

## **Použití $\alpha$ -*N*-acetylgalaktosaminidasy jako nástroje vhodného pro syntézu komplexních oligosacharidových stimulátorů imunitního systému**

**Úvod:** Alfa-*N*-acetylgalaktosaminidasy jsou exoglykosidasy specificky štěpící terminálně vázaný  $\alpha$ -*N*-acetylgalaktosamin v různých sacharidových řetězcích neboz aminokyselin serin nebo threonin. Tyto enzymy jsou široce rozšířené, vyskytují se téměř v každém organismu. Stabilita a aktivita v extrémních podmínkách je důležitá vlastnost, které se hojně využívá při mnoha průmyslových aplikacích. Studium velkého množství extracelulárních  $\alpha$ -*N*-acetylgalaktosaminidas izolovaných z vláknitých hub byl nalezen nejlepší producent *Asperillus niger* CCIM K2. Enzym izolovaný z vláknité houby *Aspergillus niger* vykazoval jedinečné vlastnosti, které byly dále zkoumány.

**Metody:** Alfa-*N*-acetylgalaktosaminidasa izolována z *A.niger* byla částečně sekvenována pomocí Edmanova odbourávání a MALDI MS. Na základě zjištěných sekvencí byly navrženy degenerované oligonukleotidy. Gen kódující  $\alpha$ -*N*-acetylgalaktosaminidasu byl amplifikován pomocí PCR. Jako templát byla použita cDNA izolovaná z *A.niger*. Získaný gen byl ligován do expresního vektoru pYES-2CT a rekombinantní protein byl exprimován v kvasinkovém expresním systému *Saccharomyces cerevisiae*. Byly optimalizovány podmínky exprese tohoto proteinu. Protein byl purifikován pomocí několika-krokové chromatografie. Purifikovaný rekombinantní enzym byl biochemicky a enzymaticky plně charakterizován.

**Výsledky:** Klonovaná DNA byla 1450 párů bází dlouhá, kóduje 480 aminokyselin (vypočítaná hmotnost proteinu dle aminokyselinové sekvence je 54814Da). Porovnáním tohoto enzymu s jinými proteiny byla zjištěna 96% identita s  $\alpha$ -galaktosidasou ( EC.3.2.1.22 ) která byla izolovaná též z vláknité houby *Aspergillus niger*.

Velikost  $\alpha$ -*N*-acetylgalaktosaminidasy byla určena několika na sobě nezávislými metodami: gelovou filtrací, analytickou centrifugou a dynamickým rozptylem světla. Velikost byla stanovena na 70kDa a 130kDa. Rovnováha mezi monomerní a dimerní formou byla zjištěna pomocí analytické ultracentrifugy. Rekombinantní  $\alpha$ -*N*-acetylgalaktosaminidasa vykazovala hodnotu  $K_m$  0,5588 mmol/l v 50mM citratovém pufru pH= 3,5 při teplotě 37°C. Purifikovaný enzym vykazoval teplotní optimum 50-55 °C a pH optimum 2,0-2,4. Byly zjištěny místa glykosylace rekombinantního i přirozeného enzymu s využitím hmotnostně spektrometrických metod MALDI MS, FT-ICR MS.

**Závěr:** Byl vyvinut expresní systém pro produkci rekombinantní  $\alpha$ -*N*-acetylgalaktosaminidasy. Výhoda tohoto systému je v krátké době produkce, velkého množství exprimovaného enzymu. Snadná purifikace rekombinantního proteinu pomocí chromatografických technik. Rekombinantně připravený protein vykazuje přibližně 20% enzymatickou aktivitu i v oblasti neutrálního pH. Těto vlastnosti lze vhodně použít při chemoenzymatické syntéze sacharidových struktur a dále při enzymatické přeměně krevní skupiny A na skupinu H(0), univerzální dárce.

Tato práce byla financována Grantovou agenturou Univerzity Karlovy (19309) a Institutional Research Concept for the Institute of Microbiology (AVOZ50200510), a grantem Czech Science Foundation (203/05/0172, 204/06/0771).