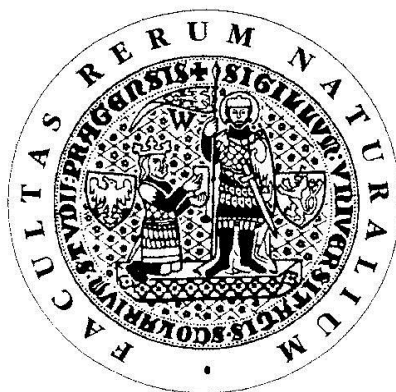


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Jana Horáková

Analýza vlivu glykosylace na poskládání a
molekulární architekturu enzymů

Analysis of influence of
glycosylation on assembly and
molecular architecture of enzymes

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Karel Bezouška DSc.

Praha 2011

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty LC 06035, MSM 0021620857 a RP 14/63), projektem KONTAKT (AMVIS) ME 10004 a grantem SVV-2011-263204 a SVV-2011-263209.

Prohlášení:

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

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

V Praze dne 24.8.2011

Ráda bych poděkovala Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi DSc. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat všem členům katedry biochemie za příjemné prostředí, které mi poskytovali během mé práce v laboratoři. Děkuji také svým rodičům, jenž mi umožnili studovat vysokou školu a děkuji za jejich podporu během studia.

Abstrakt:

V rámci zaměření naší laboratoře na studium vlivu glykosylace na proteinovou architekturu a biologickou aktivitu plísňových hexosaminidase jsem pro experimenty zvolila enzym z *Penicillium oxalicum*. Jeho hlavní výhodou je relativně homogenní glykosylace, propeptid tohoto enzymu je přirozeně glykosylovaný pouze na dvou místech, asparaginu 11 a serinu 66. Katalytická podjednotka a propeptid enzymu hexosaminidasy z *Aspergillus oryzae* byly pro rekonstituční experimenty odděleny od sebe. Cílenou mutagenesí byly v propeptidové části enzymu izolovaného z *Penicillium oxalicum* vyměněny asparagin 11 a serin 66 za cystein vhodný ke glykosylaci. Velkou nadějí pro účinné navrácení (rekonstituci) enzymové aktivity představoval nově syntetizovaný propeptidový derivát celobiosy, který je nejvíce podobný přirozeně se vyskytujícímu cukru chitobiose. Glykosylovaný propeptid byl oddělen od neglykosylovaného. Pomocí rekonstitučních experimentů jsme zjišťovali vliv glykosylace na enzymovou strukturu a aktivitu s využitím různě glykosylovaných propeptidů. Největší účinnost nastala při rekonstituci s původním propeptidem. V dalších pokusech byly zahrnuty kombinace synteticky glykosylovaných propeptidů, z nichž největší účinnost měla celobiosa (Asn¹¹) - manosa (Ser⁶⁶) a N-acetylglukosamin (Asn¹¹) - manosa(Ser⁶⁶). Ostatní varianty dosahovaly po rekonstituci nižší enzymové aktivity.

Klíčová slova: *Aspergillus oryzae*, *Penicillium oxalicum*, β -N-acetylhexosaminidasa, glykosylovaný propeptid, katalytická podjednotka, rekonstituční experimenty, celobiosa

Abstract:

Our laboratory studies the influence of glycosylation on protein architecture and the biological activity of fungal hexosaminidases. I studied the enzyme from *Penicillium oxalicum* which has an advantage of quite a homogenous glycosylation. The propeptide of this enzyme is naturally glycosylated only at two places – asparagine 11 and serine 66. Catalytic subunit and propeptide of the hexosaminidase enzyme from *Aspergillus oryzae* were separated from each other for reconstitution experiments. In the propeptide part of the enzyme separated from the *Penicillium oxalicum* hexosaminidase, asparagine 11 and serine 66 were swapped for cysteine by targeted mutagenesis. The newly synthesized propeptide modified with cellobiose, which is a compound most similar to naturally occurrence saccharide chitobiose, promised a significant chance of restoration of enzyme activity. The glycosylated propeptide was separated from the nonglycosylated. In reconstitution experiments we observed the influence of glycosylation on the enzyme structure and activity using different glycosylated propeptides. The highest efficiency occurred during the reconstitution by the original propeptide. Next we used combinations of artificially glycosylated propeptides of which the highest reconstitution efficiency had cellobiose(Asn¹¹)-mannose(Ser⁶⁶) and N-acetylglucosamine(Asn¹¹)-mannose(Ser⁶⁶). Other variants achieved a lower enzyme activity. (In Czech)

Key words: *Aspergillus oryzae*, *Penicillium oxalicum*, β -N-acetylhexosaminidase, glycosylated propeptide, catalytic subunit, reconstitution experiments, cellobiose

Obsah

Seznam zkratk:	7
1 Teoretický úvod	8
1.1 Hexosaminidasa	8
1.1.1 Enzymová charakteristika.....	8
1.1.2 Struktura enzymu.....	9
1.1.3 Funkce β -N-acetylhexosaminidasy	11
1.2 Mechanismus reakce katalyzované hexosaminidasou	11
1.3 Glykosylace enzymu	13
1.3.1 Vliv glykosylace na enzymovou aktivitu a stabilitu.....	13
1.3.2 Způsoby deglykosylace enzymu.....	13
1.3.3 Cílená glykosylace propeptidu	14
1.4 Rekonstituce enzymové aktivity	15
2 Cíl práce	16
3 Materiály a metody	17
3.1 Seznam použitých látek a přístrojů	17
3.1.1 Chemikálie.....	17
3.1.2 Enzymy a glykosylované propeptidy:	17
3.1.3 Použité přístroje:.....	18
3.2 Glykosylace propeptidu	18
3.3 Separace N-terminální části peptidu po reakci s glykosylačním činidlem	19
3.4 Separace katalytické podjednotky a propeptidu z <i>A. oryzae</i>	19
3.5 Rekonstituční experimenty	20
3.6 Určení enzymatické aktivity	20
4 Výsledky	21
4.1 Separace propeptidu a katalytické podjednotky hexosaminidasy z <i>A. oryzae</i> .	21
4.2 Glykosylace N- a C-terminálního fragmentu z propeptidu hexosaminidasy derivátem celobiosy	22
4.2 Látky používané pro rekonstituční experimenty:	25
4.3 Experimenty s enzymovou rekonstitucí	27
5 Diskuze	30
6 Závěr	32
7 Použitá literatura	33

Seznam zkratek:

Asn	asparagin
Cel	celobiosa
Endo H	endo- β -N-acetylglukasaminidasa H
Endo F1	endo- β -N-acetylglukosaminidasa F1
Gal	galaktosa
GlcNAc	N-acetylglukosamin
Man	manosa
Ser	serin
TCEP	tris(karboxyethyl)fosfin
TFA	trichloroctová kyselina
Thr	treonin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

Pozn. Pro zkratky aminokyselin a sacharidů je použita standardní trojpísmenová nomenklatura dle doporučení IUPAC. Veškeré použité sacharidy se vyskytovaly v D-konfiguraci.

1 Teoretický úvod

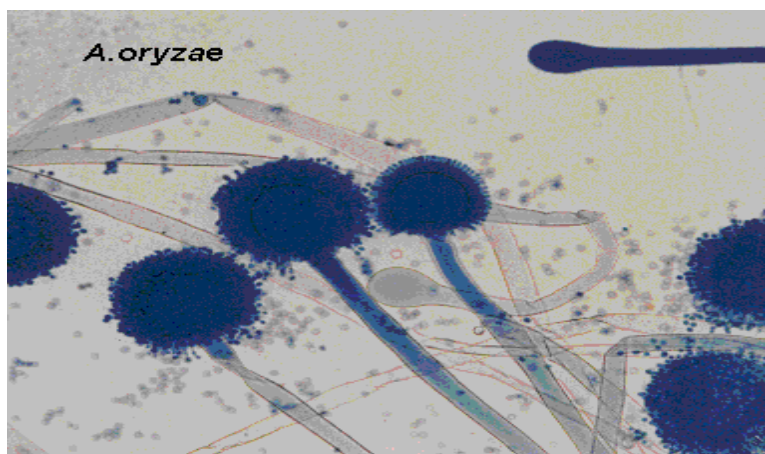
1.1 Hexosaminidasa

1.1.1 Enzymová charakteristika

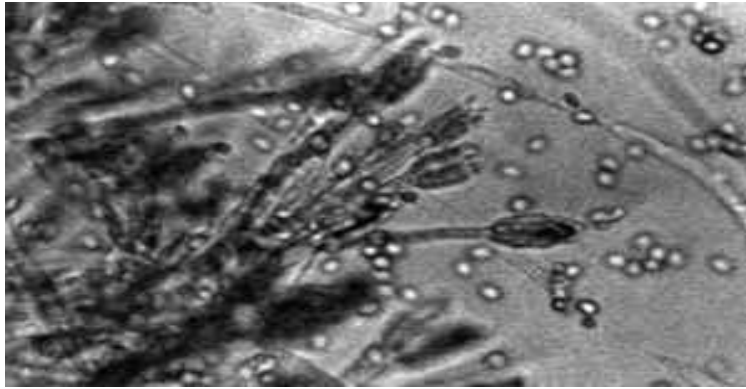
Jako enzymy označujeme biokatalyzátory, které katalyzují a regulují většinu biochemických reakcí v živých organismech. Chemickým složením se jedná o bílkoviny účastnící se specifických reakcí. Enzymy se dělí do 6 tříd, a to na oxidoreduktázy, transferázy, hydrolázy, lyázy, izomerázy, a ligázy. ⁽¹⁾

Námi studovaný enzym plísňová β -*N*-acetylhexosaminidasa (EC 3.2.1.52) je řazen mezi hydrolázy zodpovědné za katabolismus sacharidů, přesněji mezi exoglykosidasy, které katalyzují štěpení glykosidické vazby v terminální části. β -*N*-acetylhexosaminidasa zprostředkovává hydrolýzu koncových neredukujících *N*-acetyl-D-hexosaminových zbytků v *N*-acetyl- β -D-hexosaminidech. ⁽²⁾

Enzym β -*N*-acetylhexosaminidasy byl studován u lidí^(3,4), bakterií⁽⁵⁾ a plísní⁽⁶⁾. Nejmenší pozornosti se dostalo rostlinné β -*N*-acetylhexosaminidase.⁽⁷⁾ Námi studované enzymy pocházely z vláknitých plísní *A. oryzae* (Obr.1) a *P. oxalicum* (Obr.2), ve kterých zprostředkovávají štěpení chitobiosy na *N*-acetyl-D-glukosaminy⁽⁸⁾.



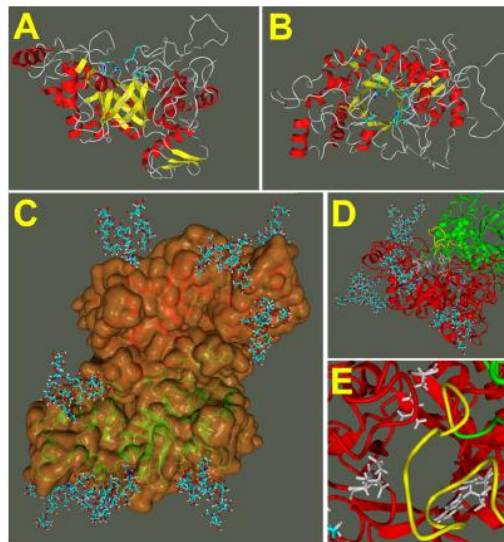
Obrázek 1. Vláknitá houba *A. oryzae*⁽⁹⁾



Obrázek 2. Vlákennitá houba *P.oxalicum*⁽¹⁰⁾

1.1.2 Struktura enzymu

Enzymy, které zodpovídají za katabolismus sacharidů, byly rozříděny celkem do 85 rodin na základě jejich sekvenční podobnosti. Většinu β -N-acetylhexosaminidas zařazujeme do rodiny číslo 20 (glykosylhydrolas).⁽¹¹⁾ Glykosylhydrolasy z rodiny 20 a také z rodiny 3, které jim jsou strukturně velmi blízké, obsahují strukturní motiv tvaru soudku (TIM-barrel) s katalytickým centrem. V katalytickém centru se nachází glutamová kyselina sloužící jako acidobazický katalyzátor.⁽¹²⁾ Enzym se skládá z propeptidu, zincin domény a katalytické podjednotky⁽¹³⁾ (Obr.3).



Obrázek 3. Molekulární model β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae*, modely ukazují podobu katalytické podjednotky, (A) pohled ze strany, (B) pohled shora s aktivním místem v C-terminálním čele (β, α)₈-soudku, (C) ukazuje úpravu katalytické podjednotky v plně N-glykosylovaném dimeru, (D) pohled ze strany, (E) pohled shora na dlouhou ohebnou smyčku (značenou žlutě) zeleného monomeru, která je přibližně 1 nm nad aktivním místem zbytků (ukázány šedivě) červeného monomeru.⁽⁸⁾

V případě plísňové hexosaminidasy jsou propeptid a katalytická podjednotka spojeny nekovalentně, ⁽⁶⁾ kdežto u lidské hexosaminidasy se jedná o spojení pomocí disulfidových můstků cysteinu. ⁽¹⁴⁾ V závislosti na okolních podmínkách a životním cyklu se β -N-acetylhexosaminidasa vyskytuje v různých formách. Většina vylučovaného enzymu se vyskytuje ve formě dimeru katalytické podjednotky, monomerní forma katalytické podjednotky je enzymaticky neaktivní. Katalytická podjednotka námi používaného enzymu hexosaminidasy z vláknité plísně *A. oryzae* je N-glykosylována na šesti místech a spojena s jednou nebo dvěma molekulami propeptidu O-glykosylovaného na čtyřech místech (Obr.4). ⁽⁶⁾ Glykosylace propeptidu hexosaminidasy z *A. oryzae* se nachází na N-terminální části propeptidu v místech Thr⁶⁰, Ser⁶⁵, Ser⁶⁶, Thr⁷². V případě β -N-acetylhexosaminidasy pocházející z *P. oxalicum* se vyskytují na propeptidu pouze dvě glykosylační místa. Na Asn¹¹ se přirozeně nachází N-glykosidycky vázaný oligosacharid složený z GlcNAc-GlcNAc-Man-(Man)₄₋₉, a na Ser⁶⁶ se nachází O-glykosidycky vázaný oligosacharid o složení (Man)₂₋₄-Gal. ⁽¹⁵⁾ Katalytická podjednotka enzymu hexosaminidasy z vláknité plísně z *P. oxalicum* je N-glykosylována na pěti místech. ⁽¹⁶⁾



Obrázek 4. Navrhnutá struktura domén β -N-acetylhexosaminidasy z *A. oryzae* a její glykosylace. ⁽⁶⁾

Lidská β -N-acetylhexosaminidasa je dimerní lysosomální enzym skládající se ze dvou podjednotek α a β . Tvoří tři isoformy: hexosaminidasu A tvořenou podjednotkou α a β , hexosaminidasu B tvořenou dvěma β podjednotkami a minoritně i hexosaminidasu S skládající se ze dvou podjednotek α . ⁽¹⁷⁾ Jak již bylo řečeno, propeptid a katalytická podjednotka jsou spojeny disulfidovým můstkem.

Bakteriální enzym hexosaminidasa se nachází převážně v monomerní formě. ⁽⁸⁾

1.1.3 Funkce β -N-acetylhexosaminidasy

Funkce β -N-acetylhexosaminidasy jsou zkoumány především kvůli dysfunkcím lidského enzymu β -N-acetylhexosaminidasy, které jsou spojovány s několika fatálními vrozenými vadami. Mutace genu HexA způsobuje Tay-Sachsovu chorobou a mutace obou genů HexA i HexB je spojována se Sandhoffovou chorobou⁽¹⁸⁾. Dalšími funkcemi, na kterých se lidská β -N-acetylhexosaminidasa podílí, jsou změny způsobené spermatem v děloze umožňující oplození vajíčka⁽¹⁹⁾, osteoartridida (β -N-acetylhexosaminidasa urychluje katabolismus glykosaminoglykanů)⁽²⁰⁾ a podílí se na metabolismu glykolipidů.⁽²¹⁾

Plísňová β -N-acetylhexosaminidasa hraje nezbytnou roli v restrukturalizaci buněčné stěny během růstu a také se účastní recyklace buněčné stěny, tedy metabolismu chitinu⁽²²⁾. V laboratoři ji lze využít pro syntézu různých sacharidů nebo derivátů námelových alkaloidů a steroidů.⁽²³⁾

Bakteriální β -N-acetylhexosaminidasa se stejně jako plísňová podílí na rozkladu buněčné stěny, metabolismu mureinu.⁽²⁴⁾

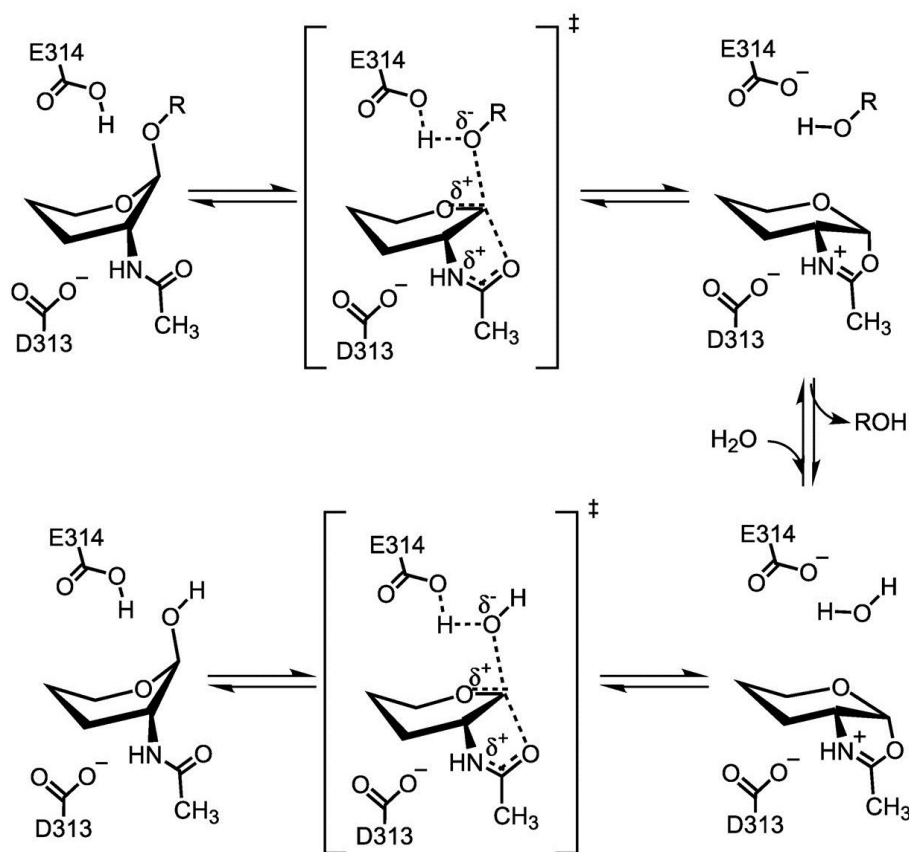
Rostlinná β -N-acetyl hexosaminidasa se s největší pravděpodobností podílí na degradaci zásobního glykoproteinu⁽²⁵⁾ a účastní se zrání ovoce.⁽²⁶⁾

1.2 Mechanismus reakce katalyzované hexosaminidasou

Reakce katalyzované hexosaminidasou probíhají jako nukleofilní substituce na nasyceném anomerickém uhlíku⁽²⁷⁾. Glykosylhydrolasy z rodiny 20 účinkují jako enzymy retenující, tj. u produktu se udržuje identická anomerická konfigurace jako u substrátu. U glykosidas tohoto druhu většinou má reakce dva kroky. V první části dochází pomocí kyseliny glutamové nebo asparagové ke kyselé katalyzované štěpení β -(1,4)-glykosidické vazby. Tím na enzymu vzniká přechodný ion s oxakarbeniovým charakterem. Enzym je vázán na glykosyl svým aktivním centrem bohatým na karboxyly. Ve druhé části je karboxylované aktivní centrum

hydrolyzováno bazicky katalyzovanou reakcí s vodou, čímž dojde k uvolnění substrátu a obnově chemické struktury katalytického centra.

Nicméně enzymy β -hexosaminidasa a chitobiosa jsou specifické tím, že postrádají karboxylovou skupinu schopnou stabilizovat oxakarbeniový ion přechodného stavu molekuly, a proto je pro jimi prováděnou katalýzu nezbytná acetamidová skupina na sousedním C2 uhlíku substrátu. Acetamidová skupina zastupuje enzymový nukleofil a stabilizuje enzym-oxazoliniový ion. Jeho cyklická forma je poté hydrolyzována bazicky katalyzovaným útokem vody na anomerickém centru stejným způsobem jako u mechanismu ostatních hydrolas z rodiny 20. Tento mechanismus katalýzy (Obr. 5) je uplatňován především u rodiny 18.^(28,29)



Obrázek 5. Předpokládaný mechanismus katalýzy pro β -hexosaminidasu. Obecně kyselina glutamová (Glu³¹⁴) a asparagová (Asp³¹³) jsou primárně zodpovědné za stabilizaci kladného náboje na oxazoliniovém iontu, ačkoliv žádný pokus neukázal jejich skutečné umístění. Hydroxylové skupiny a C6 byly odstraněny z pyranosového kruhu pro přehlednost.⁽²⁸⁾

1.3 Glykosylace enzymu

1.3.1 Vliv glykosylace na enzymovou aktivitu a stabilitu

Glykosylace je jednou z velmi častých postranslačních modifikací proteinů.⁽³⁰⁾ Ovlivňuje především rozpustnost, stabilitu, enzymovou aktivitu, a správného prostorového uspořádání enzymu.^(30,31) N-glykosidicky vázaný sacharid je vázán na asparagin v trojici aminokyselin, kde na první pozici je asparagin, na druhé libovolná aminokyselina s výjimkou prolinu a na třetí hydroxyaminokyselina tvořící s asparaginem vodíkový můstek. Prolin se v této trojici nemůže vyskytovat, jelikož by znemožnil vznik vodíkového můstku mezi asparaginem a serinem či threoninem. Serin či threonin může být vzácně nahrazen cysteinem. K N-glykosylaci dochází v endoplazmatickém retikulu oligosacharidem s vysokým obsahem manosy.⁽³²⁾

β -N-acetylhexosaminidasa obsahuje glykosylovaná místa na katalytické podjednotce⁽⁸⁾ i na propeptidu.⁽¹⁷⁾ N-glykosylovaná místa jsou obsazena výhradně vysoce manosovými typy glykanů. Deglykosylací katalytické podjednotky zůstává enzym plně aktivní jak v neutrálním, tak v zásaditém prostředí, kdežto po vystavení kyselému prostředí (pH 2) dochází k ireverzibilní ztrátě enzymové aktivity.⁽³³⁾ Propeptid a jeho správná glykosylace jsou naprosto nezbytné pro enzymovou aktivitu β -N-acetylhexosaminidasy. Deglykosylace propeptidu vede k úplné ztrátě enzymové aktivity.⁽¹⁷⁾ Počet glykosylačních míst se liší v závislosti na původu konkrétní β -N-acetylhexosaminidasy, stejně jako aktivita těchto enzymů.

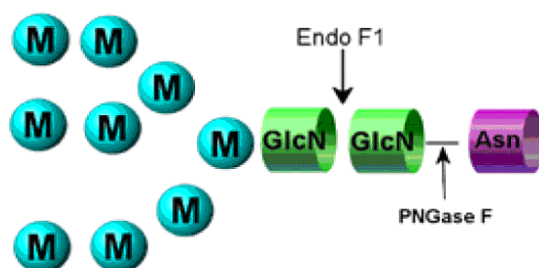
Z důvodu menšího počtu glykosylačních míst byl zvolen pro glykosylaci a rekonstituční experimenty propeptid z *P.oxalicum*.

1.3.2 Způsoby deglykosylace enzymu

Deglykosylace enzymu se dá provést enzymaticky či chemicky. Enzymatická deglykosylace se dá provést odštěpením celého sacharidu, a tím dojde k modifikaci aminokyseliny, na které je navázán N-glykosidyckou vazbou. Takto deglykosylovaný enzym ztrácí z velké části své vlastnosti. Pro tento typ glykosylace se využívají N-glykosidasy např. PNGasa F (Obr.6). Nebo se může štěpit vazba mezi N-acetylglukosaminem navázaným na aminokyselinový skelet a následujícím N-acetylglukosaminem. Takto glykosylovaný enzym si často zachovává původní

vlastnosti. K docílení tohoto typu glykosylace se používají endoglykosidasy zvolené podle typu navázaného oligosacharidu např. Endo H nebo Endo F1 (Obr.6). Jednodušší sacharidy vázané O-glykosidyckou vazbou lze odštěpit pomocí O-glykosidas, ovšem univerzální přístup u těchto deglykosylací zatím neexistuje.

Deglykosylace se dá provést i chemickou cestou reakcí s trifluormethansulfonovou kyselinou, která ponechá N-acetylglukosamin vázaný na aminokyselinovém řetězci a všechny ostatní sacharidy zničí. Mezi další metody chemické deglykosylace patří hydrazinolýza a alkalické štěpení.⁽³²⁾



Obrázek 6. Příklad deglykosylace pomocí N-glykosidasy PNGasa F a endoglykosidasy Endo F1 oligomanosního N-vázaného glykanu. (34)

1.3.3 Cílená glykosylace propeptidu

Deglykosylovaný propeptid lze glykosylovat pomocí lysinu nebo cysteinu. U lysinu se využívá konjugace ϵ -aminoskupiny lysinu s oligosacharidem.⁽³⁵⁾ V případě cysteinu se jedná o specifickou reakci reaktivní $-SH$ skupiny s alkylačním činidlem, jako je například námi používaný jodoacetamidový derivát celobiosy. Vzniklá thioetherová vazba je stabilní a nedochází ke změně ve struktuře sacharidu⁽³⁶⁾. Jelikož propeptid izolovaný z *P. oxalicum* neobsahuje přirozeně ve své aminokyselinové sekvenci cystein⁽³⁷⁾, je nutno tuto aminokyselinu cílenou mutagenesí vnést do aminokyselinového řetězce na potřebné místo glykosylace propeptidu. Výhodou je, že nedochází ke glykosylaci na nežádoucích místech.

1.4 Rekonstituce enzymové aktivity

Hexosaminidasa se skládá ze dvou molekul propeptidu, které připadají na jeden dimer katalytické podjednotky. Taková molekula se vyznačuje dvojnásobnou specifickou aktivitou oproti molekule obsahující jeden dimer katalytické podjednotky spojený s jediným propeptidem. Enzym, kde se vyskytují dvě nekovalentně svázané molekuly propeptidu se tvoří mnohem rychleji než forma s jedním propeptidem. ⁽⁶⁾

Aktivní stav enzymu plísňové hexosaminidasy je udržován pomocí propeptidu, který je nekovalentně navázán na katalytickou podjednotku. Pro enzymovou aktivitu je také zapotřebí glykosylace propeptidu⁽⁶⁾. Glykosylace na katalytické podjednotce v tomto případě nehraje příliš důležitou roli, vyskytuje-li se enzym ve vhodném prostředí⁽⁸⁾. Bylo zjištěno, že pro enzymovou aktivitu je důležitější navázání alespoň jednoho vhodného sacharidu na správné místo v aminokyselinovém skeletu⁽³⁸⁾, než skutečnost na jaké aminokyselině je navázán nebo-li na typu glykosylace. Proto v našich experimentech mohly být vyměněny původně glykosylované aminokyseliny Asn¹¹ a Ser⁶⁶ za Cys, který slouží ke specifické glykosylaci, čímž dojde k částečnému navrácení enzymové aktivity hexosaminidasy.

Rekonstituční aktivita u různých druhů hexosaminidas není stejná. Hexosaminidasa z *A. oryzae* vykazuje okolo 40 % enzymové aktivity hexosaminidasy z *P. oxalicum*.⁽³⁷⁾

2 Cíl práce

1. Separace propeptidu od katalytické podjednotky hexosaminidasy pocházející z *Aspergillus oryzae*.
2. Glykosylace N- a C- terminálního propeptidu pomocí specifické reakce cysteinu s jodoacetamidovým derivátem celobiosy.
3. Rekonstituční experimenty s různě glykosylovanými propeptidy hexosaminidasy.

3 Materiály a metody

3.1 Seznam použitých látek a přístrojů

3.1.1 Chemikálie

Látka	Dodavatel, Země původu
Acetonitril	Merck, SRN
Guanidin.HCl	Serva, Německo
Imidazol	Sigma, USA MBÚ AV, ČR (syntetizován a analyzován dr. Karlem Křenkem)
Jodoacetamidový derivát celobiosy	
Methanol	Lach-Ner, ČR
Močovina	Lachema, ČR
Sodno citrátový puřf o pH 5.0	Sigma, USA
TCEP	Sigma, USA
TFA	Sigma, USA
Tris	Serva, Německo
Uhličitan vápenatý	Sigma, USA
4-nitrofenyl- β -D-GlcNac	Lachema, ČR

3.1.2 Enzymy a glykosylované propeptidy:

Hexosaminidasa z *A. oryzae*

Glykosylované propeptidy z *P. oxalicum*:

N-terminální propeptid Asn¹¹-Cel

C-terminální propeptid Ser⁶⁶-Cel

C-terminální propeptid Ser⁶⁶-Man

propeptid Asn¹¹-Man / Ser⁶⁶-Man

propeptid Asn¹¹-GlcNAc / Ser⁶⁶-GlcNAc

propeptid Asn¹¹-GlcNAc / Ser⁶⁶-Man
 propeptid Asn¹¹-Man / Ser⁶⁶-GlcNAc
 propeptid Asn¹¹-Cel / Ser⁶⁶-Cel
 propeptid Asn¹¹-Man / Ser⁶⁶-Cel
 propeptid Asn¹¹-Cel / Ser⁶⁶-Man

3.1.3 Použité přístroje:

Přístroj	Dodavatel, Země původu
Analytické váhy	Mettler-Toledo, Švýcarsko
Automatické pipety	Gilson, USA
Centrifuga	Beckman J-6M, USA
Hmotnostní spektrofotometr	MALDI, USA
Chladnička	Samsung Calex, Japonsko
Chladnička	Liebherr, Německo
Kolona Vydac C-4	Grace Vydac, USA
Kolona Vydac C-18	Grace Vydac, USA
Mikrocentrifuga spectrafuge 16M	Labnet, Kypr
pH metr	Beckman, Německo
Předvážkové váhy HF – 1200 G	AND, USA
Rotační vakuová odparka Jouan RC 1010	Trigon-plus, ČR
Spektrofotometr SAFIRE ²	Tecan-Schoeller Instruments, Rakousko
Sonifikátor	ColeParmer, příkon 60 W
Sušárna	WTB Binder, SRN
Vortexový mixér	VELP Scientifica, Itálie

3.2 Glykosylace propeptidu

K 200 µl upraveného vzorku propeptidu izolovaného z *P. oxalicum* byly přidány 2 µl redukčního činidla 1M TCEP. Propeptid se nechal 10 min reagovat s redukčním činidlem a poté byl separován pomocí HPLC. Separace probíhala na koloně C18 (4,6 x 250 mm, Vydac) s použitím lineárního gradientu od 10 do 40 % acetonitrilu v 0,07% TFA po dobu 30 minut. Kolona byla připojena na metalickém HPLC systému firmy

Beckman-Coulter typ 128 s binární vysokotlakou pumpou a průtokovým UV detektorem s nastavitelnou vlnovou délkou. Redukovaný propeptid byl eluován z kolony přibližně v 11. minutě a následně zkoncentrován na rotační vakuové odparce. Následně byl redukovaný propeptid rozpuštěn v pufru obsahujícím 6M guanidin.HCl, 400nmol imidazol, 50nmol Tris-HCl pH 8.5, a byl promíchán s jodoacetamidovým derivátem celobiosy. Po reakci byl uchováván 16 hodin v temnu a následně byla separována glykosylovaná část od neglykosylované, postup separace je uveden v následující kapitole.

3.3 Separace N-terminální části peptidu po reakci s glykosylačním činidlem

Glykosylovaný propeptid byl separován od neglykosylovaného na C18 koloně (4,6 x 250 mm, Vydac) s použitím stejného lineárního gradientu, který byl popsán v kapitole 3.2. Glykosylovaný propeptid byl eluován z kolony na začátku 11. minuty, kdežto neglykosylovaný propeptid na jejím konci. Frakce byly jímány po 0,5 ml a analyzovány pomocí hmotnostní spektrofotometrie MALDI na přístroji Ultraflex III (typ MALDI-TOF/TOF firmy Bruker Daltonics). Čisté frakce byly dále uchovány pro rekonstituční experimenty.

3.4 Separace katalytické podjednotky a propeptidu z *A. oryzae*

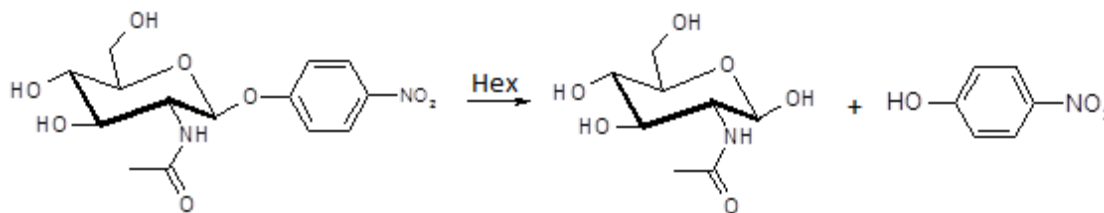
Propeptid byl separován od katalytické podjednotky hexosaminidasy na C4 koloně (4,6 x 250 mm, Vydac) s použitím lineárního gradientu od 0 do 95 % acetonitrilu v 0,07% TFA přes 60 minut. Propetid byl eluován z kolony přibližně ve 35. minutě, zatímco katalytická podjednotka byla eluována přibližně ve 41. minutě. Katalytická podjednotka a propeptid byly sbírány zvlášť po 1ml frakcích. Frakce propeptidu i katalytické podjednotky byly vysušeny na vakuové rotační odparce a následně pomocí citrátového pufru spojeny. Čisté frakce katalytické podjednotky a propeptidu byly poté použity pro rekonstituční experimenty.

3.5 Rekonstituční experimenty

Do mikrotitrační destičky s jamkami s kulatým dnem pipetujeme 30 μl 50mM sodno citrátového pufru s pH 5.0, 10 μl roztoku testované látky ve vodě, a nakonec 10 μl roztoku katalytické podjednotky hexosaminidasy ve 4M močovině a 50mM sodno citrátového pufru s pH 5.0. Po smíchání všech komponent inkubujeme destičku při 4 $^{\circ}\text{C}$ v lednici, a poté přeneseme 45 μl směsi do jamek mikrotitrační destičky s plochým dnem, a přidáme 45 μl chladného (4 $^{\circ}\text{C}$) substrátového roztoku obsahujícího 5mM 4-nitrofenyl- β -D-GlcNAc v 50mM sodno citrátovém pufru s pH 5.0. Destičku umístíme do sušárny vyhřáté na 30 $^{\circ}\text{C}$, a inkubujeme při této teplotě přesně 30 minut. Poté desku vyjmeme, a veškeré reakce okamžitě zastavíme přidávkem 90 μl 2M roztoku Na_2CO_3 . Změříme hodnoty absorbance při 400 nm, a aktivitu v jednotlivých experimentech vyjadřujeme jako procento aktivity v kontrolních jamkách obsahující nativní propeptid hexosaminidasy.

3.6 Určení enzymatické aktivity

Enzymová aktivita byla měřena s použitím 4-nitrofenyl- β -D-GlcNAc, kterou enzym hexosaminidasy rozkládá na N-acetylglukosamin a 4-nitrofenol, který po zalkalizování (přídavek 1M uhličitanu) zežloutne. Koncentrace rozkladem vzniklého 4-nitrofenolu (Obr.7) byla měřena spektrofotometricky při 400 nm. Získané výsledky byly vztaženy na procento enzymové aktivity nativního enzymu s *A. oryzae*.

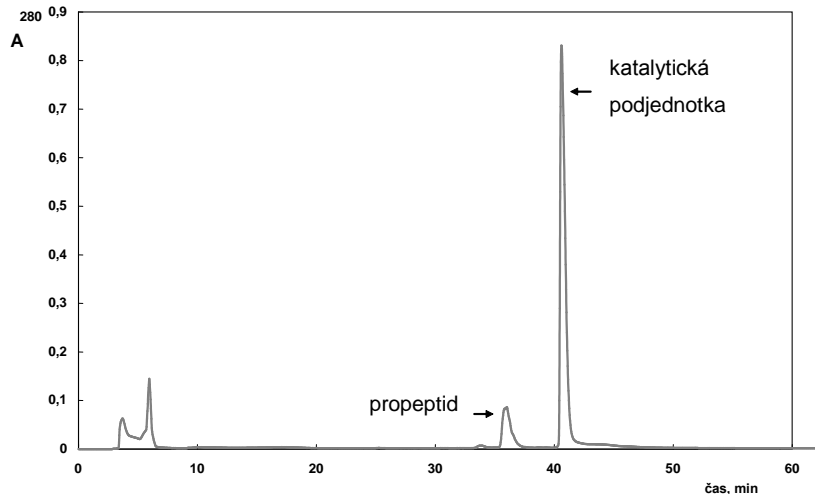


Obrázek 7. Štěpení substrátu (4-nitrofenyl- β -D-GlcNAc) hexosaminidasy za vzniku spektrofotometricky sledovaného para-nitrofenolu.

4 Výsledky

4.1 Separace propeptidu a katalytické podjednotky hexosaminidasy z *A. oryzae*

Pro oddělení propeptidu od katalytické podjednotky byla použita chromatografie na obrácené fázi s použitím kolony Vydac C4 dle publikovaného postupu⁽⁶⁾. Inkubací vzorku v kyselém prostředí 0,1% TFA a přítomnosti acetonitrilu dochází k rozpadu hexosaminidasy na oba její polypeptidy. Propeptid, který je více hydrofilní, bývá eluován zhruba v 35. minutě hodinového gradientu, zatímco katalytická podjednotka bývá eluována později cca kolem 40. minuty. Tento způsob eluce se potvrdil i pro mnohou separovanou hexosaminidasu, propeptid jsem detekovala na základě jeho výrazně nižší absorpance při 280 nm oproti katalytické podjednotce (Obr. 8). Vzhledem k tomu, že došlo k dokonalé separaci propeptidu od katalytické podjednotky, jímala jsem obě frakce zvlášť do plastických mikroskopických nádob a materiál uschovala pro následné rekonstituční experimenty.

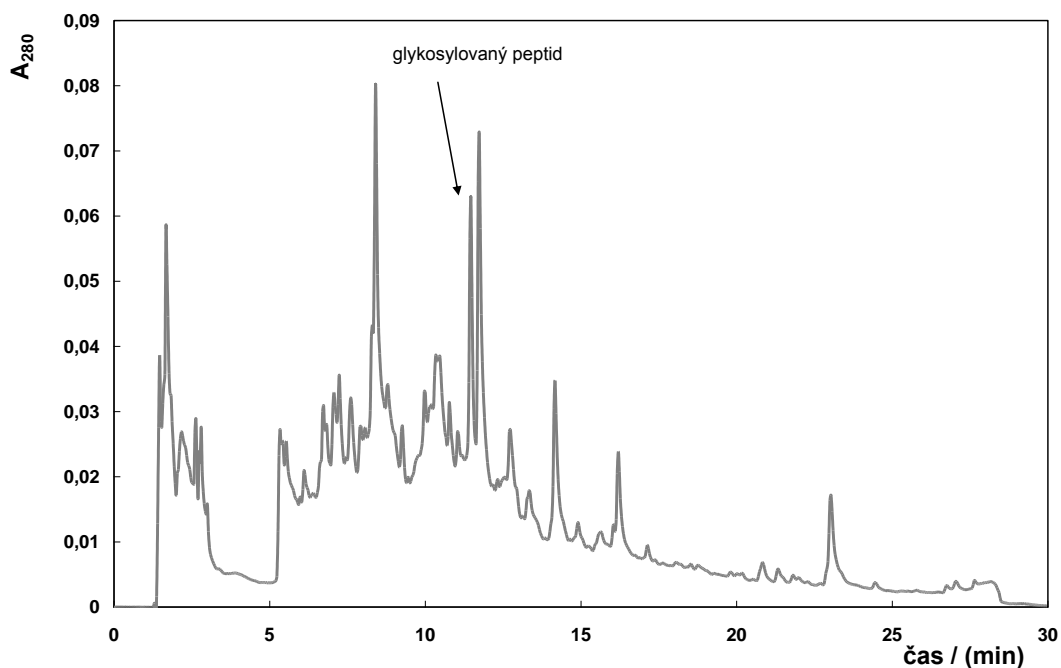


Obrázek 8. Separace propeptidu od katalytické podjednotky hexosaminidasy z *A. oryzae*. Detaily experimentu jsou uvedeny v části Materiál a metody. Látky nezachycené na separační koloně a eluované cca v 5. minutě nebyly dále analyzovány. Lineární gradient acetonitrilu byl zahájen v čase 10 minut.

4.2 Glykosylace N- a C-terminálního fragmentu z propeptidu hexosaminidasy derivátem celobiosy

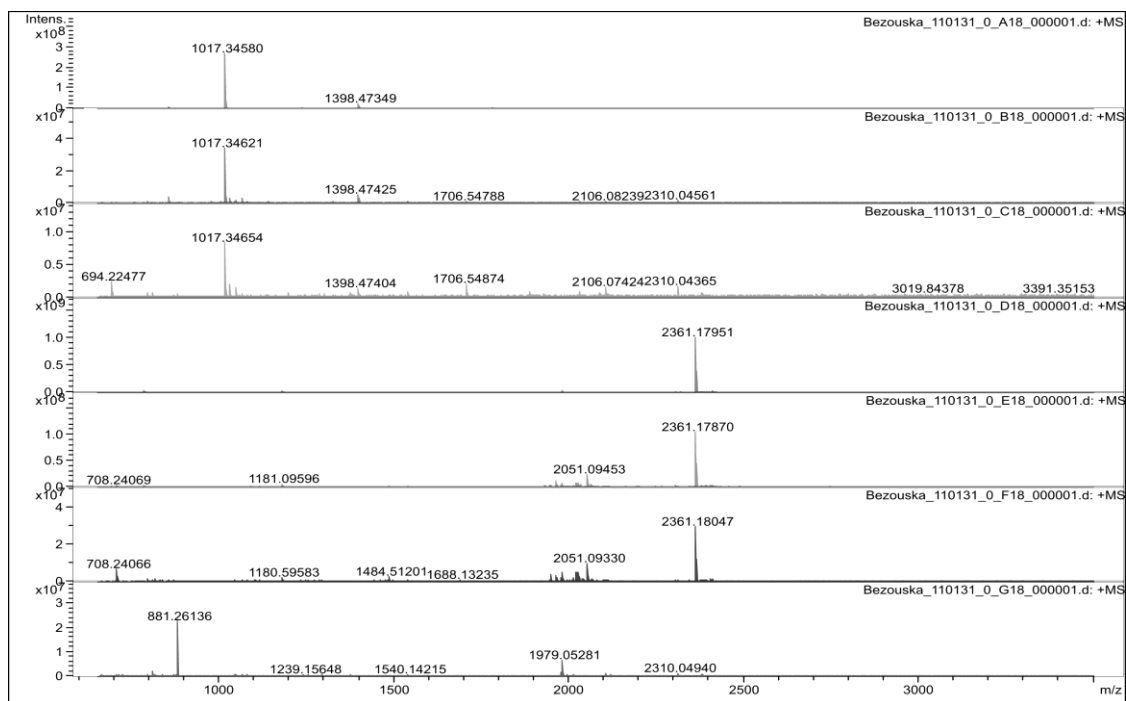
V předcházejících experimentech v naší laboratoři byla využita cílená glykosylace cysteinových zbytků deriváty α -D-manosy a β -D-N-acetylglukosaminu. Jelikož se nyní podařilo připravit syntetický jodoacetamidový derivát od disacharidu celobiosy (Glc β 1-4Glc), jevílo se jako zajímavé použít tento disacharid pro glykosylační a rekonstituční experimenty. V přirozené formě propeptidu hexosaminidasy není přítomen žádný zbytek cysteinu což umožňuje jeho umístění do libovolné polohy v aminokyselinové sekvenci. Po chemické glykosylaci je potom možné tímto způsobem umístit kovalentně vázaný sacharidový zbytek do libovolné polohy podél polypeptidového řetězce. V mém případě jsem využila evolučně konzervovaného N- a C-terminálního fragmentu o délce 18 a 21 aminokyselin a cysteinový zbytek, který byl následně použit ke glykosylaci, jsem umístila vždy do polohy odpovídající přirozené glykosylaci.⁽¹⁵⁾

Vzhledem k tomu, že jodoacetamidový derivát celobiosy byl přímo připraven k použití (neobsahoval již chránící O-acetylové skupiny), byly přímo nasazeny glykosylační reakce. Reakční směs byla připravená dle údajů uvedených v literatuře, navíc jsem ještě přidala 10mM TCEP chránící SH- skupiny cysteinů před oxidací během chemické reakce. Glykosylace probíhala při laboratorní teplotě 16 hodin v temnu, neboť světlo rozkládá použitý jodoacetamidový derivát. Po reakci byla celá reakční směs nastříknuta na kolonu s obrácenou fází Vydac C18 a byly jímány veškeré frakce s absorbcí při 280 nm (Obr. 9).



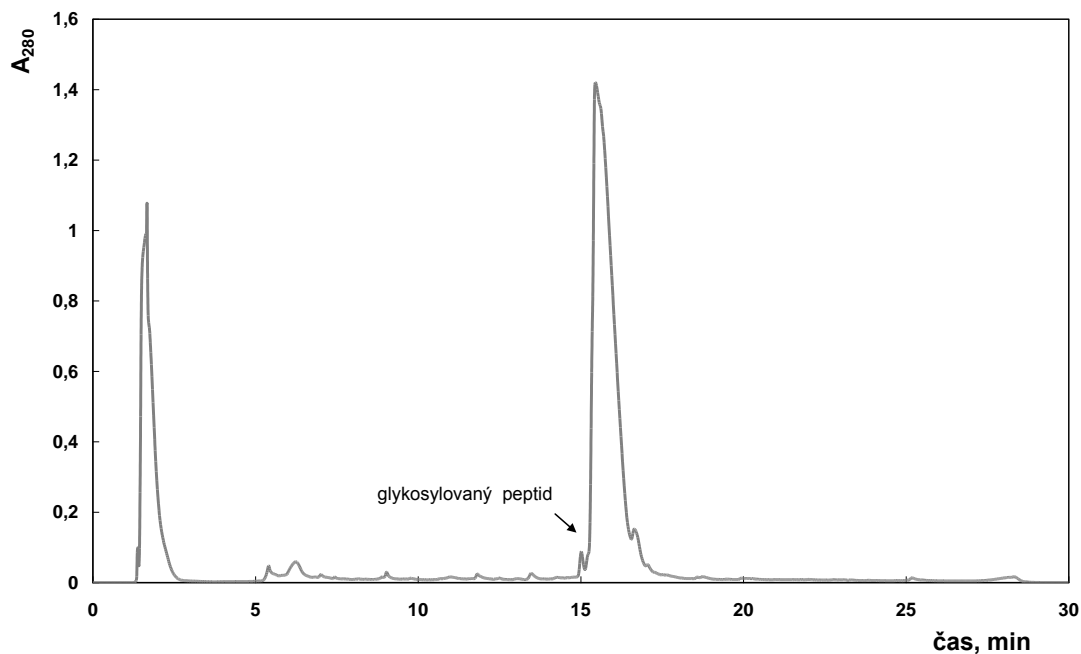
Obrázek 9. Separace N-terminálního peptidu po reakci s glykosylačním činidlem. Eluce peptidů zachycených na koloně byla prováděna lineárním gradientem acetonitrilu zahájeným v čase 5 minut. Ostatní podmínky chromatografie jsou uvedeny v sekci Materiál a metody.

Identita jednotlivých frakcí byla poté prověřována hmotnostní spektrometrií MALDI. Hmotnost požadovaného derivátu byla vypočtena jako součet hmoty jeho peptidové části a hmoty sacharidového derivátu, odečten byl jodovodík HI, který je v průběhu reakce eliminován. Pro N-terminální fragment byla získána hodnota 2361,18 a sledována v jednotlivých měřených frakcích. V nejčistší podobě byl požadovaný konjugát přítomen ve frakci D (Obr. 10) Tato frakce odpovídá prvému ze dvou majoritních píků na HPLC profilu (Obr. 9).

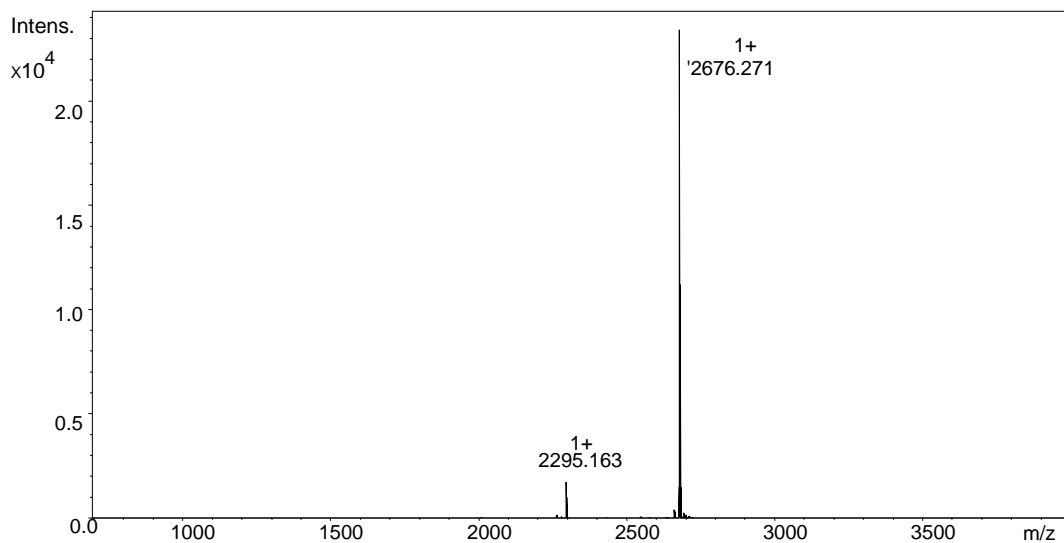


Obrázek 10. Hmotnostní spektra jednotlivých frakcí získaných separací reakční směs po reakci N-terminálního peptidu s glykosylačním činidlem. Jako nejčistší se jevila frakce D uvedená ve 4.řádku.

Výsledky získané při glykosylaci C-terminálního fragmentu (experiment prováděn Prof. Bezouškou) byly obdobné jako v případě N-terminálního fragmentu. V tomto případě byl však výtěžek glykosylovaného fragmentu relativně nízký (Obr. 11). Struktura minoritní frakce glykosylovaného fragmentu byla potvrzena hmotnostními spektrometrií (Obr. 12). Pro potřeby rekonstitučních experimentů bylo množství získaného glykosylovaného fragmentu dostatečné.



Obrázek 11. Separace C-terminální ho peptidu po reakci s glykosylačním činidlem. Podmínky experimentu byly identické jako u separace na obr. 10.



Obrázek 12 Hmotnostní spektrum C-terminální ho peptidu po reakci s glykosylačním činidlem.

4.2 Látky používané pro rekonstituční experimenty:

Látky používané k rekonstitučním experimentům jsou uvedeny v tabulce 3. Látky byly zvoleny s ohledem na nově připravený jodoacetamidový derivát celobiosy

a výsledky předchozích rekonstitučních experimentů prováděných Marií Vysokou a Miloslavou Vítovcovou. Ke všem vzorkům s výjimkou negativní kontroly (samotný citrátový pufr s pH 5.0) a enzymu hexosaminidasy (vzorky A a O) byla přidána katalytická podjednotka z *A. oryzae* a sodno citrátový pufr s pH 5.0. Veškeré glykosylované propeptidy pocházely z *P. oxalicum*. Látkové množství katalytické podjednotky a glykosylovaného propeptidu bylo stejné.

Tabulka 3. Látky používané v rekonstitučních experimentech

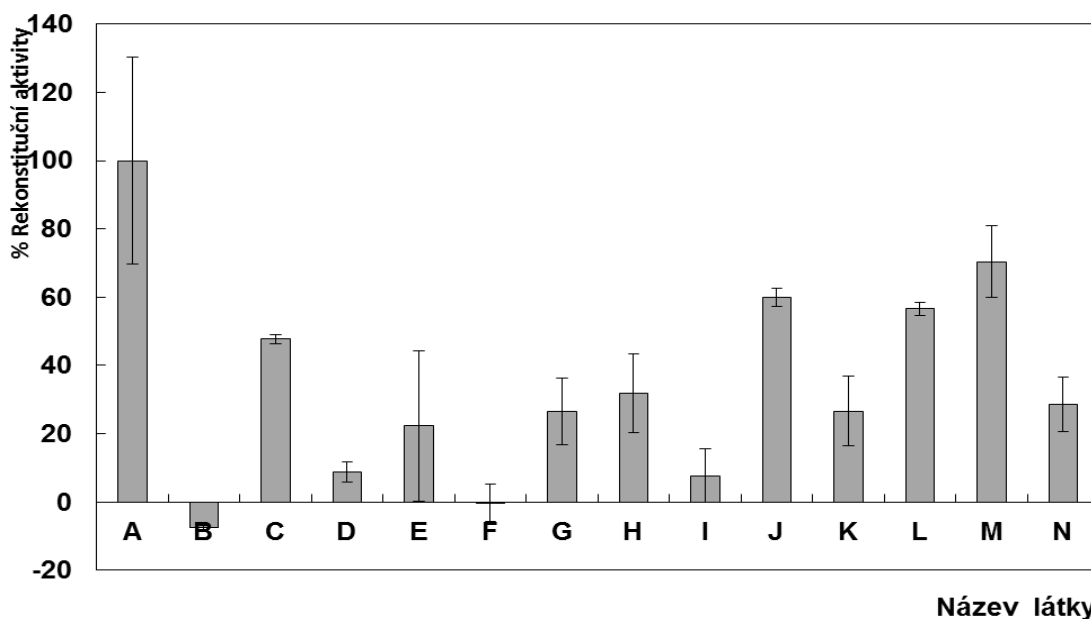
Název látky	Chemické složení	Původ
a	Enzym hexosaminidasy z <i>A. oryzae</i>	Připraven Z. Kukačkou
b	Pouze katalytická podjednotka z <i>A.s oryzae</i>	Isolace
c	Nativní propeptid z <i>A.s oryzae</i>	Isolace
d	Glykosylovaný N-terminální propeptid Asn ¹¹ Cel	Tato práce
e	Glykosylované propeptidy N-terminální Asn ¹¹ -Cel a C-terminální Ser ⁶⁶ -Cel	Tato práce K. Bezouška
f	Glykosylovaný C-terminální propeptid Ser ⁶⁶ -Cel	K. Bezouška
g	Glykosylované propeptidy N-terminální Asn ¹¹ -Cel a C-terminální Ser ⁶⁶ -Man	Tato práce K. Bezouška
h	Glykosylovaný. propeptid Asn ¹¹ -GlcNAc Ser ⁶⁶ -GlcNAc	M.Vítovcová
i	Glykosylovaný propeptid Asn ¹¹ -Man Ser ⁶⁶ -Man	M.Vítovcová
j	Glykosylovaný. propeptid Asn ¹¹ -GlcNAc Ser ⁶⁶ -Man	M.Vítovcová
k	Glykosylovaná propeptid Asn ¹¹ -Man Ser ⁶⁶ -GlcNAc	M.Vítovcová
l	Glykosylovaný propeptid Asn ¹¹ -Cel Ser ⁶⁶ -Cel	K. Bezouška
m	Glykosylovaný propeptid Asn ¹¹ -Cel Ser ⁶⁶ -Man	K. Bezouška
n	Glykosylovaný propeptid Asn ¹¹ -Man Ser ⁶⁶ -Cel	K. Bezouška
o	Citrátový pufr (negativní kontrola)	

4.3 Experimenty s enzymovou rekonstitucí

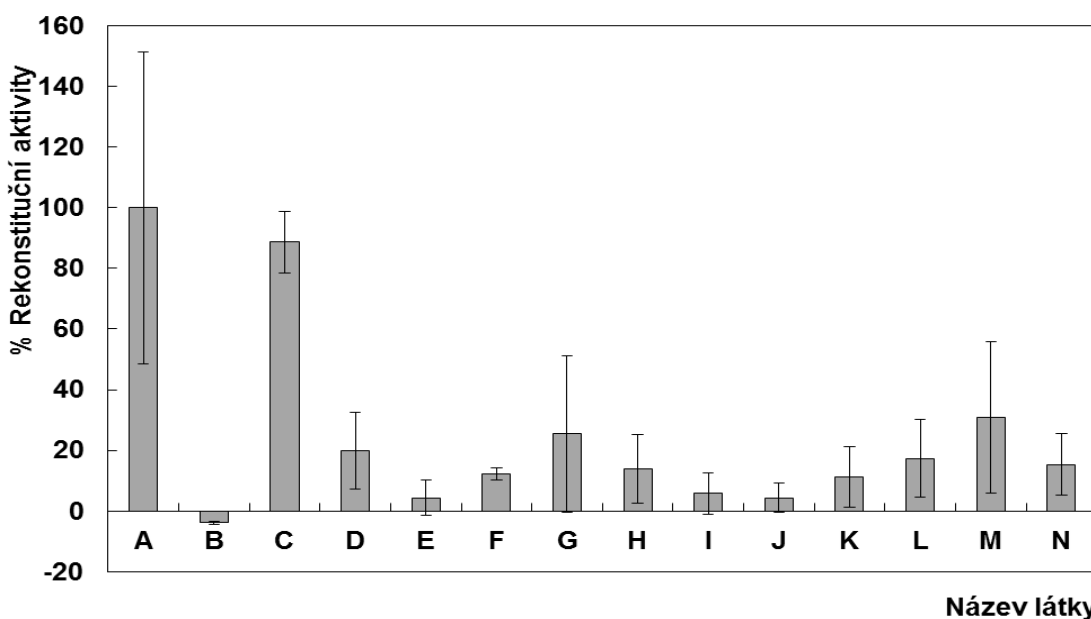
Enzymová rekonstituce spočívá ve smíchání separovaných molekulárních komponent enzymu nebo enzymového komplexu za podmínek umožňujících získat enzymovou aktivitu odpovídající nativnímu enzymu. Ve svých experimentech jsem optimalizovala inkubační dobu nezbytnou pro dosažení rekonstituce (Obr. 13 až 15). Různé časy rekonstituce neměly dramatický vliv na její účinnost, spíše docházelo k dosti velkému kolísání výsledků. K vyřešení tohoto problému jsem nakonec provedla pět sad rekonstitučních experimentů v kvadruplikátech a získané výsledky jsem shrnula do souhrného grafu (Obr. 16).

Mnou prováděné rekonstituční experimenty obsahovaly celkem čtrnáct experimentálních variant (Tab. 3). Varianta O neobsahovala katalytickou podjednotku a sloužila tudíž jako negativní kontrola. Od všech měřených hodnot byla hodnota negativní kontroly odečtena. Varianty A až C mého experimentu byly již v laboratoři zkoumány a já jsem ověřila, že přidáním izolovaného propeptidu do reakční směsi je možné zrekonstituovat enzymovou aktivitu až z 80 %. Varianty D až G ověřovaly možnost rekonstituce fragmenty s celobiosou. Pokud byl přidán N-terminální i C-terminální fragment současně docházelo pouze asi k 12% rekonstituci enzymové aktivity. Pokud byly přidávány fragmenty jednotlivě nepřesáhla úroveň rekonstituční aktivity 8 %. Pro C-terminální fragment není připojení celobiosy přirozené, protože se zde vyskytuje za přirozené situace manosový oligosacharid. Pokud byl v rekonstituční směsi nahrazen C-terminální peptid s celobiosou manosylovaným fragmentem, dosáhla úroveň rekonstituce 20 %.

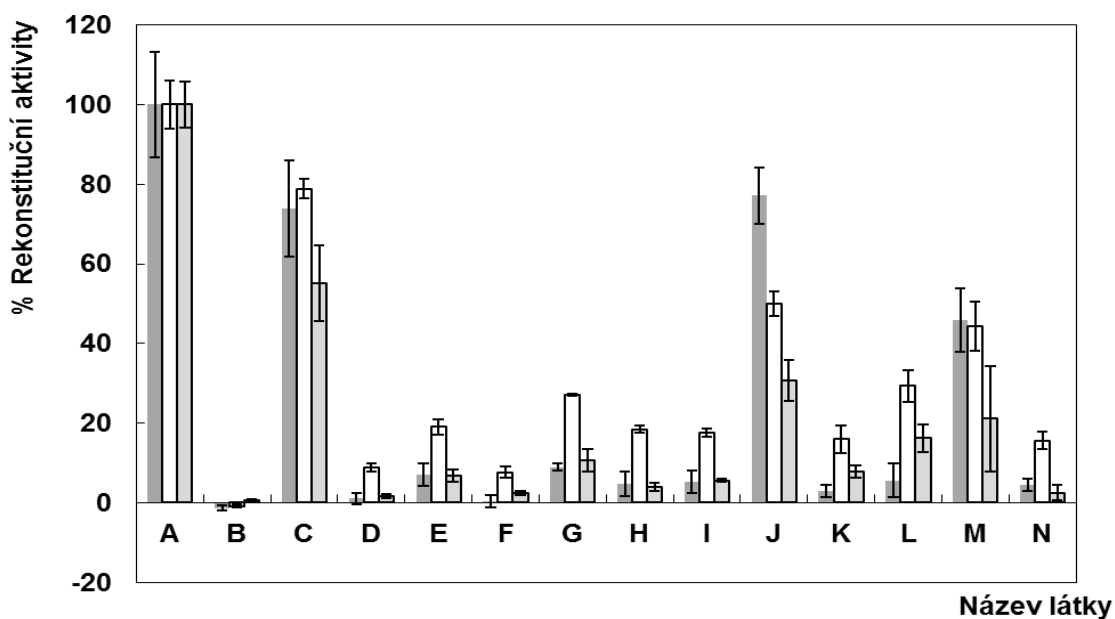
K vyšším úrovním enzymové rekonstituce docházelo u celého propeptidu glykosylovaného v přirozených pozicích (experimenty H až N). Nejlepší výsledky z této série (více než 40% rekonstituce) přitom poskytovaly látky J a M. Látka J obsahovala N-glykosidycky vázaný N-acetylglukosamin a C-glykosidycky vázanou manosu, tedy monosacharidy odpovídající přirozené glykosylaci. V látce M byl N-terminální monosacharid nahrazen disacharidem ovšem poněkud odlišné chemické povahy (na tomto místě se přirozeně vyskytuje chitobiosa, kdežto u syntetického derivátu celobiosa).



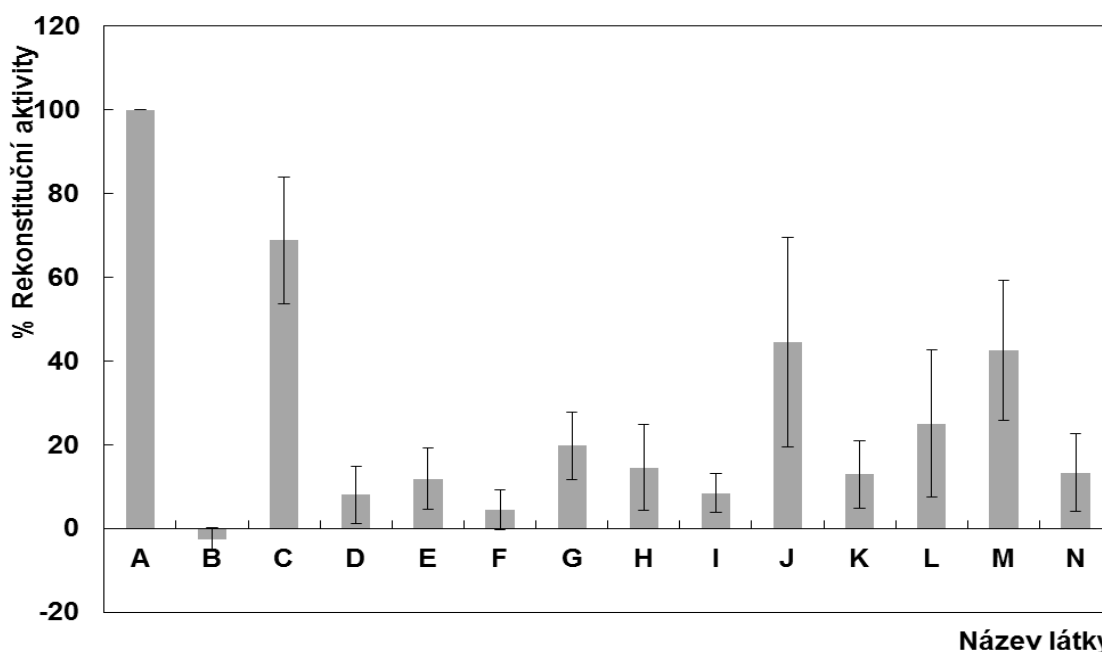
Obrázek 13. První rekonstituční experiment: Rekonstituční aktivity hexosaminidasy získané rekonstitucí katalytické podjednotky z *A. oryzae* a různě glykosylovaných propeptidů z *P. oxalicum*. Doba inkubace při 4 °C po smíchání všech komponent byla 1 den. Za 100% úroveň rekonstituce byla vzata enzymová aktivita přirozeného enzymu hexosaminidasy z *A. oryzae*. Na ni byly vztaženy ostatní experimenty.



Obrázek 14. Druhý rekonstituční experiment: Rekonstituční aktivity hexosaminidasy získané rekonstitucí katalytické podjednotky z *A. oryzae* a různě glykosylovaných propeptidů z *P. oxalicum*. Doba inkubace při 4 °C po smíchání všech komponent 2 dny. Za 100% úroveň rekonstituce byla vzata enzymová aktivita přirozeného enzymu hexosaminidasy z *A. oryzae*. Na ni byly vztaženy ostatní experimenty.



Obrázek 15. Třetí rekonstituční experiment: Rekonstituční aktivity hexosaminidasy získané rekonstitucí katalytické podjednotky z *A. oryzae* a různě glykosylovaných propeptidů z *P. oxalicum*. Doba inkubace při 4 °C po smíchání všech komponent 5 dní.. Za 100% úroveň rekonstituce byla vzata enzymová aktivita přirozeného enzymu hexosaminidasy z *A. oryzae*. Na ni byly vztaženy ostatní experimenty.



Obrázek 16. Souhrn rekonstitučních experimentů: Rekonstituční aktivity hexosaminidasy získané rekonstitucí katalytické podjednotky z *A. oryzae* a různě glykosylovaných propeptidů z *P. oxalicum*. Za 100% úroveň rekonstituce byla vzata enzymová aktivita přirozeného enzymu hexosaminidasy z *A. oryzae*. Na ni byly vztaženy ostatní experimenty. Doba inkubace při 4 °C po smíchání všech komponent se nejevila jako významná, tudíž bylo možné jednotlivé experimenty navzájem porovnat.

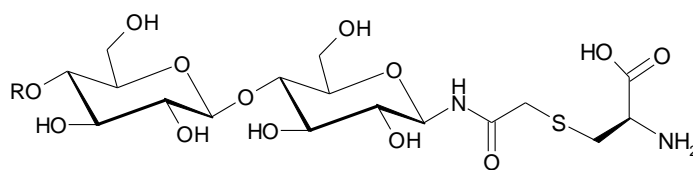
5 Diskuze

Nativní enzymy hexosaminidasy jsou různě glykosylované v závislosti na jejich původu. Liší se jak počtem glykosylačních míst, tak i enzymovou aktivitou, a to i u příbuzných druhů hexosaminidas^(8,17,37). Dříve již bylo zjištěno, že glykosylace propeptidu na správném místě aminokyselinové sekvence je velice důležitá pro enzymovou aktivitu⁽³⁸⁾. V této práci jsme se zabývali vlivem struktury sacharidu (vázaného na vhodném místě aminokyselinové sekvence) na enzymovou aktivitu hexosaminidasy. Předpokládali jsme, že navázání celobiosy na Cys¹¹ (Obr. 17) by mohlo vést vzhledem k podobnosti s přirozeně se vyskytující chitobiosou na Asn¹¹ (Obr. 18) k vysoké rekonstituci enzymové aktivity. Nicméně procento rekonstituce bylo naprosto srovnatelné s propeptidem glykosylovaným *N*-Acetylglucosaminem. V případě glykosylace Cys⁶⁶ se manosa potvrdila jako nejvhodnější sacharid ke glykosylaci, jelikož v přirozeném enzymu se nachází na tomto místě Ser⁶⁶ glykosylovaný vysoce manosovým oligosacharidem (Obr. 19). Z výsledku lze potvrdit, že pro částečnou rekonstituci enzymové aktivity postačuje navázání alespoň jednoho sacharidu strukturně shodného s původně glykosylovaným sacharidem. V současné době se kolegové ze spolupracující Laboratoře biotransformací na MBÚ AV ČR v.v.i. snaží o provedení syntézy jodoacetamidového derivátu chitobiosy, aby bylo možné rekonstituční studie doplnit pomocí této varianty glykosylovaného propeptidu, jehož uspořádání je bližší přirozenému.

Jelikož procento rekonstituční aktivity bylo poměrně nízké, pokusili jsme se o jeho zvýšení prodloužením doby inkubace po smíchání všech komponent, což bohužel nemělo na enzymovou aktivitu vliv.

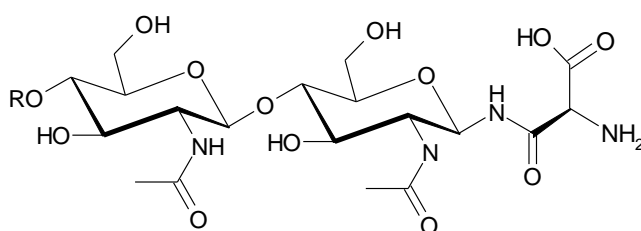
Předchozí výsledky získané v naší laboratoři ukázaly, že rekombinantní propeptid Asn¹¹-GlcNAc Ser⁶⁶-Man z *P. oxalicum* měl dokonce vyšší procento rekonstituční aktivity než nativní enzym pocházející z *A. oryzae*.⁽³⁸⁾ Nicméně námi prováděné experimenty s rekombinantním propeptidem Asn¹¹-GlcNAc Ser⁶⁶-Man z *P. oxalicum* sloučeným s katalytickou podjednotkou z *A. oryzae* ukázaly rekonstituční aktivitu odpovídající pouze 40 % nativního enzymu izolovaného z *A. oryzae*. A neukázalo se tedy jako příliš výhodné kombinovat jednotlivé komponenty z různých druhů vláknitých plísní. A proto by bylo zajímavé rekonstituci

provést s propeptidem glykosylovaným Asn¹¹-GlcNAc Ser⁶⁶-Man z *P. oxalicum* v přítomnosti katalytické podjednotky pocházející taktéž z *P.oxalicum*.



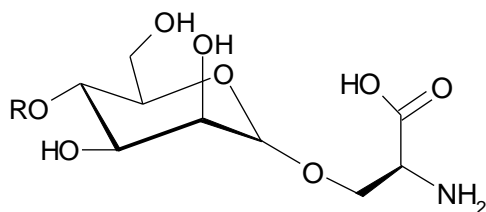
[Celobiosa vázaná β vazbou na cystein]

Obrázek 17. Struktury S-glykosylace námi používaná pro rekonstituční experimenty na místě ¹¹ Asn.



[chitobiosa vázaná β vazbou na asparagin]

Obrázek 18. Struktura přirozené glykosylace enzymy hexosaminidasy pocházející z *P. oxalicum*



[manosa vázaná α vazbou na serin]

Obrázek 19. Struktura přirozené O-glykosylace enzymy hexosaminidasy pocházející z *P. oxalicum*

6 Závěr

Cílem naší práce bylo separovat propeptid od katalytické podjednotky hexosaminidasy pocházející z *A. oryzae*. Dále glykosylovat N-terminální propeptid hexosaminidasy z *P. oxalicum* pomocí specifické reakce cysteinu s jodoacetamidovým derivátem celobiosy a zjistit vliv struktury sacharidu na enzymovou aktivitu pomocí rekonstitučních experimentů s různě glykosylovanými propeptidy hexosaminidasy.

Podarilo se nám pomocí reverzní chromatografie dobře oddělit propeptid a katalytickou podjednotku enzymu hexosaminidasy.

Úspěšně jsme glykosylovali N-terminální propeptid a pomocí reverzní chromatografie oddělili glykosylovanou část od neglykosylované.

Úspěšnost glykosylace byla potvrzena hmotnostní spektrofotometrií MALDI. Byl získán dostatečně čistý glykosylovaný propeptid s molekulovou hmotností 2361,2 odpovídající N-terminální části propeptidu glykosylovaného celobiosou s aminokyselinovou sekvencí VKVNPLPAPRC*ITWGSSP, kde C* je cystein substituovaný celobiosou.

Rekonstituční experimenty potvrdily, že propeptid je naprosto nezbytný pro rekonstrukci enzymové aktivity a samotná katalytická podjednotka enzymovou aktivitu nevykazuje. Stejně tak je důležitá i glykosylace vhodným cukrem na správném místě v aminokyselinovém skeletu. Jako nejvhodnější cukry pro glykosylaci se jevily cukry, které jsou strukturně nejvíce podobné přirozeně glykosylovaným cukrům.

Nebylo prokázáno, že prodloužením doby inkubace po smísení všech komponent by došlo ke zvýšení enzymové aktivity. Doba uvedená v použité metodě (jeden den) je pro experiment dostačující a její prodloužení nemá na výsledky experimentu vliv.

7 Použitá literatura

- 1) Kolektiv: Biochemie, skriptum PřF UK Praha, str. 41 (2009)
- 2) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme> (27.7.20011)
- 3) Swallow, D.M., Stokes, D.C., Corney, G., Harris, H.: *Ann. Hum. Genet.* 37, 287-302 (1974) Differences between the N-acetyl hexosaminidase isozymes in serum and tissues
- 4) Robinson, D., Jordan, T.W., Horsburgh, T.: *J. Neurochem.* 19, 1975-1985 (1972). The N-acetyl- β -D-hexosaminidases of calf and human brain
- 5) Soto-Gil, R.W., Zyskind J.W.: *J. Biol. Chem.* 264, 14778-14783 (1989) N,N'-diacetylchitobiase of *Vibrio harveyi*. Primary structure, processing, and evolutionary relationships
- 6) Plíhal, O., Sklenář, J., Kmoníčková, J., Man, P., Pompach, P., Havlíček, V., Křen, V., Bezouška, K.: *Biochem. Soc. Trans.* 32, 764-765 (2004) N-glycosylated catalytic unit meets O-glycosylated propeptide: complex protein architecture in a fungal hexosaminidase
- 7) Aronson, N.N. Jr., Kuranda M.J.: *FASEB J.* 3, 2615-2622 (1989) Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins
- 8) Ettrich, R., Kopecky, V. Jr., Hofbauerova, K., Baumruk, V., Novák, P., Pompach, P., Man, P., Plíhal, O., Kutý, M., Kulik, N., Sklenář, J., Ryšlavá, H., Křen, V., Bezouška, K.: *BMC Struct. Biol.* 7: 32 (2007) Structure of the dimeric N-glycosylated form of fungal β -N-acetylhexosaminidase revealed by computer modeling, vibrational spectroscopy, and biochemical studies.
- 9) http://eso.vscht.cz/cache_data/1154/www.vscht.cz/kch/galerie/obrazky/houby/aspl5au.gif (4.7.2011)
- 10) http://www.reviberoammicol.com/photo_gallery/Penicillium/oxalicum/ (4.7.2011)
- 11) Henrissat, B., Bairoch, A.: *Biochem. J.* 316, 695-696 (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases

- 12) Tews, I., Perrakis, A., Oppenheim, A., Dauter, Z., Wilson, K.S., Vorgias, C.E.: *Nat. Struct. Biol.* 3, 638-648 (1996) Bacterial chitobiase structure provides insight into catalytic mechanism and the basis of Tay-Sachs disease
- 13) Hušáková L., Herkommerová-Rajnochová E., Semeňuk T., Kuzma M., Rauvolfová J., Příkrylová V., Ettrich R., Plíhal O., Bezouška K., Křen V.: *Adv. Synth. Catal.* 345, 735-742 (2003) Enzymatic discrimination of 2-acetamido-2-deoxy-D-mannopyranose-containing disaccharides using β -N-acetylhexosaminidases
- 14) Sagherian, C., Thorner, P., Mahuran, D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 135-141 (1994) The pro-peptide of the pro β -polypeptide chain of human β -hexosaminidase is necessary for proper protein folding and exit from the endoplasmic reticulum
- 15) Bezouška, K.: osobní sdělení
- 16) 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, 2469-2484 (2011) Enzymatic characterization and molecular modeling of an evolutionarily interesting fungal β -N-acetylhexosaminidase
- 17) 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, 2719-2734 (2007) Large propeptides of fungal β -N-acetylhexosaminidases are novel enzyme regulators that must be intracellularly processed to control activity, dimerization, and secretion into the extracellular environment
- 18) Hechtman, P., LeBlanc, D.: *Biochem. J.* 167, 693-701 (1977) Purification and properties of the hexosaminidase A-activating protein from human liver
- 19) Miranda, P.V., Gonzalez-Echeverria, F., Blaquier, J.A., Mahuran, D.J., Tezon, J.G.: *Mol. Hum. Reprod.* 6, 699-706 (2000) Evidence for the participation of β -hexosaminidase in human sperm-zona pellucida interaction in vitro
- 20) Liu, J., Shikhman, A.R., Lotz, M.K., Wong, C.H.: *Chem. Biol.* 8, 701-711 (2001) Hexosaminidase inhibitors as new drug candidates for the therapy of osteoarthritis

- 21) Winchester, B.G.: Subcell. Biochem. 27, 191-238 (1996) Lysosomal metabolism of glycoconjugates
- 22) Cabib, E.: Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 59, 59-101 (1987) The synthesis and degradation of chitin
- 23) Plíhal, O.: Investigation of fungal β -N-cetylhexosaminidase: Structural Properties Related of Function: Kandidátská disertační práce PřF UK Praha, katedra Biochemie, str. 11-12, (2005).
- 24) Votsch, W., Templin, M.F.: J. Biol. Chem. 275, 39032-39038 (2000) Characterization of a β -N-acetylglucosaminidase of Escherichia coli and elucidation of its role in muropeptide recycling and β -lactamase induction
- 25) Pócsi, I., Kiss, L., Zsoldos-Mady, V., Pinter, I.: Biochim. Biophys. Acta 1039, 119-122 (1990) Studies on the N-acetyl- β -D-hexosaminidase B from germinating *Lupinus luteus* L. seeds. II. Mechanism and inhibition with some 2-acetamido-2-deoxyaldono(1-4)lactones
- 26) Jagadeesh, B.H., Prabha, T.N.: Phytochemistry 61, 295-30 (2002) β -hexosaminidase, an enzyme from ripening bell capsicum (*Capsicum annum* var *variata*)
- 27) Sinnot, M.L.: Chem. Rev. 90, 1171-1202 (1990) Catalytic mechanism of enzymatic glycosyl transfer
- 28) Mark, B.L., Vocadlo, D.J., Knapp, S., Triggs-Raine, B.L., Withers, S. G., James, M.N.: J. Biol. Chem. 276, 10330-10337 (2001) Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial β -hexosaminidase
- 29) Plíhal, O.: Investigation of fungal β -N-cetylhexosaminidase: Structural Properties Related of Function: Kandidátská disertační práce PřF UK Praha, katedra Biochemie, str. 3-6, (2005).
- 30) Shental-Bechor, D., Levy, Y.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 8256-8261 (2008) Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization
- 31) Muntoni, F., Brockington, M., Torelli, S., Brown, S.C.: Curr. Opin. Neurol. 17, 205-209 (2004) Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies
- 32) Man, P., Bezouška, K.: Chem. Listy 100, 1084-1095 (2006). Současné trendy v analýze eukaryotických proteinů, glykolů a lipidomů

- 33) Plíhal, O.: Investigation of fungal β -*N*-cetylhexosaminidase: Structural Properties Related of Function: Kandidátská disertační práce PŘF UK Praha, katedra Biochemie, str. 18-24, (2005).
- 34) <http://www.qa-bio.com/docs/QA-Bio.E-EF01.specsheet.pdf> (25.7.2011)
- 35) Mennella, C., Visciano, M., Napolitano, A., Del Castillo, M.D., Fogliano, V.: J. Pept. Sci. 12, 291-296 (2006) Glycation of lysine-containing dipeptides
- 36) Macmillan, D., Bill, R. M., Sage, K.A., Fern, D., Flitsch, S.L.: Chem. Biol. 8 133-145 (2001) Selective in vitro glycosylation of recombinant proteins: semi-synthesis of novel homogeneous glycoforms of human erythropoietin
- 37) Vítovcová, M.: Produkce mutantních propeptidů plísňové hexosaminidasy vhodných pro studium vlivu glykosylace na rekonstituci enzymové aktivity: Bakalářská práce PŘF UK Praha, katedra Biochemie, (2008)
- 38) Vysoká, M.: Expres propeptidu hexosaminidasy a jeho použití pro enzymovou rekonstituci: Bakalářská práce PŘF UK Praha, katedra Biochemie, (2008)

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

Jméno a příjmení S adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------