

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**



Katedra biologických a lékařských věd

**VALIDACE PURIFIKACE ENZYMŮ
ACETYLCHOLINESTERASY A BUTYRYLCHOLINESTERASY**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant/ka: RNDr. Martina Hrabínová, Ph.D.

Hradec Králové 2022

Barbora Hejtmánková

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením konzultantky RNDr. Martiny Hrabínové, Ph.D. a vedoucím práce PharmDr. Miroslava Kovaříka, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne

.....

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování za odborné vedení bakalářské práce, za pomoc a cenné rady patří PharmDr. Miroslavu Kovaříkovi, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Martině Hrabínové, Ph.D za její čas, znalosti, rady a nikdy neustávající ochotu mi pomoci na cestě k odevzdání této bakalářské práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Barbora Hejtmánková

Školitel: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Martina Hrabínová, Ph.D.

Název bakalářské práce: Validace a purifikace enzymů acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy

Purifikace je závěrečným krokem produkce rekombinantních proteinů. Zahrnuje sérii procesů, které vedou k izolaci jediného typu bílkoviny, ze složitější směsi látek. Purifikační metody využívají rozdílných vlastností proteinu, které jsou dány jeho velikostí, nábojem, tvarem či aktivitou.

Tato bakalářská práce porovnávala účinnost třech afinitních pryskyřic, prokainamid sefarósy, Hupresinu a nikel-nitriltriocetové kyseliny (Ni-NTA), na enzymech acetylcholinesterasa (AChE) a butyrylcholinesterasa (BChE). Průběh purifikace cholinesteras (ChE) byl monitorován modifikovanou Ellmannovou spektrofotometrickou metodou. K identifikaci a určení čistoty enzymů bylo využito gelové elektroforézy a spektrofotometrického stanovení koncentrace proteinů. Enzymy byly charakterizovány určením kinetických konstant: Michaelisovy konstanty (K_m), specifické aktivity a hodnoty poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC_{50}) pro selektivní inhibitor AChE donepezil a pro BChE etopropazin.

Porovnáním výsledků gelové elektroforézy byla pryskyřice obsahující Ni-NTA vyhodnocena jako nejvhodnější typ pro obě ChE. Tento výsledek byl taktéž potvrzen výslednou koncentrací proteinu v purifikovaném enzymu.

Klíčová slova: purifikace, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasy, kinetická konstanta, inhibitor

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Barbora Hejtmánková

Trainer: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Consultant: Mgr. Martina Hrabínová, Ph.D.

Title of the bachelor thesis: Validation and purification of enzymes acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase

Purification is a final step in the production of recombinant proteins. It involves a series of processes that lead to isolation of a single type of protein from more complex mixture of substances. Purification methods take advantage of the different properties of protein, which determined by its size, structure, charge and activity.

This bachelor's thesis compared the effectiveness of three affinity resins, procaineamide sepharose, Hupresin and nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA), on the enzymes acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE). The progress of purification of cholinesterases (ChE) was monitored by modified Ellmann spectrophotometric method. Gel electrophoresis and spectrophotometric determination of protein concentration were used to identify and determine the purity of the enzyme. The enzymes were characterized by determining the kinetic constants: Michaelis constant (K_m), specific activity and IC_{50} value of half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for the selective AChE inhibitor donepezil and for the BChE inhibitor ethopropazine.

By comparing the results of gel electrophoresis, the Ni-NTA agarose was evaluated as the most suitable type for both ChEs. This result was also confirmed by the final protein concentration in the purified enzyme.

Key words: purification, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, kinetic constant, inhibitor

OBSAH

1. Úvod.....	9
2. Cíl práce	10
3. Teoretická část	11
3.1 Acetylcholinesterasa	11
3.2 Butyrylcholinesterasa.....	12
3.3 Produkce rekombinantních proteinů.....	12
3.3.1 Příprava vektoru a exprese	14
3.3.2 Expresní systémy.....	15
3.4 Purifikace	17
3.4.1 Chromatografické metody.....	17
3.4.2 Afinitní chromatografie	18
3.4.3 Purifikační systém Ni-NTA.....	18
3.4.4 Purifikační systém Prokainamid sefarósa.....	19
3.4.5 Purifikační systém Hupresin.....	20
3.5 Hodnocení čistoty	20
4. Experimentální část.....	22
4.1 Použité chemikálie a kity	22
4.1.1 Chemikálie.....	22
4.1.2 Kity	22
4.2 Biologický materiál.....	23
4.3 Sterilní plast a spotřební materiál	23
4.4 Instrumentace.....	23
4.5 Vypracování metodické práce	24
4.6 Purifikace lidské rekombinantní AChE	24

4.7	Purifikace lidské rekombinantní BChE	26
4.8	Analýza ChE gelovou elektroforézou.....	26
4.8.1	Složení gelu	27
4.8.2	Příprava vzorků na gelovou elektroforézu	28
4.8.3	Barvení gelu.....	29
4.9	Stanovení koncentrace proteinů.....	29
4.10	Validace kinetických vlastností lidských rekombinantních ChE	30
4.10.1	Princip Ellmanovy metody	30
4.10.2	Stanovení aktivity	31
4.10.3	Stanovení Michaelisovy konstanty	32
4.10.4	Stanovení IC ₅₀ standardního inhibitoru	33
5.	Výsledky	34
5.1	SDS-PAGE gelová elektroforéza.....	34
5.2	Stanovení koncentrace	35
5.3	Validace kinetických vlastností	35
5.3.1	Aktivita enzymu	35
5.3.2	Specifická aktivita	35
5.3.3	Michaelisova konstanta a maximální rychlost reakce	36
5.3.4	IC ₅₀ donepezil	38
5.3.5	IC ₅₀ etopropazin.....	39
6.	Diskuze.....	41
6.1	Purifikace AChE	41
6.2	Purifikace BChE	42
6.3	Přínos práce.....	43
7.	Závěr	45

8.	Seznam použitých zkratk.....	46
9.	Seznam tabulek	48
10.	Seznam obrázků.....	49
11.	Použitá literatura.....	51

Úvod

Předkládaná bakalářská práce se zabývá porovnáním třech purifikačních pryskyřic využitých k přečištění rekombinantních lidských cholinesteras (ChE). Komerčně dodávané lidské enzymy se často potýkají s problémem nízké stability a aktivity. Z těchto důvodů a také vzhledem k vysoké spotřebě těchto enzymů si pracoviště Katedra toxikologie a vojenské farmacie (KTVF) Fakulty vojenského zdravotnictví (FVZ) Univerzity obrany (UO) produkuje enzymy vlastní.

KTVF je unikátní pracoviště Armády České Republiky (AČR) a České Republiky celkově, v jejichž laboratořích se provádí výzkum účinku toxických a bojových otravných látek a ochraně proti nim na vysoké úrovni (UNOB 2021a). Výzkum je především cílen na profylaxi u otrav nervově paralytickými látkami (NLP) jako je sarin soman, VX, tabun. Předmětem studie jsou efektivní antidota, jejichž účinek spočívá v ochraně ChE před inhibicí. Díky těmto zkušenostem se zabývají i civilním výzkumem nových léčiv Alzheimerovy choroby (UNOB 2021b).

Doposud se pro purifikace acetylcholinesterasy (AChE) využívala pryskyřice prokainamid sefarósa (PS) a pro purifikaci butyrylcholinesterasy (BChE) pryskyřice Hupresin. S ohledem na ekonomickou část produkce bylo potřeba optimalizovat krok purifikace za použití jedné pryskyřice na obě ChE. Polyhistidinová značka, která označuje naše proteiny, nám umožňuje pro jejich purifikaci využít nikl-nitritriocetovou agarósu (Ni-NTA). Tento krok by mohl snížit jak časovou náročnost přípravy, tak i finanční zatížení pracoviště.

1. Cíl práce

Cílem práce bylo porovnat účinnost purifikace rekombinantní lidské AChE a BChE při použití různých afinitních pryskyřic. Průběh purifikace ChE byl monitorován modifikovanou spektrofotometrickou Ellmannovou metodou. K identifikaci a určení čistoty enzymů bylo využito gelové elektroforézy a spektrofotometrického stanovení koncentrace proteinů. Enzymy byly charakterizovány určením kinetických konstant: Michaelisovy konstanty, specifické aktivity a hodnoty poloviny maximální inhibiční koncentrace (IC_{50}) pro selektivní inhibitor AChE donepezil a pro BChE etopropazin.

2. Teoretická část

2.1 Acetylcholinesterasa

AChE je klíčový enzym v centrálním nervovém systému. Nachází se v nervosvalových spojích a cholinergních synapsích, kde katalyzuje hydrolyzu esterů neurotransmiteru acetylcholinu (ACh). Slouží k ukončení synaptického přenosu a zabraňuje nepřetržitému vzruchu nervového zakončení, které by se mohlo projevit např. ve svalech, křečích. Dále ji najdeme na erytrocytech, plicích, slezině a všech částech mozku (Patočka et al. 2004).

Molekula AChE je složena ze dvou domén. Velká doména je tvořena 500 zbytky a malá je tvořena méně než 50 zbytky peptidů zakončených C-koncem. Kavita AChE zahrnuje dvě vazebná místa: periferní anionické místo (PAS) a katalytické anionické místo (CAS), acylovou kapsu a estratické místo též nazývané katalytická triáda (Wiesner et al. 2007). PAS se nachází na vstupu katalytické kavity, kde dochází k prvnímu kroku katalytické dráhy, vazbě kationtového dusíku ACh. Jeho další funkcí je i vazba kvarterních ligandu kompetitivních inhibitorů a kvarterních oximů, reaktivátorů AChE inhibovanou oragnofosfáty. V CAS dochází k interakci kvarterního dusíku ChE s Try₈₄. Acetylová skupina je pak vázána v acylové kapse. Na dně kavity se nachází katalytická triáda složená z aminokyselin Ser₂₀₀-His₄₄₀-Glu₃₂₇. Zde dochází k hydrolyze ACh na acetát a cholin. AChE se vyskytuje se jak v globulární formě (monomer, dimer, tetramer), tak i v asymetrické formě spojené kolagenem Q, v rozpustné a i v membránové formě (Johnson a Moore 2006).

AChE je významným markerem otrav pesticidy a nervově paralytickými látkami (NPL). Své místo má i v patologii a terapii Alzheimerovy choroby (AD). AD je nejčastější příčina demence na celém světě. Kromě amyloidových plaků a neurofibrilárních klubek je jedním z hlavních patofyziologických znaků AD ztráta cholinergních receptorů. To se projevuje poruchou zejména krátkodobé paměti, která je spojená se zhoršením kognitivních funkcí. Inhibitory AChE a nekompetitivní antagonisty N-Metyl-D-Asparátových (NMDA) receptorů (Ebixa®) (SÚKL 2010), jsou jedinými terapeutikami v léčbě AD (Lionetto et al. 2013). V současné chvíli byl v USA registrovaný lék Aduhelm, jehož účinná látka je aducanumab (protilátka na amyloid

beta). Tento lék, nefunguje jako současná terapeutika, ale cílí na pravděpodobnou příčinu AD, (Cummings et al. 2021).

2.2 Butyrylcholinesterasa

BChE patří stejně jako AChE do skupiny ChE. Přezdívá se jí plazmatická, sérová či falešná esterasa. Najdeme ji v plazmě, játrech, hladké svalovině, střevu, slinivce břišní a bílé hmotě mozkové (Patočka et al. 2004).

BChE může zastoupit funkci AChE v hydrolýze ACh, pokud je aktivita AChE vyčerpána. BChE je zodpovědná za hydrolýzu sukcinylcholinu, který se používá při operacích jako svalového relaxancia ke krátkodobé blokaci cholinergních receptorů (Chatonnet a Lockridge 1989). Její hlavní význam je v degradaci xenobiotik např. léčiv a kokainu. Hraje důležitou roli při adhezi buněk, v neurogenezi a udržování myelinu. BChE může být použita jako bioscavenger při otravách NPL a pesticidy.

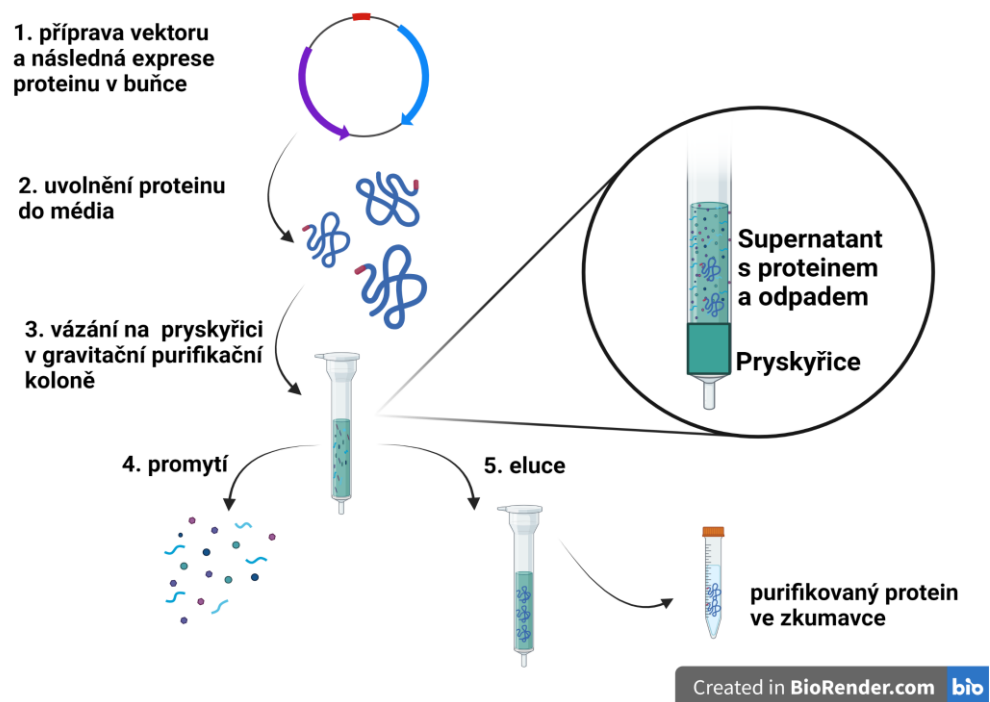
V lidské plazmě se nachází ve čtyřech formách. Nejčastěji jako oligomer utvořený ze čtyř podjednotek spojených hydrofobními interakcemi. Tyto tetramery jsou tvořeny dimery vznikajícími z monomerů, které jsou spojené disulfidickými můstky mezi molekulami cysteinu (Boyko et al. 2019). Existují i další asymetrické formy spojeny kolagenem Q. Kromě katalytické triády obsahuje acylovou kapsu, oxyanionové místo i anionické místo, kde se stejně jako u AChE váže kationtový dusík Ach. Katalytická triáda obsahuje Ser₁₉₈, His₄₃₈ a Glu₃₂₅. (Darvesh et al. 2003).

2.3 Produkce rekombinantních proteinů

V dnešní době se rekombinantní proteiny využívají v širokém spektru výzkumů. Jejich praktický význam se nachází v rozsáhlém klinickém použití např. hormonálních produktů, enzymů při insuficienci a onkologii. Léčba hemofilie využívá virového vektoru kódujícího gen pro tvorbu srážecího faktoru (VIII nebo IX) (Nathwani 2019). Další možnosti aplikace rekombinantního proteinu je léčba diabetu mellitu. Inzulin byl v minulosti získáván ze slinivky břišní skotu či prasat. Dnes se inzulin připravuje rekombinantně pomocí bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) nebo kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Hwang et al. 2016). Do pokroku v terapii náleží i příprava rekombinantních vakcín. Vakcína proti viru hepatitidy B (HBV) se v roce 1982

vyráběla z plazmy infikovaných lidí. Ačkoliv byla bezpečná a účinná, její příprava byla drahá, což limitovalo použití pro větší masu lidí. Dnes se antigen HBsAg, který se nachází na povrchu HBV, připravuje pomocí klonování v kvasinkovém systému s využitím *Saccharomyces cerevisiae*. Tento antigen se pak naočkuje člověku, který si vytvoří imunitu, aniž by se dostal do přímého kontaktu s virem (Zhao et al. 2020).

Rekombinantní proteiny musí splňovat přísná kritéria jako je kvalita, účinnost a bezpečnost. Proto se připravují ve speciálních expresních systémech, které umožňují protein modifikovat dle potřeby např. změnou biologického poločasu, změnou farmakokinetických parametrů (Fusek et al. 2012), aby byla usnadněna jejich purifikace a také pozměněna jejich stabilita, aktivita nebo funkce, (Růčková et al. 2014). Jednotlivé kroky produkce rekombinantních proteinů popisuje **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**, podrobněji budou vysvětleny v kapitolách 2.3.1 až 2.4.



Obr. 1 Příprava rekombinantního proteinu s důrazem na purifikaci (zdroj: vlastní s využitím BioRender)

2.3.1 Příprava vektoru a exprese

Molekulární klonování začíná izolováním či syntetickou přípravou genové sekvence, která kóduje požadovaný protein. Tato genová sekvence se označí afinitními značkami (tagy). Díky afinitě těchto tagů k purifikační matici se zjednodušuje následný krok purifikace (více o afinitních značkách v kapitole 2.4.2).

Pro vložení genové sekvence do vhodného vektoru se používají tři základní metody.

1. přímé klonování PCR (polymerázová řetězová reakce) produktů (lze využít u prokaryotních genů, pokud klonujeme eukaryotický gen obsahující introny, je výhodnější izolovat mRNA a tu pomocí reverzní transkriptázy přepsat do komplementární DNA (cDNA)) (NEB 2022)
2. ligace fragmentů DNA pomocí DNA ligázy (Casali a Preston 2003)
3. specifická rekombinace DNA katalyzovaná enzymy (Gibson 2011)

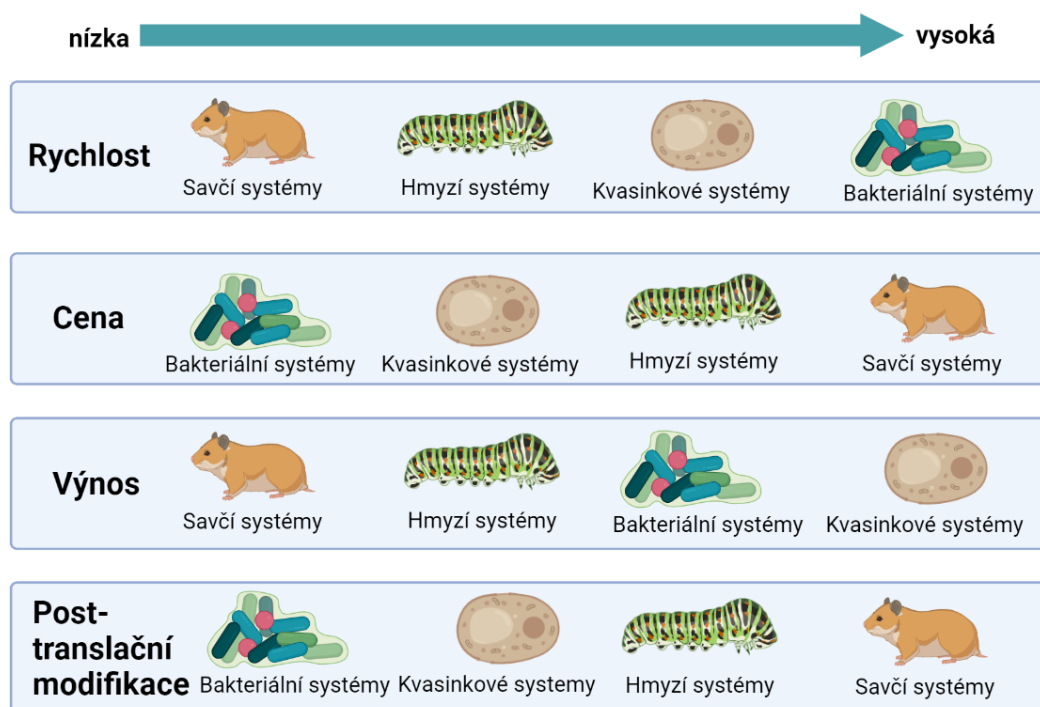
Připravený vektor se vkládá do expresního systému (bakteriální, hmyzí nebo savčí buňky), který je pro expresi proteinu nejvhodnější. Vnesení rekombinantní DNA do prokaryotické buňky se označuje jako transformace, vnesení do eukaryotické buňky jako transfekce. Chemicky upravené *E. coli* (CaCl₂, chemokompetentní buňky) jsou transformovány tepelným šokem (Kant et al. 2019). Další metoda je elektroporace, která je založena na dočasné destabilizaci buněčné membrány, způsobené elektrickým pulsem. Tato metoda se nejčastěji používá při transfekci eukaryotických buněk. Pro transformaci prokaryotických buněk se využívá infekce rekombinantními plazmidy, u hmyzích buněk bakuloviry (Celie et al. 2016).

Expres se vyjadřuje transkripcí a translací genu. Exprimovaný protein se z buňky izoluje nebo se sekretuje do růstového média. Pokud chceme využít přímé sekrece do média, na C nebo N konec požadovaného proteinu navážeme speciální sekreční sekvenci. Protein se pak přemístí z vnitřní strany membrány na vnější a uvolní se do média (Mackman et al. 1987). Pokud je protein exprimovaný v buňce, je nutné pro jeho izolaci vložit lyzační krok, jehož cílem je rozrušit buněčnou membránu buněk a uvolnit jejich obsah do roztoku. Lýzu buněk lze provést fyzikálními nebo chemickými metodami, nejčastěji však jejich kombinací (Wingfield 2015).

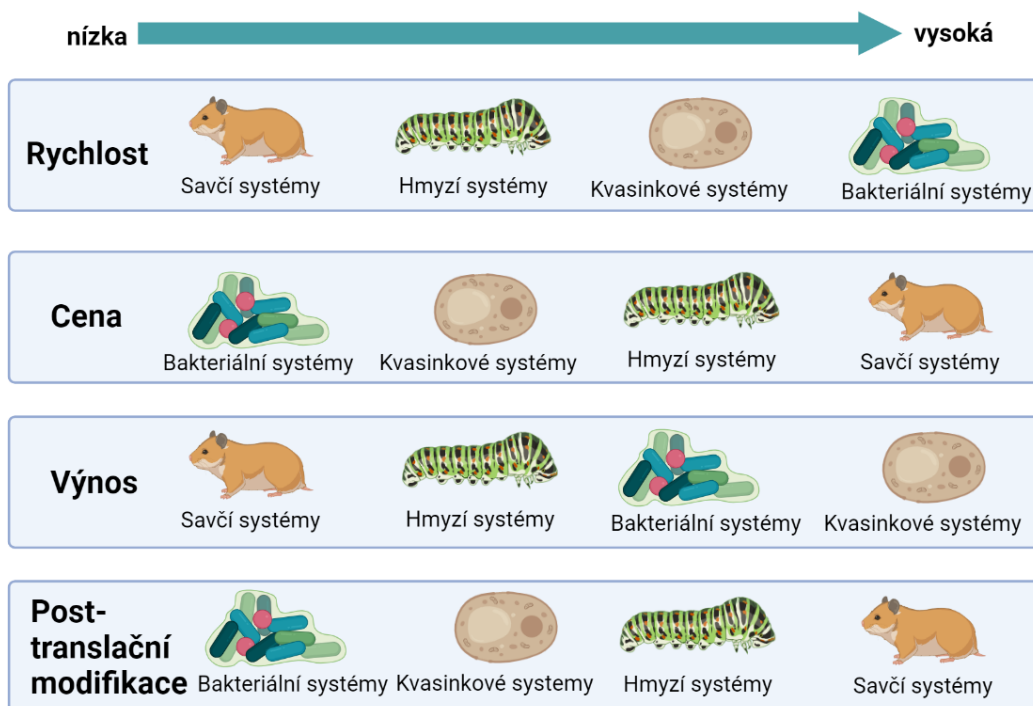
2.3.2 Expresní systémy

Hlavní rozdělení expresních systémů je na prokaryotní (bakteriální) a eukaryotní (např. kvasinkové, hmyzí, savčí). Použití různých expresních systémů má různé výhody a nevýhody. Zajímá nás především rychlost buněčného růstu, cena, výnos a posttranslační modifikace, které daný systém na vznikajícím rekombinantním proteinu provede

(



Obr. 2).



Obr. 2 Přehled expresních systémů a jejich výhod, zdroj: vlastní

2.3.2.1 Bakteriální systémy

Pro produkci rekombinantních proteinů se nejčastěji používají bakteriální systémy. Jsou oblíbené pro jednoduchou kultivaci bakteriálních buněk, jejich rychlý růst, vysoký výtěžek proteinu, genetickou manipulaci a z toho vyplývající finanční nenáročnost. Nevýhodou však je, že vzniklé proteiny nejsou posttranslačně modifikovány, jsou schopny produkce proteinu o max. velikosti ~150 kDa, často je omezená schopnost disulfidických vazeb a sekrečního mechanismu pro efektivní uvolňování proteinu do kultivačního média. Proteiny jsou exprimovány buď v cytosolu nebo se hromadí v inkluzních tělíscích, často nerozpustných a může tak vznikat nefunkční protein. I přesto je nejoblíbenější hostitelem pro produkci rekombinantních proteinů *E. coli* (Khow a Suntrarachun 2012).

2.3.2.2 Kvasinkové systémy

Kvasinky jsou lepší alternativou, pro produkci rekombinantních proteinů, k bakterii *E. Coli*. Produkce v kvasinkách je populární hlavně proto, že si zachovávají výhody bakteriálních expresních systémů (finanční nenáročnost, snadná genetická manipulace) a k tomu jsou navíc schopny některých eukaryotických posttranslačních modifikací

(Griffith et al. 2003). Nejpoužívanějšími hostiteli jsou *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula Polymorpha* nebo *Yarrowia lipolytica*. Proteiny vzniklé v kvasinkách nesou strukturní i funkční podobnosti k lidským nebo k těm, které vznikají ve vyšších eukaryotách (Mumberg et al. 1995). Některé kvasinky byly modifikovány, aby nesly další výhody, jako jsou třeba glykosylace. Nevýhodou je, že glykosylace často neproběhne správně, což může ovlivnit aktivitu enzymu. Díky všem informacím, které se o kvasinkách doposud ví (velký výběr vektorů, promotorů, selekčních markerů či techniky fermentace), jsou vědci schopni navrhnout efektivnější expresní systémy pro produkci proteinů a glykoproteinů (Celik a Calik 2012).

2.3.2.3 Hmyzí systémy

Hmyzí buňky jsou alternativou mezi bakteriálními a savčími expresními systémy. Kultivace je časově i finančně náročná. U hmyzích buněk si musíme dávat pozor na čistotu při práci, jsou totiž citlivější na kontaminaci než savčí buňky. Hmyzí buňky jsou sice schopny posttranslačních modifikací, ale glykosylace je odlišná od glykosylace v savčích buňkách. (Geisler et al. 2015). Nejčastěji využívaným hostitelem je *Spodoptera frugiperda* (Blýskavka kukuřičná) nebo *Trichoplusia ni* (Kovolesklec cizokrajný). U hmyzích buněk se obvykle používá infekce bakulovirem, který nese gen pro cílový protein. Inkubace bakuloviru je ale časově náročnější (dny) než příprava plazmidu (hodiny) (Weber a Fussenegger 2009).

2.3.2.4 Savčí systémy

Hlavní výhodou savčích buněk je jejich schopnost zajistit složení vzniklého proteinu do správné konformace a potřebné posttranslační modifikace, jako je metylace, fosforylace, acetylace, glykosylace atd., které jsou důležité pro správnou biologickou aktivitu rekombinantního proteinu (Khan 2013). Nevýhodou je vysoká cena produkce a celková náročnost podmínek pro kultivaci buněk. Mezi často používané patří buňky ovarií křečka čínského (CHO), myší myelomové buňky (NS0) či lidské embryonální ledvinné buňky (HEK293). Savčí systémy jsou pro přípravu proteinů nejlepší, i když jsou finančně náročné.

2.3.2.5 Specifické systémy

Mezi další expresní systémy, které jsou pro produkci proteinů možná méně využívané, ale poskytují mnoho výhod, patří třeba houby, řasy či mechy.

Z vláknitých hub se využívají druhy *Aspergillus*, *Penicillium* nebo *Trichoderma*. Výhodou houbových systémů je schopnost sekrece velkého množství proteinu do růstového média (Nevalainen et al. 2005). Nejsou tolik vhodné pro produkci lidských rekombinantních proteinů, protože v nich proteiny podléhají odlišným glykosylacím. Vlákňité houby jsou hlavní producenti primárních a sekundárních metabolitů (penicilin, cefalosporin), které jsou využívány v terapii (Ward 2012).

Naopak systémy ze zelených řas nejsou finančně náročné, jsou bezpečné, metabolicky rozmanité a nenáročné. Jelikož zelené řasy získávají energii fotosyntézou, požadavky na médium nejsou tak náročné. Omezené zdroje uhlíku v médiu snižují riziko kontaminace bakteriemi, což je výhodou. Nedávné studie dokázaly, že zelené řasy jsou schopny exprimovat, skládat a posttranslačně modifikovat savčí i jiné eukaryotické proteiny (Rasala a Mayfield 2015).

2.4 Purifikace

Finálním krokem produkce rekombinantního proteinu je purifikace. Purifikace je sled kroků, který vede k izolaci proteinu ze složitější směsi. Purifikační metody můžeme rozdělit do 4 typů podle využívaných vlastností proteinu na ty, které využívají vlastnosti povrchu, velikost a tvar, náboj a biologické vlastnosti jako je aktivita (Scopes 2001).

2.4.1 Chromatografické metody

Chromatografické metody se zabývají především povrchovým nábojem při daném pH a rozpustností. Využívá se stacionární fáze, kterou prochází mobilní fáze. Ta unáší separovanou látku stacionární fází, na níž se zachycuje dle rozdílů v rozpustnosti. Tyto rozdíly jsou důležité pro výběr vhodného rozpouštědla, a následném zisku extraktu, obsahující požadovaný protein.

Chromatografické metody se využívají zejména ve svislém kolonovém provedení. Patří sem mimo jiné i ionexová chromatografie, chromatofokusace, hydrofobní chromatografie, reverzní fáze, afinitní chromatografie a molekulová vylučovací chromatografie (Mixa 2010).

2.4.2 Afinitní chromatografie

Nejvíce specifickou metodou je afinitní chromatografie, která se provádí v kolonách. Purifikace je výrazně jednodušší, pokud cílový protein obsahuje afinitní značku (tag), která je navázána na N- nebo C- konci.

Mezi nejčastěji používané tagy patří polyhistidin, označovaný jako His-tag nebo His6. Obvykle se skládá z 6 (ale klidně i 2 až 10) histidinových zbytků. Vzhledem k jeho malé velikosti (0,84 kDa) a díky tomu, že při fyziologickém pH je prakticky bez náboje, neinterferuje se strukturou a obvykle nenarušuje skládání proteinu (Loughran et al. 2017).

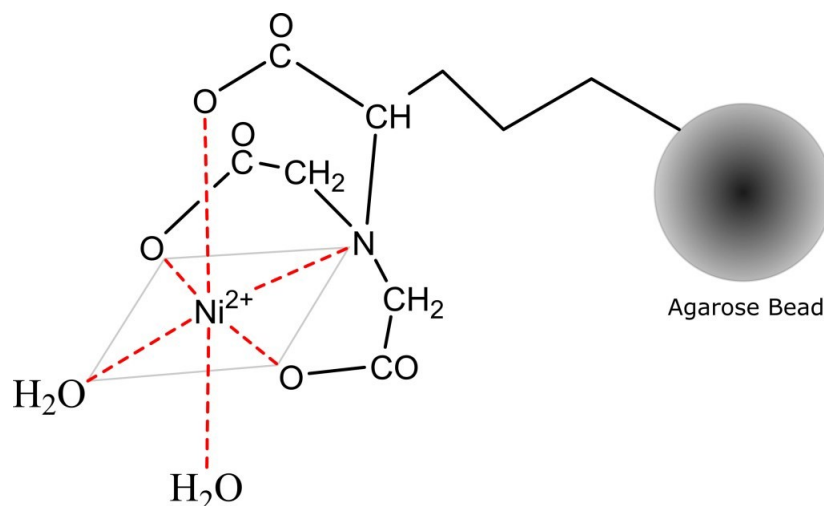
Dalším používaným tagem je maltózu vázající protein (maltose binding protein – MBP). Proteiny značené pomocí MBP mohou být purifikovány pomocí afinitní chromatografie na zesítěné amylozové pryskyřici. Dále se využívá značení glutatonin S-transferázou (GST), kdy se následně aplikuje afinitní chromatografie na glutatonin sefaroze (Kimple et al. 2013).

Díky tagu se protein specificky zachytí na chromatografické koloně. Aby se dosáhlo co nejvyšší čistoty proteinu, je často využíváno tandemového řazení tagů. Proteiny, které se nenavážou, se poté vymyjí v promývacím kroku a v dalším kroku se cílový protein uvolní přidáním kompetitivního ligandu, změnou pH, iontové síly či polarity (Růčková et al. 2014).

2.4.3 Purifikační systém Ni-NTA

Ni-NTA agaróza je speciálně vytvořena pro purifikaci rekombinantních proteinů, které jsou značeny His-tagem. Histidin snadno tvoří koordinační vazby s imobilizovanými ionty přechodných kovů (Co^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{3+}). Nejčastěji se ve spojení s His-tagem používá Ni-NTA agaróza obsahující nitrilotrioctovou kyselinu (NTA) nabitou Ni^{2+} a vázanou dlouhými oddalujícími raménky s agarósou CL-6B (viz Obr. 3) (Kimple et al. 2013).

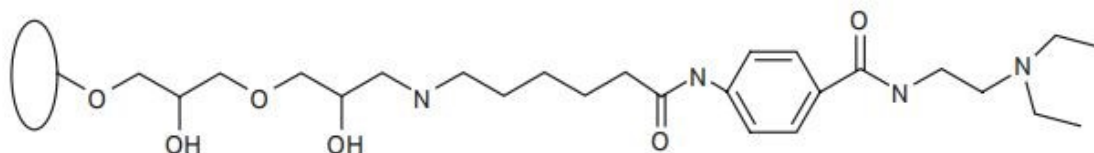
Proteiny, které jsou navázány na resin, jsou pak vymývány puftrem o nízkém pH nebo imidazolem. (Novex by life technologies 2015). Tento typ purifikace se provádí v gravitačních kolonách. Metoda je jednoduchá a robustní.



Obr. 3 Struktura Ni-NTA purifikační pryskyřice, zdroj: (Biotrend 2021)

2.4.4 Purifikační systém Prokainamid sefarósa

Prokainamid sefarósa slouží k purifikaci ChE od roku 1978. Ačkoliv tato pryskyřice byla vynalezena pro purifikaci BChE, je specifitější pro purifikaci AChE. Stejně jako předchozí pryskyřice, funguje PS na principu afinitní chromatografie. Ligand prokainamid je kovalentně navázán na agarózovou matici a jeho dlouhé hydrofilní konce (viz Obr. 4) interagují s ChE. Poté se vhodným elučním činidlem uvolní ChE z vazby na pryskyřici (Cytiva 2021).

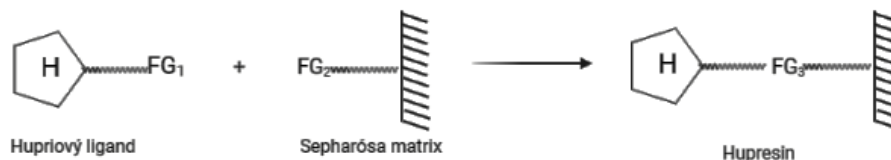


Obr. 4 Hydrofilní rameno prokainamid sefarósy, která váže cílovou ChE
(Cytiva 2021)

2.4.5 Purifikační systém Hupresin

Hupresin je od roku 2012 nástupcem PS pro purifikaci BChE. Tato pryskyřice je selektivní pryskyřicí pro purifikaci BChE. Hupresin se skládá ze dvou komponent: sefarosové matrice a huprinového ligandu, který specificky váže BChE díky vysoké vazebné afinitě (Obr. 5). Hupresin nemůže být použit k purifikaci AChE, protože ji váže příliš silně. AChE se pak nedá z této vazby uvolnit bez použití denaturačních pufrů.

Tento ligand je speciálně syntetizovaný hybrid takrinu a huprezinu, který slouží jako kompetitivní inhibitor BChE (Lockridge et al. 2018).



Obr. 5 Hupresin složený ze dvou komponent, zdroj: vlastní

2.5 Hodnocení čistoty

Nedílnou součástí purifikace je monitorování čistoty proteinu v průběhu i na konci purifikace. Pokud se jedná o biologicky aktivní protein, můžeme tyto vlastnosti využít k hodnocení čistoty. Pokud se jedná např. o protein strukturní, využíváme alternativní cestu, antigenní vlastnosti (detekce pomocí protilátek) (Lillehoj a Malik 1989).

Pro hodnocení čistoty ChE bylo využito měření koncentrace proteinu pomocí kyseliny bicionchoniové (*BCA Protein Assay Kit*), viz kapitola 0, kdy se výsledná koncentrace proteinu měřila spektrofotometricky (ThermoFisher 2021). Mezi další metody hodnocení koncentrace proteinu patří např. Lowryho metoda či Bradfordův test (Netinbag 2022).

Dále se k hodnocení čistoty používá gelová elektroforéza, která využívá k separaci odlišný náboj proteinu, nebo velikost molekuly či odlišnou pohyblivost v elektrickém poli. Pro mou práci byla použita SDS - PAGE elektroforéza, která využívá polyakrylamidový gel obohacený o dodecylsírán sodný (SDS) a β -merkaptoethanol ve vzorkovém pufru, který slouží jako denaturační činidlo. V tomto případě je cílový protein na gelu v monomerní formě a dělí se podle své molekulové hmotnosti. (Lillehoj a Malik 1989).

Purifikovaný protein můžeme následně charakterizovat pomocí spektrofotometrických metod: stanovení aktivity a výpočet kinetických konstant jako je V_{\max} a K_M .

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a kity

3.1.1 Chemikálie

- dimethylsulfoxid (DMSO)
- acetylthiocholin jodid (ATChI)
- butyrylthiocholin jodid (BTChI)
- dodecylsírán sodný (SDS)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan sůl (Tris-HCl)
- tris(hydroxymethyl)aminomethan-báze (Tris-báze)
- akrylamid
- kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)
- imidazol
- *N,N,N',N'*-tetramethyletan-1,2-diamin (TEMED)
- 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB)
- peroxodisírán amonný (APS)
- β -merkptoethanol, chlorid sodný (NaCl)
- dihydrogen fosforečnan draselný (KH_2PO_4)
- hydrogen fosforečnan sodný (Na_2HPO_4)
- donepezil
- etopropazin
- glycin
- glycerol
- Ni-NTA agaróza byla zakoupeny u Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).
- prokainamid sefarósa byla zakoupena u GE Healthcare (Chicago, IL, USA).
- Hupresinová pryskyřice byla zakoupena u Chemforase (Paříž, Francie).
- pufr Tris-HCl pH 8,8 byl zakoupen u Bio-Rad.

3.1.2 Kity

Micro BCA Protein Assay kit byl zakoupen u Thermo Fisher Scientific.

3.2 Biologický materiál

Supernatant obsahující ChE v médiu.(enzymy AChE a BChE byly exprimovány v buňkách Expi293)

3.3 Sterilní plast a spotřební materiál

- 96-jamkové destičky číré byly zakoupeny u Nalge Nunc International (New York, NY, USA).
- Centrifugační mikrozkušavky (0,5, 1,5, 2 a 5 ml) byly zakoupeny u Eppendorf (Hamburk, Německo).
- Kolonky Econo-Pac® column byly zakoupeny u Bio-Rad.
- Dialyzační kazety byly zakoupeny u Thermo Fisher Scientific.

3.4 Instrumentace

- Thermostrepačka MTC-100 Thermoshaker Incubator (MI Instruments, Hanzghou, Čína),
- pH metr-Titrando 820 (Metrohm, Herisau, Švýcarsko),
- výrobek ultračisté vody (H₂O) na bázi reverzní osmózy typ 06 (AquaOsmotic, Tišnov, Česká republika),
- centrifuga U-320 R, centrifuga M-240 R (Boeco, Hamburk, Německo),
- míchačka big squide, Vrotex Lab Dancer, Třepačka destiček (IKA, Staufen v Breisgau, Německo),
- třepačka/kývačka MR-1 (Biosan, Riga, Lotyšsko),
- elektroforéza (Bio-Rad),
- hlubokomrazicí box -80 °C (ESCO, Horsham, PA, USA),
- lednice (Liebherr, Bulle, Švýcarsko),
- multifunkční destičkový reader Synergy 2 (BioTek, Winooski, VT, USA),
- laboratorní váhy CPA 225D (Sartorius, Gottingen, Německo),
- výrobek ledu CB 249 A HC (Berma, Modletice, Česká republika),

- Azure c280 (Azure biosystems, Dublin, CA, USA).

3.5 Vypracování metodické práce

Purifikace, identifikace a validace kinetických vlastností enzymů AChE a BChE byla provedena na KTVF FVZ UO.

3.6 Purifikace lidské rekombinantní AChE

Supernatant, který byl po expresi proteinu o celkovém objemu 30 ml, byl rozdělen na tři alikvotní části (10 ml) a následně zmražen. Před každou purifikací byla vždy jedna část rozmrazena a rozdělena na dvě po 5 ml pro každou pryskyřici, tento postup byla zopakován celkem 3x.

Ze supernatantu obsahující AChE byl odebrán vzorek pro změření aktivity enzymu. Poté byl supernatant převeden pomocí sterilní jehly a stříkačky do dialyzační kazety, která byla předem navlhčená Tris pufrem viz **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..** Kazety byly umístěny do kádinek s Tris pufrem o pH 7,5 a supernatant byl dialyzován při teplotě 4 °C do druhého dne. Výměna pufru probíhala po 2 hodinách. Tento proces byl zopakován 3x. Druhý den byl odebrán vzorek pro kontrolní změření aktivity.

Do jedné Econo-Pac kolony bylo napipetováno 5 ml pryskyřice prokainamid sefarósy a do druhé 5 ml pryskyřice Ni-NTA agarósy. Obě kolony naplněné pryskyřicemi byly promyty 10 ml 20 mM TRIS pufrem s 0,3 M NaCl o pH 7,5. Objem supernatantu byl rozdělen na polovinu. Do obou kolon se napipetovalo 5 ml enzymu AChE. Objem pryskyřice se navyšuje podle objemu supernatantu. Kolony obsahující pryskyřici a supernatant byly ponechány na kývačce Mini Rocker MR/1 při teplotě 4 °C. V průběhu vazby enzymu na pryskyřici byla sledována aktivita enzymu modifikovanou Ellmanovou metodou (viz kapitola 3.10.1). Jakmile byla aktivita vzorku nulová, byl roztok z kolony vypuštěn.

Kolona obsahující pryskyřici prokainamid sefarósu, na které byla navázána AChE, byla promyta 20 mM Tris pufrem o pH 7,5 a poté stejným pufrem který při první eluci obsahoval 0,1 M NaCl a při druhé 0,3 M NaCl. Následně byl enzym z pryskyřice uvolněn pomocí elučního roztoku viz Tab. 2.

Kolona obsahující pryskyřici Ni-NTA agarózu byla promyta 5 ml roztoku imidazolu o třech různých koncentracích. Nejprve 25 mM imidazolem, poté 50 mM

roztokem a nakonec byl enzym uvolněn z pryskyřice pomocí 250 mM roztoku imidazolu.

Poté byly odebrány vzorky pro kontrolní měření aktivity a eluát z obou purifikací byl opět dialyzován (jako před purifikací) v 20 mM roztoku Tris pufru o pH 7,5 viz Tab. 1. Roztok byl po 2 hodinách měněn, výměna roztoku byla provedena 3x. Dialýza byla ponechána do druhého dne. Enzym byl zmražen v hlubokomrazícím boxu při teplotě – 80 °C

Tab. 1 – Složení 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan pufru pH 7,5, zdroj: vlastní

Složka	Množství
tris(hydroxymethyl)aminomethan sůl	2,0488 g
tris(hydroxymethyl)aminomethan báze	0,8356 g
destilovaná voda	doplnit do 1 l

Tab. 2 – Složení elučního roztoku AChE, zdroj: vlastní

Složka	Množství
10 mM tetramethylamonium jodid	2,105 g
1mM dekametonium bromid	0,0418 g
1 M chlorid sodný	5,844 g
20 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan pufr pH 7,5	doplnit do celkového množství 100 ml

3.7 Purifikace lidské rekombinantní BChE

Lidská rekombinantní BChE byla purifikována stejným postupem jako AChE (kapitola 3.6), 3.6 pouze s tou odlišností, že byla použita selektivní pryskyřice Hupresin a Ni-NTA agaróza. Do první kolony bylo napipetováno 2 ml Hupresinu. Do druhé kolony bylo napipetováno 2 ml Ni-NTA agarózy. Obě pryskyřice byly následně promyty

20 mM Tris pufrům o pH 7,5 a bylo k nim připipetováno 5 ml supernatantu BChE.

Eluce BChE z Ni-NTA agarózy proběhla stejně jako v předchozí kapitole 3.6. Navázaná BChE na pryskyřici Hupresin byla nejdříve promyta 20 mM Tris pufrům o pH 7,5 a poté stejným pufrům který při prvním promytí obsahoval 0,1 M NaCl a při druhé 0,3 M NaCl. Následně byl enzym z pryskyřice uvolněn pomocí elučního roztoku viz Tab. 3.

Opět byly odebrány vzorky pro kontrolní změření aktivity a eluát z obou purifikací byl dialyzován v 20 mM roztoku Tris pufru o pH 7,5 viz Tab. 1. Roztok byl po 2 hodinách měněn, jeho výměna proběhla 3x a dialýza byla ponechána do druhého dne. Enzym byl zmražen v hlubokomrazícím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 3 – Složení elučního roztoku BChE, zdroj: vlastní

Složka	Množství
Tris báze	0,2422 g
trimethylamonium chlorid	0,9557 g
destilovaná voda	0,1M/100 ml

3.8 Analýza ChE gelovou elektroforézou

Pro analýzu purifikované AChE a BChE byla využita gelová elektroforéza, která separovala proteiny na základě velikosti molekuly proteinu, díky přidanému SDS. Čím byla molekula větší, tím se gelem pohybovala pomaleji. Analýza proběhla na 12 %

polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). Složení gelu popisují následující tabulky (Tab. 4 a Tab. 5).

3.8.1 Složení gelu

Tab. 4 – Složení 12 % separačního gelu (2 mini gely), zdroj: vlastní

Složka	Objem
destilovaná voda	5 ml
1,5 M tris(hydroxymethyl)aminomethan sůl pH 8,8	3,8 ml
40% akrylamid	6,0 ml
10 % dodecylsírán sodný	150 μ l
10 % peroxodisírán amonný	50 μ l
tetramethylethylendiamin	6 μ l

Tab. 5 – Složení 4% zaostřovacího gelu (2 mini gely), zdroj: vlastní

Složka	Objem
destilovaná voda	5 ml
1,5 M tris(hydroxymethyl)aminomethan sůl pH 8,8	3,8 ml
40% akrylamid	6,0 ml
10 % dodecylsírán sodný	150 μ l

Složka	Objem
10 % peroxidisíran amonný	50 μ l

3.8.2 Příprava vzorků na gelovou elektroforézu

Bylo smícháno 85 μ l vzorkového pufru viz Tab. 6 a 15 μ l β -merkatoethanolu. 60 μ l vzorku enzymu bylo smícháno s 30 μ l směsi (vzorkového pufru a β -merkatoethanolu) a povařeno při 95 °C po dobu 5 minut. Na gel bylo nanášeno 5 μ l hmotnostního markeru a 30 μ l vzorku. Elektroforéza proběhla v prostředí elektrodového pufru pH 8,5 viz

Tab. 7 za konstantního napětí 200 V v proudu 60 mA na 1 gel po dobu 1 hodiny.

Tab. 6 – Složení vzorkového pufru, zdroj: vlastní

Složka	Množství
0,5 M tris(hydroxymethyl)aminomethan sůl pH 6,8	3,75 ml
glycerol	3 ml
dodecylsírán sodný	0,69 g
destilovaná voda	doplnit do celkového množství 8,5 ml

Tab. 7 – Složení elektrodového pufru, zdroj: vlastní

Složka	Množství
50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan	15 g

Složka	Množství
báze	
384 mM glycin	72 g
0,1 % dodecylsírán sodný	2,5 g
destilovaná voda	doplnit do celkového množství 2,5 l

3.8.3 Barvení gelu

Po skončení elektroforézy byla od gelu odstraněna část zaostřovacího gelu, gel byl opláchnut destilovanou vodou a barven na modro viz Tab. 8 po dobu 10 minut a poté odbarven odbarvovacím roztokem viz Tab. 9.

Tab. 8 – Složení roztoku pro modření gelu, zdroj: vlastní

Složka	Množství
Comassie Brilliant Blue R 250	1,25 g
methanol	227 ml
kyselina octová	46 ml
destilovaná voda	doplnit do celkového množství 500 ml

Tab. 9 – Složení odbarvovacího roztoku, zdroj: vlastní

Složka	Množství
methanol	300 ml
kyselina octová	100 ml
destilovaná voda	600 ml

3.9 Stanovení koncentrace proteinů

Celkový obsah proteinů byl stanoven pomocí kolorimetrické metody, jejíž princip je založen na redukci měďnatého iontu na měďný po reakci s peptidovou vazbou a jeho následnou reakcí s kyselinou bicinchoninovou (BCA). Pro měření byl použit komerční Protein Assay kit. Jako standard byl použit hovězí sérový albumin (BSA), z něhož byla připravena koncentrační řada v rozmezí koncentrace 200 – 1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorky i standard byly naředěny 0,1 M fosfátovým pufrem o pH 7,4. V jamce mikrotitrační destičky bylo smícháno 150 μl standardu (nebo vzorku) a 150 μl pracovního roztoku BCA, která byla smíchána ze složek A, B a C dle pracovního postupu přiloženému v kitu. Směs byla promíchána a inkubována 1 h při teplotě 37 °C. Spektrofotometricky se změřila barevná změna pomocí multifunkčního readeru Synergy při vlnové délce 562 nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinu.

3.10 Validace kinetických vlastností lidských rekombinantních ChE

3.10.1 Princip Ellmanovy metody

Ellmanova metoda je modifikovaná kolorimetrická metoda pomocí níž byla stanovena aktivita ChE. Princip této metody je založen na hydrolyze substrátu (ATChI či BTChI) působením příslušné ChE za vzniku thiocholinu a kyseliny octové (Obr. 6) (kyseliny máselné u BChE). Měříme intenzitu žlutého zbarvení, které vzniká při reakci thiocholinu s DTNB. Thiocholin redukuje disulfidický můstek v molekule DNTB sám se váže na vzniklou -SH skupinu (Obr. 7). Uvolňuje se 5-merkpto-2-nitrobenzoový aniont (TNB), u kterého dochází ke konjugaci dvojných vazeb (Obr. 8) za vzniku barevného chromoforu, který je detekován při vlnové délce 412 nm. Jedná se o citlivou metodu, pro stanovení bylo použito 10 μl enzymu (Ellman et al. 1961).

3.10.2 Stanovení aktivity

ChE byly naředěny 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,4 na aktivitu cca 300 $\Delta_{A412} \cdot \text{min}^{-1}$ a stabilizovány albuminem. V průběhu měření se ChE uchovávaly v ledové tříšti, aby se zamezilo kolísání jejich aktivity. Měření probíhalo v 96-jamkových čirých destičkách s plochým dnem. Do každé destičky bylo napipetováno 10 μl enzymu, 50 μl 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,4 a 20 μl 2,5 mM DTNB. Směs v destičkách byla promíchána na třepačce a destička byla vložena na 5 minut pro inkubaci při 37 °C do spektrofotometru, kde docházelo ke kontinuálnímu protřepávání. Po uplynutí inkubační doby byl do jamek přidán 20 μl 10 mM substrátu (ATChI neo BTChI), čímž se odstartovala reakce. Absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm. Hodnoty aktivity v % byly vypočítány následujícím postupem Obr. 9. Specifická aktivita vztažená na hmotnost enzymu byla vypočítána dle Obr. 10. Měření bylo provedeno v triplikátu a výsledky byly hodnoceny pomocí GrapdPad Prism 5 (Grahpad Software Inc, San Diego, CA, USA).

Enzym byl naředěn 0,1M fosfátovým pufrům o pH 7,4 na aktivitu $\sim 0,3 \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$. Následně byl enzym stabilizován přidávkem albuminu 1 mg/ml^{-1} roztoku. Takto připravený enzym byl pak použit pro měření Michaelisovy konstanty a stanovení hodnoty IC_{50} selektivního inhibitoru AChE.

$$\text{aktivita v \%} = \left(1 - \frac{(\text{aktivita enzymu} - \text{aktivita inhibovaného enzymu})}{\text{aktivita enzymu}} \right) \times 100$$

Obr. 9 Výpočet aktivity, zdroj: vlastní

$$\text{specifická aktivita} = \frac{\text{průměrná hodnota absorbance}}{\text{koncentrace enzymu}} [U \cdot \text{mg}^{-1}]$$

Obr. 10 Výpočet specifické aktivity, zdroj: vlastní

3.10.3 Stanovení Michaelisovy konstanty

Michaelisova konstanta (K_m) je koncentrace substrátu, při níž je rychlost reakce rovna polovině maximální rychlosti, (polovina enzymu je přítomna jako enzym-substrát). Tato konstanta byla určena modifikovanou Ellmanovou metodou (viz kapitola 3.10.1).

Michaelisova konstanta se používá v praxi místo substrátové konstanty K_s . Vyjadřuje afinitu enzymu k substrátu a je specifická pro každý substrát. Čím je K_M nižší, tím je afinita enzymu k substrátu vyšší. Pro zjištění hodnoty K_m byla připravena koncentrační řada substrátu ATChI, které byla proměřena v triplikátu. Pro výpočet hodnoty K_m byl použit jiný vzorec (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.1**), než se standardě používá, protože enzym byl inhibován nadbytkem substrátu. Při výpočtu pomocí programu GraphPad Prism 5 byla pro obě ChE určena maximální rychlosti reakce (V_{max}). V_{max} je definována takovou koncentrací substrátu, kdy je rychlost průběhu reakce poloviční k maximální rychlosti (Copeland 2000).

$$Y = \frac{V_{max} \times X}{K_m + X \times \left(1 + \frac{X}{K_i}\right)}$$

Obr. 11 Výpočet hodnoty K_m , zdroj: vlastní

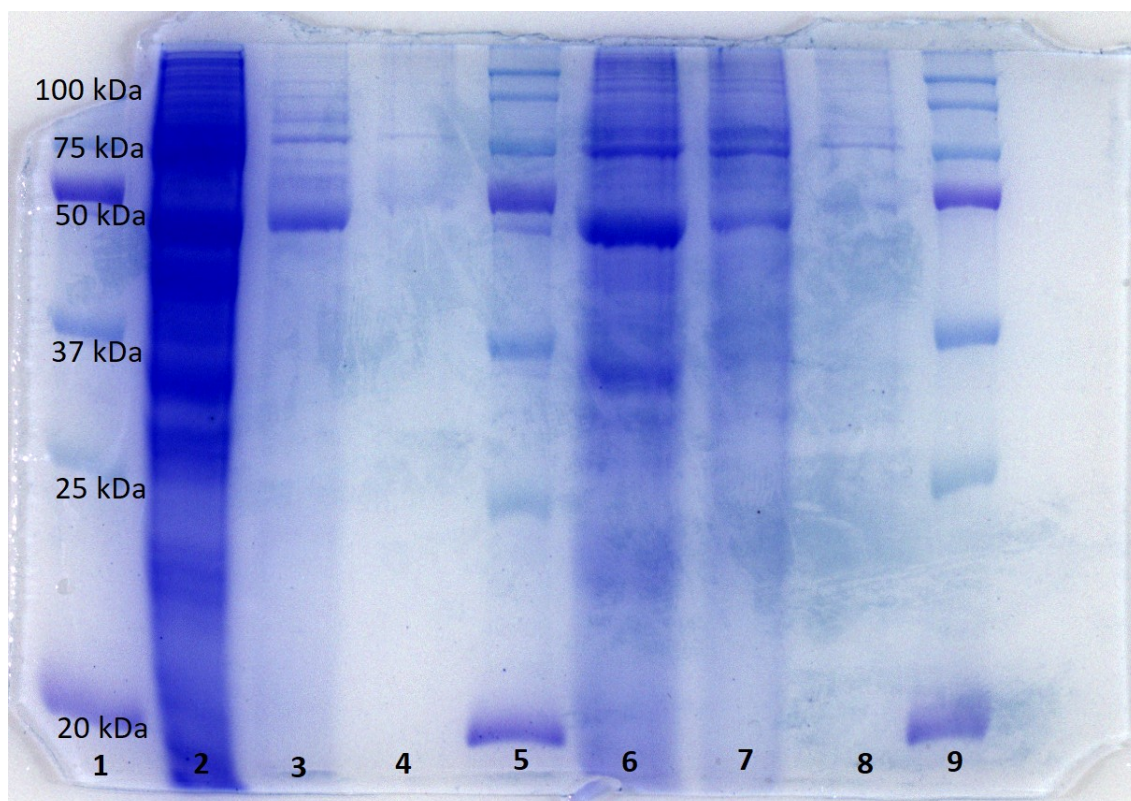
3.10.4 Stanovení IC_{50} standardního inhibitoru

Hodnota IC_{50} udává takovou koncentraci standardního inhibitoru, která způsobí pokles aktivity enzymu o 50 %. Pro hodnocení AChE byl použit reverzibilní nekompetitivní inhibitor donepezil, který je vysoce selektivní pro tento enzym. Byla připravena koncentrační řada v rozmezí od 10^{-3} do 10^{-9} M v destilované vodě. Pro BChE byl použit selektivní inhibitor Etopropazin. Aktivita ChE byla změřena v 96-jamkové číré destičce s plochým dnem (viz kapitola **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Hodnota aktivity v % byly vypočítány viz Obr. 9.

4. Výsledky

4.1 SDS-PAGE gelová elektroforéza

Reprezentativní výsledky SDS-PAGE purifikované AChE (~70 kDa) a BChE (~70 kDa) s použitím různých pryskyřic na (Obr. 12).



Obr. 12 SDS-PAGE (gelová elektroforéza s přidavkem dodecylsulfátu sodného na polyakrylamidovém gelu), 1. hmotnostní marker, 2. acetylcholinesterasa (AChE) - supernatant, 3. purifikovaná AChE pomocí prokainamid sefarósu (PS), 4. purifikovaná AChE Ni-NTA (nikl-nitriľtrioctová kyselina), 5. marker, 6. butyrylcholinesterasa (BChE) - supernatant, 7. purifikovaná BChE pomocí pryskyřice Hupresin, 8. purifikovaná BChE Ni-NTA, 9. hmotnostní marker. Zdroj: vlastní fotografie

4.2 Stanovení koncentrace

Hodnota koncentrace proteinu pro AChE purifikovanou pomocí pryskyřice PS byla 23,94 [μg/ml].

Hodnota koncentrace proteinu pro AChE purifikovanou pomocí pryskyřice Ni-NTA byla 1,17 [μg/ml].

Hodnota koncentrace proteinu pro BChE purifikovanou pomocí pryskyřice Hupresin byla 4,85 [μg/ml].

Hodnota koncentrace proteinu pro BChE purifikovanou pomocí pryskyřice Ni-NTA byla 0,42 [μg/ml].

4.3 Validace kinetických vlastností

4.3.1 Aktivita enzymu

Aktivita AChE byla měřena optimalizovanou Ellmanovou metodou. Naředěný a stabilizovaný enzym albuminem byl použit pro měření Michaelisovy konstanty a stanovení hodnoty IC₅₀ selektivního inhibitoru AChE. Aktivita BChE byla měřena stejným způsobem.

Průměrná aktivita AChE po purifikaci pomocí PS byla 1,203 ΔA·min⁻¹.

Průměrná aktivita AChE po purifikaci pomocí Ni-NTA byla 2,653 ΔA·min⁻¹.

Průměrná aktivita BChE po purifikaci pomocí Hupresinu byla 0,668 ΔA·min⁻¹.

Průměrná aktivita BChE po purifikaci pomocí Ni-NTA byla 1,470 ΔA·min⁻¹.

4.3.2 Specifická aktivita

Specifická aktivita byla spočítána dle vzorce na Obr. 10.

Specifická aktivita pro AChE purifikovanou pomocí pryskyřice PS byla 5025 U · mg⁻¹

Specifická aktivita pro AChE purifikovanou pomocí pryskyřice Ni-NTA byla 226 752 U · mg⁻¹.

Specifická aktivita pro BChE purifikovanou pomocí pryskyřice Hupresin byla 13 773 U · mg⁻¹.

Specifická aktivita pro BChE purifikovanou pomocí pryskyřice Ni-NTA byla 350 000 U · mg⁻¹.

4.3.3 Michaelisova konstanta a maximální rychlost reakce

Kinetické parametry lidské rekombinantní AChE a BChE K_m a V_{max} , byly získány s pomocí programu GraphPad Prism 5 (Obr. 13, 14, 15, 16). Výsledek je vyjádřen jako hodnota průměru z 3 nezávislých stanovení \pm SEM. Výsledné hodnoty K_m byly porovnány s výsledky zveřejněnými v odborné literatuře.

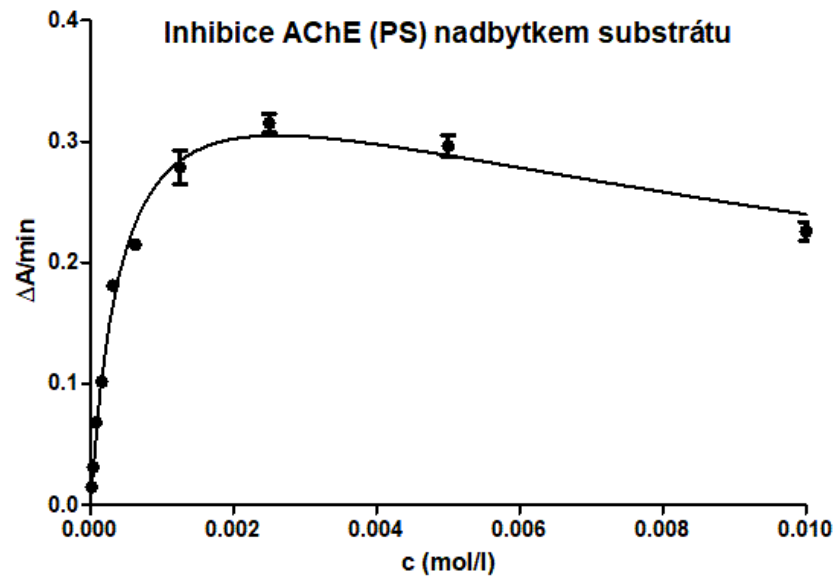
Hodnota K_m (Obr. 13) pro AChE purifikovanou pryskyřicí PS byla $0,000456 \pm 0,000042$ M a hodnota V_{max} byla $0,412 \pm 0,015 \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$.

Hodnota K_m (Obr. 14) pro AChE purifikovanou pryskyřicí Ni-NTA byla $0,000281 \pm 0,000027$ M a hodnota V_{max} byla $0,382 \pm 0,013 \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$.

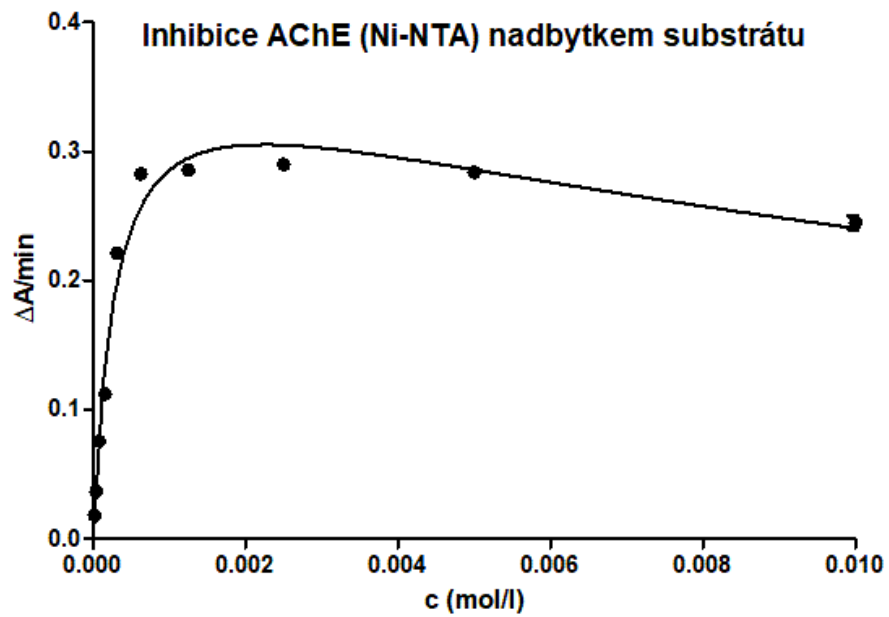
Hodnota K_m (

Obr. 15) pro BChE purifikovanou pryskyřicí Hupresin byla $0,001342 \pm 0,000113E \cdot 10^{-4}$ mM a hodnota V_{max} byla $0,651 \pm 0,020 \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$.

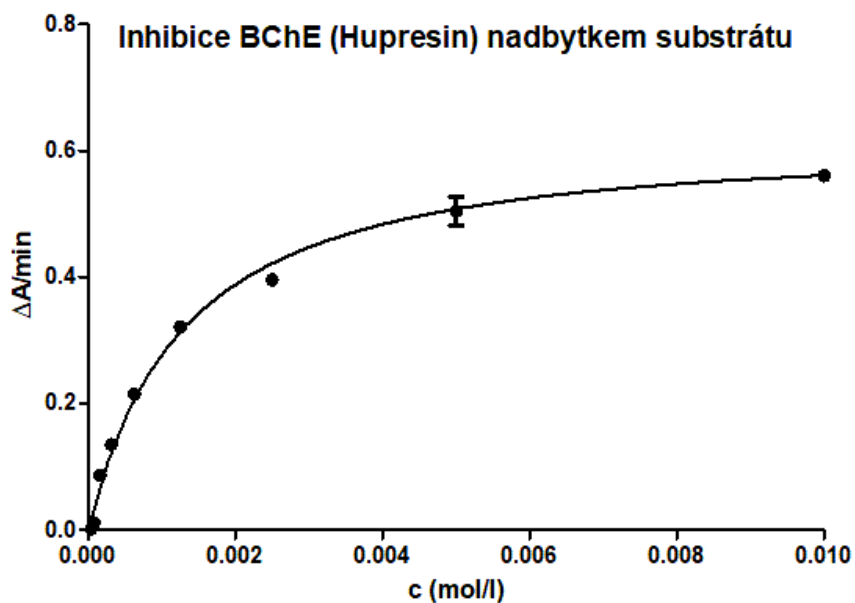
Hodnota K_m (Obr. 16) pro BChE purifikovanou pryskyřicí Ni-NTA byla $0,000889 \pm 0,000064$ M a hodnota V_{max} byla $0,458 \pm 0,008 \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$.



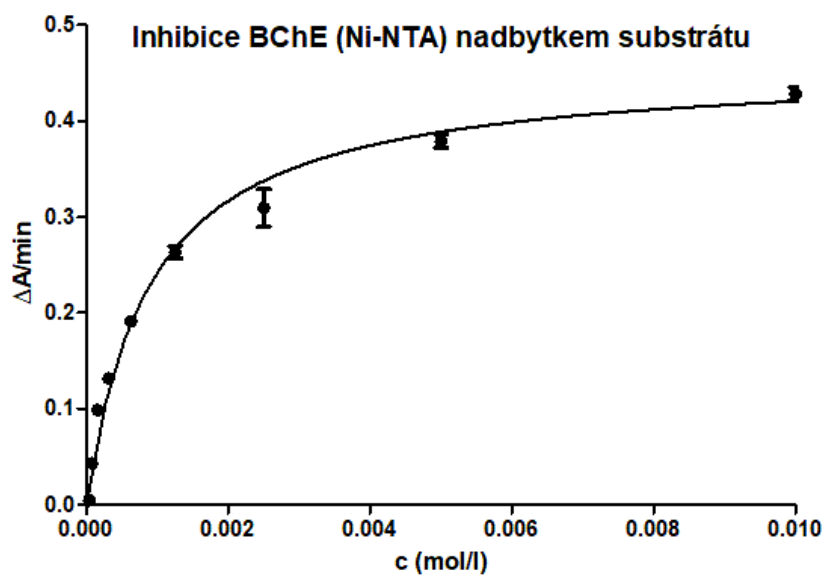
Obr. 13 Průběh inhibice acetylcholinesterasy (AChE), purifikované prokainamid sefárosou (PS), nadbytkem substrátu acetylthiocholin jodid (ATChI)



Obr. 14 Průběh inhibice acetylcholinesterasy (AChE), purifikované NI-NTA pryskyřicí, nadbytkem substrátu acetlthiocholin jodidu



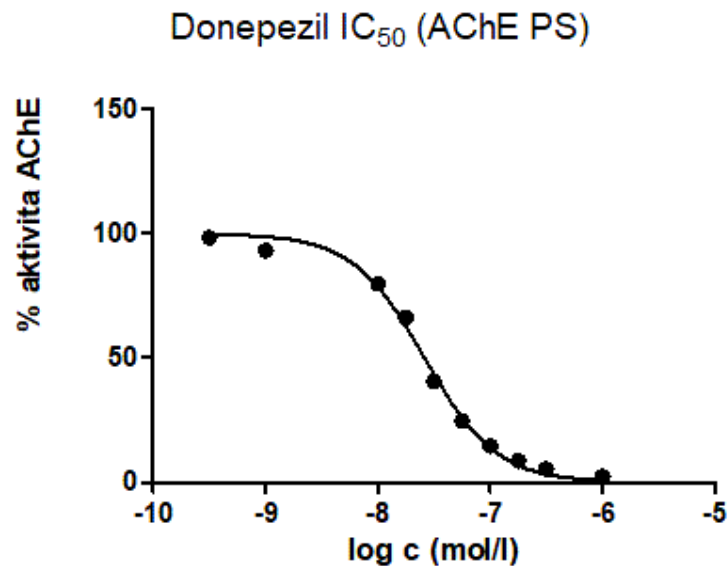
Obr. 15 Průběh inhibice butyrylcholinesterasy (BChE), purifikované pryskyřicí Hupresin, nadbytkem substrátu butyrylthiocholin jodidu (BTChI)



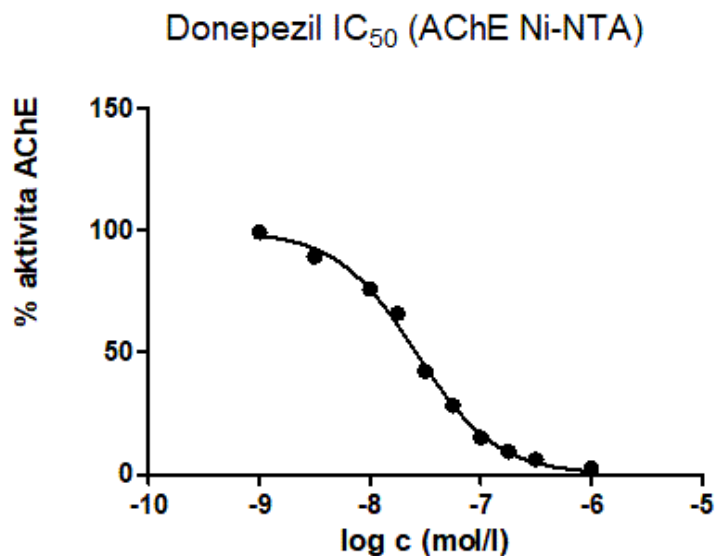
Obr. 16 Průběh inhibice butyrylcholinesterasy (BChE), purifikované NI-NTA pryskyřicí, nadbytkem substrátu butyrylthiocholin jodidu (BTChI)

4.3.4 IC₅₀ donepezilu

Hodnota IC₅₀ pro obě AChE byla 26,1 nM nezávisle na metodě purifikace (viz Obr. 17 a Obr. 18). Výsledky byly spočítány jako průměr ze tří nezávislých měření. Pro výpočet byl použit program GraphPad Prism 5. Naměřená hodnota IC₅₀ byla porovnána s výsledky zveřejněnými v odborné literatuře.



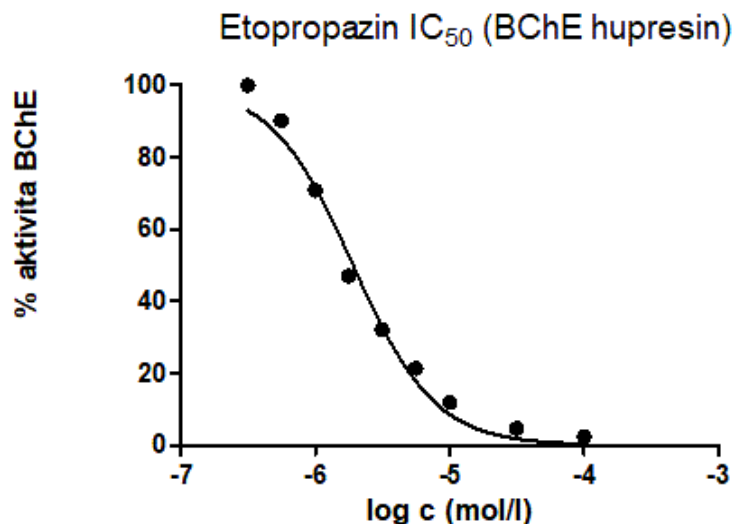
Obr. 17 Inhibiční účinek různých koncentrací donepezilu na acetylcholinesterasy (AChE) purifikovanou pryskyřicí prokainamid sefarosa (PS)



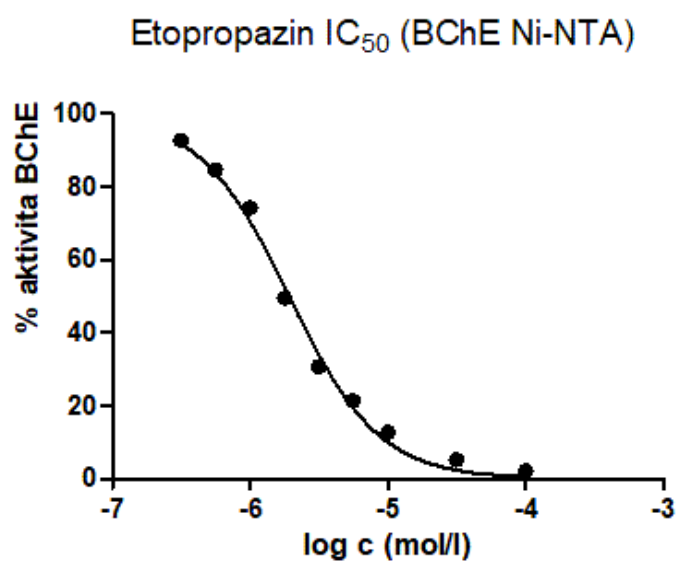
Obr. 18 Inhibiční účinek různých koncentrací donepezilu na acetylcholinesterasy (AChE) purifikovanou pryskyřicí Ni-NTA

4.3.5 IC₅₀ etopropazinu

Hodnota IC₅₀ etopropazinu pro obě BChE byla 1,92 μM nezávisle na metodě purifikace (viz Obr. 19 a Obr. 20). Výsledky byly spočítány jako průměr ze tří různých měření. Pro výpočet byl použit program GraphPad Prism 5. Naměřená hodnota IC₅₀ byla porovnána s výsledky zveřejněnými v odborné literatuře.



Obr. 19 Inhibiční účinek různých koncentrací etopropazinu na butyrylcholinesterasu (BChE) purifikovanou pryskyřicí Hupresin



Obr. 20 Inhibiční účinek různých koncentrací etopropazinu na butyrylcholinesterasu (BChE) purifikovanou pryskyřicí Ni-NTA

5. Diskuze

V rámci této bakalářské práce byly porovnány 3 pryskyřice (Ni-NTA, PS a Hupresin) vhodné k purifikaci ChE. Proces byl zopakován třikrát se vzorky z jedné exprese, aby byly zachovány stejné podmínky pro všechna opakování.

AChE byla purifikována pryskyřicemi PS a Ni-NTA. BChE byla purifikována pryskyřicemi Hupresinem a Ni-NTA. Purifikačním krokům předcházelo odsolení supernatantu pomocí dialýzy. Průběh purifikace byl hodnocen sledováním změny aktivity enzymu, která se zaznamenávala modifikovanou Ellmanovou metodou.

Po purifikaci byla provedena identifikace enzymů pomocí SDS-PAGE gelové elektroforézy, stanovena koncentrace proteinů, změřena aktivita enzymů a validace enzymů pomocí kinetických konstant K_m , V_{max} a určeny hodnoty IC_{50} selektivních inhibitorů pro obě ChE.

5.1 Purifikace AChE

Význam AChE tkví ve fyziologickém, patofyziologickém i toxikologickém odvětví výzkumu. V centrálním nervovém systému slouží k degradaci neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) a tím ukončuje nervosvalový přenos (Patocka et al. 2004). Je významný marker při otravě pesticidy, nervově paralytickými látkami (NPL) či v problematice AD, kde jedna z příčin tohoto onemocnění je ztráta cholinergních receptorů (Lionetto et al. 2013).

Jelikož naše rekombinantní ChE byly označeny histidinovou sekvencí His-tag, bylo výhodné pro purifikaci enzymů zvolit Ni-NTA pryskyřici. Histidin je schopen tvořit vazbu s ionty přechodných kovů, např. Ni^{2+} , Co^{2+} nebo Cu^{2+} a váže enzym pevně na pryskyřici, ta je umístěna v purifikační gravitační koloně, a můžeme ho tak přecistit od nežádoucích látek (nízkomolekulárních proteinů, zbytků média atd.) (Kimple et al. 2013).

U pryskyřice PS, která byla roku 1978 původně zavedena i pro purifikaci BChE, se časem zjistilo, že je účinnější jen pro purifikaci AChE.

Na gelu (Obr. 12) ve sloupci číslo 4 se nachází band AChE (~70 kDa – molekulová hmotnost potvrzena v předchozích testech pomocí Western blotu a protilátky - data neuvedena) purifikované pomocí Ni-NTA agarósy, který ukazuje mnohem menší znečištění nízkomolekulárními proteiny než AChE purifikovaná PS ve sloupci číslo 3. Tento výsledek byl potvrzen výslednou koncentrací proteinu ve vzorcích purifikovaných pomocí Ni-NTA, která byla 20x nižší, než u AChE purifikované PS.

Vypočítaná specifická aktivita byla 45x vyšší u purifikace s Ni-NTA, v porovnání s purifikací pomocí PS. Z výše zmíněných hodnot je patrné, že i malé množství tohoto enzymu přečištěného pomocí Ni-NTA je velice aktivní.

Hodnota K_m po purifikaci Ni-NTA agarósovou byla asi 1,5x nižší a V_{max} byla asi 1,1x nižší, než při použití PS. Nižší hodnota K_m po purifikaci Ni-NTA agarósovou než po PS pryskyřicí značí vyšší afinitu enzymu k substrátu. Hodnota V_{max} enzymu purifikovaného pomocí Ni-NTA agarósovou byla také nižší než po PS, tedy nám stačí k přeměně stejného množství substrátu menší množství enzymu.

Výsledná hodnota IC_{50} pro donepezil, byla pro obě purifikace shodná. Tuto hodnotu tedy čistota enzymu neovlivňuje. Její hodnota 26,1 nM se shoduje s literárně publikovanými hodnotami, které se nachází v rozmezí 6,7–35,0 nM (Ogura et al. 2000, Li et al. 2016).

5.2 Purifikace BChE

BChE hydrolyzuje Ach s mnohem menší účinností. Naopak bylo prokázáno, že BChE hydrolyzuje ghrelin, jemuž se přezdívá hormon hladu a je spojován s obezitou. U lidí, kteří mají v plazmě nižší hladinu BChE, se vyskytuje vyšší hladina ghreluinu. BChE dále účinně hydrolyzuje kokain. Tyto poznatky by se mohly využít při léčbě závislosti na kokainu, úzkosti, agrese a obezity (Brimijoin et al. 2018).

Při purifikaci BChE se porovnávaly pryskyřice Hupresin a Ni-NTA. Hupresin v roce 2012 nahradil PS. Huprinový ligand selektivně váže BChE díky jeho vysoké afinitě (Lockridge et al. 2018). Studie prokázala, že pomocí Hupresinu lze získat BChE o čistotě 54-100% (Lockridge 2015). Bohužel ho nelze použít pro purifikaci AChE, protože ji váže příliš silně a nelze ji poté z této vazby uvolnit (Lockridge et al. 2018).

Pro identifikaci byla opět použita SDS-PAGE gelová elektroforéza (Obr. 12Obr. 12). Molekulová hmotnost BChE se může měnit v závislosti na počtu obsazených glykosylačních míst. Nejčastěji byla nalezena BChE o velikosti ~70 a ~100 kDa, tyto výsledky byly potvrzeny Western blotem s použitím protilátky při předchozích pokusech (data nejsou uvedena). Ve sloupci číslo 8 vidíme band BChE (~70 kDa) purifikované pomocí Ni-NTA, který obsahuje mnohem méně nízkomolekulárních

proteinů, než u purifikace BChE pomocí Huperesinu, kterou vidíme ve sloupci číslo 7. Tento výsledek byl potvrzen výslednou koncentrací proteinu ve vzorcích purifikovaných pomocí Ni-NTA, která byla asi 11,5x nižší a specifická aktivita BChE byla asi 25x vyšší, než při použití Hupresinu.

Hodnota K_m byla 1,5x nižší a hodnota V_{max} byla asi 1,4x nižší, než při použití Hupresinu. Z toho nám vyplývá, že BChE po purifikaci Ni-NTA agarosou má vyšší afinitu k substrátu a postačí nám ho menší množství k přeměně stejného množství substrátu, než při použití pryskyřice Hupresinu.

Výsledná hodnota IC_{50} pro etopropazin, byla pro obě purifikace stejná. Tento výsledek není tedy ovlivněn čistotou BChE stejně jako tomu je u enzymu AChE. Výsledná hodnota 1,92 μM se shoduje s literárně publikovanými hodnotami, které se nachází v rozmezí 0,16–15,14 μM (Ucar et al. 2005).

Z těchto výsledků je patrné že BChE purifikovaná pryskyřicí Ni-NTA je opět výrazně čistší o vyšší specifické aktivitě a lepšími hodnotami kinetických konstant než enzym purifikovaný pomocí Hupresinu.

5.3 Přínos práce

Hlavním přínosem bakalářské práce je sjednocení purifikačního postupu pro obě ChE. Po porovnání výsledků vychází jako nejvhodnější pryskyřice Ni-NTA pro purifikaci obou ChE, kdy jsme dosáhli mnohem vyšších čistot enzymů než u původně používaných pryskyřic prokainamid sefarósy a Hupresinu. Tento postup byl pak zopakován v laboratoři KTVF FVZ UO i s dalšími supernatanty z různých expresí a výsledky potvrdily náš závěr (data nejsou v bakalářské práci uvedena).

Molekula AChE v organismu degraduje 25 000 molekul Ach za sekundu, má tedy velmi vysokou aktivitu (Čolović et al. 2013). Takové enzymy musí přesně a rychle pracovat i při testování, abychom se co nejvíce přiblížili reakcím v organismu. Enzymy po purifikaci Ni-NTA mají i vyšší specifickou aktivitou. Vysoce aktivního enzymu spotřebujeme menší množství a výsledkem je provedení většího množství experimentů. Zvolením Ni-NTA pryskyřice pro purifikaci našich enzymů mimo jiné skrývá i ekonomické výhody. Výběrem jedné purifikační pryskyřice Ni-NTA si usnadníme i další práci:

- Nemusíme připravovat různé typy roztoků pro rozdílné purifikační postupy. Jednotný gradient imidazolu lze použít pro obě ChE.
- Významná finanční úspora. Cena 10 ml Hupresinu se pohybuje okolo 20 000 Kč. Oproti tomu cena 10 ml Ni-NTA je 4760 Kč.

Ačkoliv si můžeme pořídit komerčně připravené a purifikované enzymy, aktivita takových enzymů je často kolísavá a dodávka těchto enzymů není vždy ihned. Tyto nevýhody vedly laboratoř na pracovišti KTVF FVZ UO k vlastní produkci rekombinantních enzymů pro výzkumné účely, k čemu se váže i vlastní purifikace enzymů. Takto připravené enzymy se ihned lyofilizují, čímž se předchází ztrátě aktivity při manipulaci, a při biochemických reakcích vykazují vyšší stabilitu. AChE o vysoké aktivitě umožňuje testovat inhibitory i jinými než spektrofotometrickými metodami, např. potenciometrickými. BChE nám umožňuje její použití jako bioscavangeru v dalších experimentech.

6. Závěr

Porovnáním účinnosti purifikace rekombinantní lidské AChE a BChE pomocí různých afinitních pryskyřic bylo zjištěno, že i přesto, že jsou obě pryskyřice prokainamid sefarósa a Hupresin vhodné pro purifikaci obou ChE, tak Ni-NTA pryskyřice je mnohem selektivnější a účinnější, jelikož His-tag má velmi vysokou afinitu k vazbě Ni^{2+} iontu. Při použití Ni-NTA pryskyřice jsme získali AChE i BChE o vyšší čistotě, aktivitě a s lepšími kinetickými vlastnostmi.

Výsledkem této bakalářské práce je zavedení jednotného purifikačního postupu pryskyřicí Ni-NTA agarósoou pro AChE i BChE, který přinese výraznou úsporu finančních prostředků na nákup pryskyřic a času, která byla nutná věnovat přípravě velkému množství roztoků, nutných při použití různých pryskyřic. Tyto purifikované enzymy pak budou sloužit k *in vitro* a *in vivo* hodnocení potenciálních léčiv Alzheimerovy choroby a k výzkumu účinku toxických a bojových otravných látek a ochraně proti jejich účinku, které jsou předmětem výzkumu na pracovišti KTVF FVZ UO.

Tak jak se v průběhu let vyvíjí produkce rekombinantních proteinů, tak se posouvají i purifikační postupy. V průběhu vypracovávání bakalářské práce jsme se rozhodli využít purifikačních kolon Amicon od firmy Merck, které umožňují provádět jednotlivé kroky purifikace (odsolení, dialýzu a purifikaci) v jedné koloně. Hlavní výhodou kolon Amicon je usnadnění práce. Nemusíme připravit tak velké množství roztoků, k čemuž se váže úspora financí a času. Práce, která nám dříve trvala několik dní, nám teď trvá pouze pár hodin. Díky zjednodušenému postupu předcházíme snížení aktivity proteinů během procesu purifikace (Merck 2021).

7. Seznam použitých zkratek

AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasy
AČR	Armáda České Republiky
AMK	aminokyselina
BCA	bicinchoniová kyselina
BChE	butyrylcholinesterasy
BTChI	butyrylcholin
CAS	katalytické anionické místo
CNS	centrální nervový systém
DM	<i>diabetes mellitus</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
DTNB	5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FVZ UO	Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany
GST	glutatonin S-transferáza
HBV	vir hepatitidy B
His	histidin
CaCl ₂	chlorid vápenatý
ChE	cholinesterasa
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru, při níž aktivita enzymu klesne na 50 % původní aktivity
K _M	Michaelisova konstanta
KTVF	Katedra toxikologie a vojenského zdravotnictví

MBP	maltózu vázající protein
MeOH	methanol
NaCl	chlorid sodný
Ni-NTA	nikl-nitriltriocetová kyselina
NPL	nervově paralytické látky
PAS	periferní anionické místo
PCR	polymerázová řetězová reakce
PNS	periferní nervový systém
PS	prokainamid sefarósa
V_{\max}	maximální rychlost reakce
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s přídavkem SDS

8. Seznam tabulek

Tab. 1 – Složení 20 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan pufru pH 7,5, zdroj: vlastní.....	25
Tab. 2 – Složení elučního roztoku AChE, zdroj: vlastní	25
Tab. 3 – Složení elučního roztoku BChE, zdroj: vlastní	26
Tab. 4 – Složení 12 % separačního gelu (2 mini gely), zdroj: vlastní.....	27
Tab. 5 – Složení 4% zaostřovacího gelu (2 mini gely), zdroj: vlastní.....	27
Tab. 6 – Složení vzorkového pufru, zdroj: vlastní.....	28
Tab. 7 – Složení elektrodového pufru, zdroj: vlastní.....	28
Tab. 8 – Složení roztoku pro modření gelu, zdroj: vlastní	29
Tab. 9 – Složení odbarvovacího roztoku, zdroj: vlastní	29

9. Seznam obrázků

Obr. 1 Příprava rekombinantního proteinu s důrazem na purifikaci (<i>zdroj: vlastní s využitím BioRender</i>)	13
Obr. 2 Přehled expresních systémů a jejich výhod, <i>zdroj: vlastní</i>	15
Obr. 3 Struktura Ni-NTA purifikační pryskyřice, zdroj: (Biotrend 2021).....	19
Obr. 4 Hydrofilní rameno prokainamid sefarósy, která váže cílovou ChE (Cytiva 2021).....	19
Obr. 5 Hupresin složený ze dvou komponent, <i>zdroj: vlastní</i>	20
Obr. 6 Hydrolyza acetylthiocholinu působením AChE, <i>zdroj: vlastní</i>	30
Obr. 7 Redukce S-S můstku a vazba thiocholinu na DTNB, <i>zdroj: vlastní</i>	31
Obr. 8 Konjugace dvojných vazeb kyseliny 5-merkpto-2-nitrobenzoové, <i>zdroj: vlastní</i>	31
Obr. 9 Výpočet aktivity, <i>zdroj: vlastní</i>	32
Obr. 10 Výpočet specifické aktivity, <i>zdroj: vlastní</i>	32
Obr. 11 Výpočet hodnoty K_m , <i>zdroj: vlastní</i>	33
Obr. 12 SDS-PAGE (gelová elektroforéza s přidavkem dodecylsulfátu sodného na polyakrylamidovém gelu).....	34
Obr. 13 Průběh inhibice acetylcholinesterasy (AChE), purifikované prokainamid sefarosou (PS), nadbytkem substrátu acetylthiocholin jodid (ATChI).....	36
Obr. 14 Průběh inhibice acetylcholinesterasy (AChE), purifikované NI-NTA pryskyřicí, nadbytkem substrátu acetlthiocholin jodid (ATChI).....	37
Obr. 15 Průběh inhibice butyrylcholinesterasy (BChE), purifikované pryskyřicí Hupresin, nadbytkem substrátu butyrylthiocholin jodidu (BTChI).....	37
Obr. 16 Průběh inhibice butyrylcholinesterasy (BChE), purifikované NI-NTA pryskyřicí, nadbytkem substrátu butyrylthiocholin jodidu (BTChI)	38
Obr. 18 Inhibiční účinek různých koncentrací donepezilu na acetylcholinesterasy (AChE) purifikovanou pryskyřicí prokainamid sefarosa (PS)	39

Obr. 19 Inhibiční účinek různých koncentrací donepezilu na acetylcholinesterasy (AChE) purifikovanou pryskyřicí Ni-NTA	39
Obr. 20 Inhibiční účinek různých koncentrací etopropazinu na butyrylcholinesterasu (BChE) purifikovanou pryskyřicí Hupresin	40
Obr. 21 Inhibiční účinek různých koncentrací etopropazinu na butyrylcholinesterasu (BChE) purifikovanou pryskyřicí Ni-NTA.....	40

10. Použitá literatura

BIOTREND, 2021. *Ni-NTA FPLC columns* [online]. 2021. Dostupné z: <https://www.biotrend.com/kauf/cat-nickel-nta-fplc-columns-3463.html>

BOYKO, K. M., T. N. BAYMUKHAMETOV, Y. M. CHESNOKOV, M. HONS, Sofya V. LUSHCHEKINA, P. V. KONAREV, A. V. LIPKIN, A. L. VASILIEV, P. MASSON, V. O. POPOV a M. V. KOVALCHUK, 2019. 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD. *Biochimie* [online]. **156**, 196–205. ISSN 1638-6183. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biochi.2018.10.017](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.017)

BRIMIJOIN, S., Y. GAO, L. GENG a V. P. CHEN, 2018. Treating Cocaine Addiction, Obesity, and Emotional Disorders by Viral Gene Transfer of Butyrylcholinesterase. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **9** [vid. 2022-04-26]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00112>

CASALI, N. a A. PRESTON, 2003. *E. Coli Plasmid Vectors: Methods and Applications*. B.m.: Springer Science & Business Media. ISBN 978-1-59259-409-2.

CELIE, P. H, A. H PARRET a A. PERRAKIS, 2016. Recombinant cloning strategies for protein expression. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. **38**, 145–154. ISSN 1879-033X. Dostupné z: [doi:10.1016/j.sbi.2016.06.010](https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.06.010)

CELIK, E. a P. CALIK, 2012. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnology Advances* [online]. **30**(5), 1108–1118. ISSN 1873-1899. Dostupné z: [doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.011](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.011)

COPELAND, R. A., 2000. *Enzymes*. 2. vydání. B.m.: Wiley. ISBN 978-0-471-35929-6.

CUMMINGS, J., P. AISEN, L. G. APOSTOLOVA, A. ATRI, S. SALLOWAY a M. WEINER, 2021. Aducanumab: Appropriate Use Recommendations. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease* [online]. **8**(4), 398–410. ISSN 2426-0266. Dostupné z: [doi:10.14283/jpad.2021.41](https://doi.org/10.14283/jpad.2021.41)

CYTIVA, 2021. *Procainamide sepharose 4 Fast flow* [online]. 2021. Dostupné z: <https://cdn.cytivalifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=29490>

ČOLOVIĆ, M. B, D. Z KRSTIĆ, T. D LAZAREVIĆ-PAŠTI, A. M BONDŽIĆ a V. M VASIĆ, 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. **11**(3), 315–335. ISSN 1570-159X. Dostupné z: [doi:10.2174/1570159X11311030006](https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006)

DARVESH, S., D. A. HOPKINS a Ch. GEULA, 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. **4**(2), 131–138. ISSN 1471-0048. Dostupné z: [doi:10.1038/nrn1035](https://doi.org/10.1038/nrn1035)

ELLMAN, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES a R. M. FEATHERSTONE, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.* 88–95.

FUSEK, M., V. LIBOR, J. BLAHOŠ, M. HAJDÚCH a T. RUMML, 2012. *Biologická léčiva: teoretické základy klinické praxe*. 1. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3727-0.

GEISLER, Ch., H. MABASHI-ASAZUMA a D. L. JARVIS, 2015. An Overview and History of Glyco-Engineering in Insect Expression Systems. In: A. CASTILHO, ed. *Glyco-Engineering: Methods and Protocols* [online]. New York, NY: Springer, Methods in Molecular Biology, s. 131–152 [vid. 2021-08-01]. ISBN 978-1-4939-2760-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2760-9_10

GIBSON, D. G., 2011. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. *Methods in Enzymology* [online]. **498**, 349–361. ISSN 1557-7988. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-385120-8.00015-2

GRIFFITH, D. A, Ch. DELIPALA, J. LEADSHAM, S. M JARVIS a D. OESTERHELT, 2003. A novel yeast expression system for the overproduction of quality-controlled membrane proteins. *FEBS Letters* [online]. **553**(1), 45–50. ISSN 0014-5793. Dostupné z: doi:10.1016/S0014-5793(03)00952-9

HWANG, H. G, K. J KIM, S. H LEE, Ch. K KIM, Ch. K MIN, J. M YUN a S. U. L. Y. J SON, 2016. Recombinant Glargine Insulin Production Process Using Escherichia coli [online]. **26**(10), 1781–1789. Dostupné z: doi:10.4014/jmb.1602.02053

CHATONNET, A. a O. LOCKRIDGE, 1989. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochemical Journal.* **260**(3), 625–634. ISSN 0264-6021.

JOHNSON, G. a S. W. MOORE, 2006. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Current Pharmaceutical Design* [online]. **12**(2), 217–225. ISSN 1381-6128. Dostupné z: doi:10.2174/138161206775193127

KANT, R., G. BHATT, V. K PATEL, A. GANGULI, Deepak SINGH, M. NAYAK, K. MISHRA, A. GUPTA, K. GANGOPADHYAY, S. GANGOPADHYAY, G. RAMANATHAN a S. BHATTACHARYA, 2019. Synchronized Electromechanical Shock Wave-Induced Bacterial Transformation. *ACS Omega* [online]. **4**(5), 8512–8521. Dostupné z: doi:10.1021/acsomega.9b00202

KHAN, K. H, 2013. Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. **3**(2), 257–263. ISSN 2228-5881. Dostupné z: doi:10.5681/apb.2013.042

KHOW, O. a S. SUNTRARACHUN, 2012. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. **2**(2), 159–162. ISSN 2221-1691. Dostupné z: doi:10.1016/S2221-1691(11)60213-X

KIMPLE, M. E., A. L. BRILL a R. L. PASKER, 2013. Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* [online]. **73**, Unit-9.9. ISSN 1934-3655. Dostupné z: doi:10.1002/0471140864.ps0909s73

LI, F., Z. M WANG, J. J WU, J. WANG, S. S XIE, J. S LAN, W. XU, L. Y KONG a X. B WANG, 2016. Synthesis and pharmacological evaluation of donepezil-based agents as new cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential application against Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. **31**(sup3), 41–53. ISSN 1475-6366, 1475-6374. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2016.1201814

LILLEHOJ, E. P. a V. S. MALIK, 1989. Protein purification. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* [online]. **40**, 19–71. ISSN 0724-6145. Dostupné z: doi:10.1007/BFb0009827

LIONETTO, M. G., R. CARICATO, A. CALISI, M. E. GIORDANO a T. SCHETTINO, 2013. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed Research International* [online]. **2013**, 321213. ISSN 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2013/321213

LOCKRIDGE, O., 2015. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **148**, 34–46. ISSN 1879-016X. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.011

LOCKRIDGE, O., E. DAVID, L. M. SCHOPFER, P. MASSON, X. BRAZZOLOTTO a F. NACHON, 2018. Purification of recombinant human butyrylcholinesterase on Hupresin®. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* [online]. **1102–1103**, 109–115. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2018.10.026

LOUGHRAN, S. T., R. T. BREE a D. WALLS, 2017. Purification of Polyhistidine-Tagged Proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. **1485**, 275–303. ISSN 1940-6029. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-6412-3_14

MACKMAN, N., K. BAKER, L. GREY, R. HAIGH, J. M NICAUD a B. HOLLAND, 1987. Release of a chimeric protein into the medium from Escherichia coli using the C-terminal secretion signal of haemolysin. *The EMBO Journal*. **6**(9), 2835–2841. ISSN 0261-4189.

MERCK, 2021. *Amicon® Pro Purification System for Dialysis | Life Science Research | Merck* [online] [vid. 2022-02-28]. Dostupné z: <https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/life-science-research/protein-sample-preparation/dialysis/amicon-pro-purification-system/1fKb.qB.PaMAAAFAwkdwFMtE,nav>

MIXA, J., 2010. *Purifikace proteinů s využitím chromatografických metod, zejména gelové permeační chromatografie* [online]. B.m. [vid. 2021-07-20]. Palacký University

Olomouc, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: https://theses.cz/id/uwnesw/?lang=en&fbclid=IwAR3Wu1eUdPA11UbKZzIv24t_COjKxgkOLxQxM2DPaz1WneooTPgMdlO9XqI

MUMBERG, D., R. MÜLLER a M. FUNK, 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* [online]. **156**(1), 119–122. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(95)00037-7

NATHWANI, A. C., 2019. Gene therapy for hemophilia. *Hematology: the American Society of Hematology Education Program* [online]. **2019**(1), 1–8. ISSN 1520-4391. Dostupné z: doi:10.1182/hematology.2019000007

NEB, 2022. PCR Cloning Method | NEB. *New England Biolabs* [online] [vid. 2022-05-10]. Dostupné z: <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/pcr-cloning>

NETINBAG, 2022. *Jaké jsou různé metody stanovení koncentrace proteinů?* [online] [vid. 2022-04-14]. Dostupné z: <https://www.netinbag.com/cs/science/what-are-the-different-methods-of-protein-concentration-determination.html>

NEVALAINEN, K. M. H, V. S. J. TE’O a P. L. BERGQUIST, 2005. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology* [online]. **23**(9), 468–474. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2005.06.002

NOVEX BY LIFE TECHNOLOGIES, 2015. *Ni-NTA Purification System* [online]. 13. srpen 2015. B.m.: Novex by life technologies. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R90115?SID=srch-srp-R90115&fbclid=IwAR2AyyXbE_8hc11XPoPAUZ9yGsFT90bG0WiWxzO0oCvTWzxOe1HXBzndUPg#/R90115?SID=srch-srp-R90115

OGURA, H., T. KOSASA, Y. KURIYA a Y. YAMANISHI, 2000. Comparison of inhibitory activities of donepezil and other cholinesterase inhibitors on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in vitro. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* [online]. **22**(8), 609–613. ISSN 0379-0355. Dostupné z: doi:10.1358/mf.2000.22.8.701373

PATOCKA, J., K. KUČA a D. JUN, 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase--important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Králové)*. **47**(4), 215–228. ISSN 1211-4286.

RASALA, B. A. a S. P. MAYFIELD, 2015. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynthesis Research* [online]. **123**(3), 227–239. ISSN 1573-5079. Dostupné z: doi:10.1007/s11120-014-9994-7

RŮČKOVÁ, E., P. MÜLLER a B. VOJTĚŠEK, 2014. [Protein expression and purification]. *Klinická Onkologie: Casopis České a Slovenské Onkologické Společnosti* [online]. **27 Suppl 1**, S92-97. ISSN 0862-495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20141s92

SCOPES, R. K., 2001. Overview of protein purification and characterization. *Current Protocols in Protein Science* [online]. **Chapter 1**, Unit 1.1. ISSN 1934-3663. Dostupné z: doi:10.1002/0471140864.ps0101s00

SÚKL, 2010. *MEMANTIN MYLAN, 20MG TBL FLM 28, Státní ústav pro kontrolu léčiv* [online] [vid. 2022-04-14]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0194043&tab=prices>

THERMOFISHER, 2021. *PierceTM BCA Protein Assay Kit* [online] [vid. 2022-04-14]. Dostupné z: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225?ef_id=Cj0KCQjwJN-SBhCkARIsACsrBz4TsinuVPH39YJbbWqE_U_sHqKXPWPijlBOwqkMJvYsSqm411yhxfgaAg3gEALw_wcB:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!437211904042!!!g!!&cid=bid_pca_sbu_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con&gclid=Cj0KCQjwJN-SBhCkARIsACsrBz4TsinuVPH39YJbbWqE_U_sHqKXPWPijlBOwqkMJvYsSqm411yhxfgaAg3gEALw_wcB

UCAR, G., N. GOKHAN, A. YESILADA a A. A. BILGIN, 2005. 1-N-Substituted thiocarbamoyl-3-phenyl-5-thienyl-2-pyrazolines: a novel cholinesterase and selective monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neuroscience Letters* [online]. **382**(3), 327–331. ISSN 0304-3940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2005.03.028

UNOB, 2021a. *O pracovišti - Katedra toxikologie a vojenské farmacie* [online] [vid. 2022-04-14]. Dostupné z: https://www.unob.cz/fvz/struktura/k304/Stranky/o_pracovisti.aspx

UNOB, 2021b. *Výzkum - Katedra toxikologie a vojenské farmacie* [online] [vid. 2022-04-14]. Dostupné z: <https://www.unob.cz/fvz/struktura/k304/Stranky/vyzkum.aspx>

WARD, O. P., 2012. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* [online]. **30**(5), 1119–1139. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.012

WEBER, E. W. a M. FUSSENEGGER, 2009. Insect Cell-Based Recombinant Protein Production. In: R. EIBL, D. EIBL, R. PÖRTNER, G. CATAPANO a P. CZERMAK, ed. *Cell and Tissue Reaction Engineering: With a Contribution by Martin Fussenegger and Wilfried Weber* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer, Principles and Practice, s. 263–277 [vid. 2021-08-01]. ISBN 978-3-540-68182-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-68182-3_6

WIESNER, J., Z. KRIZ, K. KUČA, D. JUN a J. KOČA, 2007. Acetylcholinesterases--the structural similarities and differences. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. **22**(4), 417–424. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.1080/14756360701421294

WINGFIELD, P. T., 2015. Overview of the purification of recombinant proteins. *Current Protocols in Protein Science* [online]. **80**, 6.1.1-6.1.35. ISSN 1934-3663. Dostupné z: doi:10.1002/0471140864.ps0601s80

ZHAO, H., X. ZHOU a Y. H ZHOU, 2020. Hepatitis B vaccine development and implementation. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. **16**(7), 1533–1544. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.1080/21645515.2020.1732166