

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Ingrida Šmeringaiová

**Enzymatické modifikace GlcNAc-thiazolinových inhibitorů
hexosaminidas**

**Enzymatic modifications of GlcNAc – thiazoline
inhibitors of hexosaminidases**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Ing. Lenka Weignerová, PhD.

Praha 2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením mé školitelky Ing. Lenky Weignerové, PhD. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne

.....

Ingrida Šmeringaiová

Poděkování

Děkuji vedoucí mé bakalářské práce Ing. Lence Weignerové, PhD., a zároveň RNDr. Evě Vavříkové, PhD., Ing. Janě Hofmeisterové, Ing. Bc. Petru Šimonovi a dalším z kolektivu Laboratoře biotransformací na MBÚ, AV ČR, za jejich ochotu, vstřícnost, profesionální vedení i přátelskou pomoc při řešení mé bakalářské práce. Současně děkuju za podporu své rodině a přátelům.

OBSAH

ABSTRAKT	6
Klíčová slova	6
ABSTRACT.....	7
Key words.....	7
SEZNAM ZKRATEK.....	8
1. ÚVOD.....	9
2. CÍL PRÁCE.....	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1. β -N-Acetylhexosaminidasy	10
3.1.1. Glykosidasy skupin GH 20 a GH 84	10
3.2. NGT	12
3.2.1. Struktura NGT.....	12
3.2.2. Význam NGT a jeho derivátů	13
3.2.3. Příprava NGT	15
3.3. LIPASY.....	16
3.3.1. Struktura lipas.....	16
3.3.2. Mechanismus účinku lipas	18
3.3.3. Kinetika lipolýzy	18
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
4.1. Seznam použitých látek, materiálů a přístrojů	21
4.1.1. Použité chemikálie.....	21
4.1.2. Použité lipasy	22
4.1.3. Glykosidasy	22
4.1.4. Materiál a přístroje.....	23
4.2. POSTUP PRÁCE	24

4.2.1.	Příprava NGT	24
4.2.2.	Enzymatická acetylace NGT pomocí enzymu Novozyme [®] 435	25
4.2.3.	Kinetický průběh acetylace NGT enzymem Novozyme [®] 435	25
4.2.4.	Porovnání reaktivity lipas při enzymatické modifikaci NGT využitím TLC	25
4.2.5.	Kinetický průběh modifikační reakce NGT lipasami využitím HPLC	26
4.2.6.	Porovnání reaktivity tří nejreaktivnějších lipas s NGT využitím HPLC	26
4.2.7.	Příprava LB media pro růst kompetentních buněk	26
4.2.8.	Transformace plasmidu do kompetentních buněk	26
4.2.9.	Pomnožení plasmidu a exprese β - <i>N</i> -acetylhexosaminidas	27
4.2.10.	Izolace enzymu z buněk a jeho purifikace	28
4.2.11.	Stanovení aktivity β - <i>N</i> -acetylhexosaminidas ve frakcích z kolony Ni-NTA Agarose	29
4.2.12.	SDS elektroforéza frakcí enzymu	29
4.2.13.	Testování inhibičního vlivu AcNGT na aktivitu připravených enzymů	30
4.3.	VÝSLEDKY	32
4.3.1.	Příprava NGT	32
4.3.2.	Enzymatická acetylace NGT s využitím enzymu Novozyme [®] 435	32
4.3.3.	Kinetický průběh acetylace NGT enzymem Novozyme [®] 435	33
4.3.4.	Porovnání reaktivity lipas při enzymatické modifikaci NGT využitím TLC	33
4.3.5.	Porovnání reaktivity tří nejreaktivnějších lipas s NGT využitím HPLC	34
4.3.6.	Expresa β - <i>N</i> -acetylhexosaminidas v <i>E. coli</i> buňkách	37
4.3.7.	Testování inhibičního vlivu AcNGT na aktivitu připravených enzymů	38
5.	DISKUSE	40
6.	ZÁVĚR	42
	REFERENCE	43

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá problematikou hledání účinných inhibitorů enzymů β -*N*-acetylhexosaminidas, které jsou odvozeny od 1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glukopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazolinu (NGT). Práce je orientována na produkci inhibitorů odvozených od struktury NGT, acetylací jeho molekuly pomocí volných a na nosičích imobilizovaných lipas. Potenciální inhibitory β -*N*-acetylhexosaminidas mohou být účinnými nástroji pro studium těchto enzymů v buněčných procesech a taktéž otevírají dveře k nalezení možných terapeutik pro léčbu některých neurodegenerativních chorob, jako např. Alzheimerova nemoc.

V práci je věnována pozornost stručné charakterizaci β -*N*-acetylhexosaminidas, a to hlavně glykosidas ze skupin označovaných GH 20 a GH 84. V experimentech byly konkrétně využity β -*N*-acetylhexosaminidas y člověka¹ a z mikroorganismů *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces plicatus*, *Talaromyces flavus*. Enzymy byly produkovány, izolované, purifikované a následně byla otestována jejich aktivita. 6-*O*-Acetyl-1,2-dideoxy-2'-methyl- β -D-glukopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazolin byl testován jako inhibitor zkoumaných enzymů. Výchozí látka NGT byl připraven modifikovaným postupem podle Knappa² z 2-acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosy reakcí s Lawessonovým činidlem.

Předmětem další části této práce bylo studium vlastností a chování vybraných lipas při modifikacích (acetylacích) substrátu NGT ve zvoleném prostředí. Některé lipasy (Lipase CV Amano, Lipase PL Amano, Novozyme[®] 435 Sigma-Aldrich), které vykazovaly vyšší účinnost při acetylaci substrátu byly zkoumány i z kinetického hlediska, využitím HPLC.

Klíčová slova

β -*N*-acetylhexosaminidasa, [protein]-3-*O*-(*N*-acetyl-D-glukosaminyl)-L-serin/threonin *N*-acetylglukosaminyl hydrolasa (*O*-GlcNAcase, OGA), 1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glukopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazolin (NGT), lipasa, enzymatická modifikace (acetylace), 6-*O*-acetyl-1,2-dideoxy-2'-methyl- β -D-glukopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazolin (AcNGT)

ABSTRACT

This work deals with the problem of searching for effective derivatives of 1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glucopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazoline (NGT), potential inhibitors of human β -N-acetylhexosaminidases. The work is targeted to production of inhibitors derived from NGT by the modification of its structure by free and immobilised lipases. Potential inhibitors of β -N-acetylhexosaminidases may be potent tools for studying of enzymes in cell processes and also open possibility to the discovery of new possible drugs for the treatment of some neurodegenerative diseases, such as Alzheimer disease.

The thesis is focused on brief characterization of β -N-acetylhexosaminidases, e.g., glycosidases from enzymatic groups GH 20 and GH 84. β -N-Acetylhexosaminidases from microorganisms *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces plicatus*, *Talaromyces flavus* and humans¹ were used in the experiments. The enzymes produced were purified and then tested for their activity.

We also tested inhibitory activity of potential inhibitor 6-O-acetyl-1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glucopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazoline. Starting compound, NGT, was synthesized by the modified process (originally created by prof. Knapp²) using 2-acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy- α -D-glucopyranose in the reaction with Lawesson's reagen.

In the second part of this work we explored some biochemical properties of lipases used and their action in NGT acetylation reactions in selected enviroment. Some lipases (Lipase CV Amano, Lipase PL Amano, Novozyme[®]435 Sigma Aldrich), which showed higher efficiency in NGT acetylation were investigated also from kinetic point of view.

Key words

β -N-acetylhexosaminidase, [protein]-3-O-(N-acetyl-D-glucosaminyl)-L-serine/threonine N-acetylglucosaminyl hydrolase (O-GlcNAcase, OGA), 1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glucopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazoline (NGT), lipase, enzymatic modification (acetylation), 6-O-acetyl-1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glucopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazoline (AcNGT)

SEZNAM ZKRATEK

AC = aktivní centrum/místo (enzymu)

AcNGT = 6-*O*-acetyl-1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glucopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazolin

AoHex = β -*N*-acetylhexosaminidasa z *Aspergillus oryzae*

BtOGA = β -*N*-acetylglukosaminidasa z *Bacteroides thetaiotaomicron*

LB(A) = Luria-Bertani (agar) médium

MT destička = mikrotitrační (92 – jamková) destička

MW = (angl. molecular weight) molekulová hmotnost

NGT = 1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glucopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazolin

OGA = [protein]-3-*O*-(*N*-acetyl-D-glukosaminy)-L-serin/threonin *N*-acetylglukosaminy
hydrolasa

PMSF = fenylmethansulfonylfluorid

p-NP- β -GlcNAc = *p*-nitrofenyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosid

SDS - PAGE = elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

SpHex = β -*N*-acetylhexosaminidasa z *Streptomyces plicatus*

TfHex = β -*N*-acetylhexosaminidasa z *Talaromyces flavus*

Tris = tris(hydroxymethyl)aminomethan

Triton X-100 = 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl-polyethylenglykol*

t- octylphenoxy-polyethoxyethanol

X-Gal = 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1. ÚVOD

Enzymy β -*N*-acetylhexosaminidasy (EC 3.2.1.52) v poslední době upoutávají stále větší pozornost, jakožto enzymy, které se podílí na důležitých enzymatických reakcích ve všech třídách organismů, včetně člověka, u kterého disfunkce těchto životně důležitých enzymů vede k závažným neurodegenerativním poruchám, jakými jsou například Tay-Sachsova, Sandhoffova či Alzheimerova nemoc. Právě z toho důvodu se věnuje nemalé úsilí hledání účinných a specifických inhibitorů těchto enzymů, které by mohli pomoci při designu účinných léčiv. Slibný v tomto ohledu se jeví 1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glukopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazolin (NGT), látka, jejichž selektivní a vysoce účinná inhibice byla prokázána na CAZy třídě glykosidas GH 20 a GH 84. Struktura tohoto inhibitoru se podobá struktuře intermediátu enzymové reakce β -*N*-acetylhexosaminidas, tzv. oxazolinu, a díky tomu se jeví jako vhodný nástroj pro přípravu dalších, strukturně odvozených inhibitorů, s vyšší selektivitou a inhibiční silou. V této práci byl připraven derivát NAG-thiazolinu, AcNGT, a jeho inhibiční vliv byl testován na pěti β -*N*-acetylhexosaminidasach.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce byla příprava nového derivátu NAG-thiazolinu (NGT) s využitím lipas, purifikace produktu a následné testování inhibičního vlivu na aktivitu β -*N*-acetylhexosaminidas.

Dalším cílem byla exprese příslušných enzymů v kompetentních buňkách *E. coli*, jejich izolace, purifikace a využití pro testování inhibitorů.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. β -*N*-Acetylhexosaminidasy

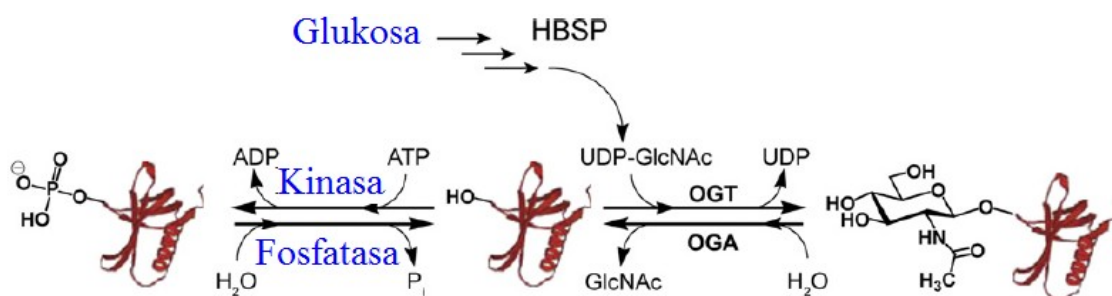
β -*N*-Acetylhexosaminidasy (systematický název: 2-acetamido-2-deoxy- β -D-hexopyranosid acetamidodeoxyhexohydrolasy, EC 3.2.1.52) jsou glykosidasy (EC 3.2.1), které jako exo-enzymy štěpí terminální 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosidové (β -GlcNAc) nebo 2-acetamido-2-deoxy- β -D-galaktopyranosidové zbytky (β -GalNAc) v glykokonjugátech. β -*N*-Acetylhexosaminidasy jsou rozšířené ve většině živých organismů, jak eukaryotických, tak prokaryotických, včetně *Archae*. Tyto enzymy mají širokou škálu funkcí, v závislosti na jejich původu a lokalizaci v tkáni či v samotných buňkách. β -*N*-Acetylhexosaminidasy tvoří jen malou část z celkem 113 skupin sekvenčně a strukturně podobných glykosidas kategorizovaných v CAZy systému pod zkratkou GH³. Jde hlavně o GH 20 a GH 84. Enzymy těchto skupin sice nevykazují žádnou sekvenční homologii, ale sdílejí některé základní strukturní črty a podobnost v katalytickém mechanismu (Asp/Glu v aktivním centru, substrátem-asistovaná katalýza)⁴.

3.1.1. Glykosidasy skupin GH 20 a GH 84

Lidé jsou nositelé několika genů kódujících β -*N*-acetylhexosaminidasy. Jedním z nich je gen pro nukleocytoplasmatické β -*N*-acetylglukosaminidasy, členy rodiny GH 84, další dva geny *HEXA* a *HEXB* kódují lysosomální β -*N*-acetylhexosaminidasy, z nichž jsou složeny dimerní izoformy HexA resp. HexB, členy rodiny GH 20. Guttering et. al. (2009) nedávno popsal další lysosomální β -*N*-acetylhexosaminidasy (HexD), které preferují β -*N*-acetylgalaktosaminidy⁵, a jejichž funkce není doposud známa.

Izoforma HexA je heterodimer složený z podjednotky α (kódované genem *HEXA*) a podjednotky β (kódované *HEXB*). Primární sekvence těchto podjednotek je shodná přibližně z 60%⁶. HexB je homodimer tvořený pouze podjednotkami β . HexA enzym je důležitý pro degradaci GalNAc- β -(1,4)-[α -Neu5Ac-(2 \rightarrow 3)]- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-Glc-ceramid gangliosidů (GM2 gangliosidů) na GM3 gangliosidy v lysosomech. Biologická důležitost HexA a HexB je zřejmá při geneticky podmíněných deficiencích tohoto enzymu, které ústí do vážných neurodegenerativních poruch (Tay-Sachsova nemoc, Sandhoffova nemoc)⁷.

Lidé jsou nositelé jenom jednoho enzymu patřícího do GH 84, aktivního v neutrálním pH. Enzym byl biochemicky charakterizován jako β -*N*-acetylglukosaminidasa (OGA nebo také *O*-GlcNAcasa)^{8,9}, jaderný a cytoplasmatický enzym se striktní specifitou k odštěpování *N*-acetylglukosaminových zbytků připojených na Ser/Thr residuích buněčných proteinů (Obr. 1), komplementární k fosforylaci proteinů. OGA má tedy opačnou funkci než lidská *N*-acetylglukosaminyltransferasa (OGT), která přenáší *N*-acetylglukosamin na protein. V katalytickém centru obsahují OGA dva Asp zbytky (v kontrastu s Asp a Glu v AC β -*N*-acetylhexosaminidas z GH 20) a Tyr zbytek, stabilizující přechodový stav substrátu¹⁰. Nedávné studie ukázaly, že patologická hyperfosforylace proteinu „tau“ (stabilizujícího mikrotubuly axonů v neuronech), je charakteristickou změnou při Alzheimerově nemoci. Využitím vhodných selektivních inhibitorů OGA, dochází ke snížení fosforylace proteinu „tau“, za zvýšení hladiny *N*-acetylglukosaminů v tkáni¹¹.



Obr. 1 *O*-GlcNAc modifikace proteinu. Glukosa vstupuje do biosyntetické dráhy hexosaminů (HBSP = hexosamine biosynthetic pathway) a pomocí β -*N*-acetylglukosaminyltransferasy (OGT) je jako aktivovaný substrát uridindifosfát *N*-acetylglukosamin (UDP-GlcNAc) připojena *O*-glykosidickou vazbou na protein. β -*N*-Acetylglukosaminidasa (OGA) naopak tuto vazbu umí hydrolyticky štěpit¹².

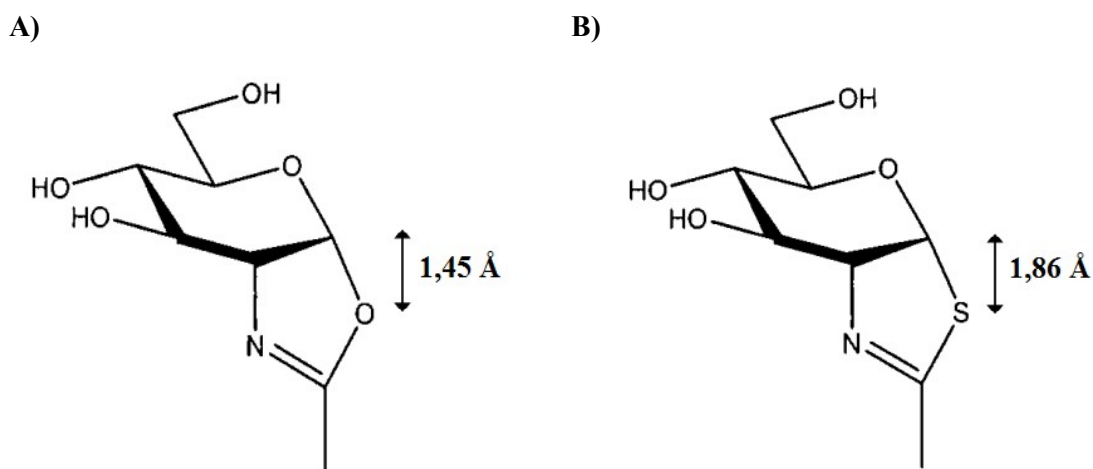
3.2. NGT

3.2.1. Struktura NGT

Přestože existuje mnoho známých inhibitorů β -*N*-acetylhexosaminidas (např. PUGNAc), pro další experimenty byl zvolen právě NGT, protože jeho syntéza je ekonomicky i časově poměrně výhodná¹³.

NGT byl poprvé syntetizován týmem prof. Knappa a jeho inhibiční aktivita byla prokázána u β -*N*-acetylhexosaminidas z tropické fazole *Canavalia ensiformis* (angl. “jack bean”) již v roce 1996¹.

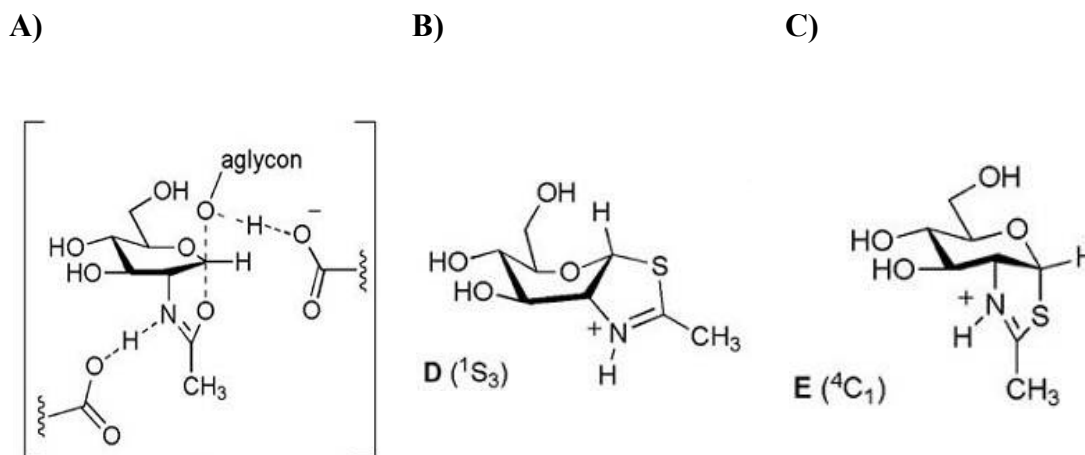
V NGT nalezneme kruh, který pravděpodobně dobře stabilizuje pozitivní náboj, který se tvoří při formaci oxazolinového intermediátu (Obr. 2). Protože slabé van der Waalsovy síly, pomocí nichž se substráty váží v AC, jsou značně citlivé na meziatomové vzdálenosti, i relativně malé rozdíly ve struktuře jednotlivých inhibitorů β -*N*-acetylhexosaminidas vedou ke značným rozdílům v jejich selektivitě vůči těmto enzymům¹⁴.



Obr. 2 Porovnání struktury oxazolinu (A) a NGT (B)¹⁵.

Z krystalografických studií vyplynulo, že samotná molekula NGT může volně zaujímat tři konformace o podobné energii (rozdíl cca 1-2 kcal/mol), a to: *pseudo*-židličkovou konformaci 4C_1 a dva *pseudo*-stočené lodičkové konformace 0S_2 a 1S_3 . Ukázalo se, že NGT se váže do aktivního centra β -*N*-acetylhexosaminidas jen v 4C_1 konformaci, tj. v té, která nejvíc připomíná oxazolinový intermediát (Obr. 3). Konformace 1S_3 připomíná základní stav substrátu. Detaily vztahu mezi konformacemi inhibitoru a aktivního místa enzymu

pomáhají lépe pochopit tuto interakci a eventuelně z toho odvodit struktury dalších inhibitorů¹⁶.



Obr. 3 Intermediát oxazolin (A) „vznikající“ při reakci β -*N*-acetylhexosaminidas se substrátem. Konformace protonovaného NGT: ¹S₃ (B) a ⁴C₁(C)¹⁶.

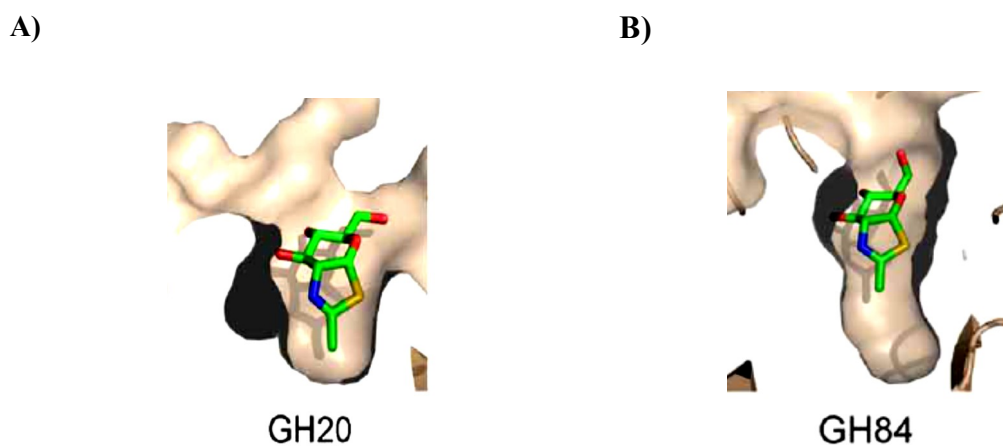
3.2.2. Význam NGT a jeho derivátů

V současnosti se deriváty NGT využívají hlavně jako nástroje pro studium enzymů v buněčných procesech, na základě strukturální podobnosti NGT s intermediátem enzymatické reakce – oxazolinem.

Potenciál inhibitorů jako NGT (1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glukopyranoso-[2,1-d]- Δ -2'-thiazolin, (3a*R*,5*R*,6*S*,7*R*,7a*R*)-5-(hydroxymethyl)-2-methyl-5,6,7,7a-tetrahydro-3a*H*-pyrano[3,2-d]thiazole-6,7-diol), resp. jeho GalNAc epimeru, v terapii některých nemocí tkví v jejich využití jako chemických chaperonů. Vzniklý komplex enzym (GH 84) – inhibitor (chaperon) může být bezproblémově transferován z endoplasmatického retikula do lysosomu, kde je vysoká koncentrace substrátu (gangliosid), jenž nahradí inhibitor v aktivním centru enzymu a tím umožní (částečnou) obnovu jeho enzymové aktivity^{17,15}.

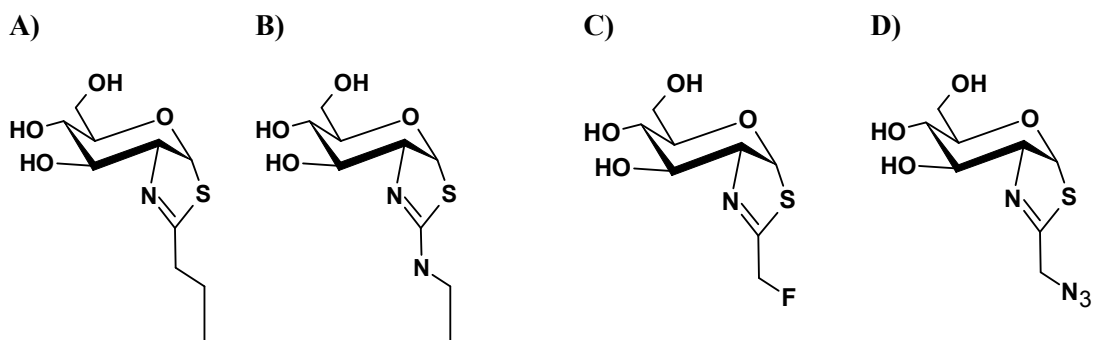
NGT získal značnou pozornost po tom, co se podařilo prokázat jeho vysokou inhibiční selektivitu nejen vůči β -*N*-acetylhexosaminidasám z GH 20, ale i β -*N*-acetylglukosaminidasám z GH 84. Nevýhodou bylo, že šlo o velmi podobnou inhibici obou skupin enzymů, již v nanomolárních koncentracích. Proto se hledali (a pořád hledají) jiné inhibitory, odvozené od struktury NGT. Při jejich syntéze se vycházelo z poznatku

o různé struktuře vazebného místa těchto dvou rodin enzymů. β -*N*-Acetylglukosaminidasy z GH 84 mohou vázat i více objemné *N*-acylové skupiny na molekule NGT, než hexosaminidasy z rodiny GH 20 (Obr. 4). Pokud se délka řetězce *N*-acylu zvětšuje, například připojením butylu k C7' NGT, inhibice GH 20 se sníží oproti GH 84 až 3100 násobně^{4,18}.



Obr. 4 Porovnání „hloubky“ aktivního místa hexosaminidas z GH 20 (A) a GH 84 (B), s vázanou molekulou neselektivního inhibitoru NGT¹⁸.

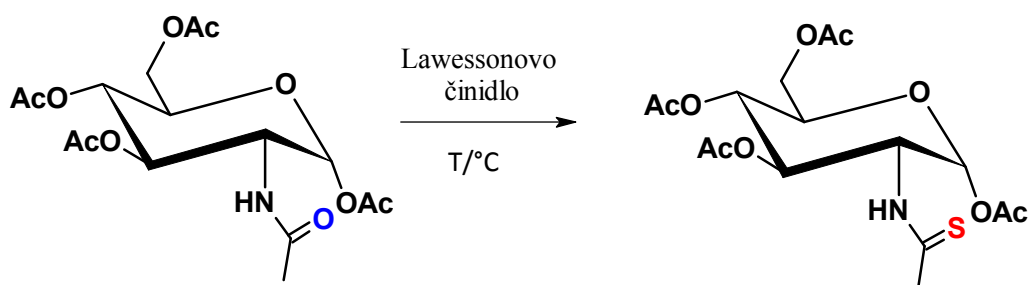
Byly připraveny i fluoridové a azidové deriváty NGT (Obr. 5, strana 15), které vykazovaly výbornou inhibiční aktivitu cytosolických β -*N*-acetylglukosaminidas, čehož by se mohlo použít při značení a zobrazování těchto enzymů v živých buňkách¹⁹. Zatím nejúčinnější inhibitor β -*N*-acetylglukosaminidas, Thiamet-G, vykazoval selektivitu 37 000 krát vyšší pro β -*N*-acetylglukosaminidasy z GH 84 než pro GH 20. *In vivo* testy prokázaly zvýšenou hladinu OGA v mozku obratlovců a sníženou fosforylaci proteinu „tau“, čeho by se v budoucnu mohlo využít pro léčbu Alzheimerovy nemoci, blokací patologické hyperfosforylace tau²⁰.



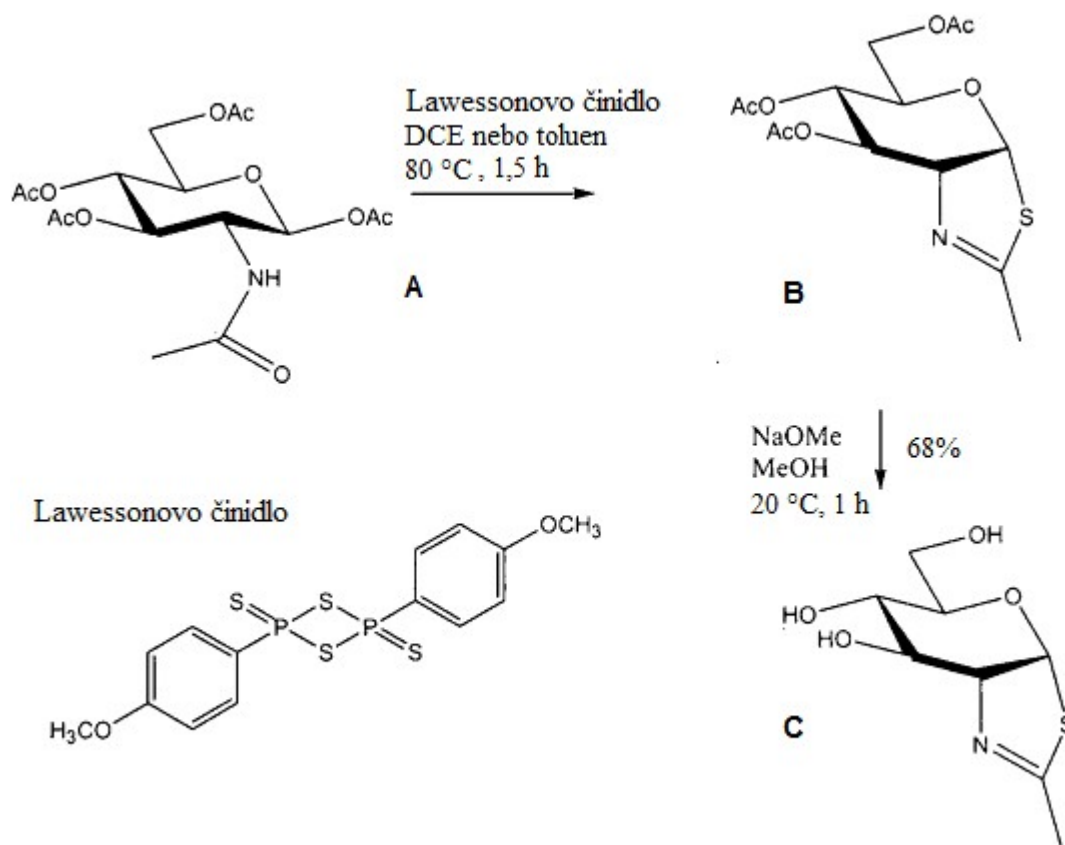
Obr. 5 Přehled některých dalších potenciálně účinných inhibitorů hexosaminidas: NbutGT (A), Thiamet- G (B), 2'- fluorothiazolinol triol (C), 2'- azidomethyl thiazolinu (D) [2] [3].

3.2.3. Příprava NGT

Při přípravě NGT podle Knappa¹ se vychází z 2-acetamido-1,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-2-deoxy- β -D-glukopyranosy (Obr. 7, A, strana 16), která reaguje s Lawessonovým činidlem (LR) v toluenu. Připraví se tak peracetylovaný meziprodukt (Obr. 7, B), který se deacetyluje na výsledný produkt, NGT, methanolátem sodným v methanolu (Obr. 7, C). Reakce s LR poskytuje thioacetamid, zahřívání reakční směsi podporuje cyklizaci přes S_N2 reakci, náhradou β -*O*-acetylu za thioacetamidovou skupinu. Alfa anomer 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranoso 1,3,4,6-tetraacetátu se pro přípravu NGT nevyužívá, protože z něho reakcí s LR vzniká thiamid (Obr. 6) místo požadovaného NGT.



Obr. 6 Alfa anomer 2-acetamido-2-deoxy-D-glukopyranoso 1,3,4,6 – tetraacetátu v reakci s LR necyklizuje, ale tvoří thiamid.



Obr. 7 Příprava NGT reakcí podle Knappa¹.

3.3. LIPASY

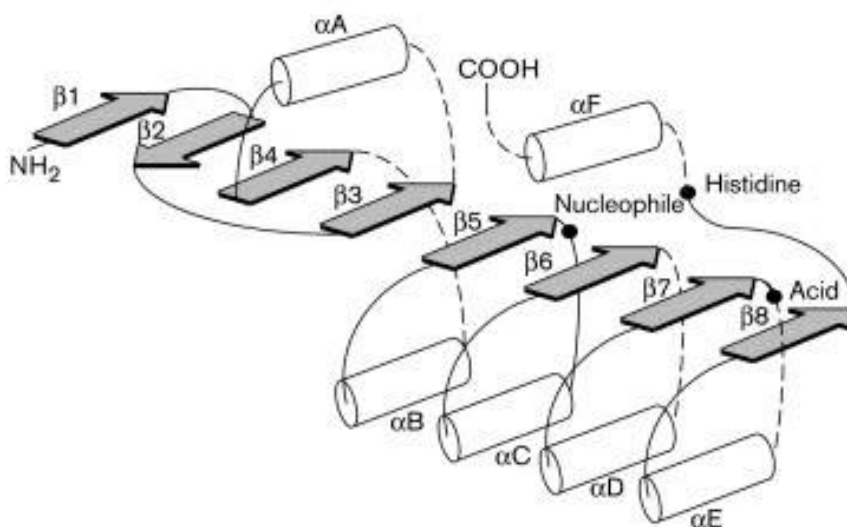
Lipasy (EC 3.1.1.X) jsou členy rodiny hydrolas - podílejí se na hydrolýze triglyceridů na diglyceridy, monoglyceridy, mastné kyseliny a glycerol. Lipasy jsou v živé tkáni téměř všudypřítomné. Kromě hydrolýzy mohou katalyzovat aminolýzu, acidolýzu, alkoholýzu, či interesterifikaci v bezvodých médiích.

Velké využití mají také díky své enantioselektivitě, regioselektivitě a široké substrátové specifitě (nespecifický rozklad triacylglycerolu na mastnou kyselinu a glycerol; preference mastní kyseliny jako substrátu před triacylglycerolem)²¹.

3.3.1. Struktura lipas

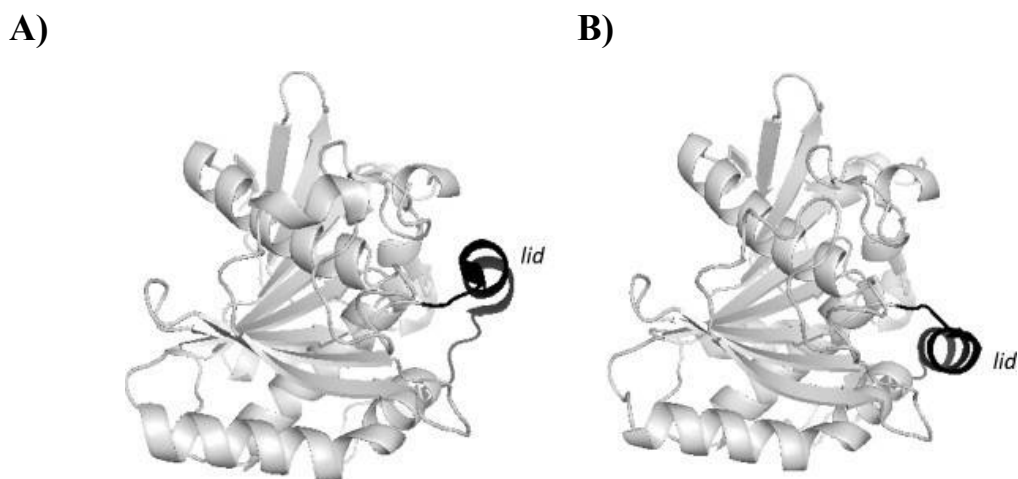
Lipasy jsou serinové hydrolasy a jsou strukturně variabilní. Jediný společný motiv, který sdílí, a který je identifikuje v rámci proteinů, je pentapeptid Gly – His – Ser – Glu/Asp – Gly (s možnou substitucí glycínu za jiná malá residua)²². Ve své struktuře obsahují dvě domény, N – koncovou doménu s kanonickou α/β hydrolasovou konformací (Obr. 8)²³

a C – koncovou doménu (angl. β -sandwich), na kterou se může vázat kolipasa (amfifilní proteinová kotva), jako je tomu například u lidské pankreatické lipasy²⁴.



Obr. 8 Diagram sekundární struktury kanonické α/β hydrolasové konformace přítomné v molekule všech lipas. Obsahuje osm β -listů (jeden z nich antiparalelní), kde $\beta 3$ až $\beta 8$ jsou spojeny sérií α -helixů (αA až αF). Topologická pozice katalytické triády je vyznačena černými tečkami^{25,26}.

Lipasy mohou existovat ve dvou odlišných konformacích (Obr. 9). V jedné z nich (uzavřená forma) je aktivní místo lipasy (katalytická triáda Ser-His-Asp(Glu))²⁷ izolováno helikálním oligopeptidem zvaným „lid“ (víčko) nebo „flap“ (klapka). Druhá forma (otevřená forma) má víčko díky konformační změně odsunutě, a tím pádem je aktivní místo přístupné okolnímu médiu – aktivní forma lipasy²⁸. V homogenním vodném médiu je rovnováha mezi těmito dvěma konformacemi posunuta k uzavřené formě. V přítomnosti hydrofobního prostředí (micely, nemísitelná organická rozpouštědla) se víčko lipasy otvírá a její katalytická aktivita se zvyšuje. Tato „aktivace na fázových rozhraních“ (angl. interfacial activation) je výhodná z hlediska možnosti purifikace či imobilizace lipas²⁹. Nespornou výhodou lipas je jejich nízká aktivační energie, což umožňuje mírnější reakční podmínky (teplota, pH) a tím se redukuje možnost degradace substrátu. Teplotní optimum lipas se pohybuje okolo 30 – 60 °C³⁰ (výjimky tvoří např. *Bacillus thermocatenuatus* s $T_{opt.} > 70$ °C)³¹.



Obr. 9 Komerčně dostupná lipasa z *Rhizomucor miehei* (říše Fungi) v otevřené (A) a uzavřené (B) konformaci. Helix víčka (angl. lid) jsou zvýrazněna tmavě šedě. 3D struktura získána z Protein Data Bank³⁶.

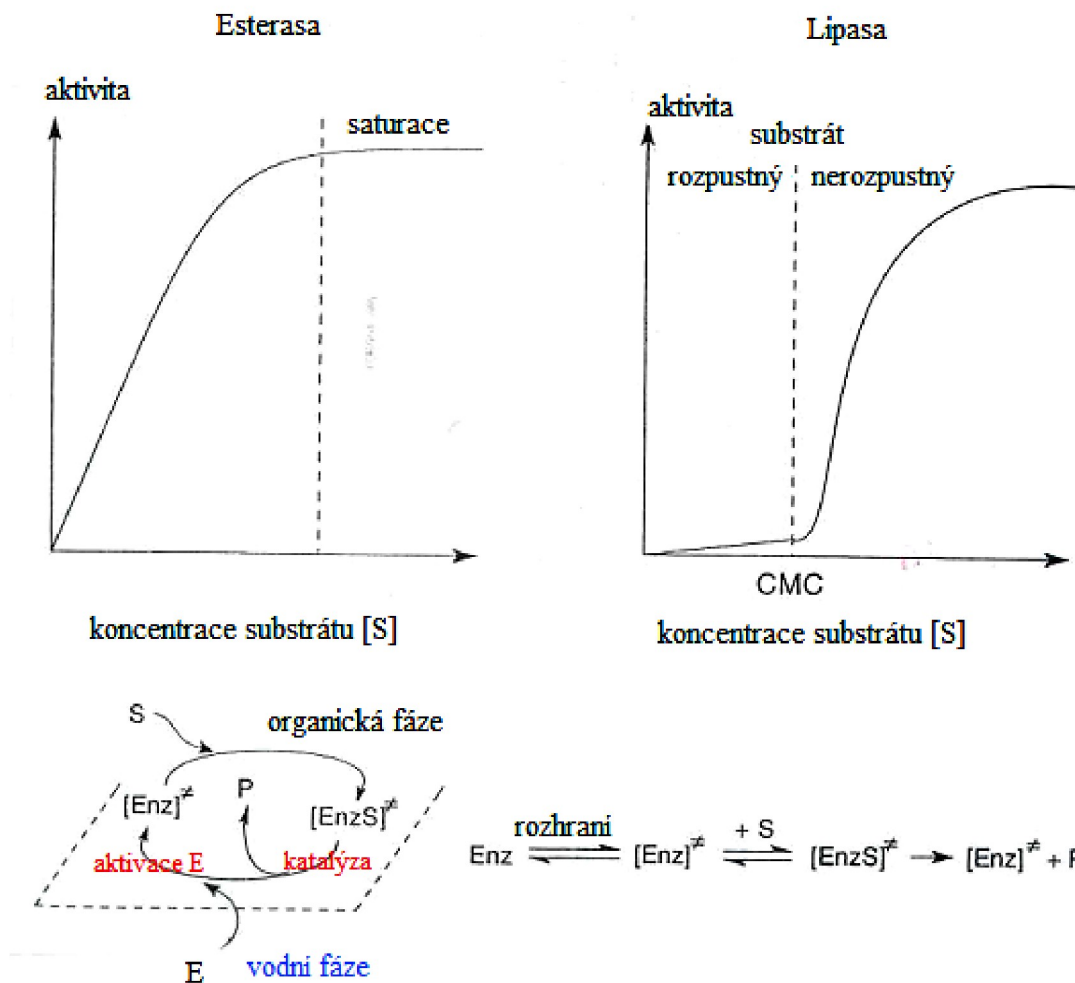
3.3.2. Mechanismus účinku lipas

Lipasy pracují mechanismem kovalentní katalysy. Na aktivovaný serin (nukleofil, lokalizovaný těsně za $\beta 5$ listem α/β hydrolasového motivu) se váže substrát za tvorby kovalentního tetraedrického intermediátu (umístěném mezi $\beta 8$ a αF). Záporný náboj ve vzniklém acylderivátu je stabilizován NH skupinami His a Asp (Glu). V dalším kroku dochází k uvolnění alkoholu (atakem molekuly vody) a tvorbě komplexu enzym – substrát. Hydroxidový anion (zbytek molekuly vody) atakuje karbonylový uhlík E - S komplexu za uvolnění acylu a regenerace enzymu³¹.

3.3.3. Kinetika lipolýzy

Přestože lipasy mohou hydrolyzovat a formovat esterové vazby stejně jako proteasy nebo esterasy, jejich molekulární mechanismus působení je odlišný a v některých ohledech unikátní. V kontrastu s většinou enzymů, lipasy nevykazují běžný kinetický model Michaelis – Mentenové, kdy je aktivita enzymu závislá pouze na koncentraci substrátu. Lipasy totiž nevykazují téměř žádnou aktivitu, pokud je substrát v médiu přítomen ještě v monomerní formě, pod tzv. „kritickou micelární koncentrací“ (angl. CMC = critical micellar concentration). Za tímto bodem se již začínají tvořit shluky substrátu (micely) a aktivita enzymu se díky tomu rapidně zvyšuje (Obr. 10, strana 19). Rychlost lipolýzy je ovlivněna koncentrací substrátu na rozhraní fází (vyjádřené v mol/m^2)²⁷. Fyzikální parametry ovlivňující transfer substrátu a produktu mezi vodní a organickou fází, jako

míchání nebo třepání, mají značný vliv na reakční rychlost lipasami katalyzovaných reakcí³².

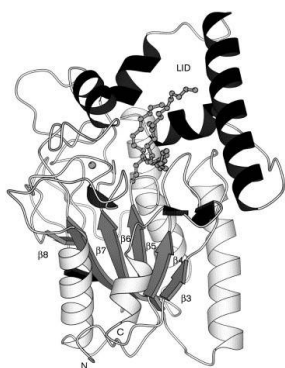


Obr. 10 Obecná enzymová kinetika esterasy a lipasy. U esterasy je maximální reakční rychlost dosažena ještě před bodem nasycení (model Michaelis – Mentenové). Reakční rychlost katalýzy u lipasy výrazně závisí na tvorbě emulze. E = inaktivní lipasa (konformace se zavřeným víčkem), $[\text{E}]^{\neq}$ = aktivní lipasa (otevřené víčko), S = substrát, P = produkt, CMC = kritická micelární koncentrace^{32,33}.

Reaktivita souvisí se zmíněnou strukturou lipas. Víčko neaktivní formy enzymu znemožňuje vazbu molekuly substrátu do aktivního centra. Kontaktem klapky (její hydrofobní částí) s rozhraním substrát/rozpouštědlo dochází ke konformační změně kolem aktivního centra a k jeho zpřístupnění^{27,34}. Kinetika lipolitické reakce předpokládá dvoukrokový model reakce. V prvním kroku dochází k reverzibilní adsorpci enzymu

($E \leftrightarrow E^*$) na hydrofobní povrch substrátu (S), a ve druhém kroku je tento enzym-substrátový komplex (E^*S) štěpen na produkt a volný enzym ($E^*S \leftrightarrow P + E$). Tento krok se dá popsat modelem Michaelise-Mentenové, pokud vyjádříme koncentraci substrátu v molech na jednotky mezifázového povrchu (mol/m^2) místo jeho koncentrace v celém objemu. Některé lipasy, např. u *Pseudomonas aeruginosa* či *Bacillus subtilis* (20kDa) nevykazují aktivaci v přítomnosti fázového rozhraní^{21,34}.

A)



B)



Obr. 11 Otevřená konformace lipasy z *Pseudomonas aeruginosa* (A)³⁰ a struktura „minimální“ α/β hydrolasové konformace lipasy z *Bacillus subtilis* (20 kDa) (B)³¹.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Seznam použitých látek, materiálů a přístrojů

4.1.1. Použité chemikálie

2-Acetamido-1,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-2-deoxy- α -D-glukopyranosa	TCI-EP, JP
Akrylamid (29% w/v akrylamid, 1% w/v N,N-methylenbis-akrylamid)	
Ampicilin	Duchefa, NL
Coomassie Brilliant Blue	Sigma, US
1,2-Dichlorethan	Sigma, US
EDTA	Sigma, US
HPLC acetonitril Ultra Gradient HPLC Grade	J. T. Baker, US
Chloramfenikol	Duchefa, NL
IPTG	Carbosynth, GB
Imidazol	Sigma, US
Kanamycin	Duchefa, NL
99% v/v Kyselina octová	Sigma, US
Lawessonovo činidlo	Sigma Aldrich, US
Lysozym (75 579 U/mg, slepičí vejce)	Fluka, US
Methanolát sodný (25 hm. % v methanolu)	Sigma Aldrich, US
NiSO ₄ ·7H ₂ O	-
Persíran amonný (10% w/v)	USB, US
Pancaldi reagens: 2,1 g (NH ₄) ₆ MoO ₄ , 0,1 g Ce(SO ₄) ₂ , 3 ml H ₂ SO ₄ , 47 ml H ₂ O	
PMSF	Sigma – Aldrich, US
<i>p</i> -NP- β -GlcNAc	Senn Chemicals, CH
Tris	Sigma, US
SDS (10 % w/v)	Sigma, US
TEMED	Sigma, US
Triton X-100	Sigma, US
Tryptone	Oxoid, GB
Vinylacetát (\geq 99%, 3-20 ppm hydrochinonu)	Sigma, US

X-Gal
Yeast Extract

Carbosynth, GB
Oxoid, GB

4.1.2. Použité lipasy

Tab. 1 Seznam použitých enzymů, včetně některých jejich charakteristik.

Č.	Název enzymu	Zdroj	Výrobce	Aktivita [U/g]	pH _{opt.}	T _{opt.} [°C]
1	Lipase A6	<i>A. niger</i>	Amano	≥ 6,000 - 7,500	6,5	45
2	Lipase AK	<i>P. fluorescens</i>	Amano	≥20,000	8,0	60
3	Lipase PS	<i>P. cepacia</i>	Amano	≥30000 U/g	7,0	50
4	Lipase CV	<i>C. viscosum</i>	Amano	*	*	*
5	Lipase G	<i>P. camemberti</i>	Amano	≥50,000	5,0	45
6	Lipase F-AP15	<i>R. oryzae</i>	Amano	≥150,000	7,0	40
7	Lipase CE	<i>H. lanuginosa</i>	Amano	≥10000	*	*
8	Lipase PL	<i>Alcaligenes sp.</i>	Meito Sangyo	≥100000	8 - 9,5	50
9	Novozyme® 435	<i>C. antarctica - B</i>	Sigma-Aldrich	≥10,000	*	40 - 60

* Blíže nespecifikováno.

4.1.3. Glykosidasy

- β – *N*-acetylhexosaminidasy z *Talaromyces flavus* (CCF 2686) a *Aspergillus oryzae* (CCF 1066), připraveny pracovníky Laboratoře biotransformací, MBÚ, AV ČR)³⁵
- Laboratorní transformací kompetentních buněk *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS připraveny enzymy:
 - β -*N*-Acetylhexosaminidasa ze *Streptomyces plicatus* – vektor pET15b (GeneArt®, Life Technologies, ČR)
 - β -*N*-Acetylhexosaminidasa z *Bacteroides thetaiotaomicron* a lidská β -*N*-acetylglukosaminidasa – oba pET28a vektor (poskytnuté prof. D. Vocadlem, Department of Chemistry, Simon Fraser University, British Columbia, Canada)

4.1.4. Materiál a přístroje

2D třepačka	Grant, GB
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units	Merck Millipore, DE
Analytické váhy	Precisa, CH
Automatické pipety 1 – 5000 µl	Eppendorf, DE
Centrifuga, J-6B, Beckman	Biotech, US
TLC Silicagel 60, F ₂₅₄	Merck, DE
HPLC přístroj - pumpa DeltaChrom™ SDS020&030	DeltaChrom, US
Chromolith® SpeedROD HPLC Column, monolithic silica, RP-18e, 50 - 4,6 mm	Merck, DE
NiNTA Agarose (50% suspension in 30% ethanol, precharged with Ni ²⁺ , BC: Up to 50 mg/ml)	Qiagen, CZ
Laminární box	Thermo Scientific, US
Mikrocentrifuga	Labnet International, US
pH metr	VELP Scientifica, IT
Počítačový program na zpracování dat HPLC „Clarity“	DataApex, CZ
Rotační vakuová odparka	Heidolph, DE
SDS-PAGE aparatura „Mini-Protean® 3“	Bio-Rad, US
Spektrofotometr UV Mini – 1240	Shimadzu, US
Sunrise Absorbance Reader	Tecan, CH
Termomixer	Eppendorf, DE
Termomixer	N-Biotek, KR
Vícekanálové pipety 3 – 300 µl	BrandTech, US
Vortex	IKA, DE
Zdroj napětí pro elektroforézu EPS 601	GE Healthcare, US

4.2. POSTUP PRÁCE

4.2.1. Příprava NGT

NGT byl syntetizován modifikovaným postupem dle Knappa¹. Do 250 ml kulaté baňky opatřené magnetickým míchadlem bylo naváženo 4,0 g NGT a 3,0 g Lawessonova činidla. Po přidavku 80 ml 1,2-dichlorethanu byla směs zahřívána na teplotu 80 až 85 °C pod zpětným chladičem po dobu dvou hodin. Reakce byla monitorována pomocí TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 15:1) a byla ukončena po zreagování veškeré výchozí látky. Takto byla získána surová reakční směs s tri-*O*-acetyl-1,2-dideoxy-2'-methyl- α -D-glukopyranoso-[2,1-d]- Δ 2'-thiazolinem (TLC chloroform/methanol 15:1, R_f 0,76). Po odpaření rozpouštědla na rotační vakuové odparce byl peracetylovaný NGT čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (mobilní fáze chloroform/methanol 15:1). Průběžně byly odebírány frakce po 25 ml a průběh chromatografie byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 15:1). Omytím TLC desky roztokem 5% kyseliny sírové v ethanolu a jejím následným ohřevem horkovzdušnou pistolí byly skvrny hledané látky zviditelněny v místě přítomnosti cukerného derivátu. Frakce obsahující žádanou látku pak byly sloučeny a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce.

V dalším kroku byl peracetylovaný NGT deacetylován v methanolu za katalýzy methanolátem sodným. Reakční směs byla míchána v kulaté baňce při laboratorní teplotě. Reakce byla monitorována pomocí TLC (ethylacetát/methanol 9:1). Během dvou hodin došlo k ochránění všech tří hydroxylových skupin a vzniku produktu NGT (R_f 0,5). Po reakci byl methanol odstraněn na rotační vakuové odparce a produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (ethylacetát/methanol 9:1). Byly odebírány frakce 25 ml a průběh chromatografie byl sledován pomocí TLC (acetonitril/voda 4:1). Frakce s přítomným produktem byly spojeny a rozpouštědla byla odpařena na rotační vakuové odparce. Celkový výtěžek reakce činil 70 %.

Pozn.: Alternativně bylo použito čištění na koloně Sephadex LH-20 stacionární fáze s mobilní fází methanolem. Toto zařízení bylo napojeno na peristaltickou pumpu a automatický sběrač frakcí. Frakce byly opět analyzovány pomocí TLC, frakce s produktem byly spojeny a odpařeny na rotační vakuové odparce. Výtěžek činil 60%.

4.2.2. Enzymatická acetylace NGT pomocí enzymu Novozyme[®] 435

Do 15 ml PE zkumavky s uzávěrem byl navážen NGT (50 mg, 0,22 mmol), enzym Novozyme[®] 435 (50 mg) a uhličitan sodný (50 mg, 0,48 mmol). Poté byl přidán aceton (5 ml, 68,1 mmol) a vinylacetát (1 ml, 10,8 mmol). Takto připravená reakční směs byla třepána na termomixeru při 45 °C a 700 rpm. Pomocí TLC (acetonitril/voda 4:1) byl monitorován průběh konverze výchozí látky (R_f 0,44) na acetylovaný produkt (R_f 0,67) pravidelným odebíráním vzorků reakční směsi v intervalu 30 min

4.2.3. Kinetický průběh acetylace NGT enzymem Novozyme[®] 435

Do PE zkumavky byl navážen NGT (20 mg, 0,09 mmol), Na₂CO₃ (20 mg, 0,19 mmol), enzym Novozyme[®] 435 (5 mg) a dále byl přidán aceton (5 ml, 68,1 mmol) a vinylacetát (1 ml, 10,8 mmol). Reakční směs byla míchána v termomixeru při teplotě 45 °C a 700 rpm a byl sledován průběh reakce, jak prostřednictvím TLC, tak i pomocí HPLC. Vzorky reakční směsi byly odebírány po 30 minutách automatickou pipetou do připravených uzavíratelných mikrozkušavek („vialky“, 1,5 ml), a to v množství 20 µl. Vzorek byl ihned vysušen fénem, aby se odpařila kapalná činidla, následně přidáno po 1 ml 10% acetonitrilu.

Odebraný materiál byl analyzován metodou HPLC, při které byla použita kolona Chromolith[®]-RP Column (izokratická metoda, mobilní fáze 10 % HPLC acetonitril, průtoková rychlost 0,90 ml/min, doba měření 5 minut). Tato metoda byla využita také ve veškerých dalších měřeních. Výsledky analýz byly vyhodnoceny programem MS Excel, jako součet poměrů plochy elučních vrcholů k celkové ploše (součtu) obou elučních vrcholů.

Reakční směs po enzymatické acetylaci NGT pomocí enzymu Novozyme[®] 435 byla filtrována přes skládaný filtr, odpařena na vakuové odparce a nanesena na kolonu pro sloupcovou chromatografii (naplněna silikagelem; mobilní fáze ethylacetát/methanol 8:2). Průběžně byly sbírány frakce o objemu 25 - 50 ml. Frakce obsahující produkt (dle TLC; ethylacetát/methanol 9:1, AcNGT R_f 0,43) byly slity a odpařeny. AcNGT byl charakterizován na ¹H NMR (pozn. spektrum není součástí této práce).

4.2.4. Porovnání reaktivity lipas při enzymatické modifikaci NGT využitím TLC

Do sedmi PE zkumavek byly naváženy NGT (20 mg, 0,09 mmol), Na₂CO₃ (20 mg, 0,19 mmol) a po 5 mg lipasy 1 až 7 (Tab. 1, kapitola 4.1.2). Do osmé zkumavky byly naváženy

NGT (20 mg, 0,09 mmol), Na₂CO₃ (20 mg, 0,19 mmol) a 5 mg enzymu Novozyme[®]435. Do všech zkumavek bylo přidáno 5 ml acetonu a 1 ml vinylacetátu (1 ml, 10,8 mmol). Reakce probíhaly 5 dnů, při teplotě 45 °C a 700 rpm. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (acetonitril/voda 4:1).

4.2.5. Kinetický průběh modifikační reakce NGT lipasami využitím HPLC

Do osmi PE zkumavek byly naváženy NGT (20 mg, 0,09 mmol), Na₂CO₃ (20 mg, 0,19 mmol), do každé zkumavky bylo přidáno 5 mg lipasy 1 až 8 (Tab. 1, kapitola 4.1.2). Do všech zkumavek bylo přidáno 5 ml acetonu a vinylacetátu (1 ml, 10,8 mmol). Reakce probíhaly při 45 °C a 700 rpm v termomixeru, po dobu cca 5 hodin. Průběh reakcí byl sledován jednak pomocí TLC (acetonitril/voda 4:1) a jednak pomocí HPLC (kapitola 4.2.3). Vzorky reakčních směsí v objemu 20 µl byly odebírány do mikrozkušavek (1,5 ml) vždy po 15 minutách. Rozpouštědla byla ihned odpařena. Pro analýzu HPLC byly tyto vzorky rozpuštěny v 1 ml mobilní fáze (10 % acetonitril).

4.2.6. Porovnání reaktivity tří nejreaktivnějších lipas s NGT využitím HPLC

Do tří PE zkumavek bylo naváženo NGT (40 mg, 0,18 mmol), Na₂CO₃ (40 mg, 0,38 mmol) a do každé vždy po 10 mg jednoho enzymu (Lipase CV, Lipase PL resp. Novozyme[®]435). Do všech zkumavek bylo přidáno 5 ml acetonu a vinylacetátu (1 ml, 10,8 mmol). Reakce probíhala v termomixeru při 45 °C, 700 rpm po dobu 4 hodin. Během ní byly průběžně odebírány vzorky (20 µL) a analyzovány metodou TLC a HPLC (viz výše).

4.2.7. Příprava LB media pro růst kompetentních buněk

Do Erlenmeyerovy baňky bylo naváženo Tryptone (10 g/litr), Yeast Extract (5g/litr) a NaCl (5g/litr) a vše bylo rozpuštěno v destilované vodě. Následně byl obsah uzavřené baňky sterilizován v autoklávu.

4.2.8. Transformace plasmidu do kompetentních buněk

β-N-Acetylhexosaminidasy z *T. flavus* a *A. oryzae* byly připraveny postupem podle Slámová et al³⁵ Ostatní enzymy (β-N-acetylhexosaminidasy ze *Streptomyces plicatus*, *Bacillus thtaiotaomicron* a lidská OGA) byly připraveny dále popsáním postupem, který byl stejný pro přípravu všech tří enzymů, s výjimkou *S. plicatus*, kde se enzym exprimoval

při vyšší teplotě (25 °C) a delší dobu (kolem 20 hodin), než u zbylých dvou enzymů (4 hod).

Hluboce zmražené (-80 °C) kompetentní buňky *E. coli* BL21(DE3)pLysS byly rozmrazeny na ledu. Roztok (0,625 µg/ml) s vektorem pET15b (GH 20) nebo pET28a (GH 84) v destilované vodě, byl rozmražen při laboratorní teplotě. Ve sterilním prostředí (plynový kahan) bylo pipetováno 1,0 µl plasmidu do cca 100 µl kompetentních buněk BL21(D3)pLysS, které byly následně inkubovány 20 minut na ledu a následně byly buňky vystaveny teplotnímu šoku (42 °C) po dobu 90 sekund a ty pak byly přeneseny na 20 min na led. Poté byly buňky regenerovány přidáním 1 ml sterilního LB média (předem vytemperovaného na laboratorní teplotu) a inkubovány 1 hodinu při 37 °C, 350 rpm. Buňky byly zakoncentrovány centrifugací (13 500 g, 10 min) v mikrocentrifuze. Ze supernatantu bylo odebráno cca 800 µl objemu (odpad) a buněčný pelet byl opatrně resuspendován pipetou v mikrozkušavce.

Mezitím byly připraveny Petriho misky s agarem pro růst buněčných kolonií. Živná půda byla připravena rozpuštěním LBA agaru (Trypton 10 g/l, Yeast Extract 5g/l, NaCl 5g/l, mykologický agar 15 g/l) na plotně, ochlazením na laboratorní teplotu, přidávkem (sterilně) požadovaného antibiotika (100 µl/100 ml agaru), vůči němuž byly dané kompetentní buňky resistantní - v našem případě: kanamycin v destil. H₂O (50 mg/ml), ampicilin v destil. H₂O (150 mg/ml), chloramfenikol (34 mg/ml); pak bylo přidáno IPTG (0,5 M) (100 µl/100 ml agaru), X-Gal (40 mg/ml) (250 µl/100 ml agaru) a následným zatuhnutím ve flow-boxu. Na takto připravené živné médium bylo naočkováno rozetřením cca 50 až 100 µl vzorku (hokejkou, ve flow-boxu) a buňky byly ponechány růstu při 37 °C, 24 hod.

4.2.9. Pomnožení plasmidu a exprese β-N-acetylhexosaminidas

Pro růst a množení transformovaných buněk bylo nejdříve ve flow-boxu připraveno inokulum (10 ml). Do 4 plastových zkumavek bylo nalito 10 ml LB media a do každé bylo přidáno 10 µl vhodného antibiotika (kanamycin 50 mg/ml, ampicilin 150 mg/ml, chloramfenikol 34 mg/ml). Pomocí sterilního páratka byla setřena jedna kolonie na LB agaru vyrostlých buněk (viz výše) a párátko bylo vloženo do zkumavky s LB médiem (10 ml). Poté byly buňky inkubovány při 37 °C a 220 rpm do druhého dne.

Z inokula narostlých buněk bylo ve flow-boxu zaočkováno předpřipravené sterilní LB medium (4 litrové baňky po 0,5 litru LB), a to pipetováním vhodného antibiotika (500 μ l na 500 ml LB) a 3 ml buněk. Tyto baňky byly uzavřeny a buňky rostly při 37 °C a 220 rpm v termomixeru po dobu 3,5 až 4 hodin. Průběžně byla měřena optická densita buněk. Po dosažení hodnoty cca 0,6 - 0,7 (600 nm) bylo do baněk přidáno po 1 ml IPTG (0,5 M) pro indukci exprese enzymu. Teplota byla snížena na 22 °C při expresi BtOGA a lidské OGA (resp. 25 °C v případě exprese *S. plicatus*) a buňky byly inkubovány další 4 hodiny v termomixeru (resp. do dalšího dne v případě *S. plicatus*) a při 220 rpm. Buňky byly izolovány centrifugací (3400 g x 20 min) v jednolitrových plastových kyvetách, supernatant byl vylit a pelety byly zmrazeny do dalšího dne (viz dále).

4.2.10. Izolace enzymu z buněk a jeho purifikace

Bylo připraveno 25 ml pufru Tris (20mM), ke kterému bylo přidáno 100 μ l $MgCl_2$ (1M), 1,3 ml NaCl (1M) a 50 μ l PMSF. Peleta z 0,5 l narostlých buněk byla resuspendována v 5 ml připraveného pufru. Následně bylo vše pipetováno do PE falkony (2 x 5 ml/1 zkumavka) a do každé bylo přidáno po cca 800 μ l detergentu (triton X-100) a lysozymu (na špičku nože). Zkumavky byly uzavřeny a obsah řádně rozmíchán na vortexu a následně inkubován 30 min při 37 °C a při 220 rpm. Po inkubaci byly buňky rozrušeny sonikací (4 krát po 2 min každá zkumavka) a pak byly pipetovány do 1,5 ml mikrozkuvek, které byly vloženy do mikrocentrifugy na 10 min a 13 500 g.

Purifikace enzymu proběhla v cyklu na agarosové koloně s navázanými ionty nikelnatými (Ni-NTA Agarose). Ta byla nejdříve předmyta 20% (v/v) ethanolem, 2 ml destilované vody a 10 ml pufru (150mM KCl + 10mM imidazol, pH 7 – 7,8), po kterém byla kolona z jedné strany uzavřena a na agarosu vsádkově aplikován supernatant jednotlivých vzorků. Kolona byla řádně uzavřena, důsledně promíchán její obsah, který byl míchán 30 minut při laboratorní teplotě na 2D trepačce. Poté byl obsah kolony vypuštěn (odpad) a po usazení pevné části byla kolona promývána připravenými pufrů: 3 x 3 ml pufru 150 mM KCl + 10mM imidazol; 4 x 2 ml pufru 150 mM KCl + 40 mM imidazol; 5 x 1 ml 150 mM KCl + 250 mM imidazol. V posledním případě byly při promývání kolony jímány frakce (1 ml), jejichž obsah byl testován na přítomnost (aktivitu) β -N-acetylhexosaminidasy (viz dále). Frakce byly odebírány do té doby, dokud byla aktivita enzymu vysoká. Po odebrání aktivních frakcí byla kolona regenerována postupným promytím: 4 x 3 ml EDTA

(50 mM); 4 × 3 ml NaOH (0,5 M); 4 x 3 ml destilovanou vodou; 4 × 3 ml NiSO₄ (100 mM); 4 × 3 ml destilovanou vodou a nakonec 2 × 3 ml 20% (v/v) ethanolem.

4.2.11. Stanovení aktivity β -N-acetylhexosaminidas ve frakcích z kolony Ni-NTA

Agarose

Do mikrozkušavek (počet podle počtu frakcí) bylo pipetováno po 10 μ l *p*NP- β -GlcNAc (10 mM), 10 μ l citrát-fosfátového pufru (pH 6) a následně 30 μ l vzorku. Obsah mikrozkušavky byl krátce promíchán na vortexu a vložen na 10 min do termomixeru při 37 °C, 900 rpm. Po 10 minutách byla reakce v každé mikrozkušavce zastavena přidáním 1 ml Na₂CO₃ (0,1M) a ve zkušavce bylo sledováno žluté zbarvení (*p*-nitrofenol).

Jednotka U odpovídá množství enzymu, které přemění 1 μ mol substrátu na produkt, za minutu a za standardních podmínek (tj. nasycení enzymu substrátem, 37 °C a pH 7)

4.2.12. SDS elektroforéza frakcí enzymu

Pro prozkoumání čistoty frakcí z afinitní chromatografie byla použita SDS-PAGE. Standardním postupem byl připraven gelový sendvič, mezi skla byl nalit 10% separační gel (4 ml dH₂O; 3,3 ml 30% w/v roztok akrylamidu; 2,5 ml 1,5M Tris pH 8.8; 0,1 ml 10% SDS; 0,1 ml 10% amonium persulfát; 0,004 ml TEMED) a přelit n-butanolem. Po ztuhnutí gelu byl nalit zaostřovací gel (2,7 ml dH₂O; 0,67 ml 30% roztok akrylamidu; 0,5 ml 1,5M Tris pH 6.8; 0,04 ml 10% w/v SDS; 0,04 ml amonium persulfát; 4 μ l TEMED), do něhož byl vsunut hřebínek. Mezitím byly připraveny vzorky enzymu. Z každé frakce bylo do mikrozkušavky pipetováno 15 μ l vzorku, pak byly přidány 4 μ l barviva (0,25 g Coomassie Blue Brilliant, 90 ml vody:methanolu (1:1), 10 ml 99% kyseliny octové). Obsah byl homogenizován. Následně byly vzorky inkubovány 5 min při 99 °C v termomixeru, bez míchání, a pak byly centrifugovány (13 500 g × 2 min). Takto připravené vzorky byly automatickou pipetou naneseny do jamek SDS gelu v množství 5 μ l v nanášecím pufru (glycerol, bromfenolová modř), společně s komerčním proteinovým „MW markerem“ (97, 66, 45, 30, 14, 4 kDa) - vždy do 1. jamky gelu). Elektroforéza probíhala cca 1 hodinu při 130 V, 75 A, 15 W, v 1 × koncentrovaném elektrodovém pufru, který vznikl naředěním 5 × koncentrovaného zásobního pufru o složení: Tris (15,1 g, 0,125 mol), Glycin (94,0 g, 1,252 mol), SDS (10% w/v) (50 ml), 900 ml dH₂O. Po ukončení elektroforézy byly

výsledné gely vloženy na 30 minut do barvicí směsi o složení: Coomassie Brilliant Blue (0,25 g, 0,30 mmol), směs methanol/voda 1:1 (90ml), 99% (v/v) kyselina octová (10 ml) a nakonec odbarveny (směs ethanol/voda/kyselina octová 350:550:100). Gely byly uchovávány v 1% (v/v) kyselině octové.

4.2.13. Testování inhibičního vlivu AcNGT na aktivitu připravených enzymů

Frakce s β -*N*-acetylhexosaminidasami z *Talaromyces flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Streptomyces plicatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron* a lidské OGA byly po purifikaci na Ni-NTA agarose (popsáno výše) zakonzentrovány pomocí Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units a následnou centrifugací (4000 g x 20 min).

U koncentrovaných roztoků enzymů byla spektroskopicky testována jejich aktivita. Do mikrozkušavky bylo pipetováno 10 μ l substrátu *p*-nitrofenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glukopyranosidu (*p*NP- β -GlcNAc; 10 mM), 10 μ l citrát-fosfátového pufru (50 mM, pH 6), 30 μ l vzorku enzymu. Reakční směs byla ponechána 10 minut míchat v termomixeru při 37 °C, 220 rpm. Po uplynutí této doby byla reakce zastavena přidáním 1 ml Na₂CO₃ (0,1 M). Na spektrofotometru (Shimadzu, USA) byly při 420 nm měřeny absorbance takto připravených vzorků a podle získaného výsledku byly zásobní roztoky enzymů vhodně naředěny až na výslednou absorbanci < 0,4 (420 nm), o aktivitě 2 mU.

V dalším kroku byl testován inhibiční vliv připraveného potenciálního inhibitoru AcNGT na připravené β -*N*-acetylhexosaminidasu (enzymy E1 až E5, TfHex, AoHex, SpHex, BtOGA a lidská OGA). Do osmi PE mikrozkušavek byla připravena ředící řada roztoků (pufrů) o koncentraci inhibitoru AcNGT 0 – 0,01 mM (Tab. 2). Výsledné roztoky obsahovaly citrát-fosfátový pufr (pH 7, 50 mM), substrát (*p*NP- β -GlcNAc), pipetováním roztoku o koncentraci 5,5 mM a inhibitor AcNGT o koncentraci výchozího roztoku 1 mM, který byl pipetován v různém množství a tím naředěn až na koncentraci 0,01 mM (Tab. 2).

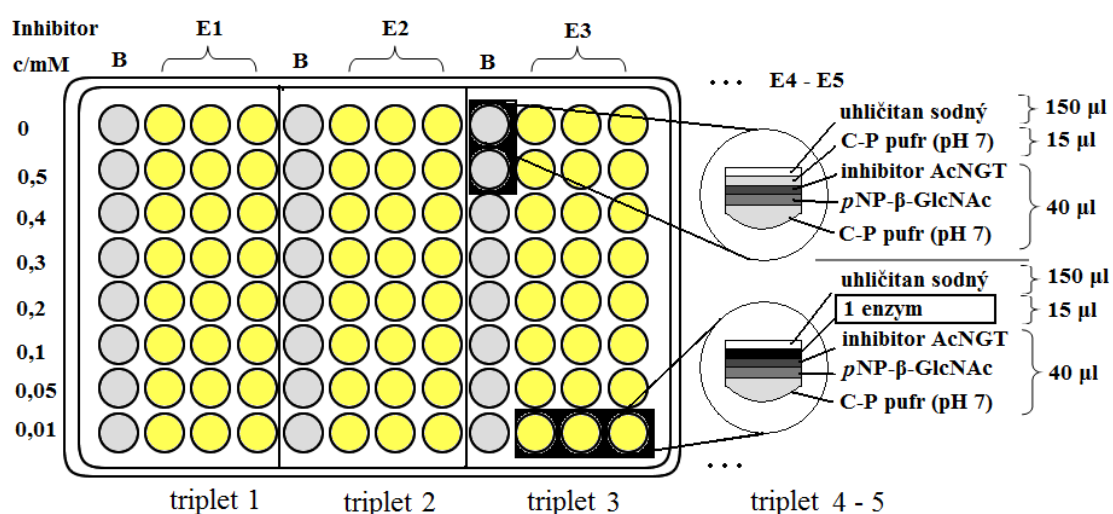
Do všech jamek MT destičky bylo pipetováno po 40 μ l připraveného pufru (z ředící řady obsahující 0 mM až 0,01 mM inhibitoru) (Obr. 12). Do prvního řádku MT destičky bylo pipetováno po 40 μ l roztoku pufru s koncentrací 0 mM inhibitoru. Do druhého řádku bylo do všech jamek pipetováno po 40 μ l roztoku obsahující 0,5 mM inhibitoru. Do třetího řádku bylo pipetováno po 40 μ l pufru obsahujícího 0,4 mM inhibitoru, a tak dále až do posledního osmého řádku MT destičky, kde bylo pipetováno vždy 40 μ l roztoku

o koncentraci inhibitoru 0,01 mM do každé jamky. Následně byla destička rozdělena na třetiny (32 jamek), obsahující 4 sloupce jamek. Do prvního sloupce každé třetiny bylo pipetováno 15 μl citrát-fosfátového pufru (pH7, 50 mM), který sloužil jako blank při následném spektrofotometrickém měření. Do zbylého tripletu sloupců bylo pipetováno 15 μl vhodně naředěného (absorbance < 0,4, aktivita 2 mU, koncentrace *p*NPGlcNAc 0,34 mM) roztoku dané β -*N*-acetylhexosaminidasy.

Takto připravená MT destička byla vložena do spektrofotometru, s funkcí míchání, a ponechána třepání po dobu 10 min, 220 rpm. Reakce byly zastaveny přidávkem 150 μl 1M Na_2CO_3 . Uvolněný *p*-nitrofenol byl detekován spektrofotometricky při 420 nm. Výsledné hodnoty absorbance byly graficky vyhodnoceny v programu MS Excel (viz výsledky).

Tab. 2 Ředící řada pro testování inhibiční aktivity AcNGT.

c (AcNGT)/mM	V (AcNGT) / μl	V (<i>p</i> NP- β -GlcNAc) / μl	V (C-P pufr, pH 7) / μl
0	0	62,5	937,5
0,5	500	62,5	437,5
0,4	400	62,5	537,5
0,3	300	62,5	637,5
0,2	200	62,5	737,5
0,1	100	62,5	837,5
0,05	50	62,5	887,5
0,01	10	62,5	927,5



Obr. 12 Vyznačený postup pipetování vzorků na MT. B = blank, E1-5 = enzymy 1-5.

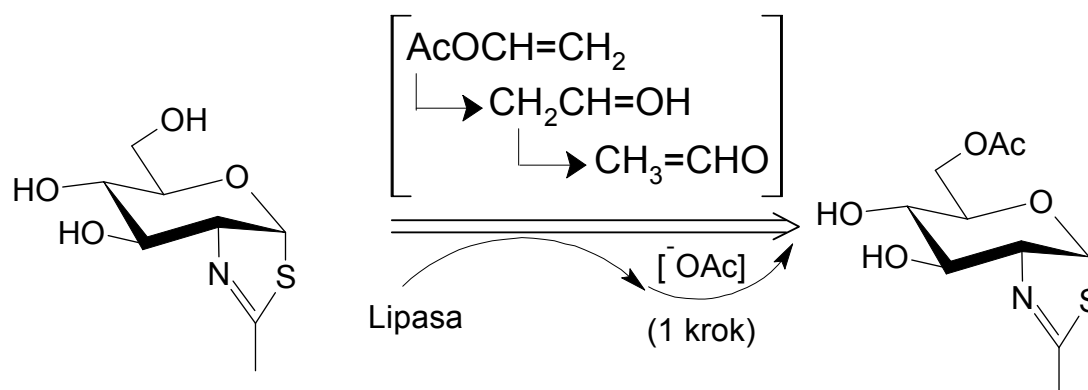
4.3. VÝSLEDKY

4.3.1. Příprava NGT

Při přípravě NGT se podařilo potvrdit již dříve publikovaný postup dle Knappa¹ a výtěžek, který činil 70% po dvou krocích reakce. Celkový výtěžek reakce závisel na úspěšnosti chromatografického dělení při čistících procedurách meziprojektu a výsledného produktu. Pokud se při chromatografii na koloně pečlivě sledují odebírané frakce (nejlépe o velikosti max. 50 ml, v kritických elučních časech max. 25 ml), tak lze získat velmi čistý produkt s vysokým výtěžkem. Výsledná látka po chromatografickém čištění a odpaření mobilní fáze či případně následné lyofilizaci je bílý (až lehce nažloutlý) hydroskopický, UV aktivní prášek. Na vzduchu dochází k přijímání vlhkosti a tím změně konzistence ze sypkého prášku na medovitou konzistenci, proto je vhodné udržovat nádobu s NGT dobře neprodyšně uzavřenou a v lednici.

4.3.2. Enzymatická acetylace NGT s využitím enzymu Novozyme[®] 435

Novozyme[®] 435 (*Candida antarctica* lipase B, CALB) je lipasa imobilizována na mikropórovém akrylovém polymeru. Její účinnost při acylaci NGT byla dále testována. Konverze substrátu na acetylovaný produkt (Obr. 13) proběhla již v průběhu jedné hodiny (použijeme-li 1 mg enzymu/1 mg NGT). NGT vykazuje určitou nestabilitu v kyselějším prostředí (pH < 6), ve kterém dochází pravděpodobně k otevírání thiazolinového kruhu.



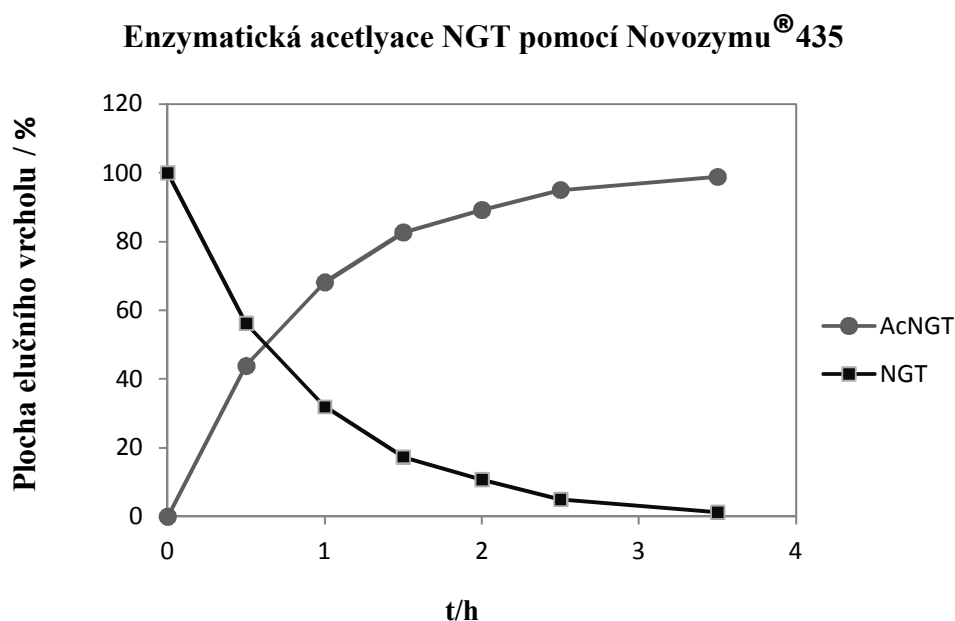
Obr. 13 Průběh acetylace NGT lipasou na AcNGT, v prostředí vinylacetátu a acetonu.

Při enzymatické modifikaci NGT pomocí komerčně dostupné lipasy Novozyme[®] 435, byla ověřena její vysoká účinnost při acylaci primární alkoholické skupiny (C6-OH) NGT, a

také i to, že přidavek uhličitanu sodného pro neutralizaci kyselého prostředí (vinylacetát) nemá vliv na průběh samotné enzymatické reakce. Konverze substrátu na žádaný produkt (AcNGT) byla při použití enzymu Novozyme[®]435, podle TLC (acetonitril/voda 4:1), téměř kvantitativní. Na TLC byla pod UV lampou pozorovaná výsledná skvrna produktu s R_f 0,66 ze startovacího R_f 0,48. Toto pozorování potvrdila i analýza reakce pomocí HPLC (viz dále).

4.3.3. Kinetický průběh acetylace NGT enzymem Novozyme[®]435

HPLC analýza reakční směsi NGT a enzymu Novozyme[®]435 potvrdila výsledky z TLC pozorování, přičemž enzym Novozyme[®]435 konvertoval NGT na AcNGT do 3 hodin (použijeme-li 1 mg enzymu/4 mg NGT). Pozorování ukazuje následující graf (Obr. 14).



Obr. 14 Průběh acetylace NGT v prvních 4 hodinách od počátku reakce.

4.3.4. Porovnání reaktivity lipas při enzymatické modifikaci NGT využitím TLC

Reakcí popsanou v kapitole 4.2.4 byla pozorována výrazná aktivita enzymu Novozyme[®]435 – konverze substrátu do 2 hodin, TLC (acetonitril/voda 4:1, R_f 0,66). Po 4 dnech od počátku reakce byla reaktivita většiny lipas nulová. Lipase CV, Lipase PL a Novozyme[®]435 vykazovaly konverzi výchozí látky na produkt do 3 hodin (dle TLC

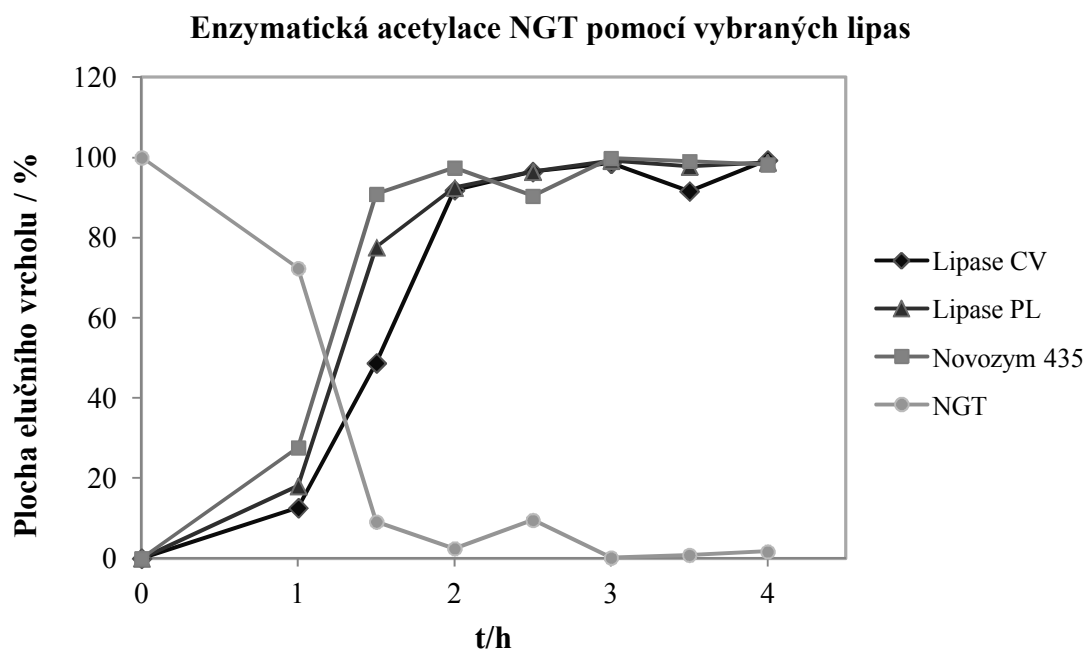
analýzy). Reaktivita lipas Lipase F – AP15 a Lipase A6 se projevila až po 96 hodinách od počátku reakce.

4.3.5. Porovnání reaktivity tří nejreaktivnějších lipas s NGT využitím HPLC

Metodou HPLC byl pozorován průběh acetylace NGT katalyzovanou lipasami (Tab. 1, kapitola 4.1.2). Po 2 hodinách reakce se jako nejúčinnější jevíly enzymy Lipase CV, Lipase PL a, podle očekávání, Novozyme[®]435, které dokázaly proměňovat výchozí NGT na produkt do tří hodin od počátku reakce (Obr. 15). Ostatní zkoumané lipasy netvořily výsledný produkt, proto mohou být označeny jako nevyhovující pro tento účel. Nejrychlejší konverze substrátu na AcNGT (dle TLC i HPLC) proběhla za katalýzy enzymem Novozyme[®]435, následovaná lipasou PL z *Alcaligenes sp.* a nakonec lipasou CV. V HPLC chromatogramu získaném analýzou vzorků reakčních směsí obsahujících nejúčinnější lipasy (po 1,5 hodině od začátku reakce), byly pozorovány eluční vrcholy v oblasti typické pro výchozí látku (t_R 1,04) a pro produkt (t_R 3,32) (Obr. 16, strana 36).

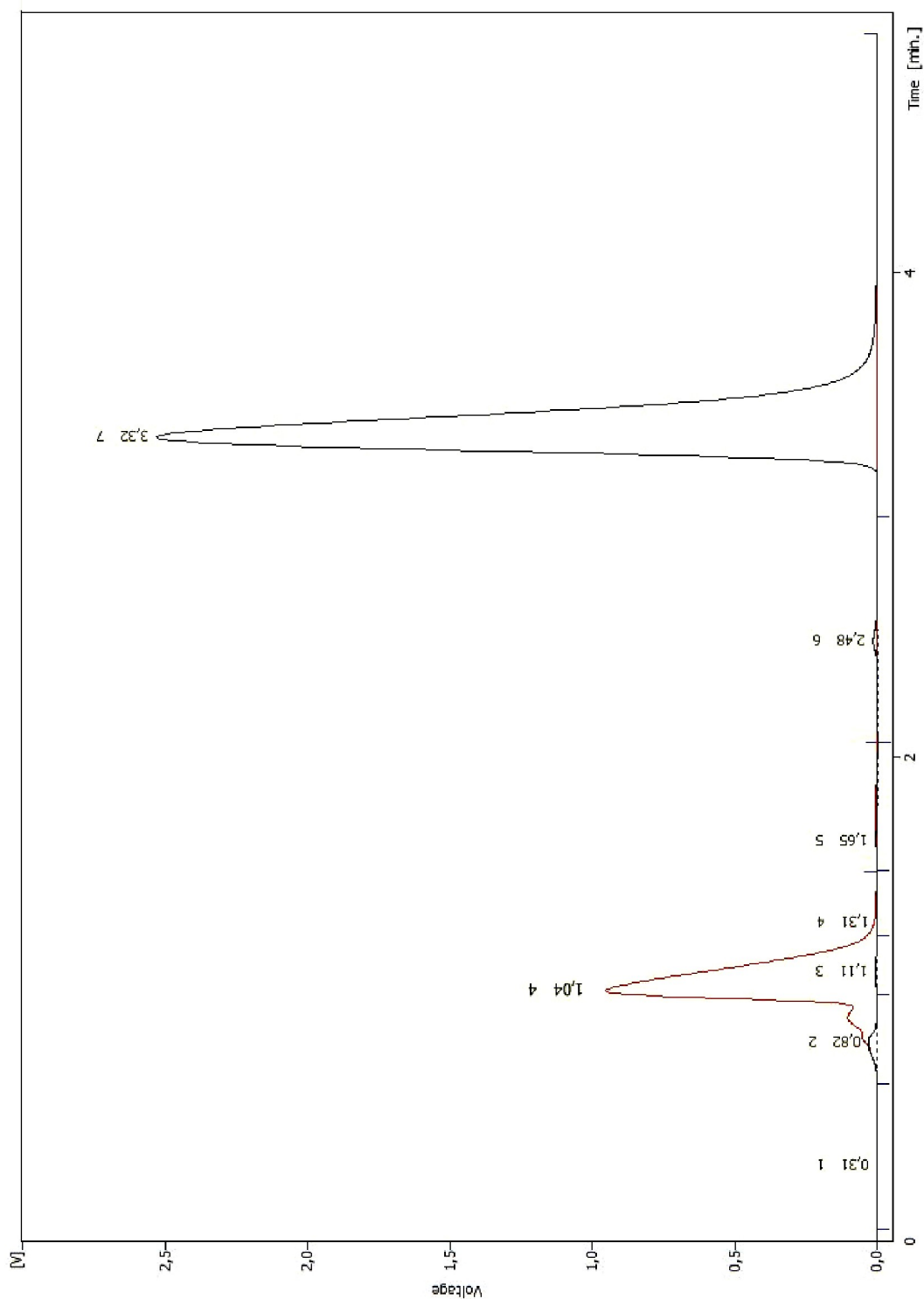
Při všech pokusech vždy vznikl jen derivát NGT, který obsahoval acetyl na uhlíku C-6. Enzymatická modifikace ostatních hydroxylových skupin na struktuře NGT nebyla úspěšná, tedy šlo o selektivní reakci.

Nejvhodnější podmínky pro syntézu AcNGT byly teplota v průběhu enzymatické reakce 45 °C a frekvence třepání thermomixeru 600-700 rpm. Průběh reakcí byl s výhodou sledován pomocí TLC (acetonitril-voda 4:1), kdy docházelo k dobrému rozdělení (rozlišení) skvrn odpovídajících výchozí látce (NGT) a acetylovanému produktu (AcNGT).



Obr. 15 Konverze NGT katalyzovaná lipasami (měření pomocí HPLC).

—●— znázorňuje úbytek výchozí látky (NGT) při reakci s enzymem Novozyme® 435.

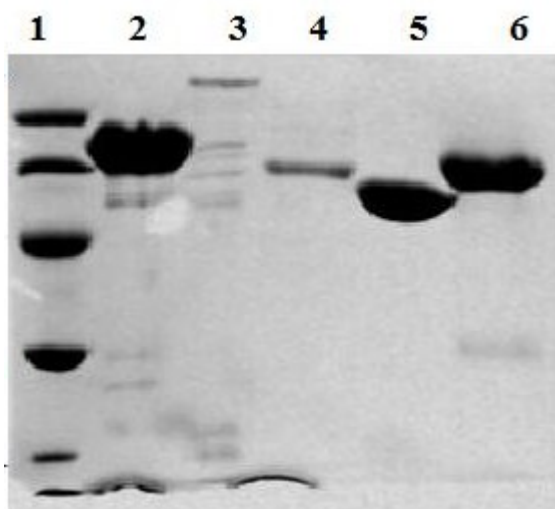


Obr. 16 Chromatogram s elučními vrcholy v oblastech typických pro výchozí látku NGT (t_R 1,04) (červeně) a produkt AcNGT (t_R 3,32). Reakční směs: NGT (2 mg, 0,91 μ mol), Novozyme[®] 435 (2 mg) v prostředí aceton/vinylacetát 5:1 (viz text). Kolona: Chromolith[®] SpeedROD HPLC Column, monolithic silica, RP-18e, 50 - 4,6 mm (Merck, Německo), průtoková rychlost 0,90 ml/min, doba měření 5 minut.

4.3.6. Expresa β -*N*-acetylhexosaminidas v *E. coli* buňkách

Využitím transformovaných buněk BL21(DE3)pLysS byly úspěšně exprimovány β -*N*-acetylhexosaminidasy ze *S. plicatus*, *B. thetaiotaomicron* a zároveň lidská OGA. Kompetentní buňky byly transformovány pomocí vektorů pET15b (GH 20) a pET28a (GH 84), kolonie pomnoženy v Petriho miskách na LBA mediu a následně také v kapalném LB mediu, které bylo rozdělené po 0,5 l do jednolitrových Erlemeyerových baněk - pro dostatečnou zásobu vzduchu pro buňky. Do LBA i LB media bylo vždy přidáno vhodné antibiotikum, vůči kterému byli transformované buňky s vektorem resistantní – kanamycin (*B. thetaiotaomicron*; OGA), ampicilin plus chloramfenikol (*S. plicatus*). Expresa proteinů byla indukována přidávkem IPTG. Enzymy byly v těchto buňkách úspěšně exprimovány v průběhu 4 hodin při 22 °C (*B. thetaiotaomicron*; OGA) až 20 hodin při 25 °C (*S. plicatus*), za stálého míchání média při 220 rpm. Dosatečný nárůst buněk byl průběžně sledován spektrofotometrickým měřením optické density při 600 nm, až dosahovala požadovanou hodnotu v rozmezí 0,6 – 0,7.

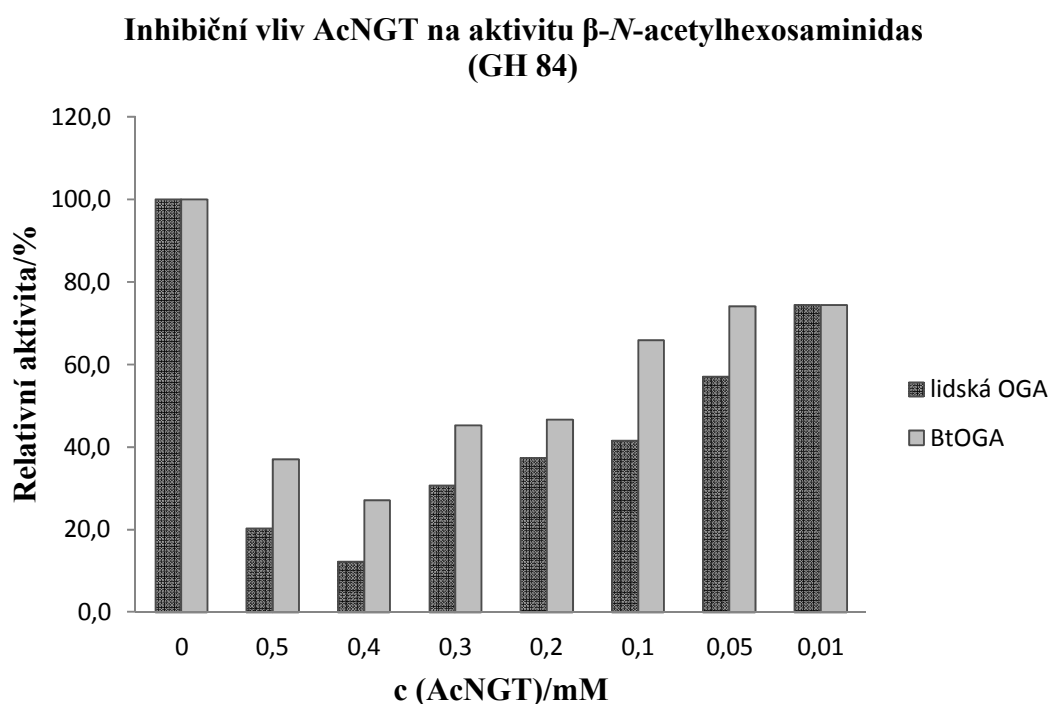
Takto připravené enzymy byly izolovány centrifugací a sonikací a purifikovány na Ni-NTA agarosové koloně, frakce s aktivním enzymem zahuštěny a čistota enzymů analyzována využitím SDS-PAGE elektroforesy (Obr. 17). Jak je z obrázku patrné, vyvinutou technikou přípravy β -*N*-acetylhexosaminidas byly připraveny enzymy o vysoké čistotě.



Obr. 17 Gel z SDS - PAGE proteinů v následovním pořadí: 1 - marker (97, 66, 45, 30 a 20,1 kDa); 2 –BtOGA; 3 - lidská OGA; 4 – AoHex; 5 – SpHex; 6 – TfHex.

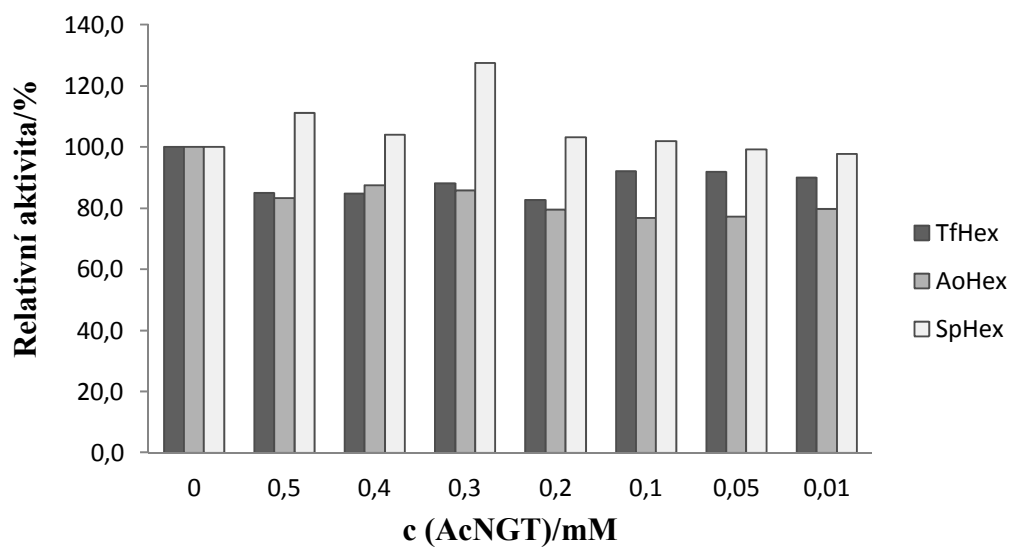
4.3.7. Testování inhibičního vlivu AcNGT na aktivitu připravených enzymů

Inhibiční vliv derivátu NAG – thiazolinu AcNGT, připraveném jedнокrokovou acetylací NGT lipasami v prostředí vinylacetátu a acetonu, byl prokazatelně vyšší v případě β -*N*-acetylhexosaminidas z GH 84 (BtOGA, lidská OGA) než v případě β -*N*-acetylhexosaminidas z GH 20 (TfHex, AoHex, SpHex). Aktivita enzymů GH 84 byla značně potlačena při koncentracích inhibitoru 0,4 mM a 0,5 mM, kdy relativní aktivita těchto enzymů dosahovala cca 20%, v porovnání s výchozí aktivitou (nulový obsah inhibitoru) v měřené reakční směsi a koncentraci substrátu (*p*NP-GlcNAc) 0,34 mM (Obr. 18). Naproti tomu, relativní aktivita β -*N*-acetylhexosaminidas ze skupiny GH 20 byla poměrně vysoká (mezi 80 – 90% v případě TfHex a AoHex) i v přítomnosti inhibitoru ve všech testovaných koncentracích. V případě SpHex došlo dokonce ke zvýšení relativní enzymové aktivity (koncentrace AcNGT 0,3 – 0,5 mM) (Obr. 19, strana 39).



Obr. 18 Výsledky analýzy inhibice GH 84 připraveným AcNGT.

Inhibiční vliv AcNGT na aktivitu β -N-acetylhexosaminidas (GH 20)



Obr. 19 Výsledky analýzy inhibice GH 20 připraveným AcNGT.

5. DISKUSE

Dlouhodobým cílem Laboratoře biotransformací, MBÚ, AV ČR v.v.i., je hledání účinných selektivních inhibitorů β -*N*-acetylhexosaminidas, derivátů, které by vykazovaly stejnou nebo vyšší inhibiční aktivitu jako má samotný NGT, od kterého se odvozují. Inhibiční schopnost NGT spočívá v jeho strukturní podobnosti s oxazolinovým intermediátem enzymatické reakce katalyzované β -*N*-acetylhexosaminidasami. Jelikož by inhibice těchto enzymů mohla umožnit sledování daných enzymů v buněčných procesech, a zároveň v budoucnu dopomoci k léčbě některých neurodegenerativních nemocí, hledání vhodného, biologicky účinného a bezpečného inhibitoru je cílem mnoha současných výzkumů.

V prvním z provedených experimentů byl připraven NGT podle již dříve publikovaného postupu podle prof. Knappa¹. Výtěžky byly vysoké, cca 70%, velký vliv na výtěžek měly ztráty při chromatografickém čištění meziprojektu i produktu. Jako vhodná mobilní fáze pro chromatografické dělení se jevila směs ethylacetát/methanol v poměru 8:2, kdy se produkt eluoval v poměrně krátkém čase a ve vysoké čistotě. S vyšším stářím vzorku NGT docházelo k jeho částečnému rozpadu pravděpodobně na jeho otevřenou formu, což se projevilo i při analýze vzorku pomocí TLC (acetonitril/voda 4:1), kde byla po vypálení TLC destičky horkovzdušnou pistolí viditelná řada menších skvrn pod úrovní NGT (R_f 0,44). Tato tendence NGT k částečnému otevírání thiazolinového kruhu byla potvrzena i při analýzách NGT a jeho syntetických derivátů pomocí ¹H NMR (data nejsou součástí této práce). Na tomto místě je vhodné dodat, že pro detekci NGT a jeho derivátů (AcNGT) na TLC byla s výhodou využita reakční směs tzv. „Pancaldi reagens“, o složení: 2,1g (NH₄)₆MoO₄, 0,1g Ce(SO₄)₂, 3 ml H₂SO₄, 47 ml H₂O, kdy po omytí TLC desky a následné aplikaci proudu horkého vzduchu docházelo k „vypálení“ tmavě modrých skvrn v místech cukerných derivátů NGT, s vyšší intenzitou zabarvení, než při využití 5% kyseliny sírové v ethanolu.

V dalších experimentech byly testovány různé mikrobiální enzymy (lipasy) a jejich účinnost při acetylaci připraveného NGT. Cílem této práce bylo enzymaticky připravit acetylované deriváty NGT pomocí lipas a také otestovat jejich biologickou aktivitu na vybraných β -*N*-acetylhexosaminidasach. Přestože byly testovány různé reakční podmínky, úspěšně byl připraven jen derivát AcNGT. Enzymatická modifikace ostatních hydroxylových skupin na kruhu NGT nebyla úspěšná. Nejvýhodnější pro jedнокrokovou acety-

laci NGT z dostupných lipas byly enzymy: Lipase CV, Lipase PL a Novozyme[®]345. Aktivita ostatních zkoumaných lipas byla zanedbatelná (dle pozorování na TLC a HPLC). Nejvhodnější podmínky pro syntézu AcNGT byla reakční činidla vinylacetát/acetone (v poměru 1:5), teplota reakce 45 °C a 600-700 rpm. Průběh reakcí byl s výhodou sledován pomocí TLC (acetonitril/voda 4:1), kdy docházelo k dobrému rozdělení (rozlišení) skvrn výchozí látky (NGT) a acetylovaného produktu (AcNGT). Katalýza reakce pomocí Lipase CV a PL, zmíněných účinných lipas, probíhala již do tří hodin, pomocí enzymu Novozyme[®]435 již do jedné, maximálně dvou hodin (v závislosti na množství substrátu).

Pro analytické hodnocení průběhu enzymatické acetylace NGT využitím HPLC (kolona Chromolith[®]SpeedROD, viz kapitola 4.1.4) byla vyvinuta izokratická metoda (mobilní fáze 10 % acetonitril, doba měření 5 min, průtoková rychlost 0,90 ml/min, vlnová délka 210 nm), při níž docházelo k dobrému rozlišení separovaných látek (eluce NGT i AcNGT) do pěti minut od počátku měření. Ve výsledném chromatogramu byly pozorovány eluční vrcholy NGT (t_R 1,04), AcNGT (t_R 3,32).

Pro expresi β -*N*-acetylhexosaminidas byly s výhodou využity kompetentní buňky *E. coli* BL21(D3)pLysS, do kterých byl transformován vektor (pET15b nebo pET28a) kódující β -*N*-acetylhexosaminidas. Byly připraveny enzymy ze *S. plicatus*, *B. thetaiotaomicron* a lidská OGA, které byly zdárně izolovány, purifikovány na Ni-NTA agarosové koloně ve vysoké čistotě a vysoké aktivitě (hlavně OGA a SpHex), což bylo ověřeno i aplikací SDS-PAGE. Zbylé enzymy (TfHex, AoHex) byly připraveny podle Slámová et al.³⁵ expresí v *Pichia pastoris* pracovníky Laboratoře biotransformací, MBÚ, AV ČR.

Přestože mají β -*N*-acetylhexosaminidas z GH 20 a GH 84 konzervované struktury v aktivním centru (Asp/Glu) a obdobný mechanismus katalýzy (substrátem-asistovaná katalýza), inhibiční vliv AcNGT na aktivitu těchto tříd enzymů byl výrazně odlišný. V případě GH 20 byla inhibice enzymů téměř nulová, v případě GH 84 byla inhibice výraznější – při vyšších koncentracích inhibitoru (za konstantní koncentrace substrátu *p*NP-GlcNAc v reakční směsi) byla relativní aktivita snížena na cca 20% oproti 100% aktivitě při absenci inhibitoru. Tento selektivní vliv inhibitoru na aktivitu GH 84 by mohl dopomoci k selektivní inhibici lidské β -*N*-acetylhexosaminidasy účastnící se deglykosylace proteinů v mozkové tkáni (hyperfosforylace při Alzheimerově nemoci) a současně zabránit možné deaktivaci důležitých lysosomálních GH 20 enzymů neurální tkáně.

6. ZÁVĚR

Předmětem této práce byla enzymatická modifikace NGT pomocí vybraných mikrobiálních lipas, a připravené acetylované deriváty otestovat jako potenciální inhibitory β -*N*-acetylhexosaminidas. Výsledky provedených experimentů lze stručně shrnout do následujících bodů:

- Selektivní enzymovou acetylací pomocí lipasy byl připraven derivát NGT 6-AcNGT, který vznikl jedнокrokovou acetylací. Bylo ověřeno, že pro tuto reakci je nejvhodnější komerční lipasa Novozyme[®]435, která přeměňuje substrát na produkt do 1- 2 hodin od počátku reakce, v závislosti na množství substrátu. Acetylace ostatních poloh touto reakcí neprobíhá.
- Byla vyvinuta HPLC metoda, která se dá s výhodou využít pro sledování enzymatické modifikace (acetylace) NGT na jeho AcNGT derivát (případně jiný). Jedná se o chromatografii na reverzní fázi, izokratickou metodu, s využitím 10% acetonitrilu jako mobilní fáze, při vlnové délce 210 nm.
- Byla provedena úspěšná exprese a purifikace tří β -*N*-acetylhexosaminidas – GH 20 ze *S. plicatus*, GH 84 ze *B. thetaiotaomicron* a lidská OGA (GH 84).
- Testovaný derivát AcNGT, který dobře inhiboval lidskou OGA (relativní aktivita kolem 20 % při koncentraci inhibitoru 0,5 mM, substrát 0,34 mM) a bakteriální β -*N*-acetylhexosaminidasu (*B. thetaiotaomicron*). Inhibice ostatních enzymů (GH 20) nebyla pozorována.

REFERENCE

- 1 Macauley, M., Whitworth, G. E., Debowski A. W., Chin, D., Vocadlo D. J.: *J. Biol. Chem.* 280, 25313–25322 (2005a)
- 2 S. Knapp, D. J. Vocadlo, G. Zhinong, B. Kirk, J. Lou a S. G. Withers: *J. Biol. Chem.* 118, 6804-6805, (1996)
- 3 Catarnel, B.L., a další.: *Nucleic Acid Res.* 37, 233-238 (2009)
- 4 Macauley, M.S., Stubbs, K. A. a Vocadlo, D. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 17202-17203 (2005a)
- 5 Guttering, M., Rendić, D., Voglauer, R., Iskratsch, T., Wilson, B. H.: *Biochem. J.* 419, 83 – 90 (2009)
- 6 Lemieux, M. J., Mark, B. L., Cherney, M. N. a další.: *J. Mol. Biol.* 359, 913 - 929
- 7 Mark, B. L.; Vocadlo, D. J.; Knapp, S.; Triggs - Raine, B. L.; Withers, S. G.; James, M. N. G.: *J. Biol. Chem.* 276, 10330–10337 (2001)
- 8 Gao, Y.; Wells, L.; Comer, F. I.; Parker, G.J.; Hart, G. W.: *J. Biol. Chem.* 276, 9838 - 9845 (2001)
- 9 Dong, D. L.; Hart, G. W.: *J. Biol. Chem.* 269, 19321 - 19330 (1994)
- 10 Dennis, R. J.; Taylor, E. J.; Macauley, M. S.; Stubbs, K.; Turkenburg, J. P.; Hart, S. J.; Black, G. N.; Vocadlo, D. J.; Davies, G. J.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 365 - 371 (2006)
- 11 Yuzwa, S. A., Vocadlo, D. J.: *Curr. Alzheimer. Res.* 6, 451 - 454 (2009)
- 12 Macauley, M. S.; He, Y.; Gloster, T. M.; Stubbs, K. A.; Davies, G. J.; Vocadlo, D. J.: *Chem. Biol.* 17, 937 - 948 (2010)
- 13 Macauley, M. S.; Vocadlo, D. J.: *Biochim. Biophys. Acta.* 1800, 107 - 121 (2009)
- 14 Whitworth, G. E.; Macauley, M. S.; Stubbs, K. A.; Dennis, R. J.; Taylor, E. J.; Davies, G. J.; Greig, I. R.; Vocadlo, D. J.: *J. Am. Chem. Soc.* 129, 635 - 644 (2007)
- 15 Reid, S. P.: The use of inhibitors to stabilize folded conformations of enzymes. Diplomová práce The Univerity of British Columbia, str. 22 (2004)
- 16 Knapp, S.; Fash, D.; Abdo, M.; Emge, T.; Rablen, P. R.: *Bioorg. Med. Chem.* 17, 1831–1836 (2009)
- 17 Tropak, B. M.; Blanchard, J.; Withers, S. G.; Brown, E.; Mahuran, D.: *Chem. Biol.* 14, 153 - 164 (2007)
- 18 Gloster, T. M.; Vocadlo, D. J.: *Curr. Signal Transduction Ther.* 5, 74 - 91 (2010)
- 19 Knapp, S.; Abdo, M.; Ajayi, K.; Huhn, R. A.; Emge, T. J.; Kim, E. J.; Hanover, J.

- A.:Org. Lett. 9, 2321-2324 (2007)
20. Yuzwa, S. A.; Macauley, M. S.; Heinonen, J. E.; Shan, X.; Dennis, R. J.; He, Y.; Whitworth, G. E.; Stubbs, K.A.; McEachern, E. J.; Davies, G. J.; Vocadlo, D. J.: Nat. Chem. Biol. 4, 483 - 490 (2008)
 21. Houde, A.; Kademi, A.; Leblanc, D.: Appl. Biochem. Biotechnol. 118, 155 - 170 (2004)
 22. Svendsen, A.:Biochim. Biophys. Acta. 1543, 223 - 238 (2000)
 23. Frikha, F.; Miled, N.; Bacha, A. B.; Mejdoub, H.; Gargouri, Y.: Protein Pept. Lett. 17, 254 - 259 (2010)
 24. Van Tilbeurgh, H.; Bezzine, S.; Cambillau, C.; Verger, R.; Carriere, F.: Biochim. Biophys. Acta. 1441, 173 - 184 (1999)
 25. Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B. W.; Frolow, F.; Franken, S. M.; Harel, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J.; et al: Protein Eng. 5, 197 - 211 (1992)
 26. Nardini, M.; Dijkstra, B. W.: Curr. Opin. Struct. Biol. 9, 732 - 737 (1999)
 27. Jaeger, K. E.; Rancas, S.; Dijkstra, B. W.; Colson, Ch.; van Heuel, M.; Misset, O.: FEMS Microbiol. Rev. 15, 29 - 63 (1994)
 28. Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D.: Chem. Phys. Lipids. 93, 67 - 80 (1998)
 29. Cabrera, Z.; Fernandez-Lorente, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Palomo, J. M.; Guisan, J. M.: J. Mol. Catal. B: Enzym. 57, 171 - 176 (2009)
 30. Dharmstiti, S.; Kuhasuntisuk, B.: J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 21, 75 - 80 (1998b)
 31. Lotti, M.; Alberghina, L.: Industrial enzymes. 16, 263 - 281 (2007)
 32. Lopez, R.: Hydrolytic reactions [online]. Rok: 2007. Rok přístupu: 2012. Dostupné online:http://www.sc.ehu.es/qpwaiipj/PDF/R_Lopez/2.1.%20Hydrolytic%20Reactions.pdf
 33. Faber, K.: SpringerImages. Biotransformations in Organic Chemistry.[online] Rok: 2011. Rok přístupu: 2012. Dostupné online: http://www.springerimages.com/Images/RSS/1-10.1007_978-3-642-17393-6_2-59
 34. Gojkovic, Ž...: Study of preparations for fat separators. Diplomová práce Technická univerzita, Brno, str. 16 - 19 (2009)
 35. Slámová, K., Bojarová, P., Gerstorferová, D., Fliedrová, B. , Hofmeisterová, J., Fiala, M., Pompach, P., Křen, V.: Protein Expression Purif.82, 212 - 217 (2012)

36. Rodrigues, R. C.; Fernandez - Lafuente, R.:J. Mol. Catal. B: Enzym. 64, 1-22 (2010)

