

Univerzita Karlova
Přírodovědecká Fakulta
Katedra Biochemie



**Použití α -N-acetylgalaktosaminidasy jako
nástroje vhodného pro syntézu komplexních
oligosacharidových stimulátorů imunitního
systému**

Autoreferát dizertační práce

Mgr. Hynek Mrázek

Školitel: Prof. RNDr. Karel Bezouška, Dsc.

Praha 2011

Úvod

Glykoproteiny jsou proteiny obsahující kovalentně vázané sacharidové struktury. Sacharidy mohou být připojeny k proteinovému řetězci dvojitým způsobem: *O*-glykosidickou nebo *N*-glykosidickou vazbou. *N*-glykosidicky spojené sacharidy jsou vázány k aminokyselině asparaginu, zatímco *O*-glykosidicky vázané sacharidy jsou spojeny k aminokyselinám serinu nebo threoninu.

V glykoproteinech vyšších obratlovců se převážně vyskytují *N*-glykosidicky vázané sacharidové struktury. V případě *N*-glykosylace je sacharidový řetězec přenesen na aminokyselinu asparagin, který se nachází v aminokyselinové sekvenci N-X-ST, kde X může být jakákoliv aminokyselina kromě prolinu. Zatímco syntéza *N*-glykoproteinů se řídí určitými pravidly, u syntézy *O*-glykoproteinů nebyla žádná taková pravidla pro zatím nalezena. Proteinové glykosylace, která je nejčastější posttranslační modifikací, se účastní velké množství enzymů a enzymových komplexů. Celý proces glykosylace probíhá v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu.

Glykosidasy hydrolasy

Podle EC nomenklatury jsou klasifikovány jako enzymy skupiny EC 3.2.1 katalyzující hydrolýzu *O*- nebo *N*- spojených glykosidů. Dále mohou být děleny podle mechanismu katalytické reakce na *retenující* a *invertující* a podle místa štěpení sacharidových struktur na *exo* (štěpí na koncích sacharidového řetězce) a *endo* (štěpí vně sacharidového řetězce).

α -N-Acetylgalaktosaminidasa

α -N-Acetylgalaktosaminidasa (*α -NAGA*, EC 3.2.1.49) patří mezi exoglykosidasy specificky štěpící terminální GalNAc vázaný k aminokyselinám serinu nebo threoninu nebo vázaný v oligo/polysacharidovém řetězci. Podle enzymatické nomenklatury IUB-MB (International Union of Biochemistry and

Molecular Biology) patří tento enzym do skupiny Hydrolas-Glykosidas-Glykosidas hydrolyzující *O*- nebo *S*- glycosidickou vazbu. Podle CAZY systému patří prokaryotická α -NAGA do rodiny 36 (Klan GH-D) a eukaryotická α -NAGA do rodiny 27 stejného klanu jako prokaryotická α -NAGA.

Syntéza glykopeptidů a glykoproteinů in vitro

Syntézu sacharidů můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin: lineární a konvergentní. V lineárním přístupu jsou sacharidové podjednotky spojovány přímo s aminokyselinami. Výsledkem tohoto spojení jsou modifikované aminokyseliny nesoucí mono nebo oligosacharidové jednotky, které slouží jako základní stavební struktury při následné syntéze v roztoku nebo na pevné fázi (SPPS - solid-phase peptide synthesis). Naopak v konvergentním přístupu jsou sacharidové struktury připojovány k peptidu/proteinu, který je stále ve fázi syntézi.

V závislosti na chemii používané při syntéze je v některých případech nutná ochrana funkčních skupin aminokyselin i sacharidů. Po porovnání lineárních a konvergentních přístupů můžeme říct, že konvergentní syntéza glykopeptidových a glykoproteinových mimetik nabízí větší flexibilitu pokud jde o přípravu glykopeptidů. Tímto přístupem lze připravit mnoho dobře definovaných struktur bez předchozí protekce funkčních skupin aminokyselin a sacharidů. Tento přístup umožňuje provádět chemoselektivní ligační reakce, jejichž výsledkem jsou homogenní glykoproteinová mimetika.

Přirozené zabíječské buňky (NK buňky)

Poprvé byly popsány v roce 1975 jako lymfocyty, které jsou schopné zabít infikované či nádorově změněné buňky bez předchozí stimulace, proliferace a diferenciaci. Jsou to velké granulární lymfocyty, které se vyvíjí stejně jako ostatní buňky imunitního systému v kostní dřeni. Vývojově jsou NK buňky bližší T lymfocytům, na jejichž povrchu byl nalezen charakteristický

marker NK buněk, NKR-P1 receptor. Tato skupina buněk byla nazvána NKT. Tyto buňky se účastní podobně jako Tc lymfocyty cytotoxických reakcí proti infikovaným nebo nádorově změněným buňkám. NK buňky jsou také velmi důležitými producenty cytokinů, které jsou důležité při regulaci specifické imunitní odpovědi, buněčné proliferaci nebo adhezi buněk. Jako příklad můžeme uvést INF- γ , který se uplatňuje při stimulaci makrofágů (Horejsi and Bartunkova, 2001).

Lektiny C-typu

Lektiny C-typu byly poprvé definovány v 80 letech dvacátého století (Drickamer, 1988). Hlavním rysem této rodiny lektinů je tak zvaná sacharid vázající doména CRD (Carbohydrate Recognition Domain). Pro vazbu sacharidu do CRD domény je nutná přítomnost vápníku. Délka sacharid vázající domény je kolem 125 amino kyselin. CRD je složena z konzervované kombinace dvou α -helixů a dvou anti-parallelních β skládaných listů spojených nahodným klubkem (Bezouska et. al. 1991). Tato sacharid vázající struktura je stabilizována dvěma nebo více disulfidickými můstky. Během evolučního vývoje některé lektiny C-typu ztratily schopnost vázat sacharidové struktury a získaly jinou vazebnou specifitu (Drickamer, 1999).

Cíle práce

Předkládaná práce měla dva cíle. Prvním cílem bylo nalezení vhodného expresního systému pro produkci rekombinantní enzymaticky aktivní α -N-acetylgalaktosaminidasy s duální α -galaktosidasovou aktivitou. Druhým cílem bylo charakterizovat biochemické a enzymatické vlastnosti tohoto rekombinantního enzymu. Pro jejich splnění byly stanoveny tyto konkrétní podcíle:

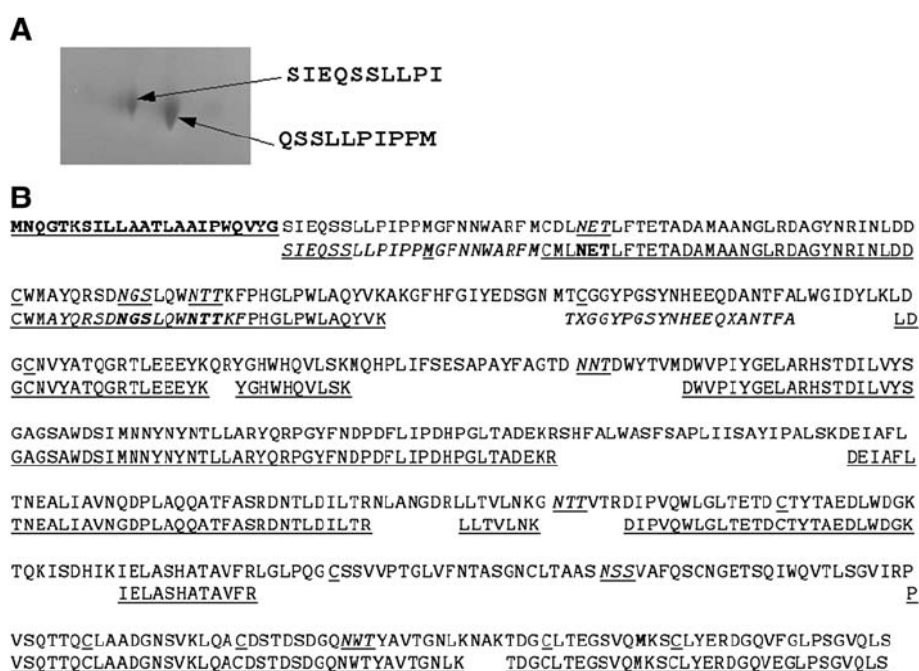
- Určení aminokyselinové sekvence přirozené α -NAGA izolované z vláknité houby *Aspergillus niger*.
- Vývoj expresního systému vhodného pro rekombinantní produkci α -NAGA v enzymaticky aktivní formě.
- Vývoj optimálních podmínek exprese poskytujících dostatečné množství rekombinantního enzymu.
- Nalezení optimálního purifikačního protokolu, který by zajistil dostatečné množství α -NAGA pro funkční a strukturní studie.
- Charakterizace biochemických a enzymatických vlastností rekombinantní α -NAGA.
- Určení míst N-glykosylace rekombinantní α -NAGA.

Těchto cílů bylo dosaženo za použití vhodných metodik, počínaje bakteriálním a kvasinkovým expresním systémem, přes biochemické a enzymatické techniky, až po pokročilé analytické metody (chromatografie, analytická ultracentrifuge, hmotnostní spektrometrie, elektronová mikroskopie atd.).

Výsledky

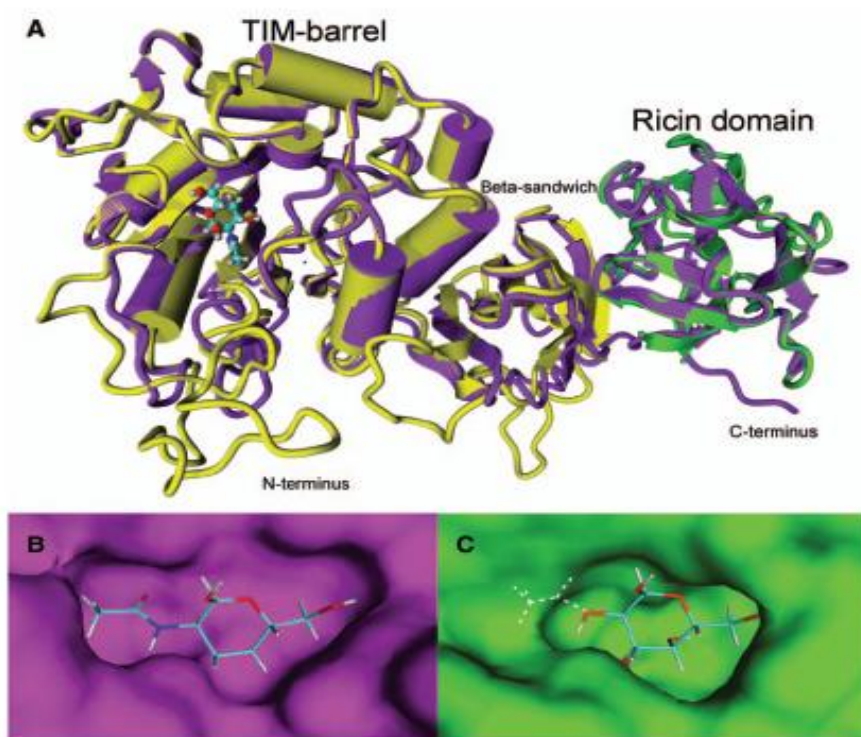
Zjištění aminokyselinové sekvence α -NAGA a vytvoření počítačového modelu tohoto enzymu

V první fázi projektu byl hledán přirozený producent α -NAGA. Na přítomnost α -NAGA aktivity bylo testováno 42 kmenů vláknitých hub, dále bylo provedeno testování velkého množství induktorů a kultivačních podmínek. Jako nejlepší producent α -NAGA se ukázal *Aspergillus niger* CCIM K2. Dále se ukázalo, že α -NAGA z této vláknité houby vykazuje duální α -GA aktivitu. Enzym byl izolován do vysoké čistoty použitím chromatografických technik (Weigenerova et. al. 2008). S takto purifikovaným enzymem byla provedena 2D elektroforéza, na které byly odhaleny dva proteinové bandy. Oba tyto bandy byly analyzovány pomocí N-terminálního sekvenování a hmotnostní spektrometrie (obrázek 1).



Obrázek 1. Shrnutí sekvenčních dat α -NAGA. (A) Separace α -NAGA pomocí 2D elektroforézy a následná N-terminální sekvenace odhalila různé aminokyselinové sekvence. (B) Vrchní řádek ukazuje aminokyselinovou sekvenci genu *aglA* z vláknité houby *Aspergillus niger* se signální sekvencí (tučně). Spodní řádek ukazuje shrnutí sekvenčních dat získaných Edmanovým odbouráváním a analýzou hmotnostní spektrometrií.

Na základě porovnání nalezené aminokyselinové sekvence *AglA* genu proti α -*N*-acetylgalaktosaminidázám, jejichž struktura byla již rozřešena, byl sestaven počítačový model α -NAGA (obrázek 2). α -NAGA se skládá z katalytické (melibiázové) domény obsahující TIM barrel, následné beta domény a C-terminální ricinové domény. α -*N*-Acetylgalaktosaminidasy o známé struktuře obsahují podobné složení proteinových domén avšak bez C-terminální ricinové domény (Kulik et. al. 2010).



Obrázek 2. Struktura α -NAGA z *Aspergillus niger*. (A) α -NAGA se skládá z TIM-barrelu, ve kterém je v N-terminální oblasti umístěno aktivní místo tohoto enzymu, prostřední malé domény skládající se z osmi antiparalelních β podjednotek a ricinové domény na C terminální části (vpravo). Fialové části počítačového modelu jsou nově vytvořeny pomocí již známých struktur α -*N*-acetylgalaktosaminidas z kuřete (žlutá), a xylanázy z *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 (zelená). (B) a (C) Pohled do aktivního místa α -NAGA *aglA* enzymu (fialová) a *aglB* enzymu (zelená) s *o*-NP- α -GalNAc jako substrátem. Jak se ukázalo aktivní místo *aglA* obsahuje prostor pro *N*-acetylovou skupinu substrátu. Tento prostor chybí u enzymu *aglB*, kde je aminokyselina Trp205, která brání vstupu *N*-acetylu do aktivního místa. Tento fakt vysvětluje duální aktivitu α -NAGA z *Aspergillus niger*.

Rekombinantní exprese α -NAGA

α -NAGA izolována z *Aspergillus niger* vykazovala jedinečné vlastnosti. Produkce tohoto enzymu byla provedena v kultivačním médiu po dobu 6 dní při teplotě 26°C, jako induktor byla použita sojová mouka. Enzym vykazoval teplotní optimum při 55°C a hodnotě pH 1,8. Po celkové deglykosylaci bylo pH optimum posunuto na hodnotu 1,5. Nativní i deglykosylovaný enzym byl stabilní v hodnotách pH 1,5-4,0 při teplotě 4°C. Nativní enzym byl při této teplotě stabilní několik měsíců. Byla zjištěna hodnota K_m purifikovaného enzymu 0,73 mmol/l pro *o*-NP- α -GalNAc v 50 mM citrát-fosfátovém pufru (pH 3,5) při 35°C. Duální α -GA aktivita byla vysvětlena evolučním mapováním a počítačovým modelováním α -NAGA. Evolučním mapováním bylo zjištěno, že α -NAGA se vyvinula z α -GA (popsáno výše). Rozdíl mezi α -GA a α -NAGA je právě v tak zvané vazebné kapse, která umožňuje vstup *N*-acetylaminu do aktivního místa enzymu (obrázek 2).

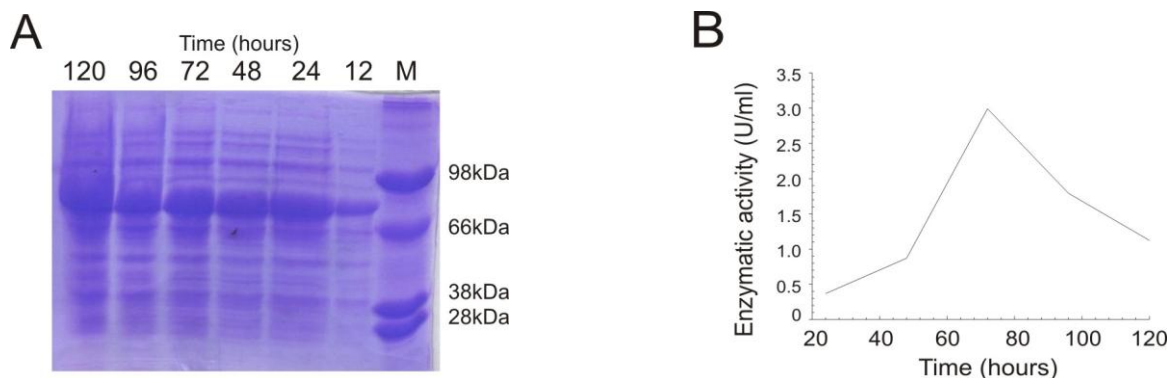
Na základě vlastností deglykosylované α -NAGA byl nejdříve navrhnout prokaryotický expresní systém *Escherichia coli* pro rekombinantní přípravu tohoto enzymu. Gen kódující α -NAGA byl získán z RNA, která byla izolována z houby *Aspergillus niger*, tato celková RNA byla reverzní transkripcí přepsána do DNA sekvence. Gen byl klonován do prokaryotického expresního vektoru pPET 30a+. Pro expresi α -NAGA byly použity dva expresní systémy. Jako první byl použit expresní systém *E. coli* BL-21 (DE3) Gold. V případě tohoto systému byla α -NAGA exprimována ve formě inkluzních tělísek bez enzymové aktivity. Bylo provedeno několik renaturačních experimentů, bohužel však bez úspěchu. Jako druhý prokaryotický expresní systém byl použit *E. coli* ArticExpressCells. Výhoda tohoto expresního systému je schopnost produkce rekombinantních proteinů při nízké teplotě obvykle kolem 12°C. Nízká teplota by měla zajišťovat pomalejší produkci, vyšší účinnost skládání proteinu a menší pravděpodobnost agregace. Bohužel, ani v tomto případě nebylo dosaženo produkce aktivní α -NAGA.

Na základě těchto experimentů byl navrhnout eukaryotický expresní systém *Pichia pastoris*. Bylo použito několik expresních kmenů a mnoho odlišných kultivačních podmínek, bohužel však ani v tomto případě nebylo dosaženo úspěšné exprese aktivní α -NAGA.

Jako poslední kvasinkový expresní systém byl použit expresní systém *Saccharomyces cerevisiae* (Ashida et. al. 2000). Produkce rekombinantní enzymaticky aktivní α -NAGA byla v tomto případě úspěšná. Rekombinantně připravený protein byl úspěšně exprimován, biochemicky a enzymově charakterizován.

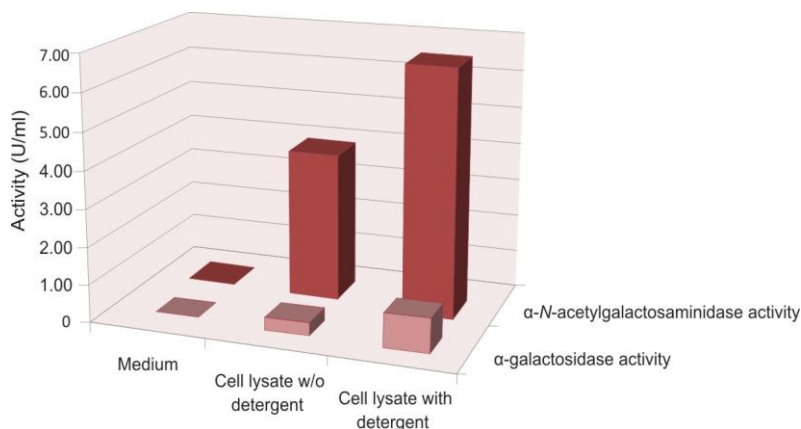
Vlastnosti rekombinantní α -NAGA byly kromě podjednotkového složení a pH aktivity v oblasti neutrálního pH shodné s nativní α -NAGA.

Rekombinantní α -NAGA se vyskytuje v roztoku ve dvou aktivních formách, monomerní a dimerické. Obě tyto formy vykazují jak α -NAGA, tak α -GA aktivitu. Výsvětlení tohoto jevu může být tzv. overexprese α -NAGA a umístění tohoto enzymu v různých buněčných organelách. Část enzymu se může vyskytovat v cytoplasmě, kde je redukční prostředí a část v jiných membránových organelách. Tuto hypotézu potvrzuje experiment, kdy bylo do lyzačního pufru přidáno malé množství detergentu, který výrazně zvýšil specifickou enzymovou aktivitu (obrázek 4). Druhý rozdíl mezi rekombinantní a přirozenou α -NAGA je v aktivitě v oblasti neutrálního pH. Rekombinantní α -NAGA vykazuje přibližně 15% α -NAGA aktivitu, zatímco přirozená α -NAGA je v této oblasti neaktivní.



Obrázek 3. Časový profil produkce α -NAGA v expresním systému *S. cerevisiae*: (A) SDS-PAGE elektroforéza (B), enzymová aktivita. Optimalizace produkce byla provedena při 30°C, jako induktor byla použita galaktóza. Rekombinantní α -NAGA byla identifikována pomocí SDS elektroforézy v redukujícím prostředí jako band o hmotnosti přibližně 76 kDa.

Přidáním detergentu do lyzačního pufru bylo dosaženo zvýšení enzymové aktivity. Tímto experimentem byl potvrzen výskyt rekombinantního enzymu v různých buněčných kompartmentech.



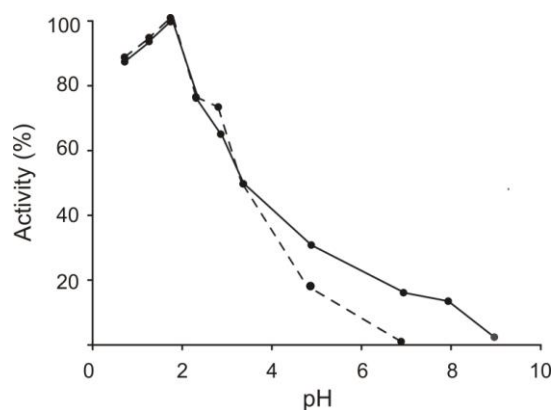
Obrázek 4. α -NAGA a α -GA aktivita měřená v buněčném lyzátu s přidavkem a bez přidavku dodecylmaltosidu jako detergentu.

Krok	Protein (mg)	Aktivita (U)	Spec.aktivita (U mg ⁻¹)	Čistota (násobek)	Výtěžek (%)
Buněčný lyzát	378.0	150.0	0.4	1.0	100
Phenyl-sepharose HR	31.4	102.3	3.3	8.3	68.2
S-Sepharose FF	12.8	81.0	6.3	15.8	54.0
Superdex 200	1.5	41.9	27.9	69.9	27.9
Mono P 5/200	0.4	18.1	42.3	105.9	12.1

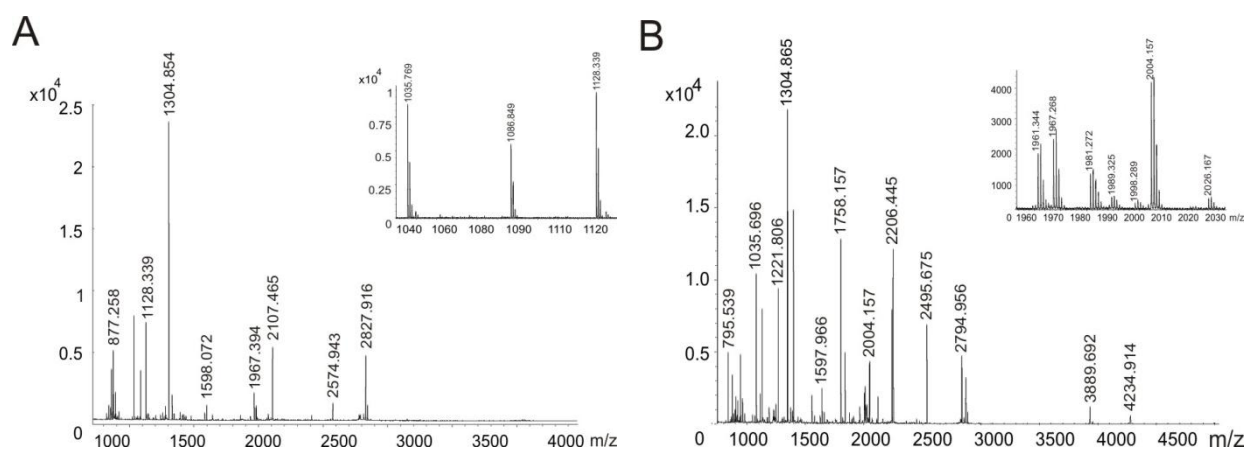
Tabulka 1. Purifikace rekombinantní α -NAGA ze *Saccharomyces cerevisiae*. Čistota enzymu je vztažena k počátečnímu materiálu.

Rekombinantní α -NAGA vykazuje duální enzymatickou aktivitu v oblasti neutrálního pH. Tohoto faktu by bylo možné využít při změně červených krvinek typu A na typ H(0).

Molekulová hmotnost přirozené a rekombinantní α -NAGA byla zjištěna pomocí gelové filtrace a analytické ultracentrifugy (Schutz P. 2003). Těmito metodami byla zjištěna molekulová hmotnost rekombinantního enzymu 70 kDa a 130 kDa (Schutz P. 2000). Tento enzym se vyskytuje v roztoku jako monomer a dimer. Hmotnost přirozené α -NAGA byla stanovena na přibližnou hodnotu 70 kDa. α -NAGA je glykoprotein, který obsahuje celkově osm potenciálních *N*-glykosylačních míst Asn 14, 52, 58, 88, 168, 320, 401 a 456. Analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie byla identifikována místa *N*-glykosylace (obrázek 6).



Obrázek 5. Efekt pH na aktivitu přirozené α -NAGA (---○---) a rekombinantní α -NAGA (—●—).



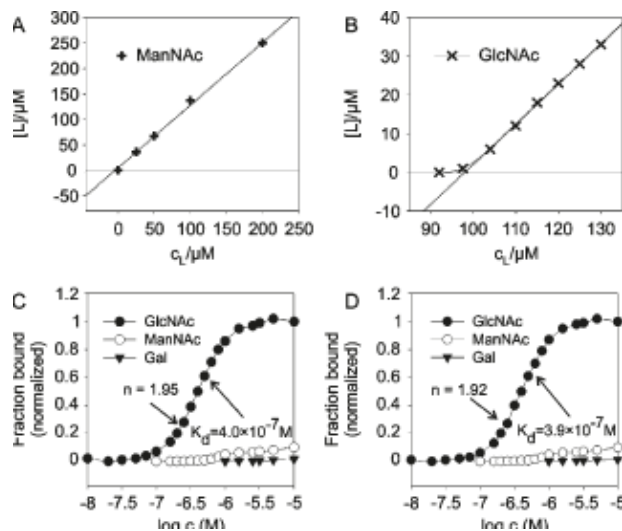
Obrázek 6. Stanovení míst *N*-glykosylace. (A) α -NAGA byla deglykosylována PNGázou F a štěpena Asp-N proteázou. MALDI-TOF hmotnostní analýza ukázala nový peptidový signál m/z 1128.337. Tento signál odpovídá peptidu 310-319 (m/z pro $[M+H]^+$ 1127.337) s 1 Da zvýšením hmotnosti, která odpovídá změně glykosylovaného asparaginu na kyselinu asparagovou vzniklou deglykosylací PNGázou F. (B) α -NAGA byla štěpena Asp-N a deglykosylována Endo Hf, která štěpí sacharidovou vazbu mezi dvěma GlcNAc jednotkami připojenými k aminokyselině asparaginu. Hmotnost finálního peptidu je zvýšená o 203,079 Da. Peptidový signál m/z 2004.157 odpovídá opět peptidu 310-325 (m/z for $[M+H]^+$ 1801.076) se zvýšením hmotnosti o 203.079 Da (GlcNAc).

Kooperace mezi podjednotkami CD69 receptoru

Bylo prokázáno, že vazba HexNAc na rozpustnou formu receptoru CD69 způsobuje velké změny na molekulární úrovni. Tyto změny nebyly pozorovány v případě mutantních receptorů Q93A a R134A, které nemohou tvořit nekovalentní dimerní formu CD69. Podobná situace je na buněčné úrovni, kde signalizace pomocí protilátek či bivalentních ligandů není úspěšná v případě výše popsaných mutantů.

Bylo připraveno několik konstruktů vysoce stabilního rozpustného receptoru CD69, který je vhodný na ligandové vazebné studie. První vazebné studie byly provedeny s monosacharidovými jednotkami a vápníkem. V případě vazby vápníku nebyly zjištěny rozdíly mezi vazbou kovalentního dimeru a

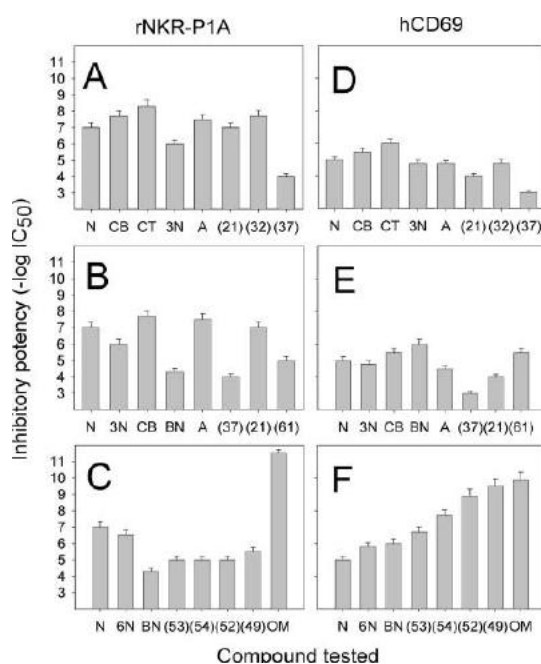
nekovalentní dimerní formy. Každý z proteinů vázal 1 mol vápníku/mol CD69 podjednotky s K_d přibližně 58 μM . Významné rozdíly byly však zjištěny při vazbě HexNAc. Hodnota IC_{50} pro rozpustnou formu CD69 s vazbou dvou HexNAc, D-GlcNAc a D-GalNAc byla přibližně 10^{-5} M pro každý ligand. Tyto hodnoty byly přibližně 10 krát nižší pro kovalentní dimerní protein a 100 krát nižší pro nekovalentní dimerní formu tohoto proteinu.



Obrázek 7. Měření přímé interakce rozpustné formy nekovalentního dimeru CD69 receptoru s ManNAc a GlcNAc. (A, B) NMR titrace rozpustného CD69 s ManNAc a GlcNAc. (C, D) Koncentrační závislost saturace receptoru měřená metodami rovnovážné dialýzy a tryptofanové zhášení fluorescence s použitím GlcNAc, ManNAc a Gal.

Byly připraveny tři série ligandů potenciálně vhodných pro vazebné studie s receptory NK buněk NKR-P1 a CD69 (Veprek et. al. 2006). Každý z těchto ligandů byl individuálně testován použitím radioznačené formy rozpustného receptoru. V případě NKR-P1 se námi připravené ligandy ukázaly jako průměrné nebo slabé v porovnání s GlcNAc jako kontrolou. Dále bylo zjištěno, že $\beta 1-4$ spojení je více preferované, než ostatní sacharidové vazby. Větvené sacharidové struktury výrazně snižovaly inhibiční potenciál nezávisle na použité sérii. V případě receptoru CD69 byly získány velmi zajímavé výsledky. Jen

malé rozdíly byly nalezeny v případě lineárních ligandů ze série GlcNAc/GalNAc v porovnání s GlcNAc jako kontrolou. Nicméně zvyšující se inhibiční potenciál byl objeven u série větvených GlcNAc/GalNAc. Na základě těchto předběžných výsledků byly navrženy další větvené sacharidové struktury, které budou použity pro další vazebné studie.



Obrázek 8. Biologické testování synteticky připravených HexNAc struktur pomocí inhibičních experimentů. Připravené sloučeniny byly testovány jako inhibitory vazby radioznačených receptorů rNKR-P1A (vlevo) nebo hCD69 (vpravo), které vykazují vysokou afinitu k GlcNAc23BSA ligandu.

Použitá literatura

Ashida H., Tamaki H., Fujimoto T., Yamamoto K., Kumagai H. (2000). Molecular cloning of cDNA encoding α -N-acetylgalactosaminidase from *Acremonium* sp. and its expression in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.* **384**: 305–310.

Bezouska, K.; Crichlow, G. V.; Rose, J. M.; Taylor, M. E.; Drickamer, K. (1991). Evolutionary conservation of intron position in a subfamily of genes encoding carbohydrate-recognition domains. *J. Biol. Chem.* **266**: 11604-11609.

Drickamer K. (1988). Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol. Chem.* **263**: 9557-9560.

Drickamer K. (1999). C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**: 585-590.

Hořejší V., Bartůňková J. (2001). *Základy imunologie*. Triton. Praha.

Kulik N., Weignerova L., Filipi T., Pompach P., Novak P., Mrazek H., Slamova K., Bezouska K., Kren V., Etrich R. (2010). The α -galactosidase type A gene *aglA* from *Aspergillus niger* encodes a fully functional α -N-acetylgalactosaminidase. *Glycobiology* **20**: 1410-1419.

Schutz P. (2000). Size distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and Lamm equation modelling. *Biophys. J.* **78**: 1606-1619.

Schutz P. (2003). On the analysis of protein self-association by sedimentation velocity analytical ultracentrifugation. *Anal. Biochem.* **320**: 104-124.

Veprek, P.; Hajduch, M.; Dzubal, P.; Kuklik, R.; Polakova, J.; Bezouska, K. (2006). Comblike dendrimers containing Tn antigen modulate natural killing and induce the production of Tn specific antibodies. *J Med Chem* **49** (21): 6400-6407.

Weignerova L., Filipi T., Manglova D., Kren V. (2008). Induction, purification and characterization of alpha-N-acetylgalactosaminidase from *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79**: 769-774.

Seznam publikací

Kulik N., Weignerova L., Filipi T., Pompach P., Novak P., Mrazek H., Slamova K., Bezouska K., Kren V., Etrich R. (2010). The α -galactosidase type A gene *aglA* from *Aspergillus niger* encodes a fully functional α -N-acetylgalactosaminidase. *Glycobiology* **20**: 1410-1419.

Rey M., Mrazek H., Pompach P., Novak P., Pelosi L., Brandolin G., Forest E., Havlicek V., Man P. (2010). Effective removal of nonionic detergents in protein mass spectrometry, hydrogen/deuterium exchange, and proteomics. *Anal. Chem.* **82**: 5107-5116.

Kovalova A., Ledvina M., Saman D., Zyka D., Kubickova M., Zidek L., Sklenar V., Pompach P., Kavan D., Bily J., Vanek O., Kubinkova Z., Libigerova M., Ivanova L., Antolikova M., Mrazek H., Rozbesky D., Hofbauerova K., Kren V., Bezouska K. (2010). Synthetic N-acetyl-D-glucosamine based fully branched tetrasaccharide, a mimetic of the endogenous ligand for CD69, activates CD69+ killer lymphocytes upon dimerization via a hydrophilic flexible linker. *J. Med. Chem.* **53**: 4050-4065.

Kavan D., Kubickova M., Bily J., Vanek O., Hofbauerova K., Mrazek H., Rozbesky D., Bojarova P., Kren V., Zidek L., Sklenar V., Bezouska K. (2010). Cooperation between subunits is essential for high-affinity binding of N-acetyl-D-hexosamines to dimeric soluble and dimeric cellular forms of human CD69. *Biochemistry* **49**: 4060-4067.

Mrazek H., Benada O., Man P., Vanek O., Kren V., Bezouska K., Weignerova L. (2011). Facile production of *Aspergillus niger* α -N-acetylgalactosaminidase in yeast. *Submitted for Protein expression and purification (under review)*.

Mrazek H., Weignerova L., Bezouska K. (2011). Aktivní forma α -N-acetylgalaktosaminidázy z vláknité houby *Aspergillus niger* a její rekombinantní exprese. *Czech Patent Application*.