

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Bakalářská práce

Praha 2007

Barbora Fliedrová

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Bakalářská práce

**Studium závislosti glykosylace hexosaminidasy
na stavu buněčné kultury**

Vypracovala:

Barbora Fliedrová

Obor:

Klinická a toxikologická analýza

Školitel bakalářské práce:

Mgr. Jan Sklenář, PhD.

Vedoucí bakalářské práce:

Prof. RNDr. Karel Bezouška, CSc.

Vypracováno v Laboratoři architektury proteinů MBÚ AV ČR

Praha 2007

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Mgr. Jana Sklenáře, PhD., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

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

V Praze dne 30. května 2007

/

Barbora Fliedrová
.....

Barbora Fliedrová

Poděkování

Na této stránce bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, CSc. za možnost pracovat v Laboratoři architektury proteinů MBÚ AV ČR. Dále děkuji svému školiteli Mgr. Janu Sklenáři, PhD. za vedení bakalářské práce, ochotu a pomoc. Poděkování také patří RNDr. Kateřině Hofbauerové, PhD. za přípravu kultivačních medií a kultivaci, Mgr. Danielu Kavanovi za pomoc při práci v laboratoři a samozřejmě mé díky patří celému kolektivu laboratoře architektury proteinů za poskytnutí dobrého pracovního zázemí.

Obsah

Seznam zkratk	6
1 Cíl práce	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Houby (<i>Fungi</i>).....	8
2.2 Rod <i>Aspergillus</i>	9
2.3 Houbami sekretované enzymy	10
2.4 Glykosylace.....	16
3 Přístroje a chemikálie	18
3.1 Přístroje	18
3.2 Chemikálie	19
4 Experimentální část.....	21
4.1 Srážení proteinů síranem amonným.....	21
4.2 Chromatografie s hydrofobní interakcí.....	21
4.3 Iontově výměnná chromatografie.....	22
4.4 Chromatografie s reverzní fází	23
4.5 Ultrafiltrace	24
4.6 SDS-PAGE.....	24
4.7 Stanovení enzymové aktivity	25
4.8 Deglykosylace enzymu	25
5 Výsledky.....	26
5.1 Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy.....	26
5.2 Elektroforéza v prostředí SDS.....	29
5.3 Analýza N-vázaných oligosacharidů.....	31
6 Diskuze.....	32
7 Závěr.....	33
Použitá literatura	34

Seznam použitých zkratk

AcN	acetonitril
APS	persíran amonný
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomasie Brilliant Blue
DTT	dithiothreitol
EtOH	ethanol
GN	N-acetylglukosamin
GNMN 100	roztok o stejném poměru složek GN a MN
HAc	kyselina octová
HIC	chromatografie s hydrofóbní interakcí
IEC	iontově výměnná chromatografie
MeOH	methanol
MN	N-acetylmannosamin
PNGasa	N-glykosidasa F
pNP-NAcGlc	p-nitrofenyl-N-acetyl- β -D-glukosamin
RPC	chromatografie na reverzní fázi
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenethyldiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
Tris	tris-hydroxymethyl-aminomethan

1 Cíl práce

Glykosylace jako vysoce proměnlivá posttranslační modifikace závisí na stavu glykosylačního aparátu, buňky, tkáně případně organismu. Změny v glykosylaci rovněž značně ovlivňují vlastnosti proteinů. Jejich analýza se proto stává nezbytnou ve výzkumu proteinů zvláště v kontextu vyššího celku, např. buňky, buněčné signalizace, tkáně nebo jejich interakcí v rámci organismu. Vysoká variabilita oligosacharidových struktur, které se mohou vyskytovat na daném proteinu po jejich kvalitativní i kvantitativní analýze vypovídá o způsobu sekrece proteinu a stavu sekrečního aparátu resp. celé buňky. Porovnáním glykosylace za různých kultivačních podmínek nám proto dovoluje získat:

- důkaz o souvislosti glykosylace se způsobem rychlosti sekrece daného enzymu
- definovat biologické stavy (různé kultivační podmínky) pomocí analýzy glykosylace
- zhodnotit stabilitu glykosylační mašinerie v eukaryotní buňce
- odhadnout šíři procesů, s kterými glykosylace souvisí

Cílem této práce byla izolace β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* který byl kultivován na dvou různých mediích a porovnání glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy izolované z těchto medií.

2 Teoretická část

2.1 Houby (*Fungi*)

Houby patří mezi nejrozšířenější eukaryotické heterotrofní organismy na světě. Dělí se na kmeny *Chytridomycota*, *Microsporidiomycota*, *Zygomycota* (spájkivé houby), *Ascomycota* (vřeckovýtrusné houby), *Basidiomycota* (stopkovýtrusé houby). U oddělení *Chytridomycota* a *Microsporidiomycota* tvoří vegetativní stélku jediná buňka. U zbylých tří oddělení je vegetativní stélka tvořena vláknitými hyfami (myceliem). Výjimečně může být tvořena jednotlivými nepravidelně laločnatými buňkami nebo kulovitými buňkami se schopností tvorby pseudomycelia vzniklého pučením. U některých se mohou objevit přehrádkované hyfy (hyfa je rozdělena na vícejaderné, dvoujaderné či jednojaderné úseky).

U většiny zástupců je přítomna buněčná stěna která je tvořena různými polysacharidy, bílkoviny, tuky. Chemické složení buněčných stěn není zcela jednotné. Hlavní polysacharidovou složku tvoří chitin a chitinoso nebo chitin a $\beta(1-3,6)$ -glukan nebo chitin a β -mannan. U některých skupin je chitin nahrazen glykosaminoglykanem. V nepatrném množství u některých skupin byla v buněčné stěně zjištěna celulóza.

Řada vřeckovýtrusných hub má velký význam pro člověka, nebo naopak může působit značné škody. Člověk využívá kvasných aktivit mnoha druhů, produkce různých látek (antibiotik, růstových regulátorů či stimulátorů, feromonů). Dále v tomto oddělení existují parazité rostlin a živočichů a v neposlední řadě druhy, které produkují mykotoxiny (toxické cyklické peptidy, fenoly, terpenoidy, polysacharidy, glykoproteidy) jako produkty sekundárního metabolismu.¹ V této práci byl použit jako modelový organismus *Aspergillus oryzae* (rod *Aspergillus*) patřící mezi *Ascomycota*.

2.2 Rod *Aspergillus*

Pravděpodobně žádný jiný organismus není pro člověka tolik škodlivý jako stejně tak užitečný. Rod *Aspergillus* zahrnuje asi 150 druhů. Jedná se o vláknité houby s vlákny oddělenými septy. Makroskopický útvar složený z rozvětvených vláken (hyf) se nazývá mycelium. Dle lokalizace a funkce má dvě části. Mycelium vegetativní vrůstá do kultivační půdy a čerpá živiny. Vzdušné mycelium nese reprodukční orgány. Konce vláken bývají rozšířeny v konidiofor, který nese volné, řetízkově uspořádané malé konidie-rozmnožovací elementy.

Rod *Aspergillus* roste dobře na různých půdách za 2-4 dny. Chmýřité kolonie mohou být zbarvené podle barvy mikrokonidií (žlutě, šedozeleň, černě).²

2.2.1 Patogenní druhy rodu *Aspergillus*

Několik jich bylo prokázáno jako původci lidských onemocnění. Nejčastějším původcem mykóz je *A.fumigatus*, méně *A.flavus* a *A.niger*. Přenos na člověka se děje vzdušnou cestou, inhalací mikrokonidií. Ohrožují člověka dvojitým způsobem. Některé kmeny aspergilů (*Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*) produkují mykotoxiny (aflatoxiny), které jsou hepatotoxické a kancerogenní. Druhým typem ohrožení člověka je infekční onemocnění aspergilóza. Primárně jsou postiženy dýchací cesty. Závažné jsou akutní pneumonie, astma bronchopneumonie.²

2.2.2 Průmyslově využitelné druhy rodu *Aspergillus*

Vláknité houby z rodu *Aspergillus* jsou mimořádné v jejich schopnosti sekrece velkého množství proteinů, metabolitů a organických kyselin do media. Tato vlastnost je široce využívána v potravinářství, při výrobě nápojů (*Asperillus niger*) a sojových omáček (*Aspergillus sojae*).¹ Tento organismus byl označen jako GRAS (Generally Regarded As Safe).

2.2.3 Taxonomické zařazení *Aspergillus oryzae*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>, 6.4 2007)

Doména:	Eucaryota
Říše:	Fungi
Kmen:	Ascomycota
Třída:	Eurotiomycetes
Řád:	Eurotiales
Čeleď:	Trichocomaceae
Rod:	Aspergillus
Druh:	Aspergillus oryzae

2.3 Houbami sekretované enzymy

Enzymy jsou látky bílkovinné povahy a jsou přítomny ve všech živých systémech. Houby produkují enzymy, které využívají k degradaci polysacharidů a proteinů na jednodušší sacharidy a aminokyseliny které využívají pro růst a reprodukci.

Vysoká kapacita sekrečního mechanismu hub je široce využívána pro produkci homolytických a heterolytických proteinů. Sekretované proteiny začínají svoji cestu do extracelulárního media v endoplazmatickém retikulu (ER). V ER jsou proteiny skládány za vzniku jejich prostorové struktury, která dále bývá modifikována glykosylací, tvorbou disulfidických můstků, fosforylací či navázáním podjednotek. Postupně proteiny opouštějí ER sbalené v transportních váčcích a směřují do Golgiho aparátu kde mohou být dále modifikovány. Dále jsou shromážděny do váčků a směřovány přes cytoplazmatickou membránu a ER, což je proces označovaný jako sekrece. V některých případech proteiny nejsou sekretovány do extracelulární tekutiny, ale míří do intracelulárních organel, například vakuol, kde se stanou trvalými proteiny nebo podstoupí proteolýzu.⁴

2.3.1 Houbami sekretované enzymy používané v průmyslu

Enzymy, sekretované houbami, jsou odpradávně využívány k tvorbě různých typů jídel a nápojů. Jedno z nejstarších využití těchto enzymů je při výrobě alkoholických nápojů. Kde kvasinky např. *Saccharomyces cerevisiae* převádějí pyruvát vzniklý glykolýzou na ethanol. Pyruvát je nejprve dekarboxylován na acetaldehyd a ten je následně redukován na ethanol. Redukci acetaldehydu na ethanol katalyzuje alkoholdehydrogenasa sekretovaná kvasinkami.

Další hojně využívané houby jsou z rodu *Aspergillus*. *Aspergillus niger* produkující glukamylasu, která katalyzuje hydrolýzu vazby α -1,4 a α -1,6 vázané D-glukózy ve škrobu se užívá ke zkapalnění škrobu ve vysoce glukózovém sirupu. Dále produkuje glukosidasu která se používá do ovocných džusů kde eliminuje působení kyslíku a tak nápoje konzervuje. Kyselina citrónová používaná do různých nápojů je také vyráběna pomocí enzymů produkovaných druhem *Aspergillus niger*. Ke zkapalnění škrobu v maltózovém sirupu se užívá α -amylasa produkovaná z *Aspergillus oryzae*. Lipasy, produkované *Aspergillus oryzae*, jsou používány do mycích prostředků. *Aspergillus oryzae* se také používá při zkvašování rýže na saké. *Aspergillus sojae* se používá při zkvašování sojových bobů, *Aspergillus ochraceus* se v Orientu používá při úpravě a fermentaci kávy.¹

Kyselá proteasy jsou většinou produkovány houbami, zatímco alkalické proteázy jsou produkovány bakteriemi. Alkalické proteasy jsou používány do mycích prostředků. Chymosin, kyselá proteasa produkovaná *Rhizomucor pusillus*, *Rhizomucor miehi* a *Cryphonectria parasitova*, je užívána k výrobě sýra. Tento enzym sráží mléčné proteiny.

2.3.1.1 β -glukanasa produkovaná *Rhizopus microsporus var. microsporus*

Tato práce popisuje možné využití β -glukanasy produkované *Rhizopus microsporus var. microsporus* v pivovarském průmyslu.

V klíčícím semeni sladového ječmene probíhá částečná hydrolýza β -glukanů. Endogenní β (1-3,4)-glukanázy jsou však teplem inaktivovány a zbývající vysoká molekulová hmotnost β -glukanů zapříčiňuje zvýšenou viskozitu a kalnost sladu. Zvýšená viskozita zpomaluje filtraci což má za následek sníženou efektivitu a želatinové vlastnosti v konečném pivu. Proto je velmi vhodné užití exogenních β -glukanás na redukci β -glukanů obsažených ve sladovém ječmeni.

Rhizopus microsporus var. microsporus třídy *Zygomycetes* sekretuje značné množství 1,3-1,4- β -glukanasy do media obsahující 5% chitin. Tento enzym je schopen hydrolyzovat β -glukan obsahující 1,3 a 1,4 vazby. Molekulová hmotnost enzymu je 33,7 kDa. Maximum aktivity bylo detekováno v rozmezí pH 4-5 a teploty v rozmezí 50-60 °C. Enzym byl schopen snížení viskozity ječného sladu a doby fitrace.⁵

2.3.2 Sekretované enzymy z *Aspergillus flavus*

Typické sekretované proteiny vláknitých hub byly nedávno systematicky popsány pro *Aspergillus flavus*. *A. Flavus* byl kultivován na třech mediích s různými látkami jako zdroji uhlíku. Hlavní pozornost byla upřena na medium kde jako zdroj uhlíku byl použit flavonoid rutin. Jako další zdroje uhlíku byla použita dextróza z brambor a glukóza. Vzorky byly odebrány a elektroforeticky analyzovány po třech, sedmi, deseti a čtrnácti dnech. Celková analýza proteinů byla provedena ve vzorku který byl kultivován čtrnáct dní.

Šestnáct typických enzymů bylo sekretováno ve všech mediích. Byly to enzymy účastníci se proteolýzy, peptidolýzy, metabolismu cukrů a transportu iontů. Glutaminasa byla také nalezena ve všech třech mediích.

Pouze jeden enzym byl unikátní pro medium obsahující dextrózu z brambor, ribonucleasa T2 prekurzor. V mediu obsahující rutin byly nalezeny enzymy účastnících se redox reakcí - metaloproteiny a další různorodé enzymy

Překvapivý nález byl enzym chinasa nalezený v mediu obsahující rutin. Chitin je charakteristická složka houbových buněčných stěn a všechny chitinové houby produkují chitinolytické enzymy. Jejich produkce přispívá k vývoji a růstu houby. N-acetylglukosamidasa stejně jako exo-beta-glukanasa je také považována za chitinasu. Je zajímavé že oba tyto enzymy byly sekretovány *A. flavus* ve všech mediích, ale chitinasu byla nalezena pouze v rutin obsahujícím mediu.⁶

2.3.3 Induktory sekretovaných proteinů

Sekretované proteiny lze rozdělit na dvě skupiny: konstitutivně sekretované a inducibilní proteiny/enzymy. V minulosti se vědci snažili přimět vhodnou indukci mikroorganismus k sekreci požadovaných enzymů. Dnes je indukce požadované aktivity používána také ke studiu molekulárních mechanismů indukce a souvisejících procesů. My jsme pracovali na modelovém glykoproteinu β -N-acetylhexosaminidase sekretovaném z *Aspergillus oryzae*. Jako induktor sekrece byl použit N-acetylglukosamin a N-acetylmannosamin.

2.3.4 β -N-acetylhexosaminidasy

β -N-acetylhexosaminidasy jsou v přírodě velmi rozšířené enzymy. Vyskytují se u eukaryotních i prokaryotních organismů a je známo, že jsou odpovědné za celou škálu degradačních procesů.

β -N-acetylhexosaminidasy jsou exoglykosidasy patřící do skupin hydrolas. β -N-acetylhexosaminidasy, systematický název 2-acetamido-2-deoxy- β -D-hexapyranosid acetaminododeoxyhexohydrolasa (EC 3.2.1.52), katalyzují hydrolyzu koncového neredukujícího N-acetyl- β -D-glukosaminu (GlcNAc) a N-acetyl- β -D-galaktosaminu (GalNAc).

2.3.4.1 Fungální β -N-acetylhexosaminidasy

β -N-acetylhexosaminidasa ve vláknitých houbách je součástí důležitého chitinolytického systému v buněčné stěně rostoucích hyf. Rostoucí vláknité houby produkují chitinolytické enzymy, chitinasy a β -N-acetylhexosaminidasy. Zde β -N-acetylhexosaminidasy štěpí chitobiosu (konečný produkt degradace chitinu působením chitinas) na 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid (β -GlcNAc), který je v buňce metabolizován jako zdroj uhlíku a dusíku. Tento enzymový systém má významnou úlohu v regulaci růstu hyf, protože při růstu je nutné citlivě kontrolovat lyzi buněčné stěny a koordinovaně regulovat syntézu chitinu, aby byl zajištěn růst hyf na špičkách a v místech větvení, a zároveň aby nedošlo k prasknutí buněk bez chitinové opory. V procesu růstu hyf pracuje β -N-acetylhexosaminidasa jako mediátor mezi hydrolyzou a syntézou chitinu, kdy hydrolyzuje chitobiosu vzniklou působením chitinasy a uvolněné N-acetylglukosaminové zbytky předává chitinsynthase, kde je chitin opět syntetizován.⁷

Působení těchto enzymů je regulováno aktuálními koncentracemi jednotlivých substrátů. Experimentálně byl prokázán vliv aktivity β -N-acetylhexosaminidasy na morfologii hyf u *A. niger*.⁸

Sekrece enzymu může být podporována přidáním induktoru do kultivačního media. Mezi nejběžnější induktory patří chitin, chitooligomery (N-acetylglukosamin a N-acetylmanosamin).

Fungální β -N-acetylhexosaminidasy jsou homodimerní glykoproteiny. Typická glykosylace těchto enzymů jsou vysoce mannosové typy oligosacharidů.

U β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* byla objevena regulace aktivity a sekrece fungální β -N-acetylhexosaminidasy jejím propeptidem. Tento mechanismus je založen na tvorbě a sekreci dvou různých forem enzymových molekul, jedné plně aktivní a druhé s poloviční aktivitou. Tyto dvě formy enzymu se liší počtem nekovalentně navázaných molekul propeptidu, který se po translaci odštěpuje a zpětně reasociuje s poskládanou β -N-acetylhexosaminidasou, což je nezbytný krok aktivace enzymu. Plně aktivní β -N-acetylhexosaminidasa je heterodimer složený ze dvou katalytických podjednotek, s kovalentně vázanými dvěma molekulami propeptidu. Enzym s poloviční aktivitou má na katalytickém dimeru navázanu pouze jednu molekulu propeptidu. Rychlost sekrece enzymu do prostředí také závisí na počtu navázaných propeptidů - β -N-acetylhexosaminidasa ve formě tetrameru je sekretována rychleji. Pokud na katalytické podjednotce není navázán žádný propeptid, není enzym vůbec aktivní. Předpokládá se, že fungální buňky mají mechanismus, jak regulovat množství propeptidu v endoplasmatickém retikulu, kde k syntéze enzymu dochází, ale tento mechanismus není dosud znám. Takto mohou buňky ovlivňovat množství aktivního enzymu uvnitř i vně buňky podle svých růstových a metabolických potřeb. Tento mechanismus byl prokázán u β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* a *Penicillium oxalicum*.⁹

β -N-acetylhexosaminidasy mohou katalyzovat také transglykosylaci a jsou užitečné pro syntézu nových glykostruktur. β -N-acetylhexosaminidasy z různých vláknitých hub byly použity pro syntézu oligosacharidů.¹⁰ Vzhledem k důležitosti a rozšířenosti β -N-acetylhexosaminidasy u hub se o tomto enzymu uvažuje jako o možném cíli při hledání nových širokospektrých antifungálních látek.¹¹

2.3.4.2 Výskyt a funkce β -N-acetylhexosaminidás v ostatních organismech

U bakterií se podílejí na vzniku a degradaci polysacharidových kapsulí.¹² U hmyzu se podílejí na tvorbě vnější kostry z chitinu a u strunatců jsou důležité k navázání spermií na vajíčko.¹³

Rostlinné hexosaminidasy jsou studovány méně než živočišné. Existují případy monomerních i oligomerních enzymů. Všechny enzymy rýžových semínek¹⁴ a sazenic kukuřice¹⁵ jsou monomerní proteiny. Existence různých izoenzymů byla zjištěna pro β -N-acetylhexosaminidasy získané z pšenice a zvonkové papriky.¹⁶ Fyziologická funkce ve vyšších rostlinách není známá. Předpokládá se, že se podílí na degradaci rezervních glykoproteinů ve vakuole a lysosomech.^{17, 18} Předpokládá se, že enzym ze zvonkové papriky má funkci při zrání ovoce.¹⁶

V živočišných buňkách je β -N-acetylhexosaminidasa umístěna v lysosomech a její funkcí je modifikace proteinů a degradace glykoproteinů a glykolipidů. U člověka se jedná o enzym složený ze dvou podjednotek které mají přibližně z 60% stejnou sekvenci. Objevují se ve třech izoformách, homodimerové hexosaminidasy B ($\beta\beta$) a S ($\alpha\alpha$), a heterodimerové hexosaminidasy A ($\alpha\beta$). Dimerizace je nutná pro katalytické aktivity těchto enzymů.⁹ Zájem o lidské hexosaminidasy souvisí s alelickými variantami v genech HexA a HexB, které způsobují fatální vrozené vady metabolismu, které jsou známé jako nemoci Tay-Sachs a Sandhoff. Projevují se výrazným zvýšením hladin glykolipidů, glykoproteinů, oligosacharidů a glykosaminoglykanů.¹⁹

2.4 Glykosylace

Glykosylace je nejběžnější posttranslační modifikací proteinů v eukaryotických buňkách která zásadně mění některé jejich vlastnosti. Glykosylace proteinů probíhá v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu s katalytickou účastí glykosylačních enzymů. Druhy glykosylace se rozeznávají podle spojení aminokyselinových zbytků se sacharidovým řetězcem. Nejčastější je N-vázaný asparagin a O-vázaný threonin a serin. N-glykany jsou vázány přes N-acetyl- β -D-glukosamin na amidový dusík v L-asparaginu. Pro tuto glykosylaci musí být přítomna signální sekvence Asn-Xxx-Ser/Thr, přičemž Xxx může být jakákoli aminokyselina s výjimkou prolinu a asparaginu. O-glykany jsou vázány na hydroxylovou skupinu L-serinu nebo L-threoninu, a to přes N-acetyl- α -D-galaktosamin. Na základě současných vědomostí pro O-glykany neexistuje typický sekvenční motiv.²⁰ O-glykosylace se většinou objevuje v určitých shlucích v oblastech bohatých na výskyt serinu a threoninu. Funkčně se O-glykosylace uplatňuje v tvorbě krevních skupin, účastní se na vývoji krevních buněk, a řada O-glykoproteinů se podílí na ochraně epitelu.²¹

Enzymy odpovědné za biosyntézu proteinové glykosylace (glykosidasy a glykosyltransferasy) jsou rozmístěny v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu tak, že vylučovaný protein musí „skrz“ ně projít. Společně s dostupnými enzymy vázající glykany má biosyntéza za následek značnou různorodost oligosacharidových struktur.²²

Struktura sacharidů vázaných N-glykosidycky vychází ze základní struktury (2 N-acetylglukosaminy + 3 mannosy). Na tuto základní strukturu jsou dále vázány různé monosacharidové jednotky např. D-mannosa, D-galaktosa, L-fukosa, kyseliny sialové a od nich se odvozují tři základní typy oligosacharidových struktur: vysoce mannosové, komplexní a hybridní. Další možné modifikace oligosacharidů jsou sulfatace, fosforylace, acetylace. Připojení oligosacharidu k proteinu dochází v endoplazmatickém retikulu ještě před ukončením biosyntézy. Výchozí oligosacharid je větvený s vysokým obsahem mannosy, a na jedné větvi je zakončen sekvencí tří glukosylových zbytků. V Endoplazmatickém retikulu a následně v Golgiho aparátu se postupně odštěpují glukosové a některé mannosové zbytky a připojují se jiné monosacharidové jednotky.^{23,24} Základní strukturu O-glykosylací tvoří N-acetylgalaktosamin a na něj vázány jeden či dva sacharidy (galaktosa, N-acetyl-

glukosamin, N-acetylgalaktosamin). Od těchto struktur se odvíjejí nejrůznější typy oligostruktur.²⁵

β -N-acetylhexosaminidasa sekretovaná druhem *Aspergillus oryzae* je tvořena katalytickou podjednotkou která je N-glykosylovaná a propeptidem který je O-glykosylovaný.²⁶

Většina glykosylace byla nalezena extracelulárně na vylučovaných glykoproteidech nebo receptorech. V posledních létech byla nalezena O-glykosylace GlcNAcku v cytosolu a v buněčných jádrech.²⁷

Glykosylace má většinou ochrannou funkci – brání proteolýze, působení nízkých či extrémně vysokých pH a ochraňuje proteiny před volnými radikály.²⁵ Dále napomáhá zaujmout správnou prostorovou strukturu, zajišťují dobrou rozpustnost, ovlivňuje aktivitu enzymů, určuje směřování uvnitř buňky a stabilizuje proteiny uvolněné z buňky ven.²⁸ Sacharidy se také uplatňují při interakcích mezi různými buňkami v mechanismu mikrobiální infekce, nebo mají podpůrnou funkci při interakci receptoru s ligandem.²⁹ Díky těmto funkcím glykosylace a těsnému spřažení funkce proteinu a jeho glykosylace velmi ovlivňuje proteiny a proto cílem jejího studování je získat znalosti o tom, jak glykosylace ovlivňuje funkci těchto molekul a také jak se mění glykosylace v různých stavech buňky popř. organismu.

3 Přístroje a chemikálie

3.1 Přístroje

Automatické pipety (1-10, 2-20, 20-200, 200-1000)	Gilson, USA
Centrifuga J2-21	Beckman, USA
Centrifuga Shelton Scientific USMC13	Mars Biomedical product, USA
HPLC systém, pumpa Ecom/ det. INGOS 5000	Waters, USA
HPLC systém BioSys 510	Beckman, USA
Chladnička	Zanussi, Itálie
Kolona MONO Q HR 5/5	Pharmacia Biotech, USA
Kolona Phenyl-sepharosa (1 x 8cm)	Sigma, USA
Kolona Vydac (C4 kolona pro izolaci propeptidu)	Dionex, USA
Koncentrátor Centricon 30 kDa	Millipore, USA
Koncentrátor Centriprep 30 kDa	Millipore, USA
Magnetická míchačka	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Mikrocentrifuga 16M	National Labnet, USA
Mikrotitrační destičky (96 jamek)	NUNC, Denmark
Mrazicí box (-80°C)	Forma Scientific, USA
pH metr φ 200	Beckman, USA
Předvážky HF1200G	AND, USA
Souprava pro vertikální elektroforézu	Sigma, USA
Speedvac RC 1010	Jouan, Francie
Spektrofotometr Safire ²	Tecan, Rakousko

3.2 Chemikálie

3.2.1 Chemikálie

AcN	Merck, Německo
Akrylamid	Sigma, USA
APS	Sigma, USA
Azid sodný	Sigma, USA
Bromfenolová modř	Sigma, USA
Citrát sodný	Lachema, ČR
Coomasie Brilliant Blue R-250	Sigma, USA
DTT	Fluka, Německo
EtOH	Lachner, ČR
Glycerol	Sigma, USA
Glycin	Penta, ČR
Hydrogenuhličitan sodný	Sigma, USA
Hydroxid sodný	Lachner, ČR
Chlorid sodný	Lachema ČR
Kyselina fosforečná 85%	Fluca, Německo
Kyselina octová	Lachema, ČR
Kyselina trifluoroctová	Fluca, Německo
MeOH	Lachner, ČR
N,N'-metylen-bis-akrylamid	Sigma, USA
Piperazin	Sigma, USA
PNGasa	New England Biolabs
pNP-NAcGlc	Senn Chemicals
SDS	Serva, USA
Síran amonný	Sigma, USA
TEMED	Serva, USA
Tris	Sigma, USA
Tris-Cl	Fluca, Německo
Uhličitan sodný	Sigma, USA

3.2.2 Roztoky a pufry

5% gel pro SDS elektroforézu
(zaostřovací)

destilovaná voda (1,4 ml),
30% akrylamidový mix (29 g akrylamidu
+ 1 g N,N'-metylen-bis-akrylamidu) (0,33 ml)
1 M Tris (pH=6,8) (0,25 ml),
10% SDS (0,02 ml), TEMED (0,004 ml),
10% APS (0,02 ml)

12% gel pro SDS elektroforézu (rozlišovací)	destilovaná voda (1,6ml), 30% akrylamidový mix (2,0 ml), 1,5 M Tris (pH=8,8) (1,3 ml), 10% SDS (0,05 ml), TEMED (0,002 ml), 10% APS (0,05 ml)
Elektrodotový pufr pro SDS elektroforézu	250 mM glycin, 10 mM Tris, 0,1% SDS, pH (8,3)
Marker pro SDS elektroforézu	BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), b-laktoglobulin (18,4 kDa), lysozym (14,3 kDa)
Barvicí roztok pro SDS elektroforézu	45% MeOH, 10% HAc, 0,25% CBB R-250
Odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu	35% EtOH, 10% HAc
Vzorkový pufr pro SDS elektroforézu (redukující)	50 mM Tris-Cl (pH=6,8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0,01% bromfenolová modř, 10% glycerol
Pufr A (Phenyl-sepharosa)	0,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM NaN ₃ , pH (6,8)
Pufr B (Phenyl-sepharosa)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM NaN ₃ , pH (6,8)
Pufr A (MONO-Q RH 5/5)	20 mM piperazin, 1 mM NaN ₃ , pH (5,6)
Pufr B (MONO-Q RH 5/5)	20 mM piperazin, 0,3 M NaCl, 1mM NaN ₃ , pH (5,6)
Pufr A (Vydac C-4)	destilovaná voda, 0,1% TFA
Pufr B (Vydac C-4)	AcN, 0,08% TFA
Substrát pro změřeni aktivity β -N-acetylhexosaminidasy	5 mM pNP-NAc-Glc, 50mM citrát sodný pH (5,0)

4 Experimentální část

β -N-acetylhexosaminidasa byla izolována z *Aspergillus oryzae*, který byl kultivován 48 h. na mediích s obsahem N-acetylglukosamin (GN) a N-acetylglukosamin+ N-acetylamannosamin v poměru 1 : 1(GNMN 100).

4.1 Srážení proteinů síranem amonným

Kultivační médium bylo po ukončení kultivace odfiltrováno. K filtrátu byl postupně přidáván za stálého míchání a chlazení na 4°C síran amonný do 80% saturace. Vysrážený precipitát byl odstředěn při 4°C při 20 000 g 20 minut při 4°C.

4.2 Chromatografie s hydrofobní interakcí

4.2.1 Teorie metody - Chromatografie s hydrofobní interakcí

(HIC, angl. Hydrophobic Interaction Chromatography)

Moderní chromatografická kolonová technika vyvinutá zejména pro dělení bílkovin. Jako stacionární fáze slouží speciální nosiče nesoucí hydrofobní skupiny, na něž se bílkoviny váží, aniž by byly (na rozdíl od chromatografie s obrácenými fázemi) denaturovány. Při vysoké iontové síle mobilní fáze na začátku chromatografie se bílkoviny váží na stacionární fázi; postupným snižováním iontové síly (sestupný solný gradient) dochází k oslabování hydrofobních interakcí bílkovin s nosičem a k jejich postupné eluci z kolony.³

V této práci byla použita hydrofobní nosič fenyl-Sepharosa

4.2.2 Praktické provedení metody- Chromatografie s hydrofobní interakcí

Pelet byl rozpuštěn ve 4 ml 0,6M (NH₄)₂SO₄. Roztok byl centrifugován 5 minut při 15 000g při 20°C. Supernatan byl dávkován na kolonu fenyl-Sepharosa (1 x 8 cm) ekvilibrovanou v pufru A.

Eluční gradient mobilní fáze při průtoku 2 ml/min

20 min	10%B
20 min	10-100%B
10 min	100%B
15 min	ekvilibrace

Detekce byla prováděna spektrofotometricky při 280 nm. V jímaných frakcích byla sledována enzymová aktivita. Frakce s enzymovou aktivitou byly zkoncentrovány ultrafiltrací. Poté byly analyzovány na SDS-PAGE.

4.3 Iontově výměnná chromatografie

4.3.1 Teorie metody - Iontově výměnná chromatografie

(IEC, angl. Ion-Exchange Chromatography)

Tato chromatografie umožňuje dělit biologické nízkomolekulární i vysokomolekulární ionty. Stacionární fázi tvoří ionex (anex nebo katex), na něž se na začátku pokusu naváží ionty opačného náboje obsažené ve vzorku (dělené látky). Poté se změní složení mobilní fáze (hodnota pH nebo koncentrace soli) tak, aby se složky dělené směsi postupně uvolňovaly (desorbovaly).³

V této práci byla použita kolona MONO-Q.

4.3.2 Praktické provedení metody- Iontově výměnná chromatografie

Vzorek byl dávkován na kolonu MONO-Q RH 5/5, ekvilibrovanou v pufru A.

Eluční gradient mobilní fáze při průtoku 1 ml/min

5 min	10%B
1 min	10-36%B
40 min	36-70%B
6 min	100%B
7min	ekvilibrace

Detekce byla prováděna spektrofotometricky při 280 nm. V jímaných frakcích byla sledována enzymová aktivita. Frakce s enzymovou aktivitou byly zkoncentrovány ultrafiltrací. Poté byly analyzovány na SDS-PAGE.

4.4 Chromatografie s reverzní fází

4.4.1 Teorie metody - Chromatografie s reverzní fází

(RPC, angl. Reversed Phase Chromatography)

Rozdělovací chromatografie, kdy proti běžnému provedení je stacionární fází nepolární kapalina a mobilní fází kapalina polární. Dnes používané stacionární nepolární fáze (uhlovodíkové řetězce C₄ - C₁₈) jsou chemicky vázané na nosič (grafitové nebo uhlíkem potažené silikagely, kopolymery styrenu a divinylbenzenu atd.). Ve většině aplikací této metody slouží jako mobilní fáze směs vody a organického rozpouštědla (acetonitrilu, isopropanolu, methanolu ap.). Vzhledem k nepolárnímu charakteru stacionární fáze k ní mají větší afinitu látky s vyšším obsahem hydrofobních oblastí, tedy méně polární. Na počátku pokusu jsou obvykle dělené látky rozpuštěny ve vodě a svými hydrofobními skupinami se zachytí na kolonu; poté se postupně z kolony eluují rostoucím gradientem koncentrace organického rozpouštědla.³ Chromatografie s reverzní fází se uplatňuje zejména v uspořádání HPLC. Při této metodě se uplatňuje jak princip rozdělovací chromatografie, tak princip chromatografie s hydrofobní interakcí.

V této práci byla použita kolona Vydac C-4.

4.4.2 Praktické provedení metody- Chromatografie s reverzní fází

Vzorek byl dávkován na kolonu Vydac C-4. Na této koloně došlo k oddělení katalytické podjednotky od propeptidu.

Eluční gradient mobilní fáze při průtoku 0,8 ml/min

5 min	5%B
35 min	15-60%B
10 min	100%B
15min	ekvilibrace

Detekce byla prováděna spektrofotometricky při 280 nm. Frakce s katalytickou pojednotkou β -N-acetylhexosaminidasy byly vysušeny ve vakuové odparce. Následně byly rozpuštěny ve 20 μ l 50mM NaHCO₃ a analyzovány na SDS-PAGE.

4.5 Ultrafiltrace

Po HIC a IEC chromatografií byly frakce s aktivitou zkoncentrovány pomocí koncentrátorů (Centrikon 30kDa) při 3600 g při 20°C.

4.6 SDS-PAGE

4.6.1 Teorie metody - SDS-PAGE

Elektroforeza v prostředí SDS je separační metoda která dělí bílkoviny dle jejich molekulové hmotnosti. Bílkoviny k separaci jsou modifikovány tvorbou komplexů s SDS, vzniklé komplexy mají prakticky stejný povrchový záporný náboj a v zónově elektroforetickém uspořádání se dělí podle molekulových hmotností.³

4.6.2 Praktické provedení metody- SDS-PAGE

Po všech chromatografiích byly vzorky analyzovány na SDS-PAGE. Rozměry gelu pro tuto elektroforézu byly 70x50 mm, tloušťka 0,75mm. Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrům pro SDS-elektroforézu v poměru 1:1. Před nanesením na gel se vzorky 5 minut povařily ve vodní lázni a centrifugovaly se 2 minuty při 12 000g. Poté byly vzorky naneseny na zaostřovací gel. Počáteční nastavení napětí bylo 80 V a proud na jeden gel byl 15 mA. Po 15 minutách se napětí zvýšilo na 120 V. Po skončení elektroforézy se gel nechal 20 minut v barvicím roztoku a poté byl odbarven.

4.7 Stanovení enzymové aktivity

V této práci byla aktivita měřena spektrofotometricky při vlnové délce 405 nm. Jako substrát byl použit p-nitrofenyl-*N*-acetyl- β -D-glukosamin. K 2,5 μ l vzorku bylo přidáno 25 μ l 5mM pNP-NAcGlc v 50mM citrátu sodném pH 5,0. Směs byla inkubována 10 minut. Poté byla reakce zastavena 150 μ l Na_2CO_3 . Vzniklý p-nitrofenyl je žlutě zbarven.

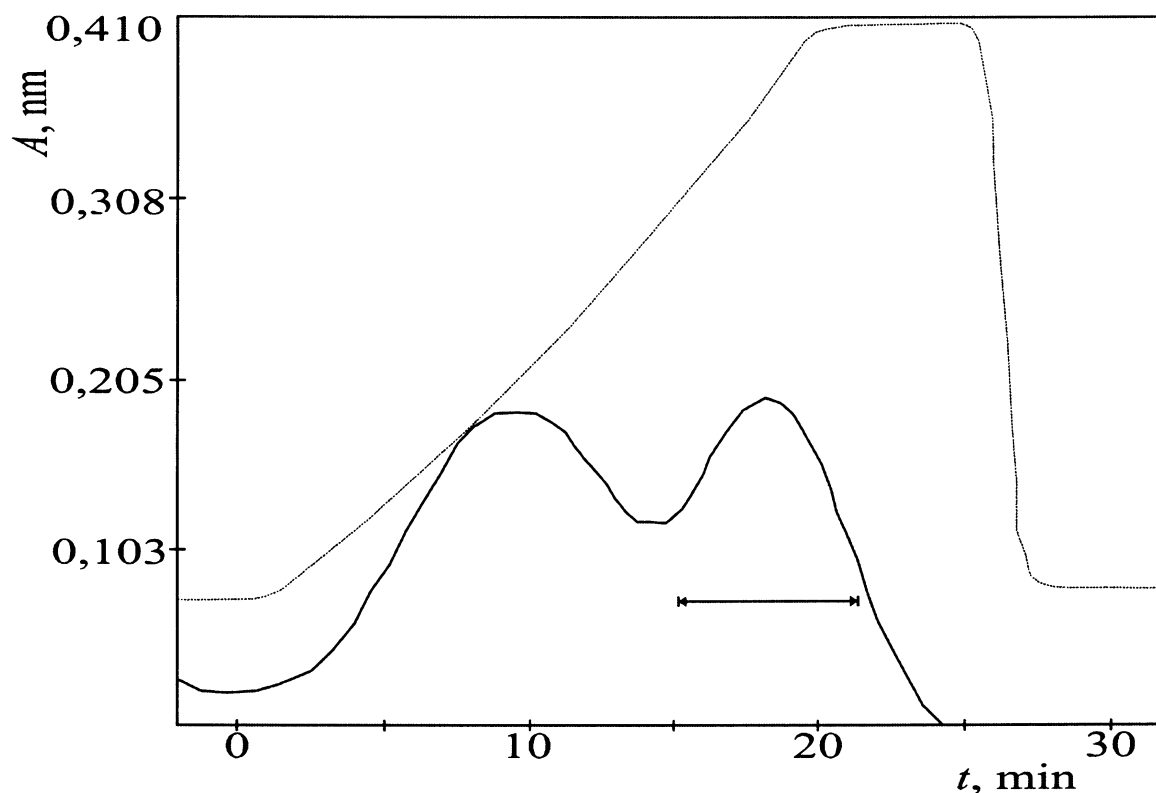
4.8 Deglykosylace enzymu

K β -*N*-acetylhexosaminidase, která byl rozpuštěna ve 20 μ l 50mM NaHCO_3 , byla přidána PNGasa štěpící *N*-glykany vázané katalytickou pojednotkou β -*N*-acetylhexosaminidasy .

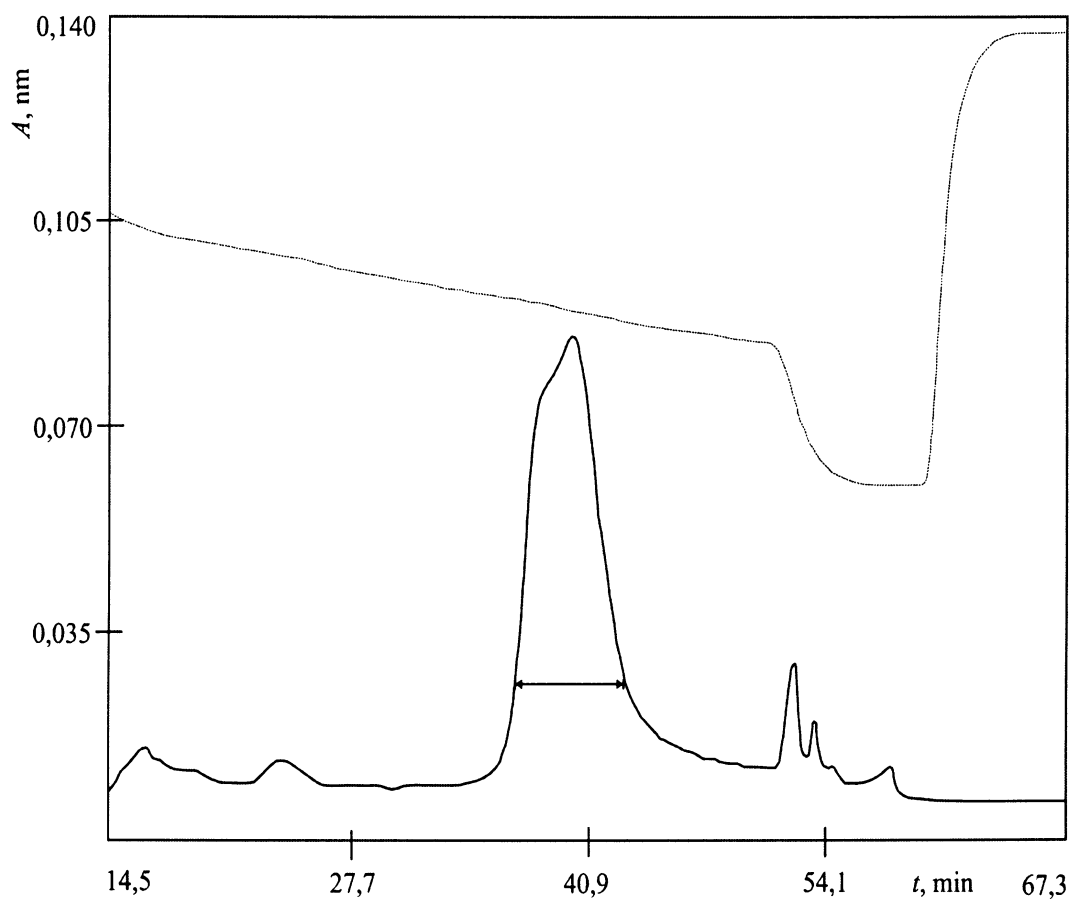
5 Výsledky

5.1 Purifikace β -N-acetylhexosaminidasy

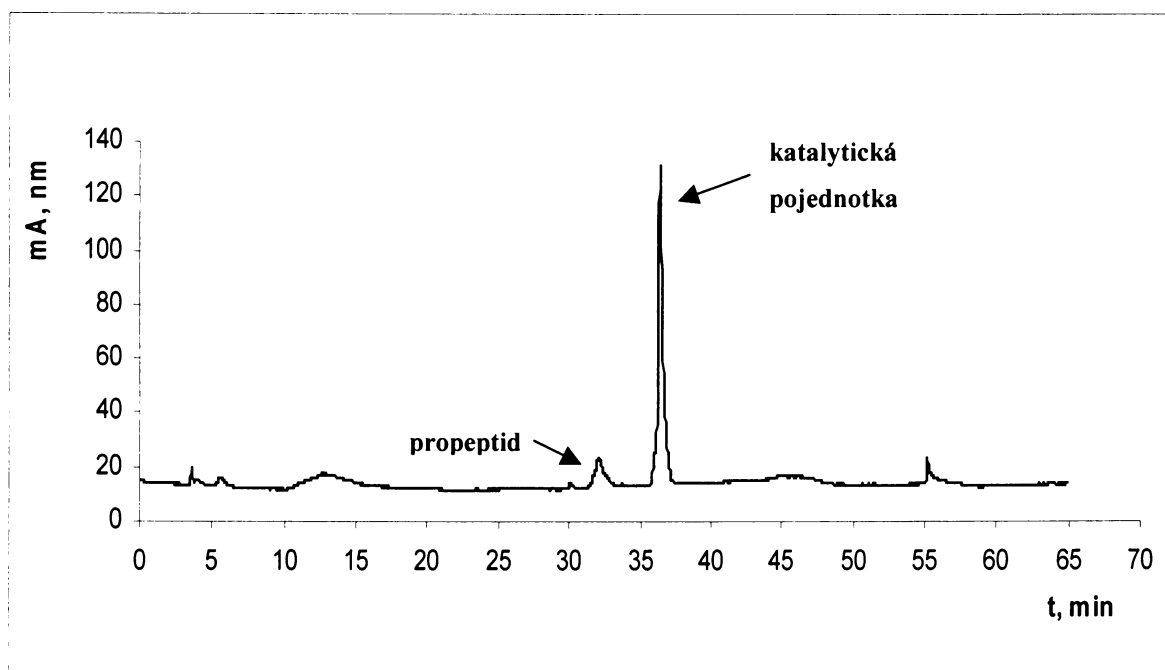
Po vysrážení proteinů z media síranem amonným a následně jejich rozpuštěním v 0,6 M síranu amonném byly vzorky separovány nejprve na koloně s hydrofobní interakcí, následně na koloně s iontoměničem a poslední separace byla provedena na koloně s reverzní fází kde byla oddělena katalytická podjednotka od propetidu. Ve frakcích byla stanovena aktivita na spektrofotometru se substrátem pNP-NAc-Glc.



Obr.1: Separace proteinů na koloně Phenyl-sepharosa. Absorbance byla měřena při vlnové délce 280nm. Aktivita β -N-acetylhexosaminasy byla mezi 15-24 minutou od začátku gradientu viz. šipka v grafu.



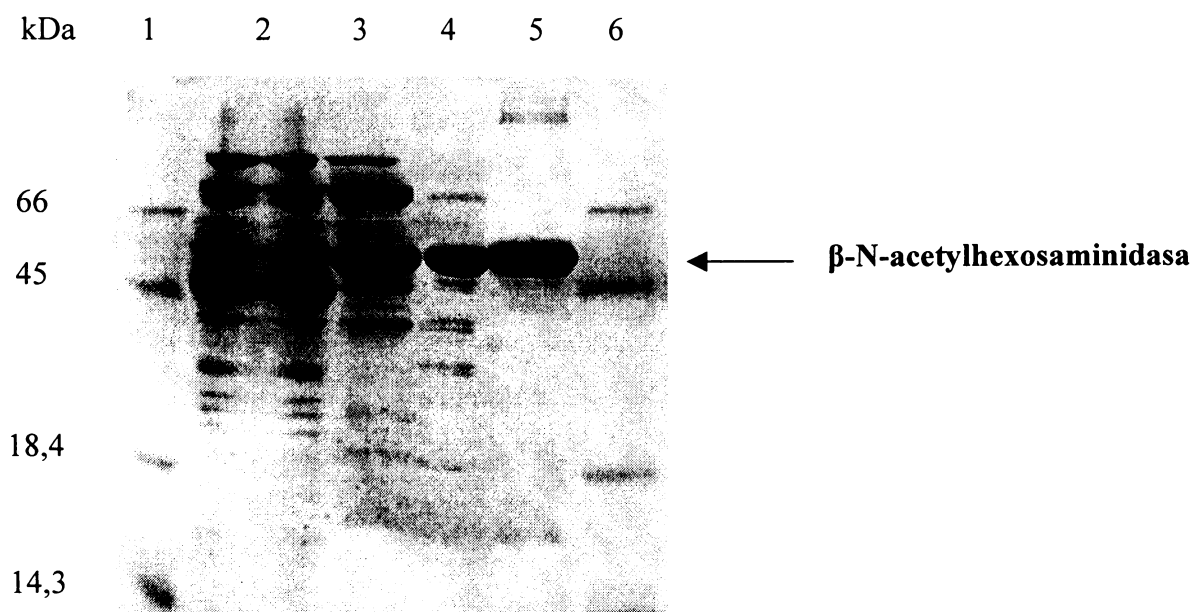
Obr.2: Separace proteinů na koloně MONO-Q. Absorbance byla měřena při vlnové délce 280nm. Aktivita β -N-acetylhexosaminasz byla mezi 35-44 minutou od začátku separace viz. šipka v grafu.



Obr.3: Separace proteinu na koloně Vydac C4. Absorbance byla měřena při vlnové délce 280nm. β -N-acetylhexosaminasa se eluovala mezi 36-38 minutou od začátku separace viz. šipka v grafu. Na této koloně došlo k oddělení katalytické pojednotky od propeptidu.

5.2 Elektroforéza v prostředí SDS

Po každé chromatografii byly vzorky pro kontrolu analyzovány SDS-elektroforezou. Stejně tak i vzorky po deglykosylaci byly analyzovány SDS-elektroforezou.



Obr.4: 12% polyakrylamidový gel s SDS, purifikace β-N-acetylhexosaminidasy.
Do dráhy 1-6 bylo naneseno 10 μl vzorku.

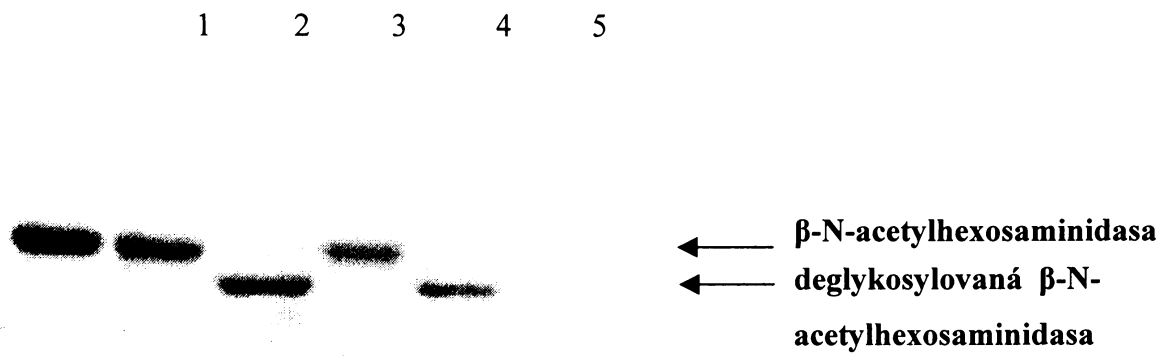
Dráha 1 a 6 proteinové standardy

2 původní vzorek před purifikací

3 vzorek po HIC

4 vzorek po IEC

5 vzorek po RPC



Obr.5: 12% polyakrylamidový gel s SDS

Deglykosylace β-N-acetylhexosaminidasy. Do dráhy 1-5 byly naneseny 2 μl vzorku. Dráha 1 standard hexosaminidasy

2 GN hexosaminidasa

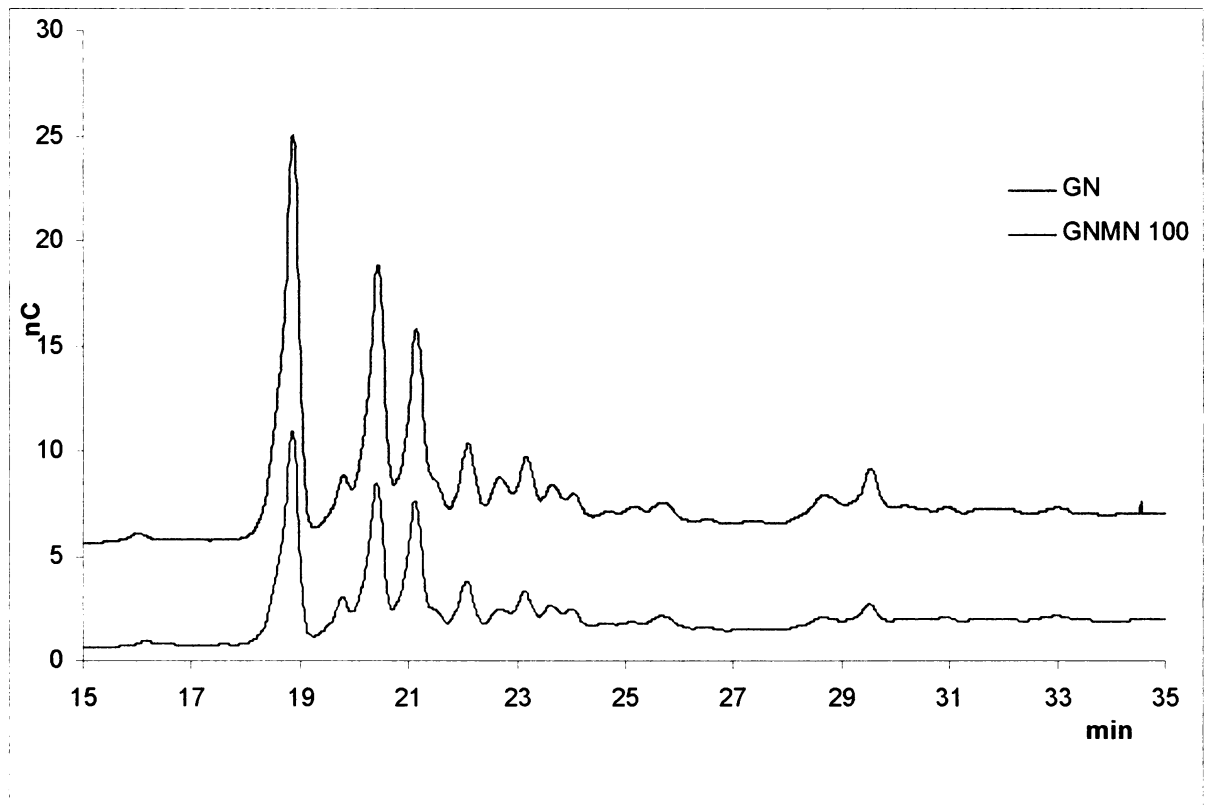
3 GN hexosaminidasa po deglykosylaci

4 GNMN 100 hexosaminidasa

5 GNMN 100 hexosaminidasa po deglykosylaci

5.3 Analýza N-vázaných oligosacharidů

β -N-acetylhexosaminidasa byla deglykosylována PNGasou. Odštěpené oligosacharidy byly analyzovány vysokokapacitní aniontovou chromatografií s pulsní amperometrickou detekcí. Tuto analýzu provedl Mgr. Jan Sklenář, PhD.



Obr.4: Separace N-vázaných oligosacharidů na koloně Carbpak PA-100 (Dionex). Glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy sekretované z *Aspergillus oryzae* který byl kultivován na dvou různých mediích byla naprosto shodná viz. graf:

červený chromatogram - glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy z media obsahující GNMN 100 .

modrý chromatogram - glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy z media obsahující GN.

6 Diskuze

Podnětem k této bakalářské práci byla nepublikovaná studie popisující různou rychlost sekrece β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* v závislosti na typu kultivačního media. V této studii bylo zjištěno, že na mediu obsahující N-acetylmannosamin dochází ke změně glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy i ke změně rychlosti její sekrece v testu typu „puls-chase“ s polyklonální protilátkou. Měření aktivity během kultivace tj. integrační hodnoty aktivity v mediu však dramatický rozdíl mezi těmito medii nepotvrdily.

Protože změna rychlosti sekrece proteinů resp. jeho množství v organelách glykosylačního aparátu vyvolala změnu v glykosylaci,³⁰ po devíti dnech, chtěli jsme potvrdit pozorování analýzou glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy kultivované na různých mediích i 48 hodin od indukce. Důvodem pro kratší kultivaci byla možná zvýšená indukce α -mannosidas, která by mohla přispívat ke změně glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy.

Ukázalo se, že glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy sekretované z media obsahující N-acetylglukosamin a z media obsahující oba monosacharidy (tj. N-acetylglukosamin a N-acetylmannosamin) byla naprosto shodná, což byl na rozdíl od předešlé práce překvapující výsledek. Tento výsledek jiné sekrece a glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy je pravděpodobně způsoben nestejným složením kultivačního media, zřejmě způsobující indukci α -mannosidas. Pozorované zvýšení rychlosti sekrece β -N-acetylhexosaminidasy není tak podpořeno změnou její glykosylace a mělo by být přehodnoceno.

7 Závěr

Závěrem bych výsledky této práce shrnula do několika bodů:

- Byla provedena izolace β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*, který byl kultivován na mediu obsahující N-acelmannosamin a N-acetylglukosamin v poměru 1:1 a na mediu obsahující N-acetylglukosamin. Izolace β -N-acetylhexosaminidasy byla provedena pomocí chromatografie s hydrofobní interakcí, iontoměničové chromatografie a chromatografie na reverzní fázi.
- Získaná β -N-acetylhexosaminidasy byla deglykosylována a následně byla provedena analýza N-vázaných oligosacharidů katalytickou podjednotkou β -N-acetylhexosaminidasy.
- Glykosylace β -N-acetylhexosaminidasy sekretované z media obsahující N-acetylglukosamin a z media obsahující N-acetylmannosamin byla naprosto shodná.
- Pokud dochází ke změně v rychlosti sekrece β -N-acetylhexosaminidasy na různých aminosacharidech, tato změna neovlivňuje glykosylaci tohoto enzymu.

Použitá literatura

1. Kalina, T.; Váňa, J.: *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*, Karolinum, Praha (2005)
2. Bednář, M.; Fraňková, V.; Schindler, J.; Souček, A.; Vávra, J.: *Lékařská mikrobiologie*, Marvil, Praha (1997)
3. Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*, Karolinum, Praha (2003)
4. Conesa, A.; Peter, J.; Punt, Nicole van Luijk.; Cees, A.M.J.J. van den Hondel: The Secretion Pathway in Filamentous Fungi: a Biotechnological View. *Fungal genetics and biology* **33**, 155-171 (2001)
5. Celestino, K.R.; Cunha, R.B.; Felix, C.R.: Characterization of a β -glucanase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, and its potential for application in the brewing industry. *BMC Biochemistry* **7**, 23 (2006)
6. Medina, M.L., Haynes, P.A., Breci, L., Francisco W.A.: Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteomics* **5**, 3153-3161 (2005)
7. Rast, D.; Horsch, M.; Futer, R.; Gooday, G.W.: A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function. *Journal of general microbiology* **137**, 2792-2810 (1991)
8. Pera, L.M.; Baigori, M.D.; Callieri, D.: Influence of Environmental Conditions on Hyphal Morphology in Pellets of *Aspergillus niger*: Role of β -N-Acetyl-D-Glucosaminidase. *Current microbiology* **39**, 65-67 (1999)
9. Plíhal, O.; Sklenář, J.; Hofbauerová, K.; Novák, P.; Pompach, P.; Kavan, D.; Ryšlavá, H.; Weignerová, L.; Charvátová-Pišvejcová, A.; Křen, V.; Bezouška, K.: Large propeptides of fungal beta-N-acetylhexosaminidases are novel enzyme regulators that must be intracellularly processed to control activity, dimerization, and secretion into the extracellular environment. *Biochemistry* **46**, 2719-2734 (2007)
10. Weignerová, L.; Rajnochová-Hermanová, E.; Křen, V.: Enzymová reverzní glykosylace. *Chemické listy* **93**, 781-787 (1999)
11. Horsch, M.; Mayer, C.; Sennhauser, U.; Rast, D.M.: β -N-Acetylhexosaminidase: a target for the design of antifungal agents. *Pharmacology & therapeutics* **76**, 187-218, (1997)

12. Yem, D.W.; Wu, H.C.: Purification and properties of β -N-acetylglucosaminidase from *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **125**, 324-331 (1976)
13. Godknecht, A., Honegger, T.G.: Isolation, characterization, and localization of a sperm-bound N-acetylglucosaminidase that is indispensable for fertilization in the ascidian, *Phallusia mammillata*. *Developmental biology* **143**, 398-407 (1991)
14. Jin, Y.L.; Jo, Y.Y.; Kim, K.Y.; Shim, J.H.; Kim, Y.W.; Park, R.D.: Purification and characterization of β -N-acetylhexosaminidase from rice seeds. *Journal of biochemistry and molecular biology* **35**, 313-319 (2002)
15. Oikawa, A.; Itoh, E.; Ishihara, A.; Iwamura, H.: Purification and characterization of β -N-acetylhexosaminidase from maize seedlings. *Journal of plant physiology* **160**, 991-999 (2003)
16. Jagadeesh, B.H.; Prabha, T.N.: β -hexosaminidase, an enzyme from ripening bell capsicum (*Capsicum annuum var variata*). *Phytochemistry* **61**, 295-300 (2002)
17. Aronson, N.N.; Jr.; Kuranda, M.J.: Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins. *The FASEB journal* **3**, 2615-2622 (1989)
18. Pocti, I.; Kiss, L.; Mañasi, P.: Studies on the N-acetyl- β -D-hexosaminidase B from germinating *Lupinus luteus* L. seeds. I. Purification and characterization. *Biochimica et biophysica acta* **1039**, 110-118 (1990)
19. Maier, T.; Strater, N.; Schuette, C.G.; Klingenstein, R.; Sandhoff, K.; Saenger, W.: The X-ray crystal structure of human β -hexosaminidase B provides new insights into Sandhoff disease. *Journal of molecular biology* **328**, 669-681 (2003)
20. Varki, A.; Cummings, R.; Esko, J.; Freeze, H.; Hart, G.; Marth, J.: Essentials of Glycobiology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York (1999)
21. Hounsell, E.F.; Davies, M.J.; Renouf, D.V.: O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconjugate journal* **13**, 19-26 (1996)
22. Grabenhorst, E.; Conradt, H.S.: The cytoplasmic, transmembrane, and stem regions of glycosyltransferases specify their in vivo functional sublocalization and stability in the Golgi. *The journal of biological chemistry* **274**, 36107-36116 (1999)
23. Kornfeld, R.; Kornfeld, S.: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry* **54**, 631-334 (1985)
24. Moremen, K.W.: Golgi alpha-mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals. *Biochimica et biophysica acta* **1573**, 225-235 (2002)

25. Man, P.; Bezouška, K.: Současné trendy v analýze eukaryotických proteinů, glykolů a lipidomů. *Chemické listy* **100**, 1084-1095 (2006)
26. Plíhal, O.; Sklenář, J.; Koníčková, J.; Man, P.; Pompach, P.; Havlíček, V.; Křen, V.; Bezouska, K.: N-glycosylated catalytic unit meets O-glycosylated propeptide: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase. *Biochemical society transactions* **32**, 764-765 (2004)
27. Zachara, N.E.; Hart, G.W.: O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochimica et biophysica acta* **1673**, 13-28 (2004)
28. Muntoni, F.; Brockington, M.; Torelli, S.; Brown, S.C.: Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Current opinion in neurology* **17**, 205-209 (2004)
29. Pavlíček, J.; Sopko B.; Ettrich, R.; Kopecký, V.; Baumruk V.; Man, P.; Havlíček V.; Vrbacký, M.; Martínková, L.; Křen, V.; Pospíšil, M.; Bezouška, K.: Molecular characterization of binding of calcium and carbohydrates by an early activation antigen of lymphocytes CD69. *Biochemistry* **42**, 9295-306 (2003)
30. Lipscomb, M.L.; Palomares, L.A.; Hernandez, V.; Ramirez, O.T.; Kompala, D.S.: Effect of production method and gene amplification on the glykosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells. *Biotechnology progress* **21**, 40-49 (2005)