

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Tereza Krunclová

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**VÝZKUM STRUKTURY β -N-ACETYLHEXOSAMINIDASY
Z *PENICILLIUM OXALICUM***

**Investigation of the β -N-acetylhexosaminidase structure
from *Penicillium oxalicum***

Školitel: RNDr. Petr Novák, Ph.D.

konzultant: Mgr. Zdeněk Kukačka

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou diplomovou práci s názvem: „Výzkum struktury β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*“ zpracovala samostatně, pod vedením mého školitele RNDr. Petra Nováka, Ph.D., a s použitím odborné literatury. Všechny použité zdroje vyznačené v textu jsou uvedené na konci mé diplomové práce v kapitole 7. Seznam použité literatury.

Tato práce ani její podstatná část nebyla využita v rámci jiného vysokoškolského studia a nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 14. května. 2012

.....

Bc. Tereza Krunclová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala institucím, laboratořím a spolutvůrcům, kteří se podíleli na vzniku této diplomové práce.

V první řadě bych ráda poděkovala Laboratoři přirozené buněčné imunity a Laboratoři charakterizace molekulární struktury Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i., za poskytnutí materiálů, přístrojů a prostor potřebných k vykonání této práce. Děkuji též kolektivu těchto laboratoří za přátelské pracovní prostředí.

Děkuji především RNDr. Petru Novákovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, za jeho podporu, odborné a cenné rady, inspiraci, připomínky, ochotu kdykoliv poradit a za čas strávený konzultacemi a měřením. Dále děkuji Mgr. Zdeňkovi Kukačkovi za jeho konzultace a za přínosnou spolupráci teoretickou i praktickou, která mi pomáhala tento projekt směřovat ke zdárnému cíli. Rovněž bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc., za možnost pracovat v jeho laboratoři. Děkuji Ing. Lenky Weignerové, Ph.D. a celému kolektivu Laboratoře biotransformací AV ČR, v. v. i. za možnost využít jejich laboratorních přístrojů.

Poděkování patří též katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a Mikrobiologickému ústavu AV ČR, v. v. i. za umožnění tuto práci vykonat.

V neposlední řadě děkuji své rodině za morální i finanční podporu a tvorbu potřebného zázemí během celého mého studia. Děkuji i svému příteli a všem přátelům za podporu.

Abstrakt v češtině

β -*N*-Acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) je exoglykosidasa, která má ve vláknitých houbách unikátní vlastnosti. Enzym z těchto organismů je dimerní, inducibilní a extracelulárně sekretovaný. Je exprimovaný jako preproprotein, skládá se ze signální sekvence, dlouhého propeptidu a katalytické podjednotky. Ačkoli je enzym široce rozšířen, jeho struktura se v jednotlivých organismech liší. Bakterie mají hexosaminidasy pouze monomerní. Lidské enzymy jsou stejně jako fungální dimerní, ale jen hexosaminidasy z vláknitých hub mají katalytickou podjednotku asociovanou nekovalentně s propeptidem. Propeptid je nezbytnou součástí aktivního enzymu. Existuje homologní model katalytické podjednotky β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*, ale struktura propeptidu zatím vyřešená nebyla.

Tato diplomová práce se v první části zabývá optimalizací podmínek produkce a purifikace. V druhé části se zabývá strukturními studii β -*N*-acetylhexosaminidasy z vláknité houby *Penicillium oxalicum* CCF 3438. Tyto studie byly prováděny pomocí metod chemického sítění a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením. Kombinací těchto metod byla odhalena místa nekovalentní interakce katalytické podjednotky a propeptidu.

(In Czech)

Klíčová slova

Vláknité houby

Penicillium oxalicum

Hexosaminidasa

Chemické zesítění

Hmotnostní spektrometrie

Abstract in English

β -*N*-Acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) is exoglycosidase, which exhibits the unique properties in the filamentous fungi. Enzyme from these organisms are dimeric, inducible and secreted extracellularly. It is expressed as preproprotein, consists of a signal sequence, a large propeptide and a catalytic subunit. Although the enzyme is widely distributed, its structure differs in various organisms. Bacteria have only monomeric hexosaminidase. Human enzymes are dimeric as well as fungal, but only hexosaminidase from filamentous fungi have the catalytic subunit noncovalently associated with the propeptide. Propeptide is essential for the enzyme activity. It exists a homologous model of the catalytic subunit of β -*N*-acetylhexosaminidase from *Penicillium oxalicum*, but the structure of the propeptide has not yet been solved.

The first part of this diploma thesis deals with the optimization of production and purification conditions. The second part deals with structural studies of β -*N*-acetylhexosaminidases from the filamentous fungi *Penicillium oxalicum* CCF 3438. These studies were carried out using chemical cross-linking and high resolution mass spectrometry. The combination of these methods revealed region of the noncovalent interaction of the catalytic subunit with the propeptide.

Key words

Filamentous fungi

Penicillium oxalicum

Hexosaminidase

Chemical cross-linking

Mass spectrometry

Obsah

Prohlášení	2
Poděkování.....	3
Abstrakt v češtině	4
Abstract in English	5
Obsah.....	6
Seznam používaných zkratk	9
1. TEORETICKÝ ÚVOD	11
1.1 β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidasa – exoglykosidasa	11
1.2 Zařazení β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy	13
1.3 Aktivní centrum glykosidas	14
1.4 Mechanismus katalýzy	15
1.4.1 Mechanismus využívaný rodinou GH 3	16
1.4.2 Mechanismus využívaný rodinami GH 18, 20, 84	18
1.5 Lidské β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy	20
1.5.1 Lysosomální poruchy	20
1.5.2 Metabolismus gangliosidů G_{M2}	21
1.5.3 Struktura a funkce isoenzymů	22
1.6 Fungální β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasa.....	24
1.6.1 Fungální β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy jako biosyntetické nástroje	26
1.6.1.1 Glykosyltransferasy	27
1.6.1.2 Glykosidasy	27
1.7 Vláknité houby.....	29
1.7.1 <i>Penicillium oxalicum</i>	30
1.7.1.1 β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasa z <i>Penicillium oxalicum</i>	31
2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	33

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	34
3.1 Materiál	34
3.1.1 Seznam chemikálií.....	34
3.1.2 Seznam přístrojů.....	36
3.1.3 Biologický materiál.....	38
3.1.4 Použité speciální programy	38
3.1.5 Seznam roztoků.....	38
3.2 Metody	40
3.2.1 Kultivace	40
3.2.1.1 Příprava šikmých agarů.....	40
3.2.1.2 Zaočkování <i>Penicillium oxalicum</i>	40
3.2.1.3 Příprava kultivačních medií	41
3.2.1.4 Očkování kapalných medií	41
3.2.1.5 Vysolování.....	42
3.2.1.6 Centrifugace vysolených roztoků	42
3.2.2 Purifikace	43
3.2.2.1 Separace na koloně Fenyl-Sepharosy	43
3.2.2.2 Separace na koloně SP-Sepharosy	43
3.2.2.3 Separace na koloně MonoQ.....	44
3.2.2.4 Separace na koloně Superdex 200.....	45
3.2.2.5 Separace na koloně Fractogel	45
3.2.2.6 Separace na obrácené fázi	46
3.2.3 Charakterizace enzymu	47
3.2.3.1 Stanovení katalytické aktivity	47
3.2.3.2 Orientační stanovení katalytické aktivity	48
3.2.3.3 Stanovení koncentrace proteinů.....	49
3.2.3.4 Elektroforetická separace.....	50
3.2.4 Chemické zesílení	50
3.2.4.1 Elektroforetická separace produktů.....	52
3.2.4.2 Vyřezávání gelu.....	52

3.2.4.3	Redukce a alkylace disulfidových můstků	53
3.2.4.4	Deglykosylace	53
3.2.4.5	Štěpení enzymu	54
3.2.4.6	Odsolení a zakoncentrování.....	55
3.2.4.7	Peptidové mapování.....	56
3.2.4.8	LC-MS analýza.....	57
4.	VÝSLEDKY	58
4.1	Kultivace.....	58
4.1.1	Vliv počátečního pH media	58
4.1.2	Změna pH media v průběhu kultivace.....	59
4.1.3	Porovnání medií o počátečním pH 2 a 5.....	60
4.1.4	Vliv „stáří“ spor a druhu peptonu.....	61
4.1.5	Zněny složení media	62
4.1.6	Vliv „stáří“ spor a pH media.....	63
4.1.7	Aktivitní křivky pro nové medium.....	63
4.2	Purifikace	65
4.3	Charakterizace enzymu	69
4.3.1	Stanovení celkové koncentrace proteinů	70
4.3.2	SDS-PAGE po chromatografických separacích.....	70
4.4	Chemické zesílení β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasy	71
4.5	MS-experimenty	73
5.	DISKUZE	77
6.	ZÁVĚR.....	82
7.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	83

Seznam používaných zkratek

Aminokyseliny jsou značeny tří- či jednopísmennými zkratkami dle IUPAC

ACN	acetonitril
AV ČR	Akademie věd České republiky
APS	peroxodisíran amonný - <i>amonium persulphate</i>
BIS	N,N'-metylen- <i>bis</i> -akrylamid
BSA	hovězí sérový albumin - <i>bovine serum albumin</i>
CAZy	databáze enzymů - <i>Carbohydrate Active enZymes</i>
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CCF	označení sbírky izolovaných kmenů plísní - <i>Culture Collection of Fungi</i>
DSG	disukcinimidyl glutarát
DTT	dithiothreitol
EC	enzymatický kód (číslo) - <i>enzyme commission</i>
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EndoH	endo- β - <i>N</i> -acetylglukosaminidasa H
ESI	ionizace elektrospřejem - <i>electrospray ionization</i>
EtMo	ethylmorfolinový pufr
ExPaSy	databáze proteinů - <i>Expert Protein Analysis System</i>
FA	mravenčí kyselina - <i>formic acid</i>
FT-ICR	hmotnostní analyzátor - iontově cyklotronová rezonance využívající fourierovu transformaci- <i>Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance</i>
Gal	galaktosa (D-galaktopyranosa)
GH	glykosidasy- <i>glycosid hydrolase</i>
Glc	glukosa (D-glukopyranosa)
GalNAc	<i>N</i> -acetylgalaktosamin (2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosid)
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglukosamin (2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid)
G _{M2}	gangliosid s jedním řetězcem sialové k. 2- <i>gangliosid momosialac 2</i>
HCCA	kyselina α -kyano-4-hydroxyškořicová- α - <i>Cyano-4-hydroxy-cinamic acid</i>
HexA	lidský protein β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasa isoenzym A

HexB	lidský protein β - <i>N</i> -acetylhexosaminidasa isoenzym B
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie - <i>high performance liquid chromatography</i>
IAA	iodacetamid
IPA	isopropanol
IUBMB	mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii- <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
IUPAC	mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii - <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC	kapalinová chromatografie - <i>liquid chromatography</i>
LDS	dodecylsíran litný
MALDI	ionizace laserovou desorpcí v přítomnosti matrice - <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MES	2-(<i>N</i> -morfolin)ethansulfonová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie - <i>mass spectrometry</i>
MW	marker molekulových hmotností - <i>molecular weight</i>
NMR	nukleární magnetická resonance - <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
p. a.	kvalita čistoty pro analýzu - <i>per analysis</i>
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforesa - <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenyl - <i>p-nitrophenyl</i>
RPM	otáčky za minutu - <i>revolutions per minute</i>
SDS	dodecylsíran sodný - <i>sodium dodecyl sulphate</i>
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
TFA	trifluoroctová kyselina - <i>trifluoroacetic acid</i>
Tris	<i>tris</i> (hydroxymethyl)aminomethan
Tween80	polyoxyethylensorbitan monooleát
UV	ultrafialové záření - <i>ultraviolet</i>
YE	kvasničný autolyzát – <i>yeast extract</i>

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1. β -*N*-Acetylhexosaminidasa - exoglykosidasa

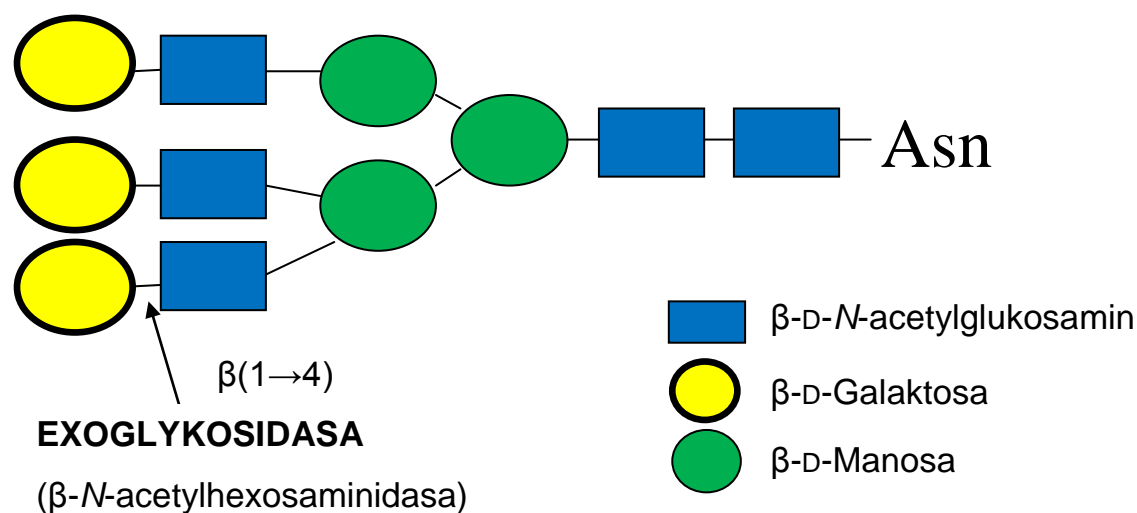
β -*N*-Acetylhexosaminidasa (dále hexosaminidasa) je protein vykazující enzymovou aktivitu. Podle IUBMB (mezinárodní unie pro biochemii a molekulární biologii) je označován enzymovým číslem EC 3.2.1.52. Systematický název je β -*N*-acetyl-D-hexosaminid-*N*-acetylhexosaminohydrolasa. Jedná se tedy o hydrolasu, glykosidasu a konkrétně exoglykosidasu. Některé hexosaminidasy však také vykazují i transglykosylační aktivitu [1]. Hexosaminidasa je v přírodě široce rozšířena, lze ji nalézt téměř ve všech živých organismech od mikroorganismů až po člověka. Význam enzymu a jeho funkce se liší v závislosti na daném organismu, na umístění v něm a na konkrétním typu enzymu. β -*N*-acetylhexosaminidasa je intenzivně studována v posledních letech. Za tuto skutečnost jsou zodpovědné především lidské typy hexosaminidas, jejichž nedostatek či nesprávná činnost způsobují různá onemocnění. Za zmínku také stojí hexosaminidasy z mikroorganismů, které se ukázaly být vhodné z pohledu biosyntetických nástrojů [2].

Enzym je exoglykosidasou, jeho funkce tedy spočívá ve schopnosti katalyzovat štěpení glykosidické vazby z neredukujícího konce sacharidových struktur polysacharidů či různých glykokonjugátů (glykoproteinů, glykolipidů, glykosaminoglykanů, glykosfingolipidů), které obsahují sacharidy s *N*-acetylaminovou skupinou. Hexosaminidasa má jak β -*N*-acetylglukosaminidasovou (odštěpuje GlcNac: *N*-acetylglukosamin) tak β -*N*-acetylgalaktosaminidasovou (odštěpuje GalNac: *N*-acetylgalaktosamin) aktivitu [3].

Glykosidasy jsou enzymy, které jsou v organismu důležité z hlediska celé řady biologických procesů, účastní se jak anabolických tak katabolických drah. U člověka jsou obecně glykosidasy součástí např. střevního zažívání (porucha způsobuje nesnášenlivost laktosy), lysosomálního metabolismu glykokonjugátů (neurodegenerativní poruchy), biosyntesy a degradace glykoproteinů atd. [4].

Většina exoglykosidas má pH optimum reakce okolo 4 až 5,5 (s výjimkou lysosomálních). Tato skupina enzymů je schopna specificky rozeznat konkrétní sacharid a jeho anomerní vazbu, ke zbytku molekuly (aglykon, disacharid) vykazuje specifitu menší [5]. Selektivní hydrolýza glykosidické vazby je klíčová v mnohých záležitostech, ať už jde o rozšiřování či degradaci buněčné stěny či o obrat signalizačních molekul. Princip hydrolýzy konce sacharidového řetězce exoglykosidasami znázorňuje schéma na *Obr. 1*.

Ačkoli za fyziologických podmínek glykosidasy vazbu štěpí, úpravou reakčních podmínek lze jejich funkci obrátit a využít je k syntéze této vazby. Tato schopnost obrácení hydrolytické aktivity byla popsána i u jiných enzymů, např. u proteas či lipas. V posledních letech se glykosidasy studují právě kvůli jejich schopnosti biosyntesy glykosidické vazby glykosidů. Enzymatickou syntézou byl například s využitím β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* připraven glykosid $\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow6)\text{GlcNAc}$ i aryl glykosid benzylo- β -D-GlcNAc a mnoho dalších [6].



Obr. 1 Princip hydrolýzy exoglykosidas na příkladu sacharidového řetězce
převzato a upraveno z [4,7].

1.2. Zařazení β -*N*-acetylhexosaminidasy

Podle komise pro nomenklaturu při IUBMB je každému enzymu přiřazeno enzymové číslo, přičemž jednotlivé kategorie jsou sestaveny podle typu katalyzované reakce a substrátové specifity. Enzymové číslo EC 3.2.1.52. znamená: 3.(skupina hydrolas), 2.(skupina glykosylas), 1.(skupina glykosidas hydrolyzující O- a S- glykosidické vazby), 52. β -*N*-acetylhexosaminidasa [8].

Další používané názvy tohoto enzymu jsou např. *N*-acetyl- β -D-hexosaminidasa, *N*-acetyl- β -hexosaminidasa, β -hexosaminidasa, β -acetylaminodeoxyhexosidasa, hexosaminidasa [9].

Hexosaminidase dříve náležely čísla EC 3.2.1.29. a EC 3.2.1.30. Předpokládalo se, že obě aktivity k GlcNAc a GalNAc lze oddělit a až později, prostřednictvím imunologických studií, bylo dokázáno, že tyto aktivity náleží stejnému enzymu [10].

Protože stereochemie sacharidů je velice rozsáhlá, živé organismy využívají celou řadu oligosacharidů a polysacharidů pro nejrůznější funkce od zásobní, strukturní až po vysoce specializovanou signalizaci. Z tohoto důvodu je v jejich metabolismu zahrnuto mnoho enzymů, které sacharidy degradují, modifikují, nebo tvoří nové glykosidické vazby. A protože glykosidasy tvoří v této úloze zásadní roli, je jim věnováno více pozornosti [11].

Byl sestaven systém, který kromě substrátové specifity (jako je tomu u rozdělení enzymů systémem IUBMB) odráží i strukturní vlastnosti enzymů. Databáze CaZy dělí glykosidasy na základě podobnosti aminokyselinové sekvence a zařazuje je do rodin a podle strukturních motivů dále do klanů. Tato databáze byla navržena s myšlenkou snadného odvození struktury a katalytického mechanismu glykosidas. β -*N*-Acetylhexosaminidasa je zařazena do rodin 3, 18, 20 a 84. Z toho rodina 18 a 20 je zařazena do klanu GH-K [12]. Tyto rodiny jsou tedy funkčně příbuzné, ale sekvenční homologii nevykazují.

CaZy databáze bere v úvahu strukturní rysy enzymu, tento systém je vhodný zejména pro enzymy vykazující širší substrátovou specifitu, jimiž glykosidasy jsou.

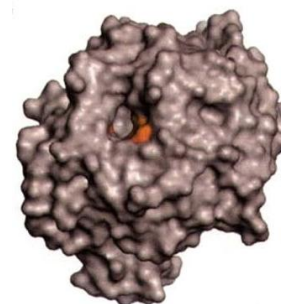
Jelikož je dokázáný vztah mezi sekvencí a skládáním proteinu, předpokládá se, že členové jedné rodiny budou vykazovat velmi podobnou strukturu. Na tomto předpokladu a na skutečnosti, že prostorové uspořádání proteinu je více konzervované než jeho sekvence, je založena metoda homologního modelování a určování trojrozměrné (3D) struktury proteinu [13].

1.3. Aktivní centrum glykosidas

Ačkoli existuje mnoho glykosidas rozdělených do několika skupin, rodin či klanů, obecně lze aktivní centra těchto enzymů klasifikovat do tří skupin, které jsou znázorněné na **Obr. 2, 3 a 4** str. 15. Glykosidická vazba je nejstabilnější vazbou vyskytující se v přírodních biopolymerech, např. poločas spontánního rozkladu celulosy je okolo 5 milionů let. Glykosidasy se řadí mezi nejzdatnější katalyzátory, jsou schopny urychlit hydrolýzu až 10^{17} x oproti nekatalyzované reakci. Aktivní místa těchto enzymů vykazují vlastnosti a strukturu, která jim tuto schopnost umožňuje [14].

Kapsa

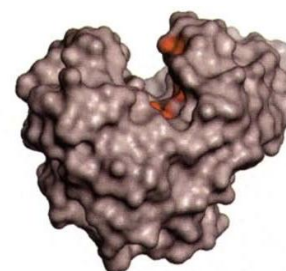
Tato topologie připomínající kapsu či kráter, je vhodná pro enzymy, které mají za substráty sacharidy s mnoha neredukujícími konci. S tímto aktivním centrem se setkáváme u enzymů rozpoznávajících monosacharidy či u exoglykosidas pro polysacharidy, nachází se i u β -N-acetylhexosaminidas.



Obr. 2 Aktivní centrum-kapsa

Klepeto

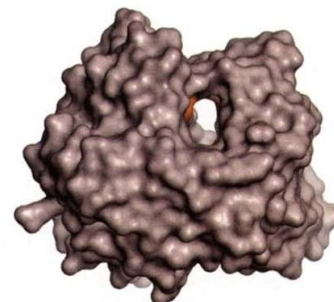
Toto otevřené aktivní místo s prohlubní je vhodné pro náhodnou vazbu polymeru, z tohoto důvodu, se takové centrum nachází především v endoglykosidasch vázajících polysacharidy [15].



Obr. 3 Aktivní centrum-klepeto

Tunel

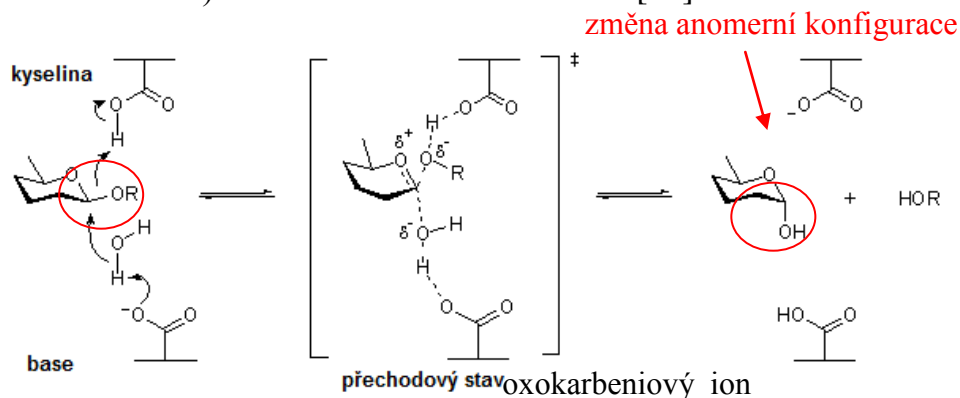
Tunel vznikl modifikací předchozí topologie, aktivní místo je pomocí smyček uzavřeno v tunelu. Není žádný důkaz ze strukturních pokusů, že by se tunel během hydrolýzy otevřel, smyčky naopak pomáhají těsnější vazbě substrátu [16]. Výsledkem je struktura, kterou se sacharidový řetězec protahuje skrz. Strany tunelu jsou bohaté na postranní řetězce aminokyselin, které jsou známé svou interakcí s cukry, především na tryptofanové. Tunel byl nalezen jen u celobiohydrolas, enzymů hydrolyzujících celulosu (hlavní strukturní polysacharid rostlin). Celobiohydrolasa je nejhojnější celulasa produkovaná vláknitými houbami [17].



Obr. 4 Aktivní centrum- tunel

1.4 Mechanismus katalýzy

Vzhledem k rostoucímu biotechnologickému potenciálu β -*N*-acetylhexosaminidas vzrostl zájem o studium jejich struktury a neméně i zájem o detailnější zkoumání katalytického mechanismu. Existují dva možné stereochemické výsledky po štěpení glykosidické vazby pomocí glykosidas [18]. U prvního z nich vzniká produkt s opačnou anomerní konfigurací, než měl substrát (enzym anomerní konfiguraci konvertuje) **Obr. 5** a v druhém případě vzniká produkt 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glykopyranosid s konfigurací stejnou jako měl substrát (enzym anomerní konfiguraci zachovává) **Obr. 6** str. 17 a **Obr. 7** str. 19 [19].



Obr. 5 Mechanismus glykosidas s invertním produktem [12]

Společným rysem obou mechanismů je přítomnost dvou aminokyselinových zbytků-karboxylových skupin v aktivním centru, které obvykle pochází z kyseliny glutamové a asparagové. Důležitým rozdílem je vzdálenost těchto karboxylových skupin, u invertujícího mechanismu se nacházejí průměrně 10Å od sebe a mechanismus probíhá přes jeden krok acidobazickou katalýzou. Zatímco glykosidasy využívající ke své funkci mechanismy, které anomerní konfiguraci zachovávají, mají v aktivním centru tyto karboxylové skupiny blíže sobě, vzdálené přibližně 5,5Å a reakce probíhá dvoukrokovým mechanismem. Druhý způsob využívají i β -*N*-acetylhexosaminidasy, proto jsou mu věnovány následující dvě kapitoly, kde jsou mechanismy podrobněji popsány.

Existuje několik způsobů jak provést hydrolyzu se zachováním anomerní konfigurace, β -*N*-acetylhexosaminidasy používají dva. První mechanismus je klasický podle Koshlanda, využívaný rodinou GH 3 a druhý je mechanismus substrát asistované katalýzy, který využívají rodiny GH 18, 20 a 84 [20].

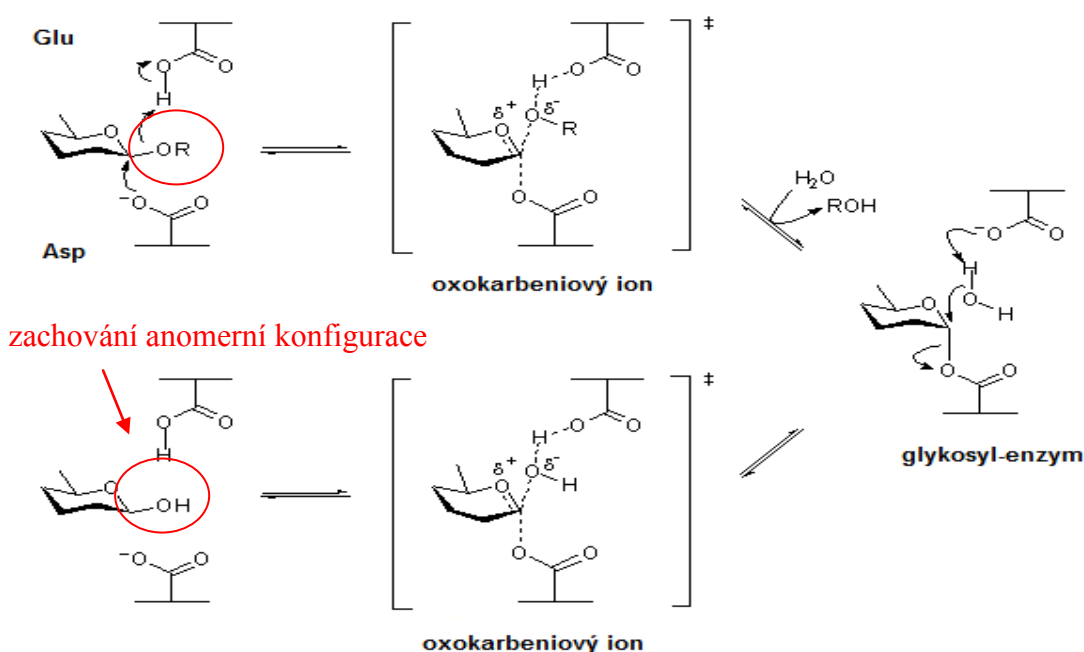
1.4.1 Mechanismus využívaný rodinou GH 3

Jak již bylo zmíněno výše, hydrolyza glykosidické vazby je katalyzována dvěma aminokyselinami, jež se nacházejí v aktivním centru molekuly enzymu. Jedna aminokyselina má funkci nukleofilu donoru (dárce protonu) a druhá aminokyselina zastává funkci acidobazickou. U rodiny GH 3 tuto funkci zastupují karboxylové skupiny na postranních řetězcích asparagové a glutamové kyseliny.

Tento klasický mechanismus katalýzy β -*N*-acetylhexosaminidas rodiny GH 3 probíhá přes dva kroky a zahrnuje vznik meziprojektu, kterým je α -glykosyl-enzym. Meziprojekt se tvoří na aspartátovém řetězci (někdy na glutamátu či dokonce tyrosinu) [21]. Reakce jsou znázorněné na **Obr. 6.** str. 17.

Každý krok zahrnuje tvorbu oxokarbeniového iontu, jako přechodového stavu. Inhibitory těchto mechanismů obvykle pracují na principu stabilizace tohoto přechodového stavu [22]. V průběhu celého mechanismu dochází ke dvěma nukleofilním substitucím. V prvním kroku tzv. glykosylačním jedna karboxylová

skupina hraje roli nukleofilu, a narozdíl od invertujícího mechanismu je těsně uzavřena v aktivním centru enzymu vedle anomerního centra substrátu a tak atakuje uhlík tohoto centra s cílem oddělit aglykon. Současně druhá karboxylová skupina, která se v tomto kroku chová jako kyselina, protonuje kyslík na anomerním uhlíku substrátu. Vzniká glykosyl-enzym jako kovalentní meziprodukt a odděluje se aglykon. V druhém kroku tzv. deglykosylačním dochází k tomu, že stejná karboxylová skupina, která měla v předchozím kroku funkci kyseliny, zde katalyzuje reakci jako base a deprotonuje (aktivuje) molekulu vody. Voda atakuje anomerní centrum a kovalentní glykosyl-enzym zaniká. Výsledkem je *N*-acetylhexosamin s anomerní konfigurací, jakou měl původně substrát a produkt opouští aktivní centrum enzymu [12, 15].



Obr. 6 Mechanismus katalýzy rodiny GH3[12]

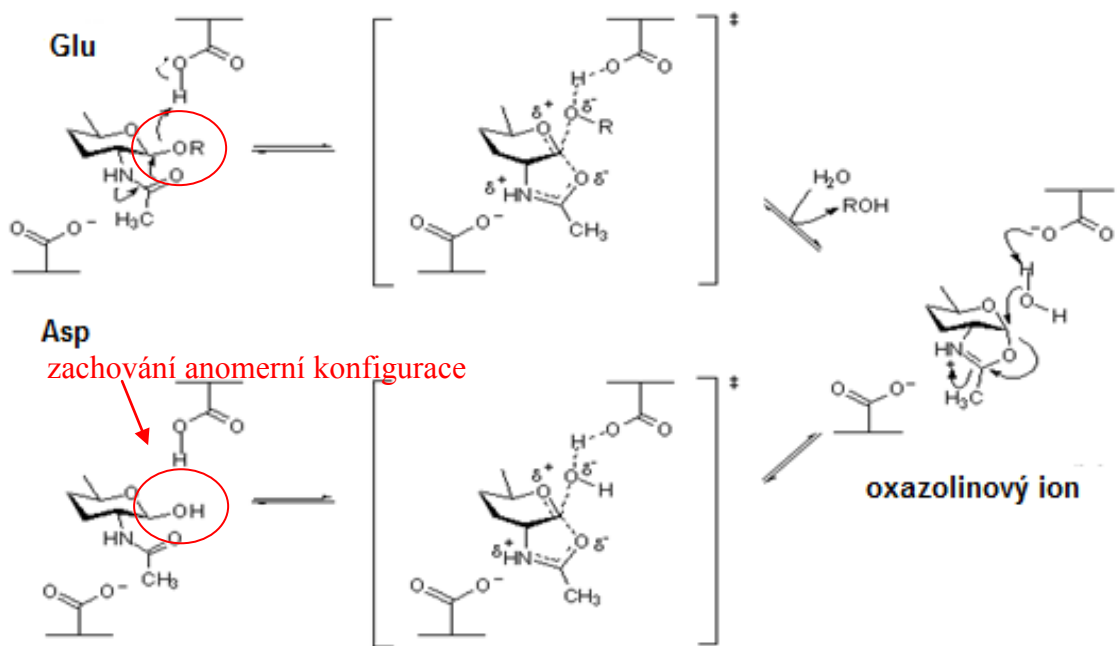
Meziprodukt, který při tomto procesu vzniká, kovalentní glykosyl-enzym, byl dříve považován za oxokarbeniový ion. Až studie lysozymu a teoretické úvahy vedly k zjištění, že tomu tak není. Předpokládá se, že ke snížení energetické bariéry hydrolytické reakce je zapotřebí deformační změna substrátu. Protonace glykosidické vazby je zřejmě doprovázena značným prodloužením vazby [23].

1.4.2 Mechanismus využívaný rodinami GH 18, 20 a 84

Tyto rodiny glykosidas využívají také dvoukrokový mechanismus, ale je založen na substrát asistované katalýze. Jedná se stejně jako u rodiny GH 3 o acidobazickou katalýzu, při níž jedna karboxylová skupina enzymu má funkci kyseliny, ale nukleofilem je zde polární 2-acetamidová skupina sacharidového řetězce [24]. Enzymy hydrolyzují substráty, které mají ve své struktuře *N*-acetyl nebo *N*-glykolovou skupinu na uhlíku C2. Enzymy nemají katalytický nukleofil jako součást proteinového řetězce, proto nelze vytvořit glykosyl-enzymový meziprodukt, jak je tomu u mechanismu rodin GH 3. Místo toho se jako meziprodukt tvoří tzv. oxazolinový ion. Katalytický mechanismus tedy zahrnuje asistenci 2-acetamidové skupiny substrátu [25].

Glykosidasy těchto rodin mají malou sekvenční podobnost, ale jejich aktivní centrum vykazuje vysoce konzervované sekvence a strukturu. Katalytické místo obsahuje konzervovaný katalytický pár aminokyselin asparagové a glutamové. Kyselina glutamová zastává roli protonového donoru, ale jako nukleofil je zde již zmíněná 2-acetamidová skupina substrátu. Druhá kyselina, kyselina asparagová má v katalýze více rolí, zejména brání 2-acetamidové skupině substrátu v tvorbě vodíkové vazby s neredukujícím koncem a podílí se na navázání substrátu na enzym. Je také důležitá z hlediska správné polohy kyseliny glutamové a může být dodatečným zdrojem negativního náboje v aktivním centru [26].

V prvním kroku nukleofilem, který atakuje anomerní místo, není karboxylová skupina pocházející z enzymu, ale karbonylový uhlík C2 acetamidové skupiny substrátu tzv. intramolekulární nukleofil. Kyselina glutamová zde hraje roli donoru protonu a kyselina asparagová stabilizuje vznikající cyklický oxazolinový meziprodukt, který je stereochemicky ekvivalentní k meziproduktu glykosyl-enzym. Druhý krok zahrnuje atak molekuly vody a je stejný jako u mechanismu zachovávajících anomerní konfiguraci [27]. Schéma reakce je znázorněno na **Obr. 7.** str. 19.



Obr. 7. Schéma mechanismu substrát asistované katalýzy [12]

1.5. Lidské β -N-acetylhexosaminidasy

Existují dva hlavní lidské lysosomální isoenzymy, β -N-acetylhexosaminidasa A (HexA) a β -N-acetylhexosaminidasa B (HexB) a vedlejší isoenzym β -N-acetylhexosaminidasa S (HexS). Byly nalezeny i cytosolické isoenzymy β -N-acetylhexosaminidasa C (HexC) označovaná jako O-GlcNAcasa [28] a β -N-acetylhexosaminidasa D (HexD), která zatím není detailně prozkoumána [29]. Lidské hexosaminidasy jsou dimerní, HexA je heterodimer a je složen z podjednotek α a β , enzym HexB je homodimer a skládá se z dvou β podjednotek [30]. Isoenzym HexS, který je poskládán z dvou podjednotek α , není považován za fyziologický enzym, *in vivo* nebyla nalezena žádná jeho funkce [31].

1.5.1. Lysosomální poruchy

Lysosomální poruchy tvoří mnoho onemocnění. Všechny tyto poruchy mají společný rys, mutaci v genu pro protein, který je součástí lysosomálního katabolismu (př. hydrolasy či jejich kofaktory podílející se např. na transportu makromolekul). Většina lysosomálních enzymů jsou exoglykosidasy. V lysosomech může dojít k poruše, která způsobí hromadění mukopolysacharidů (mukopolysacharidosy), může dojít i k hromadění sfingolipidů (lipidosy) či k poruše v degradaci glykoproteinů. Hromadění proteinů ani nukleových kyselin zatím v lysosomech popsáno nebylo.

Mezi mukopolysacharidosy patří např. mukopolysacharidosa typu VII, která je způsobena deficitem v β -D-glukuronidase. Mezi poruchy degradace glykoproteinů lze zařadit fukosidasu způsobenou deficitem α -L-fukosidasy. Lipidosy zahrnují například galaktosialidosu, způsobenou deficitem dvou enzymů β -D-galaktosidasy a N-acetyl- α -neuraminidasy, Fabryho chorobu, způsobenou deficitem v α -D-galaktosidase, metachromatickou leukodystrií, způsobenou deficitem v arylsulfatase a Gaucherovu chorobu, způsobenou deficitem β -D-glukocerebrosidasy [32]. Další skupinou lipidů jsou tzv. G_{M2} gangliosidosy,

několik onemocnění charakteristická hromaděním G_{M2} gangliosidů. G_{M2} gangliosidy jsou způsobeny deficitem enzymu β -*N*-acetylhexosaminidasy (choroba Tay-Sachsova a Sandhoffova) či G_{M2} aktivátorového proteinu (AB varianta).

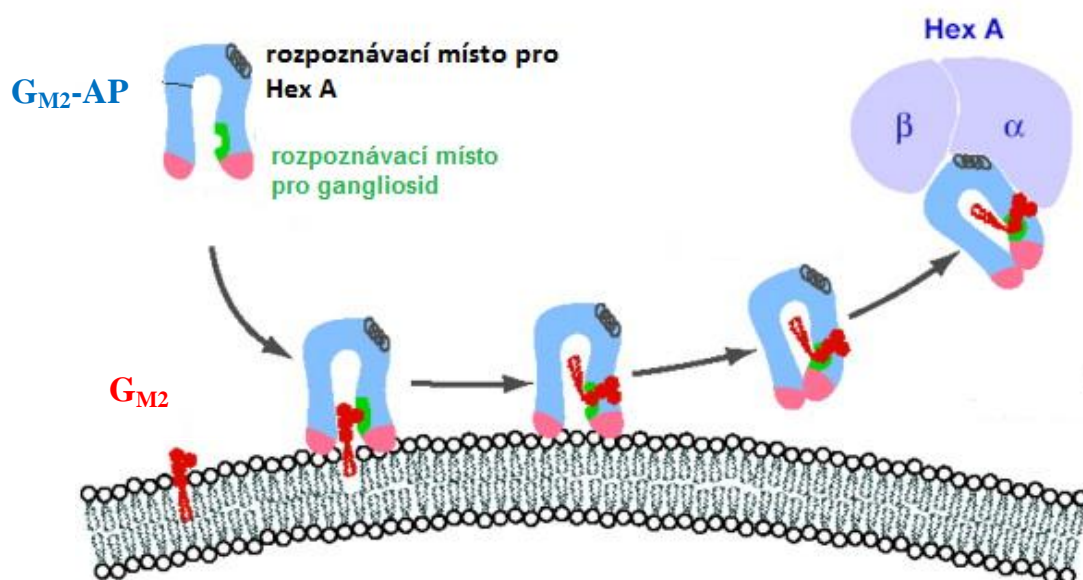
První zájem o studium lidských hexosaminidas vzbudila právě Tay-Sachsova choroba, kterou poprvé v roce 1881 popsal britský oftalmolog Warren Tay. Při Tay-Sachsově chorobě dochází k mutaci v genu pro α podjednotku β -*N*-acetylhexosaminidasy. Dochází-li k mutaci v genu pro β podjednotku, jedná se o Sandhoffovu chorobu. Obě onemocnění jsou dědičné, autosomálně recesivní a zahrnují masivní hromaděni G_{M2} gangliosidů v nervových buňkách (kde jsou gangliosidy syntetizovány). Hromaděni gangliosidů v lysosomech nakonec způsobí apoptosu buňky. Tato mozková degenerace je zatím nevyléčitelná. Tay-Sachsova choroba je způsobena nepřítomností či nedostatkem lysosomální hexosaminidasy HexA, která štěpí terminální GalNAc z oligosacharidových jednotek G_{M2} gangliosidů [33]. Choroba byla nalezena u nejrůznějších etnických skupin na celém světě, ale nejvíce u populace aškenazských židů. Mutace v genu pro β podjednotku má za následek ztrátu funkce obou isoenzymů HexA i HexB a vede k Sandhoffově chorobě.

1.5.2 Metabolismus G_{M2} gangliosidů

K hydrolyze G_{M2} gangliosidů je zapotřebí spolupráce tří polypeptidových řetězců, které jsou kódované třemi geny. Dva z nich jsou podjednotky hexosaminidasy, podjednotka α (gen *HEXA*) a podjednotka β (gen *HEXB*). Třetí složkou je malý transportní protein pro glykolipidy tzv. G_{M2} aktivační protein (AP) (gen *GM2A*) [34]. Nedostatek některého z těchto proteinů vede k ukládání gangliosidů a vede k progresivní neurodegeneraci. Kromě Tay-Sachsovy a Sandhoffovy choroby existuje vzácnější porucha tzv. AB varianta, která souvisí s mutací v genu *GM2A* [35].

HexA odstraňuje terminální β -GalNAc a k této činnosti vyžaduje G_{M2} aktivační protein (G_{M2} AP), který připraví G_{M2} gangliosidy pro HexA tak, že je oddělí

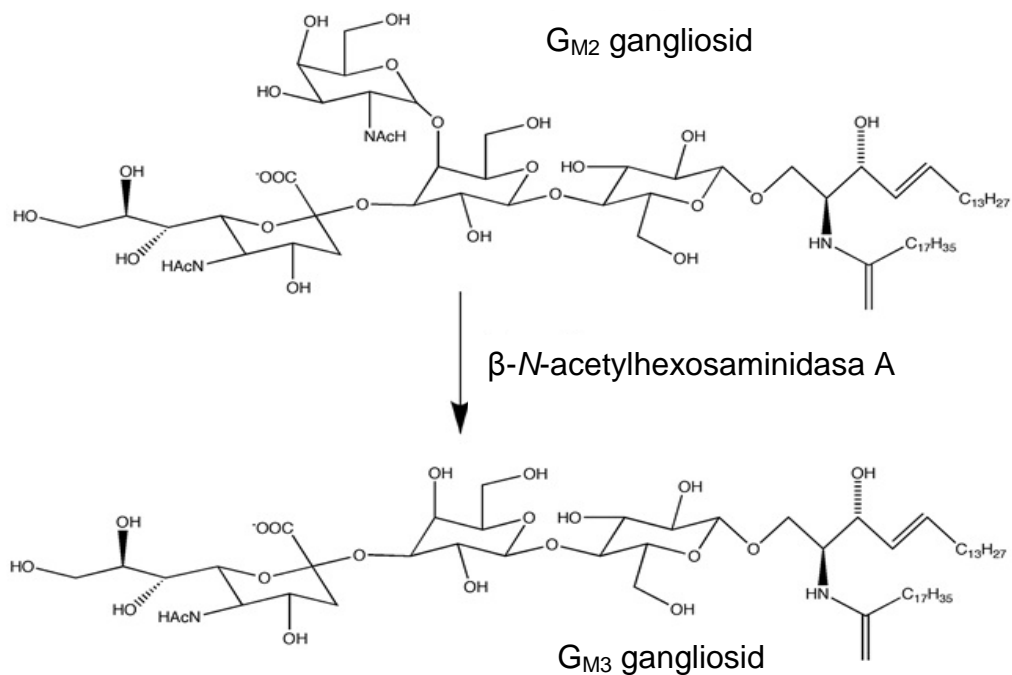
(extrahuje) od membrány, aby mohly být zpracovány. Podjednotka β je nezbytná pro navázání G_{M2} na HexA [36]. Funkce $G_{M2}AP$ je znázorněna na **Obr. 8**.



Obr. 8. Schéma spolupráce HexA a aktivačního proteinu $G_{M2}AP$ v metabolismu gangliosidů [37].

1.5.3 Struktura a funkce isoenzymů

HexA isoenzym je kromě mozku přítomen např. v játrech, ledvinách a krevní plasmě a je nezbytný pro odbourávání G_{M2} gangliosidů jak v centrálním tak i periferním nervovém systému. Patří do rodiny GH 20 a společně s HexB se zúčastní degradace oligosacharidů a glykokonjugátů (glykolipidů, glykosaminoglykanů, glykoproteinů, proteoglykanů) v lysosomech. Jejich funkce spočívá v katalyzování štěpení terminální $\beta(1\rightarrow4)$ glykosidické vazby GlcNAc a GalNAc z neredukujícího konce vyjmenovaných struktur [38]. HexA a HexB vykazují 60 % homologie primární sekvence a jsou v lidských tkáních zastoupeny ve srovnatelném množství. Oproti tomu isoenzymu HexS bylo nalezeno výrazně méně. Dalším odlišným znakem HexS je její značná nestabilita.



Obr. 9. Schéma funkce lidského isoenzymu hexosaminidasy HexA [39].

Krystalografickými studii bylo odhaleno, že obě podjednotky α i β obsahují aktivní místo, ale monomery nejsou samostatně aktivní. Jen α podjednotka může hydrolyzovat G_{M2} gangliosidy, jak je vidět na **Obr. 9**. HexA má narozdíl od HexB flexibilní smyčku, která byla HexB postranlačně odštěpena a která slouží k navázání G_{M2} aktivačního proteinu. Na α podjednotce byly v aktivním místě nalezeny významné aminokyseliny, jedná se o Asn423 a Arg424. Arg434 je zásadní pro vazbu karboxylové skupiny N-acetylneuraminové kyseliny G_{M2} gangliosidů. Podjednotka β tyto aminokyseliny neobsahuje a na jejich místech má Asp452 a Leu453. Tato krystalografická studie vysvětluje proč β podjednotka je schopna štěpit pouze neutrální substráty [39] a jen HexA je schopna zpracovat substráty obsahující negativní náboj (G_{M2} mají negativní náboj díky kyselině sialové) v přítomnosti G_{M2} aktivačního proteinu. Zajímavé je, že i HexS je schopna hydrolyzovat G_{M2} , ale musí být přidán dodatečný detergent, protože není schopna vázat $G_{M2}AP$ [30].

1.6. Fungální β -*N*-acetylhexosaminidasa

β -*N*-Acetylhexosaminidasa je v houbách součástí skupiny enzymů, které jsou asociované s buněčnou stěnou. V této souvislosti je součástí metabolismu chitinu rostoucích hub společně s enzymy chitin syntasou (EC 2.4.1.16) a chitinasou (EC 3.2.1.14) [40]. Tyto enzymy jsou konstitutivní a jsou produkovány za podmínek katabolické represe. Degradace enzymu je regulována konečným produktem GlcNAc, který reakci inhibuje. Chitinolytický systém zahrnuje hydrolytické a transglykosylační reakce [41].

Biochemický model metabolismu chitinu je znázorněn na **Obr. 10** str. 25.

Je složen ze čtyř následujících kroků:

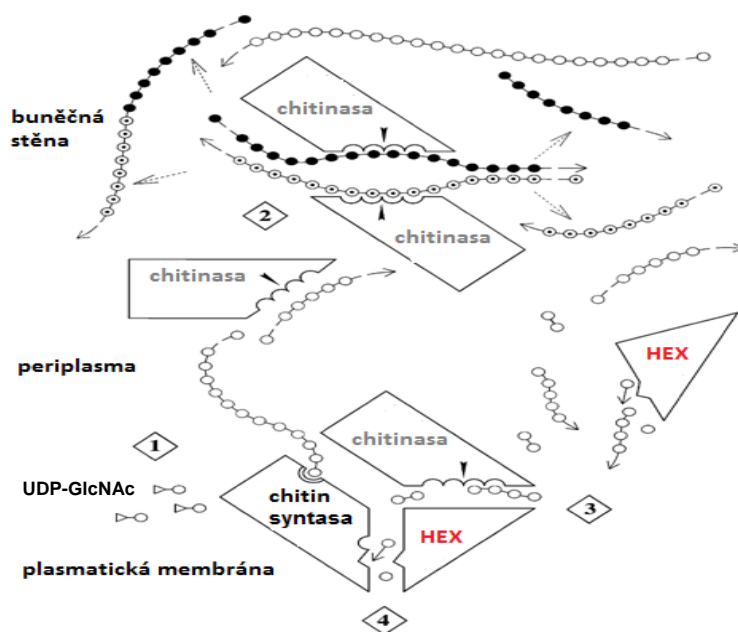
- 1) aktivitou chitin syntasy vzniká nový chitinový řetězec z UDP (uridindifosfát-aktivovaných GlcNAc jednotek
- 2) přestavba nových a stávajících chitinových řetězců kombinací transglykosylační a hydrolytické aktivity chitinasy, jejich prodlužování
- 3) hydrolytické štěpení chitinu hexosaminidasou, postupně vznikají kratší chitooligomery
- 4) hexosaminidasa rozkládá chitobiosu, vzniká GlcNAc a ten alostericky aktivuje chitin syntasu, která naváže UDP-GlcNAc

Veškeré uvedené reakce probíhají současně. Vlastnost fungální hexosaminidasy rozkládat chitobiosu a chitooligomery buněčných stěn využívají vláknité houby během růstu pro tvorbu sept a během klíčení [42].

Hexosaminidasy z vláknitých hub jsou studovány díky jejich unikátním vlastnostem, které nejsou nalezeny ani u enzymů savčích ani u bakteriálních. Fungální hexosaminidasy jsou dimerní extracelulárně sekretované, zatímco bakteriální jsou monomerní a intracelulární. Savčí enzymy jsou sice také dimerní, ale lokalizovány v lysosomech [43]. Enzymy z hub se tedy jako jediné musí umět vyrovnat s oxidativním prostředím. Fungální hexosaminidasy jsou proto robustní enzymy a postranlační modifikace jako dimerizace a *N*-glykosylace udržují enzym aktivní i za těchto podmínek. Podjednotky spolu asociují nekovalentně a dimerizace

je reversibilní, závislá na pH ve kterém se enzym nachází. Dalším rozdílem fungálních hexosaminidas je jejich aktivní místo, které obsahuje navíc flexibilní smyčku, hned vedle vazebného místa pro substrát. Katalytická doména je α/β TIM-barel [44].

Aktivní hexosaminidasa může mít buď podobu dimeru *N*-glykosylovaných katalytických podjednotek s nekovalentně asociovaným jedním či dvěma *O*-glykosylovanými propeptidy [45]. Vazba alespoň jednoho propeptidu je pro aktivitu enzymu nezbytná, ale s dvěma propeptidy vykazuje enzym aktivitu 2x vyšší. Enzymový prekursor je intracelulárně časně po biosyntese zpracováván pomocí dibasické peptidasy, místo pro štěpení je pro tuto peptidasu unikátní, odlišné od Kex2 peptidasy, která běžně dibasické sekvence štěpí např. v kvasinkách. Místa pro štěpení rozeznávané dibasickou peptidasou jsou evolučně konzervované napříč vláknitými houbami. Asociace propeptidu a katalytické podjednotky nastává před dimerizací. Buňky hub jsou schopny regulovat přítomnost propeptidu a tím regulují strukturu a aktivitu hexosaminidasy podle potřeb buňky během životního cyklu vláknité houby [46]. Fungální hexosaminidasy jsou inducibilní jak substráty, tak konečnými produkty jejich aktivity (GlcNAc) [47].



Obr. 10 Přestavba chitinu chitinolytickým systémem pomocí hydrolytických a transglykosylačních reakcí [41]

1.6.1 Fungální β -*N*-acetylhexosaminidasy jako biosyntetické nástroje

Sacharidy jsou nejhojněji zastoupenými složkami živých hmot, tvoří až 95% biomasy. Nejvíce zastoupené jsou polysacharidy, jako je škrob (zásobní polysacharid rostlin), celulóza (stavební polysacharid rostlin), glykogen (zásobní polysacharid živočichů) a za zmínku také stojí chitin (stavební polysacharid, který je součástí buněčných stěn hub a vnější kostry členovců). Nejhojněji zastoupenými disacharidy jsou sacharosa, laktosa a maltosa, z řad monosacharidů je to glukosa. Účastní se v živých organismech mnoha rolí zejména stavebních (jsou např. součástí buněčných stěn, nukleové kyseliny a proteinů) či zásobních, a neméně důležitá je i jejich účast v procesu rozpoznávání, proto jsou častými povrchovými složkami buněk (glykoproteiny, proteoglykany, glykolipidy, glykofosfatidylinositoly) [48]. Pochopení molekulárního základu funkce obrovského množství sacharidových struktur, je ústřední otázkou glykobiologie. Sacharidy jsou v posledních letech studovány z hlediska zdroje nových biologicky aktivních molekul používaných jako léky. Pokroky v poznání protein-sacharidové interakce umožnily vývoj nových léků, většinou malých molekul, které svými vlastnostmi napodobují přirozené vlastnosti sacharidů-tzv. glykomimetika. Ty představují novou třídu unikátních terapeutik. [49].

Rozvoj glykobiologických věd s sebou přináší stále se zvyšující potřebu nových sacharidových struktur. Tyto struktury mohou být získány pomocí enzymatické syntézy, která pomáhá řešit problémy složité chemické syntézy. Enzymatická glykosylace je zvláště vhodná pro syntézu termodynamicky nepreferovaných struktur, nebo v případě, že chemická syntéza nevede k žádným produktům. Existují dva základní přístupy, použití glykosyltransferas (EC 2.4) či glykosidas (EC 3.2) [50]. Syntéza sacharidů s využitím enzymů probíhá v jednom kroku a s kontrolou anomerní konfigurace. Jsou výhodnější z hlediska času i složitosti [51].

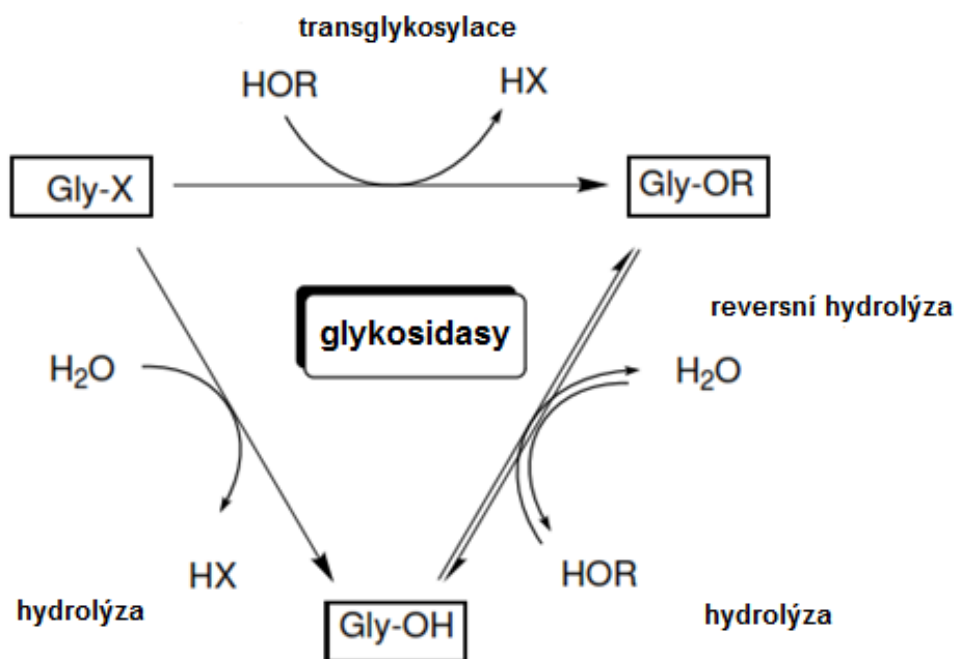
1.6.1.1 Glykosyltransferasy

Glykosyltransferasy jsou enzymy, jejichž fyziologická funkce je syntéza glykosidické vazby. Jejich nevýhodou je, že nejsou snadno dostupné a jsou málo stabilní. Další nevýhodou je jejich striktní regioselektivita, která omezuje škálu použitelných substrátů, při jejich reakci dochází též k anomerní selektivitě. Glykosyltransferasy využívají jako substráty cukerné nukleosidy, přenášejí monosacharidy z aktivovaného cukerného donoru, na sacharid, protein, lipid, DNA nebo malé molekulové akceptory. Jsou velice selektivní na glykosylový-akceptor. Využitelná je celá řada glykosyltransferas [52].

1.6.1.2. Glykosidasy

Glykosidasy jsou enzymy, které za fyziologických podmínek glykosidickou vazbu štěpí. *In vitro* lze úpravou reakčních podmínek jejich aktivitu použít k syntéze těchto vazeb. Jak lze vidět na **Obr. 11** str. 28. Glykosidasy často vykazují oproti glykosyltransferasám malou regioselektivitu, kterou lze ovlivnit reakčními podmínkami, a někdy i malé výtěžky. Jsou striktně stereoselektivní. Jejich výhodou je, že jsou levné, protože jsou dostupné z různých přírodních zdrojů. Jsou součástí mnohých rostlinných i živočišných tkání a jsou produkovány v hojné míře celou řadou mikroorganismů. Navíc jsou robustní a odolnější vůči prostředí [53]. Pro syntetické reakce je k dispozici velká škála těchto enzymů [54].

Vykazují širokou substrátovou specifitu, a tudíž jsou schopny přijmout celou řadu donorů s různými aglykony jako akceptory. Kromě substrátů přirozených, zpracovávají také celou řadu substrátů modifikovaných, připravených uměle. Narozdíl od glykosyltransferas jsou schopny přijmout celou řadu jednodušších a snadněji dostupnějších substrátů. Tyto substráty jsou důležité např. z biologického či biomedicínského hlediska [55]. V přítomnosti vody jako kompetitivního nukleofilu jsou transglykosylační výtěžky nižší.



Obr. 11 Schéma reakcí katalyzovaných glykosidasami [56]

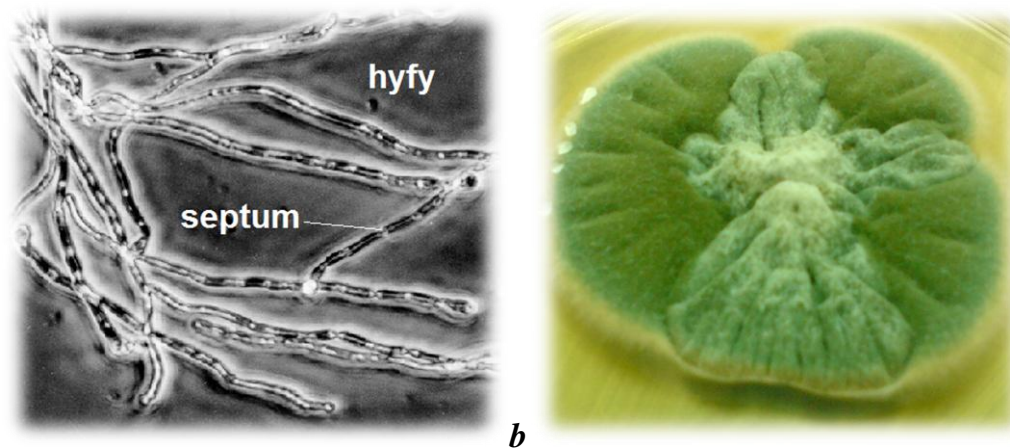
Glykosidasy pocházející z vláknitých hub představují vhodný biosyntetický nástroj pro syntézu např. galaktosidů, glykosidů, manosidů, acetylglukosaminidů či acetylgalaktosaminidů. K těmto syntézám se využívají reakce transglykosylační a reakce reversní hydrolýzy (kondenzace). Pro příslušnou reakci je nutné zvolit vhodnou glykosidasu např. β -*N*-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum* má unikátní poměr β -GalNAc/ β -GlcNAc posunut ve prospěch β -galnakasové aktivity [57].

Transglykosylace je řízená kineticky a vyžaduje glykosidy aktivované vhodnou odstupující skupinou (např. nitrofenyl). Jedná se o přenos glykosylového zbytku z glykosylovaného donoru na akceptor [58]. U tohoto typu reakce lze snadno ovlivnit regioselektivitu a výtěžek reakce úpravou reakčních podmínek a proto je více využívána než reakce reversní hydrolýzy. Reversní hydrolýza je řízena termodynamicky a pro reakci je zapotřebí vysoké koncentrace volných cukerných zbytků [2].

1.7 Vlákňité houby

Vlákňité houby jsou eukaryotické mikroorganismy, se kterými se v běžném životě setkáváme v mnohých oblastech, v zemědělství, medicíně, biotechnologii či potravinářství. Využívají se např. k výrobě léků, antibiotik, potravin, nápojů či jako produkční organismy pro vědecký materiál především pro produkci proteinů, které jsou většinou extracelulární [59]. V posledních 60 letech bylo k produkčním účelům, především pro výrobu celé řady enzymů (amylas, celulas, proteinas atd.) použito mnoho kmenů tohoto specifického druhu hub [60]. Mikroskopické houby mají více morfologií, např. kvasinky jsou jednobuněčné samostatné buňky, zatímco vlákňité houby jsou mnohobuněčné [61].

Organismy vlákňitých hub jsou složeny z vícebuněčných hyf (houbových vláken), které jsou rozděleny do sept (příhrádek) **Obr. 12a**. Hyfy jsou polarizované, složené z jednotlivých buněk, kdy každá z nich může mít odlišný osud [62]. Pro vlákňité houby se ne zcela správně používá výraz plísně. V přírodě jsou přítomné na mnoha místech, jsou součástí rostlin (obilí), půdy, zvířat atd., nejčastěji osidlují jejich povrch [63]. Na **Obr.12b** je příklad vlákňité houby *Penicillium oxalicum*.



Obr. 12a. Příklad morfologického členění vlákňité houby na příkladu *Candida albicans* [64] **b.** *Penicillium oxalicum* CCF 3438 na agaru

1.7.1 *Penicillium oxalicum*

Tento druh vláknité houby byl poprvé popsán v roce 1915, kdy byl objeven druh rodu *Penicillium*, který produkoval šťavelovou kyselinu (oxalic acid), která je hlavním, ale ne konečným produktem jejich metabolismu [65]. Tyto plísně mohou být součástí potravin a krmiv. *Penicillium oxalicum* CCF 3438 **Obr. 12b** str. 29 je mykoparazit [66].

Rod *Penicillium* (štetičkovci) je v přírodě široce rozšířen. Ve významném množství se vyskytuje v hnilící vegetaci, ale zástupci jsou také nalezeni v půdě, v rostlinách a ovoci (*Penicillium expansum* způsobuje hnilobu jablek), ale i semenech a samotném dřevě. Zástupci tohoto rodu vykazují antagonistické efekty proti bakteriím, hmyzu či jiným houbám. Rod *Penicillium* obsahuje okolo 300 druhů, některé z nich hrají důležitou roli v biologické recyklaci a v léčbě infekčních chorob (např. penicilin). Jiné zástupci jsou zas kontaminanty a patogeny, kvůli produkci mykotoxinů [67]. Některé druhy jsou součástí výroby sýrů př. *Penicillium roqueforti*. Nejvýznamnějšími mykotoxiny rodu *Penicillium* jsou patulin a ochratoxin A **Obr. 13**. Ochratoxin A je veden jako potenciální lidský karcinogen. Patulin má mutagenní vlastnosti a řadí se mezi silná antibiotika [68].

Zařazení *Penicillium oxalicum* [69]

Soustava: *Vitae* (živé organismy)

Doména: *Eucaryota* (jaderní)

Říše: *Fungi* (houby)

Kmen: *Ascomyceta* (vřeckovýtrusé)

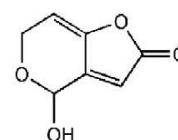
Třída: *Eurotiomycetes* (buňeňkové)

Řád: *Eurotiales* (plesnivkotvaré)

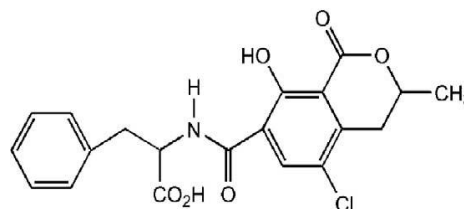
Čeleď: *Trichocomaceae* (plísňovkovité)

Rod: *Penicillium* (štetičkovec)

Druh: *Penicillium oxalicum*



Patulin



Ochratoxin A

Obr. 13 Nejvýznamnější mykotoxiny rodu *Penicillium* [68]

1.7.1.1 β -*N*-acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum*

β -*N*-Acetylhexosaminidasa z *Penicillium oxalicum* má mnoho vlastností společných s těmito enzymy pocházejících z evolučně příbuzných rodů, ale má i některé vlastnosti unikátní. Tento enzym je inducibilní a extracelulární. Pochází z rodiny GH 20, má konzervované katalytické místo a aminokyseliny, které se účastní katalýzy a vazby substrátu [70]. Unikátní je jeho vysoký poměr GalNAcasové aktivity oproti aktivitě GlcNAcasové [1]. Další unikátní vlastností je, že lépe toleruje substráty s *N*-acylovou skupinou [55]. Dobře štěpí i substráty s modifikací na uhlíku C6 [71]. A dokonce i 4-deoxy substráty. Má i neobvyklé pH optimum a pH stabilitu [3]. Enzym je více stabilní v prostředí neutrálním (pH optimum 7-8) než v prostředí kyselém.

Celý enzym je složen ze signální sekvence, propeptidu a katalytické podjednotky. Velké propeptidy mají funkci intracelulárních regulátorů, ovlivňují sekreci, dimerizaci a aktivitu enzymu, jak již bylo popsáno v kapitole 1.6 [46]. Za fyziologických podmínek se enzym vyskytuje v podobě dvou nekovalentně asociovaných katalytických podjednotek (každá o molekulové hmotnosti 65 kDa) s dvěma nekovalentně asociovanými propeptidy (každý 15 kDa). Celková molekulová hmotnost enzymu při plné glykosylaci tedy činí 160 kDa. Katalytická podjednotka je 501 aminokyselin dlouhá a obsahuje 5 míst pro *N*-glykosylaci, která ovšem nemusí vždy být obsazena. Glykosylace slouží enzymu ke stabilitě. Po deglykosylaci má enzym stejnou aktivitu, ale sníží se jeho stabilita v kyselém i zásaditém prostředí [70].

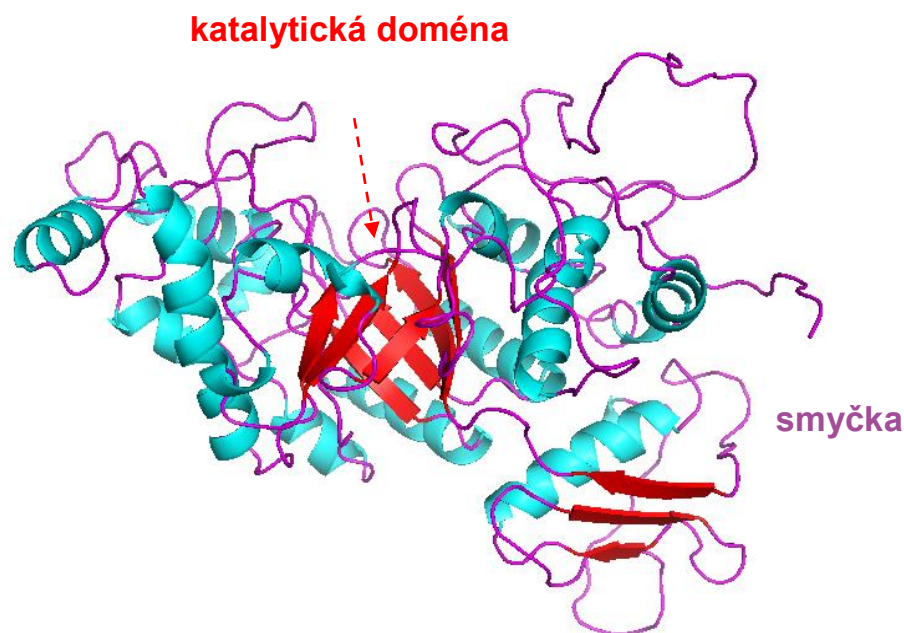
Struktura katalytické podjednotky enzymu je stabilizována pomocí disulfidových můstků, v primární struktuře existuje 6 konzervovaných cysteinů, které tvoří 3 disulfidové můstky **Obr. 14** str. 32. Disulfidy jsou vytvořeny mezi Cys191-Cys252, Cys350-Cys384, a Cys483-Cys491. Propeptid neobsahuje ani jeden cystein. Disulfidové vazby jsou důležité pro proteinovou strukturu a jejich studie je nápomocná při strukturním počítačovém modelování [72].

DTAATAIHSVHLSVVDAAADLQHGVDSESYTLEVTADSGTIQIHAQTVWGAIHAMTTLQQLVITDGHG
 NLIIEQPVKIQDAPLYPYRGMIDTGRNFISVPKILEQIDGMALSKLNVLHWHLDDTQSWPVQIRSYP
 QMTKDAYSSREIYTETDLRRVLAYARARGVRVIPEVDMPGHSASGWKQVDPDVVT^C¹⁹¹TDTWWS
 NDDWPKHTAVEPNPGQLDIYNKTYEVVGNVYKDLSAIFSDNWFHVGGDELQNN^C²⁵²FNFSTHITK
 WFAEDPSRTYNDLSQYWLDHALPIFHGTGGPQRRLLMMWEDIFINTDAAHHVPRDIVMQSWNNGID
 NIKNLTASGFDVVSSADFLYLD^C³⁵⁰GFAGFVGNDPRYNVMSNPGGDVTFNYGGSGGSW^C³⁸⁴APY
 KSWQRIYDYDFTTNLTASEAKHVIGAEAPLWSEQVDDVTISSKMWPRAAALGELWVSGNRDASGH
 KRTTQLTQRLLNFREYLVANGVMATNLAPKY^C⁴⁸³LQHPHAC^C⁴⁹¹DLYYNQSVITP

Obr. 14 Aminokyselinová sekvence katalytické podjednotky

β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* [72]

Byl vytvořen homologní model na základě aminokyselinové podobnosti primární sekvence s β -N-acetylhexosaminidasou ze třech organismů, s dvěma bakteriálními *Serratia marcescens*, *Streptomyces plicatus*, a s lidským (*Homo sapiens sapiens*). Model jedné katalytické podjednotky β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* je na **Obr. 15**, s katalytickou doménou uprostřed (červená), která má typický tvar TIM barelu. Lze zde vidět i dlouhou charakteristickou smyčku pro tyto fungální enzymy.



Obr. 15 Homologní model β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*

2 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Tento projekt diplomové práce se zabývá studiem fungálního enzymu β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438. Enzym se skládá z katalytické podjednotky a z propeptidu. Propeptid je s katalytickou podjednotkou vázán nekovalentně, ale jeho přítomnost je nezbytná pro enzymovou aktivitu. Cílem práce bylo zjistit, v jaké části polypeptidového řetězce katalytické podjednotky dochází k jejich vzájemné interakci.

K realizaci cíle bylo nutné splnit následující úkoly:

- ▶ optimalizace kultivace vláknité houby *Penicillium oxalicum* CCF 3438 v mediu
- ▶ optimalizace produkce a izolace enzymu β -*N*-acetylhexosaminidasy
- ▶ optimalizace purifikace získaného enzymu β -*N*-acetylhexosaminidasy
- ▶ charakterizace vzájemné nekovalentní interakce mezi propeptidem a katalytickou podjednotkou enzymu, pomocí chemického sítění a hmotnostní spektrometrie

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1. Seznam chemikálií

Acetonitril (pro LC-MS)	Merck, Německo
Agar technický č. 3	Oxoid, USA
Akrylamid	Serva, Německo
Azid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
Citronan sodný	Lachema, ČR
Citrónová kyselina p. a.	Lach-ner, ČR
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka, Švýcarsko
Cytochrom c	Sigma-Aldrich, USA
Činidlo pro Bradford metodu	Bio-Rad laboratories, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný	Lachema, ČR
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p. a	Lachema, ČR
DSG	ThermoScientific, USA
DTT	Fluka, Švýcarsko
Dusičnan amonný	Fluka, Švýcarsko
Dusičnan sodný p. a.	Lachema, ČR
EDC	ThermoScientific, USA
EndoH	New England Biolabs, USA
Ethanol, 99,8% pro UV	Lach-ner, ČR
4-Ethylmorfolin	Fluka, Švýcarsko
GlcNac (<i>N</i> -Acetyl-D-glukosamin) 95%	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Guanidine HCl	Serva, Německo
Gel gradientový Nu Page 4-12%	Invitrogen, USA

HCCA Maldi matrice	Bruker Daltonics, USA
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p. a.	Lach-ner, ČR
Hydroxid sodný	Lachema, ČR
Chlorid draselný	Lachema, ČR
Chlorid sodný	Lach-ner, ČR
Chlorovodíková kyselina, 35% p. a.	Lach-ner, ČR
Iodacetamid	Sigma-Aldrich, USA
Isopropanol p. a.	Lach-ner, ČR
Kvasničný autolyzát	Imuna Pharm, SR
MES-SDS pufr (20x)	Invitrogen, USA
<i>N,N'</i> -metylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Octová kyselina, 99% p. a.	Lach-ner, ČR
<i>p</i> -NP-GlcNAc	Sigma-Aldrich, USA
Pepton mykologický	Oxoid, USA
Pepton bakteriologický	Oxoid, USA
Pyridin	Fluka, Švýcarsko
Síran amonný p. a.	Lach-ner, ČR
Síran železnatý heptahydrát	Lach-ner, ČR
Síran hořečnatý heptahydrát	Lachema, ČR
Standard MW SeeBlue	Invitrogen, USA
Standard MW SeeBlue, Plus2	Invitrogen, USA
TEMED	Serva, Německo
Tris, min. 99,9%	Sigma-Aldrich, USA
Trifluorooctová kyselina	Sigma-Aldrich, USA
voda pro chromatografii (LC-MS)	Merck, Německo
TCEP	ThermoScientific, USA
Trypsin	Promega, USA
Uhličitan sodný	Lachema, ČR

3.1.2. Seznam přístrojů

Analytické váhy ALJ220-4	Kern, Německo
Analytické váhy AL54-IC	Mettler Toledo, Švýcarsko
Centrifuga 5415 R	Eppendorf, Německo
Centrifuga Avanti J-25-XP	Beckman Coulter, USA
Centrifuga Hermle Z233MK-2	BioTech, ČR
Centrifuga PrismR	Labnet international, USA
Centrifuga stolní MiniSpin	Eppendorf, Německo
Centrifuga stolní Spectrafuge 16M	Labnet international, USA
Elektroforetická souprava	Bio-Rad laboratories, USA
Elektroforetická souprava X Cell SureLock	Invitrogen, USA
Hmotnostní spektrometr Apex Ultra	Bruker Daltonics, USA
HPLC system Agilent 1200	Agilent, USA
HPLC systém BioSys 500	Beckman Coulter, USA
HPLC system BioSys 510	Beckman Coulter, USA
HPLC Äkta purifier P900, Frac 920	GE Healthcare, USA
HPLC Äkta FPLC P920, UPC 900	GE Healthcare, USA
Chromatografické kolony	
Fenyl-Sepharosa (2,6 x 10,6 cm)	Amersham Bioscience, UK
Fractogel (2,5 x 11,6 cm)	Merck, Německo
Magic C18AQ (0,02 x 15 cm)	Michrom Bioresources, USA
MonoQ (0,5 x 5 cm)	Amersham Bioscience, UK
SP-Sepharosa (1,6 x 5 cm)	Amersham Bioscience, UK
Superdex 200 (1 x 30 cm)	Amerham Bioscience, UK
Vydac C4 (1 x 25 cm)	Dionex ThermoScientific, USA
Inkubační box stolní Thermomixer comfort	Eppendorf, Německo
Inkubační box stolní Thermomomixer compact	Eppendorf, Německo
Koncentrátory Centricon 10 kDa	Millipore, USA
Lázeň vodní	Memert, Německo

Laminární box, UV, MSCA	Jouan, Francie
Ledovač Ice Flaker	Brema Ice Makers, Itálie
Chladnička	Whirlpool Corporation, USA
Míchačka magnetická MM2A	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Míchačka VSR 23	Grant Boekel, UK
Mikrocentrifuga roth	P-lab, ČR
Mikrokolona microtrap (0,1 x 0,8 cm)	Michrom bioresources, USA
Mikrotitrační destička	Nunc, Dánsko
pH metr ϕ 200	Beckman Coulter, USA
pH metr Orion 2 Star	ThermoScientific, USA
Pipety automatické Pipetman	Gilson, Francie
Pipety automatické Eppendorf research plus	Eppendorf, Německo
Pipety automatické Finepipett	ThermoScientific, USA
Spektrofotometr Safire ²	Tecan, Rakousko
Spektrofotometr UV mini 1240 UV/VIS	Schimatzu, Japonsko
Sonikační lázeň	Bandelin, Německo
Souprava pro filtraci za sníženého tlaku	Sigma, USA
Sterilní filtr (PES membrána 0,22 μ m, 0,45 μ m)	Millipore, USA
Stříkačka mikro 250 μ l	Hamilton Company, Švýcarsko
Třepačka	Gallenkamp, VB
Vakuová odparka Speedvac	Jouan, Francie
Vakuová odparka Savant SPD 121P	Thermo Fisher, USA
Vaříč	Sencor, JPN
Vortex Zx ³	VELP Scientifica, Itálie
Vortex Grant Bio	P-lab, ČR
Vialky se septem	Agilent, USA
Zdroj deionizované vody MiliQ	Millipore, USA
Zdroj napětí ECPS 3000/150	Pharmacia, USA
Zdroj napětí MP-250 V	Cleaver Scientific Ltd., UK
Zdroj napětí PowerPac	Bio-Rad, USA

3.1.3. Biologický materiál

Penicillium oxalicum

vláknitá houba kmene CCF 3438 pocházející 1) z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i 2) ze sbírky hub Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze

3.1.4. Použité speciální programy

BioTools 3.2.	Bruker Daltonics, Německo
Data analysis 4.0.SP2	Bruker Daltonics, Německo
GPMAW 8.00 sv.1	Lighthouse data, Dánsko
PyMol 1.3	Schrödinger, USA

3.1.5 Seznam roztoků

Roztok sporulačního agaru / 300 ml

sladový výtažek 13,5 g; glycerol 37,5 g; NaCl 4,5 g; NH_4NO_3 0,132 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,018 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,45 mg (1-2krystaly); agar 7,4 g

Roztok kultivačního media / 100 ml

NaNO_3 0,2 g; KCl 0,05 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g; KH_2PO_4 0,1 g; pepton (popř. kvasničný autolyzát) 0,1 g

Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / 50 ml; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g

Roztok Tween 80 / 50 ml; Tween 80 50 μl

Roztok N-acetylglukosaminu 0,5% / 100 ml; GlcNAc 0,5 g

Pufr A (pro chromatografii na koloně Fenyl-Sepharosy) / 1 l; pH 6,8

NaH_2PO_4 7,8 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 132,14 g; NaN_3 65 mg

Pufr B (pro chromatografii na koloně Fenyl-Sepharosy) / 1 l; pH 6,8

NaH_2PO_4 3,12 g; NaN_3 65mg

Pufr A, citrátový (pro chromatografii na koloně SP-Sepharosy) / 1 l; pH 4,5

citronan sodný 6 g; NaN_3 65 mg

Pufr B (pro chromatografii na koloně SP-Sepharosy) / 1 l; pH 4,5

NaCl 58 g; NaN₃ 65 mg

Pufr A (pro chromatografii na koloně MonoQ) 0,5 l; pH 7

Bis-Tris 2,09 g; NaN₃ 32,5 g

Pufr B (pro chromatografii na koloně MonoQ) 0,5 l, pH 7

NaCl 29,22 g; NaN₃ 35,5 g

Pufr pyridinový 50mM / 250 ml; pH 7,0

H₂O: LC-MS; pyridin 1 ml; NaCl 0,73 g

Pufr A (pro chromatografii na obrácené fázi) / 250 ml

H₂O: LC-MS; TFA 250 µl

Pufr B (pro chromatografii na obrácené fázi) / 250 ml

H₂O: LC-MS; ACN (99,9%) 240 µl; TFA 175 µl

Pufr Citrát-fosfátový 50mM / 500 ml; pH 5,0

kyselina citronová 5,2g; Na₂HPO₄ 8,25 g

Vzorkový pufr / LDS, 100mM DTT

Barvicí roztok / 100 ml

Coomasie Brilliant blue R 250 0,25 g; H₂O 45 ml; methanol 45 ml;

kyselina octová 10 ml

Odbarvovací roztok / 100 ml

ethanol 35 ml; kyselina octová 10 ml; H₂O 55 ml

Trypsin zásobní roztok 1 g/l

kyselin octová 50mM 100 µl; trypsin 100 µg

Štěpící roztok pH 8,5; EtMo pufr 900 µl; ACN 100 µl

Roztok Maldi matrice

zásobní roztok HCCA; 0,1% TFA+80% ACN; 0,1% TFA v poměru 1:1:1

Pufr A (pro LC-MS analýzu)

0,2% FA; 2% IPA; 2% ACN/H₂O

Pufr B (pro LC-MS analýzu)

0,16% FA; 10% IPA; 5% H₂O/ACN

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace

Pro produkci β -*N*-acetylhexosaminidasy byl vybrán kmen vláknité houby *Penicillium oxalicum* CCF 3438. Tento organismus byl dodán v kultuře narostlé na šikmém agaru.

3.2.1.1. Příprava šikmých agarů

V mikrobiologii se pro kultivace (růst či udržování) mikroorganismů používá přírodní polysacharid agar, který pochází z červených mořských řas a má vysokou schopnost tvořit gelovitou strukturu.

Byl připraven sterilní sporulační agar. Tuhý agar byl uchováván v lednici při 4°C. Příprava šikmých agarů probíhala za sterilních podmínek v boxu s laminárním prouděním za dodržení podmínek aseptické práce. Agar byl zkapalněn a teplý roztok byl nalit do sterilních silnostěnných zkumavek. Zkumavky byly naplněny asi z jedné třetiny a byly uloženy pod takovým úhlem, aby agar pokryl stěny zkumavky a vytvořil dostatečnou plochu. Po ztuhnutí agaru byly zkumavky opět uchovávány při 4°C.

3.2.1.2 Zaočkování *Penicillium oxalicum*

V boxu s laminárním prouděním byly sterilní očkovací kličkou přeneseny spory *Penicillium oxalicum* do zkumavek s šikmým sporulačním agarem. Zkumavky s vláknitou houbou i s agarem byly předem vytemperovány na pokojovou teplotu. Spory byly nanесeny po celé délce agaru odspoda nahoru vlnitým pohybem. Po zaočkování agarů, probíhala kultivace při 28°C, 3-6dní. Narostlá kultura byla uchována při 4°C.

3.2.1.3 Příprava kultivačních medií

Použitá media byla obdobou minerálního media Czapek-Dox. Byl připraven roztok kultivačního media. Pepton či kvasničný autolyzát byl přidán do směsi až nakonec. Hodnota pH byla upravována pomocí HCl či NaOH. Dále byl vytvořen 10% roztok MgSO_4 a 0,1% roztok Tweenu 80 v 50 ml erlenmayerových baňkách. Všechny roztoky byly sterilovány.

3.2.1.4 Očkování kapalných medií

Očkování probíhalo sterilně v boxu s laminárním prouděním za dodržení podmínek aseptické práce. K roztokům medií bylo přidáno 50 ml roztoku GlcNAc přes sterilní filtr (0,22 μm). Dále k 300 ml media v baňkách bylo přidáno 1,5 ml sterilního roztoku 10% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Agary s narostlou kulturou byly vytemperovány na laboratorní teplotu a poté k nim bylo přidáno 4-5 ml 0,1% roztoku Tween 80 podle velikosti zkumavky. Sterilní očkovací kličkou byly spory přeneseny do roztoku. Do kultivačních medií byl skleněnou pipetou přidán 1 ml takto vzniklého roztoku spor. Kultivace probíhala při 28°C za stálého třepání 200 RPM po dobu 7-12 dnů. V průběhu kultivace byla měřena aktivita β -N-acetylhexosaminidasy.

3.2.1.5 Vysolování

Princip vysolování je založen na skutečnosti, že proteiny v prostředí s vysokým obsahem soli mají nižší rozpustnost, vlivem snížení efektivní koncentrace vody v solvatačním obalu molekuly proteinu.

Kultivační medium bylo vysoleno v době, kdy aktivita β -*N*-acetylhexosaminidasy dosahovala nejvyšších hodnot. Roztok byl za sníženého tlaku pomocí Büchnerovy nálevky dvakrát přefiltrován přes dvě vrstvy filtračního papíru. Zfiltrovaný roztok byl chlazen ledovou tříští a za stálého míchání byl postupně po malých částech přidáván síran amonný do 80% nasycení. Po rozpuštění veškeré soli byly roztoky ponechány při 4°C 2-4 dny.

3.2.1.6 Centrifugace vysolených roztoků

Centrifugace se používá k oddělení částic v roztoku, přičemž se využívá odstředivé síly. Složky směsi se dělí na základě rozdílného sedimentačního koeficientu.

Roztoky vysrážených proteinů byly převedeny do polykarbonátových centrifugačních 250 ml kyvet. Kyvety byly vyváženy a centrifugovány 25 min při 10°C, 22 000 g s použitím úhlového rotoru. Vzniklý supernatant byl centrifugován znova za stejných podmínek. Po druhé centrifugaci byl supernatant odstraněn. Vzniklé pelety z obou centrifugací byly resuspendovány v malém objemu supernatantu a převedeny do menších 50 ml propylenových kyvet. Tyto kyvety byly opět centrifugovány v úhlovém rotoru 20 minut při 10°C a 35 000 g. Supernatant byl odstraněn a vzniklá peleta byla převedena do 1,5 ml mikrozkrumavek a ty byly poté centrifugovány 10 min při 10°C a 14 000 g. Supernatant byl odstraněn a zbylá peleta byla převrstvena 0,5 ml nasyceného roztoku síranu amonného. U takto vzniklých precipitátů byla stanovena enzymová aktivita β -*N*-acetylhexosaminidasy.

3.2.2 Purifikace

Purifikace enzymu byla provedena kombinací různých chromatografických metod, které vedly k jeho zakoncentrování a vyšší čistotě. Všechny chromatografické kroky byly provedeny na vysokoúčinných systémech pro kapalinovou chromatografii. Pokud nebylo s proteinovými frakcemi ihned pracováno, byly uchovány při 4°C. Všechny použité pufrы byly před použitím filtrovány za sníženého tlaku přes filtr 0,22 µm, který brání prostupu bakterií.

3.2.2.1 Separace na koloně Fenyl-Sepharosy

Stacionární fáze je při této chromatografii hydrofobní, proteiny se na tuto fázi váží při vysoké iontové síle, přičemž jsou odděleny neproteinové kontaminanty. K eluci proteinů z kolony dochází postupným snižováním iontové síly, která oslabuje hydrofobní interakce.

Precipitáty byly rozpuštěny v pufru A a centrifugovány v polypropylenové kyvetě v úhlovém rotoru 30 minut při 60 000 g a 20°C. Peleta byla odstraněna a supernatant byl přefiltrován přes filtr (0,22 µm). Kolona byla promyta puftrem B a následně ekvilibrována puftrem A. Poté byl supernatant nanesen na kolonu, rychlost nanášení vzorku na kolonu i průtok mobilní fáze byly 4 ml/min. Po nanesení vzorku na kolonu a ustálení signálu detektoru byly kolonou zachycené proteiny vymyty lineárním gradientem pufru B od 0-100% za 60 minut. Obsah proteinů byl sledován měřením absorbance při 280 nm. Byly jímány frakce o objemu 12 ml. U získaných frakcí byla testována enzymatická aktivita a elektroforetická čistota získaného preparátu.

3.2.2.2. Separace na koloně SP-Sepharosy

Tato iontově-výměnná chromatografie probíhá na stacionární fázi, kde funkční skupinou je ionex, který váže kationty (katex), jedná se o SP-sulfopropyl

($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3^-$), s protiontem Na^+ . Síla vazeb proteinů na kolonu je závislá na pH a iontové síle mobilní fáze. Síly slábnou se zvyšující se iontovou silou.

Frakce z chromatografické separace na koloně Fenyl-Sepharosy, které vykazovaly nejvyšší aktivitu hexosaminidasy a zároveň nejvyšší čistotu, byly použity pro dělení na iontoměniči. Frakce byly zahuštěny pomocí membránových filtrů Centricon 10 kDa centrifugací po dobu 20 min při 2 000 RPM. Zahuštěný protein byl následně zředěn pufrém A na 15 ml a za stejných podmínek znovu zahuštěn. Takto vniklý roztok byl znovu zředěn pufrém A, ale na 30 ml. Kolona byla promyta pufrém B a ekvilibrována pufrém A. Rychlost nanášení vzorku i mobilní fáze byla 3 ml/min. Kolonou zachycené proteiny byly vymyty lineárním gradientem pufru B od 0-70% za 40 minut. Obsah proteinu byl sledován měřením absorbance při vlnové délce 280 nm. Během separace byly frakce jímány frakce objemu 15 ml. Všechny frakce byly testovány na enzymatickou aktivitu hexosaminidasy, ty které vykazovaly nejvyšší aktivitu, byly následně charakterizovány elektroforeticky. Frakce s nejvyšší aktivitou, a zároveň o nejvyšší čistotě, byly následně chromatograficky čištěny na koloně MonoQ.

3.2.2.3 Separace na koloně MonoQ

Stacionární fáze kolony pro tento typ chromatografie je ionex, jedná se o anex (má na svém povrchu kladně nabitě skupiny). Mezi kladně nabitou stacionární fází s negativně nabitými proteiny vznikají iontové vazby. Síla těchto vazeb je charakteristická pro daný protein. K eluci dochází rostoucím gradientem soli.

Vybrané frakce po separaci na koloně SP-Sepharosy, byly zahuštěny pomocí membránových filtrů Centricon 10 kDa na 15 ml. Kolona byla promyta pufrém B a ekvilibrována pufrém A. Koncentrát byl naředěn pufrém A, a znovu zahuštěn za stejných podmínek jako před separaci na koloně SP-Sepharosy. Vzniklý koncentrát byl znovu naředěn pufrém A minimálně na dvounásobný objem a takto vzniklý roztok byl nanesen na kolonu. Rychlost nanášení vzorku i rychlost průtoku mobilní fáze byly 0,5 ml/min. Kolonou zachycené proteiny byly vymyty lineárním

gradientem pufru B od 0-80% za 60 minut. Obsah proteinů byl sledován pomocí absorbance při vlnové délce 280 nm. Během separace byly jímány frakce do 1,5 ml mikroskopických kumavek. Frakce byly opět testovány na aktivitu hexosaminidasy a elektroforeticky charakterizovány. U vybraných frakcí byla též stanovena koncentrace proteinů pomocí metody dle Bradfordové. Vybrané frakce byly následně dočištěny gelovou filtrací.

3.2.2.4 Separace na koloně Superdex200

Jedná se o gelovou permeační chromatografii (gelovou filtraci). Stacionární fází je gel s přesně definovanou velikostí pórů. Molekuly se dělí na základě své rozdílné velikosti. Malé molekuly jsou oproti větším molekulám zpomalovány vstupem mezi póry.

Frakce byly zahuštěny pomocí membránových filtrů Centricon 10 kDa centrifugací po dobu 20 min při 2 000 RPM. Kolona Superdex200 byla nejprve promyta LC-MS vodou, byla promyta i nástřiková smyčka s ventilem a následně byla kolona ekvilibrována pyridinovým pufrům. Koncentrát v objemu 0,5 ml byl nastříknut na kolonu. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,5 ml/min. Obsah proteinů byl sledován měřením absorbance při vlnové délce 280 nm. Během separace byly jímány frakce, které odpovídaly elučním vrcholům na chromatografickém záznamu. Frakce byly jímány po 1,5 ml do mikroskopických kumavek a následně testovány na enzymatickou aktivitu hexosaminidasy, jejich čistota byla ověřena elektroforeticky. Nakonec byla stanovena celková koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové.

3.2.2.5 Separace na koloně Fractogel

Dělení proteinů na koloně Fractogel využívá stejných principů jako na koloně SP-Sepharose. K tomuto dělení bylo přistoupeno, pokud dělení na SP-Sepharose nebylo dostatečné, nevedlo k požadované proteinové čistotě preparátu, nebo byla ze

stejného důvodu zařazena až za gelovou chromatografií, přičemž po této separaci vždy následovala další gelová chromatografie.

Byly použity stejné pufrů jako při separaci na SP-Sepharose. Kolona byla promyta pufrů B a ekvilibrována pufrů A. Rychlost nanášení vzorku i průtok mobilní fáze byl 1 ml/min. Kolonou zachycené proteiny byly vymyty lineárním gradientem pufrů B od 0-100% za 100 minut. Obsah proteinů byl sledován měřením absorbance při vlnové délce 280 nm. Frakce odpovídající elučním vrcholům zobrazených na chromatogramu byly jímány po 1,5 ml do mikrozkuvek. U frakcí byla následně stanovena enzymatická aktivita hexosaminidasy, elektroforeticky byla ověřena čistota enzymu, a stanovena celková koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové.

3.2.2.6 Chromatografie na obrácené fázi

Chromatografie na obrácené fázi byla použita k oddělení propeptidu a katalytické podjednotky hexosaminidasy. Stacionární fázi je modifikovaný silikagel, je nepolární a mobilní fáze je polární. Dochází k hydrofobním interakcím, polární sloučeniny jsou eluovány a nepolární jsou zadrženy [73]. Analyt zachycený na kolonu se uvolní postupným zvyšováním podílu nepolárního rozpouštědla v mobilní fázi.

Vzorky vybraných frakcí po gelové chromatografii byly v mikrozkuvkách ve vakuové odparce sesušeny, poté byly rozpuštěny v malém množství vody. Nakonec k nim bylo přidáno takové množství TFA (trifluoroctové kyseliny), aby měl roztok minimálně pH 3. K tomuto roztoku byl přidán 1 ml pufrů A.

K chromatografické separaci byla použita kolona VydacC4. Kolona byla promyta pufrů B a ekvilibrována pufrů A. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 ml/min. Vzorek byl na kolonu nastříknut. Obsah proteinů byl sledován pomocí absorbance při vlnové délce 280 nm. Frakce odpovídající elučním vrcholům byly jímány do mikrozkuvek. Schéma elučního gradientu je v **Tab. 1.** str. 47.

Tab. 1 Gradientový program pro separaci enzymu na koloně VydacC4

čas separace	zastoupení roztoku B
0-5 min	0%
5-50 min	0→70%
50-51 min	70→100%
51-55 min	100%
55-60 min	100→0%

3.2.3 Charakterizace enzymu

3.2.3.1 Stanovení katalytické aktivity

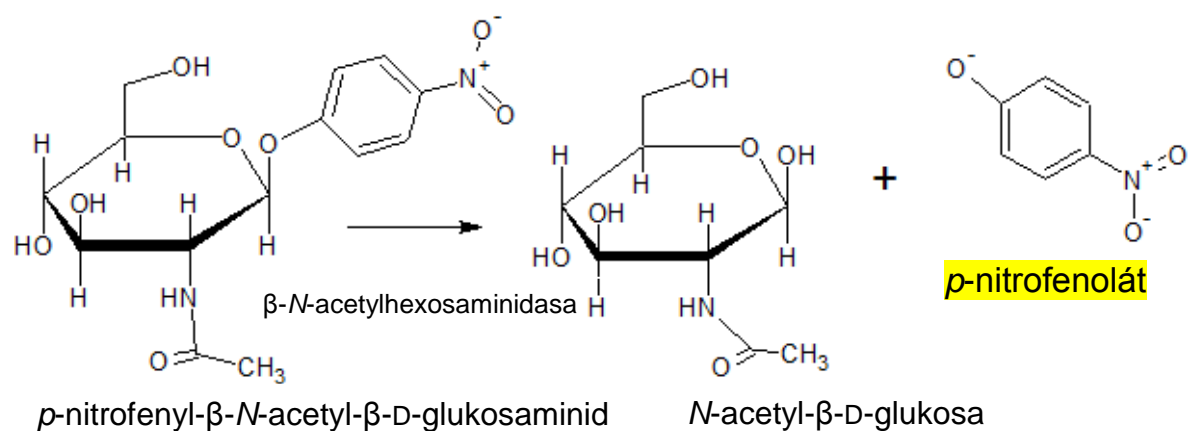
Touto metodou byla stanovena katalytická aktivita enzymu ve vzorcích medií v průběhu kultivace a v precipitátech vzniklých jejich vysolením a ve vzorcích po chemickém sítění. Metoda je založena na schopnosti enzymu β -*N*-acetylhexosaminidasy zpracovávat substrát pNP-GlcNAc (*p*-nitrofenyl-*N*-acetylglukosamin) [74]. Jako jeden z produktů reakce vzniká *p*-nitrofenolát **Obr. 16** str. 48, který je v zásaditém prostředí žlutý a jeho obsah lze měřit spektrofotometricky. Absorpční maximum vykazuje při 420 nm.

Ke stanovení enzymové aktivity hexosaminidasy bylo použito 30 μ l vzorku, 10 μ l 50mM citrát-fosfátového pufru a 10 μ l substrátu pro hexosaminidasu 10mM pNP-GlcNAc. Takto připravené vzorky byly inkubovány při 35°C po dobu 10 minut třepány při 600 ot/min. Poté byla reakce zastavena přidáním 1 ml 1M Na₂CO₃ a byla změřena absorbance při 420 nm. Současně byl připraven slepý pokus smícháním 40 μ l pufru a 10 μ l substrátu.

Stanovení katalytické aktivity bylo počítáno jako tzv. koncentrace katalytické aktivity tj. katalytická aktivita enzymu vztažená na jednotku objemu kapaliny. Jednotkou je U/ml a lze jí vypočítat podle vzorce:

$$A_{obj} = \frac{A \cdot k \cdot V_{RS}}{t \cdot V_{VZ}}$$

- A_{OBJ} koncentrace katalytické aktivity (U/ml) tzv. objemová aktivita
 A naměřená absorbance při 420 nm
 k experimentálně stanovená konstanta vyjadřující vztah absorbance a koncentrace vzniklého *p*-nitrofenolu (mol/ml)
 V_{RS} objem reakční směsi (ml)
 t čas (min)
 V_{VZ} objem vzorku (ml)



Obr. 16 Schéma reakce katalyzované β -*N*-acetylhexosaminidasou

3.2.3.2 Orientační stanovení katalytické aktivity

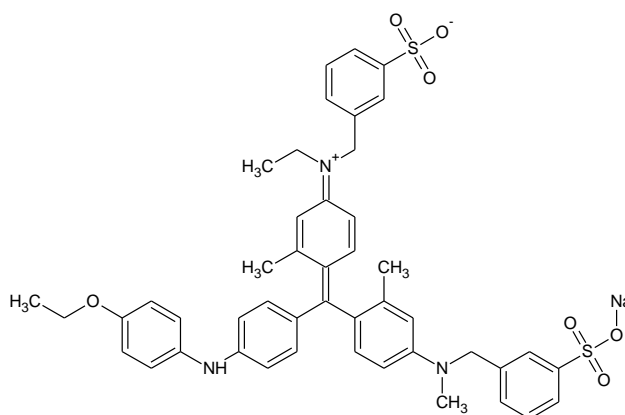
Touto metodou byla stanovena katalytická aktivita β -*N*-acetylhexosaminidasy ve frakcích po chromatografických separacích. Stanovení je orientační a slouží pouze jako semikvantitativní důkaz přítomnosti hexosaminidasy ve vzorku. Čím vyšší je aktivita hexosaminidasy tím větší je žluté zbarvení v jamce.

Stanovení bylo prováděno v mikrotitrační destičce. Do jamek bylo napipetováno 45 μl substrátu 5mM *p*-NP-GlcNAc v 50mM citrát-fosfátovém pufru o pH 5,0. Následně bylo přidáno 5 μl vzorku z příslušné frakce. Jako negativní kontrola bylo použito 5 μl příslušného pufru, ve kterém se nacházely vzorky. Jako pozitivní kontrola byl použit zahuštěný vzorek β -*N*-acetylhexosaminidasy. Reakce byla ponechána 10 minut při laboratorní teplotě a následně byla zastavena přidáním 150 μl 1M Na_2CO_3 . Jamky ve kterých byla přítomna hexosaminidasa zežloutly. Následně byla změřena absorbance destičky při 420 nm.

3.2.3.3 Stanovení koncentrace proteinů

Celková koncentrace proteinů byla stanovena metodou podle Bradfordové. Tato metoda je založena na existenci dvou barevných forem barviva Coomassie Brilliant blue G-250 **Obr. 17**. Vazba barviva na bazické a aromatické skupiny proteiny způsobuje posun jeho absorpčního maxima z 365 nm z červené formy na 595 nm na modrou formu. Měření je nárůst absorbance při 595nm [75].

Komerční činidlo obsahující CBB G-250 bylo před použitím zředěno 5x destilovanou vodou. Současně k této metodě byla provedena kalibrace s kalibračními roztoky hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 g/l. Do mikrotitrační destičky bylo přidáno 200 μl činidla. Následně k němu bylo přidáno 5 μl vzorku. Stanovení proběhlo vždy ve dvou sadách. Po uplynutí 10 minut byla změřena absorbance vzorků při 595 nm.



Obr. 17 Struktura barviva Coomassie Brilliant blue G-250

3.2.3.4 Elektroforetická separace

Elektroforetická separace byla provedena na komerčním gradientovém (4-12%) polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) [76]. Jedná se o elektromigrační separační metodu, při které se dělí molekuly na základě rozdílné rychlosti jejich migrace, která je ovlivněná jejich velikostí a nábojem. Denaturují-li se proteiny a jsou-li na ně navázány molekuly dodecylsírany sodného (SDS) dělí se pouze na základě své velikosti. SDS se váže v poměru 1,4 g SDS/1 g proteinu, a tím každému řetězci udílí uniformní záporný náboj, který převáží nad vlastním proteinovým nábojem [77].

Vzorky byly smíchány se vzorkovým pufrům v poměru 1:3. Následně byly ponechány 4 minuty v termostatu při 90°C, stočeny a naneseny na komerční gradientový polyakrylamidový gel (4-12%). Byl použit MES SDS elektrodový pufr, který byl před použitím zředěn 20x. Současně se vzorky byl na gel nanesen také standard molekulových hmotností. Do případných prázdných jamek byl nanesen naředěný vzorkový pufr. Napětí bylo nastaveno na 200 V. Po ukončení elektroforesy byl gel barven 15 minut v barvicím roztoku a několik hodin odbarvován v odbarvovacím roztoku.

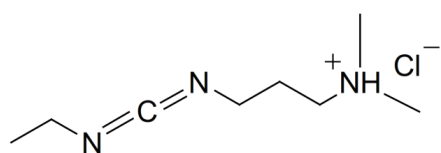
3.2.4 Chemické zesíťení

Metoda chemického sítění je hojně používaná ke strukturním studiím. Je známá pod názvem „chemical cross-linking“. Tato strategie slouží jako alternativní k jiným metodám jako jsou krystalografie či NMR spektrometrie (nukleární magnetická resonance). Oproti nim chemické zesíťení, které je spojováno s MS analýzou (hmotnostní spektrometrie) přináší několik výhod: 1) teoreticky neomezená molekulová hmotnost proteinu, protože jsou analyzovány peptidy 2) za příznivých okolností je analýza rychlá 3) je potřeba pouze pikomolové množství proteinu 4) protein lze studovat v roztoku a je možné charakterizovat flexibilní oblasti. Chemicky zesíťit lze molekulu kovalentní vazbou mezi dvěma proteinovými

molekulami (intermolekulárně), nebo v rámci různých oblastí jedné molekuly (intramolekulárně). Dále může vzniknout oligomer či precipitát. Je k dispozici celá řada činidel, ale obvykle se využívají bifunkční činidla. Tato činidla jsou homobifunkční (spojují 2 stejné skupiny postranních řetězců aminokyselin) či heterobifunkční (spojují 2 různé skupiny). Propojením skupin lze získat informaci o jejich minimální vzdálenosti [78]. V této práci byla použita síťovací činidla EDC, DSG a DSS.

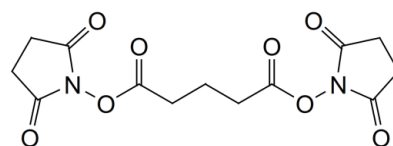
EDC **Obr. 18a** {1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid hydrochlorid} je heterobifunkční činidlo, které spojuje karboxylovou skupinu s amino skupinou a to na tzv. nulovou vzdálenost.

DSG **Obr. 18b** (disukcinimidyl glutarát) je homobifunkční činidlo, které propojuje aminoskupiny na minimální vzdálenost 18Å.



a)

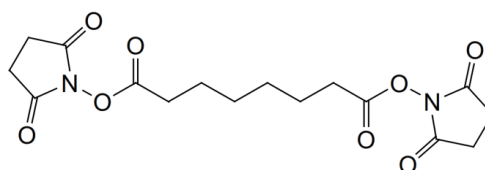
Obr. 18 a Struktura molekuly EDC



b)

b Struktura molekuly DSG

DSS **Obr. 19** (disukcinimidyl suberát) je homobifunkční činidlo kovalentně spojující aminoskupiny do minimální vzdálenosti 22Å.



Obr. 19 Struktura molekuly DSS [79]

Chemického síťení bylo použito s cílem vytvořit vazbu mezi katalytickou podjednotkou a propeptidem β -N-acetylhexosaminidasy. Byl použit vzorek proteinu s nejvyšší získanou čistotou, ověřenou elektroforeticky. Protein z frakce po separaci na gelové chromatografii se nacházel v pyridinovém pufru o pH 7,0. Byl použit

vzorek o koncentraci 0,5 mg/ml. Roztok EDC byl připraven rozpuštěním v H₂O a roztoky DSS a DSG byly připraveny rozpuštěním v dimethylsulfoxidu. Byly vytvořeny zásobní roztoky o koncentraci 2 mg/ml. Definované množství proteinu, obvykle 20-15 µg bylo napipetováno do malých mikrozkušavek a následně bylo přidáno síťovací činidlo v definovaném molárním přebytku. Molární přebytek činidla bylo nutné optimalizovat. Současně byla provedena kontrola obsahující protein bez činidla. Takto připravené vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě, v případě EDC 5 hodin, v případě DSG a DSS 3 hodiny.

3.2.4.1 Elektroforetická separace produktů

Při síťovací reakci vzniká více produktů a je nutné je elektroforeticky oddělit. Vzorky byly sesušeny na 10 µl a byla provedena elektroforetická separace popsána v kapitole 3.2.3.4 str. 50.

3.2.4.2 Vyřezávání a odbarvení gelu

Na odbarveném polyakrylamidovém gelu s rozdělenými produkty síťovací reakce byly vybrány oblasti odpovídající molekulové hmotnosti požadovaných produktů, kovalentnímu heterodimeru, katalytické podjednotky a propeptidu a pomocí skalpelu byly vyříznuty. Vyříznuté proužky byly dále nařezány na malé kostičky a přeneseny do malých 0,5 ml mikrozkušavek. Do zkumavek bylo přidáno 100 µl čerstvě připraveného 100mM ethylmorfolinového pufru (EtMo) o pH 8,4 a 100 µl acetonitrilu (ACN). Mikrozkušavky byly zamíchány na vortexu a po dobu 1h byly sonikovány do odbarvení gelu. Poté bylo přidáno 150 µl ACN, vzorky byly zamíchány a sonikovány dalších 5 minut. Následně byly roztoky s gelem sesušeny na vakuové odparce. Pokud se vzorky nebylo ihned dále pracováno, byly zamrazeny na -20°C.

3.2.4.3 Redukce a alkylace disulfidových můstků

Vzorky byly vytemperovány na laboratorní teplotu, následně k nim bylo přidáno 100 μ l roztoku 100mM TCEP {tris(2-karboxyethyl)fosfin}, který slouží k redukci disulfidových můstků. Roztok vznikl naředěním zásobního 1M TCEP v 100mM EthMo pufru o pH 8,4. Vzorky byly zamíchány pomocí vortexu a 5 minut inkubovány v termostatu při 90°C. Poté byl za tepla roztok nad gelem odebrán a bylo přidáno 100 μ l ACN. Vzorky byly zamíchány na vortexu, stočeny v mikrocentrifuze při 13 000 g a roztok byl opět odebrán. Dále bylo ke vzorkům přidáno 70 μ l čerstvě připraveného roztoku 50mM iodacetamidu (IAA), který alkyluje cysteinové zbytky, aby nedošlo k znovuvytvoření disulfidových můstků. Tento roztok vznikl rozpuštěním IAA v 100mM EthMo pufru o pH 8,4. Takto připravené vzorky byly ponechány ve tmě po dobu 20 minut.

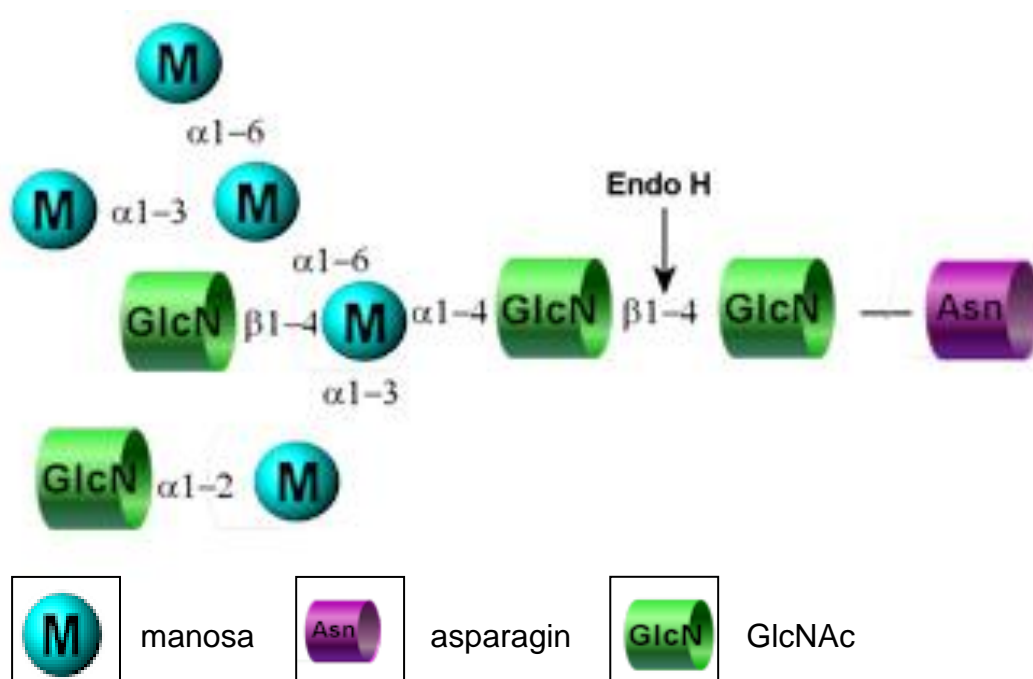
Poté byla provedena extrakce nízkomolekulárních látek, roztok byl odebrán a bylo přidáno 150 μ l vody, vzorky byly zamíchány na vortexu, 5 minut sonikovány a stočeny na mikrocentrifuze, roztok byl opět odebrán. Celý proces byl opakován se 150 μ l ACN poté s H₂O znovu s ACN a znovu s H₂O a nakonec s ACN/H₂O v poměru 1:1. Nakonec byl gel sesušen na vakuové odparce. Vzorky byly dále zpracovány nebo uchovány při -20°C.

3.2.4.4. Deglykosylace

Enzym byl pro zjednodušení MS analýzy deglykosylován. Byla použita endoglykosidasa H (EndoH). Tato glykosidasa je vysoce specifická, štěpí vazbu $\beta(1\rightarrow4)$ v diacetylchitobiosovém jádře u *N*-vázaných (na asparaginu) oligosacharidů bohatých na manosu **Obr. 20**. str. 54.

Ke každému gelu bylo přidáno 20 μ l roztoku EndoH (na jeden vzorek: 20 μ l Neb pufr/H₂O v poměru 1:9 + 0,5 μ l EndoH). Vzorky byly ponechány v termostatu při 37°C po dobu asi 16 hodin. Po uplynutí doby byly mikrozkušavky s gelem vyndány z termostatu, stočeny v mikrocentrifuze a roztok nad gelem byl odebrán.

Následně bylo přidáno 200 μl ACN, vzorky byly zamíchány na vortexu, 5 minut sonikovány a poté byl roztok nad gelem odebrán. Postup promývání byl opakován s 200 μl H₂O, 300 μl ACN, 200 μl H₂O, a nakonec s 200 μl ACN/H₂O (1:1). Nakonec byl gel byl sesušen na vakuové odparce.



Obr. 20 Princip štěpení vazby v sacharidových řetězcích endoglykosidasou H [80]

3.2.4.5 Štěpení enzymu

Aby bylo možné zjistit, mezi kterými aminokyselinami došlo k propojení síťící sondou, bylo nutné enzym štěpit na kratší peptidy. K tomuto účelu byla použita serinová proteasa, trypsin (EC 3.4.21.4), která štěpí peptidové vazby v polypeptidovém řetězci za Lys a Arg.

Ke vzorkům bylo přidáno asi 20 μl roztoku trypsinu, který vznikl 40x naředěním zásobního roztoku štěpícím pufrem. Ke vzorkům obsahujících propeptid byl přidán roztok trypsinu o vyšší koncentraci, pro zvýšení produktů proteolytické reakce. Bylo přidáno asi 20 μl zásobního roztoku trypsinu ředěného pouze 20x. Objem roztoku trypsinu byl přidán tak aby gel byl zcela ponořen ale neplaval. Takto připravené vzorky byly uloženy při 37°C v termostatu. Po 30 minutách byl objem roztoku

zkontrolován a popřípadě byl trypsin doplněn. Vzorke byly v termostatu ponechány 16 hodin (přes noc). Po uplynutí doby byly vzorky vyndány z termostatu, stočeny v mikrocentrifuze, 2 minuty sonikovány a následně opět stočeny. Roztok byl odebrán do nových mikrozkuavek. K původním mikrozkuavkám obsahující gel bylo přidáno 30 μ l roztoku 50% ACN, byly zamíchány na vortexu, sonikovány a stočeny v mikrocentrifuze. Roztok byl následně odebrán do nových mikrozkuavek. Tento postup promytí gelu byl opakován s 30 μ l 0,1% TFA, 30 μ l 60% ACN / 0,1% TFA. Pokud nebyly získané vzorky peptidů ihned zpracovány, byly sesušeny na 5-10 μ l a zmrazeny.

3.2.4.6 Odsolení a zakoncentrování

Protože vzorky mohou obsahovat kontaminanty ve formě solí, které by rušily MS analýzu peptidů, je nutné tyto kontaminanty odstranit a zároveň vzorky zakoncentrovat. K tomuto účelu byla použita mikrokolona microtrap, která pracuje na principu chromatografie na obrácené fázi, který je vysvětlen v kapitole 3.2.2.6.

Tab. 2 Roztoky používané k odsolení vzorků peptidů

Název roztoku	složení
extrakyselý ACN	80% ACN + 1% TFA
kyselý ACN	80% ACN + 0,1% TFA
kyselá voda	0,1% TFA

Vzorky peptidů byly vytemperovány na laboratorní teplotu, stočeny a ke každému bylo přidáno 5 μ l roztoku 80% ACN + 0,1% TFA. Vzorky byly sonikovány a opět stočeny a bylo k nim přidáno 240 μ l 0,1% TFA, následovala sonikace a stočení. Byla používána mikrokolona pro odsolení. Roztok do aparatury byl nanášen 250 μ l hamiltonovou mikrostríkačkou. Kolonka byla promyta 50% ACN, extrakyselým, kyselým ACN, kyselou vodou, znovu extrakyselým ACN a kyselou vodou. Složení roztoků je v **Tab. 2**. Před každým vzorkem byla kolonka promyta 3x kyselou vodou a poté byl nabrán vzorek a pomalu protlačován. Následně byla mikrokolona odsolena 3x promytím kyselou vodou. K eluci peptidů

bylo použito 50 μl extrakyselého ACN a následně 50 μl kyselého ACN. Roztok eluovaných peptidů byl jímán do nových mikrozkušavek. Mikrokolonka byla promyta extrakyselým ACN, kyselou vodou a kyselým ACN. Vzorky byly sesušeny na 5 μl a zamraženy.

3.2.4.7 Peptidové mapování

K identifikaci produktů a ověření skutečnosti, zda opravdu došlo k tvorbě požadovaného heterodimeru propeptidu a katalytické podjednotky, byla použita hmotnostní spektrometrie s využitím MALDI (ionizace laserovou desorcí v přítomnosti matrice).

Jako matrice byl použit roztok kyseliny α -kyano-4-hydroxy skořicové (HCCA). Zásobní roztok HCCA byl připraven ve formě nasyceného roztoku v methanolu, zamíchán na vortexu, sonikován a stočen. Na MALDI desku bylo nanášeno 1,5 μl peptidového standardu a vzorků peptidů. Byl připraven roztok MALDI matrice a po zaschnutí nanášky peptidů byly vzorky tímto roztokem převrstveny. Ke každému vzorku bylo přidáno 0,8 μl roztoku matrice. Po zaschnutí matrice byly vzorky změřeny RNDr. Petrem Novákem, Ph.D. Měření MALDI-MS bylo provedeno dvakrát s každým vzorkem. První bylo měření vzorků peptidů po štěpení trypsinem a druhé se stejnými vzorky po jejich odsolení.

3.2.4.8 LC-MS analýza

Vzorky byly vytemperovány na laboratorní teplotu, bylo k nim přidáno 2 μ l extrakyselého ACN a promíchány na vortexu. Poté bylo ke vzorkům přidáno 25 μ l 0,1% TFA, byly zamíchány, sonikovány a stočeny. Vzorky byly převedeny do vialek opatřených septem a tím byly finálně připraveny pro LC-MS analýzu.

Vlastní LC-MS analýza peptidů byla provedena mým školitelem RNDr. Petrem Novákem, Ph.D. Peptidy byly odděleny na koloně Magic C18 pomocí chromatografie na obrácené fázi (μ HPLC systém Agilent 1200). Nástřík vzorku byl 4 μ l. Kolonou zachycené peptidy byly vymyty lineárním gradientem pufru B od 1 do 45% za 30 minut. HPLC systém byl přímo propojen s hmotnostním spektrometrem (Apex-Ultra mass spectrometr, Bruker Daltonics). Separované peptidy byly nabitý pomocí ESI ionizace a detekovány pomocí s FT-ICR. Získaná data byla interpretována pomocí speciálních programů DataAnalysis 4.0 a BioTools 3.2. (Bruker Daltonics) a MSLinks.

Pomocí SNAP algoritmu byla spektra deisotopována a dekonvoluována. K zobrazeným absorpčním maximům (píkům) byly přiřazeny náboje a hmotnosti. Pomocí databáze knihoven peptidů byly k jednotlivým hmotnostem přiřazeny konkrétní peptidy.

Z nalezených peptidů pak byly vybrány takové, jejichž poměr hmotnost/náboj nebyl přítomen v kontrole, byly zesítěny a pocházely z kovalentního heterodimeru, tedy obsahovaly zároveň peptid z propeptidu i peptid z katalytické podjednotky. V takto vybraných peptidech byly pomocí známé sekvence nalezeny konkrétní aminokyseliny, které byly propojeny. V programu PyMol byly nalezené aminokyseliny konfrontovány s homologním modelem katalytické podjednotky β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*. Nalezené aminokyseliny, pocházející z kontaktního místa katalytické podjednotky a propeptidu byly v tomto modelu vyznačeny.

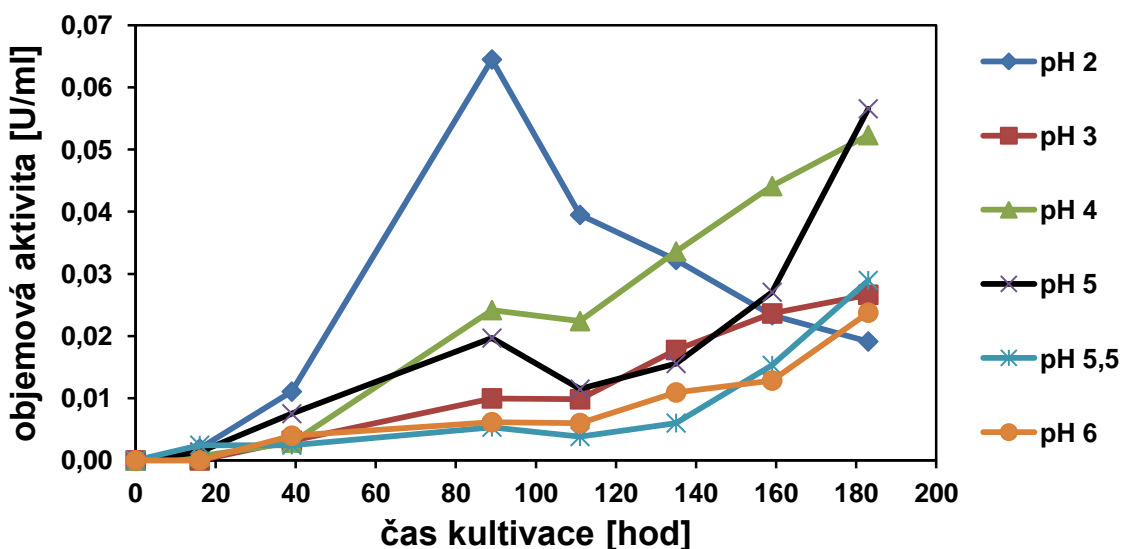
3 Výsledky

4.1 Kultivace

Vybraný kmen *Penicillium oxalicum* CCF 3438 byl kultivován v minerálním mediu, které je modifikací Czapek-Dox media a které je pro kultivaci vláknitých hub nejvhodnější. Podmínky produkce byly modifikovány změnou počátečního pH media, změnou celkového složení media a změnou přidávané organické složky (bakteriologický pepton, mykologický pepton a kvasničný autolyzát).

4.1.1 Vliv počátečního pH media

Byla připravena media o složení popsaného v kapitole 3.2.1.3 o různém počátečním pH, v tomto případě byl použit bakteriologický pepton. Pro jednotlivá media byla v průběhu kultivace měřena enzymová aktivita. Průběh aktivní křivky, která vyjadřuje závislost objemové aktivity enzymu na čase kultivace *Penicillium oxalicum* je znázorněn na **Obr. 21**.

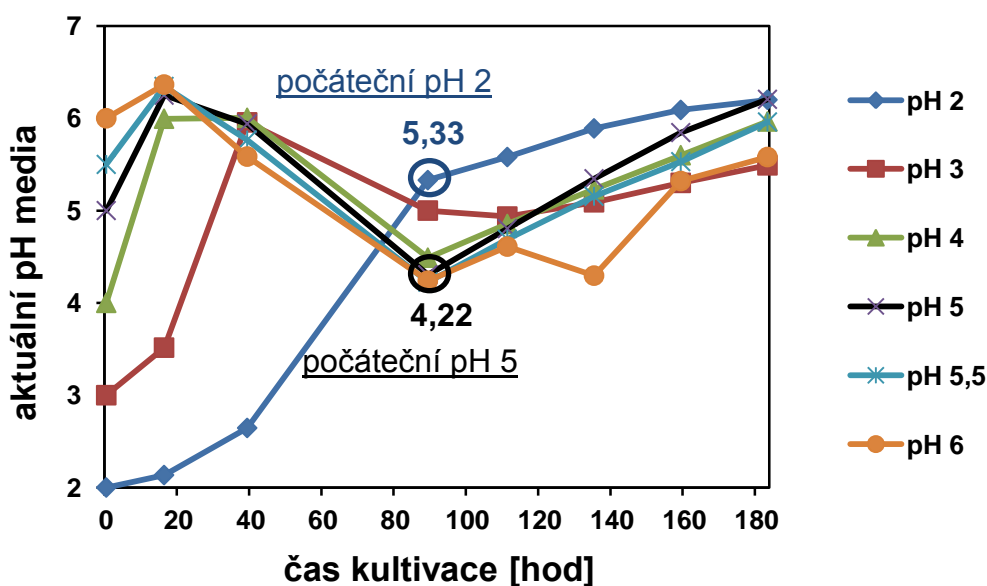


Obr. 21 Závislost objemové aktivity β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* CCF 3438 na čase kultivace pro media o různém počátečním pH

V literatuře je uvedeno jako nejvhodnější pH pro kultivaci *Penicillium oxalicum* pH v rozmezí 4,5-5,5, proto byly pro počáteční pH medií vybírány oblasti blízké těmto hodnotám. Kultivace byla obvykle ukončena v době, kdy docházelo k poklesu aktivity. Z grafu je patrné, že nejvyšší aktivity dosahoval enzym okolo 90 hodiny kultivace v mediu o počátečním pH 2, přičemž v mediu o počátečním pH 5, dosahoval enzym srovnatelné aktivity až v 180 hodině kultivace. Na základě tohoto měření bylo pro kultivaci vybráno medium o počáteční hodnotě pH 2.

4.1.2 Změna pH media v průběhu kultivace

Ve stejných časech jako probíhal odběr media pro stanovení aktivity, bylo měřeno i jeho aktuální pH. Graf závislosti aktuálního pH media na čase kultivace pro různé počáteční pH medií je znázorněn na **Obr. 22**.



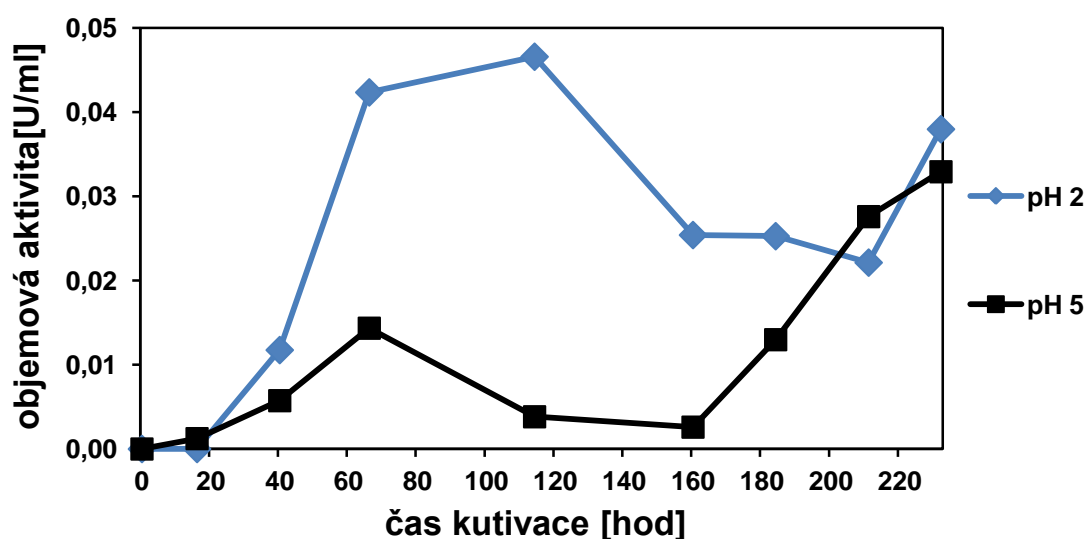
Obr. 22 Graf závislosti aktuální hodnoty pH na čase kultivace pro media o různých počátečních hodnotách pH

Z grafu lze pozorovat, že bez ohledu na počáteční pH medií, v době ukončení kultivace nebyl rozptýl pH hodnot medií tak velký jako na počátku kultivace. V průběhu kultivace pH všech medií nejdříve prudce vzrostlo a poté byl u všech medií, s výjimkou media o počátečního pH 2, zaznamenám opět prudký pokles.

Všechna media nakonec vykazovala pH v úzkém rozmezí hodnot 5,6-6,2. V 90 hodině kultivace, kdy byla naměřena nejvyšší aktivita enzymu v mediu o počátečním pH 2, mělo toto medium i nejvyšší aktuální pH ze všech monitorovaných medií a v porovnání s mediem o počáteční hodnotě pH 5 mělo pH vyšší o 1,11. Ačkoli medium o počátečním pH 5 na konci kultivace vykazovalo stejné pH jako medium o počátečním pH 2, aktivita enzymu byla téměř 3x vyšší.

4.1.3 Porovnání medií počátečních pH 2 a 5

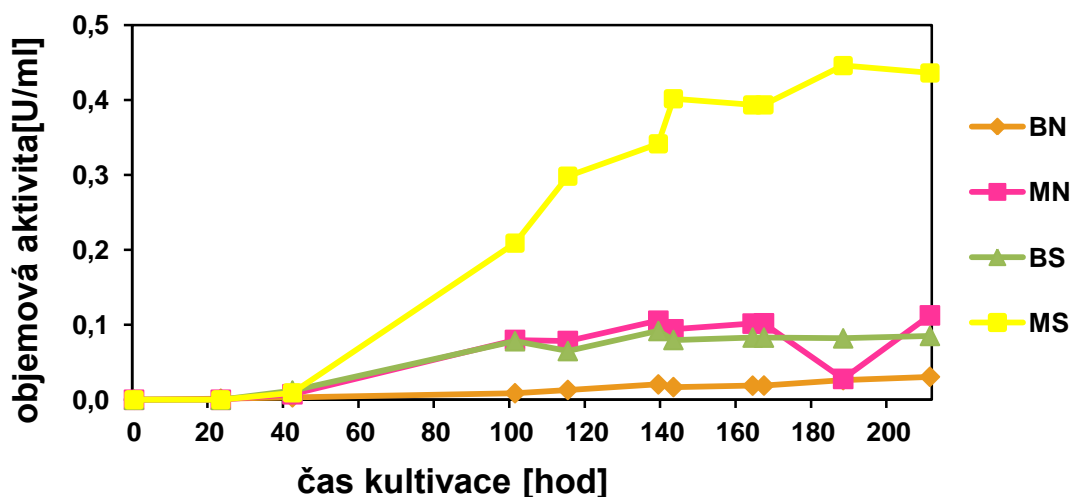
Z předchozích experimentů se ukázala být vhodná ke kultivaci *Penicillium oxalicum* media o počátečních pH 2 a 5. Pro tato dvě vybraná media byl opět naměřen časový průběh aktivity v během kultivace **Obr. 23**. Všechny podmínky byly stejné jako v předchozím experimentu. Vybraná media byla použita v tomto pokusu s cílem je znovu porovnat a potvrdit předchozí výsledky. Zároveň byl pokus využit i k demonstraci skutečnosti, že průběh aktivitních křivek není v různých kultivacích identický. V grafu lze pozorovat, že v porovnání s předchozí kultivací **Obr. 21** str. 58 aktivitní křivky skutečně nejsou při různých kultivacích identické, ale vykazují stejný trend.



Obr. 23 Graf závislosti aktivity enzymu na čase kultivace v mediích o počátečních hodnotách pH 2 a 5

4.1.4 Vliv „stáří“ spor a druhu peptonu

Z důvodu dosahování velice nízkých objemových aktivit β -*N*-acetylhexosaminidasy (0,02-0,07 U/ml), a tudíž i celkového výtěžku enzymu, bylo přistoupeno k další změně podmínek. Byl použit stejný kmen vláknité houby *Penicillium oxalicum* CCF 3438, ale z jiného zdroje, pocházel ze sbírky Botanické zahrady Karlovy univerzity v Praze. Původně byly spory vláknité houby dodány Laboratoří přirozené buněčné imunity Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. Nově získaná vláknitá houba byla označena písmenem „N“. Původní vláknitá houba, cca 1 rok uchovaná na agaru při 4°C, nesla označení „S“. Dále byla měřena objemová aktivita enzymu v mediu, které obsahovalo doposud používaný bakteriologický pepton (B) a v mediu, kde byl bakteriologický pepton nahrazen mykologickým (M) **Obr. 24**. Kultivace byla provedena v mediu o počáteční hodnotě pH 2.

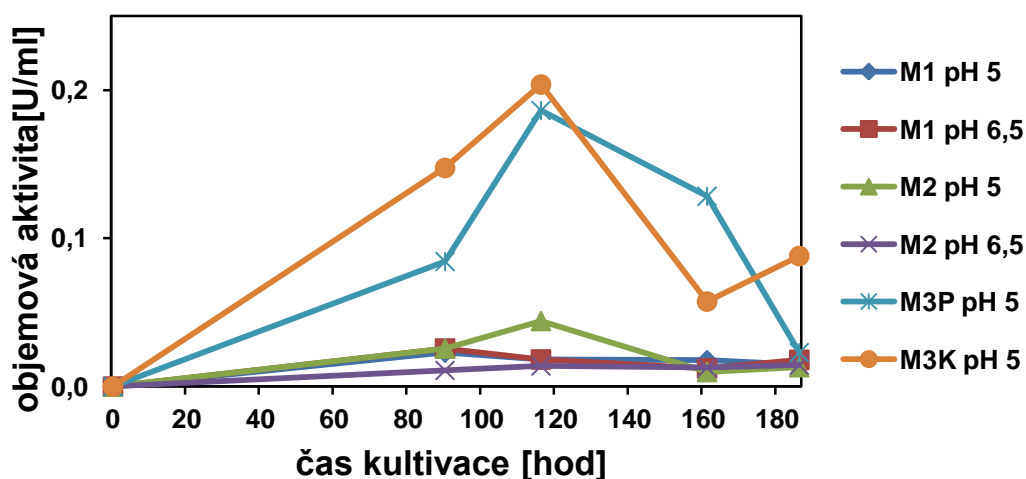


Obr. 24 Graf závislosti objemové aktivity na čase, porovnání mykologického peptonu (M), bakteriologického peptonu (B) a nových (N) a starých (S) spor *Penicillium oxalicum* CCF 3438

Z grafu je patrné, že kultivační podmínky, kdy mykologický pepton nahradil bakteriologický a při kterých byla použita původní vláknitá houba, vytvářely nejpříznivější prostředí pro tvorbu aktivní β -*N*-acetylhexosaminidasy.

4.1.5 Změny složení media

Vzhledem k stále nízkým výtěžkům β -N-acetylhexosaminidasy, byla další snahou o jejich zvýšení celková změna media. Bylo navrženo několik následujících změn ve složení medií: medium 1 (M1) na 100 ml obsahovalo 1 g mykologického peptonu, 0,5 g kvasničného autolyzátu a 0,5 g NaCl. Medium 2 (M2) na 100 ml obsahovalo 0,5 g mykologického peptonu, 1 g kvasničného autolyzátu a 0,5 g NaCl. Tato media byla referována jako potenciálně vhodná kultivační media vláknitých hub při počátečním pH 6,5, proto byly o tomto počátečním pH připraveny. Zároveň byly připraveny také media o počátečním pH 5, jelikož z předchozích provedených experimentů s původním mediem toto pH vyšlo jako jedno ze dvou nejprůzračnějších pro kultivaci *Penicillium oxalicum*. Medium o počátečním pH 5, bylo také vybráno proto, že je bližší předchozím mediím, které mají pH 6, než druhá vhodná podmínka, kterou je medium o počátečním pH 2. Medium 3 (M3) bylo původní medium, kde byl bakteriologický pepton nahrazen buď mykologickým peptonem (P) či kvasničným autolyzátem (K). Medium M3 bylo připraveno pouze o počátečním pH 5. Grafy aktivních křivek enzymu jsou znázorněny na **Obr. 25**.

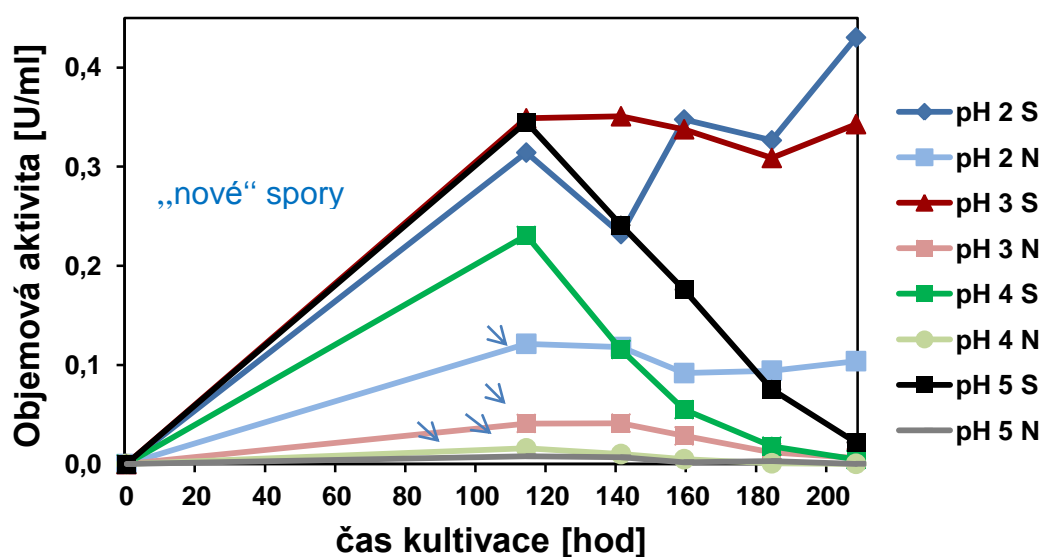


Obr. 25 Aktivitní křivka pro různé složení kultivačního media

Nejvyšších hodnot aktivity hexosaminidasy bylo dosaženo v původním medi, kde byl nahrazen bakteriologický peptonu za mykologický pepton nebo za kvasničný autolyzát.

4.1.6 Vliv „stáří“ spor a pH media

Jelikož záměna peptonu v kultivačním mediu za kvasničný autolyzát vykazovala pozitivní vliv na objemovou aktivitu hexosaminidasy, byla takto upravená media připravena znovu o různých počátečního pH medií a znovu bylo použito dvou druhů spor *Penicillium oxalicum* lišících se stářím. Naměřené hodnoty objemových aktivit β -N-acetylhexosaminidasy jsou zaznamenány v grafu na **Obr. 26**.



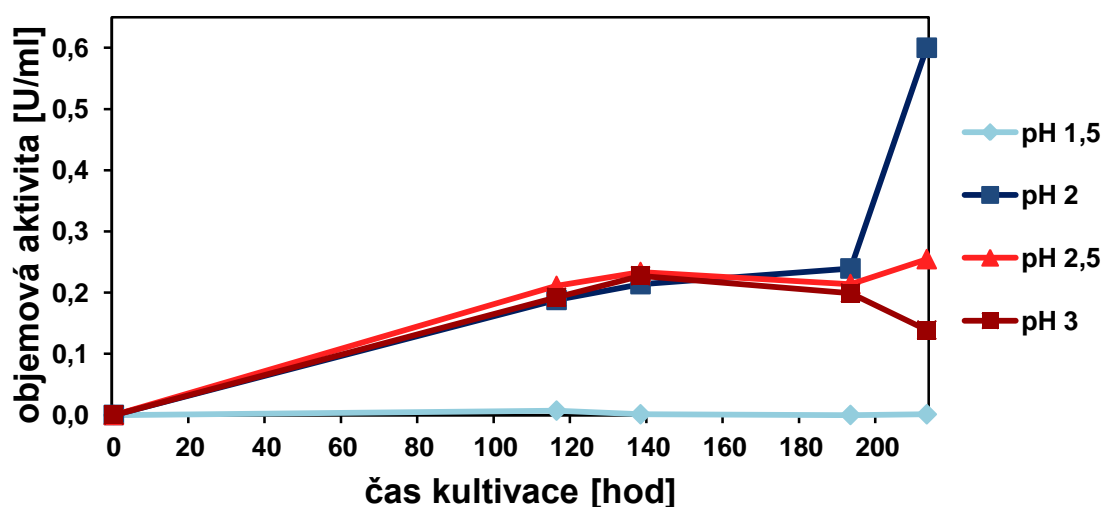
Obr. 26 Aktivitní křivka enzymu v mediích při různých počáteční pH, pro různé stáří spor při použití kvasničného autolyzátu jako součásti kultivačního media

Z grafu je patrné, že bylo znovu potvrzeno zjištění, že naměřená objemová aktivita enzymu je výrazně nižší při použití spor s označením „N“, tedy nově získaných, než spor, které byly po dobu jednoho roku uchovávány na agaru při 4°C. Nejvyšších aktivit je opět dosaženo při počátečním pH 2 a 5.

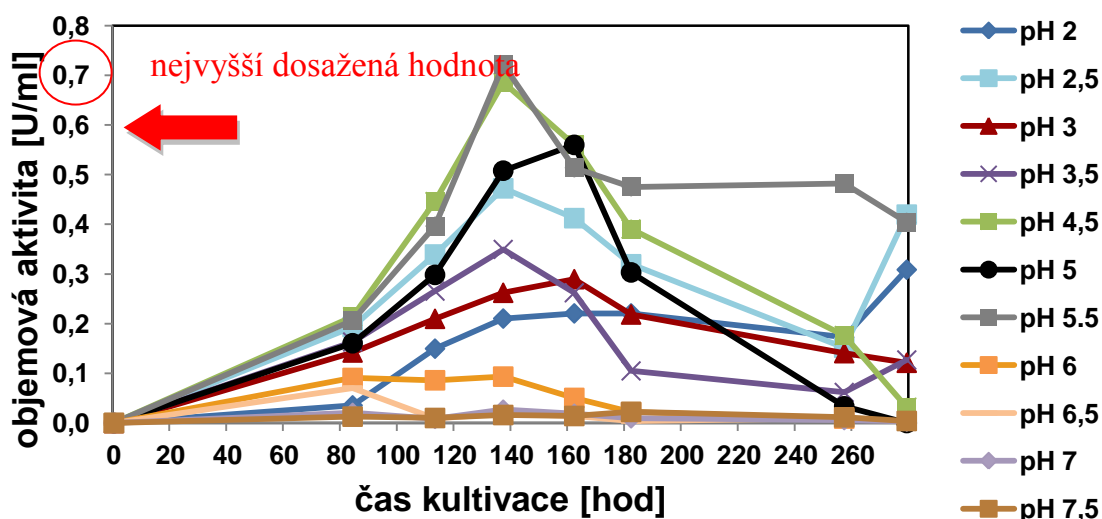
4.1.7 Aktivitní křivky pro nové medium

Jako kultivační medium bylo vybráno původní medium, které obsahovalo přídavek kvasničného autolyzátu namísto bakteriologického peptonu v původním mediu. Kultivace byla nadále uskutečněna pouze s původními „starými“ vzorky spor

Penicillium oxalicum CCF 3438. Pro takto vybrané podmínky kultivace byly změřeny aktivní křivky pro nízké počáteční hodnoty pH medií **Obr. 27**. Lze pozorovat, že v mediu při počátečním pH 1,5 nebyla v průběhu kultivace naměřena žádná aktivita. Při počátečním pH 2 byla opět naměřena aktivita β -N-acetylhexosaminidasy nejvyšší, přibližně 2x vyšší než u medií o počátečních pH 2,5 a 3. Aktivní křivka pro hodnoty pH v širším rozsahu a delším čase je znázorněna na **Obr. 28**. Lze pozorovat, že nejvyšších hodnot (až 0,7 U/ml) objemové aktivity dosahuje enzym v mediích při počátečních pH 4,5 a 5,5.



Obr. 27 Aktivitní křivky pro media o nízkém počátečním pH

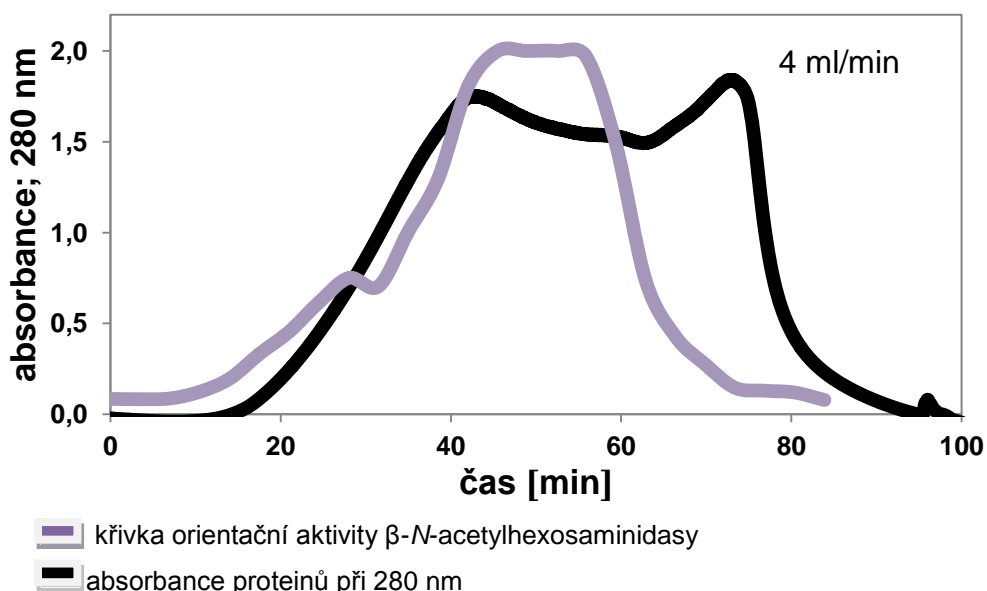


Obr. 28 Aktivitní křivky pro media o širším rozsahu počátečních hodnot pH

4.2 Purifikace

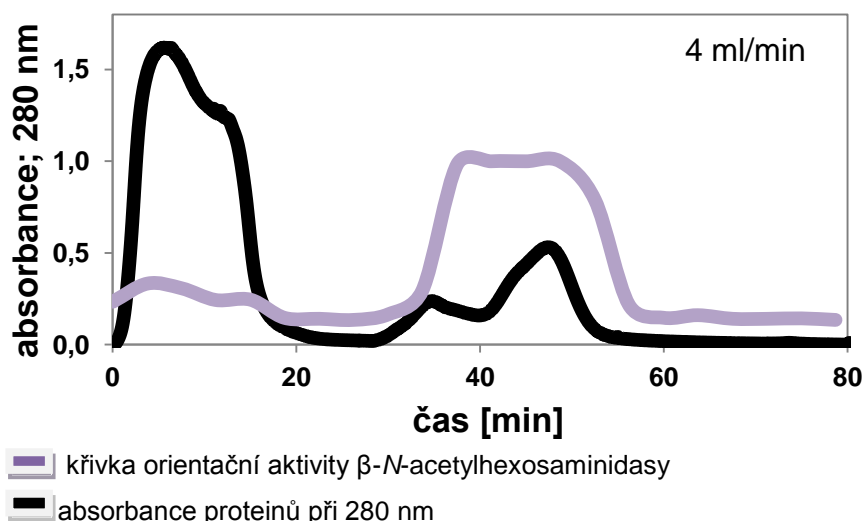
Extracelulární enzym byl produkován do media, z kterého byla vysolením získána proteinová frakce. Následně bylo nutné proteiny odseparovat s cílem získat čistou β -*N*-acetylhexosaminidasu. Purifikace enzymu probíhala sadou chromatografických technik. U každé chromatografie je zobrazený příslušný chromatogram (absorbance eluovaných frakcí při 280 nm) černou křivkou a naměřená orientační enzymová aktivita fialovou křivkou. Ploché vrchol křivek orientačních enzymových aktivit vznikl z hodnot, které byly nad limitem detekce přístroje.

Při hydrofobní chromatografii docházelo především k odstranění kontaminant ze síranové frakce, které nebyly proteinové povahy. Chromatogram a orientační aktivitní křivka enzymu jsou znázorněny na **Obr. 29**. Lze pozorovat, že enzym, vyskytující se ve frakcích z oblasti ohraničené aktivitní křivkou po separaci nevykazoval požadovanou čistotu, a proto byly provedeny další chromatografické separace na jiných kolonách. Následovaly chromatografické separace na ionexech.



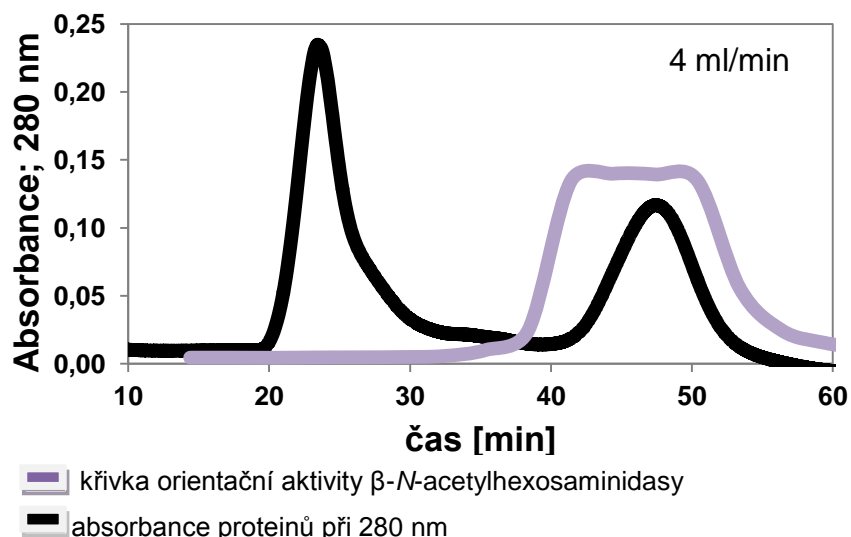
Obr. 29 Chromatografická separace β -*N*-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* na koloně Fenyln-Sepharosy

Na chromatogramu a aktivitní křivce po separaci proteinů na koloně SP-Sepharose **Obr. 30** lze vidět, že již došlo k odstranění velké části proteinových kontaminant, ale enzym ještě nevykazuje požadovanou čistotu. V porovnání s chromatogramem po separaci na koloně Fractogel **Obr. 31** str. 67 si lze všimnout obdobného elučního profilu. Separace na koloně Fractogel byla použita buď namísto SP-Sepharosy, když purifikace neproběhla úspěšně, nebo až dodatečně pro zvýšení čistoty enzymu po separaci na koloně Superdex200. Pokud byla separace na koloně Fractogel zařazena až za gelovou chromatografií, následovala po této separaci další gelová chromatografie. Na záznamu chromatografické separace na ionexové koloně MonoQ **Obr. 32** str. 67. lze podle profilu obou křivek usoudit, že enzym je již téměř čistý.

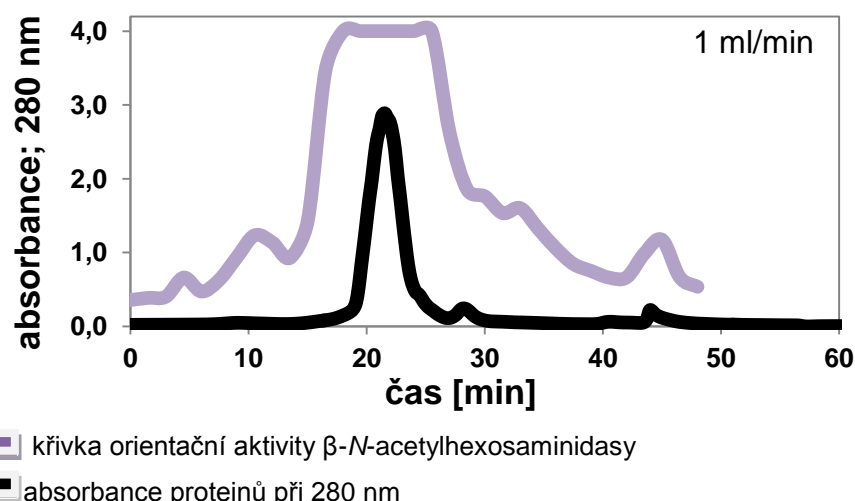


Obr. 30. Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* na ionexové koloně SP-Sepharose

Poslední v řadě byla vždy gelová chromatografie. Chromatografický záznam lze vidět na **Obr. 33** str. 68. Ačkoli na chromatogramu je zaznamenán jen jeden eluční vrchol, a enzym se tedy zdá být čistý, křivka orientační aktivity, která byla naměřena jen u vybraných frakcí, ohraničuje v elučním vrcholu jen část, která vykazuje aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy.



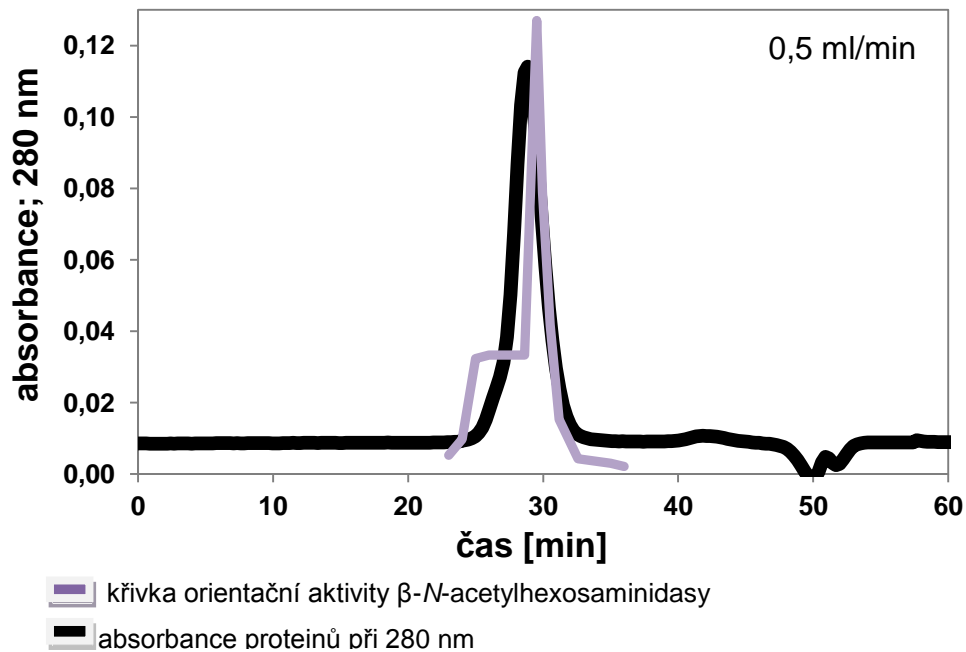
*Obr. 31 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* na ionexové koloně Fractogel*



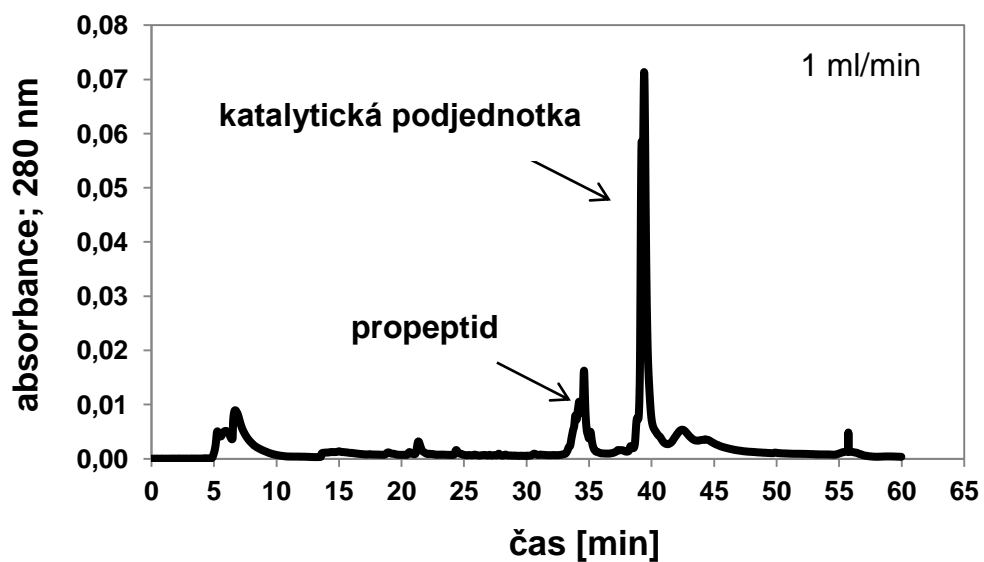
*Obr. 32 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* na koloně MonoQ*

Z důvodu charakterizace stability enzymu za nízkého pH byla provedena chromatografie na obrácené fázi. Na chromatogramu *Obr. 34* str. 68 lze vidět eluční vrcholy patřící samotnému propeptidu a samotné katalytické podjednotce β -N-acetylhexosaminidasy. Touto chromatografií došlo k jejich oddělení, způsobeného prostředím o nízkém pH, které porušilo jejich interakci. Propeptid je

eluován jako první. V důsledku velkého poměru glykosylace polypeptidového řetězce a jeho velikost, eluce není zaznamenána jako hladká křivka.



Obr. 33 Chromatografická separace β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* na gelové koloně Superdex200

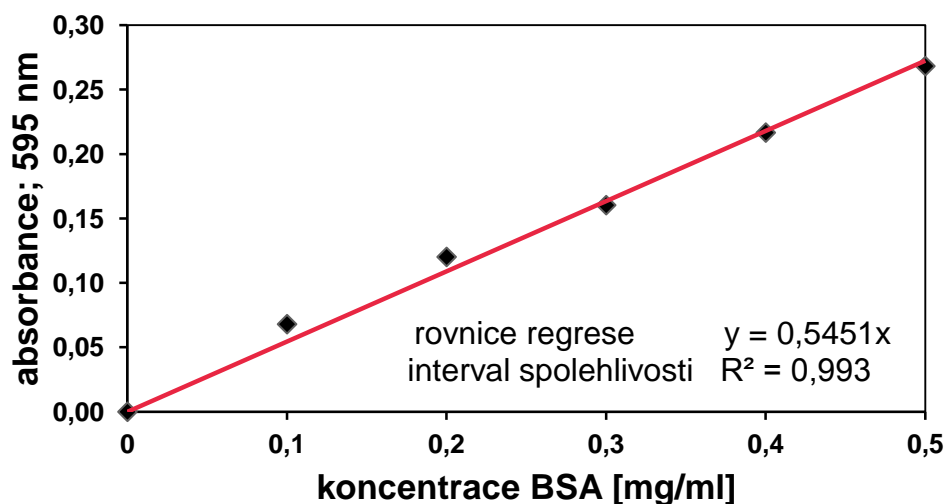


Obr. 34 Chromatogram propeptidu a katalytické podjednotky β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* na koloně VydacC4

4.3 Charakterizace enzymu

4.3.1 Stanovení koncentrace proteinů

Celková koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové byla stanovena vždy před chemickým sítěním. Kalibrační křivka **Obr. 35** byla změřena pomocí standardů připravených z BSA (hovězího sérového albuminu) jejichž koncentrace a absorbance při 595 nm je uvedena v **Tab. 3**. Kalibrační křivka je složena z naměřených bodů a charakterizuje závislost naměřené absorbance proteinů na jejich koncentraci. Křivka má tvar přímky a za předpokladu známé absorbance po použití lineární regrese je možné z její rovnice vypočítat neznámou koncentraci.



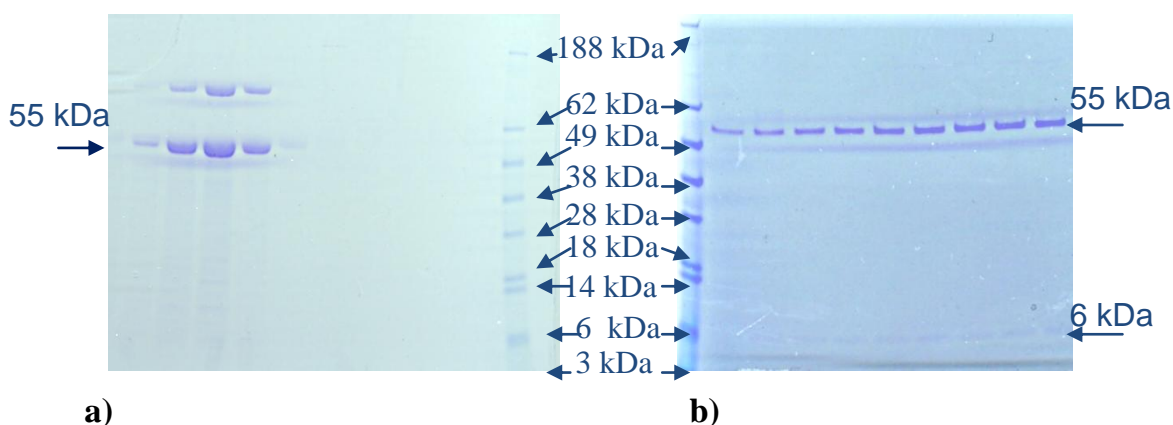
Obr. 35 Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové

Tab. 3 Koncentrace a absorbance standardů BSA

koncentrace proteinů mg/ml	absorbance 595 nm
0,0	0,000
0,1	0,068
0,2	0,120
0,3	0,160
0,4	0,217
0,5	0,268

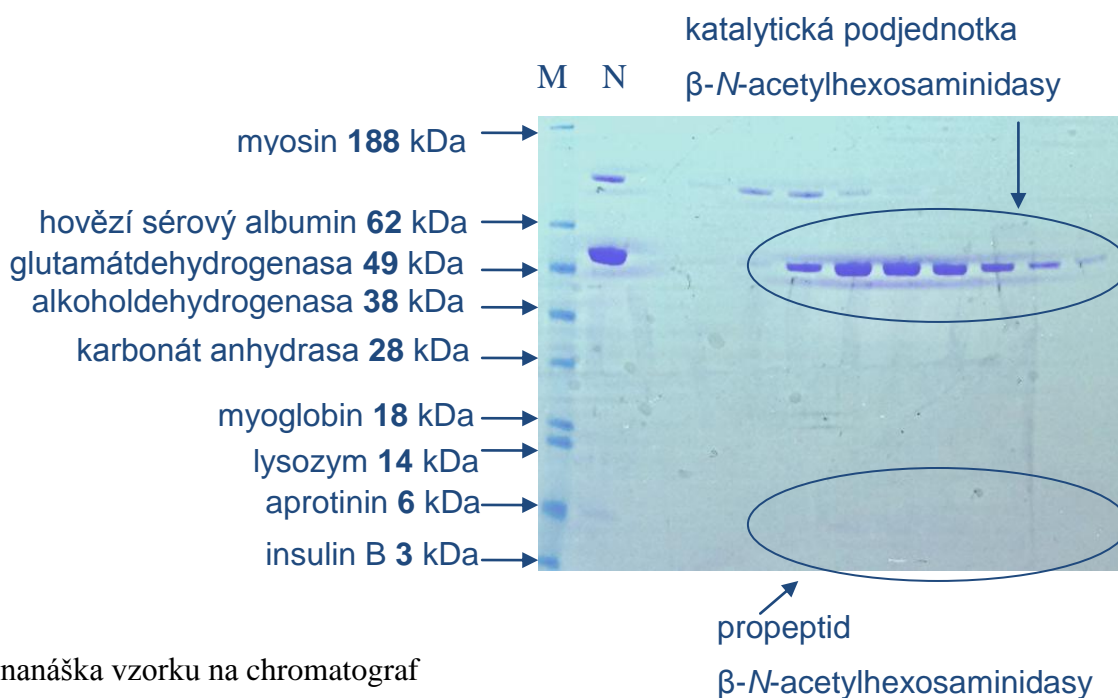
4.3.2 SDS-PAGE po chromatografických separacích

Polyakrylamidová gelová elektroforesa v přítomnosti SDS byla uskutečněna po každé chromatografické separaci k ověření čistoty enzymu, k tomu byl použit komerčně vyrobený 4-12% gradientový gel. Na **Obr. 36a** je polyakrylamidový gel po elektroforetické separaci frakcí purifikovaných na koloně MonoQ **Obr. 36b** purifikovaných na koloně Fractogel. Na **Obr. 37** str. 71 je zobrazen popis standardu molekulových hmotností. Jak je vidět na **Obr. 36a** katalytická podjednotka β -*N*-acetylhexosaminidasy se na gelu vyskytuje v oblasti odpovídající molekulové hmotností okolo 55 kDa. Propeptid na gelu v těchto frakcích není vidět. Obrázek **Obr. 36b** znázorňuje frakce po chromatografické separaci na koloně Fractogel, lze na něm rozeznat katalytickou podjednotku a se slabou intenzitou i propeptid, který se nachází v oblasti molekulové hmotnosti přibližně 8 kDa.



Obr. 36 Polyakrylamidové gely frakcí po chromatografických purifikacích
a) na koloně MonoQ b) na koloně Fractogel

Purifikace enzymu gelovou chromatografií na koloně Superdex200 byla provedena vždy před strukturálními studiemi, jak lze vidět na **Obr. 37** str. 71, vyskytují se zde frakce, které již obsahují enzym o vysoké proteinové čistotě. Lze zde pozorovat katalytickou podjednotku a velmi slabě lze rozpoznat i propeptid, obě části enzymu se nacházejí ve stejných oblastech jako v gelech po SDS-PAGE po předchozích chromatografiích.



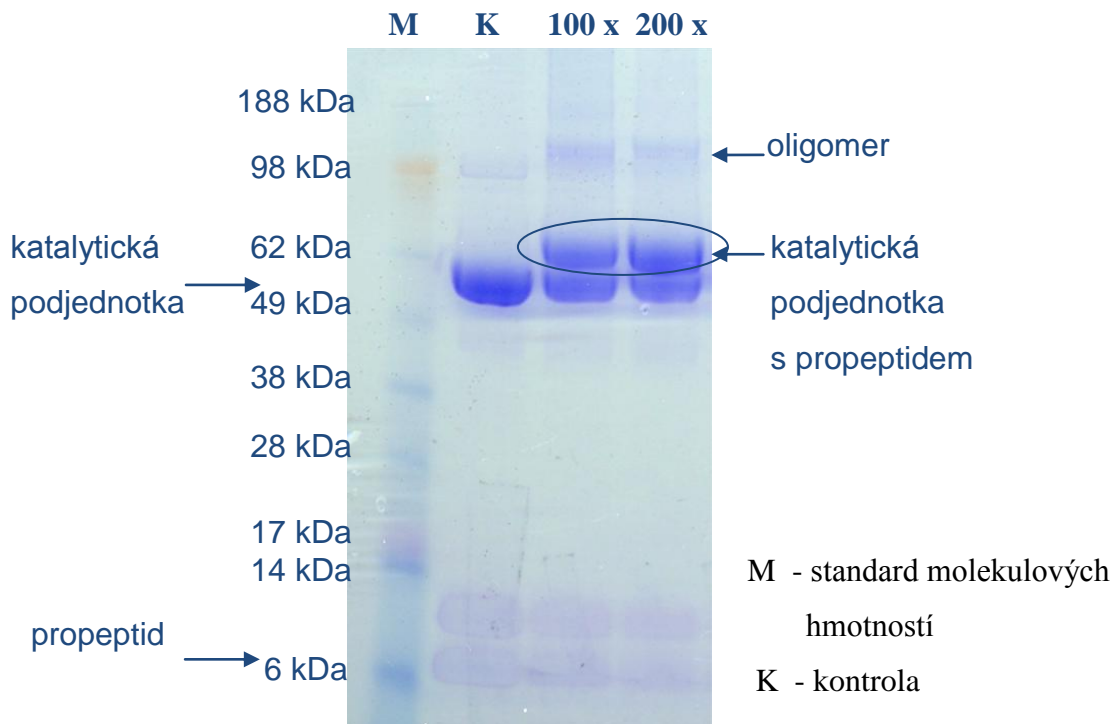
N - nanáška vzorku na chromatograf
M - standard molekulových hmotností

Obr. 37 Polyakrylamidový gel frakcí po gelové chromatografii

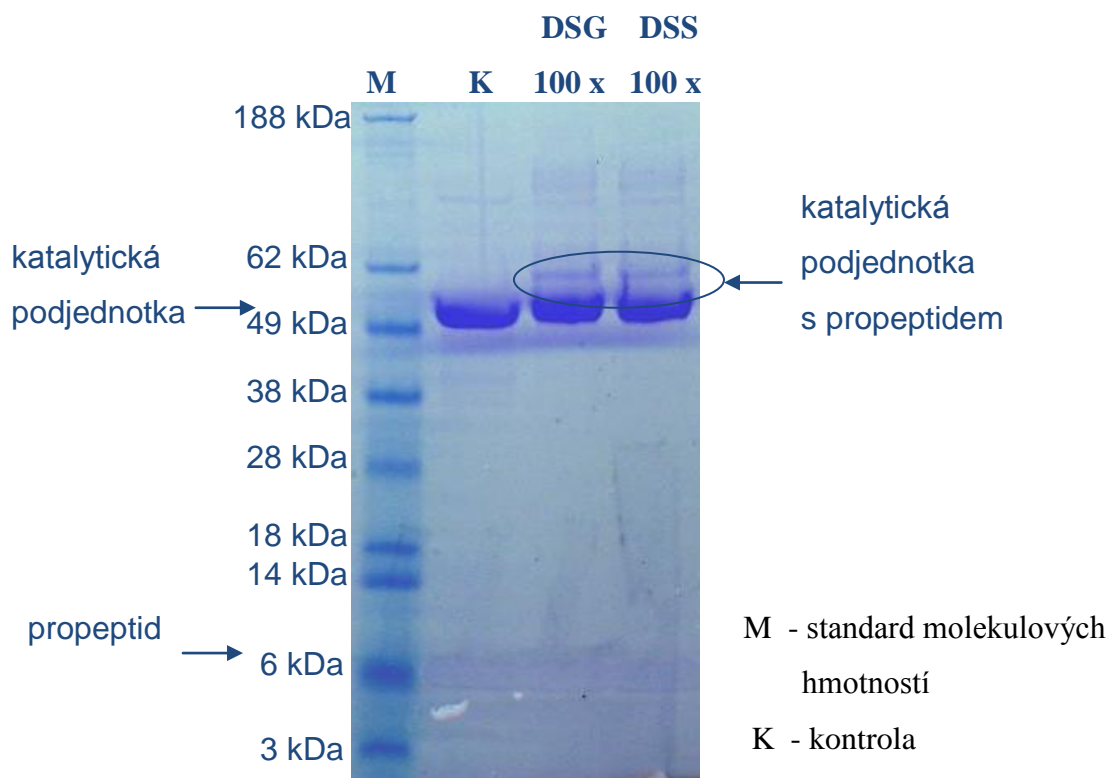
4.4 Chemické zesíťení β -N-acetylhexosaminidasy

U roztoků β -N-acetylhexosaminidasy, které byly síťeny pomocí činidla EDC v stonásobném nadbytku, byla změřena enzymová aktivita v pufru o pH 5. Stanovení bylo provedeno jako důkaz skutečnosti, že chemické síťovací reakce zachovávají enzymovou strukturu v nativním a tedy funkčním stavu. Jako kontrola byl použit roztok hexosaminidasy bez přídavku síťovacího činidla. Aktivita kontrolního i síťeného vzorku byla při pH 5 stejná.

Po reakci chemického zesíťení bylo nutné vzniklé produkty vzájemně odseparovat metodou SDS-PAGE. Na **Obr. 38** str. 72 polyakrylamidového gelu lze tyto separované produkty pozorovat. Enzym byl síťen činidlem EDC v 100 a 200 násobném molárním nadbytku, lze vidět, že vznikl požadovaný kovalentní heterodimer katalytické podjednotky a propeptidu, který není přítomen v kontrolním vzorku. Na **Obr. 39** str. 72 je polyakrylamidový gel s produkty po síťení pomocí DSG a DSS v stonásobném molárním nadbytku, i zde lze pozorovat vznik kovalentního heterodimeru.



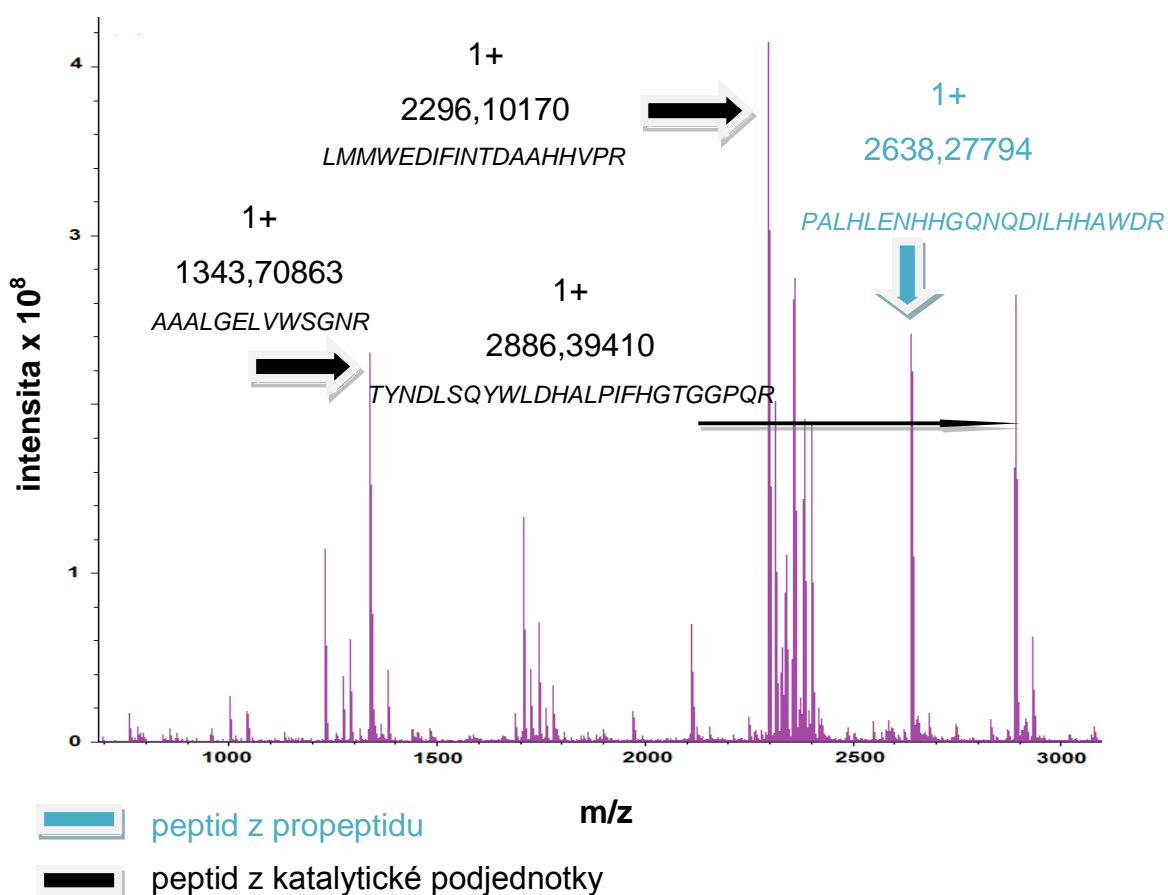
Obr. 38 Polyakrylamidový gel po reakci EDC a β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*



Obr. 39 Polyakrylamidový gel po reakci DSG a DSS a β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum*

4.5 MS experimenty

Produkty chemického sítěni byly zpracovány a analyzovány. Na **Obr. 40** je ukázka peptidového mapování kovalentního heterodimeru katalytické podjednotky a propeptidu β -*N*-acetylhexosaminidasy. Lze identifikovat peptidy, které pochází z katalytické podjednotky (označené černě) a peptidy pocházející z propeptidu (označené modře). Vzorky byly štěpeny trypsinem a měřeny hmotnostní spektrometrií s využitím MALDI ionizace (MALDI-MS). Pomocí programu GPMAW a aminokyselinové sekvence katalytické podjednotky a propeptidu byly nalezeny teoretické peptidy a jejich hmotnosti po štěpení trypsinem. Tyto teoretické údaje byly porovnány s naměřeným spektrem a vybrané nalezené shodné peptidy byly vyznačeny.



Obr. 40 MS-MALDI spektrum kovalentního heterodimeru katalytické podjednotky a propeptidu s vyznačenými vybranými peptidy a jejich hmotnostmi

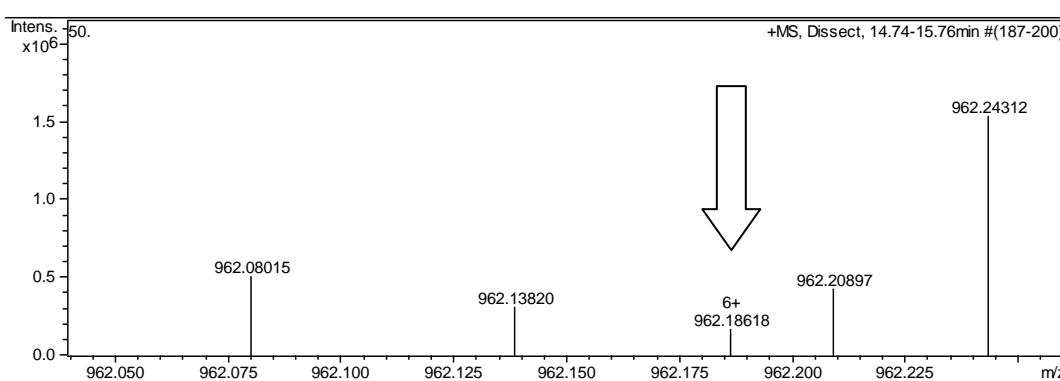
Poté, co byl pomocí MALDI-MS ověřen kovalentní heterodimer, byl vzorek dále zpracován a finálně analyzován metodou hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením HPLC/ESI FT-ICR MS. V **Tab. 4** jsou zaznamenány nalezené a identifikované zesítěné peptidy. Výsledky z těchto pokusů pocházejí ze sítění katalytické podjednotky a propeptidu pomocí činidla EDC ve stonásobném nadbytku a následném štěpení pomocí trypsinu. Byly nalezeny dva peptidy, v tabulce jsou zaznamenány sekvence těchto peptidů a informace, zda pocházejí z katalytické podjednotky či z propeptidu. V prvním peptidu se spojil lysin v pozici 21 z propeptidu buď s kyselinou glutamovou v pozici 566, nebo s kyselinou asparagovou v pozici 591. V druhém případě je to lysin v pozici 43 z propeptidu a kyselinou asparagovou v pozici 190.

Tab. 4 Nalezené zesítěné peptidy, změřené pomocí HPLC/ESI FT-ICR MS

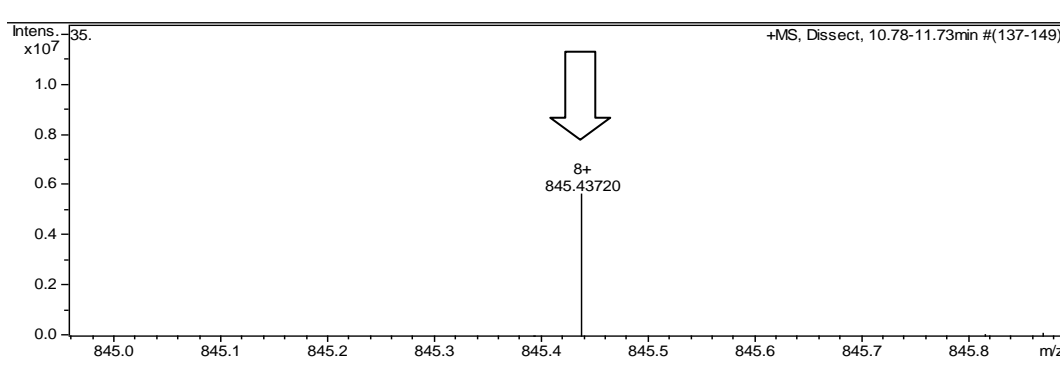
nadbytek /činidlo	úsek sekvence: propeptid/ katalytická podjednotka	m/z (monoizotopická hmotnost)		chyba měření (ppm)
		teoretická	experimentální	
100 EDC	20-29,561-601	5767,9707	5767,9873	2,9
100 EDC	22-65,186-200	6756,4761	6756,4775	0,2

sekvence z propeptidu	sekvence z katalytické podjednotky
V _{K21} VNPLPAPR-LLNFR _{E566} YLVANGVMATNLAPKYCLQHPHAC _{D591} LYYNQSVITP	
VNPLPAPRNITWGSSGPISIT _{K43} PALHLENHHGQNQDILHHAWDR- GIMID ₁₉₀ TGRNFISVPK	
zesítěné aminokyseliny	K 21 - E 566, D 591
	K 43 - D 190

Oba tyto peptidy byly nalezeny v MS spektru v příslušných nábojových stavech. Tyto spektra jsou zobrazeny na **Obr. 41** a **Obr. 42**. První sítěný peptid se ve spektru vyskytoval 6x nabitý a druhý peptid 8x nabitý a jeho intenzita byla o řád vyšší.

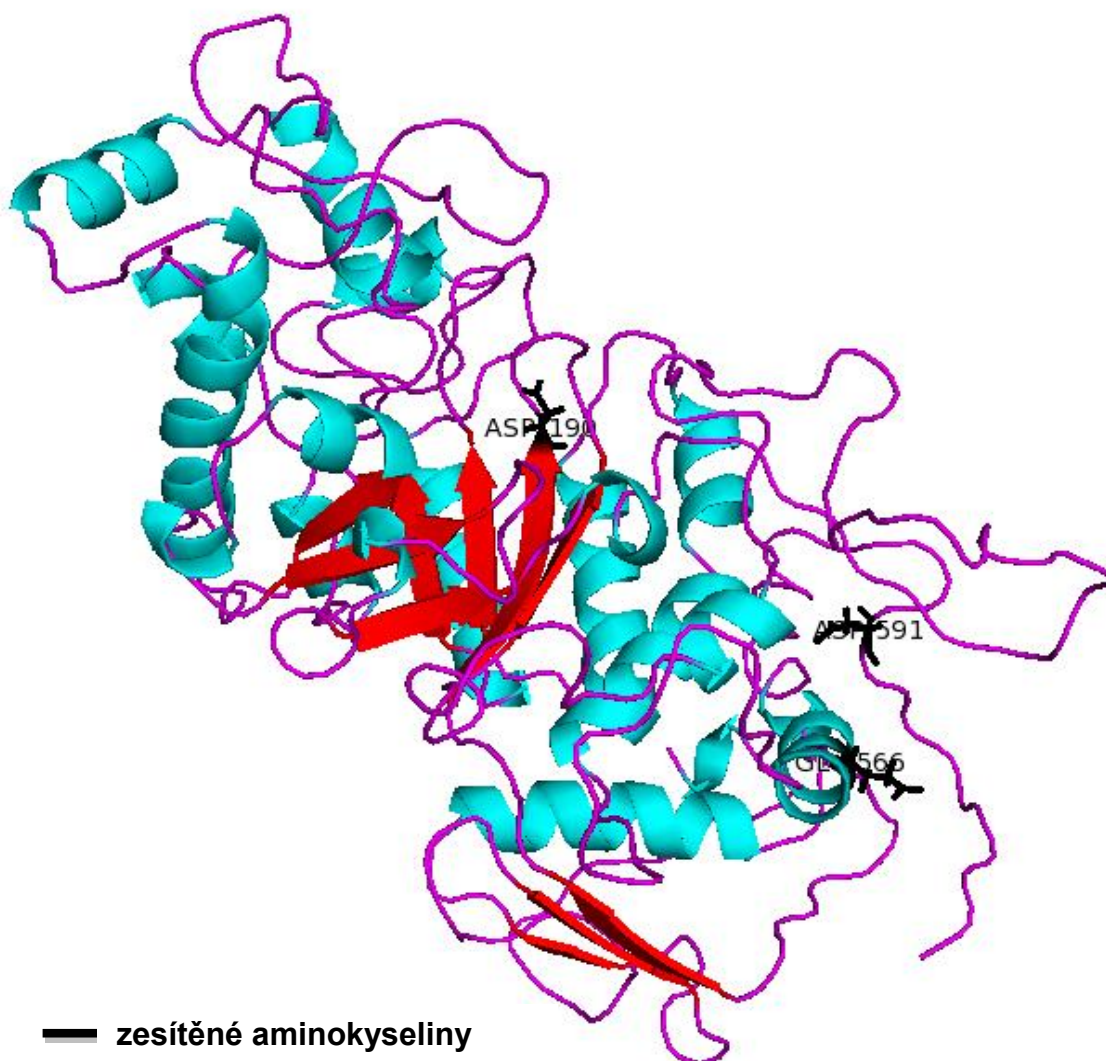


Obr. 41 6x nabitý sítěný peptid č. 1



Obr. 42 8x nabitý peptid č. 2

Byly vybrány aminokyseliny na katalytické podjednotce, které byly sítěny s propeptidem a tyto aminokyseliny byly v programu PyMOL vyznačeny v homologním modelu katalytické podjednotky β -N-acetylhexosaminidasy **Obr. 43**. str. 76. V modelu byly zobrazeny kyselina glutamová (E 566) a kyseliny asparagové (D 591) a (D 190).



*Obr. 43 Homologní model katalytické podjednotky β -N-acetylhexosaminidasy z *Penicillium oxalicum* s vyznačenými aminokyselinami (černá), které představují místo kontaktu s propeptidem*

4. DISKUZE

Zhruba před 10 ti lety byla nalezena unikátní vlastnost fungálních β -*N*-acetylhexosaminidas. Bylo objeveno, že katalytická podjednotka a propeptid jsou nekovalentně asociované. Tato asociace obou polypeptidových řetězců β -*N*-acetylhexosaminidasy zatím nebyla popsána u žádného jiného organismu, jen u vláknitých hub. Interakce se stala zájmem studií, které se snažily o její charakterizaci. Dosud nebyla vyřešená struktura propeptidu [45]. Cílem této práce bylo nalézt místo této unikátní interakce katalytické podjednotky a propeptidu β -*N*-acetylhexosaminidasy z vláknité houby *Penicillium oxalicum*.

V první části práce bylo nutné získat enzym využitím produkčního organismu. Výhodou použití vláknité houby je skutečnost, že β -*N*-acetylhexosaminidasy z tohoto organismu jsou sekretované do media. Je tedy relativně snadné získat nativní enzym a není nutné expresi provádět heterologně, hledat vhodný eukaryotický produkční organismus a následně kontrolovat správné sbalení proteinu[3]. Nevýhodou produkce je nízký výtěžek proteinu v porovnání s produkcemi jiných proteinů realizovaných v bakteriálních kmenech. Nadějnou strategií může být použití kvasinek jako produkčních organismů pro tento enzym.

Výhodou produkce β -*N*-acetylhexosaminidasy z vláknitých hub je také skutečnost, že enzymy jsou inducibilní a lze tudíž použít vhodné induktory, kterými jsou např. GlcNAc či GalNAc a které produkci enzymu podpoří. V této práci byl jako induktor využit GlcNAc. Podle literatury a zkušeností Laboratoře přirozené imunity Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. bylo jako vhodné počáteční medium zvoleno obdoba minerálního media Czapek-Dox, které je obecně vhodné pro kultivace vláknitých hub. Existuje velké množství vlivů, kterými lze ovlivnit produkci hexosaminidasy, i proto se první část této diplomové práce zabývá touto problematikou. Produkci lze ovlivnit zejména celkovým složením media, úpravou pH media, přidáním vhodného induktoru apod. Jelikož není možné kvantifikovat počet spor, kterými je medium na počátku kultivace zaočkováno, nelze ani předpokládat, že křivka objemové aktivity hexosaminidasy bude při každé kultivaci

vykazovat totožný průběh a dosahovat maxima ve stejný čas, jak je možné sledovat např. porovnáním **Obr. 21** str. 58 **Obr. 23** str. 60. Proto je nutné aktivitu enzymu během kultivace průběžně sledovat. Kultivace byla ukončena v době, kdy β -*N*-acetylhexosaminidasa dosahovala nejvyšší aktivity, k tomu docházelo průměrně mezi 160-240 hodinách kultivace. Při použití medií o různých počátečních pH **Obr. 21** str. 58. bylo zjištěno, že nejvyšší aktivity dosáhl enzym v mediu o počátečním pH 2 v přibližně 90. hodině kultivace. V mediu o počátečním pH 5, které je podle literatury nejvhodnější pro kultivace hexosaminidasy, byla aktivita nejvyšší přibližně ve 180. hodině kultivace. Je zřejmé, že pH media, jak počáteční tak aktuální, má výrazný vliv na produkci enzymu do media. Bez ohledu na počáteční hodnotu pH media na začátku kultivace, aktivita prudce vzroste **Obr. 22** str. 59, poté je zaznamenán pokles s výjimkou počátečního pH 2, které po celou dobu kultivace roste a v 90. hodině kultivace má nejvyšší aktivitu hexosaminidasy i nejvyšší pH ze všech medií. Všechna media nakonec dosáhla přibližně stejné hodnoty, jejich pH se pohybovalo blízko pH 6. Ať už je počáteční pH media vyšší či nižší než pH konečné, v průběhu kultivace je ho vláknitá houba schopna upravovat, a aktivita a sekrece hexosaminidasy do media jsou na tomto pH závislé. Pokud je vláknitá houba kultivována v mediu, které má počáteční pH 1,5 **Obr. 27** str. 64., enzym v průběhu celé kultivace nevykazuje žádnou aktivitu, s největší pravděpodobností jsou tyto pH podmínky pro vláknitou houbu již tak extrémní, že nejen nebyla schopna produkovat aktivní enzym, ale ani v nich nepřežila.

Dvě nejpříznivější pH podmínky pro aktivitu hexosaminidasy v mediu jsou počáteční pH media 2 a 5. Počáteční pH media 2 zajišťuje vláknité houbě takové podmínky, že aktivita hexosaminidasy dosahuje po dlouhou dobu vyšší hodnoty než u počátečního pH 5 **Obr. 23** str. 60. Má-li medium počáteční pH 5, dosáhne téměř srovnatelné enzymové aktivity jako počáteční pH 2, ale za delší dobu kultivace.

S bakteriologickým peptonem jako součástí media, které bylo původně používáno, bylo dosaženo objemové aktivity enzymu v rozmezí 0,02-0,07 U/ml. Tato aktivita a současně i produkce enzymu jsou velice nízké. Záměnou bakteriologického peptonu za mykologický **Obr. 24** str. 61, vzrostla objemová

aktivita β -*N*-acetylhexosaminidasy až 6x a dosahovala hodnoty až 0,44 U/ml. Mykologický pepton má na rozdíl od bakteriologického téměř o jednotku nižší pH a nižší obsah celkového dusíku. Další provedenou změnou bylo použití stejného kmene *Penicillium oxalicum* CCF 3438, ale z jiného zdroje, kvůli podezření, že nízké výtěžky enzymu mohou souviset se „stářím“ spor vláknitých hub, s dobou jejich skladování či dokonce s případnou náhodnou mutací, ke které mohlo v průběhu dlouhodobého skladování a opakované kultivace dojít. Použití vláknité houby z jiného zdroje nepřineslo vyšší výtěžky enzymu **Obr. 24** str. 61. a **Obr. 26** str. 63. Delší doba skladování spor vláknitých hub není příčinou nízké objemové aktivity při kultivaci β -*N*-acetylhexosaminidasy v mediu. Při změně media **Obr. 25** str. 62. nebylo nalezeno žádné nové složení, které by vedlo k zvýšení objemové aktivity enzymu, ale jako nadějná změna se ukázala být záměna mykologického peptonu za kvasničný autolyzát. Při kultivaci vláknité houby v mediu obsahující kvasničný autolyzát **Obr. 28** str. 64 byly nalezeny počáteční podmínky pH 5,5 a pH 4,5, při kterých vzrostla objemová aktivita enzymu v mediu až 10x. Nejvyšší hodnota objemové aktivity β -*N*-acetylhexosaminidasy, které se podařilo optimalizací kultivace dosáhnout, byla 0,72 U/ml.

Ačkoli se podařilo nalézt podmínky kultivace, které produkci enzymu značně zvýšily, k největším ztrátám docházelo při purifikačních postupech. Při hydrofobní chromatografii na koloně Fenyl-Sepharosa **Obr. 29** str. 65. byly odstraněny pouze hrubé nečistoty. Na ionexové koloně SP-Sepharosy došlo k oddělení velké části proteinových kontaminant **Obr. 30** str. 66. Eluční profil je obdobný i na chromatogramu po separaci na ionexové koloně Fractogel **Obr. 31** str. 67. Záměna těchto dvou kolon, ke které bylo v některých případech přistoupeno, je tedy možná. Po následující chromatografické separaci na ionexové koloně MonoQ se zdá být protein podle chromatografického záznamu téměř čistý **Obr. 32** str. 67, avšak na polyakrylamidovém gelu po SDS-PAGE **Obr. 36a** str. 70. je zřejmé, že frakce neobsahují čistý protein, ale obsahují značnou kontaminaci doposud neznámého proteinu, o molekulové hmotnosti přibližně 100 kDa. Po gelové chromatografii na koloně Superdex200 **Obr. 33** str. 68, je na chromatogramu zobrazen jen jeden eluční

vrchol, ale jak už vyplývá z křivky orientační aktivity, tento jeden vrchol nepatří celý pouze jednomu proteinu. Elektroforetická separace potvrdila, že část elučního vrcholu patří jinému proteinu a část β -*N*-acetylhexosaminidase **obr. 37** str. 71. Tyto dva proteiny se podařilo při gelové chromatografii částečně odseparovat a získat tak frakce, které obsahují pouze čistý enzym, použitelný pro strukturní studie.

Katalytická podjednotka β -*N*-acetylhexosaminidasy byla na polyakrylamidovém gelu po elektroforetické separaci pozorována v oblasti odpovídající molekulové hmotnosti 55 kDa a propeptid v oblasti 8 kDa **Obr. 36** str. 70 a **Obr. 37** str. 71. Tyto rozdílly migrace v gelu oproti jejich teoretickým hmotnostem jsou dány rozdílem v glykosylaci. Všechna místa na polypeptidovém řetězci, která mohou být glykosylována, nemusí být využita, a často také nejsou. Glykosylace polypeptidového řetězce má také vliv na tvar elučních vrcholů propeptidu a katalytické podjednotky při separaci chromatografií na obrácené fázi na koloně VydacC4 **Obr. 34** str. 68. Tvary elučních vrcholů nevykazují hladké křivky, protože je jejich eluce ovlivněna glykosylací. Eluce katalytické podjednotky je ovlivněna glykosylací mnohem méně, protože její polypeptidový řetězec je delší. Množství propeptidu je asi 7 x nižší oproti katalytické podjednotce, proto ho na polyakrylamidových gelech po SDS-PAGE separaci lze pozorovat pouze v případě, že byl nanesen enzym v dostatečné koncentraci. To bylo splněno ve frakcích po gelové chromatografii **Obr. 37** str. 71, nebo ve frakcích po chromatografii na koloně Fractogel, pokud následovala po gelové chromatografii **Obr. 36b** str. 70. Propeptid navíc obsahuje málo bazických aminokyselin a špatně se na něj váže barvivo CBB G-250, proto ho lze pozorovat na polyakrylamidových gelech s nízkou intenzitou.

Strukturní charakteristiky enzymu byly provedeny pomocí metody chemického sítění spojené s hmotnostní spektrometrií. Studie pomocí infračervené spektroskopie (FTIR) a Ramanovy spektroskopie byly již s tímto enzymem provedeny, avšak k odhalení vazebného místa nevedly. Použití NMR je vzhledem k velikosti proteinu obtížné.

K síťovacím reakcím byly použity činidla EDC, DSG a DSS. Po sítění zůstává protein stále v nativní konformaci, při pH 5 nedochází k poklesu aktivity.

S použitím všech tří činidel bylo dosaženo vzniku požadovaného produktu kovalentního heterodimeru katalytické podjednotky a propeptidu **Obr. 38 a 39** str. 72. V kontrolním vzorku vždy tento produkt chyběl, tudíž jeho vznik je důsledkem sítění. Kontrola také obsahuje větší množství volného propeptidu a katalytické podjednotky, protože u sítěných vzorků jsou tyto proteiny použity na tvorbu produktů síťovací reakce. Kromě požadovaného kovalentního heterodimeru vznikaly i vedlejší produkty chemického sítění ve formě oligomerů. Nejlepších výsledků sítění bylo dosaženo se 100 násobným přebytkem činidel EDC, DSG a DSS oproti katalytické podjednotce. Strukturní analýza byla kvůli malým výtěžkům s ostatními síťovacími činidly provedena pouze s činidlem EDC.

Po chemickém sítění a MS analýze s vysokým rozlišením byly nalezeny oblasti, kde spolu interagují katalytická podjednotka a propeptid **Obr. 43** str. 76. Byly nalezeny peptidy, které obsahovaly sekvence jak z propeptidu, tak z katalytické podjednotky. V těchto peptidech byly identifikovány konkrétní aminokyseliny, mezi kterými došlo k sítění, byla nalezena kyselina asparagová D 191, a v druhém případě byly nalezeny dvě možné aminokyseliny, buď kyselina asparagová D 591, nebo kyselina glutamová E 566. Tyto aminokyseliny ačkoli jsou sekvencně vzdálené jsou ve struktuře proteinu prostorově blízko a představují místa přímého kontaktu katalytické podjednotky s propeptidem β -N-acetylhexosaminidasy. Nalezená data jsou ve shodě se zatím nepublikovanými strukturními výsledky získaných z krystalografických analýz β -N-acetylhexosaminidasy z *Aspergillus oryzae*.

6. ZÁVĚR

- ▶ byla úspěšně provedena kultivace vláknité houby *Penicillium oxalicum* CCF 3438 a optimalizací kultivačních podmínek byla až 10x zvýšena objemová aktivita β -*N*-acetylhexosaminidasy v kultivačním mediu
- ▶ podařilo se enzym produkovat do media a následně ho z něj izolovat
- ▶ purifikací byl získán enzym dostatečné čistoty k použití pro MS analýzu, purifikační postup byl optimalizován
- ▶ strukturní analýza β -*N*-acetylhexosaminidasy odhalila na katalytické podjednotce i propeptidu oblasti, kde dochází k nekovalentní interakci obou podjednotek

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Weignerova, L., Vavrušková, P., Pišvejcová, A., Thiem, J., Křen, V.:
Carbohydr. Res., 338, 1003 (2003)
- [2] Slámová, K., Bojarová, P., Petrásková, L., Křen, V.: *Biotech. Adv.* 28, 682
(2010)
- [3] Yakamoto, K., Kwang, M., L., Kumagai, H.: *Agric. Biol. Chem.* 49, 611 (1985)
- [4] Asano, N.: *Azaglycomimetics: Natural occurrence, biological activity and activation*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (2008)
- [5] Varki, A., Cummings, R., Esko, J., et al., editors.: *Essentials of Glycobiology*,
Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)
- [6] Weignerová, L., Rajnochová-Herkommerová, E., Křen, V.: *Chem. Listy*, 93,
781 (1999)
- [7] Webové stránky společnosti Sigma-Aldrich
<http://www.sigmaaldrich.com>, staženo dne 28. 3. 2012
- [8] Stránky společnosti IUB-MB: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>
staženo dne 2. 4. 2012
- [9] Stránky databáze proteinů ExPaSy <http://enzyme.expasy.org/>
staženo dne 2. 4. 2012
- [10] Every, D., Ashwort, J., M.: *Biochem. J.*, 143, 785 (1974)
- [11] Henrissat, B.: *Biochem. J.*, 280, 309 (1991)

-
- [12] Databáze enzymů CaZy <http://www.cazy.org/> staženo dne 2. 4. 2012
- [13] Henrissat, B., Bairoch, A.: *Biochem. J.*, 293, 781 (1993)
- [14] Zechel, D., L., Withers, S., G.: *Acc. Chem. Res.*, 33, 11 (2000)
- [15] Davies, G., Henrissat, B.: *Structure*, 3, 853 (1995)
- [16] Varrot, A., Schülein, M., Davis, G., J.: *Biochemistry*, 38, 8884 (1999)
- [17] Divne, CH., Stahlberg, J., Reinikainen, T., Ruohonen, L., Pettersson, G., Knowles, J., K., C., Teeri, T., T., Jones, T., A.: *Science*, 265, 524 (1994)
- [18] Vocadlo, D., J., Mayer, C., Withers, C., G.: *Biochemistry*, 39, 1554 (2000)
- [19] Withers, S., G.: *Carbohydr. Polym.*, 44, 325 (2001)
- [20] Rye, S., C., Withers, G., S.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 573 (2000)
- [21] Vocadlo, D., J., *Biochemistry*, 44, 12809 (2005)
- [22] Knapp, S., Vocadlo, D., Gao, Z., Kirk, B., Withers, S., G.: *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 6804 (1996)
- [23] Kuroki, R., Weaver, L., H., Mathews, B., W.: *Science*, 262, 2030 (1993)
- [24] Tews, I., Parrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K., S., Vorgias, C., E.: *Nat. Struct. Biol.*, 3, 638 (1996)

-
- [25] Macauley, S., M., Stubbs, K., A., Vocadlo, D., J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 17203 (2005)
- [26] Prag, G., Papanikolau, Y., Tavlas, G., Vorgias, C., E., Petratos, K., Oppenheim, A., B.: *J. Mol. Biol.*, 300, 611 (2000)
- [27] Mark, B., L., James, M., N., G.: *Can. J. Chem.*, 80, 1064 (2002)
- [28] Braidman, I., Carroll, M., Dance, N., Robinson, D.: *FEBS Lett.*, 41, 181 (1974)
- [29] Gutternigg, M., Rendić, D., Voglauer, R., Iskratch, T., Wilson, I., B., H.: *Biochem. J.*, 490, 83 (2009)
- [30] Mark, B., L., Mahuran, D., J., Cherney, M., M., Zhao, D., Knapp, S., James, M., N., G.: *J. Mol. Biol.*, 327, 1093 (2003)
- [31] Hou, Y., Tse, R., Mahuran, D., J.: *Biochemistry*, 35, 3963 (1996)
- [32] Gielselmann, V.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 1270, 103 (1995)
- [33] Okada, S., O'Brien, J., S.: *Science*, 165, 698 (1969)
- [34] Mahuran, D., J.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1455, 105 (1999)
- [35] Akeboshi, H., Chiba, Y., Kasahara, Y., Takashiba, M., Takaoka, Y., Ohsawa, M., Tajima, Y., Kawashima, I., Tsuji, D., Itoh, K., Sakuraba, H., Jigami, Y.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4805 (2007)
- [36] Wright, C., Mi, L., Rastinejad, F.: *J. Mol. Biol.*, 342, 585 (2004)

-
- [37] Kolter, T., Sandhoff, K.: *FEBS Lett.*, 584, 1700 (2010)
- [38] Schuette, C., G., Wiesgerber, J., Sandhoff, K.: *Glycobiology*, 17, 549 (2001)
- [39] Lemieux, M., J., Mark, B., J., Cherney, M., M., Withers, S., G., Mahuran, D., J., James, M., N., G.: *J. Mol. Biol.*, 359, 913 (2006)
- [40] Adams, D., J.: *Microbiology*, 150, 2029 (2004)
- [41] Rast, D., M., Baumgartner, D., Mayer, Ch., Hollenstein, G., O.:
Phytochemistry, 64, 339 (2003)
- [42] Rast, D., M., Horsch, M., Furter, R., Gooday, G., W.: *J. Gen. Microbiol.*, 137, 2797 (1991)
- [43] Ramot, O., Viterbo, A., Friesem, B., Oppenheim, A., Chet, I.: *Curr. Genet.*, 45, 205 (2004)
- [44] Ettrich, R., Kopecky, V., Hofbauerová, K., Baumruk, V., Novák, P., Pompach, P., Man, P., Plíhal, O., Kutý, M., Kulik, N., Sklenář, J., Ryšavá, H., Křen, V., Bezouška, K.: *BMC Struct. Biol.*, 7, 32 (2007)
- [45] Plíhal, O., Sklenář, J., Kmoníčková, J., Man, P., Pompach, P., Havlíček, V., Křen, V., Bezouška, K.: *Biochem. Soc. Trans.*, 32, 764 (2004)
- [46] Plíhal, O., Sklenář, J., Hofbauerová, K., Novák, P., Man, P., Pompach, P., Kavan, D., Ryšlavá, H., Weignerová, L., Charvátová-Pišvejcová, A., Křen, V., Bezouška, K.: *Biochemistry*, 46, 2719 (2007)

-
- [47] Huňková, Z., Křen, V., Šcigelová, L., Weignerová, L., Scheel, O., Thiem, J.: *Biotechnol. Lett.*, 18, 725 (1996)
- [48] Dwerk, D., A.: *Chem. Rev.*, 96, 683 (1996)
- [49] Ernst, B., Magnani, J., L.: *Nat. Rev. Drug Discovery*, 8, 661 (2009)
- [50] Singh, S., Packwood, J., Samuel, Ch., J., Critchley, P., Crout, D., H., G.: *Carbohydr. Res.*, 279, 293 (1995)
- [51] Crout, D., H., G., Vic, G.: *Curr. Opin Chem. Biol.*, 2, 98 (1998)
- [52] Ünligil, U., M., Rini, J., M.: *Curr. Opin Struct. Biol.*, 10, 510 (2000)
- [53] Scigelová, M., Singht, S., Crout, D., H., G.: *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 6, 483 (1999)
- [54] Raulvolfová, J., Weignerová, L., Kuzma, M., Přikrylová, V., Macková, M., Pišvejcová, A., Křen, V.: *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 29, 259 (2004)
- [55] Fialová, P., Weigenerová, L., Raulvolfová, J., Přikrylová, V., Pišvejcová, A., Ettrich, R., Kuzma, M., Sedmera, P., Křen, V.: *Tetrahedron*, 60, 693 (2004)
- [56] Křen, V., Thiem, J.: *Chem. Soc. Rev.*, 26, 463 (1997)
- [57] Huňková, Z., Kubátová, A., Weignerová, L., Křen, V.: *Czech. Mycol.*, 51, 34 (1999)
- [58] Singht, S., Scigelová, M., Critchley, P., Crout, D., H., G.: *Carbohydr. Res.*, 305, 363 (1998)

-
- [59] Pazouki, M., Panda, T.: *Bioprocess Eng.*, 22, 127 (2000)
- [60] Gusakov, A., V., Semenova, M., V., Sinitsyn, A., V.: *J. Anal. Chem.*, 65, 1446 (2010)
- [61] Ostrý, V.: *Vesmír*, 79, 187 (2000)
- [62] Harris, D., S.: *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 736 (2001)
- [63] Iwashita, K.: *J. Biosci. Bioeng.*, 94, 530 (2002)
- [64] <http://www.igb.fraunhofer.de/de/presse-medien/archiv/2005/hefe-pilze.html>
staženo dne 15. 4. 2012
- [65] Currie, J., N., Thom, C.: *J. Biol. Chem.*, 22, 287 (1915)
- [66] Sempere, F., Santamarina, M., P.: *Brazil. J. Microbiol.*, 41, 700 (2010)
- [67] Periera, E., S., Sarquis, M., I., M., Ferriera-Keppler, R., L., Hamada, N., Alencar, Y., B.: *Neurotropic. Entomol.*, 38, 352 (2009)
- [68] Paterson, R., R., M., Venâncio, A., Lima, N.: *Res. Microbiol.*, 155, 507 (2004)
- [69] Společné webové stránky tří amerických institucí: národního centra pro biotechnologické informace (NCBI), národní lékařské knihovny (NML) a národního institutu pro zdraví (NIH) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>
staženo dne 16. 4. 2012

-
- [70] Ryšlavá, H., Kalendová, A., Doubnerová, V., Skočdopol, P., Kumar, V., Kukačka, Z., Pompach, P., Vaněk, O., Slámová, K., Bojarová, P., Kulik, N., Ettrich, R., Křen, V., Bezouška, K.: *FEBS J.*, 278, 2469 (2011)
- [71] Hušáková, L., Riva, S., Calasi, M., Nicotra, S., Kuzma, M., Huňková, Z., Křen, V., *Carbohydr. Res.*, 331, 143 (2001)
- [72] Pompach, P., Man, P., Kavan, D., Hofbaerová, K., Kumar, V., Bezouška, K., Havlíček, V., Novák, P.: *J. Mass. Spectrom.*, 44, 1571 (2009)
- [73] Molnár, I., Horvath, C.: *Clin. Chem.*, 22, 1497 (1976)
- [74] Molloy, Ch., Cannon, R., D., Sullivan, P., A., Shepherd, M., G.: *Microbiology*, 140, 1543 (1994)
- [75] Bradford, M., M., *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976)
- [76] Laemmli, U., K.: *Nature*, 227, 680 (1970)
- [77] Ewing, A., E., Wallingford, R., A., Olefirowicz, T., M.: *Anal. Chem.*, 61, 292 (1989)
- [78] Sinz, A.: *Mass Spekrom. Rew.*, 25, 662 (2006)
- [79] Webové stránky společnosti piercenet
<http://www.piercenet.com>, staženo dne 21. 4. 2012
- [80] <http://glycotools.qa-bio.com/endo-glycosidase>, staženo dne 4. 5. 2012

