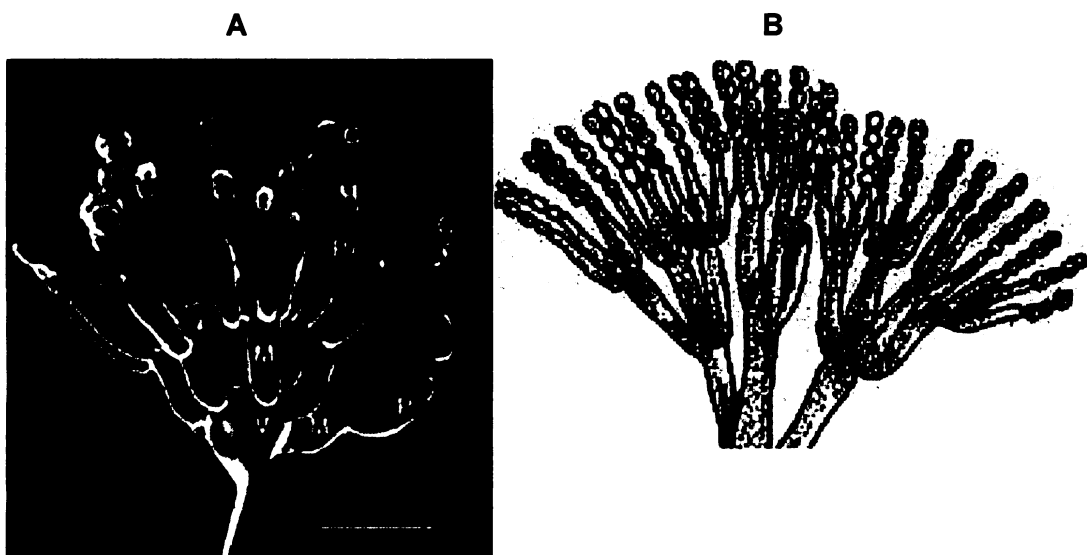
Pro vegetativní stélku (tělo houby) oddělení *Microsporidiomycota* jsou charakteristické samostatné jednojaderné nebo dvoujaderné buňky, výjimečně jakási plazmodia (vícejaderné buňky rovněž se samostatnými nebo dikaryotickými jádry) [5].

V oddělení *Chitridiomycota* tvoří vegetativní stélku jediná buňka, v odvozenějších typech oddělení představovaná nepřehrádkovanými hyfami (vlákno houby) s větším počtem jader [5].

Vegetativní stélka v oddělení *Zygomycota*, *Ascomycota* a *Basidiomycota* je myceliální, tzn. je tvořena vláknitými hyfami (myceliem), jen výjimečně je tvořena jednotlivými nepravidelně laločnatými buňkami nebo kulovitými až elipsoidními buňkami se schopností tvorby pseudomycelia vzniklého pučením. Některé vývojově odvozenější typy hub z těchto tří oddělení mají přehrádkované hyfy. Hyfa je potom rozdělena na vícejaderné, dvoujaderné či jednojaderné úseky. Pokud jsou přítomny nepřehrádkované hyfy (*Chitridiomycota*, většina zástupců oddělení *Zygomycota*) tvoří se přehrádky (septa) alespoň při tvorbě reprodukčních struktur nebo ve starších hyfách. Pokud se v některých druhích vyskytují jednotlivé, obvykle kvasinkovité buňky, ale i vláknité mycelium, hovoříme o dimorfismu [5].

Mezi vláknité houby patří například rody *Aspergillus* (Obr. 3A), *Penicillium* (Obr. 3B), *Neurospora*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Stachybotrys* a další [6].

Příprava a práce s β -N-acetylhexosaminidasou z hub má několik výhod. Enzym je sekretován do kultivačního média, je inducibilní a jeho produkci lze regulovat použitím různých induktorů [7], z nichž nejefektivnější jsou chitooligomery nebo GlcNAc [8]. Enzym je stabilní po dobu několika měsíců [9, 10].



Obr. 3: Hyfy rodů *Aspergillus* (A) [11] a *Penicillium* (B) [12].

1.2 β -N-acetylhexosaminidasa a další glykosidasy s podobnou aktivitou

V roce 1974 Every a Ashworth pomocí imunochemických studií potrdili, že za odštěpení koncového GlcNAc (GlcNAc-asová aktivita) i GalNAc (GalNAc-asoá aktivita) je zodpovědný pouze jeden protein [13]. Z tohoto důvodu byly z enzymové nomenklatury IUBMB odstraněny dosavadní E.C. 3.2.1.29 (chitobiasa) a E.C. 3.2.1.30 (β -N-acetylglukosaminidasa) a nahrazeny E.C. 3.2.1.52 (β -N-acetylhexosaminidasa) [3].

Kromě β -N-acetylhexosaminidasy, která je lyzozomální, asociovaná s membránou nebo sekretovaná, existují i NCOAT (Nuclear cytoplasmic O-GlcNAc-ase and acyltransferase), jaderné a cytoplazmatické β -N-acetylglukosaminidasy a acyltransferasy, tzv. O-GlcNAc-asy. Tyto enzymy nejen odštěpují GlcNAc vázaný na Ser (Thr) jaderných a cytoplazmatických proteinů, ale mají i acyltransferasovou aktivitu (E.C. 2.3.1.48) [14].

Endo- β -N-acetylhexosaminidasa (mannosyl glykoprotein, di-N-acetylchitobiosyl- β -N-acetylglukosaminidasa E.C. 3.2.1.96) katalyzuje hydrolýzu chitobiosylových jednotek v glykokonjugátech s vysokým obsahem mannosy obsahujících strukturu $-(\text{Man}(\text{GlcNAc})_2)\text{Asn}-$. Jeden GlcNAc zůstává navázán na protein, zbytek struktury zůstává nezměněn. Dochází tedy ke štěpení vazby mezi dvěma GlcNAc [3].

Chitinasa (chitodextrinasa, 1,4- β -poly-N-acetylglukosaminidasa, E.C. 3.2.1.14) katalyzuje náhodné štěpení β (1 \rightarrow 4) N-acetylglukosaminidových vazeb v chitinu a chitodextrinu [3].

β -N-acetylgalaktosaminidasa (E.C. 3.2.1.53) katalyzuje hydrolýzu koncového neredukujícího β -vázaného GalNAc z glykokonjugátů [3].

Kromě β -N-acetylhexosaminidasy, štěpící β -glykosidickou vazbu, existuje i α -N-acetylglukosaminidasa (E.C. 3.2.1.50) a α -N-acetylgalaktosaminidasa (E.C. 3.2.1.49) katalyzující štěpení příslušných neredukujících monosacharidových jednotek vázaných α -glykosidickou vazbou [3].

Vedle přírodního polymeru chitinu existuje i chitosan, což je zcela nebo částečně deacetylovaný chitin. Enzymy schopné štěpit chitosan jsou chitosanasa (E.C. 3.2.1.132) [3] a β -glukosaminidasa [15, 16, 17] (bez přiděleného E.C.), což je exohydrolasa odštěpující koncové β -GlcN.

1.3 Začlenění β -N-acetylhexosaminidasy do skupin glykosidas

Podle systému IUBMB jsou enzymy rozděleny do skupin (E.C.) na základě typu katalyzované reakce a substrátové specifity [18]. V roce 1991 poukázal Henrissat [18] také na nutnost klasifikovat O-glykosidas na základě struktury a navrhl jejich první rozdělení podle aminokyselinové sekvence. 291 glykosidas bylo rozděleno do 35 rodin. Se vzrůstajícím počtem známých sekvencí glykosidas byl aktualizován i počet rodin – 45 v roce 1993 [19] a 57 v roce 1996 [20].

Vzhledem k tomu, že trojrozměrná struktura proteinu je více konzervovaná než aminokyselinová sekvence, byl navržen a následně potvrzen předpoklad, že několik rodin je možno seskupit do klanu, pro nějž je charakteristická stejná evoluční linie, strukturní motiv a konzervované katalytické centrum včetně mechanismu katalýzy [19, 20]. Na těchto principech je založena databáze CAZy (Carbohydrate Active Enzymes, www.cazy.org), která k 11. 2. 2008 obsahuje 112 rodin rozdělených do 12 klanů [21].

Většina bakteriálních β -N-acetylhexosaminidas je zařazena do rodiny 3 (např. *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*), eukaryotní pak do rodiny 20 (*Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*) i do rodiny 84 (*Rattus norvegicus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*). V rodině 84 jsou ale zařazeny enzymy NCOAT (Nuclear cytoplasmic O-GlcNAcase and acetyltransferase) [21].

Rodina 3 není začleněna v klanu a neobsahuje strukturní prvek, rodina 20 patří do GH-K (Glycoside hydrolase-K) klanu, pro nějž je typickým strukturním prvkem TIM barel (β/α)₈. Rodina 84 není součástí klanu, ale typickým strukturním motivem je pro ni rovněž TIM barel [21].

Fungální β -N-acetylhexosaminidasy jsou zařazeny v rodině 20 (*Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium chrysogenum*) [21], obsahují tedy strukturní motiv TIM barelu. Katalytické centrum je vysoce konzervované s jedním aminokyselinovým zbytkem, glutamátem, který funguje jako místo pro acidobazickou katalýzu – je donorem H⁺, zatímco akceptorem je pak karbonylový kyslík acetamidu na C-2 substrátu [22].

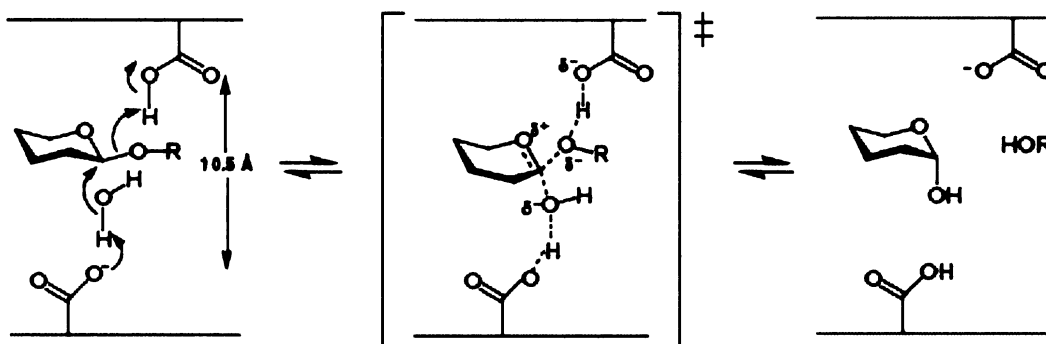
1.4 Mechanismus reakce katalyzované glykosidasami a β -N-acetylhexosaminidasou

Mechanismus katalýzy jednotlivých glykosidas je stále studován. Jeho znalost je podmínkou jak pro návrh účinných inhibitorů, tak pro proteinové inženýrství, které umožňuje změnu vlastností glykosidas [23]. Glykosidas lze na základě mechanismu hydrolyzy glykosidické vazby rozdělit do dvou skupin: glykosidasy invertující anomerickou konfiguraci (Obr. 4) a glykosidasy zachovávající anomerickou konfiguraci (Obr. 5, str. 12) [24].

1.4.1 Glykosidasy invertující anomerickou konfiguraci

Společné pro oba mechanismy hydrolyzy je to, že dochází ke vzniku oxokarbeniového tranzitního stavu [25].

Glykosidasy invertující konfiguraci fungují na principu jednokrokové acidobazické katalýzy, kde odstupující skupina je přímo nahrazena nukleofilní vodou (Obr. 4). Reakce se účastní dva karboxyly enzymu, kde jeden se chová jako báze a druhý jako kyselina [25].

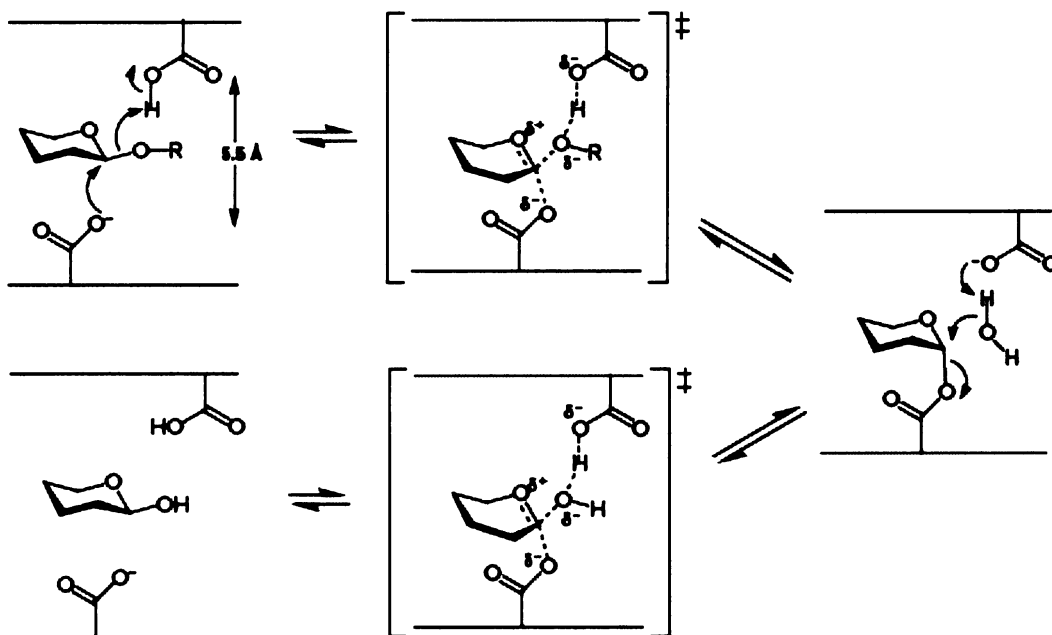


Obr. 4: Mechanismus glykosidas invertující anomerickou konfiguraci probíhající jednokrokovou záměnou [25].

1.4.2 Glykosidasy zachovávající anomerickou konfiguraci

Glykosidasy zachovávající konfiguraci využívají systému dvojité záměny (Obr. 5, str. 12). Tato reakce vyžaduje dva katalytické karboxyly: acidobazický a nukleofilní. V prvním kroku (glykosylaci) dochází ke dvěma simultánním dějům: odštěpení odstupující skupiny katalyzované acidobazickým karboxylem a zároveň nukleofilní atak druhého karboxylu, který vede ke vzniku glykosyl-enzymového inetermediátu. V druhém kroku (deglykosylaci) acidobazický karboxyl aktivuje přicházející nukleofil (voda nebo jiný

akceptor), který následně hydrolyzuje glykosyl-enzymový intermediát za vzniku nové glykosidické vazby [26]. Tyto glykosidasy mají často transglykosylační aktivitu [23].



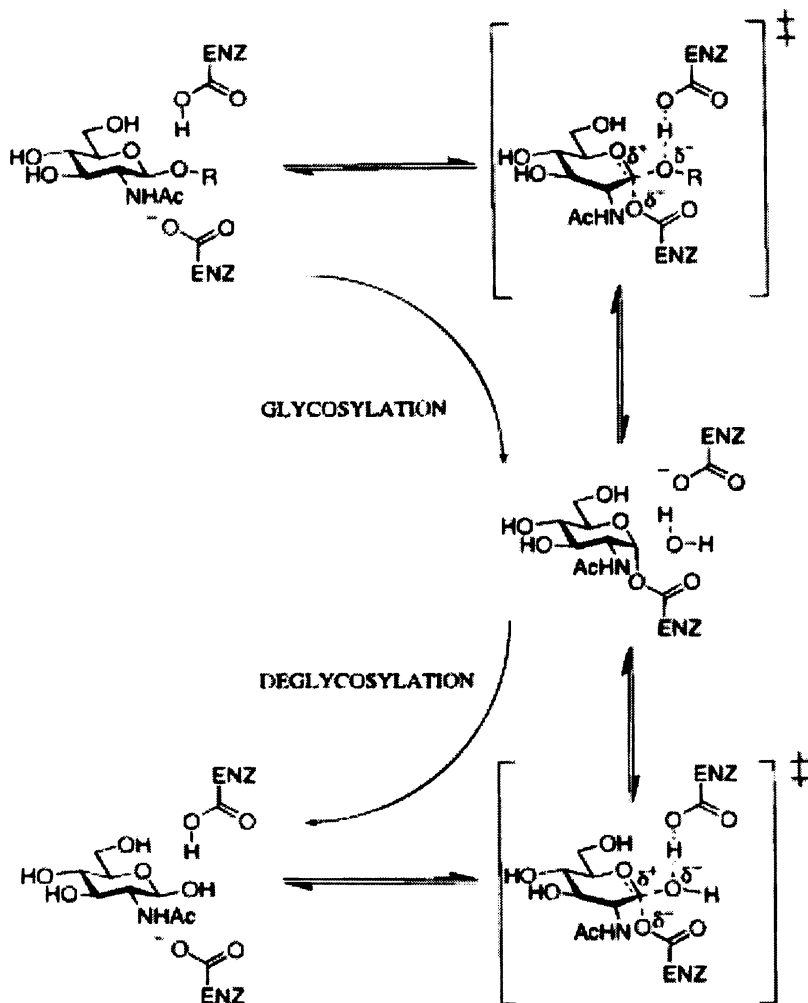
Obr. 5: Mechanismus glykosidas zachovávajících anomerickou konfiguraci probíhající dvoukrokově [25].

1.4.3 Mechanismus reakce β -N-acetylhexosaminidasy

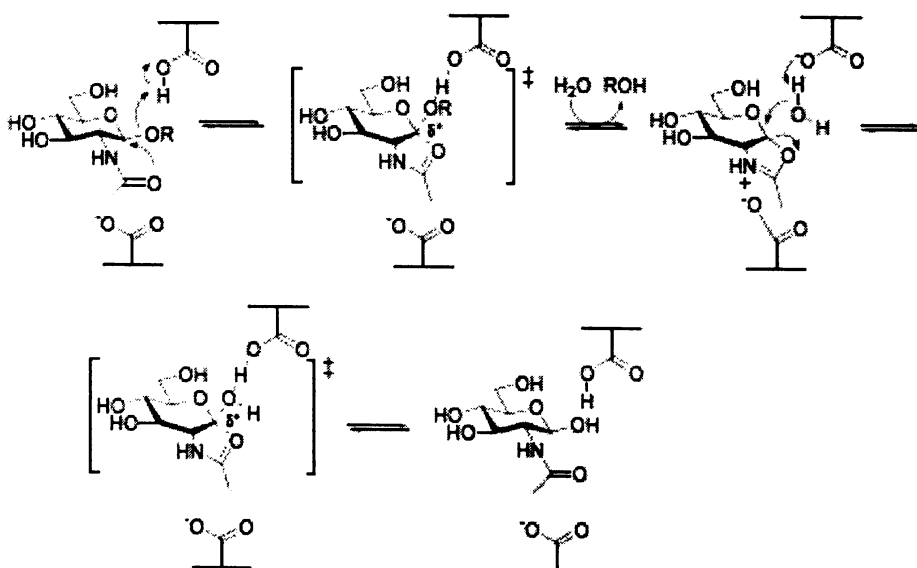
β -N-acetylhexosaminidasy rodiny 3 i 20 hydrolyzují mechanismem zachovávajícím anomerickou konfiguraci. Mezi oběma mechanismy je ale rozdíl [27].

β -N-acetylhexosaminidasa rodiny 3 zachovává postup obecně navržený pro glykosidasy zachovávající anomerickou konfiguraci, jak je ukázáno na obr. 6 (str. 13) [27].

β -N-acetylhexosaminidasa rodiny 20, do níž patří i fungální enzym [21], reaguje atypickým mechanismem zachovávajícím anomerickou konfiguraci, kde funkci nukleofilu přebírá 2-acetamidová skupina substrátu samotného, která interaguje s anomerickým uhlíkem sacharidu, což vede ke vzniku oxazoliniového intermediátu (Obr. 7 str. 13) [27]. Karboxylová skupina enzymu napomáhá stabilizaci oxazoliniového intermediátu. [28].



Obr. 6: Mechanismus hydrolýzy β -N-acetylhexosaminidasy rodiny 3 využívající klasické schéma glykosidas zachovávajících anomerickou konfigurací [27].



Obr. 7: Mechanismus β -N-acetylhexosaminidasy rodiny 20 využívající substrát jako nukleofil [23].

1.5 Struktura molekuly β -N-acetylhexosaminidasy

1.5.1 Struktura lidské a živočišné β -N-acetylhexosaminidasy

Lidská β -N-acetylhexosaminidasa je kódována dvěma geny HexA a HexB. Enzym je lysozomální, jedná se o dimer složený z podjednotek α a β a vyskytuje se ve formě 3 izoenzymů: β -N-acetylhexosaminidasa A složená z α a β podjednotek, β -N-acetylhexosaminidasa B složená ze dvou β podjednotek a minoritní β -N-acetylhexosaminidasa S složená ze dvou α podjednotek [29]. V monomerním stavu není aktivní [30]. Podjednotky jsou syntetizovány ve formě preproproteinů a jejich úprava včetně glykosylace probíhá v endoplazmatickém retikulu. Podjednotky α jsou před asociací do dimerů fosforylovány, asociace s β podjednotkami probíhá pravděpodobně v Golgiho aparátu [31]. Propeptidy jsou odštěpeny a následně kovalentně navázány k nativní β -N-acetylhexosaminidase prostřednictvím disulfidových můstků [32]. Molekulová hmotnost podjednotek včetně propeptidů je asi 62 kDa pro α a 58 až 65 kDa pro β [33].

Myší β -N-acetylhexosaminidasa je rovněž lysozomální enzym vyskytující se ve třech izoenzimech (A, B, S) podobných lidskému. Gen kódující podjednotku α u myši (Hexa) se v 84 % shoduje s lidským (HexA) a gen kódující podjednotku β (Hexb) u myši se shoduje v 75 % s lidským (HexB) [34].

Lidská β -N-acetylhexosaminidasa A má širokou substrátovou specifitu a katalyzuje odštěpení β -GlcNAc i β -GalNAc ze širokého spektra substrátů zahrnujících glykoproteiny, oligosacharidy, glykolipidy a glykosaminoglykany. β -N-acetylhexosaminidasa B je schopna katalyzovat štěpení mnoha substrátů s výjimkou G_{M2} gangliosidu. β -N-acetylhexosaminidasa S má nízkou aktivitu [31]. Z experimentů vyplývá, že i myší β -N-acetylhexosaminidasa vykazuje podobnou specifitu [34].

1.5.2 Struktura rostlinné β -N-acetylhexosaminidasy

Struktura rostlinných β -N-acetylhexosaminidas je velmi rozmanitá. Všechny rostlinné β -N-acetylhexosaminidasy (podobně jako enzym živočišný, bakteriální i z hub) obsahuje jedno aktivní místo pro konjugáty p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc [35, 36].

β -N-acetylhexosaminidasa se vyskytuje ve formě monomeru například v listech salátu (M_r 65 kDa) [37], v mladých rostlinách kukuřice (M_r 70 kDa) [38], v semenech sladového ječmene (M_r 92 kDa) [39].

Ve formě homodimeru (M_r podjednotky 53 kDa) se β -N-acetylhexosaminidasa vyskytuje v semenech fazolu obecného [40]. Jablko (plod) obsahuje β -N-acetylhexosaminidasu ve formě homooktameru, složeného z podjednotek o molekulové hmotnosti 29 kDa [41]. β -N-acetylhexosaminidasa z listů zelí je trimer složený ze tří různých podjednotek o molekulových hmotnostech 64; 57 a 51 kDa [42].

V listech pšenice je β -N-acetylhexosaminidasa obsažena ve formě pěti izoenzymů [35], v paprice (plod) ve třech izoenzimech [37], v semenech rýže v sedmi [36].

Semena hrachu obsahují čtyři izoformy (I, II, III, IV), všechny byly izolovány z dělohy a každá má molekulovou hmotnost 210 kDa. Forma II se skládá ze dvou párů heterogenních podjednotek 62 a 64 kDa [43].

1.5.3 Struktura bakteriální β -N-acetylhexosaminidasy

Bakteriální β -N-acetylhexosaminidasy jsou převážně asociované s membránou [44]. Jejich struktura a molekulové hmotnosti se liší u jednotlivých organismů. Tento enzym z termotolerantního organismu *Bacillus sp.* NCIM 5120 je homotetramer o celkové molekulové hmotnosti 240 kDa [45], z *Bacillus stearothermophilus* je monomer o 74 kDa [46], z *Thermococcus kodakaraensis* je homodimer o molekulové hmotnosti 180 kDa [47], z *Trichinella spiralis* 50 kDa (neurčeno podjednotkové složení) [48], z *Escherichia coli* je monomer o 36 kDa [49], z *Trichomonas vaginalis* má celkovou molekulovou hmotnost 200 kDa a skládá se z podjednotek o 64, 66 and 72 kDa [50].

1.5.4 Fungální β -N-acetylhexosaminidasa

Fungální β -N-acetylhexosaminidasy jsou enzymy extracelulárně sekretované, od roku 1979 byly popsány jejich vlastnosti z mnoha zdrojů [51]. Informace o molekulových hmotnostech, podjednotkové struktuře a způsobu jejich určení jsou uvedeny v tab. 1, (str. 17). Většina těchto enzymů je glykosylována [52, 53, 54, 55, 56].

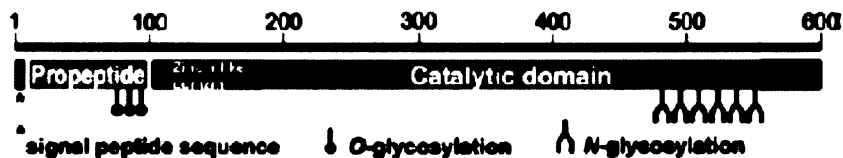
1.5.4.1 Stavba molekuly β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*

β -N-acetylhexosaminidasa z *Aspergillus oryzae*, je složena z několika domén: signální peptid, propeptid, „zincin-like“ doména, katalytická doména typická pro glykosidasy rodiny 20 [57] a C-terminální část (obr. 8, str. 16) [58].

Extracelulární β -N-acetylhexosaminidasa se může vyskytovat ve dvou formách: dimer katalytických podjednotek obsahující jednu nebo dvě molekuly nekovalentně vázaného propeptidu. Druhá ze zmíněných forem má dvojnásobnou aktivitu oproti první

formě. Propeptid hraje významnou roli nejen při regulaci aktivity enzymu, ale i jeho dimerizaci a sekreci [44].

Existuje i intracelulární β -N-acetylhexosaminidasa, která je ale narozdíl od extracelulární monomerní [44].



Obr. 8: Schéma domén a glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* [58]

Vzhledem k tomu, že propeptid je ke katalytické podjednotce vázán nekovalentně, musí být prekurzor enzymu intracelulárně procesován. V endoplazmatickém retikulu probíhá odštěpení signálního peptidu a glykosylace. Úprava, zahrnující odštěpení propeptidu dibasickou proteasou na dvou dibasických místech, probíhá jako ko- nebo post-translační proces rovněž v endoplazmatickém retikulu [44]. Nekovalentní asociace propeptidu s katalytickou podjednotkou je rychlá a specifická a předchází dimerizaci [44].

Plíhal a kol. prokázali [44], že dimerizovat tedy může pouze katalytická podjednotka asociovaná s propeptidem. Rychleji také vzniká dimer ze dvou párů katalytická podjednotka a propeptid než z katalytické podjednotky s propeptidem a katalytické podjednotky bez propeptidu. [44]

Katalytická podjednotka o molekulové hmotnosti 65 kDa je N-glykosylována (Obr. 8) na 6 místech oligosacharidy mannosového typu, kde dominantní je hexamannosylový řetězec [44, 59]. Narozdíl od katalytické podjednotky je propeptid o molekulové hmotnosti 15 kDa O-glykosylován na třech místech (Obr. 8) [58]. Forma složená ze dvou katalytických podjednotek a dvou propeptidů má tedy molekulovou hmotnost 160 kDa [44]. Úplná deglykosylace enzymu pomocí N-glykosidasy vede k precipitaci [58].

Transkripce β -N-acetylhexosaminidasy je během růstu buněk konstantní, její sekrece do extracelulárního prostoru je regulována množstvím propeptidu v endoplazmatickém retikulu [44]. Pokud metabolismus houby vyžaduje vysokou β -N-acetylhexosaminidasovou aktivitu, je obsah propeptidu v endoplazmatickém retikulu vysoký a je syntetizována forma obsahující dva propeptidy. Pokud buňka požaduje snížení produkce β -N-acetylhexosaminidasy, je propeptid aktivně transportován do cytosolu a jeho hladina v endoplazmatickém retikulu je minimální [44]. Změny v produkci β -N-acetylhexosaminidasy souvisí s vývojem buňky, např. na počátku růstu, resp. na

Tab. 1: Molekulové hmotnosti (M_r) β -N-acetylhexosaminidasy z fungálních zdrojů včetně způsobu jejich určení a podjednotkové struktury

Zdroj β -N-acetylhexosaminidasy	M_r nativního enzymu	Podjednotková struktura	Způsob určení M_r
<i>Aspergillus nidulans</i> [62]	68 kDa	N	sekvence genu
<i>Aspergillus nidulans</i> [52]	190 kDa	N	GPC
<i>Aspergillus niger</i> [63]	149 kDa	N	AA sekvence
<i>Aspergillus niger</i> 419 [64]	131 kDa	N	GPC
<i>Aspergillus oryzae</i> [44]	160 kDa	homodimer 2 x 65 kDa + propeptidy 2 x 15 kDa	GPC, SDS-PAGE, nativní elektroforéza
<i>Bipolaris sorokiniana</i> [53]	120 kDa	homodimer 2 x 55 kDa	GPC, SDS-PAGE
<i>Candida albicans</i> [54]	A: 350 kDa B: 600 kDa	A: 85 kDa B: 132 kDa	GPC, SDS-PAGE
<i>Mucor fragilis</i> [1]	125 kDa	homodimer 2 x 70 kDa	GPC, SDS-PAGE
<i>Penicillium oxalicum</i> [55]	143 kDa 141 kDa	homodimer 2 x 68 kDa	GPC sedimentace
<i>Penicillium chrysogenum</i> [65]	141 kDa	homodimer 2 x 66,4 kDa	GPC
<i>Penicillium chrysogenum</i> [66]	66,5 kDa	N	sekvence genu
<i>Penicillium janthinellum</i> P9 [67]	35,4 kDa 45 kDa	N N	SDS-PAGE SDS-PAGE
<i>Sclerotinia fructigena</i> [68]	141 kDa	N	GPC
<i>Trichoderma harzianum</i> [69]	36 kDa	N	SDS-PAGE
<i>Trichoderma harzianum</i> [56]	124 kDa	64 kDa	GPC, SDS-PAGE
<i>Trichoderma atroviride</i> (<i>Trichoderma harzianum</i> P1) [70]	73 kDa	N	sekvence genu

Pozn.: Podjednotková struktura nebyla u mnoha β -N-acetylhexosaminidas určena (N), k určení M_r byly použity gelová chromatografie (GPC), elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí SDS (SDS-PAGE) a predikce na základě aminokyselinové sekvence (AA sekvence) nebo nukleotidové sekvence (sekvence genu).

konci stacionární fáze je potřeba vysoká aktivita, která je spojena s růstem a remodelací hyf, resp. s autolýzou stárnoucích a mrtvých buněk [44].

Rychlost sekrece β -N-acetylhexosaminidasy je také regulována propeptidem a je přímo úměrná obsahu propeptidu v molekule enzymu [44]. Enzym bez propeptidu nemůže být sekretován. Molekuly obsahující dva propeptidy tedy nejsou jen aktivnější než molekuly s jedním propeptidem, ale jsou také sekretovány rychleji. Rychlost sekrece tedy koreluje s aktivitou β -N-acetylhexosaminidasy [44].

Propeptid β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* není možno zařadit mezi propeptidy třídy I, intramolekulární chaperony, které napomáhají správnému skládání, zůstávají navázány kovalentně ke složenému proteinu a jsou nakonec odštěpeny během aktivace enzymu [60] jako například u subtilisinu [61]. Tento propeptid je možno zařadit do třídy II mezi propeptidy, které se přímo neúčastní skládání proteinu, ale participují na široké škále biologicky významných procesů [44].

Propeptid β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* udržuje enzym v aktivním stavu, což je funkce odlišná od všech dosud popsanych [44]. Podobně u lidské β -N-acetylhexosaminidasy B propeptid neinhibuje enzymovou aktivitu, ale zůstává kovalentně vázán ke katalytické podjednotce pomocí disulfidových vazeb [32].

Fungální β -N-acetylhexosaminidasy představují unikátní mechanismus asociace propeptidu s katalytickou podjednotkou: nevyžadují přítomnost cysteinu (netvoří kovalentní disulfidové můstky), nekovalentní vazba je velmi pevná za fyziologických podmínek a propeptid je nezbytný pro katalytickou funkci [44].

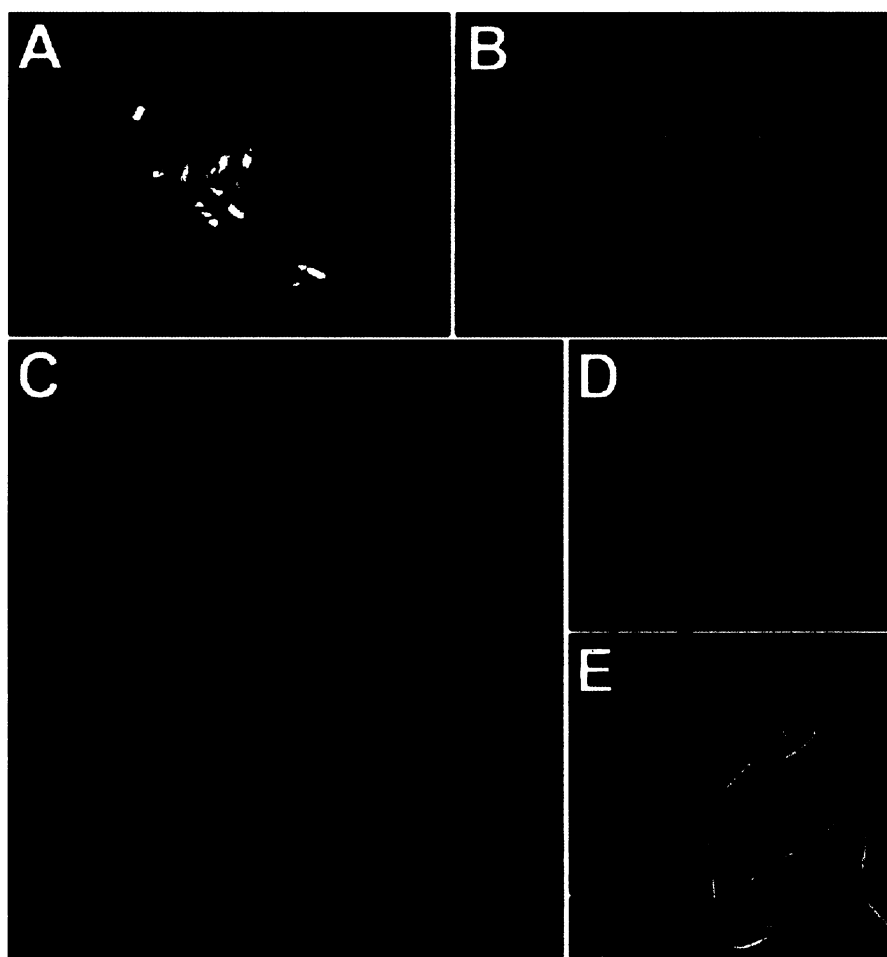
1.5.4.2 Trojrozměrná struktura β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*

Na základě známé primární struktury β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* [71] a rozřešených struktur ze *Serratia marcescens* [72], *Streptomyces plicatus* [73] a *Homo sapiens* [74] byl homologním modelováním sestaven model katalytické podjednotky a dimeru β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* [59]. V předchozích studiích krystalizace enzymu ze *Serratia marcescens* s analogem substrátu ukázala konzervované aminokyselinové zbytky Asp⁵³⁹ a Glu⁵⁴⁰ blízko aktivního centra. Glu⁵⁴⁰ je donorem protonů pro substrát, zatímco Asp⁵³⁹ orientuje svou acetamidovou skupinu tak, aby mohlo dojít k vodíkové vazbě s N2 substrátu [72]. V případě β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* se jedná o Asp³⁴⁵ a Glu³⁴⁶ [59].

Monomer podjednotky β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* obsahuje katalytické centrum se strukturou TIM barelu (β/α)₈ (Obr. 9A, 9B, str. 19, žlutá), v jehož

centru jsou umístěny aminokyselinové zbytky účastníci se katalýzy (Arg¹⁹³, Tyr⁴⁴⁵, Asp⁴⁴⁷, Trp⁴⁸², Glu⁵¹⁹, Asp³⁴⁵) a katalytický Glu³⁴⁶ na horní hranici [59].

Na základě struktury lidského dimeru β -N-acetylhexosaminidasy [74] byl Ettrichem a kol. [59] navržen i model dimeru β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (Obr. 9C, monomery červený a zelený). Styčná plocha obsahuje velmi důležité aminokyselinové zbytky: jednotlivé monomery jsou spojeny 39 vodíkovými vazbami, 19 hydrofobními vazbami a iontovými vazbami mezi Arg a His jedné podjednotky a Asp a Glu druhé podjednotky [59]. Dimerizace je reverzibilní proces, který je in vitro striktně závislý na pH a stabilizuje katalytické podjednotky. Kromě toho jedním disulfidovým můstkem, který se nevyskytuje v bakteriálních ani v lidských β -N-acetylhexosaminidasách, je ve styčné ploše jednoho monomeru zakotvena velká flexibilní smyčka (Obr. 9D, 9E smyčka žlutá, monomery červený a zelený, katalytické zbytky šedé), která zasahuje



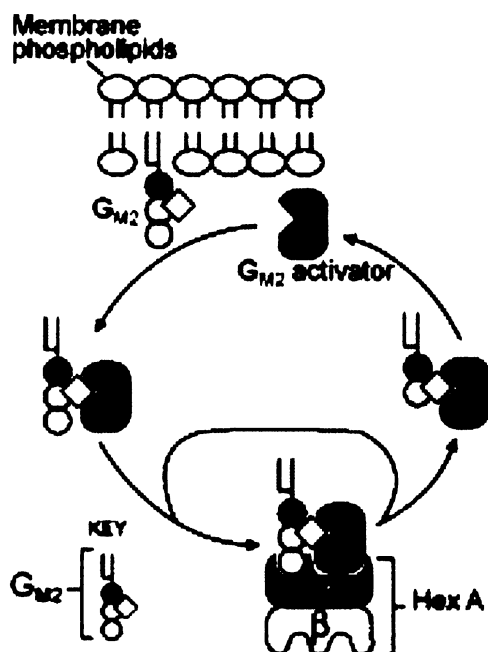
Obr. 9: Model β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* znázorňující tvar katalytické podjednotky při pohledu ze strany (A), ze shora (B) s aktivním centrem na C-konci TIM barelu (žlutý). Struktura plně N-glykosylovaného dimeru (C), monomery znázorněny červeně a zeleně. Flexibilní smyčka (žlutá) při pohledu ze strany (D) a ze shora (E) zeleného monomeru je 1 nm nad katalyticky aktivními zbytky (šedé) červeného monomeru [59].

pouze 1 nm nad aktivní centrum druhého monomeru a vytváří tak víčko nad vazným místem pro substrát. Navíc disulfidový můstek chrání aktivní místo před vlivem volného pohybu smyčky [59]. Smyčky, fungující také jako víčko, byly v minulosti nalezeny v různých enzimech obsahujících TIM barel [129].

1.6 Funkce β -N-acetylhexosaminidasy

1.6.1 Funkce lidské a živočišné β -N-acetylhexosaminidasy

Lidská β -N-acetylhexosaminidasa je lyzozomální enzym, který se vyskytuje ve třech izoenzimech A, B a S (viz. kap. 1.5.1, str. 14) [29]. β -N-acetylhexosaminidasa B štěpí především negativně nabitě substráty obsahující např. N-acetylglukosamin-6-sulfát, zatímco β -N-acetylhexosaminidasa A má afinitu k neutrálním substrátům [31]. Pouze tato forma je po asociaci s G_{M2} aktivátorem (Obr. 10) schopna štěpit G_{M2} gangliosidy, které jsou součástí membrán nervových buněk [75]. Absence β -N-acetylhexosaminidasy A vede k neurodegenerativnímu onemocnění projevujícím se hromaděním G_{M2} gangliosidů v lyzozomech neuronů. Absence aktivního enzymu může být způsobena mutací v genu HexA kódujícím α podjednotku (Tay-Sachsova choroba) nebo HexB kódujícím β podjednotku (Sandhoffova choroba) [128]. Souhrnně se všechny tyto choroby nazývají G_{M2} gangliosidosy. [34].



Obr. 10: Model metabolismu gangliosidu G_{M2} za normálních podmínek. Ke štěpení gangliosidu G_{M2} je nutná β -N-acetylhexosaminidasa A a aktivační protein [75].

Při Sandhoffově chorobě je exprimována inaktivní β -N-acetylhexosaminidasa A i B. V mozku se hromadí všechny sfingolipidy s terminálním N-acetylhexosaminem, nejen G_{M2} gangliosid, ale i asialo- G_{M2} -gangliosid a globosidy [128].

Pro studium Tay-Sachsovy choroby byly použity myší modely, které se ukázaly jako účelné pouze do té doby, než si aktivovaly další minoritní cestu odbourávání G_{M2} gangliosidu. U myší tedy β -N-acetylhexosaminidasa odbourává široké spektrum substrátů, izoformy A a B mají podobnou substrátovou specifitu, ale s mutací v genech Hexa a Hexb se myši dokážou vyrovnat přes aktivaci minoritních degradačních procesů. [75].

Kromě lysozomální je v potkanech popsána také β -N-acetylhexosaminidasa asociovaná s membránou, jak bylo zjištěno v potkaní slezině [76] a spermích [77].

U hmyzu je β -N-acetylhexosaminidasa spojena s vývojem exoskeletu [78].

1.6.2 Funkce rostlinné β -N-acetylhexosaminidasy

Role β -N-acetylhexosaminidasy v rostlinách není dosud zcela objasněna. Podobně jako v bakteriích je její funkce i v rostlinách spojována s obrannou funkcí v součinnosti s chitinasami [35].

Substrátem rostlinných β -N-acetylhexosaminidas jsou pravděpodobně především oligosacharidové řetězce glykoproteinů. V této souvislosti bylo zjištěno zvýšení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy během vývoje a dozrávání plodu rajčete a papriky. Toto zvýšení je pravděpodobně spojeno se štěpením glykoproteinů, které se procesu dozrávání účastní [37, 79].

Podobná tendence byla zjištěna i v klíčících semenech bavlny [80], *Lupinus luteus* [81] a kukuřice [38]. Předpoklad, že β -N-acetylhexosaminidasa v semenu štěpí hlavně oligosacharidové části zásobních glykoproteinů nebyl potvrzen [81].

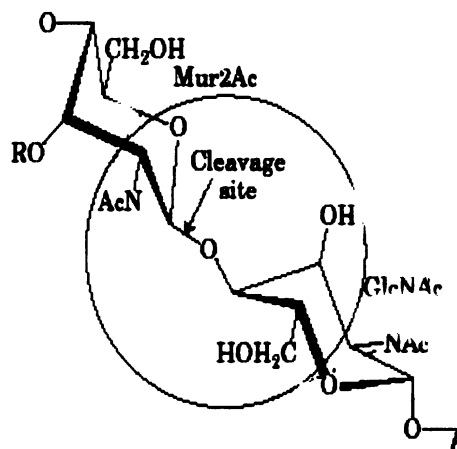
Další možnou funkcí je spolupráce β -N-acetylhexosaminidasy v procesu lignifikace způsobené fungálním patogenem a zprostředkované chitooligomery [35].

Žádná z těchto teorií o funkci rostlinné β -N-acetylhexosaminidasy ale nebyla dosud zcela potvrzena.

1.6.3 Funkce bakteriální β -N-acetylhexosaminidasy

Bakteriální β -N-acetylhexosaminidasy jsou intracelulární enzymy nejčastěji asociované s membránou, účastníci se především metabolismu mureinu, peptidoglykanu buněčné stěny [82]. Muropeptidy obsahují GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ MurNAc, který je

β -N-acetylhexosaminidasa schopna štěpit (Obr. 11). β -N-acetylhexosaminidasa z *E. coli* štěpí také GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ anhydroMurNAc, součást anhydro-muropeptidů [82].



Obr. 11: Štěpení bakteriální buněčné stěny β -N-acetylhexosaminidasou, štěpena vazba GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ MurNAc [85].

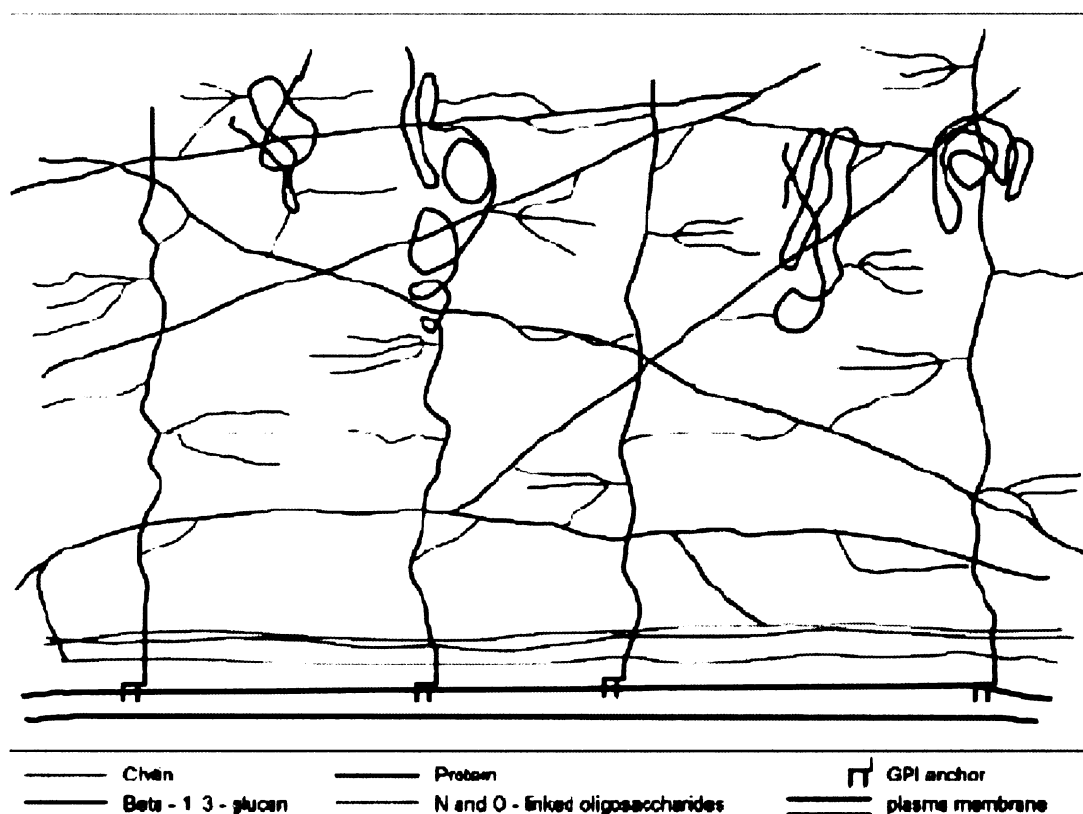
Během růstu bakterie je degradováno až 40 % buněčné stěny na anhydro-muropeptidy v mureinovém tripeptidovém metabolismu, ve kterém je murein recyklován [83]. Anhydro-muropeptidy jsou dále transportovány do cytoplazmy, kde jsou štěpeny β -N-acetylhexosaminidasou a dalšími enzymy [82] za vzniku GlcNAc, MurNAc a tripeptidu. Tripeptid pomocí ligasy váže UDP-MurNAc [84] a je tak účinně recyklován a připraven k syntéze mureinu de novo [82].

1.6.4 Funkce fungální β -N-acetylhexosaminidasy

Hlavní složky fungální buněčné stěny jsou glukán (dlouhé lineární řetězce $\beta(1\rightarrow3)$ vázané Glc), glykoproteiny a chitin (lineární řetězec $\beta(1\rightarrow4)$ vázaného GlcNAc) (Obr. 12, str. 23). Zastoupení jednotlivých složek se liší různých druhů hub [86]. U vláknitých hub (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora*) tvoří chitin až 20 % suché váhy [87].

Syntéza chitinu je zajišťována chitin synthasami, integrálními membránovými enzymy, které zajišťují přenos GlcNAc [86]. Prodlužování chitinového řetězce je směrované a chitin prochází membránou tak, jak je nasyntetizován. Tvorba vodíkových můstků mezi novými vlákny vede ke tvorbě mikrofibril. Syntéza chitinu probíhá primárně na místech aktivního růstu nebo remodelace buněčné stěny [86].

β -N-acetylhexosaminidasa se spolu s chitinasami a dalšími glykosidasami účastní binárního chitinolytického štěpení při degradaci vlastních buněčných stěn nebo jejich remodelaci [88], růstu a větvení hyf, jejich autolýzy [89], tvorby sept a plodnic [90].



Obr. 12: Buněčná stěna hub s jednotlivými komponentami [86].

β -N-acetylhexosaminidasa má také antifungální [91] a baktericidní efekt [92], který spočívá ve schopnosti štěpení cizích buněčných stěn.

Vzhledem k tomu, že chitin zajišťuje buňkám strukturální integritu, je jeho syntéza potenciálním místem pro zásah antifungálních látek. [86]

1.7 Substrátová specifita β -N-acetylhexosaminidasy

1.7.1 Přirozené substráty

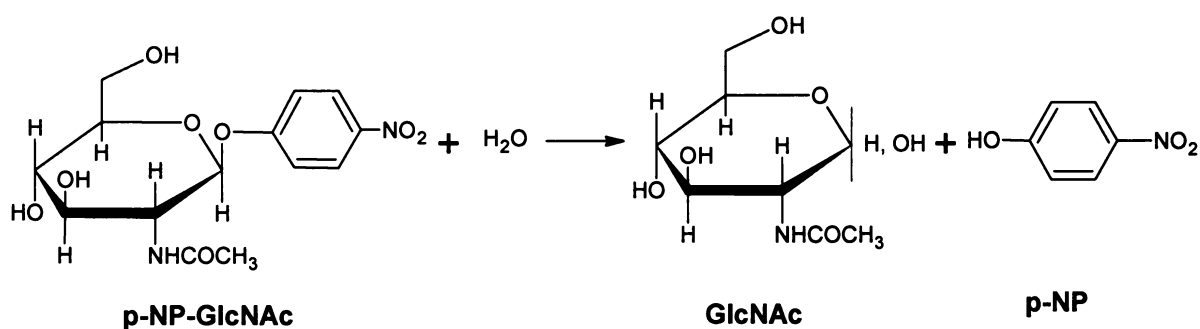
Mezi nejčastěji používané přirozené substráty β -N-acetylhexosaminidasy patří chitooligosacharidy. Stanovení aktivity je založeno na analýze hydrolytických produktů reakce, kterými jsou N-acetylhexosaminy. V současné době se k jejich detekci využívá nejčastěji systém HPAEC/PAD (High performance anion exchange chromatography/Pulsed amperometric detection) [93], který je vhodnější než HPLC, kde je nutné substráty derivatizovat [88]. Systém HPAEC/PAD umožňuje současnou detekci produktů hydrolyzy a transglykosylace [93].

Hydrolyza glykolipidů může být provedena se substráty modifikovanými na terminálním HexNAc nebo na sfingozinu (pokud lze modifikovat) [94].

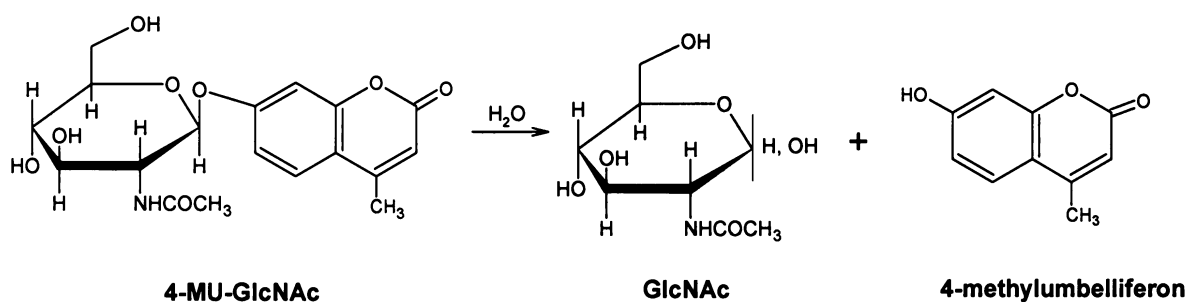
Přestože použití přirozených substrátů je složitější v porovnání s arteficiálními, jejich místo je při enzymových studiích nezastupitelné [88].

1.7.2 Umělé substráty

Pro stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidas se používají umělé substráty složené ze sacharidové složky (GlcNAc, GalNAc, chitobiosa) a O-glykosidicky vázaného aglykonu, který lze snadno vizualizovat (p-nitrofenol, 4-methylumbelliferon). V případě p-nitrofenylglykosidů se uvolňuje příslušný sacharid a p-nitrofenol (Obr. 13), který v alkalickém prostředí poskytuje žluté zbarvení. Podobná je i reakce 4-methylumbelliferylglykosidů, která poskytuje v alkalickém prostředí 4-methylumbelliferon, látku fluoreskující po excitaci vlnovou délkou 380 nm (Obr. 14). Oba substráty jsou dostupné i jako deriváty GalNAc.

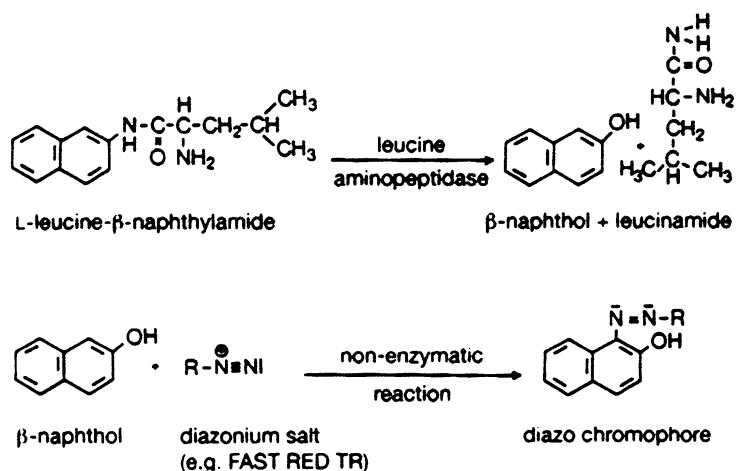


Obr. 13: Štěpení p-NP-GlcNAc β -N-acetylhexosaminidasou, které poskytuje p-nitrofenol a GlcNAc v obou anomerních konfiguracích.



Obr. 14: Štěpení 4-MU-GlcNAc β -N-acetylhexosaminidasou, které poskytuje 4-methylumbelliferon a GlcNAc v obou anomerních konfiguracích.

Reakce 4-MU-GlcNAc se využívá i k detekci β -N-acetylhexosaminidasové aktivity v gelu po elektroforéze v nativním prostředí. Jiná reakce pro detekci v gelu je založena na enzymovém štěpení nebarevného substrátu naftol-AS BI-GlcNAc, které poskytuje β -naftol, který neenzymově reaguje kopulační reakcí s diazoniou solí za vzniku barevné azosloučeniny (Obr. 15, str. 25, schéma reakce pro leucinaminopeptidasu) [95].



Obr. 15: Schéma reakce využívané pro detekci enzymu v gelu, v tomto případě pro leucinaminopeptidasu. V prvním kroku dochází ke vzniku β -naftolu, který ve druhém kroku reaguje s diazoniovým barvivem kopulační reakcí za vzniku barevné azosloučeniny [95].

1.7.3 Substrátová specifita fungální β -N-acetylhexosaminidas

Schopnost fungálních β -N-acetylhexosaminidas štěpit umělé substráty p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc je různá. Hodnoty Michaelisových konstant, vyjadřujících afinitu enzymu k substrátu, shrnuje tab. 2.

Tab. 2: Hodnoty Michaelisových konstant (K_M) pro fungální β -N-acetylhexosaminidas.

Zdroj β -N-acetylhexosaminidas	p-NP-GlcNAc	p-NP-GalNAc
	K_M (mM)	K_M (mM)
<i>Aspergillus niger</i> [63]	0,34	0,86
<i>Aspergillus niger</i> 419 [64]	0,2	N
<i>Bipolaris sorokiniana</i> [53]	0,081	1,24
<i>Candida albicans</i> [54]	0,77	1,26
<i>Mucor fragilis</i> [1]	0,28	0,46
<i>Penicillium oxalicum</i> [55]	0,48	1,0
<i>Penicillium oxalicum</i> CCF 1959 [10]	0,24	0,7
<i>Penicillium chrysogenum</i> [65]	0,57	1,30
<i>Sclerotinia fructigena</i> [68]	2	2
<i>Trichoderma harzianum</i> [69]	0,008	-

Pozn.: Enzym daný substrát nehydrolyzuje (N) nebo Michaelisova konstanta nebyla určena (-).

β -N-acetylhexosaminidasa z *Aspergillus nidulans* silně váže chitin a je schopna štěpit chitooligosacharidy od chitobiosy až po chitohexaosu. Hydrolyza chitobiosy je kompetitivně inhibována všemi delšími chitooligosacharidy až do délky chitohexaosy [52]. Chitobiosu i chitotriosu dále štěpí β -N-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum* [55], *Mucor fragilis* [1] a *Candida albicans*, jejíž aktivita je inhibována ve vyšších koncentracích substrátu [54]. β -N-acetylhexosaminidasa z *Penicillium chrysogenum* hydrolyzuje chitobiosu, ale chitotriosu ani koloidní chitin vlastní či krabí nehydrolyzuje [65].

β -N-acetylhexosaminidasa z *Bipolaris sorokiniana* hydrolyzuje p-NP-(GlcNAc)₂ [53].

β -N-acetylhexosaminidasa z *Aspergillus niger* hydrolyzuje i p-NP-thioacetyl- β -D-glukosaminid (K_M 1,3 mM) a 2,4-dinitrofenyl-GlcNAc (K_M 0,27 mM). Zvláštním případem je β -N-acetylhexosaminidasa z *Aspergillus niger* 419, která nehydrolyzuje p-NP-GalNAc ani p-NP-(GlcNAc)₂ [64].

GlcNAc-asová aktivita *Penicillium oxalicum* je inhibována při vyšších koncentracích substrátu p-NP-GlcNAc [55], stejně tak i GlcNAc-asa z *Hohenbuechelia serotina* [51] a *Sclerotinia fructigena* [52]. β -N-acetylhexosaminidasa z *Candida albicans* je inhibována nadbytkem p-NP-GlcNAc, (GlcNAc)₂, (GlcNAc)₂ ale ne p-NP-GalNAc [54].

Zajímavý je i poměr GlcNAc-asové a GalNAc-asové aktivity, který se liší u jednotlivých druhů. Rychlost hydrolytické reakce se substráty p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc není tedy pro všechny fungální zdroje stejná, naopak poměr se pohybuje v rozmezí 0,7 až 5,6 (Tab. 3, str. 27).

1.7.4 Inhibitory fungální β -N-acetylhexosaminidasy

Aktivita většiny fungálních β -N-acetylhexosaminidas je inhibována přítomností iontů těžkých kovů [52, 53, 63], nebo Cu²⁺ a Fe³⁺ [64, 69]. Naopak aktivační vliv iontů kovů pozorován nebyl.

Aktivita β -N-acetylhexosaminidasy je inhibována produkty hydrolytické reakce GlcNAc nebo GalNAc u *Aspergillus nidulans* (oba nekompetitivní inhibitory) [52], *Bipolaris sorokiniana* [53], *Aspergillus niger* [63] a pouze GlcNAc u *Penicillium chrysogenum* [65].

Narozdíl od předchozích aktivita β -N-acetylhexosaminidasy ze *Sclerotinia fructigena* [68] není ovlivněna GlcNAc ani GalNAc. Ke stejnému závěru došel i Yamamoto a kol. [55] v případě β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*. Skočdopol [9] ale zjistil pro β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959 inhibici oběma sacharidy. GlcNAc se choval jako nekompetitivní a GalNAc jako kompetitivní inhibitor.

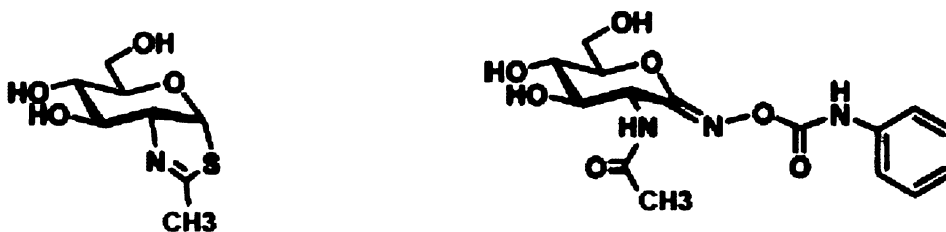
Tab. 3: Poměr GalNAc-asové a GlcNAc-asové aktivity β -N-acetylhexosaminidasy z různých fungálních zdrojů

Zdroj β -N-acetylhexosaminidasy	poměr GlcNAc-asa a GalNAc-asa
<i>Aspergillus cellulosa</i> IFO 4040 [55]	1,6
<i>Aspergillus nidulans</i> [52]	5,0
<i>Aspergillus niger</i> IFO 6341 [55]	2,0
<i>Aspergillus niger</i> [88]	4,8
<i>Aspergillus oryzae</i> AKU 3301 [55]	2,0
<i>Aspergillus penicilloides</i> IFO 8155 [55]	1,6
<i>Aspergillus phoenicis</i> IFO 6670 [55]	1,7
<i>Aspergillus sojae</i> IFO 4253 [55]	1,9
<i>Aspergillus sojae</i> IFO 30112 [55]	2,1
<i>Aspergillus tamarii</i> [96]	2,5
<i>Aspergillus terreus</i> IFO 6123 [55]	0,9
<i>Candida albicans</i> [54]	0,7
<i>Dictyostelium discoideum</i> [97]	5,6
<i>Mucor fragilis</i> [1]	2,5
<i>Mucor jansseni</i> IFO 6746 [55]	0,7
<i>Mucor rouxii</i> [88]	2,9
<i>Neurospora ritophila</i> AKU 3551 [55]	2,0
<i>Penicillium chrysogenum</i> [98]	1,1
<i>Penicillium chrysogenum</i> IFO 4626 [55]	0,9
<i>Penicillium janthinellum</i> IFO 4651 [55]	1,2
<i>Penicillium oxalicum</i> CCF 1959 [10]	0,7
<i>Penicillium oxalicum</i> IFO 5748 [55]	0,7
<i>Penicillium roqueforti</i> IFO 4622 [55]	1,8
<i>Pycnopus cinnabarinus</i> [99]	0,8
<i>Rhizopus javanicus</i> IFO 5441 [55]	0,8
<i>Sclerotinia fructigena</i> [68]	1,0
<i>Trichoderma harzianum</i> [100]	1,3
<i>Trichoderma viride</i> IFO 4847 [55]	1,9

Mezi silnější inhibitory patří laktony, např. 2-deoxy-2-acetamidoglukonolaktonem pro *Aspergillus nidulans* [52], *Sclerotinia fructigena* [68] a *Aspergillus niger* [63].

β -N-acetylhexosaminidasa z *Bipolaris sorokiniana* je inhibována GlcNAc-6-sulfát, GalNAc-izothiokyanát a ManNAc [53], aktivita *Trichoderma harzianum* je inhibována Glc [69], aktivita *Aspergillus niger* je inhibována p-NP-1-thio-N-acetyl- β -D-glukosaminidem [63].

Thioglykosidy jsou široce rozšířenými inhibitory glykosidas [101]. Velmi silným inhibitorem β -N-acetylhexosaminidasy z *Canavalia ensiformis* [102] i lidské β -N-acetylhexosaminidasy je NAG-thiazolin (Obr. 14) [103]. Jeho schopnost inhibovat aktivitu vychází ze strukturní podobnosti s oxazoliniovým přechodným stavem. Silným inhibitorem je také PUGNAc (Obr. 16), ale bylo prokázáno, že narušil od NAG-thiazolinu není analogem přechodného stavu [103].



Obr. 16: NAG-thiazolin (vlevo) a PUGNAc (vpravo) [103]

1.8 Využití β -N-acetylhexosaminidasy

β -N-acetylhexosaminylové jednotky jsou běžnou součástí biologicky významných sloučenin jako například látek krevních skupin, imunoglobulinů, mikrobiálních buněčných stěn apod. [96]. Mikrobiální β -N-acetylhexosaminidasy jsou účinným nástrojem pro objasnění struktury a funkce glykoproteinů a glykolipidů [1, 55, 104]. Enzymy s úzkou substrátovou specifitou v kombinaci s enzymy se širokou substrátovou specifitou jsou velmi efektivními nástroji pro vazebnou analýzu nebo pro zjištění struktury N-glykosidů [105, 106, 107]. Velmi významným výsledkem z klonování β -N-acetylhexosaminidasy je zúžení substrátové specifity způsobené zkrácením sekvence [105].

Fungální β -N-acetylhexosaminidasy (*Aspergillus oryzae*) lze dále využít také k separaci směsí disacharidů [57], která je založena na schopnosti enzymu štěpit pouze jeden z disacharidů. Směs disacharidů je jen těžko dělitelná HPLC, zatímco směs požadovaného disacharidu a rozštěpených monosacharidů už lze rozdělit například gelovou chromatografií [57].

Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy lze také využít k rozlišení jednotlivých druhů organismů (*Candida*), které se liší právě v její produkci [108], je tedy jejich markerem.

Chitinolytické enzymy mohou být využity v biokonverzích materiálů bohatých na chitin jako je například odpad z koryšů [109], produkci GlcNAc pro farmaceutický nebo potravinářský průmysl [110] a k biologickému hubení škůdců [111, 112].

Vzhledem k tomu, že fungální infekce jsou u lidí velmi časté, je nutné hledat nová místa terapeutického zásahu. Buněčná stěna reprezentuje nejvíc rozdílů mezi lidskou buňkou a buňkou houby [113] a je metabolicky aktivní strukturou [114]. Právě v ní je třeba najít nová místa, která jsou kritická pro její syntézu [113]. β -N-acetylhexosaminidasa, která hraje u hub významnou roli při tvorbě [89] a remodelaci buněčných stěn, je potenciálním místem zásahu nízkomolekulárních antifungálních látek [88].

Schopnost některých β -N-acetylhexosaminidas katalyzovat přenos glykosylu na různé nukleofilní akceptory je významnou cestou syntézy široké škály látek [96]. Transglykosylační aktivita byla dosud studována například u β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* [115, 116, 117], *Penicillium oxalicum* [117, 118], *Nocardia orientalis* [119], *Canavalia ensiformis* [120], *Phaseolus vulgaris* [116], *Acremonium persicinum*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium pitii* a *Talaromyces flavus* [117]. Tímto způsobem byly syntetizovány nové deriváty námelových alkaloidů pomocí enzymu z *Aspergillus oryzae* [121]. Široká škála derivátů disacharidů a trisacharidů byla připravena použitím glykosidů jako akceptorů [96]. Oligosacharidové struktury náročné na přípravu klasickými metodami organické syntézy byly připraveny snadněji za použití enzymů, a to buď rovnou cílové sloučeniny nebo ve formě stavebních bloků [96]. Transglykosylační aktivita β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* byla prakticky využita k syntéze nosičů pro léčiva [118].

2. CÍL PRÁCE

- 1) Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959
- 2) Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* CCF 1066
- 3) Doplnění informací o vlastnostech β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* CCF 1066, *Penicillium oxalicum* CCF 1959 i *Penicillium oxalicum* CCF 3438
- 4) Porovnání vlastností β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959 i 3438 a zjištění jejich rozdílů oproti β -N-acetylhexosaminidase z *Aspergillus oryzae* CCF 1066

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Použité přístroje

Analytické váhy 100 A – Denver Instrument Company, USA

Centrifuga MPW 375 – Praca, Polsko

Centrifuga Univerzal 32 R – Hettich, Německo

Elektroforetická souprava Whatman – Biometra, Německo

HPLC Biosys 500 – Beckman, USA

Chromatografické kolony: fenylo-Sepharosa HP (2,6 x 10,6 cm) – Amersham Biosciences, UK

Mono Q (0,5 x 5 cm) – Amersham Biosciences, UK

Superdex 200 HR (1 x 30 cm) – Amersham Biosciences, UK

S-Sepharosa HR (1,6 x 5 cm) – Amersham Biosciences, UK

Luminescenční spektrometr LS 55 – Perkin Elmer, USA

pH metr Ultrabasic UB 10 – Denver Instrument Company, USA

Spektrofotometr Spekol 11 – Carl Zeiss, Jena, Německo

Spektrofotometr Ultrospec 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech, UK

Spektrometr Sunrise – Tecan, Švýcarsko

3.2 Materiál

Precipitát kultivačního média *Aspergillus oryzae* CCF 1066 a *Penicillium oxalicum* CCF 1959 získaný srážením $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 80 % nasycení. Poskytnuto Laboratoří architektury proteinů MBÚ AV ČR Prof. RNDr. Karla Bezoušky, DrSc.

3.3 Použité chemikálie

azid sodný (Sigma, USA)

akrylamid (Sigma, USA)

bis-akrylamid (Sigma, USA)

bis-tris (Fluka, USA)

Bradford činidlo (Sigma, USA)

Coomassie Brilliant Blue G 250 (Sigma, USA)

Coomassie Brilliant Blue R 250 (Sigma, USA)

Fast Red Violet LB (Sigma, USA)

p-MU (Sigma, USA)
p-MU-GlcNAc (Sigma, USA)
GlcNAc (Sigma, USA)
GalNAc (Sigma, USA)
GlcNAc-thiazolin (Laboratoř proteinové architektury, MBÚ AV ČR)
naftol-AS BI-GlcNAc (Sigma, USA)
p-NP (Sigma, USA)
p-NP-GlcNAc (Sigma, USA)
p-NP-GalNAc (Sigma, USA)
p-NP-GlcN-R = N-acyl modifikované substráty (Laboratoř biotransformací, MBÚ AV ČR)
piperazin (Fluka, USA)
persíran amonný (Sigma, USA)
SDS (Sigma, USA)
standard pro určení molekulových hmotností při SDS elektroforéze (Sigma, USA)
TEMED (Serva, Německo)
ostatní chemikálie (Lachema, ČR)

3.4 Metody

3.4.1 Chromatografické separace

3.4.1.1 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci fenyly-Sepharosy

Kolonu fenyly-Sepharosy jsem promyla puřrem B (1 mM NaN_3 ve 20 mM fosfátovém puřru pH 6,8 a) a poté ekvilibrovala puřrem A (1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1 mM NaN_3 v 50 mM fosfátovém puřru pH 6,8). Východí precipitát kultivačního média, získaný srážením $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 80 % nasycení, jsem rozpustila v 60 ml puřru A, centrifugovala při 60 000 g 30 min a supernatant jsem nanesla na kolonu rychlostí 4 ml/min. Po ustálení absorbance jsem zachycené proteiny vymyla lineárním gradientem puřru B od 0 do 100 % za 90 min. V jímaných frakcích jsem poté sledovala obsah proteinů měřením absorbance při 280 nm a stanovila aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy způsobem uvedeným v kap. 3.4.1.5 (str. 34). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsem použila pro další purifikaci [122].

3.4.1.2 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci S-Sepharosy

Kolonu S-Sepharosy jsem promyla pufrém B (0,5 M NaCl a 1 mM NaN_3 ve 20 mM citrátovém pufru pH 3,5) a poté ekvilibrovala pufrém A (1 mM NaN_3 ve 20 mM citrátovém pufru pH 3,5). Frakce z chromatografie na sloupci fenyly-Sepharosy obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsem koncentrovala na 2 ml pomocí membrány Centricon 30. Tento roztok jsem zředila 20 ml pufru A a opět koncentrovala na 2 ml. Ke koncentrovanému vzorku jsem přidala 40 ml pufru A a nanasla na kolonu rychlostí 4 ml/min. Po ustálení absorbance jsem zachycené proteiny vymyla lineárním gradientem pufru B od 0 do 100 % za 60 min. V jímaných frakcích jsem poté sledovala obsah proteinů měřením absorbance při 280 nm a aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy způsobem uvedeným v kap. 3.4.1.5 (str. 34). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsem použila pro další purifikaci [122].

3.4.1.3 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Mono Q

Kolonu Mono Q jsem promyla pufrém B (0,5 M NaCl a 1 mM NaN_3 ve 20 mM Bis-Tris pufru pH 7,0 pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum*, resp. 0,3 M NaCl a 1 mM NaN_3 ve 20 mM piperazinu pH 5 pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae*) a ekvilibrovala pufrém A (1 mM NaN_3 ve 20 mM Bis-Tris pufru pH 7,0 a pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum*, resp. 1 mM NaN_3 ve 20 mM piperazinu pH 5 pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae*). Frakce z chromatografie na sloupci S-Sepharosy obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsem koncentrovala na 2 ml, zředila 15 ml pufru A a opět zakoncentrovala na 2 ml pomocí membrány Centricon 30. K tomuto vzorku jsem přidala 20 ml pufru A a nanasla na kolonu rychlostí 2 ml/min. Po ustálení absorbance jsem spustila lineární gradient od 0 do 100 % pufru B po dobu 60 min. V jímaných frakcích jsem poté sledovala obsah proteinů měřením absorbance při 280 nm a stanovila aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy způsobem uvedeným v kap. 3.4.1.5 (str. 34). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsem použila pro další purifikaci [122].

3.4.1.4 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Superdex 200

Kolonu Superdex 200 jsem ekvilibrovala pufrém A (0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 1 mM NaN_3 ve 20 mM Bis-Tris pufru pH 7,0). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsem koncentrovala na 150 μl pomocí membrány Centricon 30. Takto připravený vzorek jsem

nanesla na kolonu rychlostí 0,4 ml/min a jímala frakce, ve kterých jsem sledovala obsah proteinů měřením absorbance při 280 nm a aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy stejným způsobem uvedeným v kap. 3.4.1.5. Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsem zakoncentrovala na 1,5 ml [122].

3.4.1.5 Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy v zachycených frakcích po chromatografické separaci

Reakční směs obsahovala 45 μ l 2 mM p-NP-GlcNAc v 50 mM citrátovém pufru pH 5 a 5 μ l roztoku enzymu. Reakce probíhající při laboratorní teplotě jsem zastavila po 10 min 150 μ l Na₂CO₃ pH 11. Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsem určila pomocí žlutého zbarvení.

3.4.2 Deglykosylace β -N-acetylhexosaminidasy

Frakce po chromatografii na sloupci S-Sepharosy byly koncentrovány na 1 ml pomocí membrány Centricon 30, zředěny 15 ml pufru (1 mM azid sodný v 50 mM citrátovém pufru o pH 5,5) a opět koncentrovány na přibližně 400 μ l. Ke čtvrtině enzymu byl přidán enzym endo H (endoglykosidasa H), zbytek byl ponechán jako negativní kontrola. Všechny vzorky byly inkubovány 34 hodin při 37 °C.

Endo H je glykosidasa, která štěpí vazbu GlcNAc β (1 \rightarrow 4) GlcNAc, která je součástí pentasacharidového jádra N-glykosidicky vázaných sacharidů v glykoproteinech.

3.4.3 Stanovení obsahu proteinů

Stanovení obsahu proteinů jsem provedla metodou podle Bradfordové [123]. Ke 33,3 μ l enzymového vzorku jsem přidala 1 ml Bradfordova činidla a nechala 20 min volně reagovat. Po 20 min jsem změřila absorbanci při 595 nm proti slepému vzorku. Koncentraci bílkovin jsem odečetla z kalibrační křivky pro sérový hovězí albumin 0 až 1,4 mg/ml.

3.4.4 Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy

Ke stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidasy jsem použila substráty p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc a 4-MU-GlcNAc. Množství p-NP uvolněného enzymovou reakcí jsem určila měřením absorbance proti slepému vzorku při 405 nm a jeho koncentraci jsem vypočítala z Lambert-Beerova zákona ($\epsilon = 18$ l/mmol.cm). Množství uvolněného 4-MU jsem určila měřením fluorescence na spektrofluorimetru (excitační vlnová délka 380 a emisní 520 nm) a koncentraci jsem odečetla z kalibrační přímky. Aktivita β -N-acetylhexosaminidasy je

tedy vyjádřena jako látkové množství p-NP (4-MU) uvolněného za min jedním ml enzymu, popř. jako specifická aktivita vztažená na 1 mg proteinu.

3.4.5 Vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy

Připravila jsem 0,1 M HCl-KCl pufr o pH 1 a 2; 0,1 M Mcllvaneův pufr o pH 3 až 6 a 0,1 M Tris-HCl pufr o pH 7 až 11. Tyto pufrы jsem postupně použila k přípravě reakčních směsí. Reakční směs tedy obsahovala 100 μ l 0,1 M pufru o daném pH; 50 μ l 2 mM p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc a 50 μ l roztoku enzymu. Reakce, probíhající za laboratorní teploty, jsem zastavila po 10 min 800 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy jsem určila postupem dle kap. 3.4.4 (str. 34).

3.4.6 Vliv pH na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy

Připravila jsem 0,1 M HCl-KCl pufr o pH 1 a 2; 0,1 M Mcllvaneův pufr o pH 3 až 6 a 0,1 M Tris-HCl pufr o pH 7 až 11. V těchto pufrách jsem uchovávala β -N-acetylhexosaminidasu a v pravidelných intervalech odebírala alikvoty pro stanovení aktivity. Reakční směs obsahovala 145 μ l 0,1 M citrátového pufru o hodnotě pH odpovídající optimu pro daný enzym, 30 μ l 4 mM p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc a 25 μ l enzymu. Reakce, probíhající za laboratorní teploty, jsem zastavila po 10 min 800 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy jsem určila postupem dle kap. 3.4.4 (str. 34).

3.4.7 Stanovení kinetických parametrů pro p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc

Sledovala jsem závislost rychlosti reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou na koncentraci substrátu. Stanovení jsem provedla na mikrotitračních destičkách. Reakční směs obsahovala 40 μ l p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc o koncentracích 0 až 2,75 mM rozpuštěné v 0,1 M citrátovém pufru o hodnotě pH odpovídající optimu pro daný enzym a 15 μ l enzymu. Reakce, probíhající za laboratorní teploty, jsem zastavila po 10 min přidávkem 200 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy jsem určila postupem dle kap. 3.4.4 (str. 34).

Michaelisovu konstantu a maximální rychlost reakce jsem vypočítala nelineární regresí podle rovnice Michaelise a Mentenové:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}, \text{ kde } V_{\max} \text{ je maximální rychlost reakce, } K_M \text{ je Michaelisova konstanta a } [S]$$

je koncentrace substrátu [124].

Inhibiční konstantu pro inhibici nadbytkem substrátu jsem vypočítala pomocí rovnice popisující tuto inhibici:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S] + \frac{K_M \cdot [S]^2}{K_{SS}}}, \text{ kde } V_{\max} \text{ je maximální rychlost reakce, } K_M \text{ je Michaelisova}$$

konstanta $[S]$ je koncentrace substrátu a K_{SS} je inhibiční konstanta pro inhibici substrátem [124].

3.4.8 Stanovení kinetických parametrů pro 4-MU-GlcNAc

Sledovala jsem závislost rychlosti reakce katalyzované β -N-acetylhexosaminidasou na koncentraci substrátu. Stanovení jsem provedla na destičkách. Reakční směs obsahovala 40 μ l 4-MU-GlcNAc o koncentracích 0 až 2,75 mM rozpuštěné v 0,1 M citrátovém pufru o hodnotě pH odpovídající optimu pro daný enzym a 15 μ l enzymu. Reakce, probíhající za laboratorní teploty, jsem zastavila po 10 min přidavkem 200 μ l 0,1 M K_2CO_3 . Z této směsi jsem odebrala alikvot 150 μ l a změřila jeho fluorescenci. Aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy jsem určila postupem dle kap. 3.4.4 (str. 34).

Maximální reakční rychlost, Michaelisovu konstantu a inhibiční konstantu pro inhibici substrátem jsem určila nelineární regresí podle rovnic v kap. 3.4.7 (str. 35).

3.4.9 Vliv teploty na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy

Reakční směs, složenou z 50 μ l 0,1 M citrátového pufru o pH optimu, 50 μ l substrátu p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc o saturační koncentraci a 100 μ l enzymu, jsem inkubovala při teplotách 25 až 70 °C po dobu 10 min. Po této době jsem reakce zastavila 800 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy jsem určila postupem dle kap. 3.4.4 (str. 34).

3.4.10 Vliv teploty na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy

Enzym jsem inkubovala při teplotách 25 až 70 °C po dobu 10 min. 100 μ l takto inkubovaného enzymu jsem přidala do reakční směsi, která obsahovala 50 μ l 0,1 M citrátového pufru o pH optimu, 50 μ l substrátu p-NP-GlcNAc saturační koncentraci. Reakci jsem nechala probíhat při teplotě 25 °C po dobu 10 min. Poté reakce zastavila 800 μ l 0,1 M borátového pufru o pH 9. Aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy jsem určila postupem dle kap. 3.4.4 (str. 34).

3.4.11 Vliv solí na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy

Zjišťovala jsem vliv $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 a MgCl_2 na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou. Reakční směs obsahovala 50 μl p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc o saturační koncentraci, 50 μl 0,1 M citrátového pufru o hodnotě pH odpovídající optimu pro daný enzym; 50 μl příslušné soli o výsledné koncentraci 0 až 2 M a 50 μl enzymu. Reakce jsem zastavila po 10 min přidavkem 800 μl 0,1 M borátového pufru o pH 9. Aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy jsem určila postupem dle kap. 3.4.4 (str. 34).

3.4.12 Vliv GlcNAc, GalNAc a NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou

Zjišťovala jsem vliv GlcNAc, GalNAc, NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou. Reakční směs obsahovala 50 μl p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc o saturační koncentraci, 50 μl 0,1 M citrátového pufru o hodnotě pH odpovídající optimu; 50 μl příslušného sacharidu o výsledné koncentraci 0,05 až 20 mM a 50 μl enzymu. Reakce jsem zastavila po 10 min přidavkem 800 μl 0,1 M borátového pufru o pH 9. Aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy jsem určila postupem dle kap. 3.4.4 (str. 34).

Pro každý sacharid jsem vynesla dvojité reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka, určila typ inhibice a podle příslušné rovnice určila inhibiční konstantu.

Rovnice pro kompetitivní inhibici:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + [S]}, \text{ kde } V_{\max} \text{ je maximální reakční rychlost, } K_M \text{ je Michaelisova}$$

konstanta, $[S]$ je koncentrace substrátu, $[I]$ je koncentrace inhibitoru a K_I je inhibiční konstanta [124].

Rovnice pro nekompetitivní inhibici:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{(K_M + [S]) \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)}, \text{ kde platí stejné symboly [124].}$$

3.4.13 Elektroforetické separace

3.4.13.1 Separace β -N-acetylhexosaminidasy elektroforézou za nativních podmínek

Nativní elektroforézu jsem provedla v polyakrylamidovém gelu v alkalickém prostředí metodou podle Lee a Lee [125] při pH 8. Použila jsem 3 % zaostřovací a 6 % separační gel obsahující glycerol.

Nativní elektroforézu v polyakrylamidovém gelu jsem provedla také v kyselém prostředí při pH 4,5. Použila jsem 3 % zaostřovací a 6 % separační gel obsahující také glycerol [126].

Ke vzorku proteinu jsem přidala takové množství sacharosy, aby její výsledná koncentrace byla 10 %. Elektroforéza probíhala při počátečním napětí 70 V, po dosažení separačního gelu jsem zvýšila napětí na 140 V.

3.4.13.2 Detekce β -N-acetylhexosaminidasy po nativní elektroforéze pomocí naftol-AS BI-GlcNAc

Po skončení elektroforézy jsem gel inkubovala v 20 ml citrátového pufru o pH optimu při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Poté jsem do lázně přidala 1 ml 8 mM substrátu naftol-AS BI-GlcNAc v dimethylsulfoxidu a 20 mg Fast Red Violet LB. Po několika hodinách barvení jsem odbarvovala pozadí v lázni 7 % CH_3COOH přes noc.

3.4.13.3 Detekce β -N-acetylhexosaminidasy po nativních elektroforéze pomocí 4-MU-GlcNAc

Po skončení elektroforézy jsem gel inkubovala v 20 ml citrátového pufru o pH optimu při laboratorní teplotě po dobu 10 min. Poté jsem gel vložila do 0,25 mM roztoku 4-MU-GlcNAc v citrátovém pufru pH 5 a inkubovala 10 min při laboratorní teplotě. Poté jsem gel zalkalizovala 1 M Na_2CO_3 a detekovala 4-MU pomocí UV záření o vlnové délce 380 nm.

3.4.13.4 Separace proteinů elektroforézou v denaturujícím prostředí

Elektroforézu v denaturujícím prostředí SDS jsem provedla v polyakrylamidovém gelu metodou podle Laemmliho [127]. Použila jsem 5 % zaostřovací a 10 % separační gel obsahující SDS. Ke vzorku proteinu jsem přidala vzorkový pufr a takto připravený vzorek jsem 10 min vařila. Po nenesení vzorku na gel jsem spustila elektroforézu při počátečním napětí 70 V, po dosažení separačního gelu jsem zvýšila napětí na 140 V.

3.4.13.5 Detekce proteinů v gelu po elektroforéze v denaturujícím prostředí

Gel jsem po skončení elektroforézy barvila několik hodin v barvicím roztoku složeném z 2 g Coomassie Brilliant Blue R 250, 0,5 g Coomassie Brilliant Blue G 250, 425 ml ethanolu, 100 ml CH₃COOH, 50 ml methanolu a 425 ml redestilované vody. Poté jsem obarvený gel odbarvovala přes noc v odbarvovacím roztoku složeném z vody, ethanolu a CH₃COOH v poměru 25:10:65.

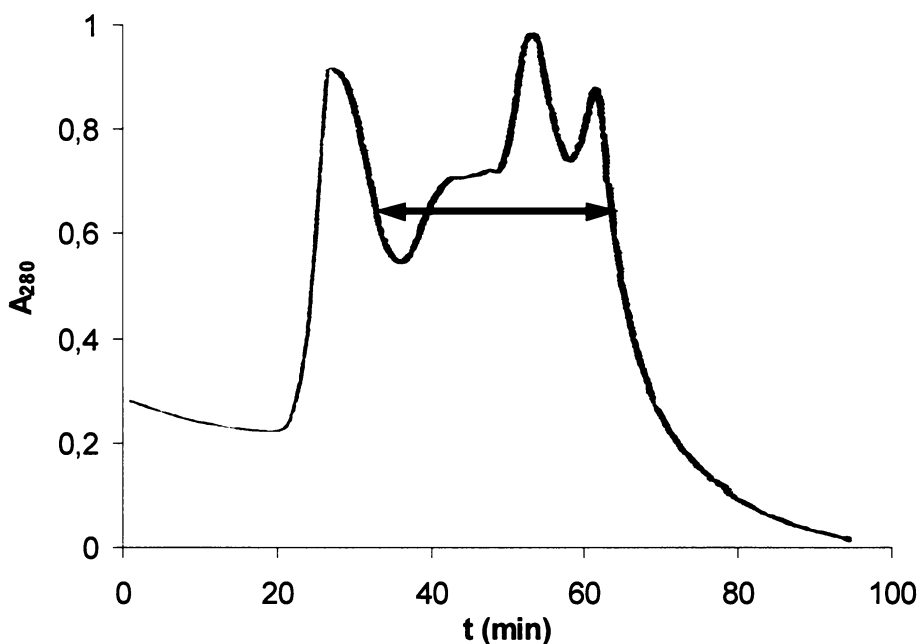
4. VÝSLEDKY

4.1 Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy

4.1.1 Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*

4.1.1.1 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci fenyli-Sepharosy

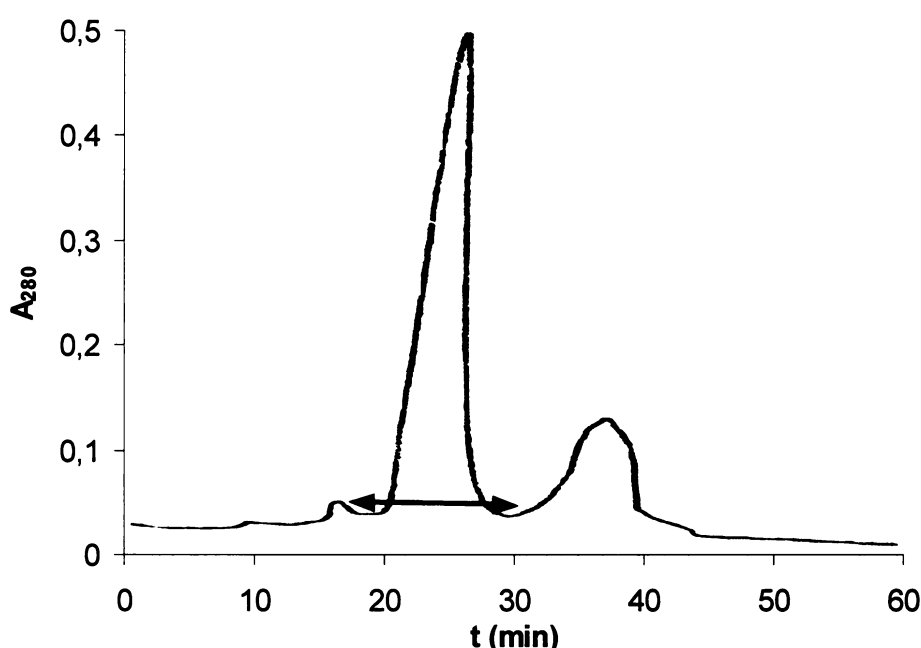
Separaci β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci fenyli-Sepharosy jsem provedla postupem uvedeným v kapitole 3.4.1.1 (str. 32). Precipitát kultivačního média, získaný srážením 1 l kultivačního média $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, jsem rozpustila, centrifugovala a 60 ml supernatantu (141 mg proteinu) nanasla na ekvilibrovanou kolonu fenyli-Sepharosy. Proteiny zachycené na koloně jsem vymyla lineárním gradientem pufru B od 0 do 100 % za 90 minut. Průběh eluce je znázorněn na chromatogramu (Obr. 17). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasovou aktivitu (eluované po 30 min, celkem 112 ml) jsou vyznačeny červenou šipkou.



Obr. 17: Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na koloně fenyli-Sepharosy. Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsou znázorněny červenou šipkou.

4.1.1.2 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci S-Sepharosy

Chromatografii na sloupci S-Sepharosy jsem provedla postupem popsáním v kap. 3.4.1.2 (str. 33). Frakce získané separací na sloupci fenyl-Sepharosy jsem spojila, koncentrovala na 60 ml (30 mg proteinu) a nanasla na ekvilibrovanou kolonu S-Sepharosy. Frakce zachycené na koloně jsem vymyla lineárním gradientem pufru B od 0 do 100 % za 60 min. Průběh eluce je znázorněn na chromatogramu (Obr. 18). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu (eluované po 12 min, celkem 64 ml) jsou označeny červenou šipkou.

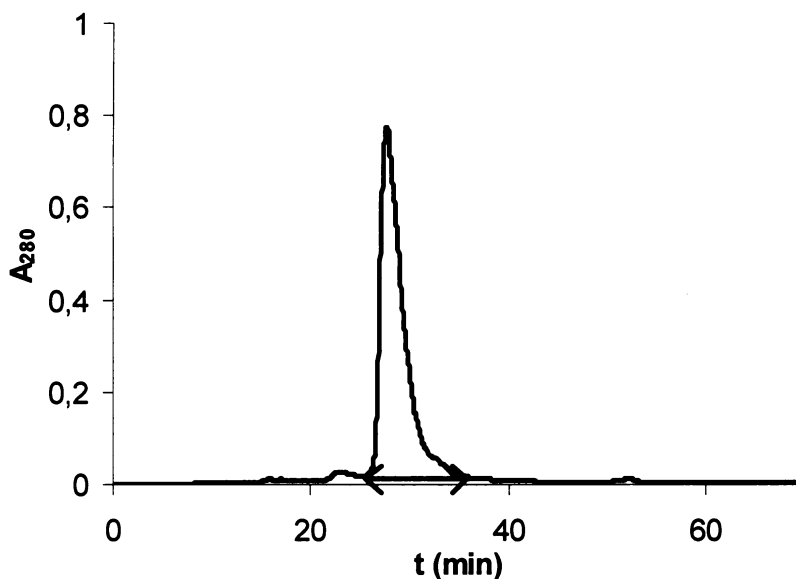


Obr. 18: Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci S-Sepharosy. Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsou označeny červenou šipkou.

4.1.1.3 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Mono Q

Chromatografii na sloupci Mono Q jsem provedla postupem popsáním v kap. 3.4.1.3 (str. 33). Frakce získané chromatografií na sloupci S-Sepharosy jsem spojila, koncentrovala na 21 ml (10 mg proteinu) a nanasla na ekvilibrovanou kolonu Mono Q. Zachycené frakce jsem vymyla lineárním gradientem pufru B od 0 do 100 % za 60 min. Průběh eluce je znázorněn na chromatogramu (Obr. 19, str. 42). Frakce obsahující

β -N-acetylhexosaminidu (eluované po 25 min, celkem 21 ml) jsou označeny červenou šipkou.



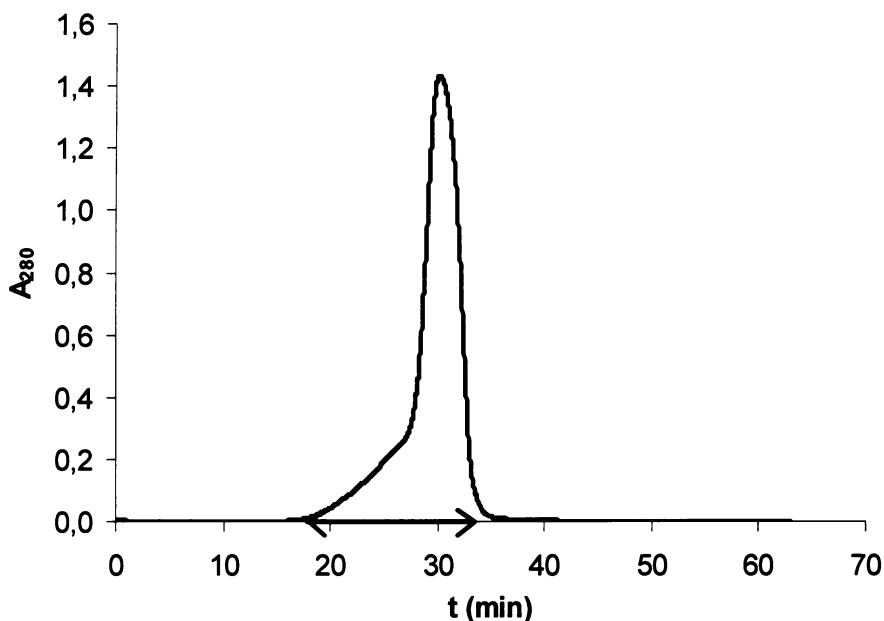
Obr. 19: Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Mono Q. Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsou označeny červenou šipkou.

4.1.1.4 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Superdex 200

Chromatografii na sloupci Superdex 200 jsem provedla postupem popsáním v kap. 3.4.1.4 (str. 33). Frakce získané chromatografií na sloupci Mono Q jsem spojila, koncentrovala na 100 μ l (3,3 mg proteinu) a nanasla na ekvilibrovanou kolonu Superdexe. Průběh eluce je znázorněn na chromatogramu (Obr. 20, str. 43). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu (eluované po 16 min, celkem 9 ml) jsou označeny červenou šipkou.

Po separaci na sloupci Superdex 200 byly zachycené frakce spojeny a koncentrovány na 1,5 ml. Takto získaný enzymový preparát β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* byl dále charakterizován.

Průběh purifikace charakterizuje tab. 4 (str. 43), ve které je uveden i výtěžek a stupeň načištění enzymového preparátu. Průběh purifikace dokumentuje i elektroforetická separace proteinů po jednotlivých separačních krocích v denaturujícím prostředí (Obr. 21, str. 43), kde majoritní proužek odpovídá katalytické podjednotce β -N-acetylhexosaminidasy o molekulové hmotnosti 65 kDa.



Obr. 20: Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Superdex 200. Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsou označeny červenou šipkou.

Tab. 4: Průběh purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*

	obsah proteinu (mg)	a (U)	a (U/mg)	stupeň načištění	výtěžek (%)
precipitát	140,9	1473	10	1,0	100
fenyl-Sepharosa	30,4	1287	42	4,1	87
S-Sepharosa	10,4	583	56	5,4	40
Mono Q	3,3	217	66	6,3	15
Superdex	2,9	208	71	6,8	14

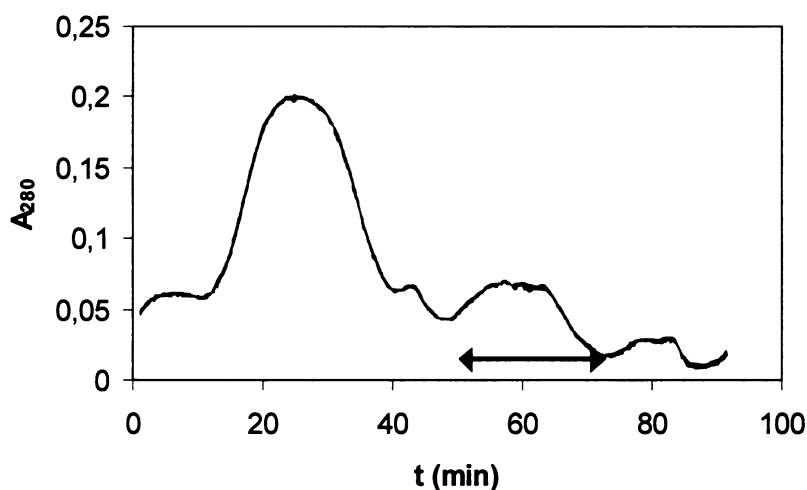


Obr. 21: Průběh purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (SDS-PAGE, 10 %). Standard molekulových hmotností (M), precipitát (1), separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci fenyl-Sepharosy (2), S-Sepharosy (3), Mono Q (4) a na sloupci Superdex 200 (5).

4.1.2 Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959

4.1.2.1 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci fenyl-Sepharosy

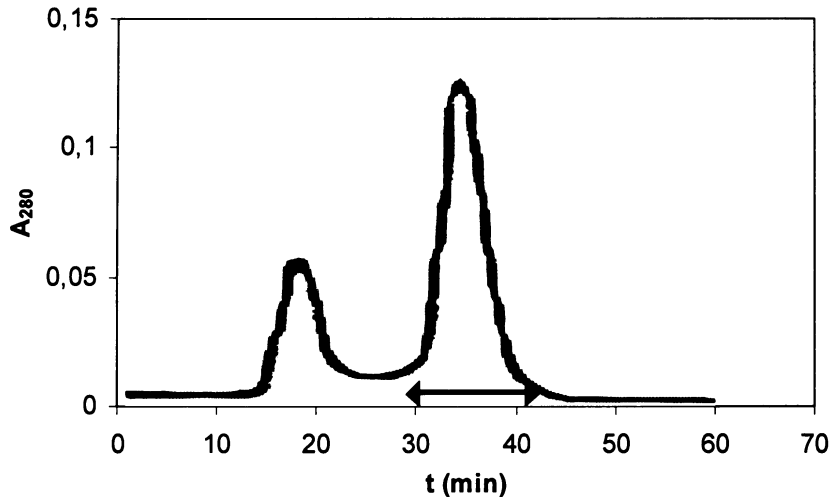
Separaci β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci fenyl-Sepharosy jsem provedla postupem uvedeným v kapitole 3.4.1.1 (str. 32). Precipitát kultivačního média, získaný srážením 3 l kultivačního média $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jsem rozpustila, centrifugovala a 65 ml supernatantu (45 mg proteinu) nanasla na ekvilibrovanou kolonu fenyl-Sepharosy. Proteiny zachycené na koloně jsem vymyla lineárním gradientem pufru B od 0 do 100 % za 90 minut. Průběh eluce je znázorněn na chromatogramu (Obr. 22). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu (eluované po 50 min, celkem 168 ml) jsou vyznačeny červenou šipkou.



Obr. 22: Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na koloně fenyl-Sepharosy. Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsou znázorněny červenou šipkou.

4.1.2.2 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci S-Sepharosy

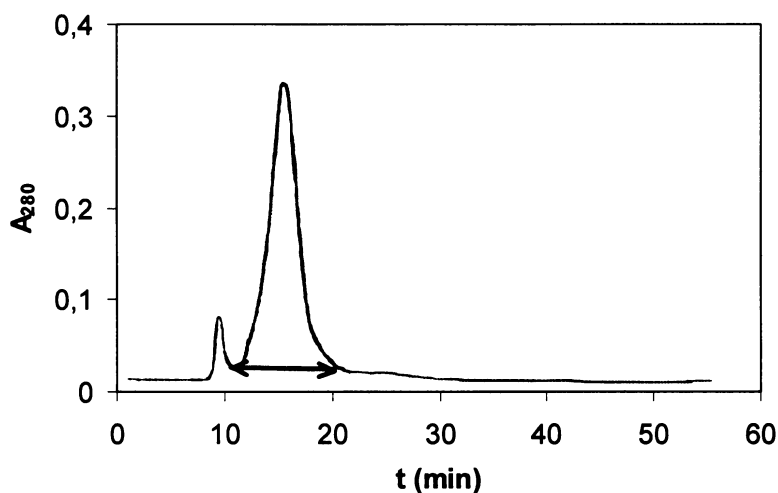
Chromatografii na sloupci S-Sepharosy jsem provedla postupem popsáním v kap. 3.4.1.2 (str. 33). Frakce získané separací na fenyl-Sepharose jsem spojila, koncentrovala na 40 ml (10 mg proteinu) a nanasla na ekvilibrovanou kolonu S-Sepharosy. Frakce zachycené na koloně jsem vymyla lineárním gradientem pufru B od 0 do 100 % za 60 min. Průběh eluce je znázorněn na chromatogramu (Obr. 23, str. 45). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu (eluované po 30 min, celkem 80 ml) jsou označeny červenou šipkou.



Obr. 23: Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci S-Sepharosy. Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsou označeny červenou šipkou.

4.1.2.3 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Mono Q

Chromatografii na sloupci Mono Q jsem provedla postupem popsaným v kap. 3.4.1.3 (str. 33). Frakce získané chromatografií na sloupci S-Sepharosy jsem spojila, koncentrovala na 30 ml (5 mg proteinu) a nanasla na ekvilibrovanou kolonu Mono Q. Zachycené frakce jsem vymyla lineárním gradientem pufru B od 0 do 100 % za 60 min. Průběh eluce je znázorněn na chromatogramu (Obr. 24). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu (eluované po 10 min, celkem 21 ml) jsou označeny červenou šipkou.



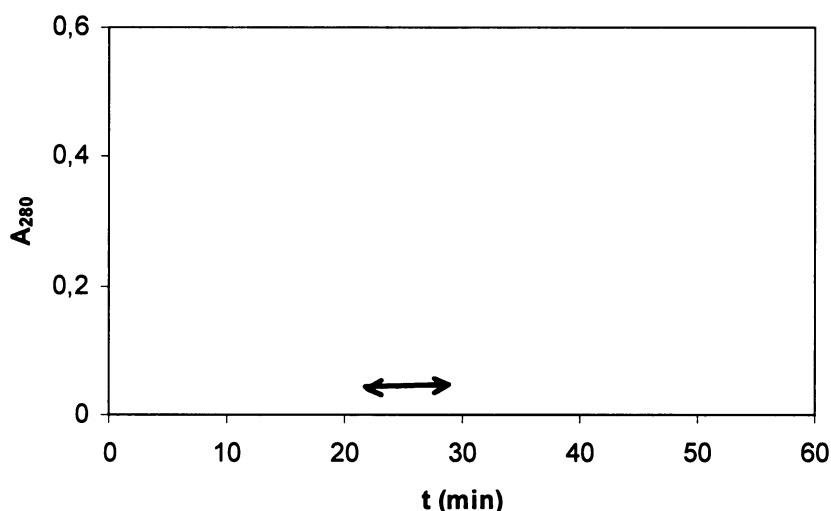
Obr. 24: Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Mono Q. Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsou označeny červenou šipkou.

4.1.2.4 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Superdex 200

Chromatografii na sloupci Superdex 200 jsem provedla postupem popsáním v kap. 3.4.1.4 (str. 33). Frakce získané chromatografií na sloupci Mono Q jsem spojila, koncentrovala na 150 μ l (2 mg proteinu) a nanasla na ekvilibrovanou kolonu Superdexu. Průběh eluce je znázorněn na chromatogramu (Obr. 25). Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu (eluované po 20 min, celkem 12 ml) jsou označeny červenou šipkou.

Po separaci β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Superdex 200 byly zachycené frakce spojeny a koncentrovány na 1,5 ml. Takto získaný enzymový preparát β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959 byl dále charakterizován.

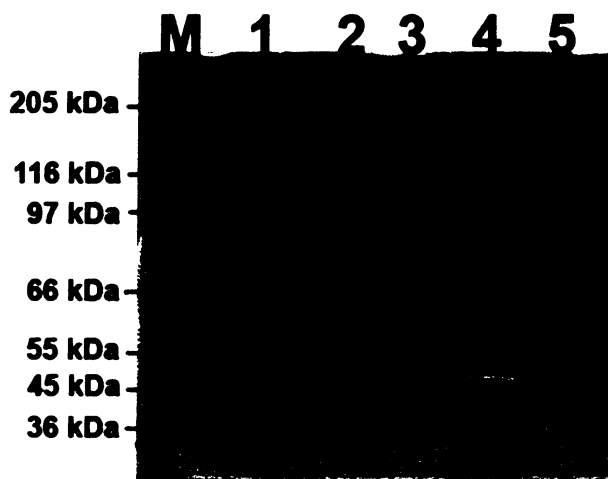
Průběh purifikace charakterizuje tabulka 5, ve které je uveden i výtěžek a stupeň načištění enzymového preparátu. Průběh purifikace dokumentuje i elektroforetická separace proteinů po jednotlivých separačních krocích v denaturujícím prostředí (Obr. 26, str. 47), kde majoritní proužek odpovídá katalytické podjednotce β -N-acetylhexosaminidasy o molekulové hmotnosti 65 kDa.



Obr. 25: Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci Superdex 200. Frakce obsahující β -N-acetylhexosaminidasu jsou označeny červenou šipkou.

Tab. 5: Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959

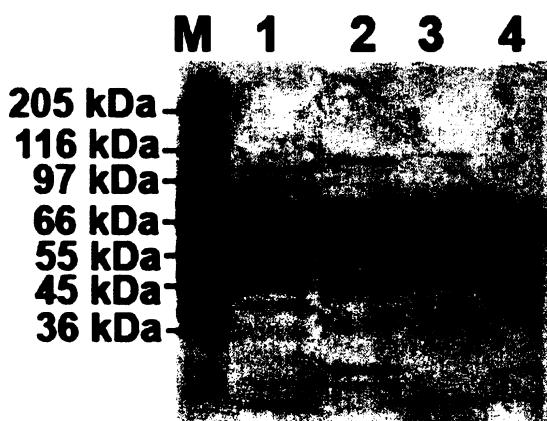
	obsah proteinu (mg)	a (U)	a (U/mg)	stupeň načištění	výtěžek (%)
precipitát	45,1	488	10,8	1,0	100
fenyl-Sepharosa	9,7	256	26,4	2,4	52
S-Sepharosa	5,1	160	31,3	2,9	33
Mono Q	2,0	69	34,0	3,1	14
Superdex	1,4	48	35,6	3,3	10



Obr. 26: Průběh purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959 (SDS-PAGE, 10 %). Standard molekulových hmotností (M), precipitát (1), separace β -N-acetylhexosaminidasy na sloupci fenyl-Sepharosy (2), S-Sepharosy (3), Mono Q (4) a na sloupci Superdexu (5).

4.2 Deglykosylace β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438 a *Aspergillus oryzae*

Deglykosylace N-glykosidicky vázaných sacharidových řetězců byla pro oba enzymy provedena pomocí endoglykosidasy H (endo H) za nativních podmínek v Laboratoři architektury proteinů postupem uvedeným v kap. 3.4.2 (str. 34). Výsledky byly potvrzeny elektroforetickou separací nativního i deglykosylovaného enzymu v denaturujícím prostředí (Obr. 27). Z obrázku je patrné, že u obou enzymů došlo po deglykosylaci (*A. o.* dráha 2, *P. o.* 3438 dráha 4) ke snížení molekulové hmotnosti oproti nativní formě (*A. o.* dráha 1, *P. o.* 3438 dráha 3). Deglykosylované enzymy byly použity k další charakterizaci.

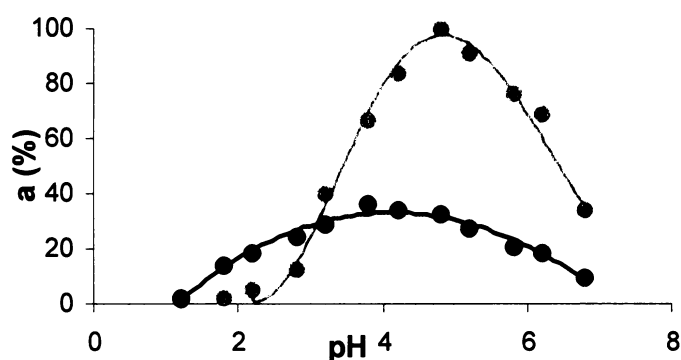


Obr. 27: Elektroforetická separace nativní (1) a deglykosylované (2) β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* a nativní (3) a deglykosylované (4) β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438 (SDS-PAGE, 10 %). Standard molekulových hmotností označen M.

4.3 Vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy

4.3.1 Vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*

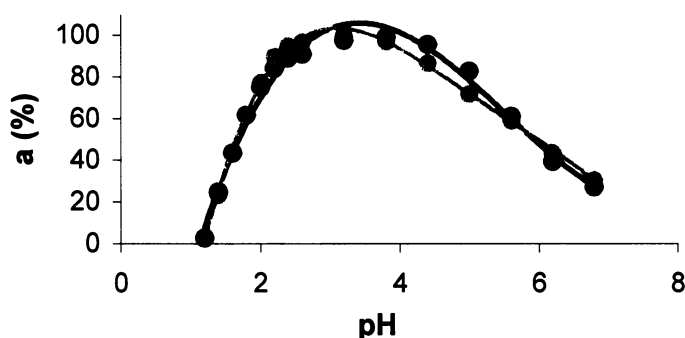
Byl sledován vliv pH na aktivitu nativní β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (Obr. 28). Pro substrát p-NP-GlcNAc leží optimální hodnota pH v rozmezí 4 až 6 a maximální aktivitu lze dosáhnout při pH 5. Pro substrát p-NP-GalNAc leží optimální hodnota pH v intervalu 3 až 5 a nejvyšší aktivitu lze dosáhnout při pH 4.



Obr. 28: Vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *A. o.*
 * p-NP-GlcNAc, --•-- p-NP-GalNAc. 100 % odpovídá aktivitě 103 U/mg.

4.3.2 Vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959

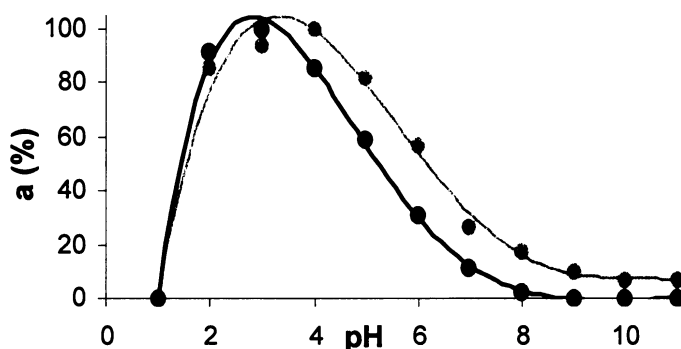
Byl sledován vliv pH na aktivitu nativní β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959 (Obr. 29). Pro substráty p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc leží optimální hodnota pH v rozmezí 2 až 4 a nejvyšší aktivitu lze dosáhnout při pH 3. Při pH 7 enzym dosahuje pouze 30 % aktivity oproti aktivitě při pH 3.



Obr. 29: Vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 1959,
 * p-NP-GlcNAc, --•-- p-NP-GalNAc. 100 % odpovídá aktivitě 40 U/mg.

4.3.3 Vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438

Byl sledován vliv pH na aktivitu nativní β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438 (Obr. 30). Pro substráty p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc leží optimální hodnota pH v rozmezí 2 až 4 a nejvyšší aktivitu lze dosáhnout při pH 3. Při pH 7 enzym dosahuje pouze 15 %, resp. 30 % GalNAc-asové, resp. GlcNAc-asové aktivity oproti aktivitě při pH 3. Při pH 8 je GlcNAc-asová aktivita 20 % oproti aktivitě při pH 3 a GalNAc-asová je nulová.

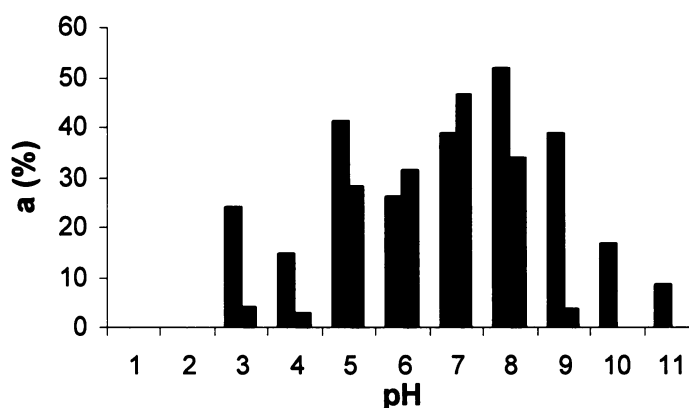


Obr. 30: Vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 3438,
 • p-NP-GlcNAc, -•- p-NP-GalNAc. 100 % odpovídá aktivitě 120 U/mg.

4.4 Vliv pH na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438

Byl sledován vliv pH na stabilitu nativní a deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy, a to jak pro substrát p-NP-GlcNAc, tak pro p-NP-GalNAc.

Nativní β -N-acetylhexosaminidasa je stabilní v rozmezí hodnot pH 7 až 9 pro



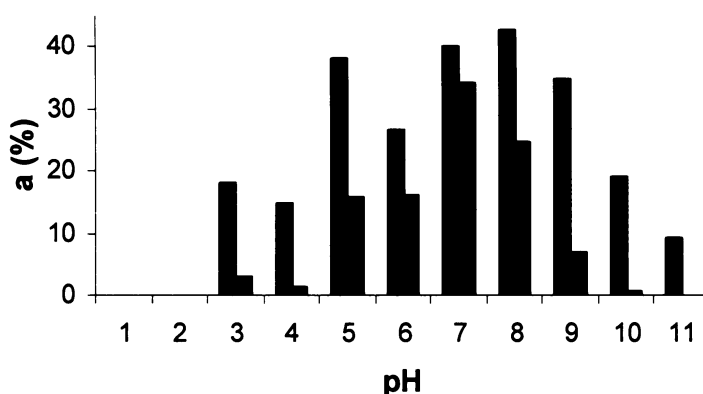
Obr. 31: Vliv pH na stabilitu nativní (■) a deglykosylované (●) β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 3438 pro substrát p-NP-GlcNAc, 68. den. 100 % odpovídá aktivitě 100 U/mg.

substrát p-NP-GlcNAc (Obr. 31, str. 49). Nejvyšší stabilitu vykazuje nativní β -N-acetylhexosaminidasa při pH 8. Při pH 1 a 2 je aktivita nativního enzymu nulová.

Deglykosylovaná β -N-acetylhexosaminidasa je stabilní v rozmezí hodnot pH 6 až 8 pro substrát p-NP-GlcNAc (Obr. 31, str. 49). Nejvyšší stabilitu vykazuje deglykosylovaná β -N-acetylhexosaminidasa při pH 7. Při pH 1, 2, 10 a 11 je aktivita deglykosylovaného enzymu nulová. Při pH nižším než 4 a vyšším než 8 je deglykosylovaný enzym oproti nativnímu výrazně nestabilní.

Nativní β -N-acetylhexosaminidasa je stabilní v rozmezí hodnot pH 7 až 9 pro substrát p-NP-GalNAc (Obr. 32). Nejvyšší stabilitu vykazuje nativní β -N-acetylhexosaminidasa při pH 8. Při pH 1 a 2 je aktivita nativního enzymu nulová.

Deglykosylovaná β -N-acetylhexosaminidasa je stabilní v rozmezí hodnot pH 6 až 8 pro substrát p-NP-GalNAc (Obr. 32). Nejvyšší stabilitu vykazuje deglykosylovaná β -N-acetylhexosaminidasa při pH 7. Při pH 1, 2 a 11 je aktivita deglykosylovaného enzymu nulová, při pH 3, 4 a 10 dosahuje maximálně 3 % původní aktivity.

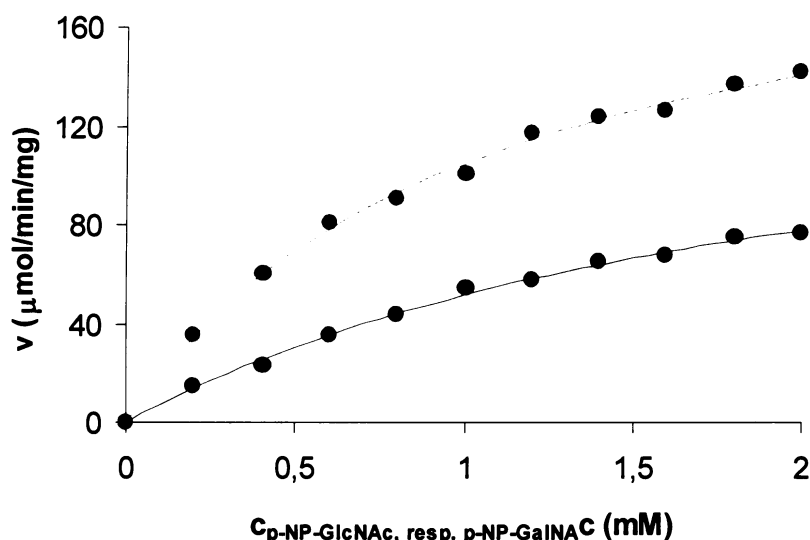


Obr. 32: Vliv pH na stabilitu nativní (■) a deglykosylované (▣) β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o. CCF 3438* pro substrát p-NP-GalNAc, 68. den. 100 % odpovídá aktivitě 120 U/mg.

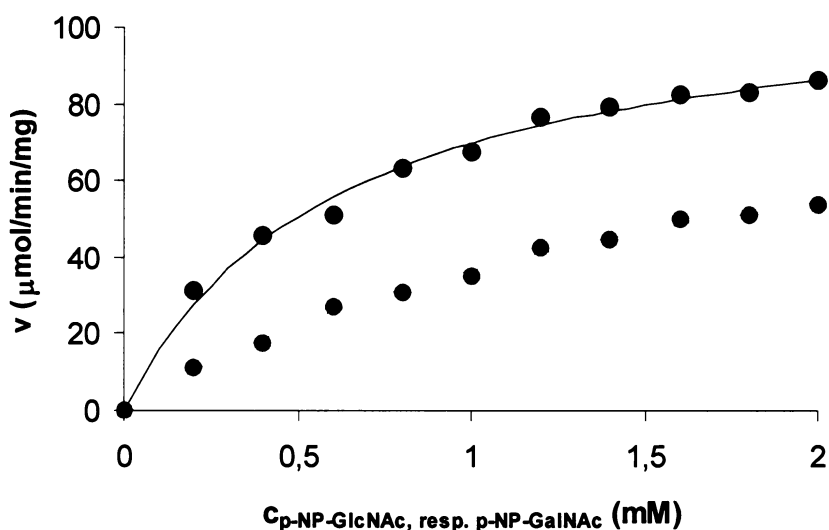
4.5 Stanovení kinetických parametrů pro substráty p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc

4.5.1 Stanovení kinetických parametrů pro β -N-acetylhexosaminidasu z *Aspergillus oryzae*

Byl sledován vliv koncentrace substrátu p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc na rychlost reakce katalyzovanou nativní (Obr. 33, str. 51) a deglykosylovanou (Obr. 34, str. 51) β -N-acetylhexosaminidasou z *A. oryzae* při optimálním pH (pH 5 pro p-NP-GlcNAc a 4 pro p-NP-GalNAc).



Obr. 33: Vliv koncentrace substrátu p-NP-GlcNAc (●), resp. p-NP-GalNAc (○) na rychlost reakce katalyzovanou nativní β -N-acetylhexosaminidasou z *A. o.*



Obr. 34: Vliv koncentrace substrátu p-NP-GlcNAc (●), resp. p-NP-GalNAc (○) na rychlost reakce katalyzovanou deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *A. o.*

Z obrázků vyplývá, že rychlost reakce katalyzovaná nativní i deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasou stoupá se zvyšující se koncentrací substrátu p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc a řídí se hyperbolickou kinetikou podle rovnice Michaelise a Mentenové. Rychlost reakce je pro nativní i deglykosylovaný enzym vyšší se substrátem p-NP-GlcNAc. Také afinita obou forem β -N-acetylhexosaminidasy k substrátu p-NP-GlcNAc je vyšší než k substrátu p-NP-GalNAc, což potvrzují hodnoty Michaelisových konstant (Tab. 6, str. 52). Deglykosylace nemá vliv na afinitu k oběma substrátům, ale má vliv na rychlost reakce. Maximální rychlost štěpení substrátu

p-NP-GlcNAc klesá po deglykosylaci o polovinu a maximální rychlost štěpení p-NP-GalNAc klesá po deglykosylaci o třetinu maximální rychlosti nativní formy (Tab. 6).

V obrázcích 33 i 34 (str. 51) jsou experimentální data proložena nelineární regresí podle rovnice Michaelise a Mentenové.

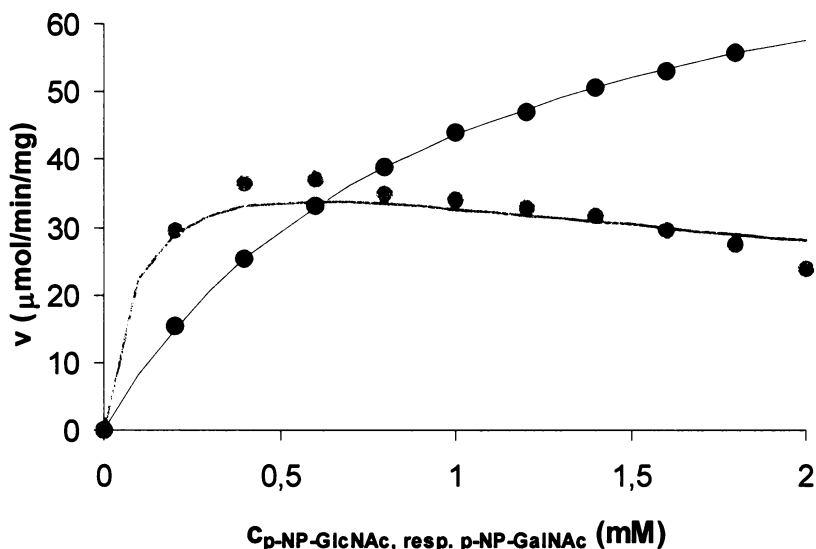
Poměr GlcNAc-asové a GalNAc-asové aktivity je 1,3 pro nativní a 1,1 pro deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasu. Tento poměr je vypočítán z maximálních rychlostí reakce (Tab. 6).

Tab. 6: Michaelisovy konstanty a maximální rychlosti pro nativní a deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* včetně směrodatných odchylek.

	NATIVNÍ		DEGLYKOSYLOVANÁ	
	pNP-GlcNAc	pNP-GalNAc	pNP-GlcNAc	pNP-GalNAc
K_M (mM)	1	2	1	2
odchylka (%)	± 7	± 11	± 9	± 10
V_{max} (μ mol/min/mg)	211	157	112	102
odchylka (%)	± 3	$\pm 0,6$	± 4	± 6

4.5.2 Stanovení kinetických parametrů pro β -N-acetylhexosaminidasu z *Penicillium oxalicum* CCF 1959

Byl sledován vliv koncentrace substrátu p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc na rychlost reakce katalyzovanou nativní β -N-acetylhexosaminidasou (Obr. 35) při



Obr. 35: Vliv koncentrace substrátu p-NP-GlcNAc (●), resp. p-NP-GalNAc (○) na rychlost reakce katalyzovanou nativní β -N-acetylhexosaminidasou z *P. o. CCF 1959*. Proložení experimentálních dat nelineární regresí podle rovnice Michaelise a Mentenové (—, —), proložení experimentálních dat nelineární regresí podle rovnice inhibice substrátem (—).

optimálním pH (pH 3 pro oba substráty).

Chování β -N-acetylhexosaminidasy vůči oběma substrátům je rozdílné. Rychlost reakce katalyzovaná nativní β -N-acetylhexosaminidasou stoupá se zvyšující se koncentrací substrátu p-NP-GalNAc a probíhá tedy hyperbolickou kinetikou podle rovnice Michaelise a Mentenové.

Rychlost hydrolyzy substrátu p-NP-GlcNAc stoupá do jeho koncentrace 0,4 mM, poté dochází k poklesu reakční rychlosti. GlcNAc-asová aktivita je tedy inhibována substrátem p-NP-GlcNAc při koncentracích vyšších než 0,4 mM. Maximální rychlost této reakce je tedy pouze teoreticky vypočítaná hodnota, která by platila pro reakci probíhající bez inhibice nadbytkem substrátu.

Afinita β -N-acetylhexosaminidasy je vyšší k substrátu p-NP-GlcNAc, což vyplývá z vypočítaných Michaelisových konstant (Tab. 7). V tab. 7 jsou shrnuty i hodnoty maximálních reakčních rychlostí a inhibiční konstanta pro p-NP-GlcNAc.

V obrázku 35 (str. 52) jsou experimentální data proložena nelineární regresí podle rovnice Michaelise a Mentenové. Data pro substrát p-NP-GlcNAc jsou navíc proložena nelineární regresí podle rovnice pro inhibici substrátem.

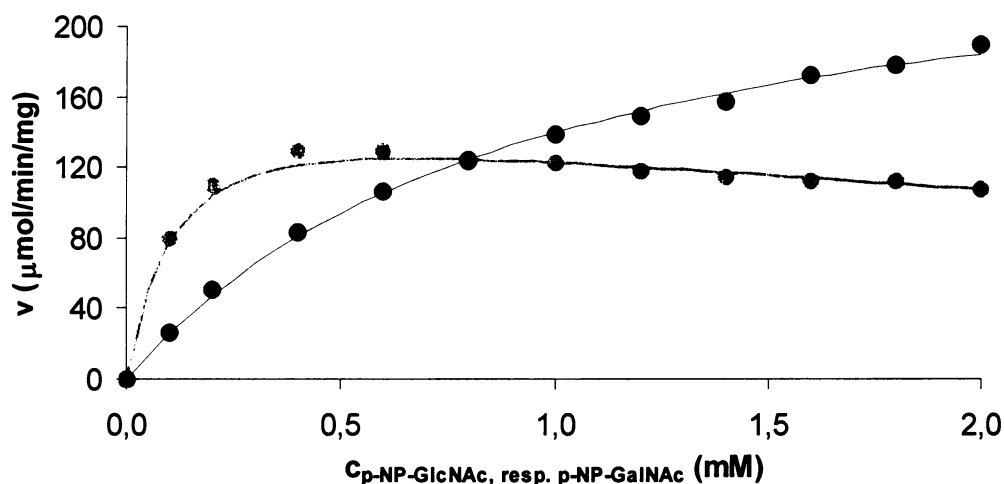
Poměr GlcNAc-asové a GalNAc-asové aktivity, vypočítaný z maximálních reakčních rychlostí, je pro nativní β -N-acetylhexosaminidasu roven 0,5. Tento poměr platí pro reakci, která by nebyla inhibována nadbytkem substrátu.

Tab. 7: Michaelisovy konstanty, maximální reakční rychlosti a inhibiční konstanta pro inhibici substrátem pro nativní β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum* CCF 1959 včetně směrodatných odchylek.

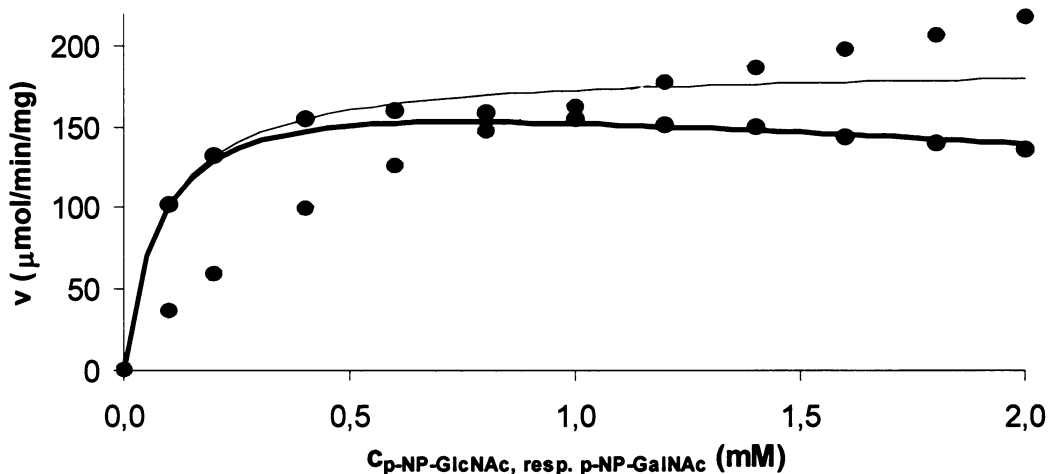
	pNP-GlcNAc	pNP-GalNAc
K_m (mM)	0,1	1
odchylka (%)	± 6	± 2
V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	45	85
odchylka (%)	± 2	± 1
K_{ss} (mM)	0,4	-
odchylka (%)	± 8	-

4.5.3 Stanovení kinetických parametrů pro β -N-acetylhexosaminidasu z *Penicillium oxalicum* CCF 3438

Byl sledován vliv koncentrace substrátu p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc na rychlost reakce katalyzovanou nativní (Obr. 36, str. 53) a deglykosylovanou (Obr. 37, str. 54) β -N-acetylhexosaminidasou při optimálním pH (pH 3 pro oba substráty).



Obr. 36: Vliv koncentrace substrátu p-NP-GlcNAc (●), resp. p-NP-GalNAc (○) na rychlost reakce katalyzovanou nativní β -N-acetylhexosaminidasou z *P. o. CCF 3438*. Proložení experimentálních dat nelineární regresí podle rovnice Michaelise a Mentenové (—), proložení experimentálních dat nelineární regresí podle rovnice pro inhibici substrátem (---).



Obr. 37: Vliv koncentrace substrátu p-NP-GlcNAc (●), resp. p-NP-GalNAc (○) na rychlost reakce katalyzovanou deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *P. o. CCF 3438*. Proložení experimentálních dat nelineární regresí podle rovnice Michaelise a Mentenové (—, ---), proložení experimentálních dat nelineární regresí podle rovnice pro inhibici substrátem K_{SS} (—).

Chování β -N-acetylhexosaminidasy vůči oběma substrátům je rozdílné. Rychlost reakce katalyzovaná nativní i deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasou stoupá se zvyšující se koncentrací substrátu p-NP-GalNAc a probíhá tedy hyperbolickou kinetikou podle rovnice Michaelise a Mentenové.

Rychlost reakce katalyzovaná nativní, resp. deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasou stoupá až do 0,5 mM, resp. 0,6 mM koncentrace p-NP-GlcNAc v souladu s kinetikou Michaelise a Mentenové. Poté dochází k poklesu reakční rychlosti. GlcNAc-asová aktivita je tedy inhibována nadbytkem substrátu p-NP-GlcNAc při koncentracích vyšších než 0,5 mM pro nativní a 0,6 mM pro deglykosylovaný enzym. Maximální rychlosti těchto reakcí jsou tedy pouze teoreticky vypočítané hodnoty, které platí pro reakci probíhající bez inhibice nadbytkem substrátu (Tab. 8).

Afinita nativní i deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy je vyšší k substrátu p-NP-GlcNAc, jak vyplývá z hodnot Michaelisových konstant (Tab. 8). Tab. 8 shrnuje i hodnoty maximálních reakčních rychlostí a inhibiční konstanty pro inhibici nadbytkem substrátu.

Deglykosylace má vliv na rychlost reakce. Maximální rychlost štěpení substrátu p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc roste po deglykosylaci o desetinu vzhledem k maximální rychlosti nativní formy (Tab. 8). Deglykosylace nemá vliv na afinitu k oběma substrátům.

V obrázcích 36 a 37 (str. 54) jsou experimentální data proložena nelineární regresí podle rovnice Michaelise a Mentenové. Data pro substrát p-NP-GlcNAc jsou navíc proložena nelineární regresí podle rovnice pro inhibici substrátem.

Poměr GlcNAc-asové a GalNAc-asové aktivity je 0,6 pro nativní i deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasu. Tento poměr platí pro reakci, která by nebyla inhibována nadbytkem substrátu.

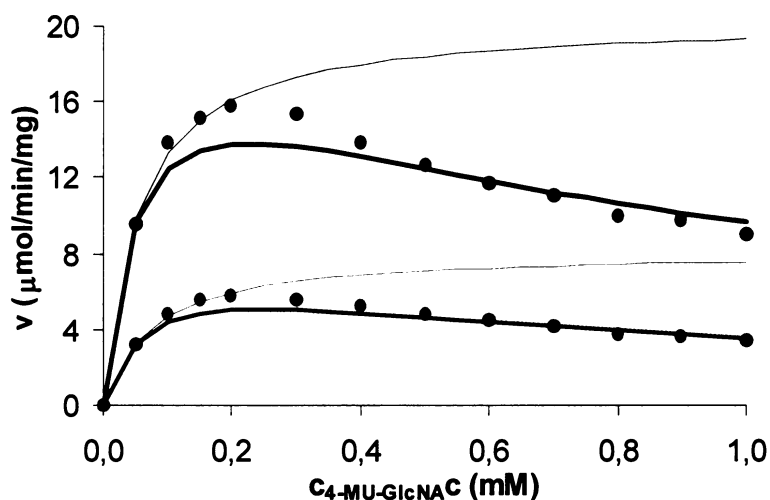
Tab. 8: Michaelisovy konstanty, maximální reakční rychlosti a inhibiční konstanta pro inhibici substrátem pro nativní a deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum* CCF 3438 včetně směrodatných odchylek.

	NATIVNÍ		DEGLYKOSYLOVANÁ	
	pNP-GlcNAc	pNP-GalNAc	pNP-GlcNAc	pNP-GalNAc
K_m (mM)	0,1	1	0,1	1
odchylka (%)	± 8	± 6	± 2	± 3
V_{max} (μ mol/min/mg)	166	271	187	301
odchylka (%)	± 3	± 3	± 1	± 5
K_{SS} (mM)	0,5	-	0,6	-
odchylka (%)	± 9	-	± 8	-

4.6 Stanovení kinetických parametrů pro substrát 4-MU-GlcNAc

4.6.1 Stanovení kinetických parametrů pro β -N-acetylhexosaminidasu z *Penicillium oxalicum* CCF 1959 a *Penicillium oxalicum* CCF 3438

Byl sledován vliv koncentrace substrátu 4-MU-GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou nativní β -N-acetylhexosaminidasou z *P. oxalicum* 1959 a *P. oxalicum* 3438 (Obr. 38) při pH 3.



Obr. 38: Vliv koncentrace substrátu 4-MU-GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou nativní β -N-acetylhexosaminidasou z *P. o.* CCF 1959 (●), resp. *P. o.* CCF 3438 (◼). Proložení experimentálních dat nelineární regrese podle rovnice Michaelise a Mentenové (—, —), proložení experimentálních dat nelineární regrese podle rovnice pro inhibici substrátem (—, —).

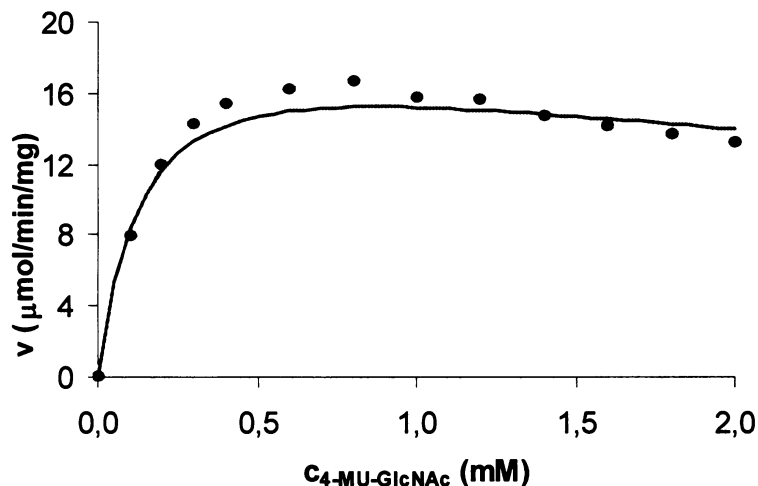
Reakční rychlost β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 1959 i *P. o.* 3438 stoupá se zvyšující se koncentrací substrátu 4-MU-GlcNAc a řídí se kinetikou Michaelise a Mentenové až do koncentrace 0,2 mM. Nad touto koncentrací dochází k poklesu reakční rychlosti vlivem inhibice nadbytkem substrátu. Maximální rychlosti těchto reakcí jsou tedy pouze teoreticky vypočítané hodnoty, které platí pro reakci probíhající bez inhibice nadbytkem substrátu (Tab. 9).

Tab. 9: K_M , V_{max} a K_{SS} pro nativní β -N-acetylhexosaminidasu z *P. o.* CCF 3438 a *P. o.* CCF 1959 včetně směrodatných odchylek

	<i>P. o.</i> CCF 3438	<i>P. o.</i> CCF 1959	<i>A. o.</i>
K_M (mM)	0,05	0,07	0,14
odchylka (%)	16	14	10
V_{max} (μ mol/min/mg)	20	8	20
odchylka (%)	5	5	3
K_{SS}	0,05	0,06	0,75
odchylka (%)	10	9	10

4.6.2 Stanovení kinetických parametrů pro β -N-acetylhexosaminidasu z *Aspergillus oryzae*

Byl sledován vliv koncentrace substrátu 4-MU-GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou nativní β -N-acetylhexosaminidasou z *A. oryzae* (Obr. 39) při pH 5.



Obr. 39: Vliv koncentrace substrátu 4-MU-GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou nativní β -N-acetylhexosaminidasou z *A. o.* (\bullet). Proložení experimentálních dat nelineární regresí podle rovnice Michaelise a Mentenové (—), proložení experimentálních dat nelineární regresí podle rovnice pro inhibici substrátem (—).

Z obrázku 39 je patrné, že reakce se až do koncentrace 4-MU-GlcNAc 0,8 mM řídí kinetikou Michaelise a Mentenové. Při koncentracích vyšších dochází k poklesu reakční rychlosti vlivem inhibice nadbytkem substrátu. Maximální rychlosti těchto reakcí jsou tedy pouze teoreticky vypočítané hodnoty, které platí pro reakci probíhající bez inhibice nadbytkem substrátu (Tab. 9, str. 56).

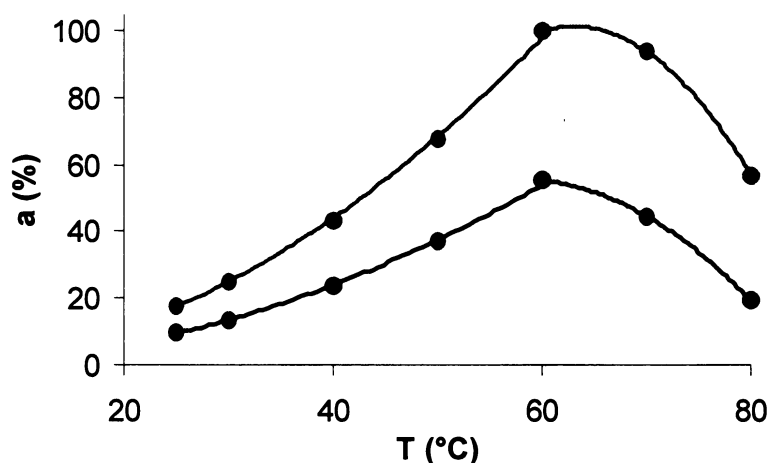
Vyšší afinitu k substrátu 4-MU-GlcNAc vykazují β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum*, jak vyplývá z hodnot Michaelisových konstant (Tab. 9, str. 55). Jejich afinita je dvojnásobně vyšší než afinita β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae*. Hodnoty maximální reakční rychlosti jsou srovnatelné pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum* CCF 3438 a *A. oryzae*, hodnota maximální rychlosti β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum* CCF 1959 je méně než poloviční (Tab. 9, str. 56).

V obrázcích 38 (str. 56) a 39 jsou experimentální data proložena jak nelineární regresí podle rovnice Michaelise a Mentenové, tak nelineární regresí podle rovnice popisující inhibici nadbytkem substrátu.

4.7 Vliv teploty na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy

4.7.1 Vliv teploty na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*

Byl sledován vliv teploty v rozmezí 25 až 80 °C na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (Obr. 40), a to jak na aktivitu GlcNAc-ovou, tak GalNAc-ovou. Byl použit 2 mM p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc, což odpovídá saturační koncentraci.

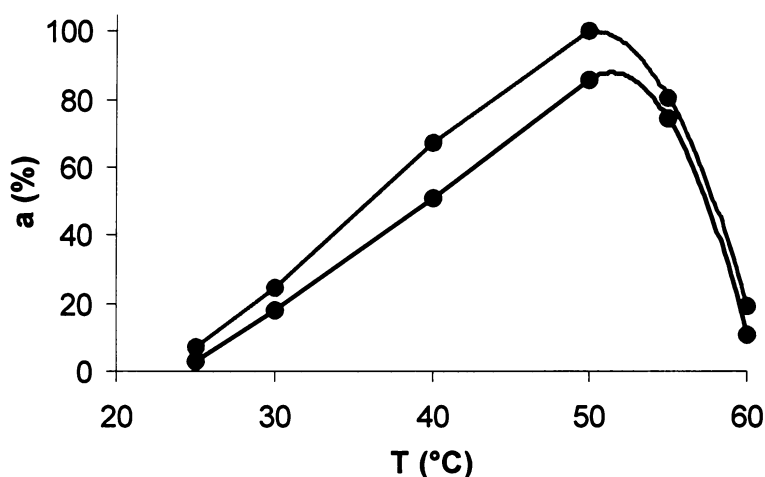


Obr. 40: Vliv teploty na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *A. o.* s použitím substrátů p-NP-GlcNAc (●) a p-NP-GalNAc (●). 100 % odpovídá aktivitě 900 U/mg.

Z obrázku 40 vyplývá, že maximální GlcNAc-ová i GalNAc-ová aktivita je dosažena při teplotě 60 °C, vysokých aktivit lze dosáhnout v rozmezí teplot 50 až 70 °C. Při teplotě 80 °C je enzym stále aktivní.

4.7.2 Vliv teploty na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959

Byl sledován vliv teploty v rozmezí 25 až 60 °C na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959 (Obr. 41, str. 59), a to jak na aktivitu GlcNAc-ovou, tak GalNAc-ovou. Byl použit 0,5 mM p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc. Tyto koncentrace nejsou saturační, ale jak vyplývá z obr. 35 (str. 52) při vyšších koncentracích p-NP-GlcNAc dochází k inhibici β -N-acetylhexosaminidasy vlivem nadbytku substrátu.

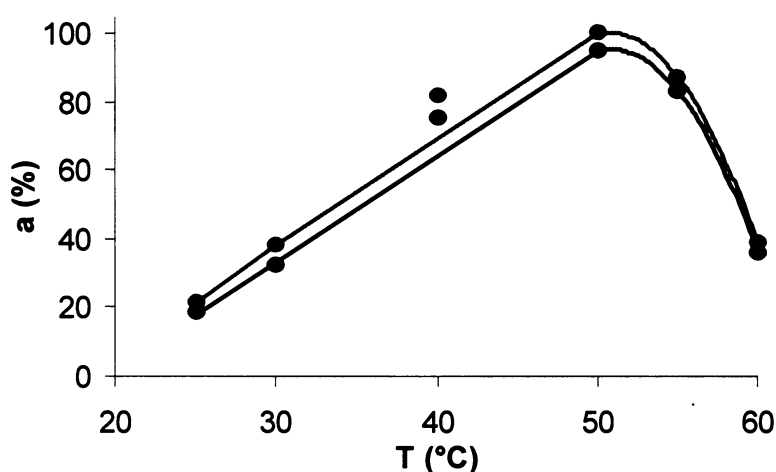


Obr. 41: Vliv teploty na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o. CCF 1959* s použitím substrátů p-NP-GlcNAc (●) a p-NP-GalNAc (○). 100 % odpovídá aktivitě 650 U/mg.

Z obr. 41 vyplývá, že maximální GlcNAc-asová i GalNAc-asová aktivita je dosažena při teplotě 50 °C, vysokých aktivit lze dosáhnout v rozmezí teplot 45 až 55 °C. Při teplotě 60 °C je enzym stále aktivní a jeho aktivita je asi o 10 % vyšší než při 25 °C.

4.7.3 Vliv teploty na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438

Byl sledován vliv teploty v rozmezí 25 až 60 °C na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438 (Obr. 42), a to jak na aktivitu GlcNAc-asovou, tak GalNAc-asovou. Byl použit 0,5 mM p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc.



Obr. 42: Vliv teploty na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o. CCF 3438* s použitím substrátů p-NP-GlcNAc (●) a p-NP-GalNAc (○). 100 % odpovídá aktivitě 320 U/mg.

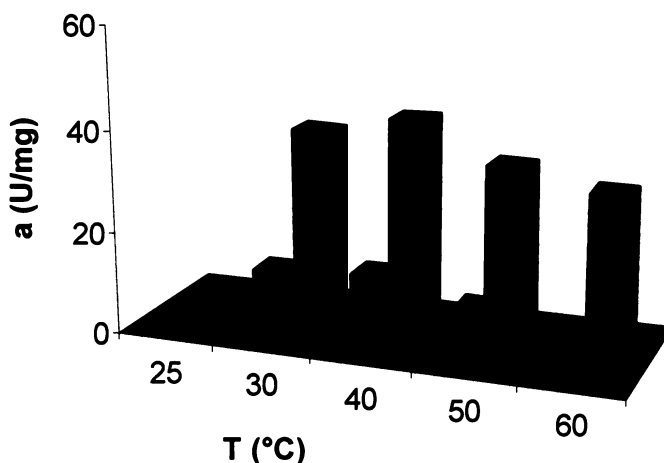
Tyto koncentrace nejsou saturační, ale jak vyplývá z obr. 36 (str. 54) při vyšších koncentracích p-NP-GlcNAc dochází k inhibici β -N-acetylhexosaminidasy vlivem substrátu.

Z obr. 42 (str. 59) vyplývá, že maximální GlcNAc-asová i GalNAc-asová aktivita je dosažena při teplotě 50 °C, vysokých aktivit lze dosáhnout v rozmezí teplot 45 až 55 °C. Při teplotě 60 °C je enzym stále aktivní a jeho aktivita je asi o 10 % vyšší než při 25 °C.

4.8 Vliv teploty na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy

4.8.1 Vliv teploty na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*

Byl sledován vliv teploty na stabilitu nativní a deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (Obr. 43). Enzym byl inkubován po dobu 10 min v lázni o teplotách v rozmezí 25 až 60 °C a následně měřena jeho GlcNAc-asová aktivita. Byl použit 2 mM p-NP-GlcNAc, což odpovídá saturační koncentraci.



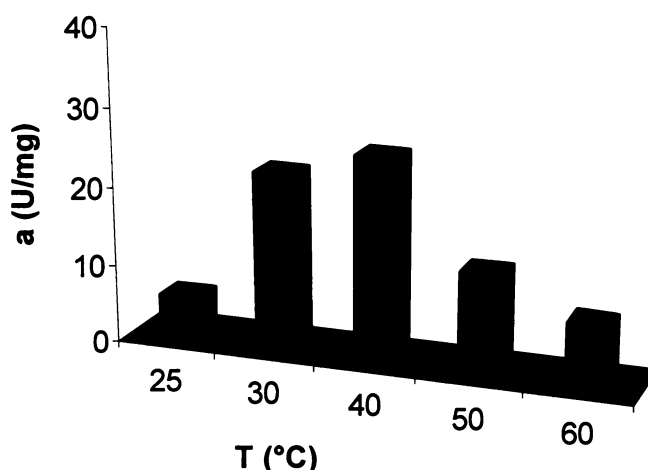
Obr. 43: Vliv teploty na stabilitu nativní (■) a deglykosylované (▣) β -N-acetylhexosaminidasy z *A. o.* pro substrát p-NP-GlcNAc.

Z obrázku 43 vyplývá, že nativní i deglykosylovaná β -N-acetylhexosaminidasa vykazují nejvyšší aktivitu po inkubaci při teplotě 40 °C. Po inkubaci při teplotách vyšších než 40 °C dochází k poklesu obou aktivit, u deglykosylovaného enzymu je ale pokles významnější.

Po inkubaci při teplotě 40 °C je aktivita deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy o 60 % nižší než aktivita nativního enzymu. Aktivita nativního i deglykosylovaného enzymu je při 60 °C vyšší než při 25 °C.

4.8.2 Vliv teploty na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959

Byl sledován vliv teploty na stabilitu nativní β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959 (Obr. 44). Enzym byl inkubován po dobu 10 min v lázni o teplotách v rozmezí 25 až 60 °C a následně měřena jeho GlcNAc-asová aktivita. Byl použit 0,5 mM p-NP-GlcNAc. Tato koncentrace není saturační, ale jak vyplývá z obr. 35 (str. 52) při vyšších koncentracích dochází k poklesu aktivity β -N-acetylhexosaminidasy vlivem substrátu.

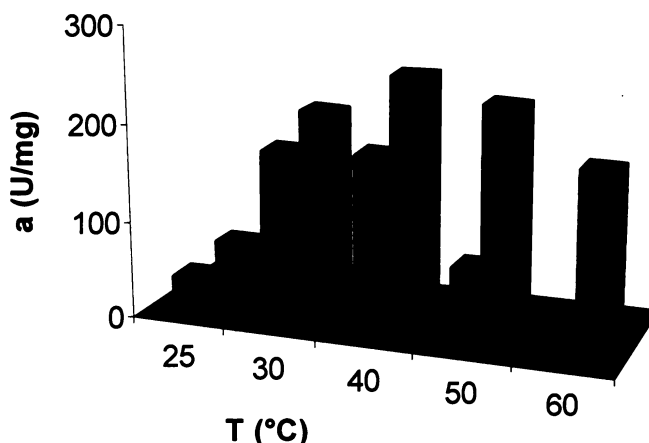


Obr. 44: Vliv teploty na stabilitu nativní β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 1959 pro substrát p-NP-GlcNAc.

Z obrázku 44 vyplývá, že nativní β -N-acetylhexosaminidasa vykazuje nejvyšší aktivitu po inkubaci při teplotě 40 °C. Po inkubaci při teplotách vyšších než 40 °C dochází k poklesu aktivity. Aktivita při 60 °C je o 30 % vyšší než aktivita při 25 °C.

4.8.3 Vliv teploty na stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438

Byl sledován vliv teploty na stabilitu nativní a deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438 (Obr. 45, str. 62). Enzym byl inkubován po dobu 10 min v lázni o teplotách v rozmezí 25 až 60 °C a následně změřena jeho GlcNAc-asová aktivita. Byl použit 0,5 mM p-NP-GlcNAc. Tato koncentrace není saturační, ale jak vyplývá z obr. 36 (str. 54) při vyšších koncentracích dochází k poklesu aktivity β -N-acetylhexosaminidasy vlivem substrátu.



Obr. 45: Vliv teploty na stabilitu nativní (■) a deglykosylované (▣) β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 3438 pro substrát p-NP-GlcNAc.

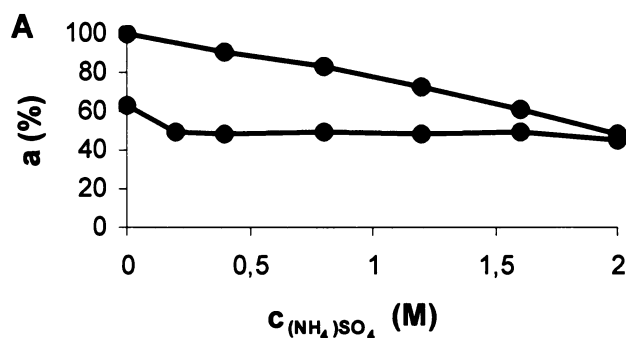
Z obrázku 45 vyplývá, že nativní i deglykosylovaná β -N-acetylhexosaminidasa vykazují nejvyšší aktivitu po inkubaci při teplotě 40 °C. Po inkubaci při teplotách vyšších než 40 °C dochází k poklesu obou aktivit, u deglykosylovaného enzymu je ale pokles významnější.

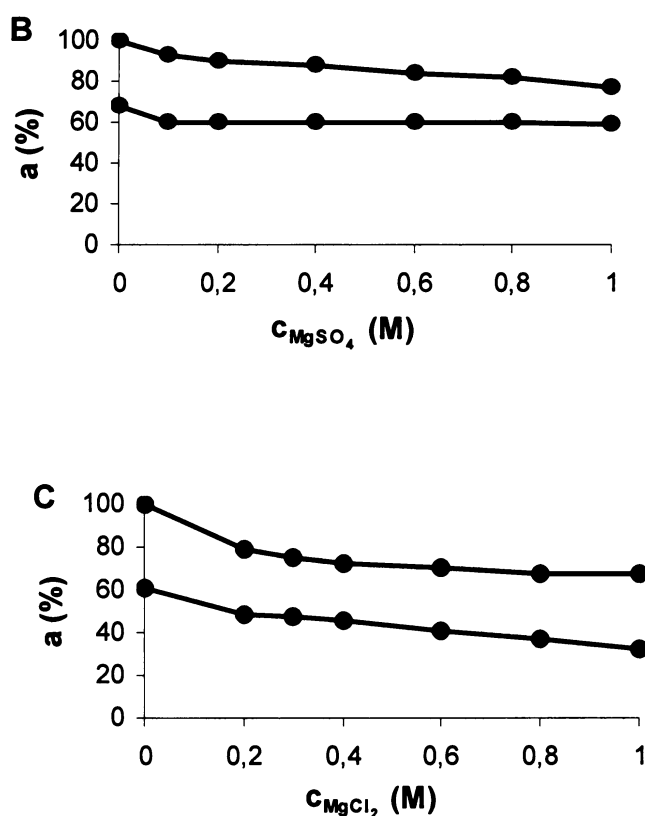
Aktivita deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy je při inkubaci při 40 °C o 15 % nižší než aktivita nativního enzymu. Po inkubaci při 60 °C je aktivita nativního enzymu vyšší než při 25 °C.

4.9 Vliv solí na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy

4.9.1 Vliv solí na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*

Byl sledován vliv $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 a MgCl_2 na aktivitu nativní β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (Obr. 46, str. 62-63). Ke stanovení byly použity substráty p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc v koncentracích 2 mM, což odpovídá saturační koncentraci.





Obr. 46: Vliv $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (A), MgSO_4 (B) a MgCl_2 (C) na aktivitu nativní β -N-acetylhexosaminidasy z *A. o.*, p-NP-GlcNAc (●), p-NP-GalNAc (○). 100 % odpovídá aktivitě 120 U/mg.

Přítomnost $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ způsobuje pokles GlcNAc-asové aktivity a to tím vyšší, čím vyšší je jeho koncentrace v reakční směsi (Obr. 46A, str. 62). Aktivita GalNAc-asová je také $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ inhibována, ale jeho zvyšující se koncentrace nezpůsobuje další pokles. Při 2 mM koncentraci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je GlcNAc-asová i GalNAc-asová aktivita téměř stejná, poměr obou aktivit klesá z hodnoty 1,3 při nepřítomnosti solí na 1,1 (Tab. 10, str. 65).

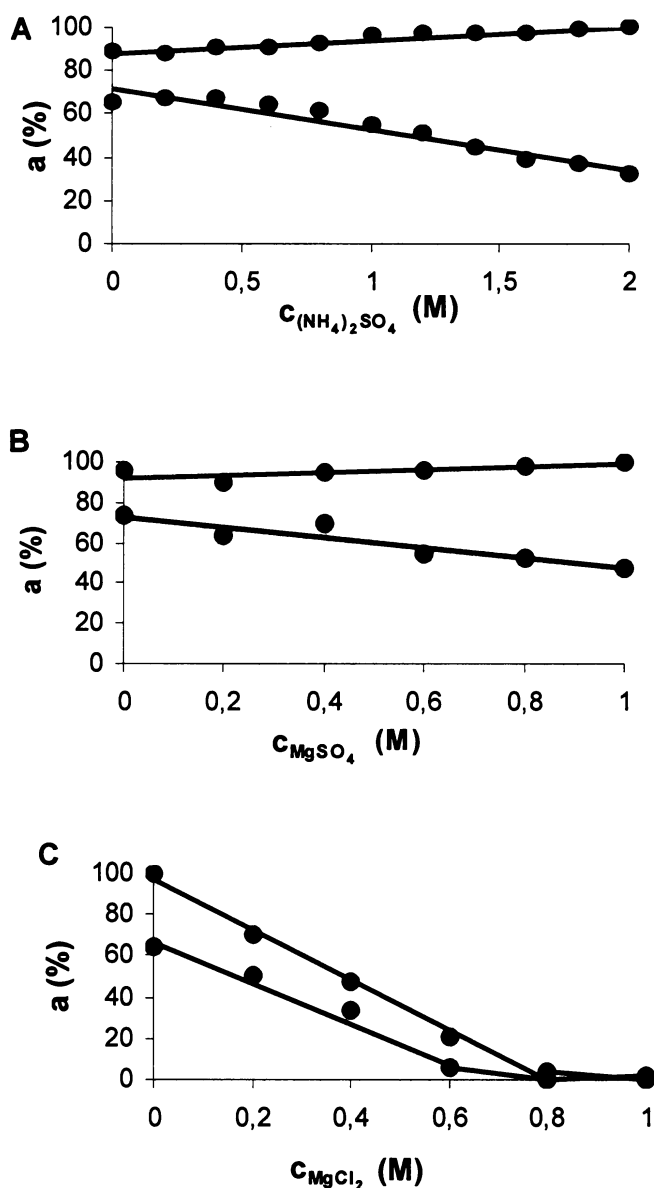
V přítomnosti MgSO_4 dochází k poklesu GlcNAc-asy a to tím víc, čím vyšší je jeho koncentrace v reakční směsi (Obr. 46B). Tento pokles je ale mírnější než v přítomnosti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Aktivita GalNAc-asová je také MgSO_4 inhibována, ale jeho zvyšující se koncentrace nezpůsobuje další pokles. Poměr obou aktivit zůstává nezměněn (Tab. 10, str. 65).

Přítomnost MgCl_2 má stejný vliv na průběh obou aktivit. Dochází k jejich rovnoměrnému poklesu a to tím více, čím vyšší je koncentrace MgCl_2 v reakční směsi. Poměr aktivit se mění z hodnoty 1,3 za nepřítomnosti solí na 2,0 (Tab. 10, str. 65).

Ve všech případech je aktivita GlcNAc-asová vyšší než aktivita GalNAc-asová.

4.9.2 Vliv solí na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438

Byl sledován vliv $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 a MgCl_2 (Obr. 47) na aktivitu nativní β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438. Ke stanovení byly použity substráty p-NP-GalNAc v koncentraci 2 mM, což odpovídá saturaci, a p-NP-GlcNAc v koncentraci 0,4 mM. Tato koncentrace není saturační, ale jak vyplývá z obr. 36 (str. 54) při vyšších koncentracích dochází k poklesu aktivity β -N-acetylhexosaminidasy vlivem substrátu.



Obr. 47: Vliv $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (A), MgSO_4 (B) a MgCl_2 (C) na aktivitu nativní β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 3438. p-NP-GlcNAc (●), p-NP-GalNAc (○). 100 % odpovídá aktivitě 120 U/mg.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ působí zvýšení GalNAc-asové aktivity a naopak snížení GlcNAc-asové aktivity (Obr. 47A, str. 64) a to tím větší, čím vyšší je jeho koncentrace v reakční směsi. Při 2 M koncentraci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ je GlcNAc-asová aktivita o 70 % nižší než GalNAc-asová aktivita. Dochází k poklesu poměru obou aktivit z hodnoty 0,6 při nepřítomnosti soli na 0,3 (Tab. 10).

Podobně i přítomnost MgSO_4 působí zvýšení aktivity GalNAc-asy a snížení aktivity GlcNAc-asy (Obr. 47B, str. 64). Tento efekt je ale slabší než v přítomnosti $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Dochází k poklesu poměru obou aktivit z hodnoty 0,6 při nepřítomnosti soli na 0,5 (Tab. 10).

MgCl_2 má stejný vliv na průběh obou aktivit (Obr. 47C, str. 63). Dochází k rovnocennému poklesu, a to tím více, čím vyšší je jeho koncentrace v reakční směsi. Při 0,8 M koncentraci dochází k úplné inhibici aktivit. GlcNAc-asa dosahuje pouze 1,7 % a GalNAc-asa 0,3 % aktivity vzhledem k reakci bez přítomnosti soli.

Ve všech případech zůstává aktivita GalNAc-asová vyšší než aktivita GlcNAc-asová.

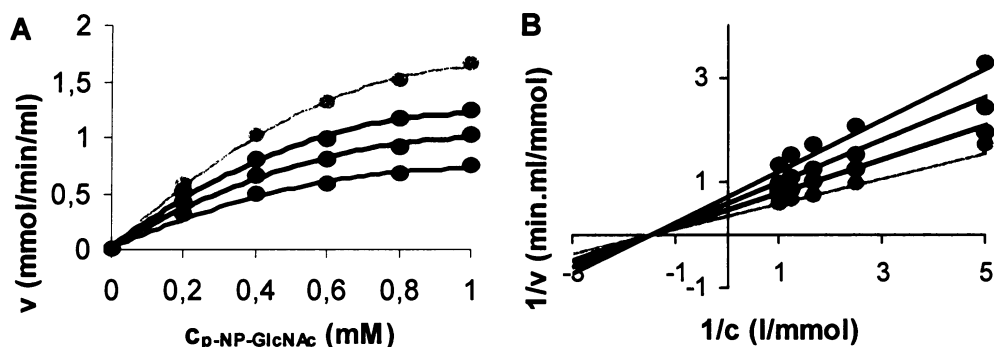
Tab. 10: Vliv solí na poměr GlcNAc-asové a GalNAc-asové aktivity β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* a *P. oxalicum* CCF 3438

	Poměr GlcNAc-asa/GalNAc-asa	
	<i>A. oryzae</i>	<i>P. oxalicum</i> CCF 3438
bez soli	1,3	0,6
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,1	0,3
MgSO_4	1,3	0,5
MgCl_2	2,0	-

4.10 Vliv GlcNAc, GalNAc a NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou

4.10.1 Vliv GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou

Byl sledován vliv GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *Aspergillus oryzae* a *Penicillium oxalicum* CCF 3438. Byl použit jak substrát p-NP-GlcNAc, tak substrát p-NP-GalNAc.

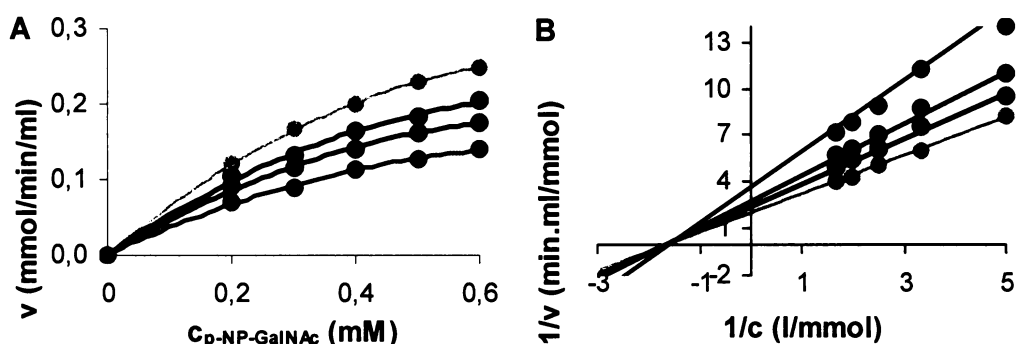


Obr. 48: Vliv GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *A. o.* pro substrát p-NP-GlcNAc. Reakce bez inhibitoru (\circ), 5 mM GlcNAc (\bullet), 10 mM GlcNAc (\bullet), 15 mM GlcNAc (\bullet). Závislost rychlosti na koncentraci substrátu při různých koncentracích inhibitoru (A), dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka (B).

Vliv GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *A. oryzae* pro substrát p-NP-GlcNAc je znázorněn na obr. 48. Obr. 48A dokumentuje vliv GlcNAc o třech různých koncentracích na reakční rychlost, která je tím nižší, čím vyšší je koncentrace GlcNAc v reakční směsi. Obr. 48B je pak dvojitě reciproké vynesení dat z obr. 48A dle Lineweavera a Burka.

Byl sledován i vliv GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *P. oxalicum* CCF 3438 pro substrát p-NP-GlcNAc. Byly vyneseny analogické závislosti jako v případě *A. oryzae*.

Pro oba enzymy je GlcNAc nekompetitivním inhibitorem β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GlcNAc. Podle rovnice pro nekompetitivní inhibici byly vypočítány inhibiční konstanty, které jsou shrnuty v tabulce 11 (str. 69).



Obr. 49: Vliv GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *P. o.* CCF 3438 pro substrát p-NP-GalNAc. Reakce bez inhibitoru (\circ), 1 mM GlcNAc (\bullet), 2 mM GlcNAc (\bullet), 5 mM GlcNAc (\bullet). Závislost rychlosti na koncentraci substrátu při různých koncentracích inhibitoru (A), dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka (B).

Na obr. 49 (str. 66) je znázorněn vliv GlcNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou pro substrát p-NP-GalNAc. Na obr. 49A (str. 66) je vliv GlcNAc o třech různých koncentracích na rychlost reakce pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum* CCF 3438. Rychlost reakce je tím nižší, čím vyšší je koncentrace GlcNAc v reakční směsi. Obr. 49B (str. 66) je dvojitě reciproké vynesení dat z obr. 49A (str. 66) dle Lineweavera a Burka.

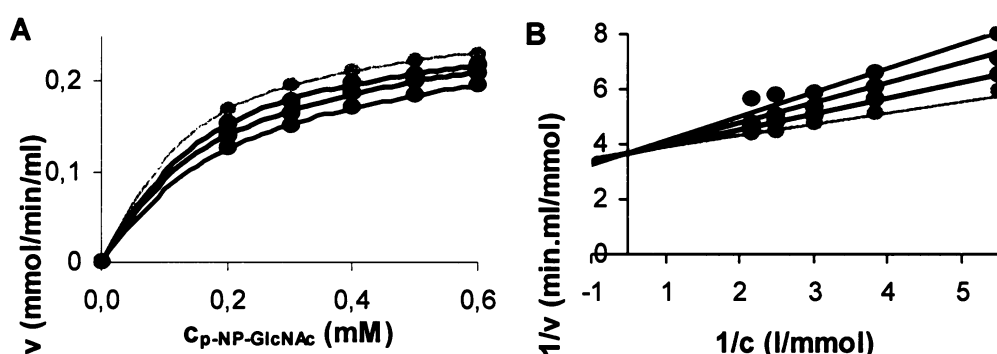
Totožné měření bylo provedeno i pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* a vyneseny analogické závislosti.

V obou případech bylo určeno, že GlcNAc je nekompetitivním inhibítoem β -N-acetylhexosaminidasu pro substrát p-NP-GalNAc. Podle rovnice pro nekompetitivní inhibici byly vypočítány hodnoty inhibičních konstant, které jsou shrnuty v tabulce 11 (str. 69).

GlcNAc má silnější inhibiční efekt na β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum* CCF 3438 než na enzym z *A. oryzae*. U obou enzymů je také více inhibována rychlost reakce při štěpení p-NP-GlcNAc.

4.10.2 Vliv GalNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou

Byl sledován vliv GalNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *Aspergillus oryzae* a *Penicillium oxalicum* CCF 3438. Byl použit jak substrát p-NP-GlcNAc, tak substrát p-NP-GalNAc.

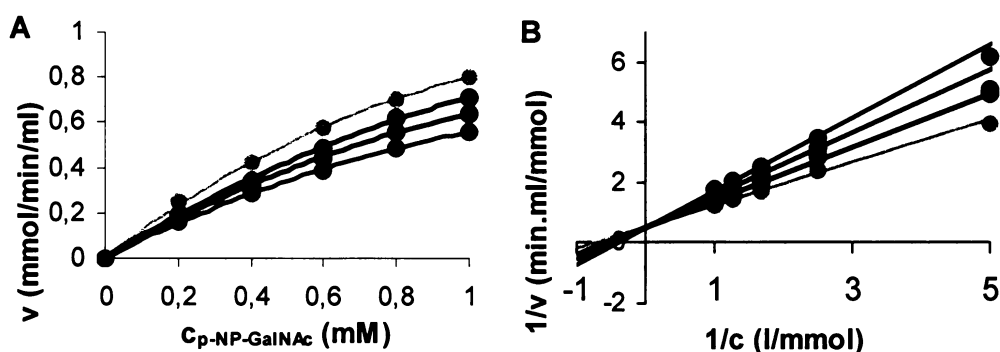


Obr. 50: Vliv GalNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *P. o.* CCF 3438 pro substrát p-NP-GlcNAc. Reakce bez inhibitoru (\bullet), 5 mM GlcNAc (\bullet), 10 mM GlcNAc (\bullet), 15 mM GlcNAc (\bullet). Závislost rychlosti na koncentraci substrátu při různých koncentracích inhibitoru (A), dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka (B).

Obr. 50A (str. 67) dokumentuje vliv GalNAc o třech různých koncentracích na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *P. oxalicum* CCF 3438 pro substrát p-NP-GlcNAc. Rychlost reakce klesá ze zvyšující se koncentrací GalNAc v reakční směsi. Obr. 50B (str. 67) je pak dvojitě reciproké vynesení dat z obr. 50A (str. 676) dle Lineweavera a Burka.

Totožné měření bylo provedeno i pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* vyneseny analogické závislosti.

Z provedených stanovení vyplývá, že GalNAc je pro oba enzymy kompetitivním inhibítorem β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GalNAc. Hodnoty inhibičních konstant, vypočítané podle rovnice pro kompetitivní inhibici, jsou uvedeny v tab. 11 (str. 69).



Obr. 51: Vliv GalNAc na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *P. o.* CCF 3438 pro substrát p-NP-GalNAc. Reakce bez inhibítoru (\circ), 5 mM GlcNAc (\bullet), 10 mM GlcNAc (\bullet), 15 mM GlcNAc (\bullet). Závislost rychlosti na koncentraci substrátu při různých koncentracích inhibítoru (A), dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka (B).

Obr. 51A dokumentuje vliv GalNAc o třech koncentracích na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *P. oxalicum* CCF 3438 pro substrát p-NP-GalNAc. Rychlost reakce klesá se zvyšující se koncentrací GalNAc v reakční směsi. Obr. 51B je dvojitě reciproké vynesení dat z obr. 51A dle Lineweavera a Burka.

Totožné stanovení vlivu GalNAc na rychlost reakce bylo provedeno pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae*. Byly vyneseny analogické závislosti.

Z provedených stanovení vyplývá, že GalNAc je pro oba enzymy kompetitivním inhibítorem β -N-acetylhexosaminidasy pro substrát p-NP-GalNAc. Hodnoty inhibičních konstant, vypočítané podle rovnice pro kompetitivní inhibici, jsou uvedeny v tabulce 11 (str. 69).

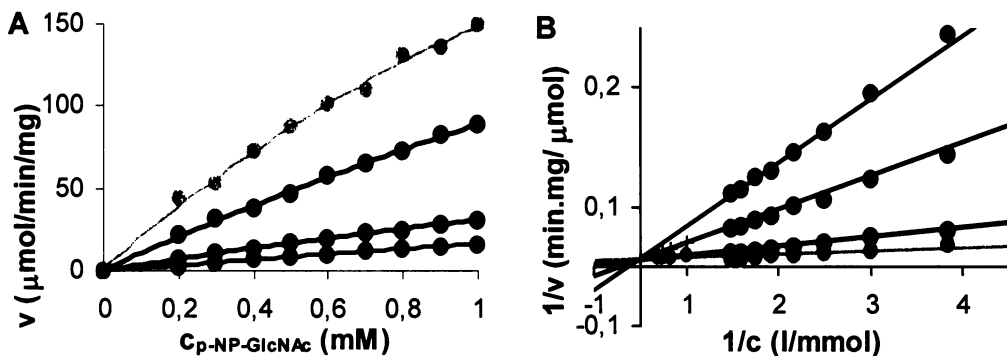
GalNAc je silnějším inhibítorem β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum* CCF 3438 než z *A. oryzae*. GalNAc je slabší inhibítor než GlcNAc, jak vyplývá z hodnot inhibičních konstant pro oba inhibitory (Tab. 11).

Tab. 11: Typ inhibice a hodnoty inhibičních konstant pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae*, *P. oxalicum* CCF 1959 a *P. oxalicum* CCF 3438. Symbolem (-) jsou označeny inhibice, které nebyly sledovány.

		GlcNAc		GalNAc		NAG-thiazolin	
		typ inhibice	K_i (mM)	typ inhibice	K_i (mM)	typ inhibice	K_i (mM)
<i>A. oryzae</i>	p-NP-GlcNAc	N	14	C	30	C	0,04
	p-NP-GalNAc	N	16	C	22	C	0,03
<i>P. o.</i> CCF 3438	p-NP-GlcNAc	N	4	C	13	C	0,07
	p-NP-GalNAc	N	6	C	21	C	0,05
<i>P. o.</i> CCF 1959	p-NP-GlcNAc	-	-	-	-	C	0,03
	p-NP-GalNAc	-	-	-	-	C	0,05

4.10.3 Vliv NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou

Byl sledován vliv NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *Aspergillus oryzae*, *Penicillium oxalicum* CCF 1959 a *Penicillium oxalicum* CCF 3438, a to jak pro substrát p-NP-GlcNAc, tak pro substrát p-NP-GalNAc.

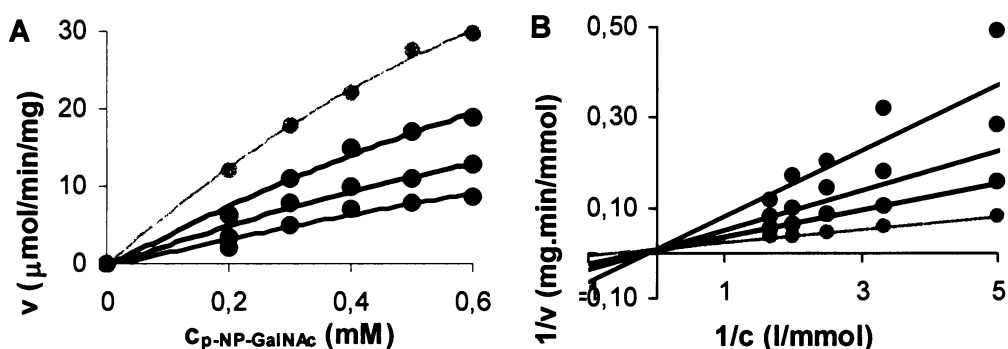


Obr. 52: Vliv NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *A. o.* pro substrát p-NP-GlcNAc. Reakce bez inhibítoru (+); 0,005 mM (•); 0,05 mM (◐) a 0,5 mM (◑) NAG-thiazolin. Závislost rychlosti na koncentraci substrátu při různých koncentracích inhibítoru (A), dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka (B).

Na obrázku 52A (str. 69) je znázorněn vliv NAG-thiazolinu o třech různých koncentracích na reakční rychlost katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *A. oryzae* pro substrát p-NP-GlcNAc. Rychlost reakce je tím nižší, čím vyšší je koncentrace NAG-thiazolinu v reakční směsi. Obrázek 52B (str. 69) je pak dvojitým reciprokým vynesemím obrázku 52 A dle Lineweavera a Burka.

Totožné stanovení bylo provedeno i pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. oxalicum* CCF 1959 a 3438 a vyneseny analogické závislosti.

Pro všechny tři enzymy je NAG-thiazolin kompetitivním inhibítoem β -N-acetylhexosaminidasu pro substrát p-NP-GlcNAc. Podle rovnice pro kompetitivní inhibici byly vypočítány inhibiční konstanty, které jsou shrnuty v tabulce 11 (str. 69).



Obr. 53: Vliv NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *P. o.* CCF 1959 pro substrát p-NP-GalNAc. Reakce bez inhibitoru (\circ); 0,005 mM (\bullet); 0,1 mM (\bullet); 0,2 mM (\bullet) NAG-thiazolin. Závislost rychlosti na koncentraci substrátu při různých koncentracích inhibitoru (A), dvojitě reciproké vynesení dle Lineweavera a Burka (B).

Na obrázku 53A je znázorněn vliv NAG-thiazolinu o třech různých koncentracích na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *P. oxalicum* CCF 1959. Rychlost reakce je tím nižší, čím vyšší je koncentrace NAG-thiazolinu v reakční směsi. Obrázek 53B je pak dvojitým reciprokým vynesemím obr. 53A dle Lineweavera a Burka.

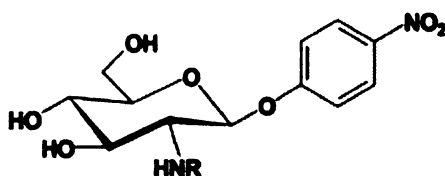
Totožné stanovení bylo provedeno i pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* a *P. oxalicum* CCF 3438 a vyneseny analogické závislosti.

Pro všechny tři enzymy je NAG-thiazolin kompetitivním inhibítoem β -N-acetylhexosaminidasu pro substrát p-NP-GalNAc. Podle rovnice pro kompetitivní inhibici byly vypočítány inhibiční konstanty, které jsou shrnuty v tabulce 11 (str. 69).

NAG-thiazolin je silnější inhibitor než GlcNAc a GalNAc, hodnoty jeho inhibičních konstant jsou až o 3 řády nižší a pro jednotlivé enzymy srovnatelné (Tab. 11, str. 69).

4.11 Aktivita β -N-acetylhexosaminidasy s modifikovanými substráty

Byla sledována schopnost nativní a deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (Obr. 55) a *Penicillium oxalicum* CCF 3438 (Obr. 56, str. 72) hydrolyzovat čtyři N-acyl substituované deriváty p-NP- β -D-glukosaminidu. Byly použity p-NP-GlcN-glykoloyl, p-NP-GlcN-formyl, p-NP-GlcN-propionyl a p-NP-GlcN-trifluoroacetyl (Obr. 54). Ke stanovení byla použita 1 mM koncentrace modifikovaných substrátů.



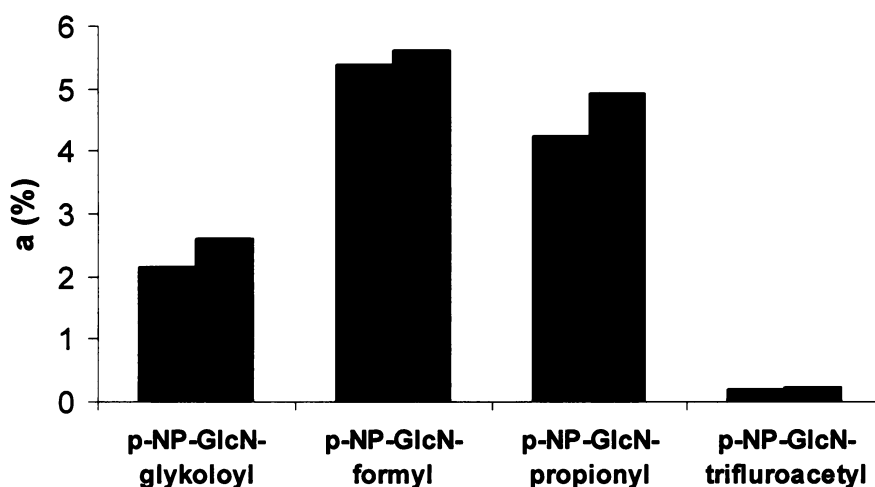
Obr. 54: p-NP-GlcN-R – N-acyl modifikované substráty:

R = $-\text{COCH}_2\text{OH}$ (p-NP-GlcN-glykoloyl)

R = $-\text{CHO}$ (p-NP-GlcN-formyl)

R = $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$ (p-NP-GlcN-propionyl)

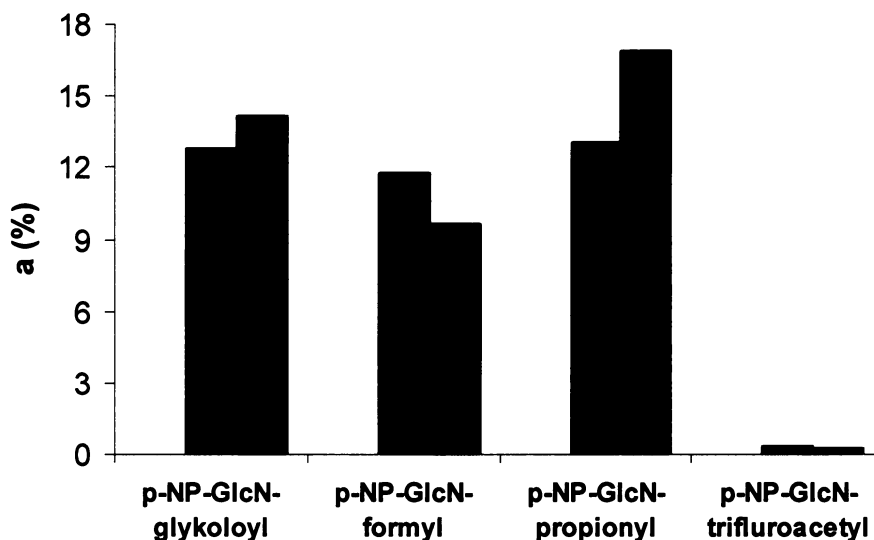
R = $-\text{COCF}_3$ (p-NP-GlcN-trifluoroacetyl)



Obr. 55: Štěpení N-acyl modifikovaných substrátů nativní (■) a deglykosylovanou (▣) β -N-acetylhexosaminidasou z *A. o.* Aktivita vztažena ke GlcNAc-asové aktivitě, 100 % odpovídá aktivitě 250 U/mg.

β -N-acetylhexosaminidasa z *A. oryzae* katalyzuje hydrolýzu všech použitých modifikovaných substrátů (Obr. 55). Aktivita β -N-acetylhexosaminidasy je v obr. 55 vztažena k aktivitě GlcNAc-asové, kde byl použit 1 mM p-NP-GlcNAc. Nejvyšší aktivita nativní i deglykosylované formy je vzhledem k substrátu p-NP-formylu, a to 5,6 %, resp.

5,4 %. Nejnižší aktivitu dosahuje nativní i deglykosylovaná forma se substrátem p-NP-GlcN-trifluoroacylem, a to 0,2 % v obou případech. Deglykosylovaná β -N-acetylhexosaminidasa vykazuje vyšší aktivity u všech použitých substrátů, největší rozdíl je vzhledem k substrátu p-NP-GlcN-propionylu, kde je aktivita deglykosylovaného enzymu o 0,5 % vyšší.

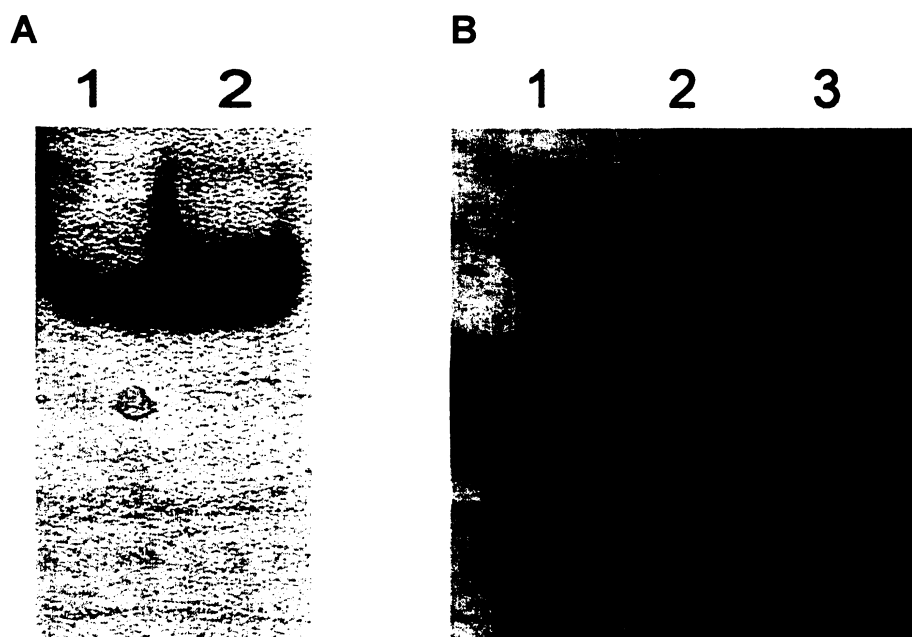


Obr. 56: Štěpení N-acyl modifikovaných substrátů nativní (■) a deglykosylovanou (▣) β -N-acetylhexosaminidasou z *P. o. CCF 3438*. Aktivita vztažena ke GlcNAc-asové aktivitě, 100 % odpovídá aktivitě 220 U/mg.

β -N-acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum* CCF 3438 katalyzuje hydrolyzu všech použitých modifikovaných substrátů (Obr. 56). Aktivita β -N-acetylhexosaminidasy je v obr. 56 vztažena k aktivitě GlcNAc-asové, kde byl použit 1 mM p-NP-GlcNAc. Aktivita nativní formy je pro substráty p-NP-GlcN-glykoly, p-NP-GlcN-formyl a p-NP-GlcN-propionyl srovnatelná, činí 13 %. Nejnižší aktivitu dosahuje nativní forma se substrátem p-NP-GlcN-trifluoroacylem, a to 0,3 %. Deglykosylovaná β -N-acetylhexosaminidasa vykazuje nejvyšší aktivitu pro substrát p-NP-GlcN-propionyl, a to 18 %. Pro p-NP-GlcN-formyl je aktivita deglykosylované formy nižší než nativní o 2 %. Nejnižší aktivitu dosahuje deglykosylovaná forma pro p-NP-GlcN-trifluoroacetyl, 0,2 %.

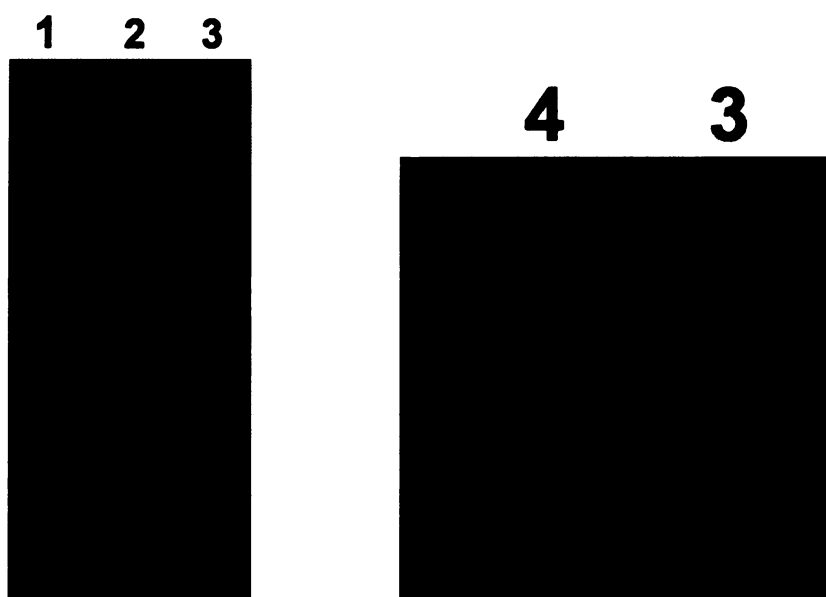
4.12 Elektroforetická separace β -N-acetylhexosaminidasy za nativních podmínek

Byla provedena elektroforetická separace β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*, *Penicillium oxalicum* CCF 1959 a CCF 3438 za nativních podmínek v alkalickém a kyselém prostředí. Byla použita fluorescenční vizualizace pomocí 4-MU-GlcNAc. Dále byla použita detekce založená na enzymovém štěpení substrátu naftol-AS BI-GlcNAc, kterým vzniká β -naftol. Ten pak reaguje neenzymově s diazoniovým barvivem Fast Red Violet LB za vzniku červené azosloučeniny (kap. 1.7.2, str. 24).



Obr. 57: Elektroforetická separace (6 % PAGE) β -N-acetylhexosaminidasy za nativních podmínek v kyselém (A) a alkalickém prostředí (B). Vizualizace pomocí naftol-AS BI-GlcNAc a Fast Red Violet LB. β -N-acetylhexosaminidasa z *P. o.* CCF 1959 (1), *A. o.* (2) a *P. o.* CCF 3438 (3).

Na obrázku 57 je β -N-acetylhexosaminidasa detekována pomocí barevné azosloučeniny. β -N-acetylhexosaminidasu lze tímto způsobem detekovat po elektroforéze v kyselém (Obr. 57A) i alkalickém (Obr. 57B) prostředí. V případě β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* lze po elektroforéze v alkalickém prostředí detekovat dva proužky odpovídající dvěma formám enzymu (Obr. 57B, dráha 2).



Obr. 58: Elektroforetická separace (6 % PAGE) β -N-acetylhexosaminidasy za nativních podmínek v alkalickém prostředí. Vizualizace pomocí 4-MU-GlcNAc. Nativní β -N-acetylhexosaminidasa z *P. o.* CCF 3438 (1), deglykosylovaná z *P. o.* CCF 3438 (2), nativní *P. o.* CCF 1959 (3) a nativní *A. o.* (4).

Na obrázku 58 je β -N-acetylhexosaminidasa detekována fluorescenčně pomocí substrátu 4-MU-GlcNAc. Dva proužky byly detekovány u všech forem nativních enzymů, tj. nativní β -N-acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum* CCF 3438 (dráha 1), nativní *P. o.* CCF 1959 (dráha 3) a nativní *A. o.* (dráha 4). Pouze v případě deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 3438 byl detekován jeden proužek (dráha 2). Dva proužky odpovídají dvěma formám enzymu.

Jedna forma má vyšší molekulovou hmotnost a nižší aktivitu, druhá forma má nižší molekulovou hmotnost a vyšší aktivitu.

5. DISKUZE

Tato práce se zabývá purifikací, charakterizací a doplněním informací o vlastnostech β -N-acetylhexosaminidasy z vláknitých hub *Aspergillus oryzae* CCF 1066 a dvou kmenů *Penicillium oxalicum* CCF 1959 a CCF 3438.

5.1 Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* a *Penicillium oxalicum* CCF 1959

Purifikace se provádí čtyřmi po sobě následujícími chromatografiemi [122]. Kultivační médium se pomocí centrifugace zbaví buněk a poté se sráží $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 80 % nasycení. Vzniklý precipitát se rozpustí, suspenze se centrifuguje a supernatant se nanáší na kolonu. Prvním krokem je chromatografie na sloupci fenyl-Sepharosy. Zařazení této metody využívající hydrofobní vlastnosti proteinu na počátek purifikace je efektivní, protože dojde k odstranění hnědého zbarvení a zároveň také k odsolení od $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, které je nežádoucí pro další krok, ionexovou chromatografii na sloupci S-Sepharosy. Po chromatografii na sloupci S-Sepharosy následuje ionexová chromatografie na sloupci Mono Q. Pouze při této separaci se liší pH použitých pufrů pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* a *P. oxalicum* neboť se oba enzymy liší v izoelektrických bodech. Posledním krokem je pak chromatografie na sloupci Superdex 200, při které dochází k odstranění posledních kontaminujících proteinů [122].

Tento postup je efektivní jak pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae*, tak pro *P. oxalicum* CCF 1959. Průběh purifikace dokumentují elektroforetické separace proteinů v jednotlivých krocích (Obr. 21, str. 43 a Obr. 26, str. 47). Výtěžek je 14 % pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* a specifická aktivita 71 U/mg (Tab. 4, str. 43). Výtěžek β -N-acetylhexosaminidasy z *P. oxalicum* CCF 1959 je 10 % a specifická aktivita 36 U/mg (Tab. 5, str. 46).

Stejný postup je využíván i pro purifikaci β -N-acetylhexosaminidasy z *P. oxalicum* CCF 3438 [Bezouška, K., nepublikováno], která v této práci provedena nebyla. Kmeny *P. oxalicum* CCF 1959 a CCF 3438 se významně liší v produkci β -N-acetylhexosaminidasy: pro purifikaci enzymu z *P. oxalicum* CCF 1959 se používá 3 l kultivačního média, zatímco pro *P. oxalicum* CCF 3438 se používá 1 l kultivačního média [Hofbauerová, K., nepublikováno] pro jednu izolaci enzymu. Pro izolaci enzymu z *A. oryzae* se používá také 1 l kultivačního média.

5.2 Vlastnosti β -N-acetylhexosaminidasy

5.2.1 Struktura molekuly β -N-acetylhexosaminidasy

Struktura molekuly β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* byla již popsána [44, 58, 59]. β -N-acetylhexosaminidasa je dimer složený ze dvou katalytických podjednotek o molekulové hmotnosti 65 kDa [44]. Ke každé podjednotce musí být nekovalentně navázán propeptid o molekulové hmotnosti 15 kDa, aby β -N-acetylhexosaminidasa měla svou maximální aktivitu [44]. Katalytická podjednotka je N-glykosylována (Obr. 8, str. 16) na 6 místech oligosacharidy mannosového typu, kde dominantní je hexamannosylový řetězec [44, 59]. Propeptid je na třech místech O-glykosylován (Obr. 8, str. 16) [58]. Forma složená ze dvou katalytických podjednotek a dvou propeptidů má tedy molekulovou hmotnost 160 kDa [44]. Propeptid hraje důležitou roli při regulaci aktivity a je s katalytickou podjednotkou asociován unikátním mechanismem (kap. 1.5.4, str. 15) [44].

β -N-acetylhexosaminidasy z *P. oxalicum* CCF 3438 i CCF 1959 mají stejnou molekulovou hmotnost nativní molekuly 160 kDa složenou ze dvou katalytických podjednotek a dvou nekovalentně vázaných propeptidů [Bezouška, K., nepublikováno]. Oba enzymy byly separovány také elektroforézou za denaturujících podmínek (Obr. 26, Obr. 27, str. 47), na které je vidět proužek odpovídající katalytické podjednotce o molekulové hmotnosti 65 kDa.

Byla provedena elektroforéza v nativním prostředí s vizualizací fluorescenční pomocí 4-MU-GlcNAc (Obr. 58, str. 74) a barevnou (Obr. 57, str. 73), jejíž princip je uveden v kap. 1.7.2 (str. 24). Barevnou vizualizací byly detekovány dvě formy β -N-acetylhexosaminidasy v *A. oryzae*, zatímco fluorescenčně byly detekovány dvě formy v *A. oryzae*, *P. oxalicum* CCF 1959 i CCF 3438. Jedna forma o vyšší molekulové hmotnosti a nižší aktivitě a druhá o nižší molekulové hmotnosti a vyšší aktivitě. Forma s vyšší molekulovou hmotností je pravděpodobně agregát dvou molekul aktivních enzymů.

V současnosti jsou známy sekvence β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* [71], *P. oxalicum* CCF 3438 i CCF 1959 [Bezouška, K., nepublikováno] a navržena struktura β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* [59]. Na základě těchto znalostí a dalších zjištěných vlastností (pH závislosti, substrátová specifita, inhibitory apod.) je v současnosti navrhován i model β -N-acetylhexosaminidasy z *P. oxalicum* CCF 3438.

5.2.2 pH závislosti

Byl sledován vliv pH na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* (Obr. 28, str. 48), *P. oxalicum* CCF 1959 (Obr. 29, str. 48) i *P. oxalicum* CCF 3438 (Obr. 30, str. 49) pro substráty p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc.

β -N-acetylhexosaminidasa z *A. o.* vykazuje nejvyšší GlcNAc-asovou aktivitu při pH 4, zatímco maximální GalNAc-asové aktivity dosahuje při pH 5. Podobné hodnoty byly nalezeny i pro β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus niger* [40], *Aspergillus nidulans* [52], *Beauveria bassiana* [7], *Candida albicans* [108], *Mucor fragilis* [1].

β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 1959 i CCF 3438 vykazují stejnou hodnotu optimálního pH, a to pH 3 pro oba substráty. Tento výsledek je shodný s výsledkem zjištěným v diplomové práci A. Hodkové [10], P. Skočdopola [9] a Yamamota a kol. [55] publikovaným pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. o.* Výsledek se ale odlišuje od β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium chrysogenum* [65] a všech dalších fungálních β -N-acetylhexosaminidas, které mají pH optima v rozmezí 4 až 6.

Byl sledován vliv pH na stabilitu nativní a deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy z *P. oxalicum* CCF 3438 pro substrát p-NP-GlcNAc (Obr. 31, str. 49) a p-NP-GalNAc (Obr. 32, str. 50). Nativní enzym vykazuje nejvyšší GlcNAc-asovou i GalNAc-asovou stabilitu při pH 8, zatímco deglykosylovaný enzym vykazuje nejvyšší GlcNAc-asovou i GalNAc-asovou stabilitu při pH 7. Tyto výsledky pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. o.* CCF 3438 se neshodují se stanovením provedeným pro z *P. o.* CCF 1959 v diplomové práci A. Hodkové [10], kde nejvyšší GlcNAc-asová i GalNAc-asová stabilita pro nativní i deglykosylovaný enzym byla zjištěna při pH 7. Yamamoto a kol. [55] zjistil nejvyšší stabilitu GlcNAc-asy i GalNAc-asy z *P. o.* při pH 8.

Ettrichem a kol. bylo zjištěno, [59] že nativní i deglykosylovaná GlcNAc-asa z *A. o.* je nejvíce stabilní při pH 5. Při pH nižším než 4 je deglykosylovaná forma výrazně nestabilní. V neutrální oblasti nemá deglykosylace vliv na stabilitu [59].

5.2.3 Substrátová specifita

Byly testovány substráty p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc, 4-MU-GlcNAc a čtyři N-acyl modifikované deriváty p-NP- β -D-glukosaminidu.

Byla sledována závislost rychlosti reakce na koncentraci substrátu p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc. Pro nativní (Obr. 33, str. 51) i deglykosylovanou (Obr. 34, str. 51) β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* se rychlost reakce pro oba substráty p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc řídí kinetikou Michaelise a Mentenové. Z hodnot

Michaelisových konstant (Tab. 6, str. 52) vyplývá, že vyšší afinita je k substrátu p-NP-GlcNAc, jak bylo pro enzym z *A. o.* zjištěno i Ettrichem a kol. [59].

Kinetické vlastnosti β -N-acetylhexosaminidasy z *P. oxalicum* CCF 1959 a CCF 3438 jsou obdobné. Oba enzymy se při hydrolýze substrátu p-NP-GalNAc řídí kinetikou Michaelise a Mentenové, zatímco reakce s p-NP-GlcNAc je inhibována při vyšších koncentracích nadbytkem substrátu (Obr. 35, str. 52, Obr. 36, Obr. 37, str. 54). Inhibice nadbytkem substrátu nastává u nativní (Obr. 36, str. 54) i deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 3438 (Obr. 37, str. 54) a nativního enzymu z *P. o.* CCF 1959 (Obr. 35, str. 52) (pro deglykosylovanou formu nebylo stanoveno). Zjištěná inhibice nadbytkem substrátu p-NP-GlcNAc je v souladu s výsledkem publikovaným Yamamotem a kol. pro *P. o.* [55], stejně jako pro β -N-acetylhexosaminidasy z *Hohenbuechelia serotina* [51], *Sclerotinia fructigena* [52] a *Candida albicans* [54].

I pro β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 1959 a CCF 3438 platí, že afinita k p-NP-GlcNAc je vyšší než k p-NP-GalNAc (Tab. 7, str. 53, Tab. 8, str. 55). Stejně je tomu i pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. o.* dle Yamamota a kol. [55], *Bipolaris sorokiniana* [53], *Candida albicans* [54] a *Penicillium chrysogenum* [65].

Hydrolýza 4-MU-GlcNAc byla sledována pro nativní β -N-acetylhexosaminidasu z *A. o.* (Obr. 39, str. 57), *P. o.* CCF 1959 i CCF 3438 (Obr. 38, str. 56). Toto stanovení poskytlo překvapivý výsledek, protože v případě všech tří enzymů, a tedy i *A. o.*, dochází k inhibici nadbytkem substrátu. Kinetické parametry jsou shrnuty v tab. 9 (str. 56). Kinetika štěpení substrátu 4-MU-GlcNAc nebyla dosud pro žádnou fungální β -N-acetylhexosaminidasu sledována. Při koncentracích produktu štěpení 4-MU vyšších než 50 μ M dochází k jeho samozhášení. V případě sledovaných experimentů nemůže být inhibice samozhášením způsobena, protože koncentrace 4-MU v reakční směsi nedosahuje této prahové hodnoty.

Afinita všech tří sledovaných β -N-acetylhexosaminidas k substrátům klesá v řadě 4-MU-GlcNAc, p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc.

Byla stanovena aktivita nativní a deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy z *A. o.* (Obr. 55, str. 71) a *P. o.* CCF 3438 (Obr. 56, str. 72) s N-acyl modifikovanými substráty p-NP-GlcN-R: R = $-\text{COCH}_2\text{OH}$ (p-NP-GlcN-glykoloyl), R = $-\text{CHO}$ (p-NP-GlcN-formyl), R = $-\text{COCH}_2\text{CH}_3$ (p-NP-GlcN-propionyl), R = $-\text{COCF}_3$ (p-NP-GlcN-trifluoracetyl).

Nativní i deglykosylovaná β -N-acetylhexosaminidasa z *A. o.* vykazuje nejvyšší aktivity se substrátem p-NP-GlcN-formylem. Obě formy β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 3438 vykazují nejvyšší aktivitu se substrátem p-NP-GlcN-propionylem. Nejnižší aktivitu dosahují nativní i deglykosylované formy z obou zdrojů se substrátem p-NP-GlcN-

trifluoroacetylem. Ostatní substráty jsou štěpeny také. Nízká rychlost hydrolýzy p-NP-GlcN-trifluoroacetylu je pravděpodobně dána přítomností fluoru, který brání substrátu vytvořit oxazoliniový intermediát. Fialová a kol. [117] testovali tyto a další substráty. Výsledky pro enzym z *A. o.* zjištěné v této práci jsou v souladu s publikovanými. Výsledky stanovené pro *P. o.* CCF 3438 v této práci souhlasí s výsledky publikovanými pro *P. o.* CCF 1959. Substrát, k němuž má enzym nízkou afinitu, lze využít jako akceptor glykosylu při transglykosylacích [117].

5.2.4 Teplotní závislosti

Bylo stanoveno teplotní optimum pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae*, *P. oxalicum* CCF 1959 a CCF 3438 pro substráty p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc. Pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. o.* byla maximální aktivita zjištěna při teplotě 60 °C pro aktivitu GlcNAc-asovou i GalNAc-asovou (Obr. 40, str. 58), zatímco pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. o.* CCF 1959 (Obr. 41, str. 59) i 3438 (Obr. 42, str. 59) je maximální aktivita při teplotě 50 °C. Stejný výsledek pro *P. o.* CCF 1959 publikovala i A. Hodková v diplomové práci [10]. Yamamoto publikoval pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. o.* teplotní optimum při 55 °C [55], pro β -N-acetylhexosaminidasu z *Trichoderma harzianum* bylo stanoveno 60 °C [69] a z *Bipolaris sorokiniana* 55 °C [53].

Byl sledován také vliv inkubace po dobu 10 min pro nativní i deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasu z *A. o.* (Obr. 43, str. 60) nativní enzym z *P. o.* CCF 1959 (Obr. 44, str. 61) a nativní i deglykosylovaný enzym z *P. o.* CCF 3438 (Obr. 45, str. 62) pro substrát p-NP-GlcNAc. Vliv inkubace při dané teplotě má na aktivitu všech tří enzymů podobný vliv. Maximální GlcNAc-asovou aktivitu vykazují enzymy po inkubaci při 40 °C. Deglykosylovaná β -N-acetylhexosaminidasa z *A. o.* i z *P. o.* CCF 3438 má po inkubaci při 40 °C nižší aktivitu než nativní forma. Po inkubaci při teplotě vyšší než 40 °C dochází u všech enzymů k poklesu aktivity, u deglykosylované formy je ale pokles prudší.

Výsledky pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. o.* jsou v souladu s výsledkem zjištěným Yamamotem [55] i A. Hodkovou v diplomové práci [10]. Pro *Aspergillus niger* je β -N-acetylhexosaminidasa stabilní při teplotě 65 °C [50], pro *Mucor fragilis* při 45 °C [1], pro *Aspergillus nidulans* při 50 °C [52], *Bipolaris sorokiniana* při 28 °C [53] a *Trichoderma harzianum* 37 °C [69].

5.2.5 Inhibitory β -N-acetylhexosaminidasy

V této práci byl sledován vliv GlcNAc, GalNAc a NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *A. oryzae*, *P. oxalicum* CCF 1959 i CCF 3438. Použity byly substráty p-NP-GlcNAc a p-NP-GalNAc. Tyto tři sacharidy jsou inhibitory a byly pro ně určeny typy inhibice a inhibiční konstanty (Tab. 11, str. 69).

GlcNAc působí na β -N-acetylhexosaminidasu ze všech tří zdrojů jako nekompetitivní inhibitor (Obr. 48, Obr. 49, str. 66) a je silnější než GalNAc. Váže se jak na komplex enzymu se substrátem, tak na volný enzym a předpokládá se výskyt dalšího vazného místa na molekule enzymu. GalNAc působí jako kompetitivní inhibitor (Obr. 50, str. 67, Obr. 51, str. 68) a váže se tedy pouze na volný enzym a soutěží se substrátem. Tyto výsledky pro β -N-acetylhexosaminidasu z *P. o.* CCF 1959 odpovídají výsledkům zjištěným P. Skočdopolem v diplomové práci [9], zatímco Yamamoto nezjistil inhibiční vliv GlcNAc ani GalNAc na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* [55]. Stejně tak nebyl inhibiční vliv pozorován u β -N-acetylhexosaminidasy ze *Sclerotinia fructigena* [68]. β -N-acetylhexosaminidasa je inhibována GlcNAc i GalNAc v *Aspergillus nidulans* (oba nekompetitivní inhibitory) [52], *Bipolaris sorokiniana* [53], *Aspergillus niger* [63] a pouze GlcNAc u *Penicillium chrysogenum* [65].

NAG-thiazolin je kompetitivní inhibitor β -N-acetylhexosaminidasy ze všech tří zdrojů a je nejsilnější (Obr. 52, str. 69, Obr. 53, str. 70). Inhibiční konstanty jsou o tři řády nižší než pro GlcNAc a GalNAc. Jeho silný inhibiční efekt vychází z podobnosti se strukturou oxazoliniového přechodného stavu [103]. Jeho inhibiční vliv byl sledován pro β -N-acetylhexosaminidasu z *Canavalia ensiformis* [102] a lidského enzymu [103]. Jeho vliv na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z hub testován nebyl.

5.2.6 GlcNAc-asová a GalNAc-asová aktivita

β -N-acetylhexosaminidasa je schopna štěpit syntetické substráty p-NP-GlcNAc i p-NP-GalNAc. Vyšší rychlostí je však často štěpen p-NP-GlcNAc [55, 96, 97]. Právě z tohoto důvodu byla vybrána β -N-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum*, protože aktivita GalNAc-asy je stejná nebo i vyšší než aktivita GlcNAc-asy. V důsledku inhibice nadbytkem substrátu lze aktivitu regulovat koncentrací substrátu.

Poměr GlcNAc-asy a GalNAc-asy (vypočítaný z maximálních reakčních rychlostí) lze ovlivnit přítomností solí v reakční směsi. Byl sledován vliv $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 a MgCl_2 na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* (Obr. 46, str. 63) a *P. oxalicum* CCF 3438 (Obr. 47, str. 64). Na β -N-acetylhexosaminidasu z *P. o.* CCF 3438 má největší

vliv $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, který mění poměr GlcNAc-asy a GalNAc-asy z původních 0,6 bez přítomnosti soli na 0,3 ve prospěch GalNAc-asy. MgCl_2 pak při 1 M koncentraci působí úplnou inhibicí obou aktivit. Na β -N-acetylhexosaminidasu z *A. o.* má největší vliv MgCl_2 , který mění poměr z původních 1,1 bez přítomnosti soli na 2,0 ve prospěch GlcNAc-asy.

β -N-acetylhexosaminidasy s vysokým poměrem GalNAc-asové aktivity lze využít např. při transglykosylačních reakcích, při kterých je nutno syntetizovat sacharidy s obsahem GalNAc. Další β -N-acetylhexosaminidasy mající vysokou GalNAc-asovou aktivitu jsou z *Candida albicans* [54], *Rhizopus javanicus* IFO 5441 [55] a *Mucor jansseni* IFO 6746 [55], jejichž poměr GlcNAc-asy a GalNAc-asy se pohybuje kolem 0,7.

5.3 Význam oligosacharidů v molekule β -N-acetylhexosaminidasy

β -N-acetylhexosaminidasa z *A. oryzae* a *P. oxalicum* CCF 3438 byla deglykosylována pomocí endoglykosidasy H (Obr. 27, str. 47). Tento enzym štěpí vazbu GlcNAc β (1 \rightarrow 4) GlcNAc, která je součástí neměnného pentasacharidového jádra N-glykosidicky vázaných oligosacharidových řetězců glykoproteinů. Pomocí tohoto enzymu tedy dojde k deglykosylaci N-glykosidicky vázaných oligosacharidů z katalytických podjednotek.

Deglykosylace snižuje stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 3438 v alkalické a silně kyselé oblasti pH (Obr. 31, str. 49, Obr. 32, str. 50). Po deglykosylaci dochází ke změně maximální stability β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 3438 z pH 8 na 7. Stabilita deglykosylovaného enzymu je nižší než nativního enzymu v celé škále pH, majoritní pokles však nastává v silně kyselé a alkalické oblasti pH. Ettrichem a kol. bylo zjištěno [59], že deglykosylace snižuje stabilitu β -N-acetylhexosaminidasy z *A. o.* v silně kyselé oblasti pH.

Deglykosylace nemá vliv na afinitu β -N-acetylhexosaminidasy k substrátům p-NP-GlcNAc ani p-NP-GalNAc, má ale vliv na maximální reakční rychlost. Hodnoty Michaelisových konstant zůstávají po deglykosylaci stejné pro enzym z *A. o.* i *P. o.*, zatímco hodnoty maximálních reakčních rychlostí se mění (Tab. 6, str. 52, Tab. 8, str. 55). Pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. o.* dochází po deglykosylaci k významnému poklesu maximální reakční rychlosti, zatímco pro enzym z *P. o.* CCF 3438 dochází k mírnému nárůstu. Výsledky pro enzym z *A. o.* jsou v rozporu s výsledky publikovanými Ettrichem a kol. [59], kde maximální reakční rychlost mírně stoupla.

5.3 Porovnání β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438 a 1959

Z výsledků této práce vyplývá, že β -N-acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum* CCF 1959 i 3438 vykazuje většinu sledovaných vlastností stejnou. Neliší se v pH optimu (Obr. 29, str. 48), teplotním optimu (Obr. 41, Obr. 42, str. 59), hodnotách Michaelisových konstant pro p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc (Tab. 7, str. 53, Tab. 8, str. 55), 4-MU-GlcNAc (Tab. 9, str. 55). Oba enzymy jsou stejným způsobem inhibovány nadbytkem substrátů p-NP-GlcNAc (Obr. 35, str. 52, Obr. 36, str. 54) a nativní a 4-MU-GlcNAc (Obr. 38, str. 56). β -N-acetylhexosaminidasa z obou kmenů vykazuje nevyšší afinitu k substrátu 4-MU-GlcNAc. Afinita k p-NP-GlcNAc je desetkrát vyšší než afinita k p-NP-GalNAc pro oba kmeny. Poměr GlcNAc-asové a GalNAc-asové aktivity je pro oba enzymy srovnatelný a může být ovlivněn přítomností některých solí, především $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Obr. 47, str. 64). Shodné je i chování za přítomnosti inhibitorů GlcNAc, GalNAc a NAG-thiazolinu (Tab. 11, str. 69).

Oba kmeny se ale liší v produkci β -N-acetylhexosaminidasy, *P. o.* CCF 3438 produkuje čtyřikrát více enzymu než *P. o.* CCF 1959 [Hofbauerová, K., nepublikováno]. Přestože pro purifikaci β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* CCF 1959 se používá trojnásobek kultivačního média oproti *P. o.* CCF 3438, specifická aktivita je poloviční. Vzhledem k tomu, že sekvence obou β -N-acetylhexosaminidas jsou totožné [Bezouška, K., nepublikováno], je tato odlišnost pravděpodobně způsobena tím, že β -N-acetylhexosaminidasa z *P. o.* CCF 1959 je sekretována ve své méně aktivní formě, tj. dimer katalytických podjednotek pouze s jedním propeptidem. Tato forma je také sekretována pomaleji [44], což může způsobovat nižší produkci enzymu tímto kmenem.

5.4 Porovnání β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* a *Aspergillus oryzae*

Jak již bylo řečeno v kapitole 5.3 vlastnosti β -N-acetylhexosaminidasy ze dvou kmenů *P. o.* CCF 3438 a 1959 se až na produkci enzymu neliší. β -N-acetylhexosaminidasa z *A. o.* a *P. o.* se liší ve většině studovaných vlastností.

β -N-acetylhexosaminidasa z *P. o.* a *A. o.* se liší v pH optimu. Pro enzym z *P. o.* je hodnota pH optima stejná pro substráty p-NP-GlcNAc, resp. p-NP-GalNAc a leží v silně kyselé oblasti (pH 3, Obr. 29, str. 48), zatímco pro enzym z *A. o.* je vyšší a liší se pro oba substráty (pH 4, resp. pH 5, Obr. 28, str. 48).

Oba enzymy se také liší v pH, při kterém jsou nejvíce stabilní. β -N-acetylhexosaminidasa z *A. o.* je stabilní v kyselé oblasti (pH 5) [59] a enzym z *P. o.* je stabilní v neutrální až slabě alkalické oblasti pH (pH 7 a 8, Obr. 31, str. 49), což je výsledek netypický pro glykosidasy.

β -N-acetylhexosaminidasa z obou zdrojů se liší také ve vlivu teploty na její aktivitu. Enzym z *P. o.* má nejvyšší aktivitu při teplotě 50 °C (Obr. 41, str. 59), zatímco enzym z *A. o.* (Obr. 40, str. 58) dosahuje nejvyšších hodnot při teplotě 60 °C.

Pro oba enzymy klesá afinita k substrátům v řadě 4-MU-GlcNAc, p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc, avšak afinita β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* pro p-NP-GlcNAc je desetkrát vyšší než enzymu z *A. o.* Afinita β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* k p-NP-GalNAc je také vyšší než afinita enzymu z *A. o.*, ale pouze dvakrát (Tab. 6, str. 52, Tab. 7, str. 53). Většina fungálních β -N-acetylhexosaminidas preferuje GlcNAc-asovou aktivitu před GalNAc-asovou. Toto platí i pro enzym z *A. o.*, kde poměr GlcNAc-asové a GalNAc-asové aktivity je roven 1,3; zatímco enzym z *P. o.* má relativně vysokou GalNAc-asovou aktivitu v porovnání s jinými β -N-acetylhexosaminidasami. Pro enzym z *P. o.* je tento poměr roven 0,6. Poměry jsou vypočítány z maximálních reakčních rychlostí, což jsou hodnoty vypočítané pro reakci probíhající bez inhibice substrátem.

Další rozdíl mezi oběma enzymy je v závislosti rychlosti reakce na koncentraci p-NP-GlcNAc. β -N-acetylhexosaminidasa z *A. o.* není inhibována nadbytkem substrátu (Obr. 33, str. 51) p-NP-GlcNAc, zatímco enzym z *P. o.* je inhibován v koncentracích vyšších než 0,6 mM (Obr. 35, str. 52). Enzymy z *P. o.* i *A. o.* jsou inhibovány nadbytkem 4-MU-GlcNAc (Obr. 39, str. 57, Obr. 38, str. 56), pro enzym z *P. o.* je inhibice vyšší.

GlcNAc, GalNAc i NAG-thiazolin inhibují oba enzymy stejným typem inhibice, β -N-acetylhexosaminidasa z *P. o.* je inhibována více než z *A. o.* (Tab. 11, str. 69).

Po získání sekvence β -N-acetylhexosaminidasy z *P. o.* bylo zjištěno, že nevyšší homologii k této molekule má právě β -N-acetylhexosaminidasa z houby *A. o.* Oba enzymy jsou proto vhodným modelem pro porovnání jednotlivých enzymových vlastností případně pro přípravu mutantních enzymů [Bezouška, K., nepublikováno].

6. SOUHRN

1. Byla purifikována β -N-acetylhexosaminidasa z *Aspergillus oryzae* CCF 1066 se specifickou aktivitou 71 U/mg a β -N-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum* CCF 1959 se specifickou aktivitou 36 U/mg.
2. Byla určena molekulová hmotnost podjednotky 65 kDa pro β -N-acetylhexosaminidasu ze všech tří zdrojů. Byla provedena elektroforéza za nativních podmínek a detekovány 2 formy enzymu pomocí fluoescenčního barvení substrátem 4-MU-GlcNAc.
3. Bylo stanoveno optimální pH pro β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* (GlcNAc-asa pH 4, GalNAc-asa pH 5), z *P. oxalicum* CCF 1959 (pH 3) a CCF 3438 (pH 3). Byla stanovena i pH stabilita pro β -N-acetylhexosaminidasu *P. oxalicum* CCF 3438, a to pH 8 pro nativní a pH 7 pro deglykosylovaný enzym.
4. Byly stanoveny Michaelisovy konstanty, maximální reakční rychlosti a inhibiční konstanty pro inhibici substrátem pro nativní a deglykosylovanou β -N-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae*, *P. oxalicum* CCF 1959 i CCF 3438 se substráty p-NP-GlcNAc, p-NP-GalNAc, 4-MU-GlcNAc. Byla určena i aktivita nativní a deglykosylované β -N-acetylhexosaminidasy *A. oryzae*, *P. oxalicum* CCF 3438 s N-acyl modifikovanými deriváty p-NP- β -D-GlcN-R.
5. Byl zjištěn vliv solí $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 a MgCl_2 na aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* a *P. oxalicum* CCF 3438. Přítomností solí lze významně ovlivnit poměr GlcNAc-asové a GalNAc-asové aktivity.
6. Byl sledován vliv GlcNAc, GalNAc a NAG-thiazolinu na rychlost reakce katalyzovanou β -N-acetylhexosaminidasou z *A. oryzae*, *P. oxalicum* CCF 1959 i CCF 3438. GlcNAc je nekompetitivním inhibitorem, GalNAc a NAG-thiazolin jsou kompetitivní inhibitory. NAG-thiazolin je nejsilnějším inhibitorem a jeho inhibiční konstanty jsou o tři řády nižší než pro GlcNAc a GalNAc.
7. β -N-acetylhexosaminidasa z *A. oryzae* a *P. oxalicum* CCF 3438 byla deglykosylována enzymem endo H. Deglykosylace má vliv na reakční rychlost a především stabilitu enzymu, neovlivňuje afinitu enzymu k substrátům.
8. β -N-acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum* CCF 1959 a CCF 3438 se neliší ve sledovaných vlastnostech, liší se ale od enzymu z *A. oryzae*.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Yamamoto, K.; Tsuji Y.; Matsushita, S.; Kumagai, H.; Tochikura, T.: Appl. Environ. Microb. 51, 1019-1023 (1986).
2. Voet, D.; Voet, J.: Biochemistry, 3rd edition, John Wiley and Sons, New Jersey, 2004, str. 977.
3. IUBMB Enzyme Nomenclature na serveru ExPASy Proteomics Server www.expasy.org/enzyme, 10. 3. 2008.
4. Rosypal, S. a kol.: Houby, v knize Přehled biologie, SPN, Praha, 2005, str. 341-346.
5. Kalina, T.; Váňa, J.: Říše – Houby, v knize Sinice, řasy, houby a jim podobné organismy v současné biologii, Karolinum, Praha, 2005, str. 229-236.
6. Madigan, M.; Martinko, J.: Brock Biology of Microorganisms, 11th ed., Prentice Hall, 2005.
7. Bidochka, M. J.; Khachatourians, G. G.: Can. J. Microbiol. 39, 6-12 (1993).
8. Huňková, Z.; Křen, V.; Ščigelová, M.; Weignerová, L.; Scheel, O.; Thiem, J.: Biotechnol. Lett. 18, 725-730 (1996).
9. Skočdopol, P.: Izolace a charakterizace β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 1959, Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, 2002.
10. Hodková, A.: Vlastnosti β -N-acetylhexosaminidasy z vláknité houby *Penicillium oxalicum*, Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie, 2007.
11. http://www.innovations-report.de/bilder_neu/53330_sporentraeger.jpg, 1. 4. 2008.
12. http://www.co.st-louis.mo.us/doh/pollen_site/pollen_pix/penicillium.gif, 1. 4. 2008.
13. Every, D.; Ashworth, J. M.: Biochem. J. 143, 785-787 (1974).
14. Toleman, C.; Paterson, A. J.; Whisenhunt, T. R.; Kudlow, J. E.: J. Biol. Chem. 279, 53665-53673 (2004).
15. Nogawa, M.; Takahashi, H.; Kashiwagi, A.; Ohshima, K.; Okada, H.; Morikawa, Y.: Appl. Environ. Microb. 64, 890-895 (1998).
16. Fukamizo, T.; Fleury, A.; Côté, N.; Mitsutomi, M.; Brzezinski, R.: Glycobiology 16, 1064-1072 (2006).
17. Nanjo, F.; Katsumi, R.; Sakai, K.: J. Biol. Chem. 17, 10088-10094 (1990).
18. Henrissat, B.: Biochem. J. 280, 309-316 (1991).
19. Henrissat, B.; Bairoch, A.: Biochem. J. 293, 781-788 (1993).
20. Henrissat, B.; Bairoch, A.: Biochem. J. 316, 695-696 (1996).
21. Carbohydrate Active Enzymes na www.cazy.org. Coutinho, P. M.; Henrissat, B.: Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In "Recent

- Advances in Carbohydrate Bioengineering", H. J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12 (1999).
22. Tews, I.; Perrakis, A.; Oppenheim, A.; Dazter, Z.; Wilson, K. S.; Vorgias, C. E.: *Nat. Struct. Biol.* **3**, 638-648 (1996).
 23. Enzymatic approaches to O-glycoside introduction: Glycosidases, v *Comprehensive Glycoscience* (J. P. Kamerling, Ed.), Oxford, rukopis v tisku, 2007.
 24. Koshland, D. E.: *Biol. Rev.* **28**, 416-436 (1953).
 25. Rye, C. S.; Withers, S. G.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 573-580 (2000).
 26. Ly, H. D.; Withers, S. G.: *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 487-522 (1999).
 27. Vocadlo, D. J.; Mayer, C.; He, S.; Withers, S. G.: *Biochemistry* **39**, 117-126 (2000).
 28. Vocadlo, D. J.; Davies, G. J.; Laine, R.; Withers, S. G.: *Nature* **412**, 835-838 (2001).
 29. Mahuran, D. J.; Neote, K.; Klavins, M. H.; Leung, A.; Gravel, R. A.: *J. Biol. Chem.* **263**, 4612-4618 (1988).
 30. Hou, Y.; Vocadlo, D. J.; Leung, A.; Withers, S. G.; Mahuran, D. J.: *Biochemistry* **40**, 2201-2209 (2001).
 31. Proia, R. L.; d'Azzo, A.; Neufeld, E. F.: *J. Biol. Chem.* **259**, 3350-3354 (1984).
 32. Sagherian, C.; Thorner, P.; Mahuran, D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **204**, 135-141 (1994).
 33. Mahuran, D. J.: *J. Biol. Chem.* **265**, 6794-6799 (1990).
 34. Yamanaka, S.; Johnson, O. N.; Norflus, F.; Boles, D. J.; Proia, R. L.: *Genomics* **21**, 588-596 (1994).
 35. Barber, M. S.; Pride, J. P.: *Plant Sci.* **60**, 163-172 (1989).
 36. Jin, Y. L.; Jo, Y. Y.; Kim, K. Y.; Shim, J. H.; Kim, Y. W.; Park, R. D.: *J. Biochem. Mol. Biol.* **35**, 313-319 (2002).
 37. Jagadeesh, B. H.; Prabha, T. N.: *Phytochemistry* **61**, 295-300 (2002).
 38. Oikawa, A.; Itoh, E.; Ishihara, A.; Iwamura, H.: *J. Plant Physiol.* **160**, 991-999 (2003).
 39. Mitchell, E. D.; Houston, C. W.; Latimer, S. B.: *Phytochemistry* **15**, 1869-1871 (1976).
 40. Bahl, O. P.; Agrawal, K. M. L.: *J. Biol. Chem.* **243**, 98-102 (1968).
 41. Choi, S. Y.; Gross, K. C.: *Phytochemistry* **36**, 1-6 (2001).
 42. Chang, C. T.; Young, F. P.; Chang, M. H.; Sung, H. Y.: *Biochem. Mol. Biol. Int.* **45**, 371-380 (1998).
 43. Harley, S. M.; Beevers, L.: *Plant Physiol.* **85**, 1118-1122 (1987).
 44. Plíhal, O.; Sklenář, J.; Hofbauerová, K.; Novák, P.; Man, P.; Pompach, P.; Kavan, D.; Ryšlavá, H.; Weignerová, L.; Charvátová-Pišvejcová, A.; Křen, V.; Bezouška, K.: *Biochemistry* **46**, 2719-2734 (2007).
 45. Amutha, B.; Khire, J. M.; Khan, M. I.: *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 300-310 (1998).

46. Sakai, K.; Narihara, M.; Kasama, Y.; Wakaya, M.; Moriguchi, M.: *Appl. Environ. Microb.* **60**, 2911-2915 (1994).
47. Tanaka, T.; Fukui, T.; Atomi, H.; Imanaka, T.: *J. Bacteriol.* **185**, 5175–5181 (2003).
48. Bruce, A. F.; Gounaris, K.: *Mol. Biochem. Parasit.* **145**, 84–93 (2006).
49. Yem, D. W.; Wu, H. C.: *J. Bacteriol.* **125**, 324-331, (1976).
50. Sanon, A.; Tournaire-Arellano, C.; El Hage, S. Y.; Bories, C.; Caujolle, R.; Loiseau, P. M.; *Biomed. Pharmacother.* **59**, 245-248 (2005).
51. Vafina, M. G.; Molodtsov, N. V.; Govor, S. A.: *Biokhimiia* **44**, 755-761 (1979).
52. Reyes, F.; Calatayud, J.; Vazquez, C.; Martinez, M. J.: *FEMS Microbiol. Lett.* **53**, 83-87, (1989).
53. Geimba, M. P.; Riffel, A.; Brandelli, A.: *J. Appl. Microbiol.* **85**, 708-714 (1998).
54. Molloy, C.; Cannon, R. D.; Sullivan, P. A.; Shephard, M. G.: *Microbiology* **140**, 1543-1553 (1994).
55. Yamamoto, K.; MooLee, K.; Kumag, H.; Tochikura, T.: *Agric. Biol. Chem.* **49**, 611-619, (1985).
56. Ulhoa, C. J.; Sankievicz, D.; Limeira, P. S.; Peberdy, J. F.: *Biochim. Biophys. Acta* **1528**, 39-42 (2001).
57. Hušáková, L.; Herkommerová-Rajnochová, E., Semeňuk, T.; Kuzma, M., Rauvolfová, J.; Přikrylová, V.; Ettrich, R.; Plíhal, O.; Bezouška, K.; Křen, V.: *Adv. Synth. Catal.* **345**, 735–742 (2003).
58. Plíhal, O.; Sklenář, J.; Kmoníčková, J.; Man, P.; Pompach, P.; Havlíček, V.; Křen, V.; Bezouška, K.: *Biochem. Soc. T.* **32**, 764-765 (2004).
59. Ettrich, R.; Kopecký, V.; Hofbauerová, K.; Baumruk, V.; Novák, P.; Pompach, P.; Man, P.; Plíhal, O.; Kutý, M.; Kulik, N.; Sklenář, J.; Ryšlavá, H.; Křen, V.; Bezouška, K.: *BMC Struct. Biol.* **7**, 32-46 (2007).
60. Shinde, U.; Inouye, M.: *Semin. Cell. Dev. Biol.* **11**, 35-44 (2000).
61. Fu, X.; Inouye, M.; Shinde, U.: *J. Biol. Chem.* **275**, 16871-16878 (2000).
62. Kim, S.; Matsuo, I.; Ajisaka, K.; Nakajima, H.; Kitamoto, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**, 2168-2175 (2002).
63. Jones, C. S.; Kosman, D. J.: *J. Biol. Chem.* **256**, 11861-11869 (1980).
64. Pera, L. M.; Infante Majolli, M. V.; Baigori, M. D.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* **26**, 183-187 (1997).
65. Pósci, I.; Pósci, I.; Pusztahelyi, T.: *J. Basic Microbiol.* **39**, 177-187 (1999).
66. Diez, B.; Rodriguez-Saiz, M.; de la Fuente, J. L.; Moreno, M. A.; Barredo, J. L.: *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 257-264 (2005).

67. Di Giambattista, R.; Federici, F.; Petruccioli, M.; Fenice, M.: J. Appl. Microb. 91, 498-505 (2001).
68. Reyes, F.; Byrde, R. J.: J. Biochem. 131, 381-388 (1973).
69. Lisboa De Marco, J.; Valadares-Inglis, M. C.; Felix, C. R.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 70-75 (2004).
70. Peterbauer, C. K.; Brunner, K.; Mach, R. L.; Kubicek, C. P.: Mol. Genet. Genomics 267, 162-170 (2002).
71. Plihal, O.; Sklenar, J.; Ettrich, R.; Novak, P.; Man, P.; Matousek, P.; Weignerova, L.; Hunkova, Z.; Kren, V. ; Bezouska, K.: Sekvence β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*, GenBank/DDBJ/EMBL číslo AY091636.
72. Prag, G.; Papanikolau, Y.; Tavlas, G.; Vorgaris, C. E.; Petratos, K.; Oppenheim, A. B.: J. Mol. Biol. 300, 611-617 (2000).
73. Mark, B. L.; Vocadlo, D. J.; Zhao, D.; Knapp, S.; Withers, S. G.; James, M. N. G.: J. Biol. Chem. 276, 42131-42137 (2001).
74. Mark, B. L.; Mahuran, D. J.; Cherney, M. M.; Zhao, D.; Knapp, S.; James, M. N. G.: J. Mol. Biol. 327, 1093-1109 (2003).
75. Nutritional and Metabolic Diseases v knize Genes and Disease, on-line na URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?highlight=genes,disease&rid=gnd.section.238>, 20. 3. 2008.
76. Bell, E. T.; Bell, J. E.: Biochim. Biophys. Acta 758, 144-151 (1983).
77. Lambert, C. C.: J. Exp. Zool. 249, 308-315 (1989).
78. Kramer, K. J.; Dziadik-Turner, C.; Koga, D.: Chitin metabolism in insects, v knize Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry nad Pharmacology, Kerkut, G. A. and Gilbert, L. I. (eds.) Pergamon Press, New York, 1985, str. 75-115.
79. Jagadeesh, B. H.; Prabha, T. N.; Srinivasan, K.: Plant Sci. 166, 1451-1459 (2004).
80. Yi, C. K.: Plant Physiol. 67, 68-73 (1981).
81. Pócsi, I.; Kiss, L.; Nánási, P.: Biochim. Biophys. Acta 1039, 110-118 (1990).
82. Cheng, Q.; Li, H.; Merdek, L.; Park, J. T.: J. Bacteriol. 182, 4836-4840 (2000).
83. Goodell, E. W.: J. Bacteriol. 163, 305-310 (1985).
84. Mengin-Lecreulx, D.; van Heijenoort, J.; Park, J. T.: J. Bacteriol. 178, 5347-5352 (1996).
85. Nelson, Cox: Lehninger Principles of Biochemistry, 4th edition, W. H. Freeman, 2004, p. 223.
86. Bowman, S. M.; Free, S. J.: BioEssays 28, 799-808 (2006).
87. De Nobel, J. G.; Van Den Ende, H.; Klis, F. M.: Trends. Microbiol. 8, 344-345 (2000).

88. Horsch, M.; Mayer, C.; Sennhauser, U.; Rust, D. M.: *Pharmacol. Ther.* 76, 187-218 (1997).
89. Gooday, G. W.; Zhu, W. Y.; O'Donnell, R. W.: *FEMS Microbiol. Lett.* 100, 387-392 (1992).
90. Ueda, M.; Arai, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1204-1207 (1992).
91. Lorito, M.; Harman, G. E.; Hayes, C. K.; Broadway, R. M.; Tronsmo, A.; Woo, S. L.; Di Pietro, A.: *Phytopathology* 83, 302-307 (1993).
92. Hussain, A. M.; Daniel, R. C. W.; Frost, A. J.: *Vet. Microbiol.* 32, 75-80 (1992).
93. Horsch, M.; Mayer, C.; Rast, D. M.: *Eur. J. Biochem.* 237, 476-482 (1996).
94. Conzelmann, E.; Sandhoff, K.: *Adv. Enzymol.* 60, 89-216 (1987).
95. Eisenthal, R.; Danson, M.J.: The azo coupling method to detect hydrolases, v knize *Enzyme Assays 2nd edition*, Oxford University Press, 2002, str. 178-179.
96. Scigelova, M.; Crout, D. H. G.: *Enzyme Microb. Tech.* 25, 3-14 (1999).
97. Every, D.; Ashworth, J. M.: *J. Biochem.* 133, 37-47 (1973).
98. Pocsi, I.; Pusztahelyi, T.; Bogati, M. S.; Szentirmai, A.: *J. Basic Microbiol.* 33, 259-267 (1993).
99. Ohtakara, A.; Yoshida, M.; Murakami, M.; Izumi, T.: *Agric. Biol. Chem.* 45, 239-247 (1981).
100. Koga, K.; Iwamoto, Y.; Sakamoto, H.; Hatano, K.; Sano, M.; Kato, I.: *Agric. Biol. Chem.* 55, 2817-2823 (1991).
101. Barr, B. K.; Holewinski, R. J.: *Biochemistry* 41, 4447-4452 (2002).
102. Knapp, S.; Voadlo, D.; Gao, Z. N.; Kirk, B.; Lou, J. P.; Withers, S. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6804-6805, 196.
103. Whitworth, G. E.; Macauley, M. S.; Stubbs, K. A.; Dennis, R. J.; Taylor, E. J.; Davies, G. J.; Greig, I. R.; Voadlo, D. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 635-644, 2007.
104. Hughes, R. C.; Jeanloz, R. W.: *Biochemistry* 3, 1543-1548 (1964).
105. Clarke, V. A.; Platt, N.; Butters, T. D.: *J. Biol. Chem.* 270, 8805-8814 (1995).
106. Yamashita, K.; Ohkura, T.; Yoshima, H.; Kobata, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 226-32 (1981).
107. Jacob, G. S.; Scuder, P.: *Methods. Enzymol.* 230, 280-299 (1994).
108. Niimi, K.; Shepherd, M. G.; Cannon, R. D.: *J. Clin. Microbiol.* 39, 2089-2097 (2001).
109. Chen, J. P.; Chang, K. C.: *J. Chem. Technol. Biot.* 60, 133-140 (1994).
110. Sakai, K.; Najo, F.; Usui, T.: *Depun. Kangaku* 37, 79-86 (1990).
111. Lorito, M.; Peterbauer, C.; Hayes, C. K.; Harman, G. E.: *Microbiology* 140, 623-669, 1994.

112. DiPietro, A.; Lorito, M.; Hayes, C. K.; Broadway, R. M.; Harman, G. E.: *Phytopathology* **83**, 308-313 (1993).
113. Selitrennikoff, C. P.; Nakata, M.: *Curr. Opin. Investig. Drugs* **4**, 200-205 (2003).
114. Gozalbo, D.; Elorza, M. V.; Sanjuan, R.; Marcilla, A.; Valentín, E.; Sentandreu, R.: *Pharmacol. Ther.* **60**, 337-345 (1993).
115. Ogata, M.; Zeng, X.; Usui, T.; Uzawa, H.: *Carbohydrate Research*. **342**, 23-30 (2007).
116. Lakshmanan, T.; Loganathan, D.: *Tetrahedron-Asymmetr.* **16**, 255-260 (2005).
117. Fialová, P.; Weignerová, L.; Rauvolfová, J.; Příkladová, V.; Pišvejcová, A.; Ettrich, R.; Kuzma, M.; Sedmera, P.; Křen, V.: *Tetrahedron* **60**, 693-701 (2004).
118. Kadowaki, S.; Saskiawan, I.; Watanabe, J.; Yamamoto, K.; Bunno, M.; Ichichara, Y.; Kumagai, H.: *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 341-345 (1997).
119. Murata, T.; Tashiro, A.; Itoh, T.; Usui, T.: *Biochim. Biophys. Acta* **1335**, 326-334 (1997).
120. Nilsson, K. G. I.: *Carbohydr. Res.* **188**, 9-17 (1989).
121. Křen, V.; Ščigelová, M.; Příkladová, V.; Havlíček, V.; Sedmera, P.: *Biocatalysis* **10**, 181-193 (1994).
122. Doplnující informace k článku Plíhal et al., 2007 [44] na URL:
<http://pubs.acs.org/subscribe/journals/bichaw/suppinf/bi061828m/bi06128m-File004.pdf> a
http://pubs.asc.org/subscribe/journals/bichaw/suppinf/bi061828m/bi061828msi20060901_091228.pdf
123. Bradford, M. M.: *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
124. Marangoni, A. G.: *Enzyme Kinetics*, John Willey and Sons, New Jersey, 2003.
125. Lee, D. H.; Lee, C. B.: *Plant Sci.* **159**, 75-85 (2000).
126. Reisfeld, R. A.; Lewis, U. J.; Williams, D. E.: *Nature* **195**, 281-283 (1962).
127. Laemmli, U. K.: *Nature* **227**, 680 – 685 (1990).
128. Siegel, G. J.; Agranoff, B. W.; Albers, R. W.; Fisher, S. K.; Uhler, M. D.: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Lippincott, Williams & Wilkins; Philadelphia 1999.
129. Joseph, D.; Petsko, G. A.; Karplus, M.: *Science* **249**, 1425-1428 (1990).

