

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Heterologní exprese a využití bakteriálních aryl-
sulfotransferas**

Bakalářská práce

David Čáka

Obor studia: Kvalita produkce

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Heterologní exprese a využití bakteriálních aryl-sulfotransferas" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího a konzultantů bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15.07.2020

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval svému školiteli doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. a konzultantkám doc. Ing. Kateřině Valentové, Ph.D. a RNDr. Pavle Bojarové, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při experimentální práci i při sepisování bakalářské práce. Dále děkuji prof. Ing. Vladimíru Křenovi, DrSc. z Laboratoře biotransformací Mikrobiologického ústavu AV ČR, *v.v.i.* za umožnění vypracování práce v jeho laboratoři. Ing. Kristýně Slámové, Ph.D. děkuji za pomoc při purifikaci enzymů a paní Janě Fritschkové za technickou pomoc při práci v laboratoři.

Heterologní exprese a využití bakteriálních aryl-sulfotransferas (EC 2.8.2.1)

Souhrn

Sulfatace biologicky aktivních přírodních látek, které jsou součástí (zdravé) lidské stravy, je jednou z hlavních reakcí fáze II jejich biotransformace v lidském těle a může mít významný vliv na farmakokinetiku a biologickou aktivitu těchto látek. Typickými zástupci jsou např. polyfenoly, rostlinné steroidy, karotenoidy či glukosinoláty. Příprava selektivně sulfatovaných látek jako definovaných standardů přírodních metabolitů chemickou cestou je však obtížná, vhodnou alternativou je syntéza pomocí enzymů. Zatímco savčí eukaryotní sulfotransferasy využívají k sulfataci drahý a nestabilní adenosin-3'-fosfát-5'-fosfosulfát (zkráceně PAPS) jako donor sulfátu a jejich heterologní exprese je problematická, bakteriální aryl-sulfotransferasy (AST; EC 2.8.2.1) jsou robustní enzymy s širokou substrátovou specifitou využívající pro sulfataci levné donory (např. *p*-nitrofenyl-sulfát). Tyto enzymy lze s vysokým výtěžkem exprimovat v bakteriálních expresních systémech. Bakteriální AST jsou mnohem méně charakterizované než eukaryotní PAPS závislé sulfotransferasy. Přesto se pro biosyntézu metabolitů xenobiotik v poslední době využívají právě tyto bakteriální AST, které na rozdíl od eukaryotních nejsou závislé na PAPS. Díky své široké substrátové specifitě mají aryl-sulfotransferasy velký potenciál k využití v biotechnologických aplikacích.

V rámci této práce byly heterologní expresí vyprodukovány dvě šarže arylsulfotransferasy z *Desulfitobacterium hafniense* v *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, enzymy byly z buněk získány 1) jako hrubý buněčný lyzát a 2) z periplazmatického prostoru. Obě vyprodukované šarže byly následně purifikovány dvěma metodami – pomocí iontoměničové chromatografie (anex) na koloně DEAE Sephacel a pomocí metody gelové permeační chromatografie. U purifikovaných aryl-sulfotransferas byly porovnány jejich výtěžky, čistoty (pomocí SDS-PAGE), specifické aktivity (U/mg), koncentrace (mg/ml) a aktivity (U/ml) v jednotlivých fázích. Dále byly charakterizovány jejich biochemické (pH a teplotní optimum) a kinetické parametry (Michealisova konstanta a maximální rychlost).

Klíčová slova: Metabolismus, sulfatace, aryl-sulfotransferasy, purifikace, *Desulfitobacterium hafniense*

Heterologous expression and use of bacterial aryl sulfotransferases (EC 2.8.2.1)

Summary

Sulfation of biologically active natural substances, that are part of the (healthy) human diet is one of the main reactions of phase II biotransformation of these xenobiotics (for example polyphenols, plant steroids, carotenoids and glucosinolates) in the human body and can have significant impact on the pharmacokinetics and biological activity of these substances. However, the preparation of selectively sulfated substances as defined standards for natural metabolites by chemical means is difficult, and enzymatic synthesis is a suitable alternative. While mammalian eukaryotic sulfotransferases use expensive and unstable adenosin-3'-phosphate-5'-phosphosulfate (PAPS) as a donor for sulfation and their heterologous expression is not easy, bacterial aryl-sulfotransferases (AST, EC 2.8.2.1) are robust enzymes with wide substrate specificity utilizing inexpensive donors (for example para-nitrophenylsulfate) for sulfation. These enzymes can be expressed in high yields in bacterial expression systems. Bacterial ASTs are much less characterized than eukaryotic PAPS-dependent sulfotransferases. Nevertheless, these bacterial non PAPS-dependent ASTs are frequently used for biosynthesis of xenobiotic metabolites. Due to their wide substrate specificity, aryl-sulfotransferases have great potential for biotechnological applications.

In this work, two batches of arylsulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense* were produced in *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS by heterologous expression, enzymes were obtained from cells 1) as total cell lysate and 2) from the periplasmic space. Both batches produced were purified by two methods – by ionic exchange chromatography (anex) on a DEAE Sephacel column and by gel permeation chromatography. The purified sulfotransferases were compared for the yields, purity (by SDS-PAGE), specific activity (U/mg), concentration (mg/ml) and activity (U/ml). Furthermore, were compared their biochemical (pH and temperature optimum) and kinetic values (Michealis constant and maximum velocity).

Keywords: Metabolism, sulfation, aryl sulfotransferases, purification, *Desulfitobacterium hafniense*

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Metabolismus xenobiotik	10
3.1.1 První fáze	11
3.1.2 Druhá fáze	11
3.1.2.1 Glukuronosylace	11
3.1.2.2 Acetylace	11
3.1.2.3 Methylace	11
3.1.2.4 Konjugace s glutathionem	11
3.1.2.5 Sulfatace	12
3.2 Enzymy přenášející siřné skupiny	12
3.2.1 Aryl-sulfotransferasy (EC 2.8.2.1)	13
3.2.1.1 Eukaryotické sulfotransferasy	13
3.2.1.2 Bakteriální arylsulfotransferasy	14
3.3 Sulfatace v průmyslovém a laboratorním měřítku	15
3.3.1 Chemická sulfatace	15
3.3.2 Enzymatická sulfatace	16
3.3.3 Využití sulfotransferas ze savčích enzymů	16
3.3.3.1 Sulfotransferasa z potkaních jater (AST IV)	16
3.3.4 Využití bakteriálních sulfotransferas	18
3.3.4.1 AST z <i>Desulfitobacterium hafniense</i>	18
3.3.4.2 AST z <i>Haliangium ochraceum</i> (HocAST)	20
4 Metodika	22
4.1 Použité materiály a přístroje	22
4.1.1 Výchozí látky a použitá činidla	22
4.1.2 Biologický materiál	22
4.1.3 Média a roztoky	22
4.1.4 Přístrojové vybavení	23
4.2 Použité metody	23
4.2.1 Stanovení aktivity aryl-sulfotransferasy	23
4.2.2 Měření koncentrace proteinů podle Bradforda	24
4.2.3 SDS – PAGE	24

4.2.4	Koncentrování proteinů	25
4.3	Produkce enzymu	25
4.3.1	Příprava buněk	25
4.3.2	Lyzování buněk <i>E. coli</i>	25
4.3.2.1	Sonikace	25
4.3.2.2	Periplasmatický lyzát	25
4.3.3	Purifikace pomocí iontoměničové chromatografie	26
4.3.4	Purifikace pomocí metody gelové permeační chromatografie (gelová filtrace)	26
4.4	Charakterizace sulfotransferasy	26
4.4.1	Teplotní optimum	26
4.4.2	pH optimum	27
4.4.3	Měření enzymové kinetiky	27
5	Výsledky	28
5.1	Sulfotransferasa připravená sonikací a purifikovaná metodou iontoměničové chromatografie (anex) a gelovou filtrací na koloně Sephacryl	28
5.1.1	Produkce enzymu	28
5.1.2	První purifikace metodou iontoměničové chromatografie	28
5.1.3	Druhá purifikace metodou gelové filtrace	29
5.2	Sulfotransferasa připravená periplasmatickým lyzačním pufrem a purifikována pomocí metod iontoměničové chromatografie (anex) a gelové filtrace na koloně Superdex – S 200	31
5.2.1	Produkce enzymu	31
5.2.2	První purifikace metodou iontoměničové chromatografie	31
5.2.3	Druhá purifikace metodou gelové filtrace	32
5.3	Porovnání obou vzorků	33
5.4	Stanovení biochemických vlastností	35
5.4.1	pH optimum a teplotní optimum	35
5.4.2	Hodnoty K_m a V_{max}	36
6	Diskuze	38
7	Závěr	39
8	Literatura	40
9	Seznam použitých obrázků	43

1 Úvod

Součástí (zdravé) lidské stravy je množství ovoce a zeleniny, které obsahují zdraví podporující látky, jako jsou vitamíny, nenasycené mastné kyseliny, ale i rostlinné sekundární metabolity, např. flavonoidy a jiné polyfenoly. Tyto látky jsou také složkami mnoha doplňků stravy, ve kterých se nacházejí v často velmi vysokých koncentracích (až gramy v denní dávce).

Mezi hlavní reakce ve fázi II metabolismu těchto xenobiotik patří sulfatace. Je známo, že v lidském těle dochází k sulfataci flavonoidů, steroidů, léčiv, antibiotik, hormonů, polysacharidů a proteinů, což vede ke změnám biologické aktivity těchto látek (Simpson & Widlanski 2006). Během sulfatace dochází ke změně mnoha chemicko-fyzikálních vlastností akceptoru, jako je velikost a hlavně rozpustnost. Vzniklé sulfatované sloučeniny jsou polárnější a mohou se snadněji transportovat v krvi nebo vyloučit močí (Van Der Horst et al. 2015). Sulfatace má rovněž důležitou roli při detoxikaci např. fenolových sloučenin v játrech. Mnoho metabolitů xenobiotik může mít vliv na různé buněčné funkce a farmakokinetiku v lidském těle. Proto jsou stále častěji syntetizovány sulfatované metabolity biologicky aktivních flavonoidů či dalších polyfenolů (Chapman et al. 2004).

Chemická sulfatace je pro přípravu těchto látek jako definovaných standardů přírodních metabolitů poměrně obtížná. V chemickém nebo farmaceutickém průmyslu se používá řada toxických činidel či organických rozpouštědel zatěžujících životní prostředí ve formě odpadů (např. oxid sírový, pyridin či terciární amidy). Reakce provází často nedostatečná selektivita nebo může docházet ke vzniku vedlejších produktů. Celková nízká rozpustnost v organických rozpouštědlech ztěžuje další čištění či transformace sulfatovaných molekul (Al-Horani & Desai 2010; Van Der Horst et al. 2012; Islam et al. 2018).

Vhodnou alternativou ke komplikované chemické syntéze je syntéza enzymová. Hlavní roli při sulfataci hrají eukaryotní sulfotransferasy (SULT), které využívají adenosin-3'-fosfát-5'-fosfosulfát (PAPS) jako donor sulfátu (Murray et al. 2002). Tyto enzymy jsou však značně nestabilní a jejich izolace nebo heterologní exprese není snadná zejména proto, že se často jedná o enzymy zabudované do membrány endoplazmatického retikula. Na druhé straně existují bakteriální aryl-sulfotransferasy (AST) nezávislé na PAPS, které se jeví jako vhodný nástroj pro sulfataci v laboratorních podmínkách. Tyto extracelulární a robustní enzymy mají řadu výhod, počínaje levnějším a stabilnějším donorem sulfátu v podobě *para*-nitrofenyl-sulfátu, přes snadnou expresi v bakteriálních expresních systémech po schopnost přípravy stovek miligramů požadovaného sulfatovaného produktu (Van Der Horst et al. 2012). Přestože se již běžně používá několik takových enzymů, většina z nich však nebyla podrobně charakterizována a krystalová struktura je známa pouze u jedné z nich. Dle literatury (Van Der Horst et al. 2012) hrají aryl-sulfotransferasy roli v řadě chorobných stavů včetně vstupu HIV, chronického zánětu a různých forem rakoviny. I díky tomuto biologickému významu roste zájem o syntézu sulfatovaných molekul.

Tato bakalářská práce se zabývá heterologní expresí a produkcí aryl-sulfotransferasy z *Desulfitobacterium hafniense* v *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, její následnou purifikací a stanovením optimální teploty, pH a kinetických parametrů (Michaelisova konstanta a maximální rychlost V_{max}).

2 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo:

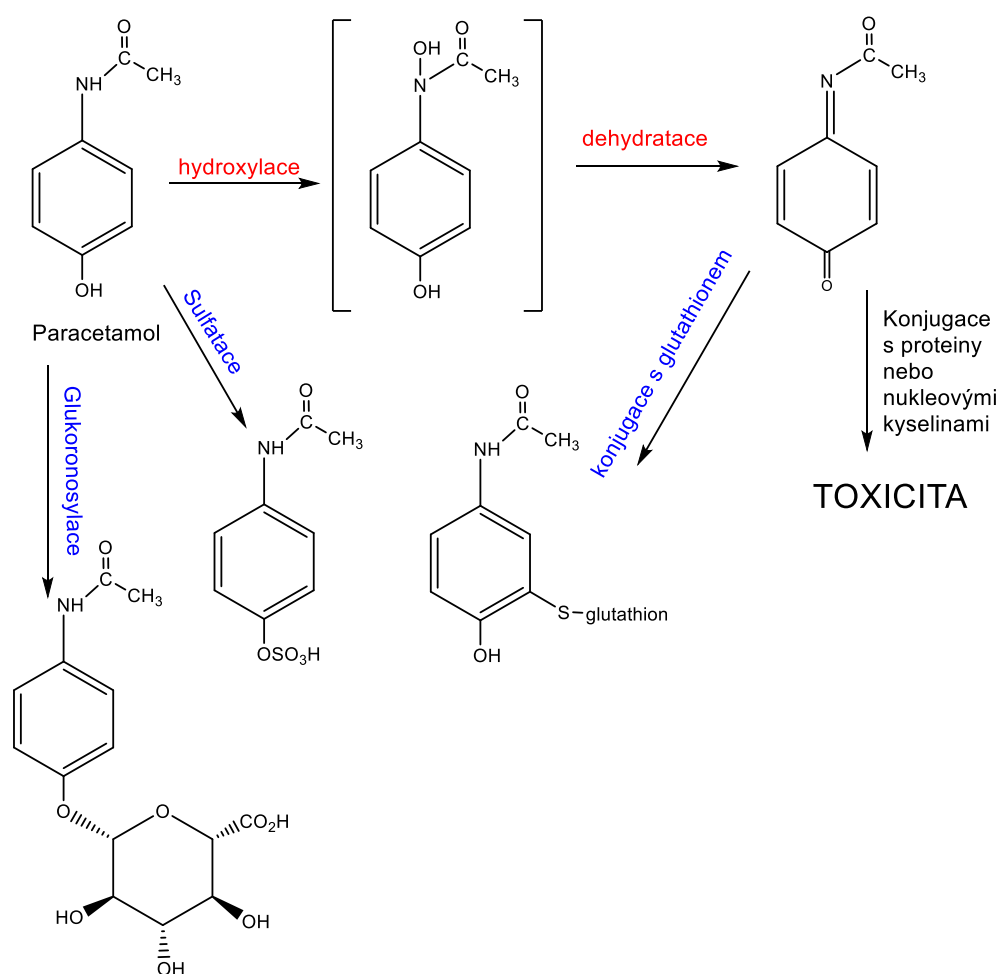
- vypracování literární rešerše na téma využití bakteriálních aryl-sulfotransferas
- osvojení si metodiky heterologní exprese
- purifikace bakteriálních enzymů
- charakterizace exprimovaného purifikovaného enzymu – teplotní a pH optimum, Michealisova konstanta a maximální rychlost (V_{\max}).

3 Literární rešerše

3.1 Metabolismus xenobiotik

Lidé jsou ve zvětšující se míře vystavováni nejrůznějším cizorodým látkám (xenobiotikům), ať už se jedná o chemické přípravky, potravinářské chemikálie, léky nebo látky znečišťující životní prostředí (Murray et al. 2002). Mezi xenobiotika se však řadí také zdraví prospěšné látky, jako jsou například přírodní biologicky aktivní látky z potravy, zejména sekundární metabolity rostlin, tzv. fytochemikálie. Typickými zástupci takových látek jsou například polyfenoly, rostlinné steroidy, karotenoidy, glukosinoláty aj. (Shin et al. 2018).

Nejdůležitějším orgánem v lidském těle, kde většina xenobiotik může být metabolizována, jsou játra. Metabolismus xenobiotik se většinou rozděluje na dvě fáze (Obrázek 1), na jejichž konci se stávají polárnějšími, a tak je jednodušší je vyloučit z organismu. Metabolismu těchto látek se účastní enzymy, jejichž aktivita je ovlivňována mnoha faktory, například věk a pohlaví jedince. Aktivita daných enzymů se může lišit u různých biologických druhů a zároveň je rozdílná i mezi samotnými jednotlivci (rozdíly způsobené genetickými faktory). Vliv mohou mít i metabolity jiných xenobiotik, které mohou inhibovat aktivitu enzymu právě metabolizovaného xenobiotika (Murray et al. 2002; Hodgson 2010).



Obrázek 1 - Možnosti fáze I (červeně) i II (modře) metabolismu paracetamolu. Převzato od (Murray et al. 2002).

3.1.1 První fáze

Hlavní reakcí v první fázi metabolismu xenobiotik je hydroxylace. Zodpovídají za ni zejména enzymy zvané monooxygenasy neboli systém cytochromu P-450. Obecná reakce pro ně je: $\text{RH} + \text{O}_2 + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{R-OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{NADP}^+$, kdy RH je cizorodá látka (Murray et al. 2002; Timbrell & Marrs 2009; Boroujerdi 2015).

Většina polyfenolů je v potravě přítomna ve formě glykosidů, esterů nebo polymerů. V této formě však nemohou být absorbovány do lidského těla. Tyto látky musí být nejprve hydrolyzovány. Během absorpce a po ní projdou polyfenoly methylocí, sulfatací nebo glukuronidací (Murray et al. 2002).

3.1.2 Druhá fáze

Zatímco v první fázi jsou xenobiotika metabolizována na polárnější hydroxyderiváty, ve druhé fázi jsou tyto sloučeniny konjugovány např. s molekulami kyseliny glukuronové, sulfátu nebo glutathionu. Tím se stávají rozpustnějšími ve vodě a mohou být vyloučeny močí. Podle (Murray et al. 2002) existuje nejméně pět typů reakcí fáze II.

3.1.2.1 Glukuronosylace

Pomocí glukuronosylace jsou vylučovány cizorodé látky jako anilin, kyselina benzoová, fenol a celá řada steroidů. Donorem reakce je UDP-glukuronát a katalyzátorem jsou glukosiduronáttransferasy, vyskytující se v cytosolu nebo endoplazmatickém retikulu.

3.1.2.2 Acetylace

Donorem acetylace je acetyl-koenzym A (CoA) a reakce katalyzují acetyltransferasy, které jsou přítomny v cytosolu (hlavně v játrech). Schéma reakce je $\text{R} + \text{AcetylCoA} \rightarrow \text{Acetyl-R} + \text{CoA}$, kde R je označení pro xenobiotikum.

3.1.2.3 Methylace

Xenobiotikum může být metabolizováno pomocí methylace, kdy donorem je methyl ve formě *S*-adenosyl-L-methioninu a reakci katalyzují methyltransferasy (např. katechol-*O*-methyltransferasa, COMT).

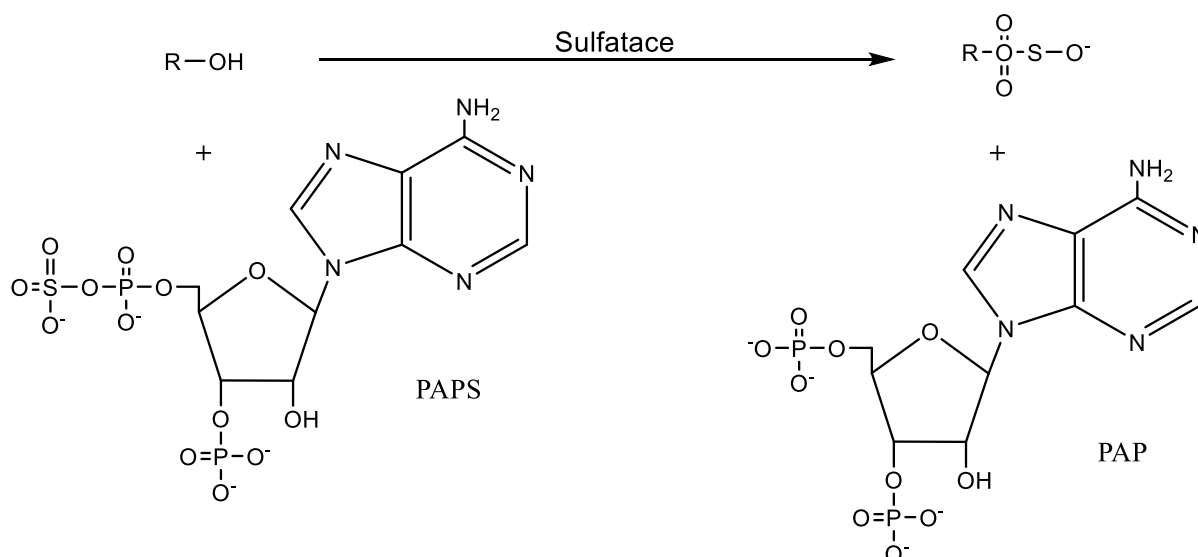
3.1.2.4 Konjugace s glutathionem

Tento tripeptid napomáhá metabolizovat velký počet potenciálně toxických elektrofilních xenobiotik. Sám glutathion (GSH) je nukleofilní. Reakci můžeme vyjádřit jako $\text{R} + \text{GSH} \rightarrow \text{R-S-G}$, kdy R je označení pro xenobiotikum. Katalyzujícím enzymem jsou glutathion-*S*-transferasy, vyskytující se hlavně v jaterním cytosolu.

3.1.2.5 Sulfatace

Sulfatace molekul hraje velkou roli v biologických funkcích jako je regulace hormonů, transdukce signálů nebo detoxikace. V metabolismu jí nejčastěji podléhají alkoholy, fenoly a arylaminy. Donorem reakce je adenosin-3'-fosfát-5'-fosfosulfát (zkráceně PAPS), který se nazývá aktivní sulfát (Obrázek 2). PAPS je syntetizován prostřednictvím fosforylace adenosin-5'-fosfosulfátu (APS) s použitím ATP jako donoru (Murray et al. 2002).

Během sulfatace dochází ke změně mnoha chemicko-fyzikálních vlastností akceptoru, jako je náboj, velikost a hlavně rozpustnost. Vytvořené sulfatované sloučeniny jsou polárnější a mohou se snadněji transportovat v krvi nebo vyloučit močí. Na reakcích těchto sloučenin se podílejí sulfotransferasy, které usnadňují přenos sulfátové skupiny na hydroxylovou skupinu různých sloučenin např. flavonoidů (Van Der Horst et al. 2012). Sulfatace xenobiotik snižuje jejich toxicitu a zlepšuje jejich vylučování (Purchartová et al. 2015). Celkově sulfatace je hlavní cesta pro biotransformaci fenolových a katecholových léčiv a jiných xenobiotik.



Obrázek 2 - Schéma sulfatace. Přenos sulfátu z donoru sulfátu adenosin-3'-fosfát-5'-fosfosulfátu PAPS na OH skupinu sloučeniny R-OH.

Typ konjugace je rozdílný dle typu povahy substrátu a přijímané skupiny. Sulfatace má obecně vyšší afinitu a nižší kapacity než glukuronidace. Když se tedy zvýší požitá dávka xenobiotika, bude daná látka ve zvýšené míře glukuronylována. Rovnováha mezi sulfatací a glukuronylací je ovlivněna druhem, pohlavím a nutričním statutem jedince (Manach et al. 2004). Metabolity fáze II biotransformace mnoha látek jsou sulfáty. Sulfatované malé molekuly mohou být také, díky jejich hydrofilní povaze, užitečné jako složky terapeutických přípravků (Purchartová et al. 2015). Příprava autentických, čistých a strukturně charakteristických metabolitů polyfenolů je velmi důležitá pro správné stanovení jejich farmakologických vlastností (Purchartová et al. 2015).

3.2 Enzymy přenášející siřné skupiny

Většina enzymů katalyzujících reakce fáze II biotransformace xenobiotik patří do druhé ze šesti tříd enzymů, jsou to tedy transferasy. Tyto enzymy napomáhají přenosu skupiny atomů

z jedné molekuly (donoru) na druhou (akceptor). Dále se dělí do podtříd a skupin podle typu přenášených funkčních skupin. Jednou z těchto podtříd jsou enzymy přenášející sirmé skupiny (EC 2.8.), kam patří:

- Sulfurtransferasy (EC 2.8.1.) – sirmé skupiny kromě EC 2.8.2. a 2.8.3.
- Sulfottransferasy (EC 2.8.2.) – přenášející sulfát
- CoA-transferasy (EC 2.8.3.) – přenášející koenzym A

3.2.1 Aryl-sulfottransferasy (EC 2.8.2.1)

Aryl-sulfottransferasy (AST) jsou skupinou enzymů, které využívají jako substráty (donory i akceptory) celou řadu derivátů fenolu. Ayuso-Fernández et al. řadí AST mezi cystolické sulfottransferasy, které přenášejí sulfátovou skupinu na molekuly jako jsou fenoly, steroidy, hormony, aminy a xenobiotika (Ayuso-Fernández et al. 2014). Tyto enzymy se dělí do dvou skupin - aryl-sulfottransferasy I, II a aryl-sulfottransferasy III, IV (Sekura et al. 1981). Další možné rozdělení je podle (Van Der Horst et al. 2012), který rozděluje AST na skupinu, která používá jako molekulu donoru PAPS pro sulfataci cukrů, hormonů a antibiotik. Druhá skupina využívá fenolové sulfátové estery, jako je *p*-nitrofenylsulfát (*p*-NPS), *p*-acetylphenylsulfát nebo 1-naftylsulfát jako donor sulfátu (Van Der Horst et al. 2012; Islam et al. 2018).

Řada malých molekul včetně hormonů, léčiv, antibiotik nebo i makromolekul, jako jsou proteiny a cukry, je přirozeně sulfatovaná právě AST (Stressler et al. 2016). Aryl-sulfottransferasy jsou navíc schopné zvrátit proces sulfatace v buňkách (Wang & James 2005). AST mají široký substrátový rozsah a je možné je snadno produkovat v bakteriálních expresních systémech. AST jsou schopné sulfatovat fenolová antibiotika, steroidy, flavonoidy a lignin (Islam et al. 2018). Aryl-sulfottransferasy je možné najít v mikroorganismech, v živočišných tkáních i u některých rostlin (Stressler et al. 2016).

3.2.1.1 Eukaryotické sulfottransferasy

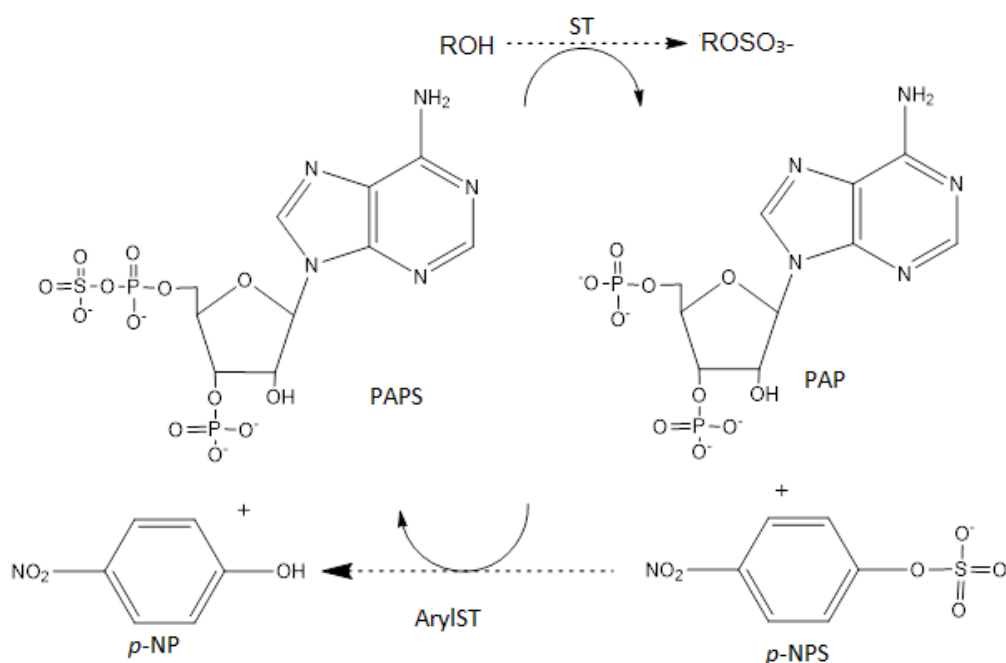
V eukaryotních buňkách sulfottransferasy zodpovídají právě za přeměnu xenobiotik na metabolity, které jsou dále rozpustnější ve vodě a vylučovány do moči. Protože jsou metabolity snadno odbourávány, lze považovat sulfataci pomocí sulfottransferas za buněčný obranný mechanismus (Strott 2002). Tyto enzymy jsou přítomny v různých tkáních a k účinné konjugaci sulfátu v eukaryotech je potřebná přítomnost PAPS. Enzymový mechanismus této reakce se označuje „bi-bi“, jelikož reakce zahrnuje 2 substráty (donor a akceptor sulfátu), které vedou ke dvěma produktům. Existují dvě skupiny eukaryotických sulfottransferas – cytosolové a membránově vázané (Negishi et al. 2001).

Cytosolové sulfottransferasy sulfatují malé endogenní a exodenní sloučeniny jako jsou steroidy, bioaminy a různá léčiva, a podílejí se tak na detoxikaci organismu. Podílejí se ale i na aktivaci a deaktivaci hormonů a karcinogenů tvorbou sulfátových konjugátů (Chapman et al. 2004).

Membránové sulfottransferasy sulfatují i větší molekuly, například proteiny (Negishi et al. 2001) a jsou lokalizované v Golgiho aparátu (Glatt et al. 2001). Tyto sulfottransferasy regulují extracelulární signální pochody (Chapman et al. 2004). Většina známých sulfottransferas je

členem nadrodiny enzymů zvané SULT. U člověka je známo deset genů kódujících různé isoformy SULT (Glatt et al. 2001).

Jak už bylo řečeno výše, eukaryotické sulfotransferasy používají PAPS jako donor sulfátu pro sulfataci molekul. Problematickým pro praktické využití těchto sulfotransferas je velmi nákladný PAPS, který lze sice regenerovat, zavádí se však do systému další donor substrátu (Van Der Horst et al. 2012). AST IV (arylsulfotransferasa z potkaních jater), byla použita k vývoji takového regeneračního systému s jedním enzymem pro PAPS (Burkart et al. 2000; Ayuso-Fernández et al. 2014), který využívá reverzibilitu reakce katalyzované pomocí AST IV. Pokud je spojena s jinou sulfotransferasou, závislou na PAPS, může AST IV přenášet sulfátovou skupinu z *p*-NPS na PAP a regenerovat PAPS (Obrázek 3). Nevýhoda tohoto systému může být v nestabilitě čisté AST IV (Ayuso-Fernández et al. 2014), kterou je možné překonat použitím celých buněk exprimujících AST IV namísto jejich dezintegrace a přidáváním čerstvého enzymu k překonání jeho krátké životnosti.



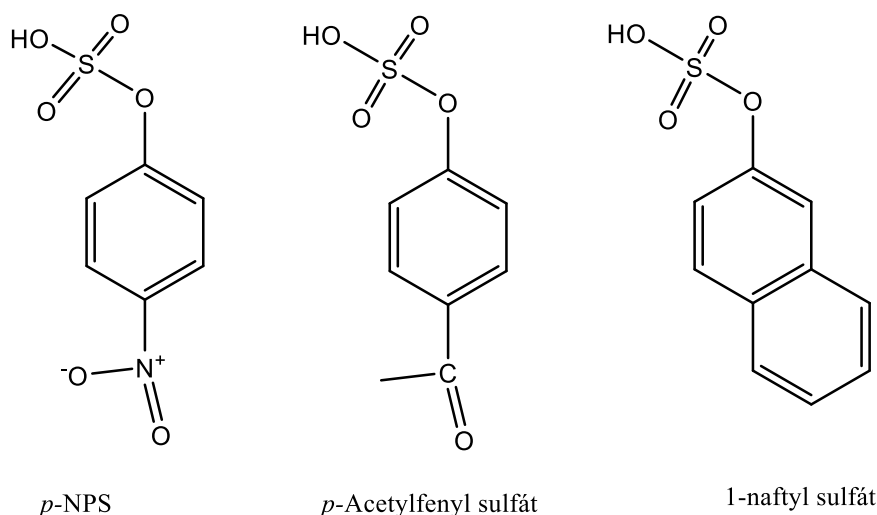
Obrázek 3 - Regenerační cyklus adenosin-3'-fosfát-5'-fosfosulfátu (PAPS) závislý na použití aryl-sulfotransferasy. Upraveno a převzato od (Ayuso-Fernández et al. 2014).

Podle literatury (Van Der Horst et al. 2012) hrají aryl-sulfotransferasy roli v řadě chorobných stavů včetně vstupu HIV, chronického zánětu a různých forem rakoviny. I díky tomuto biologickému významu roste zájem o syntézu sulfatovaných molekul.

3.2.1.2 Bakteriální arylsulfotransferasy

Tato skupina aryl-sulfotransferas používá fenolové sulfátové estery (Obrázek 4, např. *p*-NPS) jako donory sulfátu (Van Der Horst et al. 2012). Mechanismus přenosu sulfátu během této reakce je nezávislý na PAPS (Mangold et al. 1993). Používání těchto enzymů se ukázalo jako vhodné pro preparativní přípravu sulfátů. Jejich velkou výhodou je snadná exprese v *E. coli*. AST jsou stabilnější oproti eukaryotickým aryl-sulfotransferasám a *p*-NPS je levnější a stabilnější oproti PAPS. Mezi nejvyužívanější patří AST z *Desulfitobacterium hafniense* či z

Haliangium ochraceum (Ayuso-Fernández et al. 2014). První AST byla objevena v bakterii *Eubacterium A-44* v lidském střevě. V poslední době bylo objeveny další bakterie obsahující aryl-sulfotransferasy nezávislé na PAPS (Van Der Horst et al. 2012). Jediná krystalová struktura AST byla dosud určena pro AST z kmene *E. coli* CFT073 (Malojčić et al. 2008). AST vykazují širokou substrátovou specifitu a u většiny bakterií jejich fyziologické role zůstávají neznámé. Ale například ze *Streptomyces* sp. MK730-62F2 byla exprimována AST, která se účastní biosyntézy liponukleosidů. Je zodpovědná za tvorbu sulfatovaných liponukleosidových antibiotik (Kaysser et al. 2010; Van Der Horst et al. 2012).



Obrázek 4 - Příklad fenolových sulfátových esterů jako donorů sulfátové skupiny

3.3 Sulfatace v průmyslovém a laboratorním měřítku

3.3.1 Chemická sulfatace

V chemickém nebo farmaceutickém průmyslu se k sulfataci sloučenin používají komplexy oxidu sírového (SO₃) s terciálními amidy nebo aminy (Van Der Horst et al. 2012), kyselina sírová a amidosulfonová (Islam et al. 2018). Používání těchto činidel má řadu nevýhod. Mezi hlavní nevýhody patří nepříznivé podmínky reakcí, které mohou poškodit citlivé komplexní sloučeniny, nebo špatná selektivita reakce, tj. v průběhu reakcí může docházet i ke vzniku vedlejších produktů (Van Der Horst et al. 2012). Chemická výroba zahrnuje několik kroků a použití řady nebezpečných chemikálií jako je např. oxid sírový-pyridin, řada toxických činidel či organických rozpouštědel, zatěžující životní prostředí ve formě odpadů (Simpson & Widlanski 2006; Islam et al. 2018).

Další problém je spojen se změnami fyzikálních nebo chemických vlastností sulfatovaných molekul. Celková nízká rozpustnost v organických sloučeninách ztěžuje další transformace či čištění. Dále je potřeba chránění reaktivních skupin a následné odstranění chránění, což vyžaduje několikakrokovou syntézu (Penney & Perlin 1981; Al-Horani & Desai 2010).

3.3.2 Enzymatická sulfatace

Alternativou k chemické sulfataci je využití enzymů, jako jsou právě sulfotransferasy. Oproti chemické sulfataci zahrnuje enzymová reakce většinou pouze jeden krok a probíhá za mírnějších podmínek. Nicméně u SULT je hlavním problémem, že potřebují používat nákladný PAPS, který je zároveň nestabilní a může způsobit i k substrátové inhibice produktu 3'-fosfoadenosin-5'-fosfátem (PAP) (Gamage et al. 2006; Ayuso-Fernández et al. 2014). Nákladný PAPS lze regenerovat ovšem za cenu zavedení dalšího sulfátového donoru do reakce. Zároveň membránové sulfotransferasy jsou nestabilní a hůře se exprimují, proto není jejich produkce triviální (Chopin et al. 2014).

Bakteriální AST jsou výhodnější pro biotransformace multigramových množství substrátů z důvodů nižších nákladů, díky jejich vyšší stabilitě a schopnosti využívat levné donory sulfátů jako je *p*-NPS oproti PAPS. AST mají širokou substrátovou specifitu a vysokou regiosektivitu. Mají nižší tendenci inhibice produktem než SULT a jsou schopny sulfatace nearomatických sloučenin (Hartog & Wever 2015; Van Der Horst et al. 2015).

3.3.3 Využití sulfotransferas ze savčích enzymů

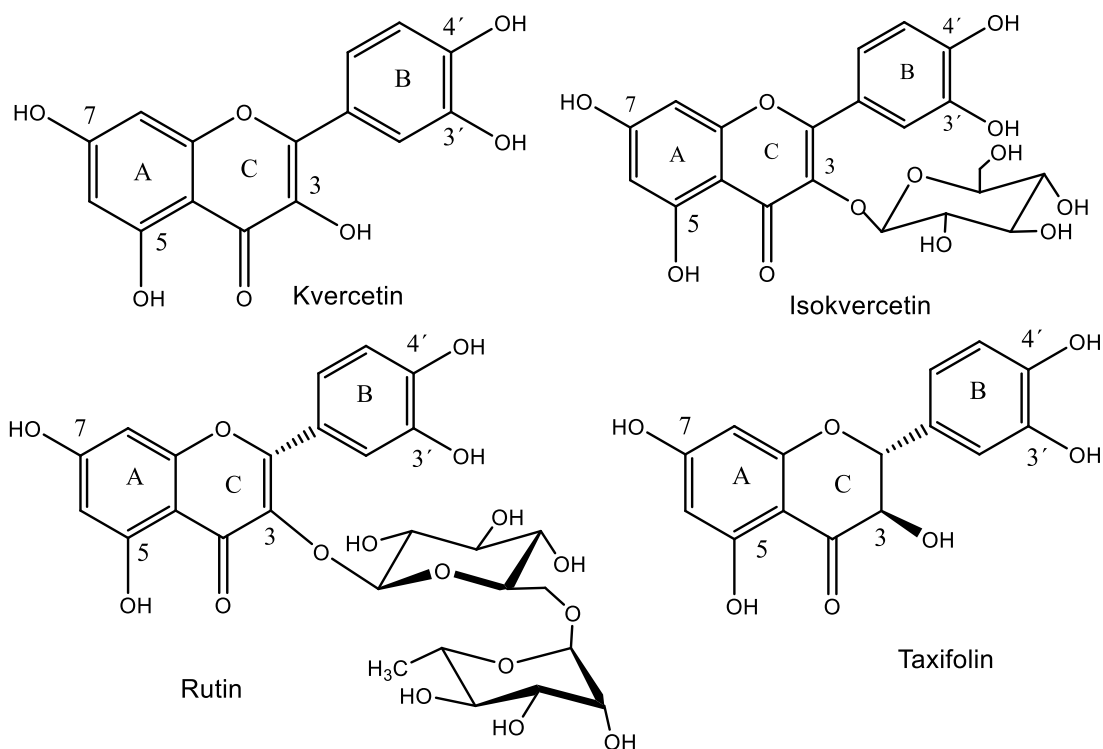
3.3.3.1 Sulfotransferasa z potkaních jater (AST IV)

AST IV je jedním z izozymů cytosolických sulfotransferas vykazující nejširší substrátovou specifitu (Duffel & Jakoby 1981; Sekura et al. 1981). Tento enzym byl použit v mnoha pracích pro ověřování autenticity sulfatovaných metabolitů u savců.

Kvercetin, rutin, isokvercetin a taxifolin patří mezi flavanoly, což je hlavní třída flavonoidů - přirozeně se vyskytujících polyfenolů a látek, které mají významnou roli v lidské stravě. Vyskytují se v ovoci a zelenině a jsou považovány za antioxidanty. Kvercetin pomáhá organismu při chorobách spojených s oxidačními nerovnováhami, např. při zánětech nebo kardiovaskulárních problémech. V přírodě se kvercetin vyskytuje ve formě glykosidů, např. isokvercitrin (3-*O*-β-D-glukopyranosid) nebo rutin (kvercetin 3-*O*-rutinosid, Obrázek 5), který je používán ve farmaceutickém, nutraceutickém a kosmetickém průmyslu jako stabilizátor nebo přírodní barvivo (Purchartová et al. 2015). Kromě toho mají kvercetin a rutin antikoagulační, antiagregační a antivirové účinky (Valentová et al. 2018). Taxifolin se od kvercetinu liší absencí dvojnásobné vazby v poloze C2 a C3 na kruhu C; izoluje se z kůry *Pinus roxburhii*, *Larix sibirica* nebo *Taxus chinensis* var. *mairei*. Taxifolin se podílí na udržování normální funkce oběhového systému, zlepšuje imunitu a snižuje tvorbu rakovinných buněk (Weidmann 2012). Nejbohatším zdrojem kvercetinu je například cibule, kapusta nebo brokolice (Manach et al. 2004). Příjem kvercetinu a jeho glykosidů i taxifolinu z potravy je poměrně vysoký a jejich metabolity jsou často sulfáty. Sulfatované deriváty těchto látek jsou tedy důležité jako standardy pro metabolické studie. Sulfatované deriváty kvercetinu navíc vykazují další zajímavé biologické aktivity – antimikrobiální, anti-HIV, protizánětlivé a protinádorové účinky (Purchartová et al. 2015).

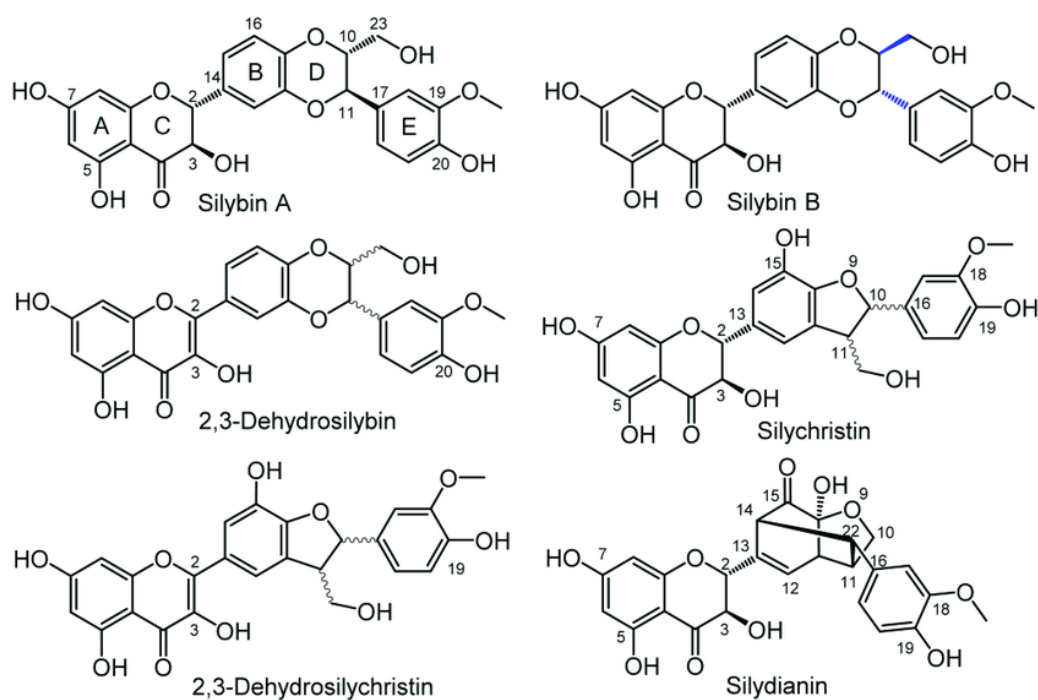
Pro ověření, zda jsou kvercetin a jeho deriváty substráty pro AST IV z jater potkana, byla testována sulfatace rekombinantním enzymem exprimovaným v *E. coli*. Díky přirozeně se vyskytujícímu kofaktoru PAPS v buňkách *E. coli* byla AST IV schopna katalyzovat regeneraci PAPS pomocí *p*-NPS jako donoru sulfátu, ale pouze za použití celých buněk produkujících

tento enzym, který byl po izolaci nestabilní. Ze zkoumaných látek byl pouze taxifolin schopen sulfatace pomocí AST IV (Purchartová et al. 2015).



Obrázek 5 - Kvercetin a jeho deriváty

Sulfatace pomocí AST IV byla studována i u flavonolignanů silymarinu, což je výtažek z plodů ostropestřce mariánského (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.). V současné době se používá jako doplněk stravy s antioxidačními (Kwon et al. 2013), hepatoprotektivními (Dehmlow et al. 1996), chemoprotektivními, protirakovinnými (Zi et al. 2000) a dermatoprotektivními účinky. Mezi hlavní flavonolignanové izomery v silymarinu patří silybin, silychristin a silydianin (Obrázek 6) (Saller et al. 2001; Gillissen & Schmidt 2020). K prvotnímu prokázání sulfatace byl proveden pokus pomocí AST z potkaních jater, která prokázala proces sulfatace (tvorba *p*-nitrofenolu z *p*-NPS), avšak izolovaný sulfát se povedlo získat pouze od silybinu B (Valentová et al. 2018).



Obrázek 6 - Vybrané flavonolignany obsažené v ostropestřci mariánském.

3.3.4 Využití bakteriálních sulfotransferas

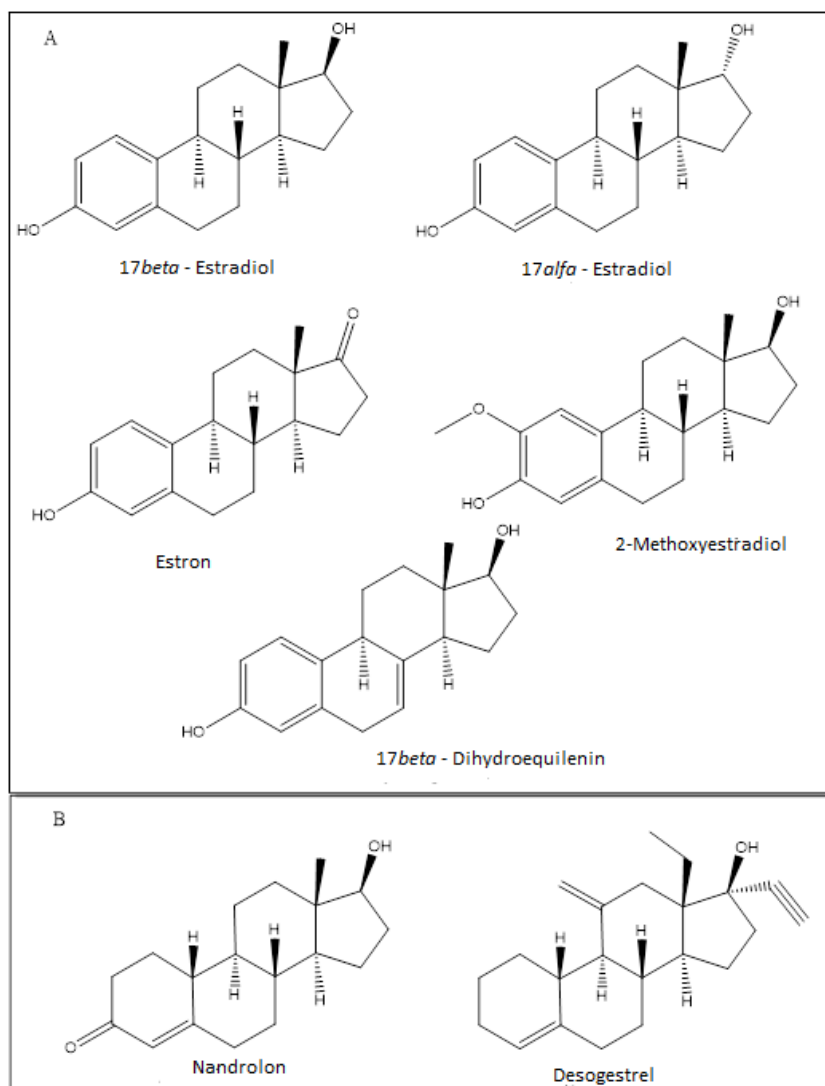
Výhodou bakteriálních enzymů je zejména jejich snadná exprese v jednoduchých expresních systémech, jako je *E. coli*, a následná schopnost připravit žádané produkty v množstvích až stovek miligramů. Bakteriální AST jsou mnohem méně charakterizované než eukaryotní PAPS závislé sulfotransferasy. Nicméně právě tyto AST jsou užitečné pro biotransformační účely. Mají výhodu ve vyšší stabilitě *p*-NPS oproti PAPS a v široké substrátové specifitě (Mozhaev et al. 2002), proto mohou být potenciálně užitečnými v selektivní a mírné sulfataci mnoha sloučenin např. peptidů, steroidů a sacharidů (Van Der Horst et al. 2012).

3.3.4.1 AST z *Desulfitobacterium hafniense*

Tento enzym byl poprvé exprimován a zkoumán v roce 2012 (Van Der Horst et al. 2012). Proteinová sekvence z *D. hafniense* kóduje protein se 628 zbytky odpovídající molekulové hmotnosti 71,4 kDa. Srovnání sekvencí AST od různých organismů ukazuje na možné rozdělení do dvou tříd (Van Der Horst et al. 2012). První třída zahrnuje proteiny hlavně proteobakterií a sekvence vykazují velkou podobnost (Grimshaw et al. 2008). Druhá třída, kam patří i AST z *D. hafniense*, vykazují menší podobnost sekvencí, sekvence jsou delší než u první třídy (až o 30 zbytků) a liší se i počty zbytků (Van Der Horst et al. 2012). Prostorové uspořádání zbytků aktivního místa v bakteriálních AST je nicméně stejné jako v sulfotransferasách závislých na PAPS (Teramoto et al. 2009).

Byla zkoumána aktivita AST z *D. hafniense* a její schopnost sulfatace různých akceptorů ze skupin fenolových látek, steroidů a alifatických alkoholů; jako donor sulfátu byl použit *p*-NPS. U většiny fenolových sloučenin bylo zjištěno, že jsou schopny přijmout sulfát. Pro sulfataci steroidů, jak se ukázalo, je důležitá přítomnost 3'-OH skupiny na aromatickém jádře,

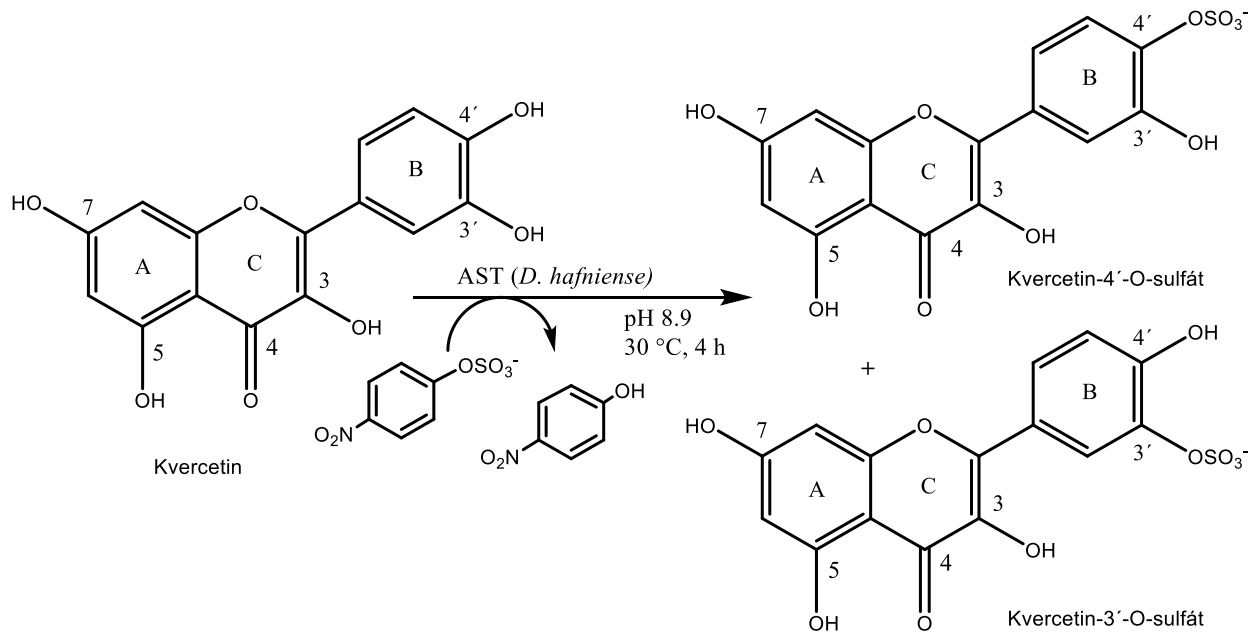
kteřá dobře přijímá sulfátovou skupinu (Obrázek 7). Při stanovení charakterizace enzymu bylo stanoveno optimální pH 9,6 a střední teplota tání v závislosti na podmínkách v rozmezí 30,9-44,9 °C. K purifikaci enzymu byla použita kolona DEAE Sephacel. Autoři uvádějí, že po purifikaci byl na kontrolní SDS-PAGE pouze jeden proužek o přibližné molekulové hmotnosti 70 kDa, ovšem obrázek nebyl v práci uveden (Van Der Horst et al. 2012). Přesto tento enzym dosud nebyl krystalizován.



Obrázek 7 - Příklady steroidů, které se podařilo (A) a nepodařilo (B) sulfatovat pomocí AST z *D. hafniense*. Upraveno a převzato od (Van Der Horst et al. 2012).

AST z *D. hafniense* dokázala využít jako akceptory sulfátové skupiny také některé nefenolové alkoholy. Ovšem tato reakce je mnohem pomalejší oproti reakci s fenoly (Van Der Horst et al. 2012).

Pomocí AST z *D. hafniense* byly získány sulfatované produkty kvercetinu ve velmi dobrém množství (stovky mg) k provedení dalších studií (Purchartová et al. 2015). Bylo zjištěno, že AST z *D. hafniense* je velmi vhodná pro sulfataci díky své vysoké účinnosti (Tabulka 1) a že produkuje stejné deriváty jako savčí enzym (Obrázek 8). Testování případných alternativních donorů sulfátu (*N*-hydroxysukcinimid sulfát, *N*-ftalimid sulfát) ukázalo, že *p*-NPS je jako donor nejlepší (Valentová et al. 2017).



Obrázek 8 - Sulfatace kvercetinu. Upraveno a převzato od (Purchartová et al. 2015)

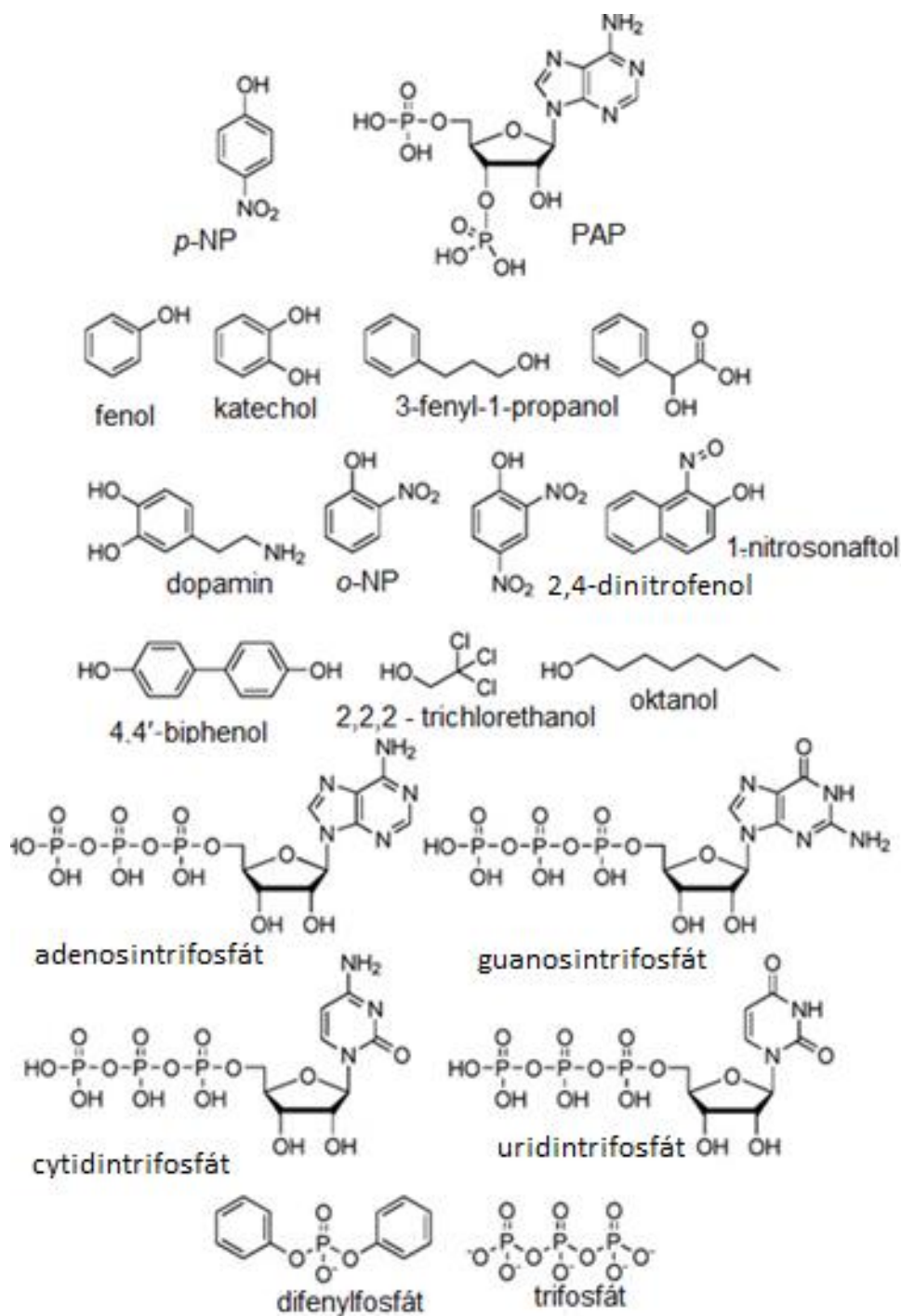
Tabulka 1 - Porovnání základních vlastností AST IV a AST z *D. hafniense*. Upraveno a převzato od (Purchartová et al. 2015)

Vlastnosti	Potkaní AST IV	AST z <i>D. hafniense</i>
Použití PAPS	Ano	Ne
Katalyzátor	Celé buňky	Lyzát
Čas reakce	3 dny	4 hodiny
Výtěžek	0-25 % (10 mg)	50-80 % (100 mg)
Optimální teplota °C	37	30

Pomocí *D. hafniense* byly získány i sulfatované flavonolignany silymarinu (např. silybin A i B, silydianin, silychristin a 2,3-dehydroflavonolignany), strukturně identické s metabolity savců (Marhol et al. 2013; Valentová et al. 2018). Následné testování ukázalo, že některé sulfatované metabolity flavonolignanů silymarinu vykazovaly vazorelaxační účinky (Pourová et al. 2019).

3.3.4.2 AST z *Haliangium ochraceum* (HocAST)

AST kódovaná tímto genem byla heterologně exprimována v *E. coli* a byla dokázána aktivita tohoto enzymu. HocAST je schopna používat PAPS i *p*-NPS jako donor sulfátu, což z něj dělá poměrně všestranný enzym. Vyzkoušené akceptory HocAST jsou uvedeny na obrázku (9). Molekulární hmotnost tohoto enzymu činí 37 kDa (Ayuso-Fernández et al. 2014).



Obrázek 9 - Akceptory pro AST z *H. ochraceum* Přeřazeno a upraveno od (Ayuso-Fernández et al. 2014).

Z výše uvedeného vyplývá, že přestože se již běžně používá několik bakteriálních arylsulfotransferas, většina z nich nebyla podrobně charakterizována a krystalová struktura je známa pouze u jedné z nich.

4 Metodika

4.1 Použité materiály a přístroje

4.1.1 Výchozí látky a použité činidla

Akrylamid (VWR, Česká republika)
Bradfordovo činidlo (ředěno 1:4 s destilovanou vodou, Bio-rad, USA)
Coomassie Brilliant Blue (USB Corporation, USA)
Destilovaná voda
Dodecylsírán sodný (SDS, SERVA, USA)
Ethanol (VWR, Česká republika)
Ethylendiamintetraoctová kyselina (Sigma-Aldrich, USA)
Fenylmethylsulfonyl-florid (PMSF, Sigma-Aldrich, USA)
Fenol (VWR, Česká republika)
Glycerol (VWR, Česká republika)
Glycin (Lach-Ner, Česká republika)
Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
Isopropyl- β -D-thiolaktopyranosid (IPTG, Sigma-Aldrich USA)
Kanamycin-sulfát (Sigma-Aldrich, USA)
Kyselina chlorovodíková (VWR, Česká republika)
Kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)
Lysozym (Oxoid, Velká Británie)
Methanol (ISOLAB, Německo)
para-Nitrofenyl-sulfát (ACROS Organics, Německo)
Persulfát amonný (Bio-rad, USA)
Sacharosa (Chemapol, Česká republika)
Tetramethylethyldiamin (TEMED, Sigma-Aldrich, USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, MERCK, Německo)
Trypton (Oxoid, Velká Británie)
Kvasničný extrakt (Oxoid, Velká Británie)

4.1.2 Biologický materiál

Kryokonzervované buňky *E. coli* BL21(DE3)pLysS, transformované plasmidem obsahujícím gen pro AST z *D. hafniense* (dar dr. van der Horsta, University of Amsterdam) byly skladovány při -80 °C a použity nejpozději 6 měsíců po transformaci.

4.1.3 Média a roztoky

Luria Bertani (LB) médium: 5 g tryptonu, 2,5 g kvasničného extraktu a 2,5 g NaCl doplněné vodou na 500 ml

100 mM Tris-glycinový pufr: 6,057 g Tris-báze, 3,754 g glycinu a 5,84 g NaCl doplněné vodou na 500 ml a upravené na pH 8,9 HCl

Pufř A: 7,507 g glycinu a 12,114 g Tris-báze doplněné na 1000 ml a upravené pH 8,5 HCl

Pufř B: 7,507 g glycinu, 12,114 g Tris-báze a 11,688 g NaCl doplněné na 1000 ml a upravené pH na 8,5 HCl

Periplasmatický lyzační pufř: 40 g sacharózy, 6 ml Tris o pH 8,0, 0,4 ml 0,5M EDTA o pH 8,0 a 0,2 g lysozymu doplněné vodou na 200 ml

Barvicí roztok: 0,25 g Coomassie Brilliant Blue, 90 ml methanolu, 90 ml vody a 10 ml 99% kyseliny octové

Elektrodoř pufř pro SDS-page (Running pufř): 3 g/l Tris, 18,8 g/l glycinu a 1 g/l SDS, zásobní roztok 5krát koncentrovaný

Gel na SDS-PAGE (10%): 10% separační gel – 4 ml vody, 3,3 ml 30% akrylamidu, 2,5 ml 1,5M Tris pufřu pH 8,8, 100 μ l 10% SDS, 100 μ l 10% persulfátu amonného, 5 μ l TEMED a 5% zaostřovací gel – 2,7 ml vody, 0,67 ml 30% akrylamidu, 0,5 ml 0,5 M tris pufřu pH 6,8, 40 μ l 10% SDS, 40 μ l 10% persulfátu amonného a 4 μ l TEMED

Marker molekulových hmotností: LMW (low molecular weight) 14,4 - 97,4 kDa, 2,4 mg proteinu ve 200 μ l 50% glycerolu, 300 mM NaCl, 10 mM Tris o pH 8,5, 2 mM EDTA, 3 mM NaN₃,

Odbarvovací roztok: 350 ml ethanolu, 550 ml vody, 100 ml kyseliny octové

4.1.4 Přístrojové vybavení

Äkta FPLC (Amersham Biosciences, Švédsko)

Äkta purifer (Amersham Biosciences, Švédsko)

Analytické váhy (OHAUS Corporation, USA)

Aparatura pro SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)

Centrifuga MiniSpin (Eppendorf, USA)

Inkubátor a shaker NB205-QF (N-Biotek, Velká Británie)

Kolona DEAE Sephacel (Sigma Aldrich, USA)

Kolona Sephacryl (Amersham Biosciences, Švédsko)

Kolona Superdex (Amersham Biosciences, Švédsko)

Magnetická míchačka Magneticstirner (Velp Scientifica, Itálie)

Sonikátor UP50H (Hielscher, Německo)

Spektrofotometr UV mini 1240 (SHIMADZU, Japonsko)

Spektrofotometr Schoeller instruments (Tecan, Švýcarsko)

Termomixer (Eppendorf, USA)

Vortex Grant-bio (Grant Instruments, Velká Británie)

pH metr (Eppendorf, USA)

4.2 Použitě metody

4.2.1 Stanovení aktivity aryl-sulfotransferasy

Principem metody pro stanovení aktivity enzymu je reakce fenolu jako akceptoru a *p*-nitrofenyl-sulfátu jako donoru sulfátové skupiny ve stejném poměru za přítomnosti aktivního enzymu ve 100 mM Tris-glycinovém pufřu o optimálním pH 8,9 (Van Der Horst et al. 2012).

Měření probíhá ve spektrofotometru v jamkách mikrotitračních destiček za teploty 30 °C. Následně se aktivita vypočítá pomocí vzorce:

$$a = \frac{A/min}{k} * V * \text{ředění} * 5$$

kdy A/min je absorbance za minutu, k – kalibrační faktor závislosti absorbance na koncentraci o hodnotě 0,0109 [mM⁻¹], ředění značí ředění enzymu ze zásobního roztoku, V je celkový objem (250 µl), a je výsledná aktivita v jednotkách U/ml.

4.2.2 Měření koncentrace proteinů podle Bradforda

Měření proteinů podle Bradforda (Bradford 1976) slouží ke stanovení koncentrace proteinů ve vzorku (v mg/ml). Měření se provádí ve spektrofotometru. K měření je potřeba 1 ml Bradfordova činidla, které spolu s 100 µl 100 mM Tris-glycinového pufru tvoří slepý vzorek. Vzorek enzymu (100 µl) s Bradfordovým činidlem (1 ml) je pak měřen při absorbanci 595 nm vůči slepému vzorku. Reakční směsi jsou před změřením inkubovány 15 minut při laboratorní teplotě. Výsledná koncentrace se pak vypočítá dle vzorce:

$$c = A * k * \text{ředění}$$

kdy A je absorbance při 595 nm (výsledná absorbance by se měla nacházet v rozmezí 0,1-0,6 pro zachování lineární závislosti), k je kalibrační faktor Bradfordova činidla závislosti absorbance na koncentraci standardu (hovězí γ-globulin, „Protein Standard I“, Bio-Rad), ředění značí ředění vzorku ze zásobního roztoku a c je výsledná koncentrace v mg/ml.

4.2.3 SDS – PAGE

Elektroforesa v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) je biochemická metoda, která se používá k dělení proteinů na základě jejich pohyblivosti v elektrickém poli, která je závislá na jejich molekulární hmotnosti a na průchodu gelem. Jejich pohyblivost je srovnávána s pohyblivostí standardů o známé molekulární hmotnosti.

Připravený roztok pro 10% polyakrylamidový gel byl napipetován do aparatury, která se skládá ze dvou skel a nástavce s jamkami pro následné pipetování vzorků, a odstaven pro ztuhnutí separačního gelu. Následně byl připraven zaostřovací gel a napipetován do aparatury po rysku. Po plném ztuhnutí byl gel připravený k elektroforéze.

Elektroforesa probíhá v aparatuře Mini-PROTEAN Tetra cell při 130 V v prostředí elektrodového pufru. Do první jamky bylo napipetováno 5 µl markeru molekulových hmotností. Vzorky byly napipetovány do dalších jamek (20 µl) spolu s přidáním vzorkovým pufrem (5 µl). Vzorky byly před nanesením denaturovány (3 minuty při 99 °C). Gel byl zalit elektrodovým pufrem a aparatura připojena k elektrodám. Po skončení byl gel vyjmut, proteiny obarveny (15 minut) pomocí Coomassie Brilliant Blue a pozadí bylo odbarveno odbarvovacím činidlem (složení roztoků viz kapitola 4.1.2).

4.2.4 Koncentrování proteinů

Koncentrování enzymu probíhá na principu ultracentrifugace při 10 °C a 5000 otáčkách za minutu (rpm) ($1677 \times g$) na 1 ml v kyvetách Amicon Ultra s membránou o „cut-off“ 10 kDa.

4.3 Produkce enzymu

4.3.1 Příprava buněk

Do pěti Erlenmeyerových baněk se 100 ml živného LB média bylo naočkováno 100 μ l předem připravených kryokonzervovaných buněk *E. coli*, transformovaných plasmidem obsahujícím gen pro AST z *D. hafniense*. Buňky byly před použitím postupně rozmrazeny na ledu. Dále bylo přidáno 100 μ l antibiotika kanamycin-sulfátu. Veškeré pipetování a další manipulace s buňkami byly prováděny ve sterilním prostředí v laminárním boxu. Poté byly buněčné suspenze inkubovány při teplotě 37 °C a 120 rpm ve třepačce. Bakterie se nechaly narůst, dokud OD (optická densita) při vlnové délce 600 nm nebyla 0,600. Průběžné měření bylo prováděno po 2, 2,5 a 3 hodinách spektrofotometricky proti slepému vzorku, kterým bylo LB medium bez bakterií. Do každé baňky bylo následně přidáno 160 μ l isopropyl- β -D-thiolaktopyranosidu a suspenze byly inkubovány přes noc ve třepačce za stálé teploty 25 °C a 220 rpm.

Druhý den byly kultury přelity do kyvety a centrifugovány 20 minut při otáčkách 5000 rpm ($4000 \times g$) a teplotě 10 °C. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a vzniklá peleta obsahující buňky byla dále zpracována.

4.3.2 Lyzování buněk *E. coli*

K získání enzymu z buněk byly použity dvě různé metody. Při prvním způsobu byly buňky rozbity pomocí ultrazvuku, u druhého způsobu byla použita metoda, kdy pomocí změny osmotického tlaku byla rozbита periplasmatická membrána.

4.3.2.1 Sonikace

Peleta vzniklá po centrifugaci byla resuspendována v 10 ml 100 mM Tris-glycinového pufru o pH 8,9. Do resuspendovaného vzorku bylo přidáno 100 μ l PMSF. Roztok byl sonikován pomocí sonikátoru UP50H ve zkumavce o objemu 50 ml (typ Falcon) na ledu v pravidelných intervalech 4 minuty sonikování, 4 minuty stání ve čtyřech opakováních při amplitudě 80 % a cyklu 0,5. Rozbité buňky byly přepipetovány do zkumavek o 1,5 ml (eppendorf) a následně centrifugovány 2 minuty při 13 000 rpm ($12\,225 \times g$). Poté byl odebrán supernatant s enzymem a změřena jeho aktivita a koncentrace proteinů.

4.3.2.2 Periplasmatický lyzát

Pro získání enzymu z buněk byl použit periplasmatický lyzační pufr (25 ml), ve kterém byla resuspendována peleta. Roztok byl inkubován 24 hodin při 6 °C za stálého míchání. Následující den byl vzorek rozpipetován do zkumavek o objemu 1,5 ml (eppendorf) a centrifugován po

dobu 20 minut, při otáčkách 13 500 ($12\,225 \times g$) a teplotě 8 °C. U výsledného supernatantu s enzymem byla změřena aktivita enzymu a koncentrace proteinů.

4.3.3 Purifikace pomocí iontoměničové chromatografie

Pro purifikaci AST byla použita metoda iontoměničové chromatografie na koloně DEAE Sephacel (anex) na chromatografické sestavě Äkta Prime Plus. Kolona byla nejdříve promývána pufrý A (100 mM Tris-glycinový pufr o pH 8,5) a B (100 mM Tris-glycinový + 1 M NaCl o pH 8,5 pufr) za tlaku 0,35 MPa a průtoku 2 ml/min. Následně byl nanesen vzorek při průtoku 2 ml/min. Poté, co byl vzorek nanesen, byla kolona promyta pufrém A. Enzym byl eluován při gradientu 120 ml a průtoku 2 ml/min pomocí soli obsažené v pufru B. Frakce eluovaných proteinů byly sbírány po 2 ml na automatickém sběrači do 15 ml zkumavek.

Průběh purifikace byl spektrofotometricky monitorován pomocí programu Unicorn, kde byla kontrolována absorbance UV při 280 nm. Po ukončení purifikace byla kolona následně promyta postupně 1 M NaOH, 1 M NaCl, destilovanou vodou a 20% ethanolem.

4.3.4 Purifikace pomocí metody gelové permeační chromatografie (gelová filtrace)

Pro purifikaci AST byla použita metoda gelové filtrace na koloně Sephacryl. Kolona byla nejdříve promývána 100 mM Tris-glycinovým pufrém o pH 8,5 s přidavkem 200 mM NaCl přes noc při průtoku 0,2 ml/min a tlaku 0,65 MPa. Druhý den byl na kolonu nanesen koncentrovaný vzorek enzymu, tento vzorek byl dělen při průtoku 0,5 ml/min a 2 ml frakce eluovaných proteinů byly sbírány na automatickém sběrači do 20 ml zkumavek.

Průběh purifikace byl spektrofotometricky monitorován pomocí programu Unicorn, kde byla kontrolována absorbance UV při 280 nm. Po ukončení purifikace byla kolona následně promyta 20% ethanolem.

Z důvodů nižšího množství enzymu byla purifikace u vzorku 2 provedena na jiné koloně – Superdex S-200. Purifikace proběhla za stejných podmínek, kromě velikosti frakcí, které byly sbírány po 0,3 ml do 1,5 ml zkumavek.

4.4 Charakterizace sulfotransferasy

Charakterizace sulfotransferasy zahrnovala stanovení pH optima, teplotního optima a měření enzymové kinetiky. Při všech měřeních bylo používáno stanovení aktivity enzymu, jak je popsáno v oddíle 4.2.1.

4.4.1 Teplotní optimum

Měření teplotního optima bylo prováděno pomocí stanovení aktivity enzymu zahřátého na určitou teplotu v termomixeru. Teplotní škála byla vybrána od 20 °C až do 75 °C, vždy v rozmezí po 5 stupních. Aktivita byla měřena pomocí spektrofotometru Tecan a programu Magellan. Pro měření aktivity bylo použito 25 μ l 50 mM *p*-NPS, 25 μ l 50 mM fenolu, 50 μ l 100-krát zředěného enzymu a 150 μ l 100 mM Tris-glycinového pufru o pH 8,9. Měření bylo prováděno v tripletu v mikrotitračních destičkách.

4.4.2 pH optimum

Měření pH optima bylo prováděno pomocí stanovení aktivity enzymu v pufru o určitém pH. Škála pH byla vybrána od 2 do 12 po půl jednotkách pH v Britton-Robinsonových pufrách. Aktivita byla měřena pomocí spektrofotometru Tecan a programu Magellan. Pro měření aktivity bylo použito 25 μ l 50 mM *p*-NPS, 25 μ l 50 mM fenolu, 50 μ l 100krát zředěného enzymu a 150 μ l Tris-glycinového pufru o určitém pH. Měření bylo prováděno v tripletu v mikrotitračních destičkách. Hodnotili jsme závislost aktivity na pH.

4.4.3 Měření enzymové kinetiky

Byla změřena závislost počáteční rychlosti enzymové reakce na koncentraci substrátu a z ní byla nelineární regresí stanovena Michaelisova konstanta (K_m) a maximální rychlost enzymové reakce (V_{max}).

Bylo vybráno osm koncentrací substrátu v rozmezí 0,025 – 1,25 mM. Reakce obsahovala 50 μ l enzymu, 125 μ l 50 mM fenolu a *p*-NPS v různých objemech od 0,5 do 25 μ l. Objem reakční směsi byl doplněn pufrům na 250 μ l. Hodnoty absorbancí byly zaneseny do grafu v závislosti na koncentraci substrátu a kinetické parametry byly vyhodnoceny nelineární regresí pomocí programu GraphPad Prism 7.0.

5 Výsledky

5.1 Sulfotransferasa připravená sonikací a purifikovaná metodou iontoměničové chromatografie (anex) a gelovou filtrací na koloně Sephacryl

5.1.1 Produkce enzymu

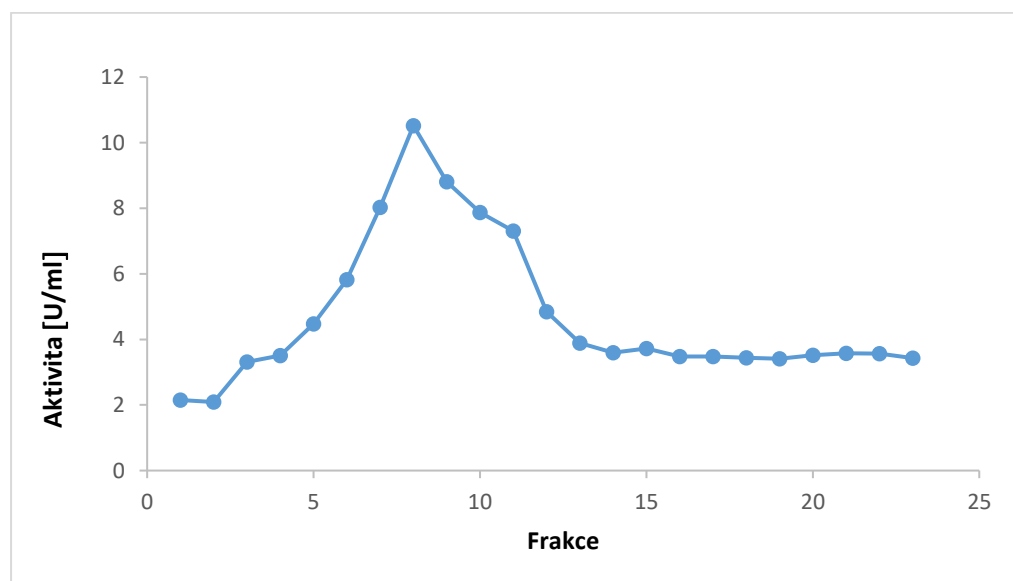
Vzorek 1 byl produkován v LB mediu při 37 °C a 125 rpm do nárůstu přibližně OD 0,6. OD bylo průběžně kontrolováno během produkce a vzorek inkubován přes noc při 25 °C a otáčkách 225 rpm. Parametry získaného enzymu byly zaznamenány v následující tabulce (Tabulka 2). Enzym byl získán z buněk pomocí metody sonikace celých buněk.

Tabulka 2 - Parametry vzorku 1 - objem, hmotnost, koncentrace a aktivita po produkci

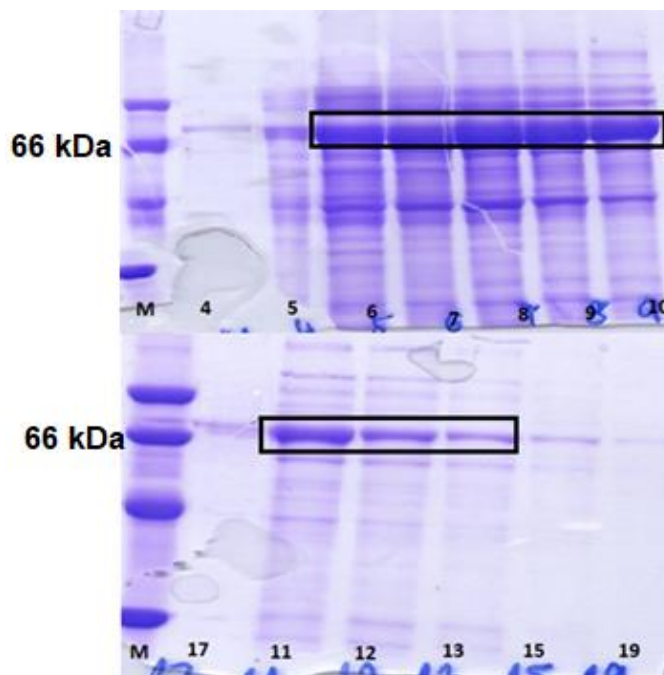
	<i>Objem supernatantu [ml]</i>	<i>Hmotnost pelety [g]</i>	<i>Aktivita [U/ml]</i>	<i>Koncentrace [mg/ml]</i>
Vzorek 1	14,2	4,7	13,5	7,1

5.1.2 První purifikace metodou iontoměničové chromatografie

Vzorek byl purifikován pomocí kolony DEAE Sephacel za použití chromatografu Äkta. Kolona byla nejdříve promývána pufrý A (100 mM Tris-glycinový pufr o pH 8,5) a B (100 mM Tris-glycinový + 1 M NaCl o pH 8,5 pufr) za tlaku 0,35 MPa a průtoku 2 ml/min. Enzym byl eluován při gradientu 120 ml a průtoku 2 ml/min pomocí soli obsažené v pufru B. Bylo sebráno 23 frakcí po 2 ml a u všech změřena aktivita (Obrázek). Čistota purifikovaného enzymu ve vybraných frakcích byla stanovena SDS-PAGE (Obrázek 10).



Obrázek 10 - Aktivita AST ve frakcích po první purifikaci

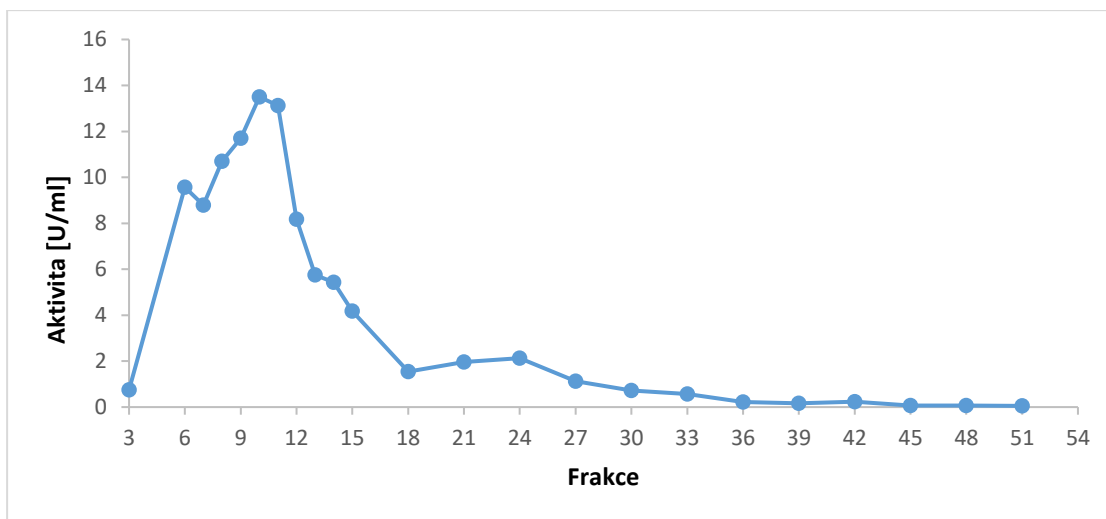


Obrázek 10 – Polyakrylamidový gel frakcí po první purifikaci.
 Jako marker (M) byl použit LMW. V ostatních drahách jsou jednotlivé frakce (4-19) s AST.

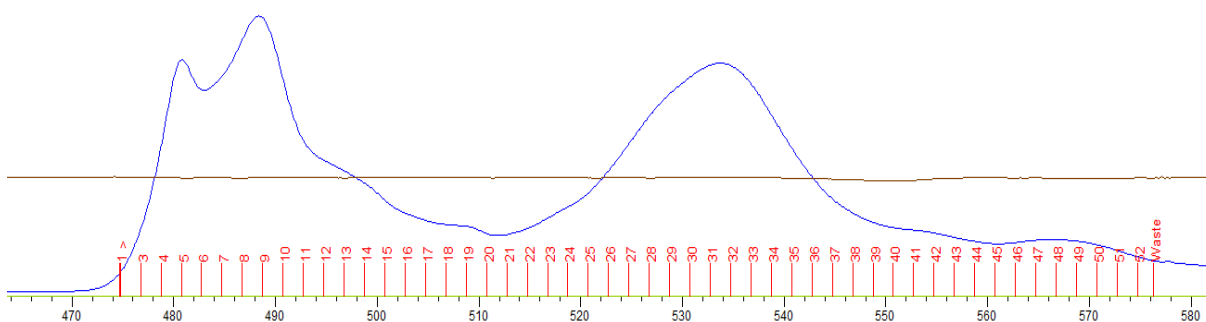
Frakce s nejvyšším množstvím enzymu a největší aktivitou (frakce 6 až 11) byly spojeny do jedné zkumavky (výsledný objem 12 ml) a koncentrovány pomocí centrifugačních filtrů Amicon na celkový objem 1 ml. Následně byla změřena koncentrace proteinů podle Bradforda a aktivita enzymu. Výsledný vzorek měl aktivitu 9,1 U/ml, koncentraci 8,6 mg/ml.

5.1.3 Druhá purifikace metodou gelové filtrace

Koncentrovaný vzorek byl dále purifikován pomocí metody gelové filtrace (Obrázek 12). K purifikaci byla použita kolona Sephacryl. Kolona byla nejdříve promývána 100 mM Tris-glycinovým pufrem o pH 8,5 s přidavkem 200 mM NaCl přes noc při průtoku 0,2 ml/min a tlaku 0,65 MPa. Druhý den byl na kolonu nanesen koncentrovaný vzorek enzymu, tento vzorek byl dělen při průtoku 0,5 ml/min. Celkem bylo sesbíráno 51 frakcí po 2 ml. U každé třetí frakce byla změřena aktivita (Obrázek 11). U frakcí s největší aktivitou (4-12) byla provedena elektroforesa pro kontrolu čistoty enzymu (Obrázek 13).

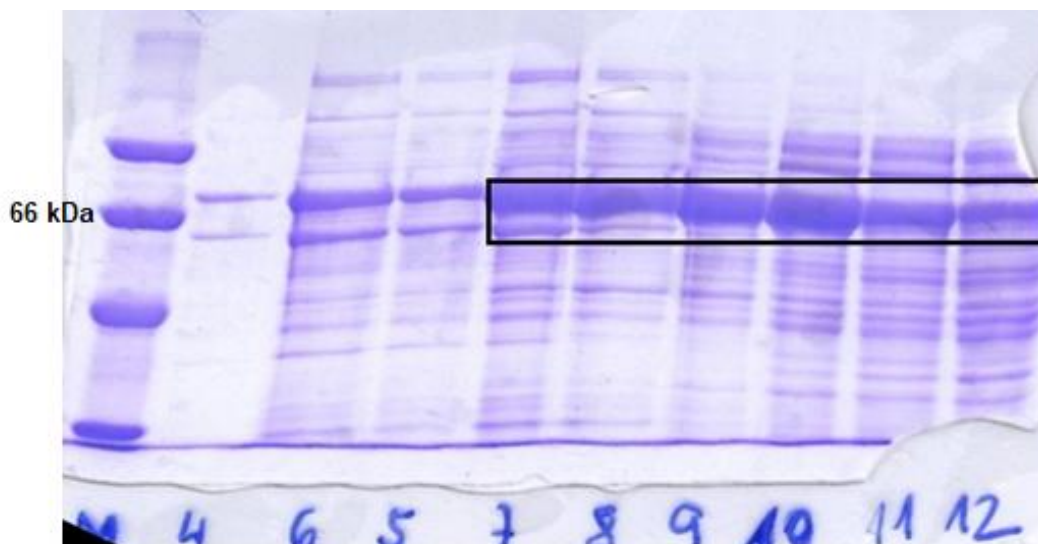


Obrázek 11 – Aktivita AST ve frakcích vzorku po druhé purifikaci



Obrázek 12 – Chromatogram průběhu purifikace pomocí metody gelové filtrace. Modrá křivka je eluční křivka enzymu vyjadřující absorbcí při 280 nm. Na ose x je objem mobilní fáze.

Podle množství enzymu a čistoty byly spojeny frakce 7-10. Výsledné množství vzorku 1 bylo 7,7 ml. Aktivita vzorku byla 9 U/ml a koncentrace 8,8 mg/ml. U vzorku bylo nadále provedeno stanovení teplotního a pH optima a kinetických parametrů V_{max} a K_m (kapitola 5.4).



Obrázek 13 - Polyakrylamidový gel frakcí 4-12 po druhé purifikaci. Jako marker (M) byl použit LMW. V ostatních drahách jsou jednotlivé frakce enzymu.

5.2 Sulfotferasa připravená periplasmatickým lyzačním pufrem a purifikována pomocí metod iontoměničové chromatografie (anex) a gelové filtrace na koloně Superdex – S 200

5.2.1 Produkce enzymu

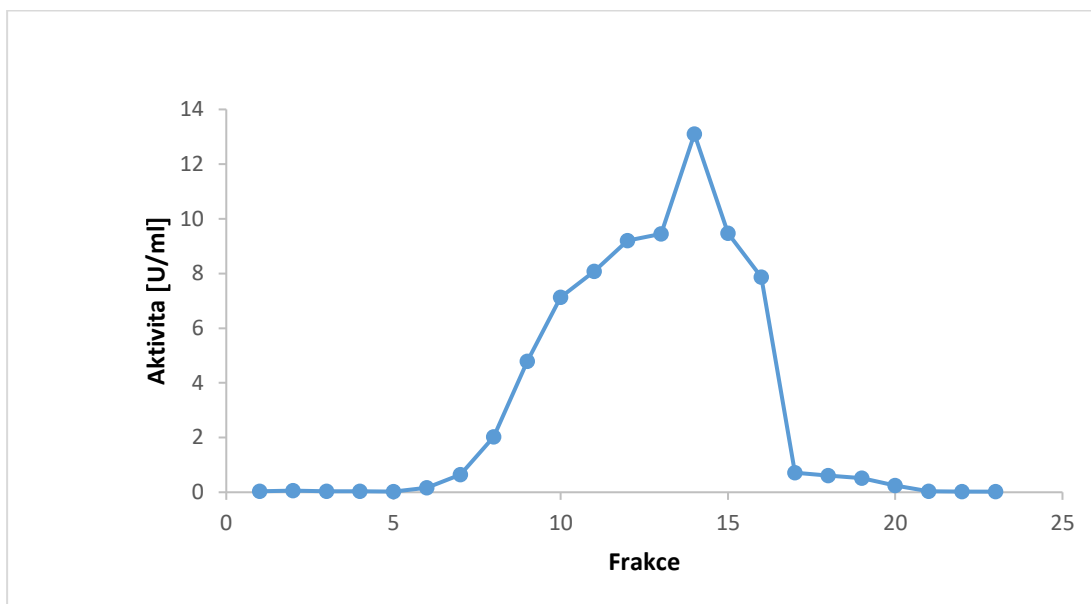
Vzorek 2 byl produkován v LB mediu při 37 °C a otáčkách 125 rpm do nárůstu OD přibližně 0,6, které bylo průběžně kontrolováno během produkce, a inkubován přes noc při 25 °C a 225 rpm. Enzym byl získán pomocí periplasmatického lyzačního pufru. Parametry získaného enzymu byly zaznamenány v následující tabulce (Tabulka 3). Ze vzorku před inkubací byl odebrán alikvot o objemu 1 ml, ze kterého byl enzym získán pomocí sonikace, pro porovnání výtěžku, množství a čistoty enzymu z obou metod.

Tabulka 3 - Parametry vzorku 2 po produkci

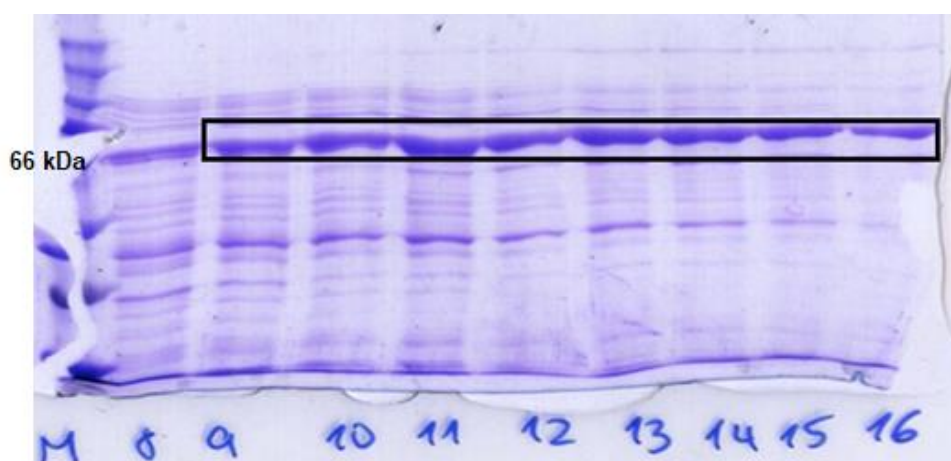
	<i>Objem supernatantu [ml]</i>	<i>Hmotnost pelety [g]</i>	<i>Aktivita [U/ml]</i>	<i>Koncentrace [mg/ml]</i>
Vzorek 2	19,5	4,2	9,9	6,92
Alikvot 1	1,0	0,3	10,0	17,5

5.2.2 První purifikace metodou iontoměničové chromatografie

Vzorek byl purifikován pomocí kolony DEAE Sephacel za použití chromatografu Äkta. Kolona byla nejdříve promývána pufrý A (100 mM Tris-glycinový pufr o pH 8,5) a B (100 mM Tris-glycinový + 1 M NaCl o pH 8,5 pufr) za tlaku 0,35 MPa a průtoku 2 ml/min. Enzym byl eluován při gradientu 120 ml a průtoku 2 ml/min pomocí soli obsažené v pufru B. Čistota purifikovaného enzymu byla ověřena SDS-PAGE (Obrázek 15). Bylo sebráno 24 frakcí po 2 ml a u všech změřena aktivita (Obrázek 14).



Obrázek 14 - Aktivita AST v jednotlivých frakcích po první purifikaci vzorku 2

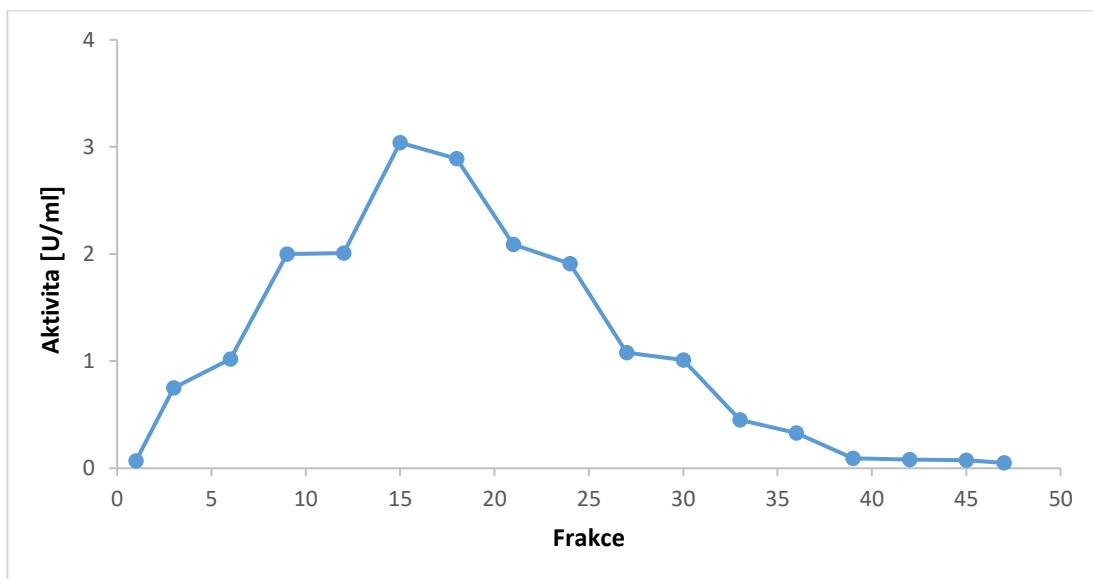


Obrázek 15 - Polyakrylamidový gel frakcí 8 až 16 po první purifikaci. Jako marker (M) byl použit LMW. V ostatních drahách jsou jednotlivé frakce enzymu.

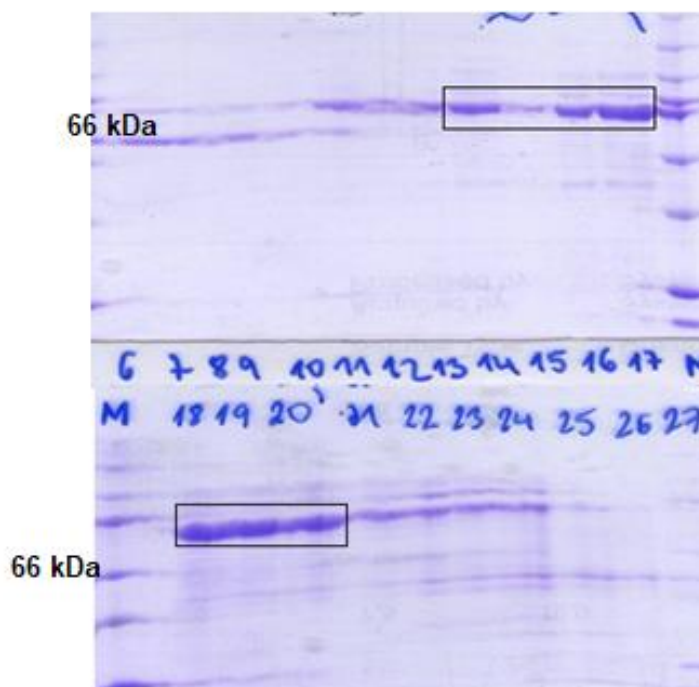
Frakce s nejvyšším množstvím enzymu a největší aktivitou (frakce 11 až 16) byly spojeny do jedné zkumavky. Výsledný objem činil 12 ml. Následně byl produkt zakoncentrován pomocí zkumavek Amicon na 1 ml. Byla změřena koncentrace podle Bradforda a aktivita enzymu. Výsledný vzorek měl aktivitu 3,0 U/ml, koncentraci 3,9 mg/ml.

5.2.3 Druhá purifikace metodou gelové filtrace

Zakoncentrovaný vzorek byl dále purifikován pomocí gelové filtrace. K purifikaci byla použita kolona Superdex 200. Kolona byla nejdříve promývána 100 mM Tris-glycinovým pufrům o pH 8,5 s přidavkem 200 mM NaCl přes noc při průtoku 0,2 ml/min a tlaku 0,65 MPa. Druhý den byl na kolonu nanesen koncentrovaný vzorek enzymu, tento vzorek byl dělen při průtoku 0,5 ml/min. Celkem bylo vzato 43 frakcí po 0,3 ml. U každé třetí frakce byla změřena aktivita (Obrázek 16). U frakcí s největší aktivitou (6 až 27) byla provedena elektroforesa pro kontrolu čistoty enzymu (Obrázek 17).



Obrázek 16 - Graf aktivity AST v jednotlivých frakcích po druhé purifikaci vzorku 2



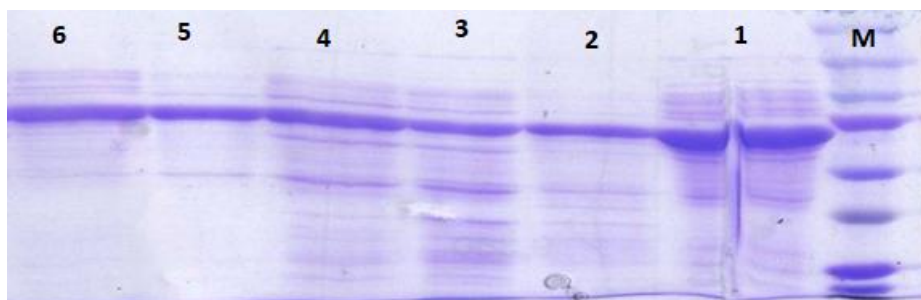
Obrázek 17 - Polyakrylamidový gel jednotlivých frakcí po druhé purifikaci pomocí gelové filtrace. Jako marker (M) byl zvolen LMW. V ostatních drahách jsou jednotlivé frakce enzymu s nejvyšší aktivitou

Frakce 14-17 a 18-20, které vykazovaly největší čistotu a množství proteinu, byly spojeny do dvou samostatných zkumavek a u obou změřena aktivita a koncentrace, které vycházely u frakcí 14 až 17 3,6 U/ml a 3,4 mg/ml a u 18 až 20 frakcí 2,1 U/ml a 3,3 mg/ml. Výsledné množství vzorků bylo 1 ml a 0,8 ml.

5.3 Porovnání obou vzorků

Dále byly porovnány hodnoty specifické aktivity a celkové aktivity obou vzorků AST v průběhu jejich purifikací (Tabulka 4). Pro porovnání celkové čistoty vzorků byla provedena SDS-PAGE z odebraných 1 ml alikvotů během každé fáze purifikace vzorků (Obrázek 18).

Produkce obou vzorků enzymu byla provedena za stejných podmínek, následně se však lišila metoda extrakce a výtěžek enzymu z buněk. Zatímco první vzorek byl sonikován, protein byl získán rozbitím buněk pomocí ultrazvuku, u druhého vzorku byl získán pomocí inkubace v periplasmatickém lyzačním pufru, kdy jsou buňky rozbity pomocí změny osmotického tlaku a enzym je z nich vyplavován. Čistota finálních AST po obou purifikacích v obou metodách je srovnatelná (Obrázek 18, dráhy 2,5,6). Dále byl použit vzorek číslo jedna pro další testování.



Obrázek 18 – Srovnávací polyakrylamidový gel proteinů v různých fázích purifikace arylsulfotransferasy (AST) z *Desulfitobacterium hafniense*.

Jako marker (M) byl použit LMW. 1- alikvot vzorku 2 po sonikaci. 2 - vzorek 1 po provedení obou purifikací. 3 - vzorek 2 po první purifikaci. 4 - vzorek 2 po vyprodukování enzymu pomocí lyzačního pufru. 5 a 6 – vzorek 2 po druhé purifikaci (5 - frakce 14-17 a 6 - frakce 18-20).

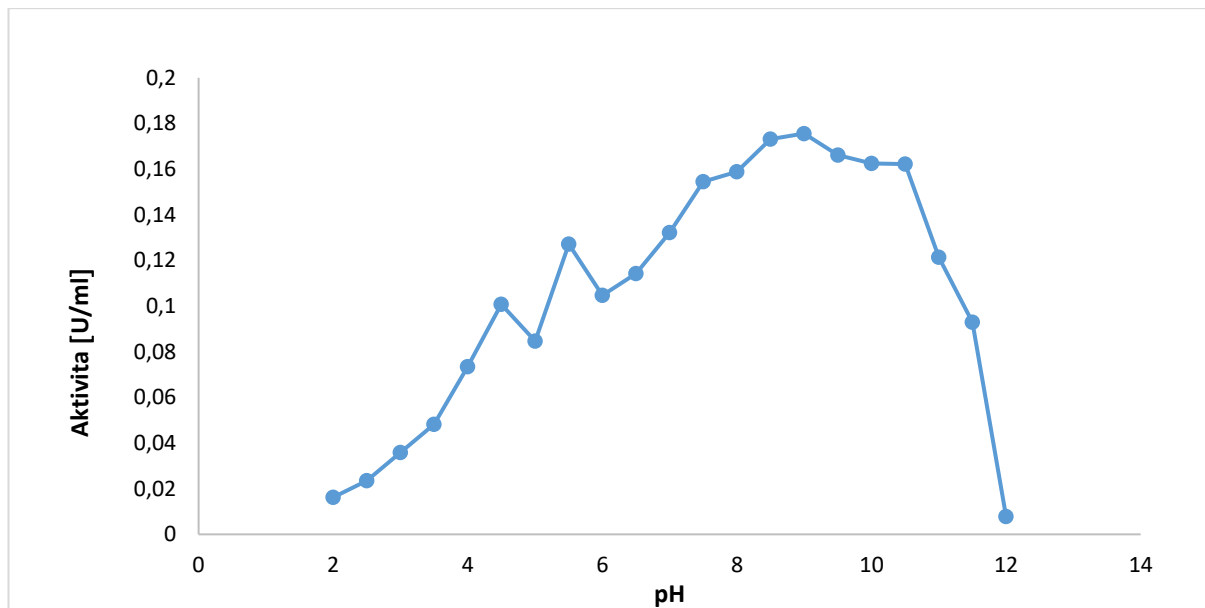
Tabulka 4 - Srovnání celkového výtěžku buněk, aktivity, specifické aktivity, celkové aktivity, koncentrace a celkové aktivity na gram buněk obou vzorků v průběhu jejich purifikace

<i>číslo vzorku</i>	<i>výtěžek buněk [g]</i>	<i>Průběh</i>	<i>Aktivita [U/ml]</i>	<i>Koncentrace proteinu [mg/ml]</i>	<i>Objem vzorku [ml]</i>	<i>Specifická aktivita [U/mg proteinu]</i>	<i>Celková aktivita [U]</i>	<i>Aktivita [U/g buněk]</i>
1	4,7	po sonikaci	13,5	7,1	14,2	1,9	192,0	41,0
		po DEAE Sephacel	9,1	8,6	12	1,1	109,0	23,0
		po gelové filtraci	9,0	8,8	7,7	1,0	69,0	15,0
2 alikvot	0,3	po sonikaci	10,0	17,9	1,0	0,6	10,0	50,0
2 vzorek	4,2	24 hod periplasmatický lyzační pufr	9,9	6,9	19,5	1,4	193,0	46,0
		po DEAE Sephacel	3,1	3,4	12,0	0,8	30,0	7,0
		po gelové filtraci frakce 14-17	3,6	3,4	1,0	1,1	3,0	1,0
		po gelové filtraci frakce 18-20	2,1	3,3	0,8	0,6	2,0	0,5

5.4 Stanovení biochemických vlastností

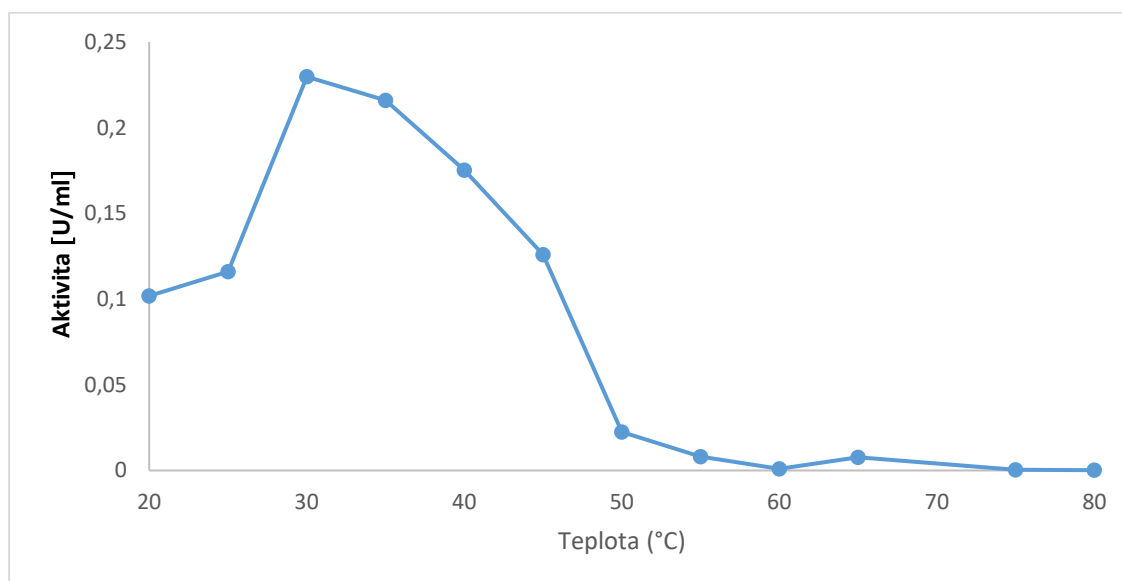
5.4.1 pH optimum a teplotní optimum

Stanovení pH optima bylo provedeno v prostředí univerzálního Britton-Robinsonova pufru v rozmezí hodnot pH 2-12 při 30 °C. Stanovení bylo provedeno v tripletu. Z vypočítaných hodnot byl stanoven graf závislosti aktivity na pH. Ideální pH bylo stanoveno z grafu (Obrázek 19) a má hodnotu 9.



Obrázek 19 – Graf závislosti aktivity enzymu na pH

Teplotní optimum bylo stanoveno v prostředí Tris-glycinového pufru pH 9 v rozmezí teplot 20 °C až 80 °C. Teplota byla zvyšována postupně po 5 °C. Měření bylo provedeno v tripletu a z vypočítaných hodnot byl stanoven graf závislosti aktivity na teplotě (Obrázek 20). Ideální teplota byla z grafu stanovena na hodnotě 30 °C.



Obrázek 20 - Graf závislosti aktivity enzymu na teplotě

5.4.2 Hodnoty K_m a V_{max}

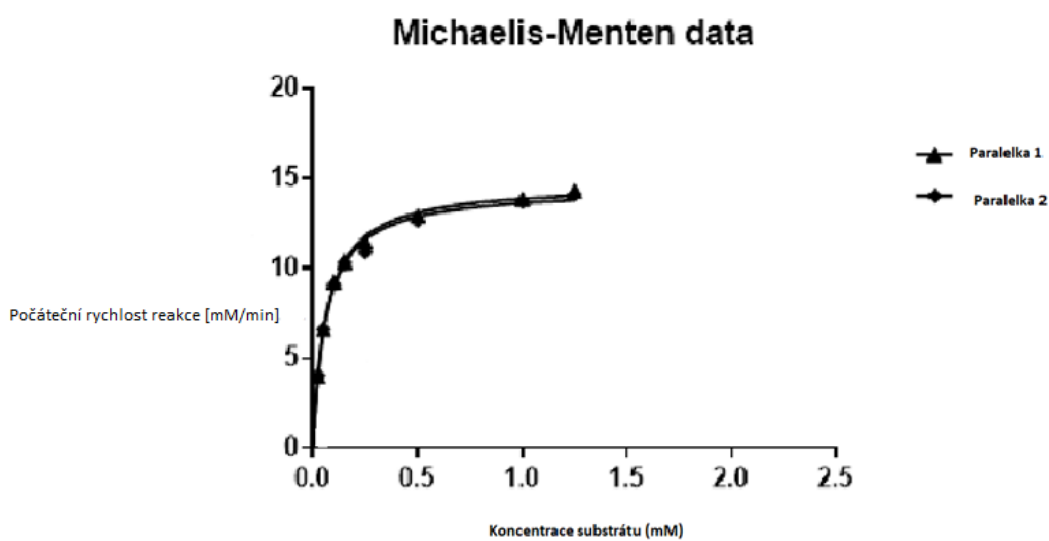
Poslední charakterizací sulfotransferasy bylo stanovení kinetických parametrů. Byla stanovena aktivita ve dvou paralelních stanoveních pro koncentrace substrátu 0,05 až 1,25 mM (Obrázek 21, Tabulka 5, Tabulka 6). Pomocí programu GraphPad Prism byly stanoveny hodnoty K_m (0,0618 mmol/l) a V_{max} (14,04 mmol/l/s).

Tabulka 5 - Měření kinetiky v nadbytku akceptoru a výsledné aktivity

<i>Množství fenolu [μl]</i>	<i>75,0</i>	<i>125,0</i>	<i>175,0</i>
<i>Paralelka 1</i>	10,5	10,9	11,7
<i>Aktivita [U/ml]</i>			
<i>Paralelka 2</i>	8,7	10,8	12,2
<i>Aktivita [U/ml]</i>			

Tabulka 6 - Měření kinetiky v rozdílných objemech donoru a jejich aktivity

<i>Množství donoru [μl]</i>	<i>0,5</i>	<i>1,0</i>	<i>2,0</i>	<i>3,0</i>	<i>5,0</i>	<i>10,0</i>	<i>20,0</i>	<i>25,0</i>
<i>Paralelka 1</i>	4,0	5,6	8,0	9,3	10,0	11,2	11,9	12,6
<i>Aktivita [U/ml]</i>								
<i>Paralelka 2</i>	4,1	5,5	8,1	9,5	10,0	11,3	11,5	12,5
<i>Aktivita [U/ml]</i>								



Obrázek 21 - Graf závislosti koncentrace substrátu na aktivitě enzymu

6 Diskuze

Aryl-sulfotransferasa z *Desulfitobacterium hafniense* má široké využití v biotechnologických aplikacích díky své široké substrátové specifitě. Pro biosyntézu metabolitů xenobiotik se v poslední době využívají právě tyto bakteriální AST, které na rozdíl od eukaryotních nejsou závislé na PAPS. Jako své donory využívají levnější a hlavně stabilnější fenolové sulfátové estery (např. *p*-NPS). Jejich velkou výhodou je i snadná exprese v *E. coli*. Využití aryl-sulfotransferas je i vhodnou alternativou k chemické syntéze. V rámci této práce byla tento enzym produkován heterologní expresí a byly ověřeny jeho biochemické vlastnosti. Vytyčeným cílem této práce bylo získat enzym dostatečně čistý, aby mohl být podroben krystalizaci, což se u něho zatím nikomu ještě nepodařilo.

Enzym byl produkován heterologní expresí v *E. coli* BL21(DE3)pLysS, které byly transformovány plasmidem obsahujícím gen pro arylsulfotransferasu z *D. hafniense* podle vzoru (Van Der Horst et al. 2012), kteří tento enzym exprimovali jako první. Enzym byl získán z buněk pomocí 2 odlišných metod. Buď sonikací, kdy byl protein získán rozbitím buněk pomocí ultrazvuku nebo byl získán pomocí inkubace v periplasmatickém lyzačním pufru, kdy jsou buňky rozbity pomocí změny osmotického tlaku a enzym je z nich vyplavován. Rozdíly v obou produkcích byly v objemu supernatantu, hmotnosti buněk a aktivity AST, ale celková specifická aktivita vyprodukovaných AST byla přibližně stejná (Tabulka 4).

Purifikace vyprodukovaného enzymu proběhla pomocí iontové výměnné chromatografie (kolona DEAE Sephacel – anex) a enzym byl eluován při gradientu 120 ml pomocí soli obsažené v pufru o pH 8,5. Čistota však nebyla dostačující, a proto byla provedena druhá purifikace enzymu metodou gelové permeační chromatografie (kolony Superdex a Sephacryl) a enzym byl eluován v pufru o pH 8,5. Kontrola čistoty byla provedena SDS-PAGE, kdy se čistoty enzymů moc nelišily (Obrázek 18). K velké ztrátě enzymu došlo u první purifikace pomocí DEAE Sephacelu (snížení celkové aktivity na polovinu), ale u stejného kroku u druhého vzorku došlo ke ztrátě téměř 85 % aktivity a množství enzymu vzorku. Ke ztrátě došlo i po druhé purifikaci u obou vzorků, přesto u druhého vzorku opět k větší (Tabulka 4).

Enzym připravený v rámci této práce má pH optimum 9 a teplotní optimum 30 °C. Tyto hodnoty odpovídají i hodnotám publikovaných v literatuře (Van Der Horst et al. 2012). Molekulová velikost proteinu odpovídá hodnotě 70 kDa. Poslední studované parametry byly Michealisova konstanta a maximální rychlost (V_{max}). K_m AST činilo 0,0618 mM a V_{max} 14,04 mmol/l/s. Tyto hodnoty dosud nebyly v literatuře publikovány.

7 Závěr

V rámci této práce byly shrnuty současné poznatky o eukaryotních a bakteriálních enzimech arylsulfotransferasach a jejich využití v biotechnologickém průmyslu pro produkci metabolitů, stejných jako se tvoří při sulfataci významných biologicky aktivních složek potravy ve fázi II metabolismu těchto xenobiotik.

V experimentální části byly pomocí heterologní exprese v *E. coli* BL21(DE3)pLysS, vyprodukovány dvě šarže arylsulfotransferasy z *Desulfitobacterium hafniense*. Enzymy získané dvěma různými metodami (sonikace celých buněk vs. extrakce z periplazmatického prostoru) byly následně purifikovány iontoměničovou chromatografií a gelovou filtrací. Nebyl zjištěn významný rozdíl mezi použitými metodami. Aryl-sulfotransferasa byla dále biochemicky charakterizována pomocí stanovení teplotního a pH optima, Michealisovy konstanty a maximální rychlosti.

Cílové čistoty tohoto enzymu, vhodné ke krystalizaci, se však v rámci této práce nepodařilo dosáhnout. V další práci se tedy zaměříme na zavedení vhodné kotvy do struktury tohoto proteinu, která by měla purifikaci usnadnit.

8 Literatura

- Al-Horani RA, Desai UR. 2010. Chemical sulfation of small molecules-advances and challenges.
- Ayuso-Fernández I, Galmés MA, Bastida A, García-Junceda E. 2014. Aryl sulfotransferase from *Haliangium ochraceum*: A versatile tool for the sulfation of small molecules. *ChemCatChem*.
- Boroujerdi M. 2015. Biotransformation of Xenobiotics. Page *Pharmacokinetics and Toxicokinetics*.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*.
- Burkart MD, Izumi M, Chapman E, Lin CH, Wong CH. 2000. Regeneration of PAPS for the enzymatic synthesis of sulfated oligosaccharides. *Journal of Organic Chemistry*.
- Chapman E, Best MD, Hanson SR, Wong CH. 2004. Sulfotransferases: Structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility.
- Chopin N, Guillory X, Weiss P, Bideau J, Collic-Jouault S. 2014. Design Polysaccharides of Marine Origin: Chemical Modifications to Reach Advanced Versatile Compounds. *Current Organic Chemistry*.
- Dehmlow C, Erhard J, De Groot H. 1996. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology*.
- Duffel MW, Jakoby WB. 1981. On the mechanism of aryl sulfotransferase. *Journal of Biological Chemistry*.
- Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, McManus ME. 2006. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism.
- Gillessen A, Schmidt HHJ. 2020. Silymarin as Supportive Treatment in Liver Diseases: A Narrative Review.
- Glatt H, Boeing H, Engelke CEH, Ma L, Kuhlow A, Pabel U, Pomplun D, Teubner W, Meinel W. 2001. Human cytosolic sulphotransferases: Genetics, characteristics, toxicological aspects. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*.
- Grimshaw JPA, Stirnimann CU, Brozzo MS, Malojčić G, Grütter MG, Capitani G, Glockshuber R. 2008. DsbL and DsbI Form a Specific Dithiol Oxidase System for Periplasmic Arylsulfate Sulfotransferase in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*.
- Hartog AF, Wever R. 2015. Substrate Engineering and its Synthetic Utility in the Sulfation of Primary Aliphatic Alcohol Groups by a Bacterial Arylsulfotransferase. *Advanced Synthesis and Catalysis*.
- Hodgson E. 2010. Introduction to Biotransformation (Metabolism). Page *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*.
- Islam S, Mate DM, Martínez R, Jakob F, Schwaneberg U. 2018. A robust protocol for directed aryl sulfotransferase evolution toward the carbohydrate building block GlcNAc. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Kaysser L, Eitel K, Tanino T, Siebenberg S, Matsuda A, Ichikawa S, Gust B. 2010. A new arylsulfate sulfotransferase involved in liponucleoside antibiotic biosynthesis in streptomycetes. *Journal of Biological Chemistry*.
- Kwon DY, Jung YS, Kim SJ, Kim YS, Choi DW, Kim YC. 2013. Alterations in sulfur amino acid metabolism in mice treated with silymarin: A novel mechanism of its action involved in enhancement of the antioxidant defense in liver. *Planta Medica*.
- Malojčić G, Owen RL, Grimshaw JPA, Brozzo MS, Dreher-Teo H, Glockshuber R. 2008. A structural and biochemical basis for PAPS-independent sulfur transfer by aryl

- sulfotransferase from uropathogenic *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability.
- Mangold JB, McCann DJ, Spina A. 1993. Aryl sulfotransferase-IV-catalyzed sulfation of aryl oximes: steric and substituent effects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*.
- Marhol P, Hartog AF, Van Der Horst MA, Wever R, Purchartová K, Fuksová K, Kuzma M, Cvačka J, Křen V. 2013. Preparation of silybin and isosilybin sulfates by sulfotransferase from *Desulfitobacterium hafniense*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.
- Mozhaev V V., Khmel'nitsky YL, Sanchez-Riera F, Maurina-Brunker J, Rosson RA, Grund AD. 2002. Arylsulfotransferase from *Clostridium innocuum* - A new enzyme catalyst for sulfation of phenol-containing compounds. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. 2002. Harperova Biochemie. Page Harperova biochemie.
- Negishi M, Pedersen LG, Petrotchenko E, Shevtsov S, Gorokhov A, Kakuta Y, Pedersen LC. 2001. Structure and function of sulfotransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Penney CL, Perlin AS. 1981. A method for the sulfation of sugars, employing a stable, aryl sulfate intermediate. *Carbohydrate Research*.
- Pourová J et al. 2019. The effect of silymarin flavonolignans and their sulfated conjugates on platelet aggregation and blood vessels ex vivo. *Nutrients*.
- Purchartová K et al. 2015. Prokaryotic and Eukaryotic Aryl Sulfotransferases: Sulfation of Quercetin and Its Derivatives. *ChemCatChem*.
- Saller R, Meier R, Brignoli R. 2001. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. Sekura RD, Duffel MW, Jakoby WB. 1981. Aryl Sulfotransferases. *Methods in Enzymology*.
- Shin SA, Moon SY, Kim WY, Paek SM, Park HH, Lee CS. 2018. Structure-based classification and anti-cancer effects of plant metabolites.
- Simpson LS, Widlanski TS. 2006. A comprehensive approach to the synthesis of sulfate esters. *Journal of the American Chemical Society*.
- Stressler T, Leisibach D, Lutz-Wahl S, Kuhn A, Fischer L. 2016. Homologous expression and biochemical characterization of the arylsulfatase from *Kluyveromyces lactis* and its relevance in milk processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Strott CA. 2002. Sulfonation and molecular action. *Endocrine Reviews*.
- Teramoto T, Adachi R, Sakakibara Y, Liu MC, Suiko M, Kimura M, Kakuta Y. 2009. On the similar spatial arrangement of active site residues in PAPS-dependent and phenolic sulfate-utilizing sulfotransferases. *FEBS Letters*.
- Timbrell JA, Marrs TC. 2009. Biotransformation of Xenobiotics. Page General and Applied Toxicology.
- Valentová K et al. 2017. Chemoenzymatic preparation and biophysical properties of sulfated Quercetin metabolites. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Valentová K et al. 2018. Sulfated metabolites of flavonolignans and 2,3-dehydroflavonolignans: Preparation and properties. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Van Der Horst MA, Hartog AF, El Morabet R, Marais A, Kircz M, Wever R. 2015. Enzymatic sulfation of phenolic hydroxy groups of various plant metabolites by an arylsulfotransferase. *European Journal of Organic Chemistry*.
- Van Der Horst MA, Van Lieshout JFT, Bury A, Hartog AF, Wever R. 2012. Sulfation of various alcoholic groups by an arylsulfate sulfotransferase from *desulfitobacterium hafniense* and synthesis of estradiol sulfate. *Advanced Synthesis and Catalysis*.

- Wang L-Q, James M. 2005. Inhibition of Sulfotransferases by Xenobiotics. *Current Drug Metabolism*.
- Weidmann AE. 2012. Dihydroquercetin: More than just an impurity?
- Zi X, Zhang J, Agarwal R, Pollak M. 2000. Silibinin up-regulates insulin-like growth factor-binding protein 3 expression and inhibits proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. *Cancer Research*.

9 Seznam použitých obrázků

Obrázek 1 - Možnosti fáze I (červeně) i II (modře) metabolismu paracetamolu. Převzato od (Murray et al. 2002).	10
Obrázek 2 - Schéma sulfatace. Přenos sulfátu z donoru sulfátu adenosin-3'-fosfát-5'-fosfosulfátu PAPS na OH skupinu sloučeniny R-OH.	12
Obrázek 3 - Regenerační cyklus adenosin-3'-fosfát-5'-fosfosulfátu (PAPS) závislý na použití aryl-sulfotransferasy. Upraveno a převzato od (Ayuso-Fernández et al. 2014).	14
Obrázek 4 - Příklady fenolových sulfátových esterů jako donorů sulfátové skupiny	15
Obrázek 5 - Kvercetin a jeho deriváty	17
Obrázek 6 - Vybrané flavonolignany obsažené v ostropestřci mariánském.	18
Obrázek 7 - Příklady steroidů, které se podařilo (A) a nepodařilo (B) sulfatovat pomocí AST z <i>D. hafniense</i> . Upraveno a převzato od (Van Der Horst et al. 2012).	19
Obrázek 8 - Sulfatace kvercetinu. Upraveno a převzato od (Purchartová et al. 2015).	20
Obrázek 9 - Akceptory pro AST z <i>H. ochraceum</i> Převzato a upraveno od (Ayuso-Fernández et al. 2014).	21
Obrázek 10 – Polyakrylamidový gel frakcí po první purifikaci.	29
Obrázek 11 – Aktivita AST ve frakcích vzorku po druhé purifikaci.	30
Obrázek 12 – Chromatogram průběhu purifikace pomocí metody gelové filtrace. Modrá křivka je eluční křivka enzymu vyjadřující absorbanční při 280 nm. Na ose x je objem mobilní fáze.	30
Obrázek 13 - Polyakrylamidový gel frakcí 4-12 po druhé purifikaci.	31
Obrázek 14 - Aktivita AST v jednotlivých frakcích po první purifikaci vzorku 2	32
Obrázek 15 - Polyakrylamidový gel frakcí 8 až 16 po první purifikaci.	32
Obrázek 16 - Graf aktivity AST v jednotlivých frakcích po druhé purifikaci vzorku 2	33
Obrázek 17 - Polyakrylamidový gel jednotlivých frakcí po druhé purifikaci pomocí gelové filtrace.	33
Obrázek 18 – Srovnávací polyakrylamidový gel proteinů v různých fázích purifikace arylsulfotransferasy (AST) z <i>Desulfitobacterium hafniense</i>	34
Obrázek 19 – Graf závislosti aktivity enzymu na pH	36
Obrázek 20 - Graf závislosti aktivity enzymu na teplotě	36
Obrázek 21 - Graf závislosti koncentrace substrátu na aktivitě enzymu	37
Tabulka 1 - Porovnání základních vlastností AST IV a AST z <i>D. hafniense</i> . Upraveno a převzato od (Purchartová et al. 2015)	20
Tabulka 2 - Parametry vzorku 1 - objem, hmotnost, koncentrace a aktivita po produkci.	28
Tabulka 3 - Parametry vzorku 2 po produkci	31
Tabulka 4 - Srovnání celkového výtěžku buněk, aktivity, specifické aktivity, celkové aktivity, koncentrace a celkové aktivity na gram buněk obou vzorků v průběhu jejich purifikace.	35
Tabulka 5 - Měření kinetiky v nadbytku akceptoru a výsledné aktivity	37
Tabulka 6 - Měření kinetiky v rozdílných objemech donoru a jejich aktivity.	37

