

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

Přírodovědecká fakulta  
Katedra Biochemie

# **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**Purifikace a charakterizace penicilin-G-acylasy izolované  
z rekombinantní *Pichia pastoris* X33 (pPICPA1)  
a z donorového kmene *Escherichia coli* RE3**

**Vypracovala: Zdenka Marková**

**Vedoucí diplomové práce: RNDr. Pavel Kyslík, CSc.**

**Praha 2007**

## Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. P. Kyslíka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

**Místo a datum:**

PRAHA, 2 5 2007

**Podpis:**

Zdenka Maršová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu RNDr. Pavlu Kyslíkovi, CSc. za pomoc a podporu při práci v laboratoři, za cenné rady a korekturu této práce. Dále bych ráda poděkovala kolegyni RNDr. Heleně Marešové, CSc. za cenné rady, odbornou pomoc a trpělivost a celému kolektivu z Laboratoře enzymových technologií MBÚ AVČR za cenné rady a pomoc.

Dále bych ráda poděkovala panu Janu Sklenářovi, PhD. za analýzu vzorků pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS.

Mé poděkování patří také mému bratru Vítkovi Markovi za pomoc při řešení problémů, pomoc při grafické úpravě a konečnou korekci této práce.

Především chci ale poděkovat mým rodičům za umožnění studia a za jejich lásku a podporu a ráda bych jim proto tuto práci věnovala.

## Seznam zkratk a symbolů

AOX1	alkoholoxidas 1
AMK	aminokyselina/y
6-APA	6-aminopenicilánová kyselina
BCA	bicinchoninová kyselina
CYSEP	flokulační činidlo obsahující kvartérní amin
DTT	dithiotreitol
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
kDa	kilodalton
$K_m$	konstanta Michaelise-Mentenové
$k_{cat}$	katalytická konstanta
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionisation – time-of-flight mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
MG	základní médium
MW	molekulová hmotnost
NIPAB	6-nitro-3-fenylacetylamidobenzoová kyselina
OD <sub>600</sub>	optická hustota suspenze
PAA	fenyloctová kyselina
pDAB	<i>p</i> -dimethylaminobenzaldehyd
PGA	penicilin-G-acylasa
PGA <sup>EC</sup>	penicilin-G-acylasa získaná fermentací <i>Escherichia coli</i>
PGA <sup>PP</sup>	penicilin-G-acylasa získaná fermentací <i>Pichia pastoris</i>
<i>pga, pac</i>	gen kódující PGA
PTM	roztok stopových prvků
PVA	penicilin-V-acylasa
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute) (180 rpm = 0,33 Hz)
SDS	dodecylsulfát sodný
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	jednotka enzymové aktivity (1U = 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )
$V_{max}$	maximální rychlost reakce
YPD	médium

# OBSAH

<b>1 Úvod</b> .....	9
<b>2 Literární přehled</b> .....	10
2.1 Penicilinacylasy – rozdělení.....	10
2.1.1 Penicilin–G–acylasy.....	10
2.1.2 Penicilin–V–acylasy.....	11
2.1.3 $\alpha$ –aminoacidesterhydrolasy .....	12
2.2 Penicilin–G–acylasy z <i>E. coli</i> .....	13
2.2.1 Podjednotková struktura.....	13
2.2.2 Gen kódující PGA-regulace jeho exprese.....	13
2.2.3 Posttranslační skládání PGA.....	14
2.3 Chemické vlastnosti PGA.....	17
2.3.1 Struktura vazebného místa PGA z <i>E. coli</i> .....	17
2.3.2 Katalýza hydrolytického štěpení substrátu.....	18
2.3.3 Syntetické vlastnosti PGA.....	18
2.4 Komerční využití PGA.....	19
2.5 Strategie pro zvýšení produkce PGA .....	20
2.6 Použití kvasinek jako hostitele pro <i>pga</i> gen.....	21
2.7 <i>Pichia pastoris</i> .....	22
2.7.1 Výhody a nevýhody <i>P. pastori</i> :.....	23
2.7.2 Posttranslační modifikace proteinů exprimovaných <i>P. pastoris</i> .....	23
<b>3 Cíl práce</b> .....	25
<b>4 Materiál</b> .....	26
4.1 Chemikálie.....	26
4.2 Antibiotika a substráty enzymů pro spektrofotometrické stanovení aktivity .....	27
4.3 Standarty molekulových hmotností pro SDS – elektroforézu.....	27
4.4 Komerční soupravy.....	27
4.5 Pufry a roztoky.....	28
4.5.1 Univerzální Brittonův–Robinsonův pufr pro stanovení pH optima	

a pH stability.....	28
4.5.2 Roztoky pro SDS–elektroforézu v polyakrylamidovém gelu.....	28
4.5.3 Mikroorganismy, kultivační média a zásobní roztoky.....	29
4.6 Přístroje a software.....	30
4.6.1 Přístroje.....	30
4.6.2 Laboratorní míchaný bioreaktor a příslušenství .....	31
4.6.3 Software.....	32
<b>5 Metody a pracovní postupy.....</b>	<b>33</b>
5.1 Kultivace kvasinky <i>Pichia pastoris</i> .....	33
5.1.1 Příprava inokula.....	33
5.1.2 Kultivace v laboratorním míchaném bioreaktoru (přítokovaná kultivace s vysokým nárůstem biomasy) .....	33
5.2 Stanovení koncentrace biomasy.....	35
5.3 Stanovení suché hmotnosti biomasy.....	35
5.4 Příprava bezbuněčného extraktu pro stanovení aktivity .....	35
5.5 Dezintegrace buněk narostlých v bioreaktoru .....	35
5.5.1 Dezintegrace pomocí dezintegrátoru Manton Gaulin.....	35
5.5.2 Dezintegrace pomocí balotín.....	36
5.6 Srážení balastních bílkovin.....	36
5.7 Selektivní srážení síranem amonným.....	36
5.8 Separační metody - vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	37
5.8.1 Chromatografie na koloně s náplní DEAE–fraktogelu.....	37
5.8.2 Chromatografie na koloně s náplní hydroxyapatitu.....	37
5.8.3 Gelová chromatografie .....	38
5.9 Elektroforéza v prostředí SDS.....	38
5.9.1 Barvení proteinů v gelu.....	39
5.10 Stanovení aktivity a substrátové specifity PGA.....	39
5.10.1 Stanovení aktivity – spektrofotometricky.....	39

5.10.1.1 Stanovení aktivity pro substráty penicilin G, penicilin V, ampicilin, amoxicilin, cefalexin.....	39
5.10.1.2 Stanovení aktivity pro substrát NIPAB.....	40
5.10.1.3 Stanovení aktivity pro substrát fenylacetamid.....	41
5.10.2 Stanovení aktivity PGA na titrátoru.....	41
5.11 Stanovení koncentrace proteinů .....	42
5.12 Stanovení teplotní stability PGA.....	42
5.13 Stanovení pH stability PGA .....	42
5.14 Stanovení teplotního optima hydrolýzy penicilinu G katalyzované PGA .....	43
5.15 Stanovení pH optima hydrolýzy penicilinu G katalyzované PGA.....	43
5.16 Stanovení substrátové specifity PGA.....	43
5.17 Stanovení kinetických parametrů hydrolytických reakcí katalyzovaných PGA...44	
5.18 Analýza podjednotek PGA <sup>EC</sup> a PGA <sup>PP</sup> pomocí MALDI–TOF MS.....	45
<b>6 Výsledky.....</b>	<b>46</b>
6.1 Příprava částečně purifikované PGA z <i>Escherichia coli</i> RE3(pKA18) .....	46
6.2 Kultivace <i>Pichia pastoris</i> X33(pPIC–PA1) .....	46
6.3 Purifikace PGA <sup>EC</sup> .....	50
6.3.1 Srážení PGA pomocí síranu amonného (1. krok).....	50
6.3.2 Chromatografie na DEAE – fraktogelu (2. krok).....	50
6.3.3 Chromatografie na koloně s náplní hydroxyapatitu (3. krok) .....	50
6.3.4 Gelová filtrace (4. krok) .....	51
6.4 Purifikace PGA <sup>PP</sup> .....	51
6.4.1 Odstranění části proteinů pomocí flokulačního činidla CYSEP (1. krok) ....	52
6.4.2 Srážení PGA pomocí síranu amonného (2. krok) .....	52
6.4.3 Chromatografie na DEAE–fraktogelu (3. krok) .....	53
6.5 Ověření čistoty PGA po jednotlivých krocích purifikace pomocí SDS–elektroforézy .....	54
6.6 Odhad molekulových hmotností podjednotek PGA <sup>EC</sup> a PGA <sup>PP</sup> .....	58
6.7 Analýza podjednotek PGA <sup>EC</sup> a PGA <sup>PP</sup> pomocí MALDI–TOF MS .....	58
6.8 Charakterizace a porovnání PGA <sup>EC</sup> a PGA <sup>PP</sup> .....	61
5.8.1 Stanovení pH stability PGA <sup>EC</sup> a PGA <sup>PP</sup> .....	62

6.8.2	Teplotní stabilita $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$ .....	63
6.8.3	pH optimum pro aktivity $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$ .....	64
6.8.4	Teplotní optimum $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$ .....	65
6.8.5	Substrátová specifita $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$ .....	66
6.8.6	Stanovení kinetických parametrů $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$ pro substráty penicilin G a NIPAB .....	66
<b>7</b>	<b>Diskuse</b> .....	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Přehled použité literatury</b> .....	<b>77</b>



# 1 ÚVOD

Penicilinacylasa patří mezi enzymy, které mají významné uplatnění ve farmaceutickém průmyslu. Tento enzym byl popsán v 60. letech minulého století a doposud je nenahraditelným prvkem ve výrobě semisyntetických  $\beta$ -laktamových antibiotik. Jeho význam spočívá v enzymatické konverzi přírodních penicilínů na klíčové meziproducty výroby semisyntetických  $\beta$ -laktamových antibiotik, kyselinu 6-aminopenicilánovou a kyselinu 7-aminodeacetoxycefalosporánovou. Z těchto meziproductů se dále připravují buď chemickou, nebo enzymatickou syntézou deriváty antibiotik, které vykazují v porovnání s přírodními peniciliny výrazně lepší antibiotické vlastnosti jako je širší spektrum účinku, vyšší účinek na mikroorganismy či nižší toxicita.

Význam tohoto enzymu v poslední době vzrůstá v souvislosti s celosvětovým trendem pro vývoj a využití bioprocésů, které mají nahradit ekologicky nešetrné chemické postupy. K získání enzymů pro průmyslové využití se běžně využívá rekombinantních mikroorganismů. Navíc, za použití vhodného hostitele, může dojít i ke zlepšení chemických vlastností enzymu například posttranslačními modifikacemi. V současné době se pro expresi rekombinantních proteinů hojně začínají využívat methylotrófní kvasinky, jejichž kultivace jsou obdobně jako u bakterií jednoduché a navíc poskytují vysoké výtěžky a dobré expresní podmínky.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

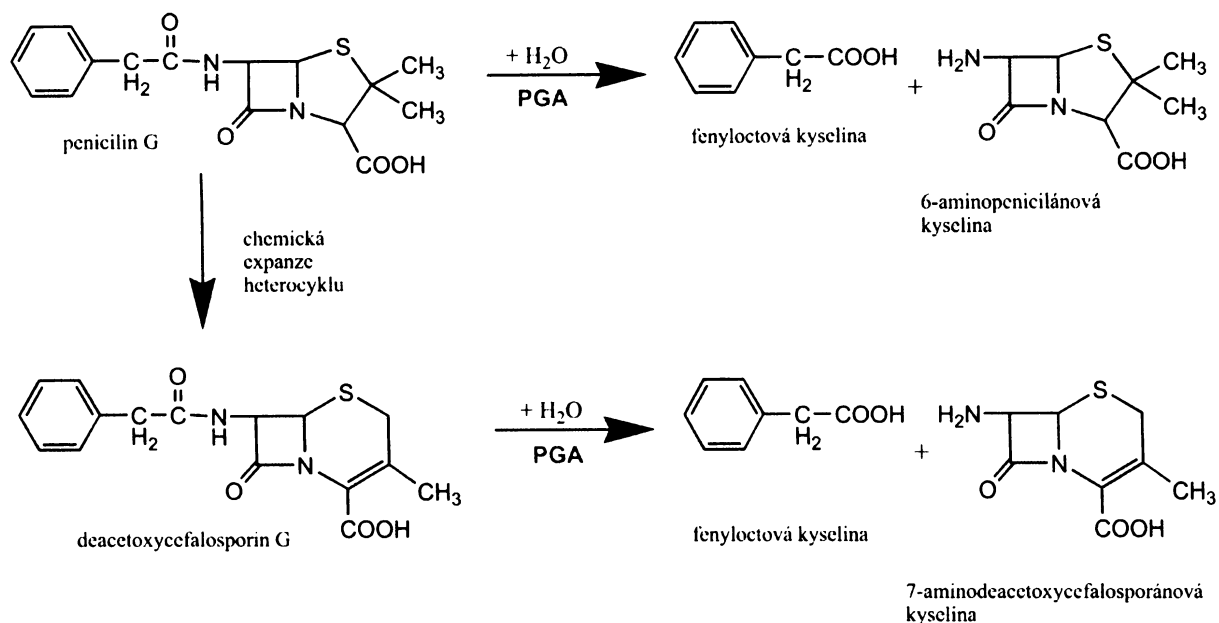
### 2.1 Penicilinacylasy – rozdělení

Oficiálním názvem této skupiny enzymů podle nomenklatury je penicilinaminohydrolasy (EC 3.5.1.11), ale jsou používány i neoficiální názvy jako penicilinacylasy nebo penicilinamidasy. Penicilinacylasy patří do skupiny enzymů N-koncových hydrolas. Původně byly penicilinacylasy děleny do tří skupin podle jejich preferovaného substrátu: (i) penicilin-G-acylasy (PGA), které přednostně hydrolyzují penicilin G, (ii) penicilin-V-acylasy (PVA), které přednostně hydrolyzují penicilin V a (iii) ampicilinacylasy štěpící ampicilin [1]. V současné době jsou však ampicilinacylasy zařazeny do skupiny enzymů  $\alpha$ -aminoacidesterhydrolas, které mají odlišné zařazení (EC 3.1.1.43) [2].

#### 2.1.1 Penicilin-G-acylasa

Penicilin-G-acylasa (PGA, EC 3.5.1.11) je enzym, který má nejvyšší afinitu k sloučeninám s amidově vázaným fenylacetátem, který hydrolyticky odštěpuje. PGA má významné postavení mezi penicilinacylasami díky průmyslovému použití v hydrolýze penicilinu G. Molekula penicilinu G se skládá z 6-aminopenicilánové kyseliny (6-APA), k jejíž 6-aminové skupině je amidovou vazbou vázána kyselina fenylactová (PAA). Hlavním významem je získání právě 6-APA, která je dále využívána v produkci semisyntetických penicilinů, které vznikají různou kombinací postranních řetězců a  $\beta$ -laktamových jader [3–5]. 6-APA může být získávána nejen enzymatickou deacetylací přírodního penicilinu G, ale také deacetylací chemickou [1].

PGA je enzym využíváný také v průmyslové přípravě 7-aminodeacetoxycefalosporánové kyseliny konverzí deacetoxycefalosporinu G, který se připravuje z penicilinu G chemickou modifikací (obr. 1, str. 11). Princip modifikace spočívá v expanzi pětičlenného heterocyklu na šestičlenný heterocyklus, přičemž celý postup zahrnuje několik kroků [6].



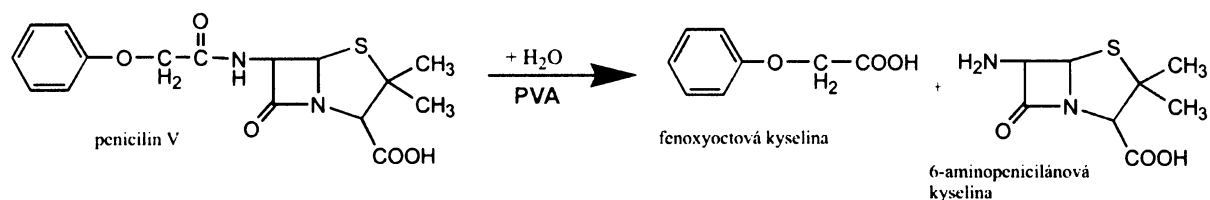
**Obr. 1:** Hydrolýza penicilinu G a deacetoxycefalosporinu G pomocí PGA

V přírodě se PGA nachází v různých organismech a poprvé byla izolována z *Penicillium chrysogenum* Q176 [1]. Od této doby byla její přítomnost nalezena také v jiných mikroorganismech, a to gram–negativních a gram–pozitivních bakteriích, kvasinkách i plísních [4]. PGA produkovaná gram–negativními bakteriemi jako je *Escherichia coli* (*E. coli*), *Kluyvera citrophila*, *Providencia rettgeri* a *Alcaligenes faecalis* se akumuluje v periplazmatickém prostoru, zatímco gram–pozitivní bakterie (*Bacillus megaterium*, *Arthrobacter viscosus*) ji sekretují. Úloha PGA v mikroorganismech není zcela jasná, ale předpokládá se, že PGA je zahrnuta do degradace fenylacetylových složek sloučenin pro vznik fenyloctové kyseliny, která může být použita jako zdroj uhlíku [7].

### 2.1.2 Penicilin–V–acylasa

Penicilin–V–acylasa (PVA, EC 3.5.1.11) vykazuje nejvyšší afinitu k sloučeninám s amidově vázanou skupinou fenoxycetátu (obr. 2, str. 12). PVA produkované různými mikroorganismy (bakterie, kvasinky, vláknité houby) mají odlišné molekulární struktury podjednotek, na rozdíl od PGA, která je vždy sekretována jako heterodimer. PVA mají také důležitý význam v průmyslu, neboť konverzí penicilinu V katalyzovanou PVA se

získává zhruba 15 % světové produkce 6-APA. Navíc má PVA obdobné využití jako PGA ve výrobě 7-aminodeacetoxycefalosporánové kyseliny konverzí deacetoxycefalosporinu V [6].

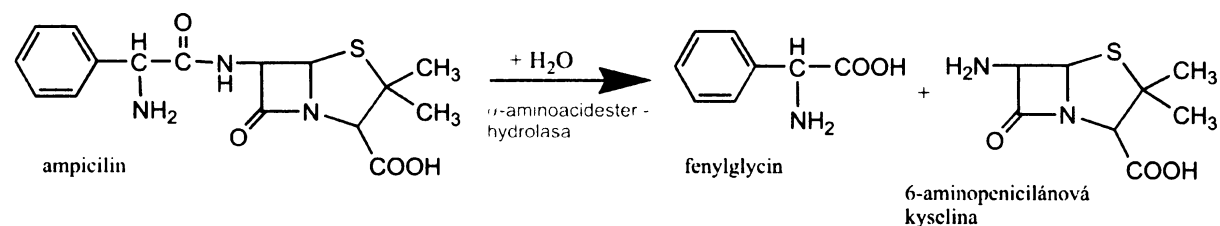


**Obr. 2:** Hydrolýza penicilinu V pomocí PVA

### 2.1.3 $\alpha$ -aminoacidesterhydrolasa

Některé enzymy patřící mezi  $\alpha$ -aminoacidesterhydrolasy (EC 3.1.1.43) byly dříve řazeny pod penicilinacylasy.  $\alpha$ -aminoacidesterhydrolasy obecně katalyzují přenos acylové skupiny z esteru  $\alpha$ -aminokyseliny na  $\text{H}_2\text{O}$ , avšak někteří zástupci z této skupiny jsou schopni hydrolyzovat a syntetizovat  $\beta$ -laktamová antibiotika nesoucí  $\alpha$ -aminoacyl (obr. 3). Takovými antibiotiky jsou například ampicilin, amoxicilin či cefalexin. Právě pro tuto vlastnost byly některé z těchto enzymů dříve řazeny pod skupinu penicilinacylas.

První enzym tohoto druhu byl nalezen v bakterii *Pseudomonas melanogenum* IFO 12020 [8] a byl původně pojmenován ampicilinacylasa díky své vlastnosti štěpit ampicilin, zatímco penicilin G ani penicilin V štěpit nedokázal.



**Obr. 3:** Hydrolýza ampicilinu pomocí  $\alpha$ -aminoacidesterhydrolasy

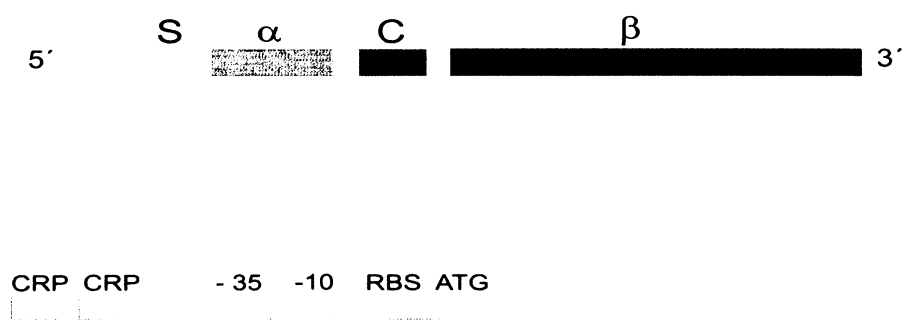
## 2.2 Penicilin–G–acylasa z *E. coli*

### 2.2.1 Podjednotková struktura:

PGA z *E. coli* je periplazmatický enzym, který je složen ze dvou neidentických podjednotek  $\alpha$  (23,8 kDa) a  $\beta$  (62,2 kDa) s nezávislou a odlišnou funkcí [9, 10, 11]. Tyto dvě heterologní podjednotky, které dávají vznik aktivní molekule, vznikají z polypeptidového prekurzoru o velikosti přibližně 95 kDa [12] a jsou drženy pohromadě hydrofóbními interakcemi [13].  $\alpha$  ani  $\beta$ -podjednotka nemají vlastní enzymovou aktivitu a pouze poskládání obou podjednotek do správné konformace poskytuje aktivní formu molekuly [14, 15]. Kinetické a biochemické studie odhalily, že malá podjednotka tohoto enzymu obsahuje vazebné místo pro postranní řetězec a udává tak substrátovou specifitu, zatímco velká podjednotka hraje důležitou úlohu v katalytické aktivitě [11].

### 2.2.2 Gen kódující PGA–regulace jeho exprese

Gen kódující PGA, označován jako *pga* [16] nebo *pac* [3, 17], je tvořen 4 strukturálními doménami: nukleotidy 1–78 kódují signální peptid, 79–705 kódují  $\alpha$ -podjednotku, 706–867 kódují spacer („spojovací“ peptid) a 868–2538 kódují  $\beta$ -podjednotku. Schematická mapa oblasti kódující penicilin–G–acylasu je uvedena na obr. 4 [4].



**Obr. 4:** Struktura *pga* genu a jeho regulační oblasti. 5' regulační oblast obsahuje 2 domnělé **CRP** vazebná místa. Oblast -35 až -10 označuje promotorovou sekvenci, **RBS** je místem vazby ribozomu a **ATG** značí translační iniciační kodon. **S** značí oblast kódující signální peptid, **C** spacer,  $\alpha$  malou podjednotku a  $\beta$  velkou podjednotku.

Exprese *pga* genu je regulována teplotou, mechanismy katabolické represe a indukci fenyloctovou kyselinou [18, 19]. Maximum hladiny PGA je dosaženo při růstu buněk při teplotě nižší než 29°C [20], zatímco při 37°C je syntéza PGA nízká. Je to pravděpodobně způsobeno citlivostí posttranslačních úprav na teplotu [21], protože samotný enzym je nad 37°C velmi aktivní.

### 2.2.3 Posttranslační skládání PGA

Posttranslační skládání PGA bylo zkoumáno mnoha skupinami [9–11, 13–15, 17]. PGA je syntetizována jako **preproprotein**, který je katalyticky inaktivní a je proteolyticky upraven k vytvoření aktivního enzymu majícího dvě podjednotky. Charakteristiky komponent prekurzoru polypeptidu PGA z *E. coli* [14]:

signální peptid: 26 AMK

$\alpha$ -podjednotka: 209 AMK

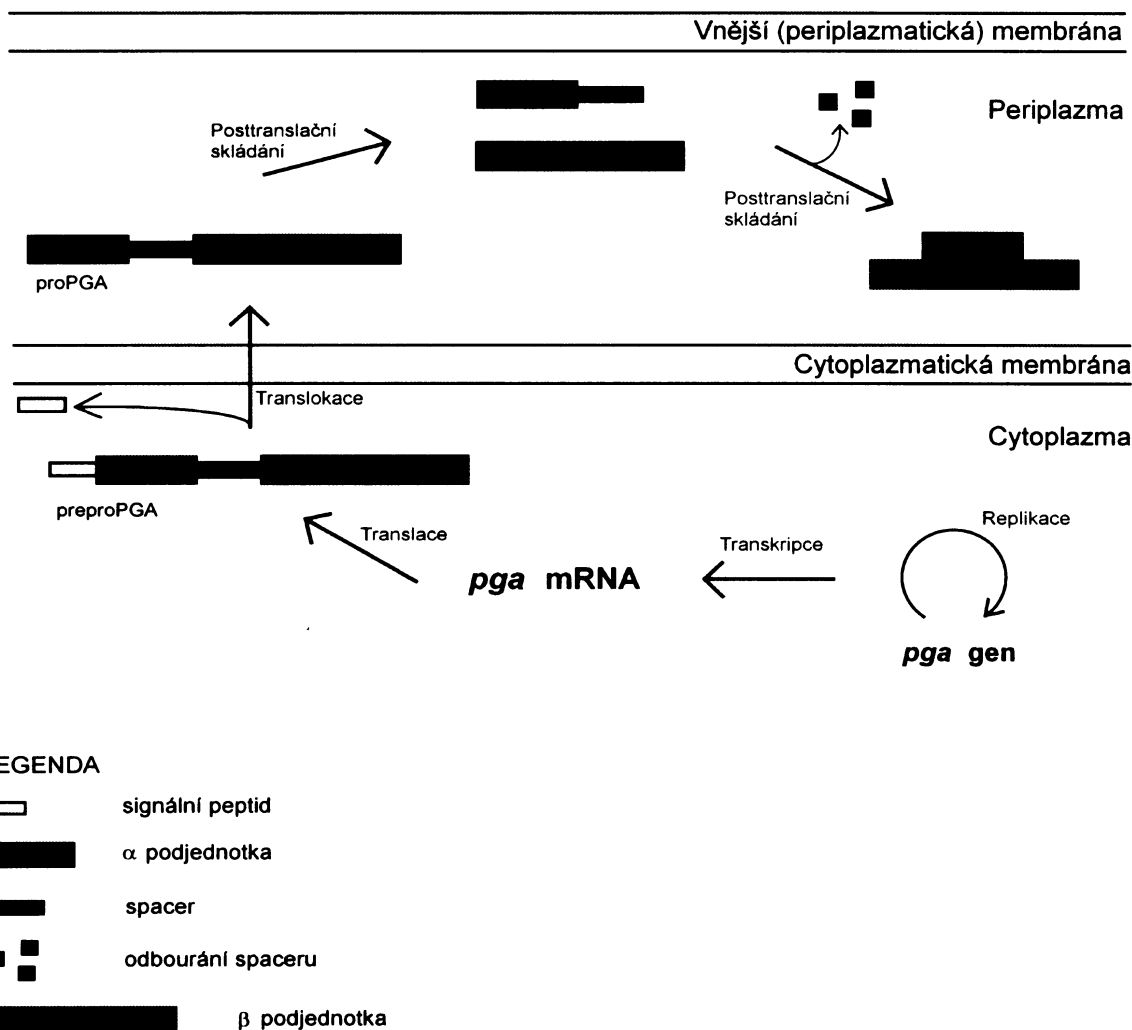
spacer: 54 AMK

$\beta$ -podjednotka: 557 AMK

Prekurzor polypeptidu PGA se skládá ze čtyř strukturních domén. Od N-konce to jsou: signální sekvence,  $\alpha$ -podjednotka, spacer („spojovací“ peptid) a  $\beta$ -podjednotka. Každá z těchto domén hraje rozhodující úlohu v transportu, posttranslační úpravě a tvorbě funkčního enzymu. Rolí signálního peptidu je umožnit transport celého PGA prekurzoru do periplazmatického prostoru. Prekurzorový polypeptid bez signální sekvence je akumulován v cytoplazmě [14, 15, 17].  $\alpha$ -podjednotka hraje klíčovou roli při skládání prekurzoru polypeptidu. Předpokládá se, že  $\alpha$ -podjednotka se skládá jako první a  $\beta$ -podjednotka se formuje na již dobře poskládané  $\alpha$ -podjednotce překrytím jejich hydrofóbních řetězců za vzniku stabilního globulárního intermediátu [22]. Stabilitu tohoto procesu podporují navázané ionty  $\text{Ca}^{2+}$  [23]. Spacer, který kovalentně spojuje  $\alpha$  a  $\beta$ -podjednotku se též podílí na jejich správném poskládání. Experimentálně bylo potvrzeno, že významné změny ve velikosti spaceru mají za následek vznik neaktivního enzymu [16, 24]. Nepoškozenost C-konce  $\beta$ -podjednotky je také klíčový požadavek pro proteolytické skládání prekurzoru. Ztráta několika aminokyselinových zbytků na tomto konci má za následek částečnou nebo kompletní blokaci skládání a akumulaci propeptidu [25].

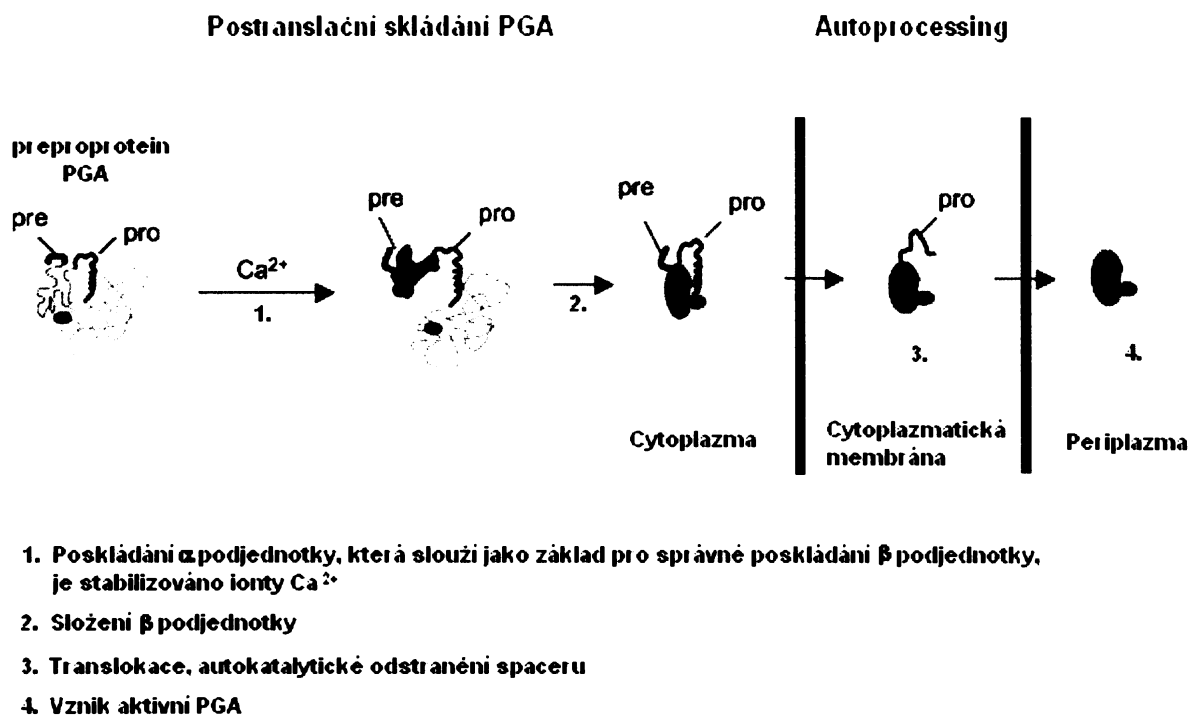
Proces formování aktivního enzymu obecně zahrnuje následující body (obr. 5):

- (i) syntéza prepropeptidu PGA obsahující sekvence pro signální peptid,  $\alpha$ -podjednotku, spacer,  $\beta$ -podjednotku *pga* genu,
- (ii) transport prepropeptidu PGA do periplazmatického prostoru a odštěpení signálního peptidu,
- (iii) autokatalytické odštěpení spaceru na N-konci  $\beta$ -podjednotky. Aktivní místo pro toto proteolytické štěpení se nachází přímo na prekurzoru PGA [25]. Pro aktivní enzym je nezbytné štěpení peptidové vazby mezi threoninem T289 a serinem S290,
- (iv) odstranění spaceru z  $\alpha$ -podjednotky sekvenčním C-koncovým proteolytickým procesem v minimálně třech krocích [26].



Obr. 5: Syntéza a posttranslační úpravy preproproteinu a vznik funkční PGA v *E. coli*

Skládání a autokatalytické procesy PGA jsou časově oddělené. Pouze po ustanovení stabilní nativní konformace může hydrolázová doména být aktivní a umožnit autoproteolytické štěpení. V divokém kmeni *E. coli* jsou skládání a tvorba aktivní molekuly PGA oddělené do různých buněčných prostor. Zatímco skládání propeptidu se odehrává v cytoplazmatickém prostoru, při transportu přes cytoplazmatickou membránu do periplazmy je PGA již poskládaná a dokončení a odstranění spaceru je až po vstupu do periplazmatického prostoru (obr. 6). PGA se stává aktivní až po dosažení konečné destinace [23].



**Obr. 6:** Umístění jednotlivých kroků posttranslačních úprav v *E. coli*

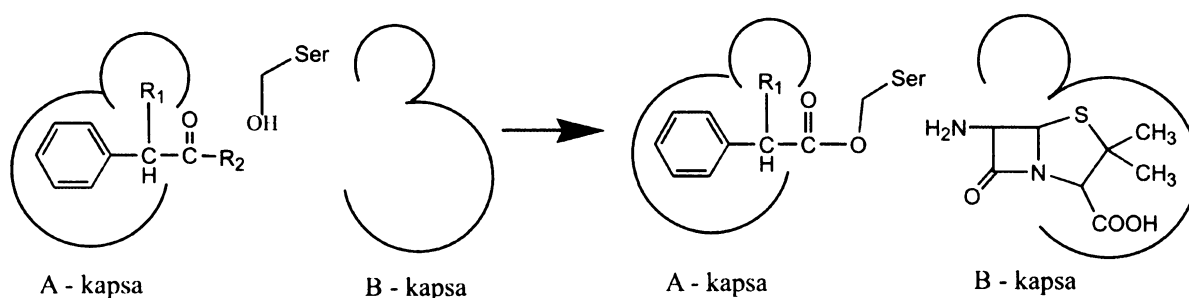


## 2.3 Chemické vlastnosti PGA

Ačkoli hlavní průmyslové použití PGA je v produkci 6-APA katalýzou hydrolyzy penicilinu G [1], může být použita i v jiných biotechnologických aplikacích, jako je syntéza antibiotik a jiných molekul s amidovými vazbami [27–30].

### 2.3.1 Struktura vazebného místa PGA z *E. coli*

Struktura aktivního místa je dána správnou konformací  $\alpha$  a  $\beta$ -podjednotky PGA. Na základě substrátové specifity byl navržen model aktivního místa PGA z *E. coli* [30]. To se skládá z A-kapsy („acyl binding pocket“) a N-kapsy („nucleophile binding pocket“) a jeho schéma je zobrazeno na obr. 7. Vazebné místo PGA pro acylovou skupinu je uloženo v A-kapse, která je tvořena hydrofóbními zbytky dávajícími enzymu vysokou specifitu právě pro fenyloctovou skupinu penicilinu G. A-kapsa obsahuje i rozeznávací místo pro R1 substituent na  $\alpha$ -uhlíku a akceptuje zde skupiny  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$  a  $-\text{CH}_3$ . PGA je obecně schopna hydrolyzovat i jiné amidy s obecnou strukturou  $\text{R}-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}'$ . A-kapsa preferuje acylové zbytky R hydrofóbního charakteru. Zbytek R', jenž je akceptován N-kapsou, může náležet do široké skupiny molekul od velkých  $\beta$ -laktamových struktur až po malé molekuly jako jsou alkoholy, aminy a aminokyseliny. Tato odcházející skupina substrátu má minimální efekt na rychlost hydrolyzy [32].



**Obr. 7:** Schéma aktivního místa PGA z *E. coli*

Širší substrátová specifita PGA vedla k rozšíření nových aplikací tohoto enzymu jako biokatalyzátoru pro rozklad alkoholů, hydroxyaminových kyselin, aminokyselin a pro ochranu fenyloctové skupiny při peptidových syntézách. PGA také může rozdělit

recematické směsi chirálních složek a vykazuje stereochemické rozlišení mezi příslušnými enantiomery v hydrolytickém odštěpení fenyloctové kyseliny z  $\alpha$ -aminoalkylfosforových kyselin,  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -aminokarboxylových kyselin, cukrů, amidů, peptidů a esterů fenyloctové kyseliny [33]. PGA z *E. coli* je také enzymem majícím možné aplikace jako biokatalyzátor v organických syntézách pro získání enantiomericky čistých sloučenin [34].

### 2.3.2 Katalýza hydrolytického štěpení substrátu

V enzymové katalýze je PGA členem skupiny enzymů nazývaných N-koncové nukleofilní aminohydrolázy [35-39]. U toho typu enzymů hraje důležitou roli při katalýze N-koncová aminokyselina. PGA má na N-konci  $\beta$ -podjednotky serinový zbytek Ser  $\beta$ 1, který má roli nukleofilu a je podstatný pro enzymovou katalýzu [14, 40]. Tento fakt byl potvrzen experimentem, při němž substituce Ser  $\beta$ 1 na pozici 290 cysteinem měla za následek inaktivaci enzymové aktivity, i když složení molekuly do konečné konformace proběhlo správně [34].

V PGA katalyzované hydrolýze se nukleofilní Ser  $\beta$ 1 sám aktivuje pomocí vlastní aminoskupiny, a poté napadá karbonylový uhlík amidové vazby substrátu za vytvoření tetraedreálního intermediátu, který je stabilizován vazbou na asparagin  $\beta$ 241 a alanin  $\beta$ 69. Přeskupením vazeb je následně uvolněna 6-APA za vzniku intermediátu acyl-enzym. Tento komplex je poté hydrolyzován vodou za uvolnění PAA a regenerace aktivního místa [5, 35].

### 2.3.3 Syntetické vlastnosti PGA

Některé PGA nekatalyzují pouze hydrolýzy, ale při nižších pH také katalyzují reverzní reakce startující z 6-APA [18]. PGA má totiž také schopnost přenášet acylovou skupinu z esterů, amidů nebo kyselin na akceptory jako jsou alkoholy, aminy nebo voda. Tato schopnost enzymu je dána serin-proteasovou aktivitou PGA a schopností tvořit komplex acyl-enzym [4]. Díky reverzibilitě celého procesu jsou však výtěžky těchto reakcí katalyzovaných PGA poměrně nízké [18]. Obecně lze říci, že semisyntetické peniciliny jsou produkovány při kyselém nebo neutrálním pH (4,0–7,0), zatímco 6-APA je

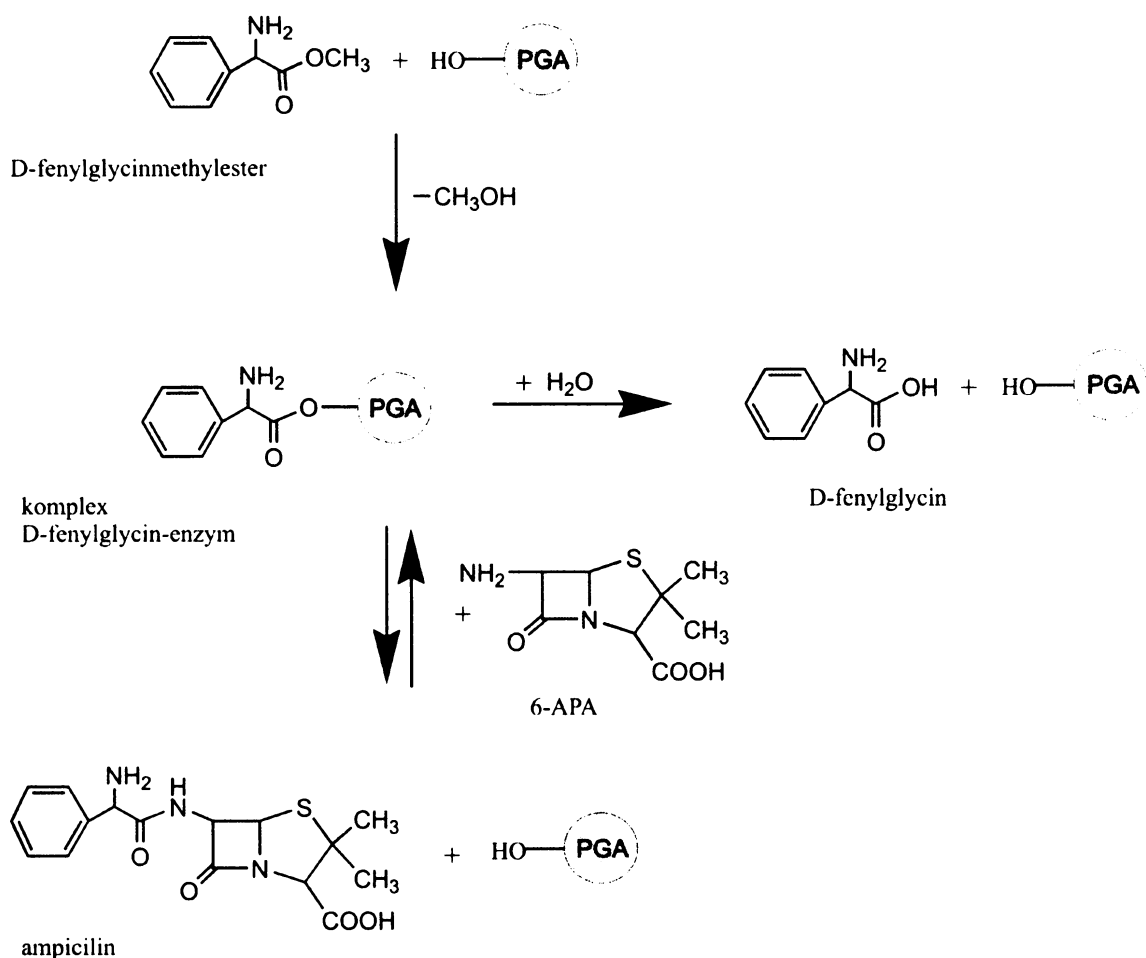
produkována spíše v zásaditém prostředí při pH 7,5–8,5 [36]. Reakční mechanismus syntéz antibiotik je analogický hydrolyzám s tím rozdílem, že intermediát acyl–enzym není rozštěpen vodou, ale jiným nukleofilním činidlem.

## 2.4 Komerční využití PGA

Peniciliny jsou nejrozšířeněji používanými  $\beta$ –laktamovými antibiotiky díky své funkci inhibitoru při syntéze buněčné stěny bakterií, širokému spektru antibakteriální aktivity, nízké toxicitě a mimořádné účinnosti proti různým bakteriálním druhům. Nadměrné používání těchto antibiotik vedlo u patogenů k vyvinutí rezistence. Ta však může být potlačena za použití novějších semisyntetických antibiotik. Ty mohou být navrhnuty tak, aby vykazovaly lepší vlastnosti, jako např. méně postranních efektů, minimalizace toxicity, vyšší selektivita proti patogenům a zlepšení farmakologických vlastností [4].

Ačkoli jsou různé postranní řetězce relativně snadno syntetizovány v průmyslové míře,  $\beta$ –laktamová jádra jsou v požadovaných měřítkách náročně syntetizovatelné, a to hlavně z ekonomické stránky. Z tohoto problému plyne i nejvýznamnější uplatnění PGA v průmyslu, a to při katalytické hydrolyze penicilinu G a získání 6–APA, která se chemicky převádí na semisyntetická  $\beta$ –laktamová antibiotika [5]. Příkladem syntézy semisyntetických antibiotik je ampicilin, který je vyráběn z penicilinu G získávaného fermentací *Penicillium chrysogenum*. Penicilin G je nejdříve enzymaticky hydrolyzován za katalýzy PGA na PAA a 6–APA, která další reakcí s D–fenylglycinem dává vznik ampicilinu (obr. 8, str. 20).

Obdobně se tímto způsobem provádí i příprava jiných semisyntetických  $\beta$ –laktamových antibiotik [8].



**Obr. 8:** Syntéza ampicilinu pomocí PGA

## 2.5 Strategie pro zvýšení produkce PGA

Existují různé strategie mající za úkol zvýšení produkce PGA, mezi které patří 3 základní směry [9, 14, 17, 37]:

- optimalizace růstových podmínek
- vývoj kmenů vhodnými mikrobiálně-genetickými technikami
- použití rekombinantních DNA metod (například zvýšení počtu plazmidových vektorů v chromozomu)

Rekombinantní kmeny produkující velké množství PGA byly mezi prvními geneticky zkonstruovanými kmeny, které byly použity ve farmaceutickém průmyslu [16]. Zvýšení produkce PGA použitím DNA rekombinantních metod dokazuje i první rekombinantní

kmen *E. coli* 5K(pHM12), který vznikl naklonováním *pga* genu z kmene *E. coli* ATCC 11105 za dosažení desetinásobného vzrůstu v produkci PGA [38]. Gen ze stejného kmene byl také klonován i v jiných laboratořích [17, 19, 39].

Obecně, může být klonovaný gen přepisován ze svého vlastního promotoru nebo může být na plazmidu umístěn za silný promotor. Při klonování *pga* genu se využívá obou přístupů. V experimentech, kde byl klonovaný gen *pga* umístěn za silný promotor, došlo použitím induktoru (1 mM izopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranozid) k dvacetinásobnému zvýšení produkce v porovnání s rodičovským kmenem a k pětinasobnému zvýšení v porovnání s kmenem nesoucím původní rekombinantní plazmid [40]. V poslední době jsou jako zdroje *pga* genu používány nejen různé průmyslové kmeny, které produkují PGA konstitutivně a jsou rezistentní ke katabolické represi [19], ale také se přechází i k jiným mikroorganismům.

## 2.6 Použití kvasinek jako hostitele pro *pga* gen

Použití kvasinek jako hostitelských organismů pro produkci eukaryotních heterogenních proteinů se ukazuje jako velice výhodné, protože kombinují dobře známé molekulárně-genetické techniky používané v prokaryotech s jejich schopností provádět komplexní posttranslační modifikace [41, 42]. Je používána široká škála druhů kvasinek zahrnující *Sacharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *Pichia pastoris* (*P. pastoris*), *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosacharomyces pombe* a *Yarrowia lipolytica* [43]. Výhody kvasinek jako hostitelů pro expresi rekombinantních proteinů z vyšších eukaryot byly dlouho zkoumány [41]. Stejně jako u bakterií, je i kultivace kvasinek v růstových médiích snadná a techniky pro manipulaci s cizími geny jsou jednoduché. Výhodou těchto mikroorganismů je, že jako eukaryotické buňky poskytují podmínky pro posttranslační skládání a sekreci, které vedou k produktu často identickému nebo více méně podobnému nativnímu proteinu.

První kvasinkou použitou pro produkci rekombinantního proteinu byla *S. cerevisiae*. Ta je ale často limitována tím, že představuje expresní systém s nízkými výtěžky. Methylotrófní kvasinky jako *P. pastoris* si uchovávají všechny výhody *S. cerevisiae*, ale poskytují vyšší výtěžky [42]. Navíc *P. pastoris* může, aspoň částečně, řešit i glykosilační problém. [44].

Během posledních patnácti let byla tato kvasinka zdokonalena a představuje tak nyní vysoce účinný systém pro produkci rozmanitých heterologních proteinů.

## 2.7 *Pichia pastoris*

Existuje limitovaný počet kvasinkových druhů, které jsou schopny používat methanol jako zdroj energie a uhlíku. Tyto kvasinky jsou označovány jako methylotrofní a patří mezi ně následující druhy: *Candida*, *Hansenula*, *Pichia* a *Torulopsis*. Tyto kmeny odbourávají methanol pomocí speciální metabolické cesty, jejímiž klíčovými enzymy jsou alkoholoxidas a resp. methanoloxidas a formátdehydrogenasa, které jsou produkovány ve vysokých množstvích. Podle současných poznatků je jejich produkce regulována již na transkripční úrovni [45].

Obecně mohou být kmeny *P. pastoris* rozděleny do několika skupin [46]: (i) divoké kmeny (X-33, Z-11430), (ii) auxotrofní mutanty, kteří jsou defektní v histidinoldehydrogenase (GS115), (iii) mutanty, kteří jsou defektní jsou genech zahrnutých v methanolové utilizaci (KM71, MC 100-3) a (iv) kmeny defektní v proteasach (SMD1163, SMD1165, SMD1168).

*Pichia* byla původně vybraná pro produkci rekombinantních proteinů hlavně díky své schopnosti růst na velmi vysokou buněčnou hustotu v jednoduše definovaném médiu. Pro *P. pastoris* byl navržen vysoce efektivní expresní systém používající methanol-indukční promotor AOX1 (alkoholoxidas 1) a vektory, které jsou integrované do jejího genomu [47]. AOX1 je přitom nejvíce využívaným promotorem v kontrole exprese heterologních genů. Tento promotor je vysoce potlačen v buňkách rostoucích na glukose, glycerolu a na mnoho dalších uhlíkových zdrojích, ale je silně indukován methanolem [48]. Exprese AOX1 je regulována na transkripční úrovni a v methanolem limitovaných kultivacích může koncentrace AOX1 tvořit i více jak 30 % celkových rozpuštěných proteinů. Specifická produkce většiny proteinů je relativně nízká, ale to je kompenzováno relativně konstantní produkcí po mnoho dní a také faktem, že *P. pastoris* může růst na methanolu do velmi vysokých optických hustot biomasy [49].

### 2.7.1 Výhody a nevýhody *P. pastoris*:

Vzrůst popularity tohoto expresního systému může být přikládán několika faktorům [50]:

- schopnost produkovat cizí proteiny do vysokých úrovní, intracelulárně i extracelulárně,
- extrémně vysoké výtěžky intracelulárních proteinů,
- velmi vysokou úroveň sekrece do téměř bezproteinového média,
- možnost provádět fermentace do vysokých optických hustot biomasy,
- genetická stabilita,
- jednoduchost technik potřebných k molekulárně–genetickým manipulacím s *P. pastoris* a jejich podobnost k těm používaným při práci s *S. cerevisiae*, která je jedním z nejlépe prostudovaných experimentálních systémů v moderní biologii,
- schopnost provádět mnoho eukaryotických posttranslačních modifikací, jako jsou vytváření glykosidových vazeb či proteolytické úpravy.

Snad nejznámějším problémem je proteolýza sekretovaných polypeptidů a buněčná smrt ve vysokých optických hustotách kultur v bioreaktorech [47].

### 2.7.2 Posttranslační modifikace proteinů exprimovaných *P. pastoris*

#### Intracelulární exprese

Kvasinkové rekombinantní proteiny mohou procházet buď intracelulárním, nebo sekrečním expresním systémem. Intracelulární exprese je cesta používaná pro heterologní proteiny, které jsou normálně exprimované do cytoplazmy nebo ty sekretované proteiny, které nemají žádné nebo pár disulfidových vazeb. V určitých případech dochází u kvasinek, stejně jako eukaryot, k posttranslačnímu odstranění počátečního methioninu z cytoplazmaticky exprimovaných proteinů pomocí kvasinkové methionylaminopeptidasy. Kromě toho dochází u nich i k N–koncovým acetylacím, C–koncovým methylacím, meristylacím a farnezylacím. Poslední tři úpravy jsou přitom důležité v membránovém přenosu intracelulárně exprimovaných proteinů [43].

## **Extracelulární exprese**

Sekrece heterologních proteinů do kulturního média poskytuje cestu jak se vyhnout toxicitě z akumulovaného materiálu, a také usnadňuje purifikaci proteinů, protože kvasinkový organismus sekretuje pouze malá množství svých nativních proteinů. Navíc proteiny sekretované touto cestou povolují posttranslační úpravy jako je posttranslační skládání, glykosilace nebo tvorba disulfidové vazby. Sekrece herologních proteinů je řízena odštěpitelnou aminokoncovou signální sekvencí, která se získává z nativního proteinu a nebo z leadru ze *S. cerevisiae* [43].



### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo porovnat biochemické vlastnosti bakteriální penicilin-G-acylasy exprimované rekombinantními mikroorganismy *Escherichia coli* RE3(pKA18) a *Pichia pastoris* R33(pPICPA1). Oba enzymy byly purifikovány a byly stanoveny jejich základní charakteristiky.

## 4 MATERIÁL

### 4.1 Chemikálie

4–dimethylaminobenzaldehyd (Fluka)

Agar (Lachema)

Akrylamid/bis-akrylamid (Sigma)

Albumin z hovězího séra (FMI Fermentas)

Bromfenolová modř (Serva)

Coomassie Brilliant blue R250 (Serva)

CYSEP 329 (CYTEC): flokulační činidlo (aktivní složkou je kvartérní amin 40–70 %)

d-biotin (Serva)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema)

Dihydrogenfosforečnan sodný (Lachema)

Dodecylsulfát sodný (Serva)

DTT: Dithiothreitol (Serva)

Dusík (Linde)

Fenol (Serva)

Glycin (Serva)

Glycerol (Lachema)

Hydrogenfosforečnan draselný (Lachema)

Hydrogenfosforečnan sodný (Lachema)

Hydroxid sodný (Lachema)

Hydroxid amonný (LaChema)

Chlorid sodný (Lachema)

Chlornan sodný (Lachema)

Kyselina boritá (Lachema)

Kyselina fenylactová (Lachema)

Kyseliny fosforečná (Lachema)

Kyseliny chlorovodíková (Lachema)

Kyselina octová (Lach–Ner)

Kyselina šťavelová (Lachema)

Methanol (Lach–Ner)  
Nitroprussid sodný (Lachema)  
N,N'–methylenbisakrylamid (BDH Chemicals Ltd)  
Odpěňovadlo 289 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo)  
Persíran amonný (Fluka)  
Síran amonný (Lachema)  
N,N,N',N'–tetra–methyl–ethylendiamin – TEMED (Bio-Rad Laboratoires)  
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Serva)

#### **4.2 Antibiotika a substráty enzymů pro spektrofotometrické stanovení aktivity**

(+)-6–aminopenicilánová kyselina (Fluka)  
NIPAB: 6–nitro–3–fenylacetylamidobenzoová kyselina (Sigma)  
7–aminodeacetoxycefalosporánová kyselina (Fluka)  
Amoxicilin (Sigma)  
Ampicilin trihydrát (Fluka)  
Cefalexin (Sigma)  
Penicilin G (draselná sůl) (Biotika)  
Penicilin V (Biotika)  
Fenylacetamid (připravil Ing. Petr Gajdoš)

#### **4.3 Standarty molekulových hmotností pro SDS–elektroforézu**

SDS–PAGE Standarts, Low and High (Bio-Rad Laboratoires)

#### **4.4 Komerční soupravy**

BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce)  
Protease Inhibitor Coctail – for use with fungal and yeast extracts, DMSO solution (Sigma)

## 4.5 Pufry a roztoky

### 4.5.1 Univerzální Brittonův–Robinsonův pufr pro stanovení pH optima a pH stability

Roztok A: 0,04 M kyseliny fosforečná, 0,04 M kyselina octová, 0,04 M kyseliny boritá

Roztok B: 0,2 M hydroxid sodný

Pufry o určitých pH (pH 4–10) byly připraveny úpravou roztoku A roztokem B.

### 4.5.2 Roztoky pro SDS–elektroforézu v polyakrylamidovém gelu

#### Roztoky pro přípravu dělicího a zaostřovacího gelu:

30 % vodný roztok akrylamidu a bisakrylamidu

1.5M Tris–Cl pufr pH 8.8

0.5M Tris–Cl pufr pH 6.8

10 % roztok SDS

10 % roztok persíranu amonného – připravován vždy čerství

TEMED

} uchováváno při 4°C

#### Vzorkový pufr (5x zakoncentrovaný)

250 mM Tris–Cl pH 8.8

500 mM DTT

50 % glycerol

10 % SDS

0.5 % bromfenolová modř

#### Elektrodový pufr

0.025 M Tris

0.192 M glycin

0.1 % SDS

– pH bylo upraveno na 8.3

### **Roztok pro barvení gelu**

0.25 g Coomassie Brilliant Blue R250

90 ml methanol: H<sub>2</sub>O (1:1 v/v)

10 ml konc. kyseliny octové

### **Odbarvovací roztok (1 l)**

450 ml methanolu

450 ml H<sub>2</sub>O

100 ml konc. kyseliny octové

### **Sušící roztok**

2 % glycerol

25 % methanol

## **4.5.3 Mikroorganismy, kultivační média a kultivační roztoky**

### **Mikroorganismy**

*Escherichia coli* RE3(pKA18) – připraven RNDr. L. Sobotkovou, CSc. [16]

*Pichia pastoris* X33(pPIC-PA1) – připraven RNDr. H. Marešovou, CSc.

Oba mikroorganismy byly vyvinuty v Laboratoři enzymových technologií MBÚ AVČR

### **Základní médium MG – navážka pro 1 l**

Glycerol – 40 g

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – 10 ml

KOH – 6 g

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 10g

KI – 1,33 g

CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O – 1,3 g

Odpěňovadlo 289 – 0,4 g

(před kultivací v bioreaktoru bylo 28% roztokem NH<sub>4</sub>OH upraveno pH na 8,2)

### **Roztok stopových prvků PTM - navážka pro 1 l**

FeSO<sub>4</sub> – 65 g

CuSO<sub>4</sub> – 6 g

MnSO<sub>4</sub> – 3 g

ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 20 g

NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O – 0,2 g

KI – 8 g

CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O – 0,5 g

H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> – 0,2 g

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 0,5 ml

### **YPD – medium - navážka pro 1 l**

yeast extrakt – 10 g

pepton – 20 g

glycerol – 20 g (připraven a sterilizován jako 10% roztok, pak dáno 100 ml/l)

(pH 7,2)

**Roztok biotinu** – 0,4 g/l – sterilizován filtrací

## **4.6 Přístroje a software**

### **4.6.1 Přístroje**

Spektrofotometr UV–1601 s temperovanou optickou celou (Shimadzu)

Spektrofotometr SP-30 (Pye Unicam)  
Vodní lázeň Tempette TE-8D (Techne)  
Vodní lázeň SW 20 (Julabo)  
Centrifuga Univerzal 32 R (Hettich)  
Centrifuga J2-21 (Beckman)  
Minicentrifuga C-1200 (National pagnet CO.)  
Třepačka (Lab-Shaker)  
Minimixer MS 1 (IKA)  
Sušárna (Chirana)  
Analytické váhy AE 200 (Mettler)  
Váhy PJ 600 (Mettler)  
HPLC 2151 (LKB-Bromma)  
Sběrač frakcí FOXY JR (ISCO)  
pH metr PHM 82 Standart (Radiometer Copenhagen)  
Titrátor TTT 80 (Radiometer Copenhagen)  
Autoburette ABU 801 (Radiometer Copenhagen)  
Míchadlo ER 10 (MLW)  
Konduktometr OK-104 (Radelkis)  
pH metr (inoLab)  
Míchačka MM22 (Laboratorní přístroje Praha)  
Milliporátor 8010– míchaná ultrafiltrace (Amicon)  
Ultrafiltrační membrány YM10 (Amicon)  
Vertikální elektroforéza Miniprotean II (Bio-Rad)  
Zdroj napětí (LKB Bromma)  
Dialyzační střeva různých průměrů (Hoechst)  
Dezintegrátor Manton Gaulin (Everest, Massachusetts, USA)  
Balotiny MK 3 GX – prům. 0,5-0,75 mm (Willy A. Bachorem AG Maschinenfabrik)  
Peristaltic PUMP, Pharmacia fine chemicals  
Třepačka LT2  
Hmotnostní spektrometr Bruker Daltoncs Biflex 2

## 4.6.2 Laboratorní míchaný bioreaktor a příslušenství

Bioreaktor (Biostat MD, B. Braun, Biotech International, Německo) se skládal ze skleněné kultivační nádoby osazené víkem s průchody pro měřicí čidla (pO<sub>2</sub> elektroda, pH elektroda, odpěňovací a teplotní sonda). Přes víko bylo také zajištěno míchání s horním pohonem, dávkování příkrmu, dávkování zásady a kyseliny pro úpravu pH, přívod vzduchu a byla zde umístěna i sekce sterilního vzorkování. Míchadlo bylo osazeno třemi turbínami typu Rushton.

Sondy a regulační prvky bioreaktoru pro:

- měření a regulaci teploty (ohřev byl zajištěn duplikátorem)
- měření a regulaci pH pomocí dávkování louhu nebo kyseliny (pro měření pH byla používána sterilizovatelná skleněná elektroda (Mettler Toledo, Švýcarsko) s gelovým elektrolytem (405-DPAS-SC-K8S/425))
- regulaci průtoku vzduchu (vzdušnění bylo zajištěno aeračním věncem, do kterého se přes mikrofiltr Sartorius 0.2 μm (Midisart<sup>®</sup> 2000, Německo) přiváděl sterilní vzduch
- měření koncentrace rozpuštěného kyslíku (pomocí sterilizovatelné pO<sub>2</sub> elektrody mající teflonovou membránu T-96 (InPro<sup>®</sup> 6000, Mettler Toledo, Švýcarsko))
- regulaci otáček míchadla
- regulaci výšky pěny v bioreaktoru (pomocí dávkování odpěňovacího prostředku Odpěňovadlo 289)
- dávkování zásobních roztoků zdroje uhlíku – váhy SB22001 Delta Range (Mettler) a substrátové čerpadlo byly připojeny přímo na řídicí jednotku IFB RS-422 (MFCS/Win) (B. Braun Biotech Int.). Dávkování zdroje uhlíku bylo regulováno udržováním koncentrace rozpuštěného kyslíku pod hodnotou 30 relativních procent

## 4.6.3 Software

Enzfitter v. 1.03 pro MS-DOS (Biosoft, Cambridge, UK)

Titrax

MFCS/Win 2.0 (B. Braun Biotech Int.)

Intelligent Quantifier



## 5 METODY A PRACOVNÍ POSTUPY

### 5.1 Kultivace kvasinky *Pichia pastoris*

#### 5.1.1 Příprava inokula

Kultura z glycerolové konzervy (uchovávána při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$ ) byla přenesena sterilní kličkou na YPD pevné médium obsahující 2 % agar. Kultivace probíhala při  $28^{\circ}\text{C}$  po dobu 3 dnů. Poté byla jedna dobře narostlá kolonie přenesena do 100 ml Erlen–Mayerovy baňky obsahující 10 ml YPD média. Kultura rostla při  $28^{\circ}\text{C}$  dalších 24 h na reciproké třepačce (180 rpm). Takto připravené inokulum bylo použito k zaočkování 250 ml YPD média doplněného biotinem v 1000 ml Erlen–Mayerově baňce tak, aby výsledná optická hustota ( $\text{OD}_{600}$ ) byla rovna 1. Tato kultivace probíhala opět při teplotě  $28^{\circ}\text{C}$  na reciproké třepačce (180 rpm) po dobu dalších 24 h.

#### 5.1.2 Kultivace v laboratorním míchaném bioreaktoru (přítokovaná kultivace s vysokým nárůstem biomasy)

Kultivace byla provedena v desetilitrovém laboratorním bioreaktoru Biostat MD obsahujícím 6 l základního média MG, které bylo doplněno roztokem stopových prvků PTM (2 ml/l), d–biotinem (0,4 ml/l) a jeho pH bylo upraveno 28% roztokem čpavku na hodnotu 8,2. Do takto připraveného média v bioreaktoru byl převeden celý objem inokula. Kultivační podmínky byly následující:  $28^{\circ}\text{C}$ , pH udržováno na hodnotě 5,0 30% roztokem  $\text{NH}_4\text{OH}$ , obsah rozpuštěného kyslíku byl udržován na 30 relativních procent, průtok vzduchu 9 l/min, míchání 300–850 rpm (v první fázi procesu pomocí kaskádové regulace míchání, ve fázi příkrmu glycerolem či methanolem bylo míchání konstantní 850 rpm). Celá kultivace byla řízena a monitorována pomocí software MFCS Win (B. Braun Biotech Int.).

Kultivace byla zahájena jako vsádková kultivace, dokud nebyl počáteční glycerol jako zdroj uhlíku vyčerpán, což se projevilo kolem dvacáté hodiny zvýšením koncentrace

rozpuštěného kyslíku. Poté bylo zahájeno příkrmování 50% roztokem glycerolu obsahujícím navíc 12 ml/l roztoku PTM a 4 mg/l biotinu. Tato fáze trvala dokud  $OD_{600}$  nedosáhla hodnoty 250. Poté byla zahájena tranzitní fáze (tab. 1), kdy během 2 h byl snižován příkrm glycerolu a současně byl zahájen příkrm roztokem methanolu obsahujícím 2 ml/l roztoku PTM a 0,4 g/l biotinu.

**Tab. 1:** Časové rozvržení tranzitní fáze fermentace *P. pastoris*

T [min]	Doba zastavení dávkování glycerolu [min]	Dávka methanolu [ml]
0.	0,0	0
5.	0,5	1
10.	1,0	1
20.	1,5	1
30.	2,0	1
40.	2,5	1
50.	3,0	1
60.	3,5	1
70.	4,0	1
80.	4,5	1
90.	6,0	1
100.	7,0	1
110.	stop příkrmu glycerolem	start příkrmu methanolem

T[min] doba od počátku tranzitní fáze, ve které byl zastaven příkrm glycerolem na určitou dobu (0–7 min) a přidán 1 ml methanolu.

Po ukončení tranzitní fáze byl methanol přidáván v závislosti na koncentraci rozpuštěného kyslíku.

V průběhu kultivací byly průběžně odebírány vzorky pro stanovení  $OD_{600}$ , aktivity PGA a suché hmotnosti buněk. Vzorky pro stanovení aktivity a suché hmotnosti buněk (celkem 1 ml a 4 ml) byly centrifugovány (5 000 rpm, 5 min, pokojová teplota). Supernatant byl dekantován a pelet byl doplněn do počátečního objemu destilovanou vodou. Supernatant byl opět dekantován a pelet byl uchován při  $-20^{\circ}\text{C}$  pro další stanovení.

Po ukončení kultivace byla biomasa z celého kultivačního objemu centrifugována (5000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30 min) a pelet byl uchován při  $-20^{\circ}\text{C}$  pro pozdější izolaci PGA.

## **5.2 Stanovení koncentrace biomasy**

Koncentrace biomasy v kultuře byla stanovena měřením optické hustoty ( $OD_{600}$ ) kultury na spektrofotometru SP-30 v 1 ml plastových kyvetách o optické dráze 1 cm při vlnové délce  $\lambda=600$  nm. Vzorek byl naředěn tak, aby měřená optická hustota suspenze byla menší než 1,5.

## **5.3 Stanovení suché hmotnosti biomasy**

Suchá hmotnost biomasy byla stanovena gravimetricky. Promytý pelet (viz. kap. 4.1.2) byl resuspendován ve 4 ml destilované vody a z takto připravené buněčné suspenze bylo odebráno 3x 1 ml na předem vysušené a zvážené hliníkové mističky. Buněčná suspenze byla sušena při teplotě 105°C (do konstantní hmotnosti, přibližně 3 h).

## **5.4 Příprava bezbuněčného extraktu pro stanovení aktivity**

K vodou promytému peletu biomasy z 1 ml kultury byl přidán 0,1 M fosfátový pufr (pH 8,0) tak, aby výsledný objem buněčné suspenze byl 1 ml. K této suspenzi ve 2 ml zkumavce Eppendorf byl přidán 1 ml skleněných balotín. Dezintegrace buněk probíhala třepáním suspenze na minimixeru IKA ( $1400 \text{ min}^{-1}$  po dobu 20 min a při pokojové teplotě). Následně byly rozbité buňky stočeny a získaný supernatant použit pro stanovení aktivit PGA.

## **5.5 Dezintegrace buněk narostlých v bioreaktoru**

### **5.5.1 Dezintegrace pomocí dezintegrátoru Manton Gaulin**

Rozbití buněk separovaných z kultury bylo provedeno na dezintegrátoru Manton Gaulin. 1,18 kg biomasy bylo naředěno 10 mM fosfátovým pufrem (pH 8,0) do celkového objemu 3,3 l. Dezintegrace byla provedena 6x při tlaku 450 atm. Po druhé a páté dezintegraci byl

vzorek asi 0,5 h chlazen v ledu. Po rozbití buněk byla hmota centrifugována (5000 rpm, 25 min, 4°C). Kontrola účinnosti této dezintegrace byla provedena porovnáním aktivit PGA s aktivitami PGA dosaženými dezintegrací pomocí balotín (kap. 4.4). Po šestnásobné dezintegraci bylo dosaženo srovnatelných aktivit).

### **5.5.2 Dezintegrace pomocí balotín**

11,8 g zcentrifugované biomasy bylo doplněno do 50 ml dezintegračním puřem a resuspendováno. Dezintegrace byla provedena v 12 ml zkumavkách s uzávěrem v poměru 5 ml vzorku: 5 ml balotín na jednu zkumavku. Dezintegrace byla provedena na třepače Lab-Shaker ( $330 \text{ min}^{-1}$  při 28°C po dobu 1,5 hod). Poté byl vzorek centrifugován (10000 rpm, 20 min, 4°C) a supernatant byl oddělen a uchován při -20°C.

### **5.6 Srážení balastních bílkovin**

CYSEP je průmyslové flokulační činidlo, jehož aktivní složkou je kvartérní amin (40–70 %). PGA je proteinem, který není CYSEPem srazitelný. Použitá koncentrace CYSEP pro částečné odstranění ostatních proteinů byla zvolena podle provedené kalibrace. Po přidání CYSEP ke vzorku probíhalo srážení 1 h při 4°C za stálého míchání. Poté byl precipitát odstraněn centrifugací (10000 rpm, 20 min, 4°C).

### **5.7 Selektivní srážení PGA síranem amonným**

#### **PGA z *E. coli***

Ke vzorku, který byl již částečně upraven (kap. 6.1), byl za stálého míchání a chlazení (4°C) postupně přidán síran amonný do 40 % nasycení (317 g/l), a poté byl vzorek ponechán 30 min srážet. Vzniklý precipitát byl odstraněn centrifugací (11 000 rpm, 15 min, 4°C). K supernatantu byl pomalu přidáván síran amonný do 60 % nasycení

(169 g/l, opět za stálého míchání a chlazení na 4°C), a poté nechán 30 min srážet. Precipitát vzniklý při zvýšení nasycení síranem amonným ze 40 na 60 % byl získán centrifugací (11 000 rpm, 20 min, 4°C) a následně rozpuštěn ve 20 ml 10 mM fosfátového pufru (pH 8,0).

### **PGA z *P. pastoris***

Ke vzorku za stálého míchání a chlazení (4°C) byl postupně přidáván síran amonný do 50 % nasycení (409 g/l, byla provedena kalibrace, a poté byl roztok nechán 1 h srážet). Vzniklý precipitát byl získán centrifugací (5 000 rpm, 35 min, 4°C) a následně byl rozpuštěn v 10 mM fosfátovém pufru (pH 8,0).

## **5.8 Separační metody – vysokoúčinná kapalinová chromatografie**

### **5.8.1 Chromatografie na koloně s náplní DEAE–fraktogelu**

Chromatografie probíhala na koloně s náplní DEAE–fraktogelu EMD 6500(S) (17 cm × 2,5 cm) [51]. Iontová síla a pH vzorku před nanesením na kolonu byly upraveny pomocí dialýzy proti pufru A (10 mM fosfátový pufr, pH 7,0) o objemu 5 l po dobu 40 h (u vzorku PGA z *P. pastoris* pouze 16 h) při 0°C, a poté byl vzorek centrifugován (11 000 rpm, 20 min, 4°C) a supernatant byl aplikován na kolonu pomocí peristaltické pumpy. Kalibrace kolony i eluce vzorku byla provedena 10 mM fosfátovým puftrem (pH 8,0). Rychlost průtoku elučního pufru kolonou byla 1 ml/min.

### **5.8.2 Chromatografie na koloně s náplní hydroxyapatitu**

Tato chromatografie byla provedena na koloně hydroxyapatitu (14 cm × 1,6 cm) [51], která byla ekvilibrována puftrem A (1 mM fosfátový pufr, pH 7,0). Iontová síla a pH vzorku byly upraveny dialýzou proti 5 l pufru A přes noc při 0°C, a poté byl vzorek

aplikován na kolonu pomocí peristaltické pumpy. Eluce byla provedena lineárním gradientem 0–100% pufru B (200 mM fosfátový pufr) po dobu 100 min. Rychlost průtoku elučního pufru kolonou byla 1 ml/min.

### 5.8.3 Gelová chromatografie

Tato chromatografie byla provedena na koloně Superdex 200 (75 cm × 1,6 cm) [52], která byla ekvilibrována pufrém A (50 mM fosfátový pufr obsahujícím 150 mM NaCl, pH 7,5). Vzorek pro nanesení na kolonu byl zakoncentrován ultrafiltrací (Amicon 8010, membrána nepropustná pro látky o molekulové hmotnosti nad 10 000) a promyt pufrém A. Poté byl vzorek aplikován na kolonu. Eluce byla provedena pufrém A.

### 5.9 Elektroforéza v prostředí SDS

Elektroforéza za denaturujících podmínek byla prováděna podle [53]. Vzhledem k velikosti proteinu byl použit 12 % separační gel a 5 % zaostřovací gel, jejichž příprava je uvedena v tab. 2.

**Tab. 2:** Rozpis pro přípravu gelů pro SDS–elektroforézu

Složky	Objem [ml]	
	12% dělicí gel	5% zaostřovací gel
H <sub>2</sub> O	3,3	2,7
30% směs akrylamidu	4,0	0,67
1,5 M Tris-Cl pH 8,8	2,5	-
0,5 M Tris-Cl pH 6,8	-	0,5
10% SDS	0,1	0,04
10% persíran amonný	0,1	0,04
TEMED	0,004	0,004

Vzorek byl před nanesením na gel příslušně naředěn, k 10 µl vzorku bylo přidáno 2,5 µl loading pufru a směs byla 5 min povařena. Na gel byl nanášen celý objem vzorku (12,5 µl)

a 10 µl standartu. Rozdělení proteinů probíhalo při napětí 80 V až do zaostření vzorku na rozhraní zaostřovací–dělicí gel, poté bylo napětí zvýšeno na 100 V. Elektroforéza byla ukončena poté, co barevný indikátor opustil gel.

### **5.9.1 Barvení proteinů v gelu**

Gely po ukončení elektroforézy byly 20 min barveny v barvicím roztoku Coomassie Brilliant blue R–250 za mírného promíchávání na třepačce, a poté odbarveny v odbarvovacím roztoku, který byl několikrát vyměněn. Gely byly uchovávány v 10 % kyselině octové nebo usušeny mezi dvěma celofánovými fóliemi předem namočenými v sušicím roztoku.

## **5.10 Stanovení aktivity a substrátové specifity PGA**

### **5.10.1 Stanovení aktivity – spektrofotometricky:**

#### **5.10.1.1 Stanovení aktivity pro substráty penicilin G, penicilin V, ampicilin, amoxicilin, cefalexin**

Stanovení aktivity PGA s těmito substráty bylo založeno na hydrolytické reakci, v níž vzniká 6–APA, popřípadě 6–ADCA (cefalexin) jako produkt. Rychlost tvorby 6–APA (resp. 6–ADCA) byla stanovena p–dimethylaminobenzaldehydovou metodou [54], neboť aldehydická skupina p–dimethylaminobenzaldehydu (pDAB) vytváří s primární aminoskupinou kyseliny 6–aminopenicilánové Schiffovu bázi, jejíž koncentraci lze stanovit spektrofotometricky. Reakční směs byla připravena smícháním vzorku obsahujícím enzym (0,5–100 µl) s 50 mM fosfátovým pufrem, pH 8, a to do celkového objemu 2 ml. Po 5 min inkubaci ve vodní lázni vytemperované na 37°C byla enzymová reakce startovaná přidáním 1 ml 2% substrátu (též vytemperovaného na 37°C). Reakce probíhala při 37°C ve skleněných zkumavkách. Ve stejných časových intervalech (1–5 min) bylo 4 krát odebráno z reakční směsi 0,5 ml a přidáno do 3 ml zastavovací směsi

(1 díl 0,05 M NaOH a 20 dílů 20% kyseliny octové), čímž byla reakce ukončena. Poté bylo přidáno 0,5 ml roztoku pDAB (5g/l methanolu), směs dobře promíchána a po 15 min byla absorbance žlutě zbarveného roztoku změřena v plastových kyvetách o optické dráze 1 cm při 415 nm na spektrofotometru Shimadzu UV-1601. Jako reference byla použita směs 2 ml 50 mM fosfátového pufru, pH 8,0 a 1 ml 2% roztoku penicilinu. Kalibrační křivka byla sestrojena pro známé koncentrace 6–APA, resp. 6–ADCA.

Pro stanovení aktivit v průběhu kultivací, purifikací a při charakterizaci PGA byl použit (pokud není uvedeno jinak) penicilin G jako substrát a aktivita byla stanovena spektrofotometricky. Jednotka aktivity PGA je pak definována jako množství enzymu, které je potřeba k hydrolyze 1  $\mu$ mol penicilinu G za daných podmínek (0,67 % penicilin G, 50 mM fosfátový pufr, pH 8,0, 37°C) za 1 min.

#### 5.10.1.2 Stanovení aktivity pro substrát NIPAB

Při stanovení aktivity PGA pomocí chromogenního substrátu 6–nitro–3–fenylacetyl–amidobenzoové kyseliny (NIPAB) [55] byla reakční směs připravena vhodným zředěním vzorku PGA 50 mM fosfátovým puftrem (pH 8), a to do celkového objemu 2 ml. Po 5 min inkubaci při 37°C byla enzymová reakce startovaná přidáním 1 ml 6 mM NIPAB vytemperovaného též na 37°C. Reakce probíhala při 37°C v křemenných kyvetách a vzrůst žlutého zbarvení byl měřen po dobu 3 min při 405 nm oproti referenci (enzym byl v reakční směsi nahrazen puftrem) na spektrofotometru Shimadzu UV–1601. Po skončení měření spektrofotometr vypočítal směrnici  $\Delta Abs_{405}$ . Enzymová aktivita byla počítána podle následujícího vzorce {1}:

$$A = \frac{\Delta Abs_{405}}{\epsilon_{405}} \cdot k \quad [U / ml] \quad \{1\}$$

kde **A** je aktivita [U/ml],  $\Delta Abs_{405}$  přírůstek absorbance za 1 min při 405 nm,  $\epsilon_{405}$  absorpční koeficient pro NIPAB při 405 nm ( $\epsilon_{405} = 9,09 \text{ dm}^2 \text{ mol}^{-1}$ ) a **k** je ředění



### 5.10.1.3 Stanovení aktivity pro substrát fenylacetamid

Stanovení aktivity PGA se substrátem fenylacetamidem bylo provedeno fenol-hypochloridovou reakcí pro určení koncentrace amoniaku, jenž je produktem této enzymové reakce [56]. Reakční směs byla připravena smícháním vzorku PGA s 50 mM fosfátovým pufrům (pH 8), a to do celkového objemu 2 ml. Po 5 min inkubaci ve vodní lázni vytemperované na 37°C byla enzymová reakce startovaná přidáním 1 ml 2% fenylacetamidu vytemperovaného na 37°C. Reakce probíhala při 37°C ve skleněných zkumavkách. V 1 min intervalech bylo 4 krát odebráno z reakční směsi 0,1 ml a přidáno do 2,5 ml zastavovací směsi (10 g/l fenolu a 50 mg/l nitroprussidu sodného), čímž byla reakce ukončena. Poté bylo přidáno 2,5 ml barvicího roztoku (5 g/l NaOH a 8,4 ml/l chlornanu sodného), směs byla promýchána a 20 min inkubována při 37°C. Absorbance byla změřena v plastových kyvetách o optické dráze 1 cm při pokojové teplotě při 625 nm na spektrofotometru Shimadzu UV-1601. Jako reference byla použita směs 2 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 8,0) a 1 ml 2% roztoku fenylacetamidu. Kalibrační křivka byla sestavena pro známé koncentrace  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

### 5.10.2 Stanovení aktivity PGA na titrátoru

Stanovení aktivity PGA s penicilinem G bylo také provedeno metodou podle Kutzbacha [55]. Vzhledem k nízké hodnotě konstanty Michaelise-Mentenové PGA vůči penicilinu G nebylo možné stanovit aktivitu při nízkých koncentracích substrátu pomocí p-dimethylaminobenzaldehydové metody. Ke stanovení aktivit za těchto podmínek byla použita metoda, kdy druhý produkt hydrolýzy penicilinu G, kyselina fenylactová (PAA), je jako kyselina titrována 0,1 M NaOH. Množství PAA vznikající během reakce je rovno množství NaOH potřebného pro udržení konstantního pH 8,0. NaOH je přidáván jako 0,01 M roztok. Reakční směs byla složena z 25 ml roztoku penicilinu G o dané koncentraci v 0,1 M NaCl. Po vytemperování na 37°C byla reakce startována přidáním PGA. Snímání pH bylo zajištěno pH metrem, který byl připojen k počítačové jednotce a vyhodnocení bylo provedeno pomocí programu TITRAX.

### 5.11 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byla stanovena pomocí soupravy BCA Protein Assay Kit. Tato metoda je založena na kolorimetrické detekci komplexu vzniklého chelatací iontu  $\text{Cu}^+$  dvěma molekulami BCA. Ion  $\text{Cu}^+$  vzniká při redukci  $\text{Cu}^{2+}$  proteinem v alkalickém prostředí. Reakční směs byla připravena smícháním 50 dílů reagentu A, 1 dílu reagentu B (celkový objem 1,6 ml) a 80  $\mu\text{l}$  10x naředěného vzorku. Reakce probíhala 30 min při 37°C a po zchlazení na pokojovou teplotu byla intenzita zabarvení změřena v plastových kyvetách o optické dráze 1 cm proti referenci (vzorek v reakční směsi byl nahrazen destilovanou vodou) při 562 nm na spektrofotometru Shimadzu UV-1601. Koncentrace proteinů pak byla určena z kalibrační závislosti získané ze známých koncentrací albuminu z hovězího séra.

### 5.12 Stanovení teplotní stability PGA

Stabilita enzymu při dané teplotě byla určena změřením zbytkové aktivity pro substrát penicilin G po 30–ti min inkubaci při dané teplotě. Oblast hodnot teplot byla zvolena v rozmezí 20–60°C v intervalech 5°. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky podle kap. 5.10.1.1. Pro stanovení teplotní stability  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  bylo vzato 10  $\mu\text{l}$  vzorku a inkubováno 30 min při dané teplotě ve 2 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 8,0). Poté byla teplota vzorku upravena na 37°C, přidán substrát a stanovena zbytková aktivita. Časový interval mezi odebráním vzorku z reakční směsi a přidáním do zastavovací směsi byl 2 min. Pro stanovení teplotní stability  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  bylo vzato 20  $\mu\text{l}$  vzorku a inkubováno 30 min při dané teplotě ve 2 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 8,0). Dále bylo postupováno jako v případě  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  s tím, že časový interval mezi vzorkováním reakční směsi byl 5 min.

### 5.13 Stanovení pH stability PGA

Stabilita enzymu při daném pH byla určena změřením zbytkové aktivity pro hydrolyzu penicilinu G po 60–ti minutové inkubaci v Britton–Robinsonově pufru o daném pH při 37°C. Oblast hodnot pH byla zvolena v rozmezí 3–10. Aktivita byla stanovena spektrofotometricky podle kap. 5.10.1.1. Pro stanovení pH stability  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  bylo vzato

12  $\mu\text{l}$  vzorku a inkubováno 60 min v 108  $\mu\text{l}$  pufru s požadovanou hodnotou pH při 37°C. Poté bylo odebráno 100  $\mu\text{l}$  do reakční směsi pro stanovení zbytkové aktivity. Časový interval vzorkování reakční směsi byl 2 min. Pro stanovení pH stability PGA<sup>PP</sup> bylo vzato 21  $\mu\text{l}$  vzorku a inkubováno 60 min v 189  $\mu\text{l}$  příslušného pufru. Následně bylo odebráno 200  $\mu\text{l}$  pro stanovení zbytkové aktivity. Časový interval vzorkování reakční směsi byl 5 min.

#### **5.14 Stanovení teplotního optima hydrolýzy penicilinu G katalyzované PGA**

Teplotní optimum enzymu bylo stanoveno spektrofotometricky měřením aktivity enzymu pro hydrolýzu penicilinu G. Kromě teploty, která byla měněna pro jednotlivá stanovení v rozmezí 20–70°C, bylo stanovení provedeno podle kap. 5.10.1.1. Pro určení teplotního optima PGA<sup>EC</sup> bylo vzato 10  $\mu\text{l}$  vzorku do reakce, pro PGA<sup>PP</sup> bylo vzato do reakce 30  $\mu\text{l}$  vzorku. Časový interval vzorkování reakční směsi byl 1 min.

#### **5.15 Stanovení pH optima hydrolýzy penicilinu G katalyzované PGA**

pH optimum enzymu bylo stanoveno spektrofotometrickým měřením aktivity enzymu pro hydrolýzu penicilinu G v rozmezí hodnot pH 4–10. Stanovení bylo provedeno podle kap. 5.10.1.1 s tím, že potřebné hodnoty pH reakční směsi bylo dosaženo použitím Britton–Robinsonova pufru o daném pH a při vlastním stanovením aktivity nebyl použit fosfátový pufr. Pro určení pH optima PGA<sup>EC</sup> bylo vzato 10  $\mu\text{l}$  vzorku do reakce, pro určení pH optima PGA<sup>PP</sup> pak 30  $\mu\text{l}$  vzorku do reakce. Časový interval vzorkování reakční směsi byl 1 min.

#### **5.16 Stanovení substrátové specifity PGA**

Hydrolytická aktivita enzymu PGA byla stanovena spektrofotometricky s použitím vybraných přírodních a semisyntetických substrátů: penicilin G, penicilin V, ampicilin, amoxicilin, cefalexin, fenylacetamid a NIPAB (viz. kap. 5.2.10). Pro stanovení aktivit PGA<sup>EC</sup> bylo pro reakci vzato 5  $\mu\text{l}$  vzorku (s výjimkou stanovení aktivity pro NIPAB, kdy bylo do reakce vzato 10  $\mu\text{l}$ ). Pro stanovení aktivit PGA<sup>PP</sup> bylo vzato 20  $\mu\text{l}$  vzorku do reakce

kromě stanovení aktivity pro NIPAB, kdy bylo do reakce vzato 5  $\mu$ l.

### 5.17 Stanovení kinetických parametrů PGA pro hydrolytické reakce

Měření kinetických parametrů PGA pro hydrolyzu substrátů penicilin G a NIPAB bylo prováděno při teplotě 37°C v 50 mM fosfátovém pufru pH 8,0 (PGA<sup>EC</sup>) a pH 7,5 (PGA<sup>PP</sup>). Kinetické parametry pro penicilin G byly stanoveny titrační metodou a pro NIPAB spektrofotometricky.

Konstanty Michaelise-Mentenové ( $K_m$ ) a limitní rychlosti ( $V_{max}$ ) hydrolytických reakcí pro jednotlivé substráty byly spočítány z počátečních rychlostí enzymových reakcí, měřených za různých koncentrací substrátu, pomocí počítačového programu Enzfitter. Tento program pracoval na principu postupných numerických aproximací kinetických parametrů ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) tak, aby rovnice Michaelise-Mentenové {2} procházela naměřenými body s co nejmenší odchylkou.

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad \{2\}$$

kde  $v$  je počáteční rychlost reakce [U/ml],  $V_{max}$  limitní rychlost [U/ml],  $[S]$  koncentrace substrátu [M] a  $K_m$  konstanta Michaelise-Mentenové [M]

Nezávisle na programu Enzfitter byl pro stanovení kinetických parametrů z naměřených dat použit výpočet podle Lineweavera-Burka (L-B výnos).

L-B výnos umožňoval získat kinetické parametry pomocí linearizované formy rovnice Michaelise-Mentenové {3}.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\lim}} \quad \{3\}$$

kde  $v$  je počáteční rychlost reakce [U/ml],  $V_{\max}$  limitní rychlost [U/ml],  $[S]$  koncentrace substrátu [M] a  $K_m$  konstanta Michaelise-Mentenové [M]

Na základě stanovení  $K_m$  a  $V_{\max}$  PGA pro oba substráty byly spočteny katalytické konstanty  $k_{\text{cat}}$  podle vzorce {4}.

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\max}}{60 \cdot c} \quad \{4\}$$

kde  $k_{\text{cat}}$  je katalytická konstanta [s<sup>-1</sup>],  $V_{\max}$  limitní rychlost [mol min<sup>-1</sup>ml<sup>-1</sup>] a  $c$  je koncentrace proteinu [mol/ml]

### 5.18 Analýza podjednotek PGA<sup>EC</sup> a PGA<sup>PP</sup> pomocí MALDI-TOF MS

Vzorky pro analýzu na MALDI-TOF hmotnostní spektrometrii byly připraveny elektroforetickým rozdělením podjednotek purifikované PGA<sup>EC</sup> a PGA<sup>PP</sup> na 12% SDS-gelu. Samotná příprava vzorku a analýza hmotnostní spektrometrií byla provedena Laboratoří charakterizace molekulární struktury MBÚ AVČR. Pro získání peptidů pro samotnou hmotnostní spektrometrii bylo použito štěpení Trypsinem. MALDI-TOF MS byla provedeny na spektrometru Bruker Biflex 2.

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Příprava částečně purifikované PGA z *Escherichia coli* RE3(pKA18)

Kultivace *Escherichia coli* RE3(pKA18) a částečná úprava získané biomasy obsahující PGA byla provedena Laboratoří enzymových technologií MBÚ AVČR již dříve. Postup, jakým byl získán výchozí materiál pro purifikaci, byl následující:

1. separace biomasy z media centrifugací a její naředění
2. mechanická dezintegrace suspenze buněk za použití vysokých tlaků na dezintegrátoru Manton Gaulin.
3. termokoagulace dezintegrované buněčné suspenze – precipitace při pH 5,0 a teplotě 45°C v přítomnosti kation–aktivního flokulačního činidla (polyethylenimin – PEI)
4. odstranění precipitátu centrifugací
5. filtrace za získání čírého roztoku obsahujícího rozpustné proteiny
6. ultrafiltrace a neutralizace vzorku na pH 6,5

Při této částečné úpravě se vycházelo z 50 l (75 g/l suché váhy) suspenze buněk o aktivitě  $6 \cdot 10^5$  U/l a bylo získáno 17,5 l (17,9 g/l suché váhy) suspenze o aktivitě  $1,38 \cdot 10^5$  U/ml. Výtěžek aktivity v této fázi purifikace byl 80,4%.

### 6.2 Kultivace *Pichia pastoris* X33(pPIC-PA1)

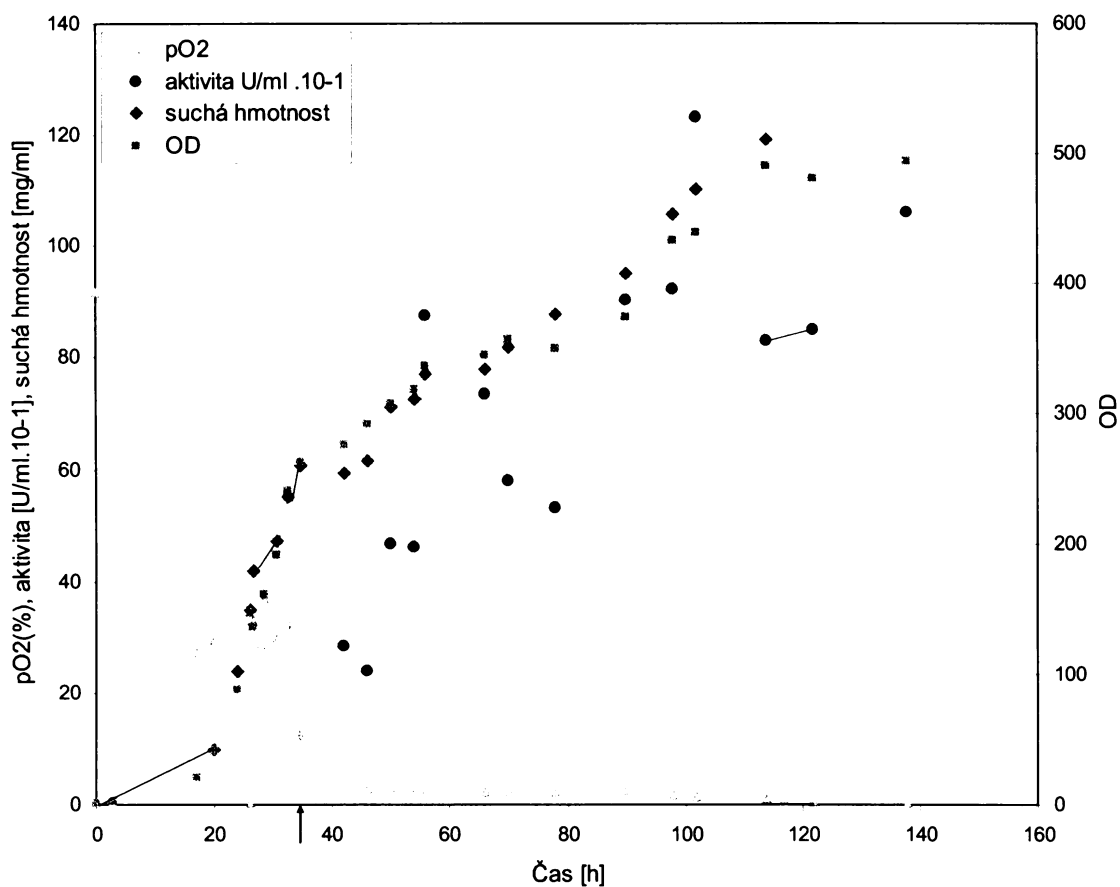
Rekombinantní kvasinka *Pichia pastoris* X33(pPIC-PA1) byla kultivována podle postupu vyvinutého v Laboratoří enzymových technologiích MBÚ AVČR (kap. 4.1). K fermentaci byl použit kmen *Pichia pastoris* X33 (pPIC-PA1), izolát č. 2 leader1. Inokulum pro kultivaci v bioreaktoru bylo připraveno dvoustupňově v třepaných baňkách (teplota 28°C, 180 rpm) (kap. 5.1.1). Po naočkování jedné kolonie z agarové misky do YPD media probíhala první kultivace 26 h a bylo dosaženo  $OD_{600} = 42$ . 5 ml z této kultury bylo použito k zaočkování druhé kultivace (počáteční  $OD_{600} = 1,19$ ). Druhá kultivace byla ukončena po 23,5 h (konečné  $OD_{600} = 32$ ) a celou kulturou bylo zaočkováno 6 l média v bioreaktoru. Fermentace v bioreaktoru probíhala jako přítokovaná kultivace, během níž byla regulována kultivační teplota,  $pO_2$  a pH (kap. 5.1.2). Tato kultivace měla dvě hlavní fáze: fázi rychlého růstu biomasy (fáze přítoku glycerolu) a fázi produkce enzymu-indukce

syntézy PGA methanolem (fáze přítoku methanolu). Důležité kroky v průběhu fermentace jsou uvedeny v tab. 3.

**Tab. 3:** Přítokovaná fermentace v bioreaktoru: jednotlivé fáze

Hodina fermentace	Krok
0	zaočkování média a zahájení fermentace aktivována kaskádová regulace $pO_2$
26	ukončena kaskádová regulace $pO_2$ zahájení příkrmu glycerolem
33	zahájení tranzitní fáze
35	tranzitní fáze ukončena zahájen příkrm methanolem
78	sterilně odebrán 1 l kultury o aktivitě 5,3 U/ml
116	sterilně odebráno 0,37 l kultury o aktivitě 8,3 U/ml
138	ukončení fermentace

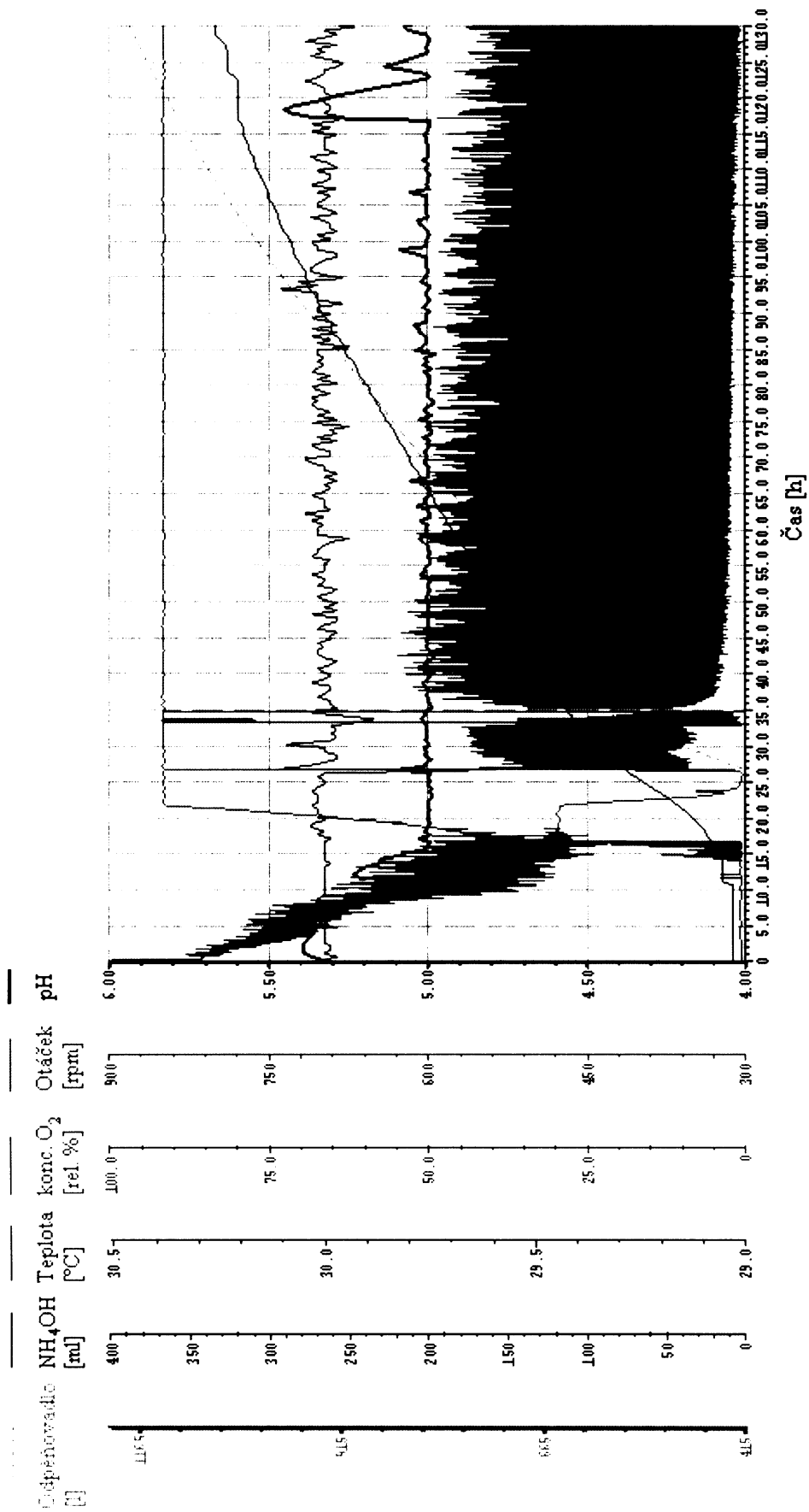
V průběhu kultivace byly průběžně odebírány vzorky, u kterých byly stanoveny aktivity, optické hustoty kultury (OD) a suché hmotnosti, a dále byly zaznamenávány hodnoty obsahu rozpuštěného kyslíku (obr. 9, str. 48). Průběh kultivace je znázorněn na obr. 10, str. 49.



**Obr. 9:** Průběh aktivity PGA, optické hustoty kultury (OD), suché hmotnosti biomasy a obsah rozpuštěného kyslík ( $pO_2$ ) během přítokované fermentace *P. pastoris* v bioreaktoru na MG mediu obsahující PTM a d-biotin při 28°C. Šipka na ose x označuje čas spuštění přítoku methanolu a start indukce syntézy PGA.

Kultivace byla ukončena po 138 h a byla získána biomasa o aktivitě 10,61 U/ml (10,8 U/mg proteinu pro substrát NIPAB).





**Obr. 10:** Parametry zaznamenávané „on-line“ v průběhu přítokované fermentace *Pichia pastoris* v míchaném bioreaktoru.

## 6.3 Purifikace PGA<sup>EC</sup>

K izolaci PGA z hrubého extraktu rekombinantní *E. coli* byl použit postup složený ze čtyř hlavních purifikačních kroků, využívající laboratorní techniku dostupnou v laboratoři. Pro purifikaci bylo vzato 50 ml částečně upraveného (hrubého) extraktu. Po jednotlivých krocích izolace byla měřena aktivita jednotlivých frakcí, u chromatografického dělení byla průběžně monitorována absorbance při 280 nm a u konečných vzorků byla stanovena specifická aktivita enzymu. Hodnoty specifické aktivity charakterizující stupeň čistoty a získané výtěžky po jednotlivých krocích jsou uvedeny v tab. 4, str. 51. Čistota vzorků PGA byla také ověřena pomocí SDS–elektroforézy. Jednotlivé metody jsou blíže popsány v kap. 5.5–5.8).

### 6.3.1 Srážení PGA pomocí síranu amonného (1. krok)

Srážení PGA síranem amonným bylo provedeno mezi 40–60% nasycení roztoku enzymu síranem amonným, což jsou podmínky obecně používané pro PGA z *E. coli* (kap. 5.7). Precipitát PGA byl rozpuštěn do konečného objemu 20 ml v 10 mM fosfátovém pufru (pH 8,0).

### 6.3.2 Chromatografie na DEAE–fraktogelu (2. krok)

Jako druhý krok purifikace byla použita chromatografie na DEAE-fraktogelu (kap. 5.8.1). Vzorek byl před nanesením na kolonu upraven dialýzou (40 hod). Po dialýze byla porovnána vodivost a pH vzorku a ekvilibračního pufru první kolony. Po ekvilibraci kolony s náplní DEAE-fraktogelu bylo na ni naneseno 27 ml upraveného vzorku. U jednotlivých frakcí (jímány po 2 ml) byla změřena aktivita a pro další izolaci byly smíchány frakce s aktivitou vyšší než 80 U/ml, což odpovídalo 63.–79. min eluce. Tím bylo získáno 34 ml vzorku.

### 6.3.3 Chromatografie na koloně s náplní hydroxyapatitu (3. krok)

Třetím krokem purifikace byla chromatografie na koloně s náplní hydroxyapatitu (kap.



5.8.2). Vzorek byl před nanesením na kolonu opět upraven dialýzou a správná iontová síla a pH byly pro další nanesení na kolonu znovu upraveny dialýzou (16 hod). Po dialýze byla opět porovnána vodivost a pH vzorku a ekvilibračního pufru druhé kolony. Na kolonu bylo aplikováno 37 ml vzorku a kolona byla promývána 120 min před spuštěním gradientu a zahájením eluce. Frakce byly jímány po 4 ml a frakce s aktivitou vyšší než 100 U/ml (51.–58. min eluce) byly smíchány (celkový objem = 16,5 ml) a použity v další purifikaci.

#### 6.3.4 Gelová filtrace (4. krok)

Vzorek byl před nanesením na kolonu zahuštěn ultrafiltrací na Amicon 8010 z 15,5 ml na 2,2 ml. Poté byl 1 ml zahuštěného vzorku aplikován na kolonu a frakce byly jímány po 2 ml. Frakce s aktivitou vyšší než 60 U/ml byly spojeny a tento roztok PGA byl použit pro charakterizaci enzymu.

**Tab. 4** Purifikace PGA<sup>EC</sup> – shrnutí jednotlivých kroků

Purifikační krok	Celkové množství proteinu [mg]	Celková aktivita [U]	Specifická aktivita [U/mg]	Purifikace [násobek]	Výtěžek [%]
Dezintegrovaná biomasa	-	8574	-	-	100,0
Flokulace	504,1	6280	12,46	1,0	80,4
Srážení (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	306,8	5262	17,15	1,4	67,4
DEAE Fractogel	76,3	3692	48,37	3,9	47,3
Hydroxyapatit	41,0	2232	54,47	4,4	28,6
Gel filtrace	27,6	1784	64,61	5,2	22,8

flokulace – označuje soubor purifikačních kroků, které jsou uvedeny v kap. 6.1

#### 6.4 Purifikace PGA<sup>PP</sup>

K izolaci PGA z biomasy získané fermentací *P. pastoris* R33(pPIC-PA1) byl použit postup složený ze tří hlavních purifikačních kroků (jednotlivé kroky izolace vycházely ze schématu purifikace PGA z *E. coli*). Purifikace PGA z *P. pastoris* byla provedena celkem třikrát:

**Purifikace č.1:** Pro purifikaci bylo vzato 500 ml hrubého extraktu, který byl získán po

dezintegraci buněk z fermentace *P. pastoris* X33(pPIC-PA1) izolát č. 2 leader1. Hrubý extrakt byl připraven mechanickou dezintegrací buněk na dezintegrátoru Manton Gaulin (kap. 4.5.1).

**Purifikace č. 2:** Pro purifikaci byla vzata biomasa z fermentace *P. pastoris* X33 (pPIC-PA1) izolát č. 7 leader2. Tato fermentace byla provedena v Laboratoři enzymových technologií MBÚ AVČR. K dezintegraci bylo vzato 11,8 g (vlhká hmotnost) stočených buněk, které byly resuspendovány do celkového objemu 25 ml 100 mM fosfátovým pufrům (pH 8,0) a dezintegrace buněk byla provedena mechanicky s využitím balotín (kap. 5.5.2).

**Purifikace č. 3:** Vycházela ze stejného vzorku jako purifikace č. 2 i ze stejného množství vzorku. V případě této purifikace bylo ale ke vzorku ještě před dezintegrací přidáno 0,5 ml koktejlu proteasových inhibitorů pro plísně a kvasinky.

Po jednotlivých krocích izolace byla měřena aktivita PGA v jednotlivých frakcích, u chromatografického dělení byla průběžně monitorována absorbance při 280 nm a u konečných vzorků byla stanovena specifická aktivita enzymu. Hodnoty charakterizující stupeň čistoty a získané výtěžky po jednotlivých krocích jsou uvedeny v tab. 5 (str. 53) a v tab. 6 (str. 54). Čistota vzorků PGA byla také ověřena opět pomocí SDS–elektroforézy.

#### **6.4.1 Odstranění části proteinů pomocí flokulačního činidla CYSEP (1. krok)**

Jelikož ani při velmi vysokých koncentracích tohoto flokulačního činidla nedošlo k precipitaci PGA, bylo množství přidaného činidla odhadnuto z provedené kalibrace flokulace (porovnáním koncentrace flokulačního činidla a množství vysrážených ostatních proteinů–OD<sub>600</sub>). Pro srážení byla použita koncentrace 0,133 l CYSEP/1 vzorku (kap. 5.6).

#### **6.4.2 Srážení PGA pomocí síranu amonného (2. krok)**

Protože bylo k úpravě vzorků použito činidlo CYSEP, jehož použití není v literatuře uváděno, byla pro následné srážení PGA síranem amonným provedena kalibrace a pro vysrážení PGA bylo použito 50% nasycení roztoku enzymu síranem amonným (409 g/l). Srážení probíhalo podle podmínek uvedených v kap. 5.7. Precipitát byl poté resuspendován v 10 mM fosfátovém pufru (pH 7,0):

1. **purifikace:** precipitát byl rozpuštěn do konečného objemu 50 ml
2. **purifikace:** precipitát byl rozpuštěn do konečného objemu 5 ml
3. **purifikace:** precipitát byl rozpuštěn do konečného objemu 5 ml

### 6.4.3 Chromatografie na DEAE–fraktogelu (3. krok)

Vzorky byly před nanesením na kolonu upraveny dialýzou (kap. 5.8.1). Po dialýze byla porovnána vodivost a pH vzorků a ekvilibračního pufru první kolony. Po ekvilibraci kolony s náplní DEAE–fraktogelu byly na ni nanášeny následující vzorky:

1. **purifikace:** 55 ml upraveného vzorku
2. **purifikace:** 4 ml upraveného vzorku
3. **purifikace:** 4 ml upraveného vzorku

U jednotlivých frakcí (jímány po 4 ml) byla změřena aktivita PGA.

1. **purifikace:** byly spojeny frakce s aktivitou vyšší než 4 U/ml (151.–202. min eluce)
2. **purifikace:** byly spojeny frakce s aktivitou vyšší než 0,25 U/ml (120.–176. min eluce)
3. **purifikace:** byly spojeny frakce s aktivitou vyšší než 0,5 U/ml (120.–180. min eluce)

Vzorky získané po chromatografii na DEAE–fraktogelu v případě druhé a třetí purifikace byly zahuštěny ultrafiltrací na Amicon 8010 z 56 ml na 8 ml v případě vzorku z druhé purifikace a z 60 ml na 11 ml v případě vzorku ze třetí purifikace.

**Tab. 5:** Purifikace PGA<sup>PP</sup> č.1: biomasa *P. pastoris* X33(pPIC–PA1), izolát č. 2 leader1

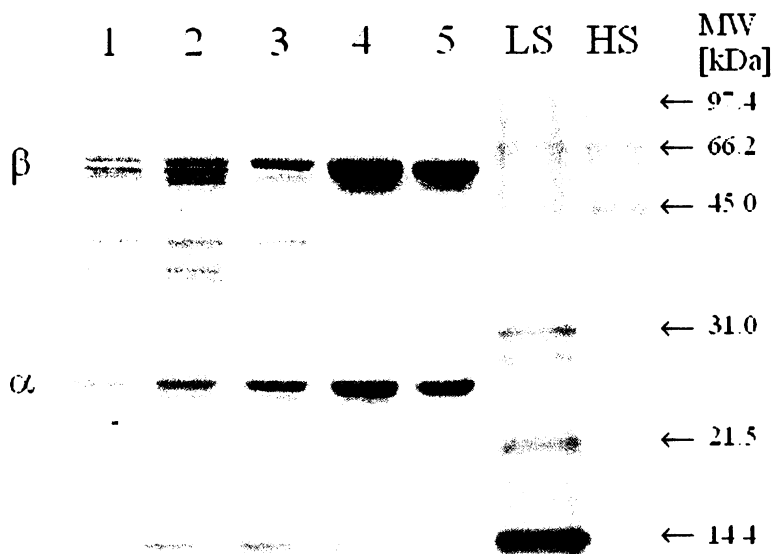
Purifikační krok	Celkové množství proteinu [mg]	Celková aktivita [U]	Specifická aktivita [U/mg]	Purifikace [násobek]	Výtěžek [%]
Dezintegrovaná biomasa	7669	5200	0,68	1,0	100,0
Flokulace	5036	4290	0,85	1,3	82,5
Srážení (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1108	3350	3,02	4,5	64,4
DEAE Fractogel	36	640	17,58	25,9	12,3

**Tab. 6:** Purifikace PGA<sup>PP</sup> č.2 a 3: biomasa *P. pastoris* X33 (pPIC-PA1), izolát č. 7  
leader2

Purifikační krok	Přítomnost inhibitorů proteáz	Celkové množství proteinu [mg]	Celková aktivita [U]	Specifická aktivita [U/mg]	Purifikace [násobek]	Výtěžek [%]
Dezintegrovaná biomasa	+ I	187	225	1,21	1,0	100,0
	- I	189	233	1,24	1,0	100,0
Flokulace	+ I	161	222	1,38	1,1	98,4
	- I	138	232	1,80	1,5	99,3
Srážení (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	+ I	83	181	2,17	1,8	80,3
	- I	85	186	2,17	1,8	79,5
DEAE Fractogel	+ I	3	103	31,81	26,4	45,6
	- I	3	122	40,96	33,1	52,2

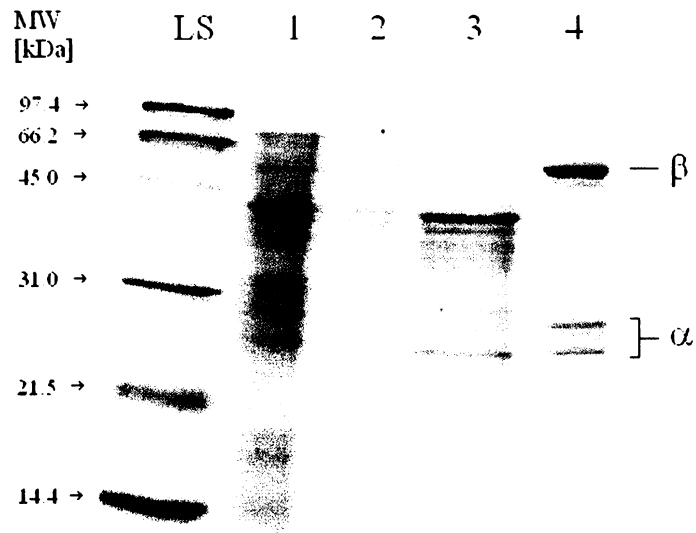
## 6.5 Ověření čistoty PGA po jednotlivých krocích purifikace pomocí SDS–elektroforézy

Pro ověření čistoty vzorků a účinnosti jednotlivých kroků izolace byly vzorky po jednotlivých krocích purifikace nanесeny na SDS–gely (Obr. 11–13, str. 55–57). Vzhledem k velikosti proteinu PGA byl zvolen 12% separační gel (kap. 5.9):



**Obr. 11:** SDS–elektroforetické rozdělení vzorků PGA<sup>EC</sup> po jednotlivých krocích purifikace.

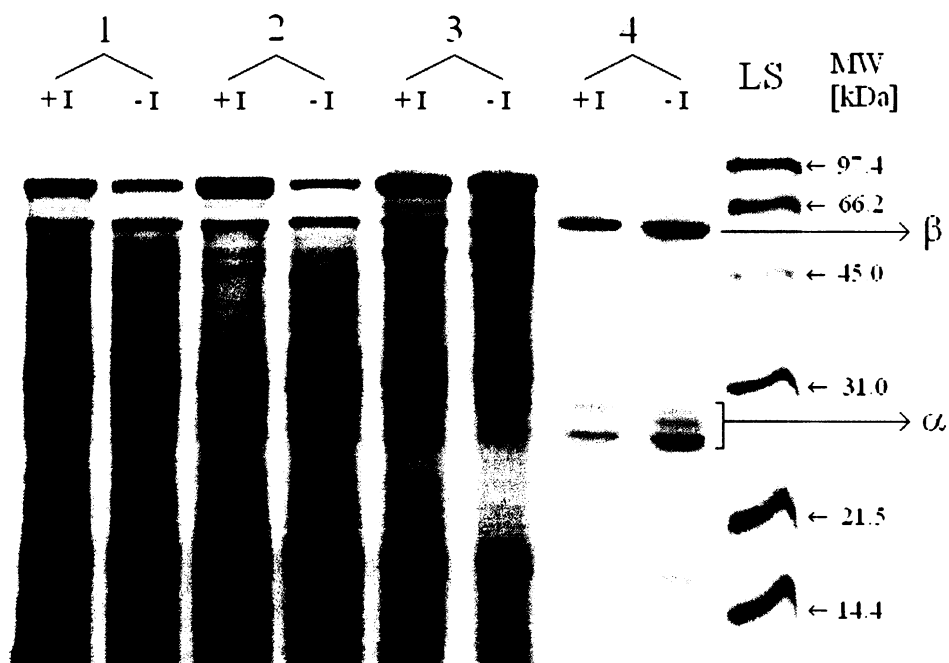
Popis drah na gelu je následující: **1** – částečně přečištěný roztok enzymu, **2** – vzorek po srážení síranem amonným, **3** – vzorek po chromatografii na koloně s náplní DEAE–fraktogelu, **4** – vzorek po chromatografii na koloně s náplní hydroxyapatitu, **5** – vzorek po gelové filtraci. **LS** – standart nízkých molekulových hmotností, **HS** – standart vyšších molekulových hmotností, **MW** – molekulová hmotnost proteinů standardu [kDa]



**Obr. 12:** SDS–elektroforetické rozdělení vzorků  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  po jednotlivých krocích purifikace.

Popis gelu: **MW** – molekulová hmotnost proteinů standardu [kDa], **LS** – standart nízkých molekulových hmotností. **1** – výchozí vzorek pro purifikaci, **2** – vzorek po kroku srážení flokulačním činidlem CYSEP, **3** – vzorek po srážení síranem amonným, **4** – vzorek po chromatografii na koloně s náplní DEAE–fraktogelu





**Obr. 13** SDS–elektroforetické rozdělení vzorků  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  po jednotlivých krocích purifikací č. 2 a 3.

Popis gelu: **1** – výchozí vzorek pro purifikaci, **2** – vzorek po kroku srážení flokulačním činidlem CYSEP, **3** – vzorek po srážení síranem amonným, **4** – vzorek po chromatografii na koloně s náplní DEAE–fraktogelu, **LS** – standart nízkých molekulových hmotností, **MW** – molekulová hmotnost proteinů standardu [kDa]. **-I** označuje purifikaci č. 2, která byla prováděná se vzorkem bez koktejlu inhibitorů proteáz. **+I** označuje purifikaci č. 3, která byla prováděná se vzorkem obsahující koktejl inhibitorů proteas.

Z SDS–elektroforetického rozdělení vzorků bylo zjištěno, že podjednotkové složení  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  je odlišné. Je patrné, že  $\beta$ –podjednotka je zřejmě stejná, ale  $\alpha$ –podjednotka je v případě  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  přítomna ve více formách (až čtyřech), přičemž dvě, resp. tři formy (v případě vzorku z druhé izolace, tj. bez inhibitorů proteas) se vyskytují ve větším množství. U jednotlivých podjednotek byla dále stanovena molekulová hmotnost a podjednotky byly zkoumány hmotnostní spektrometrií MALDI–TOF MS.

## 6.6 Odhad molekulových hmotností podjednotek $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$

Molekulové hmotnosti byly určeny za použití programu Intelligent Quantifier, který pro kalibraci používá standart nízkých molekulových hmotností.

**Tab. 7:** Molekulové hmotnosti podjednotek  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$

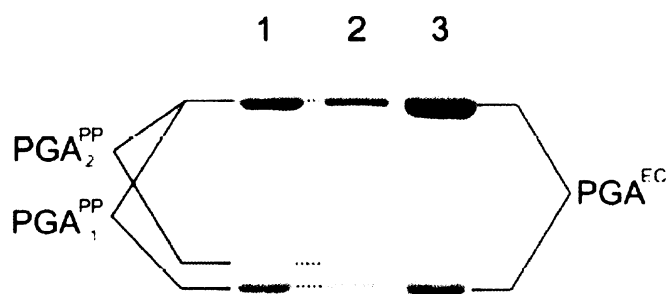
Typ PGA	MW [kDa]			
	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\beta$
$\text{PGA}^{\text{EC}}$	27	-	-	59
$\text{PGA}^{\text{PP}} + \text{I}$	27	29	-	59
$\text{PGA}^{\text{PP}} - \text{I}$	27	28	29	59

MW – molekulová hmotnost [kDa],  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\beta$  – podjednotky PGA

Z tab. 7 vyplývá, že  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  má jednu formu  $\alpha$  i  $\beta$ -podjednotky.  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  získaná purifikací č. 3 v přítomnosti inhibitorů proteas má dvě hlavní formy  $\alpha$ -podjednotky a jednu formu  $\beta$ -podjednotky (jsou oproti ostatním v nadbytku) a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  získaná při purifikaci č. 2 v nepřítomnosti inhibitorů proteas má tři hlavní formy  $\alpha$ -podjednotky a jednu formu podjednotky  $\beta$ . Dále je jako  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  označována směs všech forem PGA.

## 6.7 Analýza podjednotek $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$ pomocí MALDI-TOF MS

Vzorky pro analýzu na MALDI-TOF MS byly připraveny elektroforetickým rozdělením podjednotek purifikované  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  na 12% SDS-gelu. Samotná úprava jednotlivých podjednotek pro analýzu hmotnostní spektrometrií byla provedena Laboratoří charakterizace molekulární struktury MBÚ AVČR. Byly analyzovány následující podjednotky PGA:  $\alpha$  a  $\beta$ -podjednotka  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ , nejmenší a největší  $\alpha$ -podjednotky a  $\beta$ -podjednotky  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  vzorků purifikovaných jak bez inhibitorů, tak s inhibitory proteáz (viz. obr. 14, str. 59).

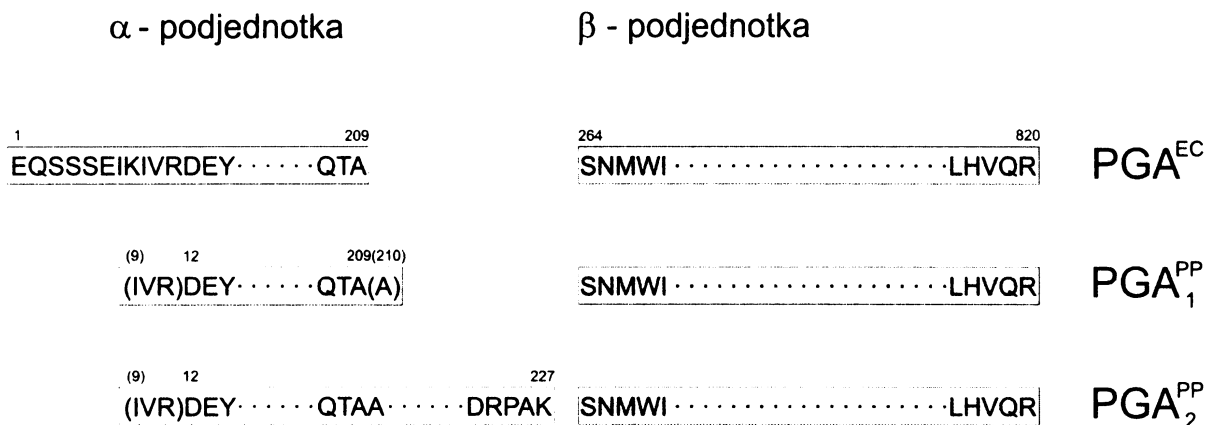


**Obr. 14:** Podjednotky PGA rozdělené na SDS–gelu a analyzované MALDI–TOF.

**1** –  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  purifikovaná bez inhibitorů proteas, **2** –  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  purifikovaná s inhibitory proteas, **3** –  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ ,  $\text{PGA}_1^{\text{PP}}$  –  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  obsahující nejmenší formu  $\alpha$ –podjednotky,  $\text{PGA}_2^{\text{PP}}$  –  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  obsahující největší formu  $\alpha$ –podjednotky

Z analýzy experimentálních dat byly učiněny následující závěry (obr. 15, str. 60):

1. Analýzy vzorků  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  purifikovaných bez i v přítomnosti inhibitorů proteas poskytly stejné výsledky.
2.  $\beta$ –podjednotky z  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a z  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  jsou shodné (u obou byly nalezeny N a C–koncevé peptidové fragmenty a spektra získaná MALDI–TOF MS byla stejná).
3. U menší i větší  $\alpha$ –podjednotky  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  byl nejbližší N–konci nalezen fragment odpovídající 12.–37. aminokyselině. Tento N–koncevý peptid (počínající 12. aminokyselinou) může být o 3 aminokyseliny delší, neboť mu předchází sekvence tripeptidového štěpení obsahující pouze tři AMK (IVR), které však u použité metody spadají pod práh detekce.
4. V oblasti C–konce byl u větší  $\alpha$ –podjednotky  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  nalezen peptidový fragment z oblasti spaceru a končící 227. aminokyselinou.
5. C–konec menší  $\alpha$ –podjednotky  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  je zřejmě o 1 aminokyselinu delší než C–konec u  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ , který končí alaninem na pozici 209.



Vysvětlivky:

(9) 12	pořadí AMK v sekvenci PGA <sup>EC</sup>
(IVR)DE·····	schéma podjednotky
·····	sekvence aminokyselin peptidů ohraničujících podjednotky (v závorkách jsou označeny neprokázané AMK)

**Obr. 15:** Struktura PGA<sup>EC</sup> a PGA<sup>PP</sup> odvozená z výsledků analýzy pomocí MALDI-TOF  
**PGA<sub>1</sub><sup>PP</sup>** – PGA<sup>PP</sup> obsahující nejmenší α - podjednotku, **PGA<sub>2</sub><sup>PP</sup>** – PGA<sup>PP</sup> obsahující největší formu α - podjednotky.

Ze získaných dat byly také vypočteny molekulové hmotnosti podjednotek, které jsou uvedeny v tab. 8.

**Tab. 8:** Vypočítané molekulové hmotnosti podjednotek PGA<sup>EC</sup> a PGA<sup>PP</sup> z dat MALDI-TOF

Typ PGA	MW [kDa]		
	α <sub>1</sub>	α <sub>2</sub>	β
<b>PGA<sup>EC</sup></b>	23,8	-	62,4
<b>PGA<sup>PP</sup></b>	22,5 (22,8)	24,6 (24,9)	62,4

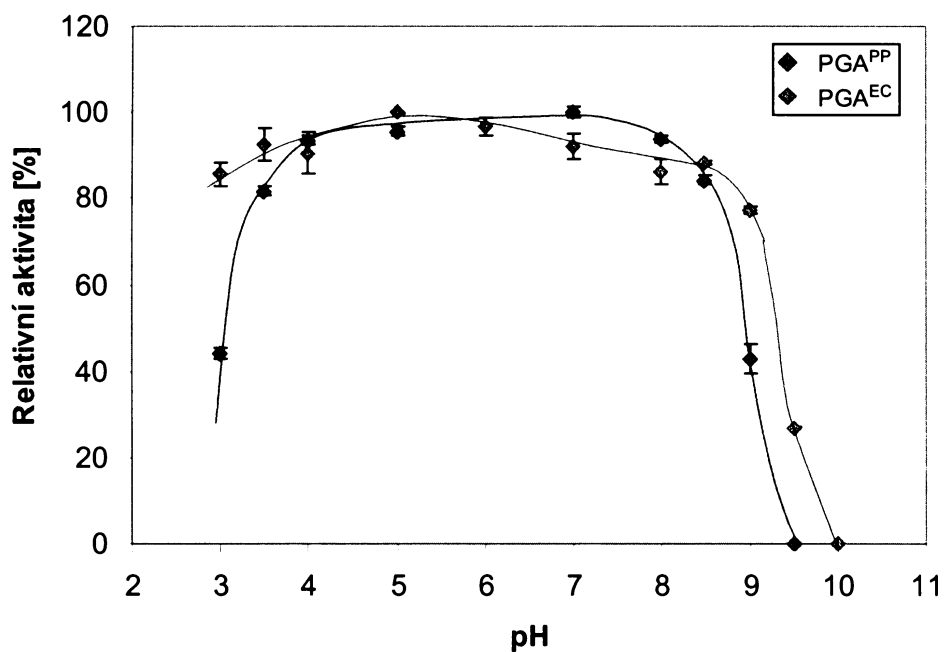
MW – molekulová hmotnost [kDa], α<sub>1</sub>, α<sub>2</sub>, a β – podjednotky PGA. MW α<sub>1</sub> PGA<sup>EC</sup> je standardní. Hodnoty v závorkách představují MW subjednotky zvětšenou o hmotnost tří aminokyselin I, V a R.

## 6.8 Charakterizace a porovnání PGA<sup>EC</sup> a PGA<sup>PP</sup>

Základní charakteristiky (pH a teplotní optimum, pH a teplotní stabilita) obou enzymů byly stanoveny s penicilinem G jako substrátem. Substrátová specifika a kinetické parametry pak byly provedeny s jednotlivými substráty. Stanovení aktivity PGA pro určení jednotlivých charakteristik bylo provedeno podle kap. 5.10. Pro charakterizaci PGA<sup>PP</sup> byl použit vzorek získaný purifikací v přítomnosti inhibitorů. Průměrné hodnoty aktivity a jejich směrodatné odchylky byly vypočteny ze tří nezávislých měření.

### 6.8.1 Stanovení pH stability $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$

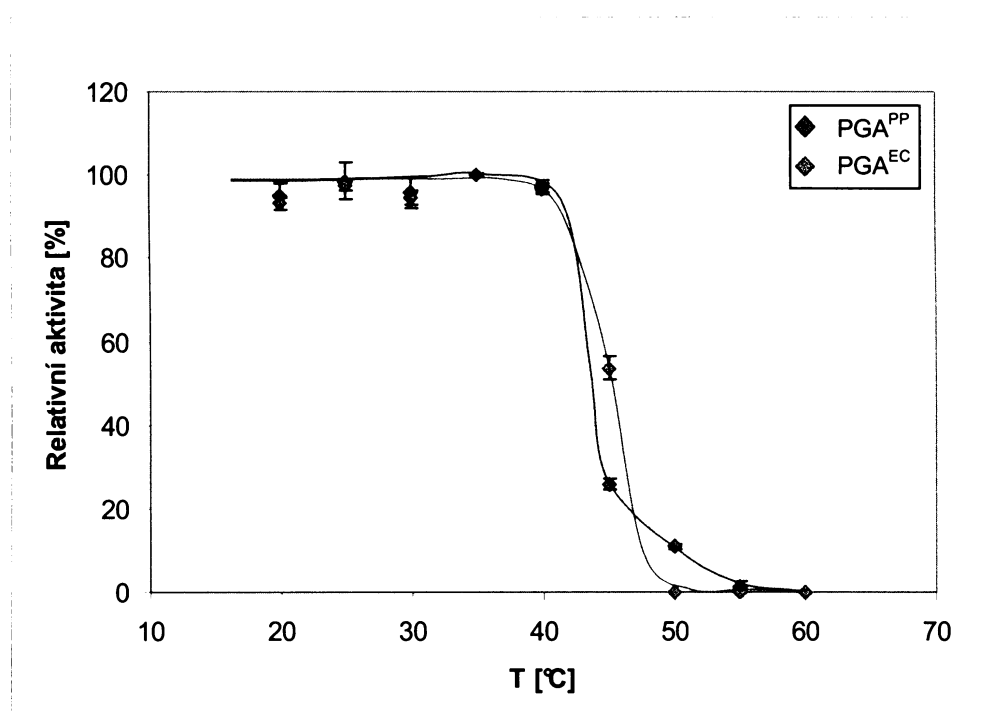
Vzorky PGA byly preinkubovány v pufrech o různém pH v rozmezí hodnot 3–10 (kap. 5.13). Bylo zjištěno, že  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  je stabilní v oblastech pH 3–8,5, zatímco  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  je stabilní v užším intervalu hodnot pH 4–8. Tento enzym při pH 3,5 a 8,5 vykazoval již 15–20% ztrátu své aktivity a při pH 3 a pH 9 již měl jen poloviční zbytkovou aktivitu. Na obr. 16 je znázorněna stabilita PGA po 1 h inkubaci při daných pH.



**Obr. 16:** Závislost zbytkové aktivity  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  na pH po 1 h inkubaci v daném pH při teplotě 37°C. Aktivita je vyjádřena jako relativní. Jako 100% byly vzaty maximální hodnoty aktivity daného enzymu: pro  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  byla maximální aktivita dosažena při pH 5 (94,0 U/ml), pro  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  byla maximální aktivita dosažena při pH 7 (6,7 U/ml).

## 6.8.2 Teplotní stabilita $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$

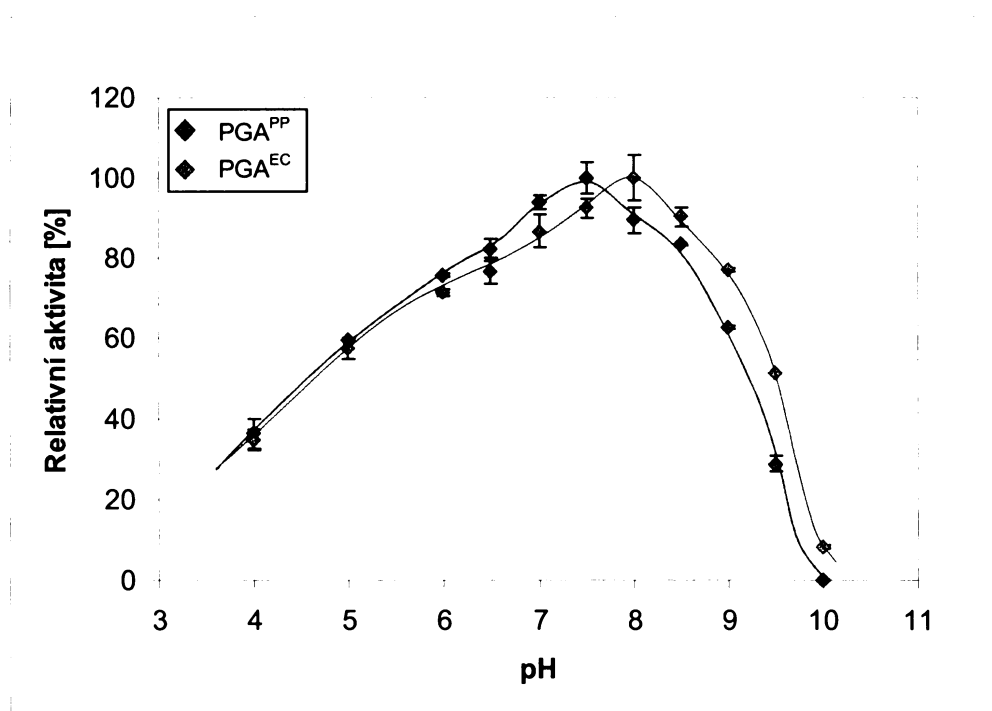
Vzorky PGA byly preinkubovány 30 min při různých teplotách v rozmezí 20–60°C (kap. 5.12). Bylo zjištěno, že obě PGA jsou stabilní při 40°C.  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  jeví pokles aktivity po preinkubaci při teplotě 45°C asi o 20% větší než  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ .  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  po preinkubaci při 50°C ještě vykazovala více než 10% aktivitu, zatímco aktivita  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  byla nedetekovatelná. Na obr. 17 je znázorněna stabilita PGA po 30 min inkubaci při daných teplotách.



**Obr. 17:** Závislosti zbytkové aktivity  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  po 30 min inkubaci v dané teplotě v 50 mM fosfátovém pufru (pH 8,0). Aktivita je vyjádřena jako relativní. Jako 100% byly vzaty maximální hodnoty aktivity daného enzymu: pro  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  byla maximální zbytková aktivita 40,3 U/ml, pro  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  byla max. zbytková aktivita 3,6 U/ml.

### 6.8.3 pH optimum pro aktivity $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$

Pro určení pH optima (hydrolytického štěpení penicilinu G) pro aktivity  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  byla měřena závislost aktivity na pH reakční směsi. Měření byla provedena v oblasti hodnot pH 4–10 (kap. 5.15). Vynesemím získané závislosti bylo zjištěno, že  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  má nejvyšší aktivitu při pH 8,0 a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  při pH 7,5. Na obr. 18 je znázorněna závislost aktivity na pH reakční směsi.

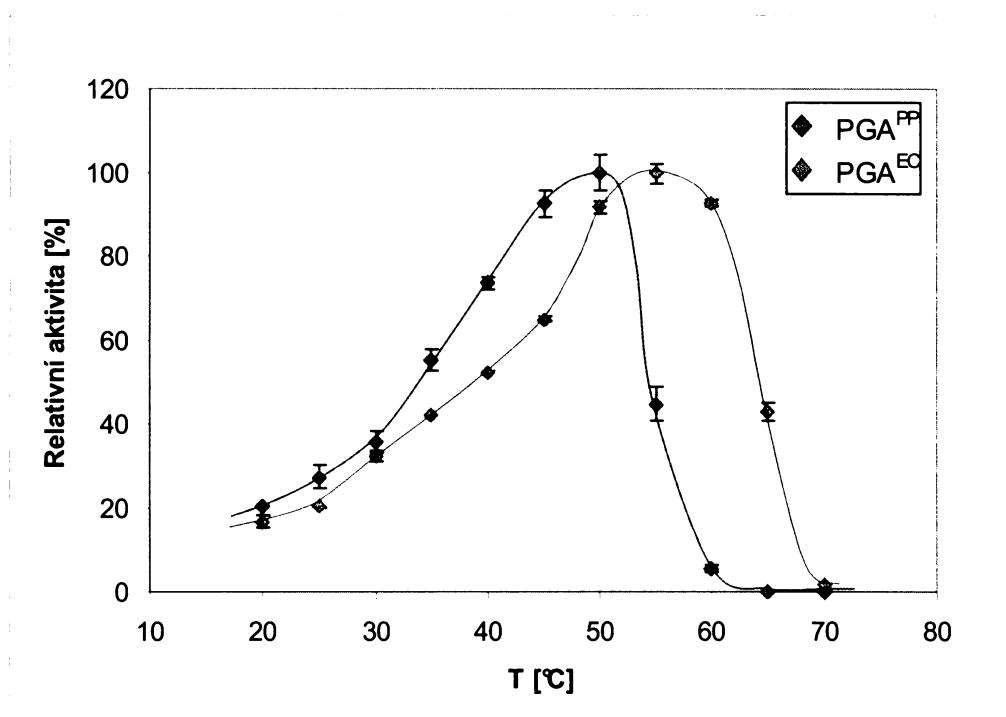


**Obr. 18:** Závislosti aktivity  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  na pH reakční směsi (37°C). Aktivita je vyjádřena jako relativní. Jako 100% byly vzaty maximální hodnoty aktivity daného enzymu: pro  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  byla maximální aktivita 100,6 U/ml, pro  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  byla max. aktivita 7,9 U/ml.



#### 6.8.4 Teplotní optimum $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$

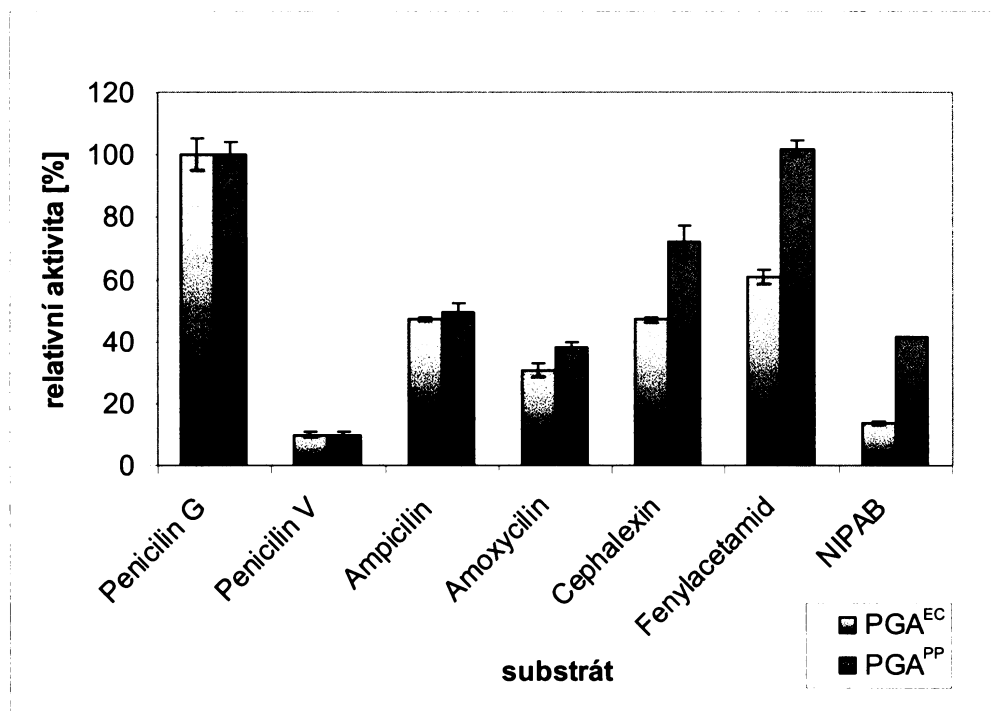
Pro určení teplotního optima  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  byla měřena závislost aktivity na teplotě reakční směsi v rozmezí 20–70°C (kap. 5.14). Vynesením získané závislosti bylo zjištěno, že  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  má nejvyšší aktivitu při 55°C a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  při 50°C. Na obr. 19 je znázorněna závislost aktivity na teplotě reakční směsi.



**Obr. 19:** Závislosti aktivity  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  na teplotě reakční směsi (pH 8,0). Aktivita je vyjádřena jako relativní. Jako 100% byly vzaty maximální hodnoty aktivity daného enzymu: pro  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  byla maximální aktivita 100,0 U/ml, pro  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  byla max. aktivita 11,3 U/ml.

### 6.8.5 Substrátová specifita hydrolytických reakcí $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$

Pro porovnání hydrolytických aktivit  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  byly použity substráty: penicilin G, penicilin V, ampicilin, amoxicilin, cefalexin, fenylacetamid a NIPAB (kap. 5.16). Aktivity pro jednotlivé substráty jsou vyneseny v obr. 20.



**Obr. 20:** Substrátové specifity  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$ . Aktivita je vyjádřena jako relativní. Jako 100% byly vzaty aktivity enzymů s penicilinem G jako substrátem: pro  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  byla vzata jako stoprocentní aktivita 64,6 U/mg proteinu, pro  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  pak 31,8 U/mg proteinu. Měření byla prováděna při 37°C a pH 8,0 pro  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a pH 7,5 pro  $\text{PGA}^{\text{PP}}$ .

### 6.8.6 Stanovení kinetických parametrů $\text{PGA}^{\text{EC}}$ a $\text{PGA}^{\text{PP}}$ pro substráty penicilin G a NIPAB

Pro substráty penicilin G a NIPAB byly stanoveny kinetické konstanty  $K_m$ ,  $V_{\text{max}}$ ,  $k_{\text{cat}}$  a  $k_{\text{cat}}/K_m$  (kap. 5.17). Měření počátečních rychlostí hydrolyzy penicilinu G katalyzované PGA bylo provedeno při koncentracích substrátu 5–100  $\mu\text{M}$ , a pro hydrolyzu NIPAB v oblasti koncentrací 6,7–2000  $\mu\text{M}$  (kap. 5.17). Hodnoty získané vyhodnocením naměřených dat pomocí programu Enzfitter a metodou Lineweaver-Burk jsou uvedeny v tab. 9.

**Tab. 9:** Kinetické konstanty  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  pro substráty NIPAB a penicilin G určené pomocí programu Enzfitter a metodou Lineweaver-Burk.

Enzym	Substrát	Enzfitter				Lineweaver-Burk			
		$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [U/ml]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_m$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$K_m$ [ $\mu\text{M}$ ]	$V_{\text{max}}$ [U/ml]	$k_{\text{cat}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{cat}}/K_m$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]
$\text{PGA}^{\text{EC}}$	penicilin G	34	121	13,6	4,00E+05	45	150	16,8	3,73E+05
	NIPAB	28	15	1,6	5,71E+04	32	16	1,8	5,63E+04
$\text{PGA}^{\text{PP}}$	penicilin G	12	7,7	6,4	5,33E+05	16	8,6	7,2	4,50E+05
	NIPAB	30	2,6	2,2	7,33E+04	45	3,2	2,6	5,78E+04

Hodnoty byly stanoveny z měření aktivit, která byla prováděna při 37°C a při pH 7,5 pro  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  a pH 8,0 pro  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ .

Srovnání námi naměřených hodnot kinetických parametrů s porovnatelnými údaji uvedenými v literatuře pro několik PGA exprimovaných různými mikroorganismy je uvedeno v tab. 10 (str. 68). Literární údaje týkající se substrátové specifity jsou uvedeny v tab. 11 (str. 69).

**Tab. 10:** Kinetické parametry různých PGA

	<i>Providencia rettgeri</i> exp. v <i>P. pastoris</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> exp. v <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> NCIB 8743A	mutantní <i>E. coli</i> ATCC 11105	<i>Providencia rettgeri</i> exp. v <i>S. cerevisiae</i>
Typ exprese	extracelulární	extracelulární	intracelulární	intracelulární	intracelulární	extracelulární
Buněčná aktivita [U/ml]	0,18 <sup>1)</sup>	40 <sup>3)</sup>	4	-	-	15 <sup>1)</sup>
Spec. akt. purif. PGA [U/mg]	30,4 <sup>1)</sup>	45 <sup>3)</sup>	-	6,35 <sup>2)</sup>	34,5 <sup>4)</sup>	-
$K_m$ Penicilin G [ $\mu$ M]	-	-	8,9 $\pm$ 4	67	3180 <sup>4)</sup>	-
$K_m$ NIPAB [ $\mu$ M]	19,7 $\pm$ 1,3 <sup>2)</sup>	-	27,0 $\pm$ 1	-	-	-
$V_{max}$ Penicilin G [U/mg]	-	-	-	7,1	22,73 <sup>4)</sup>	-
$V_{max}$ NIPAB [U/mg]	34,7 <sup>2)</sup>	-	-	-	-	-
$k_{cat}$ Penicilin G [ $s^{-1}$ ]	-	-	72,7 $\pm$ 3,0	-	-	-
$k_{cat}$ NIPAB [ $s^{-1}$ ]	-	-	68,8 $\pm$ 3,8	-	-	-
$k_{cat}/K_m$ Penicilin G [ $M^{-1}s^{-1}$ ]* $10^6$	-	-	8,2	-	-	-
$k_{cat}/K_m$ NIPAB [ $M^{-1}s^{-1}$ ]* $10^6$	-	-	2,6	-	-	-
pH - optimum	-	-	8,5	-	8	-
T - optimum [°C]	-	-	60	-	60	-
Pozn.	A	-	B	-	C	D
Zdroj informací	[57]	[58]	[59]	[60]	[51]	[61]

**NIPAB:** 6–nitro–3–fenylacetylamidobenzoová kyselina, <sup>1)</sup> 25°C, substrát NIPAB, <sup>2)</sup> 37°C, pH 7,5, substrát penicilin G, <sup>3)</sup> 37°C, pH 7,5, substrát NIPAB, <sup>4)</sup> 40°C, pH 8, substrát penicilin G, **A** – v této práci byl purifikací připraven nehomogenní vzorek; PGA má dvě  $\beta$ –podjednotky, přičemž větší je N–glykosilovaná, a jednu  $\alpha$ –podjednotku plně N–glykosilovanou.  $\alpha$ –podjednotka po deglykosilaci měla dvě formy, což bylo dáno zkrácením N–konce o 5 AMK, **B** – popsán významný pokles aktivity při pH reakce menším než 5,3 **C** – popsán významný pokles aktivity při pH menším než 6 a pH větším než 9, **D** –  $\alpha$ –podjednotka je částečně O–glykosilována

**Tab. 11:** Substrátové specifity různých PGA (hydrolytické reakce)

Substrát	Relativní aktivita [%]			
	<i>Proteus rettgeri</i> PCM 1384	<i>Achromobacter sp.</i> CCM 2428	<i>Escherichia coli</i> 5K(pHM12)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11105
penicilin G	100	100	100	100
penicilin V	13	23	14	7,2
ampicilin	25	197	11	-
amoxicilin	-	199	-	-
cefalexin	-	190	6	-
NIPAB	-	65	-	52
fenylacetamid	59	-	-	-
Zdroj informací	[62]	[63]	[64]	[55]

**NIPAB:** 6–nitro–3–fenylacetylamidobenzoová kyselina

## 7 DISKUSE

V této práci byla studována penicilin–G–acylasa z *Escherichia coli*, která byla exprimována kvasinkovým kmenem *Pichia pastoris* X33(pPIC–PA1). Tento heterologní enzym (PGA<sup>PP</sup>) byl porovnán s homologní penicilin–G–acylasou (PGA<sup>EC</sup>) produkovanou rekombinantním kmenem *E. coli* RE3(pKA18). Za účelem purifikace PGA<sup>PP</sup> pro její další charakterizaci byla provedena kultivace *P. pastoris* X33(pPIC–PA1) v míchaném bioreaktoru za definovaných podmínek v režimu přítokované kultivace. Kultivace byla provedena s pracovním objemem bioreaktoru 6 l, aby mohlo být připraveno dostatečné množství purifikovaného enzymu. Experiment probíhal ve dvou fázích, a to ve fázi příkrmu glycerolem (nárůst biomasy) a ve fázi příkrmu methanolem (indukce syntézy PGA). Obě fáze byly odděleny krátkou tranzitní fází (přechod z příkrmu glycerolem na příkrm methanolem). Celý kultivační experiment trval 138 h. Ve fázi příkrmu methanolem, kdy byla indukována syntéza PGA, docházelo k nárůstu celkové aktivity PGA. V této produkční fázi byla dvakrát sterilně odebrána kultura (vždy po významném poklesu aktivity PGA: v 78. h kultivace byl odebrán 1 l kultury o aktivitě 5,3 U/ml a v 116 h kultivace 0,37 l kultury o aktivitě 8,3 U/ml). Kolísavý charakter aktivity PGA je zřejmý z grafu na obr. 9, maximální aktivity bylo dosaženo v přibližně 105. h kultivace. Kultivace byla ukončena v 138. h, kdy z ní bylo získáno 3,8 l biomasy (376,4 g suché váhy) o aktivitě 10,61 U/ml.

Kultivace rekombinantního kmene *E. coli* RE3(pKA18) pro získání PGA<sup>EC</sup> byla provedena v Laboratoři enzymových technologií MBÚ AVČR již dříve. Pro purifikaci PGA<sup>EC</sup> byl vzat roztok enzymu, který již byl částečně purifikován, měl specifickou aktivitu 12,46 U/ mg proteinu a byl uchováván při teplotě -20°C. Postup izolace se dále skládal ze čtyř kroků (srážení PGA z roztoku síranem amonným mezi 40–60% nasycením, purifikace chromatografickými metodami na kolonách s náplní DEAE–fraktogelu, hydroxyapatitu a Superdexu 200). Jednotlivé kroky izolace byly převzaty z literatury, kde byly použity též pro izolaci PGA z bakterie *E. coli* za předpokladu, že PGA<sup>EC</sup> bude mít stejné vlastnosti. Purifikací byl získán vzorek o specifické aktivitě PGA<sup>EC</sup> 64,6 U/mg proteinu s penicilinem G jako substrátem (8,9 U/mg proteinu pro substrát NIPAB). Výtěžek představoval 23 % z celkové aktivity PGA ve výchozím vzorku. Bilance všech purifikačních kroků izolace je shrnuta v tab. 4 (str. 51) a jejich účinnost je též doložena

SDS–elektroforetickým dělením (obr. 11, str. 55). Z kvasinkové biomasy získané kultivací *Pichia pastoris* v bioreaktoru byla izolována PGA<sup>PP</sup> třemi hlavními purifikačními kroky (desintegrace buněk a flokulace pomocí CYSEP, srážení síranem amonným, chromatografie na koloně s náplní DEAE–fraktogelu), které vychází ze schématu izolace PGA z *E. coli*, jelikož se předpokládalo, že PGA<sup>PP</sup> bude mít podobné vlastnosti. Protože již po chromatografii na DEAE–fraktogelu byl vzorek relativně čistý (obr. 12, str. 56), a aby navíc nedošlo k dalším ztrátám aktivity, další dvě chromatografie (hydroxyapatit a Superdex 200) již nebyly použity. Purifikace PGA<sup>PP</sup> byla provedena celkem třikrát. První purifikace vycházela ze vzorku získaného kultivací *P. pastoris* X33(pPIC–PA1) izolát č. 2 leader1, která je popsána v této práci. Jelikož po ověření účinnosti purifikace SDS–elektroforetickým dělením bylo zjištěno, že  $\alpha$ –podjednotka PGA je přítomna ve více formách, byly provedeny další dvě nezávislé purifikace. Tyto experimenty byly provedeny se záměrem vyloučit či potvrdit, zda přítomnost více  $\alpha$ –podjednotek není způsobena přítomností proteas, které by  $\alpha$ –podjednotku během purifikace štěpily, případně, zda nejde o nespecifické modifikace proteinu způsobené metodicky. Obě další purifikace vycházely z nově připraveného vzorku pracovníky laboratoře, získaného kultivací *P. pastoris* X33(pPIC–PA1) izolát č. 7 leader2 za stejných podmínek v bioreaktoru. Tak bylo možné přidat směs inhibitorů proteas ke vzorku ještě před dezintegrací buněk. Dezintegrace buněk po druhé a třetí purifikaci byly provedeny v malém objemu na balotínách, kdežto v případě první purifikace, kdy se vycházelo z objemu většího, byl použit dezintegrátor Manton Gaulin využívající vysokého tlaku. První purifikací byl získán vzorek o specifické aktivitě PGA<sup>PP</sup> 17,6 U/mg proteinu, jeho výtěžnost však byla jen 12% (bilance jednotlivých purifikačních kroků je uvedena v tab. 5, str. 53). Druhou purifikací (bez inhibitorů proteas) byl získán vzorek o specifické aktivitě 41,0 U/mg proteinu a výtěžek činil 52% a třetí purifikací (s inhibitory proteas) byl získán vzorek o specifické aktivitě 31,8 U/mg proteinu (10,8 U/mg proteinu pro substrát NIPAB) s výtěžkem 46% (tab. 6, str. 54). Čistota enzymu byla opět ověřena SDS–elektroforetickým dělením, kde bylo zjištěno, že purifikací tentokrát nebylo dosaženo úplné homogenity vzorku. Další purifikační kroky již nebyly použity, aby nedošlo ke ztrátám PGA.

Kultivací *P. pastoris* bylo získáno dostatečné množství PGA a porovnáním s tab. 10 (str. 68) lze konstatovat, při purifikaci PGA<sup>PP</sup> byla dosažena specifická aktivita srovnatelná s ostatními publikacemi. Purifikací PGA<sup>EC</sup> bylo dosaženo vysoké specifické aktivity (1,5 násobek maximální uvedené v tab. 10, str. 68).

Porovnáním velikostí podjednotek enzymu rozdělených za denaturačních podmínek v SDS–gelu u vzorku purifikovaného bez inhibitorů proteas (-I) a vzorku purifikovaného s inhibitory proteas (+I) bylo zjištěno, že oba vzorky obsahují čtyři formy  $\alpha$ -podjednotky a jednu formu  $\beta$ -podjednotky, přičemž každý vzorek měl jiný poměr množství jednotlivých typů  $\alpha$ -podjednotek. U vzorku -I převládaly 3 formy  $\alpha$ -podjednotky, zatímco u vzorku +I převládaly pouze 2 formy  $\alpha$ -podjednotky. U obou vzorků byla odhadnuta molekulová hmotnost podjednotek z SDS–elektroforetického dělení (tab. 7, str. 58), a vždy největší a nejmenší v obou vzorcích byly dále zkoumány pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI–TOF.

Přítomnost více forem jednotlivých podjednotek uvádějí též jiné práce [57, 61], ve kterých byla PGA též exprimována kvasinkami (tab. 10, str. 68). V těchto pracích je ale PGA exprimována extracelulárně a přítomnost více forem je dána převážně glykosilací, ke které dochází při tomto způsobu exprese, zatímco v této práci je PGA exprimována intracelulárně. U tohoto způsobu exprese nebyla posttranslační modifikace doposud u *P. pastoris* popsána. Další práce, kde PGA (z *Providencia rettgeri*) je též exprimovaná v *P. pastoris*, uvádí, že kromě přítomnosti dvou typů  $\beta$ -podjednotky, z nichž jedna je N-glykosilovaná, je příčinou existence více forem  $\alpha$ -podjednotky také zkrácení jedné formy o 5 aminokyselin na jejím N-konci, přičemž jsou obě také N-glykosilované [57].

Hmotnostní spektrometrická analýza MALDI–TOF byla provedena pro porovnání všech typů  $\alpha$  a  $\beta$ -podjednotek  $PGA^{EC}$  a  $PGA^{PP}$  purifikované v přítomnosti i bez inhibitorů proteas. Analýzou bylo zjištěno, že  $\beta$ -podjednotka  $PGA^{EC}$  a  $\beta$ -podjednotky ze vzorků  $PGA^{PP}$  jsou shodné, neboť byly nalezeny identické C i N-koncové peptidové fragmenty. Jelikož byla  $\beta$ -podjednotka z  $PGA^{PP}$  správně velká, bylo tím potvrzeno, že autokatalytické štěpení mezi spacerem a  $\beta$ -podjednotkou probíhá při posttranslačním skládání správně. Dalším procesem při posttranslačním skládání je několika krokové odstranění spaceru směrem od jeho C-konce. Toto odbourávání by mělo být katalyzováno proteasami přítomnými v daném mikroorganismu, v němž dochází k expresi. Analýzou  $\alpha$ -podjednotek  $PGA^{PP}$  však bylo zjištěno, že u *P. pastoris* dochází v tomto kroku posttranslační modifikace ke špatnému odštěpení spaceru, neboť u větší  $\alpha$ -podjednotky  $PGA^{PP}$  byl nalezen peptid odpovídající N-koncovému fragmentu spaceru (viz. obr. 15,



str. 60). U menší  $\alpha$ -podjednotky je zřejmě spacer odbourán více a C-konec  $\alpha$ -podjednotky je jen o jednu aminokyselinu delší než v případě  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ . Navíc při porovnávání obou typů  $\alpha$ -podjednotek nebyl nalezen u  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  jejich správný N-koncový peptidový fragment. S určitostí je přítomen peptid začínající až dvanáctou aminokyselinou. Té u  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  předchází trojice aminokyselin **IVR**, které při tripeptidovém štěpení tvoří samostatný fragment, který spadá pod práh detekce této metody. Nebylo tudíž potvrzeno, zda u  $\alpha$ -podjednotky  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  je tento tripeptid přítomen či nikoli. Důvod, proč dochází ke ztrátě původního N-konce  $\alpha$ -podjednotky nebyl zjištěn, avšak podobná modifikace je uváděna i jinými autory [57].

$\text{PGA}^{\text{EC}}$  a  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  byly podrobeny charakterizaci a jejich vlastnosti byly porovnány. Jelikož u  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  nebyla posttranslační úprava úplná, byl zkoumán vliv této skutečnosti na aktivitu enzymu (byly určeny teplotní a pH stability, teplotní a pH optima hydrolytického štěpení penicilinu G). Experimentálně bylo zjištěno, že  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  je stabilní při rozsahu pH 3–8,5; při pH nad 9 již ztrácí svoji aktivitu.  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  je stabilní při pH 4–8 a při pH 3 a 9 vykazuje už pouze 50% aktivitu  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ . I přes pokles stability  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  při pH 3 a 9, jsou přesto oba enzymy stabilní v oblasti pH uváděné v literatuře [59, 51]. Oba enzymy jsou stabilní do teploty 40°C, nad ni již jejich aktivita prudce klesá. Ačkoli po preinkubaci při teplotě 45°C bylo zjištěno, že  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  jeví pokles aktivity asi o 20% větší než  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ , po preinkubaci při 50°C  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  ještě vykazovala více než 10% aktivitu, zatímco aktivita  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  již byla nedetekovatelná. Pro aktivitu  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  bylo nalezeno pH optimum hydrolytického štěpení penicilinu G při pH 8 a teplotní optimum 55°C. Pro  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  bylo určeno pH optimum při hodnotě 7,5 a teplotní optimum 50°C, tedy obě hodnoty jsou nižší než má  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ . pH optima  $\text{PGA}$  z jiných mikroorganismů pro hydrolytické reakce jsou většinou v oblasti pH 7–8,5. Jelikož při stanovení pH optima  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  bylo zjištěno, že pokles aktivity při pH 8 od aktivity stanovené při pH 7,5 je asi 10%, bylo další stanovení aktivity (substrátová specifita a kinetické parametry) prováděno v reakční směsi s pH 7,5.

$\alpha$ -podjednotka, která je právě u  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  modifikována, má obecně vliv na substrátovou specifitu enzymu. Proto byly také porovnány aktivity enzymu při katalýze hydrolytických reakcí substrátů, které jsou často v literatuře uváděny. Z grafu na obr. 20 (str. 66) vyplývá, že  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  opravdu jeví určitou změnu v substrátové specifitě. Pro substráty penicilin G, penicilin V, ampicilin a amoxicilin má stejné afinity jako  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ , ale u substrátů cefalexin,

fenylacetamid a NIPAB došlo k více než 20% nárůstu aktivity  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  oproti  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ . Ačkoli  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  v porovnání s  $\text{PGA}$  z *Achromobacter sp.* CCM 2428 [63] nedosáhla tak vysokých afinit pro uvedené substráty, ve srovnání s ostatními  $\text{PGA}$  uvedenými v tab. 11 (str. 69) vykazovala podstatně vyšší afinitu k substrátům cefalexinu, fenylacetamidu a ampicilinu. U ostatních substrátů vykazovala afinitu velmi podobnou  $\text{PGA}$  uvedeným v tab. 11 (str. 69).

Kinetické parametry  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  i  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  byly stanoveny pro hydrolyzu penicilinu G a NIPAB. Z naměřených dat byly spočítány konstanty Michaelise-Mentenové ( $K_m$ ), maximální rychlosti ( $V_{\text{max}}$ ) a katalytické konstanty ( $k_{\text{cat}}$ ). V tab. 9 (str. 67) jsou uvedeny hodnoty naměřených kinetických parametrů, které byly spočítány jak programem Enzfitter, tak pomocí dvojnásobného recipročního výnosu podle Lineweavera-Burka. V tab. 10 (str. 68) je uvedeno srovnání kinetických parametrů hydrolyzy penicilinu G popsanych pro několik  $\text{PGA}$  z jiných mikroorganismů, které byly stanovovány za srovnatelných, resp. velmi podobných podmínek. Z tabulky je zřejmé, že nejvyšší afinitu (nejnižší  $K_m$ ) k substrátu penicilinu G vykazoval enzym  $\text{PGA}$  z *Achromobacter xylosoxidans* exprimovaný *E. coli*. Ačkoli u  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  dochází k neúplné posttranslační modifikaci, přesto u ní došlo k snížení  $K_m$  a tím k zvýšení rychlosti hydrolyzy penicilinu G o více než 50% oproti  $\text{PGA}^{\text{EC}}$  a její hodnota je srovnatelná právě s  $K_m$   $\text{PGA}$  z *Achromobacter xylosoxidans*. U  $K_m$   $\text{PGA}^{\text{PP}}$  došlo k mírnému zvýšení oproti  $K_m$   $\text{PGA}^{\text{EC}}$  pro hydrolyzu NIPAB. V literatuře publikované hodnoty  $K_m$   $\text{PGA}$  pro tento substrát [57, 59] jsou sice trochu nižší, ale stále ještě srovnatelné.

Srovnání v této práci stanovených kinetických parametrů, substrátových specifit (vyjma substrátu penicilinu G a NIPAB) a dalších vlastností obou enzymů s  $\text{PGA}$  popsány v literatuře u dalších mikroorganismů nemohlo být provedeno, neboť literární údaje jsou založeny na měřeních prováděných za velmi různorodých podmínek a jsou neporovnatelné.

## 8 ZÁVĚR

1. Kultivací rekombinantní methylotrofní kvasinky *Pichia pastoris* X33(pPIC-PA1), v níž je exprimována penicilin-G-acylasa z donora *Escherichia coli* RE3 (PGA<sup>EC</sup>), byl připraven výchozí materiál pro izolaci penicilin-G-acylasy
2. Purifikací penicilin-G-acylasy (PGA<sup>EC</sup>) z *Escherichia coli* RE3(pKA18) byl získán čistý enzym o specifické aktivitě 64,6 U·mg<sup>-1</sup> proteinu s celkovým výtěžkem aktivity přibližně 23 %.
3. Penicilin-G-acylasa z *Pichia pastoris* X33(pPIC-PA1) byla purifikována s inhibitory proteas a bez jejich přítomnosti s cílem porovnat heterogenost výsledného purifikovaného enzymu (PGA<sup>PP</sup>).
4. Purifikací PGA<sup>PP</sup> v přítomnosti inhibitorů proteas byl získán vzorek o specifické aktivitě 31,8 U·mg<sup>-1</sup> proteinu s celkovým výtěžkem aktivity přibližně 46%. Purifikací bez přítomnosti inhibitorů proteas byl získán vzorek o specifické aktivitě 41,0 U·mg<sup>-1</sup> proteinu s celkovým výtěžkem aktivity přibližně 52%. V obou případech vzorky vykazovaly stejnou heterogenost velikosti proteinu v nativním gelu.
5. Hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF MS byla provedena analýza podjednotek, při které bylo zjištěno, že při posttranslační úpravě PGA v *P. pastoris* dochází k neúplné degradaci spaceru. U  $\alpha$ -podjednotky PGA<sup>PP</sup> nebyl nalezen N-konec shodný s PGA<sup>EC</sup> ( $\alpha$ -podjednotka PGA<sup>PP</sup> je o minimálně devět aminokyselin z N-konce kratší). Shodná a úplná  $\beta$ -podjednotka byla nalezena u PGA<sup>EC</sup> i PGA<sup>PP</sup>.
6. PGA<sup>EC</sup> a PGA<sup>PP</sup> byly charakterizovány a porovnány jejich vlastnosti. PGA<sup>PP</sup> jeví v porovnání s PGA<sup>EC</sup> pokles stability při pH nižších než 3,5 a vyšších než 8,5. Následující teplotní a pH optima byla určena pro hydrolýzu penicilinu G: pro PGA<sup>EC</sup> 55°C a pH 8, a pro PGA<sup>PP</sup> 50°C a pH 7,5.

7. Porovnáním substrátové specifity obou enzymů byl zjištěn vzrůst afinity  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  k substrátům cefalexinu, fenylacetamidu a 6-nitro-3-fenylacetylamidobenzoové kyselině oproti  $\text{PGA}^{\text{EC}}$ .
  
8. Kinetické parametry obou enzymů byly stanoveny pro hydrolýzu penicilinu G a 6-nitro-3-fenylacetylamidobenzoové kyseliny. Z naměřených dat vyplynulo, že  $\text{PGA}^{\text{PP}}$  dokáže penicilin G štěpit více než dvakrát rychleji.

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Parmar, A., Kumar, H., Marwaha, S.S., Kennedy, J.F.: *Biotechnol. Adv.* 18, 289–301 (2000)
2. Polderman-Tijmes, J.J., Jekel, P.A., de Vries, E.J., van Merode, A.E.J., Floris, R., van der Laan, J.M., Sonke, T., Janssen, D.B.: *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 211–218 (2002)
3. Sudhakaran, V.K., Deshpande, B.S., Ambedkar, S.S., Shewale, J.G.: *Process Biochem.* 27, 131–143 (1992)
4. Valle, F., Balbás, P., Marino, E., Bolivar, F.: *Trends Biochem. Sci* 16, 36–40 (1991)
5. Barends, T.R.M., Yoshida, H., Bijkstra, B.W.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 356–369 (2004)
6. Bruggink, A., Roy, P.D.: *Industrial Synthesis of Semisynthetic Antibiotics, v knize Synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics* (Bruggink, A. ed.) Dordrecht, The Netherlands, str. 331–333 (1981)
7. Rajendhran, J., Gunasekaran, P.: *Journal of bioscience and bioengineering* 97, 1–13 (2004)
8. Kim, D.J., Byun, S.M.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1040, 12–18 (1990)
9. Bruns, W., Hoppe, J., Tsai, H., Bruning, H.J., Maywald, F., Collins, J., Mayer, H.: *J. Mole. Appl. Genetics* 3, 36–44 (1985)
10. Bock, A., Wirth, R., Schmid, G., Schumacher, G., Lang, G., Buckel, P.: *FEMS Microbiol. Lett.* 20, 141–144 (1983)
11. Daumy, G.O., Danley, D., McColl, A.S., Apostolakos, D., Vinick, F.J.: *J. Bacteriol.* 163, 925–932 (1985)
12. Francetić, O., Deretić, V., Marjanović, N., Glišin, V., Belgrd/Yu: *BTF-Biotech-Forum* 5, 90–94 (1988)
13. Daumy, G.O., Danley, D., McColl, A.S., Apostolakos, D., Vinick, F.J.: *J. Bacteriol.* 163, 1279–1281 (1985)
14. Schumacher, G., Sizmann, D., Haug, H., Buckel, P., Bock, A.: *Nucleic Acids Res.* 14, 5713–5727 (1986)
15. Barbero, J.L., Buesa, J.M., Buitrago, G.G., Méndez, E., Pérez-Aranda, A., García, J.: *Gene* 49, 69–80 (1986)

16. Sobotková, L., Štěpánek, V., Plháčková, K., Kyslík, P.: *Enzyme Microb. Technol.* 19, 389–397 (1996)
17. Oliver, G., Valle, F., Rosetti, F., Gomez-Pedrozo, M., Santamarée, P., Gosset, G., Bolivar, F.: *Gene* 40, 9–14 (1985)
18. Vojtíšek, V., Slezák, J., *Folia Microbiol.* 20, 298–306 (1975)
19. Robas, N., Zouheiry, H., Branlant, G., Branlant, C.: *Biotechnol. Bioeng.* 41, 14–24 (1993)
20. Szentirmai, A.: *Appl. Microbiol.* 12, 185–187 (1964)
21. Robas, N., Branlant, C.: *Curr. Microbiol.* 29, 263–268 (1994)
22. Lindsay, C.D., Pain, R.H.: *Eur. J. Biochem.* 192, 133–141 (1990)
23. Ignatova, Z., Wischnewski, F., Notbohm, H., Kasche, V.: *J. Mol. Biol.* 348, 999–1014 (2005)
24. Sizmann, D., Keilmann, C., Bock, A.: *Eur. J. Biochem.* 192, 143–151 (1990)
25. Kasche, V., Lummer, K., Nurk, A., Piotraschke, E., Rieks, A., Střeva, S., Voelter, W.: *Biochim. Biophys. Acta* 17, 76–86 (1999)
26. Choi, K.S., Kim, J.A., Kang, H.S.: *J. Bacteriol.* 174, 6270–6276 (1992)
27. Fernández-Lafuente, R., Rosell, C.M., Guisán, J.M.: *Enzyme Microb. Technol.* 13, 898–905 (1991)
28. Fernández-Lafuente, R., Alvaro, G., Blanco, R.M., Guisán, J.M.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27, 277–280 (1991)
29. Fernández-Lafuente, R., Rosell, C., Guisán, J.M.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 24, 139–143 (1996)
30. Schroen, C.G.P.H., Nierstrasz, V.A., Kroon, P.J., Bosma, R., Janssen, E.M., Beeftink, H.H., Tranper, J.: *Enzyme Microb. Technol.* 24, 498–506 (1999)
31. Švedas, V.K., Savchenko, M.V., Beltser, A.I., Guranda, D.F.: *Ann NY Acad Sci* 799, 659–669 (1996)
32. Alkema, W.B.L., Hengens, C.M.H., Kroenzinga, E.H., de Vries, E., Fleris, J., Dijkstra, B.W., Janssen, D.B.: *Protein Eng.* 12, 857–863 (2000)
33. Calleri, E., Temporini, C., Massolini, G., Caccialanza, G.: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35, 243–258 (2004)
34. Pohl, T., Waldmann, H.: *Tetrahedron Lett.* 36, 2963–2966 (1995)
35. Duggleby, H.J., Tolley, S.P., Hill, C.P., Dodson, E.J., Dodson, G., Moody, P.C.: *Nature* 373, 264–268 (1995)

36. Kheirulomoon, A., Ardjmand, M., Fazelinia, H., Zakeri, A.: *Process Biochem.* 36, 1095–1101 (2001)
37. Barbero, J.M., Buesa, J.M., Gonzáles-de-Buitrago, G., Mendéz, E., Pérez-Aranda, A., García, J.L.: *Gene* 49, 69–80 (1986)
38. Mayer, H., Collins, J., Wagner, F.: *Enzyme Eng.* 5, 61–69 (1980)
39. Garcia, J.L., Buesta, J.M.: *J. Biotechnol.* 3, 187–195 (1986)
40. Panbangred, W., Udombrenditkul, M., Meevootisom, V.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 613, 455–459 (1990)
41. Romanos, M.A., Scorer, C.A., Clare, J.J.: *Yeast* 8, 423–488 (1992)
42. Faber, K.M., Harder, W., Ab, G., Veenhuis, M.: *Yeast* 11, 1331–1344 (1995)
43. Eckart, M.R., Bussineau, CH.M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 525–530 (1996)
44. Sudbery, P.E.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 517–524 (1996)
45. Hollenberg, C.P., Gellissen, G.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 554–560 (1997)
46. Higgins, D.R., Cregg, J.M.: *Methods Mol. Biol.* 103, 1–15 (1998)
47. Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C.: *Bio-technology* 11, 905–910 (1993)
48. Cereghino, G.P.L., Cereghino, J.L., Ilgen, C., Cregg, J.M.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 329–339 (2002)
49. Jahic, M., Veide, A., Charoenrat, T., Teeri, T., Enfors, S.O.: *Biotechnol. Progr.* 22, 1465–1473 (2006)
50. Wellcome, G.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 527–533 (1995)
51. Erarslan, A., Terzi, I., Guray, A., Bermek, E.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 51, 27–40 (1991)
52. Bečka, F.: osobní sdělení
53. Laemmli, U.K.: *Nature* 227, 680–685 (1970)
54. Batchelor, F.R., Chain, E.B., Hardy, T.L., Mansford, K.R.L., Polinson, G.N.: *Proc. R. Soc. London, Ser. B*154, 498–508 (1961)
55. Kutzbach, C., Rauenbusch, E.: *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 354, 45–53 (1974)
56. Weatherburn, M.W.: *Anal. Chem.* 39, 971–975 (1967)
57. Ševo, M., Degrassi, G., Skoko, N., Venturi, V., Ljubijankić, G.: *FEMS Yeast Research* 1, 271–274 (2002)
58. Yang, S., Huang, H., Zhang, R., Huang, X., Li, S., Yuan, Z.: *Protein Expr. Purif.* 21, 60–64 (2001)

59. Cai, G., Zhu, S., Yang, S., Zhao, G., Jiang, W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2764–2770 (2004)
60. Balasingham, K., Warburton, D., Dunnill, P., Lilly, M.D.: *Biochim. Biophys. Acta*, 250–256 (1972)
61. Ljubijankić, G., Storici, F., Glišin, V., Bruschi, C.V.: *Gene* 228, 225–232 (1999)
62. Robac, M., Szewczuk, A.: *Acta Biochim. Pol.* 28, 275–284 (1981)
63. Škrob, F., Bečka, S., Plháčková, K., Fotopulosová, V., Kyslík, P.: *Enzyme Microb. Technol.* 32, 738–744 (2003)
64. Schomer, U., Segner, A., Wagner, F.: *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 307–312 (1984)



„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.“

<b>Jméno a příjmení S adresou</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum vypůjčení</b>	<b>Poznámka</b>