

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Kateřina Adamcová

VÝSKYT  $\beta$ -RUTINOSIDASY V EUOKARYOTICKÝCH  
MIKROORGANISMECH

Occurrence of  $\beta$ -Rutinosidase in Eukaryotic Microorganisms

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lenka Weignerová, Ph.D.

Praha 2014

Tato diplomová práce na Mikrobiologickém ústavu AV ČR v souvislosti s řešením výzkumného záměru NOVOSIDES FP7-KBBE-2010-4-265854 (MŠMT 7E11011).

## Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Mikrobiologický ústav AVČR je možné pouze po písemném souhlasu této instituce.

V Praze dne 9. května 2014

## **Abstrakt:**

Rutinosidy jsou velmi běžné glykosidické prekurzory aromatických látek. Navázané glykosidy ovlivňují aroma vín, chuť džusů atd, hydrolýzou glykosidické vazby je možno zvýšit aroma některých produktů. Jedním z enzymů schopných této hydrolýzy je  $\beta$ -rutinosidasa produkovaná extracelulárně kmenem *Aspergillus niger*. Purifikovaná  $\beta$ -rutinosidasa byla částečně sekvenována (MALDI-TOF/TOF), výsledek analýzy byl porovnán se sekvencemi v databázích (BLAST). Inzert kódující  $\beta$ -rutinosidasu byl ligován do expresního vektoru pPICZ $\alpha$  A. Jako expresní systém byl použit kmen *Pichia pastoris* KM71H. Bylo zjištěno, že gen pro  $\beta$ -rutinosidasu obsahuje 1137 bp kódující protein o 379 aminokyselinách. Elektroforézou v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným byla zjištěna molekulová hmotnost enzymu 60 kDa, deglykosylovaná forma 45 kDa. pH optimum enzymu bylo stanoveno jako 3,0 a teplotní optimum při teplotě 50 °C. Substrátem pro stanovení enzymové aktivity byl *p*-nitrofenyl- $\beta$ -rutinosid.

## **Abstract:**

Rutinosides are very common glycosidic aroma precursors. The glycosidic moiety influences wine aroma, flavour and taste of juices, so its cleavage has many consequences. These interesting insights led us to a diglycosidase – the extracellular  $\beta$ -rutinosidase from *Aspergillus niger*. The purified  $\beta$ -rutinosidase was partly analyzed by MALDI-TOF/TOF. The insert encoding for  $\beta$ -rutinosidase was ligated into the expression vector pPICZ $\alpha$  A. *Pichia pastoris* KM71H was used as an expression system. It was found out, that  $\beta$ -rutinosidase gene consists of a 1137 bp, encoding protein with 379 amino acids. The enzyme was determined to have relative molecule mass 60 kDa by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The pH and temperature optima of the enzyme were found to be 3,0 and 50 °C, respectively. *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -rutinoside was used as a substrate.

Ráda bych poděkovala své školitelce Ing. Lence Weignerové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za čas a rady, které mi věnovala a vytvoření skvělých pracovních podmínek. Dále bych ráda poděkovala Ing. Daniele Gestorferové za pomoc a ochotu při zpracování experimentální části práce. Mé poděkování také patří vedoucímu Laboratoře biotransformací prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. a pracovníkům Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR.

Nemohu také opomenout poděkovat rodině a přátelům, kteří mi byli při zpracování práce velikou oporou.

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| Abstrakt:.....                            | 3  |
| Abstract:.....                            | 3  |
| Seznam zkratek .....                      | 8  |
| Klíčová slova .....                       | 9  |
| Key words .....                           | 9  |
| 1. Úvod.....                              | 10 |
| 2. Cíl práce.....                         | 11 |
| 3. Teoretická část .....                  | 11 |
| 3.1. Glykosidasy .....                    | 11 |
| 3.1.1. Dělení glykosidas.....             | 11 |
| 3.1.2. Mechanismus .....                  | 12 |
| 3.2. Diglykosidasy .....                  | 16 |
| 3.2.1. Zdroje diglykosidas.....           | 17 |
| 3.3. Rutinosidasa .....                   | 21 |
| 3.3.1. Využití rutinosidas .....          | 25 |
| 3.4. Rutinosidy.....                      | 28 |
| 3.4.1. Flavonoidy .....                   | 28 |
| 3.4.2. Účinky vybraných flavonoidů .....  | 28 |
| 4. Experimentální část.....               | 30 |
| 4.1. Použité chemikálie.....              | 30 |
| 4.2. Komerční enzymy .....                | 31 |
| 4.3. Fungální a bakteriální kultury ..... | 32 |
| 4.4. Použité plasmidy .....               | 32 |
| 4.5. Komerční sady.....                   | 32 |
| 4.6. Přístroje.....                       | 33 |
| 4.7. Média a roztoky .....                | 33 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.8.    | Metody.....   | 35 |
| 4.8.1.  | Kultivace <i>Aspergillus niger</i> .....                          | 35 |
| 4.8.2.  | Purifikace $\beta$ -rutinosidasy z <i>Aspergillus niger</i> ..... | 35 |
| 4.8.3.  | MALDI TOF/TOF analýza a návrh primerů .....                       | 36 |
| 4.8.4.  | Izolace RNA .....   | 36 |
| 4.8.5.  | Izolace mRNA a následná reverzní transkripce.....                 | 36 |
| 4.8.6.  | Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....                          | 37 |
| 4.8.7.  | Preparace z agarózového gelu.....                                 | 37 |
| 4.8.8.  | Restrikční reakce.....  | 37 |
| 4.8.9.  | Přečištění DNA .....  | 37 |
| 4.8.10. | Ligace do klonovacího vektoru.....                                | 37 |
| 4.8.11. | Transformace klonovacím vektorem.....                             | 38 |
| 4.8.12. | Izolace plazmidové DNA .....                                      | 38 |
| 4.8.13. | Restrikční analýza .....  | 39 |
| 4.8.14. | Elektroforéza v agarózovém gelu.....                              | 39 |
| 4.8.15. | Sekvenace.....  | 39 |
| 4.8.16. | Ligace do expresního vektoru .....                                | 39 |
| 4.8.17. | Transformace expresním vektorem.....                              | 40 |
| 4.8.18. | MiniPrep a MidiPrep.....  | 40 |
| 4.8.19. | Měření koncentrace DNA .....                                      | 41 |
| 4.8.20. | Příprava konstruktů na elektroporaci .....                        | 41 |
| 4.8.21. | Elektroporace .....   | 41 |
| 4.8.22. | Expresce rekombinantní $\beta$ -rutinosidasy.....                 | 42 |
| 4.8.23. | Měření aktivity $\beta$ -rutinosidasy .....                       | 42 |
| 4.8.24. | Stanovení proteinů dle Bradfordové .....                          | 44 |
| 4.8.25. | SDS-PAGE.....   | 44 |
| 4.8.26. | Lýze buněk .....  | 44 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.8.27. | Izolace celkové DNA z <i>P.pastoris</i> .....                                   | 44 |
| 4.8.28. | PCR analýza genomu <i>Pichií</i> .....  | 45 |
| 4.8.29. | Western Blot.....   | 46 |
| 4.8.30. | Dialýza .....   | 46 |
| 4.8.31. | Ionexová chromatografie .....   | 46 |
| 4.8.32. | Gelová filtrace .....   | 47 |
| 4.8.33. | Screening kvasinek na produkci $\beta$ -rutinosidasy.....                       | 47 |
| 4.8.34. | Stanovení biochemických charakteristik rekombinantní $\beta$ -rutinosidasy..... | 48 |
| 5.      | Výsledky .....  | 49 |
| 5.1.    | MALDI TOF/TOF analýza $\beta$ -rutinosidasy, návrh primerů a amplifikace .....  | 49 |
| 5.2.    | Ligace do klonovacího vektoru a následná transformace.....                      | 49 |
| 5.3.    | Izolace celkové RNA.....  | 50 |
| 5.4.    | Izolace mRNA .....  | 50 |
| 5.5.    | Ligace do expresního vektoru .....  | 50 |
| 5.6.    | Transformace <i>Escherichia coli</i> TOP 10 .....                               | 50 |
| 5.7.    | Elektroporace <i>Pichia pastoris</i> KM71H a následná exprese .....             | 51 |
| 5.8.    | Izolace celkové DNA <i>P.pastoris</i> a PCR analýza.....                        | 53 |
| 5.9.    | Western Blot a Edmanovo odbourávání.....  | 53 |
| 5.10.   | Purifikace rekombinantní $\beta$ -rutinosidasy .....                            | 53 |
| 5.11.   | Stanovení biochemických charakteristik rekombinantní $\beta$ -rutinosidasy..... | 55 |
| 5.12.   | Screening kvasinek na produkci $\beta$ -rutinosidasy .....                      | 56 |
| 6.      | Diskuze .....   | 57 |
| 7.      | Závěr .....   | 58 |
| 8.      | Literatura.....   | 59 |

## Seznam zkratek

|               |  |
|---------------|--|
| ACAT          | Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase                      |
| AOX           | Alcoholoxidase   |
| BCGY          | Buffered complex glycerol medium                         |
| BCMY          | Buffered complex methanol medium                         |
| BMGY          | Buffered minimal glycerol medium                         |
| BMMY          | Buffered minimal methanol medium                         |
| BSA           | Bovine serum albumin                                     |
| CAZy          | Carbohydrate-active enzymes database                     |
| X-Gal         | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside |
| cDNA          | Complementary deoxyribonucleic acid                      |
| DMSO          | Dimethyl sulfoxide                                       |
| EC            | Enzyme clasiffication                                    |
| EDTA          | Ethylenediaminetetraacetic acid                          |
| FPLC          | Fast protein liquid chromatography                       |
| GH            | Glycoside hydrolase                                      |
| GTC           | Guanidine thiocyanate                                    |
| HMG-CoA       | 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A                    |
| IPTG          | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside              |
| LB médium     | Luria-Bertani medium                                     |
| LDL           | Low density lipoprotein                                  |
| MALDI-TOF/TOF | Matrix assisted laser desorption ionization-Time of fly  |
| mRNA          | Messenger ribonucleic acid                               |
| MS            | Mass spectrometer  |
| NAD           | Nicotinamide adenine dinucleotide                        |
| PCR           | Polymerase chain reaction                                |
| <i>p</i> NP   | <i>para</i> -Nitrophenyl                                 |
| PVDF          | Polyvinylide difluoride membrane                         |
| RGC-5         | Retinal ganglion cell                                    |
| RNA           | Ribonucleic acid   |
| RPE           | Retinal pigment epithelium                               |



|          |   |
|----------|---|
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate – Polyacrylamide gel electrophoresis |
| TE       | Tris/EDTA buffer  |
| TLC      | Thin layer chromatography                                   |
| YNB      | Yeast Nitrogen Base   |
| YPD agar | Yeast Pepton Dextrose agar                                  |

**Klíčová slova :**  $\beta$ -rutosidasa, *Aspergillus niger* K2, *Pichia pastoris*

**Key words:**  $\beta$ -rutosidase, *Aspergillus niger* K2, *Pichia pastoris*

## 1. Úvod

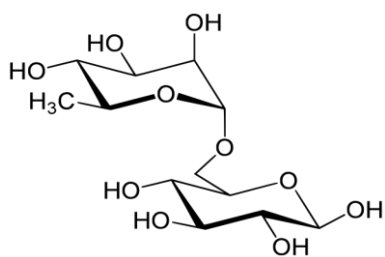
Příprava a výroba nových látek se postupně od klasických metod organické chemie přesouvá k užívání enzymových metod. Není zde potřeba velkého množství mezikroků a výtěžky bývají mnohem vyšší. Dalšími výhodami jsou ekologičnost a rychlost procesu.

Glykosidasy jsou velká skupina enzymů, které hydrolyzují glykosidickou vazbu. Nacházejí uplatnění jak ve velkých biotransformacích, tak i v jemných manipulacích jako jsou modifikace biologicky aktivních látek. Některé glykosidasy mají i transglykosylační aktivitu, tj. jsou kromě hydrolyzy schopné přenést hydrolyzovaný sacharid na další aglykon přítomný v reakci.

$\beta$ -Rutinosidasa, neboli  $\alpha$ -L-rhamnosyl- $\beta$ -D-glukosidasa, patří do skupiny diglykosidas, které odštěpují disacharid, v tomto případě rutinosu (obr. 1). Její nesporná výhoda je ve zkrácení procesu hydrolyzy rutinosidů. Pro tuto hydrolyzu bylo nutné použít dvoukrokovou reakci za použití  $\alpha$ -L-rhamnosidasy a  $\beta$ -D-glukosidasy. Rutinosidasa štěpí rutinosidy v jednom kroku.

Disacharid  $\alpha$ -L-rhamnofuranosyl- $\beta$ -D-glukopyranosid se nalézá v rostlinách. Velmi významné sloučeniny, kde je rutinosa navázána, jsou flavonoidy jako např. hesperidin a rutin. Hesperidin je obsažen především v citrusech, rutin v pohance a cibuli. Rutin a hesperidin byly dříve pojmenovány jako vitamin P, který napomáhá regulovat propustnost cév a křehkost krevních vlásečnic.

Dalšími podstatnými látkami, které obsahují rutinosa, jsou aromatické sloučeniny. Kvůli navázané rutinose je jejich těkavost potlačena. Aglykonem jsou v tomto případě geraniol, benzylalkohol, linalool a další. Tyto látky jsou velmi důležité při tvorbě aroma vína, proto se k uvolnění vůně využívá hydrolyzy pomocí enzymů.



Obr. 1 | Rutinosa

## 2. Cíl práce

- Vypracovat rešerši o stavu řešené problematiky
- Příprava rekombinantní formy  $\beta$ -rutinosidasy, její purifikace a biochemická charakterizace. Screening produkce  $\beta$ -rutinosidasy kvasinkami.

## 3. Teoretická část

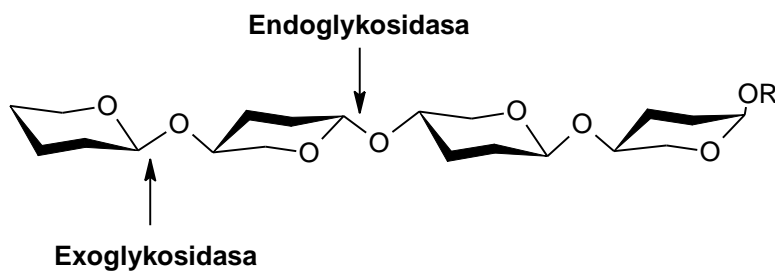
### 3.1. Glykosidasy

Glykosidasy, nebo také glykosylhydrolasy jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu glykosidické vazby za vzniku sacharidu a aglykonu [1]. EC klasifikace značí glykosidasy jako E.C.3.2.1.-, tj. enzymy hydrolyzující *O*- a *S*-glykosidy [2].

#### 3.1.1. Dělení glykosidas

- Endo/Exo
- Dle mechanismu

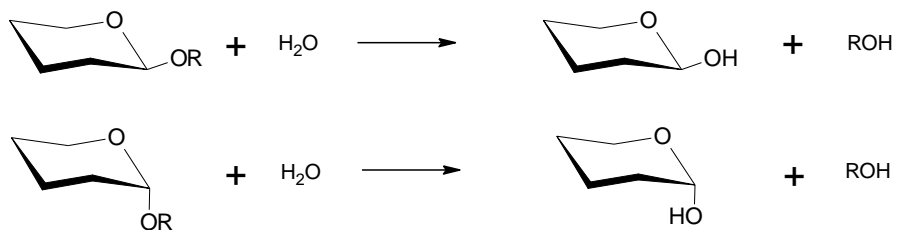
Glykosidasy se dělí podle místa hydrolýzy na endo a exoglykosidasy. Pokud je substrát štěpen enzymem na konci, nazýváme jej exoenzymem, pokud se tak děje uprostřed řetězce endoenzymem (obr. 2).



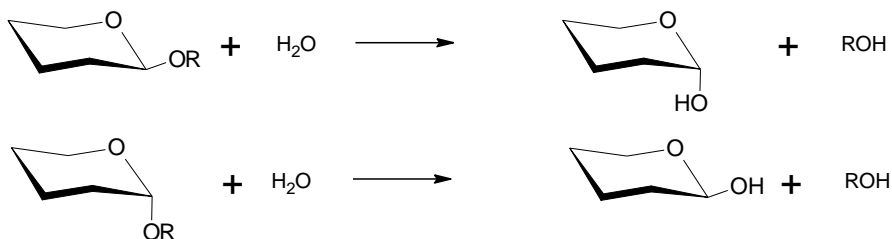
Obr. 2| Znázornění Endo/Exo enzymů

Dle mechanismu se glykosidasy dělí na tzv. *retaining* a *inverting*. *Retaining* glykosidasy zachovávají anomerickou konfiguraci, zatímco *inverting* mění anomerii sloučeniny (obr. 3, strana 12).

**Mechanismus *retaining* glykosidas:**



**Mechanismus *inverting* glykosidas:**



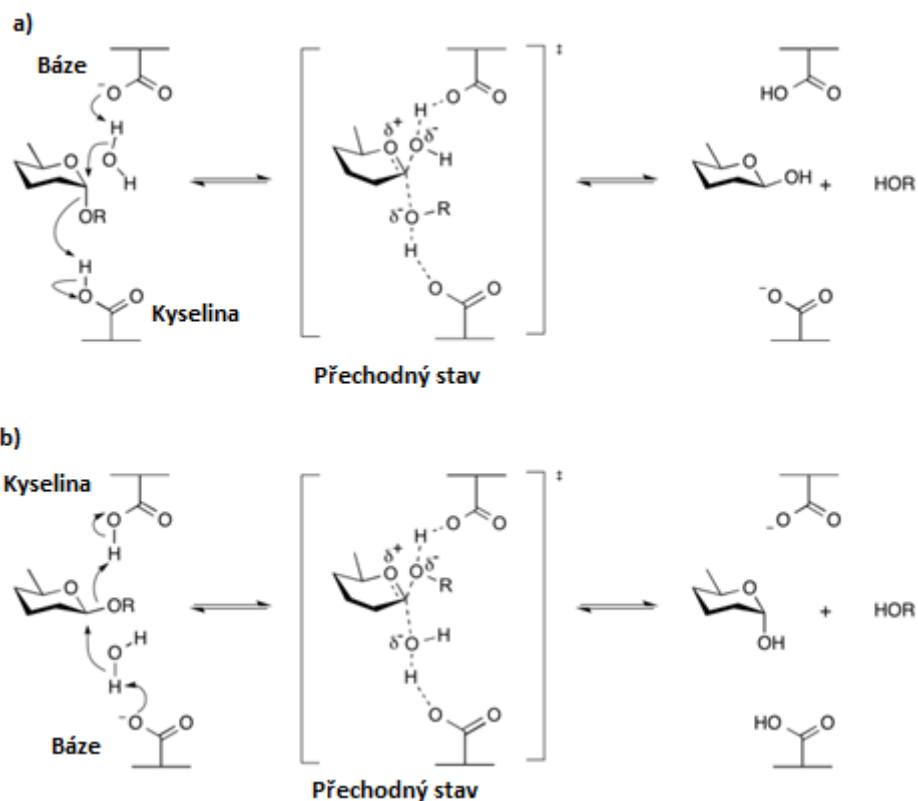
Obr. 3| Reakce glykosidas měnících a zachovávajících anomerii

### 3.1.2. Mechanismus

Mechanismus glykosidas je jen s občasnými výjimkami tentýž, který navrhl Koshland již v roce 1953 pro *inverting* a *retaining* enzymy.

- GLYKOSIDASY MĚNÍCÍ KONFIGURACI

Hydrolyza, znázorněná na obr. 4 (str. 13), probíhá jedнокrokově přes přechodný stav - za vzniku tzv. oxokarboniového iontu. Reakce je katalyzována aminokyselinami z bočního řetězce enzymu – většinou glutamovou nebo aspartovou kyselinou, které jsou většinou vzdálené cca 6 - 11 Å. Jedna z aminokyselin se chová jako báze, druhá jako kyselina. Deprotonovaná aminokyselina odebírá proton vodě, která atakuje anomerické centrum, zároveň protonizovaná aminokyselina poskytuje proton k vytvoření hydroxylové skupiny. [3]

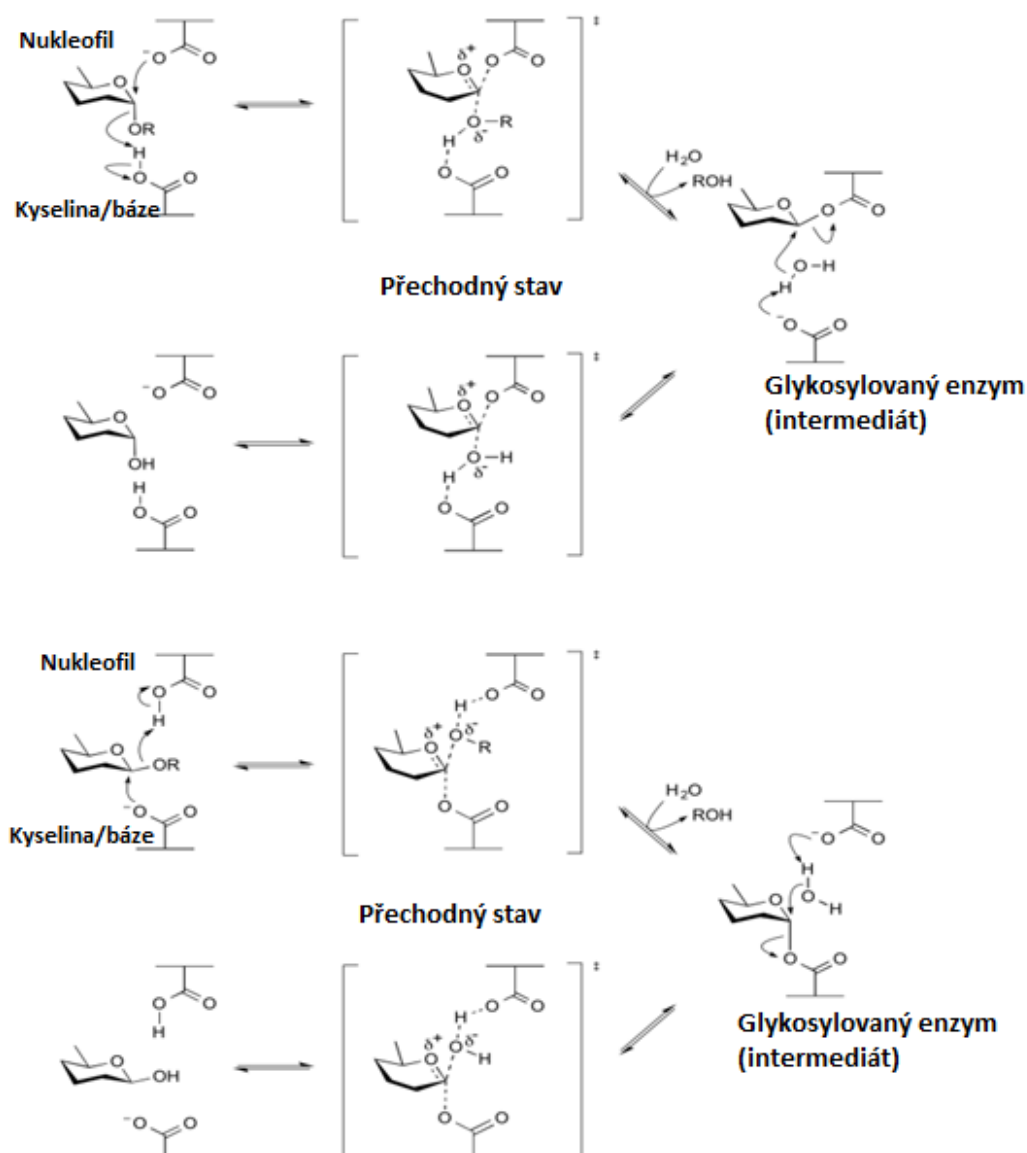


Obr. 4| Mechanismus glykosidas měnících anomerii, a) pro  $\alpha$ -glykosidasy, b) pro  $\beta$ -glykosidasy [3]

Výjimkou je např.  $\alpha$ -mannosidasa katalyzující reakci, kdy odcházejícím aglykonem je manna-1-fosfát. Katalyzující aminokyselinou v tomto případě není kyselina glutamová nýbrž glutamin. Funkci kyseliny zde nahrazuje právě fosfátový aglykon.[4]

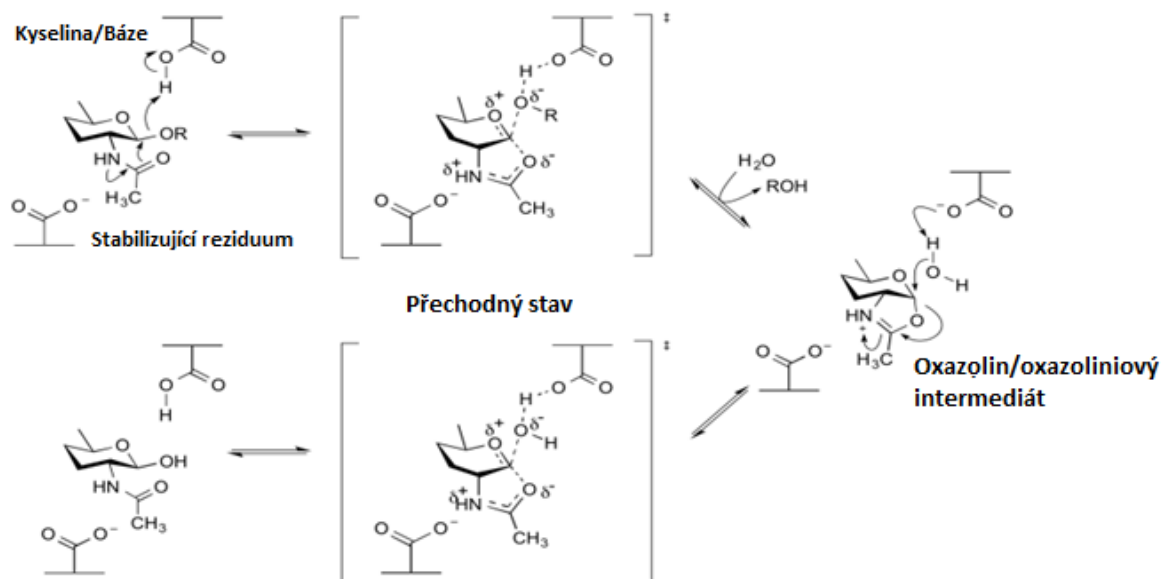
- GLYKOSIDASY ZACHOVÁVAJÍCÍ KONFIGURACI

Hydrolyza, znázorněná na obr. 5 (str. 14), probíhá dvou krokově, v obou krocích přes přechodný stav (oxokarboniový ion). Reakce opět probíhá za katalýzy dvou aminokyselin z bočního řetězce enzymu (glutamové, či aspartové). V prvním kroku, tzv. glykosylačním, jedna z aminokyselin zastává funkci nukleofilu, který atakuje sloučeninu a přesouvá aglykon za tvorby intermediátu – glykosylovaného enzymu. Druhá aminokyselina svým kyselým vodíkem protonizuje glykosidickou vazbu, čímž umožňuje vznik aglykonu. V druhém, deglykosylačním, kroku se deprotonovaná aminokyselina chová jako báze a odebírá proton vodě, která se účastní hydrolyzy glykosylovaného enzymu.[5]



Obr. 5| Mechanismus glykosidas zachovávajících anomerii, první je pro  $\alpha$ -glykosidasy, druhý pro  $\beta$ -glykosidasy. [5]

U většiny substrátů, jež mají na uhlíku C2 *N*-acetylovou skupinu, probíhá hydrolýza odlišně (obr. 6, str. 15). Enzymy hydrolyzující tyto látky nemají v katalytickém centru nukleofil a proto si vytvořily mechanismus, kdy je právě *N*-acetylová skupina využita pro tvorbu vnitřního nukleofilu. V prvním kroku je vytvořen oxazoliniový intermediát. V druhém vzniká aglykon a příslušný sacharid s *N*-acetylovou skupinou.[6-9]

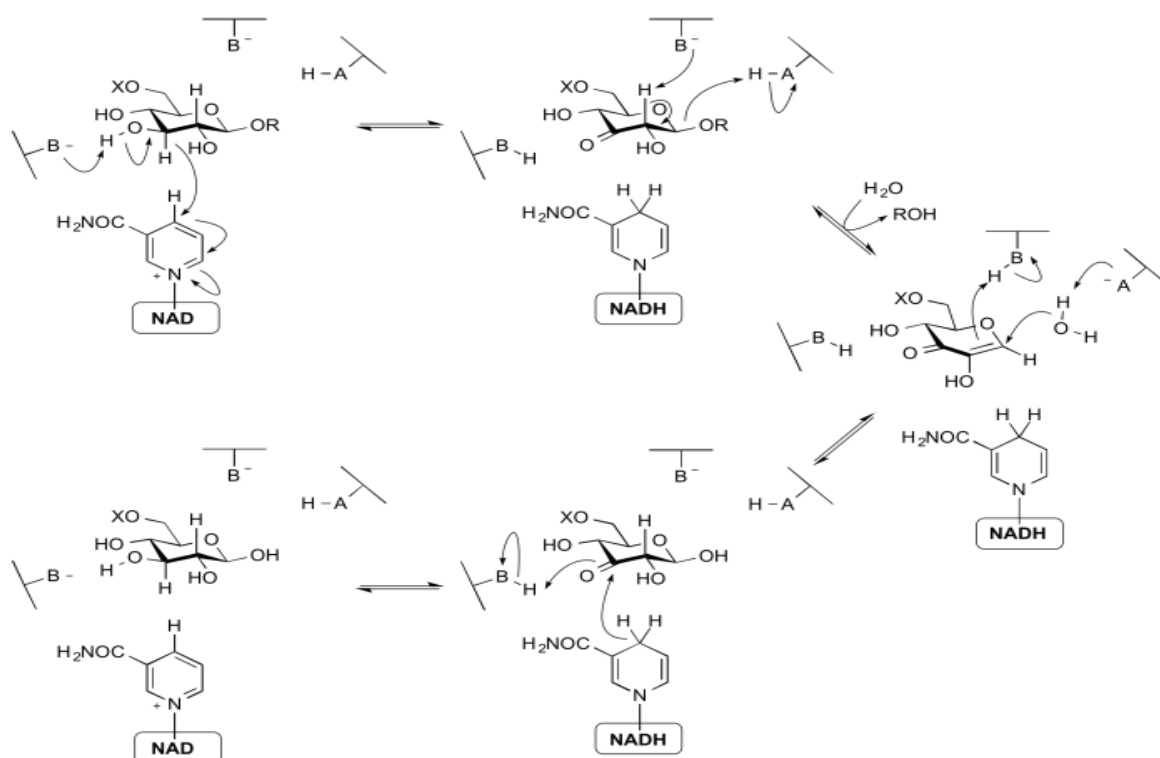


Obr. 6| Mechanismus glykosidas vytvářejících oxazoliniový intermediát[6-9]

Hydrolýza také může probíhat, jako je uvedeno na příkladu myrosinas, které mají místo glutamové kyseliny v katalytickém centru glutamin. V prvním kroku se vytvoří glykosylovaný enzym. Problém nastává v druhém kroku, kdy je vyžadována báze pro deglykosylaci. Tuto funkci zde přebírá koenzym *L*-askorbát.[10]

Některé glykosidasy využívají jako nukleofil aminokyselinu tyrosin, který je aktivován sousední bází. Tímto jevem jsou známé neuroaminidasy.[11-13]

Velmi speciální mechanismus mají glykosidasy využívající nikotinamid adenin dinukleotid jako kofaktor (obr. 7, str. 16). Tento mechanismus nezahrnuje vznik oxokarboniového iontu. Nejdříve je substrát oxidován za pomoci NAD, čímž se zvýší kyselost vodíku na uhlíku C2, který je poté odebrán bazickou částí enzymu. Následně je odváznán aglykon za vytvoření dvojné vazby mezi C1 a C2, ta je hydratována vodou. Posledním krokem je redukce ketonické skupiny na C3. [14, 15]

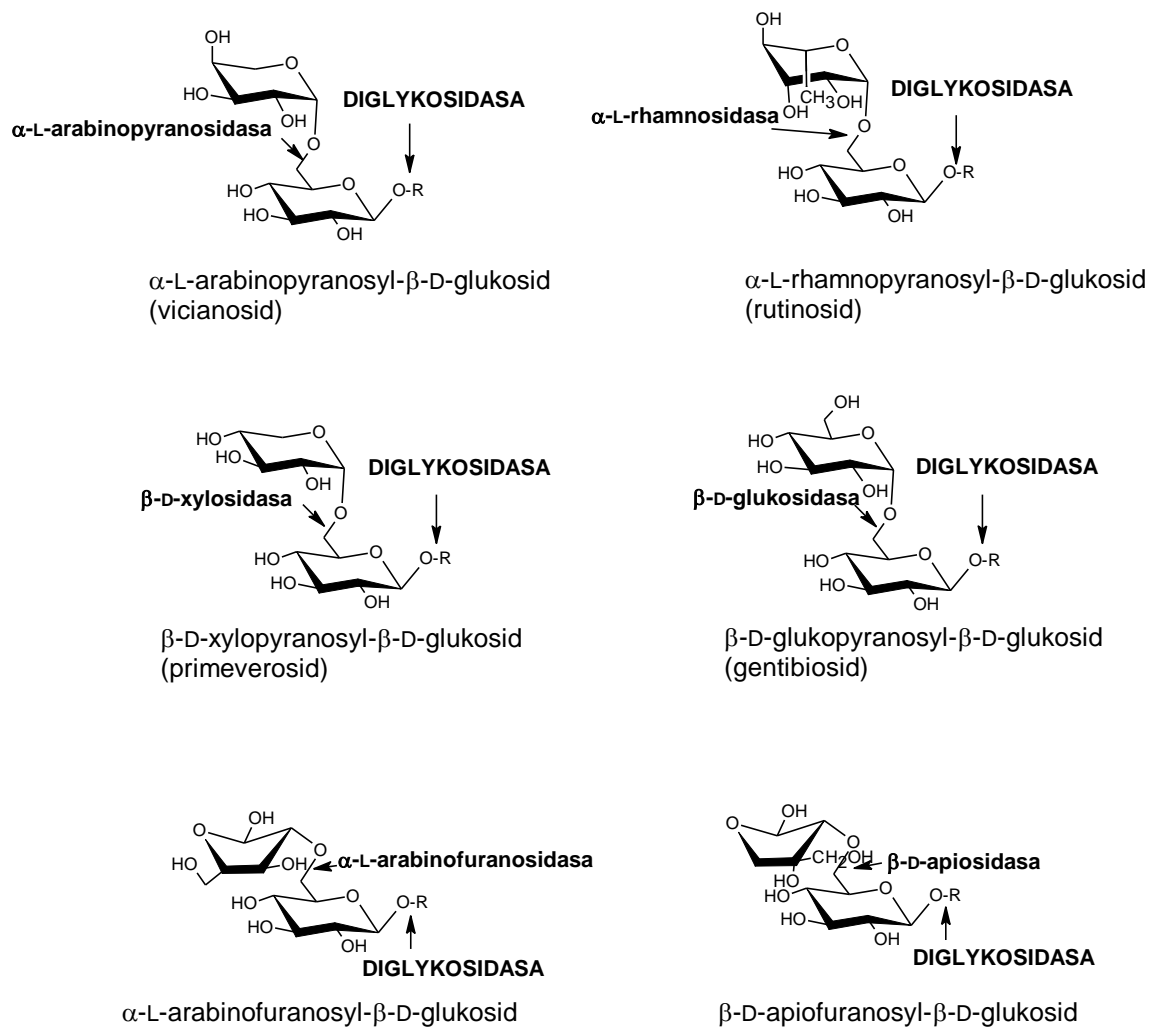


Obr. 7| Mechanismus glykosidas využívajících NAD[14, 15]

### 3.2. Diglykosidasy

Toto označení bylo zavedeno pro enzymy, které jsou schopny odštěpit disacharid od aglykonu. Další používané jméno pro tyto enzymy je disacharid-specifické glykosidasy. Mezi diglykosidasy patří např.  $\beta$ -rutinosidasa ( $\alpha$ -L-rhamnosyl- $\beta$ -D-glukosidasa), primeverosidasa ( $\beta$ -D-xylosyl- $\beta$ -D-glukosidasa), vicianin  $\beta$ -glukosidasa, akuminosidasa ( $\beta$ -D-apiofuranosyl- $\beta$ -D-glukosidasa) (obr. 8, str. 17).[16]

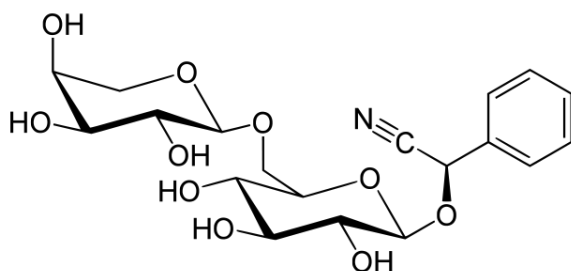




Obr. 8| Glykosidy včetně označených míst štěpení

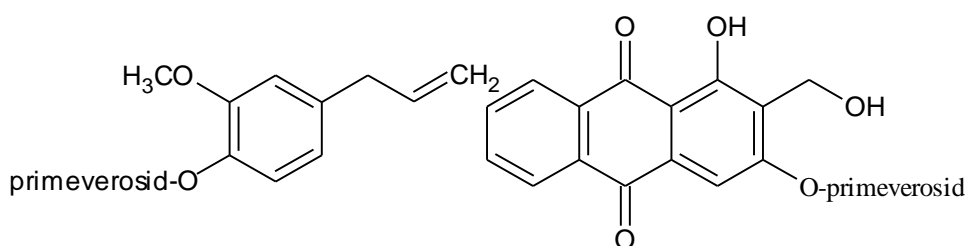
### 3.2.1. Zdroje diglykosidas

První diglykosidasy byly izolovány z rostlin. Studie byly zaměřeny hlavně na aktivaci sekundárních metabolitů. Například vicianin  $\beta$ -glukosidasa, která hydrolyzuje vicianin. Tato kyanogenní diglykosidasa byla izolována ze semen *Vicia angustifolia segetalis*. Protein se skládá z 509 aminokyselin včetně signální části, přičemž s ostatními rostlinnými diglykosidasami sdílí kolem 50% totožnosti.[17] Vicianin hydrolasa byla také nalezena v rostlině *Davallia trichomanoides* Blume. Tento protein má velmi úzkou substrátovou specifitu a preferuje (*R*)-epimery (obr. 9, str. 18). [18]



Obr. 9| Struktura (*R*)-vicianinu

Další diglykosidasou je  $\beta$ -apiosyl- $\beta$ -glukosidasa (furkatin hydrolasa), jejíž produkty jsou zapojeny v ochraně před býložravci. Izolována byla z listů *Viburnum furcatum*. Tento enzym je kódován 538 aminokyselinami.[19] Ze semen rostliny *Dalbergia nigrescens* Kurz byla purifikována 7-*O*- $\beta$ -apiosyl-glukosid  $\beta$ -glykosidasa. Tato diglykosidasa byla označována jako  $\beta$ -glukosidasa a  $\beta$ -fukosidasa, ale po identifikaci jejich přirozených substrátů bylo zjištěno, že sacharidovou složku odštěpuje jako disacharid.[20] Diglykosidasy nejsou obsaženy pouze v listech, či semenech (kde je jejich funkce zatím neznámá), ale i v kořenech – např.  $\beta$ -primeverosidasa z *Rubia tinctorum* hydrolyzující lucidin-*O*- $\beta$ -primeverosid na genotoxin lucidin (obr. 10).[21] Diglykosidasy se neúčastní jenom ochrany rostlin, ale také produkce těkavých (aromatických) látek. Jednou z nich je i výše jmenovaná primeverosidasa, která je produkována v čajových listech.[22-24] Dále byla izolována endoglykosidasa z kůže bobulí hroznů s podobnými vlastnostmi ostatních rostlinných glykosidas. Tato glykosidasa hydrolyzovala eugenol- $\beta$ -primeverosid (obr. 10) a *p*NP- $\beta$ -rutinosid.[25]



Obr. 10| Struktury eugenol- $\beta$ -primeverosidu (vlevo) a lucidin- $\beta$ -primeverosidu (vpravo)

První mikroorganismus, z kterého byla izolována diglykosidasa – primeverosidasa, byl *Aspergillus fumigatus* AP-20.[26] Z mikroorganismů patřících do skupiny *obecně považované za bezpečné* to pak bylo 8 kmenů (*Aspergillus oryzae* JMC5560, *A. niger* IAM2107, *A. awamori* IFO4033, *Rhizopus oryzae* JCM5560, *Talaromyces emersonii* IFO9747, *Trichoderma reesei* QM9414B, *Penicillium camembertii* FERMP-10452 a *P. multicolor* IAM7153), z nichž měl nejvyšší produkci primeverosidasy *Penicillium multicolor*. [27] Z producentů  $\alpha$ -rhamnosyl- $\beta$ -glukosidasy jsou to pak *Stilbella fimetaria* SES201, *Penicillium rugulosum* IFO 7242, *Pyrococcus furiosus*. [28-30]  $\alpha$ -rhamnosyl- $\beta$ -glukosidasa hydrolyzuje např. hesperidin a rutin (proto je také nazývána  $\beta$ -rutinosidasa), tj. látky obsažené hlavně v citrusích a látky s léčivým efektem na problémy s krevním oběhem, nebo rakovinu.[31]

Na str. 20 je zobrazena tab. 1, která shrnuje biochemické charakteristiky uvedených diglykosidas. Přehled rutinosidas je uveden v samostatné tabulce (tab. 2 na str. 27). pH optima se pohybují okolo pH=5,0, tj. v kyselé oblasti. Jediný *Aspergillus fumigatus* má optimum o hodně nižší – kolem 2,5-3,0. Teplotní optima se nalézají mezi 40 a 55 °C.

Tab. 1| Souhrn charakteristik diglykosidas

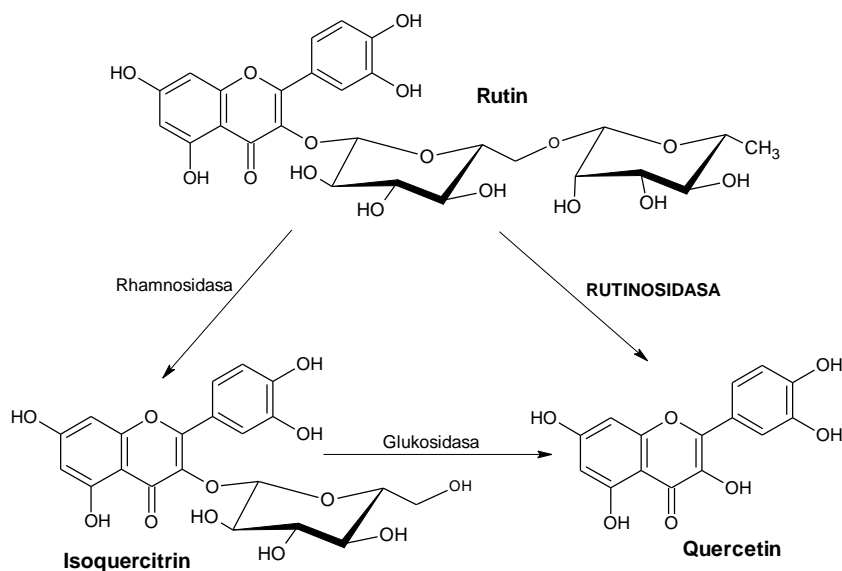
| enzym                             | Zdroj                              | velikost [kDa]             | Substrát                  | Km [mM] | GH rodina | pH optimum | teplotní optimum [°C] | pl       | literatura |
|-----------------------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------|-----------|------------|-----------------------|----------|------------|
| vicianin hydrolasa                | <i>Davallia trichomanoides</i>     | 340                        | Prunasin                  | 3,2     | X         | 5,5        | X                     | 4,6-4,7  | [18]       |
|                                   |                                    |                            | Vicianin                  | 4,9     |           |            |                       |          |            |
|                                   |                                    |                            | pNP-glukosid              | 3,4     |           |            |                       |          |            |
|                                   | <i>Vicia angustifolia smetalis</i> | 56                         | Vicianin                  | X       | 1         | X          | X                     | X        | [17]       |
| primeverosidasa                   | <i>Penicillium multicolor</i>      | 50                         | pNP-primeverosid          | 12      | 5         | 4,5-5,5    | 55                    | X        | [27]       |
|                                   |                                    |                            | pNP-glukosid              | 47      |           |            |                       |          |            |
|                                   |                                    |                            | eugenyl-primeverosid      | 3,8     |           |            |                       |          |            |
|                                   |                                    |                            | pNP-gentiobiosid          | 21      |           |            |                       |          |            |
|                                   | <i>Aspergillus fumigatus</i>       | 47                         | pNP-primeverosid          | 2,9     | X         | 2,5-3,0    | 55                    | 6        | [26]       |
|                                   |                                    |                            | pNP-gentiobiosid          | 6,3     |           |            |                       |          |            |
|                                   |                                    |                            | Eugenyl-primeverosid      | 6,3     |           |            |                       |          |            |
|                                   | <i>Camellia sinensis sinensis</i>  | 61                         | Geranyl-primeverosid      | X       | 1         | 5          | 50                    | 9,4      | [24]       |
|                                   |                                    |                            | Linalyl-primeverosid      | X       |           |            |                       |          |            |
|                                   | <i>Camellia sinensis sinensis</i>  | 61                         | 2-fenylethyl-primeverosid | X       |           |            |                       |          |            |
| <i>Camellia sinensis sinensis</i> | 60-61                              | Eugenyl-primeverosid       | X                         | 1       | 4         | 45         | 9,5                   | [23]     |            |
| <i>Camellia sinensis sinensis</i> | 61                                 | 2-fenylethyl-primeverosid  | 2                         | 1       | X         | X          | 9,4                   | [32, 33] |            |
| <i>Camellia sinensis sinensis</i> | 61                                 | 2-fenylethyl-vicianosid    | 15                        |         |           |            |                       |          |            |
| <i>Camellia sinensis assamica</i> | 60,5                               | Benzyl-primeverosid        | X                         | 1       | 4         | 45         | 9,5                   | [22]     |            |
|                                   |                                    | Linalyl-primeverosid       | X                         |         |           |            |                       |          |            |
| <i>Rubia tinctorum L.</i>         | 68                                 | Lucidin-primeverosid       | X                         | X       | X         | X          | X                     | [21]     |            |
|                                   |                                    | Alizarin-primeverosid      | X                         |         |           |            |                       |          |            |
| furkatin hydrolasa                | <i>Viburnum furcatum</i>           | 56                         | Furkatin                  | X       | 1         | 5          | 40                    | X        | [19]       |
|                                   | <i>Dalbergia nigrescens</i>        | 62-63                      | Dalpatein-aposyl-glukosid | X       | X         | 5,0-6,0    | 65                    | X        | [20]       |
|                                   |                                    | Dalnigreïn-aposyl-glukosid | X                         |         |           |            |                       |          |            |

Data značená X nebyla v člancích uvedena

### 3.3. Rutinosidasa

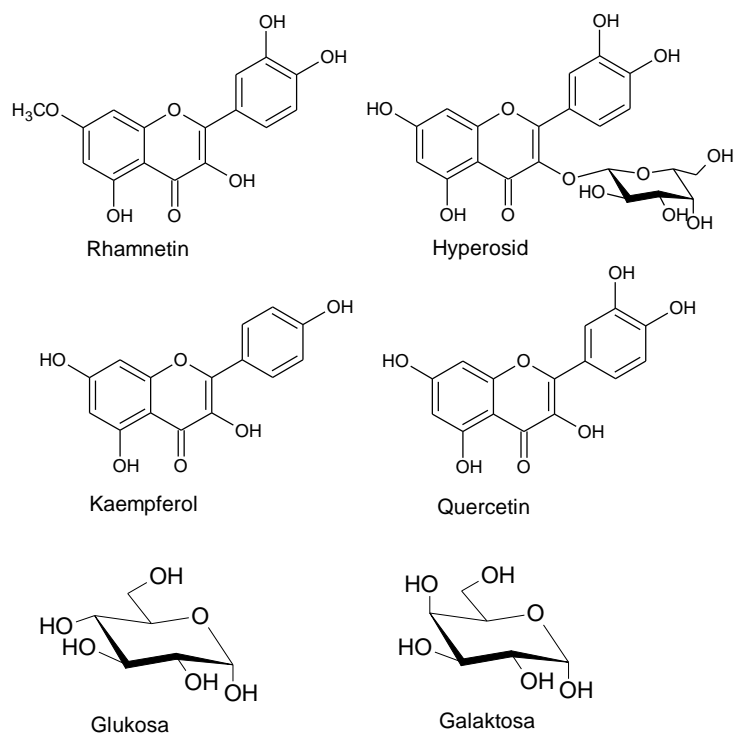
Rutinosidasa patří do skupiny diglykosidas. Tento enzym odštěpuje disacharid rutinosu z příslušného rutinoidu v jednom kroku např. rutinu (obr. 11).

V EC systému je rutinosidasa zařazena pod číslem EC 3.2.1.168 a názvem hesperidin 6-O- $\alpha$ -L-rhamnosyl- $\beta$ -D-glukosidasa, kvůli jejímu velmi častému substrátu hesperidinu. V zařazení do rodiny glykosylhydrolas je pak rutinosidasa uvedena v rodině GH 5, která spadá pod klan GH-A. Enzym schopný katalyzovat odštěpení rutinoidy byl izolován (resp. produkován) jak z rostlinného materiálu tak mikroorganismy.[1, 2]



Obr. 11| Reakce rutinu, jednokroková s rutinosidasou, dvoukroková s rhamnosidasou a glukosidasou

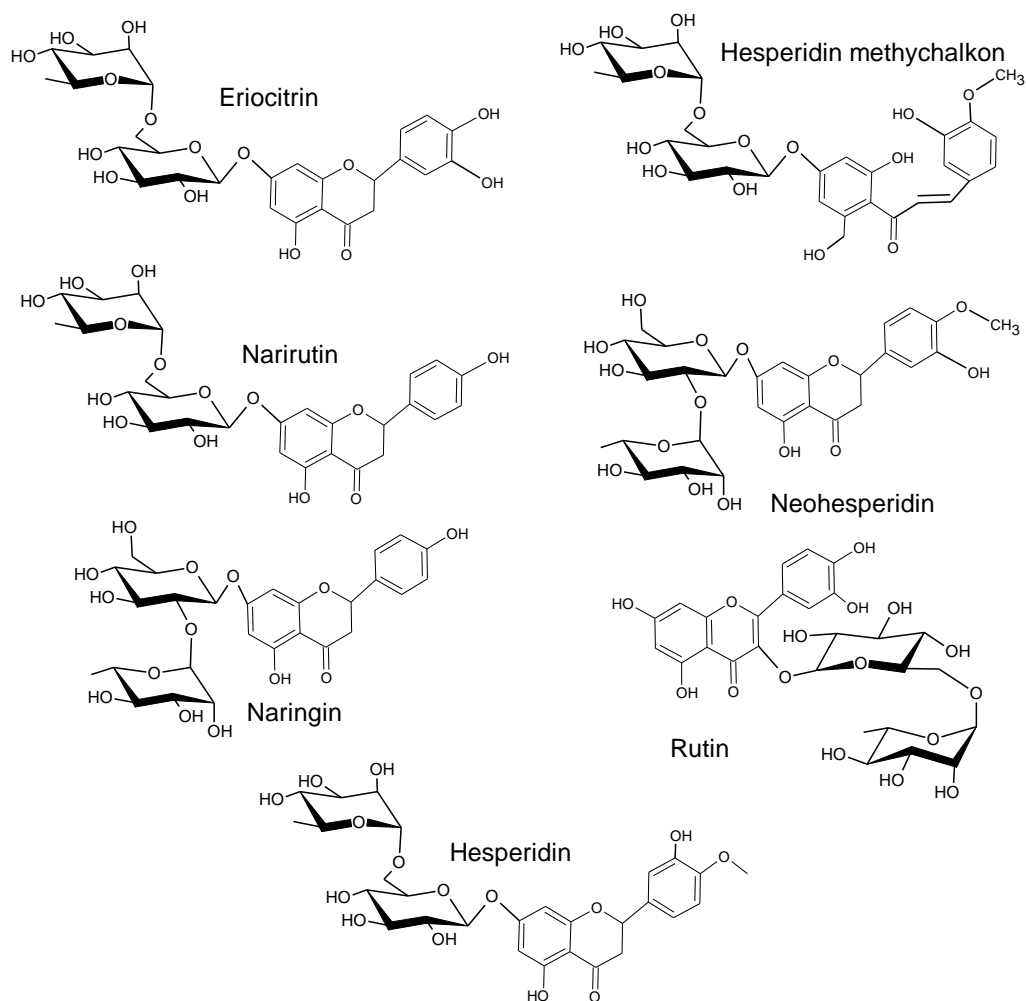
Jednou z prvních rutinosidas popsal Hay již v roce 1961. Rutinosidasa produkovaná mikroorganismem *Aspergillus flavus* byla indukována rutinem a hyperosidem, méně rhamnetinem, kaempferolem a quercetinem a vůbec rutinou, glukosou a galaktosou (obr. 12, str. 22). pH optimum bylo 5,6 a její substrátová specifita byla velmi úzká, hydrolyzovala pouze rutin a hyperosid.[34]



Obr. 12| Struktury induktorů

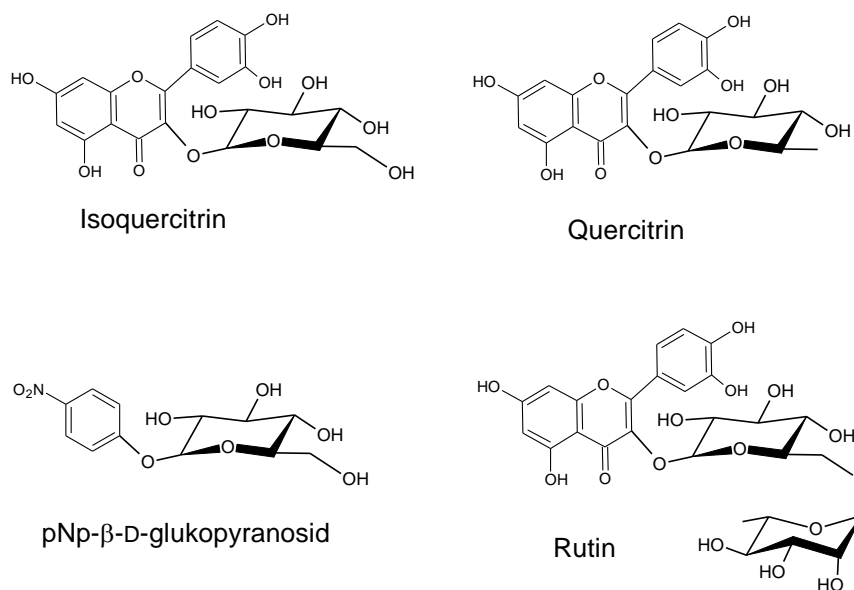
Další rutinoidy z rodu *Aspergillus* produkoval zástupce *A. niger*. Její aktivita byla nejvyšší při pH=3,4 a teplotě 65 °C. Nebyla inhibována fruktosou, oxidem siřičitým a její aktivita se zvýšila v přítomnosti etanolu. Tyto charakteristiky řadí tuto rutinoidu do skupiny ideálních enzymů pro použití ve vinařství.[35]

Mazzaferro a kol. izolovali rutinoidu z média *Stilbella fimetaria* SES201. Jako zdroj uhlíku byl použit hesperidin, je možné použít i rutin, či naringin. *S. fimetaria* nebyla schopná růst v přítomnosti hesperetinu jako zdroje uhlíku. Izolovaný enzym je glykoprotein, váží mezi 42 (MS) a 46 kDa (SDS-PAGE) a jeho pI je 5,7. Díky psychrotolerantnímu charakteru *S. fimetaria* má velmi široké rozmezí teplot, kde si stále zachovává svoji aktivitu. Optimální teplotou je 70 °C, ale je aktivní i při 5 °C. pH optimum má při pH=5,0, přičemž jeho aktivita je pozorována v rozmezí pH 4,0 – 8,0. Byla studována i substrátová specifita enzymu. Relativní aktivita (hesperidin 100%) byla 90% u eriocitrinu, nadpoloviční u narirutinu a hesperidin methylchalkonu, u naringinu, neohesperidinu a rutinu ovšem vůbec nebyla detekována (struktury substrátů obr. 13, str. 23).[29]



Obr. 13|Struktury zkoumaných substrátů rutinoidasy z *Stilbella fimetaria* SES201

Dalším organismem, který produkuje rutinoidasu, je *Pyrococcus furiosus*. Tato rutinoidasa se ukázala být velmi termostabilním enzymem – její teplotní optimum je při 95 °C. pH optimum má při pH=5,0. Zvýšení konverze bylo dosaženo použitím 0,5% (v/v) DMSO, jelikož tím byla zvýšena rozpustnost substrátu. Nejvyšší specifickou aktivitu měla rutinoidasa u *p*NP derivátů pro *p*NP-β-D-glukopyranosid, u glykosidů flavonoidů to bylo v pořadí isoquercitrin > quercitrin > rutin (obr. 14, str. 24).[30]



Obr. 14| Struktury zkoumaných substrátů pro rutinidasu produkovanou *Pyrococcus furiosus*

Rutinosidasa byla také purifikována z *Penicillia rugulosum* IFO 7242. Je charakterizována optimálním pH=2,2 a teplotou 50 °C, přičemž stabilní je mezi pH=2,0 - 11,0 a teplotami pod 40 °C. pI bylo naměřeno okolo 5,0. Molekulová hmotnost je 245 kDa, jedné podjednotky pak 65 kDa. Byla zkoumána i substrátová aktivita této rutinoidasy, hydrolyzuje jak rutin tak i isoquercitrin, k ostatním substrátům (quercitrin, hesperidin, naringin a další) je intaktní.[28]

Z rostlinných zdrojů byla izolována z *Fagopyrum esculentum*. Izolovaný enzym má 74,5 kDa. Nejvyšší aktivitu má při 30 °C a pH=4,8, její izoelektrický bod je 5,7. Největší specifickou aktivitu má pro substrát kaempferol 3-O-rutinosid, následovaný rutinem a kaempferol 3-O-sophorosid-7-glukosidem.[36]

Rutinosidasu také izolovali z hroznů odrůdy *Muscat of Alexandria*. Její biochemické charakteristiky odpovídají rostlinným glykosidasám, pH optimum má mezi pH=4 - 5, teplotní optimum při 50 °C a udávaná hmotnost je 58 kDa.[25]

Dalším rostlinným zdrojem glykosidasy schopné hydrolyzovat rutin je pohanka (*Fagopyrum tataricum*). Yasuda a kol. izolovali 2 frakce proteinu degradujícího rutin. Obě měly Mr= 68 - 70 kDa a pH optimum rovné 5,0.[37] Druhá skupina, která izolaci



prováděla dle Yasudy a kol. s nepatrnými změnami, izolovala opět dvě frakce tohoto enzymu s pH optimem pH=5,0, teplotním optimem 40 °C, ale Mr isoenzymů byla 58,2 a 57,4 kDa. Také získala odlišnou Km hodnotu pro rutin (Yasuda : 120 mM a 130 mM, Suzuki : 0,12 mM a 0,13 mM). Tyto odlišnosti se zatím nepodařilo vysvětlit.[38]

Na konci kapitoly 3.3. jsou všechny charakteristiky shrnuty v přehledné tabulce 2. Jak je vidět pH optima rutinoidas se pohybuje v kyselé části spektra – mezi 4 a 5 a nejsou ovlivněna původem rutinoidasy, tj. zda je rostlinná, či pochází z mikroorganismu. Teplotní optima jsou rozdílná dle původu. U mikroorganismů převažují teploty mezi 50 a 70 °C, ale vyskytují se i při 95 °C. Rostlinné rutinoidasy mají teplotní optima nižší (30 - 40 °C).

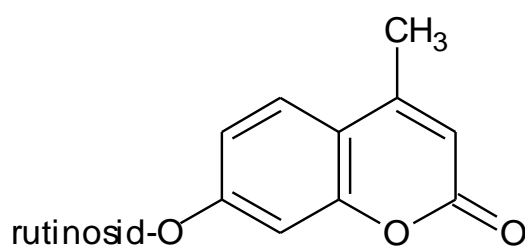
### 3.3.1. Využití rutinoidas

Rutin je glykosid složený z quercetinu a disacharidu rutinoidasy. Quercetin je prokázané protizánětlivé, antioxidační činidlo s mnoha dalšími léčivými účinky. Hydrolýza rutinu probíhá buď chemicky, nebo enzymově – až do objevení rutinoidasy dvoukrokově za využití rhamnoidasy a glukoidasy. Rutinoidasa z *Pyrococcus furiosus* však tuto reakci katalyzuje v jednom kroku. Reakce probíhala při 95 °C a pH=5,0 za přítomnosti 0,5% DMSO. Takto bylo vyrobeno 6,5 mM quercetinu z 10 mM rutinu během 2,5 hodiny.[30]

Těkavé látky jsou ve víně, čaji a jiných aromatických nápojích velmi často obsaženy ve formě glykosidů, mnoho mimo jiné rutinoidů. K obohacení aroma je potřebné tyto látky uvolnit. Rutinoidasa je v tomto procesu důležitý biotechnologický nástroj. V potravinářském průmyslu hraje rutinoidasa také významnou roli ve výrobě standardů pro analýzu potravin, jelikož je tato hydrolasa schopná i transglykosylace. Minig a kol. použili rutinoidasu z *Acremonium sp.* DSM 24697 právě pro transglykosylaci aromatických látek (linalool, geraniol, nerol a fenylethanol), jako donor rutinoidasy byl využit hesperidin. Kromě linaloolu byly všechny substráty glykosylovány. Výsledky byly v souladu s předchozími objevy, tj. reaktivita stoupala v řadě primární alkoholy, sekundární alkoholy, fenoly. Terciární alkoholy byly nereaktivní. Produkce neryl-, geranyl- a 2-fenylethyl-rutinoidu dosáhla 58, 76 a 89%. Byla zkoumána i schopnost hydrolýzy těchto rutinoidů. Ve vodné fázi nebyly produkty detekovány, ovšem při použití 12% etanolu hydrolýza proběhla.[39]

Dalším mikroorganismem produkující endo- $\beta$ -glukosidasu ke zvýšení aroma vína či džusů je *Aspergillus niger*. Aktivita tohoto enzymu byla navýšena imobilizací na celulosu při pH=4,5.[40]

Možnost transglykosylace využili Mazafferro a kol. k přípravě fluorogenního substrátu 4-methylumbelliferyl-rutinosidu (obr. 15). Jako donor byl opět využit hesperidin. Reakce probíhala při 30 °C a výtěžek dosáhnul 28 % během 1 hodiny. Poté byl již konstantní, ačkoliv hydrolyza hesperidinu stále probíhala. Koncentrace fluorogenního produktu zůstávala konstantní, popřípadě se jeho koncentrace snížila, jelikož se stal substrátem. 4 Methylumbelliferyl rutinosid je možno využít k zymografické analýze.[41]



Obr. 15| Struktura 4-methylumbelliferyl-rutinosidu

Rutinosidasa je také využívána ke kvantifikaci hesperidinu v potravinách z citrusů. Absorpční maximum hesperidinu je při 284 nm, hesperetinu při 323 nm. Po přidání rutinosidasy byla měřena absorbance (při 323 nm) až do doby, než dosáhla rovnováhy. Koncentrace hesperidinu byla pak spočítána z rozdílu absorbance před přidáním enzymu a absorbance v rovnováze. [42]

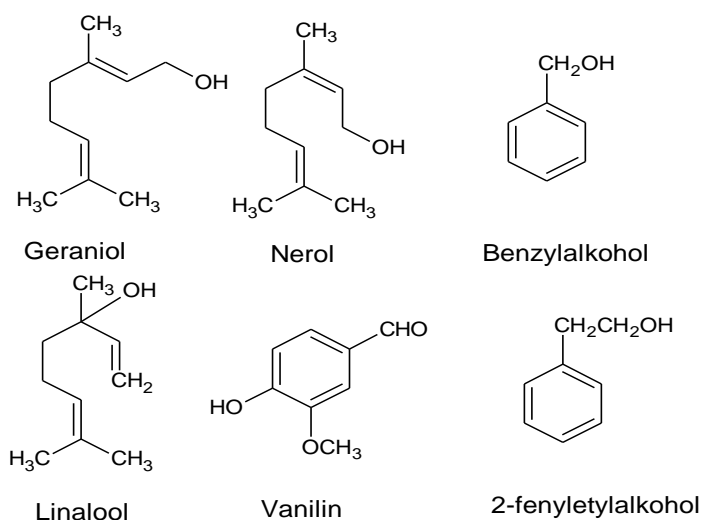
Tab. 2| Shrnutí charakteristik rutinoidů

| Zdroj                        | velikost [kDa]          | Substrát                            | Km [mM] | pH optimum | teplotní optimum [°C] | pl  | Literatura |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|---------|------------|-----------------------|-----|------------|
| <i>Stilbella fimetaria</i>   | 42,2                    | Hesperidin                          | 1,8     | 5          | 70                    | 5,7 | [29]       |
|                              |                         | Eriocitrin                          | X       |            |                       |     |            |
|                              |                         | Narirutin                           | X       |            |                       |     |            |
|                              |                         | hesperidin metylchalkon             | 8,7     |            |                       |     |            |
| <i>Pyrococcus furiosus</i>   | X                       | Rutin                               | 0,3     | 5          | 95                    | X   | [30]       |
|                              |                         | Quercitrin                          | 0,1     |            |                       |     |            |
|                              |                         | Isoquercitrin                       | 0,2     |            |                       |     |            |
| <i>Penicillium rugulosum</i> | 245<br>(podjednotka 65) | Rutin                               | X       | 2,2        | 50                    | 5   | [28]       |
|                              |                         | Isoquercitrin                       | X       |            |                       |     |            |
| <i>Aspergillus flavus</i>    | X                       | Rutin                               | X       | 5,6        | X                     | X   | [34]       |
|                              |                         | Hyperosid                           | X       |            |                       |     |            |
| <i>Aspergillus niger</i>     | 120                     | Geranyl-rutinosid                   | 1,25    | 3,4        | 65                    | 3,9 | [35]       |
|                              |                         | pNP-glukosid                        | 1       |            |                       |     |            |
| <i>Muscat of Alexandria</i>  | 58                      | pNP-rutinosid                       | X       | 4-5        | 50                    | X   | [25]       |
|                              |                         | Eugenyl-primeverosid                | X       |            |                       |     |            |
| <i>Fagopyrum esculentum</i>  | 74,5                    | Rutin                               | 0,6     | 4,8        | 30                    | 5,7 | [36]       |
|                              |                         | Kaempferol-3-O-rutinosid            | 1       |            |                       |     |            |
|                              |                         | Kaempferol-3-O-soforosid-7-glukosid | 0,5     |            |                       |     |            |
| <i>Fagopyrum tataricum</i>   | 68-70                   | Rutin (frakce I)                    | 120     | 5          | X                     | X   | [37]       |
|                              |                         | Rutin (frakce II)                   | 130     |            |                       |     |            |
|                              | 58,2                    | Rutin (frakce I)                    | 0,12    | 5          | 40                    | X   | [38]       |
|                              | 57,4                    | Rutin (frakce II)                   | 0,13    |            |                       |     |            |

Data značená X nebyla v člancích uvedena

### 3.4. Rutinosidy

Rutinosidy jsou glykosylované sloučeniny, navázaným sacharidem je rutinosa. V přírodě se takových sloučenin vyskytuje velmi mnoho. Mnoho látek glykosylovaných rutinosa je možno zařadit do skupiny flavonoidů – např. rutin, hesperidin, naringin, kaempferol-3-*O*-rutinosid a jiné. Další početnou skupinou, kde se sloučeniny nacházejí ve formě rutinosidů, jsou terpeny a jejich deriváty. Tyto rutinosidy – jako geraniol, linalool, či nerol – se často vyskytují ve víně a čaji a ovlivňují tak jejich aroma (obr. 16).[43]



Obr. 16| Příklady aglykonů rutinosidů

#### 3.4.1. Flavonoidy

Tato velmi významná skupina látek se řadí do rodiny polyfenolů. Flavonoidy jsou produkovány rostlinami jako jejich sekundární metabolity, jsou tudíž přítomny v běžné stravě člověka. Tyto sloučeniny jsou díky jejich velmi prospěšným účinkům na zdraví zkoumány již skoro dvě století. Flavonoidy působí protizánětlivě, antihepatotoxicky, antiosteoporoticky, protialergicky.[31]

#### 3.4.2. Účinky vybraných flavonoidů

- HESPERIDIN

Hesperidin je již dlouho známý pro své blahobytné účinky na kardiovaskulární systém. Již v polovině 20. století byl popsán vitamín P, což je ve skutečnosti směs

flavonoidů – včetně hesperidinu. Toto označení se již nepoužívá, ale skutečnost, že hesperidin snižuje propustnost cév, která postihuje pacienty trpícími kurdějemí, diabetem melitus, či chronickou žilní nedostatečností, byla několikrát potvrzena.[44] Dalším pozitivním účinkem na kardiovaskulární systém je schopnost hesperidinu snižovat hladinu cholesterolu, celkového i LDL (low density lipoprotein), triacylglyceridů a lipidů. Navíc inhibuje HMG-CoA (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-koenzym A), ACAT (acylkoenzym A - cholesterol acyltransferasa) a aktivitu lipasy z prasečí slinivky.[45, 46] Velmi důležité bylo i zjištění protisrážlivého působení hesperidinu. Tento jev je způsoben schopností inhibovat fosforylaci fosfolipasy C $\gamma$ 2 zprostředkovanou kolagenem a cyklooxygenasu 1.[47] Díky protisrážlivému efektu a schopnosti inhibovat angiotensin I konvertující enzym dokáže hesperidin snižovat krevní tlak.[48]

Dalším velice častým problémem je zánět. Každý krok zánětlivé reakce je spouštěn jedním, nebo více mediátory, kterými jsou deriváty kyseliny arachidonové (leukotrieny, prostaglandiny, či tromboxany), vazomotorní aminy (histamin, serotonin) a volné radikály kyslíku. Díky těmto mediátorům dochází při zánětu k vasodilataci, zvýšení propustnosti membrány a poskytnutí signálu pro specializované buňky – makrofágy, lymfocyty a další. Hesperidin působí protizánětlivě. V kombinaci s diosminem potlačuje tvorbu edému a inhibovat syntézu prostaglandinu E2 a F2 $\alpha$  a tromboxanu B2. Navíc je schopen vychytávat kyslíkové radikály.[49] [50] Protizánětlivé účinky byly zkoumány i na zánětu tlustého střeva vyvolaného trinitrobenzensulfonovou kyselinou. Byla potvrzena snížená aktivita myeloperoxidasy a zvýšená absorpce tekutin ve střevě díky hesperidinu.[51]

Hesperidin je také zkoumán v souvislosti s karcinogenesí. Antikarcinogenní efekt byl prokázán v různých studiích proti rozdílně indukovaným karcinogenesím.[52-54] Hesperidin je také prokázáným antimutagenem vůči aflatoxinu B1.[55]

- RUTIN

Další důležitou látkou v boji proti kardiovaskulárním onemocněním je rutin a jeho aglykony. Jedním z nejčastějších problémů je aterosklerosa a s tím související hyperlipidemie. Quercetin účinně snižuje hladinu triglyceridů a cholesterolu v séru, čímž se redukuje i tvorba aterosklerotických plaků.[56] Tento flavonoid také pomáhá v léčbě hypertenze zapříčiněné různými stimuly. Nejen, že krevní tlak snižuje, ale navíc chrání

orgány (srdce, ledviny a cévy) před morfologickými a funkčními změnami snížením hladiny reaktivních kyslíkových radikálů. [57, 58]

Jak již bylo výše naznačeno, aglykony rutinu mají antioxidační účinky. Isoquercitrin byl nejvíce účinný při ochraně RGC-5 buněk před poškozením peroxidem vodíku. Dokonce bylo zjištěno, že je schopen vychytávat všechny druhy kyslíkových radikálů a tím redukovat vyčerpání glutationu. [59] Quercetin také zabraňuje vzniku oxidativního stresu v RPE (sítnicové pigmentové epiteliální buňky).[60, 61]

Quercetin je také prokázaným protizánětlivým činidlem. Je spolu s isoquercitrinem významnou molekulou při léčbě astmatu, jelikož potlačují eozinofilní zánět a odpověď na leukotrienem D<sub>4</sub> a karcholem indukovanou kontrakci.[62, 63] Rovněž quercetin dokáže snížit produkci oxidu dusnatého a prostaglandinu E<sub>2</sub> snížením exprese indukovatelné syntasy oxidu dusnatého.[64]

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité chemikálie

- Aceton *Sigma-Aldrich, USA*
- Agar *Oxoid, UK*
- Agarosa *Invitrogen, USA*
- Akrylamid *Sigma-Aldrich, USA*
- Amonium persulfát *Sigma-Aldrich, USA*
- Ampicilin *Serva, DE*
- Biotin *Sigma-Aldrich, USA*
- Bovine Serum Albumin (BSA) *Sigma-Aldrich, USA*
- Bromfenolová modř *Serva, DE*
- Butanol *Sigma-Aldrich, USA*
- Citrát trisodný *Sigma-Aldrich, USA*
- Coomassie Brilliant Blue R-250 *Serva, DE*
- Dimethylsulfoxin (DMSO) *Finnzymes, FIN*
- Dithiothreitol (DTT) *Sigma-Aldrich, USA*
- dNTP *Fermentas, CAN*
- Fenol *Sigma-Aldrich, USA*

- Gel-Red<sup>TM</sup> *Biotium, USA*
- Glukosa *Merck, DE*
- Guanidium thiokyanát *Sigma-Aldrich, USA*
- Hesperidin *Senn Chemical, CH*
- Isopropanol *Sigma-Aldrich, USA*
- Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalktopyranosid (IPTG) *Qiagen, DE*
- Kvasinkový extrakt *Oxoid, UK*
- Kyselina mravenčí *Merck, DE*
- Merkaptoethanol *Sigma-Aldrich, USA*
- Methanol *Lach:ner, CZ*
- *N*-laurylsarkosin sodný *Sigma-Aldrich USA*
- *N,N'*-methylen-bis-akrylamid *Serva, DE*
- *p*-Nitrofenol *Lachema, CZ*
- Pepton *Oxoid, UK*
- Primery *Generi Biotech, CZ*
- Rutin *Alchimica, CZ*
- Sodium dodecylsulfát (SDS) *Jersey Lab Supply, USA*
- Sorbitol *Sigma-Aldrich, USA*
- Tetramethylethyldiamin (TEMED) *Serva, DE*
- Tween 80 *Sigma-Aldrich, USA*
- Uhličitan sodný *Chemapol, CZ*
- Velikostní standard pro agarosovou elektroforesu *Fermentas, CAN*
- Velikostní standard pro SDS-PAGE *GE Life Sciences, USA*
- Vzorovací pufr pro agarosovou elektroforesu *Fermentas, CAN*
- X-Gal *Qiagen, DE*
- YNB (Yeast Nitrogen Base) *Sigma-Aldrich, USA*
- Zeocin *Invitrogen, USA*

#### **4.2. Komerční enzymy**

- *EcoRI* *New England Biolabs, USA*
- *Endo<sub>Hf</sub>* *New England Biolabs, USA*
- *KpnI* *New England Biolabs, USA*

- *NotI* *New England Biolabs, USA*
- *PmeI* *New England Biolabs, USA*
- SuperScript III Reverse Transcriptase *Invitrogen, USA*
- *Taq* DNA polymerasa *Fermentas, CAN*
- T4 DNA ligasa *New England Biolabs, USA*
- Zymolyasa *Invitrogen, USA*

### 4.3. Fungální a bakteriální kultury

- *Aspergillus niger* K2 *MBÚ, CZ*
- *Escherichia coli* JM109 *Promega, USA*
- *Escherichia coli* TOP10 *Invitrogen, USA*
- *Pichia pastoris* KM71H *Invitrogen, USA*
- *Candida pseudotropicalis* 652/2 *VŠCHT, CZ*
- *Pichia fermentans* 334/1 *VUKP, CZ*
- *Rhodotorula aurantiaca* 812/3 *VŠCHT, CZ*
- *Saccharomyces cerevisiae* 321/1 *VŠCHT, CZ*
- *Saccharomycopsis lipolytica* 293/4 *CCY 292634*
- *Schizosaccharomyces japonicus var. versatilis* 2231 *CCY 4431*
- *Torula major* 51 *VŠCHT, CZ*
- *Trichosporon fermentans* *CBS 529*

### 4.4. Použité plasmidy

- pGEM-T Easy Vector Systém *Promega, USA*
- pPICZ $\alpha$  A *Invitrogen, USA*

### 4.5. Komerční sady

- Genopure Plasmid Midi Kit *Roche, USA*
- High Pure Plasmid Isolation Kitu *Roche, USA*
- JetQuick Gel Extraction Spin Kit *Genomed, DE*
- Oligotex mRNA Midi Kit *Qiagen, DE*
- PCR Product Purification Kit *Roche, USA*



## 4.6. Přístroje

- Analytické váhy *Precisa, CH*
- Automatické pipety Eppendorf *Eppendorf, DE*
- Biohazard flow box – JOUNAN MSC 9 *Jounan–Bio Omega, FR*
- Centrifuga *Labnet, CZ*
- Centrifuga – Beckman J2–21 *Beckman Instruments. Inc., USA*
- Elektroporátor *Bio-Rad, DE*
- Horkovzdušná pistole *Steinel, DE*
- Magnetická míchačka *Laboratorní přístroje Praha, CZ*
- Mikrocentrifuga *Eppendorf, DE*
- PCR Thermocycler *Biometra, DE*
- Předvážky HF1200G *A&D, USA*
- Souprava pro elektroforézu *Bio-Rad, DE*
- Spektrofotometr – Shimadzu UV–1202 *Schimadzu, JP*
- Thermobox *IKA Werke, DE*
- Thermomixer Comfort *Eppendorf, DE*
- Třepačka Lab–Shaker *Adolf Kuhner AG, DE*
- Třepačka – IKA KS400 i control *Schoeller*
- Ultrafiltrační jednotka –Amicon Ultra 4 *Millipore, USA*
- Vortex – IKA–VERK VF 2 *Janke&Kunkel, DE*

## 4.7. Média a roztoky

- AKRYLAMIDOVÁ SMĚS PRO SDS-PAGE  
29% akrylamid, 1% *N,N'*-methylen-bis-akrylamid
- BARVÍCÍ ROZTOK PRO SDS PAGE  
45% metanol, 10% kyselina octová, 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250
- *BREAKING BUFFER*  
50mM fosforečnan sodný (pH=7,4), 1mM fenylmetylsulfonyl fluorid, 1mM EDTA,  
5% glycerol
- ELEKTRODOVÝ PUFER PRO SDS-PAGE  
25mM Tris, 250mM glycin, 0,1% SDS, pH=8,3

- ODBARVOVACÍ ROZTOK PRO SDS-PAGE  
35% ethanol, 10% kyselina octová
- ROZTOK D  
0,36 ml  $\beta$ -merkaptetoetanolu na 50 ml roztoku GTC
- ROZTOK GTC  
100 g guanidium thiokyanátu, 7 ml 0,75M citrátu trisodného, pH=7, 10,6 ml 10% *N*-laurylsarkosinu sodného, doplněno na 220 ml vodou, klávkováno, před použitím přidáno 1,6 ml merkaptetoethanolu
- ROZTOK SCED  
1M sorbitol, 10mM citrát sodný (pH=7,5), 10mM kyselina dietyltetraaminoctová, 10mM dithiotreitol
- TAE  
40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA, pH=8,0
- VZORKOVACÍ PUFER PRO SDS-PAGE  
50mM Tris, pH=6,8, 10% glycerol, 2% SDS, 0,1% bromfenolová modř, 100mM dithiothreitol
- BGCY MÉDIUM (*Buffered Glycerol Complex Medium*)  
1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, 100mM fosfát draselný, pH=6,0, 1,34% YNB (Yeast Nitrogen Base),  $4 \cdot 10^{-5}$ % biotin, 1% glycerol
- BMGY MÉDIUM (*Buffered Glycerol Minimal Medium*)  
100mM fosfát draselný, pH=6,0, 1,34% YNB (Yeast Nitrogen Base),  $4 \cdot 10^{-5}$ % biotin, 1% glycerol
- BMCY MÉDIUM (*Buffered Methanol Complex Medium*)  
1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, 100mM fosfát draselný, pH=6,0, 1,34% YNB (Yeast Nitrogen Base),  $4 \cdot 10^{-5}$ % biotin, 0,5% metanol
- BMMY MÉDIUM (*Buffered Methanol Minimal Medium*)  
100mM fosfát draselný, pH=6,0, 1,34% YNB (Yeast Nitrogen Base),  $4 \cdot 10^{-5}$ % biotin, 0,5% metanol
- LB MÉDIUM (*Luria-Bertani medium*)  
10 g/l tryptonu, 5 g/l kvasinkového extraktu, 5 g/l chloridu sodného
- LB AGAR (*Luria-Bartani agar*)  
10 g/l tryptonu, 5 g/l kvasinkového extraktu, 5 g/l chloridu sodného, 15 g/l agaru

- VISHNIAC ROZTOK (*Trace Metal Solution*)  
50,0 g etylendiamintetraoctové kyseliny, 22,0 g heptahydrátu síranu zinečnatého, 5,54 g chloridu vápenatého, 5,06 g tetrahydrátu chloridu manganatého, 4,99 g heptahydrátu síranu železnatého, 1,10 g tetrahydrátu molybdenanu hexaamonného, 1,57 g pentahydrátu síranu měďnatého, 1,61 g hexahydrátu chloridu kobaltnatého, 1000 ml destilované vody, nakonec upraveno pH pomocí hydroxidu draselného na pH=6,0
- YPD MÉDIUM  
1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, 2% glukosa
- YPD AGAR  
1% kvasinkový extrakt, 2% pepton, 2% glukosa, 2% agar

## 4.8. Metody

### 4.8.1. Kultivace *Aspergillus niger*

*Aspergillus niger* K2 byl zaočkován ve formě suspenze v 0,1% roztoku TWEENU 80 do připraveného média obsahujícího: 5,0 g/l rutinu, 15 g/l dihydrogenfosforečnanu draselného, 4,0 g/l chloridu amonného, 0,5 g/l chloridu draselného, 5,0 g/l kvasinkového extraktu, 1,0 g/l kaseinového hydrolyzátu a 1 ml Vishnijac roztoku. Po sterilizaci bylo přidáno do každé baňky (200 ml média) 1,0 ml sterilního 10% heptahydrátu síranu hořečnatého. Kultivace probíhala při 28 °C a 250 rpm 5 dní.

### 4.8.2. Purifikace $\beta$ -rutinosidasy z *Aspergillus niger*

Kultivační médium bylo filtrováno přes azbestocelulozový filtr. Filtrát byl poté 24 hodin dialyzován proti 10 mM acetátovému pufru, pH=3,6. Vzorek byl poté nanesen na Fractogel kolonu, která byla předem ekvilibrována acetátovým pufrem, pH=3,6, eluován byl lineárním gradientem chloridu sodného (od 0M do 0,5M) rychlostí 5 ml/min. Pomocí TLC (viz 4.8.23) bylo zjištěno ve kterých frakcích je přítomna aktivní  $\beta$ -rutinosidasa. Tyto frakce byly koncentrovány na celulózové membráně s propustností pod 10 kDA a následně naneseny na Superdex 200 kolonu. Mobilní fáze obsahovala 25mM piperazinový pufr, 150mM chlorid sodný, pH=5,5. Ve frakcích byla opět zjišťována aktivita pomocí TLC. Posledním krokem purifikace byla chromatofokusace na Mono P 5/200 GL koloně. Kolona

byla ekvilibrována 25mM piperazinovým pufrům a 3,0ml pregradientem elučního pufru Polybuffer 74, pH=4,0.

#### **4.8.3. MALDI TOF/TOF analýza a návrh primerů**

*Aspergillus niger* byl vybrán jako jeden z producentů  $\beta$ -rutosidasy i díky tomu, že je znám jeho genom. Po kultivaci *A. niger* K2 a následné purifikaci  $\beta$ -rutosidasy, byl protein odeslán k MALDI-TOF/TOF analýze do Laboratoře charakterizace molekulární struktury (Ing. Petr Halada, PhD.) na Mikrobiologickém ústavu AVČR.

#### **4.8.4. Izolace RNA**

Mycelium *Aspergillus niger* K2 z kultivačního média bylo zfiltrováno přes filtr a následně přeneseno špachtlí na misku a zalito tekutým dusíkem. Buňky byly dále drceny tloučkem za stálého přilévání dusíku, aby nerozmrzly. Poté byly přendány do kónické zkumavky s reagentem – 10 ml roztoku D, 10 ml fenolu, 1 ml 2M octanu sodného (pH=4,1) a 2 ml směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 49:1. Zkumavka byla řádně promíchána, po 10 s třepána a poté 15 minut ponechána na ledu. Následně byla 20 minut centrifugována při 4500 rpm a 4°C. Vodná fáze byla odebrána do nové kónické zkumavky, bylo přidáno 10 ml 2-propanolu. Zkumavka byla po 1 hodině při -20°C centrifugována (4500 rpm, 4°C, 20 minut). Byla odebrána horní vrstva a pelet byl rozpuštěn v 3 ml roztoku D a 3 ml isopropanolu. Po 2 hodinách při -20°C proběhla centrifugace (4500 rpm, 4°C, 15 minut), opět byla odebrána horní vrstva a pelet resuspendován v 1 ml 75% etanolu. Směs byla centrifugována za stejných podmínek, byl odebrán supernatant a pelet byl sušen 10 minut. Následně byl rozpuštěn v sterilní vodě a uskladněn při -80°C.

Vše probíhalo za sterilních podmínek, pracovní prostor byl průběžně čištěn roztokem RNase off a práce byla prováděna v rukavicích také ošetřených roztokem RNase off.

#### **4.8.5. Izolace mRNA a následná reverzní transkripce**

mRNA byla izolována z celkové RNA za použití Oligotex mRNA Midi Kitu. Ihned po izolaci byla mRNA použita k reverzní transkripci - 12 $\mu$ l mRNA, 1  $\mu$ l oligo(dT)<sub>20</sub> a 1  $\mu$ l dNTP. Směs byla po 5 minutách při 65°C dána na 1 minutu na led. Následně byly do

směsi pipetovány 4  $\mu$ l pufru (First strand buffer), 1  $\mu$ l dithiotreitolu a 1  $\mu$ l reverzní transkriptázy SuperScript® III Reverse Transcriptase. Reakce probíhala 5 minut při 25°C, poté 1 hodinu při 50°C a byla ukončena 15 minutami při 70°C. cDNA byla uskladněna v mrazáku při -80°C.

#### 4.8.6. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Do zkumavky bylo pipetováno 40  $\mu$ l sterilní vody, 5  $\mu$ l pufru, 1  $\mu$ l forward primeru, 1  $\mu$ l reverse primeru, 1  $\mu$ l DTP, 1  $\mu$ l cDNA a 1  $\mu$ l Taq polymerasy. Primery jsou popsány v 4.8.3. Program byl nastaven dle tabulky 3.

Tab. 3| Podmínky PCR

| počet cyklů | teplota [°C] | čas [s] |
|-------------|--------------|---------|
| 1           | 95           | 60      |
| 30          | 95           | 30      |
|             | 45           | 30      |
|             | 68           | 150     |
| 1           | 70           | 300     |

#### 4.8.7. Preparace z agarózového gelu

Pruhy viditelné na gelu byly vyřezány špachtlí omytou etanolem a přendány do eppendorf zkumavek, gel byl zvážen a poté bylo pokračováno dle Jet Quick Gel Extraction kitu.

#### 4.8.8. Restrikční reakce

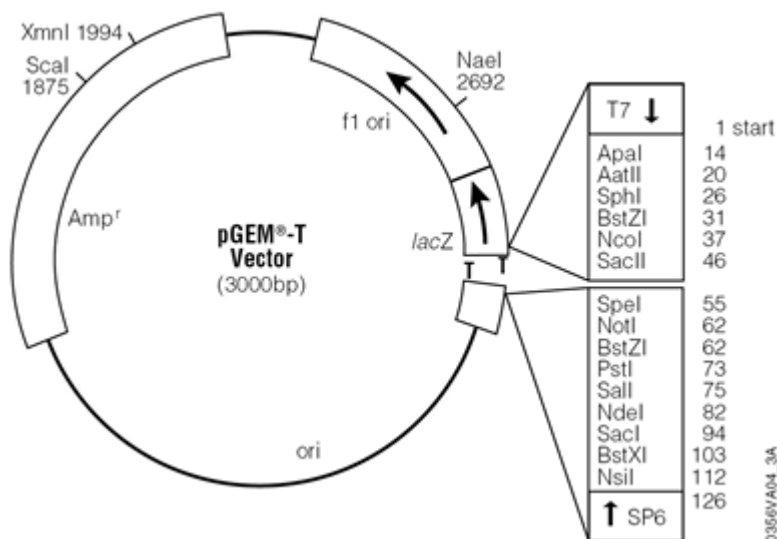
Izolovaná DNA z gelu byla štěpena pomocí restriktas *KpnI* a *EcoRI* při 37°C 24 hodin. Směs obsahovala 27  $\mu$ l PCR produktu, 3  $\mu$ l vody, 1  $\mu$ l BSA, 4  $\mu$ l pufru, 2,5  $\mu$ l *KpnI* a 2,5  $\mu$ l *EcoRI*.

#### 4.8.9. Přechištění DNA

DNA byla přechištěna pomocí Gene Jet PCR purification Kitu.

#### 4.8.10. Ligace do klonovacího vektoru

PCR produkt byl ligován do klonovacího vektoru PGEM-T-Easy. Byly pipetovány 3  $\mu$ l PCR produktu, 1  $\mu$ l vektoru PGEM-T-Easy (obr. 17, str. 38), 5  $\mu$ l pufru (2x konc.) a 1  $\mu$ l T4 DNA ligasy.



Obr. 17|Schéma vektoru PGEM-T-Easy [65]

#### 4.8.11. Transformace klonovacím vektorem

Kompetentní buňky *Escherichia coli* TOP 10 byly rozmrazeny na ledu a bylo k nim přidáno 10  $\mu$ l ligační směsi. Reakce byla ponechána 20 minut na ledu, poté následoval tepelný šok (2 minuty při 42°C) a okamžitě byla vrácena zpět na led a byl přidán 1 ml LB. Buňky byly po regeneraci 1,5 hodiny při 37°C a 300 rpm centrifugovány 10 minut (6000 rpm). 0,5 ml LB média bylo odebráno a resuspendované buňky byly rozetřeny na misky s LB agarem ve 4 koncentracích (50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 150  $\mu$ l a 200  $\mu$ l) a ponechány do 2. dne při 37°C. Na 100 ml LB agaru bylo do média přidáno 100  $\mu$ l ampicilinu (zásobní roztok: 150 mg/ml), 250  $\mu$ l X-Gal (zásobní roztok: 40 mg/ml v DMSO) a 100  $\mu$ l 0,5M IPTG. Bylo vybráno 10 bílých kolonií, které byly přeočkovány do kónických zkumavek s 6 ml tekutého LB a 6  $\mu$ l ampicilinu (noční kultura).

#### 4.8.12. Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla izolována z noční kultury. 1 ml z kultury byl odebrán a centrifugován 10 minut (13500 rpm). Médium bylo zcela odstraněno a pelet byl resuspendován v 30  $\mu$ l roztoku Easy prep (10mM Tris, 1mM EDTA, 150 mg/ml sacharosu, 2mg/ml lysozymu, 0,2 mg/ml RNAsy A, 0,1 mg/ml BSA) a ponechán 20 minut na ledu. Poté byl inkubován 90 s v termomixeru při 99°C, ochlazen na ledu a centrifugován 10 minut při 13500 rpm. Supernatant byl použit pro restriční analýzu.

#### **4.8.13. Restrikční analýza**

Bylo pipetováno 9  $\mu$ l supernatantu z izolace plazmidové DNA, 1  $\mu$ l pufru (10x konc.), 0,5  $\mu$ l BSA a 1  $\mu$ l endonukleasy *NotI*, pro kontrolu byla vybrána endonukleasa *EcoRI*, která nepotřebuje v reakci přítomné BSA. Reakce probíhala při 37°C 1 hod.

#### **4.8.14. Elektroforéza v agarózovém gelu**

Elektroforéza probíhala v TAE pufru a 1% agarózovém gelu. Do vzorků byly přidány fluorescenční barva GelRed (10 000x ředěná) a vzorkovací pufr (6x ředěný). Jako marker byl použit MassRuler DNA ladder Mix, do kterého byla také přidána fluorescenční barva (10 000x ředěná).

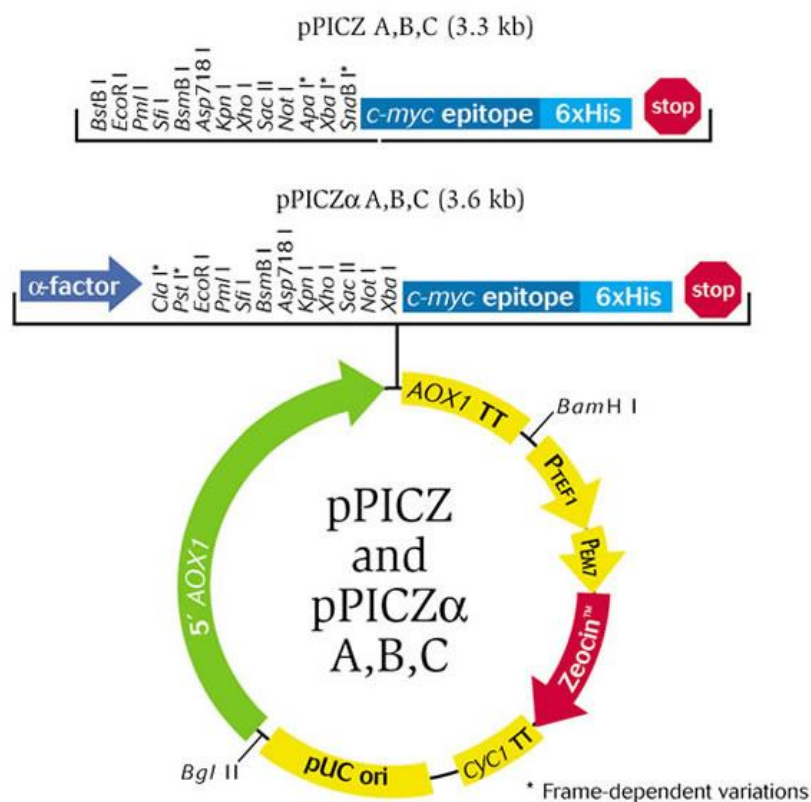
#### **4.8.15. Sekvenace**

Vzorky byly zkontrolovány kromě elektroforézou také sekvenací. Analýza proběhla ve Středisku sekvenování DNA (Dr. Jürgen Felsberg, CSc.) a záznam byl zpracován v programu Chromas Lite 2.0.

#### **4.8.16. Ligace do expresního vektoru**

Byl použit expresní vektor pPICZ $\alpha$ A (viz obr. 18, str. 40) Do reakce bylo pipetováno 0,5  $\mu$ l vektoru pPICZ $\alpha$ A, 20  $\mu$ l PCR produktu (cDNA  $\beta$ -rutinosidasy byla namnožena z klonovacího vektoru pomocí stejných primerů a za stejných podmínek jako v 4.8.6), 2  $\mu$ l pufru a 0,5  $\mu$ l T<sub>4</sub> ligasy. Reakce probíhala 2 dny při 16°C.

Figure 1 - EasySelect™ vector maps (pPICZ, pPICZ $\alpha$ )



Obr. 18| Schéma vektoru pPICZ $\alpha$ A [65]

#### 4.8.17. Transformace expresním vektorem

Postup byl stejný jako u transformace klonovacím vektorem. Jediná změna se týkala agarového media, do kterého byl přidán pouze zeocin (100  $\mu$ l/100 ml LB). 10 kolonií bylo přeočkováno do 6 ml tekutého LB s 6  $\mu$ l zeocinu (zásobní roztok 100 mg/ml) a kultivováno 24 hodin při 37°C.

#### 4.8.18. MiniPrep a MidiPrep

Izolace DNA byla provedena dle návodu k High Pure Plasmid Isolation Kitu. Bylo provedeno kontrolní štěpení (*EcoRI* a *KpnI*), které bylo ověřeno na agarózovém gelu. Pozitivní kolonie byla použita pro inokulaci 100 ml LB s 100  $\mu$ l zeocinu (zásobní roztok 100 mg/ml). Izolace proběhla dle Genopure plasmid midi kit Roche a část vzorku byla poslána na kontrolní sekvenaci.



#### 4.8.19. Měření koncentrace DNA

Koncentrace byla měřena spektrofotometricky při  $\lambda=260$  nm. Vzorek byl 250x ředěn destilovanou vodou a pro výpočet koncentrace bylo použito vzorce:

$$C_{\text{DNA}} = A \cdot \text{ředění} \cdot 50/1000 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

#### 4.8.20. Příprava konstruktů na elektroporaci

Vzorek DNA byl po kontrolní sekvenaci linearizován *PmeI* restriktaasou (10  $\mu\text{l}$  vzorku (1,9  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  *PmeI*, 15  $\mu\text{l}$  vody, 3  $\mu\text{l}$  pufru NEB4 a 1  $\mu\text{l}$  BSA). Průběh reakce byl ověřen na agarózovém gelu a následně byl linearizovaný konstrukt přečištěn fenolchloroformovou extrakcí:

Ke vzorku bylo přidáno stejné množství zásaditého fenolu, směs byla protřepána a poté centrifugována 15 minut při 13500rpm. Do nové zkumavky byla odebrána horní vrstva a k ní bylo přidáno stejné množství směsi chloroform/isoamylalkohol (v poměru 24:1). Opět bylo vše protřepáno, centrifugováno (stejně podmínky) a odebrána horní vrstva. K té byla pipetována 1/10 objemu 3M octanu sodného a 2,5 objemu 100% etanolu. Směs byla ponechána v mrazáku ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) po 30 minut, poté byla centrifugována ve vychlazené centrifuze (stejně podmínky). Byl odebrán supernatant a pelet byl omyt 70% etanolem. Opět byla směs centrifugována a odebrán etanol. Po 20 minutách sušení byl pelet rozpuštěn v 10  $\mu\text{l}$  sterilní vody.

#### 4.8.21. Elektroporace

50 ml YPD media bylo inokulováno 20  $\mu\text{l}$  *P.pastoris* KM71H z kryokonzervy, kultivace probíhala při  $28^{\circ}\text{C}$  24 hodin. Z noční kultury byl odebrán potřebný počet buněk – tj.  $10^9$  buněk/ml (předpokladem je, že  $\text{OD}=1$  odpovídá  $5 \times 10^7$  buněk/ml). Medium bylo centrifugováno (1500 rpm, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Byla odebrána horní vrstva a pelet byl resuspendován v 50 ml ledové sterilní vody. Proběhla centrifugace za stejných podmínek a pelet byl resuspendován v 25 ml ledové sterilní vody. Následovala opět centrifugace a resuspendování v 2 ml ledového sterilního 1M sorbitolu. Buňky byly naposledy centrifugovány a resuspendovány v 1 ml ledového sterilního 1M sorbitolu.

K linearizovanému expresnímu konstruktu (5-10  $\mu\text{g}$ ) bylo přidáno 80  $\mu\text{l}$  buněk *P.pastoris*. Směs byla přenesena do předem vychlazené elektroporační kyvety a 5 minut ponechána na ledu. Poté byl vyslán do kyvety pulz dle programu *Pichia*. Okamžitě po

pulzu byl přidán 1ml ledového sterilního 1M sorbitolu a směs přenesena do 15ml kónické zkumavky. Následovala inkubace při 28 °C po dobu 1,5 hodiny. Poté bylo na misky s YPD agarem a zeocinem (100 µg/ml) rozetřeno 20, 50, 100 a 150 µl transformované kultury. Inkubace probíhala 2-3 dny při 28°C.

#### **4.8.22. Exprese rekombinantní $\beta$ -rutinosidasy**

Vybrané kolonie narostlé na miskách byly inokulovány do 100 ml BMGY (nebo BCGY) média a inkubovány do druhého dne při 28°C a 220 rpm. Následně bylo medium centrifugováno 10 minut (3000 rpm) a buňky resuspendovány do 30 ml BMMY (nebo BCMY) média. Kultivace probíhala při 28°C a 220 rpm. Každý den byl do média přidáván metanol tak, aby byla výsledná koncentrace 0,5%. V odebraných vzorcích byla měřena aktivita a byly analyzovány SDS-PAGE.

#### **4.8.23. Měření aktivity $\beta$ -rutinosidasy**

$\beta$ -Rutinosidasová aktivita byla detekována 2 způsoby. Reakcí vzorku (200 µl) s butanolem (50 µl) a 150mM rutinem v DMSO/citrát-fosfát pufru (100 µl) a následnou detekcí tenkovrstevnou chromatografií. Jako mobilní fáze byla použita směs aceton/voda/kyselina mravenčí v poměru 15/0,5/0,5.

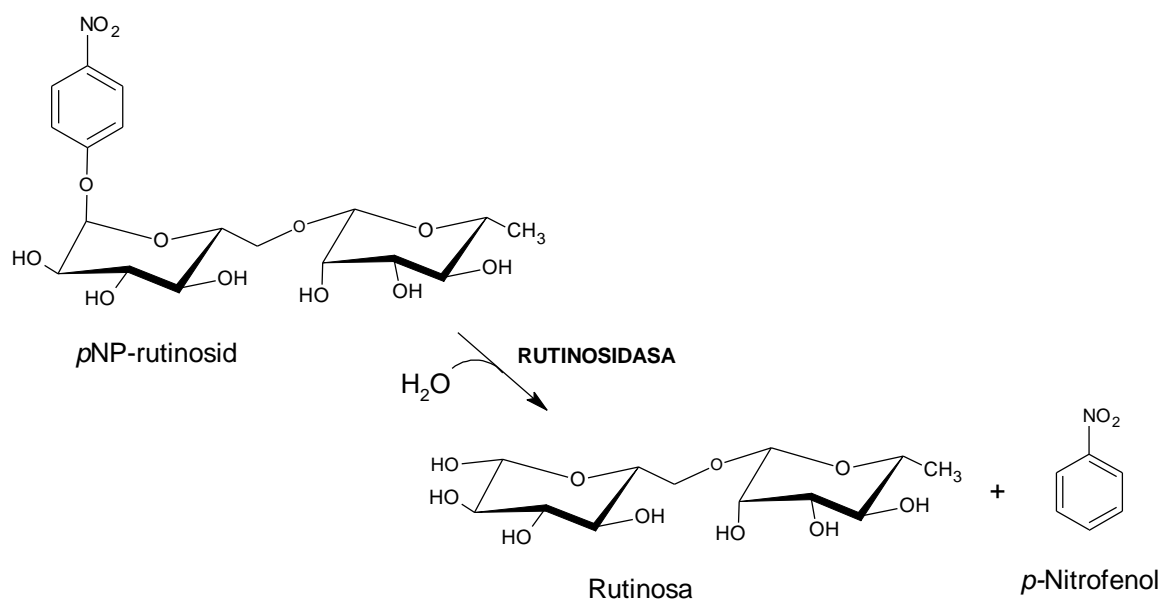
Jako druhého způsobu bylo využito spektrofotometrické detekce za použití chromogenního substrátu *p*-nitrofenyl- $\beta$ -rutinosidu (obr. 19, str. 43). Koncentrace *p*-nitrofenolu byla přímo úměrná měřené absorbanci, a to v jeho absorpčním maximu (420 nm). Kalibrační křivka závislosti absorbance *p*-nitrofenolu na jeho koncentraci (0 - 2 mM) při 420 nm byla použita na výpočet aktivity enzymu.

Reakční směs obsahovala 30 µl enzymového roztoku, 10 µl pufru (50mM citrát-fosfát pufr, pH=5) a 10 µl substrátu. Slepý vzorek byl připraven ze 40 µl pufru a 10 µl 10mM *p*-nitrofenyl- $\beta$ -rutinopyranosidu (substrát). Reakce probíhala 10 minut při 35 °C a 900 rpm. Poté byla zastavena přidáním 1 ml 0,1M uhličitanu sodného a změřena spektrofotometrem proti slepému vzorku.

$$a = \frac{A}{k} \cdot \frac{V_{vz}}{(V_{celk} \cdot t)} \cdot f$$

- a koncentrace katalytické aktivity enzymu (U/ml)
- A absorbance roztoku při 420 nm
- k kalibrační konstanta
- $V_{vz}$  objem vzorku (ml)
- $V_{celk}$  celkový objem roztoku (ml)
- t doba reakce (min)
- f faktor zředění

Koncentrace katalytické aktivity enzymu je definována jako aktivita enzymu vztážená na jednotku objemu. Jednotkou aktivity enzymu je unit (U), který odpovídá množství enzymu, které přemění 1  $\mu$ mol substrátu za 1 minutu za definovaných podmínek.



Obr. 19| Schéma hydrolýzy *p*NP-rutinosidu

#### **4.8.24. Stanovení proteinů dle Bradfordové**

Koncentrace proteinů byla měřena dle Bradfordové [66] v plastových kyvetách spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm. Pomocí roztoků BSA o známé koncentraci v rozmezí 0,01 - 0,5 mg/ml byla vytvořena kalibrační křivka. Pro měření byla pipetována směs 100 µl vzorku a 1 ml činidla, která byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě a následně byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Slepé vzorky byly připraveny smícháním 100 µl destilované vody a 1 ml činidla.

#### **4.8.25. SDS-PAGE**

8% Gely, které byly převrstveny 5% zaostřovacím gelem, byly připraveny dle laboratorního návodu.[67] Vzorky byly naředěny vzorkovým redukcujícím pufrem obarveným bromfenolovou modří a poté byly 3 minuty povařeny. Podmínky pro elektroforézu byly 15-25 mA na jeden gel a 8-13 V na 1 cm gelu. Po ukončení elektroforézy byly gely barveny 30 minut v barvicím roztoku obsahujícím Coomassie Brilliant Blue R-250. Následně byly gely odbarveny odbarvovacím roztokem a uchovávány v 1% kyselině octové.

#### **4.8.26. Lýze buněk**

Rekombinantní buňky *P.pastoris* byly centrifugovány při 5000 rpm 15 minut. Médium bylo odstraněno, buňky byly resuspendovány v 10 ml *Breaking buffer* a opět centrifugovány za stejných podmínek. Horní vrstva byla opět odstraněna, buňky resuspendovány v 10 ml *Breaking buffer* a byly přidány 2 µl zymolyasy. Směs byla 1 hodinu kultivována při 37°C, poté byla rozdělena po 4 ml do 50ml zkumavek. Do každé zkumavky byla přidána lžička skleněných kuliček. Následovalo osmkrát 30 s vortexování s 30 s pauzy na ledu.

#### **4.8.27. Izolace celkové DNA z *P.pastoris***

Kultura rekombinantní *P.pastoris* byla kultivována v 10 ml BMGY médiu při 28°C přes noc. Kultura byla centrifugována při 1500 rpm 10 minut. Médium bylo odstraněno a buňky resuspendovány v 10 ml vody, opět proběhla centrifugace za stejných podmínek. Buňky byly resuspendovány v 2 ml SCED pufru, byly přidány 3 µl zymolyasy a směs byla inkubována 50 minut při 37°C. Poté byly přidány 2 ml 1% SDS, směs byla opatrně promíchána a ponechána na ledu 5 minut. Pak bylo přidáno 1,5 ml 5M octanu draselného a opatrně vše promícháno. Následovala centrifugace 20 minut při 8000 rpm a 4°C.

K supernatantu byly přidány 2 objemy etanolu a směs byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě. Poté proběhla centrifugace 20 minut při 8000 rpm a 4°C. Pelet byl opatrně resuspendován v 0,7 ml TE pufru a směs byla přenesena do mikrozkušavky. Poté byl přidán stejný objem směsi fenol/chloroform (1/1), proběhla centrifugace 13500 rpm, 15 minut, horní vrstva byla odebrána do nové mikrozkušavky a byl k ní přidán stejný objem směsi chloroform/isoamylalkohol (24/1). Následovala centrifugace za stejných podmínek a horní vrstva byla rozdělena a přenesena do 2 zkumavek, do kterých bylo přidáno 0,5 objemu 7,5M octanu amonného a 2 objemy etanolu. Směs byla ponechána při -20°C 1 hodinu. Poté byla centrifugována při 10000 rpm 20 minut. Pelet byl omyt 1 ml 70% etanolu, sušen a v 1. zkumavce resuspendován v 50 µl TE pufru. Tato směs byla přenesena do 2. zkumavky a v ní byl resuspendován i 2. pelet. Vzorky byly uchovány při -20°C.

Ve vzorcích byla změřena koncentrace DNA (viz 4.8.19)

#### 4.8.28. PCR analýza genomu *Pichii*

PCR reakce byla pipetována dle tabulky 4. Termocykler byl nastaven dle tabulky 5 a 6 (str. 46).

Tab. 4 | Složení směsi pro PCR

|                      | 1 a 2   | 3       |
|----------------------|---------|---------|
| Pufr                 | 5 µl    | 5 µl    |
| DNA                  | 0,5 µl  | 0,25 µl |
| DTP                  | 2,5 µl  | 2,5 µl  |
| forward primer       | 1 µl    | 1 µl    |
| reverse primer       | 1 µl    | 1 µl    |
| Voda                 | 37 µl   | 40 µl   |
| chlorid hořečnatý    | 3 µl    | -       |
| Taq polymerasa       | 0,25 µl | -       |
| Advantage polymerasa | -       | 0,5 µl  |

Tab. 5|Podmínky PCR pro složení 1 (teplota nasednutí primerů je 55°C) a 2 (50°C)

| počet cyklů | teplota [°C] | čas [s] |
|-------------|--------------|---------|
| 1           | 94           | 120     |
| 25          | 94           | 60      |
|             | 55/50        | 60      |
| 1           | 72           | 60      |
|             | 72           | 420     |

Tab. 6|Podmínky PCR pro složení 3

| počet cyklů | teplota [°C] | čas [s] |
|-------------|--------------|---------|
| 1           | 95           | 60      |
| 25          | 95           | 30      |
|             | 50           | 30      |
| 1           | 68           | 150     |
|             | 70           | 300     |

#### 4.8.29. Western Blot

Gel po SDS-PAGE nebyl barven, ale uchován v 1% kyselině octové. PVDF membrána byla na 5-10 minut ponořena do metanolu kvůli její aktivaci. Bylo nastříháno 12 filtračních papírů s velikostí o 1cm větší na výšku i šířku než gel. Gel i filtrační papíry byly ponořeny do *SDS running* pufru na 5-10 minut. Poté bylo 6 filtračních papírů vloženo opatrně po jednom na blot, na ně byla položena membrána, na ní gel a opět následovalo 6 filtračních papírů. Byl nastaven proud tak, že 0,8 mA odpovídalo 1 cm<sup>2</sup> a blotování probíhalo 1-1,5 hodiny. Poté byla membrána dána do barvicího roztoku na max. 2 minuty. Následovalo odbarvení v odbarvovacím roztoku a sušení mezi kousky filtračního papíru.

#### 4.8.30. Dialýza

Dialyzační trubice byla před použitím povařena 10 minut v destilované vodě. Poté bylo naplněno roztokem a na obou koncích uzavřeno svorkami. Dialýza proběhla proti 10mM acetátovému pufru, pH=3,6.

#### 4.8.31. Ionexová chromatografie

Pro ionexovou chromatografii byl použit kapalinový chromatograf ÄKTAprime™ plus. Stacionární fázi byl měnič kationtů (Fractogel), pufr A

(10mM acetátový pufr, pH=3,6) a B (10mM acetátový pufr, pH=3,6 s 1M chloridem sodným) byly použity jako mobilní fáze pro ionexovou chromatografii. Všechny roztoky byly před použitím filtrovány přes nylonovou membránu Whatman (0,45  $\mu$ m) na vakuovém filtračním zařízení.

Limitní tlak byl pro kolonu Fractogel 0,35 MPa, po jeho nastavení byl celý systém promyt nejprve redestilovanou vodou, poté 1M hydroxidem sodným, opět redestilovanou vodou, 1M chloridem sodným a nakonec redestilovanou vodou. Promývání vždy trvalo do ustálení konduktivity. Po promytí byl do systému asi na 2 minuty přiveden pufr B a poté byl systém promyt pufrům A. Po ekvilibraci kolony pufrům A byl nanesen vzorek rychlostí 10 ml/min. Vzorek byl předem naředěn tak, aby jeho konduktivita nebyla vyšší než 7 mS/m. Po promytí kolony pufrům A rychlostí 8 ml/min, byl spuštěn 100ml lineární gradient do konečné 100 % koncentrace pufru B, rychlost průtoku byla snížena na 5 ml/min.

Detekce proteinů proběhla UV detektorem při vlnové délce 280 nm a změny mobilní fáze byly sledovány vodivostním detektorem. Eluované frakce byly testovány na  $\beta$ -rutosidasovou aktivitu tenkovrstvou chromatografií (viz 4.8.23).

#### **4.8.32. Gelová filtrace**

Koncentrované frakce po ionexové chromatografii byly nanесeny na kolonu Superdex 200 pro gelovou filtraci. Mobilní fází byl 50mM acetátový pufr s 150mM chloridem sodným, pH=5,0. Na FPLC systém byla připojena kolona Superdex 200, byl nastaven limitní tlak 1,4 MPa a průtok 0,3 ml/min. Chromatografický systém byl promyt redestilovanou vodou, poté pufrům pro gelovou filtraci a následně byl nanесen koncentrovaný vzorek (500  $\mu$ l). Všechny roztoky byly přefiltrovány přes nylonovou membránu Whatman (0,45  $\mu$ m).

Proteiny byly detekovány UV detektorem při vlnové délce 280 nm a změny mobilní fáze byly sledovány vodivostním detektorem

#### **4.8.33. Screening kvasinek na produkci $\beta$ -rutosidasy**

Byly připraveny 4 druhy medií. Ve všech bylo na 100 ml media obsaženo 10 ml YNB, 10 ml 1M draselno-fosfátového pufru, 20  $\mu$ l biotinu a zdrojem uhlíku bylo

5 ml 10% glycerolu. Lišily se pouze použitým induktorem. Indukováno bylo 0,5 g rutinu, nebo hesperidinu (na 100 ml média).

Ze šikmých agarů sbírky MBÚ AVČR byly do těchto medií naočkovány tyto kmeny:

- *Candida pseudotropicalis*
- *Hansenula anomala*
- *Pichia fermentans*
- *Rhodotorula aurantiaca*
- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Saccharomyces lipolytica*
- *Saccharomycopsis lipolytica*
- *Schizosaccharomyces japonicus var.versatilis*
- *Torula major 51*
- *Trichosporon fermentans*

Poté byly buňky inkubovány v baňkách na třepačce při 28°C a po dobu 14 dní bylo odebíráno 0,5 ml média na reakci s butanolem (analýza aktivity tenkovrstevnou chromatografií – viz 4.8.23.).

#### **4.8.34. Stanovení biochemických charakteristik rekombinantní $\beta$ -rutinosidasy**

Teplotní optimum bylo měřeno v rozmezí teplot 25 – 85 °C, při pH=3,0, v 50mM citrát-fosfátovém pufru. pH optimum v rozmezí 2,0 - 7,5, V rozmezí 2,0 až 3,0 byl použit glycin-hydrochloridový pufr, v rozmezí 3,0 až 7,5 Britton-Robinsonův pufr. Obě reakce byly měřeny spektrofotometricky – viz 4.8.23.

Velikost rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasy byla odečtena z gelu SDS-PAGE. Jelikož byla předpokládána glykosylace enzymu, byla  $\beta$ -rutinosidasa deglykosylována pomocí *EndoH* 24 hodin při 37 °C a 800 rpm. Rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasa byla nejdříve přepufrována do komerčního pufru G5 (0,5 ml enzymu na 3,5 ml pufru), poté bylo pipetováno 600  $\mu$ l vzorku a 10  $\mu$ l *EndoH*.



## 5. Výsledky

### 5.1. MALDI TOF/TOF analýza $\beta$ -rutinosidasy, návrh primerů a amplifikace

Purifikovaná  $\beta$ -rutinosidasa z *A.niger* K2 byla odeslána k MALDI TOF/TOF analýze, kde byly zjištěny některé peptidové úseky aminokyselinové sekvence. Primery (viz obr. 20) byly odvozené ze sekvence hypotetického proteinu v genomu *A. niger* 513.88 (NCBI Reference Sequence: XM\_001392191.2)

FW: 5'-CCGAATTCCGGGCCCCCCTAGCCAGCCCCCAAAC-3'

RE: 5'-CGGGGTACCCCGTCAATTGAAATACCCCTCGTCAATAAACG-3'

Obr. 20| Primery s vyznačenými restrikčními místy pro *EcoRI* a *KpnI*.

### 5.2. Ligace do klonovacího vektoru a následná transformace

Produkt amplifikace byl klonován do klonovacího vektoru pGEM-T Easy. Úspěšnost ligace a následné transformace byla ověřena restrikční analýzou. Izolované konstrukty byly poslány na sekvenaci. Sekvence odpovídala genu pro  $\beta$ -rutinosidasu (viz obr. 21).

```
GAATTCCGGGCCCCCCTAGCCAGCCCCCAAACGCCCCCCTAGCCAGCCCCC  
AAACTCTTCTACATCGACTGGCGCACCTTCAAAGGCAACGGCGTCAACCTCG  
GCGGCTGGCTCGAGCAAGAATCGACAATAGACAGTCTATTCTGGGATAAATAT  
TCTGGCGGCGCCTCAGACGAATGGGGCCTCTGCGAACATCTAGGCTCACAATG  
CGGCCCGTTCCTCGAGCACCGCTACGCAACCTGGATCACCAGGCCGACATTG  
ACAAGCTCGCCTCCGGCGGTATCACAGTCTGCGCATCCCCACCACCTATGCC  
GCATGGATCGATCTCCCCAGCTCGCAGCTCTACTCGGGAAACCAAACGGCCTA  
CCTCAAAGAAATCGCCGACTACGCCATCAAGACTTACAACATGCACATCATCA  
TCGACACGCACTCCCTCCCCGGCGGCGTCAACGGCCTGACCATCGGCGAAGCC  
ACCGGCCACTGGTACTGGTTCTACAACGAGACCAACTTCAACTACTCCATGCA  
AGTGATCGATCAAGTCATCAACTTCATCAAACCTCGGGATCCCCGCAATCCT  
ACACCCTCGAGCCCATCAACGAACCCGCCGACAACAACACCAACATGGTTCGTC  
TTCGGCACGCCCCTCGCCCTGACGGACCACGGCGCCGCTGGGTCTCAAGTA  
CATCCGGGCTGTGGTTCAACGGGTCGAATCGGTGAACCCCAACATCCCCGTCA  
TGTTCCAGGGTAGTTTCAAGTACCCGCAGTACTGGGAGGGTGACTTCCCCGCC  
AGTACGAACCTCGTCTTCGACACGCATCATTATTACTACGAGCATATGGATTCC  
TCGTCCGAGAATCTGCCCGAGTATATTCTTGCGGATGCGCGGGAGAAGTCGGG  
CACGGGCAAGTTCCTCCGTGTTTGTGGGCGAATGGGCAATCCAGGCCGACGTATA  
ATAATACGTTGGCGCTGCGGAAGAGGAATGTGTTGGCGGGGTTGGAGACTTGG  
AGCAGTTTTTCGCAGGGGAGTCCGTATTGGACGGCGAAGTTTACGGGGAATAC  
GAGTGTGCTGGACAGGGGGAGCAGAAGGATTATTGGTGTATGAGACGTTTA  
TTGACGAGGGGTATTTCAATTGA
```

Obr. 21| DNA sekvence rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasy

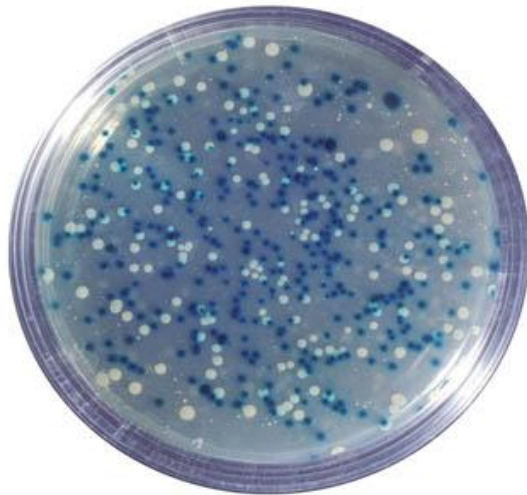
### 5.3. Izolace celkové RNA

K izolaci celkové RNA byl použit GTC roztok, tato metoda poskytovala dostatečné výtěžky k následné izolaci mRNA. Čistota izolované RNA byla ověřena spektrofotometricky. Poměr  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}} \geq 1,8$ .

### 5.4. Izolace mRNA

Izolovaná mRNA byla ihned použita k přepisu do cDNA. cDNA poté sloužila jako templát pro PCR.

Produkt byl ligován do klonovacího konstrukt. Jako kontrola byl použit *blue-white screening* (obr. 22) a po izolaci konstruktu restriční analýza.



Obr. 22| Miska s koloniemi *Escherichia coli* TOP 10 s úspěšně zaligovaným genem  $\beta$ -rutosidasy do klonovacího vektoru PGEM-T-Easy (bílé kolonie) a s neúspěšnou ligací (modré kolonie)

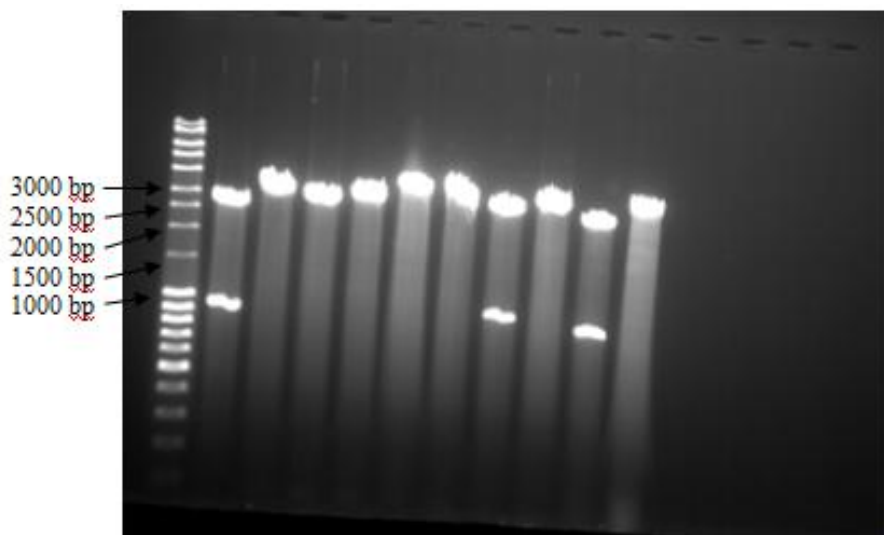
### 5.5. Ligace do expresního vektoru

PCR produkt (1000 bp) byl 24 hodin štěpen restričními endonukleasami *KpnI* a *EcoRI* a po přečištění byl ligován do linearizovaného a defosforylovaného expresního vektoru pPICZ $\alpha$  A. Byl použit malý objem vektoru z důvodu velice malých výtěžků PCR.

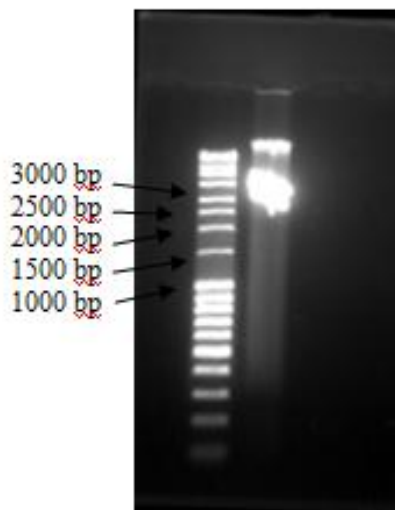
### 5.6. Transformace *Escherichia coli* TOP 10

Bylo vybráno 10 kolonií, které byly očkovány do tekutého media a následně podrobeny restriční analýze pomocí *EcoRI* a *KpnI* (obr. 23, str. 51). Z těchto 10 kolonií byly pouze 3 pozitivní. Z nich byla vybrána jedna a kultivována a byl izolován konstrukt DNA pro

sekvenaci. Sekvence potrdila gen pro  $\beta$ -rutosidasu. Izolovaný konstrukt byl linearizován endonukleasou *PmeI* (obr. 24) a přečištěn fenolchloroformovou extrakcí.



Obr. 23|Gel po restrikční analýze restrikctasami *EcoRI* a *KpnI*. Pouze (zleva) první, sedmá a devátá kolonie obsahovaly zaligovaný gen pro  $\beta$ -rutosidasu.

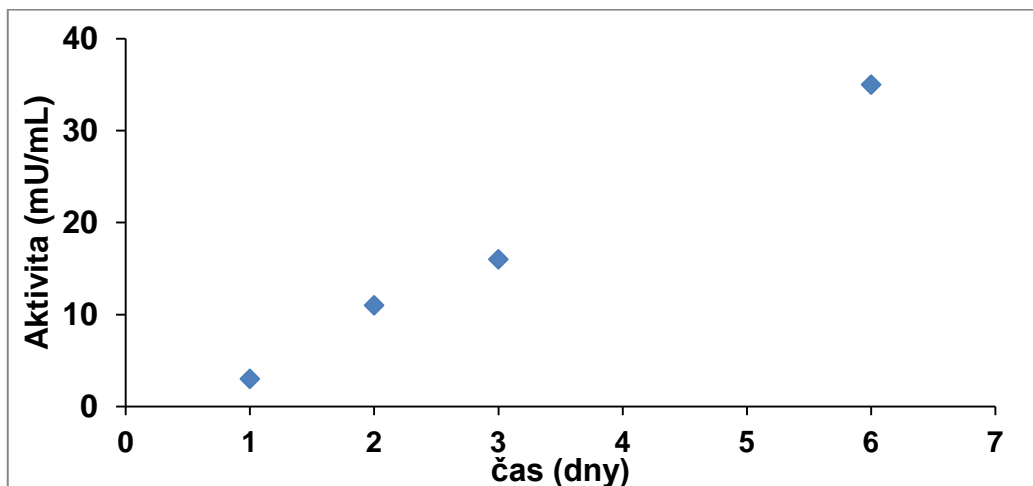


Obr. 24| Gel linearizovaného konstruktů restrikctasou *PmeI*

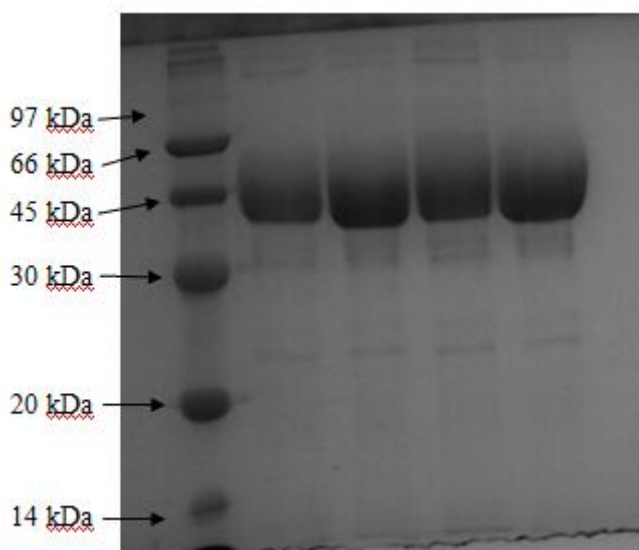
### 5.7. Elektroporace *Pichia pastoris* KM71H a následná exprese

Po elektroporaci bylo vybráno 6 kolonií, které byly přeočkovány do BMMY media a byla sledována produkce  $\beta$ -rutosidasy reakcí s butanolem a následnou tenkovrstevnou chromatografií. Aktivita  $\beta$ -rutosidasy byla zjišťována jak v médiu, tak i uvnitř buněk

(byla provedena lýze buněk). Přítomnost  $\beta$ -rutosidasy byla také zjišťována pomocí SDS-PAGE. Aktivita  $\beta$ -rutosidasy byla detekována v médiu (obr. 25) a její přítomnost byla potvrzena i na gelu z SDS-PAGE (obr. 26), uvnitř buněk nebyla detekována aktivní  $\beta$ -rutosidasa.



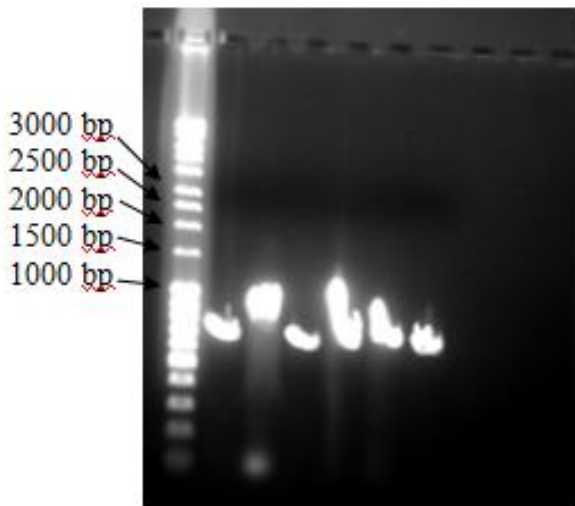
Obr. 25| Extracelulární produkce  $\beta$ -rutosidasy v čase



Obr. 26| Kontrola produkce  $\beta$ -rutosidasy (5. den produkce) pomocí SDS-PAGE

## 5.8. Izolace celkové DNA *P.pastoris* a PCR analýza

K zjištění, zda se gen pro  $\beta$ -rutinosidasu integroval do genomu *P.pastoris*, byla po izolaci celkové DNA použita PCR. Jak je vidět z gelu (obr. 27)  $\beta$ -rutinosidasu se integrovala do genomu *P.pastoris*. Bylo nutno provést PCR za různých podmínek a s různými polymerasami. Až reakce s polymerasou Advatage byla úspěšná.



Obr. 27| Gel po PCR potvrzující integraci  $\beta$ -rutinosidasu do genomu *P.pastoris*

## 5.9. Western Blot a Edmanovo odbourávání

Purifikovaná rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasu byla přenesena z SDS-PAGE gelu na PVDF membránu. Edmanovo odbourávání bylo v sedmi automatizovaných cyklech provedeno na ústavu organické chemie a biochemie. Výsledná aminokyselinová sekvence EFRLAPLA odpovídá DNA sekvenci rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasu.

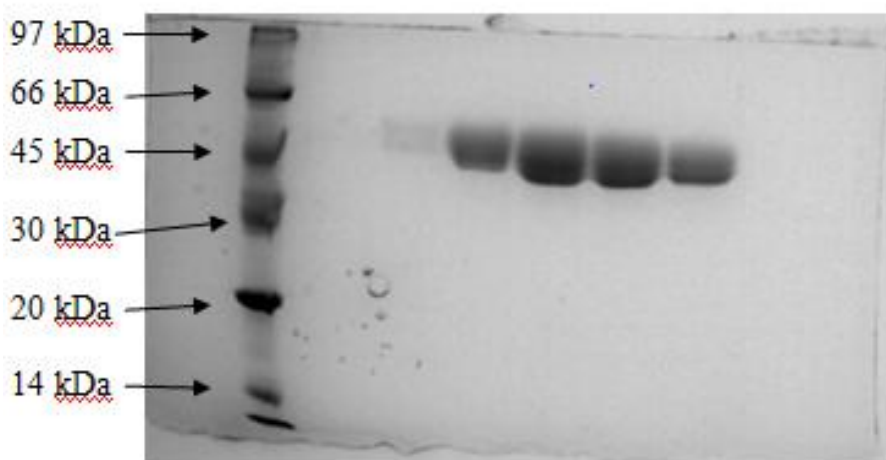
## 5.10. Purifikace rekombinantní $\beta$ -rutinosidasu

Výměna pufrů byla provedena dialýzou. Při dialýze nedošlo téměř k žádné ztrátě aktivity. Při iontové chromatografii byl použit měnič kationtů (katex). V tomto kroku došlo k navýšení specifické aktivity 1,2x (tab. 7, str. 54). Při gelové chromatografii se specifická aktivita podstatně snížila, zřejmě došlo k poklesu aktivity enzymu. Z SDS-PAGE gelu lze vidět (obr. 28, str. 54), že  $\beta$ -rutinosidasu je čistá, proto již nebylo nutno použít další přečišťovací krok jako např. chromatofokusaci.

Tab. 7| Shrnutí purifikačních kroků

|                       | V[ml] | U/ml | c[mg/ml] | U    | U/mg | m[mg] | Výtežek[%] |
|-----------------------|-------|------|----------|------|------|-------|------------|
| Médium                | 375   | 0,12 | 0,20     | 44,9 | 0,6  | 75,0  | 100        |
| Dialýza               | 500   | 0,08 | 0,13     | 41,8 | 0,7  | 65,0  | 93         |
| Katex                 | 25    | 1,38 | 1,70     | 34,4 | 0,8  | 42,5  | 77         |
| Gelová chromatografie | 8     | 1,66 | 2,89     | 13,3 | 0,6  | 23,1  | 30         |

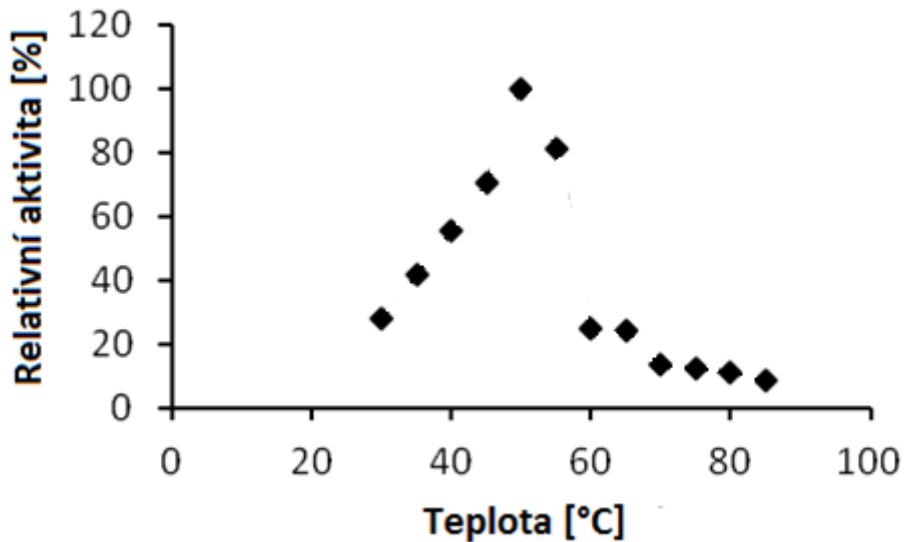
Koncentrace katalytické aktivity a koncentrace proteinů dle Bradfordové byla měřena spektrofotometricky. Přečištění bylo potvrzeno pomocí SDS-PAGE.



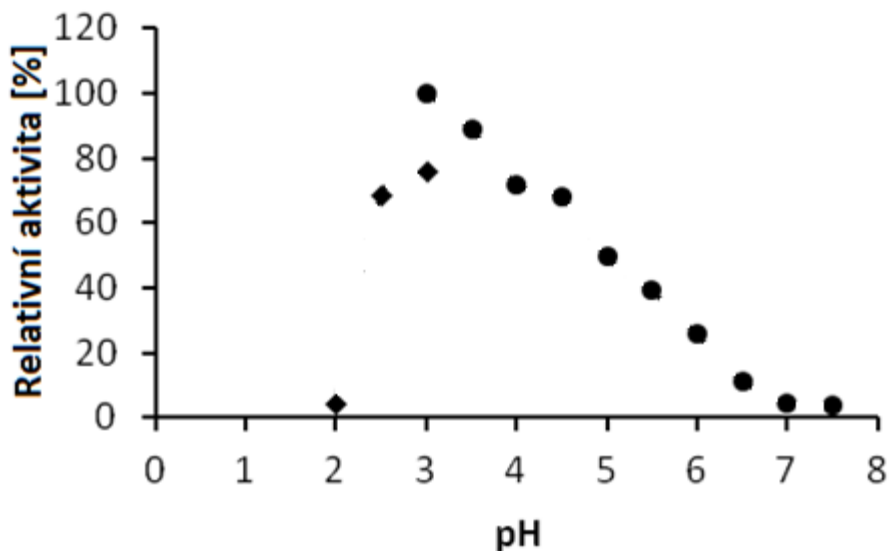
Obr. 28| SDS-PAGE gel frakcí z gelové chromatografie

## 5.11. Stanovení biochemických charakteristik rekombinantní $\beta$ -rutinosidasy

Bylo zjištěno teplotní optimum rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasy – 50 °C (obr. 29) a pH optimum – 3,0 (obr. 30).

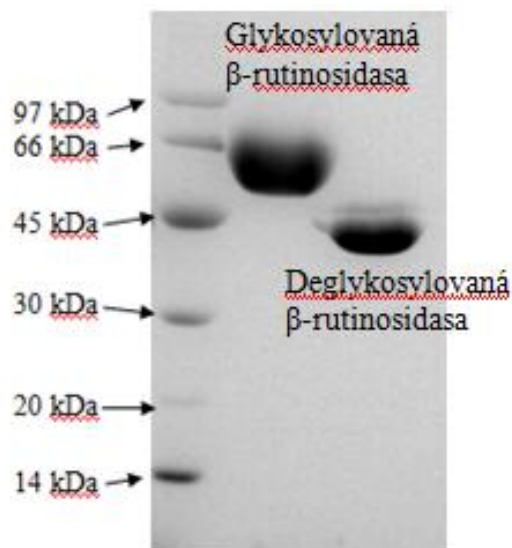


Obr. 29| Teplotní optimum rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasy



Obr. 30| pH optimum rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasy (v rozmezí pH 2,0 až 3,0 byl použit glycin-hydrochloridový pufr, v rozmezí 3,0 až 7,5 Britton-Robinsonův pufr)

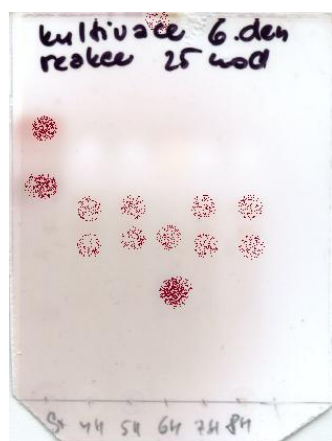
Velikost rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasy byla stanovena jako 60 kDa, po deglykosylaci 45 kDa (obr. 31). Deglykosylace nezpůsobila ztrátu aktivity rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasy.



Obr. 31| SDS PAGE gel glykosylované a deglykosylované formy rekombinantní  $\beta$ -rutinosidasy

### 5.12. Screening kvasinek na produkci $\beta$ -rutinosidasy

Jediná kvasinka, která začala produkovat  $\beta$ -rutinosidasu po 6 dnech kultivace, byla *Schizosaccharomyces japonicus var.versatilis* a to v médiu indukovaném hesperidinem (obr. 32).



Obr. 32| TLC se zvýrazněnými skvrnami, první jsou nanесeny standardy butanol-rutinosid, rutinosa a quercitrin, 4H – 8H jsou vzorky indukované hesperidinem. Jediný 6H (*Schizosaccharomyces japonicus var.versatilis*) produkoval  $\beta$ -rutinosidasu a proto je vidět produkt (rutinosa).



## 6. Diskuze

Diplomová práce byla zaměřena především na přípravu rekombinantní formy  $\beta$ -rutinosidasy. Purifikovaná  $\beta$ -rutinosidasa pocházející z *Aspergillus niger* K2 byla odeslána k MALDI TOF/TOF analýze k zjištění aminokyselinových sekvencí. Jelikož je znám genom *Aspergillus niger* 513.88 (NCBI Reference Sequence: XM\_001392191.2), byly aminokyselinové sekvence s jeho genomem porovnány a byly navrženy primery. Pomocí PCR byla připravena cDNA, která byla přepsána reverzní transkripcí z izolované RNA.

DNA byla připravena pomocí klonovacího vektoru pGEM-T-Easy. Úspěšnost ligace byla potvrzena transformací buněk *Escherichia coli* TOP 10 tímto vektorem. pGEM-T-Easy obsahuje gen pro galaktosidasu, ligací je gen přerušen a galaktosidasa není produkována. Pokud je do agarového média přidán 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid, který je štěpen galaktosidasou, narostlé buňky jsou zbarveny modře, pokud ovšem proběhla ligace správně, galaktosidasa není produkována a buňky jsou bílé.

Další kontrolou byla restriční analýza. Byly vybrány 2 restriktasy – *KpnI* a *EcoRI* a na agarosovém gelu byla zkontrolována velikost úseku. Poslední kontrolou byla sekvence genu. Ta odpovídala sekvenci v genomu *A. niger* 513.8. Po potvrzení sekvence následovala ligace do vektoru pPICZ $\alpha$ A.

Jako expresní systém byla zvolena *Pichia pastoris*. Tento expresní systém má mnoho výhod jako zpracování a sbalování proteinů, posttranslační modifikace, je levný a poskytuje vysoké výtěžky exprese. Pro heterologní expresi je využívána metabolická cesta metanolu, který je jediným zdrojem uhlíku této kvasinky. Metanol je metabolizován pomocí alkoholoxidasu na formaldehyd a peroxid vodíku. Alkoholoxidasa je produkována ve vysokém množství, jelikož má nízkou afinitu ke kyslíku. Díky tomuto jevu je právě promotor regulující produkci alkoholoxidasu využit pro heterologní expresi v *Pichia*.

Z kmenů *Pichia pastoris* byl vybrán Mut<sup>S</sup> kmen KM71H, který produkuje pouze jednu alkoholoxidasu kódovanou AOX2 genem. Ta je produkována méně než alkoholoxidasa kódovaná AOX1 genem (z něj je přítomen pouze promotor na expresním vektoru), proto kmen Mut<sup>S</sup> roste v přítomnosti metanolu pomaleji než Mut<sup>+</sup>, kde jsou přítomny obě alkoholoxidasu. Další nespornou výhodou je, že transformované kolonie je možné uchovávat dlouhodobě na

miskách s agarem, takže není nutné před každou expresí buňky transformovat. Inzert je totiž vkládán přímo do genomu *Pichia pastoris*. [68, 69]

Integrace genu pro  $\beta$ -rutosidasu do genomu *Pichia pastoris* byla v této práci potvrzena. V tomto kroku byla k zvýšení počtu kopií genu pomocí PCR vybrána Taq polymerasa. I při změně podmínek nedocházelo k namnožení genu a zdálo se, že gen pro  $\beta$ -rutosidasu se do genomu *Pichia* neintegroval. Byla vyzkoušena ještě Advantage polymerasa, s tou k namnožení genu došlo a integrace byla potvrzena.

Rekombinantní  $\beta$ -rutosidasa byla purifikována a byly zjištěny některé biochemické charakteristiky. Purifikační kroky byly pouze dva – katexová a gelová chromatografie. SDS-PAGE elektroforéza potvrdila dostatečné přečištění. Po katexové chromatografii se specifická aktivita se navýšila 1,2x. Při gelové chromatografii došlo k navýšení koncentrace proteinu, ale specifická aktivita se snížila, zřejmě při tomto kroku došlo ke ztrátě aktivity enzymu.

Teplotní optimum (50 °C) je srovnatelné s ostatními  $\beta$ -rutosidasami. Je nejnižší naměřené u mikroorganismů a nejvyšší naměřené u rostlin (viz tab. 2, str. 27). pH optimum (3,0) se nachází v kyselejší oblasti než u ostatních  $\beta$ -rutosidas, nejbližší srovnatelné je s kmeny *Aspergillus niger* [35] a *Penicillium rugulosum* [28]. Z diglykosidas má podobné charakteristiky primeverosidasu – nejvíce ta, která je produkována kmenem *Aspergillus fumigatus* (viz tab. 1, str. 20) [26].

## 7. Závěr

- Byla připravena rekombinantní forma  $\beta$ -rutosidasy
- Teplotní optimum rekombinantní  $\beta$ -rutosidasy je 50 °C
- pH optimum rekombinantní  $\beta$ -rutosidasy je 3,0
- Velikost rekombinantní  $\beta$ -rutosidasy odpovídá 60 kDa, deglykosylované formy pak 45 kDa.
- Při screeningu kvasinek produkoval  $\beta$ -rutosidasu jen jeden kmen a to *Schizosaccharomyces japonicus var. versatilis*

## 8. Literatura

1. <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>. k 9.5.2014
2. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/>. k 9.5.2014
3. McCarter, J.D. and S.G. Withers, *Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis*. *Curr Opin Struct Biol*, 1994. **4**(6): p. 885-92.
4. Tiels, P., et al., *A bacterial glycosidase enables mannose-6-phosphate modification and improved cellular uptake of yeast-produced recombinant human lysosomal enzymes*. *Nat Biotechnol*, 2012. **30**(12): p. 1225-31.
5. McIntosh, L.P., et al., *The pKa of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: a <sup>13</sup>C-NMR study of bacillus circulans xylanase*. *Biochemistry*, 1996. **35**(31): p. 9958-66.
6. Knapp, S., et al., *NAG-thiazoline, An N-Acetyl-beta-hexosaminidase Inhibitor That Implicates Acetamido Participation* 1996, *J. Am. Chem. Soc.* p. 6804-6805.
7. Mark, B.L., et al., *Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial beta-hexosaminidase*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(13): p. 10330-7.
8. Vocadlo, D.J. and S.G. Withers, *Detailed comparative analysis of the catalytic mechanisms of beta-N-acetylglucosaminidases from families 3 and 20 of glycoside hydrolases*. *Biochemistry*, 2005. **44**(38): p. 12809-18.
9. Terwisscha van Scheltinga, A.C., et al., *Stereochemistry of chitin hydrolysis by a plant chitinase/lysozyme and X-ray structure of a complex with allosamidin: evidence for substrate assisted catalysis*. *Biochemistry*, 1995. **34**(48): p. 15619-23.
10. Burmeister, W.P., et al., *High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(50): p. 39385-93.
11. Amaya, M.F., et al., *Structural insights into the catalytic mechanism of Trypanosoma cruzi trans-sialidase*. *Structure*, 2004. **12**(5): p. 775-84.
12. Watts, A.G., et al., *Trypanosoma cruzi trans-sialidase operates through a covalent sialyl-enzyme intermediate: tyrosine is the catalytic nucleophile*. *J Am Chem Soc*, 2003. **125**(25): p. 7532-3.
13. Watson, J.N., et al., *Mutagenesis of the conserved active-site tyrosine changes a retaining sialidase into an inverting sialidase*. *Biochemistry*, 2003. **42**(43): p. 12682-90.
14. Yip, V.L., et al., *An unusual mechanism of glycoside hydrolysis involving redox and elimination steps by a family 4 beta-glycosidase from Thermotoga maritima*. *J Am Chem Soc*, 2004. **126**(27): p. 8354-5.
15. Rajan, S.S., et al., *Novel catalytic mechanism of glycoside hydrolysis based on the structure of an NAD<sup>+</sup>/Mn<sup>2+</sup> -dependent phospho-alpha-glucosidase from Bacillus subtilis*. *Structure*, 2004. **12**(9): p. 1619-29.
16. Mazzaferro, L.S. and J.D. Breccia, *functional and biotechnological insights into diglycosidases*. 2011, *Biocatalysis and Biotransformation*. p. 103-112.
17. Ahn, Y.O., et al., *Vicianin hydrolase is a novel cyanogenic beta-glycosidase specific to beta-vicianoside (6-O-alpha-L-arabinopyranosyl-beta-D-glucopyranoside) in seeds of Vicia angustifolia*. *Plant Cell Physiol*, 2007. **48**(7): p. 938-47.
18. Lizotte, P.A. and J.E. Poulton, *Catabolism of Cyanogenic Glycosides by Purified Vicianin Hydrolase from Squirrel's Foot Fern (Davallia Trichomanoides Blume)*. *Plant Physiol*, 1988. **86**(2): p. 322-4.

19. Ahn, Y.O., et al., *Furcatin hydrolase from Viburnum furcatum Blume is a novel disaccharide-specific acuminosidase in glycosyl hydrolase family 1*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23405-14.
20. Chuankhayan, P., et al., *Purification of an isoflavonoid 7-O-beta-apiosyl-glucoside beta-glycosidase and its substrates from Dalbergia nigrescens Kurz*. Phytochemistry, 2005. **66**(16): p. 1880-9.
21. Nakanishi, F., et al., *Characterization of lucidin formation in Rubia tinctorum L*. Plant Physiol Biochem, 2005. **43**(10-11): p. 921-8.
22. Ijima, Y., et al., *Characterization of beta-Primeverosidase, Being Concerned with Alcoholic Aroma Formation in Tea Leaves To Be Processed into Black Tea, and Preliminary Observations on Its Substrate Specificity*. 1998, J. Agric. Food Chem.
23. Ogawa, K., et al., *Purification of a beta-Primeverosidase Concerned with Alcoholic Aroma Formation in Tea Leaves (Cv. Shuixian) To Be Processed to Oolong Tea*. 1997, J. Agric. Food Chem. p. 877-882.
24. Guo, W., et al., *Isolation and Characterization of beta-Primeverosidase Concerned with Alcoholic Aroma Formation in Tea Leaves*. 1996, Biosci. Biotech. Biochem. p. 1810-1814.
25. Günata, Z., et al., *An Endoglycosidase from Grape Berry Skin of Cv. M. Alexandria Hydrolyzing Potentially Aromatic Disaccharide Glycosides*. 1998, J. Agric. Food Chem. p. 2748-2753.
26. Yamamoto, S., et al., *Isolation and characterization of a beta-primeverosidase-like endo-manner beta-glycosidase from Aspergillus fumigatus AP-20*. Biosci Biotechnol Biochem, 2002. **66**(4): p. 801-7.
27. Tsuruhama, K., et al., *Isolation and characterization of a beta-primeverosidase-like enzyme from Penicillium multicolor*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(3): p. 691-8.
28. Narikawa, T., H. Shinoyama, and T. Fujii, *A beta-rutinosidase from Penicillium rugulosum IFO 7242 that is a peculiar flavonoid glycosidase*. Biosci Biotechnol Biochem, 2000. **64**(6): p. 1317-9.
29. Mazzaferro, L., et al., *Extracellular monoenzyme deglycosylation system of 7-O-linked flavonoid beta-rutinosides and its disaccharide transglycosylation activity from Stilbella fimetaria*. Arch Microbiol, 2010. **192**(5): p. 383-93.
30. Nam, H.K., et al., *Quercetin production from rutin by a thermostable  $\beta$ -rutinosidase from Pyrococcus furiosus*. Biotechnol Lett, 2012. **34**(3): p. 483-9.
31. Di Carlo, G., et al., *Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs*. Life Sci, 1999. **65**(4): p. 337-53.
32. Ma, S.J., et al., *Substrate specificity of beta-primeverosidase, a key enzyme in aroma formation during oolong tea and black tea manufacturing*. Biosci Biotechnol Biochem, 2001. **65**(12): p. 2719-29.
33. Mizutani, M., et al., *Cloning of beta-primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation*. Plant Physiol, 2002. **130**(4): p. 2164-76.
34. HAY, G.W., D.W. WESTLAKE, and F.J. SIMPSON, *Degradation of rutin by Aspergillus flavus. Purification and characterization of rutinase*. Can J Microbiol, 1961. **7**: p. 921-32.
35. Shoseyov, O., et al., *Endo- $\beta$ -glucosidase from Aspergillus niger grown on a monoterpene glycoside-containing medium* 1988, Phytochemistry. p. 1973–1976.

36. Baumgertel, A., et al., *Purification and characterization of a flavonol 3-O-beta-heterodisaccharidase from the dried herb of Fagopyrum esculentum Moench*. *Phytochemistry*, 2003. **64**(2): p. 411-8.
37. Yasuda, T. and H. Nakagawa, *Purification and characterization of the rutin-degrading enzymes in tartary buckwheat seeds*. 1993: *Phytochemistry*. p. 133-136.
38. Suzuki, T., et al., *Purification and characterization of flavonol 3-glucosidase, and its activity during ripening in tartary buckwheat seeds*. 2002, *Plant Science*. p. 417-423.
39. Minig, M., et al.,  *$\alpha$ -Rhamnosyl- $\beta$ -glucosidase-catalyzed reactions for analysis and biotransformations of plant-based foods*. *J Agric Food Chem*, 2011. **59**(20): p. 11238-43.
40. Shoseyov, O., et al., *Immobilized Endo-beta-glucosidase Enriches Flavor of Wine and PassionFruit Juice*. 1990, *Journal Agricultural Food Chemistry*. p. 1387-1390.
41. Mazzaferro, L.S., et al., *Transglycosylation specificity of *Acremonium* sp.  $\alpha$ -rhamnosyl- $\beta$ -glucosidase and its application to the synthesis of the new fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-rutinoside*. *Carbohydr Res*, 2012. **347**(1): p. 69-75.
42. Mazzaferro, L.S. and J.D. Breccia, *Quantification of hesperidin in citrus-based foods using a fungal diglycosidase*. *Food Chem*, 2012. **134**(4): p. 2338-44.
43. Sarry, J.-E. and Z. Günata, *Plant and microbial glycoside hydrolases: Volatile release from glycosidic aroma precursors* 2004: *Food Chemistry*. p. 509-521.
44. Bouskela, E. and K.A. Donyo, *Effects of oral administration of purified micronized flavonoid fraction on increased microvascular permeability induced by various agents and on ischemia/reperfusion in the hamster cheek pouch*. *Angiology*, 1997. **48**(5): p. 391-9.
45. Bok, S.H., et al., *Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids*. *J Nutr*, 1999. **129**(6): p. 1182-5.
46. Kawaguchi, K., et al., *Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas**. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997. **61**(1): p. 102-4.
47. Jin, Y.R., et al., *Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC-gamma2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity*. *Atherosclerosis*, 2007. **194**(1): p. 144-52.
48. Miyake, Y., et al., *Suppressive Effect of Components in Lemon Juice on Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats* 1998, *Food Sci. Technol. Int.*, Tokyo. p. 29-32.
49. Jean, T. and M.C. Bodinier, *Mediators involved in inflammation: effects of Daflon 500 mg on their release*. *Angiology*, 1994. **45**(6 Pt 2): p. 554-9.
50. Emim, J.A., A.B. Oliveira, and A.J. Lapa, *Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice*. *J Pharm Pharmacol*, 1994. **46**(2): p. 118-22.
51. Crespo, M.E., et al., *Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNBS*. *Planta Med*, 1999. **65**(7): p. 651-3.
52. Tanaka, T., et al., *Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis in rats by flavonoids diosmin and hesperidin, each alone and in combination*. *Cancer Res*, 1997. **57**(2): p. 246-52.

53. Tanaka, T., et al., *Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin*. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(5): p. 957-65.
54. Tanaka, T., et al., *Modulation of N-methyl-N-amyl nitrosamine-induced rat oesophageal tumourigenesis by dietary feeding of diosmin and hesperidin, both alone and in combination*. *Carcinogenesis*, 1997. **18**(4): p. 761-9.
55. Choi, J.S., et al., *Antimutagenic effect of plant flavonoids in the Salmonella assay system*. *Arch Pharm Res*, 1994. **17**(2): p. 71-5.
56. Józwiak, S., et al., *Effect of quercetin on experimental hyperlipidemia and atherosclerosis in rabbits*. *Pharmacol Rep*, 2005. **57**(5): p. 604-9.
57. Cassidy, A., et al., *Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **93**(2): p. 338-47.
58. Perez-Vizcaino, F., et al., *Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin*. *Pharmacol Rep*, 2009. **61**(1): p. 67-75.
59. Jung, S.H., et al., *Isoquercitrin is the most effective antioxidant in the plant Thuja orientalis and able to counteract oxidative-induced damage to a transformed cell line (RGC-5 cells)*. *Neurochem Int*, 2010. **57**(7): p. 713-21.
60. Kook, D., et al., *The protective effect of quercetin against oxidative stress in the human RPE in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. **49**(4): p. 1712-20.
61. Maher, P. and A. Hanneken, *Flavonoids protect retinal ganglion cells from oxidative stress-induced death*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005. **46**(12): p. 4796-803.
62. Rogerio, A.P., et al., *Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma*. *Inflamm Res*, 2007. **56**(10): p. 402-8.
63. Fernandez, J., et al., *Isoquercitrin from Argemone platyceras inhibits carbachol and leukotriene D4-induced contraction in guinea-pig airways*. *Eur J Pharmacol*, 2005. **522**(1-3): p. 108-15.
64. Shen, S.C., et al., *In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production*. *Eur J Pharmacol*, 2002. **446**(1-3): p. 187-94.
65. <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/V19520>. k 9.5.2014
66. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
67. Sambrook J., Fritsch E.F., and M. T., *Molecular cloning: A laboratory manual (druhé vydání)*. 1998, Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 47-55.
68. Cereghino, J.L. and J.M. Cregg, *Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev*, 2000. **24**(1): p. 45-66.
69. Cregg, J.M., et al., *Recombinant protein expression in Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol*, 2000. **16**(1): p. 23-52.