

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Mikrobiologie



Bc. Michaela Hovorková

Inženýrství mikrobiálních glykosidáz pro změnu syntetického potenciálu
Engineering of microbial glycosidases for modifying synthetic potencial

Diplomová práce

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

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze, 1.6.2020

Podpis

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala své vedoucí práce RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D. za cenné rady jak při vypracování experimentální části, tak i při sepisování práce, za ochotu, trpělivost a hlavně čas, který mi věnovala během celé naší spolupráce. Dále patří mé velké díky vedoucímu prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. za umožnění práce a všem kolegům z MBÚ AV ČR, zejména Ing. Lucii Petráskové, Ph.D., RNDr. Heleně Pelantové, Ph.D. za analýzu produktů a Ing. Natalii Kulik, PhD. za molekulární modelování.

Práce vznikla za finanční podpory MŠMT v rámci projektu LTC18038 – Multivalentní glyko-biomateriály s potenciálem v regenerační medicíně.

Abstrakt

Glykosidázy (EC 3.2.1.) neboli glykosidhydrolázy jsou enzymy katalyzující štěpení glykosidové vazby mezi dvěma sacharidy nebo mezi sacharidem a aglykonem. Za vhodných reakčních podmínek (zvláště snížení aktivity vody v reakční směsi) jsou tyto enzymy schopné glykosidovou vazbu též syntetizovat. Cílenou mutagenezí katalytického centra enzymů je možné potlačit nebo úplně zrušit jejich hydrolytickou aktivitu. Enzymová syntéza pomocí glykosidáz umožňuje připravit bioaktivní galaktosidy, např. ligandy galektinů.

Předkládaná práce se zabývá zejména β -galaktosidázou z *Bacillus circulans*, její rekombinantní expresí a mutagenezí. V první části práce byl mnou navržený komerčně připravený plazmid β -galaktosidázy z *B. circulans* izoformy A použit k rekombinantní expresi v *E. coli*. Bylo nutné optimalizovat podmínky produkce enzymu. Jelikož jde o velký protein (189 kDa) byl použit expresní vektor pCOLD II a chladová kultivace při 15 °C. Enzym je specifický pro tvorbu glykosidové vazby β -1,4 a byl využit na syntézu komplexních tri- a tetrasacharidových ligandů, které nelze připravit s hrubým komerčním preparátem obsahujícím nežádoucí enzymové aktivity. Dále byla pomocí PCR s mutantními primery provedena cílená mutageneze katalytického nukleofilu v aktivním centru tohoto enzymu, čímž byl vytvořen mutant v pozici E532G. Díky vzniklé mutaci byla potlačena téměř veškerá hydrolytická aktivita enzymu. Ve třetí části práce byla připravena kratší varianta enzymu pomocí PCR s fosforylovanými primery a následnou ligací pouze požadované části genu. Všechny připravené enzymy byly biochemicky charakterizovány a použity v syntetických aplikacích, jež jsou v této práci dokumentovány.

Klíčová slova:

Bacillus circulans, cílená mutageneze, *Escherichia coli*, β -galaktosidáza, galaktosylace, glykosyntáza, PCR, rekombinantní exprese

Abstract

Glycosidases (EC 3.2.1.) *alias* glycoside hydrolases are enzymes that catalyze the cleavage of a glycosidic bond between two carbohydrates or between a carbohydrate and an aglycone. Under suitable conditions (especially reduction of water activity in the reaction mixture), these enzymes are also able to synthesize a glycosidic bond. By targeted mutagenesis of the catalytic centre of the enzymes, it is possible to suppress or completely abolish their hydrolytic activity. Enzyme synthesis using glycosidases makes it possible to prepare bioactive galactosides, for example galectin ligands.

The present work deals mainly with β -galactosidase from *Bacillus circulans*, its recombinant expression and mutagenesis. In the first part of the work, the commercially prepared plasmid of β -galactosidase from *B. circulans* isoform A that I designed was used for recombinant expression in *E. coli*. It was necessary to optimize the conditions of the enzyme production. As it is a large protein (189 kDa), the expression vector pCOLD II and cold production at 15 ° C were used. The enzyme is specific for the formation of the β -1,4 glycosidic bond and has been used to synthesize complex tri- and tetrasaccharide ligands that cannot be prepared with a crude commercial preparation containing undesirable enzyme activities. Furthermore, site-directed mutagenesis of the catalytic nucleophile at the active site of this enzyme was performed by PCR with mutant primers, creating a mutant at position E532G. Due to the resulting mutation, almost all hydrolytic activity of the enzyme was suppressed. In the third part of the work, a shorter variant of the enzyme was prepared by PCR with phosphorylated primers and subsequent ligation of only the desired part of the gene. All prepared enzymes were biochemically characterized and used in synthetic applications, which are documented in this thesis.

Keywords:

Bacillus circulans, *Escherichia coli*, β -galactosidase, galactosylation, glycosynthase, PCR, recombinant expression, targeted mutagenesis

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Přehled literatury.....	12
2.1. Enzymy přeměňující sacharidy	12
2.1.1. Glykosyltransferázy	12
2.1.2. Glykosidhydrolázy.....	13
2.2. <i>Bacillus</i> sp.	14
2.2.1. Charakteristika rodu <i>Bacillus</i>	14
2.2.2. <i>Bacillus circulans</i> a jeho využití.....	16
2.2.3. Galaktosidázy z <i>Bacillus circulans</i>	17
2.3. Mutageneze heterologně exprimovaných proteinů	19
2.3.1. Cílená mutageneze.....	19
2.3.2. Řízená evoluce.....	20
2.3.3. Mutantní glykosidázy se zvýšeným syntetickým potenciálem.....	21
2.4. Bioaktivní galaktosidy	23
2.4.1. Enzymová galaktosylace.....	23
2.4.2. Sacharidy mateřského mléka a krevních skupin.....	23
2.4.3. Galektiny – proteiny vážící β -galaktosidy	26
3. Cíle práce	29
4. Materiál a metody	30
4.1. Použitý materiál	30
4.2. Roztoky a média.....	31
4.3. Použité komerční sety	32
4.4. Použité přístroje	32
4.5. Cílená mutageneze β -galaktosidázy z <i>Bacillus circulans</i>	34

4.5.1.	Příprava mutantní varianty BgaD-A-E532G	34
4.5.2.	Příprava zkrácené varianty BgaD-B	35
4.6.	Izolace a preparace genu <i>bgaD</i>	37
4.6.1.	Izolace genu v analytickém množství	37
4.6.2.	Izolace genu v preparativním množství	38
4.7.	Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i>	40
4.8.	Rekombinantní exprese a purifikace β -galaktosidáz	40
4.8.1.	Kultivace bakterií.....	40
4.8.2.	Purifikace enzymu afinitní chromatografií	41
4.9.	Charakterizace rekombinantních β -galaktosidáz	42
4.9.1.	Čistota a koncentrace proteinu.....	42
4.9.2.	Aktivita enzymu.....	43
4.9.3.	Enzymová kinetika	44
4.10.	Enzymová galaktosylace	45
4.10.1.	Enzymová syntéza pomocí BgaD-A	45
4.10.2.	Enzymová syntéza pomocí BgaD-B	46
4.10.3.	Transglykosylační reakce s mutantní variantou BgaD-A-E532G.....	46
5.	Výsledky	47
5.1.	Cílená mutageneze β -galaktosidázy.....	47
5.1.1.	Příprava mutantní varianty BgaD-A-E532G	47
5.1.2.	Příprava zkrácené varianty BgaD-B	48
5.2.	Izolace genů β -galaktosidáz	49
5.3.	Exprese a purifikace β -galaktosidáz	49
5.4.	Charakteristika připravených β -galaktosidáz.....	52
5.4.1.	Koncentrace a čistota β -galaktosidáz	52
5.4.2.	Aktivita připravených β -galaktosidáz.....	52

5.4.3. Kinetické parametry β -galaktosidáz	54
5.5. Enzymová galaktosylace	55
6. Diskuze	57
7. Souhrn	63
8. Seznam použité literatury	64
Přílohy	73

Seznam zkratek

α -GalF	α -D-galaktopyranosyl-fluorid
(GlcNAc) ₂ -N ₃	<i>N,N'</i> -diacetylchitobiosyl-azid
(GlcNAc) ₃ -N ₃	<i>N,N',N''</i> -triacetylchitotriosyl-azid
(GlcNAc) ₄ -N ₃	<i>N,N',N'',N'''</i> -tetraacetylchitotetraosyl-azid
BgaD	β -galaktosidáza D z <i>Bacillus circulans</i>
CRD	doména rozpoznávající sacharidy (angl. <i>carbohydrate recognition domain</i>)
DMF	dimethylformamid
DTT	dithiotreitol
ECM	extracelulární matrix
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EPS	exopolysacharid
FOS	fruktooligosacharid
Gal β 4(GlcNAc) ₂ -N ₃	β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukoktopyransyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-azid
Gal β 4(GlcNAc) ₃ -N ₃	β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukoktopyransyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-azid
GlcNAc	2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa
GlcNAc-N ₃	2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-azid
GOS	galaktooligosacharid
HMO	sacharidy mateřského mléka (angl. <i>human milk oligosaccharides</i>)
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid
ITCHY	angl. <i>iterative truncation for the creation of hybrid enzymes</i>
LacNAc	β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa
LacNAc-N ₃	β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-azid
LB	medium LB (Luria-Bertani)
NGT	thiazolin odvozený od <i>N</i> -acetylglukosaminu
ot./min	otáčky za minutu (<i>rpm</i>)
pAOS	kyselé oligosacharidy odvozené od pektinu (angl. <i>pectin-derived acidic oligosaccharides</i>)
PCR	polymerázová řetězová reakce (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)

PMSF	fenylmethylsulfonylfluorid
<i>p</i> NP-Gal	<i>p</i> -nitrofenyl- β -D-galaktopyranosid
RACHITT	angl. <i>random chimeragenesis on transient templates</i>
SDS	dodecylsulfát sodný
TAE pufr	tris-acetát-EDTA
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
WT	divoký typ (z angl. <i>wild type</i>)

1. Úvod

Mikrobiální glykosidázy, enzymy katalyzující štěpení glykosidové vazby, se hojně využívají v průmyslu, biotechnologiích a jejich studium je těžištěm mnoha vědeckých prací. Mikrobiální glykosidázy se používají např. při produkci vína, kdy jejich působením dochází ke štěpení aromatických glykosidů a uvolnění žádoucích látek (Maicas a Mateo 2016). Glykosidázy jsou kromě hydrolýzy schopné též glykosidovou vazbu syntetizovat, v procesu označovaném jako transglykosylace. Děje se tak za vhodných reakčních podmínek, které lze upravit např. snížením aktivity vody přidáním organického rozpouštědla nebo anorganické soli (Fialová *et al.* 2004). Mikrobiální glykosidázy se díky své transglykosylační aktivitě hojně využívají na syntézu oligosacharidů, bioaktivních glykosidů potenciálně využitelných v mnoha odvětvích biomedicíny.

Další možností, jak snížit hydrolytickou aktivitu glykosidáz, je cílená mutagenese. Pomocí mutagenese v aktivním centru enzymu je možné docílit různých změn ve vlastnostech enzymu. Mutací katalytického nukleofilu je možné úplně zrušit hydrolytickou aktivitu a vytvořit tak glykosyntázu, která nebude glykosidovou vazbu téměř vůbec štěpit (Mackenzie *et al.* 1998), (Malet a Planas 1998). Mutacemi na různých pozicích je možné upravit substrátovou specifitu, regioselektivitu, kinetické vlastnosti, syntetický potenciál apod. (Slámová a Bojarová 2017).

Diplomová práce se zabývá β -galaktosidázou z *Bacillus circulans*, glykosidázou, která štěpí galaktózové jednotky ze sacharidů a glykosidů. V bakterii *B. circulans* můžeme nalézt několik různých β -galaktosidáz, naším zájmem je β -galaktosidáza D (BgaD). *B. circulans* produkuje čtyři izoformy β -galaktosidázy D: BgaD-A (189,3 kDa), BgaD-B (154,9 kDa), BgaD-C (134,8 kDa) a BgaD-D (91,6 kDa). Všechny izoformy vznikají posttranslačně endogenními proteázami a liší se transglykosylační aktivitou (Song, Abe, *et al.* 2011). Isoforma BgaD-D se využívá na přípravu galaktooligosacharidů (GOS), které jsou součástí mateřského mléka a prebiotik (Yin *et al.* 2017). BgaD-D je jediná izoforma, která byla zatím krystalizována. Předmětem této práce jsou izoformy BgaD-A a BgaD-B, které by dle literatury mohly být na rozdíl od BgaD-D regioselektivní a specifické pro tvorbu disacharidů (Song *et al.* 2011).

Tato práce se zabývá heterologní produkcí těchto dvou izoform β-galaktosidázy z *B. circulans* v *E. coli*. Díky velikosti zvláště izoformy BgaD-A (189,3 kDa), bylo nutné je produkovat při nízké teplotě, aby došlo ke správnému sbalení proteinu. Dle postupů v literatuře (Song, Imanaka, *et al.* 2011) byl pro tento účel využit expresní vektor pCOLD II pro chladovou kultivaci bakterií a produkce byla optimalizována. Dále byla pomocí cílené mutagenese připravena zkrácená izoforma BgaD-B. Obě připravené izoformy byly porovnány a charakterizovány i z hlediska jejich využitelnosti pro regioselektivní syntézu oligosacharidů. Isoforma BgaD-A byla též mutována v aktivním centru enzymu za cílem zvýšit výtěžek syntetických reakcí. Mutací katalytického nukleofilu byl připraven mutant BgaD-A-E532G s výrazně sníženou hydrolytickou aktivitou. Enzymy připravené v této práci byly využity na enzymovou galaktosylaci – navázání galaktózové jednotky na sacharid nebo aglykon. Galaktosylací je možné připravit řadu bioaktivních galaktosidů, zejména pak galaktooligosacharidy mateřského mléka a inhibitory galektinů.

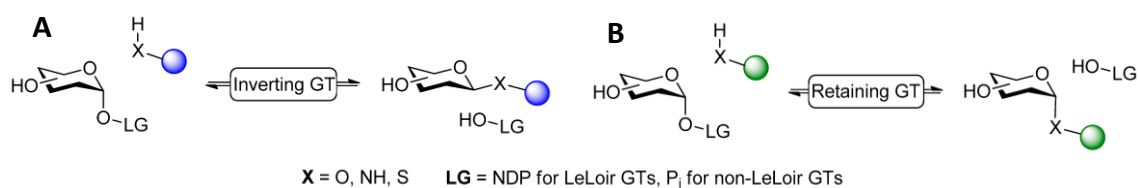
2. Přehled literatury

2.1. Enzymy přeměňující sacharidy

Enzymy metabolizující sacharidy, tedy katalyzující vznik nebo štěpení glykosidové vazby, lze rozdělit do čtyř skupin – glykosyltransferázy, transglykosidázy, glykosylfosforylázy a glykosidhydrolázy (glykosidázy).

2.1.1. Glykosyltransferázy

Glykosyltransferázy (EC 2.4) jsou enzymy katalyzující přenos sacharidových zbytků za vzniku glykosidové vazby mezi molekulou donoru a akceptoru. Mnoho glykosyltransferáz je ukotveno na membránu Golgiho aparátu (Freeze a Elbein 2009). Jsou striktně stereoselektivní, regioselektivní a mají vyhraněnou substrátovou specifitu. Glykosyltransferázy *in vivo* katalyzují syntézu glykokonjugátů na povrchu savčích buněk a polysacharidů buněčné stěny rostlin, hub a bakterií (Trincone a Giordano 2006). Donory glykosyltransferáz jsou aktivované sacharidové jednotky. Podle typu donoru můžeme glykosyltransferázy rozdělit na „leloirovské“ a „neleloirovské“. Glykosyltransferázy využívající jako substráty cukerné nukleotidy (GMP, UDP, GDP, TDP) aktivované vazbou fosfátu na daný nukleosid nazýváme „leloirovské“. Tento název byl odvozen od jména objevitele cukerných nukleotidů, biochemika a lékaře L. F. Leloira. Akceptor pro glykosylaci glykosyltransferázami může být jednoduchý monosacharid homologní k donoru nebo komplexní molekula proteinu, lipidu, nukleové kyseliny či sekundární metabolity (flavonoidy, antibiotika) obsahující hydroxylové skupiny (Palcic 2011). Schéma katalýzy glykosyltransferázami je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1: Schéma glykosyltransferáz (GT), invertujících (A), retenujících (B). LG – nukleosiddifosfát pro „leloirovské“ GT a fosfát pro „neleloirovské“ GT. Převzato z (Nidetzky, Gutmann, a Zhong 2018).

„Neleloirovské“ glykosyltransferázy jsou nezávislé na cukerných nukleotidech, mohou využívat donory aktivované přímou fosforylací nebo neaktivované donory ve formě sacharózy nebo oligosacharidů ze škrobu (Weijers, Franssen, a Visser 2008). Do této skupiny patří glykosylfosforylázy (EC 3.4) - enzymy, které katalyzují přenos sacharidové

jednotky z neredukujícího konce donoru na anorganický fosfát za vzniku glykosylfosfátu. Tato reakce je reversibilní z důvodu nízké rovnovážné konstanty. Volná energie glykosidové vazby je téměř stejná jako energie esterové vazby na fosfát. Glykosylfosforylázy jsou tak schopné syntetizovat novou glykosidovou vazbu za použití vhodného glykosylfosfátu a akceptoru (Puchart 2015).

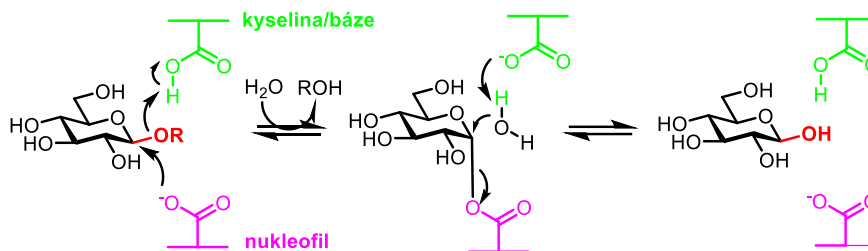
2.1.2. Glykosidhydrolázy

Glykosidhydrolázy neboli glykosidázy (EC 3.2) jsou enzymy *in vivo* katalyzující štěpení glykosidové vazby mezi dvěma sacharidy nebo mezi sacharidem a aglykonem. Kromě této své přirozené schopnosti jsou za určitých podmínek *in vitro* schopné glykosidovou vazbu též syntetizovat. Podmínky vhodné pro syntézu se dají různě upravovat redukcí aktivity vody nebo výběrem donoru glykosylu s vhodnou odstupující (např. aromatickou) skupinou. Glykosidázy můžeme rozdělit podle způsobu štěpení glykosidové vazby na *exo*-glykosidázy, které štěpí sacharidové jednotky z konce řetězce, a *endo*-glykosidázy, které štěpí uvnitř řetězce (Cuthbert *et al.* 2007). Tato práce je zaměřena na *exo*-glykosidázy, kdy je přenášen pouze monosacharid z neredukujícího konce substrátu.

Glykosidázy mohou syntetizovat glykosidovou vazbu dvěma způsoby, v závislosti na typu substrátu a podmínkách reakce. Pokud monosacharid reaguje s nukleofilem za odštěpení molekuly vody, jde o tzv. reverzní hydrolýzu, z chemického hlediska o kondenzační reakci. Rovnováha je silně na straně hydrolýzy. Pro zvýšení syntetických výtěžků je nutné potlačit aktivitu vody například přidáním anorganických solí nebo organických rozpouštědel (Fialová *et al.* 2004).

Glykosidázy lze podle mechanismu štěpení rozdělit na retenující (zachovávají anomerní konfiguraci substrátu) nebo invertující (mění anomerní konfiguraci substrátu na opačnou). Retenující glykosidázy, které mohou vykazovat syntetické schopnosti, katalyzují hydrolytické štěpení ve dvou krocích. Katalytické centrum obsahuje dva karboxyláty – nukleofilní a acidobazický. V prvním kroku (glykosylace) přijme kyslíkový atom proton z acidobazického aminokyselinového zbytku, dojde k usnadnění odstoupení aglykonu. Převrátí se anomerní konfigurace na C-1 substrátu a vzniká glykosyl-enzymový intermediát. V dalším kroku (deglykosylace) deprotonovaná aminokyselina působí jako katalytická báze a aktivuje molekulu vody nebo jiný akceptor, který funguje jako nukleofil a hydrolyzuje glykosyl-enzymový intermediát, dojde k další přeměně konfigurace a vzniká nová glykosidová vazba. Mechanismus retenujících glykosidáz je znázorněn na Obr. 2. Invertující

glykosidázy využívají jednokrokový mechanismus, ve kterém je odstupující skupina přímo nahrazena nukleofilní molekulou vody a dochází ke změně konfigurace (Bojarová a Křen 2009).



Obr. 2: Mechanismus retenujících glykosidáz se vznikem glykosyl-enzymového intermediátu. Obrázek byl vytvořen v programu ChemDraw Professional 16.0.

Mezi glykosidhydrolázy jsou též formálně řazeny transglykosidázy (EC 3.2.1), avšak jejich hydrolytická aktivita je velmi nízká. Transglykosidázy katalyzují přeměnu jednoho glykosidu na jiný. Mechanismus přeměny je podobný jako u retenujících glykosidáz (viz Obr. 2 a popis výše): v prvním kroku dojde k vytvoření glykosyl-enzymového intermediátu a v dalším kroku dochází k vytvoření nového glykosidu. Např. α -transglukosidáza je nezbytná pro degradaci škrobu a metabolismus maltózy v listech rostlin během noci (Fettke *et al.* 2006).

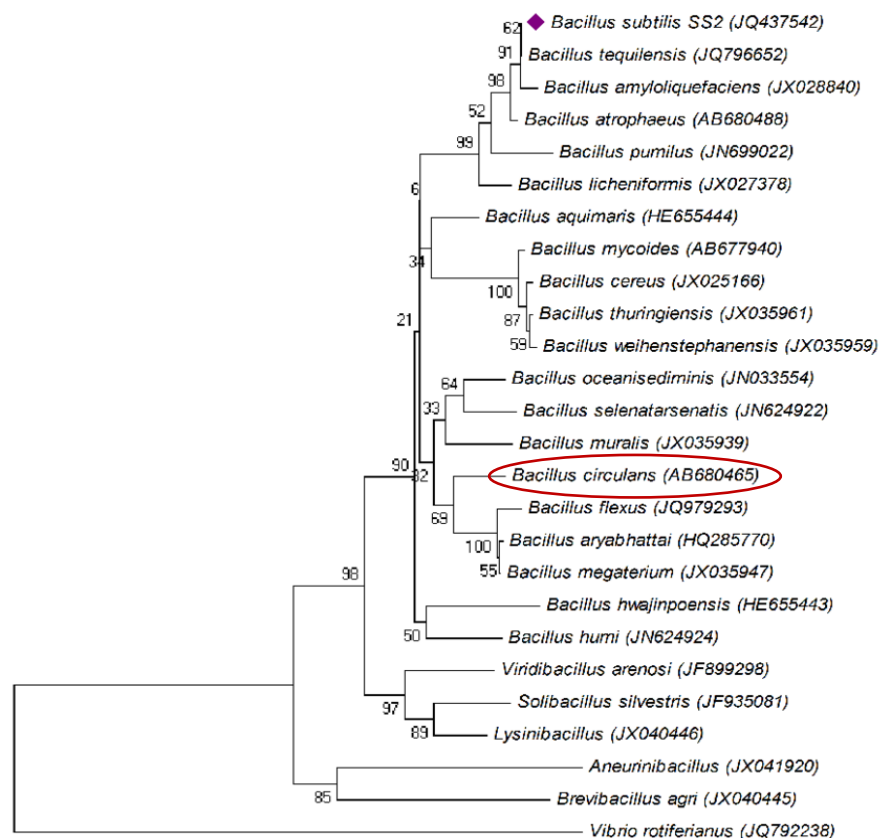
2.2. *Bacillus* sp.

2.2.1. Charakteristika rodu *Bacillus*

Bacillus je rod bakterií tyčinkovitého tvaru, schopných tvořit endospory. Je aerobní nebo fakultativně anaerobní. Patří mezi grampozitivní bakterie, ale některé druhy mohou s věkem přejít na typ gramnegativní. Bakterie *Bacillus* jsou klasifikovány do následovně: *Bacteria* – *Firmicutes* – *Bacilli* – *Bacillales* – *Bacillaceae* – *Bacillus*. Mnoho druhů tohoto rodu má různorodé fyziologické vlastnosti, díky nimž jsou schopné žít v prakticky jakémkoli prostředí. Endospory, které *Bacillus* tvoří při nedostatku živin a nevhodných podmínkách, jsou odolné proti vysoké i nízké teplotě, radiaci, vysoušení a dezinfekcím. *Bacillus anthracis*, významný patogen způsobující závažné onemocnění antrax (sněť slezinná, lidově tzv. „uhlák“), potřebuje ke sporulaci kyslík, což je důležitým faktorem v epidemiologii. *B. anthracis* produkuje *in vivo* polypeptidový obal, který ho chrání před fagocytózou (Priest 2008). Dalším významným patogenem tohoto rodu je *B. cereus*, který způsobuje závažné otravy jídlem. Při nedostatečné tepelné úpravě potravin dojde k vyklíčení spor a po

následném vegetativním množení bakterie produkují enterotoxin způsobující silné průjmy nebo zvracení (Ehling-Schulz, Fricker, a Scherer 2004).

Jedním z nejdůležitějších druhů tohoto rodu je *B. subtilis*, který je modelovým organismem grampozitivních bakterií a je hojně využíván ve studiích replikace bakterií a buněčné diferenciaci. *B. subtilis* se vyskytuje v půdě a v gastrointestinálním traktu přežvýkavců a lidí. Je schopný tvořit endospory, které jsou odolné vůči extrémním podmínkám (Earl, Losick, a Kolter 2008). *B. subtilis* je biotechnologicky významný mikroorganismus. Má širokou škálu využití, používá se např. v průmyslové produkci amyláz, proteáz a kyseliny hyaluronové. *B. subtilis* má velkou genomovou diverzitu, pomocí 16S rRNA sekvenování bylo nalezeno velké množství kmenů. Kmen izolovaný ze zasolené půdy *B. subtilis* SS2 má potenciální využití jako biofertilizátor, neboť může hrát roli při iniciaci růstu rostlin pomocí produkce fytohormonů (Kayasth, Kumar, a Gera 2017). Dalšímu významnému zástupci tohoto rodu, *B. circulans*, je věnována následující kapitola. Fylogenetický strom ukazující vztah *B. subtilis* k dalším taxonům je zobrazen na Obr. 3.

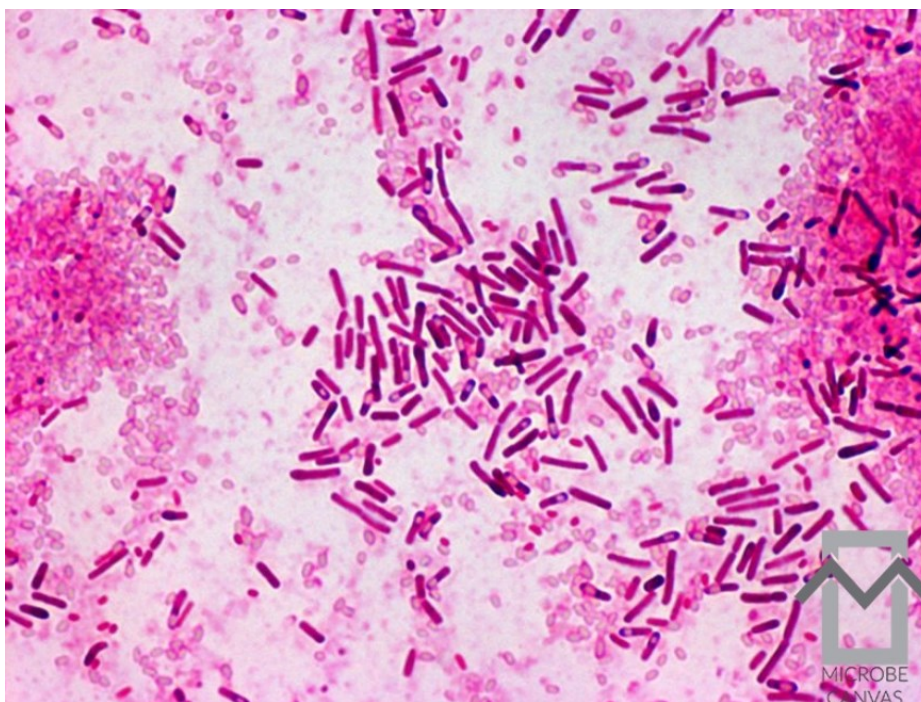


Obr. 3: Fylogenetický strom založený na 16S rRNA sekvenování, ukazující vztah *Bacillus subtilis* SS2 a *Bacillus circulans* a dalších taxonů. Převzato z (Kayasth, Kumar, a Gera 2017).

2.2.2. *Bacillus circulans* a jeho využití

Bacillus circulans je průmyslově významný zástupce rodu *Bacillus* (fylogenetický strom viz Obr. 3). Jedná se o grampozitivní, někdy též gramvariabilní sporulující tyčkovité bakterie. Vzhled těchto bakterií pod mikroskopem je zobrazen na Obr. 4. Bakterie byla poprvé popsána roku 1980 E. O. Jordanem a dále podrobněji charakterizována v roce 1983 (Nakamura a Swezey 1983). Většina druhů rodu *Bacillus* je přirozeně distribuována v prostředí, ale některé druhy se chovají jako primární nebo oportunní patogeny způsobující řadu onemocnění. Spory těchto bakterií jsou rezistentní vůči UV a jiným sterilizačním prostředkům, a jsou tak častými kontaminantami v nemocnicích. Některé druhy se také objevují v přirozené lidské mikroflóře, zejména u dlouhodobě hospitalizovaných pacientů. Příkladem je právě *Bacillus circulans* izolovaný z krevní kultury, který způsobuje fatální sepsi a je rezistentní na všechna předepsaná antibiotika (produkce karbapenemáz). *Bacillus circulans* lze tedy považovat za potenciální patogen u imunokompromitovaných pacientů a nejen za běžnou kontaminantu vzorku (Alebouyeh *et al.* 2011).

Bacillus circulans se hojně využívá pro mikrobiální produkci různých látek. Jednou z nejdůležitějších látek produkovaných tímto kmenem je *exo*-polysacharid (EPS). Exopolysacharid je struktura na vnější membráně bakterií skládající se z polysacharidů, proteinů, nukleových kyselin, lipidů a dalších biomakromolekul. EPS z *B. circulans* se skládá zejména z manózy a verbaskózy (pentasacharid tvořený čtyřmi galaktózami a jednou fruktózou), dále z glukózy a fruktózy (Vidhyalakshmi *et al.* 2016). EPS je esenciální pro buněčnou adhezi, tvorbu biofilmu a agregátů, čímž tvoří ochranu bakterií před predátory a toxiny (Sushma 2015). Biotechnologicky se EPS environmentálně využívá jako bio-flokulant, bio-adsorbent a při bioremediaci těžkých kovů. Při použití v medicíně bylo prokázáno, že EPS má anti-tumorové, anti-diabetické, imunomodulační a probiotické účinky. EPS z *B. circulans* má silné antioxidační a protizánětlivé účinky, a je tedy potenciálním kandidátem vývoj léčiv (Vidhyalakshmi *et al.* 2016). Další významné látky z *Bacillus circulans* jsou například algináza (Hansen, Doubet, a Ram' 1984), xylanáza (Wakarchuk *et al.* 2008) a alkalická *endo*-glukanáza (Hakamada *et al.* 2002).



Obr. 4: *Bacillus circulans* pod mikroskopem, barveno dle Grama, převzato z „*Microbe canvas*“. Na obrázku je patrná struktura buněk, jde o gramvariabilní tyčinky.

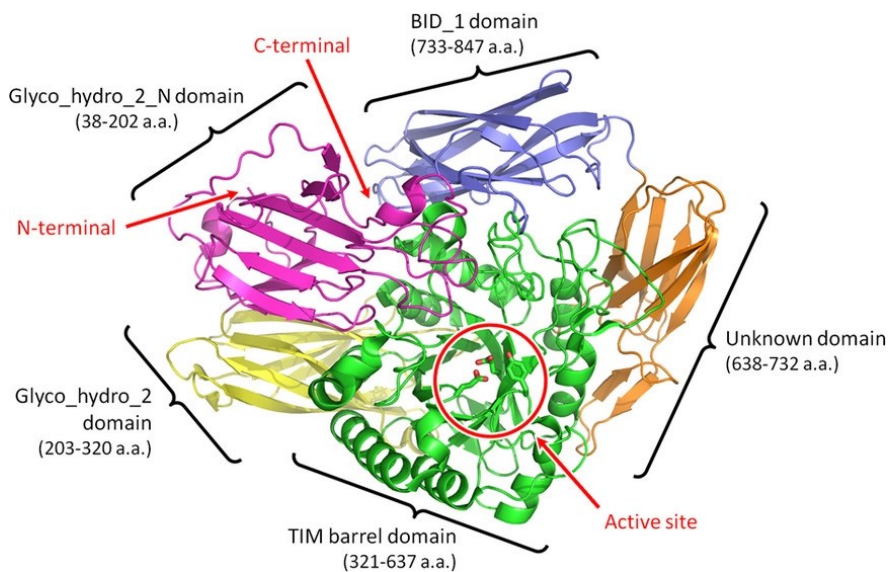
2.2.3. Galaktosidázy z *Bacillus circulans*

β -Galaktosidáza z *Bacillus circulans* je enzym patřící do skupiny glykosidhydroláz. β -Galaktosidáza, někdy také laktáza, je *exo*-glykosidáza, která katalyzuje štěpení galaktózových jednotek ze sacharidů nebo glykosidů. V lidském těle je důležitá zejména při metabolismu laktózy, kdy její nedostatek způsobuje laktózovou intoleranci.

Bacillus circulans produkuje různé typy β -galaktosidáz, které lze odlišit dle jejich regioselektivity. V komerčním přípravku enzymu β -galaktosidázy (BgaD) z *Bacillus circulans* AC 31382 (Biolacta[®], Daiwa Kasei, Shiga, Japonsko) byly nalezeny čtyři její izoformy – A (189,3 kDa), B (154,9 kDa), C (134,8 kDa) a D (91,6 kDa). Všechny tyto izoformy mají podobné vlastnosti, sekvence jejich N-koncového peptidu je shodná, ale jejich transglykosylační aktivita se liší. Bylo zjištěno, že vznikají posttranslačním štěpením endogenními proteázami od C-konce (Song, Abe, *et al.* 2011). Izoforma BgaD-D je schopná produkovat delší řetězce oligosacharidů a používá se na přípravu galaktooligosacharidů (GOS), které jsou důležitou součástí mateřského mléka a prebiotik. Produkty vzniklé syntézou pomocí rekombinantní BgaD-D jsou podobné jako složky produktu Vivinal[®] GOS (Van Leeuwen *et al.* 2014). BgaD-D je také zatím jediná izoforma β -galaktosidázy,

kteřá byla krystalizována (viz Obr. 5). Izoformy BgaD-A a BgaD-B jsou předmětem této diplomové práce.

Bacillus circulans dále produkuje β 3-galaktosidázu C (BgaC), která je schopna hydrolyzovat vazbu β -1,3 v galaktosidech mnohem lépe než vazbu β -1,4 nebo β -1,6 (Fujimoto *et al.* 1998). Enzym BgaC byl použit na syntézu cukerných nukleotidů (Kamerke *et al.* 2013). UDP-disacharidy s vazbou β -1,3 mohou být užitečné pro tvorbu či kontrolu syntézy komplexních oligosacharidů s biologickými funkcemi zahrnujícími např. buněčnou adhezi a progresi tumoru (Kamerke *et al.* 2013). Enzym BgaC byl pomocí racionálního designu mutován za cílem vytvořit glykosyntázu, tedy enzym bez hydrolytické aktivity s vysokým syntetickým potenciálem. Toho bylo dosaženo záměnou katalytického nukleofilu kyseliny glutamové za glycin (E233G). Takto připravená galaktosyntáza BgaC-E233G využívá jako donor α -galaktosyl fluorid a je schopná jedнокrokově syntetizovat oligosacharidy. Byla použita na syntézu disacharidů založených na *N*-acetylglukosaminu s různými typy linkerů (Henze *et al.* 2014).



Obr. 5: Krystalová struktura β -galaktosidázy z *Bacillus circulans* BgaD-D (PDB kód 4YPJ). Na obrázku jsou patrné domény enzymu a aktivní místo s navázaným substrátem. Převzato z (Ishikawa *et al.* 2015).

2.3. Mutageneze heterologně exprimovaných proteinů

2.3.1. Cílená mutageneze

Cílená mutageneze (angl. „*site-directed mutagenesis*“) je metoda molekulární biologie používaná k vytvoření specifických změn v sekvenci DNA za cílem přípravy genu s vylepšenými vlastnostmi. Využívá se také pro výzkum struktury a biologické aktivity DNA, RNA, proteinů a v proteinovém inženýrství při racionálním designu. Na cílenou mutagenezi se používají různé postupy, základní metodou je použití krátké komplementární DNA sekvence – primeru (Hutchison *et al.* 1978). Metoda PCR („*polymerase chain reaction*“) slouží ke snadnému zmnožení úseku DNA, vynalezl ji r. 1983 americký biochemik K. Mullis se svým týmem (Saiki *et al.* 1985) a učinili tak zásadní převrat v metodách molekulární biologie a genetiky. PCR probíhá ve třech krocích. Nejprve při teplotě 94-98 °C dochází k denuraci, přičemž dojde k rozvolnění dvoušroubovice DNA. Vzniká jednovláknová DNA, na kterou v dalším kroku nasedají primery („*annealing*“); teplota nasedání se pohybuje se mezi 50-65 °C. V posledním kroku (*elongace*) dochází k prodlužování řetězce, dojde k navázání DNA polymerázy a syntetizuje se komplementární vlákno od 5'-konce k 3'-konci. Teplota třetího kroku se volí podle teplotního optima dané DNA polymerázy (většinou 78-80 °C). Tyto kroky se cyklicky opakují, aby došlo k dostatečné amplifikaci původního templátu. Množství DNA s každým cyklem exponenciálně roste.

Jedna z dalších metod, vyvinutá r. 1985 vědcem T. A. Kunkelem, snižuje potřebu selekce mutantů. Její princip spočívá v inzerci DNA fragmentu, který má být mutován, do fazmidu, který je pak transformován do kmenu *E. coli* deficientního na dUTPázu (*dut*) a uracildeglykosidázu (*udg*) (Kunkel 1985). Tento mutantní kmen replikuje fágovou DNA a může špatně inkorporovat dUTP místo dTTP, což má za výsledek jednovláknovou DNA obsahující uracily (ssUDNA). Tato ssUDNA je z fága sekretována do media a je využita jako templát pro mutagenezi. Oligonukleotid zahrnující požadovanou mutaci je použit k prodloužení primeru. Heteroduplex DNA složený z původního templátu s dUTP a mutantního vlákna s dTTP je transformován do WT kmenu *E. coli*. DNA templát obsahující uracil je degradován a výsledkem je pouze mutovaná DNA. Kunkelova metoda byla použita např. ke konstrukci proteinové knihovny fágové displeje („*phage-display*“) (Fellouse *et al.* 2007), (Huang, Fang, a Kay 2012) a knihovny lidských jedno-doménových protilátek (Rouet, Dudgeon, a Christ 2012).

Metoda, která nevyužívá prodloužení primeru pomocí DNA polymerázy, je kazetová mutageneze (Wells, Vasser, a Powers 1985). Její princip spočívá v syntéze fragmentu DNA a inserci do plazmidu. Plazmid je na konkrétním místě rozštěpen pomocí restričních endonukleáz a následně je provedena ligace páru komplementárních oligonukleotidů zahrnujících požadovanou mutaci do vektoru. Tato metoda je schopná generovat mutanty téměř se 100% účinností, ale je limitována dostupností vhodných restričních míst obklopující místo požadované mutace. Kazetová metoda mutageneze byla využita např. k mutaci reverzní transkriptázy z HIV typu 1 (Boyer, Ferris, and Hughes 1992), k identifikaci genů potřebných pro přirozenou transformaci *Haemophilus influenzae* (Dougherty and Smith 1999) a k analýze efektů mutací cytochromu P450 (Straub *et al.* 1993).

2.3.2. Řízená evoluce

Termín řízená evoluce (angl. *directed evolution*) se používá pro označení metody využívající mutagenezi jako nástroj v proteinovém inženýrství ke zlepšení vlastností proteinů a také k evolučním studiím v uměle vytvořeném prostředí. Metoda může být provedena přímo v živém organismu nebo *in vitro* v buňkách či volně v roztoku. Při řízené evoluci je *in vitro* rekombinací vytvořena knihovna mutantů a následuje vysoce výkonný screening (angl. *high-throughput screening*) nebo selekce variant s požadovanými vlastnostmi a amplifikace daného genu (Lutz 2010).

Gen může být mutován náhodnými bodovými mutacemi pomocí chemických mutagenů nebo chybové PCR (epPCR z angl. *error prone*) a insercemi či delecemi. Pomocí chybové PCR mohou být náhodné mutace inzerovány do kterékoli části DNA. Při epPCR se volí podmínky tak, aby DNA polymeráza tvořila chyby v párování bází při syntéze nového vlákna DNA. Takto může být vytvořena knihovna náhodných mutací daného genu (McCullum *et al.* 2010). Pro rekombinaci mutovaných genů se využívá např. tzv. míchání DNA (angl. *DNA shuffling*) – zkombinování nezávisle izolovaných genových mutací do jednoho genu, tvorba chimér (RACHITT – *random chimeragenesis on transient templates*), hybridních enzymů (ITCHY – *iterative truncation for the creation of hybrid enzymes*) a další metody (Sen, Venkata Dasu, a Maal 2007). V dalším kroku je provedena detekce mutantů s vysokou aktivitou a vylepšenými vlastnostmi. V této fázi se využívá buď metoda selekce založená na vazebné aktivitě vytvořených variant na pevný povrch nebo screening, při kterém jsou jednotlivé varianty genů exprimovány a je měřena jejich aktivita. Tento tradiční postup má mnohá úskalí, zejména náročné testování milionů variant, proto se mnoho vědců

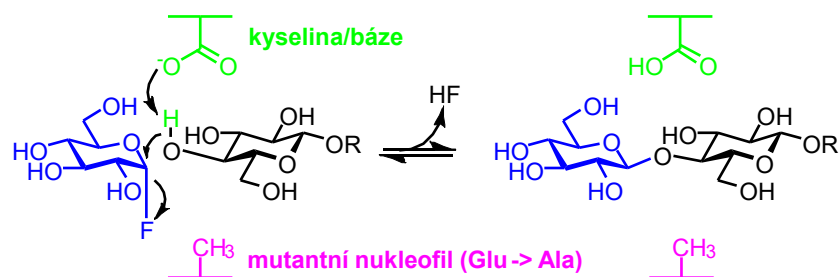
zaměřuje spíše na tvorbu menších kvalitnějších proteinových knihoven pomocí nových strategií. V takovém případě jde o semi-rationální vývoj, který využívá znalost sekvence proteinů a předpovídající algoritmy na pre-selekcii vhodných cílových míst a limitaci diversity aminokyselin pro proteinové inženýrství (Lutz 2010).

Řízená evoluce byl použit např. na zlepšení selektivity a kinetických vlastností lipázy z *Pseudomonas aeruginosa*, kdy byla nejdříve vytvořena generace mutantů pomocí eqPCR, následně byla identifikována žádoucí místa a prodloužení sekvence pomocí kombinatorní kazetové mutagenese. Tento postup se dá aplikovat na řízený vývoj dalších enantioselektivních enzymů a může být užitečný také pro vylepšení dalších vlastností enzymů (Reetz *et al.* 2001).

2.3.3. Mutantní glykosidázy se zvýšeným syntetickým potenciálem

Glykosyntázy jsou mutantní glykosidhydrolázy nesoucí bodovou mutaci v aktivním místě. Díky této mutaci je zrušena jejich hydrolytická aktivita, čímž je dosaženo mnohem vyšších syntetických výtěžků. Jde o velkou skupinu mutantních glykosidhydroláz. Lze je připravit např. cílenou mutagenézí nebo řízenou evolucí. Glykosyntázy byly vytvořeny s cílem zlepšit syntetický účinek glykosidáz. Přirozené glykosidázy (WT, z angl. *wild type* – divoký typ) jsou za vhodných podmínek sice schopny syntetizovat, avšak dochází k částečné hydrolyze vznikajícího produktu. Glykosyntázy mají naproti tomu zrušenou hydrolytickou aktivitu, čímž je dosaženo mnohem vyšších výtěžků. Objev glykosyntáz v roce 1998 (Mackenzie *et al.* 1998), (Malet a Planas 1998) způsobil revoluci v enzymové syntéze oligosacharidů.

Na hydrolyze glykosidové vazby působením glykosidáz se podílejí dva aminokyselinové zbytky v katalytickém centru enzymu, jeden nukleofilní a druhý acidobazický. Záměna aminokyselinové nukleofilní skupiny za „ne-nukleofilní“ vede ke správně sbalenému enzymu, který je však katalyticky neaktivní, protože nemůže vytvářet glykosyl-enzymový intermediát (Wang *et al.* 1994). Jelikož je zbytek aktivního centra nezměněn, může být katalyzována ligace aktivovaného substrátu s opačnou anomerní konfigurací, než má přirozený substrát glykosidáz, na vhodnou akceptorovou molekulu. Donorem β -glykosyntáz může být např. α -glykosyl fluorid a akceptorem glukosid s aromatickou skupinou (Mackenzie *et al.* 1998). Glykosyntázy využívají mechanismus katalýzy podobného typu jako invertující glykosidázy, tedy přeměňují substrát v jednom kroku, a dochází tak ke změně anomerní konfigurace na opačnou (znázorněno na Obr. 6).



Obr. 6: Mechanismus katalýzy pomocí glykosyntáz (podobný invertující glykosidázám). Obrázek byl vytvořen v programu ChemDraw Professional 16.0.

Pro přípravu glykosyntázy byla využita například metoda řízené evoluce. Byla vyvinuta metoda chemické komplementace, „*complementation assay*“, využívající kvasinkový tří-hybridní systém k propojení enzymové katalýzy k transkriptu reportérového genu *in vivo*. Pomocí této metody byla připravena saturační knihovna mutantů endoglukanázy Cel7B, která katalyzuje hydrolýzu β -1,4 glykosidových vazeb celulózy. Mutace v pozici E197A vedla k přípravě glykosyntázy, která může být použita na syntézu oligosacharidů v preparativním měřítku (Lin, Tao, a Cornish 2004).

Dalším typem mutantních glykosidáz vytvořených cílenou mutagenezí jsou thioglykoligázy a thioglykosyntázy. Používají se k syntéze thioglykosidů, kde je glykosidový atom kyslíku zaměněn za atom síry. Tyto sloučeniny jsou cennými analogy *O*-glykosidů a kompetitivními inhibitory některých enzymů, jako např. celulózy (Schou *et al.* 1993). Thioglykoligázy byly vytvořeny mutací acidobazického aminokyselinového zbytku v katalytickém centru glykosidázy. Donorem thioglykoligáz musí být aktivovaný glykosid (např. s dinitrofenylovou skupinou). Při reakci dojde k vytvoření glykosyl-enzymového intermediátu a v dalším kroku k tvorbě glykosidové vazby (obdobně jako invertující glykosidázy, viz Obr. 2). Aby reakce probíhala dostatečně rychle, je nutné zvolit silně nukleofilní akceptor, kterým je právě thioglykosid (Jahn *et al.* 2003). Thioglykosyntázy jsou dvojitě mutované glykosidázy, u kterých chybí katalytický nukleofil i acidobazický aminokyselinový zbytek v aktivním centru. Thioglykosyntázy jsou účinné pro syntézu thioglykosidů z glykosyl-fluoridového donoru a thiosacharidů jako akceptorů (Jahn *et al.* 2004).

2.4. Bioaktivní galaktosidy

2.4.1. Enzymová galaktosylace

β -Galaktosidáza se průmyslově i laboratorně využívá k enzymové galaktosylaci sacharidových akceptorů. Jedná se o navázání galaktosylu z donorové molekuly přes kyslíkový poloacetál na akceptorovou molekulu za katalýzy enzymem galaktosidázou. β -Galaktosidáza hydrolyzuje glykosidovou vazbu donoru, odštěpí galaktózu a přes galaktosyl-enzymový intermediát ji naváže na akceptor. Podle regioselectivity dané galaktosidázy vznikají různé regioizomery galaktosidů s glykosidovou vazbou β -1,6 β -1,3 nebo β -1,4. Galaktosylace se komerčně využívá např. pro přípravu galaktooligosacharidů, které se přidávají do instantního mléka pro kojence (přípravek Vivinal[®] GOS). Často se využívají mikrobiální galaktosidázy; např. β -galaktosidáza z *Bacillus circulans* BgaD se využívá právě na syntézu galaktooligosacharidů.

Galaktosylace se také uplatňuje při posttranslačních úpravách proteinů *in vivo*. Důležitá je například galaktosylace při přípravě rekombinantních imunoglobulinů IgG (rIgG), které slouží jako bioterapeutika k léčbě různých lidských onemocnění (Shantha Raju a Jordan 2012). Schéma terminální galaktosylace IgG může mít efekt na mechanismus aktivity některých terapeutických protilátek (např. efektorových drah). Terminální galaktosylace neukazuje žádný efekt na vazbu antigenu, ale změny v galaktosylaci mohou tvořit znatelné změny v cytotoxicitě závislé na komplementu některých rIgG. Rituxumab (Rituxan[®]), poprvé schválen r. 1997, je chimérická monoklonální protilátka produkovaná v buňkách morčecích vaječníků používaná k léčbě non-Hodgkinova lymfomu a jiných onemocněních spojených s B-buňkami. Heterogenita glykosylace Rituxanu je dána hlavně variabilitou terminálních galaktózových zbytků. Terminálních galaktózové jednotky Rituxanu mají efekt na vazbu komplementu C1q (Hodoniczky, Yuan, a James 2005). Metoda specifické galaktosylace rIgG může být aplikovatelná na vývoj různých rekombinantních protilátek vylepšených oproti přirozeným.

2.4.2. Sacharidy mateřského mléka a krevních skupin

Oligosacharidy mateřského mléka (HMO – angl. *human milk oligosaccharides*) jsou látky hojně zastoupeny v lidském mléce; po laktóze a tucích tvoří jeho třetí největší pevnou složku. Tyto oligosacharidy plní bioaktivní funkci mléka a hrají významnou roli při vývoji imunitního systému dítěte, ale nevyskytují se v instantních přípravcích. Již v 19. století bylo

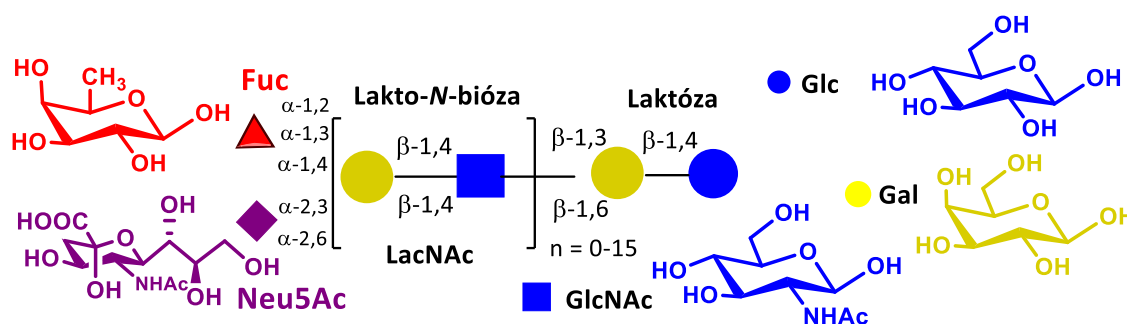
zpozorováno, že novorozenci krmení mateřským mlékem měli mnohem vyšší šanci na přežití a méně často trpěli na infekce než novorozenci krmení mlékem z lahve (Bode 2012). Později bylo zjištěno, že syrovátková část lidského mléka obsahuje růst podporující faktor pro *Lactobacillum bifidus* (později klasifikován jako *Bifidobacterium bifidus*) (Schönfeld 1926). Poté bylo potvrzeno, že tento „bifidus faktor“ se skládá z různých oligosacharidů. To bylo převratným zjištěním při objevu a výzkumu oligosacharidů mateřského mléka.

Oligosacharidy mateřského mléka jsou různých typů a plní širokou škálu funkcí, všechny však mají stejné základní strukturní schéma (znázorněno na Obr. 7). Stavební jednotky tvoří pět monosacharidů – glukóza, galaktóza, *N*-acetylglukosamin, fukóza a *N*-acetylneuraminová kyselina. Všechny HMO mají na svém redukujícím konci laktózu, která může být fukosylována (35-50 %) nebo sialylována (12-14 %). Tyto základní sacharidy tradičně obsažené v HMO mohou být na neredukujícím konci laktózy prodlouženy a větveny lakto-*N*-biózou I (Gal- β 1,3-GlcNAc) nebo *N*-acetylaktosaminem (Gal- β 1,4-GlcNAc) připojenými β -1,3 nebo β -1,6 glykosidovou vazbou. Bylo identifikováno více než sto strukturně odlišných HMO, které jsou odvozeny od tohoto základního schématu a nesou různé potencionálně bioaktivní glykanové epitopy (Bode a Jantscher-Krenn 2012).

HMO plní funkci prebiotik, tedy pro člověka nestravitelných látek, které stimulují růst a aktivitu zdravích prospěšných bakterií – probiotických kultur. Nejpoužívanějšími probiotiky v komerčních přípravcích jsou laktobacily a bifidobakterie. Mnoho *in vitro* studií ukázalo, že právě bifidobakterie jsou schopny růst na HMO jako substrátu (Jantscher-Krenn a Bode 2012). HMO jsou zásadním faktorem pro správné složení střevní mikrobioty a vývoji imunitního systému novorozence. Důkazem je vyšší výskyt bifidobakterií u novorozenců krmených mateřským mlékem než instantním (Collado *et al.* 2012). HMO mají řadu pozitivních účinků na organismus novorozenců. Fungují jako obrana před infekcí (Bode a Jantscher-Krenn 2012), jako signální molekuly (Jantscher-Krenn a Bode 2012), imunomodulátory stimulující produkci cytokinů a aktivaci T-buněk (Eiwegger *et al.* 2004) a jako nutrienty pro neurologický vývoj.

Komerční přípravky novorozeneckého mléka jsou založeny na kravském mléku a obsahují minimální množství komplexních oligosacharidů. Přípravky jsou doplňovány enzymaticky produkovanými nebo rostlinnými oligosacharidy obsahujícími galaktooligosacharidy (GOS) a fruktooligosacharidy (FOS). GOS jsou syntetizovány připojením jedné až sedmi jednotek galaktózy na neredukující konec laktózy. K tomuto účelu se využívá β -galaktosidáza z *Bacillus circulans* izoforma D (BgaD-D). FOS jsou

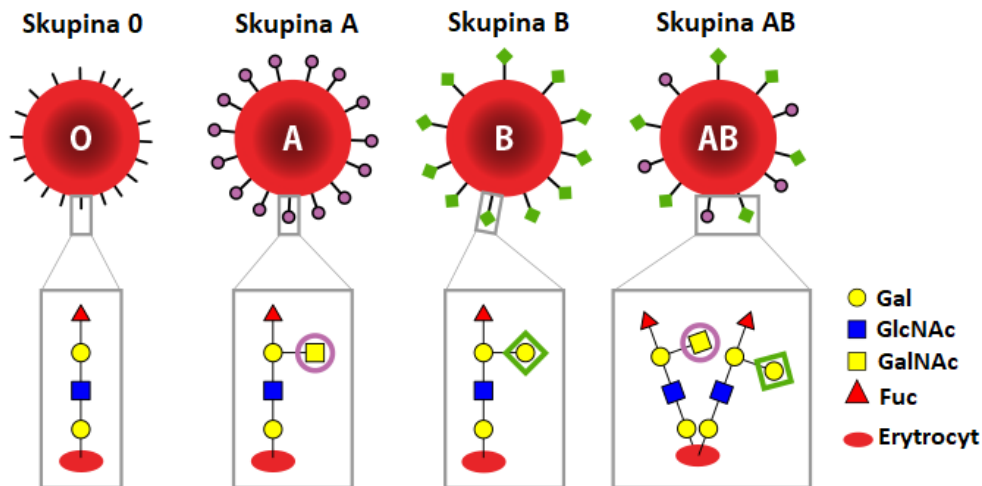
krátké řetězce oligomerů složených z fruktózových jednotek vázaných β -1,2 vazbou na redukující konec glukózy. Dále mohou být do komerčních přípravků přidávány kyselé oligosacharidy odvozené od pektinu (pAOS – „*pektin-derived acidic oligosaccharides*“) vzniklé hydrolyzou polymerů kyseliny galakturonové. Oligosacharidy GOS, FOS a pAOS mohou mít probiotický efekt podobný jako HMO (Jantscher-Krenn a Bode 2012).



Obr. 7: Strukturální schéma oligosacharidů mateřského mléka. Glukóza (Glc), galaktóza (Gal), *N*-acetylglukosamin (GlcNAc), fukóza a *N*-acetylneuramová kyselina (Neu5Ac) jsou stavebními jednotkami HMO. Vytvořeno v programu ChemDraw Professional 16.0.

Další skupinou bioaktivních galaktosidů jsou lidské krevní skupiny. Rozdělení do krevních skupin popisuje vlastnosti červených krvinek daného jedince, resp. antigenů na jejich membráně. Jako antigeny se uplatňují proteiny, sacharidy, glykoproteiny a glykolipidy. Nejdůležitější systém krevních skupin je systém AB0 a Rh faktor.

AB0 systém byl objeven r. 1901 Karlem Landsteinerem. V tomto systému se krevní skupiny dělí podle typu navázaného antigenu a působící protilátky. Skupina A – antigen A a protilátka anti-B, skupina B – antigen B a protilátka anti-A, skupina AB – antigeny A i B a žádné protilátky, skupina 0 – žádný antigen a protilátky anti-A i anti-B (Dean L. 2005a). Je velmi důležité, aby krev příjemce při transfuzi neměla protilátky proti antigenu dárce, jinak může dojít k hemolytické reakci. Krevní skupiny se liší strukturou oligosacharidu daného antigenu. Oba antigeny mají stejný strukturální základ a liší se větveným sacharidem. Schéma krevních skupin dle systému AB0 je znázorněno na Obr. 8.



Obr. 8: Krevní skupiny dle systému AB0. Převzato a upraveno z (“*Glycans a Cells*, GlyTech, Inc.” n.d.).

Druhý významný systém krevních skupin je Rhesus faktor (Rh), který byl poprvé popsán K. Landsteinerem a A. Wienerem roku 1940. Rh faktor je tvořen skupinou zhruba padesáti antigenů, z nichž nejsilnější je antigen D; tento antigen nejpravděpodobněji vyvolává odezvu imunitního systému. Podle jeho přítomnosti se krev označuje jako Rh⁺ (obsahuje antigen D) nebo Rh⁻ (neobsahuje antigen D). Systém Rh faktoru je nejčastěji spojen se systémem AB0, např. krevní skupina A⁻ (bez antigenu D). I z hlediska Rh faktoru je nutná kompatibilita dárce a příjemce krve (Dean L. 2005). Reakce na přítomnost antigenu D je nejčastější příčinou hemolytické anémie u novorozenců.

2.4.3. Galektiny – proteiny vážící β -galaktosidy

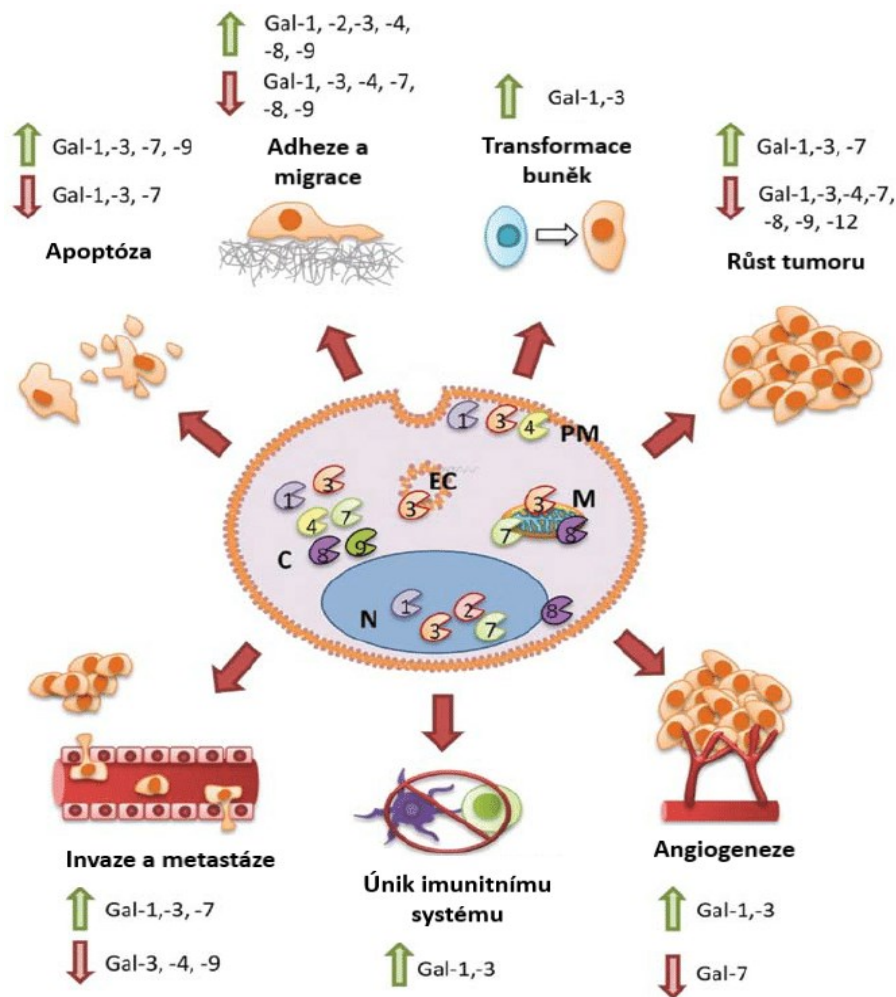
Galektiny jsou proteiny patřící do skupiny lektinů, které jsou schopné specificky rozpoznávat a vázat glykany v živočišných tkáních (Barondes *et al.* 1994). Galektiny jsou lokalizovány v jádře, v cytosolu, na povrchu buněk nebo v extracelulární matrix. Galektiny jsou charakteristické vazbou terminálních β -galaktosidů (odtud název galektiny – galaktóza), při čemž využívají vysoce konzervovanou doménu rozpoznávající sacharidy (CRD – „*carbohydrate recognition domain*“) skládající se přibližně ze 130 aminokyselin (Liu a Rabinovich 2005).

Galektiny tvoří skupinu asi patnácti proteinů a můžeme je rozdělit do tří skupin podle struktury na prototypické, tandemové a chimerické. Prototypické galektiny jsou homodimery skládající se ze dvou identických CRD domén spojených nekovalentně elektrostatickou interakcí. Patří mezi ně galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 a -15.

Tandemové galektiny obsahují dvě různé CRD domény spojené peptidovým linkerem o různé délce. Mezi tandemové galektiny patří galektin-4, -6, -8, -9 a -12 (Yang, Rabinovich, a Liu 2008). Poslední skupinou jsou chimerické galektiny, které mají jediného zástupce – galektin-3. Galektin-3 se při nízké koncentraci vyskytuje jako monomer a při vysoké koncentraci je schopný tvořit multivalentní oligomery.

Díky své rozmanitosti a multivalentní vazbě ligandů se galektiny účastní mnoha fyziologických procesů v lidském organismu. Důležitou funkcí galektinů je buněčná adheze. Na buněčné adhezi se podílí například galektin-8, který se specificky váže na integrin, a má tak přímou roli kromě adheze také pro aktivaci signalizační kaskády specifické na integrin (Zick *et al.* 2002). Další neméně důležitou funkcí galektinů je vliv na apoptózu. Galektiny se podílejí na buněčném růstu a proliferaci. Galektin-1 indukuje apoptózu T-buněk během jejich vývoje v thymu a po imunní stimulaci v periférii (Perillo *et al.* 1995). Další proapoptotický účinek mají galektiny -9, -7 a -12. Jediný galektin-3 má i anti-apoptotický účinek. Galektin-3 chrání buňky lidského karcinomu prsu před *cis*-platinou a oxidem dusíku a brání buněčné smrti vyvolané ztrátou buněčného zakotvení (anoikis) (Mueller *et al.* 1997). Galektiny se díky svým funkcím podílejí na mnoha patologických procesech, zejména na vývoji rakoviny, srdečního selhání, infekčních procesech (např. infekce HIV) a dalších autoimunitních a zánětlivých onemocněních. Funkce galektinů produkovaných v rakovinných buňkách jsou znázorněny na Obr. 9.

Galektiny hrají důležitou roli při progresi a tvorbě metastáz různých typů rakovin. Galektin-1 hraje také důležitou roli při vývoji rakoviny plic. Umlčení genu galektinu-1 snižuje invazi a migraci buněk rakoviny plic a také zvyšuje citlivost k chemoterapii (Hsu *et al.* 2013). Navíc snížení exprese galektinu-1 vede k redukci jak růstu tumoru, tak počtu metastáz v plicích (Dalotto-Moreno *et al.* 2013). Galektin-3 se váže na povrch rakovinných buněk a podílí se na vývoji metastáz a apoptóze aktivovaných T-buněk, což umožňuje rakovinným buňkám uniknout před imunitním systémem (Simone *et al.* 2014). Galektin-1, -3, -4 a -8 hrají roli při progresi mozkových gliomů. Snížení exprese galektinu-1 zapříčinilo snížení infiltrace mozku myeloidními buňkami a prodloužení života subjektu (Verschuere *et al.* 2014). Galektin-3 je exprimován v neoplastických astrocytech i v mikroglíích maligního gliomu a může být aktivován v makrofázích při progresi onemocnění (Binh *et al.* 2013). Dále se galektiny účastní progresu rakoviny střev, slinivky, kůže, prostaty a rakoviny endokrinního systému.



Obr. 9: Funkce galektinů při kancerogenezi. Galektiny se vyskytují v jádru (N), mitochondriích (M), endozomálních kompartmentech (EC), v cytoplasmě (C) a v plazmatické membráně (PM). Galektiny ovlivňují apoptózu, adhezi a migraci buněk, transformaci buněk, růst tumoru, angiogenezi, únik imunitnímu systému, invazi a tvorbu metastáz. Převzato a upraveno z (Vladoiu, Labrie, a St-Pierre 2014).

Galektiny, zejména galektin-1 a galektin-3, se kromě rakoviny zapojují do vývoje dalších onemocnění, jako jsou srdeční selhání, ateroskleróza, plicní fibróza, retinopatie, nefropatie, diabetes a obezita. Galektin-1 je nadprodukován ve fibrotické jaterní tkáni, stimuluje proliferaci fibrotických buněk, a hraje tak důležitou roli při samotném vývoji fibrózy. Modulace interakcí mezi galektinem-1 a glykany může být základem pro efektivní terapii jaterní fibrózy (Bacigalupo *et al.* 2013). Galektin-3 hraje zásadní roli při tvorbě fibrózy jater, cév, ledvin, srdce a plic (Li, Li, a Gao 2014). Galektin-3 se účastní i kardiovaskulární fibrózy, a podílí se tak na srdečním selhání. Inhibicí galektinu-3 *N*-acetyllaktosaminem došlo ke snížení produkci kolagenu a tím utlumení srdeční fibrózy (Yu *et al.* 2013). Galektin-3 se využívá také jako biomarker v extracelulární srdeční matrix a byl asociován s úmrtím nebo hospitalizací pacientů při srdečním selhání (Lopez-Arès N *et al.* 2012).

3. Cíle práce

Cílem práce je připravit rekombinantní β -galaktosidázu z *Bacillus circulans* a alespoň jednu její kratší izoenzymovou variantu, prostudovat vlastnosti a využitelnost připravených enzymů pro syntézu funkcionalizovaných sacharidových epitopů odvozených od *N*-acetyllaktosaminu (LacNAc) a u jednoho vybraného enzymu provést cílenou mutagenézi na základě molekulárního modelování za účelem zvýšení výtěžku syntetické reakce.

Dílčí cíle práce:

- exprimovat syntetický gen β -galaktosidázy z *Bacillus circulans* v *E. coli* a optimalizovat produkci enzymu
- stanovit biochemické parametry enzymu, substrátovou specifitu, regioselektivitu a syntetický potenciál
- připravit gen alespoň jedné zkrácené varianty β -galaktosidázy pomocí PCR a provést jeho ligaci do expresního vektoru
- exprimovat připravený gen zkrácené varianty v *E. coli* a optimalizovat produkci enzymu
- navrhnout bodové mutace pro zvýšení syntetického výtěžku a/ nebo snížení hydrolytické aktivity enzymu na základě molekulárního modelování (spolupráce s Dr. Kulik, MBÚ Nové Hradky)
- připravit a charakterizovat alespoň jednu mutantní variantu β -galaktosidázy

4. Materiál a metody

4.1. Použitý materiál

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

Agar (Sigma-Aldrich, USA)

Akrylamid (VWR Chemicals, Česká republika)

Ampicilin – *Ampicilin Na-salt* (Serva Electrophoresis GmbH)

Biotin (Fluka BioChemika, Švýcarsko)

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

Bromfenolová modř (Serva, Německo)

Coomassie Brilliant Blue (USB Corporation, USA)

D-glukosa (Lach-Ner, Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Etylendiamintetraoctová kyselina (Carl Roth, Německo)

Etanol (VWR Chemicals, Česká republika)

Escherichia coli Top10 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Escherichia coli BL21-Gold (DE3)

Extrakt z kvasnic (Oxoid, Česká republika)

GelRed (Biotium, USA)

GlcNAc (Acros Organics, USA)

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)

Chlorid sodný (VWR Chemicals, Česká republika)

Isopropylthiodigalaktosid (Sigma-Aldrich, USA)
Kapalný dusík (Maneko, Česká republika)
Kyselina octová (VWR Chemicals, Česká republika)
Kyselina sírová (VWR Chemicals, Česká republika)
Molekulový marker – *Amersham HMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (GE Healthcare, Velká Británie)
Hydroxid amonný (Lach-Ner, Česká republika)
Mravenčan sodný (Erba Lachema, Česká republika)
*p*NP-Gal (Senn Chemicals, Švýcarsko)
Primery BgaD-A (GENERI BIOTECH s.r.o., Česká republika)
Propan-2-ol (VWR Chemicals, Česká republika)
SDS (Serva, Německo)
Syntetický plazmid obsahující gen *bgaD-A* v expresním vektoru pCOLD II DNA (Generay, Čína)
TEMED (Sigma-Aldrich, USA)
Tris-Cl (Sigma-Aldrich, USA)
Trypton (Oxoid, Česká republika)
Uhličitan sodný (Erba Lachema, Česká republika)

4.2. Roztoky a média

LB (Luria-Bertani) médium (1 l) – 10 g trypton; 5 g kvasničný extrakt; 10 g NaCl

LBA médium (1 l) – 10 g trypton; 5 g kvasničný extrakt; 10 g NaCl; 20 g agarosa

Acetátový pufr pH 5,0 – 0,1 M kyselina octová, 0,2 M octan sodný

Sørensenův pufr pH 6,0 – 50 mM NaH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄, pH 6,0 – poměr složek 7/1

Ekvilibrační pufr pH 7,4 – 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Na₂HPO₄, pH 7,4 – poměr složek 1/ 4

Eluční pufr pH 7,4 – 100 mM imidazol, 500 mM NaCl, 20 mM Sörensenův pufr pH 7,4

Dialyzační pufr – 50 mM Sörensenův pufr pH 6,0

Separační 5% polyakrylamidový gel (10 ml) – 4,0 ml H₂O; 3,3 ml 30% akrylamidový mix (29% akrylamid, 1% *N,N'*-metylenbisakrylamid); 2,5 ml 1,5M Tris-Cl pH 8,8; 100 µl 5% SDS; 100 µl 10% peroxosíran amonný; 4 µl TEMED

Zaostřovací gel (5 ml) – 3,4 ml H₂O; 830 µl 30% akrylamidový mix (29% akrylamid, 1% *N,N'*-metylenbisakrylamid); 630 µl 1,0M Tris-Cl pH 6,8; 50 µl 5% 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 H₂O; 10 ml 99% kyselina octová

Odbarvovací roztok (1 l) – 350 ml ethanol; 100 ml kyselina octová; 550 ml H₂O

1% agarózový gel (100 ml) – 1 g agaróza; 2 ml 50× TAE pufr; 98 ml H₂O

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

Britton-Robinsonův pufr rozsah pH 2-12 – Roztok A: 0,04 M kyselina fosforečná, 0,04 M kyselina fenyloctová, 0,04 M kyselina boritá; Roztok B: 0,2 M hydroxid sodný

Vyvíjecí fáze na TLC (500 ml) – 350 ml propan-2-ol; 100 ml H₂O; 50 ml NH₄OH

4.3. Použité komerční sety

High Pure Plasmid Isolation Mini Kit (Roche, Švýcarsko)

Genopure Plasmid Midi Kit (Roche, Švýcarsko)

JETquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed, USA)

QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA)

Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (ThermoScientific, USA)

4.4. Použité přístroje

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+ (Thermo Scientific, USA)

Fotoaparát na gely: MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging systems, Izrael)

HPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko)

Chromatografické kolony: Bio-Gel P2, 45 μm \times 1000 mm \times 26 mm (Bio-Rad, USA), HisTrap HP Sepharose (GE Healthcare, Velká Británie)

Laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie)

Lyofilizátor Lyovac GT2 (Leybold GmbH, Německo)

Magnetická míchačka AREX (VELP Scientifica, Itálie)

PCR termocykler: Termocykler TPersonal 20 (Biometra, Německo)

pH metr: pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, Česká republika)

Sběrač frakcí pro gelovou chromatografií: Pump P-1 (Pharmacia Biotech, USA)

Sonikátor UP50 H UltraSonic Processor (Ultrasound Technologies, Velká Británie)

Spektrofotometr: Sunrise Tecan (Tecan, Švýcarsko)

Stříkačkové filtry Millipore Millex GP0,22 μm a 0,8 μm (Merck, 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)

UV/VIS spektrofotometr: UVmini-1240 (Shimadzu, Německo)

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

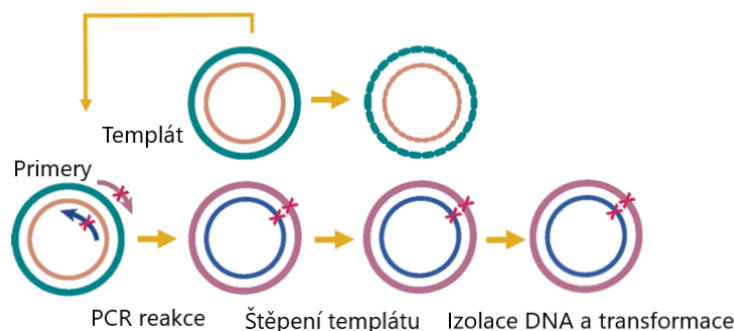
Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)

4.5. Cílená mutageneze β -galaktosidázy z *Bacillus circulans*

4.5.1. Příprava mutantní varianty BgaD-A-E532G

Metoda PCR byla použita pro cílenou mutagenezi komerčně připraveného genu β -galaktosidázy z *Bacillus circulans bgaD-A-WT* (5214 bp; Generay, Čína). Mutageneze byla provedena s cílem snížit hydrolytickou aktivitu enzymu. Byla provedena mutace v poloze E532, kdy katalytický nukleofil kyselina glutamová byla zaměněna za glycin. Pro mutagenezi byl použit komerční set „*Quick Change Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit*“ od firmy Agilent Technologies. Postup mutageneze je znázorněn na Obr. 10. Jako templát byl použit izolovaný gen *bgaD-A-WT* v expresním vektoru pCold II, kde bylo nutné mutovat triplet GAG v pozici 1595 na GGG. Dva oligonukleotidové primery s vnesenou mutací byly navrženy podle návodu ke komerčnímu setu a syntetizovány firmou Generi Biotech (tučně mutace GGG):

- BgaD-A-E532G_Fw: 5' - TGT ACG GCT CGG **GGA** CGT CCT CGG C - 3'
- BgaD-A-E532G_Re: 5' - GCC GAG GAC GTC **CCC** GAG CCG TAC A - 3'



Obr. 10: Schéma mutageneze pro přípravu mutantní varianty β -galaktosidázy BgaD-E532G. Převzato a upraveno z návodu od Agilent Technologies.

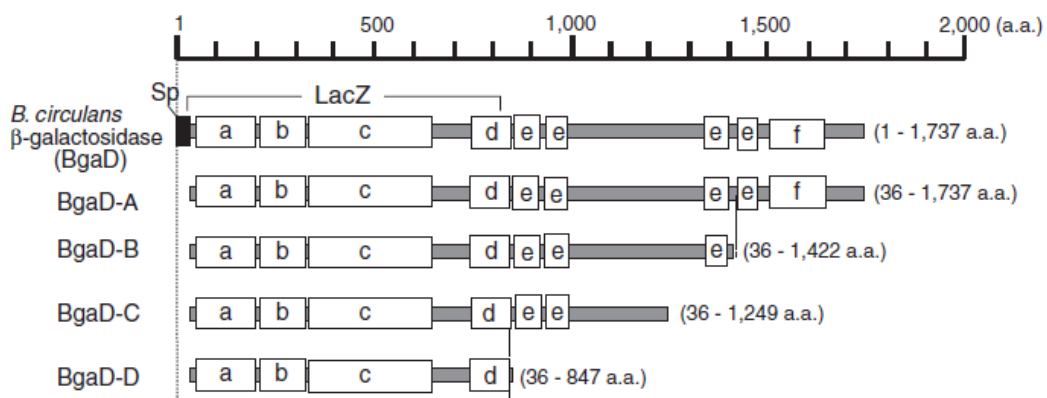
Do tenkostěnných mikrozkušavek o objemu 0,5 ml bylo pipetováno 5 μ l reakčního pufru, 0,5 μ l templátu (100 ng), 0,1 μ l (125 ng) Fw primeru a 0,1 μ l (125 ng) Re primeru, 1 μ l směsi deoxynukleotidů (dNTP), 1,5 μ l „*QuickSolution reagent*“ a 40,8 μ l sterilní vody. Nakonec byl přidán 1 μ l DNA polymerázy z *Pyrococcus furiosus* (*PfuUltra high-fidelity*) a reakční směs ve zkumavce byla umístěna do PCR cykleru, který byl nastaven na 95 °C na 2 min pro iniciační denaturaci, 18 cyklů – 95 °C na 20 s (denaturace), 62 °C na 10 s (nasednutí primerů), 68 °C na 5 min (elongace, 30 s/ kbp délky plazmidu) a 68 °C na 5 min pro finální elongaci. Po doběhnutí PCR byly k reakční směsi přidány 2 μ l restriční

endonukleázy *DpnI* (nukleáza z *Diplococcus pneumoniae*), která rozštěpila původní vlákno DNA, jež je na rozdíl od vzniklého PCR produktu methylované. Směs byla krátce centrifugována a inkubována 5 min při 37 °C a 300 ot./min.

Poté byla provedena agarózová elektroforéza a izolace DNA z gelu. Do reakční PCR směsi bylo přidáno 6 µl 6× *DNA Loading Dye* a 1 µl 20× *GelRed* pro zviditelnění DNA proužků v gelu. Jako referenční vzorek bylo použito 0,5 µl plazmidu *bgaD-A-WT*, doplněno 4,5 µl vody, 1 µl 6× *DNA Loading Dye* a 1 µl 20× *GelRed*. Vzorky byly separovány v 1% agarózovém gelu v pufru 1× TAE. Proužek DNA odpovídající referenčnímu vzorku byl z gelu vyříznut a DNA z něj byla izolována pomocí komerčního setu *JETquick Gel Extraction Spin Kit*. Gel byl rozpouštěn v roztoku L1 („*Gel Solubilization Buffer*“) při 50 °C po dobu 15 minut. Vzniklý roztok byl nanesen na kolonku vloženou do zkumavky a centrifugován 1 min při 13 500 ot./min a obsah zkumavky byl odstraněn. Dále bylo na kolonku s navázanou DNA přidáno 500 µl roztoku L2 („*Wash Buffer*“) a centrifugováno 1 min při 13 500 ot./min, obsah zkumavky byl opět vyliť a kolonka byla centrifugována naprázdno. Kolonka byla vložena do sterilní mikrozkušavky a DNA byla uvolněna přidáním 30 µl sterilní vody přehřáté na 65 °C (pro lepší eluci a vyšší výtěžek).

4.5.2. Příprava zkrácené varianty BgaD-B

Metoda PCR byla použita také pro přípravu zkrácené varianty β-galaktosidázy BgaD-B. Izoforma BgaD-B se liší od izoformy BgaD-A délkou sekvence; je kratší o 315 aminokyselinových zbytků, tedy o 945 bp (porovnání sekvencí na Obr. 11).



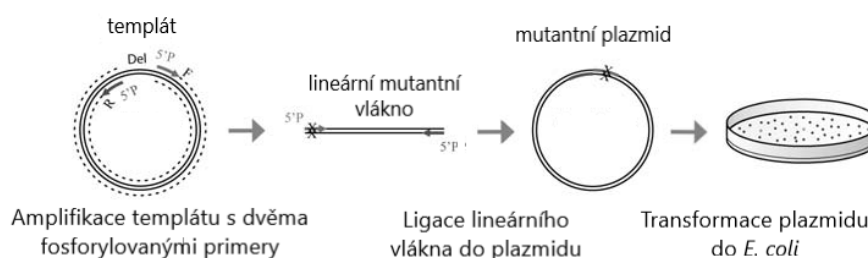
Obr. 11: Porovnání sekvencí jednotlivých izoform β-galaktosidázy z *B. circulans*. Sp – signální peptid (1-35 a.a.), a – doména vázající glykan (45-202 a.a.), b – (212-300 a.a.), c – „TIM barrel“ doména, d – bakteriální doména podobná Ig (741–842 a.a.), e – čtyři repetice velké domény (850–916, 932–990, 1,343–1,401, a 1,417–1,475 a.a.), f – doména F5/8 typ C. Převzato a upraveno z (Song, Imanaka, *et al.* 2011).

Na zkrácení genu byl použit komerční set „*Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit*“ od firmy ThermoFisher Scientific. Princip této metody spočívá v namnožení pouze požadovaného úseku DNA do místa, kde končí gen *bgaD-B* (znázorněno na Obr. 12). Primery byly navrženy tak, aby forward primer nasedal na začátek sekvence a reverse primer na konec sekvence genu kódujícího enzym BgaD-B. Oba primery musely být fosforylované na 5'-konci z důvodu následné ligace PCR produktu.

Použité primery:

- BgaD-A-zkr_Fw: 5' - TAAGAATTCAAGCTTGTCGACCTGCAGTCTAGA - 3'
- BgaD-A-zkr_Re: 5' - CATTCTAATATCCTCGACCGCAACAGCCC - 3'

PCR směs byla připravena smícháním 10 μ l reakčního pufru (5 \times „*Phusion HF Buffer*“), 1 μ l dNTP směsi (200 μ M každý), 0,25 μ l forward primer (0,5 μ M) a 0,25 μ l reverse primer (0,5 μ M), 1 μ l templátu DNA (1 ng), 38 μ l sterilní vody a 0,5 μ l DNA polymerázy (2 U/ μ l; „*Phusion Hot Start DNA Polymerase*“). PCR cyklus byl nastaven na 98 $^{\circ}$ C na 30 s pro iniciační denaturaci, 30 cyklů – 98 $^{\circ}$ C na 10 s (denaturace), 68 $^{\circ}$ C na 20 s (nasednutí primerů), 72 $^{\circ}$ C na 5 min (elongace, 30 s/ kbp délky plazmidu) a 72 $^{\circ}$ C na 5 min pro finální elongaci. Úspěšnost PCR byla ověřena na 1% agarózovém gelu, požadovaný produkt migroval rychleji než templát (došlo ke zkrácení genu). Poté byla provedena ligace, tedy spojení lineárních vláken PCR produktu do cirkulárního plazmidu. Ke 3 μ l PCR směsi byly přidány 2 μ l 5 \times ligačního pufru („*Rapid Ligation Buffer*“), 2 μ l sterilní vody a 0,5 μ l T4 DNA ligázy a jemně promícháno. Směs byla krátce centrifugována a inkubována při laboratorní teplotě 10 min. Poté byla ligační směs použita na transformaci kompetentních buněk *E. coli* Top10 (viz kap. 4.7.)



Obr. 12: Schéma mutagenese pro přípravu zkrácené varianty β -galaktosidázy BgaD-B. Převzato a upraveno z návodu od ThermoFisher Scientific.

4.6. Izolace a preparace genu *bgaD*

4.6.1. Izolace genu v analytickém množství

Kompetentní buňky *E. coli* Top10 (100 μ l) byly transformovány 10 μ l plazmidu nesoucího gen mutantní β -galaktosidázy *bgaD-A-E532G* nebo 10 μ l plazmidu nesoucího gen zkrácené varianty *bgaD-B*. Vnesení plazmidu do buněk bylo provedeno pomocí tepelného šoku při 42 °C. Po regeneraci buněk při 37 °C, byly buňky zakoncentrovány centrifugací a naneseny na misku s LB agarem s ampicilinem (100 μ g/ml). Misky byly inkubovány při 37 °C do druhého dne.

Izolace genu v analytickém množství slouží k odlišení kolonií s požadovaným (mutantním) plazmidem od kolonií s WT plazmidem; proto je vhodné udělat výběr většího množství kolonií (v našem případě ze šestnácti kolonií). Nejprve byly 3 ml LB media s ampicilinem (100 μ g/ml) v 50ml centrifugační zkumavce zaočkovány jednou izolovanou kolonií z narostlé misky. Tyto kultury byly kultivovány při 37 °C a 250 ot./min a druhý den byly zpracovány pomocí komerčního kitu „*High Pure Plasmid Isolation Mini Kit*“ (MiniPrep).

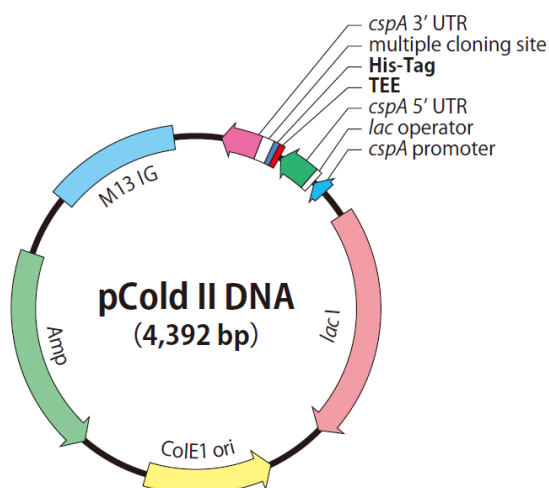
Kultury v centrifugačních zkumavkách byly centrifugovány 10 min při 5000 ot./min a 12 °C. K peletům bylo přidáno 250 μ l pufru „*Suspension Buffer*“, buňky byly resuspendovány a vzniklé suspenze byly převedeny do sterilních mikrozkuvek, poté bylo přidáno 250 μ l lyzačního pufru („*Lysis Buffer*“) a inkubováno 5 min při laboratorní teplotě. Dále bylo přidáno 350 μ l vychlazeného pufru pro navázání DNA na kolonu („*Binding Buffer*“) a inkubováno 5 minut na ledu. Po inkubaci byla směs centrifugována 10 min při 13 500 ot./min a 12 °C. Supernatant byl převeden na kolonu a centrifugován 1 min při 10 000 ot./min. Poté byla kolona promyta 500 μ l promývacího pufru I, centrifugována na 1 min, 10 000 ot./min a 700 μ l promývacího pufru II („*Wash Buffer*“) a opět centrifugována. Následně byla provedena centrifugace prázdné kolony 2 min a 13 500 ot./min. Proteklý roztok byl vyléván do odpadu. Kolona byla umístěna do sterilní mikrozkuvky, bylo na ni naneseno 30 μ l sterilní vody a centrifugováno 1 min na 10 000 ot./min, proteklá voda byla vrácena na kolonku a znovu centrifugována.

Čistota izolovaných plazmidů byla ověřena agarózovou elektroforézou (1% gel) v 1 \times TAE pufru. Jako referenční vzorek byl použit plazmid *bgaD-A-WT*. Vzorky, které obsahovaly produkt odpovídající retencí referenčnímu vzorku (u *bgaD-B* byla migrace vzorků rychlejší z důvodu menší velikosti genu) byly sekvenovány Sangerovou metodou (ve

firmě SEQme s.r.o.). Sekvence byla vyhodnocena v programu Nucleotide BLAST a bylo zjištěno, které vzorky obsahují požadovanou mutaci, popř. zkrácený gen.

4.6.2. Izolace genu v preparativním množství

Izolace genu v preparativním množství se používá, pokud chceme získat DNA ve vysoké čistotě a koncentraci. Získáme tak plazmid, který můžeme využívat na metody molekulární biologie i k rekombinantní expresi daného proteinu. Touto metodou byl izolován gen β -galaktosidázy z *Bacillus circulans bgaD-A* ze syntetického plazmidu (Takara Bio Inc.), gen mutantní β -galaktosidázy *bgaD-A-E532G* a gen zkrácené varianty *bgaD-B*. Genový konstrukt β -galaktosidázy *bgaD-A* byl navržen dle literatury (Song *et al.* 2011) a vložen do expresního vektoru pCold II (viz Obr. 13) pomocí restričních míst *SacI/SalI*. Syntézu genu a jeho klonování do vektoru provedla firma Generay (Čína). Expresní vektor pCold II se používá na chladovou produkci umožňující správné sbalení proteinů. Vektor obsahuje promotor Proteinu A chladového šoku (*cspA*). Selektivní indukce syntézy cílového proteinu probíhá při nízké teplotě (15 °C), což potlačí expresi hostitelských proteinů a sníží aktivitu proteáz. Kromě *cspA* promotoru expresní vektor obsahuje *lac* operátor, gen ampicilinové rezistence (*amp*), počátek replikace ColE1, M13 IG fragment, vícenásobné klonovací místo (MCS), prvek zvyšující translaci (TEE) a histidinovou kotvu (His-Tag) (“PCold DNA Cold-Shock Expression System” n.d.).



Obr. 13: Expresní vektor pCold II používaný pro chladovou expresi β -galaktosidáz v *E. coli* při 15 °C. (TaKaRa Bio Inc.)

Kompetentní buňky *E. coli* Top10 byly transformovány 0,5 μ l plazmidu (1 až 3 ng dle daného plazmidu), transformované buňky byly naočkovány na misky s LB agarem

obsahujícím ampicilin (100 µg/ml) a kultivovány na 37 °C do druhého dne. Poté bylo 100 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml) zaočkováno jednou narostlou kolonií z misky. Kultura byla kultivována alespoň 16 hod při 37 °C a 250 ot./min. Druhý den byla kultura zpracována pomocí komerčního setu „*Genopure Plasmid Midi Kit*“, obsahujícího různé pufrů a kolonky na zachycení a přečištění DNA.

Narostlá kultura byla centrifugována 20 minut při 5000 ot./min a 8 °C, pelet byl resuspendován v 8 ml pufru („*Suspension Buffer*“), po promíchání bylo přidáno 8 ml lyzačního pufru („*Lysis Buffer*“) promícháno a inkubováno 2 minuty na ledu. Po přidání 8 ml neutralizačního pufru („*Neutralisation Buffer*“) k suspenzi a inkubaci 5 minut na ledu se vytvořily bílé vločky. Kolonka byla umístěna do stojanu a promyta 2,5 ml pufru („*Equilibration Buffer*“). Následně byl lyzát zfiltrován přes skládaný filtr umístěný v nálevce a ponechán vykat na kolonku. Po protečení byly do kolony přidány 2×4 ml promývacího pufru („*Wash Buffer*“) a eluát byl ponechán vykat do odpadní nádoby.

Dále byla provedena eluce plazmidu puftrem („*Elution Buffer*“) přehřátým na 50 °C; plazmid byl jímán do sterilní centrifugační zkumavky. K roztoku bylo přidáno 3,6 ml propan-2-olu a inkubováno při 4 °C přes noc, čímž došlo k vysrážení DNA. Druhý den byl roztok po 1 ml pipetován do mikrozukavky a centrifugován 30 minut při 4 °C a 15 000 ot./min. Po centrifugování celého roztoku byl opatrně odpipetován supernatant a pelet s DNA byl promyt 1 ml sterilního 70% ethanolu. Roztok byl promíchán a znovu centrifugován 10 minut při 15 000 ot./min a 4 °C. Ethanol byl odpipetován a peleta ve zkumavce se nechala sušit volně na vzduchu alespoň přes noc. K suché peletě bylo přidáno 100 µl sterilní vody a ponecháno pomalu rozpouštět (cca 1 hod).

Z roztoku byla stanovena čistota a koncentrace izolované DNA. Stanovení bylo provedeno spektrofotometricky za použití deuteriové lampy při 260 nm a 280 nm (koncentrace proteinů).

Čistota a koncentrace DNA byly vypočteny podle následujících vztahů:

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

$$\text{koncentrace DNA} = A_{260} \times \text{ředění} \times k \text{ (kde } k = 50, \text{ ředění} = 250).$$

Sekvence izolovaných plazmidů byla ověřena Sangerovou metodou sekvenace (firmou SEQme s.r.o.) s následujícími sekvenačními primery:

- pCOLD_Fw: 5'-ACGCCATATCGCCGAAAGG-3'

- pCOLD_Re: 5' - GGCAGGGATCTTAGATTCTG - 3'
- BgaD-A_MidFw: 5' - CACCATGATTTAGGGGCGCTTGGGGCG - 3'
- BgaD-A_MidFw2: 5' - CATACAAAGAAACAAAGGATGGAAA - 3'
- BgaD-A_MidRe: 5' - ACAATCACTTTTGCTTGGGCTTTTA - 3'

4.7. Transformace kompetentních buněk *E. coli*

Kompetentní buňky *E. coli* BL21 Gold (DE3) byly transformovány izolovaným genem β -galaktosidázy z *B. circulans* izoformy A (*bgaD-A-WT*), popř. mutantním genem *bgaD-A-E532G* či genem zkrácené formy *bgaD-B*. Alikvot 100 μ l buněk v mikrozkuhavce byl rozmražen na ledu, poté bylo sterilně přidáno 0,5 μ l plazmidu *bgaD*, směs byla lehce promíchána a ponechána inkubovat na ledu 20 min. Dále byl proveden teplotní šok, kdy transformované buňky byly vloženy do termomixéru na 42 °C po dobu 75 s. K buňkám byl pak přidán 1 ml LB média a buňky byly ponechány inkubovat alespoň 1 hod při 37 °C a 300 ot./min, aby došlo k jejich regeneraci.

Poté byly buňky centrifugovány při 15 000 ot./min a 12 °C na 10 min. Odebráním 0,8 ml supernatantu byly buňky zakoncentrovány, zbytek buněk byl resuspendován a nanesen na misky s LB agarem s ampicilinem (100 μ g/ml). Misky byly ponechány inkubovat při 37 °C do druhého dne.

4.8. Rekombinantní exprese a purifikace β -galaktosidáz

4.8.1. Kultivace bakterií

Narostlé kolonie po transformaci byly zaočkovány do čtyř 100mL baněk s 20 ml LB media s ampicilinem (100 μ g/ml) a inkubovány při 37 °C a 160 ot./min po dobu 16 hod. Poté byly narostlé prekultury byly přelity do 1L baněk s 200 ml LB media s ampicilinem (100 μ g/ml) a inkubovány při 37 °C a 200 ot./min. Byla sledována optická denzita (OD) rostoucí kultury a při OD₆₀₀ větším než 1 byla provedena indukce přidáním IPTG (0,1mM). Kultivace bakterií probíhala dále při 15 °C a 200 ot./min alespoň 24 hod.

Tato metoda se nazývá chladová produkce, kdy je třeba bakterie ponechat růst při nízké teplotě, aby došlo ke správnému sbalení proteinu. Metoda byla převzata a upravena z (Song, Imanaka *et. al.* 2011). Produkce byla ukončena na vrcholu exponenciální fáze. Bakterie byly

centrifugovány při 5000 ot./min a 4 °C na 20 min. Buněčný pelet byl přemístěn do centrifugační zkumavky a zmražen při - 20 °C, aby došlo k narušení buněčné stěny, a bylo tak dosaženo většího výtěžku při purifikaci.

4.8.2. Purifikace enzymu afinitní chromatografií

Ke zmrzlým buňkám bylo přidáno 40 ml ekvilibračního pufru a 400 µl PMSF (inhibitor proteáz) a buňky byly ponechány rozmrazit na ledu. Poté bylo provedeno 6 cyklů sonikace na ledu (1 min sonikace a 2 min pauza) s 52% amplitudou. Po sonikaci byla suspenze rozdělena po 2 ml do mikrozkuvek a centrifugována při 4 °C a 13 500 ot./min na 15 min. Supernatant byl přelit do čisté centrifugační zkumavky, doplněn ekvilibračním pufrem na objem 50 ml a přefiltrován (0,8 µm). Tímto byl vzorek připraven na nanesení na kolonu.

Vyprodukovaná β-galaktosidáza nese na N-konci histidinovou kotvu, díky níž je možná purifikace pomocí chelatační afinitní chromatografie (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*). Byla použita kolona na bázi sefaryzy HisTrap HP (5 ml) a nízkotlaká (maximálně 0,5 MPa) chromatografická sestava Äkta Prime plus. Před nanesením vzorku byla kolona promyta 150 ml přefiltrované dvojité destilované vody a 150 ml ekvilibračního pufru (průtok 5 ml/min). Poté byl nanesen vzorek a nastaven průtok na 1 ml/min. Po nanesení vzorku byla kolona znovu promývána ekvilibračním pufrem (2 ml/min), aby se odstranily nespecificky navázané proteiny, dokud nebyla absorbance při stanovení proteinů dle Bradforda nižší než 0,02 (cca 1 hod).

β-Galaktosidáza byla z kolony uvolněna elučním pufrem s obsahem 100mM imidazolu (2 ml/min). Eluce byla monitorována pomocí UV detektoru a byly sbírány frakce po 1 ml. Po dokončení eluce byla kolona promyta 150 ml elučního pufru, 150 ml filtrované dvojité destilované vody a 150 ml 20% etanolu (5 ml/min) a uskladněna v lednici. Proteinové frakce byly analyzovány Bradfordovou metodou, frakce s vysokým obsahem proteinu byly spojeny a dialyzovány ve 2 × 5 litrech dialyzačního pufru celkem 20 hod. Po dialýze byl vyprodukovaný enzym sterilně přefiltrován a čistota byla ověřena na 5% SDS gelu.

4.9. Charakterizace rekombinantních β -galaktosidáz

4.9.1. Čistota a koncentrace proteinu

Čistota rekombinantní purifikované β -galaktosidázy byla stanovena pomocí SDS elektroforézy v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Nejprve byl připraven 6% separační gel, který byl nanesen do skleněné aparatury Bio-Rad přibližně 1,5 cm od vrchního okraje. Separační gel byl převrstven 1 ml *n*-butanolu, aby nedošlo k vyschnutí gelu. Po ztuhnutí gelu při 40 °C byl odsát butanol a na gel byl nanesen gel zaostřovací, do něj byl vsunut hřebínek a gel byl ponechán při laboratorní teplotě ztuhnout.

Vzorky obsahující 20–40 μ g proteinu byly smíseny s 5 \times koncentrovaným vzorkovým pufrem obsahujícím denaturační činidla SDS a DTT. SDS kromě denaturace proteinů obalí protein a udělí mu negativní náboj, DTT způsobí redukci disulfidových můstků, což je obojí nutné pro správné rozdělení proteinu v gelu. Posledním krokem přípravy vzorků byla denaturace zahřátím na 99 °C po dobu 5 minut v termomixéru. Vzorky byly nanесeny do jamek SDS gelu, který byl umístěn do separační vany s elektrodovým pufrem. Do první jamky byl vždy nanесen hmotnostní marker HMW. Elektroforéza byla zahájena uzavřením vany a připojením ke zdroji proudu s nastaveným napětím 130 V. Po ukončení elektroforézy byl gel vyjmut z aparatury, obarven barvicím roztokem obsahujícím *Coomasie Brilliant Blue*, odbarven odbarvovacím roztokem a následně uchován v 1% kyselině octové při 4 °C.

Stanovení koncentrace proteinu ve vzorku β -galaktosidázy bylo provedeno pomocí Bradfordovy metody, která je založena na interakci proteinů s barvivem *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB) v kyselém prostředí. Když dojde k navázání barviva na protein, změní se zabarvení roztoku z hnědé na modrou, zbarvení je pak stanoveno spektrofotometricky při 595 nm. Za změnu zbarvení jsou zodpovědné zejména bazické aminokyselinové zbytky v polypeptidu, množství navázaného barviva je tedy zhruba přímo úměrné množství pozitivních nábojů v proteinu.

Na stanovení koncentrace proteinu v neznámém vzorku je třeba kalibrační přímka naměřená za stejných podmínek. V tomto případě byla využita kalibrace na hovězí γ -globulin, z kalibrace byla získána hodnota konstanty nutná pro výpočet koncentrace proteinu. Samotné měření bylo provedeno smícháním 100 μ l vhodně naředěného vzorku proteinu s 1 ml Bradfordova činidla a inkubací při laboratorní teplotě 15 min. Poté byla změřena absorbance proti referenčnímu vzorku (jen voda a činidlo) při 595 nm.

4.9.2. Aktivita enzymu

Stanovení hydrolytické aktivity β -galaktosidáz bylo provedeno spektrofotometricky při 420 nm. Při této vlnové délce v bazickém prostředí výrazně absorbují *p*-nitrofenol, který je odštěpen z *p*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosidu (*p*NP-Gal), substrátu β -galaktosidázy. Měření bylo prováděno paralelně alespoň ve třech stanoveních proti referenčnímu vzorku obsahující pouze substrát a pufr bez enzymu.

Do mikrozkuřavky v termomixéru byl napipetován substrát (2 mM) v acetátovém pufru pH 5,0. Reakční směs byla vytemperována na 35 °C. Poté byla reakce zahájena přidáním enzymu (10 μ l) a ponechána běžet 10 minut při 850 ot./min (čas je možné upravit dle hodnoty absorbance, tak aby platil Lambertův-Beerův zákon a lineární závislost rychlosti enzymové reakce na čase). Reakce byla ukončena přidáním 1 ml 0,1M Na₂CO₃ a byla změřena absorbance při 420 nm.

Z naměřených hodnot absorbancí byla aktivita vypočtena podle vztahu:

$$AKT \text{ (U/ml)} = \frac{\overline{ABS} \cdot V_{\text{celk}} \cdot \text{řed}}{k \cdot t \cdot V_{\text{enz}}}$$

kde *AKT* je aktivita enzymu v jednotkách U/ml, \overline{ABS} je průměr absorbancí, V_{celk} je celkový objem reakční směsi (50 μ l), *řed* je ředění zásobního roztoku použitého enzymu, *k* je konstanta lineární závislosti absorbance na koncentraci *p*-nitrofenolu při 420 nm, *t* je reakční čas a V_{enz} je objem enzymu přidaného do reakce.

Touto metodou bylo dále stanoveno pH a teplotní optimum β -galaktosidáz. pH optimum bylo stanoveno v prostředí univerzálního Britton-Robinsonova pufru (složení viz kapitola 4.2.), který se používá v rozmezí hodnot pH od 2 do 12. Pufr byl použit v reakční směsi i k ředění enzymu. Aktivita byla stanovena při teplotě 35 °C. Ze tří paralelních měření byla stanovena průměrná hodnota aktivity a z grafu závislosti aktivity enzymu na pH bylo stanoveno pH optimum.

Teplotní optimum bylo stanoveno v acetátovém pufru pH 5,0. Stanovení bylo prováděno od teploty 20 °C, poté byla teplota reakční směsi zvyšována o 5 °C až do teploty, kdy byl enzym zcela inaktivován. Ze tří paralelních měření byla stanovena průměrná hodnota aktivity a z grafu závislosti aktivity enzymu na teplotě bylo stanoveno teplotní optimum.

U mutantní varianty BgaD-A-E532G došlo mutací nukleofilního aminokyselinového zbytku v aktivním centru enzymu prakticky ke zrušení hydrolytické aktivity, proto nemohla

být provedena klasická charakterizace jako u WT enzymu. Byla pouze změřena zbytková aktivita se standardním substrátem *p*NP-Gal. Princip obnovení hydrolytické aktivity je založen na přidání externího nukleofilu, který se váže do aktivního centra enzymu místo aminokyselinového nukleofilního zbytku a umožňuje tak opět využít vodu jako substrát pro reakci (Viladot *et al.* 1998). Byla proměřena závislost aktivity mutantního enzymu k *p*NP-Gal se zvyšující koncentrací mravenčanu sodného (0,5 – 10 M) a azidu sodného (0,5 – 3,5 M) v 50mM Sørensenově pufru pH 6,0.

4.9.3. Enzymová kinetika

Stanovení kinetických parametrů β -galaktosidáz BgaD-A a BgaD-B bylo prováděno diskontinuální metodou. Stanovení nelze provést kontinuálně, protože absorpční maximum *p*-nitrofenolu v neutrálním pH, které je optimální pro tyto enzymy, se výrazně překrývá s absorpčním maximem substrátu, a proto je možné měřit pouze při nízkých výchozích koncentracích substrátu. Při stanovení byla opět využita kvantifikace absorbance *p*-nitrofenolu jako při stanovení enzymové aktivity. Byly připraveny reakční směsi o objemu 320 μ l s různými koncentracemi substrátu *p*NP-Gal (0,1 – 8 mM) a temperovány v termomixéru na 25 °C při 850 ot./min.

Reakce byla zahájena přidávkem 80 μ l enzymu. Z reakční směsi bylo od první minuty v dvouminutových intervalech odebíráno 50 μ l do 96 jamkové mikrotitrační destičky, kde bylo připraveno 100 μ l 1M uhličitanu sodného pro zastavení reakce. Reakce byly paralelně provedeny ve třech nezávislých měřeních. Následně byla na přístroji Sunrise Tecan změřena absorbance při 420 nm. Z lineární závislosti množství uvolněného *p*-nitrofenolu (konstanta úměrnosti z kalibrační přímky $k = 2525,2$ mol/l) na čase reakce byla získána počáteční rychlost reakce v_0 (mol/l/min) jako směrnice přímky. Hodnoty v_0 byly vyneseny v závislosti na koncentraci substrátu v reakční směsi v programu GraphPad Prism dle vztahu:

$$v_0 = \frac{k_{cat} \cdot [E]_t \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

kde k_{cat} značí katalytickou konstantu [min^{-1}], $[E]_t$ koncentraci enzymu, $[S]$ koncentraci substrátu a K_M Michaelisovu konstantu [mmol/l].

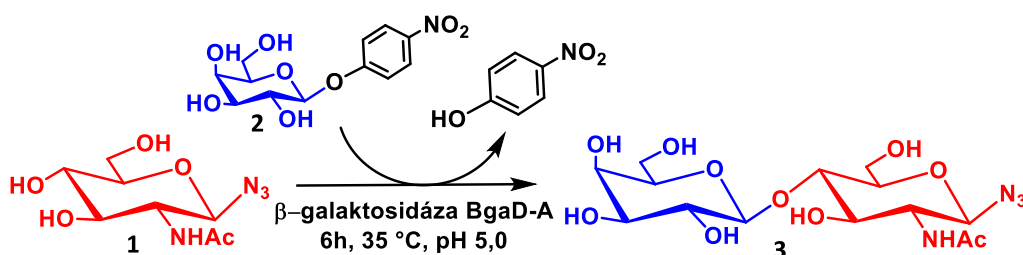
Michaelisova konstanta je rovna koncentraci substrátu, jíž je zapotřebí, aby bylo při dané koncentraci enzymu dosaženo počáteční reakční rychlosti, která odpovídá polovině limitní rychlosti (V_{max}). Hodnota V_{max} je nejvyšší počáteční reakční rychlost, jíž může reakce při dané koncentraci enzymu za určitých podmínek dosáhnout. Katalytická konstanta (k_{cat}),

někdy také číslo přeměny, udává počet molekul substrátu, které může jedna molekula enzymu při nasycení substrátem přeměnit za jednu minutu.

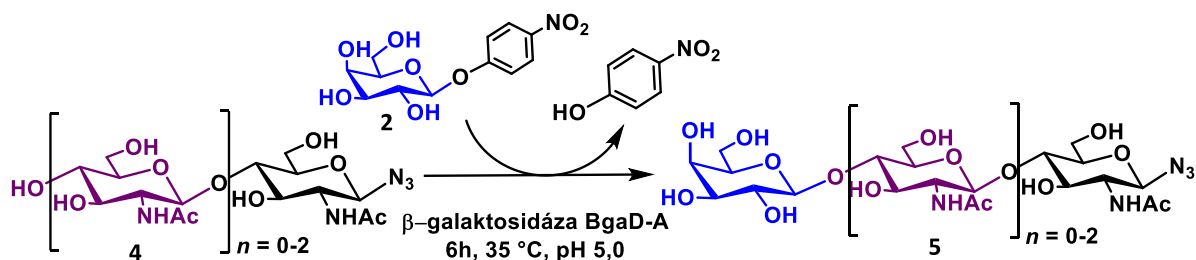
4.10. Enzymová galaktosylace

4.10.1. Enzymová syntéza pomocí BgaD-A

Rekombinantní β -galaktosidáza BgaD-A (0,5 U) byla použita pro přípravu funkcionalizovaného *N*-acetylglukosaminu LacNAc-N₃ (β -D-galaktopyranosyl-(1-4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-azid) a chitooligomerních linkerů s terminálním *N*-acetylglukosaminem (LacNAc). Chitooligomerní linker je funkcionalizovaný oligosacharid obsahující různý počet *N*-acetylglukosaminových jednotek ((GlcNAc)₂-N₃ – *N,N'*-diacetylchitobiosyl-azid, (GlcNAc)₃-N₃ – *N,N',N''*-triacetylchitotriosyl-azid, (GlcNAc)₄-N₃ – *N,N',N'',N'''*-tetracetylchitotetraosyl-azid), na který mohou být připojeny další sacharidové jednotky. V tomto případě byl (GlcNAc)₂-N₃ a (GlcNAc)₃-N₃ galaktosylován, byla na něj enzymově připojena galaktóza. Takto připravené chitooligomery mohou být konjugovány na multivalentní nosiče a díky přítomnosti chitooligomerního linkeru může být zvýšena afinita terminálního LacNAc epitopu ke galektinům. Pro přípravu funkcionalizovaného disacharidu LacNAc-N₃ (**3**) dle obr. 14 byl použit jako donor *p*NP-Gal (**2**) (30 mM) a akceptor 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosyl-azid (GlcNAc-N₃) (**1**) (200 mM) a pro přípravu galaktosylovaných chitooligomerů (**5**) dle Obr. 15 byly použity akceptory (GlcNAc)_{*n*}-N₃ (**4**) (100 mM).



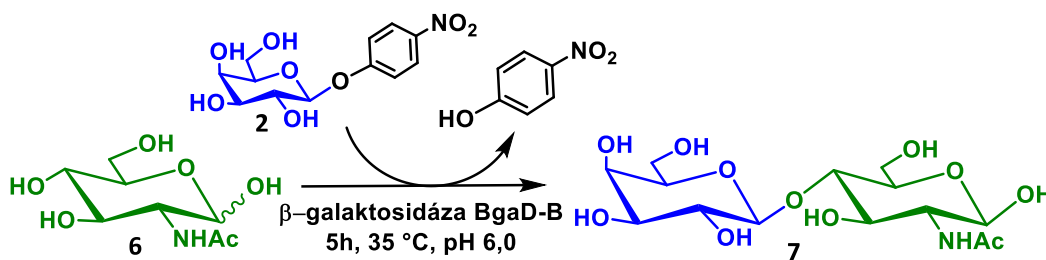
Obr. 14: Schéma přípravy funkcionalizovaného *N*-acetylglukosaminu (LacNAc-N₃). Donor – *p*NP-Gal (30 mM), akceptor – GlcNAc-N₃ (200 mM). Vytvořeno v programu ChemDraw Professional 16.0.



Obr. 15: Schéma enzymové galaktosylace chito-oligomerních linkerů. Donor – *p*NP-Gal (30 mM), akceptor – (GlcNAc)_{*n*}-N₃ (100 mM). Vytvořeno v programu ChemDraw Professional 16.0.

4.10.2. Enzymová syntéza pomocí BgaD-B

Zkrácená izoforma β -galaktosidázy BgaD-B (0,05 U) byla použita k syntéze *N*-acetylglukosaminu (LacNAc); tato reakce probíhala ve vysokém výtěžku. Pro přípravu LacNAc (7) dle Obr. 16 byl použit jako donor *p*NP-Gal (2) (30 mM) a akceptor 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranosa (GlcNAc) (6) (240 mM).



Obr. 16: Schéma přípravy *N*-acetylglukosaminu. Donor – *p*NP-Gal (30 mM), akceptor – GlcNAc (240 mM). Vytvořeno v programu ChemDraw Professional 16.0.

4.10.3. Transglykosylační reakce s mutantní variantou BgaD-A-E532G

Typickým substrátem galaktosyláz je α -D-galaktosylfluorid (α -GalF). Tento substrát byl použit jako donor v transglykosylačních reakcích, avšak bylo zjištěno, že není vhodným substrátem pro mutantní variantu BgaD-A-E532G. Díky zbytkové hydrolytické aktivitě bylo možné jako substrát použít standardní substrát *p*NP-Gal. Mutant BgaD-A-E532G byl použit k syntéze funkcionalizovaného disacharidu LacNAc-N₃ (3) obdobně jako dle obr. 14, ale s reakčním časem 48 hodin. V této reakci fungoval tedy jako transglykosidasa.

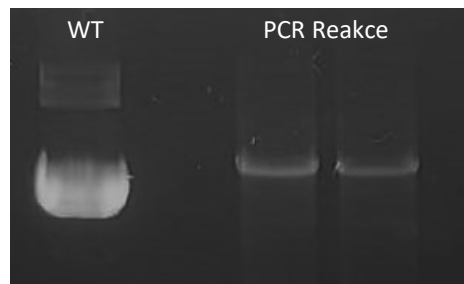
Všechny reakční směsi s požadovanými sacharidy byly purifikovány gelovou chromatografií na polyakrylamidovém gelu Biogel-P2 s vodou jako mobilní fází o rychlosti eluce 7 ml/hod. Produkty purifikace byly lyofilizovány a byla ověřena jejich čistota pomocí HPLC a NMR ve spolupráci se specializovanými odděleními v Mikrobiologickém ústavu AV ČR – Ing. Lucie Petrásková, Ph.D. (HPLC) a RNDr. Helena Pelantová, Ph.D. (NMR).

5. Výsledky

5.1. Cílená mutageneze β -galaktosidázy

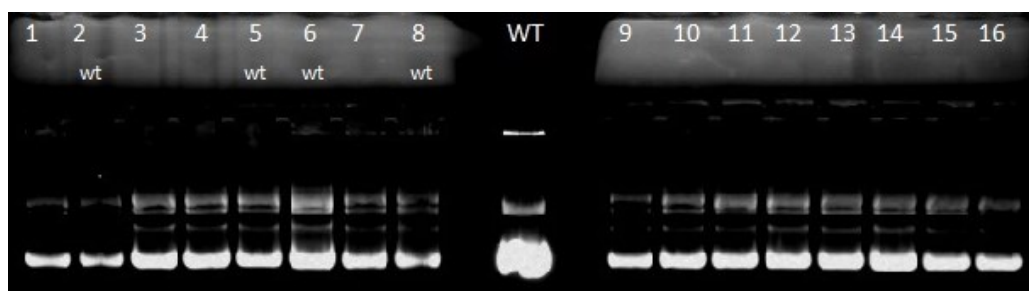
5.1.1. Příprava mutantní varianty BgaD-A-E532G

Cílená mutageneze β -galaktosidázy BgaD izoformy A z *B. circulans* byla provedena pomocí PCR. V komerčním genu *bgaD-A-WT* (viz kap. 4.6.2) byl katalytický nukleofil – kyselina glutamová – zaměněn za glycin, a tím byl připraven mutant *BgaD-A-E532G*. Na mutagenezi byl použit komerční set *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit* od firmy Agilent Technologies a spolu s navrženými mutantními primery obsahujícími požadovanou mutaci (viz kap. 4.5.1). Po PCR reakci byl zbylý WT plazmid rozštěpen pomocí restriční endonukleázy *DpnI* a mutovaný plazmid byl izolován z preparativního 1% agarózového gelu pomocí komerčního setu *JETquick Gel Extraction Spin Kit* (fotografie gelu viz Obr. 17); bylo postupováno podle kap. 4.5.1.



Obr. 17: Preparativní 1% agarózový gel na separaci PCR produktu. Vlevo referenční vzorek WT genu, rozdělení PCR reakce do dvou drah.

Izolovaný mutantní plazmid byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* Top10 a šestnáct narostlých kolonií bylo zaočkováno do LB media s ampicilinem. Následně byla provedena selekce kolonií a izolace DNA v analytickém množství pomocí komerčního setu *High Pure Plasmid Isolation Kit*; postup viz kap. 4.6.1. Izolované plazmidy byly analyzovány na 1% agarózovém gelu - proužky DNA obsahující požadovaný gen odpovídaly retencí WT genu (viz Obr. 18). Vybrané kolonie 1-10 byly sekvenovány Sangerovou metodou firmou SEQme, s.r.o. Sekvence byly analyzovány v programu Nucleotide BLAST a bylo zjištěno, které kolonie obsahují mutovaný gen. Kolonie 2, 5, 6 a 8 obsahovaly WT gen, kolonie 1, 3, 4, 7, 9 a 10 obsahovaly požadovaný mutantní gen.

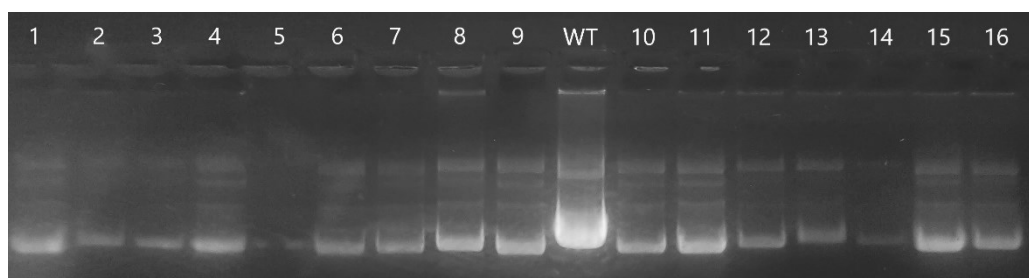


Obr. 18: Analytický 1% agarózový gel izolovaných plazmidů ze selekce kolonií. Číslo označují danou kolonii. Kolonie 1-10 byly sekvenovány. Kolonie 2, 5, 6 a 8 obsahovaly WT gen, ostatní sekvenované kolonie obsahovaly požadovanou mutaci v genu.

5.1.2. Příprava zkrácené varianty BgaD-B

Zkrácená varianta β -galaktosidázy z *B. circulans* *BgaD-B* byla též připravena pomocí PCR. Na mutagenезi byl použit komerční set „*Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit*“ od firmy ThermoScientific a mnou navržené 5'-fosforylované primery (viz kap. 4.5.2.). Po PCR reakci byly lineární úseky DNA spojeny do cirkulárního plazmidu pomocí T4 DNA ligázy. Poté byl plazmid transformován do kompetentních buněk *E. coli* Top10 a šestnáct narostlých kolonií bylo zaočkováno do LB media s ampicilinem.

Následně byla provedena selekce kolonií a izolace DNA v analytickém množství pomocí komerčního set „*High Pure Plasmid Isolation Kit*“ viz kap. 4.6.1. Izolované plazmidy byly analyzovány na 1% agarózovém gelu; proužky DNA obsahující zkrácený gen migrovaly rychleji než WT gen (viz Obr. 19). Kolonie 1, 4, 6-12 a 15 byly sekvenovány Sangerovou metodou firmou SEQme s.r.o. Sekvence byly analyzovány v programu Nucleotide BLAST a bylo zjištěno, které kolonie obsahují zkrácený gen. Všechny sekvenované kolonie obsahovaly gen zkrácené varianty β -galaktosidázy *bgaD-B*.



Obr. 19: Agarózový gel izolovaných plazmidů ze selekce kolonií. Číslo označují danou kolonii. Kolonie 1, 4, 6-12, 15 byly sekvenovány. Všechny sekvenované kolonie obsahovaly zkrácený gen (*bgaD-B*).

5.2. Izolace genů β -galaktosidáz

Na začátku práce byl navržen konstrukt β -galaktosidázy *bgaD-A-WT* s histidinovou kotvou a vložen do vektoru pCold II pomocí restrikčních míst *SacI/SalI* na základě literatury (Song, Imanaka *et al.* 2011). Syntetický gen β -galaktosidázy z *B. circulans bgaD-A-WT* v expresním vektoru pCold II od firmy Takara Bio Inc. byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* Top10 a jedna narostlá kolonie byla zaočkována do LB media s ampicilinem. Následně byla provedena izolace DNA v preparativním množství pomocí komerčního setu *Genopure Plasmid Midi Kit*, podrobně viz kap. 4.6.2. Podobně byly namnoženy a izolovány i geny mutantní β -galaktosidázy *bgaD-A-E532G* a zkrácené izoformy *bgaD-B*. Koncentrace a čistota DNA izolovaných plazmidů je uvedena v Tab. 1.

Tab. 1: Koncentrace a čistota DNA izolovaných genů β -galaktosidáz.

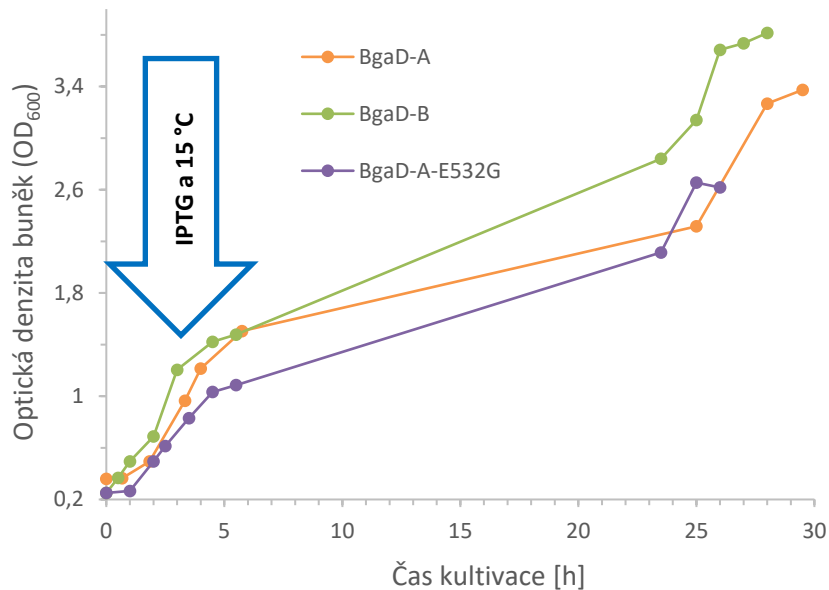
Izolovaný gen	Koncentrace DNA [$\mu\text{g/ml}$]	Čistota DNA (A_{260}/A_{280})
<i>bgaD-A-WT</i>	7550	1,7
<i>bgaD-A-E532G</i>	6791	1,6
<i>bgaD-B</i>	2089	1,6

Správnost sekvencí izolovaných genů byla ověřena Sangerovou metodou sekvenace firmou SEQme s r.o. Sekvence připravených genů β -galaktosidáz je uvedena v příloze 1. Na sekvenaci touto metodou bylo potřeba pět primerů, aby došlo překrytí sekvence celého genu (5214 bp). Primery jsou uvedeny též v příloze 1.

5.3. Exprese a purifikace β -galaktosidáz

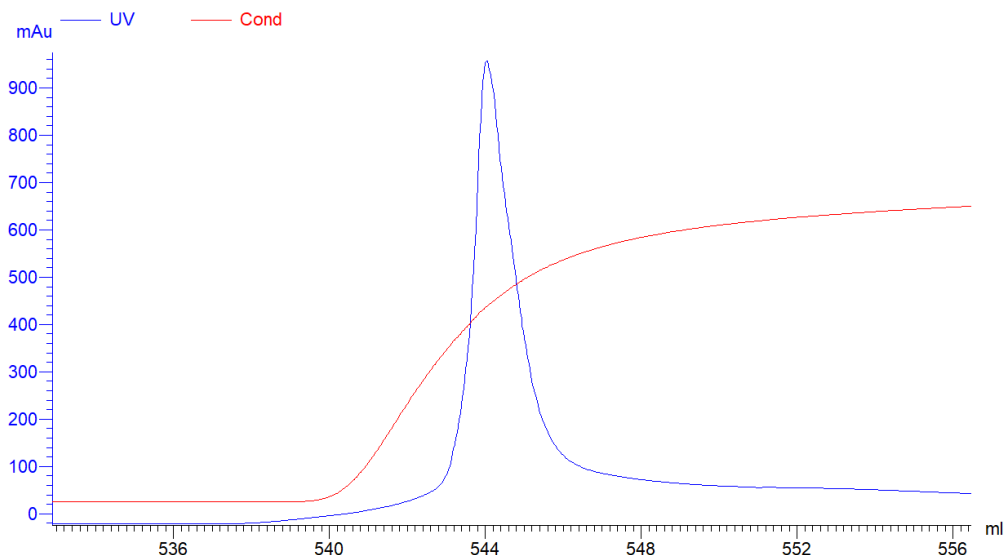
Připravené geny β -galaktosidáz byly použity k heterologní expresi enzymů v *E. coli*. Navržené genové konstrukty jsou komerčně zaklonovány v expresním vektoru pCold II, který je vhodný pro chladovou produkci proteinů (podrobně viz kap. 4.6.2). Kompetentní buňky *E. coli* Top10 byly transformovány plazmidy nesoucími geny *bgaD-A-WT*, *bgaD-B* a *bgaD-A-E532G*. Všechny připravené konstrukty obsahovaly na N-konci histidinovou kotvu. Narostlé kolonie byly očkované do LB media s ampicilinem a vzniklé prekultury byly očkované do většího objemu LB media s ampicilinem (hlavní kultura). Hlavní kultury byly kultivovány při 37 °C a jejich růst byl analyzován měřením optické denzity při 600 nm

(OD₆₀₀). Po nárůstu kultur s OD₆₀₀ větší než 0,8 byla provedena indukce přidáním IPTG a kultury byly dále kultivovány při 15 °C. Z naměřených hodnot absorbancí při 600 nm byl sestrojen graf závislosti OD₆₀₀ na čase (viz Obr. 20). Byly sestrojeny růstové křivky *E. coli* při produkci β-galaktosidázy izoformy A (BgaD-A-WT), β-galaktosidázy izoformy B (BgaD-B) a mutantní formy β-galaktosidázy izoformy A (BgaD-A-E532G).



Obr. 20: Graf růstových křivek *E. coli* při produkci β-galaktosidáz. Po 3 h při 37 °C byla provedena indukce exprese enzymu pomocí IPTG a kultury byly inkubovány při 15 °C.

Po ukončení kultivace byly buňky odděleny od media centrifugací a zmraženy při –20 °C. Enzym byl z buněk uvolněn sonikací a byl purifikován ze supernatantu afinitní chromatografií na koloně HisTrap pomocí purifikačního systému Äkta Prime Plus. Navázaný enzym, který nesl na N-konci histidinovou kotvu, byl z kolony uvolněn puřrem obsahujícím imidazol. Ukázkový záznam z purifikačního programu Prime View je zobrazen na Obr. 21.



Obr. 21: Graf elučního vrcholu purifikace β -galaktosidázy BgaD-A-E532G z programu Prime View. Osa Y zobrazuje hodnoty UV na detektoru a osa X ukazuje objem pufru protéký přes kolonu.

Byly sbírány frakce o objemu 2 ml a na základě stanovení koncentrace proteinů podle Bradforda byly vybrány frakce obsahující vysoký obsah proteinů. Purifikované enzymy byly dialyzovány ve 2×5 l 50mM Sørensenova pufru pH 6,0. Dialyzované enzymy byly poté sterilně přefiltrovány a uchovávány při 4 °C. Množství produkovaných enzymů jsou uvedena v Tab. 2. Koncentrace proteinů ve výsledných vzorcích β -galaktosidáz byla stanovena metodou podle Bradforda. Dále byla stanovena specifická aktivita enzymů k chromogennímu substrátu *p*NP-Gal (U/mg).

Tab. 2: Množství produkovaných β -galaktosidáz.

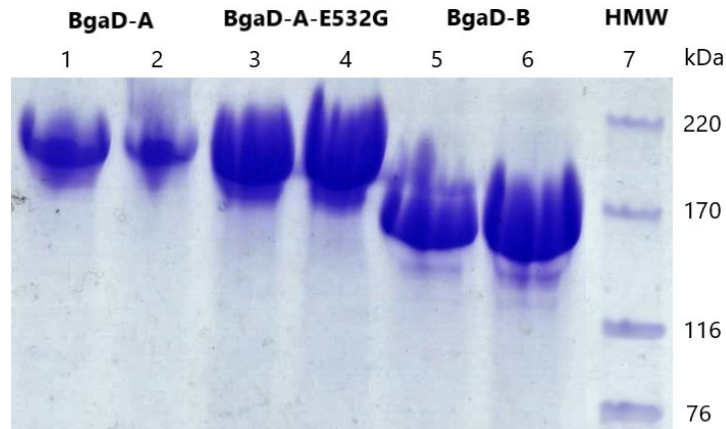
Enzym	<i>m</i> buněk na 1 l media [g]	<i>m</i> proteinů na 1 g buněk [mg]	Specifická aktivita [U/mg]
BgaD-A	6,7	19,0	11,7
BgaD-A-E532G	5,3	18,3	$5 \cdot 10^{-4}$
BgaD-B	8,0	14,8	3,2

Z hodnot specifické aktivity produkovaných enzymů je patrné, že mutantní forma BgaD-A-E532G má téměř zanedbatelnou zbytkovou hydrolytickou aktivitu (0,004 % ve srovnání s WT) a zkrácená forma BgaD-B má nižší specifickou aktivitu k *p*NP-Gal než BgaD-A. Výtěžky získaných čistých proteinů jsou ve všech třech případech srovnatelné, takže bodová mutace nepřinesla žádné významné zhoršení produkce enzymu.

5.4. Charakteristika připravených β -galaktosidáz

5.4.1. Koncentrace a čistota β -galaktosidáz

Čistota rekombinantních β -galaktosidáz byla ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Výsledný gel je zobrazen na Obr. 22.

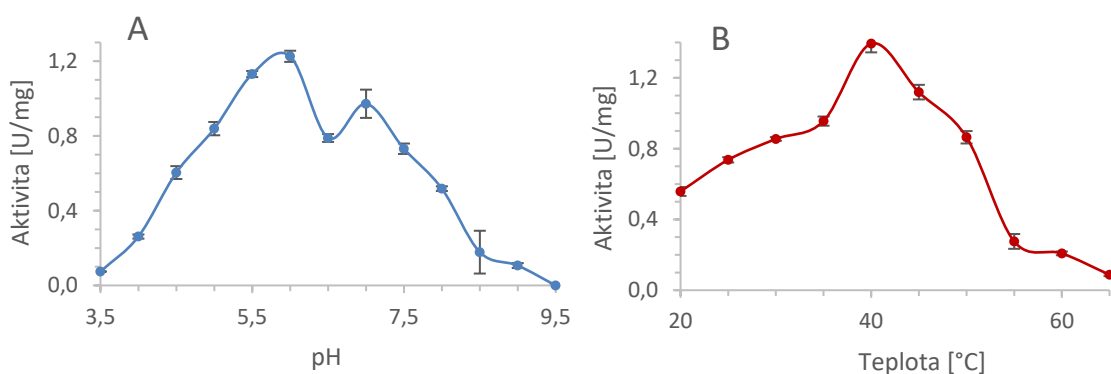


Obr. 22: SDS-PAGE analýza purifikovaných β -galaktosidáz. Dráhy 1, 2: BgaD-A; 3, 4: BgaD-A-E532G; 5, 6: BgaD-B, 7 – HMW („high molecular weight marker“).

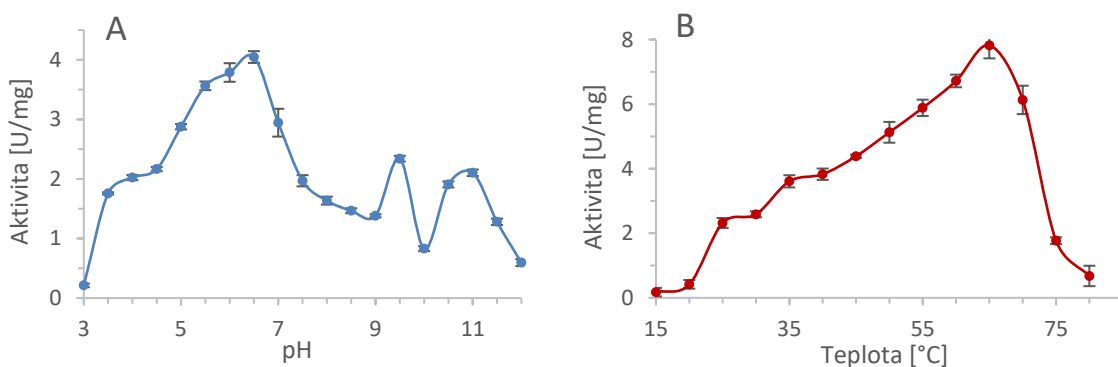
Z SDS-PAGE gelu je patrné, že mutant BgaD-A-E532G (189,2 kDa) odpovídá velikostí WT enzymu BgaD-A (189,3 kDa), zatímco zkrácená varianta β -galaktosidázy BgaD-B migruje v gelu rychleji, což odpovídá její velikosti 154,9 kDa. Všechny produkované enzymy mají čistotu vyšší než 95 %.

5.4.2. Aktivita připravených β -galaktosidáz

Byl stanoven vliv pH a teploty na aktivitu připravených β -galaktosidáz. Pro β -galaktosidázu A (BgaD-A) jsou závislosti aktivity na pH a teplotě znázorněny na obr. 23 a pro β -galaktosidázu B (Bga D-B) na obr. 24. pH optimum pro BgaD-A bylo stanoveno na pH 6,0 a pH optimum pro BgaD-B na pH 6,5. Poté byla proměřena závislost enzymové aktivity na teplotě v Sørensenově pufru pH 6,0; teplotní optimum BgaD-A bylo stanoveno na 40 °C a pro BgaD-B na 65 °C.

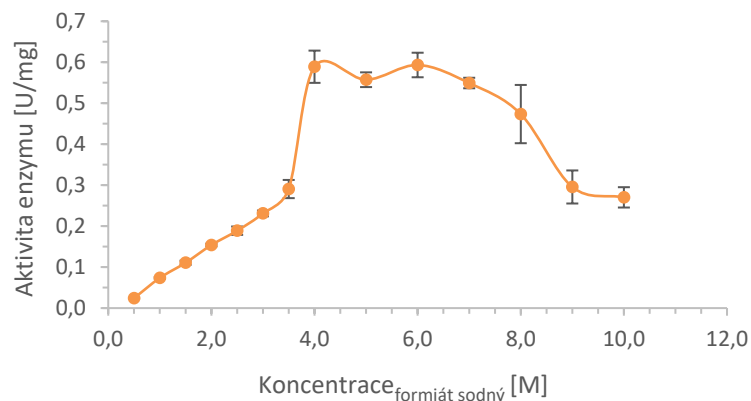


Obr. 24: Průběh závislosti β -galaktosidázy BgaD-A na pH (A) a na teplotě (B). Aktivita stanovena z průměru tří paralelních měření, chybové úsečky zobrazují standardní odchylku hodnot aktivit.



Obr. 23: Průběh závislosti β -galaktosidázy BgaD-B na pH (A) a na teplotě (B). Aktivita stanovena z průměru tří paralelních měření, chybové úsečky zobrazují standardní odchylku hodnot aktivit.

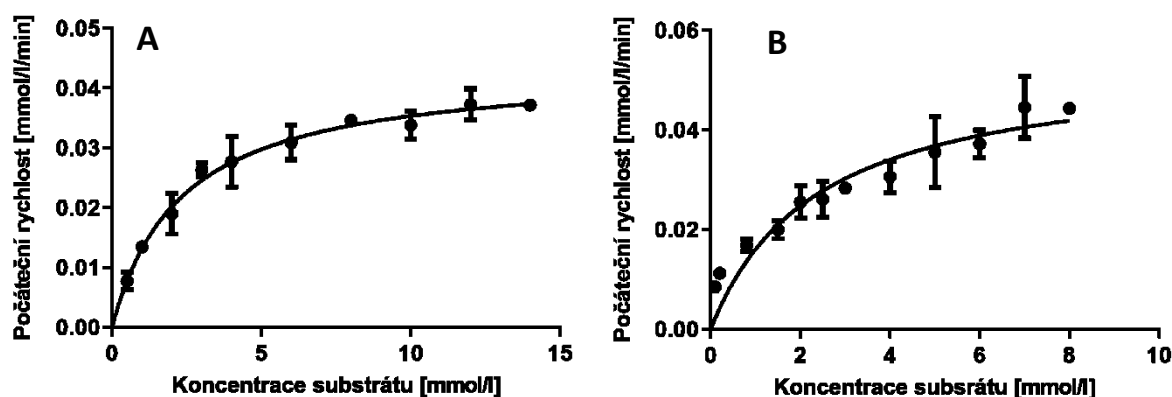
Dále byla proměřena závislost hydrolytické aktivity mutantní formy β -galaktosidázy BgaD-A-E532G na koncentraci externího nukleofilu – formiátu sodného a azidu sodného (viz kap. 4.9.2). Obnovení hydrolytické aktivity se podařilo pouze přidávkem formiátu sodného, přidáním azidu sodného nemělo na hodnotu zbytkové aktivity mutantního enzymu žádný vliv. Závislost hydrolytické aktivity BgaD-A-E532G na koncentraci formiátu sodného je znázorněna na Obr. 25.



Obr. 25: Závislost hydrolytické aktivity β -galaktosidázy BgaD-A-E532G se substrátem k *p*NP-Gal na koncentraci externího nukleofilu formiátu sodného. Aktivita byla stanovena z průměru tří paralelních měření, chybové úsečky zobrazují standardní odchylku hodnot aktivit.

5.4.3. Kinetické parametry β -galaktosidáz

Pro enzymy BgaD-A a BgaD-B byly stanoveny kinetické parametry hydrolyzy se standardním substrátem *p*NP-Gal. Byla použita metoda diskontinuálního stanovení. Počáteční rychlost reakce v_0 (mmol/l/min) byla stanovena jako směrnice přímky závislosti množství uvolněného *p*-nitrofenolu na čase. Získané hodnoty v_0 byly vyneseny v závislosti na výchozí koncentraci substrátu v programu GraphPad Prism. Z naměřené závislosti byla stanovena Michaelisova konstanta (K_M) a maximální rychlost reakce (V_{max}). Z těchto veličin byla následně spočtena katalytická konstanta (k_{cat}) a katalytická účinnost (k_{cat}/K_M). Definice jednotlivých veličin jsou uvedeny v kap. 4.9.3. Grafy závislosti počáteční rychlosti reakce na koncentraci substrátu pro oba připravené enzymy jsou znázorněny na obr. 26.



Obr. 26: Průběh závislostí počáteční rychlosti hydrolytické reakce koncentraci substrátu pro enzym BgaD-A (A) a BgaD B (B). Vytvořeno v programu GraphPad Prism.

Z grafů na obr. 26 byly vypočteny hodnoty kinetických parametrů připravených izoform β-galaktosidáz (viz tab. 3).

Tab. 3: Kinetické parametry rekombinantních β-galaktosidáz.

Enzym	K_M [mM]	V_{max} [mmol/l/min]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [l/s/mM]
BgaD-A	$2,32 \pm 0,29$	$0,017 \pm 6 \cdot 10^{-4}$	$7,67 \pm 5 \cdot 10^{-10}$	$3,31 \pm 2 \cdot 10^{-9}$
BgaD-B	$2,39 \pm 0,50$	$0,054 \pm 5 \cdot 10^{-3}$	$6,70 \pm 4 \cdot 10^{-9}$	$2,80 \pm 8 \cdot 10^{-9}$

Z tab. 3 vyplývá, že kinetické parametry hydrolyzy substrátu *p*NP-Gal jsou u obou izoform β-galaktosidázy z *B. circulans* BgaD-A i BgaD-B velmi podobné. I přes jejich katalytickou podobnost se však chovají rozdílně v syntetických reakcích.

5.5. Enzymová galaktosylace

Připravené β-galaktosidázy byly použity k enzymové galaktosylaci různých sacharidů, a byly tak připraveny oligosacharidové produkty s širokým využitím, např. jako inhibitory galektinů nebo jako analogy galaktooligosacharidů mateřského mléka. Galaktosylací byly připraveny disacharid LacNAc (Galβ4GlcNAc), jeho funkcionalizovaný derivát LacNAc-N₃, galaktosylovaný *N,N'*-diacetylchitobiosyl-azid Galβ4(GlcNAc)₂-N₃ a galaktosylovaný *N,N',N''*-triacetylchitotriosyl-azid Galβ4(GlcNAc)₃-N₃. Výtěžky a čistota produktů jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Výtěžky a čistota připravených produktů

Produkt	Enzym	Výtěžek [%]	Čistota dle HPLC [%]
LacNAc	BgaD-B	62	99
LacNAc-N ₃	BgaD-A-E532G	25	78
Galβ4(GlcNAc) ₂ -N ₃	BgaD-A	24	79
Galβ4(GlcNAc) ₃ -N ₃	BgaD-A	18	67

Z Tab. 4 je patrné, že všechny produkty se podařilo připravit čisté a v dobrých výtěžcích. Zkrácená izoforma β-galaktosidázy BgaD-B je synteticky velmi účinná a reakce probíhají ve vysokých výtěžcích.

Mutantní β -galaktosidáza BgaD-A-E532G byla analyzována při reakci s donorem α -GalF, avšak reakce neprobíhala. α -GalF pravděpodobně není vhodným substrátem pro tento enzym. Dle molekulárního modelování, které bylo provedeno Dr. Natalií Kulik z Centra nanobiologie a strukturní biologie MBÚ AV ČR, se fluoridový substrát sice váže do aktivního centra enzymu stejně silně jako *p*NP-Gal, ale enzym ho není schopný dále procesovat. Enzym byl díky své zbytkové hydrolytické aktivitě použit na syntézu funkcionalizovaného disacharidu LacNAc-N₃ s donorem *p*NP-Gal. Reakce si vyžádala delší čas z důvodu nízké aktivity enzymu, na druhou stranu zde nedocházelo k žádné hydrolýze požadovaného produktu. Mutantní enzym BgaD-A-E532G se tedy choval jako transglykosidáza.

6. Diskuze

Bakterie *Bacillus circulans* produkuje různé typy β -galaktosidáz. β -Galaktosidáza z *B. circulans* (BgaD) se hojně využívá v potravinářském průmyslu na syntézu galaktooligosacharidů (GOS) přidávaných do sacharidů mateřského mléka (HMO) a prebiotik (Yin *et al.* 2017). Analýza komerčního přípravku β -galaktosidázy BgaD od firmy Biolacta[®] (Daiwa Kasei, Shiga, Japan) ukázala, že obsahuje čtyři izoenzymové varianty – BgaD-A (189 kDa), BgaD-B (155 kDa), BgaD-C (135 kDa) a BgaD-D (92 kDa) (Song, Imanaka, *et al.* 2011). Izoformy β -galaktosidázy jsou v bakteriích *Bacillus circulans* tvořeny posttranslačně zkrácením endogenními proteázami na C-konci. Nejkratší izoforma β -galaktosidázy BgaD-D byla jako jediná krystalizována (Ishikawa *et al.* 2015); tento enzym tvoří dlouhé řetězce galaktooligosacharidů a používá se např. pro přípravu produktu Vivinal[®] GOS.

Izoformy BgaD-A a BgaD-B byly předmětem této práce. Ani jedna z těchto variant nebyla doposud podrobněji charakterizována, ale předpokládá se, že by měly být selektivní pro tvorbu glykosidové vazby β -1,4 a kratších řetězců oligosacharidů. Vzhledem k tomu, že komerční přípravek surové nativní β -galaktosidázy obsahuje nežádoucí vedlejší enzymové aktivity (Tavares *et al.* 2020) a na trhu není žádná regioselektivní β -galaktosidáza, je studium těchto izoform smysluplné i z praktického hlediska. Pomocí rekombinantních β -galaktosidáz je možné připravit bioaktivní galaktosidy využitelné např. jako inhibitory galektinů.

Pro expresi konstruktů β -galaktosidázy *bgaD-A-WT* s histidinovou kotvou byl navržen vektor pCold II. Tento vektor byl vybrán na základě literatury (Song, Imanaka *et al.* 2011) z toho důvodu, že se považuje za vhodný pro výtěžnou expresi a správné sbalení větších proteinů, jako je BgaD-A (189 kDa), za využití principu tzv. chladové kultivace. Klasickým postupem kultivace při 37 °C by mohlo dojít k nesprávnému sbalení proteinu a tvorbě inkluzních tělísek. Vektor obsahuje promotor proteinu chladového šoku a při nízké teplotě kultivace (15 °C) dojde k indukci syntézy požadovaného proteinu a zároveň snížení exprese hostitelských proteinů a potlačení aktivity proteáz. Tím je růst bakterií zpomalen a proteiny jsou správně sbaleny. Komerční plazmid byl dále použit na cílenou mutagenezi a rekombinantní expresi enzymu.

Pro cílenou mutagenézi β -galaktosidázy BgaD-A byl vybrán komerční set *Quick Change Lighting Site-Directed Mutagenesis Kit* od firmy Agilent Technologies, který umožňuje snadnou a rychlou mutagenézi plazmidů do velikosti 10 kpb (plazmid genu *bgaD-A* ve vektoru pCold II má velikost 9,6 kpb). Tento set byl zvolen také kvůli lepším předchozím zkušenostem školicího pracoviště v porovnání se samostatně dostupnými DNA polymerázami. Bylo postupováno podle instrukcí výrobce, ale uvedený doporučený postup transformace nevedl k nárůstu kolonií po transformaci do kompetentních buněk XL10-Gold *E. coli*. Důvodem bylo pravděpodobně malé množství plazmidu (2 μ l) k transformaci a/ nebo jiné médium pro kultivaci (NZY⁺ medium). Proto byl následně zvolen postup transformace ověřený na školicím pracovišti, kdy kompetentní buňky *E. coli* Top10 byly transformovány 10 μ l mutantního plazmidu a kultivovány na LBA médiu. V tomto případě již došlo k nárůstu bakteriálních kolonií, které mohly být použity na screening. Vzhledem k tomu, že šest z deseti sekvenovaných vzorků obsahovalo požadovanou mutaci, lze říci, že komerční set byl velmi účinný na cílenou mutagenézi.

Zkrácená varianta β -galaktosidázy BgaD-B byla též připravena pomocí cílené mutagenéze. Gen β -galaktosidázy *bgaD-A* bylo nutné zkrátit o 945 bazí, abychom získaly gen β -galaktosidázy *bgaD-B*. Pro tento postup byl zvolen komerční set „*Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit*“ od firmy ThermoFisher Scientific. Principem této metody byla amplifikace DNA pouze do místa, kde končí gen zkrácené varianty. Primery byly navrženy tak, aby forward primer nasedal na 5'-konec genu *bgaD-B* a reverse primer na jeho 3'-konec. Oba primery byly fosforylované na 5'-konci, aby mohla být lineární vlákna DNA vytvořená PCR reakcí spojena do cirkulárního plazmidu pomocí T4 DNA ligázy. Při mutagenézi bylo postupováno dle návodu ke komerčnímu setu. V prvním pokusu byl použit jako templát nenařaděný plazmid *bgaD-A* o vysoké koncentraci (5 μ g) a 25 cyklů pro PCR reakci. Dále byla provedena ligace, transformace a izolace genu v analytickém množství. Žádný vzorek však neobsahoval požadovaný gen zkrácené varianty *bgaD-B*. Tento postup byl nevhodný pravděpodobně kvůli příliš vysoké koncentraci a nemohlo tak dojít k dostatečné amplifikaci zkráceného genu. V dalším pokusu byl proto jako templát použit nařaděný plazmid *bgaD-A* (1 ng) a 30 cyklů pro PCR reakci. V tomto případě již došlo k amplifikaci genu zkrácené varianty a izolovaný plazmid s ověřenou sekvencí mohl být použit pro produkci enzymu.

Postup chladové rekombinantní exprese β -galaktosidázy z *B. circulans* BgaD-A, BgaD-B a BgaD-A-E532G v *E. coli* bylo nutno optimalizovat. Vinou nízké teploty

nedocházelo totiž k dostatečnému nárůstu bakteriální kultury, a tím byl výtěžek produkce nižší. V prvním pokusu produkce bylo očkováno prekulturou a vytvořené hlavní kultury byly hned inkubovány při 15 °C a po třech hodinách byla provedena indukce exprese enzymu přidáním IPTG, jak je doporučeno v literatuře (Song, Imanaka *et al.* 2011). Produkce byla ukončena už po 20 hodinách. Došlo však k malému nárůstu bakteriální kultury a nízkému výtěžku produkce enzymu. V optimalizovaném postupu byly hlavní kultury nejprve kultivovány při 37 °C, po nárůstu optické denzity (OD_{600}) na alespoň 0,8 byla provedena indukce exprese enzymu přidáním IPTG a teprve poté byly kultury kultivovány při 15 °C. Produkce byla ukončena až po 28 hodinách, ve stacionární fázi růstu buněk. Došlo tak k většímu nárůstu bakterií a získání vyššího výtěžku produkce β -galaktosidáz. Všechny β -galaktosidázy byly dialyzovány v Sørensenově pufru pH 6,0 a po dialýze a sterilní filtraci skladovány při 4 °C. Enzymy byly takto stabilní a aktivní po dobu několika měsíců.

Všechny připravené enzymové varianty β -galaktosidáz byly biochemicky charakterizovány za použití standardního substrátu *pNP-Gal*. Dle výsledků z komerčního hrubého preparátu β -galaktosidázy z *B. circulans* jsme očekávali pH optimum mezi 5-7 (Tavares *et al.* 2020). Tento předpoklad se potvrdil, pH optimum β -galaktosidázy BgaD-A bylo stanoveno na pH 6,0. Při tomto pH má enzym BgaD-A nejvyšší aktivitu, ale posléze se ukázalo, že pro enzymovou galaktosylaci je vhodnější pH 5,0 (acetátový pufr), při kterém vzniká méně nežádoucích regioizomerů (Tavares *et al.* 2020). Dále byla proměřením závislosti aktivity na stoupající teplotě stanoveno teplotní optimum. Teplotní optimum β -galaktosidázy BgaD-A bylo stanoveno na 40 °C. Tyto výsledky jsou obdobné jako u rekombinantní β -galaktosidázy BgaC z *B. circulans* (Fujimoto *et al.* 1998). Průběh závislosti aktivity β -galaktosidázy BgaD-B na pH byl však rozdílný. Byly zde nalezeny větší výkyvy aktivity při změně pH. To může být způsobeno různou protonací enzymu a aktivací enzymu při daném pH. Pro enzymovou galaktosylaci za katalýzy β -galaktosidázou BgaD-B bylo zvoleno pH 6,0 (Sørensenův pufr), které se z analytických reakcí zdálo optimální pro syntézu kratších řetězců. Také teplotní optimum β -galaktosidázy BgaD-B bylo odlišné od její delší izoformy a bylo stanoveno na 65 °C. Při této teplotě má enzym nejvyšší hydrolytickou aktivitu, avšak pro enzymovou reakci se používá teplota 35 °C z důvodu lepší stability enzymu a vyšší efektivity při syntéze sacharidových produktů (Bojarová *et al.* 2019).

Dále byly stanoveny kinetické parametry β -galaktosidáz se standardním substrátem *pNP-Gal* (maximální rychlost reakce V_{max} a Michaelisova konstanta K_M , katalytická

konstanta k_{cat}). Z výsledků vyplývá, že substrát *p*NP-Gal nemá vysokou afinitu k β -galaktosidáze (K_M bylo stanoveno na 2,3 mM, vysoká afinita substrátu by znamenala řádově nižší hodnotu K_M), i tak je vhodný pro enzymovou galaktosylaci. Obě izoformy β -galaktosidázy BgaD-A i BgaD-B mají podobné kinetické parametry, a přesto se chovají odlišně při enzymové syntéze. Rozdílné chování v syntetických reakcích může být tedy dáno spíše rozdílnou afinitou k sacharidovému akceptoru (Garcia-Oliva *et al.* 2019), ke vznikajícímu produktu nebo jinými parametry, které budou předmětem dalšího studia.

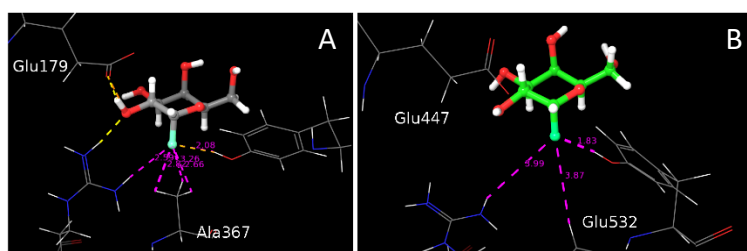
Rekombinantní β -galaktosidáza BgaD-A je selektivní pro přípravu krátkých sacharidových řetězců a byla použita na syntézu funkcionalizovaného *N*-acetylglukosaminu (LacNAc-N₃) a galaktosylaci chitooligomerních linkerů, které se dají využít jako vysoce afinitní inhibitory galektinů. Tato část práce byla formou posteru prezentována na mezinárodní konferenci EUROCARB 2019 v Leidenu. Připravená zkrácená forma β -galaktosidázy BgaD-B je rovněž selektivní pro syntézu kratších sacharidů. Na rozdíl od β -galaktosidázy BgaD-A se její kratší varianta ukázala jako účinnější pro enzymovou galaktosylaci různých substrátů. Kromě toho u reakcí katalyzovaných β -galaktosidázou BgaD-B stačí pouze nízká koncentrace enzymu (řádově setiny U/ml). β -Galaktosidáza BgaD-B byla použita na syntézu *N*-acetylglukosaminu ve vysokém výtěžku, který není možný dosáhnout pomocí jiných již známých glykosidáz ani BgaD-A. Potenciál β -galaktosidázy BgaD-B pro enzymovou galaktosylaci bude předmětem další práce na školicím pracovišti.

Mutantní forma β -galaktosidázy BgaD-A-E532G nemohla být charakterizována klasickými biochemickými parametry z důvodu téměř zanedbatelné hydrolytické aktivity. U mutantních glykosidáz je možné obnovení hydrolytické aktivity přidáním externího nukleofilu, který zastoupí roli nukleofilního aminokyselinového zbytku v aktivním centru enzymu. Obnovení hydrolytické aktivity probíhá různým mechanismem podle daného mutantu. Na obnovení aktivity se jako externí nukleofil obvykle využívá azid sodný nebo formiát sodný. Vždy je nutné ověřit, který z nukleofilů bude pro daný mutantní enzym vhodnější. Např. pro rekombinantní β -galaktosidázu z *B. licheniformis* mutant E138A nemá přidavek formiátu sodného žádný efekt, ale pro mutant E138A je formiát sodný lepší aktivátor než azid sodný (Viladot *et al.* 1998). Tento princip byl ověřen i mými výsledky. Hydrolytickou aktivitu mutantní varianty β -galaktosidázy BgaD-A-E532G bylo možné

obnovit přidavkem formiátu sodného, zatímco přidavek azidu sodného neměl na aktivitu žádný efekt. Formiát sodný se pravděpodobně se lépe váže do aktivního centra enzymu.

Na tyto výsledky bylo navázáno analytickými reakcemi se substrátem α -D-galaktopyranosyl fluoridem (α -GalF). Mutací katalytického nukleofilu obvykle dojde k úplnému zrušení hydrolytické aktivity, a enzym tak katalyzuje jiným mechanismem, který využívá α -glykosyl fluoridy opačné anomerní konfigurace než původní substrát (podrobně viz kap. 2.3.3). Např. pomocí mutantní β -galaktosidázy z *B. circulans* BgaC-E233G bylo za použití donoru α -GalF možné syntetizovat sacharidy založené na *N*-acetylaktosaminu ve vysokých výtěžcích (Henze *et al.* 2014).

Předpokládali jsme, že naše mutantní β -galaktosidáza BgaD-A-E532G se bude chovat obdobně jako β -galaktosidáza BgaC-E233G. Zjistili jsme však, že pro náš enzym není α -GalF vhodným substrátem. Za použití α -GalF jako donoru v transglykosylačních reakcích nedocházelo k žádné syntéze produktu. Naše hypotéza, že α -GalF není vhodným substrátem pro β -galaktosidázu BgaD-A-E532G, byla potvrzena molekulárním modelováním ve spolupráci s Dr. Natálií Kulik z Centra nanobiologie a strukturní biologie MBÚ AV ČR. Bylo zjištěno, že α -GalF se sice do aktivního centra mutantního enzymu váže stejně silně ($-8,2$ kcal/mol) jako *p*NP-Gal u WT enzymu ($-8,8$ kcal/mol), ale mutant BgaD-A-E532G ho není schopný dále procesovat. Z modelu aktivního centra enzymu na Obr. 27 je patrné, že α -GalF se u β -galaktosidázy z *Bacillus circulans* BgaD-A-E532G váže menším počtem vodíkových vazeb (na obr. čárkovaně) než α -GalF u mutantu E367A β -galaktosidázy z *Agrobacterium tumefaciens*.



Obr. 27: Model aktivního centra β -galaktosidázy z *Bacillus circulans* (B) s navázaným α -GalF v porovnání s aktivním centrem β -galaktosidázy z *Agrobacterium tumefaciens* (A) (PDB kód 6RJK). Model vytvořen ve spolupráci s Dr. Natálií Kulik.

Díky zbytkové hydrolytické aktivitě byla β -galaktosidáza BgaD-A-E532G použita na syntézu LacNAc-N₃ za stejných podmínek jako za katalýzy WT enzymem BgaD-A. Na syntézu byl použit donor *p*NP-Gal a reakce sice probíhala delší dobu, než je obvyklé u hrubého komerčního preparátu (Tavares *et al.* 2020), ale na rozdíl od WT enzymu nedocházelo k žádné hydrolýze produktu. Mutantní enzym BgaD-A-E532G tedy funguje jako transglykosidáza. Jedná se o první dokumentovaný případ takového chování u glykosidázy s klasickým retenujícím mechanismem. Podobné chování bylo pozorováno u série mutantních variant β -*N*-acetylhexosaminidázy z *Talaromyces flavus*; tento enzym ale využívá modifikovaného retenujícího mechanismu s asistencí substrátu (Kapešová *et al.* 2020). Pro zvýšení výtěžku syntézy LacNAc-N₃ za použití mutantu BgaD-A-E532G bude nutno reakci dále optimalizovat.

7. Souhrn

Závěrem bych ráda krátce shrnula výsledky této práce. Na základě poznatků z literatury jsem navrhla konstrukt nejdelsí izoformy A β -galaktosidázy z *B. circulans* (BgaD-A) nesoucí histidinovou kotvu a jeho zaklonování do vektoru pCOLD II pro chladovou expresi velkých proteinů. Příslušný plazmid byl připraven komerčně. Exprimovala jsem gen tohoto enzymu v *E. coli*; produkce enzymu byla optimalizována při 15 °C a enzym byl biochemicky charakterizován. β -Galaktosidáza BgaD-A byla použita na enzymovou galaktosylaci, konkrétně na syntézu disacharidu LacNAc-N₃ a galaktosylovaných chito oligomerních linkerů. Tyto látky mají potenciální využití pro konstrukci multivalentních inhibitorů galektinů.

Dále byla pomocí cílené mutagenese připravena mutantní varianta β -galaktosidázy s cílem zvýšit syntetický potenciál enzymu. Byla provedena mutace katalytického nukleofilu E532, kyselina glutamová byla zaměněna za glycin. Výsledný mutantní enzym měl výrazně potlačenou hydrolytickou aktivitu, což je ve shodě s naším předpokladem na základě literatury. Překvapivě však, ačkoliv se jedná o klasický postup pro přípravu glykosyntázy procesující jako substrát glykosyl-fluoridy opačné anomerní konfigurace, v tomto případě není α -D-galaktosyl-fluorid akceptován jako substrát. Toto chování lze osvětlit na základě molekulárního modelování a takový případ nebyl ještě nikdy literárně zdokumentován.

V další části práce byla připravena zkrácená varianta β -galaktosidázy z *B. circulans*. Pomocí PCR reakce byl amplifikován pouze gen odpovídající zkrácené formě β -galaktosidázy BgaD-B. Enzym byl produkován v *E. coli* a biochemicky charakterizován. β -Galaktosidáza BgaD-B byla použita na syntézu *N*-acetylaktosaminu ve vysokém výtěžku, který nelze takto efektivně dosáhnout jinými dostupnými glykosidázami. β -Galaktosidáza BgaD-B se ukázala jako synteticky nejúčinnější pro galaktosylaci řady dalších látek.

Část práce jsem prezentovala na mezinárodní konferenci EUROCARB 2019 v Nizozemsku (viz Příloha 2). Připravené enzymy budou dále studovány; budou jednak využity k syntéze funkcionalizovaných sacharidů a jednak budou provedeny další mutace β -galaktosidázy za cílem zvýšit výtěžek reakcí.

8. Seznam použité literatury

- Alebouych, M, P Gooran Orimi, M Azimi-Rad, M Tajbakhsh, E Tajeddin, S Jahani Sherafat, E Nazemalhosseini Mojarad, a Mr Zali. 2011. "Fatal Sepsis by *Bacillus circulans* in an Immunocompromised Patient." *Iranian Journal of Microbiology* 3 (3): 156–58.
- Bacigalupo, María L., Malena Manzi, Gabriel A. Rabinovich, María F. Troncoso. 2013. "Hierarchical and Selective Roles of Galectins in Hepatocarcinogenesis, Liver Fibrosis and Inflammation of Hepatocellular Carcinoma." *World Journal of Gastroenterology* 19 (47): 8831–49.
- Barondes, S. H., D. N.W. Cooper, M. A. Gitt, H. Leffler. 1994. "Galectins. Structure and Function of a Large Family of Animal Lectins." *Journal of Biological Chemistry*.
- Binh, Nguyen Huy, Kunio Satoh, Kazuhiro Kobayashi, Manabu Takamatsu, Yuichiro Hatano, Akihiro Hirata, Hiroyuki Tomita, Toshiya Kuno, Akira Hara. 2013. "Galectin-3 in Preneoplastic Lesions of Glioma." *Journal of Neuro-Oncology* 111 (2): 123–32.
- Bode, Lars. 2012. "Human Milk Oligosaccharides: Every Baby Needs a Sugar Mama." *Glycobiology* 22 (9): 1147-62.
- Bode, Lars, Evelyn Jantscher-Krenn. 2012. "Structure-Function Relationships of Human Milk Oligosaccharides." *Advances in Nutrition* 3 (3): 383S-391S.
- Bojarová, Pavla, Bruthans, Jan a Vladimír Křen. 2019. "β-N-Acetylhexosaminidases-the Wizards of Glycosylation." *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 (19): 7869–7881.
- Bojarová, Pavla, a Vladimír Křen. 2009. "Glycosidases: A Key to Tailored Carbohydrates." *Trends in Biotechnology* 27 (4): 199–209.
- Boyer, P. L., A. L. Ferris, S. H. Hughes. 1992. "Cassette Mutagenesis of the Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1." *Journal of Virology* 66 (2): 1031–1039.
- Collado, Maria Carmen, Maria Cernada, Christine Bäuerl, Máximo Vento, Gaspar Pérez-Martínez. 2012. "Microbial Ecology and Host-Microbiota Interactions during Early Life Stages." *Gut Microbes* 3 (4): 352-65.
- Cuthbert, R. J., P. Visser, H Louw, P. G. Ryan. 2007. "Enzymatic Approaches to

- O*-Glycoside Introduction: Glycosidases.” In *Comprehensive Glycoscience*, edited by The Kamerling, J.P. (Utrecht University and Netherlands), 38: 453–87.
- Dalotto-Moreno, Tomás, Diego O. Croci, Juan P. Cerliani, Verónica C. Martinez-Allo, Sebastián Dergan-Dylon, Santiago P. Méndez-Huergo, Juan C. Stupirski, *et al.* 2013. “Targeting Galectin-1 Overcomes Breast Cancer-Associated Immunosuppression and Prevents Metastatic Disease.” *Cancer Research* 73 (3): 1107–17.
- Dean L. 2005a. “The ABO Blood Group - Blood Groups and Red Cell Antigens - NCBI Bookshelf.” In . <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2267/>.
- Dean L. . 2005b. “The Rh Blood Group - Blood Groups and Red Cell Antigens - NCBI Bookshelf.” In . <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2269/>.
- Dougherty, Brian A., and Hamilton O. Smith. 1999. “Identification of *Haemophilus influenzae* Rd Transformation Genes Using Cassette Mutagenesis.” *Microbiology* 145 (2): 401–9.
- Earl, Ashlee M., Richard Losick, Roberto Kolter. 2008. “Ecology and Genomics of *Bacillus subtilis*.” *Trends in Microbiology* 16 (6): 269-75
- Ehling-Schulz, Monika, Martina Fricker, Siegfried Scherer. 2004. “*Bacillus cereus*, the Causative Agent of an Emetic Type of Food-Borne Illness.” *Molecular Nutrition & Food Research* 48 (7): 479–87.
- Eiwegger, Thomas, Bernd Stahl, Joachim Schmitt, Günther Boehm, Marianne Gerstmayr, Josefa Pichler, Eleonora Dehlink, Christine Loibichler, Radvan Urbanek, Zsolt Szépfalusi. 2004. “Human Milk-Derived Oligosaccharides a Plant-Derived Oligosaccharides Stimulate Cytokine Production of Cord Blood T-Cells in Vitro.” *Pediatric Research* 56 (4): 536–40.
- Fellouse, Frederic A., Kaori Esaki, Sara Birtalan, Demetrios Raptis, Vincenzo J. Cancasci, Akiko Koide, Parkash Jhurani, *et al.* 2007. “High-Throughput Generation of Synthetic Antibodies from Highly Functional Minimalist Phage-Displayed Libraries.” *Journal of Molecular Biology* 373 (4): 924–40.
- Fettke, Joerg, Tansy Chia, Nora Eckermann, Alison Smith, Martin Steup. 2006. “A Transglucosidase Necessary for Starch Degradation and Maltose Metabolism in Leaves at Night Acts on Cytosolic Heteroglycans (SHG).” *Plant Journal* 46 (4): 668–84.

- Fialová, Pavla, Lenka Weignerová, Jana Rauvolfová, Věra Přikrylová, Andrea Pišvejcová, Rüdiger Ettrich, Marek Kuzma, Petr Sedmera, Vladimír Křen. 2004. “Hydrolytic and Transglycosylation Reactions of N-Acyl Modified Substrates Catalysed by β -N-Acetylhexosaminidases.” *Tetrahedron* 60 (3): 693–701.
- Freeze, Hudson H., Alan D. Elbein. 2009. *Glycosylation Precursors. Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301253>.
- Fujimoto, Hiroshi, Mariko Miyasato, Yoshiyuki Ito, Takashi Sasaki, Katsumi Ajisaka. 1998. “Purification and Properties of Recombinant β -Galactosidase from *Bacillus circulans*.” *Glycoconjugate Journal* 15 (2): 155–60.
- Garcia-Oliva, Cecilia, Pilar Hoyos, Lucie Petrásková, Natalia Kulik, Helena Pelantová, Alfredo H. Cabanillas, Ángel Rumbero, Vladimír Křen, María J. Hernáiz, Pavla Bojarová. 2019. “Acceptor Specificity of β -N-Acetylhexosaminidase from *Talaromyces Flavus*: A Rational Explanation.” *International Journal of Molecular Sciences* 20 (24): 6181
- Hakamada, Yoshihiro, Keiji Endo, Shuichi Takizawa, Tohru Kobayashi, Tsuyoshi Shirai, Takashi Yamane, Susumu Ito. 2002. “Enzymatic Properties, Crystallization, and Deduced Amino Acid Sequence of an Alkaline Endoglucanase from *Bacillus circulans*.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1570 (3): 174–80.
- Hansen,’, Jeffrey B, R Scott Doubet, and And J Ram’. 1984. “Alginase Enzyme Production by *Bacillus circulans*.” *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 47.
- Henze, Manja, Dong Ju You, Claudia Kamerke, Natalie Hoffmann, Clement Angkawidjaja, Sabrina Ernst, Jörg Pietruszka, Shigenori Kanaya, Lothar Elling. 2014. “Rational Design of a Glycosynthase by the Crystal Structure of β -Galactosidase from *Bacillus circulans* (BgaC) and Its Use for the Synthesis of N-Acetyllactosamine Type 1 Glycan Structures.” *Journal of Biotechnology* 191 (December): 78–85.
- Hodoniczky, Jason, Zhi Zheng Yuan, David C. James. 2005. “Control of Recombinant Monoclonal Antibody Effector Functions by Fc N-Glycan Remodeling in Vitro.” *Biotechnology Progress* 21 (6): 1644–52.
- Hsu, Ya-Ling, Cheng-Ying Wu, Jen-Yu Hung, Yi-Shiuan Lin, Ming-Shyan Huang, Po-Lin Kuo. 2013. “Galectin-1 Promotes Lung Cancer Tumor Metastasis by Potentiating

- Integrin A6 β 4 and Notch1/Jagged2 Signaling Pathway.” *Carcinogenesis* 34 (6): 1370–81.
- Huang, Renhua, Pete Fang, Brian K. Kay. 2012. “Improvements to the Kunkel Mutagenesis Protocol for Constructing Primary and Secondary Phage-Display Libraries.” *Methods* 58 (1): 10–17.
- Hutchison, C. A., S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith. 1978. “Mutagenesis at a Specific Position in a DNA Sequence.” *Journal of Biological Chemistry* 253 (18): 6551–60.
- Ishikawa, Kazuhiko, Misumi Kataoka, Toshiaki Yanamoto, Makoto Nakabayashi, Masahiro Watanabe, Satoru Ishihara, Shotaro Yamaguchi. 2015. “Crystal Structure of β -Galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 31382 (BgaD) and the Construction of the Thermophilic Mutants.” *FEBS Journal* 282 (13): 2540–52.
- Jahn, Michael, Hongming Chen, Johannes Müllegger, Jennifer Marles, R. Antony J. Warren, a Stephen G. Withers. 2004. “Thioglycosynthases: Double Mutant Glycosidases That Serve as Scaffolds for Thioglycoside Synthesis.” *Chemical Communications* 4 (3): 274–75.
- Jahn, Michael, Jennifer Marles, R. Antony J. Warren, Stephen G. Withers. 2003. “Thioglycoligases: Mutant Glycosidases for Thioglycoside Synthesis.” *Angewandte Chemie - International Edition* 42 (3): 352–54.
- Jantscher-Krenn, E., L. Bode. 2012. “Human Milk Oligosaccharides and Their Potential Benefits for the Breast-Fed Neonate.” *Minerva Pediatrica* 64 (1): 83-99.
- Kamerke, Claudia, Martin Pattky, Carolin Huhn, Lothar Elling. 2013. “Synthesis of Nucleotide-Activated Disaccharides with Recombinant β 3-Galactosidase C from *Bacillus circulans*.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 89 (5): 73–81.
- Kapešová, J., Petrásková, L., Kulik, N., Straková, Z., Bojarová P., Markošová, K., Rebroš, M., Křen, V., Slámová, K. 2020. “Transglycosidase activity of glycosynthase-type mutants of a fungal GH20 β -N-acetylhexosaminidase.” *International Journal of Biological Macromolecules* [in print].
- Kayasth, Monika, Varun Kumar, Rajesh Gera. 2017. “Isolation and Identification of Diazotrophic *Bacillus subtilis* Strain SS2 from Saline Soil and Its Potential to Be Used

- as Biofertilizer.” *Journal of Microbiology and Biotechnology Research Scholars Research Library J. Microbiol. Biotech. Res.* Vol. 2012.
- Kunkel, T. A. 1985. “Rapid and Efficient Site-Specific Mutagenesis without Phenotypic Selection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (2): 488–92.
- Leeuwen, Sander S. Van, Bas J.H. Kuipers, Lubbert Dijkhuizen, Johannes P. Kamerling. 2014. “¹H NMR Analysis of the Lactose/ β -Galactosidase-Derived Galacto-Oligosaccharide Components of Vivinal® GOS up to DP5.” *Carbohydrate Research* 400 (December): 59–73.
- Li, Liu Cheng, Jun Li, Jian Gao. 2014. “Functions of Galectin-3 and Its Role in Fibrotic Diseases.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 351 (2): 336-43.
- Lin, Hening, Haiyan Tao, Virginia W. Cornish. 2004. “Directed Evolution of a Glycosynthase via Chemical Complementation.” *Journal of the American Chemical Society* 126 (46): 15051–59.
- Liu, Fu Tong, Gabriel A. Rabinovich. 2005. “Galectins as Modulators of Tumour Progression.” *Nature Reviews Cancer* 5 (1): 29-41.
- Lopez-Andr s N1, Rossignol P, Iraqi W, Fay R, Nu e J, Ghio S, Cleland JG, Zannad F, Lacolley P. 2012. “Association of Galectin-3 and Fibrosis Markers with Long-Term Cardiovascular Outcomes in Patients with Heart Failure, Left Ventricular Dysfunction, and Dyssynchrony: Insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) Trial.” *Eur J Heart Fail* 14: 74–81.
- Lutz, Stefan. 2010. “Beyond Directed Evolution-Semi-Rational Protein Engineering and Design.” *Current Opinion in Biotechnology* 21 (6): 734-743.
- Mackenzie, Lloyd F., Qingping Wang, R. Antony J. Warren, Stephen G. Withers. 1998. “Glycosynthases: Mutant Glycosidases for Oligosaccharide Synthesis.” *Journal of the American Chemical Society* 120 (22): 5583–84.
- Maicas, Sergi, José Mateo. 2016. “Microbial Glycosidases for Wine Production.” *Beverages* 2 (3): 20
- Malet, Carles, Antoni Planas. 1998. “From β -Glucanase to β -Glucansynthase: Glycosyl Transfer to α -Glycosyl Fluorides Catalyzed by a Mutant Endoglucanase Lacking Its

- Catalytic Nucleophile.” *FEBS Letters* 440 (1–2): 208–12.
- McCullum, Elizabeth O., Berea A.R. Williams, Jinglei Zhang, John C. Chaput. 2010. “Random Mutagenesis by Error-Prone PCR.” *Methods in Molecular Biology* 634: 103–109.
- Mueller, A., R. Odze, T. D. Jenkins, A. Shahsesfaei, H. Nakagawa, T. Inomoto, A. K. Rustgi. 1997. “A Transgenic Mouse Model with Cyclin D1 Overexpression Results in Cell Cycle, Epidermal Growth Factor Receptor, and P53 Abnormalities.” *Cancer Research* 57 (24): 5542–49.
- Nakamura, L. K., J. Swezey. 1983. “Taxonomy of *Bacillus circulans* Jordan 1890: Base Composition and Reassociation of Deoxyribonucleic Acid.” *International Journal of Systematic Bacteriology* 33 (1): 46–52.
- Palcic, Monica M. 2011. “Glycosyltransferases as Biocatalysts.” *Current Opinion in Chemical Biology* 15 (2): 226–33.
- “PCold DNA Cold-Shock Expression System.” n.d. Accessed May 30, 2020. <https://www.takarabio.com/products/protein-research/expression-vectors-and-systems/protein-folding-kits/pcold-dna-cold-shock>.
- Perillo, Nancy L., Karen E. Pace, Jeffrey J. Seilhamer, Linda G. Baum. 1995. “Apoptosis of T Cells Mediated by Galectin-1.” *Nature* 378 (6558): 736–39.
- Priest, Fergus G. 2008. “*Bacillus*.” In *Biotechnology: Second, Completely Revised Edition*, 1–12:367–400. Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Puchart, Vladimír. 2015. “Glycoside Phosphorylases: Structure, Catalytic Properties and Biotechnological Potential.” *Biotechnology Advances* 33 (2): 261–76.
- Reetz, Manfred T., Stephanie Wilensek, Dongxing Zha, Karl-Erich Jaeger. 2001. “Directed Evolution of an Enantioselective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis.” *Angewandte Chemie International Edition* 40 (19): 3589–91.
- Rouet, Romain, Kip Dudgeon, Daniel Christ. 2012. “Generation of Human Single Domain Antibody Repertoires by Kunkel Mutagenesis.” *Methods of Molecular Biology* 907: 195–209.
- Saiki, Randall K., Stephen Scharf, Fred Faloona, Kary B. Mullis, Glenn T. Horn, Henry A. Erlich, Norman Arnheim. 1985. “Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic

- Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia.” *Science* 230 (4732): 1350–54.
- Schönfeld, H. 1926. “Über Die Beziehung Der Einzelnen Bestandteile Der Frauenmilch Zur Bifidusflora.” *Jahrbuch Kinderh* 113: 19–60.
- Schou, Charlotte, Grethe Rasmussen, Martin Schulein, Bernard Henrissat, Hugues Driguez. 1993. “4-Thiocellooligosaccharides: Their Synthesis and Use as Inhibitors of Cellulases.” *Journal of Carbohydrate Chemistry* 12 (6): 743–52.
- Sen, S., V. Venkata Dasu, B. Mandal. 2007. “Developments in Directed Evolution for Improving Enzyme Functions.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 143 (3): 212–223.
- Shantha Raju, T., Robert E. Jordan. 2012. “Galactosylation Variations in Marketed Therapeutic Antibodies.” *MAbs* 4 (3): 385–91.
- Simone, Giuseppina, Natalia Malara, Valentina Trunzo, Maria Renne, Gerardo Perozziello, Enzo Di Fabrizio, Andreas Manz. 2014. “Galectin-3 Coats the Membrane of Breast Cells and Makes a Signature of Tumours.” *Molecular BioSystems* 10 (2): 258–65.
- Slámová, Kristýna, Bojarová, Pavla. 2017. “Engineered *N*-Acetylhexosamine-Active Enzymes in Glycoscience.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1861 (8): 2070–87.
- Song, Jingyuan, Kiriko Abe, Hiroyuki Imanaka, Koreyoshi Imamura, Masashi Minoda, Shotaro Yamaguchi, Kazuhiro Nakanishi. 2011. “Causes of the Production of Multiple Forms of β -Galactosidase by *Bacillus circulans*.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 75 (2): 268–78.
- Song, Jingyuan, Hiroyuki Imanaka, Koreyoshi Imamura, Masashi Minoda, Toru Katase, Yukiko Hoshi, Shotaro Yamaguchi, Kazuhiro Nakanishi. 2011. “Cloning and Expression of a β -Galactosidase Gene of *Bacillus circulans*.” *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 75 (6): 1194–97.
- Straub, P., M. Lloyd, E. F. Johnson, B. Kemper. 1993. “Cassette Mutagenesis of a Potential Substrate Recognition Region of Cytochrome P450 2C2.” *Journal of Biological Chemistry* 268 (29): 21997–3.
- Sushma, D.A. 2015. “Chapter 1. General Introduction to Extracellular Polymeric

Substances.”

- Tavares, M. R., Bláhová M., Sedláková L., Lothar E., Pelantová H., Konefal R., Etrych T., Křen V., Bojarová P., Chytil P. 2020. "High-Affinity *N*-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymers with Tailored *N*-Acetylglucosamine Presentation Discriminate between Galectins". *Biomacromolecules* 21 (2): 641–652.
- Trincone, Antonio, Assunta Giordano. 2006. "Glycosyl Hydrolases and Glycosyltransferases in the Synthesis of Oligosaccharides." *Current Organic Chemistry* 10 (10): 1163–93.
- Verschuere, Tina, Jaan Toelen, Wim Maes, Françoise Poirier, Louis Boon, Thomas Tousseyn, Thomas Mathivet. 2014. "Glioma-Derived Galectin-1 Regulates Innate and Adaptive Antitumor Immunity." *International Journal of Cancer* 134 (4): 873–84.
- Vidhyalakshmi, R., C. Valli Nachiyar, G. Narendra Kumar, Swetha Sunkar. 2016. "*Bacillus circulans* Exopolysaccharide: Production, Characterization and Bioactivities." *International Journal of Biological Macromolecules* 87 (June): 405–14.
- Viladot, Josep Lluís, Elisabet De Ramon, Olga Durany, Antoni Planas. 1998. "Probing the Mechanism of *Bacillus* 1,3-1,4- β -D-Glucan 4- Glucanohydrolases by Chemical Rescue of Inactive Mutants at Catalytically Essential Residues." *Biochemistry* 37 (32): 11332–42.
- Vladoiu, Maria C., Marilynne Labrie, Yves St-Pierre. 2014. "Intracellular Galectins in Cancer Cells: Potential New Targets for Therapy (Review)." *International Journal of Oncology* 44 (4): 1001–1014.
- Wakarchuk, Warren W., Robert L. Campbell, Wing L. Sung, Jamshid Davoodi, Makoto Yaguchi. 2008. "Mutational and Crystallographic Analyses of the Active Site Residues of the *Bacillus circulans* Xylanase." *Protein Science* 3 (3): 467–75.
- Wang, Qingping, S. G. Withers, R. W. Graham, D. Trimbur, R. A.J. Warren. 1994. "Changing Enzymic Reaction Mechanisms by Mutagenesis: Conversion of a Retaining Glucosidase to an Inverting Enzyme." *Journal of the American Chemical Society* 116 (25): 11594–95.
- Weijers, Carel A.G.M., Maurice C.R. Franssen, Gerben M. Visser. 2008. "Glycosyltransferase-Catalyzed Synthesis of Bioactive Oligosaccharides."

- Biotechnology Advances* 26 (5): 436–56.
- Wells, James A., Mark Vasser, David B. Powers. 1985. “Cassette Mutagenesis: An Efficient Method for Generation of Multiple Mutations at Defined Sites.” *Gene* 34 (2–3): 315–23.
- Yang, Ri Yao, Gabriel A. Rabinovich, Fu Tong Liu. 2008. “Galectins: Structure, Function and Therapeutic Potential.” *Expert Reviews in Molecular Medicine* 10 (17).
- Yin, Huifang, Tjaard Pijning, Xiangfeng Meng, Lubbert Dijkhuizen, Sander S. Van Leeuwen. 2017. “Biochemical Characterization of the Functional Roles of Residues in the Active Site of the β -Galactosidase from *Bacillus circulans* ATCC 31382.” *Biochemistry* 56 (24): 3109–18.
- Yu, Lili, Willem P.T. Ruifrok, Maxi Meissner, Eelke M. Bos, Harry Van Goor, Bahram Sanjabi, Pim Van Der Harst. 2013. “Genetic and Pharmacological Inhibition of Galectin-3 Prevents Cardiac Remodeling by Interfering with Myocardial Fibrogenesis.” *Circulation: Heart Failure* 6 (1): 107–17.
- Zick, Yehiel, Miriam Eisenstein, Rinat A. Goren, Yaron R. Hadari, Yifat Levy, Denise Ronen. 2002. “Role of Galectin-8 as a Modulator of Cell Adhesion and Cell Growth.” *Glycoconjugate Journal* 19 (7-9): 517–26.

PŘÍLOHA 1

Sekvence genu β -galaktosidázy z *B. circulans bgaD*

5'- GTGAAAAAAGCGATTAGCTGCGTTTTTTTAATTCAGCACTGATTCTATCAAGCTTT
CAAGTCCCTGTACAGGGACAAGCCATGTCAAAAACGACATCGGCAGCAGGAAACAGT
GTGAGCTATGATGGAGAGAGACGAGTGAATTTTAACGAGAATTGGCGATTTCAACGA
GAAACCAATGGAAGTATTGCCGGAGCACAGAATCCTGGCTTTGACGATTCCTCCTGGC
GGAAATTAATCTGCCGCATGACTGGAGTATTGAATTAGATTTTAATAAAAAATTCTCTT
GCCACACATGAAGGCGGTTATTTGGACGGCGGAATCGGCTGGTACCGAAAAACCTTTA
CAATCCCGGAATCGATGAAGGGAAAACGAATTTTCGCTTGATTTTGATGGCGTTTACAT
GAACAGCACCACTATCTAAACGGGGAAAGTGCTCGGGACCTATCCGTTTGGTTATAAT
GCCTTTTCCTATGATATTTCCGACAACTTTATAAAGATGGCAGGGCGAATGTCCTTGT
TGTCAAAGTCAATAACACCCAGCCGAGCAGCCGCTGGTATTCGGGGAGCGGGATCTAC
CGGAATGTCTATCTCACTGTGACCGATCCCATCCATGTGGCTCGCTACGGAACATTTGT
GACAACACCCAATTTAGAGAAATCGATAAAAGAAGACAGGGCTGATGTGAACATCAA
GACGAAAATCAGTAACGATGCTGCTGAGGCGAAACAGGTAAAGATTAATCAACCAT
CTACGATGGGGCTGGGAACACCGTACAGACAGTGGAACGGAGGAAAAACAGCTGC
CGCCGGCACGGTGACTCCGTTTGAACAAAACACAGTCATCAAGCAGCCGAAGCTTTGG
AGCATTGACAAGCCTTATCGATATAACCTTGTTACAGAAGTCATCGTTGGCGGGCAA
CGGTGGATACGTATGAAACAAAATTTGGTGTCAAGTATTTCAAATTTGATGAAAACGA
AGGCTTTTCCTTAAATGGAGAGTATATGAAGCTGCACGGCGTTTCGATGCACCATGAT
TTAGGGGCGCTTGGGGCGGCAACGAATGCACGCGGCGTGGAAGACAAATGCAGATT
ATGAAGGATATGGGGGTCAATGCCATCAGGGTTACCCACAACCCGGCATCACCGGAA
CTGCTGGAGGCAGCTAATAAATTAGGGCTATTCATCATCGAGGAGGCATTTGACAGCT
GGGCCAGTCAAAGAAACCCTATGACTATGGCCGTTTTTTCAATGCATGGGCTGAGCA
CGACATTAAGGAAATGGTCGATCGGGGCAAAAACGAACCAGCTATTATCATGTGGTC
GATCGGAAATGAAATATATGATACGACCAATGCCGCTGGTGTGGAAACAGCACGAAA
TTTAGTGGGTTGGGTAAAAGAAATTGACACCACAAGGCCGACAACGATCGGCCGAGGA
TAAAACCCGCGGAGACAAAGTAAATGTTACACCTATCAACAGCTACATCAAGGAGAT
TTTTAATATTGTGATGTGGTTCGACTGAACTACAGCGAGAACAACCTATGATGGCTAC
CACAAAGCAGAAATCCGTCATGGAAGCTGTACGGCTCG **GAG** ACGTCCTCGGCAACCCGTT
CGCGTGGTGTCTACACGCATCCGTACCAGTATAACCAAAGCACAAAGTATGCTGATTT
ACAGCAATCCTCTTATGACAATGACTATGTCGGCTGGGGACGAACTGCAGAAGATGCA
TGGAAATATGACCGCGACCTGAAGCATATTGCAGGGCAATTTATCTGGACCGGCTTTG
ATTATATTGGCGAGCCGACGCCATATTATAATTCCTATCCTGCAAAAAGCTCCTATTTT
GGTGCTGTGGATACGGCTGGTTTTTCCAAAGGATATTTTCTACTATTACCAAAGCCAATG
GAAAAAGGAGCCTATGGTCCACCTGCTGCCGCATTGGAAGTGGAAAGGAGGGGAAAA
GGTCCGCGTCTTAGCTTATACCAATGCAAGTAAGGTTGAACTTGTTCTAAATGGTGAAT
CGTTAGGGGAGAAGAACTATGACAACAAACAAACCTCCTGGGGAGCACCATACAAAG
AAACAAAGGATGGAAAAACCTATTTGGAGTGGGCCGTACCATTTAAACCGGGCAAAT
TAGAAGCCGTCGCCAAGGATGAAAACGGCAAAGTGATCGCCCCGCGATCAGGTAGTGA
CCGCTGGTGGAGCCAGCCTCTGTCAGATTAACGGCTGATCGTAAGGTGGTCAAGGCGGA
CGGTACGGATCTGTCGTTTATTACAGCAGACATTGTTGATAGTAAAGGGATTGTTGTCC
CGGATGCCGATCATCTGATTACATTTAACGTAACGGGCCAAGGGGAATTGGCCGGGGT
TGATAACGGAAACGCGTCCAGTGTGGAGCGTTACAAGGACAACAAGCGCAAGGCTTT
CAGCGGGAAAGCATTGGCGATTGTTCAATCAAGTAAGCTTTCTGGAAAAATTACGGTC
CATGCGTCAGTGGCAGGGCTTTTCGAGCGATTCCACGAGCGTATTTACGGTAACGCCAG
CTGACCATGACAAAAAGATTGTAGCTGGGATTGATGATGTTAACCTTACTGTCGATGT
CAATGAAGCACCAAAGCTTCCTTCAGAAATCAAGGTTTATTACAGTGATGAGAGTGCA
GCTGCGAAGAATGTGACTTGGGATGAGGTGGATCCAAAGCAGTACAGCACTGTTGGT
GAATTCACAGTGGAAAGGCAGTGTGAGGGAACTTCGCTGAAGGCAAAGGCATTTGTT
ATTGTCAAAGGAATTGTCGCCGTCAAGCCTTATTCAACGGCAACAAAGGTTGGTGTAC
AGCCGGTGTGCCTGAAAAAGCAACCCTTCTTTACAGTGATGGAACAACCAAGGGAG
CAACTGTCACGTGGGATGAGATCCCTGAGGACAAGCTGGCAAAAAGAGGGCCGGTTTA
CCGTCGAGGGCAGTGTGGAGGGAACAGACCTCAAGGCTAATGTCTATGTCAGGGTGA

PŘÍLOHA 1

CAAATGAAGTAAAATCAGTGAATATTATGCTTCAGGAGCAGGGTTCAGCTTATCCAAA
GCTCGAAGCTACTTTTACCAATCCAGCTGACAATCTTCAGCATTGAAACGATGGC
AAGAGCTATACCAATAACCCGGTCAACCGCTGGACGAACTGGACAAGAACACCGCGT
GATGCTGGTGA CTGATTACAGTTAATTTTGGCAAGAAGCATGTGATTAATAATCTAG
ATTTATTTGTTTTTACCGACAGCGGCACGGTGGTTCAGAAAAGGCAGAGGTCCAATA
TTGGGATGGAACGGCGTGGAAAGGATGTGCAAAAATCTAACACAGCCATCGCCATATGT
GGTAGAGAAAAATGAACTTACATTTGATGCGGTTCGCGACAGAAAAGCTGAAATTCCA
TTTGACACCATCTGTGAAAGGGAAATTCCTAGCTCTAACGGAAGCAGAGGTGTACGCC
GATCAGATTGTGATGGGTGAAACAGCAAAACTTCAAAGTATTACGGTGAATGGGAAA
GCATTAGAAGGCTTTGATCACGCTAAAAAGAATTATGAACTTGTACTTCCATATGGAA
GCGAGCTTCCTAAGATTGAGGCGGTGCTGCCGACAATGCAACTGTCACCATTTTACC
GGCATTCTCCTATCCGGGAACAGCAAAACTATTTGTCACTTCAGAGGATGGGAAGGTA
ACTACTGAGTACAGTATTGGTGTCTTCTACAGAAGAGCCAAAGCTCGTCTCCGCAGAGT
TATCCGCGGACAAGACGAATGTCATGGAGGACGATATCATCGATCTGAAGGTAATTGG
TCTCTTCGAAAGCAAGGAAAAGATTGATGTGACCGACAGCCAGCCGACATATGAATTT
GACCAGCAGATTATTAATAATTGAAGGCAATAAGCTGTATGCGCTGGAAACAGGAAAT
GTCAAGGTGAAAGTGACGGTGACATATAAGGGTGTGAGTGTCAACACCTGCGCTTG
AGTTTACGATCGCGAAAACCTGCTCCAAAATACATTACGAGCTTAGAGCCTGTAC
GGTTGTTGTTAAAAAAGGAGAAGCGCCGGAGCTTCAGCAACGGTTGTGGCCATTAT
AACCAGGAATCCCGCGGGATGTTAAGGTGAAGTGGGAAAGAATCAATCCGTCTAAG
TACCAGCAGCTAGGCGAGTTTACCGTATCTGGCATGGTGGAAAGGGACCGATATAAAA
GCCAAGCAAAAGTGATTGTAAAAGGGGCTGTTGCGGTTCGAGGATATTAGAATGGCT
GTGCTGTTAAAGCAAATGCCACAGCTGCCGGGCAAGGTTACAGTCTATTATAGTGACG
GAGCGGAAGAACAAGAGCGGTCAAGTGGGAGGAAATCCCGCAGGAGGAACTCGAG
AATGTCGGTGAATTTAAGGTTAAAGGTGATGTTAATGGAGTGAAGCTGAAAGCAACA
GCCACTATTCGAGTAACCGATGAAGTCGGCGGCGAGCAGAATATCAGCCGGGCTAAA
AATGGTTATGAATACCCGAAGGCTGAAGCTTCCTTTACCAACAATGGCCCTGGATCAA
GCGATCGAATCGAGGCCATCAATGATGACGTGATCTCCTACGAGGCTAATCCGCATAA
TCGCTGGACGAATTGGCAGCCGGTACCGCGTGCAGGGGACTGGGTTTCTATCACCTTT
GGAGACTATGAGCCTACGGAATATGATGTTGATAGCATGGAGATCCACTGGTTCGCGG
ATCATGGGACCTCGTATCCAGAGCGTTTCAAATCGAATATAAATCCGGTGATAGCTG
GAAGGAAGTCACCAGCCTGAAAAGCGATCCAGCCTCTCCGGCCTTGGGTAAGGCAAA
TGTCTATAGCTTTGATCGAGTAAAAACATCGGCTATACGAGTGAAAATGACAGCACAA
GCCGGCAAAAGCTTAGCCATTACCGAGCTGAAAGTATTTCAAATGGCCAAAGGCA
GGTACCGAACCCAGAGGTGACCGATATTAAGGTTCGGAGGAAAATCGATTCTGGAGGAC
TTTGAACAAAAAGGCGATCACTATGAAGTAACGATTGATGCAGGAGATGCGAATGTA
ATGCCGAAAATCAATGTAAAGGCTAAGGACCAGACGAGTATTACGATTGTGCCAGCA
GTTACCTCTCCATCCACGGCAAAGGTAATTGCTAAATCCGAGGATGGCAAGAAAGTGA
AGTCTATAGCATTCACTATAAATAA – 3'



Pozn.: Červeně je označena pozice bázi, která byla mutována na přípravu genu β -galaktosidázy *bgaD-A-E532G* (záměna GAG za GGG), modře je zobrazena část sekvence, o kterou byl gen zkrácen na přípravu zkrácené varianty β -galaktosidázy *bgaD-B*.

PŘÍLOHA 1

Použité sekvenační primery:

- pCOLD_Fw: 5'- ACGCCATATCGCCGAAAGG - 3'
- pCOLD_Re: 5'- GGCAGGGATCTTAGATTCTG - 3'
- BgaD-A_MidFw: 5'- CACCATGATTTAGGGGCGCTTGGGGCG - 3'
- BgaD-A_MidFw2: 5'- CATACAAAGAAACAAAGGATGGAAA - 3'
- BgaD-A_MidRe: 5'- ACAATCACTTTTGCTTGGGCTTTTA - 3'

RECOMBINANT SELECTIVE β 4-GALACTOSIDASE IN THE SYNTHESIS OF GALECTIN LIGANDS

Michaela Hovorková^{1,2}, Helena Pelantová¹, Vladimír Křen¹, Pavla Bojarová^{1,*}

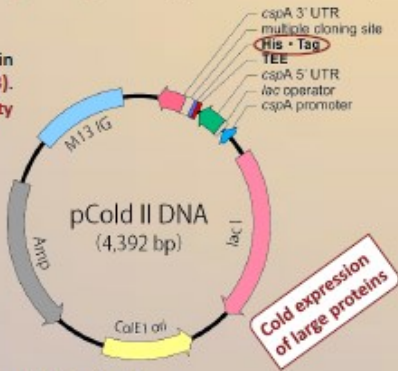
¹ Laboratory of Biotransformation, Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, 14220 Prague, Czech Republic.
E-mail: hovorkovam@natur.cuni.cz; *bojarova@biomed.cas.cz

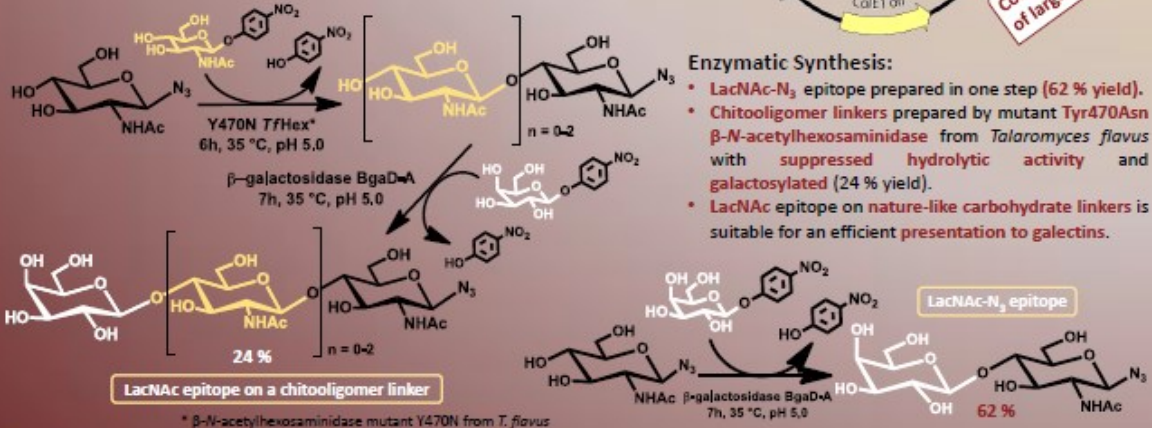
² Faculty of Natural Sciences, Charles University Prague, Czech Republic

Introduction:
 β -Galactosidases (EC 3.2.1.23) can efficiently act in **transglycosylation** mode with suitable acceptors. The commercially produced enzyme, Biolacta[®] (Daiwa Kasei), contains **four isoforms** of β -galactosidase from *Bacillus circulans* (BgaD, GH family 2), produced by endogenous C-terminal cleavage [1]. BgaD has a higher **transglycosylation activity** than other known β -galactosidases. It can be used for the synthesis of **functionalized LacNAc** epitope in a one step reaction. LacNAc disaccharide is a typical **ligand for galectins** [2]. The recombinant enzyme also enabled **galactosylation** of complex acceptors - **functionalized chitoooligomers**.

Heterologous expression of β -galactosidase BgaD-A: Synthetic gene *bgaD-A-WT* in expression vector **pCold II** was transformed to competent cells *E. coli* BL21-GOLD (DE3). Protein expression was induced by IPTG at 15 °C. Purification by **Ni²⁺ affinity chromatography** (HisTrap™ HP) yielded recombinant β -galactosidase (189 kDa).

Recombinant β -galactosidase					
Yield in 1 L medium [mg]	Activity [U/mg]	pH optimum	Temperature optimum [°C]	K_M for pNP- β Gal [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]
97	9.6	6	40	2.3 ± 0.3	0.017





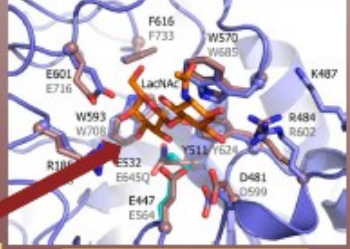
* β -N-acetylhexosaminidase mutant Y470N from *T. flavus*

Enzymatic Synthesis:

- LacNAc-N₃ epitope prepared in one step (62 % yield).
- Chitoooligomer linkers prepared by mutant Tyr470Asn β -N-acetylhexosaminidase from *Talaromyces flavus* with suppressed hydrolytic activity and galactosylated (24 % yield).
- LacNAc epitope on nature-like carbohydrate linkers is suitable for an efficient presentation to galectins.

Conclusion:

- Recombinant β -galactosidase from *B. circulans* isoform A is selective for β 4-galactosylation.
- LacNAc epitope presented on chitoooligomer linkers was prepared by cascade synthesis in tandem with mutant β -N-acetylhexosaminidase with suppressed hydrolytic activity.
- Azido group at C-1 may be used for conjugation to a multivalent carrier to increase affinity for galectins. Chitoooligomer linkers mimic nature-like presentation of epitope.
- We plan to prepare a glycosynthase by mutating the catalytic nucleophile Glu532 to glycine.
- The present β -galactosidase is unique due to its exclusive β 4-selectivity and high synthetic yield and can well replace the more expensive glycosyltransferases.



Catalytic nucleophile of BgaD [3]

References:

- [1] Song J., Abe K., Imanaka H., Imamura K., Minoda M., Yamaguchi S., and Nakanishi K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011, 75, 268–278.
- [2] Laaf D., Steffens H., Pelantová H., Bojarová P., Křen V., Elling L., *Adv. Synth. Catal.*, 2017, 359, 4015–4024
- [3] Yin H., Pijning T., Meng X., Dijkhuizen L., and Sander van Leeuwen S., *Biochemistry*, 2017, 56, 24, 3109–3118

Support from the projects LTC18038 and LTC17005 by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech is gratefully acknowledged.