

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Iva Hrubá

Klonování, exprese, purifikace a vývoj metody pro hledání inhibitorů enzymu MTH1

Cloning, expression, purification and development of a method for finding inhibitors of MTH1 enzyme

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze, *18.5.2018*

Podpis

Abstract

Malignant cells differ from healthy cells in many aspects such as metabolism, oxidative stress and DNA repair. They are thus dependent on proteins that are not essential to healthy cells. Targeting such proteins thus represents a viable way to treat cancer, which has been first demonstrated by DNA repairing enzyme PARP inhibitor, used to treat ovarian cancer. Some other potential targets have been identified including 7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase (MTH1). This enzyme degrades oxidized nucleotides and plays thus a role in the cancer cell response to oxidative stress. It has been shown that MTH1 inhibition or downregulation leads to cancer growth suppression both in vitro and in vivo and represents thus a very prominent anticancer target.

This work aims to develop a high-throughput screening (HTS) assay to identify novel MTH1 inhibitors. Recombinant MTH1 has been cloned, expressed, purified and enzymatically characterized. The enzyme has been then used to set up a HTS based on newly described DIANA technology.

Key words: MTH1, MutT homolog 1, expression, purification, enzymatic activity, DIANA

Abstrakt

Maligní tkáně se od zdravých odlišují v mnoha ohledech, jako například v metabolismu, zvýšeném oxidativním stresu a v mechanismech oprav DNA. Buňky těchto tkání jsou proto závislé na enzymech, které za normálních podmínek nejsou nezbytné. Cílení na takové enzymy je slibný směr léčby rakoviny, což bylo poprvé prokázáno užitím inhibitoru PARP, opravného enzymu DNA, při léčbě rakoviny vaječníků. Mezi další potenciální cíle obdobné léčby patří i 7,8-dihydro-8-oxoguanin trifosfatasa (MTH1). Tento enzym štěpí oxidované nukleotidy a je v rakovinných buňkách nepostradatelný pro zvládnutí oxidačního stresu. Bylo prokázáno, že inhibice nebo snížení exprese MTH1 vede k omezení růstu maligní tkáně *in vitro* i *in vivo*. Proto MTH1 můžeme zařadit mezi nadějně cíle.

Tato práce měla za cíl připravit metodu pro high-throughput screening (HTS), která by umožnila identifikovat nové inhibitory MTH1. Rekombinantní enzym byl naklonován, exprimován, purifikován a charakterizován a následně byl použit k vytvoření HTS založeného na nově objevené technologii DIANA.

Klíčová slova: *MTH1, MutT homolog 1, exprese, purifikace, enzymatická aktivita, DIANA*

Obsah

ABSTRACT	3
ABSTRAKT	4
OBSAH	5
POUŽITÉ ZKRATKY	7
1. ÚVOD	9
2. CÍLE PRÁCE	10
3. PŘEHLED PROBLEMATIKY	11
3.1 ENZYM MTH1	11
3.1.1 <i>Funkce a substráty MTH1</i>	11
3.1.2 <i>Inhibitory MTH1</i>	13
3.1.3 <i>Využití inhibice MTH1 v léčbě nádorových onemocnění</i>	15
3.2 KLONOVÁNÍ.....	16
3.2.1 <i>DNA knihovny jako výchozí materiál pro klonování DNA</i>	16
3.3 EXPRESNÍ SYSTÉMY	17
3.3.1 <i>Plasmidy jako expresní vektory</i>	17
3.4 PURIFIKACE EXPRIMOVANÉHO PROTEINU	18
3.5 DIANA	20
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	22
4.1 VÝSLEDKY	22
4.1.1 <i>Příprava DNA kódující MTH1 se štěpnými místy</i>	22
4.1.2 <i>Ligace a transformace plasmidu s insertní DNA</i>	23
4.1.3 <i>Expres a purifikace proteinu MTH1</i>	25
4.1.4 <i>Ověření aktivity MTH1</i>	27
4.1.5 <i>DNA-linked Inhibitor ANTibody Assay</i>	29
4.2 DISKUSE	32
5. EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE	33
5.1 MATERIÁL A PŘÍSTROJE	33
5.1.1 <i>Chemikálie a ostatní materiály</i>	33
5.1.2 <i>Pufry a další roztoky</i>	35
5.1.3 <i>Přístroje</i>	35
5.2 METODY	36
5.2.1 <i>Reversní transkripce izolované RNA</i>	36
5.2.2 <i>Polymerasová řetězová reakce I</i>	37
5.2.3 <i>Horizontální agarosová elektroforesa</i>	37
5.2.4 <i>Izolace DNA</i>	37
5.2.5 <i>Polymerasová řetězová reakce II</i>	38
5.2.6 <i>Štěpení insertní DNA a plasmidu</i>	38
5.2.7 <i>Ligace fragmentů DNA a vektoru</i>	39
5.2.7 <i>Transformace E.coli připraveným plasmidem</i>	40
5.2.8 <i>Minipreparace plasmidu</i>	40
5.2.9 <i>Transformace E.coli připraveným plazmidem II</i>	40
5.2.10 <i>Expres proteinu</i>	40
5.2.11 <i>Purifikace proteinu</i>	41
5.2.12 <i>SDS-PAGE elektroforesa za redukujících a denaturujících podmínek</i>	41

5.2.13 <i>Elektropřenos a imunodetekce</i>	41
5.2.14 <i>Měření aktivity MTH1 pomocí metody s malachitovou zelení</i>	42
5.2.15 <i>DNA-linked Inhibitor ANtibody Assay</i>	42
6. ZÁVĚR	43
7. PODĚKOVÁNÍ	44
8. LITERATURA	45

Použité zkratky

A	adenin
AMK	aminokyseliny
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
bp	pár basí (z angl. base pair)
C	cytosin
cDNA	komplementární DNA produkovaná při reversní transkripci
Da	unifikovaná atomová hmotnostní jednotka
DIANA	DNA-linked Inhibitor ANtibody Assay
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	směs deoxyribonukleotidtrifosfátů
DTT	dithiotreitol
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
G	guanin
GFP	green fluorescent protein
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
His-tag	histidinová kotva
K_i	inhibiční konstanta
K_m	konstanta Michaelise-Mentenové
LB medium	lysogeny broth medium
MCG	malachitová zeleň
MTH1	MutT homolog 1
NUDT1	gen kódující MTH1
Ni-NTA	Nikl-nitilotrioctová kyselina
OD	optická hustota
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforesa
PBS	fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PP_i	pyrofosfát
qPCR	kvantitativní PCR
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)

RT	pokožová teplota (z angl. room temperture)
SDS	dodecylsíran sodný (z angl. sodium dodecyl sulfáte)
T	thymín
TAE	pufr obsahující Tris, kyselinu octovou a EDTA
TEMED	tetramethylethylendiamín
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	polyoxyethylen–20–sorbitan monolaurát

1. Úvod

V posledních letech byl zaznamenán globální nárůst počtu pacientů trpících nádorovým onemocněním. Tento přírůstek můžeme přičíst na vrub zlepšení diagnostických metod a zároveň zvýšení věku dožití naší populace.^{1,2} V České republice je po chorobách oběhové soustavy rakovina druhou nejčastější příčinou úmrtí, přičemž nejběžněji postižené orgány jsou tlusté střevo, plíce, prs a prostata.³ I proto je velmi žádoucí hledat nové efektivní způsoby boje s tímto druhem chorob.

Současná medicína nabízí různé druhy léčby nádorových onemocnění. Klasické postupy jako chirurgický zákrok, radioterapie, hormonální terapie a chemoterapie cytostatiky mají svá úskalí. Ne každá z metod je vhodná pro všechny druhy nádorových onemocnění, navíc s sebou často přinášejí rozsáhlé nežádoucí účinky např. v podobě nevolností, epilace, možné neplodnosti a mnoha dalších. Na přelomu tisíciletí začala být věnována pozornost metodám, které umožňují specifické cílení léčby na nádorovou tkáň. Tyto postupy využívají odchylek v metabolismu rakovinných buněk. Pomocí necytotoxických chemoterapeutik, konjugátů protilátek, nebo nanosystémů je ničena primárně rakovinná tkáň a tím je omezeno poškození ostatních tkání organismu v průběhu léčby.^{4,5}

Jednou z častých odchylek metabolismu nádorových buněk jsou změny v regulaci redoxních dějů způsobující větší oxidační stres. Zvýšený výskyt ROS může mít z následků přímé poškození DNA, nebo dNTPs, které jsou k oxidaci mnohem náchylnější. Začlenění oxidovaných dNTPs do DNA vede k mutacím způsobeným A:T → C:G transversemi. Enzym MTH1 zabraňuje inkorporaci již poškozených dNTPs tím, že z nich odštěpuje pyrofosfát. Přestože v zdravých buňkách není MTH1 esenciální, v rakovinných buňkách bylo prokázáno, že snížení exprese, nebo inhibice MTH1 má za následek akumulaci oxidovaných dNTPs a následný vznik lézí DNA rakovinných buněk. MTH1 se jeví jako zajímavý cíl pro specifickou léčbu nádorových onemocnění vyznačujících se zvýšeným výskytem ROS.^{6,7}

K úspěšnému vývoji léčiv založených na principu inhibice enzymu MTH1 je nutné nalezení nových a strukturně odlišných inhibitorů MTH1, protože současné inhibitory jsou v buňkách funkční až při vysokých koncentracích v řádu μM .^{8,9} Pro hledání inhibitorů pomocí HTS se jako ideální metoda jeví DNA-linked Inhibitor ANtibody Assay (DIANA) dříve vyvinutá v naší laboratoři.¹⁰

2. Cíle práce

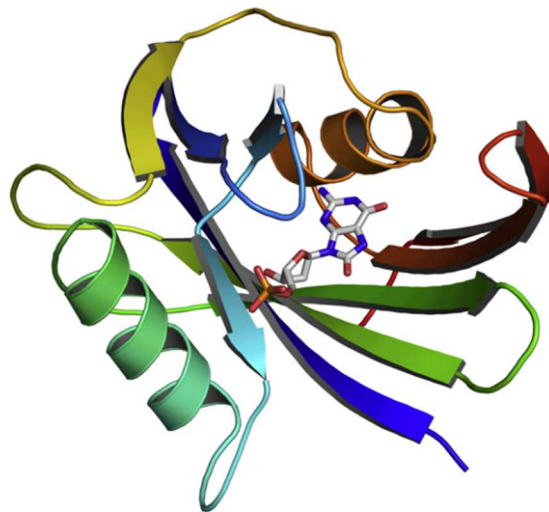
Tato práce si klade za cíl vyvinout HTS pro inhibitory enzymu MTH1. HTS bude založen na bázi metody DIANA. Pro dosažení tohoto cíle bylo nutné splnit následující postupné kroky:

- 1) Získání DNA kódující MTH1 z tkáňové cDNA knihovny
- 2) Ligace příslušné DNA do vhodného vektoru pro rekombinantní expresi
- 3) Produkce rekombinantního proteinu MTH1 z expresního systému a jeho následná purifikace
- 4) Ověření aktivity enzymu a inhibiční účinnosti referenčních látek
- 5) Vytvoření základu metody pro HTS inhibitorů MTH1

3. Přehled problematiky

3.1 Enzym MTH1

MutT homolog 1 (MTH1, E.C. 3.6.1.56) též známý jako, 2-hydroxy-dATP difosfatasa, 7,8-dihydro-8-oxoguanin trifosfatasa, nebo nudix hydrolasa 1 (NUDT1) je kódována genem NUDT1 a řadí se do skupiny hydrolas štěpících esterové vazby.¹¹ Byla publikována vyřešená krystalová struktura isoformy p18, jejíž řetězec čítá 156 aminokyselin a molekulová hmotnost se rovná přibližně 18 kDa (Obrázek 1).^{12,13}

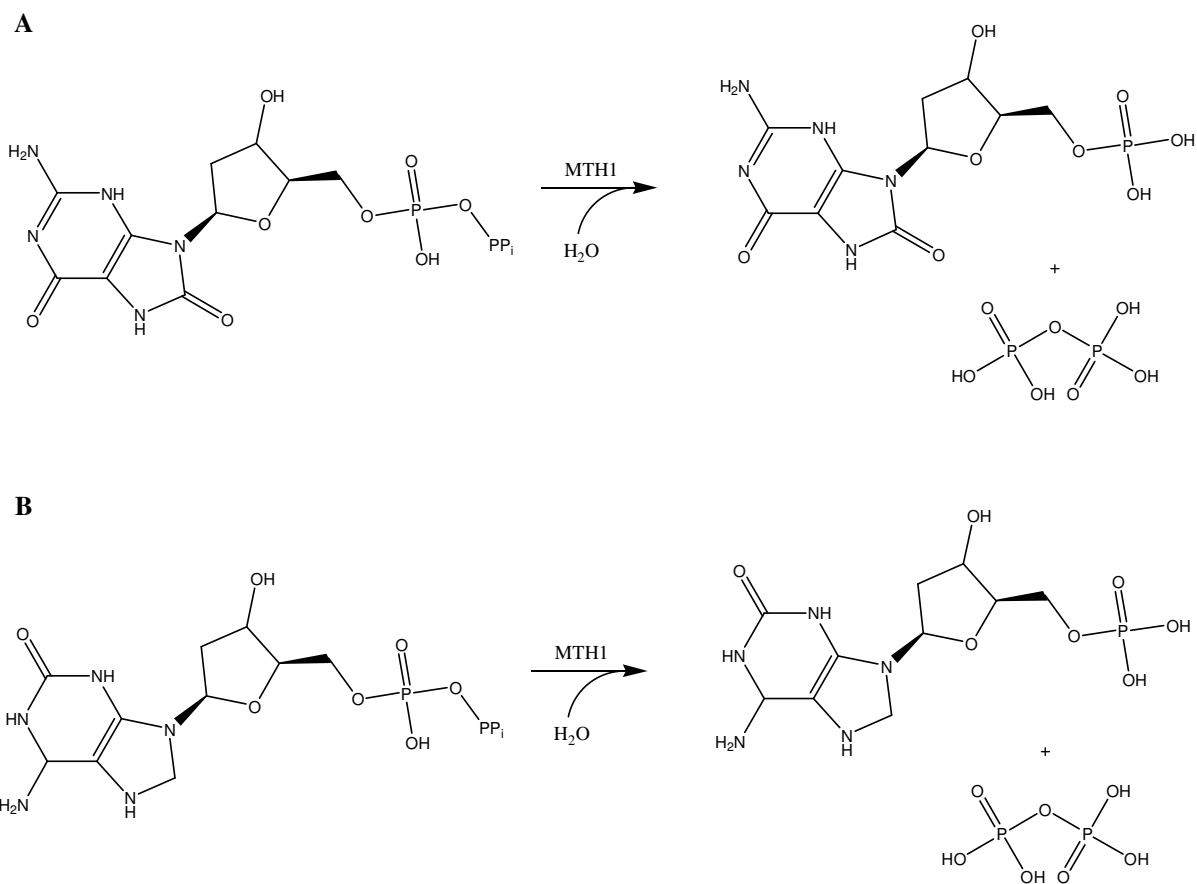


Obrázek 1: Krystalová struktura MTH1. Stužkový diagram vykresluje peptidový řetězec enzymu. N-konec je zvýrazněn modře, C-konec červeně. V aktivním místě je navázán produkt enzymem katalyzované reakce, konkrétně jde o molekulu 8-oxo-dGMP. Převzato z ¹².

3.1.1 Funkce a substráty MTH1

MTH1 je cytoplasmatický enzym. Nejhojněji je exprimován v buňkách se zvýšeným oxidačním stresem, který má za následek nadměrný výskyt reaktivních forem kyslíku. ROS mimo jiné způsobují oxidaci molekul, které se nacházejí v cytoplasmě. Pokud dojde k oxidaci dNTPs a jejich inkorporaci do DNA, následkem mohou být mutace. MTH1 pomáhá omezit množství poškozených dNTPs inkorporovaných do genomu tím, že z těchto molekul odštěpuje pyrofosfát a jejich začlenění do DNA tak není nadále možné. Obecně se tedy dá funkce MTH1 shrnout jako antimutagenní.^{14,15}

Mezi konkrétní substráty MTH1 patří například 8-oxo-dGTP, který je enzymem převáděn na 8-oxo-dGMP, nebo 2-oxo-dATP, který reaguje na 2-oxo-dAMP (Obrázek 2).



Obrázek 2: A: Substrát 8-oxodGTP je za katalýzy MTH1 hydrolyticky štěpen na 8-oxodGMP a pyrofosfát. B: Substrát 2-OH-dATP je za katalýzy MTH1 hydrolyticky štěpen na 2-OH-dAMP a pyrofosfát.

Afinita MTH1 k jednotlivým substrátům je v následujícím pořadí: 2-oxo-dATP > 2-oxo-ATP > 8-oxo-dGTP > 8-oxo-dATP >> dGTP > 8-oxo-GTP > 8-oxo-ATP (Tabulka 1).⁶

Tabulka 1: Kinetické parametry substrátů MTH1 při různých pH podle ¹⁵.

Substrát	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})
<i>pH 8.0</i>		
2-OH-dATP	8,3	13,9
8-OH-dGTP	15,2	12,3
8-OH-dATP	13,9	10,8
dGTP	258	15,7
<i>pH 7.2</i>		
2-OH-dATP	5,7	4,7
8-OH-dGTP	12,8	2,1

3.1.2 Inhibitory MTH1

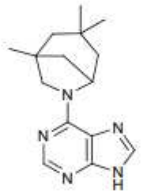
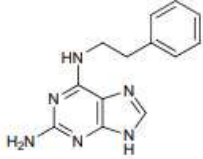
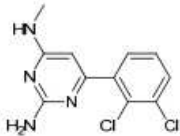
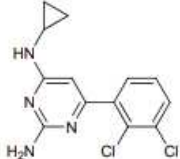
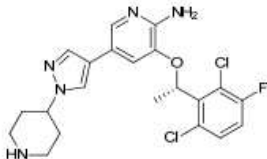
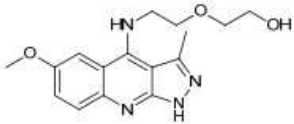
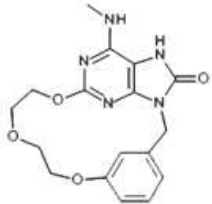
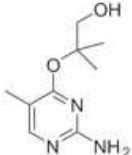
V současné době je popsáno několik různých druhů inhibitorů MTH1, ve všech případech se jedná o polycyklické inhibitory obsahující diazolovou strukturu. Potence inhibitorů *in vitro* reprezentovaná hodnotami IC₅₀ se pohybuje v nanomolárních řádech.

První potentní inhibitory MTH1 představili Helleday et al. v roce 2014, kdy v článku¹¹ uveřejnili vlastní struktury TH287 a TH588 založené na pyrimidinovém základu. Současně v druhé publikaci⁷ ukázali, že (S)-enantiomer klinicky využívaného (R)-Crizotinibu a látka SCH51344 jsou taktéž inhibitory MTH1. Všechny zmíněné látky se strukturami i hodnotami IC₅₀ jsou uvedeny v *Tabulka 2*.

Později byly publikovány struktury inhibitorů s motivem aminopyrimidinu vycházející z původních molekul TH287 a TH588. V *Tabulka 2* je zastupuje sloučenina IACS-4759.⁹ Téměř současně byly uveřejněny struktury inhibitorů s chinolinovými a makrocyclickými prvky. V citované studii měla nejlepší farmakokinetické vlastnosti makrocyclická sloučenina 15

a je proto uvedena v *Tabulka 2*.⁸ Inhibitory MTH1 jsou též látky na bázi purinu NPD7155 a NPD9948, jejichž struktury byly publikovány ve stejném roce.¹⁶ Opět jsou zastoupeny v *Tabulka 2*.

Tabulka 2: Vybrané inhibitory MTH1, jejich struktury a hodnoty IC_{50} při inhibici reakce MTH1 se substrátem 8-oxodGTP. Převzato a upraveno z ^{7,8,9,11,16}.

Sloučenina	Struktura	IC_{50} (μ M)
NPD7155		0.21 ± 0.03
NPD9948		0.29 ± 0.05
TH287		0.0022 ± 0.0003
TH588		0.011 ± 0.003
(S)-crizotinib		0.39 ± 0.10
SCH51344		0.32 ± 0.04
Compound 15		0.0005
IACS-4759		0.0006

3.1.3 Využití inhibice MTH1 v léčbě nádorových onemocnění

Léčba lidských onemocnění je dnes často prováděna cíleně za využití nízkomolekulárních látek inhibující konkrétní enzymy exprimované v postižených buňkách. To se týká i MTH1, jenž se zdá být slibným cílem pro léčbu některých nádorových onemocnění.¹¹

Dřívější publikace několika různými cestami ukázaly, že enzym MTH1 je esenciální k přežití nádorových tkání se zvýšenou hladinou ROS. Knockout genu MTH1 v buněčných liniích i v myších modelech vedl k spontánnímu zvýšení výskytu tumorů.¹⁷ Snížení exprese enzymu MTH1 v různých liniích rakovinných buněk pomocí siRNA mělo cytotoxické účinky, vedlo k poškození DNA a snížení životaschopnosti těchto buněk. Pokud byla v buňkách obnovena exprese MTH1, cytotoxický efekt byl zvrácen a jejich životaschopnost se opět zvýšila.¹¹

Na základě těchto zjištění byly navrženy inhibitory MTH1, které měly *in vivo* docílit stejných efektů, jaké vyvolalo omezení exprese enzymu, tedy snížení životaschopnosti rakovinných buněk.^{7,11} Tyto inhibitory byly vyvíjeny s důrazem na farmaceutické využití a jeden z nich, Karonudib, byl v roce 2017 skutečně uveden do první fáze klinického testování (identifikátor NCT03036228).¹⁸

Představení MTH1 jako velmi nadějného cíle pro léčbu nádorových onemocnění přitáhlo pozornost mnoha vědeckých skupin. Již v roce 2016 vyšly tři na sobě nezávislé studie, které předložily nové potentní inhibitory MTH1 a zároveň se shodly na tom, že mechanismus cytotoxicity inhibitorů MTH1 je jiný, než se původně předpokládalo.^{8,9,16}

V průběhu testování nových, strukturně odlišných inhibitorů *in vivo* se ukázalo, že jejich cytotoxické účinky jsou slabé, i přestože bylo použitím metod „target engagement“ jednoznačně prokázáno, že inhibují MTH1. Ač mají nové inhibitory dobrou potenci *in vitro*, v buňkách se, na rozdíl od původních submikromolárních inhibitorů, cytotoxicky projevují až při koncentracích v mikromolárním řádu.^{8,9,16} Jedna z publikací uvádí, že knockout genu pro MTH1 pomocí siRNA a CRISPR sice má za následek akumulaci oxidovaných dNTPs a mutace DNA, nevede ale k zvýšení letality takto postižených buněk.⁸

Nízká účinnost inhibitorů má dvě pravděpodobná vysvětlení. Jedno z nich předpokládá, že inhibitory působí cytotoxicky pouze ve chvíli, kdy kromě MTH1 zároveň inhibují i jiný, dosud neidentifikovaný enzym. Druhou možností je, že cytotoxicita původních inhibitorů vůbec nesouvisí s inhibicí MTH1, ale je způsobena interakcí s jinou buněčnou strukturou. Jako pravděpodobnější se jeví druhá varianta. Při proteomických studiích vyplynulo, že inhibitory TH287 a TH588 kromě MTH1 v buňkách inhibují i polymeraci tubulinu, což je zřejmě hlavní

příčinou jejich cytotoxicity.¹⁶ Nalezení nových inhibitorů MTH1 patřících k jinému strukturnímu typu by tedy mohlo pomoci mechanismus účinku inhibice MTH1 vysvětlit.

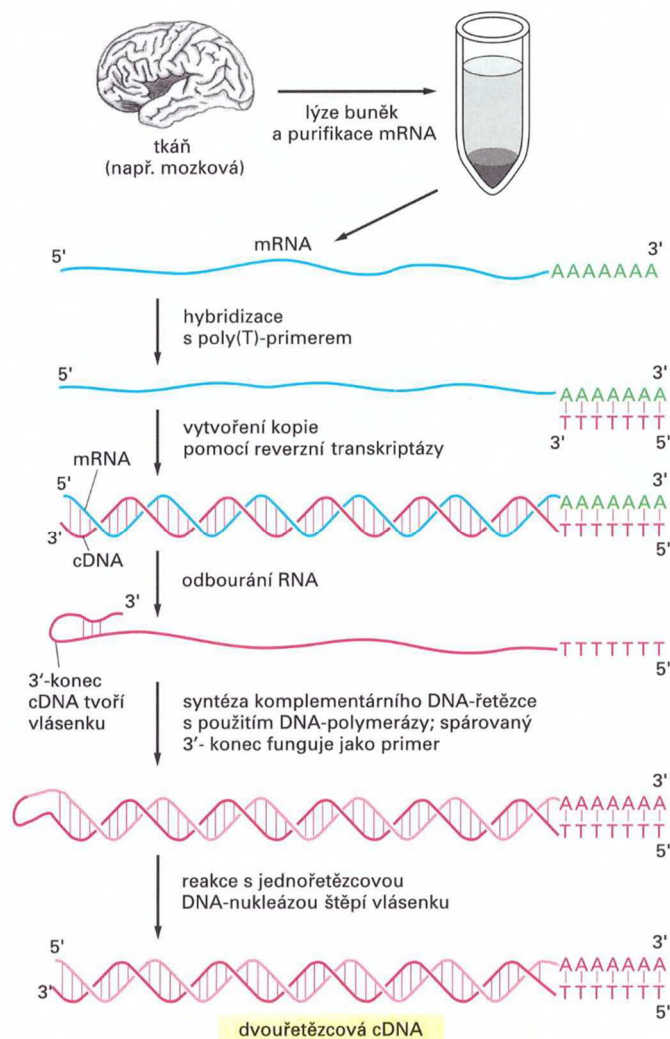
3.2 Klonování

Klonováním je označováno několik různých fenoménů. V běžné řeči se klonováním obvykle myslí umělé vytváření celých organismů, klonů, které se svou předlohou mají totožnou genetickou informaci. Za klonování můžeme považovat též asexuální rozmnožování bakterií, které probíhá binárním dělením, rostlin, u kterých jde například o množení výtrusy, oddenky nebo řízky, případně dalších organismů. V biochemii tímto pojmem rozumíme zejména molekulární klonování, tedy přípravu molekul DNA, kódujících konkrétní gen nebo skupinu genů.

3.2.1 DNA knihovny jako výchozí materiál pro klonování DNA

Jako zdroj předlohy klonované DNA může posloužit genomová knihovna. Genomová knihovna obsahuje náhodný vzorek všech sekvencí DNA z genomu organismu. Teoreticky lze ze všech somatických buněk jednoho organismu získat stejnou DNA knihovnu, v praxi existují výjimky jako červené krvinky, které v dospělosti zcela postrádají buněčné jádro. Nevýhodou DNA knihovny při snaze o klonování konkrétního genu je její velikost komplikující prohledávání a také fakt, že genomová DNA obsahuje introny, regulační oblasti a další úseky, které nemusí být žádoucí. Genomové knihovny jsou proto častěji využívány pro sekvenaci genomu než pro klonování.

Další možností je RNA knihovna, jež obsahuje celkovou mRNA přítomnou v konkrétní tkáni. Na rozdíl od DNA se obsah mRNA různí podle druhu zvolené tkáně, protože genová exprese není ve všech buňkách stejná a závisí na jejich funkci. Pokud je pro klonování zvolena RNA knihovna, musí následovat její přepis do DNA. To umožňuje enzym reversní transkriptáza, který je schopný synthetizovat DNA komplementární k vlákně mRNA. Výsledkem reversní transkripce RNA knihovny je cDNA knihovna. Průběh cDNA synthetizace je schematicky znázorněn na *obrázku 3*. Amplifikaci konkrétního fragmentu DNA poté umožňuje např. metoda PCR.



Obrázek 3: Postup tvorby cDNA knihovny. Převzato a upraveno z ¹⁹.

3.3 Expresní systémy

Expresní systémy slouží jako nástroj pro získávání rekombinantních proteinů. Jedná se o speciální buněčné kultury, které rychle rostou a jsou schopny exprimovat velká množství proteinu. Expresní systémy se dělí podle toho, jaké buňky využívají. Bakteriální expresní systémy jsou velmi rychle rostoucí, snadno udržovatelné a relativně levné, nezvládají však všechny posttranslační modifikace enzymů eukaryotních organismů. Mezi dostupnými jsou hmyzí buňky, které zvládají většinu posttranslačních modifikací a sekreci proteinu do média, ale kultivace probíhá déle a jsou nákladnější. Nejdokonalejším expresním systémem jsou savčí buňky, které se ale pomalu množí a jsou velmi nákladné a náročné na údržbu.

3.3.1 Plasmidy jako expresní vektory

Plasmid je kruhová dvouvláknová molekula DNA běžně se vyskytující u bakterií. Bakterie si v plasmidech nesou geny, které umožňují zvládnout život při nestandardních

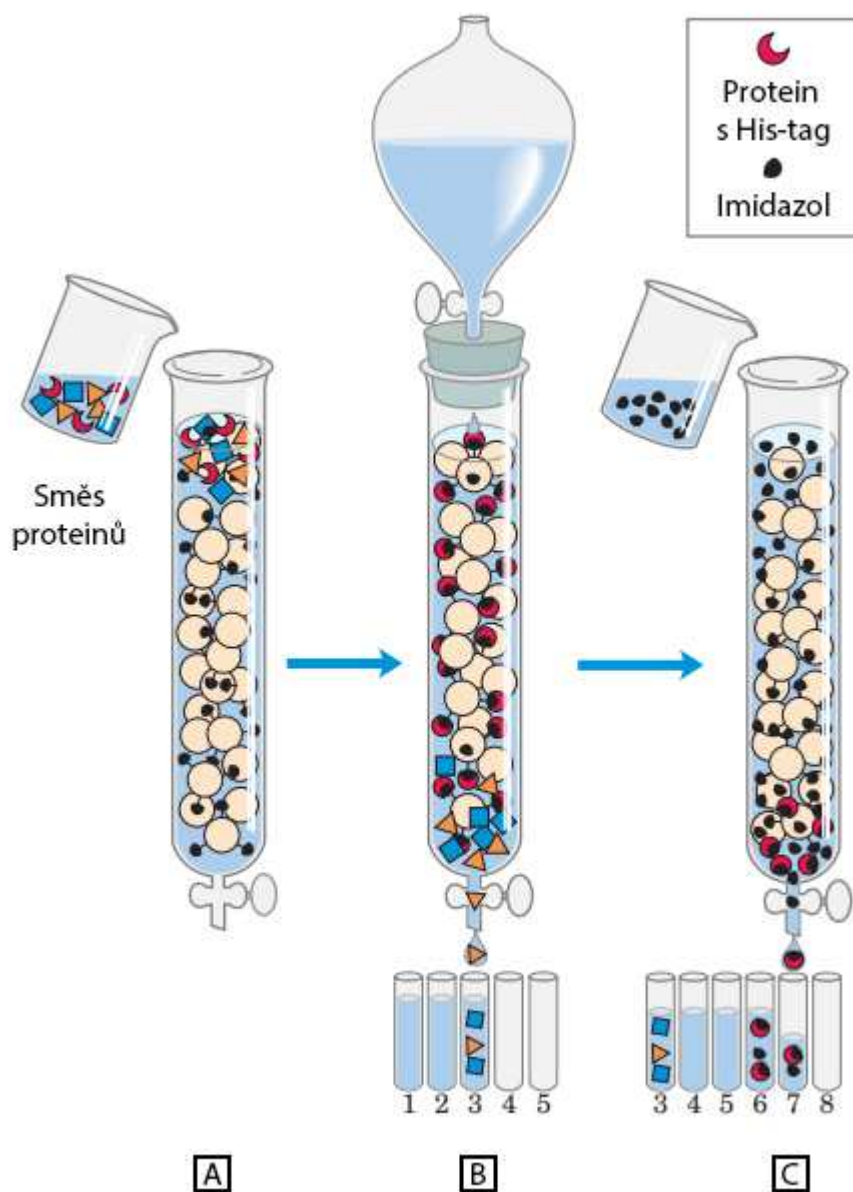
podmínkách v prostředí. Důležitá vlastnost plasmidů je nezávislost jejich replikace na replikaci chromosomální DNA.

V genovém inženýrství plasmidy slouží jako nosiče fragmentů DNA do hostitelských buněk. DNA kódující gen, který zamýšlíme exprimovat, je rozštěpena restričními endonukleasami a následně ligována do plasmidu, čímž vzniká rekombinantní DNA. Po ligaci následuje transformace (u prokaryot) či transfekce (u eukaryot) do buněk příjemce. Buňka, která přijala plasmid má odlišné vlastnosti od buňky původní. Může jít například o resistenci k antibiotiku, zajištěnou genem obsaženým v plasmidu. Po selekci kolonií buněk nesoucích plasmid následuje jejich kultivace. Při dostatečně velké populaci je přidáním induktoru zahájena vlastní exprese námi vneseného genu.

Obecně tedy lze říci, že plasmid sloužící jako expresní vektor musí obsahovat několik důležitých struktur. Jsou jimi klonovací místo (úsek se sekvencemi štěpenými restričními enzymy), replikační počátek (umožňuje replikaci plasmidu), selekční marker (gen který umožní odlišení buněk s plasmidem, např. gen pro ampicilinovou resistenci) a indukovatelný promotor (umožňuje expresi námi vloženého genu).

3.4 Purifikace exprimovaného proteinu

Jeden z možných způsobů purifikace proteinu je afinitní chromatografie. Princip spočívá v nanesení směsi proteinů na kolonu, která obsahuje polymer s imobilizovanou specifickou strukturou vázající protein našeho zájmu. Následuje promytí kolony rozpouštědlem a eluce purifikovaného proteinu roztokem látky, který má se specifickou strukturou silnější interakci (Obrázek 4).

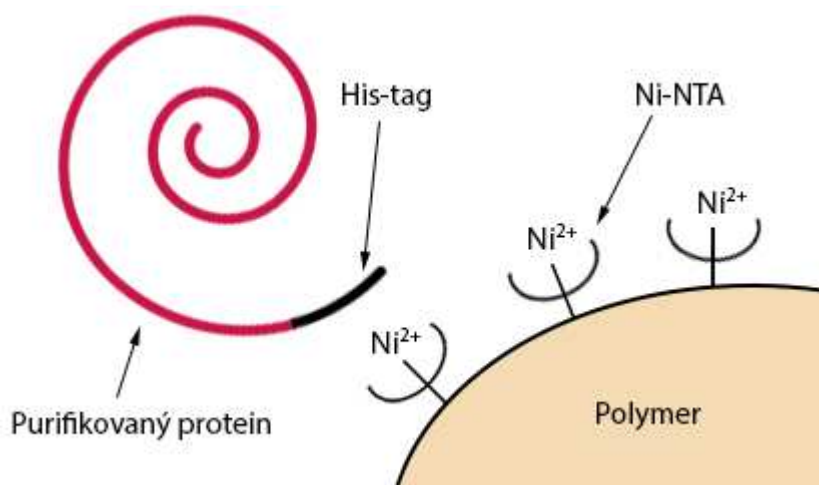


Obrázek 4: Afinitní chromatografie. Krok A – nanesení směsi proteinů na kolonu, purifikovaný protein je zde značen His-tagem; krok B – promývání kolony rozpouštědlem; krok C – eluce proteinu roztokem látky se silnější afinitou, zde imidazol. Převzato a upraveno z ²⁰.

Aby protein zájmu mohl být odlišen od ostatních proteinů, používá se tzv. kotva, což jsou speciální sekvence AMK zajišťující afinitu ke konkrétní chemické struktuře (iont, protilátka, jiný protein). Sekvence kódující kotvu je přítomna již v DNA expresního vektoru a po transkripci a translaci se stává součástí peptidového řetězce.

Na obrázku 5 figuruje hojně užívaná polyhistidinová kotva komerčně nazývaná His-tag, která byla použita i v naší práci. Kotva je obvykle složena ze šesti histidinů sousedících

v polypeptidovém řetězci. Tato sekvence AMK má afinitu k nikelnatým iontům, které jsou při afinitní chromatografii imobilizovány chelátorem NTA navázaným na polymerní povrch.

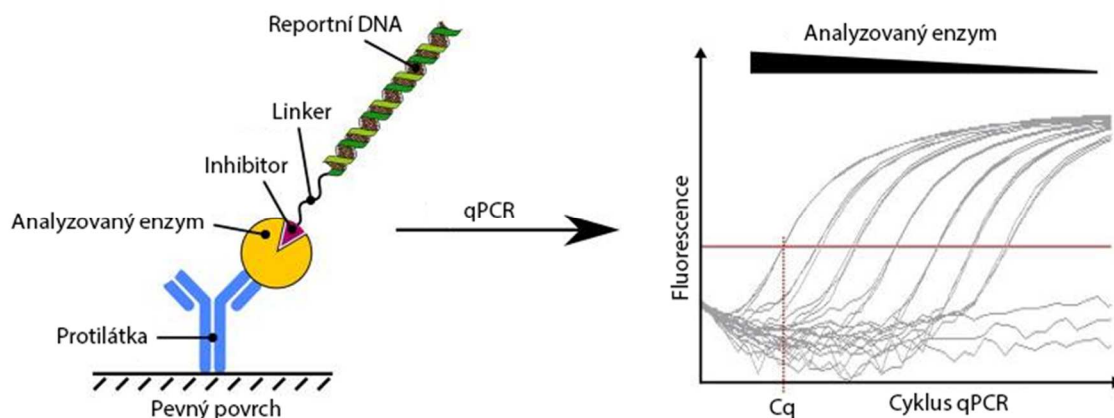


Obrázek 5: Znárodnění vazby proteinu značeného histidinovou kotvou na imobilizovanou Ni-NTA.

3.5 DIANA

V současné medicíně je na enzymy běžně cílena terapie, vývoj jejich inhibitorů je proto prvním krokem při vývoji léčiv. Návrh inhibitoru může být buď tzv. racionální, tj. na základě analogie se substrátem daného enzymu, nebo může vzejít ze screeningu knihoven nízkomolekulárních látek. Pro účinný screening je využíváno různých metod, mezi které může patřit enzymová kinetika¹¹ nebo metody využívající „active site displacement“, vazbu testované látky do aktivního místa kompetujícího s fluorescenční sondou. Nevýhodou těchto metod je častý výskyt falešně negativních a falešně pozitivních výsledků.

V naší laboratoři byla vyvinuta nová metoda pro screening inhibitorů, DNA-linked Inhibitor ANtibody Assay (DIANA). Její princip spočívá v zachycení enzymu na imobilizovanou protilátku a přidání próby, která obsahuje nízkomolekulární látku vázající se do aktivního místa enzymu kovalentně spojenou s oligonukleotidem DNA, který umožňuje následnou kvantifikaci pomocí qPCR (Obrázek 6). Zatímco dvojitě rozpoznání enzymu protilátkou a zároveň detekční proubou umožňuje vysokou selektivitu, kvantifikace metodou qPCR zajišťuje sensitivitu a široký rozsah metody.¹⁰



Obrázek 6: Próba sestávající z oligonukleotidu reportní DNA a nízkomolekulárního inhibitoru daného proteinu připojeného linkerem se váže do aktivního místa enzymu, který je zachycen protilátkou na pevném povrchu. Množství detekční próby navázané na analyzovaný enzym je zjištěno pomocí qPCR. Výstupním údajem je počet cyklů qPCR, který je nepřímo úměrný logaritmu koncentrace próby. Převzato z¹⁰.

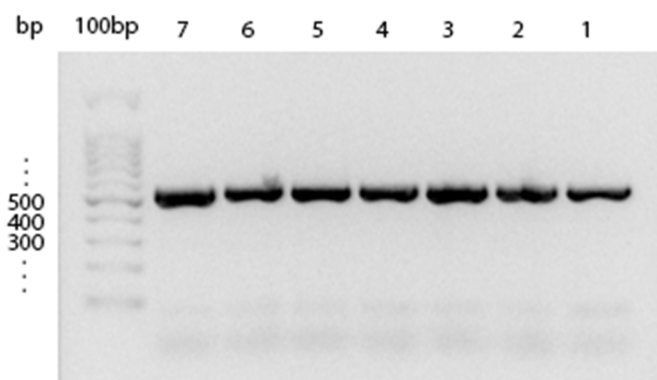
Přidáním nízkomolekulárních látek k roztoku próby může být zjištěna jejich inhibiční schopnost. V případě, že se testovaná molekula do aktivního místa enzymu váže silněji než molekula kovalentně připojená k próbě, na enzym se naváže poměrně menší množství próby, což se projeví při detekci qPCR.¹⁰

4. Výsledky a diskuse

4.1 Výsledky

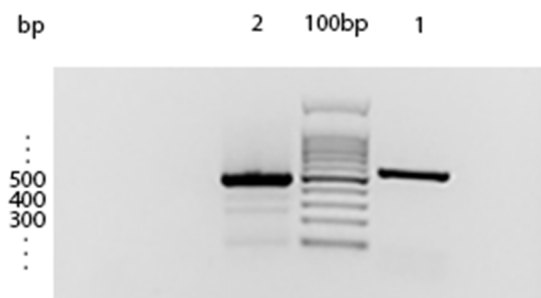
4.1.1 Příprava DNA kódující MTH1 se štěpnými místy

K vývoji HTS metody pro hledání inhibitorů MTH1 bylo v první řadě nutné připravit aktivní enzym, na kterém by bylo možné potenciální inhibitory testovat. Pro vytvoření DNA kódující MTH1 byla provedena reversní transkripce. Jako zdroj templátové RNA posloužilo sedm vzorků RNA získaných z maligních tkání a přeepsaných do cDNA. Přímo na tuto reakci navazovala PCR, jež umožnila amplifikaci DNA fragmentů kódujících MTH1. Výsledek následné agarosové elektroforesy je patrný na obrázku. Podle tloušťky proužků a jejich velikosti odpovídající očekávané délce 500 bp je možno soudit, že jak reversní transkripce, tak PCR proběhly úspěšně. Proužky odpovídající 500 bp v byly z gelu vyříznuty a přečištěny (Obrázek 7).



Obrázek 7: Agarosová elektroforesa po PCR. Do jamek 1-7 byly naneseny reakční směsi PCR, do osmé jamky GelPilot 100 bp marker. Experimentální detaily viz 5.2.3.

DNA byla dále podrobena druhé PCR reakci s rozdílnými primery nesoucími sekvenci rozeznávanou endonukleasami NotI a NdeI. Na konce řetězců DNA tak byly zakomponovány sekvence odpovídající restričním místům endonukleas NotI a NdeI (Obrázek 8).

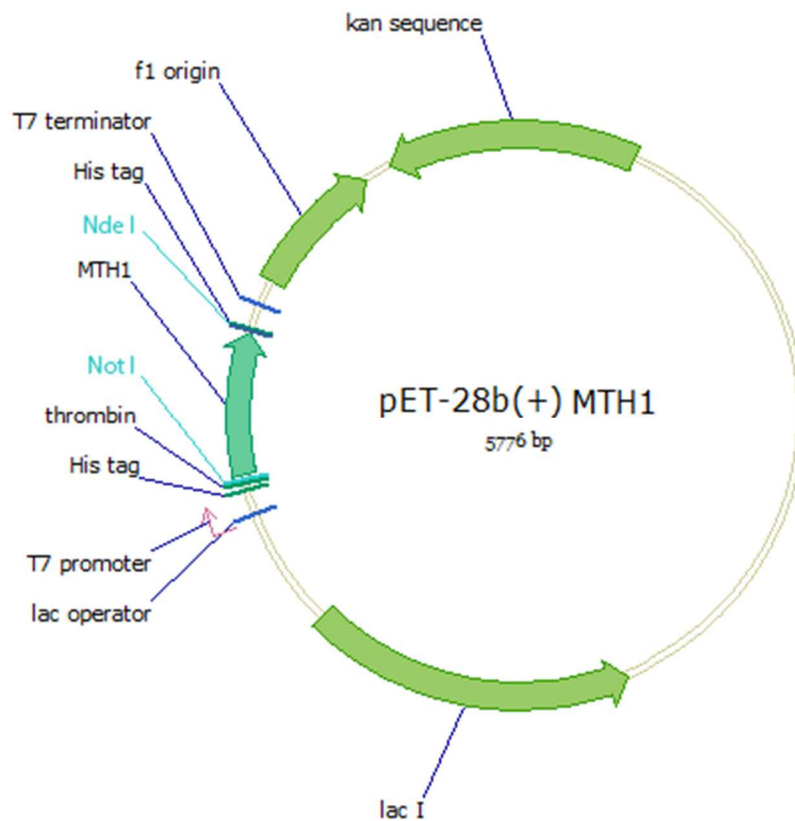


Obrázek 8: Agarosová elektroforesa po PCR II. Do dráhy 1 byl pro srovnání nanesen produkt reakce PCR I po přečištění, doprostřed GelPilot 100 bp marker a v dráze 2 je reakční směs PCR II. Experimentální detaily viz 5.2.5.

4.1.2 Ligace a transformace plasmidu s insertní DNA

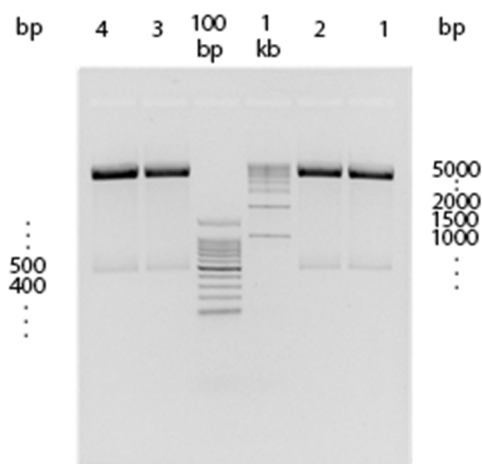
Insertní DNA i plasmid pET-28b byly rozštěpeny restrikními endonukleasami NotI a NdeI. Fragменты vzniklé štěpením byly rozděleny agarosovou elektroforézou a fragменты s délkou přibližně 500 bp (insert) a 5000 bp (plasmid) z gelu vyizolovány

Následovala ligace těchto dvou fragментů, která byla provedena se dvěma různými poměry plasmidu a insertní DNA. V obou případech byla ligace úspěšná, což se prokázalo později, ve fázi transformace. Schéma plasmidu se zaligovaným insertem je na *obrázku 9*. Kromě samotné ligace byla též provedena negativní kontrola, ve které chyběla insertní DNA. Na plotně s negativní kontrolou nebyly po inkubaci přítomny žádné kolonie.



Obrázek 9: Grafické znázornění plasmidu pET-28b se zaligovanou DNA nesoucí gen pro MTH1. Na obrázku jsou světle zeleně zvýrazněny části plasmidu: „f1 origin“ je replikační počátek, „kan sequence“ gen pro kanamycinovou resistenci, „lac I“ je lac represor. Modře jsou zvýrazněny úseky důležité pro replikaci insertního genu: lac operon, T7 promotor a T7 terminátor. Tmavě zeleně je zvýrazněn insertní úsek MTH1. Světle modře jsou zvýrazněna použitá restrikční místa.

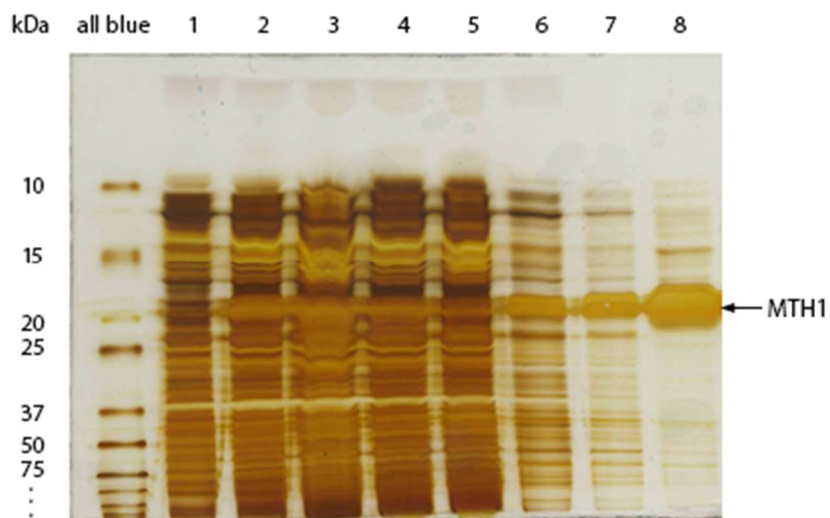
Na ligaci přímo navázala transformace plasmidů do TOP10 kompetentních buněk *E.coli*. Po teplotním šoku byla suspenze buněk rozetřena na agarové plotny s kanamycinem. Transformovaný plasmid zaručil resistenci vůči kanamycinu, proto na plotnách vznikly pouze kolonie buněk, jež tento plasmid obsahovaly. Vybrané kolonie poté byly kultivovány v živném médiu. Po dostatečném namnožení buněk byly plasmidy izolovány. Malá část plasmidu byla pro kontrolu rozštěpena restrikčními endonukleasami NotI a NdeI. Očekávané délky fragmentů, které by po štěpení měly být přítomny, byly 500bp pro insert a 5000 bp pro plasmid. Jak je vidět na *obrázku 10*, toto očekávání bylo správné a lze tedy konstatovat, že ligace byla úspěšná. Vytvořený plasmid byl následně osekvenován firmou GATC Biotech. Tato získaná sekvence byla porovnána s originální sekvencí isoformy p18 MTH1. Sekvence se shodovaly.



Obrázek 10: Agarosová elektroforesa rozštěpených plasmidů. Do drah s popiskem 1-4 byly naneseny rozštěpené plasmidy izolované z kultivací čtyř kolonií kompetentních buněk. Mezi ně byly umístěny markery GelPilot 100 bp marker a 1kb marker. Z plasmidu (cca 5 kb) byl zpětně vyštěpen insert (cca 500 bp), který je na gelu viditelný. Experimentální detaily viz 5.2.6.

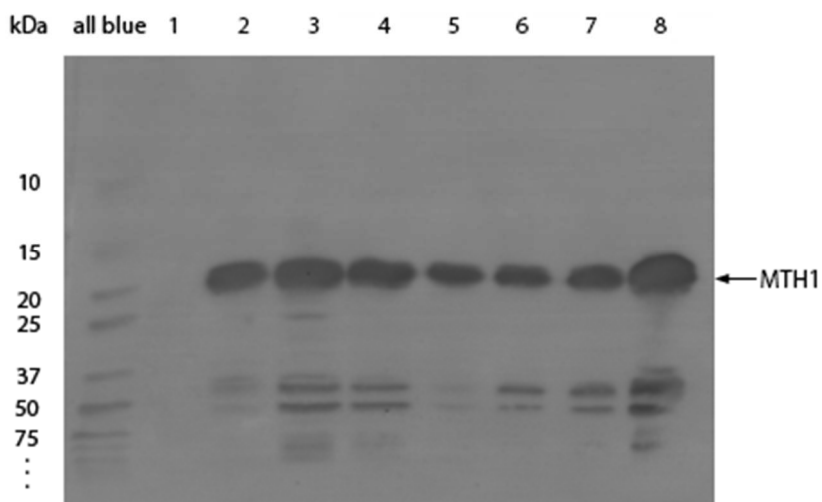
4.1.3 Expresse a purifikace proteinu MTH1

Kompetentní buňky *E.coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL byly transformovány připraveným plasmidem a inkubovány na agarových plotnách s kanamycinem. Nárůsty z ploten byly množeny v živném médiu, dokud nedosáhly vhodné optické density. Poté byla indukována exprese proteinu přidavkem IPTG, jenž aktivuje transkripci lac operonu přítomného v plasmidu. Purifikace proběhla pomocí histidinové kotvy, která byla součástí plasmidové DNA a při expresi byla začleněna do sekvence proteinu. Po purifikaci byly průběžně sbírané vzorky podrobeny analýze akrylamidovou SDS-PAGE elektroforesou. Na *obrázku 11* je možno vidět, jak se postupně měnilo složení roztoku purifikovaného proteinu v průběhu jednotlivých kroků.



Obrázek 11: SDS-PAGE akrylamidová elektroforesa vyvolaná stříbrem. Dráha označená all blue obsahuje All blue standard marker. V dráze 1 se nachází vzorek média před zahájením indukce, 2 - vzorek po indukci, 3 - vzorek po homogenizaci suspenze, 4 - vzorek supernatantu po centrifugaci homogenizátu, 5 - vzorek flow-through z afinitní chromatografie, 6 - vzorek z prvního promytí kolony, 7 - vzorek z druhého promytí a 8 - vzorek proteinu těsně po eluci z afinitní chromatografie. MTH1 odpovídají proužky v oblasti 20 kDa. Experimentální detaily viz 5.2.12.

Kromě výše popsaného barvení stříbrem byl purifikovaný enzym detegován také imunochemicky. Po elektroforese na akrylamidovém gelu byly přítomné proteiny přeneseny na nitrocelulosovou membránu a byla použita protilátka proti histidinové kotvě obsažené v detegovaném proteinu (Obrázek 12).



Obrázek 12: Imunodetekce proteinů na nitrocelulosové membráně. Dráha označená all blue obsahuje All blue standard marker. V dráze označené 1 se nachází vzorek média před zahájením indukce, v dráze 2 vzorek po indukci, v dráze 3 vzorek po homogenizaci suspenze, v dráze 4 vzorek supernatantu po centrifugaci homogenizátu, v dráze 5 vzorek flow-through z afinitní chromatografie, v dráze 6 vzorek z prvního promytí kolony, v dráze 7 vzorek z druhého promytí, v dráze 8 vzorek proteinu těsně po eluci z afinitní chromatografie. MTH1 odpovídají proužky v oblasti 20 kDa. Experimentální detaily viz 5.2.13.

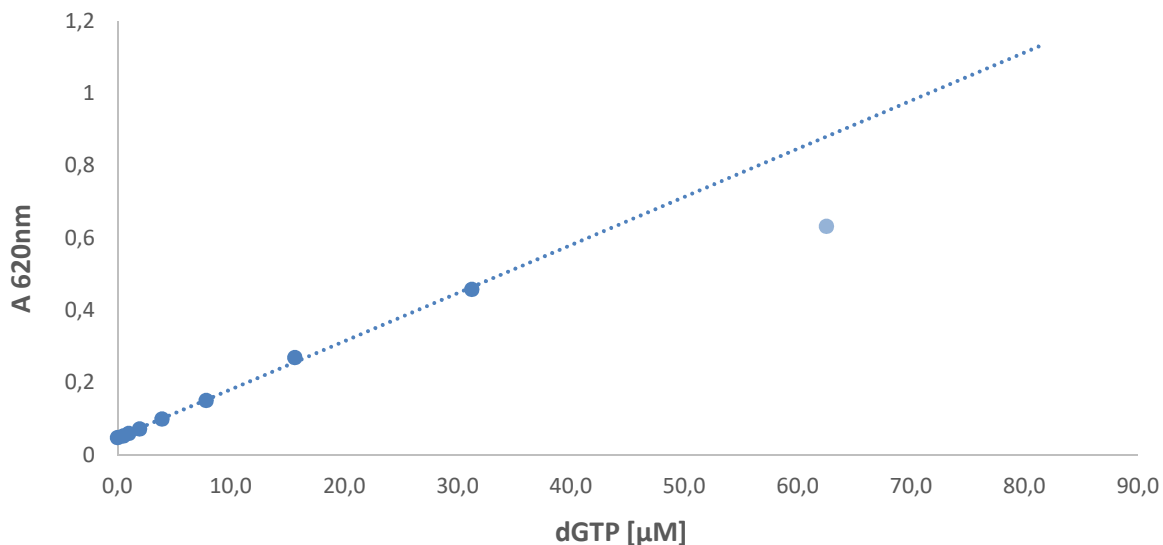
Výsledky obou použitých metod shodně ukazují, že protein MTH1 byl úspěšně exprimován a purifikován, což dokazují proužky o velikosti přibližně 20kDa patrné na *obrázku 11* a *Obrázek 12*. Koncentrace roztoku MTH1 po purifikaci určená spektrofotometricky byla 130 μ M.

4.1.4 Ověření aktivity MTH1

Dříve, než bylo možno začít vyvíjet HTS, bylo nezbytné vyvinout metodu, která by umožnila ověření aktivity a určení kinetických parametrů připraveného enzymu MTH1 za přítomnosti běžného substrátu i inhibitorů. K tomu dobře posloužila metoda využívající pyrofosfatasy a malachitové zeleně. Enzym pyrofosfatasa štěpí jeden z produktů reakcí katalyzovaných MTH1, pyrofosfát. Fosfát vzniklý touto reakcí následně může být detekován pomocí malachitové zeleně, která s molekulou fosfátu tvoří barevný komplex. Tento barevný komplex může být detekován spektrofotometricky a umožňuje nám zpětně určit množství pyrofosfátu, produktu enzymové reakce MTH1.

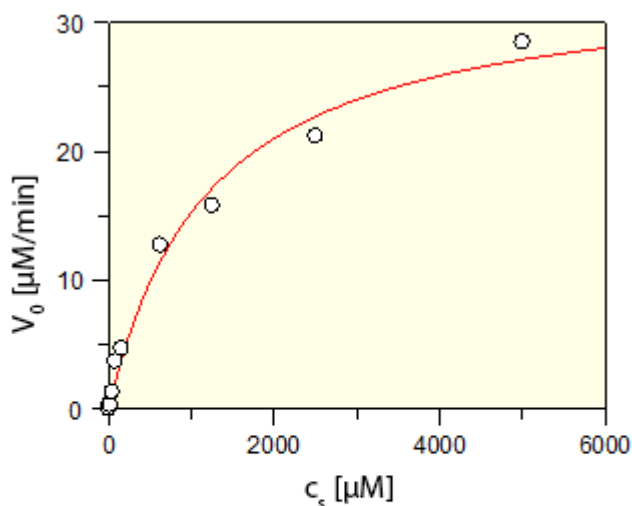
Metoda byla ověřena v několika krocích. Nejdříve byl malachitovou zelení detekován pouze fosfát v rozsahu 0,5 μ M – 500 μ M fosfátu v dvojkové ředící řadě pro určení lineárního rozsahu metody. Lineární rozsah byl přinejmenším od 4 do 30 μ M. Dalším krokem byla detekce fosfátu po rozštěpení pyrofosfátu enzymem pyrofosfatasou, měřený rozsah byl 0,5 μ M – 500 μ M pyrofosfátu v dvojkové ředící řadě. Lineární rozsah byl od 2 do 15 μ M. Posledním krokem byla detekce fosfátu vzniklého štěpením pyrofosfatasou z pyrofosfátu odštěpeného MTH1 ze substrátu dGTP. Opět bylo provedeno měření v rozsahu 0,5 μ M – 500 μ M dGTP v dvojkové ředící řadě přičemž výsledný lineární rozsah byl od 2 do 15 μ M. Vzhledem k tomu, že kalibrační řady naměřené s pyrofosfátem i s dGTP se shodují, je zřejmé, že enzym MTH1 kompletně rozštěpil dGTP a tím byla potvrzena jeho aktivita.

Vzhledem k tomu, že metoda má být dále využita pro screening inhibitorů rozpouštěných v DMSO, byl ověřen vliv DMSO na tuto metodu. Bylo zjištěno, že při přítomnosti 5% DMSO v roztoku reakce je lineární rozsah detekce pyrofosfátu i dGTP dokonce větší a to v rozmezí 2-30 μ M (Graf 1).



Graf 1: Závislost absorbance roztoku reakční směsi s malachitovou zelení na počáteční koncentraci substrátu dGTP v přítomnosti 5% DMSO. Tmavě modré body vynesené v grafu spadají do lineární oblasti měření a bylo proto možné provést lineární regresi. První z bodů, které jsou mimo lineární rozsah měření je světle modrý. Tento experiment je potvrzením aktivity připraveného enzymu MTH1.

Následně byla změřena Michaelisova konstanta K_m . Při měření byla použita 1nM koncentrace enzymu a byly štěpeny různé koncentrace substrátu dGTP v rozsahu 5 – 5000 μM . Výsledná hodnota K_m byla vypočtena pomocí programu GraFit 5.0 (Obrázek 13). Námi naměřené hodnoty K_m a k_{cat} se liší od publikované hodnoty (viz tabulka 1). Tato odlišnost může být způsobena rozdílem v použitém reakčním pufu,

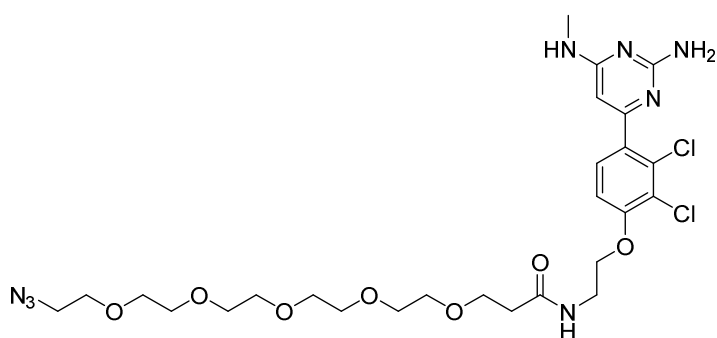


Parametr	Hodnota	σ
V_{max}	33,6560	2,0802
K_m	1203,2812	201,4553
K_{cat}	9,35	0,58

Obrázek 13: Grafické zpracování hodnot získaných měřením enzymové kinetiky MTH1 v programu GraFit 5.0 a výsledné kinetické parametry enzymu MTH1 včetně standardní odchylky σ .

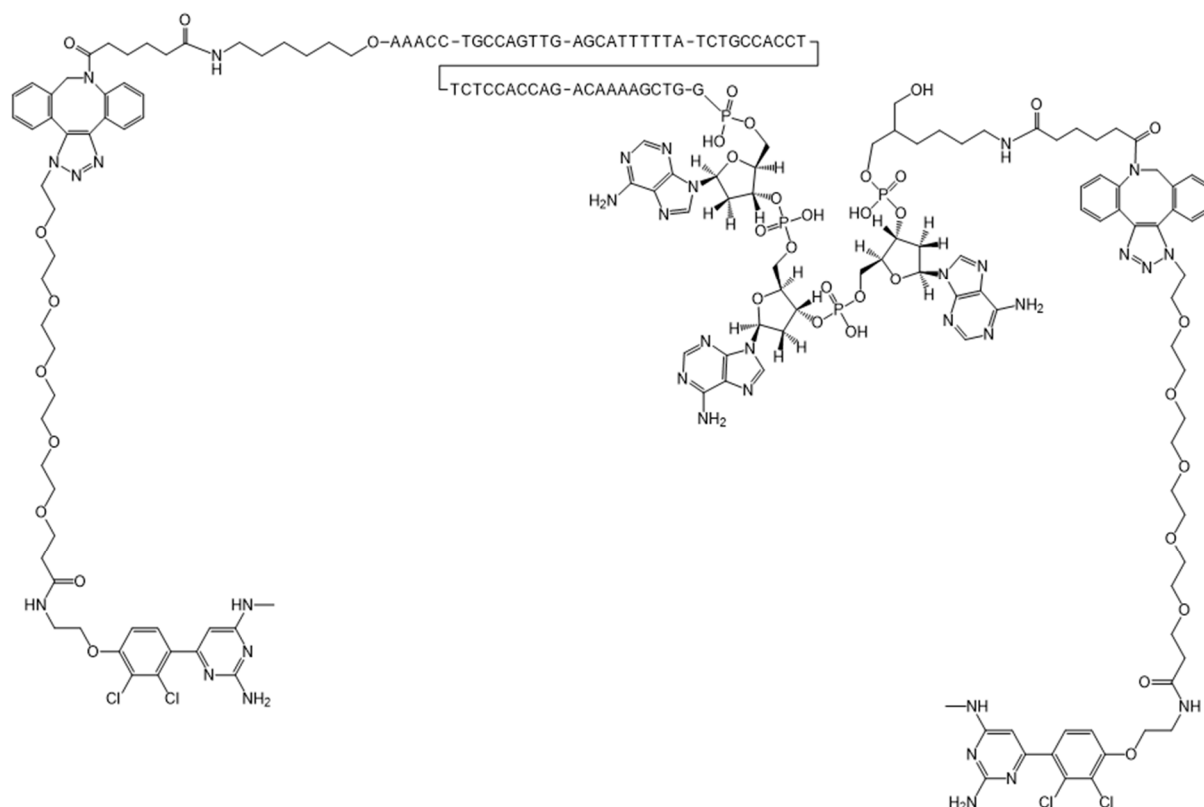
4.1.5 DNA-linked Inhibitor Antibody Assay

K provedení metody DIANA bylo nutné připravit inhibitor MTH1 s linkerem, který by umožnil pozdější připojení oligonukleotidu DNA a tím vytvoření próby. Jako inhibitor byl použit TH278 k němuž byl jako linker navázán PEG5 (Obrázek 14). Tuto molekulu nazvanou MD530 pro nás laskavě připravil Milan Dejmek ze skupiny Radima Nencky. Inhibiční schopnost této molekuly byla ověřena enzymovou esejí s malachitovou zelení, kdy byla vytvořena ředící řada inhibitoru. Již při 1nM koncentraci MD530 byla inhibice 40%, téměř 100% inhibice bylo dosaženo při 100nM koncentraci MD530, čímž bylo ověřeno, že připojením linkeru inhibitor neztratil aktivitu.



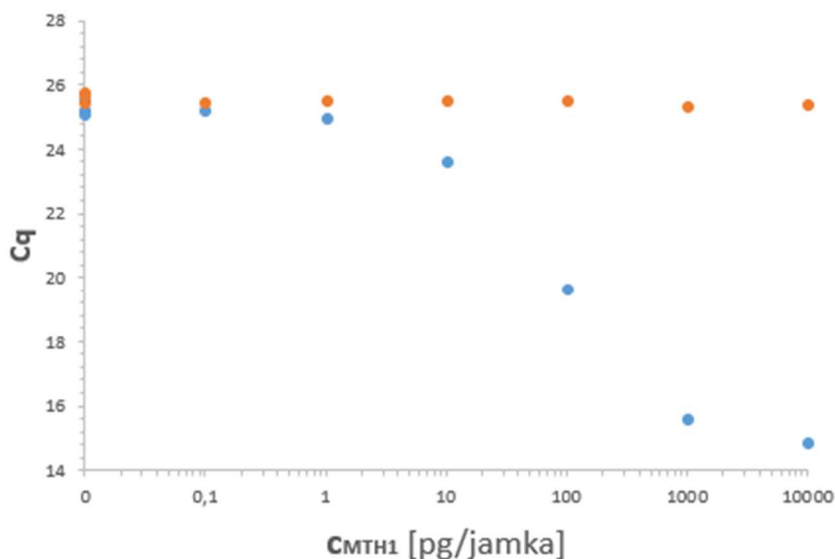
Obrázek 14: Struktura molekuly MD530, jedná se o inhibitor TH278 s připojeným linkerem.

Z této molekuly následně byla Jitkou Zemanovou v naší laboratoři metodou copper-free click připravena výsledná sonda používaná při měřeních metodou DIANA (Obrázek 15). Kromě zmíněné sondy byl v metodě použit neutravidin jako protilátka a biotinylovaný polymer s Ni-NTA vázající se na neutravidin a zároveň schopný imobilizovat enzym s histidinovou kotvou.



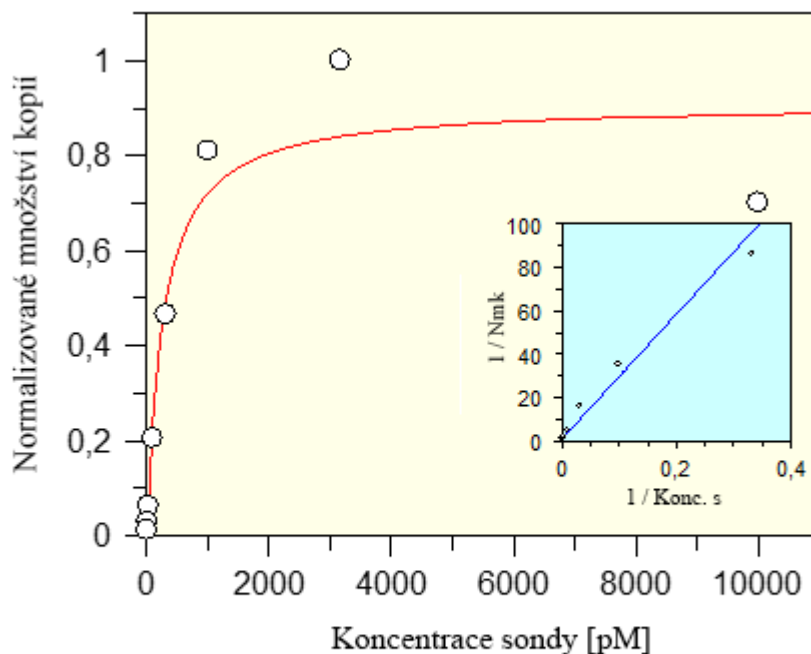
Obrázek 15: Struktura sondy používané v měřeních DIANA. Sonda je bivalentní, obsahuje dvě molekuly inhibitoru TH278, které jsou přes linkery napojeny na oligonukleotid reportní DNA.

Byly provedeny experimenty, v nichž byla metodou DIANA proměřena ředící řada enzymu MTH1, která byla lineární v rozmezí 10 pg – 1 ng přidaného enzymu MTH1. Pokud byl v jamkách zároveň se sondou přítomen navíc kompetující 1 μ M inhibitor MD530, nenavázala se na enzym téměř žádná sonda, jak je vidět v *grafu 2*. Takto bylo ověřeno, že metodu DIANA lze v této podobě použít ke screeningu inhibitorů MTH1.



Graf 2: Závislost fluorescence při qPCR vyjádřené počtem cyklů Cq na množství enzymu přidaného do jamky. Modrá datová řada odpovídá měření, kdy v jamkách bylo přítomno 0,1 – 10000 pg enzymu MTH1. Oranžová datová řada vznikla stejným měřením, ke kterému ale byl přidán kromě sondy ještě 1μM inhibitor MD530.

Na závěr byla proměřena ředící řada sondy v rozmezí 3-10000 pM. Disociační konstanta sondy byla získána v programu GraFit 5.0 výpočtem ze závislosti normalizovaného množství kopií oligonukleotidu z próby na koncentraci sondy. Normalizované množství kopií bylo použito, protože jeho závislost je lineární, kdežto závislost Cq získaných experimentem je logaritmická. Výsledná disociační konstanta byla přibližně 300pM (Graf 3).



$$K_d = 261,189 \pm 113,640 \text{ pM}$$

Graf 3: Závislost normalizovaného množství kopií oligonukleotidu na koncentraci přidané sondy. Modře je znázorněna počáteční část grafu.

4.2 Diskuse

V této práci jsem usilovala o dosažení dvou hlavních cílů. Prvním z nich bylo získání čistého, a hlavně aktivního enzymu MTH1. Vzhledem k tomu, že postupy klonování, exprese a purifikace MTH1 byly již dříve popsány v odborné literatuře¹¹, byla navržena podobná cesta.

RNA knihovna pocházející z různých maligních tkání byla reversní transkripcí převedena na cDNA knihovnu a tato DNA byla dále amplifikována metodou PCR. DNA byla štěpena a zaklonována do vhodného plasmidu, který mj. obsahoval sekvenci histidinové kotvy umožňující purifikaci a detekci enzymu. Po expresi v bakteriálním systému následovala purifikace. Lze říci, že prvního cíle, tedy přípravy enzymu, bylo dosaženo úspěšně, a to bez nutnosti větších optimalizací postupu.

Druhým cílem bylo ověření aktivity vyprodukovaného enzymu a jeho využití v metodě DIANA, která by umožnila HTS. Původně jsme k ověření kinetických parametrů enzymu a inhibitoru zamýšleli užít metody s malachitovou zelení podle Baykova²¹, tato metoda se však ukázala jako nevhodná kvůli komplikacím s přípravou roztoků potřebných k jejímu provedení. Následně proto byl zvolen komerční kit fungující na stejném principu, který experimenty usnadnil. Bylo ověřeno, že enzym MTH1 je aktivní. Na závěr byly provedeny experimenty potvrzující správnost konceptu využití metody DIANA jako nástroje pro HTS inhibitorů MTH1.

Jak bylo uvedeno v Úvodu této práce, mechanismus protinádorového účinku inhibitorů MTH1 byl velmi nedávno několika autory zpochybněn. Přesto lze považovat za prokázané, že dříve publikované inhibitory MTH1 protinádorové účinky mají. Hledání nových typů látek, inhibujících MTH1 a strukturně odlišných od dříve publikovaných sloučenin, může být tedy důležité k pochopení mechanismu tohoto protinádorového účinku. Naše pracovní hypotéza je, že dříve nalezené inhibitory mají vedlejší aktivitu, blokující dosud neidentifikovaný enzym nebo jiný cíl, důležitý pro růst nádorů. Připravujeme proto sérii proteomických experimentů, ve kterých chceme (za použití dříve publikovaných inhibitorů) tuto „vedlejší aktivitu“ studovat. Nové, specifické inhibitory MTH1 by byly důležitým nástrojem k ověření této hypotézy a metoda HTS, která je v této bakalářské práci předkládána, může k tomuto cíli významně přispět.

5. Experimentální práce

5.1 Materiál a přístroje

5.1.1 Chemikálie a ostatní materiály

4titude (Velká Británie)

FrameStar 96 multiwell plate

Bio–Rad (USA)

All blue standard marker

Biotium (USA)

GelRed

Invitrogen (USA)

kompetentní buňky TOP10

kompetentní buňky BL21-CodonPlus (DE3)-RIL

Lachema (Česká republika)

*dihydrogenfosforečnan draselný
glukosa*

Merck

Immobilon Forte Western HRP substrate

New England BioLabs (USA)

Not I

Nde I

NEBuffer 3

kit T4 DNA–ligase

kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase

pyrofosfatasa

Penta (Česká republika)

kyselina chlorovodíková

azid sodný

ethanol

glycerol

hydroxid sodný

chlorid sodný

isopropanol

methanol

agarosa

Qiagen (USA)

GelPilot 100 bp Plus Ladder

QIAquick Gel Extraction Kit

Ni-NTA Superflow

R & D Systems (USA)

Universal Kinase Activity Kit

SDT (Německo)

Cassein blocker

Serva (Německo)

peroxidisíran amonný

Sigma–Aldrich (USA)

bromfenolová modř

EDTA

Akrylamid

2–merkapt ethanol

dodecylsulfát sodný

LB agar

LB medium

Sacharóza

TEMED

1kb ladder

cOmplete Mini protease inhibitor tablets

Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse

Kanamycin

primery pro obě PCR

ThermoFisher Scientific (USA)

SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR

T7 forward primer

T7 reverse primer

Neutravidin

United States Biochemical (USA)

N,N'–methylen–bis(akrylamid)

Tween 20

Tris

Zymo Research (USA)

Zyppy Plasmid Miniprep Kit

5.1.2 Pufry a další roztoky

Dialyzační pufr (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5% glycerol, pH = 7,4)

Elektrodotový TAE pufr 50x (2M Tris, 1M CH₃COOH, 0,05M EDTA, pH 8,0)

Elektrodotový pufr - akrylamidová e. 5x (140mM Tris-HCl, 1,4M glycin, 20mM SDS, pH 8,8)

Přenosový pufr (192mM glycin, 25mM Tris/HCl, 10% methanol)

PBS (10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, pH 7,4)

Pufr pro měření aktivity (100 mM Tris-acetate, 40 mM NaCl, 10 mM Mg(CH₃COO)₂, 0,005% Tween 20, 1 mM DTT, pH = 8.0)

TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH = 7.4)

TBST (TBS s 0.05% Tween 20)

TBST' (TBS s 0.1% Tween 20)

Vzorkový pufr – agarosová e. (40% sacharosa, 10% bromfenolová modř, 0,02% NaN₃)

Vzorkový pufr – akrylamidová e. (350mM Tris-HCl, 30% glycerol, 2mM 2–merkaptoethanol, 350mM SDS, 180μM bromfenolová modř, pH 6,8)

Roztok pro tvorbu separačního gelu (375mM Tris-HCl, 15% akrylamid, 0,1% SDS, 0,2% TEMED, 0,1% APS, pH 8,8)

Roztok pro tvorbu zaostřovacího gelu (250mM Tris-HCl, 6% akrylamid, 0,1% SDS, 0,2% TEMED, 0,1% APS, pH 6,8)

5.1.3 Přístroje

CCD kamera ChemiDoc–It 600, UVP (UK)

Centrifuga 5415R, Eppendorf (Německo)

Centrifuga Allegra X–15R, Beckman Coulter (USA)

Centrifuga Sorvall Evolution RC, Thermo Scientific (USA)

Cycler Biometra Tgradient, Labrepcó (USA)

Inkubátor IPP 400, Memmert (Německo)

Laboratorní váhy XA 110/X, Radwag (Polsko)

LightCycler 480 Instrument II, Roche (Švýcarsko)

pH metr 9450, Unicam (UK)

Promývačka 405 LS Washer, BioTek (USA)

Promývačka BlueWasher, Blue Cat Bio (Německo)

Rotační inkubátor Innova 44, *Eppendorf (Německo)*

Sada pro horizontální elektroforesu EasyCast mini gel system, *Thermo Scientific (USA)*

Sada pro vertikální elektroforesu Mini-PROTEAN Tetra Cell, *Bio-Rad (USA)*

Spektrofotometr NanoDrop 1000, *Thermo Scientific (USA)*

Spektrofotometr Microplate Reader Infinite M1000 PRO, *Tecan (Švýcarsko)*

Transiluminátor Quantum ST4, *Vilber (Německo)*

Vysokotlaký homogenizátor EmulsiFlex, *Avestin (Kanada)*

Zdroj napětí PowerPac Basic power supply, *Bio-Rad (USA)*

5.2 Metody

5.2.1 Reversní transkripce izolované RNA

Sedm vzorků RNA, izolovaných z různých maligních tkání, bylo vybráno pro reversní transkripci do cDNA. Ta proběhla pomocí kitu SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR. Vzorek se sterilní vodou byl smísen tak, aby bylo přítomno 2 μg RNA v 9,5 μl objemu. Tím vzniklo sedm různých roztoků RNA. Ke každému ze sedmi roztoků byly přidány reagenty zapsané v *Tabulka 3*.

Tabulka 3 Reakční směs reversní transkripce – první část reagentů.

Objem	Reagent	Koncentrace
0,5 μl	<i>primer oligo(dT)20</i>	50 μM
1 μl	<i>dNTP mix</i>	10mM

Směsi RNA a primerů byly denaturovány po dobu pěti minut při teplotě 65 °C a poté odloženy na led. V dalším kroku k nim byl přidán cDNA synthesis mix reagentů z *Tabulka 34*.

Tabulka 4 Reakční směs reversní transkripce – druhá část reagentů.

Objem	Reagent	Koncentrace
2 μl	<i>RT buffer</i>	10x
4 μl	<i>MgCl₂</i>	25 mM
2 μl	<i>DTT</i>	0,1 M
1 μl	<i>RNaseOUT</i>	40 U/ μl
1 μl	<i>SuperScript III RT</i>	200 U/ μl

Vzniklých sedm reakčních směsí bylo na 50 minut ponecháno při 50 °C, aby mohla proběhnout cDNA synthesis. Reakce byly terminovány pěti minutami v 85 °C.

5.2.2 Polymerasová řetězová reakce I

Po terminaci reverzní transkripce byly reakční směsi s čerstvě nasynthetizovanou cDNA podrobeny polymerázové řetězové reakci. PCR byla provedena pomocí kitu Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, kódujícího primeru 5'-GCGCCTCCAGGCTCTATAC a reverzního primeru 5'-CAATGCCCCCAGGTGAAGAT. Reakční směs obsahovala složky popsané v *Tabulka 35*.

Tabulka 5 Reakční směs PCR I.

Objem	Reagent	Koncentrace
36,5 μ l	<i>Sterilní voda</i>	-
10 μ l	<i>Phusion HF Buffer</i>	5x
1 μ l	<i>dNTPs</i>	10 mM
0.5 μ l	<i>kódující primer</i>	100 μ M
0.5 μ l	<i>reverzní primer</i>	100 μ M
1 μ l	<i>cDNA (reakční směs 5.2.1)</i>	-
0.5 μ l	<i>Phusion DNA Polymerase</i>	20 U/ μ l

Počáteční denaturace probíhala při 98 °C po 30 s, následovalo 35 cyklů amplifikace po 10 s při 98 °C; 30 s při 62 °C a 30 s při 72 °C. Reakce byla ukončena 10 min při 72 °C.

5.2.3 Horizontální agarosová elektroforesa

Přečištění a analýza reakcí 5.2.2 byla provedena horizontální agarosovou elektroforesou. Hustota gelu byla přizpůsobena velikosti analyzované DNA a činila 1,25 %. Gel byl připraven smísením práškové agarosy a roztoku elektrodového pufru TAE za přídavku fluorescenčního barviva GelRed. Po rozpuštění agarosy v mikrovlnné troubě byla směs nalita na elektroforetickou desku s hřebenem a ponechána k tunutí. Následně byl gel umístěn do elektroforetické vany a přelit pufrem TAE. Vzorky smísené v poměru 5:1 se vzorkovým pufrem a GelPilot 100 bp marker byly napipetovány do jamek a poté spuštěna elektroforesa při 110 V trvající 45 min.

5.2.4 Izolace DNA

Po skončení elektroforesy byl gel umístěn do transiluminátoru, čímž byla zviditelněna přítomná DNA. Izolace proběhla pomocí QIAquick Gel Extraction Kit. Ze tří drah byly skalpelem vyříznuty kvádry gelu obsahující DNA připravenou předchozí PCR reakcí. Tyto kvádry byly umístěny do 1,5ml zkumavek a bylo k nim přidáno 300 μ l QG pufru. Po desetiminutové inkubaci při 50 °C bylo k rozpuštěnému gelu přidáno 100 μ l isopropanolu.

Roztok byl převeden do QIAquick spin kolonky se sběrnou zkumavkou a jednu minutu centrifugován na 13 000 rpm. Roztok, který stekl do sběrné zkumavky, byl vylit, kolonka znovu naplněna 500 μ l QG pufru a 1 min centrifugována. Stejný postup byl opakován se 700 μ l PE pufru, a nakonec s prázdnou kolonkou bez pufru. Zachycená DNA byla vyeluována přidáním 50 μ l sterilní vody na kolonku s čistou sběrnou zkumavkou.

5.2.5 Polymerasová řetězová reakce II

Jeden ze vzorků DNA získaných v předchozím kroku byl 10 000x zředěn ve sterilní vodě. Následně byl podroben další PCR pomocí kitu Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, kódujícího primeru 5'-ATATGCGGCCGCTTACTAGACCGTGTCCACCTCG a reversního primeru 5'-ATATCATATGGGCGCCTCCAGGCTCTATAC. Reakční směs PCR obsahovala složky uvedené v *Tabulka 36*.

Tabulka 6 Reakční směs PCR II.

Objem	Reagent	Koncentrace
36,5 μ l	<i>Sterilní voda</i>	-
10 μ l	<i>Phusion HF Buffer</i>	5x
1 μ l	<i>dNTPs</i>	10 mM
0.5 μ l	<i>kódující primer</i>	100 μ M
0.5 μ l	<i>reversní primer</i>	100 μ M
1 μ l	<i>DNA (5.2.4)</i>	-
0.5 μ l	<i>Phusion DNA Polymerase</i>	20 U/ μ l

Amplifikace probíhala za totožných podmínek jako v PCR reakci popsané v kapitole 5.2.2, následná horizontální agarosová elektroforesa byla provedena stejně jako v kapitole 5.2.3 a postup izolace odpovídal postupu v 5.2.4.

5.2.6 Štěpení insertní DNA a plasmidu

Štěpení DNA získané reakcí 5.2.5, která je insertem, a plasmidu pET-28b, který posloužil jako vektor, proběhlo pomocí restrikčních endonukleas NotI a NdeI. Teplotní podmínky včetně vhodného pufru byly určeny pomocí aplikace Double digest finder²² a byly následující: 6 h inkubace při 37 °C, 20 min při 65 °C v pufru NEBuffer 3. Složky reakce se štěpeným plazmidem obsahuje *Tabulka 37*:

Tabulka 7 Reakční směs štěpení plasmidu.

Objem	Reagent	Koncentrace
4,7 μ l	<i>Sterilní voda</i>	-
3 μ l	<i>NEBuffer 3</i>	5x

0,3 μ l	BSA	100x
1 μ l	<i>Nde I</i>	20 U/ μ l
1 μ l	<i>Not I</i>	10 U/ μ l
20 μ l	<i>pET-28b</i>	160 ng/ μ l

Reakce se štěpenou DNA, připravenou podle postupu popsaném v kapitole 5.2.5, obsahovala reagenty z *Tabulka 38*.

Tabulka 8 Reakční směs štěpení insertní DNA

Objem	Reagent	Koncentrace
4,7 μ l	<i>Sterilní voda</i>	-
3 μ l	<i>NEBuffer 3</i>	5x
0,3 μ l	BSA	100x
1 μ l	<i>Nde I</i>	20 U/ μ l
1 μ l	<i>Not I</i>	10 U/ μ l
20 μ l	DNA (5.2.5)	-

Následovala horizontální agarosová elektroforesa podle postupu popsaného v kapitole 5.2.3 s rozdílem v čase (40 min) a napětí (120 V) a izolace podle postupu v kapitole 5.2.4.

5.2.7 Ligace fragmentů DNA a vektoru

Ligace plasmidu a insertu, připravených minulým krokem, proběhla při 16 °C přes noc. Byly vytvořeny dvě reakční směsi, které se lišily přidáním množstvím insertu. Obě reakční směsi jsou popsány v *Tabulka 39* a *Tabulka 310*.

Tabulka 9 Reakční směs 1. ligace.

Objem	Reagent	Koncentrace
2,4 μ l	<i>Sterilní voda</i>	-
4 μ l	<i>T4 Ligase Buffer</i>	5x
13 μ l	<i>plasmid (5.2.6)</i>	-
0,9 μ l	<i>insert (5.2.6)</i>	-
0,2 μ l	<i>T4 DNA ligasa</i>	400 U/ μ l

Tabulka 10 Reakční směs 2. ligace.

Objem	Reagent	Koncentrace
1 μ l	<i>Sterilní voda</i>	-
4 μ l	<i>T4 Ligase Buffer</i>	5x
13 μ l	<i>plasmid (5.2.6)</i>	-
1,8 μ l	<i>insert (5.2.6)</i>	-
0,2 μ l	<i>T4 DNA ligasa</i>	400 U/ μ l

Byla také provedena negativní kontrola, jež neobsahovala žádný insert, jeho objem byl nahrazen sterilní vodou.

5.2.7 Transformace E.coli připraveným plasmidem

Ke 40 μ l kompetentních buněk byly na ledu přidány 4 μ l ligační směsi. Po 30 min inkubace následoval teplotní šok, 42 °C po 90 s, nakonec opět 2 min na ledu. Poté bylo přidáno 200 μ l LB média a roztok byl inkubován 1 h při 37 °C. Celý objem každého ze tří roztoků byl převeden na agarovou plotnu s kanamycinem, kde byl rozetřen a plotna poté vložena do inkubátoru s 37°C teplotou na noc. Ráno byl zrevidován počet kolonií na jednotlivých plotnách. Z obou ploten s buňkami obsahujícími plasmid včetně insertu bylo odebráno po čtyřech koloniích. Ty byly suspendovány v 20 ml LB média s kanamycinem a do rána ponechány v rotačním inkubátoru při 37 °C.

5.2.8 Minipreparace plasmidu

Médium s nárůstem buněk bylo centrifugováno při 4000 g po 10 min. Supernatant byl slit a pelety rozsuspendovány v 600 μ l sterilní vody a převedeny do zkumavek. Další zpracování proběhlo pomocí kitu Zyppy Plasmid Miniprep. K suspenzi buněk bylo přidáno 100 μ l lyzačního pufru, suspenze promíchána, poté přidáno 350 μ l neutralizačního pufru, suspenze opět promíchána a podrobena centrifugací po 4 minuty na 11000 g. Vzniklý supernatant byl opatrně odebrán tak, aby nebyla narušena peleta, přenesen do Zymo-Spin kolonky, ta umístěna do sběrné zkumavky a stočena. Prošlý roztok byl vylit, na kolonku nanášeno 200 μ l Endo-Wash Bufferu a po 30s stočení bylo nanášeno ještě dalších 400 μ l Zyppy Wash Bufferu. Následovala minutová centrifugace, po níž byla kolonka přenesena do čisté zkumavky. Bylo přidáno 30 μ l Zyppy Elution Bufferu a po minutě byla provedena finální 30s centrifugace. Na závěr byly plasmidy osekvenovány za pomoci T7 kódujícího a T7 reversního primeru.

5.2.9 Transformace E.coli připraveným plasmidem II

Na ledu bylo rozeřáno 150 μ l kompetentních buněk E.Coli BL21-CodonPlus (DE3)-RIL a přidán vypreparovaný plasmid, následný postup odpovídal první transformaci (viz kapitola 5.2.7) s jediným rozdílem, bylo použito 800 μ l LB média.

5.2.10 Exprese proteinu

Nárůsty na plotnách z předchozího kroku byly rozsuspendovány a přeneseny do baněk s 1 l LB media s kanamycinem, baňky poté byly třepány při 37°C. Po hodině byla poprvé změřena OD při 595 nm. Ve chvíli, kdy OD suspenzí vystoupala do rozmezí 0,6 – 0,8, byla

zahájena indukce přidáním IPTG na výslednou 1 μM koncentraci. Po pěti hodinách byly suspenze centrifugovány 10 min na 6000 g. Vzniklé pelety byly rozsuspendovány v lizačním pufru za přídavku tablety cOmplete mini a zhomogenizovány ve vysokotlakém homogenizátoru EmulsiFlex a produkt homogenizace centrifugován po 20 minut na 6000 g při 4 °C.

5.2.11 Purifikace proteinu

Celý proces probíhal při teplotě 4 °C. Purifikace byla provedena afinitní chromatografií podle návodu kitu Ni-NTA Superflow ve sledu kroků zahrnujících míchání homogenizovaného produktu 5.2.10 s resinem, následné promývání a centrifugaci. Výsledná eluční frakce byla dialyzována v trubici 6-8 kDa. Trubice byla umístěna do 2 l dialyzačního pufru a po 1 h přemístěna do 2 l téhož čerstvého pufru, kde zůstala taktéž 1 h. Roztok proteinu MTH1 byl z trubice převeden do zkumavek a zamrazen tekutým dusíkem. Malá část byla ponechána pro změření přibližné koncentrace na spektrometru NanoDrop.

5.2.12 SDS-PAGE elektroforesa za redukujících a denaturujících podmínek

Nejdříve byl do vertikální elektroforetické aparatury napipetován roztok pro tvorbu separačního gelu, který byl převrstven ethanolem. Po chvíli byl ethanol vylit, do aparatury napipetován roztok pro tvorbu zaostřovacího gelu a přidán hřeben. Po vytuhnutí gelu byla aparatura naplněna elektrodovým pufrem. Vzorky nasbírané v průběhu purifikace byly na gel nanášeny po smísení se vzorkovým pufrem a 4min inkubaci v 96 °C, dále byl na gel nanesen All blue marker. Elektroforesa probíhala při 140 V po dobu 70 min.

Vizualizace proteinů na gelu proběhla obarvením stříbrem podle následujícího postupu. Gel byl umístěn do roztoku s obsahem 12 % kyseliny octové, 50 % methanolu a 0,05 % formaldehydu. Poté byl gel třikrát po 15 min omýván 50% methanolem. Následovala 1 min v 8,1mM roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 3 promytí destilovanou vodou po 20 s, 20 min v 12mM roztoku AgNO_3 s 0,05% formaldehydem a opět 3 promytí destilovanou vodou po 20 s. V roztoku obsahujícím 0,57M Na_2CO_3 , 16,1 μM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,05% formaldehyd byl gel ponechán do objevení elektroforeogramu, načež byl na 3krát 20 s promýván destilovanou vodou. Na závěr byl gel na 10 min umístěn do roztoku 12% kyseliny octové s 50% methanolem a přes noc ponechán v roztoku 10% kyseliny octové.

5.2.13 Elektropřenos a imunodetekce

Byla provedena elektroforesa s totožným postupem jako v prvním odstavci minulé kapitoly. Po jejím ukončení byl gel společně s nitrocelulosovou membránou a filtračními papíry, přiloženými z obou stran, umístěn do Mini-PROTEAN aparatury s naplněné

přenosovým pufrem. Elektropřenos probíhal 1 h při 100 V. Následovalo blokování v 5 ml roztoku kaseinu v PBS za stálého míchání po dobu 1 h a přidání 2,5 µl myší protilátky Monoclonal Anti-polyHistidine antibody. Po hodině působení roztoku s protilátkou byla membrána třikrát promyta PBST pufrem. Nakonec bylo přidáno 700 µl substrátu Luminata FORTE a luminiscence zachycena CCD kamerou.

5.2.14 Měření aktivity MTH1 pomocí metody s malachitovou zelení

Měření probíhalo pomocí Universal Kinase Activity Kit na 96-jamkových destičkách. V prvním kroku byl substrát dGTP inkubován s enzymem MTH1, pyrofosfatasou o koncentraci 0,2 U/ml a případně i inhibítorem enzymu MTH1 po dobu 60 min při RT. Objem jedné reakce činil 50 µl. Ve druhém kroku bylo do každé jamky přidáno 10 µl Malachite green reagent A. Po 10min inkubaci bylo do každé jamky přidáno 10 µl Malachite green reagent B. Po dalších deseti minutách byla změřena absorbance při 620 nm na spektrofotometru Tecan.

5.2.15 DNA-linked Inhibitor ANTibody Assay

Reakce byly prováděny na 96-jamkové destičce 4titude. Nejdříve byla sorbována protilátka. Do jamek bylo napipetováno 10 µl roztoku neutravidinu v TBS s finální koncentrací 10 ng/µl. Následovala blokáce kaseinem casein blocker 5x ředěným v TBS. 100 µl tohoto roztoku bylo přidáno do jamek s původním roztokem protilátky a ponecháno k inkubaci při RT přes noc. Ráno proběhlo promytí TBST v promývače BioTek. Poté bylo přidáno 10 µl 100nM roztoku polymeru UOCHB35 s navázanými nikelnatými ionty v TBST'. Po 3 h inkubace proběhlo opět promytí TBST v promývače BioTek. Dále bylo přidáno 10 µl roztoku enzymu MTH1 v TBST', inkubace trvala 5 h při RT a destička byla opět stejně promyta. Následně bylo přidáno 10 µl roztoku detekční sondy v pufru TBS a případně i inhibitor MD530. Po 1 h inkubace za RT byla destička promyta v promývače BioTek. Nakonec proběhla detekce pomocí qPCR. Do všech jamek bylo napipetováno 10 µl SYBR Green master mixu s dříve publikovanými primery¹⁰, destička zalepena optickou fólií a v LightCycleru byla provedena PCR reakce za těchto podmínek: 5 min 95°C; 45 cyklů po 10 s při 95 °C, 30 s při 63 °C a 30 s při 72 °C; a na závěr 2 min při 37 °C.

6. Závěr

Podářilo se izolovat DNA nesoucí gen pro MTH1, vložit ji do vektoru a naklonovat ji. Pomocí vhodného expresního systému byl úspěšně připraven rekombinantní protein MTH1, který byl následně purifikován. Pro ověření aktivity enzymu byla použita metoda s malachitovou zelení. Ukázalo se, že vyprodukovaný enzym je aktivní. Na závěr byla ověřena funkčnost metody DIANA s MTH1 umožňující budoucí HTS inhibitorů tohoto enzymu.

7. Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc. za přátelský přístup a možnost pracovat v jeho skupině. Děkuji i celému osazenstvu laboratoře, zejména Václavu Navrátilovi, Jitce Zemanové a Karolíně Šrámkové.

V neposlední řadě si můj velký dík za nekonečnou podporu při studiu i psaní práce zaslouží mí blízcí Pavel, Eva, Ivo a Jakub.

8. Literatura

1. Ferlay, J.; Steliarova-Foucher, E.; Lortet-Tieulent, J.; Rosso, S.; Coebergh, J.; Comber, H.; Forman, D.; Bray, F. *Eur J Cancer*. **2013**, *49*, 1374-1403
2. Ahmad, A.S.; Ormiston-Smith, N.; Sasieni, P. D. *Br. J. Cancer*. **2015**, *112*, 943–947
3. Dusek, L.; Muzik, J.; Maluskova, D.; Májek, O.; Pavlík, T.; Koptíková, J.; Melichar, B.; Büchler, T.; Fínek, J.; Cibula, D.; Babjuk, M.; Svoboda, M.; Vyzula, R.; Ryska, A.; Ryska, M.; Petera, J.; Abrahámová, J. *Klin Onkol*. **2014**, *27*, 406-423
4. Sudhakar, A. *J Cancer Sci Ther*. **2009**, *1*, 1-4
5. Stirland, D.L.; Nichols, J.W.; Denison, T.A.; Bae, Y.H. *Biomaterials for Cancer Therapeutics; Woodhead Publishing*, **2013**, 31-56
6. Fujikawa, K.; Kamiya, H.; Yakushiji, H.; Nakabeppu, Y.; Kasai, H. *Nucleic Acids Res*. **2001**, *29*, 449-454
7. Huber, K.; Salah, E.; Radic, B.; Gridling, M.; Elkins, J.M.; Stukalov, A.; Jemth, A.S.; Göktürk, C.; Sanjiv, K.; Strömberg, K.; Pham, T.; Berglund, U.W.; Colinge, J.; Bennett, K.L.; Loizou, J.I.; Helleday, T.; Knapp, S.; Superti-Furga, G. *Nature*. **2014**, *508*, 222-227
8. Kettle, J.G.; Alwan, H.; Bista, M.; Breed, J.; Davies, N.L.; Eckersley, K.; Fillery, S.; Foote, K.M.; Goodwin, L.; Jones, D.R.; Käck, H.; Lau, A.; Nissink, J.W.; Read, J.; Scott, J.S.; Taylor, B.; Walker, G.; Wissler, L.; Wylot, M. *J Med Chem*. **2016**, *59*, 2346-2361
9. Petrocchi, A.; Leo, E.; Reyna, N.J.; Hamilton, M.M.; Shi, X.; Parker, C.A.; Mseeh, F.; Bardenhagen, J.P.; Leonard, P.; Cross, J.B.; Huang, S.; Jiang, Y.; Cardozo, M.; Draetta, G.; Marszalek, J.R.; Toniatti, C.; Jones, P.; Lewis, R.T. *Bioorg Med Chem Lett*. **2016**, *26*, 1503-1507
10. Navrátil V.; Schimer J.; Tykvart J.; Knedlík T.; Vik V.; Majer P.; Konvalinka J.; Šácha P. *Nucleic Acids Res*. **2017**, *45*, e10
11. Gad, H.; Koolmeister, T.; Jemth, A.; Eshtad, S.; Jacques, S.; Ström, C.; Svensson, L.; Schultz, N.; Lundbäck, T.; Einarsdottir, B.; Saleh, A.; Göktürk, C.; Baranczewski, P.; Svensson, R.; Berntsson, R.; Gustafsson, R.; Strömberg, K.; Sanjiv, K.; Jacques-Cordonnier, M.; Desroses, M.; Gustavsson, A.; Olofsson, R.; Johansson, F.; Homan, E.; Loseva, O.; Bräutigam, L.; Johansson, L.; Höglund, A.; Hagenkort, A.; Pham, T.; Altun, M.; Gaugaz, F.; Vikingsson, S.; Evers, B.; Henriksson, M.; Vallin, K.; Wallner, O.; Hammarström, L.; Wiita, E.; Almlöf, I.; Kalderén, C.; Axelsson, H.; Djureinovic, T.;

- Puigvert, J.; Häggblad, M.; Jeppsson, F.; Martens, U.; Lundin, C.; Lundgren, B.; Granelli, I.; Jensen, A.; Artursson, P.; Nilsson, J.; Stenmark, P.; Scobie, M.; Berglund, U.; Helleday, T. *Nature*, **2014**, *508*, 215-221
12. Svensson, L.; Jemth, A.; Desroses, M.; Loseva, O.; Helleday, T.; Hogbom, M.; Stenmark, P. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 2617-2621
 13. Carter, M.; Jemth, A.S.; Hagenkort, A.; Page, B.D.; Gustafsson, R.; Griese, J.J.; Gad, H.; Valerie, N.C.; Desroses, M.; Boström, J.; Warpman Berglund, U.; Helleday, T.; Stenmark, P. *Nat Commun.* **2015**, *6*, 7871
 14. Wang, J.; Liu, G.; Wilmott, J.; La, T.; Feng, Y.; Yari, H.; Yan, X.; Thorne, R.; Scolyer, R.; Zhang, X.; Jin, L. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 6226-6239
 15. Fujikawa, K.; Kamiya, H.; Yakushiji, H.; Fujii, Y.; Nakabeppu, Y.; Kasai, H. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18201-18205
 16. Kawamura, T.; Kawatani, M.; Muroi, M.; Kondoh, Y.; Futamura, Y.; Aono, H.; Tanaka, M.; Honda, K.; Osada, H. *Sci Rep.* **2016**, *6*, 26521
 17. Tsuzuki, T.; Egashira, A.; Igarashi, H.; Iwakuma, T.; Nakatsuru, Y.; Tominaga, Y.; Kawate, H.; Nakao, K.; Nakamura, K.; Ide, F.; Kura, S.; Nakabeppu, Y.; Katsuki, M.; Ishikawa, T.; Sekiguchi, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2001**, *98*, 11456-11461
 18. Warpman Berglund, U.; Sanjiv, K.; Gad, H.; Kalderén, C.; Koolmeister, T.; Pham, T.; Gokturk, C.; Jafari, R.; Maddalo, G.; Seashore-Ludlow, B.; Chernobrovkin, A.; Manoilov, A.; Pateras, IS.; Rasti, A.; Jemth, A.S.; Almlöf, I.; Loseva, O.; Visnes, T.; Einarsdottir, B.O.; Gaugaz, F.Z.; Saleh, A.; Platzack, B.; Wallner, O.A.; Vallin, K.S.; Henriksson, M.; Wakchaure, P.; Borhade, S.; Herr, P.; Kallberg, Y.; Baranczewski, P.; Homan, E.J.; Wiita, E.; Nagpal, V.; Meijer, T.; Schipper, N.; Rudd, S.G.; Bräutigam, L.; Lindqvist, A.; Filppula, A.; Lee, T.C.; Artursson, P.; Nilsson, J.A.; Gorgoulis, V.G.; Lehtiö, J.; Zubarev, R.A.; Scobie, M.; Helleday, T. *Ann Oncol.* **2016**, *27*, 2275-2283
 19. Alberts, B.; Bray, D.; Johnson A.; Lewis J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Základy buněčné biologie, Espero publishing*, **2005**, 330
 20. Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry fourth edition, New York: Worth Publishers*, **2006**, 91
 21. Baykov, AA.; Evtushenko, OA.; Avaeva, SM. *Anal Biochem.* **1988**, *171*, 266-270
 22. Double Digest Finder. New England Biolabs [online]. Ipswich: New England Biolabs, ©2017 [cit. 2015-05-28]. <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>