

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

NOVÉ FUNGÁLNÍ FUKOSIDASY A JEJICH SYNTETICKÝ POTENCIÁL

Bc. MICHAELA GLOZLOVÁ

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. MARTIN BERÁNEK, Ph.D.

Konzultantky: doc. RNDr. PAVLA BOJAROVÁ, Ph.D.,

Mgr. PAVLÍNA NEKVASILOVÁ

HRADEC KRÁLOVÉ

2023

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji prof. PharmDr. Martinu Beránkovi, Ph.D. za vedení práce, doc. RNDr. Pavle Bojarové, PhD. za věcné připomínky a nekonečnou trpělivost a Mgr. Pavlíně Nekvasilové za odborné vedení a cenné rady. Mé díky patří též dalším pracovníkům Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR, zejména Ing. Kristýně Slámové, PhD. a Mgr. Aleně Hrdličkové za jejich podporu a odborné zkušenosti.

PROHLÁŠENÍ

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 15. 5. 2023

.....
Bc. Michaela Glozlová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Michaela Glozlová

Vedoucí práce: prof. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Konzultantky: doc. RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D., Mgr. Pavlína Nekvasilová

Název diplomové práce: Nové fungální fukosidázy a jejich syntetický potenciál

Literární rešerše se zabývá α -L-fukosidázami, jejich výskytem, funkcí a použitím v syntéze fukosylovaných sloučenin, které byly takéž předmětem rešerše, zejména jejich výskyt v lidském těle a účast v patologických stavech. Dále jsou zkoumány oligosacharidy lidského mléka, jejich vliv na zdraví kojence a jejich syntéza, k níž se dají využít právě α -L-fukosidázy.

Experimentální část zahrnuje analýzu knihovny vláknitých hub s cílem nalezení zástupce s α -L-fukosidázovou aktivitu vůči pNP- α -L-fukosidu. Na základě hledání v genetických databázích byly vybrány a připraveny rekombinantní fungální α -L-fukosidázy a byla testována možnost jejich produkce v *Pichia pastoris* a *Escherichia coli*. Produkované enzymy byly purifikovány iontově-výměnnou chromatografií, charakterizovány a byla zkoumána jejich regioselektivita a syntetický potenciál pro syntézu fukosylovaných oligosacharidů.

Klíčová slova: fukosidáza, enzym, oligosacharidy, syntéza, lidské mléko

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Michaela Glozlová

Supervisor: prof. PharmDr. Martin Beránek, Ph.D.

Consultants: doc. RNDr. Pavla Bojarová, Ph.D., Mgr. Pavlína Nekvasilová

Title of diploma thesis: New fungal fucosidases and their synthetic potential

The literary research focuses on α -L-fucosidases, their occurrence, functions, and use in the synthesis of fucosylated compounds, which were also a part of the research, particularly their presence in the human body and involvement in pathological conditions. Furthermore, it explores the oligosaccharides found in human milk, their impact on infant health, and their synthesis, which can be facilitated through the use of α -L-fucosidases.

The experimental section involves the analysis of a library of filamentous fungi with the aim of identifying a representative strain with α -L-fucosidase activity towards *p*NP- α -L-fucoside. Recombinant α -L-fucosidases were selected based on searches in genetic databases and prepared. The feasibility of their production in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* was tested, and the produced enzymes were purified by ion exchange chromatography, characterized and their regioselectivity and synthetic potential for the synthesis of fucosylated oligosaccharides were examined.

Keywords: fucosidase, enzyme, oligosaccharides, synthesis, human milk

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Současný stav řešené problematiky	11
2.1	Syntéza glykosidové vazby pomocí glykosidáz.....	11
2.1.1	α -L-Fukosidázy	14
2.2	Fukóza a její deriváty.....	17
2.2.1	Výskyt a význam fukosylovaných sloučenin.....	17
2.2.2	Zástupci fukosylovaných sloučenin.....	18
2.2.3	Fukóza v patologických stavech.....	21
2.3	Oligosacharidy lidského mléka (HMO).....	22
2.3.1	Diverzita HMO	22
2.3.2	Funkce HMO.....	26
2.3.3	Kojenecká výživa	27
2.3.4	Enzymová syntéza fukosylovaných HMO.....	28
3	Cíle práce	32
4	Materiál a Metodika.....	33
4.1	Technické vybavení a materiál.....	33
4.1.1	Přístrojové vybavení.....	33
4.1.2	Kultivační média.....	34
4.1.3	Zásobní roztoky	35
4.1.4	Pufry	36
4.1.5	Komerční sady	37
4.1.6	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE).....	37
4.1.7	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	38

4.1.8	Biologický materiál.....	38
4.1.9	Tenkvrstvá chromatografie.....	39
4.2	Screening sbírky hub.....	39
4.2.1	Výběr hub.....	39
4.2.2	Kultivace vláknitých hub.....	39
4.2.3	Stanovení fukosidázové aktivity fungálních kmenů.....	41
4.3	Sekvenační analýza.....	42
4.4	Molekulárně biologické metody.....	45
4.4.1	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	45
4.4.2	Množení plazmidu v <i>E. coli</i> Top10.....	46
4.4.3	Izolace plazmidu v analytickém množství.....	47
4.4.4	Izolace plazmidu v preparativním množství.....	48
4.4.5	Sekvenování.....	49
4.4.6	Linearizace plazmidu.....	50
4.4.7	Kontrola produkce proteinu.....	51
4.5	Produkce rekombinantních enzymů v <i>P. pastoris</i>	52
4.5.1	Příprava a transformace kompetentních buněk <i>P. pastoris</i> KM71H 52	
4.5.2	Kultivace <i>P. pastoris</i> v analytickém měřítku.....	53
4.5.3	Kryokonzervace buněk <i>P. pastoris</i>	53
4.5.4	Ověření exprese α -L-fukosidáz v <i>P. pastoris</i>	54
4.5.5	Ověření vložení genu α -L-fukosidáz do genomu <i>P. pastoris</i>	54
4.5.6	Kultivace <i>P. pastoris</i> v preparativním měřítku.....	56
4.5.7	Purifikace enzymu.....	56

4.6	Produkce rekombinantních enzymů v <i>E. coli</i>	58
4.6.1	Vložení genů α -L-fukosidáz do nového vektoru.....	58
4.6.2	Produkce v buňkách <i>E. coli</i>	60
4.6.3	Purifikace proteinu	61
4.7	Biochemická charakterizace α -L-fukosidáz	62
4.7.1	Stanovení aktivity	62
4.7.2	Stanovení koncentrace proteinu	63
4.7.3	Stanovení pH optima.....	63
4.7.4	Stanovení pH stability	63
4.7.5	Stanovení kinetických parametrů.....	64
4.7.6	Screening substrátové specifity rekombinantních α -L-fukosidáz.....	65
4.7.7	Screening transfukosylační aktivity	65
5	Výsledky	67
5.1	Screening sbírky hub	67
5.2	Sekvenační analýza fungálních genů	67
5.3	Produkce rekombinantních enzymů v <i>P. pastoris</i>	70
5.3.1	Transformace buněk <i>P. pastoris</i> geny α -L-fukosidáz.....	70
5.3.2	Analytická produkce rekombinantních α -L-fukosidáz v <i>P. pastoris</i> 71	
5.3.3	Analýza exprese α -L-fukosidáz v <i>P. pastoris</i>	72
5.3.4	Analýza vložení genu α -L-fukosidáz do genomu <i>P. pastoris</i>	73
5.3.5	Preparativní produkce α -L-fukosidáz v <i>P. pastoris</i>	74
5.3.6	Purifikace α -L-fukosidáz	74
5.4	Produkce rekombinantních enzymů v <i>E. coli</i>	76

5.4.1	Vložení do plazmidu pCold II	76
5.4.2	Analýza produkce α -L-fukosidáz v různých kmenech <i>E. coli</i>	79
5.5	Charakterizace rekombinantních α -L-fukosidáz.....	82
5.5.1	Stanovení pH optima rekombinantních α -L-fukosidáz.....	82
5.5.2	Enzymová kinetika	83
5.5.3	Analýza substrátové specifity	84
5.5.4	Analýza transglykosylační aktivity	85
6	Diskuze	87
7	Závěr	94
8	Seznam zkratk	96
9	Literatura	98
10	Seznam obrázků	110
11	Seznam tabulek	112
12	Seznam příloh.....	113

1 ÚVOD

Oligosacharidy mateřského mléka (HMO) jsou nedostatečně probádaným faktorem zdraví kojence a jeho prospívání. Mají vliv na imunitní toleranci kojence a na obranu proti patogenním bakteriím a virům. Pro bližší pochopení mechanismu jejich funkce je potřeba syntetizovat HMO a mít k dispozici celou jejich knihovnu. Syntéza HMO je realizována složitými chemickými metodami, které je lze elegantně nahradit enzymovou syntézou.

Více než polovina HMO jsou fukosylované, což vysvětluje zájem o fukosidázy, enzymy katalyzující hydrolyzu fukosidů a transfukosylační reakce. Pro syntézu HMO je možné používat enzymy přirozeně se vyskytující i upravené metodami genetického inženýrství.

Teoretická část této práce prozkoumává funkce HMO, roli fukózy a možnosti enzymové syntézy glykosidové vazby. Tyto znalosti jsou aplikovány v experimentální části, která má za cíl nalezení nové α -L-fukosidázy s potenciálem syntézy fukosylovaných oligosacharidů. Experimentální enzym by bylo možné použít i pro průmyslovou výrobu HMO, které by doplňovaly kojenecké příkrmy a přinášely benefity mateřského mléka dětem, které jsou odkázány pouze na kojenecké příkrmy.

Práce byla součástí řešení projektu LTC20072 „*Library of engineered glycosidases for the preparation of bioactive glycans*“ podpořeného MŠMT ČR.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Syntéza glykosidové vazby pomocí glykosidáz

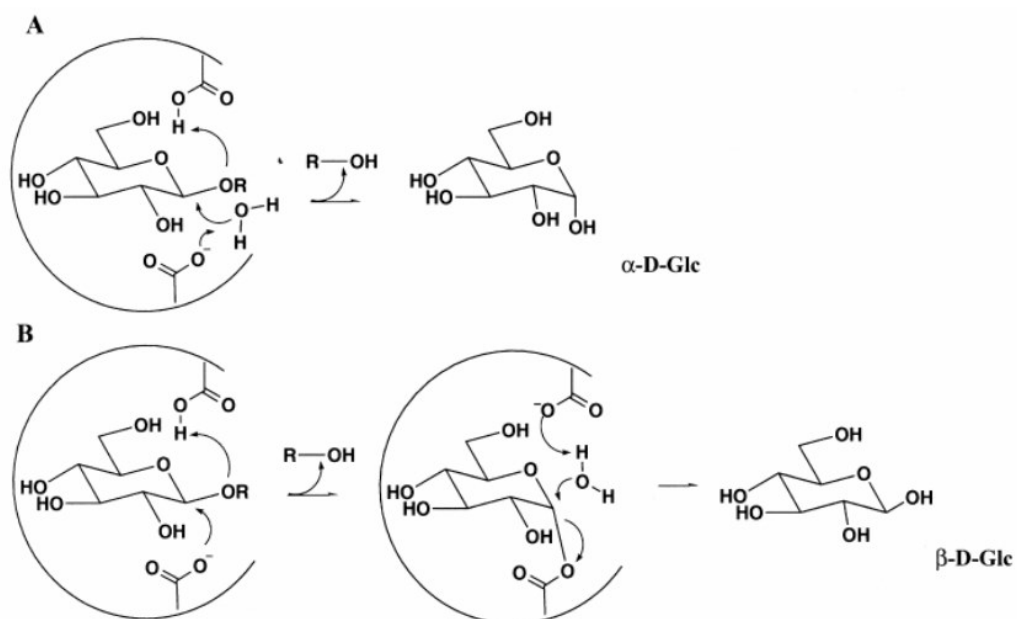
Glykosylace, tedy připojení sacharidového zbytku na akceptor pomocí glykosidové vazby, je odpovědná za strukturní rozmanitost sacharidů a od nich odvozených glykosidů. Produkty glykosylačních reakcí jsou zásadními biologickými a chemickými molekulami, ať už ve volné formě, nebo navázané na jiné biomolekuly (Nidetzky et al., 2018).

Rostoucí zájem o glykosylované sloučeniny, který lze pozorovat v posledních letech, musel nutně přivést pozornost k jejich přípravě a tím i k syntéze glykosidové vazby. Glykosylované sloučeniny lze připravit cestou klasické chemické syntézy, kterou komplikuje nutnost chránit, odchraňovat a aktivovat jednotlivá reakční centra v molekule. Elegantní alternativou je enzymová syntéza, která má potenciál být stereoselektivní a regioselektivní bez nevýhod chemické syntézy (Bojarová et al., 2009).

V přírodě probíhá glykosylace pouze pomocí glykosyltransferáz (EC 2.4) a za použití aktivovaných cukerných nukleotidů (např. UDP-Gal, UDP-Glc, GDP-Fuc) jako donorů; reakce jsou stereoselektivní a regioselektivní (Nidetzky et al., 2018). Pro rutinní laboratorní syntézu jsou glykosyltransferázy relativně málo stabilní a jejich donory příliš drahé; jeden enzym obvykle katalyzuje pouze jednu konkrétní reakci. Proto se pro syntézu glykosidové vazby používají i další skupiny enzymů, které syntézu přirozeně nekatalyzují, nebo které jsou geneticky upraveny, aby tak činily. Do první kategorie spadají glykosidázy a do druhé transglykosidázy, glykosyntázy, glykoligázy a thioglykoligázy (Mészáros et al., 2021).

Glykosidázy (glykosidhydrolázy, EC 3.2.1) jsou enzymy štěpící glykosidovou vazbu mezi dvěma sacharidovými jednotkami (nebo mezi sacharidem a jeho aglykonovou částí) za současné hydrolýzy. Glykosidázy lze podle reakčního mechanismu dělit na *endo*- a *exo*-glykosidázy. *Exo*-glykosidázy hydrolyzují

glykosidovou vazbu na neredukujícím konci oligosacharidu, zatímco *endo*-glykosidázy hydrolyzují vazbu uvnitř oligosacharidového řetězce (Mészáros et al., 2021). Též je možné rozlišit glykosidázy retenující (*retaining*) a invertující (*inverting*). Retenující glykosidázy vytváří v prvním kroku svého katalytického mechanismu kovalentní meziproduct s glykosylem za obrácení konfigurace jeho anomerního uhlíku; dochází ke glykosylaci. Ve druhém kroku je enzym odštěpen a nahrazen molekulou vody nebo jiným akceptorem; produkt získává zpět stejnou konfiguraci jako výchozí substrát. Invertující glykosidázy v jednom kroku nahrazují odstupující skupinu molekulou vody a tím převrací původní konfiguraci anomerního uhlíku (Obrázek 1, Bojarová & Křen, 2009; Koshland, 1953).



Obrázek 1 – Reakční mechanismus invertujících (A) a retenujících (B) glykosidáz je demonstrován na příkladu glukózy jako substrátu. R představuje sacharid nebo alkohol. Zdroj: Moracci et al., 2001.

Za určitých řízených podmínek lze glykosidázy využít k transglykosylační reakci, kdy se sacharidová jednotka přenáší na akceptor (např. jiný sacharid, alkohol). Většina glykosidáz inklinuje k hydrolyze glykosidové vazby více než k transglykosylaci (Wan et al., 2020). Pro podporu tvorby glykosidů je možné

provést termodynamicky řízenou reverzní hydrolýzu (kondenzační reakci), kdy je donorem glykosylu neaktivovaný monosacharid, jenž je přidáván ve vysokých koncentracích. Druhou variantou je kineticky řízená transglykosylace, kdy je použit aktivovaný donor (disacharid nebo glykosid s vhodnou dobře odstupující skupinou) a vzniká množství meziproductů (Zeuner et al., 2014; Danby et al., 2016).

Pro syntézu sacharidových sloučenin pomocí glykosidáz se používají dva zavedené postupy. První cestou je použití přirozeně se vyskytujících glykosidáz se syntetickými substráty. Druhou cestou je enzymové inženýrství, jímž se připravují glykosyntázy – mutované varianty glykosidáz (Bojarová et al., 2009). Cílenou mutací v aktivním místě enzymu dochází ke ztrátě hydrolytické aktivity a enzym je schopen glykosylovat specifické substráty ve vysokém výtěžku. Průkopnickou práci v tomto odvětví odvedl tým profesora Planase (Univerzita Ramona Llulla, Španělsko), který připravil glykosyntázu z původní glukonázy z *Bacillus licheniformis* nahrazením alaninu za kyselinu glutamovou v aktivním místě enzymu (E134A), čímž potlačil hydrolytickou aktivitu a získal výtěžek glykosylace až 90 % (Malet et al., 1998). Ve stejném roce vyšla též práce týmu profesora Witherse (Univerzita Britské Kolumbie, Kanada), ve které byla připravena glykosyntáza z β -glukosidázy z rodu *Agrobacterium* mutací E358A (Mackenzie et al., 1998). Henze a kolektiv (2014) využili stejného principu a připravili galaktosyntázu původně z *Bacillus circulans* substitucí glycinu za kyselinu glutamovou (E233G) a Nekvasilová a kol. (Nekvasilová et al., 2022). tuto galaktosyntázu použili k syntéze lakto-*N*-tetraózy se 71% výtěžkem a striktní regioselektivitou

Donorem glykosylu pro glykosyntázy jsou fluoridy daného glykosidu s opačnou anomerní konfigurací. Fluoridy jsou špatně dostupné a většinou nestabilní, ale místo nich lze použít stabilnější azidy nebo kombinaci obou donorů (Mészáros et al., 2021).

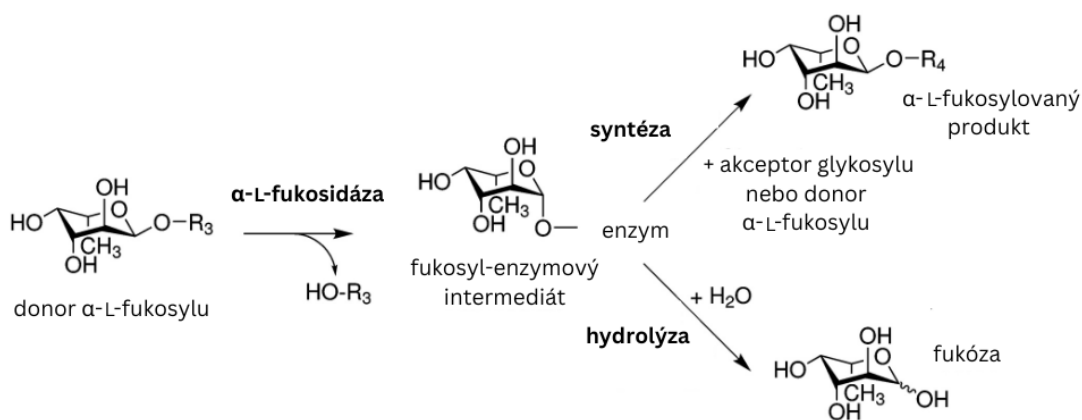
V následující kapitole jsou rozebrány α -L-fukosidázy, které jsou součástí rodiny glykosidáz a též předmětem experimentální části této práce. Pro klasifikaci glykosidáz do skupin dle strukturní příbuznosti byla publikována databáze CAZy (Carbohydrate Active Enzymes Database, <http://www.cazy.org/>), ve které jsou glykosidázy rozřazeny do klanů (GH-A až GH-R; GH značí Glycoside Hydrolase), rodin (GH1–GH174) a podrodin. Enzymy jsou klasifikovány na základě své aminokyselinové sekvence, která je úzce spojena se strukturními vlastnostmi enzymů a podle které lze odhadovat evoluční vztahy mezi jednotlivými enzymy a rodinami.

2.1.1 α -L-Fukosidázy

α -L-Fukosidázy (EC 3.2.1.51) jsou *exo*-glykosidázy katalyzující hydrolýzu fukosidů a/nebo transfukosylaci a jsou klasifikovány do rodin GH29, GH95 a GH151. α -L-Fukosidázy z rodiny GH95 využívají invertující katalytický mechanismus (viz obrázek č. 1) a byly nalezeny v bakteriích (zejména v rodech *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, a *Clostridium*) a v některých eukaryotních organismech (např. *Aspergillus nidulans*) (Carbohydrate Active Enzymes Database, <http://www.cazy.org/>; Katayama et al., 2004). Tyto fukosidázy štěpí specificky vazbu α -1,2 mezi fukosylem a galaktózou na neredukujícím konci oligosacharidů a jsou striktně hydrolytické. Fukosidázy z rodiny GH151 využívají retenující mechanismus a dosud byli charakterizováni pouze tři zástupci (Mészáros et al., 2021).

Nejvíce zástupců α -L-fukosidáz najdeme v rodině GH29: dle databáze CAZy je jich charakterizováno 57 (k únoru 2023). Jsou to retenující glykosidázy: v prvním kroku reakce nukleofilní aminokyselina aktivního místa enzymu napadá anomerní centrum donoru, čímž vzniká kovalentně vázaný fukosyl-enzymový intermediát. Fukosyl-enzymový intermediát je v druhém kroku napadán hydroxylovou skupinou – pochází-li hydroxyl z molekuly vody, pak je donor hydrolyzován, pochází-li z jiného sacharidu (který funguje jako akceptor),

pak dochází k transfukosylaci (Zeuner et al., 2014). Schéma popsaného mechanismu je uvedeno na Obrázku 2.



Obrázek 2 – Mechanismus hydrolýzy katalyzovaný glykosidázami z rodiny GH29 převažuje nad transglykosylací. Zdroj: Zeuner et al., 2014, upraveno.

α -L-Fukosidázy z rodiny GH29 se podle své substrátové specifity a fylogenetických vztahů dělí do dvou podrodin. Podrodina GH29-A štěpí vazbu α -1,2 mezi fukózou a galaktózou a také vazbu α -1,3/4/6 mezi fukózou a *N*-acetylglukosaminem (GlcNAc). α -L-Fukosidázy z rodiny GH29-A zpracovávají nitrofenyl- α -fukopyranosid (*p*NP-Fuc) jako donor a substrát transfukosylačních reakcí. Podrodina GH29-B má užší regioselektivitu: štěpí pouze fukosylové zbytky vázané vazbou α -1,3/4 na GlcNAc. Nejpoužívanější donor transfukosylačních reakcí je 3-fukosyllaktóza (Mészáros et al., 2021).

Heterologní produkce α -L-fukosidáz v hostitelský organismech *Escherichia coli* a *Pichia pastoris* (též známá jako *Komagataella phaffii*) mívá vysoké výtěžky. Enzymy bývají dobře rozpustné a jejich substrátová specifita nebývá striktně omezena. U divokých kmenů (*wild-type* – WT) α -L-fukosidáz bývá poměr transfukosylace a hydrolýzy v reakci silně nakloněn hydrolýze, což příliš nepřispívá syntetickému potenciálu těchto enzymů. Pro vyšší výtěžky syntetických reakcí je nutno připravit mutantní verze α -L-fukosidáz, konkrétně transfukosidázy a fukosyntázy (Wan et al., 2020).

α -L-Fukosidázy byly již identifikovány a charakterizovány u obratlovců, členovců, rostlin, hub a prokaryotních organismů (Intra et al., 2007). Právě původ α -L-fukosidáz ovlivňuje jejich substrátovou specifitu. α -L-Fukosidázy savčích tkání a mořských plžů mívají širokou substrátovou specifitu odpovídající specifitám rodiny GH29-A, zatímco mikrobiální α -L-fukosidázy obvykle štěpí pouze vazbu α -L-Fuc-(1→2)-D-Gal (Farkas et al., 2000). Experimentální část této diplomové práce se zaměřuje na α -L-fukosidázy ve vláknitých houbách.

2.1.1.1 Biologická funkce a význam α -L-fukosidáz

Studium fukosidáz je z velké míry podníceno biologickou důležitostí fukózy a fukosylovaných glykokonjugátů, které se uplatňují např. v potransfuzních reakcích, adhezi leukocytů a v interakcích s mikroorganismy (Becker et al., 2003); funkce fukózy jsou dále rozebrány v kapitole 2.2. Samotná α -L-fukosidáza hraje důležitou roli v mnoha biologických procesech. Podílí se na odštěpení koncové fukózy vázané α -1,2 na galaktosyl a na odštěpení fukózy vázané vazbou α -1,3, α -1,4 nebo α -1,6 na *N*-acetylglukosaminovém zbytku glykoproteinů a glykolipidů (Johnson et al., 1991).

Deficit nebo nefunkčnost α -L-fukosidázy vede k onemocnění fukosidóze, lyzomálnímu onemocnění s autozomálně recesivní dědičností. Klinické projevy zahrnují psychomotorickou retardaci, dysmorfie v obličeji, zpomalení růstu, rekurentní infekce, dysostosis multiplex, angiokeratomy a záchvaty. Pacienti ukládají ve tkáních fukosylované glykokonjugáty a močí vylučují vysoká množství glykopeptidů, zejména glykoasparagin α -L-Fuc-(1→6)-D-GlcNAc- β -1-Asn, který bez aktivní α -L-fukosidázy není možné metabolizovat (Willems et al., 1991). V klinické praxi rozlišujeme dva typy fukosidózy: typ I (těžký infantilní typ; celkové zhoršení neurologických funkcí nastává v prvním či druhém roce života) a typ II (mírnější typ; příznaky se objevují postupně, pacienti přežívají do druhé či třetí dekády), avšak tyto typy představují pouze dva extrémy na širokém spektru. Gen pro α -L-fukosidázu (*fucal*) se nachází na chromozomu 1p34 a již

bylo identifikováno přes 20 různých mutací. Léčba dosud není dostupná (Michalski et al., 1999).

Zvýšené hladiny α -L-fukosidázy nacházíme u pacientů s hepatocelulárním karcinomem. Pacienti s jaterní cirhózou, u kterých je pozorována zvýšená sérová aktivita α -L-fukosidázy, patří do skupiny s vysokým rizikem rozvoje hepatocelulárního karcinomu a tyto zvýšené aktivity lze pozorovat nejméně 6 měsíců před detekcí hepatocelulárního karcinomu ultrasonografií (Ishizuka et al., 1999; Zhou et al., 2006). Sérové aktivity α -L-fukosidázy (konkrétně α -1,6-FucT) jsou prognostickým faktorem rekurence kolorektálního karcinomu (Ayude et al., 2003).

2.2 Fukóza a její deriváty

Fukóza byla poprvé identifikována v oligosacharidech mořských řas, od nichž dostala své jméno (z řeckého slova pro řasy *phykos*). Systematicky se jedná o 6-deoxy-L-galaktózu, která je jedním z mála monosacharidů vyskytujících se v přírodě jako L-izomer. V rámci posttranslačních úprav je navázána na glykany a glykolipidy využívané např. v mateřském mléce, střevním hlenu a antigenech krevních skupin. Fukosylované oligosacharidy hrají roli ve fyziologických i patologických procesech (Guzmán-Rodríguez et al., 2019).

2.2.1 Výskyt a význam fukosylovaných sloučenin

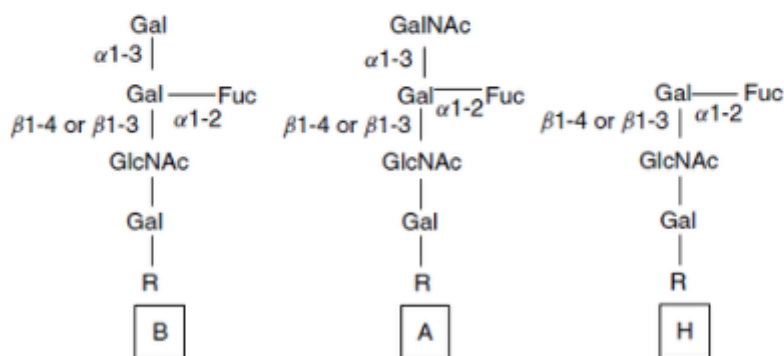
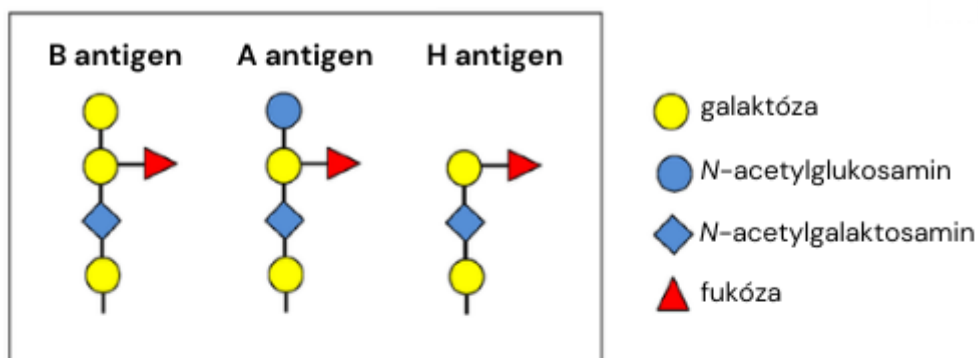
Endogenní fukóza je v lidském těle vracena do oběhu pomocí lyzosomální α -L-fukosidázy, která odštěpuje fukózu z N-glykanů a přenáší ji na GlcNAc nebo galaktózové zbytky glykanů (Johnson et al., 1991). Kromě této recyklační (záchranné) dráhy se fukóza získává *de novo* syntetickou cestou, a to převedením GDP-manosidu na GDP-fukosid pomocí sekvenční reakce GDP-manosid-4,6-dehydratázy a enzymu FX (GDP-4-keto-6-deoxymanóza-3,5-epimeráza-4-reduktáza; Smith et al., 2002; Sullivan et al., 1998).

Zdrojem exogenní fukózy jsou brambory, maniok, kiwi a sójové boby. Bohatým zdrojem fukózy jsou mořské řasy, ve kterých se fukóza vyskytuje v sulfatované formě v polymeru fukoidanu. Fukoidan lze koupit jako doplněk stravy jako extrakt z mořských řas druhů např. *Laminaria angustata* a *Fucus vesiculosus* (Adhikari et al., 2022).

Volná fukóza (endogenní i exogenní) je nejprve fosforylována a poté konjugována s molekulou GDP. Tato reakce je katalyzována fukokinázou a GDP-fukosid-pyrofosforylázou (Pastuszak et al., 1998). Molekuly GDP-fukosidu jsou transportovány do Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula, kde jsou konjugovány k proteinům a glykanům. proces konjugace je katalyzována třinácti fukosyltransferázami (FUT1–FUT11 a POFUT1–POFUT2) a jejím výsledkem je široká škála fukosylovaných molekul, které mají různé regulační a strukturní funkce (Adhikari et al., 2022).

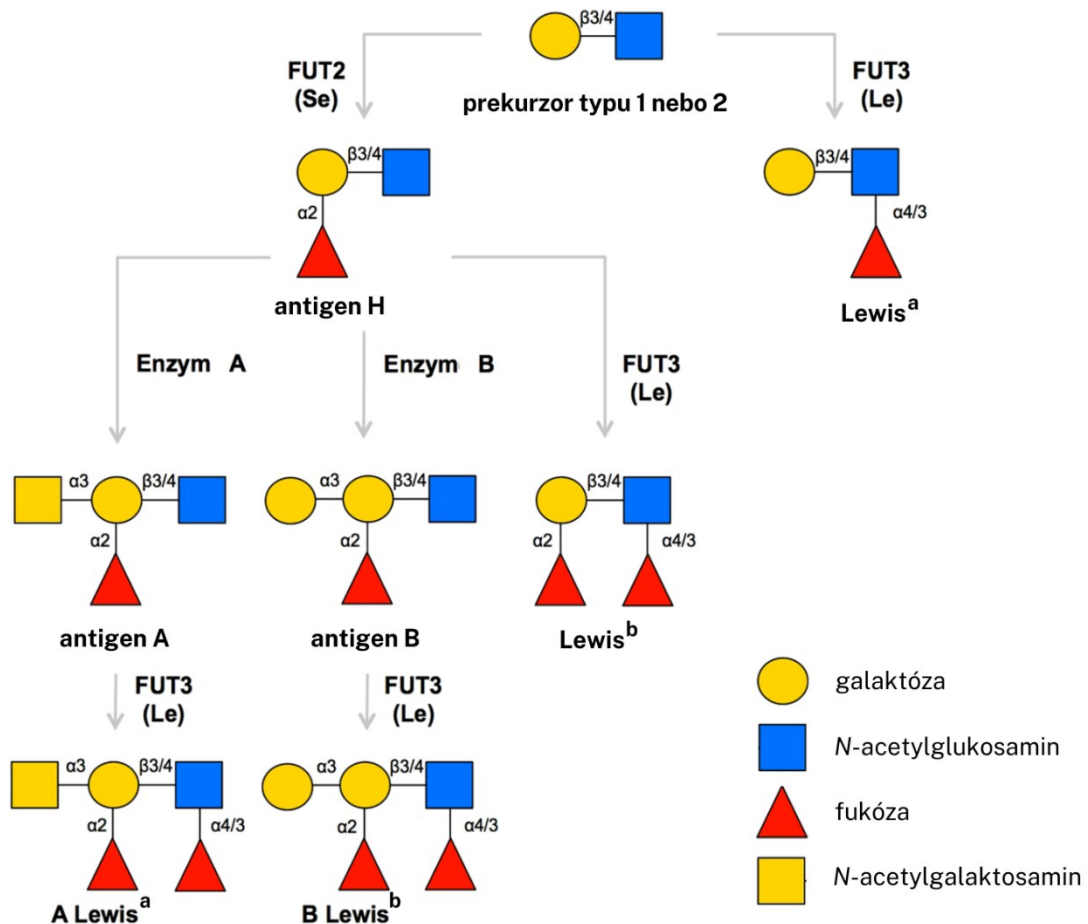
2.2.2 Zástupci fukosylovaných sloučenin

Mezi nejznámější fukosylované glykany patří antigeny krevního systému AB0. V erytroidních prekurzorech je exprimována α -1,2-fukosyltransferáza, která na galaktózové konce oligosacharidových prekurzorů H-antigenu váže fukózu transfukosylací z GDP-fukosidu. U nosičů skupin A, B a AB je H-antigen dále modifikován kodominantními glykosyltransferázami za vzniku A- a/nebo B-antigenu; u nosičů skupiny 0 je exprimován samotný H-antigen. U sekretorů se v epiteliálních tkáních a slinných žlázách vyskytuje druhá α -1,2-fukosyltransferáza, díky níž jsou u sekretorů přítomny antigeny i v jiných tělních tekutinách než v krvi (Lowe, 1993). Struktury antigenů AB0 systému jsou schematicky zobrazeny na Obrázku 3.



Obrázek 3 – Struktury antigenů AB0 systému zobrazeny pomocí dvou různých schémat. Zdroj obrázku nahoře: Cabezas-Cruz & de la Fuente, 2017; dole: Wang, 2006; upraveno.

α -1,2-Fukosyltransferáza produkující H-antigen (H-transferáza) je produktem genu *fut1*, zatímco α -1,2-fukosyltransferáza odpovědná za sekreci antigenů v epiteliích (Se-transferáza) je produktem genu *fut2*. Přítomnost *fut2* má krom AB0 systému vliv také na produkci antigenů krevního systému Lewis. Antigen Lewis^a je tvořen α -1,3/4-fukosyltransferázou (Le-fukosyltransferázou; FUT3), která váže fukózu na glykosfingolipidový prekurzor typu 1. Přítomnost dominantní alely genu *fut2* zajišťuje vznik antigenu Lewis^b, který má oproti Lewis^a ještě jednu fukózu navázanou α -1,2-fukosyltransferázou (Becker et al., 2003). Struktury Lewis antigenů a jejich vznik jsou schematicky popsán na Obrázku 4.



Obrázek 4 – Vznik Lewis antigenů je podmíněn genotypem v AB0, Se a Lewis systému. Zdroj: Barbé et al., 2018, upraveno.

V leukocytech a endoteliálních buňkách jsou produkovány dvě α -1,3-fukosyltransferázy: FUT4 a FUT7 (produkty genů *fut4* a *fut7*). Obě fukosyltransferázy katalyzují finální reakci biosyntézy ligandů pro selektiny trombocytů (P-selektin), endoteliálních buněk (E- a P-selektin) a leukocytů (L-selektin). FUC4 a FUT7 vážou fukózu na α -2,3-sialyl-N-acetyllaktosaminoligosacharidu za vzniku sialyl-Lewis^x tetrasacharidu. Obě fukosyltransferázy jsou nutné pro normální funkci a pohyb leukocytů: zmíněné selektiny a jejich ligandy zajišťují adhezi leukocytů a jejich následnou extravazaci (Natsuka et al., 1994).

2.2.3 Fukóza v patologických stavech

Fukosylace proteinů a glykanů je pro lidské tělo zásadní, neboť je nutná např. pro správnou funkci imunitního systému, adhezi molekul, fertilizaci a vývoj orgánů. Patologická (de)regulace exprese jednotlivých fukosyltransferáz vede k abnormální fukosylaci, která se vyskytuje např. při zánětlivých stavech, malignitách nebo nádorových metastázích (Adhikari et al., 2022).

V rakovinných buňkách vede zvýšená produkce FUT1 a FUT3 ke zvýšené produkci Lewis^x a Lewis^a antigenů a následně i sialovaných Lewis antigenů. Naopak snížená exprese fukosyltransferáz v rakovinných buňkách má za následek úbytek či ztrátu antigenů A a/nebo B. Obě tyto změny korelují se špatnou prognózou probíhajícího nádorového onemocnění. Sialyl-Lewis struktury napomáhají klonální expanzi nádorových buněk a též umožňují invazi do cév prostřednictvím vazby na endoteliální selektiny (Kim et al., 1997).

Další případ zvýšené produkce fukosylovaných glykanů je způsoben zvýšenou expresí α -1,6-fukosyltransferázy (FUT8). FUT8 katalyzuje adici fukózy na *N*-acetylglukosaminový zbytek *N*-glykanů a v nádorových buňkách je často exprimována ve zvýšené míře, např. při rakovině plic, jater, vaječníků, prostaty, prsu, štítné žlázy, pankreatu a kůže. FUT8 a její produkty hrají roli v úniku před imunitními buňkami regulací exprese PD-1 – kontrolního bodu imunitního systému (PD-1 – programmed cell death protein 1). FUT8 se podílí také na omezení citlivosti na inhibitory tyrosinkinázy, což má za následek zvýšený buněčný růst. α -1,6-Fukosylovaný α -fetoprotein (AFP), vznikající specificky při hepatocelulárním karcinomu, má potenciál laboratorně odlišit hepatocelulární karcinom od chronických onemocnění jater (Bastian et al., 2021).

Mutace v genu pro transportér GDP-fukosidu (SLC35C1) vede ke snížení fukosylace proteinů v buňkách a k onemocnění LAD-2 (deficit adheze leukocytů 2, *leukocyte adhesion deficiency 2*). LAD-2 je typický chronickými bakteriálními infekcemi, které jsou způsobeny ztrátou schopnosti extravazace imunitních

buněk, protože nevzniká sialyl-Lewis^x – viz kapitola 2.2.2 (Adhikari et al., 2022; Etzioni et al., 2007).

Fukóza a látky ji obsahující hrají roli v bakteriálních infekcích, jak je tomu v případě infekce *Helicobacter pylori*. Interakce *H. pylori* a Le^b antigenu, umožněná specifickými receptory *H. pylori*, může přispívat k rozvoji peptického vředového onemocnění. Po nakažení *H. pylori* setrvává v hlenové vrstvě žaludku, ale naváže-li se skrz Le^b na epitel, zvyšuje se riziko rozvinutí patologického stavu. Tato interakce vysvětluje vyšší prevalenci vředového onemocnění u nosičů krevní skupiny 0 ve srovnání se skupinami A a B. (Borén et al., 1993).

2.3 Oligosacharidy lidského mléka (HMO)

Lidské mateřské mléko je považováno za zlatý standard ve výživě kojenců; Světová zdravotnická organizace doporučuje kojit alespoň do věku šesti měsíců. Kojení snižuje pravděpodobnost výskytu atopické dermatitidy, astmatu, infekcí dýchacích cest, gastrointestinálních infekcí, diabetu prvního i druhého typu a obezity (Ip et al., 2007).

Mateřské mléko poskytuje kojenci bioaktivní sloučeniny, které navozují imunitní toleranci, zabraňují patogenním infekcím, snižují propustnost střev a působí jako prebiotika pro komenzální mikroorganismy gastrointestinálního traktu. Jednou z nejdůležitějších složek mateřského mléka jsou oligosacharidy mateřského mléka (*human milk oligosaccharides* – HMOs), které plní několik z výše zmíněných funkcí. Předpokládá se, že začlenění většího množství různých HMO do kojenecké výživy zlepší zdraví kojenců, kteří nemohou být kojeni přirozeným mateřským mlékem (Walsh et al., 2020).

2.3.1 Diverzita HMO

Základními stavebními bloky oligosacharidů mateřského mléka jsou monosacharidy glukóza, galaktóza, GlcNAc, fukóza a kyselina sialová (*N*-acetylneuraminová kyselina, Neu5Ac). Všechny oligosacharidy jsou vystavěny

na laktózové jednotce (β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc), na niž se pomocí fukosyltransferáz váže fukóza (za vzniku 2'-O-fukosyllaktózy a 3-O-fukosyllaktózy – 2'FL a 3FL). Pomocí sialyltransferáz se váže kyselina sialová a vzniká 3'-sialyllaktóza a 6'-sialyllaktóza – 3'SL a 6'SL. Na laktózovou jednotku může být také vázán GlcNAc (β -1,3/6) a galaktóza vázána pomocí galaktosyltransferáz vazbou β -1,3/4. Používané zkratky, názvy a struktury jsou shrnuty v Tabulce 1 a Obrázku 5.

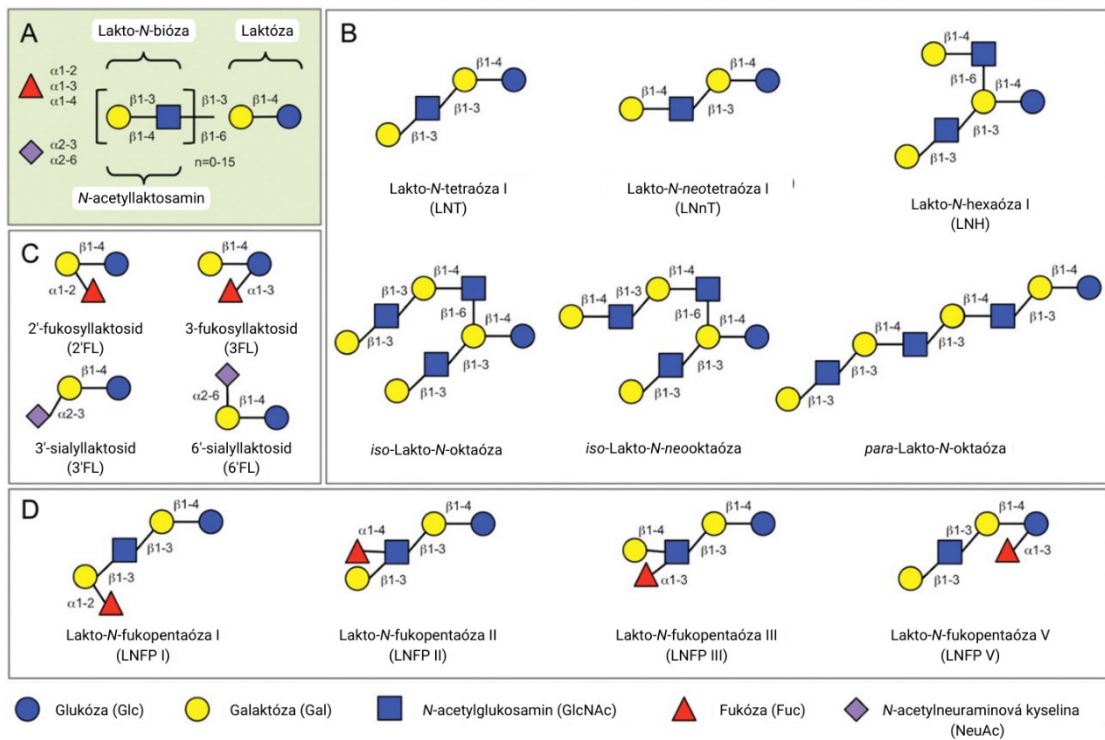
V mléčných žlázách vzniká široká paleta oligosacharidů: bylo charakterizováno 19 hlavních molekul, které mohou být lineární i větvené a na nichž mohou být navázány další fukózy a sialové kyseliny (Ayechu-Muruzabal et al., 2018). Celkově bylo identifikováno přes 200 různých HMO struktur; v mateřském mléce se vyskytují v celkové koncentraci 5–20 g/l (Zeuner et al., 2020 a). V kravském mléku, které se používá jako základ kojenecké výživy, je pouze 0,05 g/l oligosacharidů. 50–80 % HMO je fukosylovaných, 10–20 % je sialovaných (Bode, 2012).

Tabulka 1 – Názvy, zkratky a zjednodušené struktury hlavních HMO. Šipky mezi řádky ukazují větvení řetězce – viz Obrázek 5. Zdroj: Faijes et al., 2019; Saumonneau et al., 2016.

HMO	Zkratka	Struktura
2'-O-fukosyllaktóza	2'FL	α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc
3-O-fukosyllaktóza	3FL	β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)]-D-Glc
Lakto-N-tetraóza	LNT	β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc
Lakto-N-fukopentaóza I	LNFP I	α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc
Lakto-N-fukopentaóza II	LNFP II	β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)]- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc
Lakto-N-difukoheptaóza I	LNDFH I	α -L-Fuc-(1 \rightarrow 2)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 3)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 4)]- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc

Lakto- <i>N</i> -neotetraóza	LN n T	β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc
Lakto- <i>N</i> -fukopentaóza III	LNFP III	β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc
<i>para</i> -Lakto- <i>N</i> -neohexaóza	<i>p</i> LN n H	β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc
F- <i>para</i> -lakto- <i>N</i> -neohexaóza	F <i>p</i> LN n H	β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)- β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc
Lakto- <i>N</i> -neohexaóza	LN n H	β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3) \searrow β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc \nearrow β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)
F-lakto- <i>N</i> -neohexaóza I	FLN n H I	β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3) \searrow β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc \nearrow β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)
F-lakto- <i>N</i> -neohexaóza II	FLN n H II	β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3) \searrow β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc \nearrow β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)
DF-lakto- <i>N</i> -neohexaóza	DF-LN n H	β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3) \searrow β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc \nearrow β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-[α -L-Fuc-(1 \rightarrow 3)]- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 3)

Difukosyllaktóza (lakto- difukotetraóza)	DFL (LDFT)	α -L-Fuc-(1→2)- β -D-Gal-(1→4)-[α -L-Fuc-(1→3)]-D-Glc
3'-Sialyllaktóza	3'SL	α -Neu5Ac-(2→3)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc
6'-Sialyllaktóza	6'SL	α -Neu5Ac-(2→6)- β -D-Gal-(1→4)-D-Glc



Obrázek 5 – Schematické znázornění vybraných HMO molekul. Rámeček A obsahuje základní strukturní bloky a výčet možných vazeb. B: Laktóza může být prodloužena přidáním disacharidů (LNT, LNnT). Adice disacharidů může vést k dalšímu lineárnímu prodloužení (vazbou β -1,3 vzniká *para*-lakto-N-oktaóza) nebo k větvení řetězce (vazbou β -1,6 vznikají *iso*-HMO). C: Laktóza může být fukosylována a sialována za vzniku trisacharidů. D: Prodloužené řetězce mohou být fukosylovány za vzniku různých fukosylovaných regioizomerů. Zdroj: Bode, 2012, upraveno.

Ve skladbě HMO lze pozorovat interindividuální i intraindividuální rozdíly. HMO dosahují různých koncentrací v různých laktačních fázích a v různých částech dne; vliv má též strava matky a potřeby kojence – např. mléko pro nedonošené kojence obsahuje vyšší koncentrace 3'SL (Walsh et al., 2020). Složení

HMO lze ovlivnit probiotickými doplňky stravy, se kterými dochází ke zvýšení koncentrací 3FL a 3'SL (Seppo et al., 2019).

Variabilita koncentrací jednotlivých HMO je z velké míry dána genetickou dispozicí matky, zejména variací alel sekretorových a Lewis genů. Aktivní sekretorský gen kóduje fukosyltransferázu FUT2, která přidává fukózu α -1,2 vazbou za vzniku 3FL a LNFP I. Aktivní Lewis gen dává vznik FUT3, která umožňuje syntézu LNFP II a III (Ayechu-Muruzabal et al., 2018). Na základě Se/Le fenotypu a na něm závislé skladby HMO se mateřské mléko klasifikuje do čtyř skupin (Thurl et al., 1997).

Prevalence sekretorů se liší mezi kontinenty a etnickými skupinami: v evropské populaci se odhaduje 80 % sekretorů, u původních obyvatel Austrálie a Ameriky je téměř 100 % sekretorů, v severní Indii 75 % a v jižní Indii 22 % sekretorů (Daniels, 2013). Odhaduje se, že geografické rozdíly v sekretorském statusu jsou důsledkem selektivního tlaku, který způsobily patogeny prostředí, a který utvářel různé haplotypy napříč kontinenty a populacemi. Kojení mlékem matky sekretorky (s α -1,2-fukosylovanými oligosacharidy) koreluje s nižší incidencí dětských průjmů původců *Campylobacter*, calcivirus a ETEC (enterotoxická *E. coli*), zatímco neseekretorové mléko chrání před norovirovou infekcí. Mechanismus této obrany spočívá v tom, že specifické struktury některých HMO působí anti-adhezivně (buď přímo navázáním na patogen nebo kompetitivní inhibicí receptorů epitelálních buněk) a zároveň prebioticky (Walsh et al., 2020).

2.3.2 Funkce HMO

Antimikrobiální a antivirotické účinky HMO závislých na Se/Le nosičství byly již zmíněny, a tak zbývá jen doplnit výčet patogenů, proti kterým jsou HMO účinnou zbraní. Proti rotavirové infekci chrání sialované a fukosylované HMO (2'FL, 3'SL, 6'SL) tím, že se váží přímo na virus, čímž znemožňují viru vstoupit do hostitelské buňky (Laucirica et al., 2017). LNT a její fukosylovaný derivát

(LNFP I) inhibují růst bakterie *Streptococcus agalactiae*, též GBS (*Group B Streptococcus*, častý patogen vaginy a nejčastější příčina novorozeneckých infekcí; Lin et al., 2017).

Fukosylované HMO vykazují prebiotický účinek, který funguje jako další obrana proti patogenním bakteriím. Komenzální rody *Bifidobacterium* a *Bacteroides* jsou schopny metabolizovat fukosylované HMO (zejména 2'FL a 3FL) efektivněji než některé patogenní rody (*E. coli*, *Clostridium*, *Enterococcus*), což podporuje růst komenzálů, a naopak zamezuje expanzi patogenů (Marcobal et al., 2010).

FUT2 dependentní HMO snižují incidenci ekzému asociovaného s IgE a alergických onemocnění u kojenců narozených císařským řezem (Sprenger et al., 2017). Tento jev lze vysvětlit jako další důsledek prebiotického účinku některých HMO, který reguluje střevní mikrobiom ve tvorbě mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA – *short-chain fatty acids*; acetát, butyrát a propionát). SCFA jsou zdrojem energie pro epitelální buňky střeva a jsou mediátory alergického zánětu, který je vnímán jako vedlejší produkt metabolické aktivity střevních bakterií (Munblit et al., 2017).

2.3.3 Kojenecká výživa

Zde je nutno podotknout, že většina výše zmíněných studií probíhala *in vitro* na buněčných modelech. Existuje velice málo epidemiologických observačních studií, které dokládají závěry studií *in vitro*. V posledních letech byly zahájeny klinické studie zabývající se bezpečností použití specifických kombinací HMO v kojenecké výživě, konkrétně 2'FL s scGOS (galaktooligosacharidy s krátkým řetězcem) a 2'FL s LNnT. Výsledky studií se shodují na dobré snášenlivosti a na prospívání srovnatelném s dětmi kojenými mateřským mlékem. Zatím nelze s jistotou říct, zda přidané HMO přináší výhody pro vývoj imunitního systému kojence či zda zmírňují náchylnost k infekcím. Předpokládá se, že HMO se podílejí na regulaci slizniční imunity a budování imunitní bariéry mnoha

způsoby, ale specifické mechanismy zůstávají nedostatečně pochopeny a mohou být komplikovány interakcemi jednotlivých zkoumaných struktur (Ayechu-Muruzabal et al., 2018).

V roce 2015 byly 2'FL a DFL schváleny Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) jako bezpečné nové složky potravin pro kojeneckou výživu, v roce 2022 byla platnost schválení prodloužena a rozšířena o LNnT (Turck et al., 2022). Některé další HMO již jsou komerčně dostupné, ale za poměrně vysoké ceny a se stále omezenou velkovýrobou. Do kojeneckých formulí jsou přidávány fruktooligosacharidy a galaktooligosacharidy, ačkoli se v lidském mateřském mléce přirozeně nevyskytují a neplní stejné funkce jako HMO; fungují alespoň jako prebiotika (Faijes et al., 2019).

2.3.4 Enzymová syntéza fukosylovaných HMO

Tradiční přístup získávání HMO pro laboratorní výzkum spočíval v izolaci HMO z mateřského mléka, což sice přinášelo struktury v jejich přirozené formě, avšak v malém množství (Walsh et al., 2020). V nedávných letech se začaly rozvíjet metody syntetické produkce HMO využívající enzymové nebo chemoenzymové postupy. V této oblasti se čím dál častěji používá proteinové inženýrství, které navrhuje a vytváří cílené mutace v aminokyselinové sekvenci enzymů s cílem zlepšit vlastnosti enzymu pro dané použití. Alternativně se též používá metoda řízené evoluce, kdy je enzym podroben opakované mutagenезi a dochází k napodobení procesu přirozeného výběru opět s cílem upravit enzymy pro dosažení požadovaných vlastností.

Fukosylované HMO jsou *in vivo* syntetizovány fukosyltransferázami, které jsou pro produkci *in vitro* v preparativním množství problematické vinou drahého donoru (GDP-Fuc), nízkého výtěžku heterologní exprese a nízké stability. Proto jsou čím dál tím více zkoumány mikrobiální α -L-fukosidázy, které lze jako rekombinantní proteiny produkovat ve velkém množství, využívají dostupnější a levnější donory a bývají robustnější. Jejich nevýhodou může být

převažující hydrolytická aktivita nad transfukosylací a nízká regioselektivita (Zeuner et al., 2020 a).

Experimentální enzymové syntézy HMO používají např. α -1,2-fukosyltransferázu z *Helicobacter pylori* (HpFucT2) pro výrobu 2'FL z GDP-Fuc a laktózy. Alternativou je mutantní α -1,2-fukosidáza z *Bifidobacterium bifidum* (BbAfcA N423H-D766N), která dokáže vyrobit 2'FL z laktózy a β -fukosylfluoridu (β -FucF). Dalším zkoumaným enzymem je mutantní α -1,3/4-fukosidáza z *Bifidobacterium longum subsp. infantis* používaná k syntéze LNFP II, LNFP III a dalších HMO (pro každý produkt je vytvořena jiná mutace; Faijes et al., 2019). Shrnutí zkoumaných enzymů úspěšných v produkci fukosylovaných HMO je uvedeno v tabulce níže.

Tabulka 2 – Experimentálně využívané enzymy pro syntézu fukosylovaných HMO. U rozdílných hodnot výtěžků pro různé koncentrace a poměry donorů a akceptorů byly uvedeny pouze reakce s nejvyšším výtěžkem. XyG – xyloglukan. Zdroj: Zeuner & Meyer, 2020, upraveno.

Enzym (organismus)	Donor	Akceptor	Produkt	Výtěžek
α -L-fukosidáza (<i>Paenibacillus</i> sp.)	pNP-Fuc	Lac	2'FL	13 %
α -1,2-fukosidáza (<i>Bifidobacterium bifidum</i>)	3FL	LNT	LNFP II	14 %
	3FL	LN _n T	LNFP III	3 %
mutantní α -1,2-fukosidáza (<i>Bifidobacterium bifidum</i>)	3FL	LNT	LNFP II	39 %
α -1,3/4-fukosidáza (<i>Bifidobacterium infantis</i>)	3FL	LNT	LNFP II	12 %
mutantní α -1,3/4-fukosidáza (<i>Bifidobacterium infantis</i>)	3FL	LNT	LNFP II	48 %
	3FL	LN _n T	LNFP III	52 %
	3FL	LNFP I	LNDFH I	58 %
	3FL	2'FL	DFL	59 %

	3FL	LN _n H	FLN _n H I/II + DFLN _n H	77 %
	3FL	pLN _n H	FpLN _n H	61 %
α -1,3/4-fukosidáza (<i>Clostridium perfringens</i>)	3FL	LNT	LNFP II	50 %
	3FL	LN _n T	LNFP III	17 %
α -L-fukosidáza (<i>Fusarium graminearum</i>)	2'FL	LNT	LNFP I	15 %
	XyG	Lac	2'FL	14 %
α -L-fukosidáza (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>)	2'FL	LNT	LNFP I	18 %
α -L-fukosidáza (<i>Tannerella forsythia</i>)	2'FL	LNT	LNFP I	35 %
	XyG	Lac	2'FL	0,7 %
α -L-fukosidáza (<i>Thermotoga maritima</i>)	pNP-Fuc	Lac	2'FL	32 %
	2'FL	LNT	LNFP I	10 %

Bifidobacterium bifidum a *Bifidobacterium infantis* jsou komenzální bakterie střev, což vysvětluje jejich přirozenou schopnost metabolizovat HMO. U patogenních organismů (*Clostridium perfringens*, *Fusarium graminearum*, *Xanthomonas campestris*, *Tannerella forsythia*) se odhaduje, že využívají své transglykosylační enzymy k produkci glykanů, které používají při invazi a kolonizaci hostitelského organismu (Zeuner et al., 2020 a).

2.3.4.1 Heterologní exprese

Všechny enzymy v tabulce výše byly produkovány rekombinantně: geny bakteriálních enzymů byly exprimovány buňkami *E. coli* a jediný fungální zástupce byl exprimován v *P. pastoris*, což je kvasinka úspěšně používá pro produkci eukaryotních enzymů. Tento jednobuněčný organismus dokáže

provádět některé posttranslační modifikace, kterých jsou schopné vyšší eukaryotní organismy, čímž se liší od bakteriálních produkčních systémů. Oproti vyšším eukaryotám je kultivace *P.* rychlejší, levnější, jednodušší a produkce mívá vyšší výtěžek (Cregg et al., 1993).

P. pastoris patří mezi methylootropní kvasinky, tzn. dokáže využívat methanol jako zdroj uhlíku. K metabolizaci methanolu využívá alkoholoxidázu (AOX), jež je kódována genem AOX1 a v menší míře genem AOX2. Exprese AOX1 genu je regulována a indukována methanolem (Cregg et al., 1993). V experimentální části této práce byly použity buňky KM71, které mají inaktivovaný gen AOX1. Sekvence kódující alkoholoxidázu je součástí plazmidu, do kterého se vkládá gen produkovaného enzymu (Cregg et al., 2000).

E. coli je nejpoužívanější systém heterologní exprese proteinů pro experimentální i terapeutické použití. Tato bakterie roste velice rychle, je schopna vysokých výtěžků a mechanismus její heterologní exprese je dobře znám. Bohužel při produkci eukaryotních proteinů se může stát, že produkovaný protein je degradován endogenními proteázami a/nebo uzavřen do inkluzních tělísek, ze kterých je třeba protein převést do rozpustné formy složitou a časově náročnou metodikou (Li et al., 2018). Krom toho není *E. coli* schopná některých posttranslačních úprav, které se odehrávají v eukaryotních organismech – např. glykosylace proteinů (Rosano et al., 2014).

Dalším možným přístupem k syntéze HMO jsou buněčné továrny (*cell factories*), které jsou založeny na transformaci substrátů dodaných do média pomocí bakteriálních či kvasinkových kmenů transformovaných příslušnými enzymy, nejčastěji glykosyltransferázami. Je přitom využíván metabolický aparát použitého mikroorganismu (nejčastěji *E. coli*) a vlastní transport donoru/akceptoru do buňky, což může zamezit inhibičním účinkům (vedlejších) produktů (Faijes et al., 2019).

3 CÍLE PRÁCE

- Prozkoumání knihovny vláknitých hub a nalezení zástupců vykazujících α -L-fukosidázovou aktivitu vůči pNP- α -L-fukosidu.
- Exprese, purifikace a charakterizace rekombinantní varianty alespoň jedné α -L-fukosidázy,
 - komerční plazmid s příslušným genem bude navržen ve spolupráci s konzultantem na školicím pracovišti.
 - Analýza regiosektivity a syntetického potenciálu připraveného rekombinantního enzymu.
- Syntéza fukosylovaných oligosacharidů.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Technické vybavení a materiál

4.1.1 Přístrojové vybavení

- aparatura na agarózovou elektroforézu (Bio-Rad, USA);
- aparatura na SDS-PAGE (Bio-Rad, USA);
- centrifuga Minicentrifuge Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, USA);
- centrifuga Universal 320 R (Hettich, Německo);
- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5804 R (Eppendorf, USA);
- centrifuga Sorvall Centrifuge RC 6+ (Thermo Scientific, USA);
- centrifuga Himac CR22N (Hitachi, Japonsko);
- elektroporátor MicroPulser Electroporator (Bio-Rad, USA);
- elektroporační kyvety (Bio-Rad, USA);
- fluorimetr Qubit (Invitrogen, USA);
- HPLC Nexera XR (Shimadzu, Japonsko) s kolonou Luna NH₂, (plně porézní částice 10 μm s 100 Å póry, 250 mm × 21,2 mm (Phenomenex, USA) v online spojení s hmotnostním spektrometrem LS-MS 2020 (Shimadzu, Japonsko);
- laminární box MSC 9 (Jouan, Velká Británie);
- laminární box SafeFast (Schoeller Instruments, ČR);
- magnetická míchačka Arex (Velp Scientifica, Itálie);
- oscilační mlýn MM200 (Retsch, Německo);
- pH metr pH 211 Microprocessor pH Meter (Hanna Instruments, ČR);
- spektrofotometr Sunrise Tecan (Tecan, Švýcarsko);
- spektrofotometr UVmini-1240 (Shimadzu, Japonsko);
- systém afinitní chromatografie Äkta Purifier (Amersham Biosciences, Velká Británie) s kolonou Q-Sepharose (Cytiva, USA) a Fractogel EMD SO₃, (Merck, Německo);

- systém rychlé proteinové kapalinové chromatografie (FPLC) Äkta Prime Plus (Amersham Biosciences, Velká Británie) s kolonou HisTrap HP (Cytiva, USA);
- termocykler T100 (Bio-Rad, USA);
- termomixér Thermomixer comfort (Eppendorf, USA);
- třepačka IKA KS 4000 ic control (Schoeller, ČR);
- třepačka SBM/SS-X (Kuhner, Švýcarsko);
- třepačka a inkubátor NB-205QF (N-Biotek, Jižní Korea);
- UV lampa UV 240 (A. Krüss Optronic, Německo);
- ultrazvukový buněčný disruptor UP50 (Ultrasound Technologies, Velká Británie);
- váhy Precisa 80A-200M (Swiss Quality, Švýcarsko);
- vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie).

4.1.2 Kultivační média

- Sporulační agar pH 5,5: glycerol 125 g/l (VWR Chemicals, ČR), sladový extrakt 45 g/l (Oxoid, ČR), NaCl 15 g/l (Lach-Ner, ČR), NH_4NO_3 0,44 g/l (Lach-Ner, ČR), MgSO_4 0,05 g/l (Lachema, ČR), CuSO_4 0,0015 g/l (Lachema, ČR), agar 30 g/l (Oxoid, ČR).
- Peptonové médium pH 6,0: kvasničný extrakt 0,5 g/l (Oxoid, ČR), bakteriologický pepton 5,0 g/l (Oxoid, ČR), KH_2PO_4 3,0 g/l (Lach-Ner, ČR), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 5,0 g/l (Lach-Ner, ČR), hydrolyzát kaseinu 7,5 g/l (Oxoid, ČR).
- Luria-Bertani (LB) médium pro *E. coli*: trypton 10 g/l (Oxoid, ČR), kvasničný extrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l.
- Luria-Bertani (LB) agar pro *E. coli*: LB médium s přidavkem agarózy (2 g/100 ml).

- Terrific Broth (TB) médium pro *E. coli* o pH 7,5: trypton 12 g/l, kvasničný extrakt 24 g/l, glycerol 4 ml/l, 17 mmol/l KH_2PO_4 (2,31 g/l), 72 mmol/l K_2HPO_4 (12,54 g/l; Lach-Ner, ČR).
- YPD (yeast extract, peptone and dextrose) médium pro *P. pastoris*: kvasničný extrakt 10 g/l, pepton 20 g/l, D-glukóza (přidáváno po sterilizaci ze zásobního roztoku – Lach-Ner, ČR; dále vždy D-glukóza).
- YPDA agar pro *P. pastoris*: YPD médium s přidavkem agarózy (2 g/100 ml).
- BMGY (*Buffered Glycerol Complex Medium*) médium pro produkci *P. pastoris*: kvasničný extrakt 10 g/l, pepton 20 g/l, 10 % glycerol, 0,1 mol/l draselno-fosfátový pufr, 10 % YNB (yeast nitrogen base; Carl-Roth, Německo), 0,02 % biotin (BioChemika, Švýcarsko).
- BMMY (*Buffered Methanol Complex Medium*) médium pro indukci *P. pastoris*: kvasničný extrakt 10 g/l, pepton 20 g/l, 0,1 mol/l draselno-fosfátový pufr, 10 % YNB, 0,02 % biotin, 0,5 % methanol.
- BMMH (*Buffered Methanol Minimal Medium*) médium: 0,1 mol/l draselno-fosfátový pufr, 10 % YNB, 0,02 % biotinu, 0,5 % methanolu (Isolab, Německo).

4.1.3 Zásobní roztoky

Induktory: 0,5% D-arabinóza (0,25 g/50 ml; Carbosynth, Velká Británie); 2,5% L-fukóza (1,25 g/50 ml; Carbosynth, Velká Británie); 20% D-glukóza (ze zásobního roztoku); 1% fukoidan (1 g/100 ml; izolovaný z *Laminaria japonica*, Carbosynth, Velká Británie).

Substráty: 10 mmol/l *p*NP-Fuc (*p*-nitrofenyl- α -L-fukopyranosid; Carbosynth, Velká Británie); 10 mmol/l arabinóza; 10 mmol/l glukóza; 250 $\mu\text{mol/l}$ fukoidan; 10 mmol/l 2'-fukosyllaktóza (Carbosynth, Velká Británie); 10 mmol/l 3-

fukosyllaktóza (Carbosynth, Velká Británie); 10 mmol/l xyloglukan nonasacharid (Carbosynth, Velká Británie).

Transfukosylační akceptory: 100 mmol/l laktóza, 100 mmol/l laktosyl-*t*Boc ((*tert*-butoxykarbonylamido)ethylthioureidyl- β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopyranosid, syntetizována pracovníky laboratoře), 100 mmol/l arabinóza, 100 mmol/l galaktóza, 100 mmol/l fukóza.

Další roztoky: 1 mol/l MgSO₄ (MgSO₄ · 7 H₂O 61,6 g/250 ml); 1% Tween 80 (Thermo Scientific, USA); 1 mol/l HEPES (23,84 g/100 ml; pH 8,0; Megazyme, USA); 1 mol/l sorbitol (182 g/l; Lach-Ner, ČR); 1 mol/l DTT (dithiothreitol; 1,55 g/10 ml); 0,1 mmol/l Na₂CO₃ (28,6 g/l Na₂CO₃ · 10 H₂O; Lachema, ČR); 0,5 mol/l isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosid (IPTG; Sigma-Aldrich, USA); 1 mmol/l fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Sigma-Aldrich, USA); 100 mg/ml zeocin (Invivogen, USA), 150 mg/ml ampicilin, 35 mg/ml chloramfenikol, 5 mg/ml tetracyklin.

4.1.4 Pufry

- 1 mol/l draselno-fosfátový (K-P) pufr pH 6,0: 1 mol/l K₂HPO₄ a 1 mol/l KH₂PO₄;
- 50 mmol/l Sörensenův pufr pH 8,0: 0,2 mol/l Na₂HPO₄ a 0,2 mol/l NaH₂PO₄;
- 10 mmol/l citrát-fosfátový (C-P) pufr pH 3,5–8,5: 0,1 mol/l kyselina citronová a 0,2 mol/l Na₂HPO₄;
 - pufry pro iontově-výměnnou afinitní chromatografii: pufr A (ekvilibrační): C-P pufr pH 7,0; pufr B (eluční): C-P pufr pH 7,0 s 1 mol/l NaCl; pufr C (eluční): C-P pufr pH 7,0 s 2 mol/l NaCl; pufr D (ekvilibrační): C-P pufr pH 7,5; pufr E (eluční): C-P pufr pH 7,5 s 2 mol/l NaCl; pufr F (ekvilibrační): C-P pufr pH 3,0; pufr G (eluční): C-P pufr pH 3,0 s 1 mol/l NaCl; pufr H (eluční):

C-P pufr pH 3,0 s 2 mol/l NaCl; pufr I (ekvilibrační): C-P pufr pH 3,5;

- 0,5 mol/l Na-P pufr pH 6,0: 0,5 mol/l NaH_2PO_4 a 0,5 mol/l Na_2HPO_4 ;
- 0,2 mol/l octanový pufr pH 6,0: 0,2 mol/l kyselina octová a 0,2 mol/l octan sodný;
- Britton-Robinsonův pufr pH 2,0–11,5: 0,04 mol/l H_3PO_4 , 0,04 mol/l kyselina fenyloctová, 0,04 mol/l kyselina boritá, 0,02 mol/l NaOH;
- dialyzační pufr pH 7,5: 50 mmol/l Na-P pufr, 150 mmol/l NaCl.

4.1.5 Komerční sady

- *High Pure Plasmid Isolation Mini Kit* (Roche, Švýcarsko);
- *High Pure Plasmid Isolation Midi Kit* (Roche, Švýcarsko);
- *DNA Gel Extraction Kit* (Norgen Biotek, Kanada);
- *DNeasy UltraClean Microbial Kit* (Qiagen, Nizozemsko);
- *Qubit dsDNA BR Assay Kit* (Invitrogen, USA);
- *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.1.6 Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE)

- 5x *Running buffer*: Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan) 15,1 g/l, glycin 94 g/l, SDS 5 g/l;
- 10% separační gel, 10 ml: 4 ml H_2O , 3,3 ml 30% akrylamidové směsi, 2,5 ml 1,5 mol/l Tris-Cl pufru o pH 8,8, 0, ml 10% SDS (dodecylsírán sodný), 0,1 ml 10% APS (peroxosírán amonný), 0,004 ml TEMED (tetramethylethylendiamin).
- 5% zaostřovací gel, 2 ml: 1,4 ml H_2O , 0,33 ml 30% akrylamidové směsi, 0,25 ml 1,5 mol/l Tris-Cl pufru o pH 6,8, 0,02 ml 10% SDS, 0,02 ml 10% APS, 0,002 ml TEMED;
- barvicí roztok: 0,5 g Coomassie Brilliant Blue (USB Corporation, USA), 90 ml ethanol, 10 ml kyselina octová, 90 ml H_2O ;

- odbarvovací roztok: 350 ml ethanolu, 550 ml H₂O, 100 ml kyseliny octové.

4.1.7 Elektroforéza v agarózovém gelu

- 50x Tris-acetát-EDTA pufr (TAE): Tris 242 g/l, kyselina octová 57,1 ml/l, 0,5 mol/l EDTA 100 ml/l pH 8,0;
- 1% agarózový gel (0,7 g/70 ml 1x TAE pufru);
- marker: 6x MassRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA);
- barva 1x GelRed (Biotium, USA);
- barva 6x Gel Loading Dye Purple (New England Biolabs, USA).

4.1.8 Biologický materiál

- buňky *E. coli* Top10, BL21(DE3)pLysS, BL21-Gold(DE3), Rosetta2(DE3) (Thermo Fisher Scientific, USA);
- buňky *E. coli* JM109 1990 (připraveny pracovníky laboratoře);
- buňky *P. pastoris* KM71H (Invitrogen, USA);
- fungální kmeny vybrané ke screeningu pocházely ze Sbírký kultur hub (Culture Collection of Fungi – CCF) Katedry botaniky Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy uložené v Laboratoři biotransformací Mikrobiologického ústavu AV ČR;
- plazmid pPICZ α A s vnesenou antibiotickou rezistencí na zeocin s vloženými geny vybraných fungálních enzymů (Generay, Čína);
- polymeráza DreamTaq (Thermo Fisher Scientific, USA);
- polymeráza Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, USA);
- primery komerční (Generi Biotech, ČR);
- primery 3' AOX1 a 5' AOX1, pCold II-Fw a pCold II-Re (Generi Biotech, ČR);

- restrikční endonukleázy *EcoRI*-HF, *KpnI*, *SacII*, *NdeI*, *XhoI*, *BamHI*, *SalI*, *SacI* a příslušné pufry rCutSmart Buffer, NEBuffer r1.1, NEBuffer r3.1 (New England Biolabs, USA);
- DNA ligáza T4 (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.1.9 Tenkovrstvá chromatografie

- mobilní fáze: 350 ml propan-2-ol, 100 ml H₂O, 50 ml 30% NH₄OH.

4.2 Screening sbírky hub

4.2.1 Výběr hub

Ze Sbírký kultur hub Katedry botaniky PŘF UK bylo vybráno deset zástupců, u kterých byl předpokládán výskyt α -L-fukosidázové aktivity: *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Mortierella alpina*, *Fusarium culmorum*, *Mucor circinelloides*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus phoenicis*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium*, *Talaromyces flavus*. Podobnost aminokyselinových sekvencí ke známým fukosidázám z *Thermotoga maritima* a *Fusarium graminearum* byla analyzována pomocí programu BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool* od Národního centra pro biotechnologické informace USA (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.2.2 Kultivace vláknitých hub

Pomnožení a uchovávání vybraných hub probíhalo na šikmých sporulačních agarech připravených dle 4.1.2 (Obrázek 6). Po naočkování z mateřských kultur ze sbírky následovala sedmidenní kultivace při 28 °C. Takto narostlé kultury byly uchovávány při 4 °C.

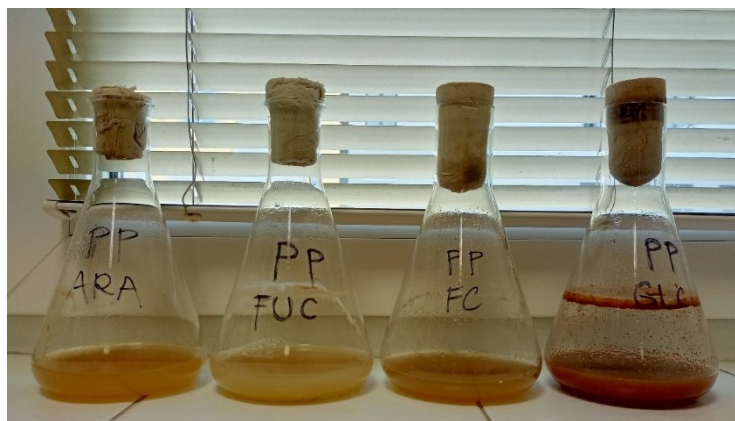
Mycelia byla omyta 4 ml 0,1% roztoku Tween 80 a takto získaná suspenze spór byla v objemu 0,5 ml odebrána a dále kultivována v médiu s induktory. Fungální kmeny byly kultivovány v 500 ml Erlenmeyerových baňkách obsahujících 100 ml kultivačního peptonového média (připraveného dle Huňkové et al., 1999; 4.1.2). Po sterilizaci média byl přidán sterilní roztok MgSO₄ do cílové koncentrace 10 %

v/v a sterilní roztoky induktorů: 0,1% *v/v* D-arabinóza, 0,5% *v/v* L-fukóza a 4% *v/v* D-glukóza. Koncentrace byly převzaty z práce Huňkové et al. (1999), příprava zásobních roztoků je uvedena v kapitole 4.1.3. Z důvodu špatné rozpustnosti byl induktor fukoidan přidán přímo do baněk v pevném skupenství v cílové koncentraci 1 % *w/v*; fukoidan byl použit k indukci v práci Shvetsové et al. (2015).



Obrázek 6 – Kultury vybraných hub byly naočkovány na šikmé sporulační agary a inkubovány 7 dní při 28 °C. Autor fotografie: Pavlína Nekvasilová

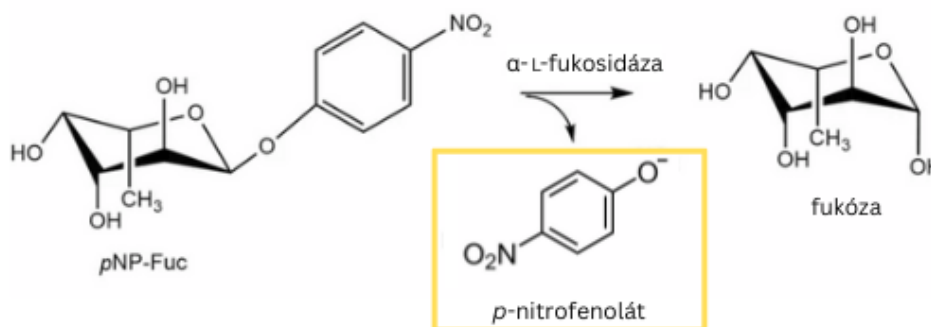
Baňky byly kultivovány (Obrázek 7) při 28 °C za třepání při 200 ot./min. Kultivace probíhala 14 dní a mezi 6. a 14. dnem byly odebírány vzorky ke screeningu aktivity; počáteční den kultivace byl určen jako nultý den (dle Bojarové et al., 2019).



Obrázek 7 – Fungální kmeny jsou kultivovány v peptonovém médiu s induktory (ARA – arabinóza, FUC – fukóza, FC – fukoidan, GLC – glukóza). Na fotce kultivace *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium* (PP).

4.2.3 Stanovení fukosidázové aktivity fungálních kmenů

Vzorek o objemu 2 ml byl sterilně odebrán z kultivační baňky a centrifugován při 12 500 x g a 4 °C po dobu 20 min. Objem 40 µl supernatantu (enzym je produkován extracelulárně) byl použit k zahájení reakce s 10 µl *p*NP-Fuc (ve výsledné koncentraci 2 mmol/l). Následovala 30 min reakce při 35 °C a 850 ot./min, která byla ukončena přidavkem 1 ml 0,1 mol/l Na₂CO₃. *p*-Nitrofenol vzniklý po rozštěpení *p*NP-Fuc dává ve formě *p*-nitrofenolátu v bazickém prostředí žluté zbarvení, které lze pozorovat pouhým okem (Obrázek 8). Vizuálně pozitivní vzorky byly následně podrobeny stanovení aktivity.



Obrázek 8 – Odštěpení *p*-nitrofenolu a jeho zbarvení v bazickém prostředí je použito pro stanovení fukosidázové aktivity. Zdroj: Robles-Arias et al., 2021, upraveno.

U houbových kultur s pozitivní barevnou reakcí byla kvantifikována aktivita k *p*NP-Fuc. Reakce se sestávala ze 30 μ l 50 mmol/l Sørensenova pufru pH 8,0 (4.1.4), 10 μ l substrátu (*p*NP-Fuc, finální koncentrace 2 mmol/l, zásobní roztok 10 mmol/l) a 10 μ l supernatantu ze vzorku z kultivační baňky. Po zahájení reakce přidavkem enzymu běžela reakce 10 min při 35 °C a 850 ot./min, poté byla ukončena přidavkem 1 ml Na₂CO₃. Obsah reakční zkumavky byl převeden do kyvety a absorbance byla změřena při 420 nm, čímž byl detekován uvolněný *p*-nitrofenolát. Vzorek (v duplikátu) byl srovnán se slepým vzorkem (bez přítomnosti enzymu) a pomocí kalibrační křivky *p*NP s rovnicí:

$$c = A_{420} \cdot 0,7195$$

kde *c* je koncentrace *p*NP a *A*₄₂₀ je absorbance při 420 nm; kalibraci provedl jiný pracovník laboratoře. Aktivita enzymu byla vypočítána dle vztahu:

$$\text{aktivita} = \frac{\overline{A_{420}} \cdot V_c \cdot \check{r}}{K \cdot V_e \cdot t}$$

kde $\overline{A_{420}}$ je průměrná absorbance při 420 nm, *V*_c je celkový objem reakce, \check{r} je ředění vzorku enzymu, *K* je konstanta z rovnice kalibrační křivky *p*NP, *V*_e je objem enzymu a *t* je čas reakce v minutách. Výsledkem je hodnota objemové aktivity v jednotkách U/ml, kde U je definováno jako množství enzymu, které katalyzuje přeměnu 1 μ mol substrátu za 1 min.

4.3 Sekvenační analýza

K nalezení fungálních enzymů s podobnou aminokyselinovou sekvencí k α -L-fukosidázám již známým z literatury byla použita aplikace BLAST. Jako referenční enzymy byly zvoleny α -L-fukosidázy z vláknité houby *Fusarium graminearum* (*Giberella zeae*; FgFuc, AFR68935.1) a z bakterie *Thermotoga maritima* (TmFuc, AAD35394.1) charakterizované v pracích Zeuner et al. (2018) a Lezyk et al. (2016). Vybrané houby jsou shrnuty v tabulce níže společně s velikostí jejich kódující sekvence (*coding sequence* – CDS) v jednotkách páru bází (bp – *base pair*). Příbuznost vybraných organismů byla znázorněna pomocí generátoru

fylogenetických stromů PhyloT (<https://phylot.biobyte.de/>) a vizualizovacím programem iTOL (*Interactive Tree Of Life*, <https://itol.embl.de/>).

Tabulka 3 – Vybrané enzymy z vláknitých hub a jejich přístupový kód.

Organismus a kód proteinu	Zkratka	Délka CDS [bp]
<i>Apiotrichum porosum</i> XP_028471782.1	ApFuc	1362
<i>Absidia repens</i> ORZ24074.1	ArFuc	1605
<i>Clonostachys rhizophaga</i> CAH0042109.1	CrFuc	1482
<i>Fusarium graminearum</i> AFR68935.1	FgFuc	1830
<i>Fusarium oxysporum</i> AFR68934.1	FoFuc	1824

Z aminokyselinových sekvencí vybraných enzymů byly navrženy geny pro vložení do plazmidu pPICZ α A: Aminokyselinové sekvence byly přeloženy do nukleotidové sekvence pomocí programu SMS: *Reverse Translate (Sequence Manipulation Suite*, https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) s použitím kodónů preferenčních pro *P. pastoris* (dle *Codon Usage Database* - <https://www.kazusa.or.jp/codon/>).

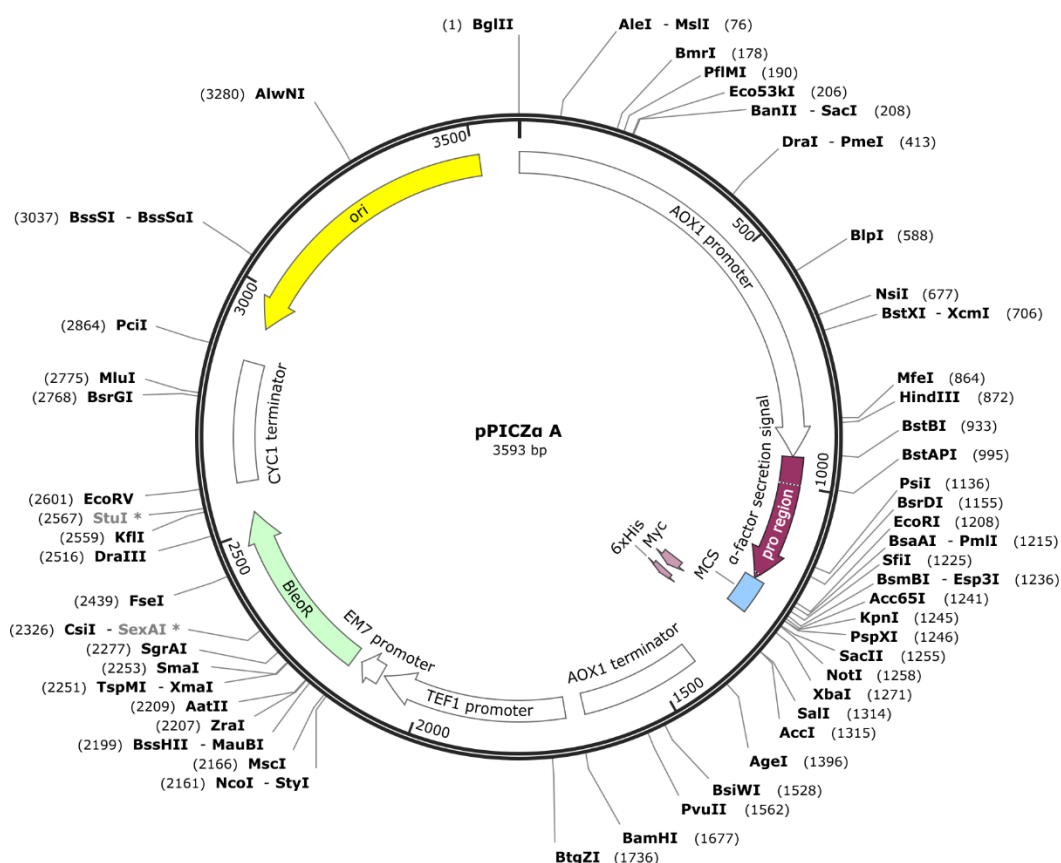
Sekvence byly podrobeny analýze přítomnosti konzervovaných domén pomocí programu InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) a programu *Conserved Domains* od NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). Přítomnost

transmembránových úseků a signálních peptidů byla detekována pomocí programu *Predict Protein* (<https://predictprotein.org/>).

Plazmidy byly připraveny komerčně firmou Generay (Čína). Ke genu α -L-fukosidázy byla přidána restriční místa (Tabulka 4), která sloužila ke vložení genu do plazmidu pPICZ α A (Obrázek 9).

Tabulka 4 – Vybrané restriční endonukleázy pro vložení genu α -L-fukosidáz do plazmidu pPICZ α A.

Plazmid	Restriční endonukleáza	Pufr	Gen enzymu
pPICZ α A	<i>EcoRI</i> -HF	rCutSmart Buffer	<i>ApFuc</i> , <i>ArFuc</i> , <i>CrFuc</i> , <i>FoFuc</i> , <i>FgFuc</i>
	<i>SacII</i>	rCutSmart Buffer	<i>ArFuc</i> , <i>CrFuc</i> , <i>FoFuc</i> , <i>FgFuc</i>
	<i>KpnI</i>	NEBuffer r1.1	<i>ApFuc</i>



Obrázek 9 – Mapa plazmidu pPICZ α A. Zdroj: SnapGene, n.d.

4.4 Molekulárně biologické metody

Následují obecné postupy molekulárně biologických (a jiných) metod, které byly během produkce používány opakovaně. Tyto metody byly používány jak v produkci v *P. pastoris*, tak v *E. coli*.

4.4.1 Elektroforéza v agarózovém gelu

Vzorky pro elektroforézu v agarózovém gelu byly připraveny následovně: ke 30 μ l DNA byl přidán 1 μ l 20x *GelRed* a 6 μ l 6x *Purple Gel Loading Dye* v poměru 1:5. Kontrolní roztok (např. nelinearizovaný plazmid pro kontrolu linearizace, plazmidy o známé velikosti) byl připraven v objemu 0,5 μ l (cca 500 ng), ke kterému byl přidán 1 μ l *Purple Gel Loading Dye*, 0,5 μ l *GelRed* a 4,5 μ l destilované vody. Společně se vzorky byl do gelu přidán marker (7 μ l zásobního roztoku smíchaných s 0,5 μ l *GelRed*).

Vzorky byly separovány v 1% agarózovém gelu ponořeném v TAE pufru. Elektroforéza probíhala 2–4 hod při 130–50 V, 90 mA a 5 W.

V případě potřeby byly vzorky z gelu izolovány. K tomuto účelu byl použita sada *DNA Gel Extraction Kit*. Agaróza byla rozpuštěna pomocí pufru G, kterého bylo přidáno 300 μ l na každých 100 mg gelu. Rozpuštění probíhalo 10 min při 55 °C, 300 ot./min; každé 3 min byly zkumavky promíchány. Do zkumavek byl přidán isopropanol v množství 100 μ l na 100 mg gelu a obsah zkumavek byl promíchán. Obsah zkumavky byl postupně převáděn do kolonky o objemu 750 μ l, na kterou byla nasazena sběrná zkumavka. Kolonka byla centrifugována 1 min při 9 600 x g. Ze sběrné zkumavky byl průběžně odstraňován odpad. Kolonka byla promyta 500 μ l promývacího roztoku a 1 min centrifugací při 16 800 x g. Po vyprázdnění sběrné zkumavky byla kolonka centrifugována ještě jednou pro úplné vysušení (2 min, 16 800 x g). DNA byla eluována z kolonky pomocí 30 μ l sterilní vody předehřáté na 55 °C. Po 1 min inkubaci byla zkumavka centrifugována 2 min při 16 800 x g a roztok byl jímán do eluční zkumavky. Zkumavka s extrahovanou DNA byla uchována při -20 °C.

4.4.2 Množení plazmidu v *E. coli*

Pro namnožení plazmidu byla vybrána *E. coli* jakožto nejpoužívanější organismus pro rekombinantní expresi. Konkrétně byly transformovány buňky Top10, JM109 1990, BL21(DE3)pLysS a BL21-Gold(DE3) tepelným šokem. Suspenze kompetentních buněk *E. coli* (100 μ l) byla rozmrazena z -80 °C během 15 min na ledu. K buňkám bylo sterilně přidáno 0,5–1 μ l (200 ng) roztoku plazmidu a směs byla inkubována 15 min na ledu. Buňky byly podrobeny tepelnému šoku po dobu 75 vteřin při 42 °C. K buňkám byl přidán 1 ml LB média (složení v 4.1.2) a buňky se regenerovaly nejméně 60 min při 37 °C a 350 ot./min. Buňky byly naočkovány po 50–150 μ l na misky s LB agarem s přísadkou zeocinu (do finální koncentrace 0,1 mg/ml ze 100 mg/ml zásobního roztoku) nebo ampicilinu (0,1 mg/ml ze 150 mg/ml zásobního roztoku) – výběr antibiotik závisel

na množených plazmidech: plazmid pPICZ α A obsahuje rezistenci na zeocin, plazmid pCold II obsahuje rezistenci na ampicilin. Misky byly ponechány v inkubátoru při 37 °C do druhého dne (24 h).

Množení v buňkách Rosetta2(DE3) se lišilo od výše popsaného postupu. 100 μ l buněk bylo rozmraženo z -80 °C během 20 min na ledu. K buňkám byl sterilně přidán 1 μ l suspenze plazmidu a směs byla inkubována 2 min na ledu. Buňky byly podrobeny tepelnému šoku (30 vteřin při 42 °C) a poté byly kultivovány 2 min na ledu. K buňkám bylo sterilně přidáno 100 μ l LB média a buňky regenerovaly nejméně 60 min při 37 °C a 350 ot./min. Po regeneraci byly buňky zakoncentrovány odebráním 100 μ l supernatantu po 30 s centrifugaci při 21 000 x g a zaočkovány na LBA misku s přidavkem ampicilinu (0,1 mg/ml) a chloramfenikolu (35 μ g/ml). Miska byla ponechána v inkubátoru při 37 °C do druhého dne.

4.4.3 Izolace plazmidu v analytickém množství

K izolaci analytického množství plazmidu byla použita sada *High Pure Plasmid Isolation Mini Kit*. Před samotnou izolací bylo třeba namnožit transformanty *E. coli* Top10 z předchozího kroku (množení plazmidu). Transformanty byly přeočkovány z LBA misek do 50 ml zkumavek se 3 ml LB média s 0,1 mg/ml ampicilem a inkubovány přes nos při 37 °C a 220 ot./min. Zkumavky s narostlými buňkami byly centrifugovány (10 min, 12 °C, 6 000 g), supernatant byl odstraněn a zkumavky s buňkami byly ponechány dnem vzhůru k vyschnutí, poté byly přemístěny na led. Buňky byly resuspendovány ve 250 μ l suspenzního pufru s RNAsou a obsah zkumavky byl převeden do sterilní zkumavky. Bylo přidáno 250 μ l lyzačního pufru, zkumavka byla promíchána a inkubována 5 min při laboratorní teplotě. Po inkubaci bylo přidáno 350 μ l pufru B, zkumavka byla promíchána a inkubována 5 min na ledu. Zkumavky byly centrifugovány (10 min, 12 °C, 12 500 x g), supernatant byl převeden na kolonu a centrifugován (1 min, 12 000 x g). Odpad v jímací zkumavce byl průběžně odstraňován. Do

kolony bylo přidáno 500 µl omývacího pufru I. a zkumavka byla centrifugována (1 min, 12 000 x g). Poté byl obsah kolonky promyt 700 µl omývacího pufru II. a zkumavka byla dvakrát centrifugována (1 min, 12 000 x g). Jímací zkumavka byla vyměněna za sterilní; na kolonu bylo přidáno 30 µl sterilní vody. Zkumavka byla centrifugována (1 min, 12 000 x g), poté byl roztok obsahující plazmid přemístěn zpátky na kolonku a centrifugován znovu pro dokonalou eluci veškeré DNA z kolonky. Kontrola izolace proběhla elektroforézou v agarózovém gelu a sekvenováním (4.4.1 a 4.4.5).

4.4.4 Izolace plazmidu v preparativním množství

Pro izolaci namnoženého plazmidu byla druhý den po transformaci z misek sterilně odebrána jedna kolonie a přenesena do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml LB média s přidavkem antibiotika. Baňky byly inkubovány při 37 °C a 220 ot./min do druhého dne (18 hod). Suspenze buněk byla převedena do 50 ml zkumavky a na dvakrát centrifugována 15 min při 10 °C. K samotné izolaci plazmidu byla použita sada *High Pure Plasmid Isolation Midi Kit*. Po odstranění supernatantu bylo přidáno 8 ml resuspenzačního pufru (ze sady), který byl promíchán s peletou. Bylo přidáno 8 ml lyzačního pufru, zkumavka byla jemně promíchána a inkubována 2 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 8 ml neutralizačního pufru za vzniku bílé sraženiny, promícháno a inkubováno 5 min na ledu. Do předem ekvilibrované kolony (ekvilibrováno 2,5 ml ekvilibračního pufru) byl přes filtrační papír převeden obsah zkumavky. Kolona byla dvakrát promyta 4 ml promývacího pufru. Poté byl plazmid eluován z kolony 2,5 ml elučního pufru předehřátého na 50 °C, roztok byl jímán do sterilní zkumavky. Do zkumavky bylo přidáno 3,6 ml isopropanolu a zkumavka byla inkubována při 4 °C přes noc.

Druhý den byl celý obsah zkumavky postupně centrifugován 30 min po 1,5 ml při 12 500 x g a 4 °C; supernatant byl odebírán, v peletě zůstával plazmid. K peletě byl přidán 1 ml sterilního 70% ethanolu; obsah zkumavky byl promíchán

a centrifugován 10 min při 12 500 g a 4 °C. Ethanol byl odebrán a zkumavky byly sušeny přes noc k odstranění zbytkového ethanolu. Třetí den bylo k plazmidům přidáno 50 µl sterilní vody a plazmid byl pomalu rozpouštěn 1 hod při 25 °C a 350 ot./min.

Vzorek roztoku plazmidu byl naředěn destilovanou vodou 250x a byla zkontrolována jeho čistota proměřením absorbance při 260 a 280 nm a vypočítána dle vztahu:

$$\text{čistota} = \frac{\bar{A}_{260}}{\bar{A}_{280}}$$

kde \bar{A} je průměrná absorbance získaná ze tří paralelních měření. Zároveň byla vypočítána koncentrace DNA dle vztahu:

$$c_{DNA} = \bar{A}_{260} \cdot k$$

kde c_{DNA} značí koncentraci DNA, \bar{A}_{260} je průměrná hodnota absorbance při 260 nm (měřilo se v triplicátu) a k je koeficient roven 12,5 µg/µl získaný ze standardního koeficientu pro dvouvláknovou DNA měřenou v 1 cm kyvetě (50 µg/ml) upraveného pro ředění vzorku (250x) a jednotky µl. Výslednou hodnotou byla koncentrace DNA v µg/µl.

4.4.5 Sekvenování

Vzorek plazmidu po izolaci byl připraven k sekvenaci: 0,5 µl (cca 500 ng) plazmidu bylo smícháno se 4,5 µl sterilní vody a s 5 µl primerů (25 pmol ze zásobního roztoku 5 µmol/l; primery vypsány v Tabulka 5). Sekvenování provedla externí firma SEQme (ČR) Sangerovým sekvenováním.

Komerčně (Generi Biotech, ČR) byly připraveny ty primery, které nebyly k dispozici u sekvenační firmy. Pro výpočet teploty tání, procentuální zastoupení cytosinu a guaninu a kontrolu komplementarity byl použit program OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>).

Tabulka 5 – Primery používané k sekvenaci. Fw – *forward* primer, Re – *reverse* primer.

5' AOX1	5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3'
3' AOX1	5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3'
pColdII_Fw	5'-ACG CCA TAT CGC CGA AAG G-3'
pColdII_Re	5'-CAG AAT CTA AGA TCC CTG CCA-3'
FgFuc_Fw	5'-CCC GAT ATC ATC TGG AAC GAT-3'
FoFuc_Fw	5'-CCC TGG TAC GGT TAC AGA ATG ACC-3'

Výsledky sekvenace byly analyzovány pomocí programů schopných srovnávání více sekvencí (*multiple alignment*): MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) a BLAST. Sekvence ve směru 3'→5' byly převedeny do komplementární sekvence pomocí programu *SMS: Reverse Complement* (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_comp.html).

4.4.6 Linearizace plazmidu

Plazmidy nesoucí gen α -L-fukosidázy byly linearizovány: 30 μ g plazmidu bylo smícháno se 3 μ l restrikční endonukleázy, 3 μ l příslušného pufru (Tabulka 6) a doplněno sterilní vodou do celkového objemu 30 μ l. Zkumavka byla promíchána a inkubována při 37 °C a 300 ot./min přes noc (18 h). Druhý den bylo štěpení zastaveno inkubací při 65 °C po dobu 20 min.

Tabulka 6 – Použité restrikční endonukleázy pro linearizaci a jejich příslušné pufr

Restrikční endonukleáza	Pufr	Gen enzymu
<i>PmeI</i>	rCutSmart Buffer	<i>ApFuc</i>
<i>SacI</i>	NEBuffer r1.1	<i>ArFuc</i> , <i>CrFuc</i> , <i>FoFuc</i> , <i>FgFuc</i>

Vhodná restrikční místa k linearizaci byla vybrána pomocí programu SMS: *Restriction Summary* (http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_summary.html) tak, aby restrikční místa nebyla obsažena v sekvenci genů α -L-fukosidáz.

4.4.7 Kontrola produkce proteinu

Produkce proteinu byla detekována provedením SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného – *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Vzorky byly před samotnou elektroforézou denaturovány (5 min při 99 °C) a podle potřeby zakoncentrovány. Vzorky byly nanášeny na 5% zaostřovací gel navrstvený na 10% separační gel (4.1.6), dělení probíhalo při 130 V asi 1 hod. Po ukončení elektroforézy byly proteiny barveny roztokem obsahující barvivo *Coomassie Brilliant Blue*. Po odbarvení pozadí odbarvovacím roztokem s kyselinou octovou a ethanolem (viz 4.1.6) byla velikost sledovaného proteinu odhadnuta porovnáním s proteiny LMW (*Low Molecular Weight*) markeru a srovnána s teoretickou velikostí proteinu.

Teoretická velikost enzymů byla vypočítána programem SMS: *Protein Molecular Weight* (http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html).

Tabulka 7 – Teoretické velikosti produkovaných enzymů.

Enzym	Velikost [kDa]
<i>ApFuc</i>	51,6
<i>ArFuc</i>	61,3
<i>CrFuc</i>	54,5
<i>FgFuc</i>	68,0
<i>FoFuc</i>	67,9

4.5 Produkce rekombinantních enzymů v *P. pastoris*

4.5.1 Příprava a transformace kompetentních buněk *P. pastoris* KM71H

Pro produkci enzymů byly vybrány buňky KM71H *P. pastoris*, u nichž byl výrobcem inaktivován AOX1 gen (viz 2.3.4). Před samotnou transformací bylo třeba buňky KM71H namnožit. Během celé přípravy se pracovalo ve sterilních podmínkách v boxu s laminárním prouděním.

První den přípravy bylo 50 μ l buněk z kryokonzervované kultury kompetentních buněk *P. pastoris* KM71H zaočkováno do YPD média (4.1.2). Buňky byly kultivovány do druhého dne (24 hod) při 28 °C a 160 ot./min. Druhý den bylo z kultury odebráno 150 μ l a přeočkováno do 500 ml YPD. Buňky byly opět kultivovány při 28 °C a 160 ot./min přes noc (18 hod). Třetí den byla změřena optická hustota a při dosažení $OD_{600} > 0,9$ byly buňky centrifugovány v centrifugačních kyvetách (5 min při 4 776 x g a 4 °C). Peleta byla resuspendována v 50 ml YPD média s přídavkem HEPES (100 ml YPD + 20 ml 1 mol/l HEPES pH 8). Do každé kyvety bylo dále přidáno 1,25 ml DTT a kyvety byly inkubovány 15 min při 30 °C a 120 ot./min. Poté bylo přidáno 200 ml 1 mol/l podchlazeného sorbitolu a kyvety byly centrifugovány (5 min, 4 000 x g, 4 °C). Peleta byla resuspendována v 50 ml podchlazeného sorbitolu, poté bylo přidáno dalších 200 ml sorbitolu a následovala druhá centrifugace (5 min, 4 000 x g, 4 °C). Pelety byly resuspendovány celkem v 10 ml sorbitolu, převedeny do jedné zkumavky a centrifugovány (5 min, 4 000 x g, 4 °C). Poté byla peleta naposled resuspendována v 0,5 ml podchlazeného sorbitolu.

Připravené buňky KM71H (80 μ l) byly společně s izolovanou linearizovanou DNA převedeny do podchlazené elektroporační kyvety a inkubovány 5 min na ledu. Po inkubaci proběhla elektroporace: kyveta byla vystavena elektrickému napětí 2 kV po dobu 3–6 ms. Ihned po elektroporaci bylo do kyvety přidán 1 ml podchlazeného sorbitolu. Celý obsah kyvety byl pomocí sterilní skleněné pipety převeden do 15 ml zkumavky a inkubován 2 hod při 28 °C. Buňky byly naředěny

YPD médiem a v různých koncentracích a objemech naočkovány na YPD agar s přídatkem zeocinu (ředění 1x, 10x a 100x očkováno po 50 μ l a 150 μ l). YPDA misky byly inkubovány 3 dny při 28 °C.

4.5.2 Kultivace *P. pastoris* v analytickém měřítku

Kolonie *P. pastoris* transformované genem α -L-fukosidázy byly z YPDA misek zaočkovány pomocí párátko do 500 ml baněk se 100 ml BMGY média (4.1.2). Buňky byly kultivovány 24 hodin při 220 ot./min a 28 °C. Druhý den byla kultura centrifugována 15 min při 10 °C a 6 000 x g. Peleta byla resuspendována ve 30 ml BMMY média (s obsahem methanolu místo glycerolu pro indukci) a převedena do 300 ml trnových baněk (Obrázek 10). Baňky byly kultivovány 2 dny při 220 ot./min a 28 °C a každý den bylo do kultury přidáno 150 μ l methanolu do cílové koncentrace 0,5 % v/v.



Obrázek 10 – Kultivace buněk *P. pastoris* s vloženou DNA enzymu v BMMY médiu v trnových baňkách. Produkce enzymu byla indukována methanolem.

Zároveň s očkováním buněk do trnových baněk byly zaočkovány záložní kolonie na YPD agaru s přídatkem zeocinu, které se inkubovaly 2 dny při 28 °C a poté byly umístěny do 4 °C.

4.5.3 Kryokonzervace buněk *P. pastoris*

Kultury v trnových baňkách z analytické produkce byly kryokonzervovány pro další produkce. Ze záložních misek transformantů byly vybrány kolonie

produkující enzym o vysoké aktivitě. Tyto kolonie byly zaočkovány do 1 l baněk s 95 ml YPD média s 0,05 mg/ml tetracyklinu. Baňky byly inkubovány při 28 °C a 220 ot./min do druhého dne. Druhý den byl obsah baněk centrifugován po 50 ml ve sterilních zkumavkách (10 min, 6 000 x g, 12 °C). Peleta byla resuspendována v 5 ml YPD média a 750 µl 15% v/v glycerolu. Objem byl rozpipetován do zkumavek po 100 µl a zamražen při -80 °C.

4.5.4 Ověření exprese α -L-fukosidáz v *P. pastoris*

Pro potřeby ověření, zda se některé enzymy v *P. pastoris* nedetekované v médiu produkují alespoň intracelulárně, byly buňky z produkce rozbity a jejich obsah byl dále testován. Buněčná kultura (4 ml) byla postupně centrifugována (4 °C, 10 min, 4 200 x g), aby došlo k oddělení buněk od média. Peleta (samotné buňky) byla resuspendována ve 150 µl 50 mmol/l Na-P pufru (pH 7,5) s 10 mmol/l 2-merkapt ethanolu. K suspenzi byly přidány 2 µl zymolyasy pro navození enzymatické lýzy buněčné stěny *P. pastoris* dle Naglak & Wang (1990). Zkumavka byla inkubována přes noc při 37 °C a 850 ot./min. Druhý den byly k suspenzi přidány skleněné kuličky (cca 1:1). Zkumavka byla vložena do oscilačního mlýnu a homogenizována 5 min při 30 Hz a 8 °C. Zkumavky byly centrifugovány (10 min při 4 200 x g a 10 °C) a supernatant (buněčný obsah) byl dále testován na aktivitu k pNP-Fuc.

4.5.5 Ověření vložení genu α -L-fukosidáz do genomu *P. pastoris*

Dle níže uvedeného postupu bylo ověřeno, zda došlo k vložení genu kódujícího enzymy do genomu hostitelských buněk *P. pastoris*. Byla provedena izolace chromozomální DNA z lyzovaných buněk a následně hybridizační reakce. Z buněčných kultur byly odebrány 4 ml a centrifugovány (4 °C, 10 min, 4 200 x g). Dále se pracovalo se sadou *DNeasy UltraClean Microbial Kit* firmy Qiagen. Peleta byla resuspendována ve 150 µl Na-P pufru (50 mmol/l, pH 7,5) s přídatkem 10 mmol/l 2-merkapt ethanolu a 2 µl zymolyasy. Zkumavky byly inkubovány přes noc při 32 °C a 850 ot./min. Druhý den bylo k buněčné suspenzi

přidáno 50 µl lyzačního roztoku, následovala 30 min inkubace při 40 °C. Celý obsah zkumavky byl poté přepipetován do PowerBead zkumavek s kuličkami (součástí sady). Zkumavka byla umístěna do oscilačního mlýnu a homogenizována 10 min při 30 Hz a 8 °C. Zkumavka byla centrifugována (30 s, 12 000 x g) a supernatant byl převeden do čisté zkumavky. Do zkumavky bylo přidáno 100 µl promývacího roztoku I, zkumavka byla promíchána, inkubována 5 min na ledu a centrifugována (12 000 x g, 1 min). Supernatant byl převeden do čisté zkumavky a bylo k němu přidáno 900 µl promývacího roztoku II. Obsah zkumavky byl převeden na kolonku a centrifugován (12 000 x g, 30 s). Kolonka byla promyta 300 µl promývacího roztoku III (2x centrifugace 12 000 x g, 30 s). Kolonka byla přemístěna do čisté zkumavky. Na kolonku bylo nanášeno 50 µl elučního roztoku, následovala centrifugace (12 000 x g, 30 s). Získaný roztok s DNA byl uchováván při -20 °C.

Pro potřeby PCR byla změřena koncentrace izolované DNA pomocí fluorimetru Qubit a sady *Qubit dsDNA BR Assay* (4.1.5). Ke 199 µl pufru byl přidán 1 µl barvy. Takto připravený roztok (199 µl) byl smíchán s 1 µl roztoku s DNA. Minizkumavka byla vložena do fluorimetru Qubit. Získaná hodnota byla s pomocí kalibrační křivky přepočítána na koncentraci DNA ve vzorku.

Ke zjištění, zda DNA kultivovaných buněk obsahuje gen pro heterologní expresi, byla použita metoda PCR s DreamTaq polymerázou. Do reakční směsi byly přidány primery v koncentraci 1 µmol/l společně s 1,25 U DreamTaq polymerázy s příslušným pufrům, 0,2 mmol/l deoxynukleotidů, 200 ng templátové DNA a s vodou doplňující objem na 50 µl. Počáteční denaturace proběhla při 98 °C, 3 min a následovalo 35 cyklů s denaturací při 98 °C a 30 s, nasednutím při 52–58 °C a 30 s a prodlužováním při 72 °C a 1 min. Závěrečná syntéza proběhla při 72 °C po dobu 15 min.

4.5.6 Kultivace *P. pastoris* v preparativním měřítku

Kryokonzervované buňky *P. pastoris* s vloženým genem α -L-fukosidázy byly v objemu 100 μ l rozmrazeny a zaočkovány do zkumavky s 15 ml YPD média. Tato prekultura byla inkubována 4 hod při 28 °C a 220 ot./min. Prekulturou byly zaočkovány 3 l Erlenmeyerovy trnové baňky s 1 l BMGY média. Baňky byly kultivovány 24 hodin při 220 ot./min a 28 °C. Druhý den byla kultura centrifugována 2x15 min při 10 °C a 6 000 x g. Peleta byla resuspendována a převedena do 1 l trnových baněk s 200 ml BMMH média (4.1.2). Baňky byly inkubovány 72 hod při 28 °C a 220 ot./min a každý den do nich byl přidán 1 ml methanolu do finální koncentrace 0,5 % *v/v*.

4.5.7 Purifikace enzymu

Před samotnou purifikací byly buňky *P. pastoris* odděleny od média, které obsahovalo extracelulárně produkováný enzym: obsah trnových baněk byl postupně centrifugován (6 000 x g, 10 min, 10 °C) a supernatant byl sbírán do kádinky. Spojené supernatanty byly naředěny vodou 1:5, pH bylo upraveno na pH ekvilibračního pufru a roztok byl filtrován přes Büchnerovu nálevku s filtračním papírem.

Pro potřeby iontově-výměnné chromatografie byly vypočítány izoelektrické body (pI) produkováných enzymů pomocí programu SMS: *Protein Isoelectric Point* (http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_iep.html) – Tabulka 8.

Tabulka 8 – Izoelektrické body purifikovanáných enzymů.

Enzym	pI
FgFuc	4,71
FoFuc	5,32

Pro purifikaci enzymů byl použit systém aniontově-výměnné chromatografie Äkta purifier a kolona Q-Sepharose, jejíž stacionární fázi jsou agarózové kuličky

s kvartérními amonnými kationty ($[\text{NR}_4]^+$). Při aniontově-výměnné chromatografii se analyt (enzym) nachází v pH vyšším než hodnota jeho pI, tudíž je negativně nabitý. Záporně nabitě molekuly analytu jsou přitahovány kladně nabitou stacionární fází (Q-Sepharosou s $[\text{NR}_4]^+$) a vážou se iontovou vazbou. Eluce analytu z kolony probíhá postupnou změnou iontové síly prostředí přidávkem NaCl, nebo změnou pH (a tudíž změnou náboje proteinu).

Kolona byla nejprve promyta 50 ml vody, 1 mol/l NaOH a 1 mol/l NaCl při průtoku 10 ml/min a poté 100 ml elučního a ekvilibračního pufru. Jako ekvilibrační pufr byl použit pufr A a pufr D (10 mmol/l citrát-fosfátový pufr pH 7,0 a 7,5 – viz 4.1.4). Jako eluční roztok byl použit pufr B, pufr C, pufr E a 100 mmol/l NaOH – viz 4.1.4). Následovalo nanesení vzorku rychlostí 10 ml/min, jeho navázání na kolonu a promytí kolony 100 ml ekvilibračního pufru rychlostí 10 ml/min. Enzym byl eluován gradientem elučního pufru (pomocí NaCl nebo NaOH) v objemu 120 ml při průtoku 2 ml/min. Podle hodnoty UV odezvy při 280 nm byl jímán enzym a podle potřeby bylo pH eluovaného enzymu ihned po eluci upraveno zředěnou HCl na 6,0. Po ukončení eluce byl systém promyt vodou, 1 mol/l NaOH a na závěr 20% *v/v* ethanolem.

Kromě aniontově-výměnné chromatografie byla použita také kationtově-výměnná chromatografie s kolonou Fractogel EMD M SO_3^- se stacionární fází z polymerních kuliček s navázanou funkční skupinou SO_3^- . Analyt získává v pH nižším než jeho pI kladný náboj, což umožňuje iontovou vazbu na záporně nabitou kolonu se sulfonovou skupinou. Jako ekvilibrační pufr byl použit pufr F a pufr I (10 mmol/l C-P pufr pH 3,0 a 3,5 – viz 4.1.4) a jako eluční pufr byl použit pufr A, pufr B, pufr G a pufr H (obsahující 1 nebo 2 mol/l NaCl).

Přítomnost proteinu byla ověřena Bradfordovou metodou (viz 4.7.2). Purifikovaný enzym byl dále zakoncentrován opakovanou centrifugací v 15 ml ultrafiltračních zkumavkách Amicon Ultra 10K (15 min, 6 000 x g, 4 °C), které zadržují molekuly s hmotností větší než 10 kDa.

4.6 Produkce rekombinantních enzymů v *E. coli*

Pro produkci byl vybrán plazmid pCold II a čtyři různé buňky *E. coli*: JM109 1990, BL21(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3) a BL21-Gold(DE3) (rozdíly v provedení produkce jsou popsány u jednotlivých buněk níže). Plazmid pCold II nese gen ampicilinové rezistence, sekvenci histidinové kotvy (*His-tag*) na N-konci, *lac* operon a gen *cspA* (*cold shock protein A*), který zajišťuje selektivní expresi proteinu v teplotách 15–37 °C. *Lac* operon kóduje tři enzymy účastníci se metabolismu laktózy a jeho indukce isopropyl-1-thio- β -D-galaktopyranosidem (IPTG) indukuje expresi vloženého genu proteinu.

4.6.1 Vložení genů α -L-fukosidáz do nového vektoru

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) byla použita pro amplifikaci genu kódujícího produkované enzymy. Pro tento účel byly připraveny a komerčně vyrobeny oligonukleotidové primery (Tabulka 9; Generi Biotech, ČR) s novými restrikčními místy. Primery byly v koncentraci 0,5 $\mu\text{mol/l}$ přidány do reakční směsi společně s 0,02 $\mu\text{mol/l}$ Q5 High-Fidelity polymerázy, Q5 pufrem, Q5 zesilovačem (*enhancer*), 200 $\mu\text{mol/l}$ deoxynukleotidů, 200 ng templátové DNA a s vodou doplňující objem na 50 μl . Templátem byl plazmid nesoucí α -L-fukosidázy

Tabulka 9 –Primery použité pro vkládání. Před sekvencí genu α -L-fukosidáz byla vložena sekvence zvoleného restrikčního místa.

<i>ApFuc_Fw</i>	5'-AAA GGT ACC GCT CAT ATT TGG GCT ACT CAT AG-3'
<i>ApFuc_Re</i>	5'-CCC CTC GAG TCT AAT TCT AAA TTC AAT ACA AGC-3'
<i>ArFuc_Fw</i>	5'-GGG GCA TAT GAC TGT TTC TGT TAA GTC TCA-3'
<i>ArFuc_Re</i>	5'-AAA ACT CGA GAA TAG AAC ACT TCA AAA CCC A-3'
<i>CrFuc_Fw</i>	5'-GGA ACA TAT GCC AAA CTT GGC TTA CAC TGG T-3'
<i>CrFuc_Re</i>	5'-CCA CTC GAG AAT GTA CAA CAA CAA ACC AG-3'

PCR začínala denurací k rozvolnění vláken DNA (98 °C, 30 s), po které následovalo 35 cyklů s denurací (98 °C, 10 s), nasednutím primerů (*annealing*, 52–58 °C, 30 sec) a syntézou komplementárních vláken (72 °C, 30 s). Po proběhnutí všech cyklů proběhlo závěrečná syntéza (72 °C, 2 min).

4.6.1.1 Ligace plazmidu

Nejprve bylo třeba rozštěpit inserty a pCold II v příslušných restrikčních místech a vytvořit tak lepivé konce pro úspěšnou ligaci. Odštěpení provedly příslušné endonukleázy (Tabulka 10) v prostředí odpovídajícího pufru. K 21 μmol/l DNA a 10 μmol/l plazmidu bylo přidáno po 3 μmol/l od každého enzymu a po 3 μmol/l pufru. Štěpení probíhalo při 37 °C a 300 ot./min přes noc. *ApFuc* bylo nutné štěpit nadvakrát (*single digest*), protože vybrané restrikční endonukleázy vyžadovaly různé pufrы. Mezi jednotlivými štěpeními byla provedena agarózová elektroforéza pro kontrolu štěpení

Tabulka 10 – Vybrané restrikční endonukleázy a jejich příslušné pufrы.

Plazmid	Restrikční endonukleáza	Pufr	Gen enzymu
pCold II	<i>Bam</i> HI	<i>NEBuffer r3.1</i>	<i>ApFuc</i>
	<i>Sal</i> I	<i>NEBuffer r3.1</i>	<i>ApFuc</i>
	<i>Nde</i> I	<i>rCutSmart Buffer</i>	<i>ArFuc, CrFuc</i>
	<i>Xho</i> I	<i>rCutSmart Buffer</i>	<i>ArFuc, CrFuc, ApFuc</i>

Produkty štěpení byly přečištěny pomocí sady *GeneJET PCR Purification Kit*. Ke 30 μl DNA bylo přidáno 30 μl vazebného pufru (v poměru 1:1). Obsah zkumavky byl promíchán a poté převeden do purifikační kolonky. Kolonka byla centrifugována 1 min při 14 400 x g. Z jímací zkumavky byl odebrán odpad a do kolonky bylo přidáno 700 μl promývacího roztoku. Zkumavka byla centrifugována 1 min při 14 400 x g, odpad byl odebrán a zkumavka byla

centrifugována ještě jednou. Jímací zkumavka byla vyměněna za sterilní zkumavku, na kolonku bylo nanášeno 30 μ l sterilní vody a následovala 2x centrifugace 1 min při 14 400 x g.

Pro ligaci genu enzymu k plazmidu byla použita T4 DNA ligáza. Do reakce vstoupil 1 μ l ligázy, 4 μ l příslušného pufru, 11 μ l insertu a 2 μ l plazmidu; ligace probíhala přes noc při 4 °C.

4.6.2 Produkce v buňkách *E. coli*

Buňky JM109 1990 mají přidáný mutovaný (nefunkční) *recA* gen, který za normálních okolností zajišťuje genetickou rekombinaci a opravu DNA, která je pro heterologní expresi proteinů nežádoucí. Také obsahují mutovaný gen *endA* kódující DNA-specifickou endonukleázu I, která by jinak rozkládala DNA plazmidu. JM109 1990 postrádají β -galaktosidázovou aktivitu díky delecii genu *lacZ*. Místo *lacZ* je v *lac* operonu vložen gen α -L-fukosidázy a indukce jeho exprese je zajištěna IPTG (analogem laktózy), jehož přítomnost v médiu funguje jako induktor exprese genů *lac* operonu.

Produkce v buňkách BL21(DE3)pLysS je umožněna T7 lysozomem, který snižuje expresi genů pozadí, což zajišťuje selektivní expresi rekombinantního genu v plazmidu pCold II po indukci IPTG.

Buňky BL21-Gold(DE3) jsou upravenou verzí BL21 buněk s vyšší efektivitou transformace a vyšším výtěžkem. Obsahují inaktivovaný gen *endA* (stejně jako JM109 1990) a mají odstraněn gen pro OmpT protein, který má proteolytickou aktivitu.

Buňky Rosetta2(DE3) jsou další úpravou BL21 buněk, tentokrát se zvýšenou schopností exprese eukaryotních proteinů. Obsahují gen chloramfenikolové rezistence.

Vybraná kolonie z namnožení byla sterilně zaočkována do LB média s přídatkem ampicilinu (a chloramfenikolu v případě BL21(DE3)pLysS a

Rosetta2(DE3)). Kultura byla inkubována při 35–37 °C a 200–220 ot./min. Po 3–24 hod byla kultura převedena po baněk s TB médiem (se stejnými antibiotiky). Kultivace probíhala do dosažení $OD_{600} = 0,6-1$, poté byla kultura indukována IPTG do finální koncentrace 0,5 mmol/l (0,1 mmol/l u BL21-Gold(DE3)). Tato kultura byla inkubována při 25–28 °C (BL21-Gold(DE3) byly inkubovány při 15 °C) a 150–200 ot./min 24 h. Poté byla kultura postupně centrifugována (20 min, 10 °C, 6 000 x g), peleta byla uchována při -20 °C.

4.6.3 Purifikace proteinu

E. coli produkuje veškeré své proteiny intracelulárně, proto byly enzymové konstrukty opatřeny histidinovou kotvou (His₆-tag) na N-konci pro purifikaci afinitní chromatografií na přístroji Äkta Prime Plus. Dochází přitom k interakci mezi histidinovou kotvou enzymového konstruktu s kationty kovů imobilizovanými na koloně HisTrap. Eluce proteinu je zajištěna navázáním imidazolu na kolonu díky jeho vyšší afinitě.

Z buněčné suspenze jednotlivých typů buněk bylo odebráno 1–5 g, které byly suspendovány v 5 ml ekvilibračního pufru s přídavkem 200 µl proteázového inhibitoru PMSF (do finální koncentrace 0,1 mol/l). Buněčná suspenze byla jemně promíchána a poté sonikována 6x1 min ultrazvukovými pulzy s 2 min pauzou na ledu. Sonikovaná suspenze byla centrifugována (4 °C, 21 000 x g, 15 min) a přefiltrována (filtrem s 0,8 µm póry) do sterilní 50 ml zkumavky. Filtrát (cca 5 ml) byl naředěn ekvilibračním pufrům do 50 ml. (200 µl bylo odebráno na stanovení koncentrace proteinů Bradfordem a SDS-PAGE, na SDS-PAGE byla odebrána peleta i supernatant).

Pro purifikaci enzymu byl použit systém rychlé proteinové kapalinové chromatografie (FPLC) Äkta prime a kolona HisTrap. Jako ekvilibrační pufr byl použit 50 mmol/l Na-P pufr s 300 mmol/l NaCl o pH 8,0 a zachycený protein byl eluován stejným roztokem s přídavkem 500 mmol/l imidazolu. Během eluce imidazolem byly jímány 2 ml frakce, které byly testovány na přítomnost proteinu

Bradfordovou metodou (4.7.2). Frakce obsahující protein byly spojeny a zbaveny přebytečných solí dialýzou. Dialýza probíhala v dialyzační membráně ve 3 l dialyzačního pufru (4.1.4) při 8 °C. Po 18 hodinách byl pufr vyměněn a dialýza pokračovala další 4 hodiny. Poté byly frakce přefiltrovány a uchovány při 4 °C.

4.7 Biochemická charakterizace α -L-fukosidáz

4.7.1 Stanovení aktivity

Pro účely screeningu aktivity k *p*NP-Fuc bylo používáno stanovení v mikrotitrační destičce. Probíhaly dvě reakce lišící se ředěním enzymu: v reakci A reagovalo 10 μ l vzorku s enzymem naředěných 30 μ l pufru (50 mmol/l Sørensenův pufr pH 6,0) s 10 μ l substrátu (*p*NP-Fuc, 2 mmol/l v reakci). V kontrolní reakci B nebyl použit pufr a namísto něj bylo použito 40 μ l vzorku s enzymem. Reakce běžely v duplikátu 10 min při 850 ot./min a 35 °C. Po uplynutém čase byla enzymová reakce ukončena přidávkem 100 μ l 1 mol/l Na₂CO₃. Aktivita byla stanovena na základě přírůstku *p*-nitrofenolu vůči slepému vzorku; byl-li enzym aktivní, pak byl nárůst absorbance při 420 nm stanoven spektrofotometricky a byla z něj vypočítána aktivita pomocí vztahu uvedeného v 4.2.3. Stejný postup byl opakován po purifikaci enzymu, jen bylo nutné některé enzymy naředit.

Pokud byla aktivita enzymů nízká (na hranici chyby stanovení či hodnoty absorbance pozadí), bylo v delším časovém intervalu (desítky minut) provedeno několik odběrů vzorků z reakční směsi, aby mohl být spolehlivě monitorován postupný nárůst absorbance přímo úměrný nárůstu koncentrace hydrolytického produktu reakce. 100 μ l vzorku bylo smícháno se 300 μ l pufru (50 mmol/l Sørensen, pH 6,0) a 100 μ l *p*NP-Fuc (2 mmol/l). Zkumavky byly inkubovány při 35 °C a 850 ot./min. Ve 20, 40 a 60 minutách byl proveden odběr 50 μ l vzorku do 100 μ l 1 mol/l Na₂CO₃ pro zastavení reakce. Z lineární závislosti nárůstu absorbance na čase byla vyhodnocena směrnice přímky odpovídající okamžité

reakční rychlosti. Průměrná aktivita daného enzymu (v U/ml) byla následně vypočítána dle modifikovaného vztahu:

$$\text{aktivita} = \frac{\overline{\Delta A_{420}} \cdot V_c \cdot \check{r}}{K \cdot V_e \cdot t}$$

kde $\overline{\Delta A_{420}}$ je průměrná změna absorbance při 420 nm (zbylé symboly jsou stejné jako ve vztahu v 4.2.3).

4.7.2 Stanovení koncentrace proteinu

Vzorek s enzymem byl podle potřeby naředěn a 100 μl naředěného vzorku bylo smícháno s 1 ml Bradfordova činidla. Během reakce se barvivo *Coomassie Brilliant Blue* v činidle vázalo na bazické aminokyseliny proteinu. Po patnáctiminutové inkubaci byla změřena absorbance při 595 nm vůči slepému vzorku (100 μl vody a 1 ml Bradfordova činidla) Ze získané absorbance byla vypočítána koncentrace proteinu ve vzorku pomocí kalibrační křivky naměřené s IgG dle vztahu:

$$c = A_{595} \cdot 0,3694$$

kde c je koncentrace proteinů ve vzorku a A_{595} je absorbance při 595 nm (kalibraci provedl jiný pracovník laboratoře).

4.7.3 Stanovení pH optima

Pro stanovení pH optima byl použit univerzální Britton-Robinsonův pufr v rozmezí pH 2,0–11,5. Enzym (100 μl) byl smíchán se 300 μl pufru o daném pH (měřilo se v rozmezí 2,0–11,5 po 0,5). Enzym byl podle potřeby naředěn puftrem o daném pH. Zkumavka s touto směsí byla preinkubována 10 min v daném pufru při 35 °C a 850 ot./min. Po preinkubaci bylo do směsi přidáno 100 μl substrátu (10 mmol/l *p*NP-Fuc) a proběhlo stanovení aktivity popsané výše (4.7.1).

4.7.4 Stanovení pH stability

Pro stanovení optimálního pH pro stabilitu enzymu se pracovalo s Britton-Robinsonovým puftrem v užším rozmezí pH (3,5–7,5 po 1,0). Enzym (50 μl) byl smíchán se 300 μl pufru a zkumavka byla inkubována při 25 °C a 300 ot./min.

V 1 h, 4 h a 20 h byl proveden odběr 100 μ l pro stanovení aktivity (4.7.1). Vyhodnocení proběhlo stejným způsobem jako vyhodnocení pH optima (4.7.3).

4.7.5 Stanovení kinetických parametrů

Pro stanovení kinetických parametrů enzymu bylo provedeno diskontinuální měření enzymové kinetiky v rozmezí koncentrace substrátu odpovídající cca 0,2–2x K_m (použití vyšších koncentrací zamezovala omezená rozpustnost substrátu). Toto rozmezí bylo pro každý enzym stanoveno screeningovou reakcí při koncentracích substrátu 0,5, 2, 5 a 7 mmol/l a orientačním vyhodnocením nelineární regrese (je popsáno níže). Pro samotné měření enzymové kinetiky bylo k dané koncentraci substrátu (*FoFuc*: 0,2–6 mmol/l, *FgFuc*: 1–8 mmol/l) přidáno 80 μ l enzymu (*FoFuc* ředěn 100x, *FgFuc* neředěn) a směs byla doplněna do 400 μ l C-P pufru o pH optima enzymu. Reakce probíhala při 35 °C a 850 ot./min. Z každé reakční směsi bylo v minutových intervalech odebíráno po dobu 7 min 50 μ l do 100 μ l 1 mol/l Na_2CO_3 pro zastavení reakce a naměření absorbance při 420 nm. Ze směrníc časových závislostí nárůstu koncentrace produktu byly stanoveny okamžité reakční rychlosti pro každou koncentraci substrátu. Závislost okamžité reakční rychlosti na koncentraci substrátu byla vyhodnocena nelineární regrese v programu GraphPad Prism 9 za použití modelu Michaelis-Menten dle vztahu:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

kde v je rychlost reakce, V_{max} je maximální rychlost reakce, $[S]$ je koncentrace substrátu a K_m je Michaelisova konstanta (udává koncentraci substrátu, při níž reakce dosahuje poloviny maximální rychlosti). Namísto rovnice Michaelis-Mentenové byla pro alosterický enzym *FgFuc* použit modifikovaný vztah:

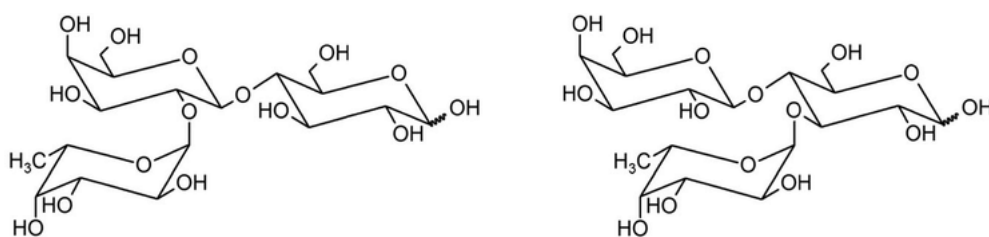
$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]^h}{K_{half}^h + [S]^h}$$

kde h je sklon Hillovy křivky a K_{half} ekvivalentem K_m . Pro všechny parametry byl vypočítán interval spolehlivosti na hladině 95% (CI 95%).

4.7.6 Screening substrátové specifity rekombinantních α -L-fukosidáz

Byla zkoumána aktivita α -L-fukosidáz k substrátům 2'-fukosyllaktóze a 3-fukosyllaktóze (vzorci viz Obrázek 11). Vzorek enzymu (10 μ l ze zásobního roztoku s aktivitou vůči *p*NP-Fuc: *Fo*Fuc: 90,4 U a *Fg*Fuc: 0,15 U) byl smíchán s 30 μ l pufru (50 mmol/l Sørensen, pH 8,0) a 10 μ l 10 mmol/l substrátu (2'FL, 3FL). Do reakcí byly přidány roztoky enzymů, které byly získány z purifikace a zakoncentrování. Hodnota aktivity nebyla pro porovnání sjednocena, protože byla snaha použít co největší dostupné množství enzymu pro detekci i nízké aktivity k substrátům.

Reakce probíhala při 35 °C a 850 ot./min po dobu 20 hodin. V průběhu reakce byly v pravidelných časových intervalech odebírány vzorky, které byly nanášeny na hliníkovou destičku potaženou silikagelem k provedení tenkovrstvé chromatografie (TLC). Reakční směs byla vyvíjena paralelně se standardy substrátů ve vyvíjecí směsi (4.1.9), která separovala jednotlivé sacharidy a oligosacharidy. Vizualizace byla provedena ponořením destičky do 5% *v/v* roztoku kyseliny sírové v ethanolu a následnou karbonizací horkovzdušnou pistolí.

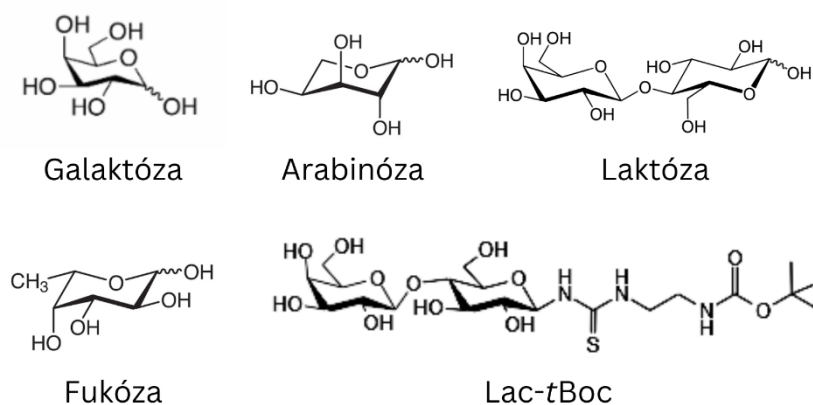


Obrázek 11 – Vzorce 2'-fukosyllaktózy (2'FL, vlevo) a 3-fukosyllaktózy (3FL, vpravo). Zdroj: Christensen et al., 2020.

4.7.7 Screening transfukosylační aktivity

Jako donor transfukosylačních reakcí byl použit 30 mmol/l *p*NP-Fuc. Jako akceptory byly použity 100 mmol/l laktóza, arabinóza, fukóza, galaktóza a

laktosyl-*t*Boc (modifikovaná laktóza; Lac-*t*Boc) – vzorce viz Obrázek 12. V 80 μ l pufru (10 mmol/l C-P pufru o pH optima) byl rozpuštěn donor a akceptor reakce; reakční směs byla pre-inkubována při 35 °C a 900 ot./min. Po 10 min bylo přidáno 20 μ l enzymu (*Fo*Fuc: 90,4 U a *Fg*Fuc: 0,15 U). V průběhu reakce byly odebrány vzorky na TLC analýzu, která probíhala výše uvedeným postupem (4.7.6).



Obrázek 12 – Struktury akceptorů transfukosylačních reakcí. Zdroje: TCI Chemicals, n.d.; Heine et al., 2021.

Výsledky TLC analýzy byly ověřeny vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Analýzy prováděla Ing. Lucie Petrásková, PhD. z Laboratoře biotransformací MBÚ AV ČR. Vzorky reakční směsi byly separovány na NH_2 koloně v systému reverzní fáze. Mobilní fáze sestávala z gradientu acetonitrilu a vody. Separované molekuly byly detekovány pomocí PDA detektoru (Photo Diode Array – detektor s diodovým polem), který snímá celé UV a viditelné spektrum v reálném čase, a ELSD (Evaporative Light Scatter Detector), který snímá rozptyl světla způsobený analytem po odpaření mobilní fáze. PDA byl použit pro detekci *p*NP, *p*NP-Fuc a Lac-*t*Boc; ELSD byl použit pro detekci nemodifikovaných sacharidů (fukóza, arabinóza, galaktóza, laktóza). HPLC byla doplněna hmotnostním spektrometrem, který podrobil analyt ionizaci elektrosprejem a následně jej analyzoval pomocí kvadrupólu za účelem identifikace látky.

5 VÝSLEDKY

5.1 Screening sbírky hub

Bylo vybráno deset zástupců ze Sbírký kultur hub, u kterých byl předpokládán výskyt α -L-fukosidázové aktivity, a to na základě několika parametrů:

- podobnost aminokyselinové sekvence daného druhu k sekvenci α -L-fukosidázy z *Fusarium graminearum*, a to: *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Mortierella alpina*, *Fusarium culmorum*;
- podobnost aminokyselinové sekvence s α -L-fukosidázou z *Thermotoga maritima*: *Mucor circinelloides*;
- podle literatury: Heine et al., 2021; Huňková et al., 1999: *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus phoenicis*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium*, *Talaromyces flavus*.

Po dvoutýdenní kultivaci vybraných hub v peptonovém médiu s induktory byl nalezen pouze jeden zástupce s α -L-fukosidázovou aktivitou, a to *Fusarium oxysporum* po indukci 0,5% fukózou a 0,1% arabinózou. Aktivita k pNP-Fuc byla měřitelná od 6. dne kultivace, kdy začalo testování. Průměrná hodnota aktivity v médiu po indukci fukózou byla $1,3 \pm 0,1$ U/ml, po indukci arabinózou $0,03 \pm 0,01$ U/ml.

Jediný zástupce ze sbírky hub s detekovanou α -L-fukosidázovou aktivitou však patří mezi již charakterizované enzymy. Pro potenciální rozšíření panelu studovaných enzymů bylo tedy zvoleno hledání potenciálních genů α -L-fukosidáz *in silico* a jejich heterologní exprese.

5.2 Sekvenační analýza fungálních genů

Prvním krokem hledání potenciálních nových α -L-fukosidáz bylo prohledání genových databází. K nalezení fungálních enzymů s podobnou

aminokyselinovou sekvencí k α -L-fukosidázám již známým z literatury byla použita aplikace BLAST. Jako referenční enzymy byly zvoleny α -L-fukosidázy z vláknité houby *Fusarium graminearum* (*Giberella zea*; FgFuc, AFR68935.1) a z bakterie *Thermotoga maritima* (TmFuc, AAD35394.1) charakterizované v pracích Zeuner et al. (2018) a Lezyk et al. (2016). TmFuc byl vybrán pro svou regioselektivitu α -1,2, která je žádoucí pro možné syntetické aplikace a FgFuc byl vybrán jako známý fungální zástupce α -L-fukosidáz, který byl již v literatuře heterologně produkován.

Byl hledán průnik mezi enzymy podobnými TmFuc a FgFuc, od kterého se očekávaly vlastnosti podobné alespoň jedné z popsaných α -L-fukosidáz. Tyto parametry splňovaly v nejvyšší míře (s nejvyššími hodnotami podobností) potenciální enzymy z *Apiotrichum porosum* (ApFuc), *Absidia repens* (ArFuc) a *Clonostachys rhizophaga* (CrFuc).

K výběru byly přidány dva již částečně popsané enzymy z *Fusarium graminearum* a *Fusarium oxysporum* (FoFuc, JX274678.1; nativní enzym byl popsán v pracích Yano et al. (1985); Yamamoto et al. (1986); Paper et al. (2013). Za účelem dosažení rozmanitosti potenciálně získaných enzymů byly z výběru nových kmenů vyjmuti ostatní zástupci rodu *Fusarium* (srpovničky).

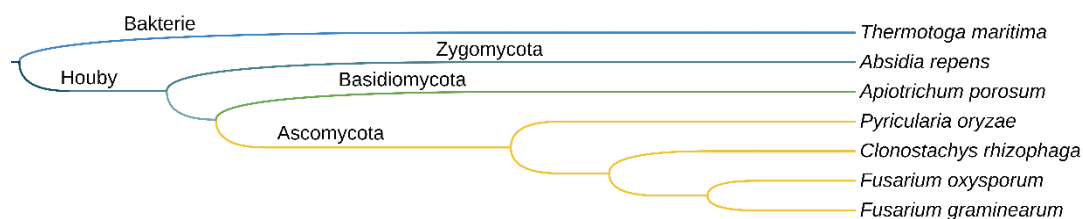
Analýza podobností vybraných sekvencí (ApFuc, ArFuc, CrFuc, FgFuc, FoFuc) s referenčními α -L-fukosidázami (FgFuc, TmFuc) ukázala různě velkou míru podobnosti aminokyselinových sekvencí, která je způsobena různou příbuzností jednotlivých organismů. Procentuální podobnost aminokyselinových sekvencí je vypsána v Tabulce 11.

Tabulka 11 – Vybrané enzymy z vláknitých hub a podobnost s α -L-fukosidázami z *Fusarium graminearum* (FgFuc) a *Thermotoga maritima* (TmFuc).

Organismus a kód proteinu	Míra	podobnosti s
	FgFuc [%]	k TmFuc [%]

<i>Apiotrichum porosum</i> (ApFuc)	24	42
<i>Absidia repens</i> (ArFuc)	27	38
<i>Clonostachys rhizophaga</i> (CrFuc)	71	27
<i>Fusarium graminearum</i> (FgFuc)	100	32
<i>Fusarium oxysporum</i> (FoFuc)	80	31

Příbuznost porovnávaných sekvencí je znázorněna na fylogenetickém stromu (Obrázek 13). Je patrné, že vybrané α -L-fukosidázy pochází z různých oddělení hub (Zygomycota – houby spájkivé, Basidiomycota – houby stopkovýtrusé, Ascomycota – houby vřeckovýtrusé).



Obrázek 13 – Fylogenetický strom srovnávaných organismů. České názvy oddělení hub jsou zmíněny v textu, české názvy hub jsou vypsány zde: *Absidia repens* – obloukovka plazivá, *Apiotrichum* (též *Trichosporon*) *porosum* – trichosporon (nemá české rodové jméno), *Clonostachys rhizophaga* je též bez českého názvu, *Fusarium oxysporum* – srpovnička špičatovýtrusá, *Fusarium graminearum* – též *Gibberella zae*, česky giberela či srpovnička růžová.

Do fylogenetického stromu byla přidána sekvence z *Pyricularia oryzae* (*Magnaporthe grisea*), která se nakonec nestala součástí práce. České názvy byly převzaty z databáze BioLib (Zicha O., 2018).

Analýza konzervovaných domén potvrdila, že všechny vybrané sekvence obsahují doménu GH29 typickou pro α -L-fukosidázy. Aplikace *Predict Protein* neobjevila žádné transmembránové úseky a jeden signální peptid v genech *FgFuc* a *FoFuc* (sekvence kódující signální peptid byla v sekvenci ponechána).

5.3 Produkce rekombinantních enzymů v *P. pastoris*

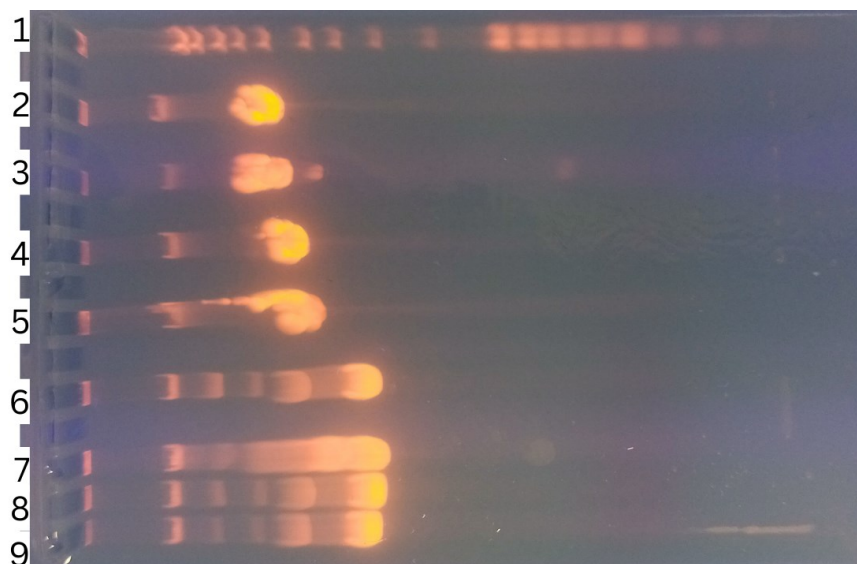
Pro heterologní produkci enzymů byla vybrána kvasinka *P. pastoris*, která byla použita v literatuře k produkci FgFuc (Cao et al., 2014) a dalších eukaryotických α -L-fukosidáz (Zeuner et al., 2018a; Usvalampi et al., 2020). Ze stejných důvodů byl vybrán plazmid pPICZ α A, který nese rezistenci na zeocin jako selekční faktor, počátek replikace pUC pro namnožení v *E. coli* a několik restričních míst, ze kterých lze vybrat vhodné restriční místo pro každý enzym. Dále plazmid obsahuje promotor pro AOX1 gen pro indukci exprese genů enzymů v *P. pastoris* pomocí methanolu (viz 2.3.4).

5.3.1 Transformace buněk *P. pastoris* geny α -L-fukosidáz

Komerčně připravené plazmidy obsahující geny vybraných enzymů byly namnoženy v buňkách *E. coli* Top10 pod selekčním tlakem zeocinu. Namnožený plazmid byl z buněk izolován pomocí sady *High Pure Plasmid Isolation Midi Kit*. Sekvenací bylo ověřeno, že geny proteinů izolovaných plazmidů odpovídají sekvencím enzymů z genetické databáze.

Připravené plazmidy byly linearizovány restriční endonukleázou *SacI* (kromě *ApFuc*, která byla linearizována endonukleázou *PmeI*) a výsledek linearizace byl ověřen elektroforézou v agarózovém gelu (Obrázek 14 – vzorový obrázek elektroforézy s vybranými plazmidy) vůči cirkulárním (nelinearizovaným) plazmidům, které v gelu zaujímají odlišnou konformaci.

Plazmidy byly izolovány z gelu v dostatečné čistotě ($A_{260/280} = 1,8-1,9$) a množství (5,5–9,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) a byly použity k transformaci buněk KM71H *P. pastoris* pomocí elektroporace. Transformované buňky *P. pastoris* se všemi analyzovanými geny byly úspěšně kultivovány na YPD agaru se zeocinem.



Obrázek 14 – Elektroforéza v agarózovém gelu byla použita pro kontrolu linearizace plazmidu. V dráhách 2–5 jsou patrné linearizované plazmidy, které v gelu zauímají jinou konformaci než plazmidy cirkulární (v dráhách 6–9). V první dráze je marker pro kontrolu velikosti. V drahách jsou plazmidy: 2 a 6 – *CrFuc*, 3 a 7 – *ArFuc*, 4 a 8 – *ApFuc* (v dráhách 5 a 9 je plazmid nesouvisející s touto prací). Proužky nalevo od proužku plazmidu odpovídají nerozštěpenému plazmidu.

5.3.2 Analytická produkce rekombinantních α -L-fukosidáz v *P. pastoris*

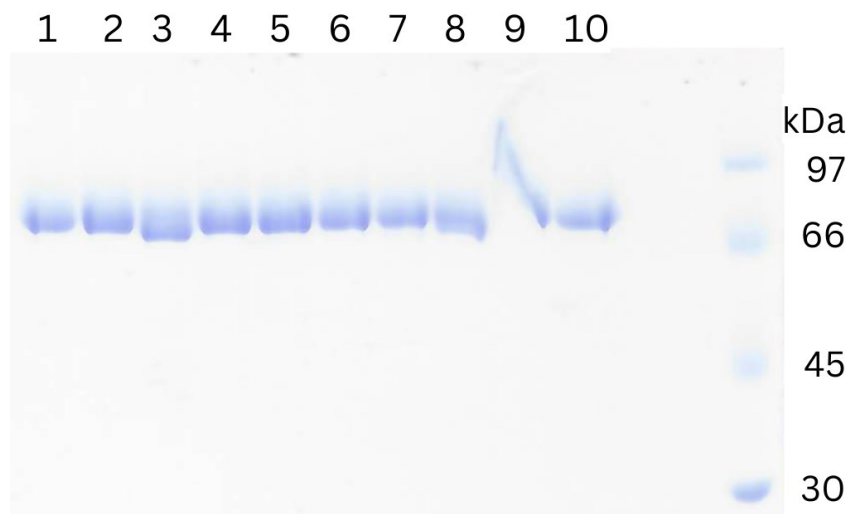
Z YPDA misek bylo vybráno 10 kolonií (pro každý enzym), které byly zaočkovány do tekutého BMGY média pro analytickou (zkušební) kultivaci a detekci přítomnosti rekombinantních α -L-fukosidáz. Cílem této kultivace bylo ověřit, že dané kolonie extracelulárně produkují rekombinantní enzymy s α -L-fukosidázovou aktivitou. Ověření proběhlo analýzou vzorků média z produkce pomocí SDS-PAGE a stanovením α -L-fukosidázové aktivity se standardním substrátem *pNP-Fuc*.

Aktivita k *pNP-Fuc* byla testována v poslední (5.) den kultivace v trnových baňkách. Tyto reakce daly pozitivní výsledek pouze u kultur produkujících enzymy *FgFuc* a *FoFuc*. U zbylých enzymů nebyla aktivita detekována.

Na SDS-PAGE byl nanesen 10x koncentrovaný vzorek každého kultivačního média společně s LMW markerem. Analýza gelů potvrdila úspěšnou expresi

genů proteinů odpovídající velikosti *FgFuc* a *FoFuc* (Obrázek 15 – uveden pouze *FgFuc* jako příklad). U enzymů *CrFuc*, *ArFuc* a *ApFuc* nebyla na gelu detekována přítomnost žádného extracelulárně produkovaného proteinu – u těchto enzymů tedy nebyla produkce úspěšná. Pro tyto enzymy byla elektroporace opakována, ale i přes to byla produkce neúspěšná.

Analytická produkce byla úspěšná pouze pro *FoFuc* a *FgFuc*. Jejich kolonie byly kryokonzervovány pro preparativní produkci.

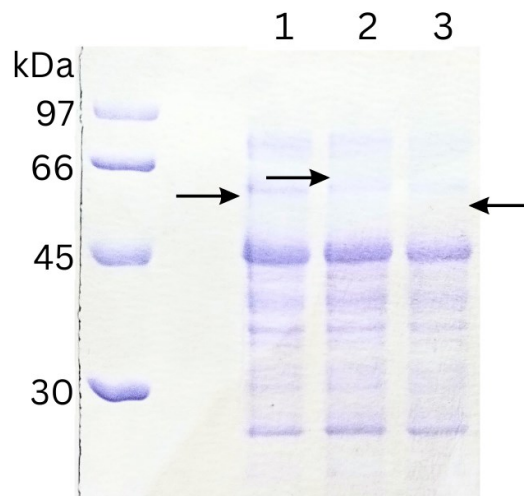


Obrázek 15 – Analýza SDS-PAGE k detekci extracelulární produkce proteinu v analytické produkci *FgFuc*. V drahách 1–10 jsou naneseny vzorky z kultivačních baněk, ve zbývajících dráze napravo je LMW marker. Proužek proteinu odpovídá teoretické hmotnosti 68 kDa.

5.3.3 Analýza exprese α -L-fukosidáz v *P. pastoris*

Vzorek transformovaných buněk *P. pastoris* z neúspěšné analytické kultivace *CrFuc*, *ArFuc* a *ApFuc* byl podroben enzymatické lýze a mechanickému rozbití buněk pro zjištění, zda nedochází u těchto kultur k intracelulární expresi enzymů vinou např. poruchy extracelulárního transportu. Buněčný lyzát kultur transformovaných geny *CrFuc*, *ArFuc* a *ApFuc* byl testován na aktivitu k *pNP-Fuc*, ale ani jeden vzorek nevykazoval aktivitu. Buněčný lyzát byl dále analyzován pomocí SDS-PAGE (Obrázek 16), na které žádný z proužků svou

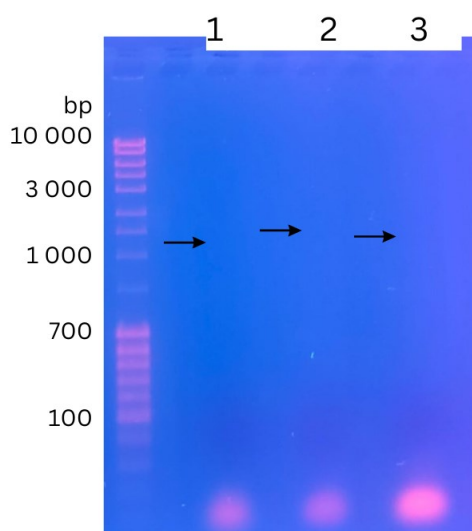
migrací neodpovídal očekávaným proteinům. Proteiny *CrFuc*, *ArFuc* a *ApFuc* nebyly tedy buňkami produkovány ani extracelulárně, ani intracelulárně.



Obrázek 16 – Analýza SDS-PAGE pro detekci α -L-fukosidáz v buněčném lyzátu. Do dráhy 1 byl nanesen *CrFuc* (54,5 kDa), do dráhy 2 *ArFuc* (61,3 kDa), do dráhy 3 byl nanesen *ApFuc* (51,6 kDa). Absence proužku v oblasti velikosti enzymů vylučuje intracelulární produkci proteinů. Zbarvení celé dráhy odpovídá bohaté proteinové výbavě *P. pastoris*.

5.3.4 Analýza vložení genu α -L-fukosidáz do genomu *P. pastoris*

Protože proteiny *CrFuc*, *ArFuc* a *ApFuc* nebyly transformovanými buňkami produkovány, bylo ověřeno, zda došlo při elektroporaci ke vložení příslušných genů do genomu *P. pastoris*. Buňky byly enzymaticky a mechanicky narušeny, z lyzátu byla izolována DNA pomocí sady *DNeasy UltraClean Microbial Kit* a fluorimetricky byla stanovena její koncentrace. S izolovanou DNA byla provedena PCR s primery (Tabulka 9) nasedajícími na sekvenci kódující geny příslušných α -L-fukosidáz. PCR byla vyhodnocena elektroforézou v agarózovém gelu (Obrázek 17), na kterém nebyly viditelné žádné proužky odpovídající genům enzymů, z čehož lze usuzovat, že při elektroporaci nedošlo ke vložení plazmidové DNA do buněk *P. pastoris*.



Obrázek 17 – Analýza PCR produktů na agarózovém gelu pro detekci genů kódujících enzymy v buňkách *P. pastoris*. Do dráhy 1 byl nanesen vzorek *ApFuc* (1 362 bp), 2 – *ArFuc* (1 605 bp), 3 – *CrFuc* (1 482 bp). Žádný viditelný proužek velikostně neodpovídá genům enzymů. Proužky na konci gelu odpovídají fragmentům chromozomální DNA.

5.3.5 Preparativní produkce α -L-fukosidáz v *P. pastoris*

Preparativní produkce byla provedena se dvěma enzymy, jež byly úspěšně produkovány v *P. pastoris*, a sice s *FoFuc* a *FgFuc*. Kryokonzervované kultury byly zaočkovány do YPD média a poté byly prekultury zaočkovány do 3 l trnových baněk s BMGY médiem. Po 24 h kultivaci byly kultury přeočkovány do BMMH média a indukovány methanolem k produkci rekombinantních enzymů.

Růst buněk byl ve všech fázích produkce kontrolován zbarvením a zákalem média. V případě potřeby byla naměřena optická hustota při 600 nm, která se u dobře narostlých buněk pohybovala nad 1. Krom vizuální kontroly lze růst buněk *P. pastoris* detekovat i čichově, neboť jsou tyto kvasinky cítit typickou kvasnicovou vůní. Na konci produkce byla přítomnost enzymů ověřena analýzou SDS-PAGE a stanovením enzymové aktivity s *pNP-Fuc*. Obě metody potvrdily, že produkce v preparativním měřítku *FoFuc* a *FgFuc* byla úspěšná.

5.3.6 Purifikace α -L-fukosidáz

Před purifikací byla média z preparativní produkce po odstranění buněk filtrována, naředěna vodou pro dosažení optimální konduktivity

v chromatografickém systému a jejich pH bylo upraveno na pH ekvilibračního pufru.

Pro purifikaci *FoFuc* a *FgFuc* byla použita iontově-výměnná chromatografie na přístroji Äkta purifier. Purifikace byla provedena na kationtově-výměnném i aniontově-výměnném systému a bylo vyzkoušeno několik kombinací ekvilibračních a elučních pufrů. Výsledné uspořádání, v němž byly enzymy zdárně purifikovány, bylo: aniontově-výměnná kolona Q-Sepharose, ekvilibrační C-P pufr pH 3,0 a eluce gradientem 100 mmol/l NaOH.

K eluci došlo v poměrně vysokém pH (9–10), proto bylo ve spojených frakcích obsahujících purifikovaný enzym ihned upraveno pH na hodnotu 6,0 (pH kultivačního média). Přítomnost α -L-fukosidáz ve frakcích byla potvrzena Bradfordovou metodou a stanovením aktivity s *pNP-Fuc*, které obě potvrdily úspěšnou purifikaci (a zachování aktivity enzymů navzdory eluci ve vysokém pH). Po purifikaci následovalo zakoncentrování enzymů v ultrafiltračních zkumavkách Amicon Ultra 10K.

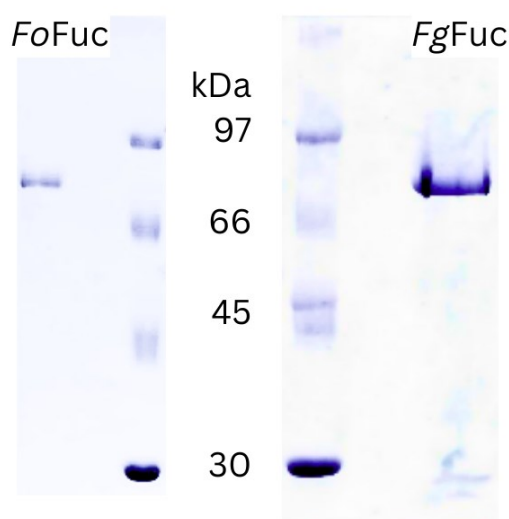
Výtěžek produkce a purifikace se zakoncentrování byl vypočítán z naměřených aktivit a koncentrací proteinů vztažených na objem roztoku (Tabulka 12 –). Ze 190 ml kultivačního média *FoFuc* bylo získáno 2,2 mg čistého proteinu, U *FgFuc* bylo získáno 83 mg čistého proteinu ze 180 ml kultivačního média.

Purifikované proteiny byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obrázek 18).

Tabulka 12 – Výtěžky produkce, purifikace a zakoncentrování *FoFuc* a *FgFuc*.

		Celková aktivita [U]	Celkový protein [mg]	Specifická aktivita [U/mg]	Výtěžek [%]
<i>FoFuc</i>	Kultivační médium	637 ± 3	14,8 ± 0,3	41 ± 3	100

	Q-Sepharose a Amicon Ultra 10K	90 ± 5	2,2 ± 0,1	41 ± 3	14
FgFuc	Kultivační médium	1,2 ± 0,1	117 ± 5	0,010 ± 0,001	100
	Q-Sepharose a Amicon Ultra 10K	0,15 ± 0,03	83 ± 2	0,0018 ± 0,0004	13



Obrázek 18 – Analýza SDS-PAGE byla provedena nadvakrát pro detekci α -L-fukosidáz ve frakcích z purifikace. Nalevo je vzorek s *FoFuc* (67,9 kDa), napravo *FgFuc* (68 kDa), mezi nimi jsou dráhy s LMW markerem. Absence dalších proužků dokazuje čistotu enzymu získanou purifikací.

5.4 Produkce rekombinantních enzymů v *E. coli*

Protože tři z pěti navržených enzymů se v původně navrženém hostiteli *P. pastoris* nepodařilo úspěšně produkovat, byla u těchto konstruktů navržena alternativní metoda produkce v jiném hostitelském organismu, a to *E. coli*.

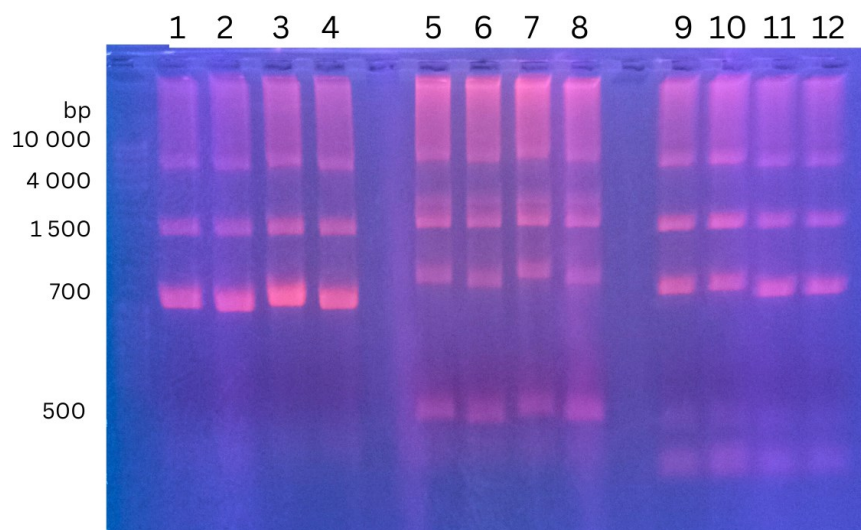
5.4.1 Vložení do plazmidu pCold II

Pro produkci v *E. coli* bylo nutné vložit gen kódující α -L-fukosidázy do plazmidu pCold II, vhodného pro expresi genu v *E. coli*. Plazmid pCold II je v literatuře používán k šetrné produkci špatně se skládajících proteinů

(Hovorková et al., 2021) a postrádá β -galaktosidázovou aktivitu, která může u proteinů s nízkou produkcí interferovat. Součástí plazmidu pCold II je sekvence pro expresi histidinové kotvy. α -L-Fukosidázy nesoucí histidinovou kotvu na N-konci mohly být purifikovány afinitní chromatografií na koloně HisTrap.

Prvním krokem byla linearizace zdrojových plazmidů pPICZ α A nesoucích příslušné geny pomocí restričních endonukleáz. Úspěšná linearizace byla ověřena elektroforézou v agarózovém gelu. Plazmidy byly z gelu izolovány a byla stanovena koncentrace DNA: *CrFuc*: 5,95 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, *ArFuc*: 9,09 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, *ApFuc*: 5,76 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Druhým krokem byla amplifikace genů α -L-fukosidáz s novými restričními místy pomocí PCR. PCR proběhla ve čtyřech zkumavkách s různými teplotami v gradientu 52–58 °C ve fázi nasednutí primerů. Rozmezí 52–58 °C bylo zvoleno jako kompromis mezi rozdílnými teplotami tání jednotlivých primerů. Na elektroforéze PCR produktů se vliv teploty projevil pouze minimálně (Obrázek 19). Z gelu byl sadou *DNA Gel Extraction Kit* izolován proužek v oblasti 1 500 bp, který velikostně odpovídal sekvenci enzymů. Poté byla fluorimetricky stanovena koncentrace DNA: *CrFuc*: 2,74 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *ArFuc*: 10,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, *ApFuc*: 3,56 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

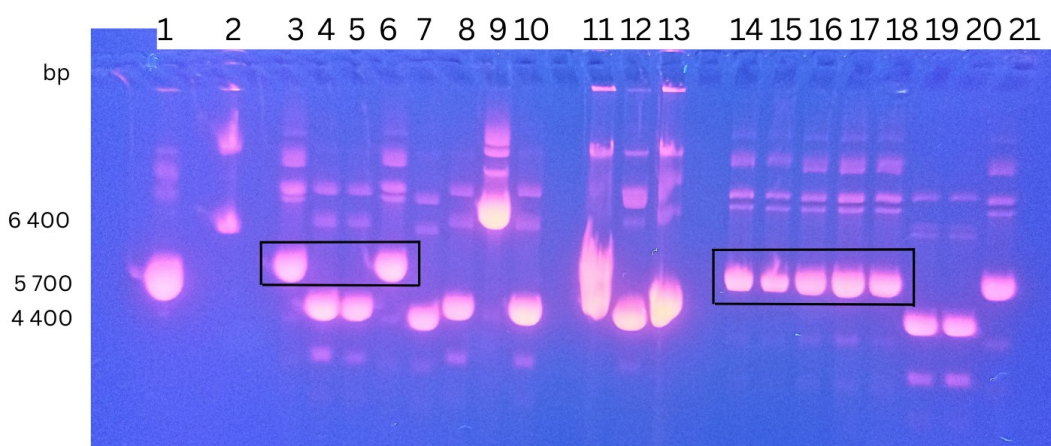


Obrázek 19 – Elektroforéza v agarózovém gelu pro vyhodnocení PCR reakce pro amplifikaci genů. Do drah 1–4 byl nanesen gen *ApFuc*, 5–8: gen *ArFuc*, 9–12: gen *CrFuc*. První dráha pro každý enzym odpovídá teplotě nasedání primerů

52 °C, druhá 54 °C, třetí 56 °C, čtvrtá 58 °C. Z intenzity jednotlivých proužků lze odhadovat množství amplifikované DNA, avšak mezi jednotlivými teplotami lze pozorovat jen minimální rozdíl.

Třetím krokem bylo rozštěpení restrikčních míst plazmidu pCold II a připravených inzertů s geny α -L-fukosidáz. Rozštěpením vznikly lepivé konce, díky nimž bylo možné vnést geny α -L-fukosidáz do plazmidu pCold II. Ligace byla provedena T4 ligázou.

Takto připravený plazmid byl použit k transformaci buněk *E. coli* Top10 pro namnožení. Namnožené transformanty byly analyzovány elektroforézou v agarózovém gelu (Obrázek 20), kdy byla porovnávána velikost plazmidů s kontrolním vzorky o známé molekulové hmotnosti. DNA ve vybraných proužcích byla izolována pomocí sady *High Pure Plasmid Isolation Mini Kit* a odeslána na sekvenování. Byly vybrány pouze vzorky s úspěšně vloženým genem α -L-fukosidáz. Na elektroforetickém gelu se vzorky *ApFuc* byly viditelné pouze proužky odpovídající velikosti vektoru pCold II bez vloženého insertu, proto jsem usoudila, že se *ApFuc* nepodařilo vložit do vektoru pCold II, a to ani při opakování postupu s novými primery.



Obrázek 20 – Elektroforéza v agarózovém gelu pro ověření úspěšnosti ligace. Do drah 3– 10 byly naneseny vzorky pCold II s genem *ArFuc* a do drah 14– 21 vzorky pCold II s genem *CrFuc*. Ve zbylých drahách jsou kontrolní vzorky: 1 – 5 700 bp, 2 – 6 400 bp, 11 – 5 198 bp (gen *ArFuc* v pPICZ α A), 12 – 4 392 bp (vektor pCold II), 13 – 5 075 bp (pPICZ α A s genem *CrFuc*). Proužky v drahách 3 a 6 odpovídají předpokládané velikosti genu *ArFuc* (5 997 bp), stejně jako proužky

v drahách 14–18 odpovídají genu *CrFuc* (5 874 bp); tyto proužky byly izolovány a zkontrolovány sekvenováním.

Plazmidy pCOLD II nesoucí geny α -L-fukosidáz byly namnoženy v buňkách Top10, izolovány v preparativním měřítku a sekvence genů byly ověřeny sekvenací.

5.4.2 Analýza produkce α -L-fukosidáz v různých kmenech *E. coli*

Připravené plazmidy byly použity k produkci α -L-fukosidáz v buňkách *E. coli* JM109 1990, BL21(DE3)pLysS, Rosetta2(DE3) a BL21-Gold(DE3). Z praktického hlediska se od sebe buňky lišily inkubačními teplotami, rychlostí třepání, kultivačními médii, antibiotickou rezistencí, koncentrací induktoru a délkou produkce. Jednotlivé kmeny používají různé mechanismy stimulace exprese genu kódujícího rekombinantní protein.

Buňky byly kultivovány 3 dny v LB nebo TB médiu pod selekčním tlakem příslušných antibiotik: k ampicilinu, jehož rezistence je obsažena v plazmidu pCold II, byl v případě BL21(DE3)pLysS a Rosetta2(DE3) přidán chloramfenikol, neboť tyto kmeny nesou chloramfenikolovou rezistenci. Během kultivace byl do média přidáván IPTG k indukci exprese genu α -L-fukosidáz. Buňky BL21-Gold(DE3) byly během exprese genu kultivovány při nižší teplotě, aby bylo zamezeno produkci jiných proteinů.

Výsledkem kultivace byla suspenze buněk (*E. coli* produkuje proteiny pouze intracelulárně na rozdíl od *P. pastoris*), ze které bylo odebráno 1–5 g (podle výtěžku kultivace). Buňky byly resuspendovány v pufru, sonikovány a purifikovány afinitní chromatografií na přístroji Äkta Prime Plus. Při purifikaci byla využita histidinová kotva na N-konci navržených konstruktů, která se vážala na kolonu HisTrap, po promytí kolony byl protein eluován puftrem s imidazolem (který má ke koloně vyšší afinitu než histidinová kotva). Průběh purifikace byl kontinuálně monitorován spektrofotometricky při 280 nm.

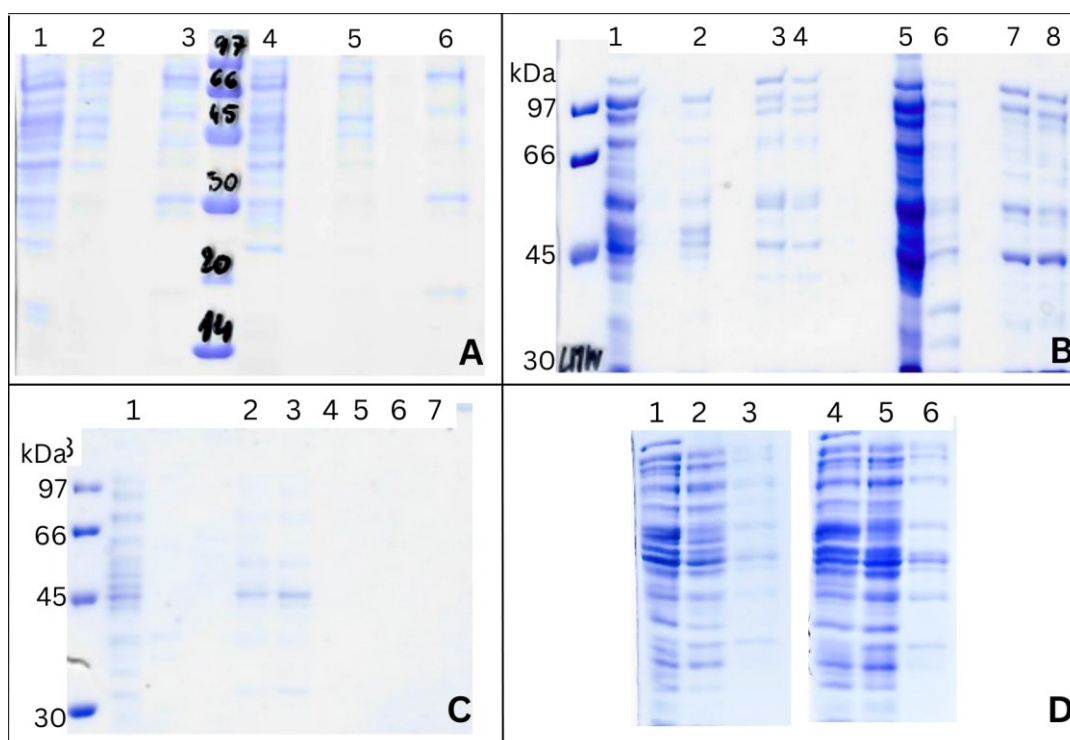
Přítomnost proteinu ve sbíraných frakcích byla dále ověřena Bradfordovou zkouškou.

Během celé produkce a purifikace byl systematicky prováděn screening α -L-fukosidázové aktivity k *p*NP-Fuc. Testovány byly vzorky obou enzymů (*CrFuc*, *ArFuc*) ve čtyřech buněčných kmenech (supernatant po centrifugaci lyzátu po produkci a frakce z purifikace). Žádný ze vzorků bohužel nevykazoval α -L-fukosidázovou aktivitu.

Produkce rekombinantních α -L-fukosidáz *CrFuc* a *ArFuc* ve všech kmenech byla analyzována pomocí SDS-PAGE, na kterou byly naneseny vzorky z buněčné suspenze a frakce z purifikace. Na žádném z gelů (Obrázek 21A) nebyla prokázána přítomnost proteinu ani v lyzátu buněk *E. coli*, ani v purifikovaném vzorku. Z toho lze usoudit, že produkce fungálních α -L-fukosidáz v buňkách *E. coli* nebyla úspěšná.

Na dalších obrázcích jsou zobrazeny gely se vzorky z produkce *CrFuc* v dalších buňkách, nicméně ani tam nebyla produkce úspěšná (Obrázek 21B a C). Situace byla totožná u produkce *ArFuc*.

V dalším experimentu jsem pomocí SDS-PAGE (Obrázek 21D) srovnala lyzáty buněk z produkce α -L-fukosidáz s lyzáty totožných buněk netransformovaných plazmidem, kdy obě kultury byly kultivovány stejným způsobem. Je zobrazen jeden příklad buněk (*E. coli* BL21-Gold(DE3)), protože výsledky exprese ostatními kmeny *E. coli* byly totožné. Je zřejmé, že proteinový profil transformovaných a netransformovaných buněk je shodný. Z hlediska přítomnosti rekombinantních α -L-fukosidáz byla produkce v buňkách *E. coli* vyhodnocena jako neúspěšná.



Obrázek 21 – Analýzy produkce rekombinantních α -L-fukosidáz v buňkách *E. coli* pomocí SDS-PAGE.

A: Analýza přítomnosti *CrFuc* (dráhy 1–3) *ArFuc* (dráhy 4–6) v buňkách JM109 1990. V první dráze obou enzymů (1, 4) je nanesen vzorek pelety buněčné suspenze, ve druhé dráze (2, 5) je supernatant a ve třetí dráze (3, 6) jsou spojené frakce z purifikace pozitivní na přítomnost proteinu. Žádný z proužků neodpovídá produkci ani velikosti α -L-fukosidáz (*CrFuc* 54,5 kDa, *ArFuc* 61,3 kDa).

B: Analýza přítomnosti *CrFuc* v buňkách BLI21(DE3)pLysS (dráhy 1–4) a buňkách Rosetta2(DE3) (dráhy 5–8) V první dráze obou setů (dráhy 1 a 5) je suspenze buněk, ve druhé (dráhy 2 a 6) je vzorek ze sbíraného odpadu z purifikace a ve zbývajících drahách jsou frakce z purifikace. Silnější proužek ve drahách 7 a 8 velikostně neodpovídá teoretické velikosti *CrFuc* (54,5 kDa), takže se nejspíš jedná o běžný protein *E. coli*.

C: Analýza přítomnosti *CrFuc* v buňkách BL21-Gold(DE3). V dráze 1 je vzorek suspenze buněk, ve dráze 2 je vzorek sbíraného odpadu z purifikace a ve zbývajících drahách jsou frakce z purifikace. Silnější proužky v drahách 2 a 3 velikostně neodpovídají teoretické velikosti *CrFuc* (54,5 kDa).

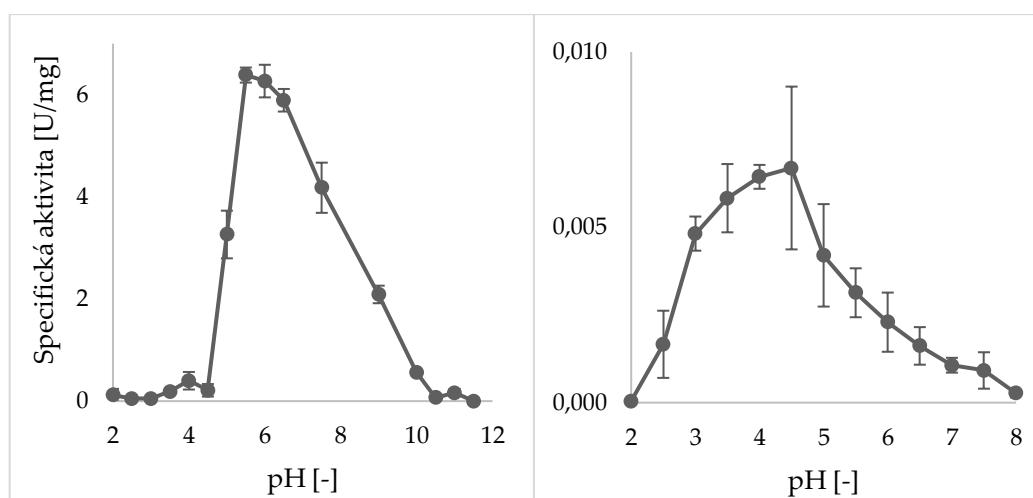
D: Analýza netransformovaných buněk BL21-Gold(DE3) (dráhy 17 a 20) a totožných buněk s vloženým plazmidem *CrFuc* (dráhy 18–19) a *ArFuc* (dráhy 21–22). V drahách 18 a 21 je vzorek suspenze buněk z produkce, v drahách 19 a 22 je vzorek ze spojených frakcí z purifikace.

5.5 Charakterizace rekombinantních α -L-fukosidáz

5.5.1 Stanovení pH optima rekombinantních α -L-fukosidáz

Byl zkoumán vliv pH na aktivitu enzymů *FoFuc* a *FgFuc* v reakci. pH optimum bylo vyhodnoceno jako hodnota pH, při níž bylo dosaženo nejvyšší aktivity enzymu. Enzym byl inkubován v daném pH a poté byla stanovena jeho aktivita k *pNP-Fuc* (stále v pH inkubace). Pro *FoFuc* bylo pH optimum (Obrázek 22 vlevo) stanoveno na pH 5,5, kdy dosáhla aktivita $6,4 \pm 0,2$ U/mg. V rozmezí pH 5,5–7,5 si *FoFuc* udržel aktivitu vyšší než 60 % maxima. V krajních hodnotách (v pH nižších než 3,5 a vyšších než 10,5) měl *FoFuc* méně než 5% aktivitu.

U enzymu *FgFuc* bylo pH optimum (Obrázek 22 vpravo) stanoveno stejným způsobem. Výsledná hodnota byla pH 4,5, kdy enzym dosáhl nejvyšší aktivity: $0,007 \pm 0,002$ U/mg. *FgFuc* si udržel vyšší než 60% aktivitu v pH 3,0–5,0, ale mimo toto rozmezí aktivita klesala. V krajních hodnotách měření (pH 2,0 a 8,0) byla aktivita nižší než 5 %.

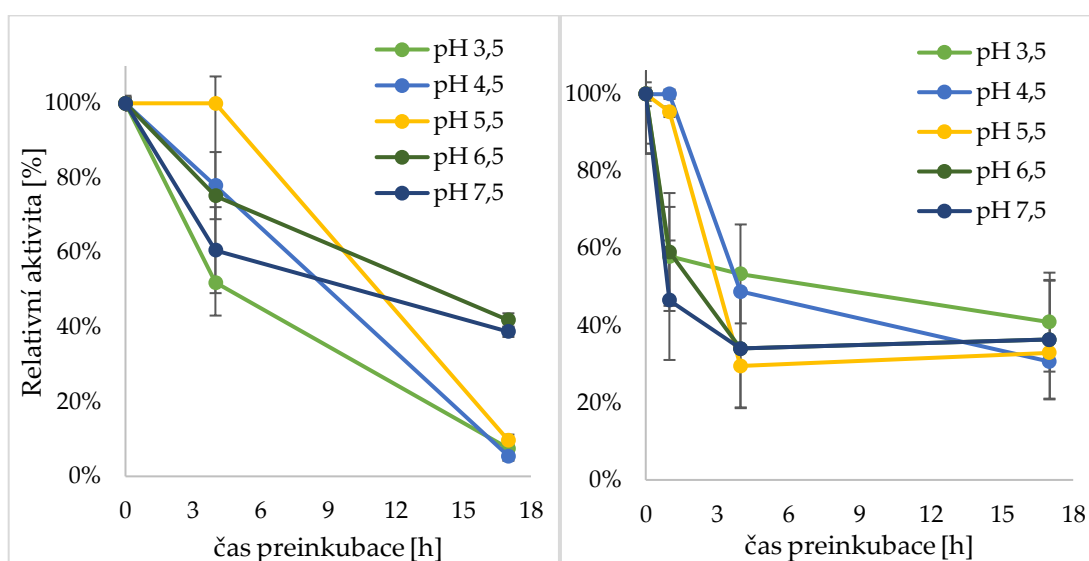


Obrázek 22 – Vliv pH na aktivitu *FoFuc* (nalevo) a *FgFuc* (napravo).

Dále byl zkoumán vliv pH na stabilitu enzymu *FoFuc* (Obrázek 23 vlevo) Enzym byl preinkubován v pH 3,5–7,5 a během preinkubací byly ve stanovených časových intervalech odebírány vzorky k provedení reakce s *pNP-Fuc* standardní metodou (4.7.1). Po 4 h v pH 5,5 vykazoval enzym *FoFuc* nejvyšší stabilitu: jeho aktivita nabyla nejvyšší hodnoty, ale po 17 h inkubace jeho aktivita

klesala pomaleji v pH 6,5 (s aktivitou 35 ± 2 U/mg) a v pH 7,5 (s aktivitou 32 ± 1 U/mg). Pro dlouhodobé uchování *FoFuc* je tedy vhodné rozmezí pH 6,5–7,5.

Stabilita *FgFuc* byla zkoumána stejným způsobem (Obrázek 23 vpravo). Po 1 h inkubaci v pH 4,5 dosáhl *FgFuc* nejvyšší aktivity: $0,07 \pm 0,02$ U/mg. S časem inkubace však jeho aktivita klesala a po 17 h byla nejvyšší aktivita dosažena v pH 3,5, kdy dosáhla 41 % maxima ($0,059 \pm 0,005$ U/mg). Hodnota pH 3,5 byla tedy vyhodnocena jako nejvhodnější pro dlouhodobé uchování *FgFuc*.



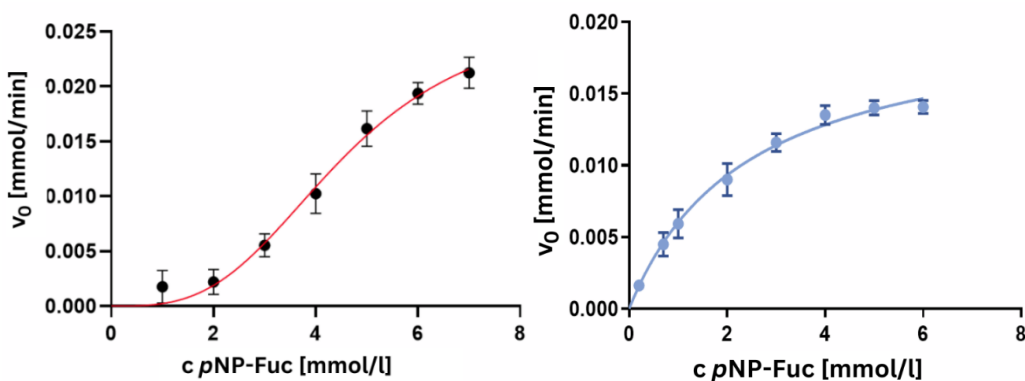
Obrázek 23 – Vliv pH na stabilitu *FoFuc* (nalevo) a *FgFuc* (napravo) během 17 h preinkubace.

5.5.2 Enzymová kinetika

Pro *FoFuc* byla ze závislosti reakční rychlosti na koncentraci substrátu *pNP-Fuc* byla sestrojena kinetická křivka (Obrázek 24 vlevo) a vypočítána Michaelisova konstanta $K_m = 2,4$ mmol/l (CI 95% = 1,8–3,0 mmol/l), maximální rychlost reakce $V_{max} = 0,02$ μ mol/l/min (CI 95% = 0,019–0,023 μ mol/l/min) a číslo přeměny $k_{cat} = 16$ s⁻¹.

Sestrojená kinetická křivka saturace *FgFuc* (Obrázek 24 vpravo) měla esovitý tvar, což znamená, že se jedná o alosterický enzym. Podle sklonu Hillovy křivky $h = 3,2$ by se *FgFuc* mohl skládat ze 3 kooperujících aktivních míst (dle Weiss

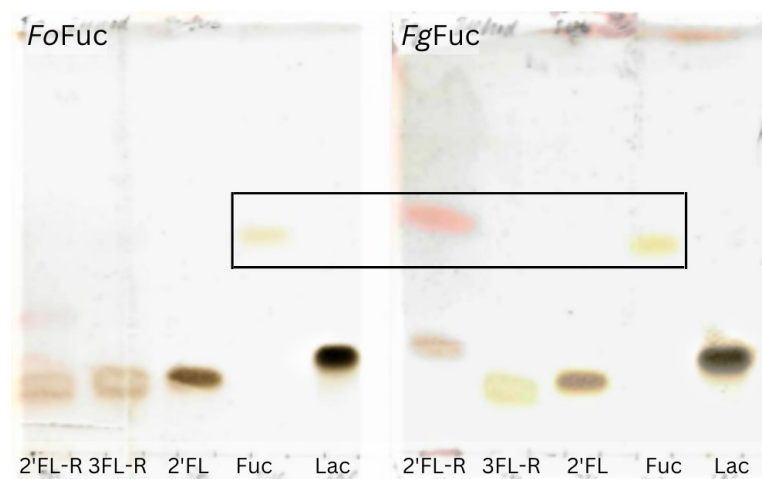
(1997)). Byla vypočítána $V_{\max} = 0,03 \mu\text{mol/l/min}$ (CI 95% = 0,02–0,05 $\mu\text{mol/l/min}$) a $K_{\text{half}} = 4,6 \text{ mmol/l}$ (CI 95% = 3,9–7,3 mmol/l). Kinetická křivka *FgFuc* není plně saturovaná z důvodu špatné rozpustnosti substrátu ve vyšších koncentracích.



Obrázek 24 – Vlevo: graf závislosti rychlosti reakce na koncentraci *pNP-Fuc* pro *FoFuc*. Vpravo: kinetická křivka hydrolýzy *pNP-Fuc* pomocí *FgFuc* má esovitý tvar typický pro alosterické enzymy.

5.5.3 Analýza substrátové specifity

U *FgFuc* a *FoFuc* byla testována aktivita k alternativním substrátům 2'FL a 3FL, která byla vyhodnocena pomocí TLC. 2'FL a 3FL se odlišují pouze regioselektivitou vazby mezi fukózou a laktózou, takže hydrolýza jednoho z těchto substrátů by odhalila regioselektivitu daného enzymu. Po hydrolýze substrátu byla v reakci detekovatelná fukóza jako produkt štěpení substrátu. Z analýzy TLC (Obrázek 25) je patrné, že došlo pouze k hydrolýze 2'FL pomocí *FgFuc*, což bylo detekovatelné po 24 h reakce. Analýza HPLC (provedena na NH_2 koloně v gradientu acetonitrilu a vody s detektory PDA a ELSD) vzorků z reakce potvrdila, že ve vzorcích z reakce byla fukóza obsažena pouze ve vzorku se substrátem 2'FL s enzymem *FgFuc*. *FgFuc* má tedy vůči tomuto substrátu α -1,2 specifitu. U enzymu *FoFuc* byla detekována pouze aktivita k *pNP-Fuc*.

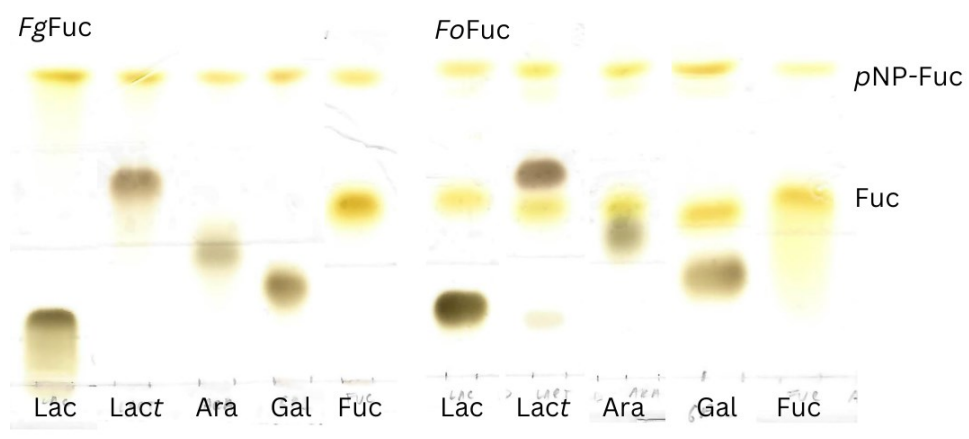


Obrázek 25 –Analýza TLC pro vyhodnocení aktivity *FoFuc* (vlevo) a *FgFuc* (vpravo) k 2'FL a 3FL. 2'FL-R a 3FL-R značí vzorky z reakce, do zbývajících drah byly nanášeny standardy substrátů. V rámečku jsou zvýrazněny proužky fukózy, která vznikla enzymovou hydrolyzou 2'FL (vznikala zde i laktóza jako druhý hydrolytický produkt).

5.5.4 Analýza transfukosylační aktivity

Transfukosylační aktivita *FgFuc* a *FoFuc* byla zkoumána reakcí *pNP-Fuc* jako donoru fukózy a několika možných akceptorů: laktózy (Lac), arabinózy (Ara), fukózy (Fuc), galaktózy (Gal) a modifikovaného akceptoru laktosyl-*tBoc* (Lact na obrázku). Akceptor byl přidáván v nadbytku (100 mmol/l vůči 30 mmol/l donoru) pro zvýšení poměru transglykosylace a hydrolyzy ve prospěch transglykosylace. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (Obrázek 26) a HPLC analýzy.

Na deskách *FoFuc* jsou ve všech drahách viditelné proužky fukózy, které dokazují hydrolyzu *pNP-Fuc*. Syntetický modifikovaný akceptor Lac-*tBoc* použitý s *FoFuc* obsahoval zbytkovou laktózu ze syntézy. Analýzou TLC nebyla za těchto podmínek pozorována žádná transfukosylační aktivita u *FoFuc* ani *FgFuc*, a to ani autokondenzační aktivita. Stejný závěr potvrdila HPLC analýza (za výše uvedených podmínek) vzorků z reakce, která potvrdila přítomnost akceptoru a částečně rozštěpeného donoru, ale žádného vznikajícího disacharidu.



Obrázek 26 – Analýza vzorků transfukosylačních reakcí pomocí TLC. Vlevo: vzorky s *FgFuc*; vpravo: vzorky s *FoFuc*.

6 DISKUZE

Ke screeningu fukosidázové aktivity ve Sbírce kultur hub Katedry botaniky PřF UK byly vybrány houby podle několika parametrů. Kmeny *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavipes*, *Aspergillus phoenicis*, *Penicillium funiculosum* a *Penicillium purpurogenum* var. *rubrisclerotium* v práci Huňkové et al. (1999) buď samy vykazovaly α -L-fukosidázovou aktivitu k pNP-Fuc, nebo byla jejich fukosidázová aktivita indukována kultivací s vybranými induktory. *Fusarium oxysporum* bylo dle Huňkové et al. aktivní po indukci 0,1% fukózou a 0,1% arabinózou. U *Aspergillus flavipes* byla dle Huňkové et al. naměřena α -L-fukosidázová aktivita 0,02–8 U/mg po indukci 4% glukózou a u *A. phoenicis* byla po stejné indukci naměřena aktivita nižší než 0,02 U/mg. U obou zástupců *Penicillium* byl zaznamenán pětinasobný nárůst aktivity po indukci 0,1% deoxyglukózou. V předkládané práci byla potvrzena α -L-fukosidázová aktivita pouze u *F. oxysporum* indukovaná kultivací s 0,5% fukózou a 0,1% arabinózou. Nepřítomnost aktivity u ostatních zástupců lze vysvětlit např. poklesem α -L-fukosidázové aktivity pod mez detekce v důsledku každoročního přeočkovávání fungálních kmenů (od práce Huňkové et al. uplynulo 24 let).

Další skupina enzymů pro screening byla vybrána na základě podobnosti aminokyselinové sekvence ke známým α -L-fukosidázám z *Fusarium graminearum* a *Thermotoga maritima*, a to: *Aspergillus terreus*, *Mortierella alpina*, *Mucor circinelloides* a *Fusarium culmorum* (též *F. oxysporum* mělo podobnost ke známým fukosidázám, ale již bylo zmíněno výše). α -L-Fukosidázová aktivita nebyla u těchto zástupců v této práci nalezena. Výběr doplňoval kmen *Talaromyces flavus*, který je předmětem současného výzkumu v laboratoři (Heine et al., 2021), nicméně ani u něj nebyla nalezena α -L-fukosidázová aktivita.

Neúspěch screeningu Sbírky kultur hub mě donutil obrátit se na genové knihovny. Výběr genů nových fungální α -L-fukosidáz byl proveden metodami funkční genomiky, které umožnily prohledat prostor genetických databází.

Vybrané geny vykazovaly relativně nízkou podobnost se známými α -L-fukosidázami (24–71 %), což bylo způsobeno parametry výběru – jen málokterý hypotetický enzym byl podobný fungální α -L-fukosidáze z *F. graminearum* a zároveň bakteriální α -L-fukosidáze z *Thermotoga maritima*. Stejnými metodami byly v nedávné publikaci (Lezyk et al., 2016) nalezeny nové α -L-fukosidázy v půdní metagenomické knihovně s podobností 41–76 % se známými fukosidázami a všech sedm enzymů bylo úspěšně produkováno v *E. coli*. Fukosidázy FoFuc a FgFuc již jsou v literatuře částečně popsány, proto byly vybrány do studované skupiny.

Zeuner & Meyer (2020) spekulují, že bohatým zdrojem glykosidáz s transglykosylační schopností mohou být patogenní organismy, protože mohou transglykosylační schopnost využívat k maskování své přítomnosti produkcí hostitelských glykanů v rámci své strategie invaze. Výběr α -L-fukosidáz k produkci v této práci navazoval na tuto teorii, neboť vybrané geny pocházejí z patogenních plísní: zástupci rodu *Fusarium* způsobují „fusariové vadnutí“ rostlin, rod *Clonostachys* jsou mykoparazitické houby. Rody *Apiotrichum* a *Absidia* jsou převážně neškodné půdní plísně, ale zároveň potenciální alergeny a původci zygomykózy krav (Middelhoven et al., 2001; Okungbowa et al., 2012).

Tato práce není jedinou prací, která narazila na potíže při expresi genu při heterologní produkci. Z množství prací, které tento problém zmiňují, lze usoudit, že se jedná o rozšířený problém, který lze vysvětlit mezerami v našich znalostech molekulárně-biologických a biochemických mechanismů komplexního procesu produkce proteinů. Jedním z nabízených řešení je změna hostitelského organismu, což bylo provedeno v práci Nekvasilové et al. (2022). V práci Nekvasilové et al. byla produkce rekombinantního proteinu přesunuta z *E. coli* do *P. pastoris*. čímž bylo dosaženo lepšího skládání proteinů (jednalo se o glykosidázu původně z *Bifidobacterium bifidum*). V práci Hovorkové et al. (2021) byla produkce β -galaktosidázy z *B. circulans* zlepšena použitím expresního

vektoru pCold II a buněk *E. coli* BL21-Gold(DE3). Kultivace při nižší teplotě aktivovala promotor *cspA*, a tak bylo dosaženo správného složení poměrně velkého proteinu.

V této práci byly geny *CrFuc* a *ArFuc* produkovány jak v *P. pastoris*, tak ve zmíněných BL21-Gold(DE3), avšak ani v jednom případě nebylo dosaženo úspěšné produkce. Na vině může být samotný gen, který bývá do genových databází přidán na základě sekvenace celého organismu. Přiřazování funkcí jednotlivým genům je doménou genomiky, která ale pracuje v čistě teoretické rovině (na základě analýz *in silico*). Vybrané geny (*CrFuc*, *ArFuc*, *ApFuc*) nebyly doposud nikdy heterologně exprimovány, a tak je jejich funkce pouze hypotetická. Je možné, že nám o jejich expresi v domovských organismech schází klíčové informace. Dalším důvodem neúspěchu produkce může být složitost zvolených proteinů – je možné, že při rekombinantní produkci nebyly hostitelským organismem provedeny všechny posttranslační úpravy nutné pro správnou produkci enzymu (např. glykosylace, odebrání signálních peptidů). Odstranění sekvence signálního peptidu bylo provedeno při produkci *FgFuc* v práci Zeuner, Muschiol, et al. (2018). V jejich práci byla k *FgFuc* přidána histidinová kotva a enzym byl nejprve neúspěšně produkován v *E. coli* BL21(DE3)pLysS, kde zůstal v nerozpustných inkluzních tělískách. Poté byl *FgFuc* úspěšně produkován v buňkách *P. pastoris* X-33 ve výtěžku 35 mg/l.

V práci Paper et al. (2013) byla neúspěšná produkce α -L-fukosidázy z *F. oxysporum* v *P. pastoris* vysvětlena možnou interferencí histidinové kotvy přidané ke genu enzymu. Tuto teorii si experimentátoři ověřili při produkci α -L-fukosidázy z *F. graminearum*, kterou si připravili ve verzi s histidinovou kotvou a bez kotvy. Exprese genu bez histidinové kotvy byla výrazně úspěšnější – vyšší byla jak spolehlivost produkce, tak množství vyprodukovaného proteinu. V produkci v předkládané práci byly geny exprimovány v *P. pastoris* bez histidinové kotvy, ale byla ke genům přidána při produkci v *E. coli*. Produkce

rekombinantních α -L-fukosidáz *CrFuc*, *ArFuc* a *ApFuc* nebyla v předkládané práci úspěšná, a to ani přes opakovanou produkci v *P. pastoris* a ve čtyřech kmenech *E. coli*. Možnou úpravou by bylo odebrání histidinové kotvy při produkci v *E. coli*, což v jiných pracích potenciálně přineslo lepší výsledky produkce (Paper et al., 2013). Další možností pro potenciální zlepšení produkce v *E. coli* je použití *chaperonů* – proteinových komplexů napomáhajících správnému složení proteinů (Santra et al., 2017).

V následujícím textu budu porovnávat rekombinantní enzymy, které se podařilo produkovat a purifikovat (*FgFuc* a *FoFuc*), s dosavadními publikacemi.

V práci Paper et al. (2013) byla připravena nativní *FoFuc* (izolováním z fungální kultury) a též rekombinantní *FgFuc*; byly stanoveny jejich kinetické parametry se substrátem *pNP-Fuc*: nativní *FoFuc*: $K_m = 0,85$ mmol/l, $k_{cat} = 82,7$ s⁻¹, rekombinantní *FgFuc*: $K_m = 9,8$ mmol/l, $k_{cat} = 510$ s⁻¹. Kinetické parametry *FoFuc* stanovené v předkládané práci ($K_m = 2,42$ mmol/l, $k_{cat} = 16$ s⁻¹), se mírně odlišují, což může být vysvětleno rozdílnou přípravou enzymu (nativní a rekombinantní). Parametry *FgFuc* ($K_{half} = 4,55$ mmol/l) nelze porovnat kvůli alosterii *FgFuc* detekované v předkládané práci. V práci Cao et al. (2014) byla prezentována krystalografická struktura *FgFuc*, která odhalila dvě konformační formy *FgFuc*, které se shodují s výsledkem této práce. Cao et al. hypotetizují, že jedna z forem představuje enzym v nereaktivním stavu, zatímco druhá forma je uzpůsobena ke katalýze.

Při pozorování vlivu pH na aktivitu α -L-fukosidáz bylo stanoveno pH optimum a pH stabilita pro *FgFuc* a *FoFuc*. Pro *FoFuc* jsem stanovila pH optimum reakce jako 5,5, což je v dobré shodě s dříve naměřenou hodnotou pH 5,0 stanovenou pro nativní *FoFuc* v práci Paper et al. (2013), či s rozmezím pH 4,5–6,0 uvedeném v práci Yamamoto et al. (1986). Výsledky stanovení pH stability *FoFuc* (pH 6,5–7,5) se též shodují s literaturou: pH 5,5–10 (Yamamoto et al., 1986) či pH 4–8 (Yano et al., 1985) (obě zmíněné práce stanovovaly pH stabilitu po

dvoudenní inkubaci nativního enzymu, zatímco v předkládané práci byla inkubace dlouhá 17 h). Pro *FgFuc* jsem naměřila pH optimum 4,5 a dospěla jsem k dobré shodě s publikovaným výsledkem (Cao et al., 2014), kde autoři stanovili pH optimum 4,6. Údaj o pH stabilitě nebyl pro *FgFuc* dosud publikován.

V práci Cao et al. (2014) zaznamenali inhibici aktivity α -L-fukosidáz způsobenou citrátovým a Tris pufrům v koncentracích 10–50 mmol/l pravděpodobně zapříčiněnou kompetitivní vazbou v aktivním místě enzymu mezi inhibitory pufru a *pNP-Fuc*. V reakcích v předkládané práci byl použit 50 mmol/l fosfátový pufr, jehož inhibiční efekt nebyl pozorován.

V předkládané práci byl *FgFuc* aktivní k substrátům *pNP-Fuc* a 2'FL. Aktivita k *pNP-Fuc* byla velice nízká, což je v souladu s tím, že *pNP-Fuc* není přirozeným substrátem *FgFuc*. Znamená to, že aromatický aglykon *p*-nitrofenyl má malou afinitu k aminokyselinám v aktivním místě enzymu. Paper et al. (2013) a Cao et al. (2014) spekulují, zda by mohly být přirozenými substráty *FgFuc* glykoproteiny, pektin, fukosylované xyloglukany (jiné než dříve testovaný xyloglukan izolovaný z hrášku a z tamarindu) nebo exopolysacharidy hub a bakterií. Reakce *FgFuc* s *pNP-Fuc* v předkládané práci i v práci Cao et al. (2014) byla výrazně pomalejší, než jak je tomu u známých α -1,2-fukosidáz z rodiny GH29 (např. *FoFuc* v této práci), což by ukazovalo na větší podobnost *FgFuc* k α -1,3/4-fukosidázám z rodiny GH29. Na rozdíl od α -1,3/4-fukosidáz však nebyl ani v práci Cao et al. (2014) ani shodně v předkládané práci *FgFuc* aktivní k 3FL ani trisacharidům Lewis^a a Lewis^x (v této práci byl testován pouze 3FL). V práci Cao et al. (2014) preferoval *FgFuc* fukosylované substráty s vazbou α -1,2 před substráty s vazbou α -1,3/4: nejvyšší aktivity bylo dosaženo s 2'FL. Tato regioselektivita *FgFuc* se shoduje s výsledky předkládané práce. Regioselektivita α -1,4 byla u fungálních α -L-fukosidáz nalezena pouze v práci Shvetsova et al. (2015), kde byla izolována α -L-fukosidáza z fungální kultury *Fusarium proliferatum* s preferenční regioselektivitou α -1,4.

FoFuc byl z testovaných substrátů (2'FL, 3FL, *p*NP-Fuc) v této práci aktivní pouze k *p*NP-Fuc. Tento výsledek se shoduje s prací, kde byl nativní *FoFuc* aktivní k *p*NP-Fuc a navíc odštěpoval fukózu z fukoidanu (v práci není zmíněn původ fukoidanu). Tento závěr se mi nepodařilo ověřit, neboť fukoidan z našeho zdroje (*Laminaria japonica*) jsme nedokázali rozpustit v dostatečné koncentraci pro reakci.

Ve screeningu transfukosylační aktivity α -L-fukosidáz *FoFuc* a *FgFuc* se sérií různých akceptorů (arabinóza, fukóza, laktóza, laktosyl-tBoc, galaktóza) tyto enzymy nekatalyzovaly transfukosylační reakce s vybranými akceptory. U WT α -L-fukosidáz bývají výtěžky syntéz HMO v rozmezí 1–20 %, což je pro průmyslové použití nedostačující (Zeuner et al., 2020a). Tento závěr potvrzuje α -L-fukosidáza z *Thermotoga maritima*, která byla v literatuře použita k syntéze 2'FL s 6,4% výtěžkem (Lezyk et al., 2016). Vyššího výtěžku 13 % při syntéze 2'FL dosáhla α -L-fukosidáza z druhu *Paenibacillus* izolovaného z horkého pramene (Thøgersen et al., 2020). Nečekaně vysoký výtěžek 50 % byl získán s α -1,3/4-L-fukosidázou z *Clostridium perfringens* při syntéze LNFP II, kde byl z důvodu regioselektivity enzymu použit donor 3FL (Zeuner et al., 2018b). Vysoký výtěžek 33 % byl taktéž dosažen s α -L-fukosidázou z *Thermotoga maritima* v práci Guzmán-Rodríguez et al. (2018), kde byl poměr donoru a akceptoru upraven na 1:1000.

Metodami genetického inženýrství lze nejen zvýšit výtěžek transfukosylace a upravit selektivitu enzymu, ale též změnit poměr transfukosylační a hydrolytické aktivity, čehož lze použít pro zvýšení efektivity syntézy HMO. V práci Zeuner et al. (2020) byl *FgFuc* upraven saturační mutagenézí se ziskem lepší regioselektivity v porovnání s WT verzí (záměnou nukleofilního asparaginu za nepolární methionin – D286M). Jiným typem úpravy byla pozměněna α -1,3/4-L-fukosidáza z *B. bifidum*: pomocí genetické modifikace (*loop engineering*) byla nahrazena smyčka 23 aminokyselin korespondující smyčkou

z α -1,3/4-L-fukosidázy z *Clostridium perfringens* poblíž aktivního místa. Touto úpravou byla téměř plně potlačena hydrolytická aktivita enzymu, což vedlo k trojnásobnému zvýšení výtěžku syntézy LNFP II a LNFP III oproti WT enzymu (Zeuner et al., 2018b).

7 ZÁVĚR

V první části práce byli ve sbírce vláknitých hub hledáni zástupci vykazující α -L-fukosidázovou aktivitu. Ve výběru deseti kmenů kultivovaných s induktory fukózou, arabinózou, glukózou a fukoidanem byl nalezen jeden kmen aktivní k *pNP-Fuc*, a to *Fusarium oxysporum*.

Na základě genů známých α -L-fukosidáz byly v genové knihovně hub nalezeny tři hypotetické enzymy, které dosud nebyly izolovány, produkovány ani charakterizovány. Byla zkoumána podobnost vybraných genů ke známým fukosidázám znázorněná sestavením fylogenetického stromu. Pro kontrolu produkce byly k výběru přidány dvě známé α -L-fukosidázy z *Fusarium graminearum* a *Fusarium oxysporum*, které jsou v literatuře již částečně charakterizovány.

Vybrané geny byly upraveny pro vložení do plazmidu *pPICZ α A*. Navržený plazmid byl komerčně vyroben a vložen do buněk *P. pastoris* KM7IH, které jsou vhodné k heterologní produkci eukaryotních enzymů. Produkce však byla úspěšná pouze u dvou již dříve produkovaných α -L-fukosidáz. Neúspěšné geny byly vloženy do plazmidu *pCold II* a exprimovány v různých buňkách *E. coli* lišící se mechanismem produkce (*JM109 1990*, *BL21(DE3)pLysS*, *BL21-Gold(DE3)* a *Rosetta2(DE3)*). Ani zde nebyla produkce úspěšná, a to ani po opakování celého procesu.

Obě heterologně produkované α -L-fukosidázy z *Fusarium oxysporum* (*FoFuc*) a *Fusarium graminearum* (*FgFuc*) byly purifikovány iontově-výměnnou chromatografií a poté charakterizovány. Byla zkoumána schopnost enzymů hydrolyzovat substrát *pNP-Fuc* a tato aktivita byla kvantifikována. Dále byla zkoumána aktivita k substrátům 2'FL a 3FL, z nichž byl hydrolyzován pouze 2'FL pomocí *FgFuc*. Detekované aktivity se shodují se substrátovou specifitou popsanou v literatuře.

Byly stanoveny hodnoty pH pro optimální průběh reakce: pH 5,5 pro *FoFuc* a pH 4,5 pro *FgFuc*. Byl pozorován vliv pH na stabilitu enzymu a ze 17 h inkubace bylo určeno rozmezí pH ideální pro stabilitu: pH 6,5–7,5 pro *FoFuc* a pH 3,5 pro *FgFuc*. Stanovené hodnoty se shodují s literaturou.

Pro oba enzymy byly stanoveny kinetické parametry. Pro *FoFuc* bylo vypočítáno $K_m = 2,42$ mmol/l, $V_{max} = 0,02$ μ mol/l/min a $k_{cat} = 16$ s⁻¹. U *FgFuc* byla zjištěna alosterická regulace a byly určeny kinetické parametry alosterického enzymu: $h = 3,2$, $V_{max} = 0,03$ μ mol/l/min a $K_{half} = 4,55$ mmol/l.

Ani u jednoho z enzymů nebyla detekována transfukosylační aktivita testovaná s donorem *pNP-Fuc* a akceptory laktózou, arabinózou, fukózou, galaktózou a modifikovaným akceptorem laktosyl-*tBoc*. Absence této aktivity znemožnila naplnění finálního cíle této práce, a to syntézy fukosylovaných oligosacharidů. Mutací v aktivním místě enzymu lze zvýšit poměr transglykosylační aktivity a hydrolýzy ve prospěch transglykosylace. Různé postupy mutagenese by byly možností jak použít vyprodukované α -L-fukosidázy k syntéze HMO, ale tento postup je mimo časový rámec této práce.

8 SEZNAM ZKRATEK

- UDP-Gal – uridin-5'-(α -D-galaktopyranosyl-difosfát)
- UDP-Glc – uridin-5'-(α -D-glukopyranosyl-difosfát)
- GDP-Fuc – guanosin-5'-(β -L-fukopyranosyl-difosfát)
- CAZy – *Carbohydrate-Active Enzymes* (enzymy aktivní k sacharidům)
- GH – *Glycoside Hydrolase* – glykosidhydroláza
- FUCA 1 – gen kódující α -L-fukosidázu
- scGOS – galaktooligosacharidy s krátkým řetězcem
- HpFucT2 – α -1,2-fukosyltransferáza z *Helicobacter pylori*
- BbAfcA – α -1,2-fukosidáza z *Bifidobacterium bifidum*
- β -FucF – β -fukosylfluorid
- HMO – oligosacharidy lidského mléka
- 2'FL – 2'-fukosyllaktóza
- 3FL – 3-fukosyllaktóza
- 3'FL – 3'-sialyllaktóza
- 6'FL – 6'-sialyllaktóza
- LNT – lakto-*N*-tetraóza
- LN_nT – lakto-*N*-neotetraóza
- LNH – lakto-*N*-hexaóza
- LNFP – lakto-*N*-fukopentaóza
- DSLNT – disialyllakto-*N*-tetraóza
- LNDFH – lakto-*N*-difukohexaóza
- DFL – difukosyllaktosid
- FLN_nH – fukosyllakto-*N*-neohexaóza
- DFLN_nH – difukosyllakto-*N*-neohexaóza
- pLN_nH – *para*-lakto-*N*-hexaóza
- FpLN_nH – fukosyl-*para*-lakto-*N*-neohexaóza
- XyG – xyloglukan

- AOX – alkoholoxidáza
- KM71 – buňky *P. pastoris* s inaktivovaným genem *aox1*
- SCFA – mastné kyseliny s krátkým řetězcem (*short-chain fatty acids*)
- IgE – imunoglobulin E
- FUT1 – α -1,2-fukosyltransferáza, H-transferáza
- FUT2 – α -1,2-fukosyltransferáza, Se-transferáza
- FUT3 – α -1,3/4-fukosyltransferáza, Le-fukosyltransferáza
- FUT4 – α -1,3-fukosyltransferáza
- FUT7 – α -1,3-fukosyltransferáza
- FUT8 – α -1,6-fukosyltransferáza
- POFUT – fukosyltransferáza
- Neu5Ac – *N*-acetylneuraminová kyselina, kyselina sialová
- GlcNAc – *N*-acetylglukosamin
- LAD-2 – deficit adheze leukocytů 2
- SLC35C1 – transportér GDP-fukosidu
- AFP – α -fetoprotein
- *p*NP-Fuc – 4-nitrofenyl- α -L-fukopyranosid
- TLC – tenkovrstvá chromatografie
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- MBÚ AV ČR – Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky

9 LITERATURA

Adhikari, E.; Liu, Q.; Burton, C.; Mockabee-Macias, A.; Lester, D. K.; Lau, E., 2022: L-fucose, a sugary regulator of antitumor immunity and immunotherapies. *Molecular Carcinogenesis.*, 61, 439–453.

Ayechu-Muruzabal, V.; van Stigt, A. H.; Mank, M.; Willemsen, L. E. M.; Stahl, B.; Garssen, J.; van't Land, B., 2018: Diversity of human milk oligosaccharides and effects on early life immune development. *Frontiers in Pediatrics.*, 6, 239.

Ayude, D.; Páez de la Cadena, M.; Martínez-Zorzano, V. S.; Fernández-Briera, A.; Rodríguez-Berrocal, F. J., 2003: Preoperative Serum Alpha-L-Fucosidase Activity as a Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Oncology.*, 64, 36–45.

Barbé, L.; Le Moullac-Vaidye, B.; Echasserieau, K.; Bernardeau, K.; Carton, T.; Bovin, N.; Nordgren, J.; Svensson, L.; Ruvoën-Clouet, N.; Le Pendu, J., 2018: Histo-blood group antigen-binding specificities of human rotaviruses are associated with gastroenteritis but not with in vitro infection. *Scientific Reports* 2018 8:1., 8, 1–14.

Bastian, K.; Scott, E.; Elliott, D. J.; Munkley, J., 2021: FUT8 Alpha-(1,6)-Fucosyltransferase in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 455., 22, 455.

Becker, D. J.; Lowe, J. B., 2003: Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology.*, 13, 41R-53R.

Bode, L., 2012: Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology.*, 22, 1147–1162.

Bojarová, P.; Křen, V., 2009: Glycosidases: a key to tailored carbohydrates. *Trends in Biotechnology.*, 27, 199–209.

Borén, T.; Falk, P.; Roth, K. A.; Larson, G.; Normark, S., 1993: Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science (New York, N.Y.)*, 262, 1892–1895.

Cabezas-Cruz, A.; de la Fuente, J., 2017: Immunity to α -Gal: The opportunity for malaria and tuberculosis control. *Frontiers in Immunology.*, 8, 1733.

Cao, H.; Walton, J. D.; Brumm, P.; Phillips, G. N., 2014: Structure and Substrate Specificity of a Eukaryotic Fucosidase from *Fusarium graminearum*. *Journal of Biological Chemistry.*, 289, 25624–25638.

Carbohydrate Active Enzymes database, <http://www.cazy.org/>, [cit. 2023-02-01], (n.d.).

Christensen, A. S.; Skov, S. H.; Lendal, S. E.; Hornshøj, B. H., 2020: Quantifying the human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 3-fucosyllactose in different food applications by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Food Science.*, 85, 332–339.

Cregg, J. M.; Vedvick, T. S.; Raschke, W. C., 1993: Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology.*, 11, 905–910.

Cregg, J. M.; Cereghino, J. L.; Shi, J.; Higgins, D. R., 2000: Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular biotechnology.*, 16, 23–52.

Danby, P. M.; Withers, S. G., 2016: Advances in Enzymatic Glycoside Synthesis. *ACS Chemical Biology.*, 11, 1784–1794.

Daniels, G., 2013: *Human Blood Groups* 3rd Edition. Wiley-Blackwell.

Etzioni, A.; Phillips, L. M.; Paulson, J. C.; Harlan, J. M., 2007: Leukocyte Adhesion Deficiency (LAD) II, 51–62.

Faijes, M.; Castejón-Vilatersana, M.; Val-Cid, C.; Planas, A., 2019: Enzymatic and cell factory approaches to the production of human milk oligosaccharides. *Biotechnology Advances.*, 37, 667–697.

Farkas, E.; Thiem, J.; Ajisaka, K., 2000: Enzymatic synthesis of fucose-containing disaccharides employing the partially purified α -l-fucosidase from *Penicillium multicolor*. *Carbohydrate Research.*, 328, 293–299.

Guzmán-Rodríguez, F.; Alatorre-Santamaría, S.; Gómez-Ruiz, L.; Rodríguez-Serrano, G.; García-Garibay, M.; Cruz-Guerrero, A., 2018: Synthesis of a Fucosylated Trisaccharide Via Transglycosylation by α -l-Fucosidase from *Thermotoga maritima*. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, 186, 681–691.

Guzmán-Rodríguez, F.; Alatorre-Santamaría, S.; Gómez-Ruiz, L.; Rodríguez-Serrano, G.; García-Garibay, M.; Cruz-Guerrero, A., 2019: Employment of fucosidases for the synthesis of fucosylated oligosaccharides with biological potential. *Biotechnology and Applied Biochemistry.*, 66, 172–191.

Heine, V.; Hovorková, M.; Vlachová, M.; Filipová, M.; Bumba, L.; Janoušková, O.; Hubálek, M.; Cvačka, J.; Petrásková, L.; Pelantová, H.; Křen, V.; Elling, L.; Bojarová, P., 2021: Immunoprotective neo-glycoproteins: Chemoenzymatic synthesis of multivalent glycomimetics for inhibition of cancer-related galectin-3. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, 220, 113500.

Henze, M.; You, D. J.; Kamerke, C.; Hoffmann, N.; Angkawidjaja, C.; Ernst, S.; Pietruszka, J.; Kanaya, S.; Elling, L., 2014: Rational design of a glycosynthase by the crystal structure of β -galactosidase from *Bacillus circulans* (BgaC) and its use for the synthesis of N-acetyllactosamine type 1 glycan structures. *Journal of Biotechnology.*, 191, 78–85.

Hovorková, M.; Kulik, N.; Konvalinková, D.; Petrásková, L.; Křen, V.; Bojarová, P., 2021: Mutagenesis of Catalytic Nucleophile of β -Galactosidase Retains Residual Hydrolytic Activity and Affords a Transgalactosidase. *ChemCatChem.*, 13, 4532–4542.

Huňková, Z.; Kubátová, A.; Weignerová, L.; Křen, V., 1999: Induction of extracellular glycosidases in filamentous fungi and their potential use in chemotaxonomy. *Czech Mycol (In English).*, 51, 71–87.

Intra, J.; Perotti, M. E.; Pavesi, G.; Horner, D., 2007: Comparative and phylogenetic analysis of α -L-fucosidase genes. *Gene.*, 392, 34–46.

Ip, S.; Chung, M.; Raman, G.; Chew, P.; Magula, N.; DeVine, D.; Trikalinos, T.; Lau, J., 2007: Breastfeeding and maternal and infant health outcomes in developed countries. *Evidence Report/technology Assessment.*, 1–186.

Ishizuka, H.; Nakayama, T.; Matsuoka, S.; Gotoh, I.; Ogawa, M.; Suzuki, K.; Tanaka, N.; Tsubaki, K.; Ohkubo, H.; Arakawa, Y.; Okano, T., 1999: Prediction of the Development of Hepato-Cellular-Carcinoma in Patients with Liver Cirrhosis by the Serial Determinations of Serum Alpha-L-fucosidase Activity. *Internal Medicine.*, 38, 927–931.

Johnson, S. W.; Alhadeff, J. A., 1991: Mammalian α -L-fucosidases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry.*, 99, 479–488.

Katayama, T.; Sakuma, A.; Kimura, T.; Makimura, Y.; Hiratake, J.; Sakata, K.; Yamanoi, T.; Kumagai, H.; Yamamoto, K., 2004: Molecular cloning and characterization of *Bifidobacterium bifidum* 1,2- α -L-fucosidase (AfcA), a novel inverting glycosidase (glycoside hydrolase family 95). *Journal of Bacteriology.*, 186, 4885–4893.

Kim, Y. J.; Varki, A., 1997: Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugate Journal.*, 14, 569–576.

Koshland, D. E., 1953: Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biological Reviews.*, 28, 416–436.

Laucirica, D. R.; Triantis, V.; Schoemaker, R.; Estes, M. K.; Ramani, S., 2017: Milk Oligosaccharides Inhibit Human Rotavirus Infectivity in MA104 Cells. *The Journal of Nutrition.*, 147, 1709–1714.

Lezyk, M.; Jers, C.; Kjaerulff, L.; Gotfredsen, C. H.; Mikkelsen, M. D.; Mikkelsen, J. D., 2016: Novel α -L-Fucosidases from a Soil Metagenome for Production of Fucosylated Human Milk Oligosaccharides. *PLoS ONE.*, 11.

Li, J.; Han, Q.; Zhang, T.; Du, J.; Sun, Q.; Pang, Y., 2018: Expression of soluble native protein in *Escherichia coli* using a cold-shock SUMO tag-fused expression vector. *Biotechnology Reports.*, 19, e00261.

Lin, A. E.; Autran, C. A.; Szyszka, A.; Escajadillo, T.; Huang, M.; Godula, K.; Prudden, A. R.; Boons, G. J.; Lewis, A. L.; Doran, K. S.; Nizet, V.; Bode, L., 2017: Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B *Streptococcus*. *Journal of Biological Chemistry.*, 292, 11243–11249.

Lowe, J. B., 1993: The blood group-specific human glycosyltransferases. *Baillière's Clinical Haematology.*, 6, 465–492.

Mackenzie, L. F.; Wang, Q.; Warren, R. A. J.; Withers, S. G., 1998: Glycosynthases: Mutant glycosidases for oligosaccharide synthesis. *Journal of the American Chemical Society.*, 120, 5583–5584.

Malet, C.; Planas, A., 1998: From β -glucanase to β -glucansynthase: glycosyl transfer to α -glycosyl fluorides catalyzed by a mutant endoglucanase lacking its catalytic nucleophile. *FEBS Letters.*, 440, 208–212.

Marcobal, A.; Barboza, M.; Froehlich, J. W.; Block, D. E.; German, J. B.; Lebrilla, C. B.; Mills, D. A., 2010: Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 58, 5334–5340.

Mészáros, Z.; Nekvasilová, P.; Bojarová, P.; Křen, V.; Slámová, K., 2021: Advanced glycosidases as ingenious biosynthetic instruments. *Biotechnology Advances.*, 49, 107733.

Michalski, J. C.; Klein, A., 1999: Glycoprotein lysosomal storage disorders: α - and β -mannosidosis, fucosidosis and α -N-acetylgalactosaminidase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.*, 1455, 69–84.

Middelhoven, W. J.; Scorzetti, G.; Fell, J. W., 2001: *Trichosporon porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the *loubieri/laibachii* group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds. *FEMS Yeast Research.*, 1, 15–22.

Moracci, M.; Trincone, A.; Cobucci-Ponzano, B.; Perugino, G.; Ciaramella, M.; Rossi, M., 2001: Enzymatic synthesis of oligosaccharides by two glycosyl hydrolases of *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles.*, 5, 145–152.

Munblit, D.; Peroni, D. G.; Boix-Amorós, A.; Hsu, P. S.; Van't Land, B.; Gay, M. C. L.; Kolotilina, A.; Skevaki, C.; Boyle, R. J.; Collado, M. C.; Garssen, J.; Geddes, D. T.; Nanan, R.; Slupsky, C.; Wegienka, G.; Kozyrskyj, A. L.; Warner, J. O., 2017: Human Milk and Allergic Diseases: An Unsolved Puzzle. *Nutrients* 2017, Vol. 9, Page 894., 9, 894.

Naglak, T. J.; Wang, H. Y., 1990: Protein Release from the Yeast *Pichia Pastoris* by Chemical Permeabilization: Comparison to Mechanical Disruption and Enzymatic Lysis. *Separations for Biotechnology* 2., 55–64.

Natsuka, S.; Lowe, J. B., 1994: Enzymes involved in mammalian oligosaccharide biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology.*, 4, 683–691.

Nekvasilová, P.; Hovorková, M.; Mészáros, Z.; Petrásková, L.; Pelantová, H.; Křen, V.; Slámová, K.; Bojarová, P., 2022: Engineered Glycosidases for the Synthesis of Analogs of Human Milk Oligosaccharides. *International Journal of Molecular Sciences.*, 23.

Nidetzky, B.; Gutmann, A.; Zhong, C., 2018: Leloir Glycosyltransferases as Biocatalysts for Chemical Production. *ACS Catalysis.*, 8, 6283–6300.

Okungbowa, F. I.; Shittu, H. O., 2012: Fusarium Wilts: An Overview. *Environmental Research Journal* ., 6, 84–104.

Paper, J. M.; Scott-Craig, J. S.; Cavalier, D.; Faik, A.; Wiemels, R. E.; Borrusch, M. S.; Bongers, M.; Walton, J. D., 2013: α -Fucosidases with different substrate

specificities from two species of *Fusarium*. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 97, 5371–5380.

Pastuszak, I.; Ketchum, C.; Hermanson, G.; Sjoberg, E. J.; Drake, R.; Elbein, A. D., 1998: GDP-1-fucose Pyrophosphorylase: PURIFICATION, cDNA CLONING, AND PROPERTIES OF THE ENZYME. *Journal of Biological Chemistry.*, 273, 30165–30174.

Robles-Arias, M. A.; García-Garibay, M.; Alatorre-Santamaría, S.; Tello-Solís, S. R.; Guzmán-Rodríguez, F.; Gómez-Ruiz, L.; Rodríguez-Serrano, G.; Cruz-Guerrero, A. E., 2021: Improvement of Fucosylated Oligosaccharides Synthesis by α -L-Fucosidase from *Thermotoga maritima* in Water-Organic Cosolvent Reaction System. *Applied Biochemistry and Biotechnology.*, 193, 3553–3569.

Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A., 2014: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology.*, 5, 172.

Santra, M.; Farrell, D. W.; Dill, K. A., 2017: Bacterial proteostasis balances energy and chaperone utilization efficiently. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*, 114, E2654–E2661.

Saumonneau, A.; Champion, E.; Peltier-Pain, P.; Molnar-Gabor, D.; Hendrickx, J.; Tran, V.; Hederos, M.; Dekany, G.; Tellier, C., 2016: Design of an α -l-transfucosidase for the synthesis of fucosylated HMOs. *Glycobiology.*, 26, 261–269.

Seppo, A. E.; Kukkonen, A. K.; Kuitunen, M.; Savilahti, E.; Yonemitsu, C.; Bode, L.; Järvinen, K. M., 2019: Association of Maternal Probiotic Supplementation With Human Milk Oligosaccharide Composition. *JAMA Pediatrics.*, 173, 286–288.

Shvetsova, S. V.; Zhurishkina, E. V.; Bobrov, K. S.; Ronzhina, N. L.; Lapina, I. M.; Ivanen, D. R.; Gagkaeva, T. Y.; Kulminskaya, A. A., 2015: The novel strain *Fusarium proliferatum* LE1 (RCAM02409) produces α -L-fucosidase and arylsulfatase during the growth on fucoidan. *Journal of Basic Microbiology.*, 55, 471–479.

Smith, P. L.; Myers, J. T.; Rogers, C. E.; Zhou, L.; Petryniak, B.; Becker, D. J.; Homeister, J. W.; Lowe, J. B., 2002: Conditional control of selectin ligand expression and global fucosylation events in mice with a targeted mutation at the FX locus. *Journal of Cell Biology.*, 158, 801–815.

SnapGene, (n.d.) pPICZ(alpha) A Sequence and Map, [cit. 2023-05-04].
[https://www.snapgene.com/plasmids/yeast_plasmids/pPICZ\(alpha\)_A?format=png](https://www.snapgene.com/plasmids/yeast_plasmids/pPICZ(alpha)_A?format=png).

Sprenger, N.; Odenwald, H.; Kukkonen, A. K.; Kuitunen, M.; Savilahti, E.; Kunz, C., 2017: FUT2-dependent breast milk oligosaccharides and allergy at 2 and 5 years of age in infants with high hereditary allergy risk. *European Journal of Nutrition.*, 56, 1293–1301.

Sullivan, F. X.; Kumar, R.; Kriz, R.; Stahl, M.; Xu, G. Y.; Rouse, J.; Chang, X. J.; Boodhoo, A.; Potvin, B.; Cumming, D. A., 1998: Molecular Cloning of Human GDP-mannose 4,6-Dehydratase and Reconstitution of GDP-fucose Biosynthesis in Vitro. *Journal of Biological Chemistry.*, 273, 8193–8202.

TCI Chemicals, (n.d.) L-(+)-Arabinose, [cit. 2023-05-08].
<https://www.tcichemicals.com>.

Thøgersen, M. S.; Christensen, S. J.; Jepsen, M.; Pedersen, L. H.; Stougaard, P., 2020: Transglycosylating β -d-galactosidase and α -l-fucosidase from

Paenibacillus sp. 3179 from a hot spring in East Greenland. *MicrobiologyOpen.*, 9, e980.

Thurl, S.; Henker, J.; Siegel, M.; Tovar, K.; Sawatzki, G., 1997: Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconjugate Journal.*, 14, 795–799.

Turck, D.; Bohn, T.; Castenmiller, J.; De Henauw, S.; Hirsch-Ernst, K. I.; Maciuk, A.; Mangelsdorf, I.; McArdle, H. J.; Naska, A.; Pelaez, C.; Pentieva, K.; Siani, A.; Thies, F.; Tsalouri, S.; Vinceti, M.; Cubadda, F.; Frenzel, T.; Heinonen, M.; Marchelli, R. et al., 2022: Safety of the extension of use of 2'-fucosyllactose (2'-FL) and lacto-N-neotetraose (LNnT) as novel foods in food supplements for infants pursuant to Regulation (EU) 2015/2283. *EFSA Journal.*, 20, e07257.

Usvalampi, A.; Ruvalcaba Medrano, M.; Maaheimo, H.; Salminen, H.; Tossavainen, O.; Frey, A. D., 2020: Production and characterization of *Aspergillus niger* GH29 family α -fucosidase and production of a novel non-reducing 1-fucosyllactose. *Glycoconjugate Journal.*, 37, 221–229.

Walsh, C.; Lane, J. A.; van Sinderen, D.; Hickey, R. M., 2020: From lab bench to formulated ingredient: Characterization, production, and commercialization of human milk oligosaccharides. *Journal of Functional Foods.*, 72, 104052.

Wan, L.; Zhu, Y.; Zhang, W.; Mu, W., 2020: α -1-Fucosidases and their applications for the production of fucosylated human milk oligosaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology.*, 104, 5619–5631.

Wang, D., 2006: Carbohydrate Antigens. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine.*

Weiss, J. N., 1997: The Hill equation revisited: uses and misuses. *The FASEB Journal.*, 11, 835–841.

Willems, P. J.; Gatti, R.; Darby, J. K.; Romeo, G.; Durand, P.; Dumon, J. E.; O'Brien, J. S., 1991: Fucosidosis revisited: A review of 77 patients. *American Journal of Medical Genetics.*, 38, 111–131.

Yamamoto, K.; Tsuji, Y.; Kumagai, H.; Tochikura, T., 1986: Induction and Purification of α -L-Fucosidase from *Fusarium oxysporum*. *Agricultural and Biological Chemistry.*, 50, 1689–1695.

Yano, T.; Yamamoto, K.; Kumagai, H.; Tochikura, T.; Yokoyama, T.; Seno, T.; Yamaguchi, H., 1985: Purification and Characterization of a Novel α -L-Fucosidase from *Fusarium oxysporum* Grown on Sludge. *Agricultural and Biological Chemistry.*, 49, 3179–3187.

Zeuner, B.; Jers, C.; Mikkelsen, J. D.; Meyer, A. S., 2014: Methods for improving enzymatic trans-glycosylation for synthesis of human milk oligosaccharide biomimetics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 62, 9615–9631.

Zeuner, B.; Muschiol, J.; Holck, J.; Lezyk, M.; Gedde, M. R.; Jers, C.; Mikkelsen, J. D.; Meyer, A. S., 2018a: Substrate specificity and transfucosylation activity of GH29 α -L-fucosidases for enzymatic production of human milk oligosaccharides. *New Biotechnology.*, 41, 34–45.

Zeuner, B.; Vuillemin, M.; Holck, J.; Muschiol, J.; Meyer, A. S., 2018b: Loop engineering of an α -1,3/4-L-fucosidase for improved synthesis of human milk oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology.*, 115, 37–44.

Zeuner, B.; Meyer, A. S., 2020a: Enzymatic transfucosylation for synthesis of human milk oligosaccharides. *Carbohydrate Research.*, 493, 108029.

Zeuner, B.; Vuillemin, M.; Holck, J.; Muschiol, J.; Meyer, A. S., 2020b: Improved Transglycosylation by a Xyloglucan-Active α -L-Fucosidase from *Fusarium graminearum*. *Journal of Fungi.*, 6, 295.

Zhou, L.; Liu, J.; Luo, F., 2006: Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology : WJG.*, 12, 1175.

Zicha O., 2018: BioLib: Biological library, [cit. 2023-04-26].
<https://www.biolib.cz>.

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Reakční mechanismus invertujících (A) a retenujících (B) glykosidáz.....	12
Obrázek 2 – Mechanismus hydrolýzy katalyzovaný glykosidázami.....	15
Obrázek 3 – Struktury antigenů ABO systému	19
Obrázek 4 – Vznik Lewis antigenů.....	20
Obrázek 5 – Schematické znázornění vybraných HMO molekul.....	25
Obrázek 6 – Kultury vybraných hub.....	40
Obrázek 7 – Fungální kmeny jsou kultivovány v peptonovém médiu.	41
Obrázek 8 – Odštěpení <i>p</i> -nitrofenolu	41
Obrázek 9 – Mapa plazmidu pPICZ α A.	45
Obrázek 10 – Kultivace buněk <i>P. pastoris</i> s vloženou DNA enzymu	53
Obrázek 11 – Vzorce 2'-fukosyllaktózy (2'FL, vlevo) a 3-fukosyllaktózy (3FL, vpravo).	65
Obrázek 12 – Struktury akceptorů transfukosylačních reakcí.....	66
Obrázek 13 – Fylogenetický strom srovnávaných organismů.....	69
Obrázek 14 – Elektroforéza v agarózovém gelu byla použita pro kontrolu linearizace plazmidu.....	71
Obrázek 15 – Analýza SDS-PAGE k detekci extracelulární produkce.....	72
Obrázek 16 – Analýza SDS-PAGE pro detekci α -L-fukosidáz v buněčném lyzátu	73
Obrázek 17 – Analýza PCR produktů na agarózovém gelu	74
Obrázek 18 – Analýza SDS-PAGE byla provedena nadvakrát pro detekci α -L-fukosidáz ve frakcích z purifikace	76
Obrázek 19 – Elektroforéza v agarózovém gelu pro vyhodnocení PCR reakce pro amplifikaci genů.	77
Obrázek 20 – Elektroforéza v agarózovém gelu pro ověření úspěšnosti ligace.	78

Obrázek 21 – Analýzy produkce rekombinantních α -L-fukosidáz v buňkách <i>E. coli</i> pomocí SDS-PAGE.....	81
Obrázek 22 – Vliv pH na aktivitu <i>FoFuc</i> (nalevo) a <i>FgFuc</i> (napravo).....	82
Obrázek 23 – Vliv pH na stabilitu <i>FoFuc</i> (nalevo) a <i>FgFuc</i> (napravo).....	83
Obrázek 24 – Vlevo: graf závislosti rychlosti reakce na koncentraci <i>pNP-Fuc</i> pro <i>FoFuc</i>	84
Obrázek 25 – Analýza TLC pro vyhodnocení aktivity <i>FoFuc</i> (vlevo) a <i>FgFuc</i>	85
Obrázek 26 – Analýza vzorků transfukosylačních reakcí pomocí TLC	86

11 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Názvy, zkratky a zjednodušené struktury hlavních HMO.	23
Tabulka 2 – Experimentálně využívané enzymy.....	29
Tabulka 3 - Vybrané enzymy z vláknitých hub.....	43
Tabulka 4 – Vybrané restriční endonukleázy	44
Tabulka 5 – Primery používané k sekvenaci.....	50
Tabulka 6 – Použité restriční endonukleázy.....	50
Tabulka 7 – Teoretické velikosti produkovaných enzymů.	51
Tabulka 8 – Izoelektrické body purifikovaných enzymů.	56
Tabulka 9 – Používané primery	58
Tabulka 10 – Vybrané restriční endonukleázy a jejich příslušné pufrý.	59
Tabulka 11 – Vybrané enzymy z vláknitých hub	68
Tabulka 12 – Výtěžky produkce, purifikace a zakoncentrování.....	75

12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Abstrakt prezentovaný na konferenci *14th Carbohydrate Bioengineering Meeting* (25–28. 9. 2022, Oslo).

Glycosidase-catalyzed fucosylation in the synthesis of human milk oligosaccharides

Pavlna Nekvasilová^{1,2}, Michaela Glozlová^{1,3}, Dorota Konvalinková¹, Vladimír Křen¹, Pavla Bojarová¹

¹*Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, CZ-14220 Praha 4*

²*Department of Genetics and Microbiology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 5, CZ-12843, Praha 2*

³*Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University, Akademia Heyrovského 1203, CZ-50005, Hradec Králové*
E-mail: pavlina.nekvasilova@biomed.cas.cz

Keywords: fucosylation, fucosidase, human milk oligosaccharide, fucosyllactose.

Human milk oligosaccharides (HMOs) play a crucial role in neonatal nutrition. The composition of human milk is unique in terms of oligosaccharide content, their concentration, and their diversity. In addition to linear and branched oligosaccharide chains consisting of D-galactose, D-glucose, and *N*-acetyl-D-glucosamine, they may be additionally decorated with L-fucose and/or sialic acid. [1]. Naturally, the fucosylation of HMOs is carried out by transferases that are strictly selective for their acceptors and use expensive nucleotide donors.

Transglycosylation catalyzed by glycosidases is an alternative to in vitro synthesis of HMOs from cheaper, naturally available substrates. Although glycosidase-catalyzed synthesis is complicated by side hydrolytic activity, strategies like the development of transglycosidases or glycosynthases may be employed to obtain fucosidases with suppressed or completely inactivated hydrolytic activity.

α -(1 \rightarrow 2)-Fucosidases belong to two GH families, namely GH29 and GH95, which differ in their catalytic mechanisms. While GH29 α -(1 \rightarrow 2)-fucosidases use the retention mechanism, GH95 α -(1 \rightarrow 2)-fucosidases are inverting enzymes and exhibit only hydrolytic activity. Mutant enzymes with enhanced transglycosylation ability have been developed in both groups [2, 3]. This project focuses on the synthetic potential of selected engineered and wild-type bacterial and fungal α -L-fucosidases and their application in the synthesis of fucosylated HMO analogs.

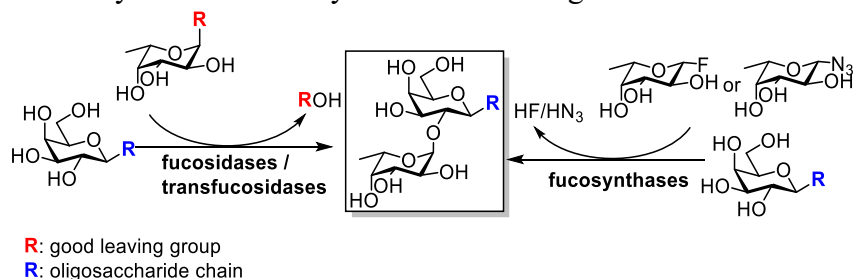


Figure 1. Synthesis of fucosylated HMOs by engineered fucosidases.

Acknowledgement: Support by project LTC20072 (COST action CA18103) is acknowledged.

[1] Bode L. *Glycobiology* **2012**, 22(9), 1147-1162.

[2] Osanjo, G., Dion, M., Drone, J., Solleux, C., Tran, V., Rabiller, C., Tellier, C. *Biochemistry* **2007**, 46(4), 1022-1033.