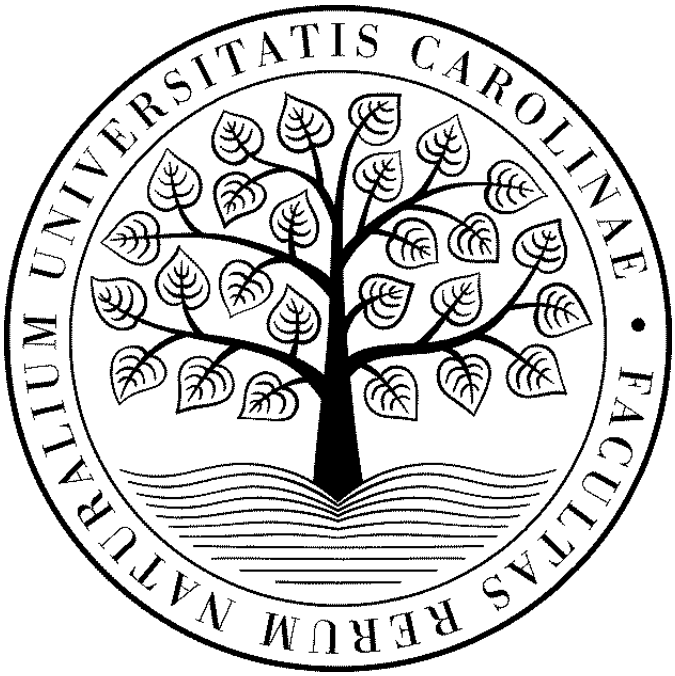
UNIVERZITA KARLOVA

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Stanislav Rudnyckyj

Funkční mutanty *β*-*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D.

Konzultantka: Ing. Kristýna Slámová, Ph.D.

Praha 2018/2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Pavly Bojarové, Ph.D. a Ing. Kristýny Slámové, Ph.D., a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze, dne Podpis:

Poděkování:

V této části bakalářské práce bych rád poděkoval vedoucí práce RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D. a zejména pak konzultantce Ing. Kristýně Slámové, Ph.D., za jejich trpělivost, velkou ochotu a cenné rady při zpracování praktické i teoretické části bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval prof. Ing. Vladimírovi Křenovi, DrSc., za možnost pracovat v Laboratoři biotransformací a cenné rady.

Abstrakt

β-*N*-Acetylhexosaminidasy (EC 3.2.1.52; systematický název 2-acetamido-2-deoxy- β-D-hexopyranosidacetamidodeoxyhexohydrolasy) jsou retenující *exo*-glykosidasy katalyzující štěpení terminálních neredukujících zbytků β-D-GlcNAc a β-D-GalNAc v oligosacharidech a glykokonjugátech (*N*-acetyl-β-D-hexosaminidů). Za vyhovujících reakčních podmínek jsou tyto enzymy schopné chitooligosacharidy nejen štěpit, ale i syntetizovat. Pro syntetické reakce se běžně využívají β-*N*-acetylhexosaminidasy zejména kvůli jejich snadné dostupnosti, široké substrátové specifitě a vysoké stabilitě. Ke zvýšení syntetických vlastnosti enzymu se využívá několik metod, mezi které patří cílená mutageneze v aktivním místě. Bodové mutace jimiž jsme se zabývali, jsou mířeny tak, aby potlačovaly hydrolytickou aktivitu enzymu. Výsledkem je zvýšení výtěžku transglykosylační reakce, jelikož nedochází k hydrolytickému štěpení ani substrátu, ani produktů v reakční směsi.

V rámci této práce byla připravena mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasa z *Aspergillus oryzae* pomocí metody PCR, kdy byla vnesena bodová mutace nahrazením kodonu TAC (Tyr) za CAC (His). Aminokyselinový zbytek Tyr445 nacházející se v aktivním centru enzymu, mezi jehož funkce patří stabilizace akceptorové molekuly vody, byl nahrazen za His. Mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasa byla rekombinantně exprimována v eukaryotické jednobuněčné kvasince *Pichia pastoris*.

Dále byly charakterizovány kinetické a syntetické vlastnosti dříve připravené mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* s bodovou mutací Tyr445Phe. Pomocí transglykosylační reakce byla připravena směs chitooligomerů *p*NP-$(GlcNAc)_n$ a $(GlcNAc)_n$. Připravené sacharidové produkty byly analyzovány pomocí TLC a HPLC.

Klíčová slova:

β-*N*-acetylhexosaminidasa, transglykosylační reakce, enzymová syntéza, bodová mutace, aktivní centrum, *Aspergillus oryzae*

Abstract

β-*N*-Acetylhexosaminidases (EC 3.2.1.52; systematic name 2-acetamido-2-deoxy-β-D-hexopyranosideacetamidodeoxyhexohydrolase) are retaining *exo*-glycosidases that catalyze the cleavage of terminal non-reducing β-D-GlcNAc and β-D-GalNAc residues in oligosaccharides and glycoconjugates (*N*-acetyl-β-D-hexosaminides). Under satisfactory reaction conditions, these enzymes are capable of not only cleaving but also of synthesizing chitooligosaccharides. β-*N*-Acetylhexosaminidases are commonly used for synthetic reactions mainly due to their availability, broad substrate specificity, and high stability. There are several methods used to enhance the synthetic properties of the enzyme, including targeted mutagenesis at the active site. Point mutations that we have studied are directed to suppress the hydrolytic activity of the enzyme. As a result, the yield of the transglycosylation is increased since there is negligible hydrolytic cleavage of both the substrate and the products in the reaction mixture.

In this work, a mutant β-*N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* was prepared by PCR method, where a point mutation was inserted by replacing the codon TAC (Tyr) with CAC (His). The amino acid residue Tyr445 found in the active center of the enzyme, which acts as a stabilizer of the acceptor water molecule, has been replaced by His. The mutant β-*N*-acetylhexosaminidase was recombinantly expressed in the eukaryotic unicellular yeast *Pichia pastoris*.

Furthermore, kinetic and synthetic properties of the previously prepared mutant β-*N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* with point mutation Tyr445Phe were characterized. By means of transglycosylation, a product mixture of chitooligomers *p*NP-$(GlcNAc)_n$ and $(GlcNAc)_n$ was prepared. The prepared isolated sugar products were analyzed by TLC and HPLC.

Keywords:

β-*N*-acetylhexosaminidase, transglycosylation, enzymatic synthesis, point mutation, active site, *Aspergillus oryzae*

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

*Dpn*I	restrikční endonukleasa z *Diplococcus pneumoniae*
EC	klasifikační systém enzymů (*Enzyme Commission Number*)
GalNAcasa	β-*N*-acetylgalaktosaminidasa (2-acetamido-2-deoxy-β-D-galaktopyranosidhydrolasa)
GalNAc	*N*-acetylgalaktosamin (2-acetamido-2-deoxy-D-galaktopyranosa)
GlcNAcasa	β-*N*-acetylglukosaminidasa (2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosidhydrolasa)
GlcNAc	*N*-acetylglukosamin (2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa)
$(GlcNAc)_2$	*N, N'*-diacetylchitobiosa
$(GlcNAc)_3$	*N, N', N''*-triacetylchitotriosa
$(GlcNAc)_4$	*N, N', N'', N'''*-tetraacetylchitotetraosa
$(GlcNAc)_5$	*N, N', N'', N''', N''''*-pentaacetylchitopentaosa
$(GlcNAc)_n$	chitooligomer
Hex*Ao*	β-*N*-acetylhexosaminidasa z *Aspergillus oryzae*
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High-Performance Liquid Chromatography*)
LB	medium LB (Luria-Bertani)
LMW	molekulový marker (*Low Molecular Weight marker*)
*p*NP	*p*-nitrofenol/ *p*-nitrofenyl
*p*NP-GalNAc	*p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-galaktopyranosid
*p*NP-GlcNAc	*p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glukopyranosid
*Sac*I	restrikční endonukleasa ze *Streptomyces achromogenes*
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (*Thin Layer Chromatography*)
UV	ultrafialový (*Ultra violet*)

Obsah

1 ÚVOD 9

1.1 β-*N*-ACETYLHEXOSAMINIDASY 9

1.1.1 Základní informace a charakteristika 9

1.1.2 Struktura, aktivní místo enzymu a reakční mechanismus 10

1.1.3 β-*N*-Acetylhexosaminidasy z vláknitých hub 13

1.1.4 Produkce fungálních β-*N*-acetylhexosaminidas 15

1.2 SYNTÉZA OLIGOSACHARIDŮ POMOCÍ GLYKOSIDAS 16

1.2.1 Glykosidasy při oligosacharidové syntéze 16

1.2.2 Transglykosylační reakce katalyzované β-*N*-acetylhexosaminidasami 18

1.2.3 Funkční mutanty β-*N*-acetylhexosaminidas 20

2 CÍL PRÁCE 23

3 MATERIÁLY A METODY 24

3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE A KOMERČNÍ SETY 24

3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE 25

3.3 SEZNAM POUŽITÝCH MEDIÍ A ROZTOKŮ 27

3.4 POUŽITÉ METODY 28

3.4.1 Vnášení bodové mutace do plasmidu pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR) 28

3.4.2 Příprava PCR produktu pro transformaci do Escherichia coli Top10 30

3.4.3 Transformace plasmidu do Escherichia coli 31

3.4.4 Izolace plasmidu 31

3.4.5 Příprava plasmidu pro elektroporaci 32

3.4.6 Příprava elektrokompetentních buněk Pichia pastoris 33

3.4.7 Transformace DNA do Pichia pastoris 33

3.4.8 Screening exprese β-*N*-acetylhexosaminidasy 34

3.4.9 Kryokonzervace vybraných kultur Pichia pastoris 35

3.4.10 Exprese β-*N*-acetylhexosaminidasy a zpracovaní kultury k purifikaci 36

3.4.11 Purifikace β-*N*-acetylhexosaminidasy 36

3.4.12 Stanovení čistoty a koncentrace enzymu 37

3.4.13 Biochemická charakterizace β-*N*-acetylhexosaminidasy 37

3.4.13 Transglykosylační reakce katalyzované β-*N*-acetylhexosaminidasou 39
3.4.14 Izolace produktů transglykosylační reakce 40
4 VÝSLEDKY PRÁCE 41
4.1 PCR MUTAGENEZE HEXAO 41
4.2 SELEKCE A IZOLACE MUTOVANÝCH PLASMIDŮ 42
4.3 PRODUKCE MUTANTNÍ β-*N*-ACETYLHEXOSAMINIDASY V PICHIA PASTORIS KM71H 44
4.4 PURIFIKACE MUTANTNÍ β-*N*-ACETYLHEXOSAMINIDASY 45
4.5 CHARAKTERIZACE MUTANTNÍ β-*N*-ACETYLHEXOSAMINIDASY 47
4.6 TRANSGLYKOSYLAČNÍ REAKCE 49
4.7 IZOLACE A CHARAKTERIZACE PRODUKTŮ TRANSGLYKOSYLAČNÍ REAKCE 53
5 DISKUZE 54
6 ZÁVĚR 57
7 LITERATURA 58

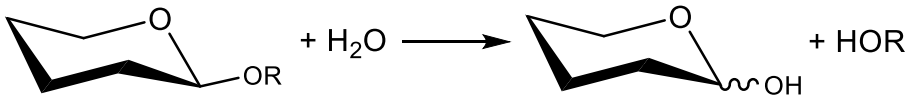
1 Úvod

1.1 β-*N*-Acetylhexosaminidasy

1.1.1 Základní informace a charakteristika

β-*N*-Acetylhexosaminidasy (EC 3.2.1.52; systematický název 2-acetamido-2-deoxy- β-D-hexopyranosidacetamidodeoxyhexohydrolasy) jsou glykosid hydrolasy (*exo*-glykosidasy) katalyzující štěpení terminálních neredukujících zbytků β-D-GlcNAc a β-D-GalNAc v oligosacharidech a glykokonjugátech (*N*-acetyl-β-D-hexosaminidů) a proto hrají důležitou roli v mnoha biologických procesech [1]. Podle klasifikace CAZy (*Carbohydrate-Active Enzymes*; http://www.cazy.org), kde jsou enzymy tříděny podle strukturní a sekvenční podobnosti, patří β-*N*-acetylhexosaminidasy do GH20 rodiny glykosidhydrolas [2].

Obecně glykosidasy (EC 3.2.1) katalyzují hydrolýzu glykosidové vazby v komplexních sacharidech [3] (Obr.1). Jsou to běžné enzymy, které se využívají například k degradaci biomasy, jako je celulosa, hemicelulosa či škrob; též jsou součásti nespecifické imunity (lysozym, neuraminidasa) a biosyntézy a degradace glykogenu v těle.



Obr. 1. Hydrolytická aktivita glykosidas

Z hlediska místa štěpení v oligosacharidovém řetězci rozlišujeme dvě skupiny glykosidas: *exo*-glykosidasy štěpící sacharidové jednotky z neredukujícího konce sacharidu, mezi které patři β-*N*-acetylhexosaminidasy, a *endo*-glykosidasy štěpící sacharidové jednotky uvnitř řetězce [4]. Pokud jsou nastaveny vhodné reakční podmínky, některé glykosidasy jsou schopné katalyzovat syntetické reakce transglykosylací nebo reverzní hydrolýzou [5].

β-*N*-Acetylhexosaminidasy nejsou striktně specifické pro konfiguraci C-4 hydroxylu na substrátu, ale přirozeně vykazují určitou preferenci pro substrát s C-4 hydroxylovou konfigurací v závislosti na jejich původu [6]. Obecně jsou upřednostňovány

D-*gluko*-struktury, což je zřejmé z běžného poměru GlcNAcasových/GalNAcasových aktivit, který leží v rozmezí 1.5-4.0 [7]. Nicméně jsou známy některé enzymy, které značně preferují axiální hydroxyl na C-4, jako β-*N*-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum* s 2,5-krát vyšší GalNAcasovou aktivitou [6].

β-*N*-Acetylhexosaminidasy patří k rozšířeným enzymům v přírodě a vyskytuji se ve většině žijících organismů. Mají řadu funkcí, které závisí na typu organismu a na lokalizaci v daném organismu nebo v buňce. Jedna z důležitých vlastnosti β-*N*-acetylhexosaminidas je rozklad chitinu buněčné stěny hub nebo exoskeletu hmyzu. Díky této vlastnosti jsou organismy jako mořské chitinolytické bakterie, houby a hmyz schopny rekonstrukce svých schránek během růstu [8-10]. U rostlin není zatím přesně známa funkce, ale zdá se, že tento enzym se uplatňuje během dozrávaní plodů a klíčení semen [11]. V říši živočichů mají β-*N*-acetylhexosaminidasy širokou škálu funkcí, účastní se například iniciační interakce samčí gamety s oocytem během oplození [12] a degradace různých glykokonjugátů v lysozomech; nedostatek nebo nefunkčnost lyosomálních β-*N*-acetylhexosaminidas vede ke vzniku fatálních neurodegenerativních onemocnění [13].

1.1.2 Struktura, aktivní místo enzymu a reakční mechanismus

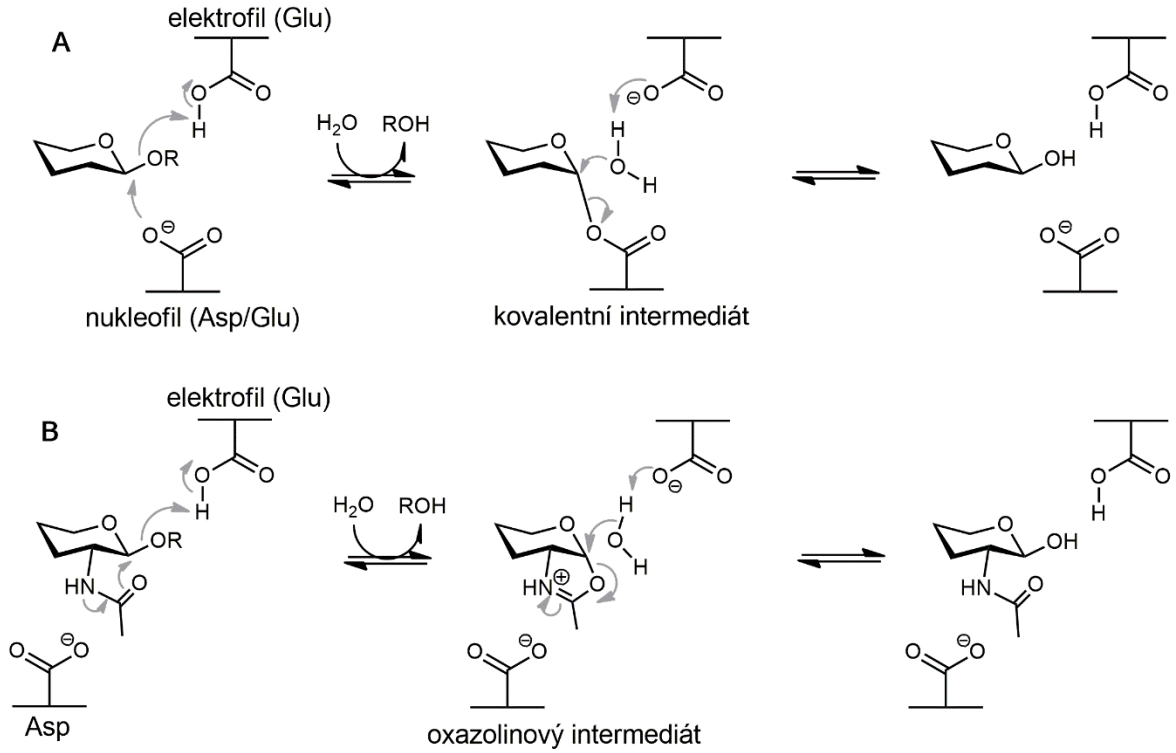
β-*N*-Acetylhexosaminidasy jsou velkou skupinou enzymů, které mají původ jak eukaryotický, tak prokaryotický, proto se strukturně mohou lišit. Celkově obecnou strukturní charakteristikou proteinů z rodiny GH20 β-*N*-acetylhexosaminidas je $(\beta/\alpha)_8$-barel, který se také nazývá TIM-barel. Tato konformace se skládá ze střídajících se osmi α-šroubovic a paralelních osmi β-listů; pro β-*N*-acetylhexosaminidasy je dále typická přítomnost dvou velkých smyček v aktivním místě, které obsahuji páry katalytických zbytků aminokyselin Asp-Glu.

První krystalové struktury β-*N*-acetylhexosaminidasy, které byly popsány v druhé polovině 90. let, pocházely z chitinolytických bakterií; první popsaná β-*N*-acetylhexosaminidasa byla izolována ze *Serratia marcescens* [14]. Další studie byly zaměřeny na enzymy vyšších organismů včetně člověka, proto byla velice dobře popsána 3D struktura lidských lysosomálních β-*N*-acetylhexosaminidas. Jedná se o dimery, které se skládají ze dvou podjednotek α a β, přičemž jsou tyto podjednotky ze 60 % identické [15]. Existuji tři isoformy lidské β-*N*-acetylhexosaminidasy: homodimerické B $(\beta\beta)$ a S $(\alpha\alpha)$ a heterodimerická A $(\alpha\beta)$. Dimerizace je nezbytná pro katalytickou aktivitu tohoto enzymu.

Další eukaryotické β-*N*-acetylhexosaminidasy, jejichž struktury byly popsány a izolovány, pocházely z hmyzu a hub. Enzymy z hub budou podrobně rozebrány v následující kapitole.

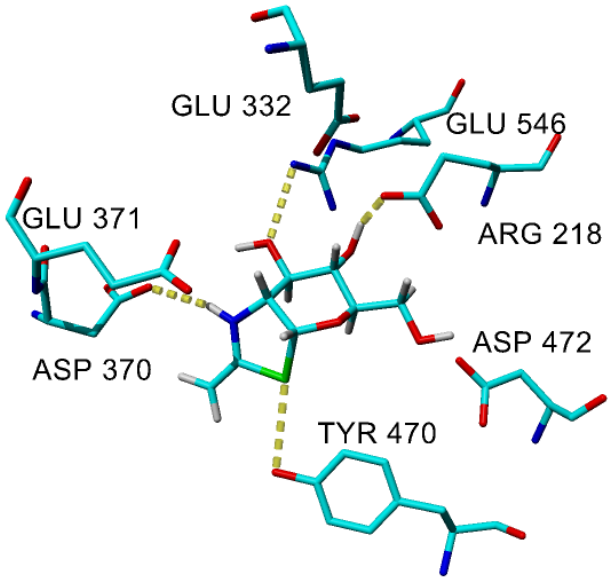
Obecně všechny popsané bakteriální β-*N*-acetylhexosaminidasy jsou aktivní jako monomery, kdežto příbuzné eukaryotické jsou aktivní v dimerní formě.

Pro reakční mechanismus β-*N*-acetylhexosaminidas jsou klíčové dvě karboxylové skupiny Glu a Asp v aktivním místě [16]. Tento reakční mechanismus s asistencí substrátu je odvozen od mechanismu retenujících glykosidas. Ze sterických důvodu jsou dvě karboxylové skupiny vzdálené naproti sobě pouze natolik, aby byl umožněn přístup jen substrátu [17] (Obr. 2, str. 12). V prvním kroku karboxylová skupina glutamátu vystupuje jako elektrofil (neboli donor protonu) a interaguje s glykosidovou vazbou. Mezitím C2-acetamidová skupina substrátu jako nukleofil utočí na C1, kde se nachází anomerní centrum. Poté dojde k rozbití glykosidové vazby a ke vzniku oxazolinového intermediátu [18,19]. Jakmile se odštěpí odstupující skupina, cyklický meziprodukt se podrobuje nukleofilnímu útoku od vstupující molekuly vody v anomerním centru. Výsledkem je akceptor o jednu cukernou jednotku kratší a odštěpená cukerná jednotka se zachovalou anomerní konfigurací [20]. Na tomto mechanismu je zajímavé to, že jako nukleofil vystupuje C2-acetamidová skupina substrátu za vzniku oxazolinového meziproduktu místo karboxylové skupiny aspartátu za vzniku kovalentně vázaného enzym-substrát komplexu, jak je běžné u retenujících glykosidas. Experimenty s mutantními β-*N*-acetylhexosaminidasami ukázaly, že Asp neztrácí svůj význam v aktivním místě, ale je nezbytný pro správnou orientaci 2-acetamidové skupiny během nukleofilního útoku a taktéž pro stabilizaci oxazolinového přechodového stavu [21].



Obr. 2. Schematické znázornění reakčního mechanismu vybraných glykosidas: A) mechanismus retenujících β-glykosidas; B) mechanismus s asistencí substrátu popsaný u β-*N*-acetylhexosaminidas.

Aktivní místo β-*N*-acetylhexosaminidas je vysoce konzervované, a kromě páru katalytických aminokyselin aspartátu a glutamátu obsahuje mnoho dalších aminokyselinových zbytků důležitých pro navázání a stabilizaci substrátu (Obr. 3, str. 12). Jednou z nejdůležitějších aminokyselin je tyrosin ležící v blízkosti 2-acetamidové skupiny substrátu, jehož funkcí je zejména stabilizace a správná orientace oxazolinového intermediátu reakce.



Obr. 3. Model aktivního místa β-*N*-acetylhexosaminidasy z vláknité houby *Talaromyces flavus*: s navázaným inhibitorem NAG-thiazolinem, který se od oxazolinového přechodového stavu liší pouze přítomností atomu síry místo kyslíku v heterocyklickém kruhu. Katalytické aminokyseliny jsou Asp370 a Glu371, stabilizující tyrosin je Tyr470 [22].

1.1.3 β-*N*-Acetylhexosaminidasy z vláknitých hub

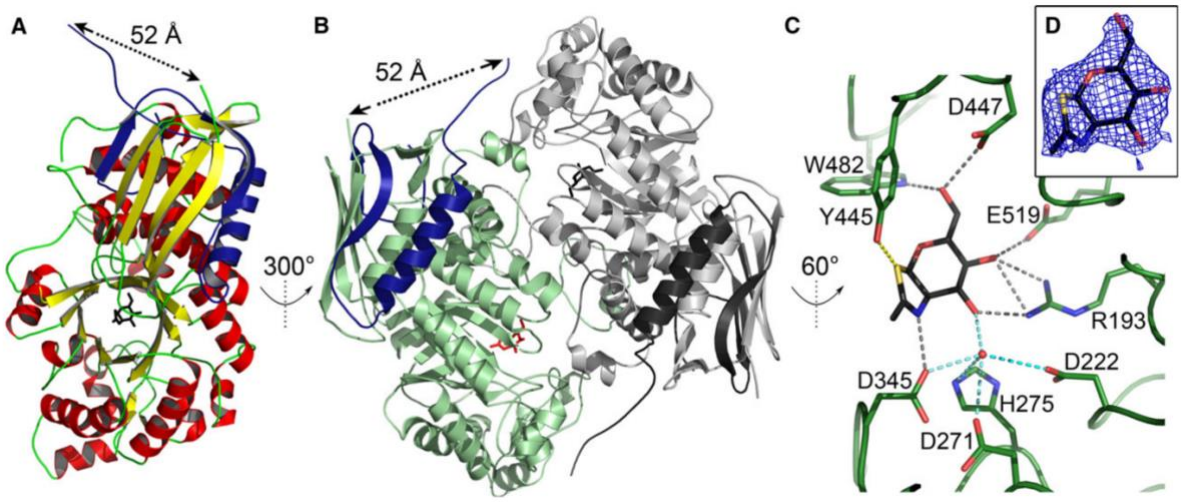
β-*N*-Acetylhexosaminidasa je součásti chitinolytického systému hub v buněčné stěně rostoucích hyf. Chitinolytický systém se skládá ze dvou enzymů, a to z chitinasy a β-*N*-acetylhexosaminidasy, kde chitinasa zpracovává chitin na *N*,*N*′-diacetylchitobiosu a pak β-*N*-acetylhexosaminidasa štěpí *N*,*N*′-diacetylchitobiosu na *N*-acetylglukosamin [9].

Tyto enzymy jsou v současnosti studovány u vláknitých mikroskopických hub kvůli jejich důležitosti ve fyziologii těchto organismů a zejména kvůli jejich unikátním katalytickým vlastnostem. Na rozdíl od lidské a bakteriální β-*N*-acetylhexosaminidasy, které jsou lysosomální nebo membránově vázáné, houbové β-*N*-acetylhexosaminidasy jsou robustní extracelulárně sekretované enzymy dobře tolerující oxidativní extracelulární prostředí. Mezi další unikátní vlastnosti fungálních β-*N*-acetylhexosaminidas patří schopnost hydrolyzovat nejen *N*,*N*′-diacetylchitobiosu, ale i vyšší chitooligomery a substráty nesoucí ve své molekule různé modifikace [23]. Výhodou těchto robustních enzymů je také jejich vysoká regioselektivita a schopnost syntetizovat různé

oligosacharidy a glykokonjugáty s poměrně vysokými výtěžky v tzv. transglykosylačních reakcích [24].

Houbové enzymy GH20 rodiny mají neobvyklou molekulární architekturu, jak bylo zjištěno z krystalické struktury β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (Obr. 4). Tyto extracelulární enzymy tvoří dimery, které se skládají ze dvou monomerních *N*-glykosylovaných katalytických podjednotek (každá z nich má 65 kDa) a jsou nekovalentně asociované se dvěma velkými *O*-glykosylovanými propeptidy (každý z nich má 10 kDa) [25]. Propeptidy hrají unikátní roli v enzymové regulaci. Pokud je jenom jedna propeptidová molekula asociovaná s dimerem z katalytického jádra, enzymový komplex vykazuje přibližně 50 % aktivitu. Houby využívají propeptidy jako regulátory k řízení aktivity β-*N*-acetylhexosaminidasy při různých stadiích růstového cyklu [26].

Enzymy z příbuzných druhů hub, jako je β-*N*-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum*, sdílejí sekvenční podobnost a jiné strukturní funkce, např. uspořádání disulfidů (s β-*N*-acetylhexosaminidasou z *Aspergillus oryzae*). Sekvenční podobnost β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* s enzymy z jiných druhů hub je přibližně 85 %. Sekvence houbového enzymu se víc odlišuje od bakteriálních a lidských enzymů s podobnosti od 42 % do 49 % [27].



Obr. 4. Krystalová struktura β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*. (A) Celková struktura monomeru β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*. Modře je znázorněn propeptid. Místo, které se aktivuje peptidasou, je zobrazeno šipkami. Taktéž šipky naznačuji vzdálenost mezi N-koncem katalytického jádra a C-koncem propeptidu. (B) struktura dimeru β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*. Zeleně je znázorněn monomer A, který má na sobě vázaný modrý propeptid a červený ligand NAG-thiazolin. Šedě je znázorněn monomer B, který má na sobě vázaný černý propeptid a NAG-thiazolin. (C) Detail aktivního místa s navazáným NAG-thiazolinem. Přerušované čáry představují polární interakce. Přímé vodíkové vazby jsou označeny šedě, vodíkové vazby zprostředkované vodou jsou tyrkysové a vodíkové vazby zprostředkované sírou jsou žluté. (D) Mapa elektronové hustoty NAG-thiazolinu [26].

1.1.4 Produkce fungálních β-*N*-acetylhexosaminidas

Mikroskopické vláknité houby jsou obecně účinní přirození producenti β-*N*-acetylhexosaminidasy. Exprese enzymu je konstitutivní, ale může být podstatně zvýšena změnou kultivačních podmínek a využitím vhodných induktorů, jako jsou chitin, chitooligomery nebo *N*-acetylglukosamin [23]. Rekombinantní exprese tohoto enzymu byla poprvé popsána v případě β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus nidulans*, která byla vyprodukována na tuhém fermentačním mediu [28].

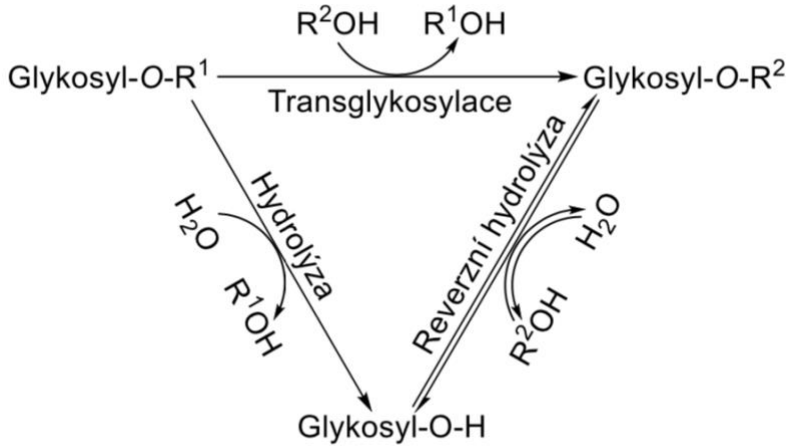
V současnosti jsou fungální β-*N*-acetylhexosaminidasy produkovány s vysokým výtěžkem v eukaryotické jednobuněčné kvasince *Pichia pastoris*. Mezi výhody této produkce patří vysoká čistota získaného enzymu, několikanásobně vyšší množství vyprodukovaného enzymu a mnohem rychlejší kultivace než u přirozených producentů.

Takto připravený rekombinantní enzym vykazuje stejné jak biochemické, tak katalytické vlastnosti, včetně syntézy s derivatizovanými sacharidovými substráty [29].

1.2 Syntéza oligosacharidů pomocí glykosidas

1.2.1 Glykosidasy při oligosacharidové syntéze

První syntéza pomoci glykosidas popsaná v odborné literatuře se uskutečnila již v roce 1898, když Hill použil extrakt z kvasinek k přípravě disacharidu [30]. Od té doby zájem o využití glykosidas rostl a s tím byly objevovány nové enzymy, substráty a reakční metody pro přípravu oligosacharidů a glykokonjugátů. Glykosidasy (*O*-glykosidhydrolasy; EC 3.2.1.-) jsou *in vivo* určeny ke štěpení oligo- a polysacharidů přenosem glykosylu na vodu. Za vhodných reakčních podmínek jsou schopny vytvořit glykosidovou vazbu, pokud se hydroxylová skupina akceptoru chová jako účinnější nukleofil než molekula vody. Takové podmínky mohou být dosaženy několika strategiemi, například snížením aktivity vody zvýšením koncentrací substrátů, případně přídavkem organických rozpouštědel a využitím aktivovaného donoru glykosylu s dobře odstupující skupinou [7].



Obr. 5. Reakce katalyzované glykosidasami

Glykosidasy syntetizují glykosidovou vazbu dvěma způsoby, v závislosti na struktuře substrátů a na poměru složek v reakčním mediu. V termodynamicky řízeném rovnovážném procesu zvaném reverzní hydrolýza je volný monosacharid spojen s nukleofilem za vyloučení molekuly vody, jedná se tedy o kondenzační reakci (Obr. 5). Reakční rovnováha

vede k upřednostnění hydrolýzy nad glykosidovou formou, proto je nutné zvolit vhodné reakční podmínky. Jeden ze způsobů, jak posunout reakční rovnováhu ke směru tvorby produktu, je snížit aktivitu vody pomocí opět vysoké koncentrace reaktantů, přidáním soli a/nebo odebíráním produktu z reakční směsi. Zvýšena reakční teplota na 50-60 °C je nezbytná pro posunutí rovnováhy do rozumného časového měřítka [31]. Takové reakce trvají dny nebo dokonce týdny s výtěžkem běžně nepřesahujícím 15 % [7].

Mezi kineticky řízené reakce patří transglykosylace (Obr. 5, str. 16), při kterých se jako donor glykosylu používají aktivované glykosidy s dobře odstupující skupinou, např. *p*-nitrofenylovou. Tento typ reakce přináší mnohem větší výtěžek v rozmezí 20-40 % za kratší reakční dobu, nežli je tomu u reverzní hydrolýzy. Voda u transglykosylací se chová jako konkurenční nukleofil, způsobuje hydrolýzu produktu a tím snižuje výtěžek; proto stejně jako u termodynamicky řízených reakcí musí být její aktivita zredukována. Tradičně se v transglykosylačních reakcích využívají především retenující *exo*-glykosidasy, které můžou přenášet jenom neredukující terminální monosacharidový zbytek substrátu. Invertující enzymy nekatalyzují transglykosylační reakce, ale běžně se využívají k reverzní hydrolýze [32].

Mezi další významné syntetické glykosidasy kromě β-*N*-acetylhexosaminidasy patří sialidasy (nebo neuraminidasy; EC 3.2.1.18) v přírodě hydrolyzující terminální sialovou kyselinu, která je α-vázána na glykoproteiny, glykolipidy a oligosacharidy. β-Fruktofuranosidasy (nebo invertasy; EC 3.2.1.26) patří ke glykosidasam produkujícím fruktooligosacharidy. Mannosidasy, které se dělí na α-mannosidasy, využívané k reverzní hydrolýze pro tvorbu *manno*-oligosacharidů, a β-mannosidasy patřící k retenujícím enzymům. Fukosidasy, které jsou zapojeny do mnoha biologických procesů, jako je růstová regulace nebo receptorová interakce, syntetizují determinant krevní skupiny H typu 2 [33].

Glykosidasy patří k enzymům se širokou substrátovou specificitou. Teoreticky každý substrát obsahující přinejmenším jednu hydroxylovou nebo thiolovou skupinu může být glykosylován, dokonce i oxim [34]. Samozřejmě substrátová tolerance se liší u jednotlivých enzymů. Glykosidasy obecně vykazují nízkou regioselektivitu. Pokud se v reakci nachází víc jak jeden akceptorový hydroxyl, s největší pravděpodobností výsledkem transglykosylace bude komplexní směs více produktů, které budou špatně oddělitelné.

S rostoucí popularitou glykosidas byly vyvinuty nové metody stimulující syntetické vlastnosti těchto enzymů, zejména substrátové a enzymové inženýrství. Glykosidasy mají značnou substrátovou flexibilitu, proto mohou být použity i v reakcích s nepřirozenými glykosylovými donory i akceptory.

Využitím řízené mutageneze byly vytvořeny nové typy glykosidas, které se označuji jako glykosynthasy [36]. Nukleofilní zbytek v aktivním místě je nahrazen za nenukleofilní aminokyselinu, většinou se jedná o glycin nebo alanin. Touto záměnou aminokyselin se potlačí hydrolytická aktivita, což vede k zesílení transglykosylační aktivity při použití substrátu s fluoridovou odstupující skupinou v opačné anomerní konfiguraci, než má přirozený substrát enzymu, tedy typicky α-glykosylfluorid pro glykosynthasy připravené z β-glykosidas.

1.2.2 Transglykosylační reakce katalyzované β-*N*-acetylhexosaminidasami

β-*N*-Acetylhexosaminidasy k syntéze využívají mnohem levnější substráty, nežli je tomu u reakcí katalyzovaných příslušnými glykosyltransferasami. K syntetickým účelům se používají β-*N*-acetylhexosaminidasy z rodiny GH20, hlavně fungální extracelulární enzymy, které vykazují vysokou transglykosylační aktivitu; enzymy z jiných zdrojů se používají zřídka [1].

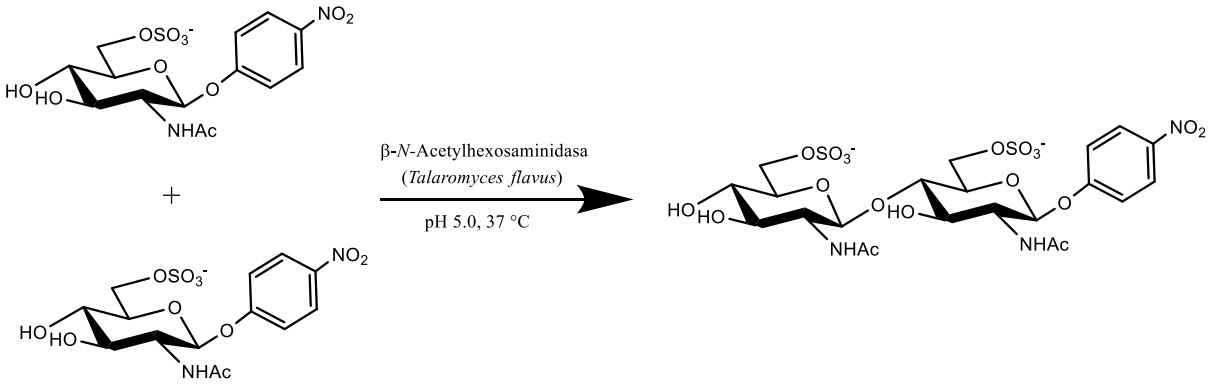
Syntetický potenciál a regioselektivita β-*N*-acetylhexosaminidas byly intenzivně studovány již v 90. letech minulého století. Během těchto studií byla použita řada akceptorů, jako jsou chitooligomery [37], námelové alkaloidy [38], α- a β- glykosidy *N*-acetylglukosaminu [39], primární alkoholy [40], vitamíny (pyridoxin, thiamin) [41] a cukerné nukleot [42]. Průběh reakce byl ovlivňován zdrojem enzymu a změnou reakčního prostředí, konkrétně přidáním cyklodextrinů, anorganických soli a pomocných rozpouštědel. Výtěžky těchto transglykosylačních reakcí se pohybovaly v rozmezí 5-30 %.

Výtěžek transglykosylační reakce z velké míry závisí na typu aktivovaného donoru glykosylu, který ve většině případů obsahuje *p*-nitrofenyl jako odstupující skupinu. Byly však navrženy a úspěšně použity alternativní účinné aglykony při transglykosylačních reakcích. Mezi takové aktivované glykosylové donory patři glykosylazidy, které se ukázaly jako dobře využitelné donory v enzymatických glykosylacích s výhodou vysoké

rozpustnosti a možnosti použití azidu jako chemického linkeru pro další konjugaci k biologickým strukturám [43].

Všestranný transglykosylační potenciál houbových β-*N*-acetylhexosaminidas byl dobře popsán při použití substrátů s modifikovaným *N*-acylem na C-2. I když je substrátová acetamidová skupina obecně považována za nepostradatelnou pro katalytickou aktivitu těchto enzymů, jsou tolerovány určité změny na C-2, jako je například délka acylu a substituce hydroxylem. Naproti tomu vysoce elektronegativní nebo nabité substituenty (trifluoracetyl, sulfát a volná aminoskupina) vedly k destabilizaci oxazolinového reakčního intermediátu v reakčním mechanismu s asistencí substrátu, a jsou tedy nevhodné pro hydrolytické i transglykosylační reakce. Glykosylace za použití substrátů *p*-nitrofenyl-2-deoxy-2-formamido-β-D-glukopyranosidu, *p*-nitrofenyl-2-deoxy-2-glykoloylamido-β-D-glukopyranosidu a *p*-nitrofenyl-2-deoxy-2-propionamido-β-D-glukopyranosidu katalyzované β-*N*-acetylhexosaminidasami z *Talaromyces flavus*, *Aspergillus oryzae* a *Penicillium oxalicum* produkovaly *N*-acyl modifikované disacharidy obsahující výhradně β1-4 vazby s dobrými výtěžky [44].

Některé fungální β-*N*-acetylhexosaminidasy prokázaly svou širokou substrátovou specifitu v reakcích se substráty nesoucími modifikaci na C-6. Negativně nabité skupiny, jako je sulfát a karboxyl, byly substituovány na C-6 za vzniku donorů a akceptorů, které byly využity k syntéze bioaktivních disacharidů nesoucích jednu nebo dvě negativně nabité skupiny (Obr. 6) [45].



Obr. 6. Autokondenzační reakce se sulfatovaným substrátem katalyzovaná β-*N*-acetylhexosaminidasou z *Talaromyces flavus*.

Některé fungální β-*N*-acetylhexosaminidasy jsou schopny přenášet dokonce i 4-deoxyglykosylový donor, což jasně ukazuje, že 4-hydroxylová skupina na pyranosovém kruhu substrátu není nezbytná pro vazbu substrátu k aktivnímu místu enzymu [46].

Regioselektivita při transglykosylačních reakcích katalyzovaných β-*N*-acetylhexosaminidasami je převážně β1-4 a v některých případech byla také pozorována tvorba β1-6 produktů. Díky specifickým β-*N*-acetylhexosaminidasám byly transglykosylací též připravené oligosacharidy s atypickou glykosidovou vazbou. K takovým enzymům patří β-*N*-acetylhexosaminidasa z *Aspergillus oryzae* vytvářející neredukující cukr GlcNAcβ(1-1)Manβ [47]. Podobně je tomu u β-*N*-acetylhexosaminidas z *A. flavofurcatis, A. oryzae a A. tamarii*, které jsou schopny přenosu GlcNAc na D-galaktosu a laktosu a tím vytváří neredukující di- a trisacharidy [48]. Mezi další neobvyklé β-*N*-acetylhexosaminidasy patří β-*N*-acetylhexosaminidasa z *Bifidobacterium bifidum*, která katalyzuje přenos jak GalNAc, tak GlcNAc na galaktosový zbytek laktosy za vzniku β1-3 glykosidové vazby [49].

Pomocí β-*N*-acetylhexosaminidas se za vhodných podmínek dají připravit di-, tri-, a tetrasacharidy, v některých případech dokonce i vyšší oligosacharidy. Použitím β-*N*-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* byly připraveny vyšší chitooligomery s šesti až deseti GlcNac jednotkami [50,39]. β-*N*-Acetylhexosaminidasa z *P. oxalicum* vykazuje vysokou β-*N*-acetylgalaktosaminidasovou aktivitu, proto se využívá pro přípravu oligosacharidů, které obsahuji β-GalNAc [6].

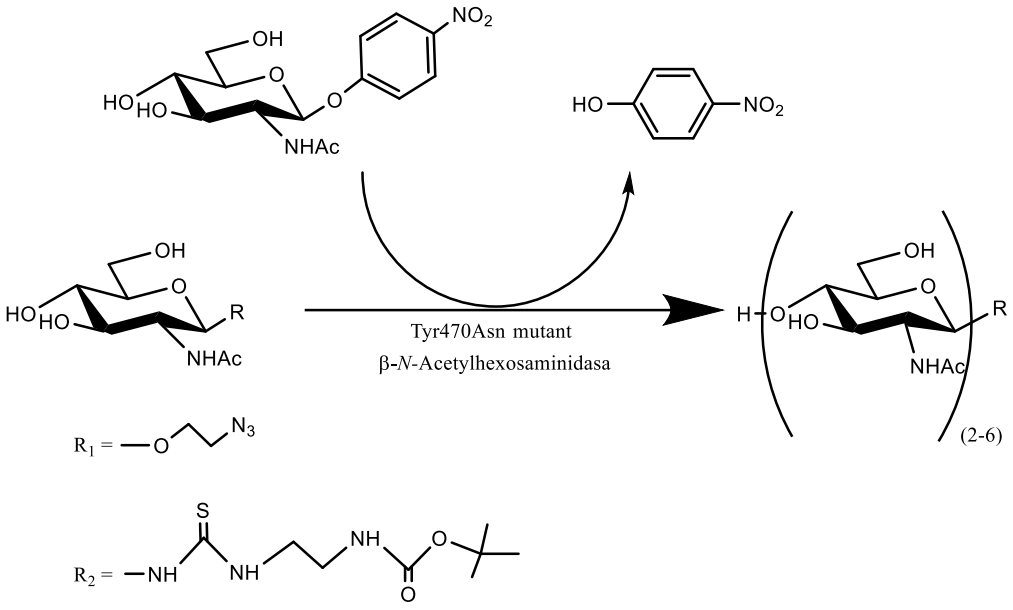
1.2.3 Funkční mutanty β-*N*-acetylhexosaminidas

Chitooligomery mají výhodné biologické vlastnosti; např. jsou silnými antioxidanty [51], antiangiogenními činidly [52] a spouštěči imunitní reakce u rostlin [53]. Chitooligomery byly tradičně vyráběny hydrolýzou chitinu, který patří mezi běžný biologický odpad, buď chemicky použitím silné kyseliny, nebo enzymově působením chitinas. Tyto metody však často vedou k tvorbě směsí produktů, které se obtížně separují a mají vysoký stupeň polymerizace, zatímco žádanými produkty jsou oligomery definované velikosti. K řešení tohoto problému byla v poslední době zkoumána enzymová syntéza definovaných chitooligomerů s použitím mutantních β-*N*-acetylhexosaminidas. Jelikož β-*N*-acetylhexosaminidasy jsou hydrolytické enzymy, výtěžky syntetických reakcí katalyzovaných přirozenými enzymy jsou podstatně sníženy kompetitivním štěpením jak

glykosylových donorů, tak produktů transglykosylace [54]. Tato nevýhoda může být elegantně vyřešena genetickým inženýrstvím.

Na základě 3D modelu β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus*, účinného a flexibilního biokatalyzátoru [22], byly navrženy mutantní varianty tohoto enzymu se zvýšenou transglykosylační aktivitou. Kromě párů katalytických aminokyselin Asp-Glu obsahuje aktivní centrum enzymů z rodiny GH20 několik vysoce konzervovaných aminokyselinových zbytků, včetně tyrosinu, který stabilizuje oxazolinový intermediát [18]. Tento zbytek tyrosinu (Tyr470 v β-*N*-acetylhexosaminidase z *T. flavus*) byl vybrán jako cíl mutace; byl vyměněn za histidin, fenylalanin a asparagin. Všechny tyto nové varianty enzymů měly transglykosylační aktivitu vykazující vysokou účinnost transglykosylace a zanedbatelnou hydrolytickou aktivitu. Zajímavé je, že si modifikované β-*N*-acetylhexosaminidasy zachovaly alespoň částečně schopnost přenášet *N*-acetylgalaktosaminovou jednotku [55]. Ztratily však původní akceptorovou flexibilitu a nemohou použít *N*-acetylgalaktosamin jako akceptor. Při použití *N*-acetylglukosaminu jako akceptoru byl vytvořen jediný disacharidový produkt, GalNAc(β1–4)GlcNAc [56]. Z důvodu vysoké strukturní podobnosti β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* s β-*N*-acetylhexosaminidasou z *Talaromyces flavus* byly navrženy analogické bodové mutace, kdy aminokyselinový zbytek v aktivním místě Tyr445 byl nahrazen za histidin, fenylalanin a asparagin; část tohoto projektu je předmětem předkládané bakalářské práce.

Použitím těchto GH20 mutantních β-*N*-acetylhexosaminidas byly připraveny nové derivatizované chitooligomery. Mezi takové chitooligomery patří glykosidy nesoucí *t*-Boc skupinu spojenou s glykosylem přes můstek obsahující thiomočovinu (GlcNAc-linker-*t*-Boc; Obr. 7, str. 22). Výhodou tohoto typu glykosidů je možnost hydrolýzy *t*-Boc skupiny a následné uvolnění aminoskupiny, která může být použita pro spojení příslušných chitooligomerů s jinými strukturami, jako jsou multivalentní dendrimery nebo jiné biomateriály [57]. Jako další potenciálně využitelné glykosidy jsou chitooligomery nesoucí ethylazid na C1. Tyto modifikované chitooligomery byly připraveny transglykosylační reakcí katalyzovanou mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasou z *Talaromyces flavus* (Obr. 7, str. 22). Chitooligomery s azidovou funkční skupinou se používají např. ke konjugaci s propargylovou skupinou HPMA kopolymerů za vzniku biokompatibilních glykopolymerních nosičů [58].



Obr. 7. Syntéza modifikovaných oligosacharidů β-*N*-acetylhexosaminidasou z *Talaromyces flavus.*

Dalším případem, kdy se bodové mutace používají pro zvýšení hydrolytické aktivity, je β-*N*-acetylhexosaminidasa z *Ostrinia furnacalis*. Tento hmyzí enzym patří k chitonolytickým β-*N*-acetylhexosaminidasám, které mají více než jedno místo, kam se váže substrát, a proto druhá molekula substrátu se může chovat jako allosterický inhibitor. Pomocí bodové mutace aminokyselinového zbytku v blízkosti aktivního centra bylo dosaženo eliminace inhibice větší koncentrací substrátu. Momentálně je tato mutantní varianta Trp490Ala β-*N*-acetylhexosaminidasy z *O. furnacalis* pravděpodobně nejúčinnější chitinolytický enzym, čímž se z něj stává vhodný kandidát pro průmyslovou produkci *N*-acetylglukosaminu z chitinu [59].

2 Cíl práce

- Příprava a charakterizace jedné mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* (Tyr445His) s potlačenou hydrolytickou aktivitou
    - Vnášení mutace do plasmidu pomocí PCR
    - Transformace mutantního plasmidu do *Escherichia coli* Top10 a expresního vektoru do *Pichia pastoris* KM71H
    - Rekombinantní exprese mutantního genu v jednobuněčném producentovi *Pichia pastoris* KM71H a screening pomocí SDS-PAGE
    - Produkce enzymu v *Pichia pastoris* KM71H a jeho purifikace
    - Stanovení kinetických parametrů mutantního enzymu
    - Charakterizace hydrolytické a transglykosylační aktivity připraveného enzymu

3 Materiály a metody

3.1 Použité přístroje a komerční sety

Äkta Prime Plus (Amersham Biosciences, Velká Británie)

Aparatura na agarosovou elektroforézu (Bio-Rad, USA)

Aparatura na SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)

Centrifugy:

- Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, USA)
- Universal 320 R (Hettich, Německo)
- Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, USA)
- Sorvall centrifuge RC 6+ (Themo Scientific, USA)

Fotoaparát na gely:

- MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging systems, Izrael)

Elektroporátor:

- MicroPulser Electroporator (Bio-Rad, USA)

HPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko)

Chromatografické kolony:

- Bio-Gel P2, <45 μm × 100 cm × 2,6 cm (Bio-Rad, USA)
- Fractogel EMD SO_3^- (Merck, Německo)
- TSKgel Amide-80 HPLC Column 5 μm × 250 mmol/l × 46 mmol/l (Tosoh Bioscience, Japonsko)

Kyvety na elektroporaci (Bio-Rad, USA)

Laminární box:

- MSC 9 (Jouan, Velká Británie)

Lyofilizátor:

- Lyovac GT2 (Leybold GmbH, Německo)

Magnetická míchačka:

- AREX, VELP SCIENTIFICA

PCR termocykler:

- Termocykler TPersonal 20 (Biometra, Německo)

pH metr:

- pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Česká republika)

Rotační vakuová odparka:

- Laborota 4001 (Heidolph, Německo)

Sběrač frakcí pro gelovou chromatografii:

- Pump P-1 (Pharmacia Biotech, USA)

Spektrofotometr:

- Sunrise Tecan (Tecan, Švýcarsko)
- UVmini-1240 (Shimadzu, Německo)

Termomixér:

- Thermomixer comfort (Eppendorf, USA)

Třepačky:

- IKA KS 4000 ic control (Schoeller, Česká republika)

UV lampa, UV 240 (A. Krüss Optronic, Německo)

UV pultík (UVitec, Velká Británie)

Váhy:

- Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko)

Vortex:

- Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)

High Pure Plasmid Isolation Mini Kit (Roche, Švýcarsko)

High Pure Plasmid Isolation Midi Kit (Roche, Švýcarsko)

JETquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed, USA)

3.2 Použité chemikálie

6× *DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, USA)

Aceton (VWR chemicals, Česká republika)

Acetonitril (VWR chemicals, Česká republika)

Agar (Sigma-Aldrich, USA)

Akrylamid (VWR chemicals, Česká republika)

Bakteriologický pepton (Oxoid, Velká Británie)

Biotin (Fluka BioChemika, Švýcarsko)

Bradfordovo činidlo – *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, USA)

Bromfenolová modř (Serva, Německo)

Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Coomasie Brilliant blue (USB Corporation, USA)

D-glukosa (Lach-Ner, Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)

DNA polymerasa: NZyProof DNA Polymerase (NZYTech, Portugalsko)

*Dpn*I (New England Biolabs, Velká Británie)

DTT (Sigma-Aldrich, USA)

EDTA (Carl Roth, Německo)

Ethanol (VWR chemicals, Česká republika)

Escherichia coli Top10 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Extrakt z kvasnic (Oxoid, Česká republika)

GelRed (Biotium, USA)

GlcNAc (Acros Organics, USA)

Glycerol dvakrát destilovaný 99,5 % (VWR chemicals, Česká republika)

Glycin (Lach-Ner, Česká republika)

HEPES (Megazyme, USA)

Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lach-Ner, Česká republika)

Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Kapalný dusík (Maneko, Česká republika)

Kyselina citronová (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina boritá (Lachema, Česká republika)

Kyselina fosforečná 85 % (Lachema, Česká republika)

Kyselina octová (VWR chemicals, Česká republika)

Kyselina sírová (VWR chemicals, Česká republika)

Molekulový marker – Amersham LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare, Velká Británie)

Hydroxid amonný (Lac-hner, Česká republika)

Methanol (ISOLAB, Německo)

N,N'-methylenbisakrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

Peroxosíran amonný (USB Corporation, USA)

Pichia pastoris KM71H (Invitrogen, USA)

Plazmid Hex*Ao*1

*p*NP-GlcNAc (Gold Biotechnology, USA)

Primery: YHHexAo_Fw a YHHexAo_Re (Generi Biotech)

Propan-2-ol (VWR chemicals, Česká republika

*Sac*I (New England Biolabs, Velká Británie)

SDS (Serva, Německo)

Síran amonný (Lach-Ner, Česká republika)

Sorbitol (Lach-Ner, Česká republika)

TEMED (Sigma-Aldrich, USA)

Tris-Cl (Sigma-Aldrich, USA)

Trypton (Oxoid, Česká republika)

Uhličitan sodný (Lachema, Česká republika)

YNB (yeast nitrogen base; Carl-Roth, Německo)

3.3 Seznam použitých medií a roztoků

LB (Luria-Bertani) médium (100 ml): 1 g trypton, 0,5 g kvasničný extrakt, 1 g NaCl

LBA médium: 1 g trypton, 0,5 g kvasničný extrakt, 1 g NaCl, 2 g agarosa

YP médium (100 ml): 1 g kvasnicový extrakt, 2 g pepton

YPA médium (100 ml): 1 g kvasnicový extrakt, 2 g pepton, 2 g agarosa

YPD médium (100 ml): 1 g kvasnicový extrakt, 2 g pepton, 10 ml 20% D-glukosa

Minimální glycerolové médium (1 l) 700 ml H_2O; 100 ml 10% glycerol; 100 ml 1 mol/l draselno-fosfátový pufr; 100 ml YNB; 2 ml 0,02% biotin

Minimální methanolové médium (200 ml) 140 ml H_2O; 20 ml 1 mol/l draselno-fosfátový pufr pH 6, 20 ml YNB, 20 ml 5% methanol, 400 µl 0,02% biotin

Plné glycerolové médium (100 ml) 70 ml H_2O; 10 ml 10% glycerol; 10 ml 1 mol/l draselno-fosfátový pufr pH 6; 10 ml YNB; 0,2 ml 0,02% biotin

Plné methanolové médium (20 ml) 20 ml YP médium; 3 ml 1 mol/l draselno-fosfátový pufr pH 6; 3 ml YNB; 3 ml 5% methanol; 60 µl 0,02% biotin

Draselno-fosfátový pufr pH 6,0: 1 mol/l K_2HPO_4; 1 mol/l KH_2PO_4

Citrát-fosfátové pufry:

- 50 mmol/l citrát-fostátový pufr pH 5: 50mM kyselina citronová; 50 mmol/l Na_2HPO_4
- 10 mmol/l citrát-fosfátový pufr pH 5: 10 mmol/l kyselina citronová; 10 mmol/l Na_2HPO_4

- 10 mmol/l citrát-fosfátový pufr pH 4: 10 mmol/l kyselina citronová; 10 mmol/l Na_2HPO_4

Separační 10% polyakrylamidový gel (10 ml): 4,0 ml H_2O; 3,3 ml 30% akrylamidový mix (29% akrylamid, 1% *N,N´*-methylenbisakrylamid); 2,5 ml 1,5M Tris-Cl pH 8,8; 100 µl 10% SDS; 100 µl 10% peroxosíran amonný; 4 µl TEMED

Zaostřovací gel (5 ml): 3,4 ml H_2O; 830 µl 30% akrylamidový mix (29% akrylamid, 1% *N,N´*-methylenbisakrylamid); 630 µl 1,0 mol/l Tris-Cl pH 6,8; 50 µl 10% SDS; 50 µl 10% peroxosíran amonný; 5 µl TEMED

5× vzorkový pufr (5 ml): 0,151 g Tris; 0,3855 g DTT; 0,5 g SDS; 0,025 g bromfenolová modř; 1,25 ml glycerol

5× elektrodový pufr (1 l): 5 g SDS; 15 g Tris; 94 g glycin

Barvicí roztok (100 ml): 0,25 g Coomasie Brilliant Blue R250; 45 ml methanol; 45 ml H_2O; 10 ml 99% kyselina octová

Odbarvovací roztok (1 l): 350 ml ethanol; 100 ml kyselina octová; 550 ml H_2O

1% agarosový gel (100 ml): 1 g agarosa; 2 ml TAE pufr; 98 ml H_2O

50× TAE (Tris-acetát-EDTA) pufr (1 l): 242 g Tris; 57,1 ml kyselina octová; 14,6 EDTA

Vyvíjecí fáze na TLC (500 ml): 350 ml propan-2-ol; 100 ml H_2O; 50 ml NH_4OH

3.4 Použité metody

3.4.1 Vnášení bodové mutace do plasmidu pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR)

Metoda PCR se skládá ze tří kroků:

První krok je denaturace templátové DNA, v našem případě plasmidu nesoucího gen pro β-*N*-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* (pPICZαA-Hex*Ao*). Tohoto efektu se dosáhne zvýšením teploty vzorku na 94-98 ℃ po dobu 30 sekund až 5 minut. Je velice důležité, aby došlo ke kompletnímu oddělení obou vláken DNA. Pokud by denaturace nebyla úspěšná, mohlo by dojít k rychlé renaturaci molekuly DNA, což by zabránilo interakci s primery.

Následujícím krokem je připojení specifických primerů (annealing) k denaturovanému templátu. Tento druhý krok je zahájen snížením teploty na 48-68 ℃, tak aby specifické primery mohly nasednout na cílové segmenty DNA. Teplota vhodná pro

tuto reakci závisí na délce oligonukleotidu a na zastoupení A-T a G-C párů. Tři vodíkové můstky fixující G-C zvyšují stabilitu komplexu a tím i denaturační teplotu.

Další fáze je syntéza DNA (polymerace). Jedná se o rozšíření připojených primerů DNA polymerasou, která ve směru 5´-3´ přidává jednotlivé nukleotidy k rostoucímu vláknu komplementární DNA. Teplota při tomto kroku se většinou pohybuje kolem 72 °C.

Pomocí polymerasové řetězové reakce byl připraven mutantní plasmid, který jsme dál použili pro přípravu nové mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy YHHex*Ao* nesoucí mutaci Tyr445His. Bodová mutace byla cílena na templát (plasmid Hex*Ao*1) s expresním vektorem pPICZαA. Tento expresní vektor obsahoval replikační počátek pro *Escherichia coli* (pUC ori), restrikční místa 5´*Eco*RI a 3´ *Kpn*I, alkoholoxidasový promotor (AOX1) pro expresi v *Pichia pastoris* a rezistenci na zeocin (selekční marker). Cílem mutace bylo nahradit kodon TAC (Tyr) za CAC (His). Primery s vnesenou mutací byly navrženy a poté objednány u komerční společnosti (Generi Biotech).

Primery:

YHHexAo_Fw: 5´-CCT CTG ACT TTC TG**C AC**C TGG ACT GTG GTC-3´
YHHexAo_Re: 5´-GAC CAC AGT CCA G**GT G**CA GAA AGT CAG AGG-3´

Složení reakční směsi pro PCR mutagenezi je popsáno v Tab. 1; celkový objem reakční směsi činil 50 µl. Poté byly na termocykleru nastaveny optimální podmínky reakce dle Tab. 2, str. 30, kde po každém cyklu teplota nasedání primerů klesala o 0,15 °C (tzv. *touchdown* metoda PCR). Celkově polymerasová řetězová reakce v tomto nastavení trvala 4 hodiny a 18 minut.

Tab. 1: Složení reakční směsi do PCR

Pořadí pipetovaných reagentů	Objem vzorku V [μl]
Sterilní voda	32,6
Stabilizační pufr 5×	10
Reakční pufr 10×	5
dNTPs	1
YHHexAo_Fw primer	0,2
YHHexAo_Re primer	0,2
templát	0,5
NZyProof DNA polymerasa	0,5

Tab. 2: Podmínky reakce PCR

Pořadí kroků PCR	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	3	1
Denaturace	95	0,5	35
Anelace	52 až 47,75	0,5	
Polymerace	72	6	
Finální polymerace	72	10	1

3.4.2 Příprava PCR produktu pro transformaci do *Escherichia coli* Top10

K reakční směsi z PCR bylo přidáno 2 µl restrikční endonukleasy *Dpn*I, která štěpí methylovanou DNA templátu, ale neštěpí nově syntetizovanou DNA pomocí PCR. Tato reakční směs s restrikční endonukleasou byla inkubována přes noc v termomixeru při 37 °C a 300 ot./min. Druhý den ráno byla reakce zastavena dvacetiminutovou inkubací v termostatu při 80 °C. Poté byly do reakční směsi přidány barvy pro nanesení DNA na agarosový gel pro elektroforézu (10 µl 6× *DNA Loading Dye Blue*) a pro UV vizualizaci DNA po elektroforéze (2 µl 20× *GelRed*). Jako standard do elektroforézy byl použit vzorek, který obsahoval 0,5 µl plazmidu Hex*Ao*1, 4 µl sterilní vody, 1 µl 6× *DNA Loading Dye Blue* a 0,5 µl *GelRed*. Takto připravené vzorky byly centrifugovány a následně naneseny na 1 % agarosový gel, který byl ponořený do elektrodového pufru (1× TAE pufr) v elektroforetické aparatuře, separační napětí bylo nastaveno na 90 V. Po separaci byl z gelu vyříznut proužek obsahující DNA velikostně odpovídající plasmidu Hex*Ao*1. K izolaci plasmidu z agarosového gelu byl využit komerční kit *JETquick Gel Extraction Spin Kit*, izolace plasmidové DNA byla provedena dle přiloženého návodu od výrobce. PCR produkt byl eluován z vazebné kolonky ve 20 µl sterilní vody.

3.4.3 Transformace plasmidu do *Escherichia coli*

Kmen *Escherichia coli* Top10 byl použit k separaci jednotlivých PCR produktů a namnožení získané plasmidové DNA. Pro kultivaci transformovaných klonů *E. coli* byly připraveny LBA misky ve sterilním prostředí. 100 ml sterilního LBA media bylo zahříváno na plotně do rozpuštění pevné fáze. Po částečném zchladnutí bylo do media přidáno 100 µl antibiotika zeocin (1 mg/ml). Medium s antibiotikem bylo opatrně promícháno a rovnoměrně rozlito do čtyř Petriho misek. Po ztuhnutí media byly misky připraveny k použití.

Kryokonzervy obsahující 100 µl kompetentních buněk *Escherichia coli* Top10 byly inkubovány na ledu po dobu 15 minut. Po rozmražení kryokonzerv bylo přidáno 20 µl roztoku plasmidové DNA a směs byla inkubována na ledu dalších 20 min. Transformace buněk byla provedena tepelným šokem v termostatu při 42 °C po dobu 50 sekund s opětovným zchlazením na ledu a následnou regenerací transformantů v 900 µl LB media po dobu 1,5 hodiny při 37 °C a 300 ot./min. Po regeneraci byly transformované buňky 10 min centrifugovány při 13500 ot./min. 800 µl supernatantu bylo odstraněno a ve zbytku supernatantu byl pelet buněk resuspendován. Transformované buňky byly pomocí pipety naneseny na Petriho misky a rozetřeny sterilní jednorázovou hokejkou po celé ploše. Takto připravené misky byly přes noc inkubovány v termostatu při 37 °C.

3.4.4 Izolace plasmidu

Vybrané kolonie *Escherichia coli* narostlé na Petriho miskách po transformaci plasmidovou DNA byly zaočkovány do roztoků 3 ml LB media se zeocinem (1 mg/ml). Poté byly kultury v LB mediu inkubovány přes noc (16 hod) při 37 °C a 250 ot./min.

Plasmidová DNA byla z narostlých kultur izolována pomocí komerční sady *High Pure Plasmid Isolation Mini Kit*. Šestnáct kultur v 50 ml plastových falkonách bylo centrifugováno 10 minut při 4500 ot./min, izolace plasmidové DNA byla provedena podle instrukcí výrobce sady. Na konci procedury byl vzorek plasmidové DNA eluován z vazebné kolonky 30 µl sterilní vody.

Elektroforéza na 1 % agarosovém gelu byla použita k ověření čistoty získaného plasmidu. Jako vzorky do gelu byly použity směsi 5 µl plasmidu s 0,5 µl 20× *GelRed* a 1 µl 6× *DNA Loading Dye*. Jako standard jsme použili 0,5 µl plasmidu Hex*Ao*1 s 4,5 µl sterilní vody, 0,5 µl 20× *GelRed* a 1 µl 6× *DNA Loading Dye*. Vzorky, jejichž proužky

odpovídaly velikostně proužku standardu, byly poslány na sekvenaci do soukromé společnosti (SEQme s.r.o.).

Po vyhodnocení výsledku sekvenace byla vybrána kolonie pro izolaci v preparativním množství. Do předpřipravených 100 ml sterilního LB media v 1 l Erlenmeyerově baňce byl přidán zeocin (1 mg/ml). Takto připravené medium bylo zaočkováno izolovanou kolonií a poté následovala kultivace po dobu 16 hodin při 37 °C a 250 ot./min. K izolaci plasmidu byla použita komerční sada *High Pure Plasmid Isolation Midi Kit*. Narostlé buňky *E. coli* byly centrifugovány 20 minut při 5000 ot./min; izolace plasmidu byla provedena dle návodu výrobce sady. K roztoku s izolovaným plasmidem bylo přidáno 3,6 ml isopropanolu, který slouží k vysrážení plasmidové DNA. Tato směs byla inkubována do druhého dne v lednici při 4 °C. Následující den byl roztok se sraženou DNA postupně rozpipetován do mikrozkumavek a centrifugován 30 minut při 13500 ot./min. Supernatant byl opatrně odpipetován a peleta resuspendována v 1 ml sterilního 70% ethanolu. Tento roztok byl protřepán na vortexu a centrifugován 10 minut při 13500 ot./min. Poté byl odpipetován ethanol a peleta se nechala vysušit v termostatu při 37 °C. Suchá peleta byla poté rozpuštěna ve 100 µl sterilní vody.

Dále byla spektrofotometricky stanovena koncentrace a čistota plasmidové DNA. Koncentrace plasmidu byla stanovena při 260 nm a koncentrace proteinů při 280 nm. Poměrem těchto hodnot byla určena čistota DNA.

$$\text{čistota plasmidové DNA} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Hodnoty poměru absorbancí čisté DNA by se měly pohybovat mezi 1,5-2,0. Hodnoty nižší než 1,5 značí kontaminaci proteinem.

3.4.5 Příprava plasmidu pro elektroporaci

Před elektroporací se kruhová plasmidová DNA musela linearizovat štěpením právě v jednom místě. K 38 µl roztoku s plasmidovou DNA (0,79 mg/ml) byly přidány 3 µl restrikční endonukleasy *Sac*I, 4,6 µl NEB pufru a 0,4 µl sterilní vody. Tato směs byla inkubována do následujícího dne při 37 °C a 300 ot./min. Následující den byla reakce zastavena zahřátím směsi v termostatu na 80 °C po dobu 20 minut. DNA byla přečištěna elektroforézou na 1% agarosovém gelu. K 46 µl vzorku bylo pipetováno 11,5 µl 6× *DNA Loading Dye Blue* a 1 µl 20× *GelRed*. Takto připraveny vzorek byl centrifugován a

následně nanesen na 1 % agarosový gel, který byl ponořený do separačního roztoku (1× TAE pufr) v elektroforetické aparatuře, separační napětí bylo nastaveno na 90 V.

K izolaci plasmidu z agarosového gelu jsme využili komerční sadu *JETquick Gel Extraction Spin Kit*; při purifikaci jsme postupovali podle návodu výrobce. Eluce plasmidu z kolonky byla provedena do 20 µl sterilní vody předehřáté na 65 °C.

3.4.6 Příprava elektrokompetentních buněk *Pichia pastoris*

Do 300 ml Erlenmeyerovy baňky s 50 ml YPD media bylo zaočkováno 50 µl kryokonzervované kultury *Pichia pastoris* KM71H, kultura byla inkubována na rotační třepačce po dobu 24 hodin při 28 °C a 160 ot./min. Po inkubaci bylo 150 µl této kultury přeneseno do 3 l Erlenmeyerovy baňky s 500 ml YPD media. Takto připravené medium s kulturou bylo inkubováno po dobu 18 hod při 28 °C a 160 ot./min.

Následující den byl průběh kultivace kontrolován dle růstu optické denzity kultury spektrofotometricky při 600 nm. Po dosažení absorbance 1,0 byla kultura centrifugována v šesti sterilních kyvetách po dobu 5 minut při 3000 ot./min. Supernatant byl odstraněn a peleta buněk byla resuspendována v 17 ml YPD media, 3,5 ml 1M HEPES pufru pH 8,0 a 0,5 ml DTT, protřepána a inkubována 15 minut při 28 °C. Po inkubaci bylo do kyvet přidáno 50 ml namraženého 1M sorbitolu, poté byla kultura odstředěna po dobu 5 minut při 3000 ot./min. Z každé kyvety byl znovu odstraněn supernatnat a pelety byly resuspendovány v 50 ml namraženého 1M sorbitolu. Následovala centrifugace 5 minut při 3000 ot./min. Pelety v každé kyvetě byly rozpuštěny v 3 ml 1M sorbitolu, spojeny do jedné 50 ml falkony, centrifugovány 5 min při 3000 ot./min a naposledy resuspendovány v 0,5 ml namraženého 1M sorbitolu. Všechny kroky kromě centrifugace byly prováděny v laminárním boxu.

3.4.7 Transformace DNA do *Pichia pastoris*

Pro transformaci DNA do *Pichia pastoris* byla zvolena metoda elektroporace. Při transformaci buněk elektroporací je kvasinková kultura s nízkou vodivostí po přídavku lineární exogenní DNA vystavena elektrickým pulsům o vysokém napětí. V cytoplasmatické membráně dojde k reverzibilnímu otevření iontových kanálů, kterými může DNA proniknout do buňky.

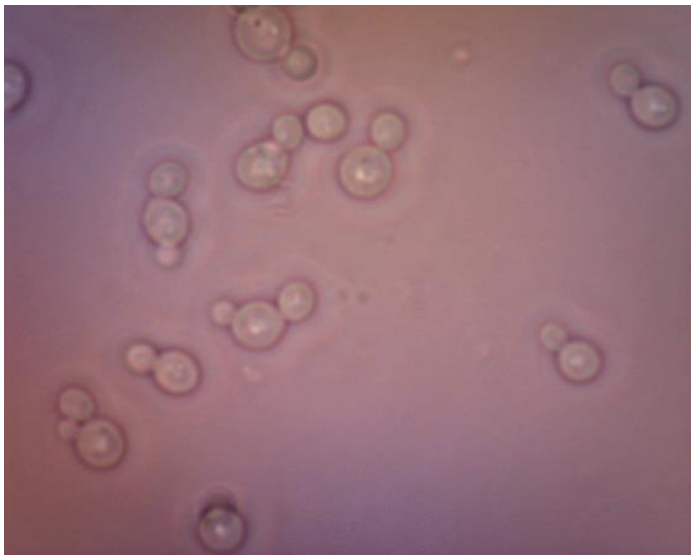
Do sterilní mikrozkumavky bylo napipetováno 80 µl kompetentních buněk a 20 µl předem připravené linearizované DNA. Takto připravená směs byla inkubována 15 minut na ledu. Dále byla směs napipetována do elektroporační kyvety mezi hliníkové plíšky a vzorek byl vystaven elektrickému pulsu v elektroporátoru (program Fungi-Pic). Ihned po elektroporaci bylo do elektroporační kyvety přidáno 1 ml namraženého 1 mol/l sorbitolu. Takto připravené buňky byly pomocí Pasteurovy pipety přeneseny do 15 ml falkony a inkubovány bez míchání 1,5 hodiny při 28 °C.

Jako další krok byla příprava Petriho misek s YPDSA mediem. Nejprve se rozehřálo 100 ml tuhého YPDSA media a po zchladnutí bylo přidáno antibiotikum zeocin (5 mg/ml). Takto připravené medium bylo rozlito do čtyř Petriho misek. Transformované buňky byly po regenaraci naneseny na misky v různém množství (5 µl, 25µl, 50 µl a 100 µl) a rozetřeny jednorázovými sterilními hokejkami. Naočkované misky byly inkubovány tři dny při 28 °C.

3.4.8 Screening exprese β-*N*-acetylhexosaminidasy

Šestnáct narostlých kolonií kvasinky *Pichia pastoris* bylo zaočkováno do 100 ml plného glycerolového media v 1 l Erlenmeyerově baňce. Buňky byly kultivovány do následujícího dne při 220 ot./min a 28 °C. Následující den byla kultura přelita do 50 ml sterilních falkon a centrifugována 15 minut při 5000 ot./min. Supernatant byl odstraněn a pelet buněk resuspendován v 30 ml plného methanolového média v 300 ml Erlenmeyerových baňkách. Methanol slouží jako induktor pro produkci enzymu. Buňky byly kultivovány tři dny při 28 °C a 220 ot./min. Třetí a čtvrtý den se do kultur přidávalo 150 µl methanolu pro další indukci exprese enzymu.

Všechny kultury byly prověřeny pod mikroskopem (Obr. 8). Využili jsme zbytky buněk ve falkonách, které byly přeneseny na sklíčko a rozetřeny s přídavkem vody.



Obr. 8. Kultura *Pichia pastoris*, jejíž kvasinkové buňky mají kulovitý tvar.

Pátý den od začátku kultivace produkce proteinu vyhodnocena pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Z každé kultury byl odebrán 1 ml kultury a centrifugován 15 minut při 13 500 ot./min. Po centrifugaci bylo odpipetováno 0,5 ml supernatantu a zakoncentrováno centrifugací přes ultracentrifugační filtr po dobu 15 minut při 13 500 ot./min. Dále bylo ze zakoncentrovaného vzorku media odebráno 16 µl a napipetováno do mikrozkumavky s 4 µl vzorkového pufru. Takto připravený vzorek byl denaturován po dobu 5 minut při 99 °C v termomixeru. Následovalo nanášení vzorku na 10% polyakrylamidový gel, který byl ponořený do elektrodového pufru. Jako marker jsme použili 5 µl LMW. Separační napětí pro SDS-PAGE bylo nastaveno na 130 V. Připravené gely byly barveny roztokem Coomassie Brilliant Blue po dobu 20 minut. Poté byly gely odbarvovány odbarvovacím roztokem a následně ponechány v uchovávacím roztoku (1% kyselina octová).

3.4.9 Kryokonzervace vybraných kultur *Pichia pastoris*

Ke kryokonzervaci byly vybrany dvě kolonie. Pomocí hokejky byly kolonie natřeny na Petriho misky s YPDA mediem a zeocinem (100 µg/ml). Misky byly inkubovány tři dny při 28 °C. Po třech dnech inkubace byly narostlé kolonie převedeny do 1 l Erlenmeyerovy baňky s 100 ml YPD media a kultivovány při 28 °C a 220 ot./min. Následující den byly kultury centrifugovány 10 min při 5000 ot./min. Supernatant byl odstraněn a buňky byly resuspendovány v 5 ml YPD media a 750 µl sterilního glycerolu.

Poté byla buněčná suspenze pipetována po 100 µl do mikrozkumavek a uchována při –80 °C.

3.4.10 Exprese β-*N*-acetylhexosaminidasy a zpracování kultury k purifikaci

K produkci β-*N*-acetylhexosaminidasy byly použity kryokonzervované kultury *Pichia pastoris*, které byly zaočkovány do 15 ml YPD media. Takto připravená prekultura byla inkubována při 28 °C a 220 ot./min po dobu 4 hodin. Poté byly kultury přeneseny do 3 l Erlenmeyerových baněk s 1 l sterilního minimálního glycerolového media a kultivovány při 28 °C a 220 ot./min.

Druhý den byly kultury centrifugovány 20 minut při 5000 ot./min. Supernatant byl odstraněn a pelet buněk byl rozpuštěn ve 200 ml sterilního minimálního methanolového media v 1 l Erlenmeyerově baňce a inkubován při 28 °C a 220 ot./min. Následující dva dny byla produkce enzymu indukována přídavkem 1 ml methanolu.

Pátý den byla kultura centrifugována 20 minut při 5000 ot./min a získaný supernatant s β-*N*-acetylhexosaminidasou byl ředěn destilovanou vodou v poměru 1:3. Následovně bylo upraveno pH vzorku roztokem kyseliny citronové na 3,5. Takto připraveny roztok byl vakuově zfiltrován přes dvojitý papírový filtr na Büchnerově nálevce.

3.4.11 Purifikace β-*N*-acetylhexosaminidasy

K purifikaci β-*N*-acetylhexosaminidasy jsme použili iontoměničovou chromatografii na koloně Fractogel SO_3^- (katex) na nízkotlaké chromatografické sestavě Äkta Prime Plus. Kolona byla postupně promývána (150 ml) ultračisté vody, (100 ml) pufru B a (100 ml) pufru A při průtoku 10 ml/min. Následovně byl nanesen roztok enzymu při průtoku 15 ml/min. Poté co byl vzorek nanesen, byla kolona promyta pufrem A (100 ml) při průtoku 10 ml/min. Po vymytí nespecificky vázaných proteinů pufrem A byl enzym eluován gradientem soli obsažené v pufru B při průtoku 2 ml/min v celkové délce gradientu 60 ml do dosažení 100 % pufru B. Celkový průběh purifikace byl sledován pomocí spektrofotometrie, kdy byla detekována absorbance v UV oblasti při 280 nm. Produkt purifikace byl jímán do sterilní 50 ml falkony. Po ukončení purifikace byla kolona postupně promyta 1 mol/l NaOH (100 ml), ultračistá voda (100 ml), 1 mol/l NaCl (100

ml), ultračistá voda (100 ml), 20% ethanol (100 ml). Enzymový roztok byl poté zakoncentrován 15 ml ultracentrifugačním filtrem při 3600 ot./min.

3.4.12 Stanovení čistoty a koncentrace enzymu

Ke stanovení koncentrace β-*N*-acetylhexosaminidasy byla využita Bradfordova metoda. Koncentrace enzymu byla určena porovnáním s kalibrační křivkou naměřenou za stejných podmínek. Ke kalibraci byl použit hovězí γ-globulin. Reakční směs se skládala z 1 ml Bradfordova činidla a 100 μl zředěného roztoku enzymu. Následovně byly vzorky promíchány a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Po inkubaci byla změřena absorbance vzorku na spektrofotometru při 595 nm.

Ke stanovení čistoty byla využita SDS elektroforéza v 10 % polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Vzorky, které byly nanášeny na gel, byly připraveny z 16 μl enzymového roztoku a 4 μl vzorkového pufru. Tato směs byla denaturována při 99 °C po dobu 5 minut. Do první jamky gelu bylo naneseno 5 μl nízkomolekulárního markeru LMW a do dalších jamek byly nanášeny enzymové vzorky. Elektroforéza probíhala při elektrickém napětí 130 V po dobu 1 hodiny a 15 minut. Připravený gel byl barven barvicím roztokem po dobu 20 minut a poté odbarvován odbarvovacím roztokem, dokud pozadí nebylo čiré. Gel byl uchován v uchovávacím roztoku za laboratorní teploty.

3.4.13 Biochemická charakterizace β-*N*-acetylhexosaminidasy

Aktivita β-*N*-acetylhexosaminidasy byla stanovena spektrofotometricky s využitím *p*NP-GlcNAc a *p*NP-GalNAc jako substrátů. Reakční směs v mikrozkumavkách obsahovala jeden ze substrátů o koncentraci 2 mmol/l, 10 mmol/l citrát-fosfátový pufr o pH 5 a vhodně ředěný vzorek enzymu. Do mikrozkumavek bylo napipetováno 10 μl substrátu (10 mM), 30 až 37 μl citrát-fosfátového pufru a 3 až 10 μl ředěného enzymu. Hydrolytická reakce probíhala 10 minut při 850 ot./min a 35 °C. Reakce byla ukončena přídavkem 1 ml 0,1 mol/l roztoku uhličitanu sodného. Takto připraveny vzorek byl následovně přelit do skleněné kyvety. Absorbance byla měřena ve třech paralelních stanoveních proti referenčnímu vzorku (10 μl substrát a 40 μl 10 mmol/l citrát-fosfátový pufr) při vlnové délce 420 nm.

Aktivita enzymu byla vypočtena z průměrů absorbančních hodnot podle vzorce:

$$\text{Aktivita} = \frac{\overline{\text{Absorbance}} \cdot \text{V}_\text{c} \cdot \text{ředění}}{\text{K} \cdot \text{V}_\text{e} \cdot \text{t}}$$

kde **aktivita** enzymu je v jednotkách U/ml, $\overline{\textbf{Absorbance}}$ je průměr absorbancí, **K** je definováno jako konstanta z kalibrační křivky závislosti absorbance *p*-nitrofenolu na jeho koncentraci (0,2732 (mmol/l)$^{-1}$), **t** přestavuje čas reakce v minutách, $\mathbf{V_e}$ je objem enzymu, $\mathbf{V_c}$ celkový objem reakční směsi (50 µl), **ředění** je celkové ředění enzymu.

pH optimum bylo stanoveno v prostředí Britton-Robinsonova pufru v rozmezí pH 2 až 10,5. pH optimum bylo měřeno pro GlcNAcasovou aktivitu enzymu ve třech paralelních měřeních při 35 °C. Enzym byl 10× předředěn citrát-fosfátovým pufrem pH 5. Ze získaných hodnot byla vyhodnocena průměrná hodnota a vypracován graf závislosti aktivity enzymu na pH.

Teplotní optimum bylo stanoveno v prostředí citrát-fosfátového pufru pH 4 ve třech paralelních měřeních. Reakce byly prováděny od teploty 20 °C až 95 °C, dokud enzym nebyl inaktivován. Poté byla stanovena průměrná hodnota aktivit a zpracován graf závislosti aktivity enzymu na teplotě.

K určení kinetických parametrů K_m a k_cat byla použita diskontinuální metoda ve třech paralelních měřeních. Reakční směsi s různými koncentracemi substrátu (0,2-2,0 mM) byly temperovány na 35°C při 850 ot./min. Reakce byla zahájena přidáním 5 µl enzymu. Celkový objem reakční směsi činil 500 µl. Od zahájení reakce každou následující minutu bylo odebíráno z reakční směsi 50 µl do předem připravené mikrotitrační destičky, která obsahovala 100 µl 0,1 mol/l Na_2CO_3 pro zastavení reakce. Měření absorbancí vzorku v mikrotitrační destičce bylo provedeno na spektrofotometru Sunrise Tecan. Z lineární závislosti množství uvolněného *p*-nitrofenolu na reakčním čase vyhodnocené v programu Excel byla vypočítána počáteční reakční rychlost v_0 (mol/l/min) jako směrnice přímky. Pomocí programu GraphPad Prism 7.0 byly vypočteny hodnoty K_m, k_cat a K_I ze závislosti počátečních rychlostí na koncentraci substrátu dle vztahu:

$$v_0 = \frac{k_\text{cat} \cdot c_\text{E} \cdot c_\text{s}}{K_\text{m} + c_\text{s}}$$

kde v_0 značí počáteční rychlost reakce [mmol/l/min], k_{cat} značí číslo přeměny [min^{-1}], c_E koncentraci enzymu [mmol/l], c_S koncentraci substrátu [mmol/l] a K_m Michaelisovu konstantu [mmol/l].

3.4.13 Transglykosylační reakce katalyzované β-*N*-acetylhexosaminidasou

Transglykosylační reakce byly nejprve provedeny v analytickém měřítku. Reakční směs A obsahovala 50 mmol/l *p*NP-GlcNAc, 40 μg enzymu a citrát-fosfátový pufr pH 4. Reakční směs B obsahovala 100 mmol/l *p*NP-GlcNAc, 40 μg enzymu a citrát-fosfátový pufr pH 4. Reakční směs C obsahovala 100 mmol/l *p*NP-GlcNAc, 100 μg enzymu a citrát-fosfátový pufr pH 4. Celkový objem reakčních směsí byl 300 μl. Jako první byly pipetovány substrát a pufr. Poté, co byly vzorky vytemperovány v termomixeru na 35 °C, byl přidán enzym a reakce byla spuštěna při 35 °C a 950 ot./min. V časových intervalech byly odebírány vzorky z reakčních směsí k vyhodnocení metodou tenkovrstvé chromatografie. Reakce byly ukončeny po 6 hodinách.

Každou hodinu od počátku reakce byly odebírány z reakčních směsí vzorky pomocí kapiláry. Vzorky byly nanášeny na start TLC destičky (silikagel) a vyvinuty v mobilní fázi (isopropanol 175 ml, voda 50 ml a čpavek 25 ml). Destičky byly analyzovány pod UV světlem pro vizualizaci cukru s *p*NP a pro detekci všech látek sacharidového charakteru byla využita karbonizace v 5 % kyselině sírové v ethanolu při 350 °C.

Po vyhodnocení výsledku byla reakce C zvolena jako nejvhodnější k provedení v preparativním množství. Reakční směs obsahovala 100 mmol/l *p*NP-GlcNAc, 1000 μg enzymu a citrát-fosfátový pufr pH 4, celkový objem činil 3 ml. Reakční podmínky byl stejné jako u analytických reakcí. Ve dvouhodinovém časovém intervalu byly odebírány z reakční směsi vzorky k vyhodnocení na TLC a HPLC (analýzu provedla Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.). Celková doba reakce činila 6 hodin.

Z reakční směsi bylo každé dvě hodiny odebráno 30 μl. Reakce byla zastavena vysokou teplotou 99 °C po dobu 3 minut. Poté byl vzorek centrifugován po dobu 10 min a bylo z něj odebráno 20 μl k vyhodnocení složení reakčních směsí na HPLC.

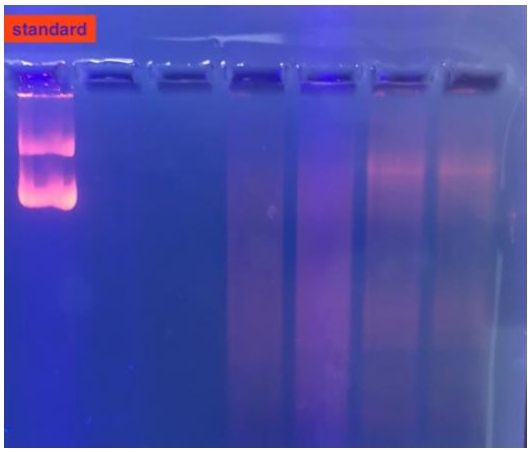
3.4.14 Izolace produktů transglykosylační reakce

Reakce byla ukončena varem reakční směsi (99 °C, 8 minut). Následně byla reakční směs centrifugována po dobu 10 minut při 13 500 ot./min. Supernatant byl odebrán a nanesen na kolonu gelové permeační chromatografie Bio-Gel P2 (26 × 1000 mm). Jako mobilní fáze byla použita ultračistá voda o průtoku 6,6 ml/hod. Sběrač frakcí byl nastaven na mrtvý objem 100 l a objem frakcí 2 ml. Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí TLC, kde jako standard byl použit vzorek reakční směsi. Frakce, které obsahovaly transglykosylační produkty, byly spojeny a lyofilizovány. Čistota produktů byla ověřena metodou HPLC.

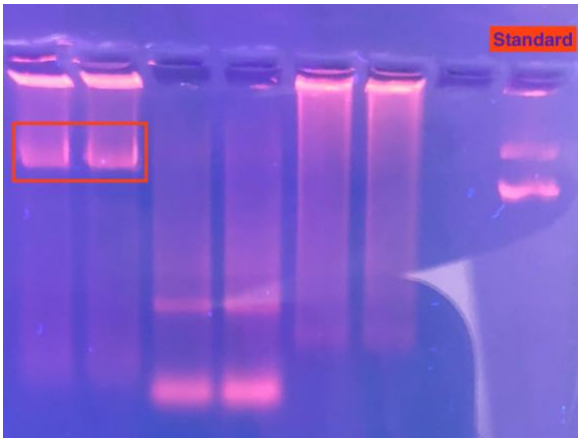
4 Výsledky práce

4.1 PCR mutageneze HexAo

K přípravě nové mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* nesoucí bodovou mutaci Tyr445His (YHHex*Ao*; Hex*Ao* GenBank ID: AY091636) byla využita metoda PCR s komplementárními primery nesoucími požadovanou mutaci. Metoda PCR byla provedena při různých teplotách nasedání primerů od 50 do 55 °C. Pro získání dostatečného množství PCR produktu byly vyzkoušeny různé koncentrace výchozí reakční směsi s přídavkem stabilizačního pufru doporučeného výrobcem (*NZYTaq 5× Optimizer Solution*) i bez něj (Obr. 9, 10, str. 41). Nejlepší výsledek jsme získali při í teplotě nasedání primerů 52 °C, kde po každém reakčním cyklu teplota nasedání primerů klesala o 0,15 °C (tzv. *touchdown* metoda PCR). Po ukončení PCR byla do reakční směsi přidána restrikční endonukleasa *Dpn*I, která štěpí methylovanou DNA templátu, zatímco nově syntetizovaná DNA zůstane zachována. Po ukončení štěpení templátové DNA (16 hod přes noc) jsme provedli analýzu reakční směsi pomocí agarosové elektroforézy. Produkt PCR velikostně odpovídající standardu byl vyříznut z agarosového gelu, izolován komerční sadou (*JETquick Gel Extraction Spin Kit*) a transformován do kompetentních buněk *E. coli* Top10.



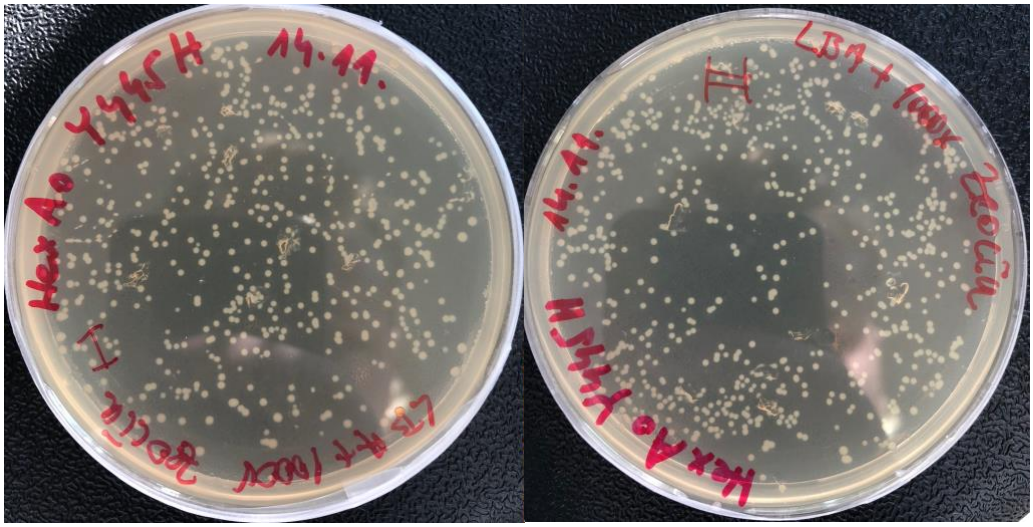
Obr. 9. Separace PCR produktů v 1 % agarosovém gelu. V první dráze se nachází standard plasmidu obsahujícího gen pro β-*N*-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* (Hex*Ao*1) velikostně odpovídající 5,5 kbp. V dráze 4 až 7 jsou naneseny produkty PCR, jejichž výchozí reakční směs neobsahovala stabilizační pufr (*NZYTaq 5× Optimizer Solution*).



Obr. 10. Separace plasmidu YHHex*Ao* v 1 % agarosovém gelu. Jako standard byl použit plasmid obsahující gen pro β-*N*-acetylhexosaminidasu z *A. oryzae* (Hex*Ao*1), červený rámeček označuje proužek odpovídající standardu a obsahuje produkt PCR plasmid YHHex*Ao*. Výchozí reakční směs obsahovala stabilizační pufr (*NZYTaq 5× Optimizer Solution*).

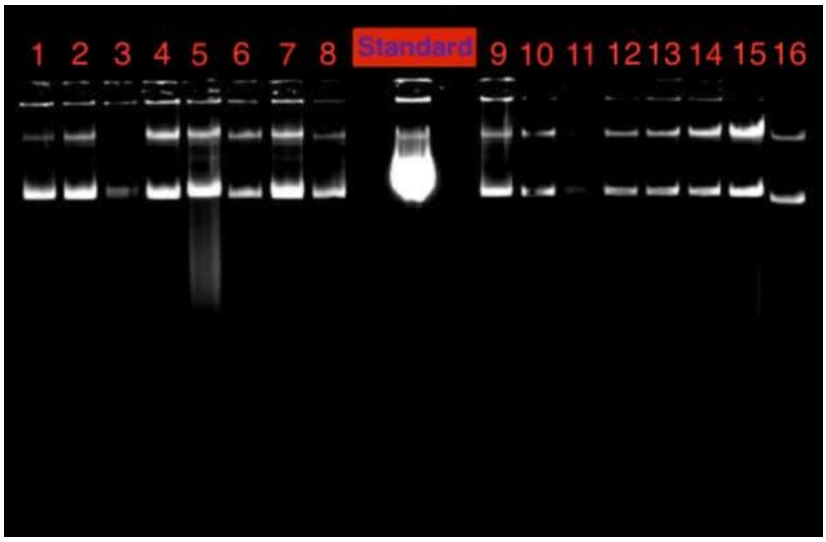
4.2 Selekce a izolace mutovaných plasmidů

Celkové množství izolovaného plasmidu bylo úspěšně transformováno do kompetentních buněk *E. coli* Top10. Kolonie *E. coli* Top10 narostly na dvou pevných LBA mediích pod selekčním tlakem zeocinu (Obr. 11). Z obou Petriho misek bylo náhodně vybráno a zaočkováno osm kolonií.



Obr. 11. Narostlé kolonie *E. coli* na tuhém LBA mediu.

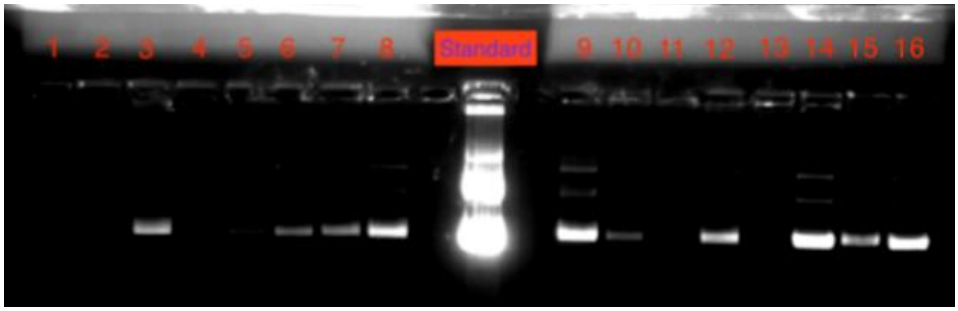
Ze šestnácti narostlých kultur *E.coli* byly vyizolovány plasmidy YHHex*Ao* komerčním kitem *High Pure Plasmid Mini Isolation Kit.* Získané plasmidy byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy v 1 % agarosovém gelu (Obr. 12). Všechny vzorky kromě 3 a 11 obsahovaly proužky odpovídající velikostí požadovanému plasmidu. Vzorky plasmidů byly zaslány na sekvenaci, kterou provedla soukromá firma (SEQme s.r.o.).



Obr. 12. Čistota plasmidů z první transformace na agarosové elektroforéze. Jako standard byl použit plasmid Hex*Ao*1. V jamkách 1 až 16 se nachází plasmidy izolované z transformace *E. coli* Top10 PCR produktem.

Výsledek sekvenace ukázal, že izolované vzorky v jamkách 4, 5 a 15 obsahují směs mutantní a původní verze plasmidu, zatímco ostatní vzorky obsahovaly pouze původní nemutovanou variantu plasmidu. K získání čisté mutantní plasmidové DNA byly izolované směsi plasmidu znova transformovány do kompetentních buněk *E. coli* Top10 a poté byly zaočkovány nové Petriho misky s LBA mediem kulturami 4, 5 a 15 a zeocinem. Z těchto misek bylo odebráno 16 kolonií ke kultivaci a následné izolaci plasmidu komerčním kitem *High Pure Plasmid Isolation Mini Kit*. Kvalita plasmidů byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy a sekvenace DNA (Obr. 13, str. 43). Plasmidy ve vzorcích 8, 9, 14 a 16 byly poslány na sekvenaci do firmy SEQme s.r.o. Dle výsledků sekvenování obsahoval plasmid izolovaný ve vzorku 14 požadovanou mutaci. Tento plasmid jsme tedy připravili ve větším množství purifikací ze 100 ml transformované kultury *E. coli* Top10 komerční sadou *High*

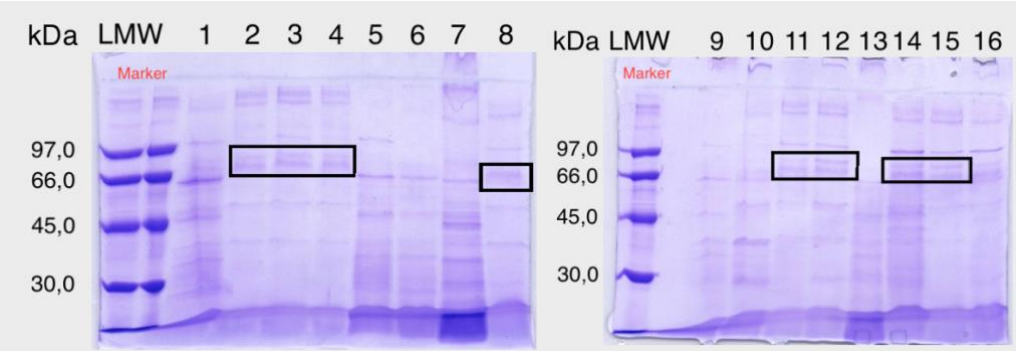
Pure Plasmid Isolation Midi Kit. Koncetrace získaného plasmidu byla 0,79 mg/ml a čistota DNA odpovídala hodnotě 1,73 z poměru absorbancí.



Obr. 13. Čistota plasmidů z druhé transformace na agarosové elektroforéze.

4.3 Produkce mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy v *Pichia pastoris* KM71H

Pro expresi rekombinantní mutantní varianty β-*N*-acetylhexosaminidasy byly použity kompetentní buňky *Pichia pastoris* KM71H, do kterých byl transformován elektroporací plasmid YHHex*Ao* linearizovaný štěpením restrikční endonukleasou *Sac*I. Buňky byly kultivovány na pevném agarovém YPDS mediu se zeocinem. Šestnáct narostlých kolonií na Petriho miskách po elektroporaci bylo zaočkováno do tekutého plného glycerolového media. Pro ověření produkce enzymu byla měřena β-*N*-acetylhexosaminidasová aktivita v mediu pátý den produkce a vzhledem k očekávané snížené hydrolytické aktivitě mutantního enzymu byla provedena i elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Aktivní forma β-*N*-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* se skládá ze dvou katalytických podjednotek o velikosti 65 kDa a dvou malých propetidů o velikosti přibližně 10 kDa [26], skutečná velikost záleží na rozsahu glykosylace enzymu. Aktivity médií nebyly měřeny z důvodu nízké exprese proteinu, proto byly vybrány kolonie 12 a 14 pro kultivaci a kryokonzervaci pouze z výsledku SDS-PAGE (Obr. 14, str. 44).

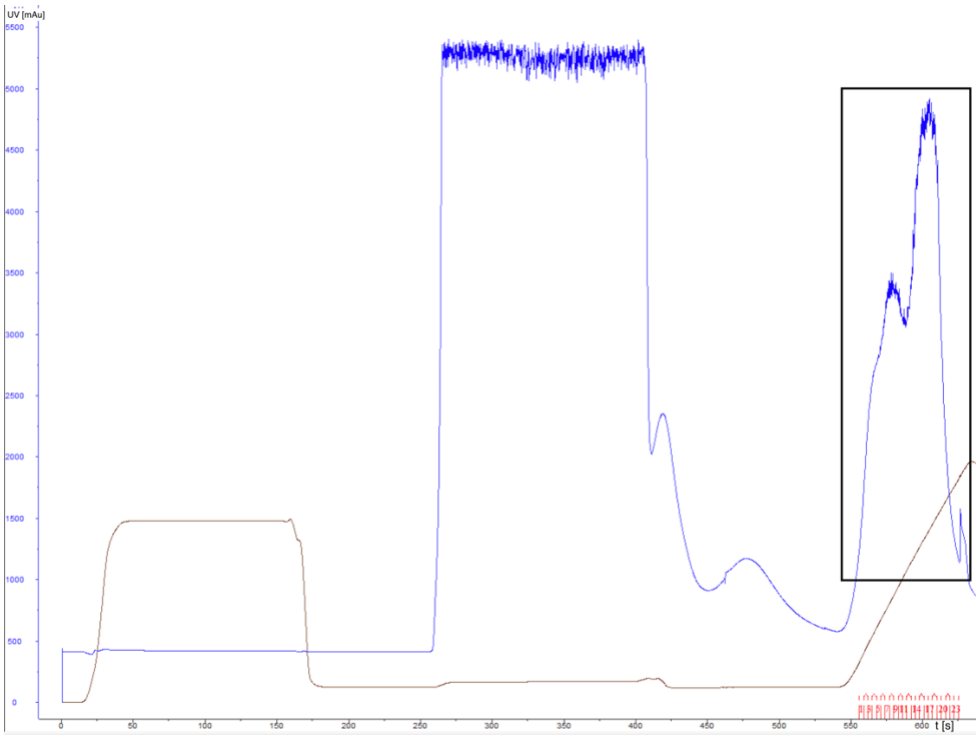


Obr. 14. Screening exprese YHHex*Ao* šestnácti koloniemi *Pichia pastoris* KM71H pomocí SDS-PAGE. Jako marker byl použit LMW (*low molecular weight*). V černém rámečku je vyznačen potenciální výskyt YHHex*Ao*.

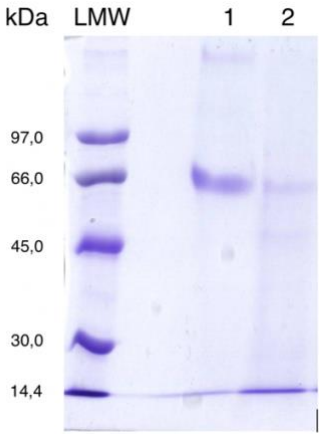
4.4 Purifikace mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy

Pro produkci mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy ve větším množství byly využity předem připravené kryokonzervované kultury *Pichia pastoris* KM71H transformované plasmidy ze vzorků 12 a 14, vybrané ze screeningu. Kryokonzervy byly zaočkovány do 1 l tekutého minimálního glycerolového media. Po 24 hodinách kultivace byly namnožené buňky byly přemístěny do 200 ml minimálního methanolového media. Jako induktor exprese proteinu byl použit methanol. Pátý den byla kultivace ukončena, media ze vzorků 12 a 14, obsahující požadovaný protein, byla slita a purifikována společně.

Exprimovaná extracelulární β-*N*-acetylhexosaminidasa vyprodukovaná koloniemi 12 a 14 byla vypurifikována pomocí iontově výměnné chromatografie na systému Äkta Prime Plus. Purifikace probíhala na silném katexu (pH 3,5). Celkový průběh purifikace byl zaznamenán na chromatogramu (Obr. 15, str. 45). Čistota získaného enzymu byla ověřena SDS-PAGE (Obr. 16, str. 45). Produkt purifikace byl zakoncentrován a poté byla změřena koncentrace a aktivita enzymu.



Obr. 15. Chromatogram purifikace YHHex*Ao*. Záznam průběhu purifikace systémem Äkta Prime Plus. Na chromatogramu je vidět černý rámeček s modrou eluční křivkou enzymu se dvěma píky, které byly sbírány. Dále je vidět hnědá křivka, která popisuje konduktivitu v mobilní fázi.



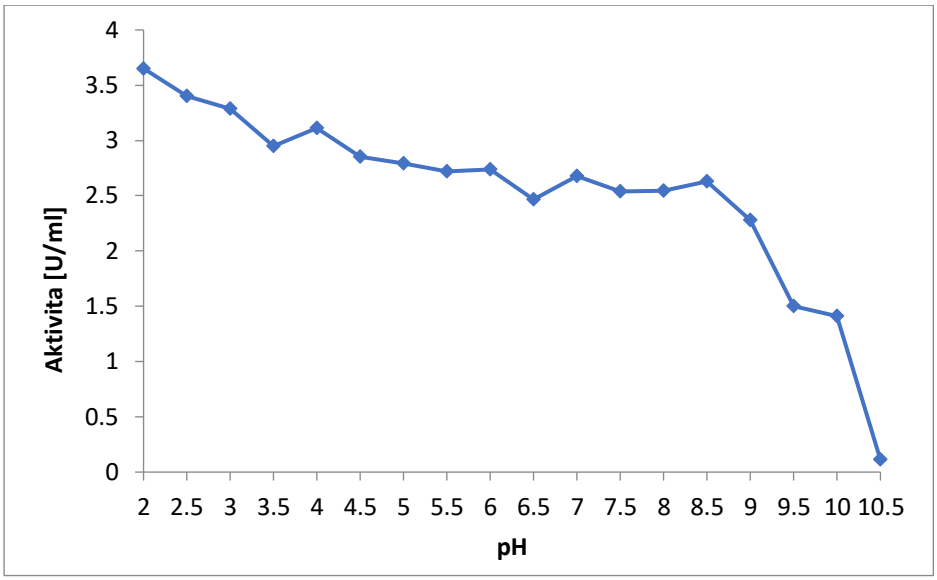
Obr. 16. SDS-PAGE po purifikaci β-*N*-acetylhexosaminidasy YHHex*Ao*. Jako marker byl použit LMW (*low molecular weight*). V dráze **1** se nachází vypurifikovaný enzym, v dráze **2** je medium před purifikaci.

Po zakoncentrovaní purifikovaného enzymu byla stanovena jeho koncentrace podle Bradforda a aktivita. Koncentrace získaného enzymu činila 0,255 mg/ml a hydrolytická aktivita 0,069 U/ml, specifická aktivita získaného mutantu YHHex*Ao* byla tedy 0,27 U/mg. Celkový objem zakoncentrovaného enzymového vzorku byl 835 µl. Byl tedy získán požadovaný mutantní enzym v dobré čistotě. Došlo k očekávanému výraznému snížení hydrolytické aktivity mutantního enzymu, bohužel úroveň exprese tohoto mutantního enzymu byla velmi nízká, výtěžek po purifikaci činil přibližně pouze 0,07 U z 1 l kultivačního media. Z důvodu malého množství vyprodukovaného proteinu, které ani při opakované kultivaci nebylo dostatečné pro všechny požadované charakterizace i z důvodu velmi nízké zbytkové hydrolytické aktivity, byl zvolen k další charakterizaci jiný mutantní enzym: YFHex*Ao* s bodovou mutací Tyr455Phe, který byl paralelně vyprodukován v laboratoři v rámci projektu s použitím stejného postupu mutace, produkce a purifikace.

4.5 Charakterizace mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy

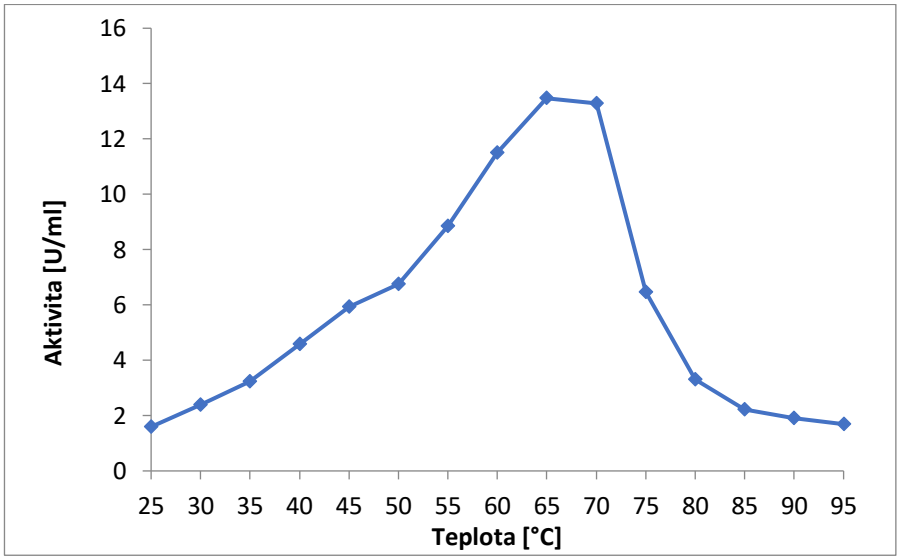
K charakterizací mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* byl zvolen dříve připravený mutantní enzym YFHex*Ao* nesoucí mutaci Tyr445Phe, který se podařilo získat v množství dostatečném pro charakterizaci jeho katalytických vlastností. Koncentrace vzorku enzymu YFHex*Ao* byla 1,74 mg/ml. GlcNAcasová hydrolytická aktivita byla 2,35 U/ml a specifická aktivita 1,35 U/mg. GalNAcasová hydrolytická aktivita byla 2,67 U/ml a specifická aktivita 1,53 U/mg. Poměr aktivit GlcNAcasa/GalNAcasa byl 0,88.

pH optimum bylo stanoveno v prostředí Britton-Robinsonova pufru v rozmezí pH 2 až 10,5. pH optimum bylo měřeno pro GlcNAcasovou aktivitu enzymu ve třech paralelních měřeních při 35 °C. Enzym byl 10× předředěn citrát-fosfátovým pufrem pH 5. Ze získaných hodnot absorbance byla vyhodnocena průměrná hodnota a poté byl vypracován graf závislosti objemové aktivity enzymu na pH (Graf 1, str. 47). Z grafu je zřejmé, že pH optimum nachází na širokém platu mezi pH 2 a 8,5; při pH 2 byla aktivita enzymu nejvyšší, další maximum se nachází v pH 4.



Graf 1. Závislost hydrolytické GlcNAcasové aktivity na pH

Teplotní optimum bylo stanoveno v prostředí citrát-fosfátového pufru pH 4 ve třech paralelních měřeních. Teplotní optimum bylo měřeno pro GlcNAcasovou aktivitu enzymu. Reakce byly prováděny od teploty 20 °C až 95 °C, dokud enzym nebyl inaktivován. Poté byla stanovena průměrná hodnota absorbance a zpracován graf závislosti aktivity enzymu na teplotě (Graf 2). Na grafu je vidět, že teplotní optimum se nachází mezi 65 a 70 °C. Toto teplotní optimum platí pouze pro hydrolytickou aktivitu enzymu, avšak nikoli pro transglykosylační aktivitu enzymu.

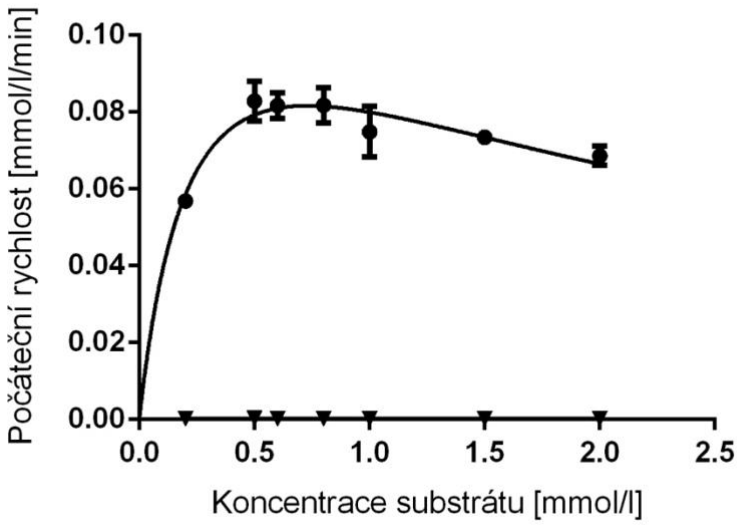


Graf 2. Závislost hydrolytické GlcNAcasové aktivity na reakční teplotě

K určení enzymových kinetických parametrů K_m a k_{cat} byla použita diskontinuální metoda ve třech paralelních měřeních, kdy byla měřena počáteční rychlost reakce v reakčních směsích o různých koncentracích substrátu (0,2-2,0 mmol/l). Měření absorbancí vzorku v mikrotitrační destičce bylo provedeno na spektrofotometru Sunrise Tecan.

Absorbance je přímo úměrná množství uvolněného *p*-nitrofenolu. Z lineární závislosti množství uvolněného *p*-nitrofenolu na reakčním čase byla lineární regresí v programu Excel získána směrnice přímky, která odpovídá počáteční rychlosti reakce v_0. Ze získaných hodnot bylo patrné, že enzym YFHex*Ao* je inhibován při vyšších koncentracích substrátu, proto byla stanovena i hodnota K_I.

Kinetické parametry $K_m = 0{,}26 \pm 0{,}06$ mmol/l, $k_{cat} = 0{,}14 \pm 0{,}02$ s^{-1}, $K_I = 2{,}1 \pm 0{,}6$ mmol/l a graf byly získány ze závislosti počátečních rychlostí na počáteční koncentraci substrátu nelineární regresí v programu GraphPad Prism. Z grafu je patrná inhibice enzymu YFHex*Ao* při vyšších koncentracích substrátu (Graf 3).

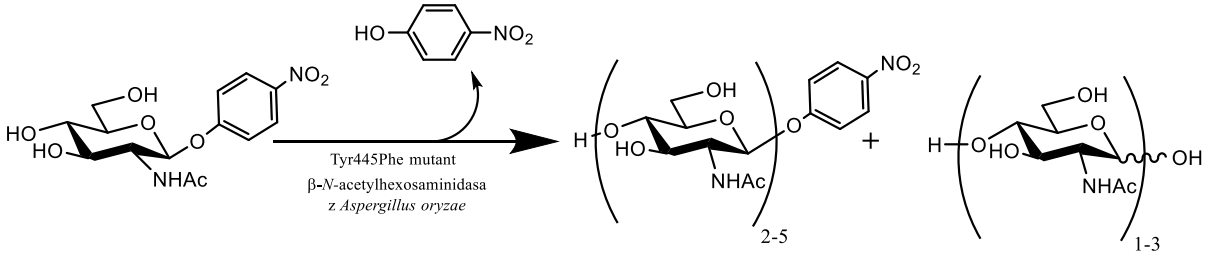


Graf 3. Kinetická křivka hydrolýzy *p*NP-GlcNAc za katalýzy YFHex*Ao*

4.6 Transglykosylační reakce

Transglykosylační reakcí katalyzovanou β-*N*-acetylhexosaminidasou vznikají chitooligomery z aktivovaného donoru *p*NP-GlcNAc. V našem případě jsme použili pro zkušební reakci *p*NP-GlcNAc zároveň jako donor i akceptor glykosylu a sledovali jsme

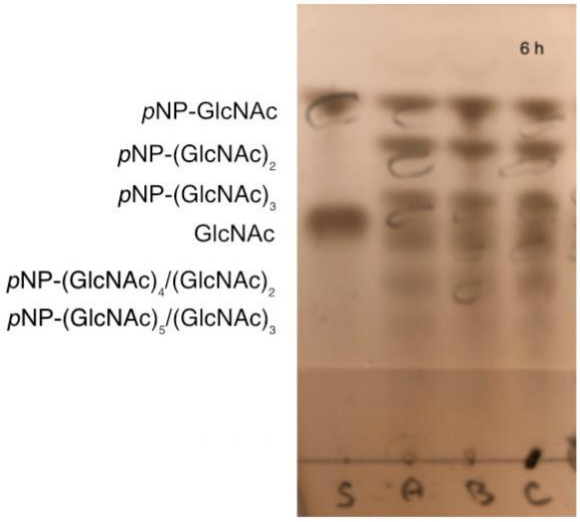
vznik *p*NP-chitooligomerů a volných chitooligomerů, kde jako akceptor posloužil GlcNAc uvolněný při hydrolýze *p*NP-GlcNAc (Obr. 17).



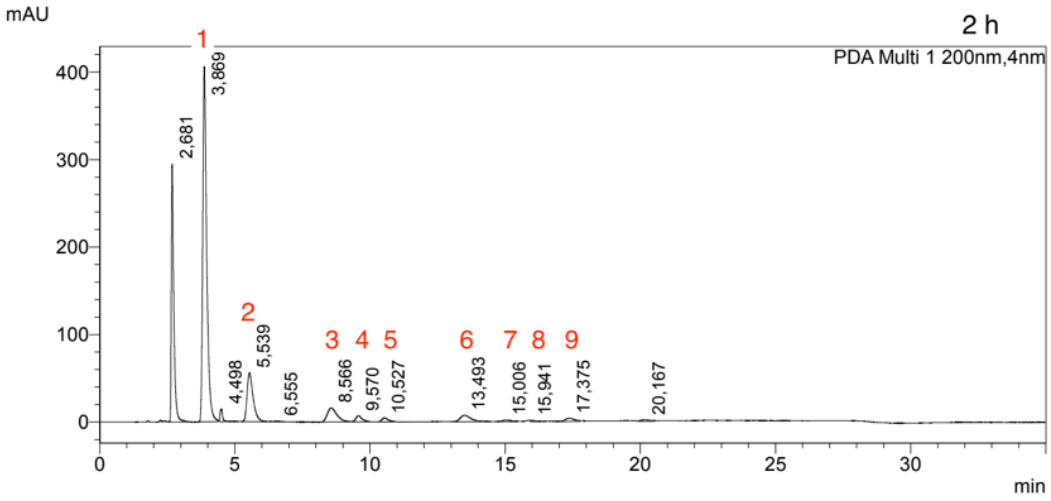
Obr. 17. Transglykosylační reakce katalyzovaná β-*N*-acetylhexosaminidasou YFHex*Ao*

Pro určení optimálních podmínek pro transglykosylační reakci byly nejprve připraveny tři reakční směsi v analytickém měřítku. Optimální pH pro reakci bylo zvoleno pH 4, při kterém měl enzym YFHex*Ao* druhou nejvyšší aktivitu. Reakční směs A obsahovala 50 mmol/l *p*NP-GlcNAc, 40 μg enzymu YFHex*Ao* a citrát-fosfátový pufr pH 4. Reakční směs B obsahovala 100 mmol/l *p*NP-GlcNAc, 40 μg enzymu YFHex*Ao* a citrát-fosfátový pufr pH 4. Reakční směs C obsahovala 100 mmol/l *p*NP-GlcNAc, 100 μg enzymu YFHex*Ao* a citrát-fosfátový pufr pH 4. Celkový objem reakčních směsí činil 300 μl. Reakční podmínky byly 35 °C a 950 ot./min. V časových intervalech byly odebírány vzorky z reakčních směsí k vyhodnocení na TLC (Obr. 18, str. 50). Reakce byly ukončeny po 24 hodinách.

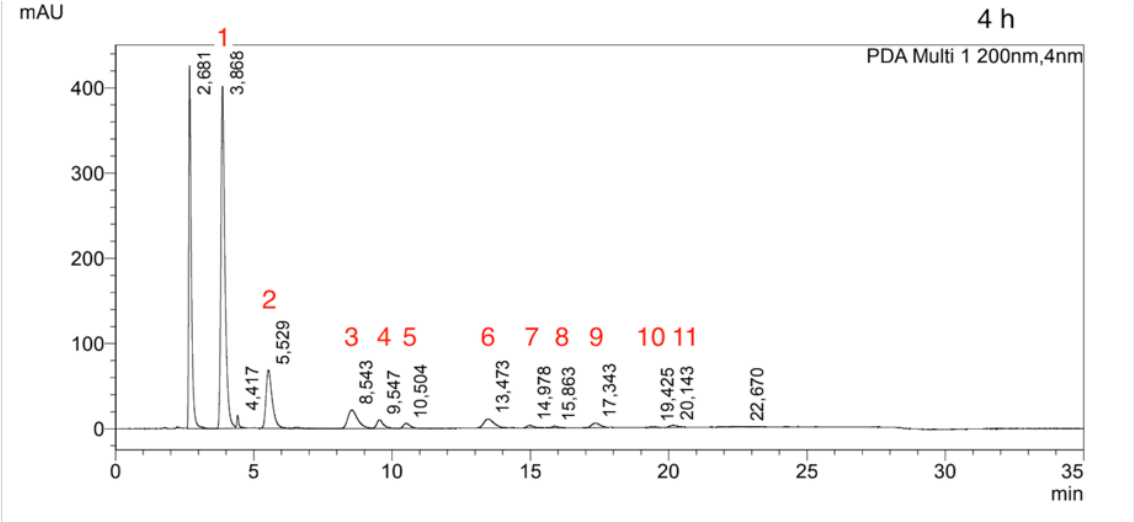
Po vyhodnocení TLC destiček byla zvolena optimální doba reakce 6 hodin. Pro reakci v preparativním měřítku byla použita reakční směs C z důvodu vzniku největšího množství transglykosylačních produktů. Pro preparativní transglykosylaci bylo celkové množství reakční směsi se stejným poměrem reakčních složek zvýšeno desetkrát, objem reakční směsi tedy činil 3 ml. Reakce byla ukončena po 6 hodinách a produkty reakce byly analyzovány pomocí TLC a HPLC (Graf 4,5 a 6, str. 50 a 51; analýzu HPLC laskavě provedla Ing. Lucie Petrásková, Ph.D.). HPLC analýza byla provedena na koloně TSK-gel Amide 80 (5 μm, 4,6 × 250 mm). Sloučeniny byly v chromatogramech přiřazeny dle retenčních časů a spekter na základě porovnání s dříve připravenými standardy.



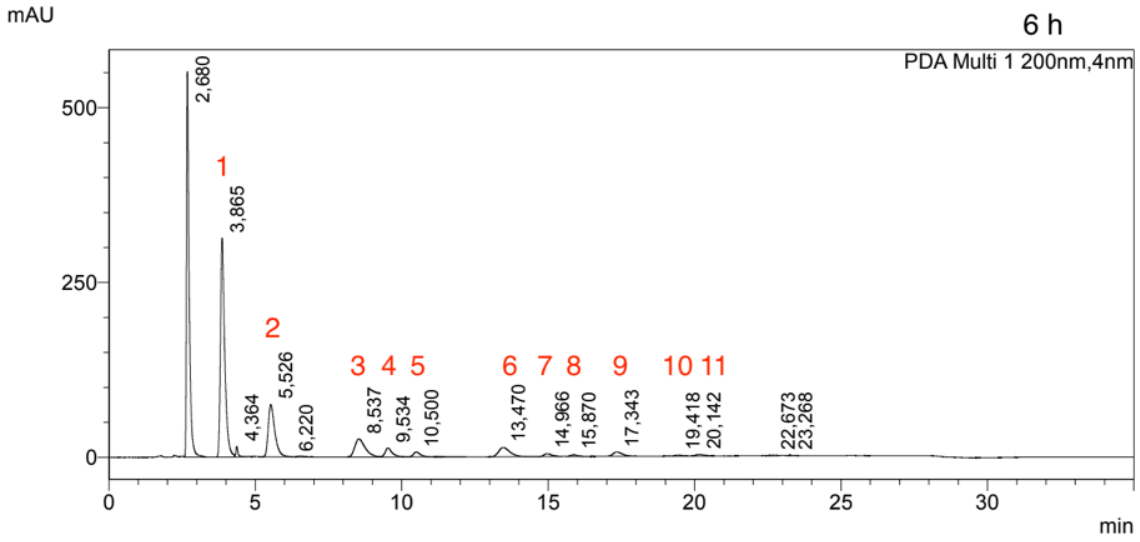
Obr. 18. Analýza průběhu transglykosylační reakce v analytickém měřítku pomocí TLC. TLC destička se vzorky z reakční směsi v čase 6 h. Na první dráze S označuje standard, který se skládal ze směsi *p*NP-GlcNAc a GlcNAc. Na druhé dráze A označuje vzorek z reakční směsi A. Na třetí dráze B označuje vzorek z reakční směsi B a na poslední dráze C je vzorek z reakční směsi C.



Graf 4. Chromatogram z HPLC reakční směsi C po 2 hodinách reakce. Píky: 1 - *p*NP-GlcNAc; 2 - *p*NP-$(GlcNAc)_2$; 3 - *p*NP-$(GlcNAc)_3$; 4, 5 – GlcNAc; 6 - *p*NP-$(GlcNAc)_4$; 7, 8 – $(GlcNAc)_2$; 9 - *p*NP-$(GlcNAc)_5$.



Graf 5. Chromatogram z HPLC reakční směsi C po 4 hodinách reakce. Píky: 1 - *p*NP-GlcNAc; 2 - *p*NP-$(GlcNAc)_2$; 3 - *p*NP-$(GlcNAc)_3$; 4, 5 – GlcNAc; 6 - *p*NP-$(GlcNAc)_4$; 7, 8 – $(GlcNAc)_2$; 9 - *p*NP-$(GlcNAc)_5$; 10, 11 – $(GlcNAc)_3$.



Graf 6. Chromatogram z HPLC reakční směsi C po 6 hodinách reakce. Píky: 1 - *p*NP-GlcNAc; 2 - *p*NP-$(GlcNAc)_2$; 3 - *p*NP-$(GlcNAc)_3$; 4, 5 – GlcNAc; 6 - *p*NP-$(GlcNAc)_4$; 7, 8 – $(GlcNAc)_2$; 9 - *p*NP-$(GlcNAc)_5$; 10, 11 – $(GlcNAc)_3$.

4.7 Izolace a charakterizace produktů transglykosylační reakce

Preparativní transglykosylační reakce byla po 6 hodinách zastavena varem a centrifugována, supernatant byl nanesen na kolonu gelové permeační chromatografie Bio-Gel P2. Jako mobilní fáze byla použita ultračistá voda o průtoku 6,6 ml/hod. Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí TLC a srovnávány se vzorkem reakční směsi. Frakce, které obsahovaly produkty, byly spojeny a lyofilizovány, bylo získáno 5 různých směsných frakcí, jejich souhrnná hmotnost činila 10,3 mg. Čistota izolovaných produktů byla ověřena na HPLC a LC-MS (Dr. Petrásková). Bohužel se produkty transglykosylační reakce nepodařilo oddělit, všechny frakce obsahovaly směsi chitooligomerů *p*NP-$(GlcNAc)_2$ *p*NP-$(GlcNAc)_3$, $(GlcNAc)_2$ a $(GlcNAc)_3$. V rámci této bakalářské práce nebylo z časových důvodů možné reakci a separaci zopakovat, při další práci na tomto projektu budou podmínky transglykosylační reakce i purifikace jejích produktů optimalizovány tak, aby byly získány čisté chitooligomery ve větším množství a výtěžku.

5 Diskuze

β-*N*-Acetylhexosaminidasa z *Aspergillus oryzae* (Hex*Ao*) má široké spektrum využití v biotechnologickém průmyslu při produkci chitooligomerů, které mají výhodné biologické vlastnosti; např. jsou silnými antioxidanty [51], antiangiogenními činidly [52] a spouštěči imunitní reakce u rostlin [53]. Pro biosyntézu chitooligomerů se běžně využívají β-*N*-acetylhexosaminidasy zejména kvůli jejich snadné dostupnosti, robustnosti, vysoké stabilitě a s ohledem na to, že využívají mnohem levnější substráty, nežli je tomu u reakcí katalyzovaných příslušnými glykosyltransferasami. K syntetickým účelům se používají β-*N*-acetylhexosaminidasy z rodiny GH20, hlavně fungální extracelulární enzymy, které vykazují vysokou transglykosylační aktivitu [1]. Cílem této práce bylo připravit a charakterizovat novou mutantní variantu Hex*Ao* s potenciálně zvýšenou transglykosylační aktivitou. Zvolená mutace Tyr445His v aktivním místě enzymu byla navržena na základě analogie s dříve připravenými mutanty β-*N*-acetylhexosaminidasy z *T. flavus*, které jsou velmi účinnými transglykosidasami [57].

V rámci této práce byl pomocí PCR připraven mutantní plasmid, který byl dále použit k přípravě nové mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy YHHex*Ao* nesoucí mutaci Tyr445His. Pro přípravu mutantní varianty byl použit jako templát plasmid Hex*Ao*1 s expresním vektorem pPICZαA. Tento expresní vektor obsahuje replikační počátek pro *Escherichia coli* (pUC ori), restrikční místa 5´*Eco*RI a 3´ *Kpn*I, alkoholoxidasový promotor (AOX1) pro expresi v *Pichia pastoris*, rezistenci na zeocin (selekční marker) a sekvencí pro α-faktor signalizující extracelulární směrování exprimovaného proteinu. Tento vektor se ukázal již v několika předchozích pracích vhodný pro produkci rekombinantních β-*N*-acetylhexosaminidas ve vysokém výtěžku a kvalitě [57], [60]. Glykosylace rekombinantních enzymů zajišťovaná kvasinkou není sice identická s glykosylací houbovou, ale dle předchozích výsledků je zcela dostačující pro produkci stabilního enzymu a, v neposlední řadě, kvasinkový producent zajišťuje správné složení aktivního tetramerního enzymu (dvě katalytické podjednotky a dva propeptidy). Cílem mutace bylo nahradit kodon TAC (Tyr) za CAC (His).

Po elektroporaci linearizovaného plasmidu s bodovou mutací produkovalo osm ze šestnácti analyzovaných kolonií požadovaný protein o velikosti 65 kDa na SDS-PAGE, jelikož selekční tlak antibiotika (zeocin) není vždy účinný. Část kolonií navíc obsahovala původní nemutovaný plasmid, jak bylo zjištěno sekvenací. Pro získání čistého mutovaného

plasmidu bylo proto nutné screening transformace dvakrát opakovat. Mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasa byla produkována v minimálním mediu obsahujícím methanol jako zdroj uhlíku a zároveň induktor exprese enzymu. Protein se evidentně produkoval v malém množství v porovnání s předchozími zkušenostmi s obdobnými enzymy. To může být způsobeno neúčinnou transformací mutovaného plasmidu do kvasinky nebo špatnou stabilitou/ skládáním tohoto konkrétního mutantního enzymu, jehož produkce je proto extrémně nízká. Vzhledem k tomu, že jiné bodové mutantní varianty téhož enzymu (např. YP) se produkují mnohem lépe, je malé množství vyprodukovaného proteinu pravděpodobně důsledkem nízké exprese způsobené bodovou mutací vnesenou do proteinu.

Purifikace vyprodukovaného enzymu YHHex*Ao* byla provedena iontově výměnnou chromatografii na koloně Fractogel SO_3^- (katex) na nízkotlaké chromatografické sestavě Äkta Prime Plus. Pro navázání enzymu na kolonu byl enzym kladně nabit snížením pH media na pH 3,5, které bylo nižší než pI purifikovaného enzymu. Elektrostatická interakce kolony s enzymem byla posléze narušena roztokem 1M NaCl. Po zakoncentrování enzymového produktu byla stanovena koncentrace 0,255 mg/ml a hydrolytická aktivita 0,069 U/ml, specifická aktivita mutantního enzymu byla tedy 0,27 U/mg. Došlo tedy k očekávanému snížení specifické hydrolytické aktivity v porovnání s přirozeným enzymem (60-80 U/mg) ve velmi podobném poměru, jako tomu bylo u dříve připraveného analogického mutantu β-*N*-acetylhexosaminidasy z *T. flavus* [57]. Celkové množství purifikovaného a zakoncentrovaného enzymu bylo však pouze 0,21 mg z 2 l media, což se bohužel dalo očekávat již ze screeningu.

Z důvodu nedostatečného množství vyprodukovaného enzymu YHHex*Ao* nesoucího mutaci Tyr445His byl zvolen k charakterizaci paralelně stejnou metodou připravený a purifikovaný enzym YFHex*Ao* nesoucí bodovou mutaci Tyr445Phe. Koncentrace vzorku enzymu YFHex*Ao* byla 1,74 mg/ml. Byly stanoveny GlcNAcasová hydrolytické aktivita 2,35 U/ml a GalNAcasová hydrolytické aktivita 2,67 U/ml enzymu YFHex*Ao*. Poměr aktivit GlcNAcasa/GalNAcasa je 0,88, což se významně liší od přirozené β-*N*-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae*, kde se tento poměr rovná přibližně 2 [6]. Změna poměrů jednotlivých aktivit v důsledku mutace na tyrosinovém zbytku byla pozorována již dříve u mutantů β-*N*-acetylhexosaminidasy z *T. flavus* [55]. Specifická aktivita mutantu YFHex*Ao* vůči *p*NP-GlcNAc je 1,35 U/mg, což odpovídá i snížené aktivitě analogického mutantu Tyr470Phe β-*N*-acetylhexosaminidasy z *T. flavus* [57]. pH

optimum tohoto enzymu se nachází v širokém platu v kyselé oblasti, nejvyšší aktivita byla naměřena při pH 2. Podobné hodnoty pH optima hydrolytické aktivity byly naměřeny i pro analogické mutantní varianty β-*N*-acetylhexosaminidasy z *T. flavus* [55]. Teplotní optimum pro rekombinantní enzym se nachází mezi 65 a 70 °C, přičemž aktivita prudce klesá od 70 °C. Toto teplotní optimum platí pouze pro hydrolytickou aktivitu enzymu, avšak nikoli pro transglykosylační aktivitu enzymu. Teplota mezi 65 a 70 °C by nebyla vhodná pro transglykosylační reakce z důvodu nízké stability substrátu a většinou výrazně zvýšenou hydrolytickou aktivitu v porovnání s transglykosylací; proto se pro syntetické aplikace používá teplota kolem 35 °C.

Kinetické parametry rekombinantního enzymu jsou $K_m = 0{,}26 \pm 0{,}06$ mmol/l a $k_{cat} = 0{,}14 \pm 0{,}02$ s^{-1}. Během měření jsme zjistili, že mutantní enzym YFHex*Ao* je inhibován substrátem, proto byla určena $K_I = 2{,}1 \pm 0{,}6$ mmol/l. Ve srovnání s přirozenou β-*N*-acetylhexosaminidasou z *A. oryzae*, jejíž kinetické parametry jsou $K_m = 0{,}74 \pm 0{,}04$ mmol/l a $k_{cat} = 335 \pm 2$ s^{-1} (nepublikované výsledky) byla významně potlačena hydrolytická aktivita u mutantního enzymu. Kinetické parametry u analogického mutantu z *T. flavus* byly $K_m = 0{,}023 \pm 0{,}008$ mmol/l a $k_{cat} = 0{,}27 \pm 0{,}01$ s^{-1}, zde je zajímavé, že hodnoty k_{cat} u těchto mutantů jsou velmi podobné [61]. Inhibice substrátem není běžná u houbových β-*N*-acetylhexosaminidas, u známých fungálních enzymů byla pouze popsána inhibice produktem u β-*N*-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* [61].

Poslední částí této práce bylo testování transglykosylační aktivity mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasy YFHex*Ao* s použitím *p*NP-GlcNAc jako donoru i akceptoru glykosylu v tzv. autokondenzační reakci. Reakční směsi s produkty byly analyzovány pomocí TLC a HPLC. Z výsledku HPLC bylo zjištěno, že dochází k syntéze chitooligomerů *p*NP-$(GlcNAc)_2$, *p*NP-$(GlcNAc)_3$, *p*NP-$(GlcNAc)_4$ a *p*NP-$(GlcNAc)_5$. Mezi dalšími produkty transglykosylačních reakcí byl *N*-acetylglukosamin, chitooligomery $(GlcNAc)_2$ a $(GlcNAc)_3$. Dle analýz HPLC byly výtěžky připravených *p*NP-chitooligomerů poměrně vysoké, analogické jako u mutantů z *T. flavus* [57]. Z toho vyplývá, že koncept mutageneze tyrosinu stabilizujícího oxazolinový intermediát reakce je univerzální metodou pro přípravu vysoce efektivních transglykosidas z fungálních β-*N*-acetylhexosaminidas. Komplexní reakční směs byla purifikována metodou gelové chromatografie, bohužel se nepodařilo získat čisté produkty, ale směsi produktů ve více frakcích. V rámci této práce již nebylo možné z časových důvodů reakci a izolaci produktů

zopakovat za jiných podmínek, toto bude optimalizováno v rámci probíhajícího projektu na pracovišti.

6 Závěr

V rámci této práce byly shrnuty současné poznatky o enzymech β-*N*-acetylhexosaminidasách využitelných v biotechnologickém průmyslu pro syntézu chitooligosacharidů a *p*NP-chitooligosacharidů.

V experimentální části práce byla vyprodukována rekombinantní mutantní β-*N*-acetylhexosaminidasa z *Aspergillus oryzae,* a to YHHex*Ao* nesoucí bodovou mutaci Tyr445His o koncentraci 0,255 mg/ml s hydrolytickou aktivitou 0,069 U/ml.

Z důvodu nízkého množství vyprodukovaného enzymu YHHex*Ao* byl vybrán k charakterizaci mutantní enzym YFHex*Ao* s obdobnou mutaci Tyr445Phe. Byla stanovena pH a teplotní optima a kinetické parametry hydrolytické reakce tohoto mutantu, mezi zajímavé vlastnosti YFHex*Ao* patří jeho výrazná inhibice substrátem. Byla stanovena aktivita produkovaného mutantu a byly provedeny analytické transglykosylační reakce.

Pomocí mutantu YFHex*Ao* byly transglykosylační reakcí připraveny chitooligomery *p*NP-$(GlcNAc)_2$, *p*NP-$(GlcNAc)_3$, *p*NP-$(GlcNAc)_4$, *p*NP-$(GlcNAc)_5$, $(GlcNAc)_2$ a $(GlcNAc)_3$. Produkty transglykosylační reakce se nepodařilo oddělit pomocí gelové chromatografie, podmínky separace je nutné ještě optimalizovat.

7 Literatura

[1] K. Slámová, P. Bojarová, L. Petrásková, a V. Křen, „β-*N*-Acetylhexosaminidase: What's in a name...? ", *Biotechnol. Adv.*, **28**, 682–693, 2010.

[2] B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, a B. Henrissat, „The Carbohydrate-Active enzymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics", *Nucleic Acids Res.,* **37**, 2009.

[3] Y. Bourne a B. Henrissat, „Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 593–600, 2001.

[4] P. Bojarová a V. Křen, „Enzymatic approaches to *O*-glycoside introduction: Glycosidases, in Comprehensive Glycoscience (J.P. Kamerling, Ed.)", *Elsevier:Oxford*, 453-487, 2007.

[5] L. Weignerová, E. Rajnochová-Herkommerová, a V. Křen, „Enzymová reverzní glykosylace", *Chem. Listy*., **93**, 781-789, 1999.

[6] L. Weignerová, P. Vavruška, A. Pišvejcová, J. Thiem, a V. Křen, „Fungal β-*N*-acetylhexosaminidases with high β-*N*-acetylgalactosaminidase activity and their use for synthesis of β-GalNAc-containing oligosaccharides", *Carbohydr. Res.,* **338**, 1003-1008, 2003.

[7] M. Horsch, C. Mayer, U. Sennhauser, a D. M. Rast, „β-*N*-Acetylhexosaminidase: a target for the design of antifungal agents", *Pharmacol. Ther*., **76**, 187-218, 1997.

[8] H. Tsujibo, N. Kondo, K. Tanaka, K. Miyamoto, N. Baba, a Y. Inamori, „Molecular analysis of the gene encoding a novel transglycosylative enzyme from *Alteromonas* sp. Strain O-7 and its physiological role in the chitinolytic system", *J. Bacteriol*., **181**, 5461-5466, 1999.

[9] D. M. Rast, M. Horsch, R. Furter, a G. W. Gooday, „A complex chitinolytic system in exponentially frowing mycelium of *Mucor rouxii*: properties and function", *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 2797-2810, 1991.

[10] D. G. Hogenkamp, Y. Arakane, K. J. Kramer, a K. Sandhoff, „Physiological substrates for human lysosamal β-hexosaminidase S", *J. Biol. Chem*., **277**, 2562-2572, 2002.

[11] Y. L. Jin, Y. Y. Jo, K. Y. Kim, J. H. Shim, Y. W. Kim, a R. D. Park, „Purification and characterization of β-*N*-acetylhexosaminidase from rice seeds", *J. Biochem. Mol. Biol.*, **35**, 313-319, 2002.

[12] S. L. Perez-Martinez, R. J. Menendez-Helman, K. S. Zitta, A. Brandelli, a P. V. Miranda, „Characterization of human sperm *N*-acetylhexosaminidase", *Int. J. Androl.*, **31**, 315-324, 2007.

[13] D. J. Mahuran, „Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidoses", *Biochim. Biophys. Acta.*, **1455**, 105-138, 1999.

[14] I. Tews, A. Perrakis, A. Oppenheim, Z. Dauter, K. S. Wilson, a C.E. Vorgias, „Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease", *Nat. Struct. Biol.*, **3***,* 638-648, 1996.

[15] R. L. Proia, „Gene encoding the human β-hexosaminidase chain: extensive homology of intron placement in the α- and β-chain genes", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85***,* 1883-1887, 1988.

[16] D. E. Koshland, „Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reaction", *Biol. Rev.*, **28**, 416-433, 1953.

[17] B. Henrissat a G. Davies, „Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases", *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 637-644, 1997.

[18] B. L. Mark, D. J. Vocadlo, S. Knapp, B. L. Triggs-Raine, S. G. Withers, a M. N. G. James, „Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial β-hexosaminidase", *J. Biol. Chem.*, **276**, 10330–10337, 2001.

[19] S. Knapp, D. Vocadlo, Z. Gao, B. Krik, J. Lou, a S. G. Withers, „NAG-thiazoline, An *N*-acetyl-β-hexosaminidase inhibitor that implicates acetamido participation", *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6804-6805, 1996.

[20] B. L. Mark, a M. N. G. James, „Anchimeric assistance in hexosaminidases", *Can. J. Chem.*, **80**, 1064-1074, 2002.

[21] S. J. Williams, B. L. Mark, D. J. Vocadlo, M. N. G. James, a S. G. Withers, „Aspartate 313 in the *Streptomyces plicatus* hexosaminidase plays a critical role in substrate-assisted catalysis by orienting the 2-acetamido group and stabilizing the transition state", *J. Biol. Chem.*, **277**, 40055-40065, 2002.

[22] N. Kulik, K. Slámová, R. Ettrich, a V. Křen, „Computational study of β-*N*-acetylhexosaminidase from *Talaromyces flavus*, a glycosidase with high substrate flexibility", *BMC Bioinf.*, **16**, 28, 2015.

[23] Z. Huňková, V. Křen, M. Ščigelová, L. Weignerová, O. Scheel, a J. Thiem, „Induction of β-*N*-acetylhexosaminidases in *Aspergillus oryzae*", *Biotechnol. Lett.*, **18**, 725-730, 1996.

[24] P. Bojarová a V. Křen, „Glycosidases: a key to tailored carbohydrates", *Trends Biotechnol.*, **27**,199-209, 2009.

[25] J. Škerlová, J. Bláha, P. Pachl, K. Hofbauerová, Z. Kukačka, P. Man, P. Pompach, P. Novák, Z. Otwinnowski, J. Brynda, O. Vaněk, a P. Řezáčová, „Crystal structure of native β-*N*-acetylhexosaminidase isolated from *Aspergillus oryzae* sheds light onto its substrate specificity, high stability, and regulation by propeptide", *FEBS J.*, **285**, 580-598, 2018.

[26] O. Plíhal, J. Sklenár, K. Hofbauerová, P. Novák, P. Man, P. Pompach, D. Kavan, H. Ryšlavá, L. Weignerová, A. Charvátová-Pišvejcová, V. Křen, a K. Bezouška, „Large propeptides of fungal β-*N*-acetylhexosaminidases are novel enzyme regulators that must be intracellularly processed to control activity, dimerization, and secretion into the extracellular environment", *Biochemistry*, **46**, 2719-2734, 2007.

[27] P. Pompach, P. Man, D. Kavan, K. Hofbauerová, V. Kumar, K. Bezouška, V. Havlíček, a P. Novák, „Modified electrophoretic and digestion conditions allow a simplified mass spectrometric evaluation of disulfide bonds", *J. Mass Spectrom.*, **44**, 1571-1578, 2009.

[28] S. Kim, I. Matsuo, K. Ajisaka, H. Nakajima, a K. Kitamoto, „Cloning and characterization of the nagA gene that encodes β-*N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus nidulans* and its expression in *Aspergillus oryzae*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 2168–2175, 2002.

[29] K. Slámová, P. Bojarová, D. Gerstorferová, B. Fliedrová, J. Hofmeisterová, M. Fiala, P. Pompach, a V. Křen, „Sequencing, cloning and high-yield expression of a fungal β-*N*-acetylhexosaminidase in *Pichia pastoris*", *Protein Expr. Purif.*, **82**, 212-217, 2012.

[30] A. C. Hill, „Reversible zyhomydrolysis", *J. Chem. Soc.*, **73**, 634–658, 1898.

[31] E. Johansson, L. Hedbys, K. Mosbach, P. O. Larsson, A. Gunnarsson, a S. Svensson, „Studies of the reversed α-mannosidase reaction in high concentrations of mannose", *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 347–352, 1989.

[32] M. R. Martearena, S. Blanco, G. Ellenrieder, „Synthesis of alkyl-α-L-rhamnosides by water soluble alcohols enzymatic glycosylation", *Bioresource Technol.*, **90**, 297–303. 2003.

[33] T. Murata, S. Morimoto, X. Zeng, S. Watanabe, a T. Usui, „Enzymatic synthesis of α-L-fucosyl-*N*-acetyllactosamines and 3'-*O*- α-L-fucosyllactose utilizing α-L-fucosidases", *Carbohydr. Res.*, **320**, 192–199, 1999.

[34] M. Pozo a V. Gotor, „Enzymatic-synthesis of β-galactosyloxime derivates using β-galactosidase", *J. Chem. Soc*., *Perkin Trans. 1*, 1001–1002, 1993.

[35] V. Křen a J. Thiem, „Glycosylation employing bio-systems: from enzymes to whole cells", *J. Chem. Soc. Rev.*, **26**, 463-473, 1997.

[36] L. F. Mackenzie, Q. P. Wang, R. A. J. Warren, S. G. Withers, „Glycosynthases: mutant glycosidases for oligosacharide synthesis", *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 5583-5584, 1998.

[37] S. Singh, R. Gallagher, P. J. Derrick, a D. H. G. Crout, „Glycosidase-catalysed oligosaccharide synthesis: Preparation of the *N*-acetylchitooligosaccharides penta-*N*-acetylchitopentaose and hexa-*N*-acetylchitohexaose using β-*N*-acetylhexosaminidase of *Aspergillus oryzae*", *Tetrahedron: Asymmetr*., **6**, 2803-2810, 1995.

[38] V. Křen, M. Ščigelová, V. Přikrylová, V. Havlíček, a P. Sedmera, „Enzymatic synthesis of β-*N*-acetylhexosaminides of ergot alkaloids", *Biocatalysis.*, **10**, 181-193, 1994.

[39] S. Singh, J. Packwood, C. J. Samuel, P. Critchley, a D. H. G. Crout, „Glycosidase-catalysed oligosaccharide synthesis: preparation of *N*-acetylchitooligosaccharides using the β-*N*-acetylhexosaminidase of *Aspergillus oryzae*", *Carbohydr. Res*., **279**, 293-305, 1995.

[40] S. Kadowaki, I. Yashiawau, J. Watanabe, K. Yamamoto, M. Bunno, a Y. Ichikawa, „Transglycosylation activity of β-*N*-acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum* and its application to synthesis of a drug carrier", *J. Ferment. Bioeng*., **83**, 341-345, 1997.

[41] L. Weignerová, Y. Suzuki, Z. Huňková, P. Sedmera, V. Havlíček, R. Marek, a V. Křen, „Pyridoxine as a substrate for screening synthetic potential of glycosidases", *Collect Czech Chem. Commun*., **64**, 1325-1334, 1999.

[42] V. Nieder, M. Kutzer, V. Křen, R. G. Gallego, J. P. Kamerling, a L. Elling, „Screening and characterization of β-*N*-acetylhexosaminidases for the synthesis of nucleotide-activated disaccharides", *Enzyme Microb. Technol*., **34**, 407-414, 2004.

[43] P. Bojarová, L. Petrásková, E. Ferrandi, D. Monti, H. Pelantová, M. Kuzma, P. Simerská, a V. Křen, „Glycosyl azides – an alternative way to disaccharides", *Adv. Synth. Catal.*, **349**, 1514-1520, 2007.

[44] P. Fialová, L. Weignerová, J. Rauvolfová, V. Přikrylová, A. Pišvejcová, R. Ettrich, M. Kuzma, P. Sedmera, a V. Křen, „Hydrolytic and transglycosylation reactions of *N*-acyl modified substrates catalysed by β-*N*-acetylhexosaminidases", *Tetrahedron*, **60**, 693–701, 2004.

[45] P. Bojarová, K. Slámová, K. Křenek, R. Gažák, N. Kulik, R. Ettrich, H. Pelentová, M. Kuzma, S. Riva, D. Adámek, K. Bezouška, a V. Křen, „Charged hexosaminides as new substrates for β-*N*-acetylhexosaminidase-catalyzed synthesis of immunomodulatory disaccharides", *Adv. Synth. Catal.*, **353**, 2409-2420, 2011.

[46] K. Slámová, R. Gažák, P. Bojarová, N. Kulik, R. Ettrich, H. Pelentová, P. Sedmera, a V. Křen, „4-Deoxy-substrates for β-*N*-acetylhexosaminidases: How to make use of their loose specificity", *Glycobiology*, **20**,1002-1009, 2010.

[47] V. Křen, E. Rajnochová, Z. Huňková, J. Dvořáková, a P. Sedmera, „Unusual nonreducing sugar GlcNAcβ(1-1)Manβ formation by β-*N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*", *Tetrahedron Lett.*, **39**, 9777-9780, 1998.

[48] J. Rauvolfová, M. Kuzma, L. Weignerová, P. Fialová, V. Přikrylová, A. Pišvejcová, M. Macková, a V. Křen, „β-*N*-Acetylhexosaminidase-catalysed synthesis of non-reducing oligosaccharides", *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **29**, 233–239, 2004.

[49] X. Chen, L. Xu, L. Jin, B. Sun, G. Gu, L. Lu, a M. Xiao, **„**Efficient and regioselective synthesis of β-GalNAc/GlcNAc-Lactose by a bifunctional transglycosylating β-*N*-acetylhexosaminidase from *Bifidobacterium bifidum*", *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 5642-5652, 2016.

[50] J. Dvořáková, D. Schmidt, Z. Huňková, J. Thiem, a V. Křen, „Enzymatic rearrangement of chitin hydrolysates with β-*N*-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae*", *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **11**, 225-232, 2001.

[51] D. N. Ngo, S. H. Lee, M. M. Kim, a S. K. Kim, „Production of chitin oligosaccharides with different molecular weights and their antioxidant effect in RAW 264.7 cells", *J. Funct. Foods*, **1**, 188-198, 2009.

[52] Z. Wang, L. Zheng, S. Yang, R. Niu, E. Chu, a X. Lin, „*N*-Acetylchitooligosaccharide is a potent angiogenic inhibitor both *in vivo* and *in vitro*", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **357**, 26-31, 2007.

[53] M. Okada, M. Matsumura, Y. Ito, a N. Shibuya, „High-affinity binding proteins for *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley and carrot

cells: conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor", *Plant Cell Physiol.*, **43**, 505–512, 2002.

[54] T. Ohnuma, T. Fukuda, S. Dozen, Y. Honda, M. Kitaoka, a T. Fukamizo, „A glycosynthase derived from an inverting GH19 chitinase from the moss *Bryum coronatum*", *Biochem. J.*, **444**, 437–443, 2012.

[55] P. Bojarová, N. Kulik, M. Hovorková, K. Slámová, H. Pelentová, a V. Křen, „The β-*N*-Acetylgalactosaminidase in the synthesis of bioactive glycans: Protein and reaction engineering", *Molecules,* **24**, 599-613, 2019.

[56] K. Slámová a P. Bojarová, „Engineered *N*-acetylhexosamine-active enzymes in glycoscience", *BBA – Gen. Subj.,* **1871**, 2070-2087, 2017.

[57] K. Slámová, J. Krejzová, P. Marhol, L. Kalachová, N. Kulik, H. Pelentová, J. Cvačka, a V. Křen, „Synthesis of derivatized chitooligomers using transglycosidases engineered from the fungal GH20 β-*N*-acetylhexosaminidase", *Adv. Synth. Catal.*, **357**, 1941-1950, 2015.

[58] P. Bojarová, P. Chytil, B. Mikulová, R. Konefal, H. Pelentová, J. Krejzová, K. Slámová, L. Petrásková, L. Kotrchová, J. Cvačka, T. Etrych, a V. Křen, „Glycan-decorated HPMA copolymers as high-affinity lectin ligands", *Polym. Chem.*, **8**, 2647-2658, 2017.

[59] T. Liu, Q. Wu, L. Liu, Q. Yang, „Elimination of substrate inhibition of β-*N*-acetylhexosaminidase by single site mutation", *Process Biochemistry*, **48**, 103-108, 2013.

[60] P. Bojarová, N. Kulik, K. Slámová, M. Hubalek, M. Kotik, J. Cvacka, H. Palentová, V. Křen, „Selective β-*N*-acetylhexosaminidase from Aspergillus versicolora tool for producing bioactive carbohydrates", *Applied Microbiology and Biotechnology.*, **103**, 1737-1753, 2019.

[61] H. Ryšlavá, A. Kalendová, V. Doubnerová, V. Kumar, Z. Kukačka, P. Pompach, O. Vaněk, K. Slámová, P. Bojarová, R. Ettrich, V. Křen, a K. Bezouška, „Enzymatic characterization and molecular modeling of an evolutionarily interesting fungal β-*N*-acetylhexosaminidase", *FEBS J.*, **278**, 2469-2483, 2011.

.

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

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka