

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Michala Kolářová

**PŘÍPRAVA REKOMBINANTNÍHO PROTEINU TAU A  
JEHO POUŽITÍ PRO DETEKCI ALZHEIMEROVY  
NEMOCI**

The preparation of recombinant tau protein  
and its usage for the detection of Alzheimer disease

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Kateřina Hofbauerová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jan Říčný, CSc.

Praha 2011

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto 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 dne 10. května 2011.

.....

Podpis

## **Poděkování**

V této části bych ráda poděkovala RNDr. Kateřině Hofbauerové, Ph.D., RNDr. Janu Říčnému, CSc. a Doc. MuDr. Aleši Bartošovi, Ph.D. za odborné vedení, pomoc a připomínky v průběhu i při konečném zpracování diplomové práce.

Také bych chtěla poděkovat Prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. a RNDr. Daniele Řípové, CSc. za umožnění vykonání této práce v laboratoři architektury proteinů a laboratoři biochemie a patofyziologie mozku.

V neposlední řadě chci poděkovat svým rodičům za podporu a umožnění studia na vysoké škole.

## **Abstrakt**

V současné době se klade velký význam na přesnou a včasnou diagnózu Alzheimerovy nemoci (AN), která je důležitá pro zavedení léčebných postupů oddalující nástup choroby. Protilátky proti tau proteinu se jeví jako vhodné biomarkery pro včasnou diagnózu AN. Proto se tato práce zabývá nejprve přípravou rekombinantního lidského tau proteinu v bakteriích a jeho následném využití pro stanovení hladiny protilátek v krevních sérech pacientů s AN a normálních seniorů. Podařilo se připravit tau protein v dostatečné čistotě pro stanovení protilátek ELISA metodou a získané výsledky byly statisticky analyzovány neparametrickými metodami. Výsledky byly porovnány s daty získanými od Mgr. Jany Švarcové změřením protilátek v sérech pacientů s AN a normálních seniorů pomocí komerčního bovinního tau proteinu. Podle těchto analýz existují rozdíly v datech získaných na lidském a bovinním tau proteinu. Prokázalo se, že pacienti s AN mají menší množství protilátek proti tau proteinu než zdraví senioři. Rekombinantní lidský tau protein byl použit také na imunizaci králíků. ELISA metodou se u králíků potvrdila tvorba protilátek proti lidskému tau proteinu.

## **Abstract**

Currently a great emphasis is being put on accurate and early diagnosis of Alzheimer's disease (AD), which is important for the introduction of treatments that could postpone the onset of the disease. Antibodies against tau protein appear to be suitable biomarkers for early diagnosis of AD. Therefore, this work deals firstly with preparation of human recombinant tau protein in bacteria and its subsequent use in determining levels of antibodies in blood serum of patients with AD and in normal older persons. A preparation of the tau protein in sufficient purity was achieved for the antibodies measurement by ELISA method and results were statistically analyzed using nonparametric methods. Results were compared with data from Mgr. Jany Švarcové obtained by measuring antibodies in serum of patients with AD and normal elderly using an commercial bovine tau protein. According to the analysis there are differences between the data obtained from human and the bovine tau protein. It was proven that patients with AN have lower levels of antibodies against tau protein than healthy seniors. Recombinant human tau protein was

also used to immunize rabbits. The ELISA method confirmed the creation of antibodies against human tau protein in rabbits.

# Obsah

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>9</b>
<b>PŘEDMLUVA .....</b>	<b>12</b>
<b>ÚVOD .....</b>	<b>13</b>
<b>1 ALZHEIMEROVA NEMOC .....</b>	<b>14</b>
1.1 <i>Patogeneze Alzheimerovy nemoci.....</i>	14
1.2 <i>Tau gen.....</i>	16
1.3 <i>Struktura a funkce tau.....</i>	17
1.3.1 <i>Projekční doména .....</i>	18
1.3.2 <i>Doména asociovaná s mikrotubuly .....</i>	19
1.4 <i>Buněčná lokalizace tau.....</i>	20
1.5 <i>Post-translační modifikace .....</i>	20
1.5.1 <i>Tau fosforylace.....</i>	20
1.5.2 <i>Tau glykosylace .....</i>	22
1.6 <i>Tau patologie .....</i>	23
1.6.1 <i>Agregace tau proteinu in vitro .....</i>	25
1.6.2 <i>Zkrácení tau proteinu.....</i>	26
1.7 <i>Protilátky .....</i>	28
1.7.1 <i>Alz50 .....</i>	29
1.7.2 <i>Tau-66 .....</i>	29
1.7.3 <i>Tau-C3 .....</i>	29
1.7.4 <i>MN423 .....</i>	30
1.7.5 <i>Protilátky proti aminokonci molekuly tau .....</i>	30
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>31</b>
<b>2 ÚVOD DO METOD .....</b>	<b>31</b>
2.1 <i>Rekombinantní exprese proteinu tau .....</i>	31
2.2 <i>Purifikace proteinu .....</i>	32
2.2.1 <i>Chromatografické metody .....</i>	32
2.2.2 <i>Zahušťování roztoku proteinů pomocí centrifugačních koncentrátorů .....</i>	32
2.3 <i>Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové .....</i>	33
2.4 <i>Stanovení koncentrace proteinů podle Lowryho .....</i>	33
2.5 <i>Elektromigrační metody .....</i>	33
2.5.1 <i>SDS-PAGE elektroforéza.....</i>	33
2.5.2 <i>Western Blotting.....</i>	34
2.6 <i>Imunizace .....</i>	34

2.7	<i>ELISA</i> .....	34
3	CÍLE PRÁCE .....	36
4	MATERIÁL .....	37
4.1	<i>Přístroje</i> .....	37
4.2	<i>Chemikálie</i> .....	38
4.3	<i>Enzymy</i> .....	39
4.4	<i>Inhibitory proteáz</i> .....	39
4.5	<i>Protilátky</i> .....	39
4.6	<i>Vektory</i> .....	39
4.7	<i>Bakteriální kmeny</i> .....	39
4.8	<i>Software</i> .....	40
4.9	<i>Roztoky a pufry</i> .....	40
4.10	<i>Média</i> .....	42
5	METODY .....	43
5.1	<i>Rekombinantní exprese tau proteinu</i> .....	43
5.1.1	Transformace kompetentních buněk a selekce produkčních klonů.....	43
5.1.2	Optimalizace produkce rekombinantního proteinu .....	44
5.1.3	Velkoobjemová produkce proteinu .....	45
5.1.4	Zjištění lokalizace tau proteinu .....	45
5.2	<i>Purifikace tau proteinu</i> .....	46
5.2.1	Afinitní chromatografie.....	46
5.2.2	Gelová chromatografie .....	46
5.2.3	Ionexová chromatografie.....	47
5.2.4	Zahušťování roztoku proteinů pomocí centrifugačních koncentrátorů .....	47
5.3	<i>Stanovení koncentrace proteinu</i> .....	48
5.4	<i>Elektromigrační metody</i> .....	49
5.4.1	SDS-PAGE elektroforéza .....	49
5.4.2	Western Blotting .....	50
5.5	<i>Imunizace králíků</i> .....	51
5.6	<i>Odběr a zpracování krevních sér králíků</i> .....	51
5.7	<i>Odběr a zpracování krevního séra pacientů s AN a normálních kontrol</i> .....	52
5.8	<i>ELISA</i> .....	52
5.8.1	Kompetitivní ELISA .....	52
5.8.2	Stanovení protilátek proti tau proteinu v sérech pacientů s AN a normálních seniorů .....	53
5.8.3	Stanovení protilátek proti tau proteinu v sérech králíků .....	54
5.9	<i>Statistické analýzy</i> .....	55
5.9.1	Testy normality .....	55
5.9.2	Neparametrický jednovýběrový párový test .....	56

5.9.3	Neparametrické dvouvýběrové nepárové testy.....	56
6	VÝSLEDKY.....	60
6.1	Úvod k výsledkům.....	60
6.2	Rekombinantní exprese tau proteinu.....	60
6.2.1	Transformace kompetentních buněk a selekce produkčních klonů.....	60
6.2.2	Optimalizace produkce rekombinantního proteinu.....	61
6.2.3	Velkoobjemová produkce proteinu a zjištění jeho lokalizace.....	63
6.3	Purifikace proteinu tau.....	64
6.3.1	Afinitní chromatografie.....	64
6.3.2	Gelová chromatografie.....	65
6.3.3	Ionexová chromatografie.....	66
6.4	Identifikace tau proteinu.....	67
6.5	ELISA.....	69
6.5.1	Kompetitivní ELISA.....	69
6.5.2	Stanovení protilátek proti tau proteinu v sérech pacientů s AN a normálních seniorů.....	70
6.5.3	Stanovení protilátek proti tau proteinu v sérech králíků.....	79
	<b>DISKUZE.....</b>	<b>83</b>
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>89</b>
	<b>LITERATURA.....</b>	<b>90</b>



## Seznam použitých zkratk

<b>A<math>\beta</math></b>	Amyloid-beta
<b>ACE</b>	Addenbrookský kognitivní test (Addenbrooke's Cognitive Examination)
<b>AD</b>	Alzheimerova nemoc (Alzheimer disease)
<b>AN</b>	Alzheimerova nemoc
<b>AN P-tau</b>	Abnormálně hyperfosforylovaný tau v AN
<b>Alz-50</b>	Monoklonální protilátka rozpoznávající tau protein
<b>AMK</b>	Aminokyseliny
<b>Apo-E</b>	Apolipoprotein E
<b>APP</b>	Amyloidový prekurzorový protein
<b>BSA</b>	Bovinní sérový albumin
<b>CaM</b>	Calmodulin kináza II
<b>CB-R250</b>	Coomassie Blue R-250
<b>Cdk5</b>	Cyklin- dependentní kináza 5 (tau protein kinasa II)
<b>CNS</b>	Centrální nervová soustava
<b>CT</b>	Počítačová tomografie
<b>D</b>	Kyselina asparagová
<b>DaB</b>	Diaminobenzidin
<b>E</b>	Kyselina glutamová
<b>EEG</b>	Elektroencefalografie
<b>ELISA</b>	Imunologický test spojený s enzymatickou reakcí (Enzyme-linked immuno sorbent assay)
<b>Fyn</b>	Proto-onkogenní tyrosin- protein kináza
<b>GSK3</b>	Glykogensyntáza-kináza 3 (Glycogen synthase kinase 3)
<b>Ig</b>	Imunoglobuliny
<b>IMAC</b>	Afinitní chromatografie (immobilized metal ion chromatography)
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
<b>K-S test</b>	Kolmogorovův-Smirnovův test
<b>mAb</b>	Monoklonální protilátka (Monoclonal antibody)

<b>MAP</b>	Proteiny asociované s mikrotubuly (Microtubule-associated protein)
<b>MMSE</b>	Orientální diagnostický test (Mini Mental State Examination)
<b>MR</b>	Magnetická rezonance
<b>MTBR</b>	Opakující se sekvence v tau proteinu vázající mikrotubuly
<b>M-W U test</b>	Mannův-Whitneyův U test
<b>NFT</b>	Neurofibrilární klubíčka (Neurofibrillary tangles)
<b>NINCDS-ADRDA</b>	Kritéria pro hodnocení Alzheimerovy nemoci (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association)
<b>NMR</b>	Nukleární magnetická rezonance
<b>NOS</b>	Normální senioři
<b>NT</b>	Neuropilová vlákna
<b>p38</b>	Kináza p38 (Microtubule-associated protein kinasa)
<b>PAGE</b>	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
<b>PCP</b>	Psychiatrické centrum Praha
<b>PET</b>	Pozitronová emisní tomografie
<b>PHF</b>	Párová helikální filamenta
<b>PKA</b>	Protein kináza A
<b>PKC</b>	Protein kináza C
<b>PLC-<math>\gamma</math></b>	Fosfolipáza C
<b>PMSF</b>	Fenylmethylsulfonyl fluorid
<b>PP1</b>	Protein fosfatáza 1
<b>PP2A</b>	Protein fosfatáza 2A
<b>PP2B</b>	Protein fosfatáza 2B
<b>PP5</b>	Protein fosfatáza 5
<b>S</b>	Serin
<b>SDS</b>	Sodium dodecylsulfát
<b>SF</b>	Přímá filamenta (Straight filament)

<b>sGAGs</b>	Sulfoglykosaminglykany
<b>SPECT</b>	Tomografická scintigrafie (Single photon emission computed tomography)
<b>TCA</b>	Trichloroctová kyselina (trichloroacetic acid)
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>W-W test</b>	Waldův-Wolfowitzův test

## **Předmluva**

Demence je chápána jako získaná porucha paměti a dalších kognitivních schopností. Alzheimerova nemoc (AN) je nejběžnějším typem demence. V souvislosti s celosvětovým trendem prodlužování lidského života a vzrůstajícím počtem starých osob v populaci se AN stává jedním z nejzávažnějších zdravotních a socioekonomických problémů současnosti. Včasná diagnóza AN je důležitá pro zahájení symptomatické léčby např. cholinesterázovými inhibitory. Během posledního desetiletí se úsilí vědců zaměřovalo na stanovení biomarkerů (koncentrace  $\beta$ -amyloidu 1-42 a 1-40 a tau proteinu) v cerebrospinální tekutině. Stále neexistuje jednoduchý test nebo biologický marker, který by detekoval časně případy AN a definitivní diagnóza AN je stále založena na důkazech získaných pitvou. Celkový tau protein je považován za hlavní biomarker neuronální degenerace. Tato diplomová práce se zabývá stanovením protilátek proti tau proteinu v krevním séru pacientů s AN a normálních seniorů a porovnáním získaných výsledků pro přínos k diagnostice AN.

## Úvod

Demence jsou choroby, jejichž hlavní charakteristikou je úpadek kognitivních (poznávacích) funkcí (např. intelektu, paměti, motivace) a druhotně i úpadek ostatních psychických funkcí z původní kapacity. Tento úpadek je tak podstatný, že interferuje s běžnými denními aktivitami nemocného člověka. Takový člověk se pak stává zcela závislý na svém okolí a je neschopen samostatné existence. Konečným důsledkem je potom smrt člověka, způsobená buď nepřímo (úrazy) nebo přímo (selháním základních životních funkcí).

Demence se dělí do dvou základních skupin: choroby atroficko-degenerativní (např. Alzheimerova nemoc) a demence sekundární, vzniklé v důsledku jiné primární poruchy (ischemicko-vaskulární demence, posttraumatické poruchy, infekční choroby atd.).

Atroficko-degenerativní demence nejsou doposud dostatečně prozkoumány po stránce etiologické. U některých byla zjištěna genetická podmíněnost, ale také spolupůsobení řady faktorů, např. vliv neurotoxinů, infekčních agens a stresorů nejrůznějšího druhu. Jedním z nejvýznamnějších faktorů je také věk [1].

# 1 Alzheimerova nemoc

AN je nejčastější formou demence. Představuje asi 50-60 % všech demencí a dalších asi 10 % demencí je smíšené etiologie, kde se kromě alzheimerovských změn vyskytují i ischemicko-vaskulární změny (mozkové infarkty) [2].

AN je neurodegenerativní onemocnění projevující se syndromem demence, které je definováno patologickými nálezy v mozku pacientů. Zároveň však existuje individuální různorodost, pokud se týče doby vzniku, rychlosti vývoje a některých dalších klinických odchylek. Pacienti se liší genetickými dispozicemi a faktory, které ovlivňují rozvoj a průběh choroby [2].

## 1.1 Patogeneze Alzheimerovy nemoci

Z genetického hlediska je AN multifaktoriální nemocí, při které se vyskytují i mutace genů. Změny související s AN jsou zakódovány na chromozomech 1, 14, 19 a 21 [3].

AN se rozlišuje na dva typy: na typickou a atypickou AN. Atypická forma nemoci je poměrně vzácná a projevuje se časným nástupem nemoci. Rozvíjí se u lidí ve věku od 30 do 60 let. Časná forma má agresivnější průběh nemoci než typická pozdní AN. Pravděpodobnost genetické příčiny je vyšší u případů s velmi časným nástupem nemoci. Přesto méně než 1% případů s AN je způsobeno autosomálně dominantní mutací. Tyto mutace nacházíme na chromozomech 21, 14 a 1. Mutace na chromozomu 21 způsobuje tvorbu abnormálního amyloidového prekurzorového proteinu (APP). Mutace genů na 14. a 1. chromozomu, kde jsou kódovány presenilin proteiny, se podílí na vzniku amyloidu-beta (A $\beta$ ). Časná forma nemoci je někdy nazývána také jako familiální, protože pozitivní rodinná historie je zde častější než mezi pacienty s pozdní formou nemoci. Pacienti s atypickou časnou AN jsou zřídka nosiči alely apolipoproteinu E4 (ApoE4), která je důležitým rizikovým faktorem pro snížení věku nástupu nemoci u pacientů s AN. Nosičství alely ApoE4 souvisí se ztrátou paměti během vývoje nemoci. Pacienti, kteří nemají alelu ApoE4 netrpí ztrátou paměti, ale mají jiné projevy nemoci např. zhoršení mentální schopnosti, zhoršené vyjadřování. Alela ApoE4 je nejdůležitějším genetickým rizikovým faktorem pro typickou sporadickou AN. Typická AN se projevuje u lidí starších 65 let a jejím typickým projevem je právě ztráta paměti [4, 5].

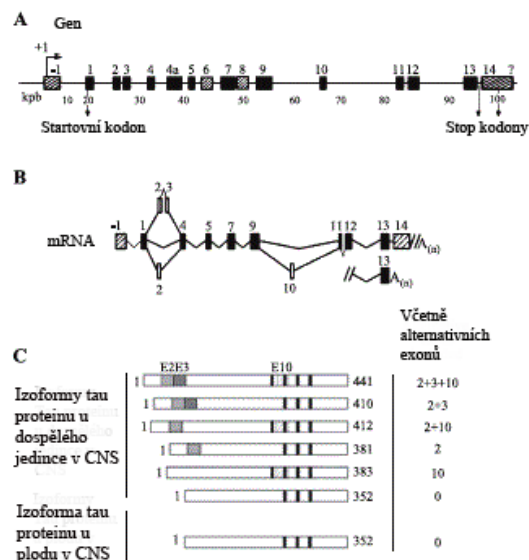
AN má některé významné neuropatologické nálezy, které lze prokázat zobrazovacími metodami (CT, EEG, SPECT, PET, MR). Progresivní primárně degenerativní onemocnění mozku se projevuje kortiko-subkortikální atrofií. Makroskopicky nalézáme ztenčení mozkové kůry, rozšířené sulky, rozšířené jsou i komory mozkové. Atrofie bývá významná i v oblasti hipokampů. Mikroskopicky nalézáme extracelulární a intracelulární změny [2]. Nemoc provázejí dva význačné morfologické nálezy v mozkové tkáni: extracelulární amyloidní plaky (složené především z nerozpustného amyloidu beta ( $A\beta$ )) a intraneuronální neurofibrilární klubíčka, obsahující nerozpustný tau protein [4].

Základní a nejdůležitější extracelulární patologickou změnou je ukládání peptidu  $\beta$ -amyloidu (nebo také amyloidu- $\beta$ ,  $A\beta$ ). V mozkové kůře jsou při AN pozorovány nepravidelné okrouhlé útvary (senilní plaky asi 10-200  $\mu\text{m}$ ) vzniklé z rozpadlých neuronů, v jejichž středu se objevuje shluk amyloidogenní bílkoviny, jenž poškozuje axony nervových buněk. Polymerovaný  $\beta$ -amyloid tvoří jádra (drúzy), kolem kterých dochází k odumírání neuronů, vzniká gliový lem, dochází k projevům sterilního zánětu. Primárním zdrojem  $\beta$ -amyloidu je amyloidový prekurzorový protein (APP). Za fyziologických podmínek je štěpen  $\alpha$ -sekretázou na fragmenty o 39-40 aminokyselinách. Tyto fragmenty ( $\beta$ -peptidy) působí za normálních podmínek neuroprotektivně a jsou rozpustné. Za patologických podmínek se uplatňují enzymy  $\beta$ -sekretáza a  $\gamma$ -sekretáza, které štěpí APP jinak: vznikají delší fragmenty (o 42-43 aminokyselinách). Zmnožené a atypické fragmenty APP začínají oligomerizovat, přestávají být rozpustné. Toto je začátek vzniku amyloidních plaků. Je postulována hypotéza, že k polymerizaci dosud rozpustných fragmentů APP přispívá přítomnost ApoE4. Apolipoprotein E (ApoE) je protein, který je mediátorem metabolismu lipidů. U lidí jsou známy formy E2, E3 a E4. Nosičství alely ApoE4 je význačným rizikovým faktorem vzniku AN. Lidé vybavení izoformou E4/E4 (tzn. dvěma alelami ApoE4) inklinují ke vzniku AN 3-5 $\times$  častěji než srovnatelná populace s jinými izoformami ApoE. ApoE je kódován na 19. chromozómu.  $A\beta$  se také ukládá ve stěnách cév. Hovoříme o tzv. amyloidní angiopatii [2, 3].

Nejzávažnější změnou uvnitř neuronů je akumulace tau proteinu. Tau byl poprvé objeven v polovině 70. let 20. století díky studiu faktorů nezbytných pro tvorbu mikrotubulů. Tau je protein asociovaný s mikrotubuly (microtubule-associated protein, MAP). V neuronech existují ještě další 2 MAP o větší molekulární hmotnosti než má tau protein tzv. MAP1 a MAP2.

## 1.2 Tau gen

Lidský tau gen je umístěn na dlouhém raménku chromozomu 17 v pozici 17q21 a obsahuje 16 exonů (Obr. 1) [6]. Zahájení přepisu začíná na exonu 1, ve kterém je lokalizován startovní kodón. Jsou zde 2 stop kodony, které jsou buď za exonem 13 nebo uvnitř exonu 14. Několik mRNA je tvořeno alternativním sestřiháním exonů 2, 3, 4A a 10. Exony 6p a 6d jsou používány jen zřídka, generují zkrácený tau protein o karboxylový konec. Exon 4A je vystřihán z mRNA tau proteinu vyskytující se v mozku a zahrnut v míše a periferním nervovém systému. Exon 8 se v lidském tau nevyskytuje a je přítomen u některých jiných druhů např. v hovězím tau. Transkripcí vzniká mRNA, která alternativním sestřiháním a translací dává vzniknout šesti odlišným izoformám tau proteinu. Tato exprese odlišných tau izoform s odlišným počtem exonů je charakteristická během vývoje mozku. Existují izoformy obsahující exon 2, exony 2, 10, exony 2, 3 a exony 2, 3 a 10. Exon 3 je v mRNA vždy vložen s exonem 2. Protože exon 10 kóduje jednu z oblastí zahrnující vázání tau k mikrotubulům, jeho alternativním sestřihováním dochází k produkci tau izoform buď se 3 (tau 3R bez exonu 10) nebo 4 (tau 4R s exonem 10) tubulin/mikrotubulovými vazebnými oblastmi. Polovina tau proteinů obsahuje 3 mikrotubulové-vazebné motivy a další polovina 4. [7].



**Obr. 1:** (A) Gen tau proteinu asociovaného s mikrotubuly (B) Několik mRNA je tvořeno alternativním sestřiháním exonu 2, 3, 4A a 10. (C) V lidském mozku je tvořeno 6 hlavních izoform tau alternativním sestřiháním exonu 2,3 a 10 [8].



### 1.3 Struktura a funkce tau

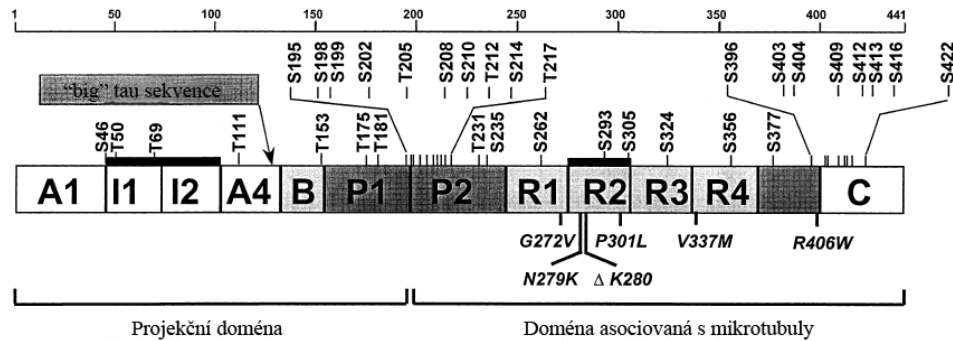
Tau je protein, který je odolný proti vysokým teplotám a koncentracím kyselin, aniž by ztratil svou funkci. V nativním stavu má jen velmi malý obsah sekundární struktury a je velmi flexibilní. Tau protein může přecházet v různé konformace, a proto se zatím nepodařilo vyřešit strukturu krystalografickými metodami. Nukleární magnetická rezonance (NMR) je jedinou metodou, která zatím umožnila popsat jeho konformace a dynamiku s vysokým stupněm rozlišení. Z počátku bylo možné studovat jen fragmenty tau proteinu nebo určité jeho sekvence. V současnosti byl získán kompletní záznam nejdelší molekuly tau proteinu (441 aminokyselin). NMR data umožnila prozkoumat strukturu a dynamiku nejdelší molekuly tau proteinu a určit, které sekvence aminokyselin se podílejí na interakci s mikrotubuly. [9].

```
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAEPRQEFVVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQ
EGDTDAGLKESPLQTPTEDEGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAA
AQPHTEIPGTTAEAEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAAGA
DGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGPEPKSGDRSGYSSP
GSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPCKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDLKN
VKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVY
KPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPG
GGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSSSTGSIDMV
DSPQLATLADEV SASLAKQGL
```

**Obr. 2:** Aminokyselinová sekvence nejdelší izoformy (441 aminokyselin) tau proteinu s histidinovou kotvou: červeně je sekvence histidinové kotvy, zeleně je sekvence tau proteinu [9, 10].

Šest izoform tau se liší podle obsahu 3R nebo 4R mikrotubulových vazebných oblastí o 31-32 aminokyselinách (repeat) v karboxylové části proteinu a jedné (1N), dvěma (2N) nebo žádné (0N) aminokoncové sekvenci o 29 aminokyselinách (AMK), která je kódována exony 2 a 3 (Obr. 3) [11, 12]. Těchto 6 izoform vypadá takto: 0N3R, 1N3R, 2N3R a 0N4R, 1N4R, 2N4R [8, 13]. Někdy jsou tyto izoformy označovány jako  $\tau_3$ ,  $\tau_3S$ ,  $\tau_3L$  a  $\tau_4$ ,  $\tau_4S$ ,  $\tau_4L$  [14]. N-terminální oblast (nazývaná projekční doménou) je kyselou částí proteinu. Je následována oblastí bohatou na prolin a C- terminální oblastí, která je bazická. Těchto 6 hlavních izoform lze separovat jako několik izovariant s izoelektrickými body mezi 9,5 a 6,5 kvůli exonické kódující kazetě a dále post-translačním modifikacím. Polypeptidová sekvence kódovaná exony 2, 3 dodává tau proteinu kyselost, zatímco exon

10 kóduje pozitivně nabitě sekvence, které dodávají bazický charakter tau proteinu. N-koncová oblast má pI 3,8, následuje prolinová doména s pI 11,4 a C-koncová oblast je pozitivně nabitá s izoelektrickým bodem 10,8. Tau je spíše dipól se dvěma doménami s opačnými náboji, které mohou být modifikovány post-translačními změnami [8].



**Obr. 3:** Schéma tau proteinu ukazuje domény a izofomy tvořené alternativním sestřiháním exonů (černá čára nad I1, I2 a R2). I1 a I2 jsou sekvence exonu 2 a 3, P1 a P2 jsou oblasti bohaté na prolin (tmavě šedá barva), R1-R4 jsou domény vázající mikrotubuly [15].

Každá z těchto izoforem má specifickou fyziologickou roli, proto jsou pravděpodobně různě produkovány během vývoje. Například jen jedna izoforma tau, charakterizována 3R a žádným N-terminálním insertem, je přítomna během vývoje plodu, zatímco další izofomy (s 1 nebo 2 N-terminálními inserty a 3- nebo 4R) jsou exprimovány v dospělosti [7, 16].

### 1.3.1 Projekční doména

Dvě sekvence o 29 AMK kódované exony 2 a 3 udávají různou délku N-terminální části tau proteinu (Obr. 3). Tato část je nazývána jako projekční doména, protože vyčnívá z mikrotubulového povrchu, kde pak může interagovat s dalšími cytoskeletálními elementy a plasmatickou membránou [7].

Projekční doména tau určuje vzdálenost mezi mikrotubuly v axonech a může zvyšovat axonální průměr. V periferních neuronech, které mají velmi dlouhý axon s velkým průměrem, je přítomná další N-terminální sekvence kódovaná exonem 4A. Díky tomu tvoří specifickou tau izoformu zvanou „velký tau“ [12]. Toto napovídá, že N-terminální regiony tau proteinu jsou velmi důležité pro stabilizaci a organizaci určitých typů axonů [7].

Tau protein se váže k aktinovým filamentům. Skrze tyto interakce může dovolit mikrotubulům propojit se s dalšími cytoskeletálními komponentami jako jsou neurofilamenta a může omezovat flexibilitu mikrotubul [17]. Tau protein interaguje s cytoplasmatickými organelami. Například taková interakce může dovolovat vázání mikrotubul k mitochondriím [7]. N-terminální projekční doména také umožňuje interakci s neurální plasmatickou membránou [18]. Tau může hrát roli při regulaci fosfolipázy C (PLC)- $\gamma$  a tím se podílet na signální transdukci [19].

### 1.3.2 Doména asociovaná s mikrotubuly

Tau proteiny se vážou na mikrotubuly prostřednictvím opakujících se regionů v C-terminální části. Tyto opakující se oblasti jsou domény (R1-R4) kódované exony 9-12. Tři (3R) nebo čtyři (4R) kopie jsou vytvořeny z konzervovaných opakujících se 18-AMK sekvencí. Tyto sekvence jsou od sebe odděleny vložením méně konzervované 13- nebo 14-AMK domény. Tau proteiny účinkují jako promotory tubulinové polymerizace *in vitro* a jsou začleněny v axonálním transportu [20]. Bylo dokázáno, že zvyšují polymerizaci mikrotubul a inhibují depolymerizaci. Opakující se 18-AMK sekvence se vážou k mikrotubulům přes flexibilní pole rozdělených slabých míst. Ukázalo se, že tau izoformy u dospělých s 4R jsou mnohem účinnější v podporování mikrotubulového skládání než izoforma s 3R u plodu. Nejúčinnější část indukující mikrotubulovou polymerizaci je ve vloženém regionu mezi první a druhou opakující se sekvencí 18-AMK a to konkrétně sekvence K<sup>274</sup>VQIINKK<sup>281</sup>. Tato sekvence je unikátní pro 4R-tau a je odpovědná za odlišnost ve vazebné afinitě mezi 3R a 4R [7]. Tau protein obsahuje také jeden nebo dva cysteiny. Cystein 291 se vyskytuje v opakujícím se regionu 2 (pouze u izoformy 4R) a cystein 322 v opakující se doméně 3 (vždy přítomný). Tato odlišnost má také vliv na agregaci tau a přechod do PHF [15].

Doména vázající mikrotubuly se pravděpodobně podílí na modulaci fosforylace tau proteinu. Byla dokázána přímá a kompetitivní vazba mezi touto doménou a mikrotubuly nebo mezi doménou vázající mikrotubuly a protein fosfatázou 2A (PP2A). Následkem toho mikrotubuly mohou inhibovat aktivitu PP2A tím, že budou soutěžit o navázání na tau protein do domény vázající mikrotubuly [7].

Tau je rozpustný, tepelně stabilní fosfoprotein a jeho biologická aktivita je regulována stupněm jeho fosforylace. Normální mozkový tau obsahuje 2-3 moly fosfátu na mol proteinu, což je optimální pro jeho funkci [14].

Tau svou schopností modulovat dynamiku mikrotubulů přispívá přímo nebo nepřímo ke klíčovým strukturálním nebo regulačním buněčným funkcím. Pomáhá udržovat příslušnou morfologii neuronů. Mikrotubulová síť je sofistikovaný transportní mechanismus, který umožňuje signálním molekulám, trofickým faktorům a dalším esenciálním buněčným složkám včetně organel cestovat podél axonů. Proto má tau protein tak velký účinek na axonální transport i na funkci a životaschopnost neuronů a jejich výběžků. Dynamická rovnováha na mikrotubuly vázaného a volného tau proteinu je primárně kontrolována fosforylačním stavem tau, který je určený akcí kináz a fosfatáz [21].

## **1.4 Buněčná lokalizace tau**

Fosforylace tau proteinu ovlivňuje při vývoji neuronů jeho distribuci. Tau fosforylovaný v oblasti bohaté na prolin je hlavně přítomný v somatodendritických částech, zatímco tau protein s defosforylovanou touto oblastí se vyskytuje v oblasti distálních axonů. Tau fosforylovaný v karboxyl-koncové doméně se nachází hlavně v oblasti distálních axonů [22].

## **1.5 Post-translační modifikace**

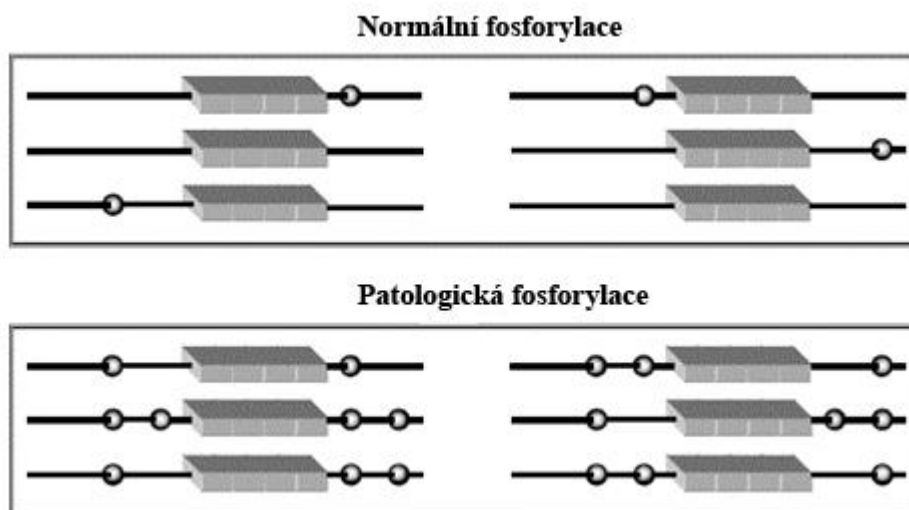
Existuje několik možností modifikace tau proteinu, jako jsou glykosylace, ubiquitylace, glykace, zesíťování apod. Nejstudovanější je však fosforylace, protože je nejcharakterističtější modifikací v patologii AN.

### **1.5.1 Tau fosforylace**

Schopnost proteinu tau vázat se na mikrotubuly je regulována řízenou fosforylací serinu nebo threoninu. Toto je nejdůležitější mechanismus regulace afinity tau k mikrotubulům. Fosforylace je regulována během vývoje, u plodů je podstatně vyšší než u dospělých. Naproti tomu nadměrná fosforylace proteinu tau je pozorována u neurodegenerace dospělých [21]. Mikrotubulová polymerizace závisí na fosforylačním stavu tau proteinu. Jeho fosforylovaná varianta je méně účinná než defosforylovaná. Fosforylace S<sup>262</sup>

dramaticky snižuje afinitu tau k mikrotubulům *in vitro*. Ale toto místo samotné, které je fosforylováno jak ve fetálním i dospělém tau proteinu, je nedostatečné pro uvolnění tau vázaného k mikrotubulům [23].

Na nejdelší variantě tau proteinu (441 AMK) je asi 80 potenciálních serinových nebo threoninových fosforylačních míst. Použitím fosforylačně-závislé monoklonální protilátky proti tau a hmotnostní spektrometrie bylo popsáno nejméně 30 těchto míst [7]. Například fosforylace na serinu 214 a 409 může být prvním krokem při změně normálního tau proteinu na abnormálně hyperfosforylovaný tau protein v AN (AN-P tau protein) [24]. Je důležité, že většina těchto potenciálních míst obklopuje mikrotubulovou-vazebnou doménu v oblasti bohaté na prolin a v C-koncové oblasti tau (Obr. 4) [8]. Různé stavy tau fosforylace vyplývají z aktivity specifických kináz a fosfatáz k těmto místům [7]. Dohromady může být tau protein fosforylován více než dvaceti protein kinázami. Ty lze dělit do dvou skupin: 1) „prolin-directed“ kinázy jako tau protein kináza I (Glycogen synthase kinase 3- GSK3), tau protein kináza II (Cdk5), MAP kináza (p38) a další stresové kinázy; 2) „non-prolin-directed“ kinázy jako protein kináza A (PKA), C (PKC), calmodulin (CaM) kináza II, MARK kináza nebo CKII, které modifikují aminokyseliny blízko ke kyselé části proteinu hlavně v exonu 2 a 3 [7, 8].



**Obr. 4:** Patologická hyperfosforylace [22]. Kulička zobrazuje fosforylaci serinu nebo threoninu a kvádr označuje oblast, která se váže k mikrotubulům.

Mezi kinázami známými tím, že fosforylují tau, byla hlavní role připsána GSK3. V transgenním modelu *Drosophila melanogaster* bylo zjištěno, že fosforylace tau GSK3 usnadňuje agregaci tau proteinu do vláknitých polymerů. Peptid A $\beta$  je začleněn v rozšiřující se fosforylaci tau proteinu pomocí GSK3, pravděpodobně zvýšením enzymatické aktivity kinázy, která se zdá být toxická pro neurony, ve kterých je přítomen tau protein. Byly identifikovány sférické agregáty A $\beta$ , které jsou vysoce neurotoxické a aktivují GSK3, která pak fosforyluje tau protein. Zvýšená fosforylace tau proteinu působením GSK3 může být způsobena antagonistickým účinkem A $\beta$  na insulinový receptor, který podporuje aktivaci GSK3. Existují další faktory, které mohou regulovat aktivitu GSK3 např. ApoE. Fosforylace tau proteinu pomocí GSK3 by mohla být potřebná při tvorbě tau polymerů. Je také možné, že fosforylace tau proteinu GSK3 kinázou potřebuje předchozí fosforylaci dalšími kinázami, a to na vedlejším místě, než které je modifikováno GSK3. Takovou kinázou, která předfosforyluje tau protein, je protein kináza II neboli Cdk5. Aktivita Cdk5 je řízena aktivitou calpainu a množstvím p25, což je aktivátor Cdk5, který je produkovaný z p35 prekurzorového proteinu proteolýzou. Množství p25 je v AN zvýšeno, což vede ke zvýšené fosforylaci tau proteinu [22, 25].

Podobně jako kinázy tak i fosfatázy mají přímý nebo nepřímý fyziologický účinek a jsou protiváhou účinku kináz. Protein fosfatázy (PP) 1, PP2A, PP2B a PP2C mohou defosforylovat tau protein *in vitro*. PP1, PP2A a PP2B defosforylují i abnormálně hyperfosforylovaný tau. PP2C fosfatáza může defosforylovat tau protein, když byl fosforylován PKA kinázou *in vitro*, ale není schopná defosforylovat abnormálně hyperfosforylovaný tau protein, který je izolován z mozkové tkáně napadené AN. PP2A se váže k tau proteinu přes jeho tubulin vazebný region. Mutace v tomto regionu mohou snížit vazebnou kapacitu PP2A a tak následně produkovat zvýšenou fosforylaci tau proteinu [22]. Protein fosfatáza 5 (PP5) je nová fosfoseryl/fosfothreonyl protein fosfatáza. Tato fosfatáza defosforyluje rekombinantní tau protein fosforylovaný cAMP- závislou protein kinázou a GSK3 [7].

### 1.5.2 Tau glykosylace

O-glykosylace je častá post-translační modifikace, která je charakterizována navázáním N-acetylglukosaminového zbytku O-glykosidovou vazbou na serin nebo threonin v sousedství prolinu za katalýzy O-GlcNAc transferázy [7, 8]. Vyskytuje se

v neurofilamentech a v proteinech asociovaných s mikrotubuly, včetně MAP a tau proteinu. Počet O-GlcN acetylovaných míst na tau proteinu je nižší než počet fosforylovaných míst. Specifické změny místa nebo stechiometrie O-glykosylace mohou modulovat funkci tau. Fosforylace a O-glykosylace mohou mít opačný účinek. Stupeň O-glykosylace proteinu, která reguluje fosforylaci, je v AN snižena a pravděpodobně je další příčinou abnormální hyperfosforylace proteinu [26]. Tau protein je navíc v mozku s AN N-glykosylován [27]. O-glykosylace může hrát roli ve zprostředkování interakce tau proteinu a MAP s tubulinem a také v subcelulární lokalizaci a degradaci tau proteinu [7].

## 1.6 Tau patologie

Změny v množství nebo struktuře tau proteinu mohou ovlivnit jeho roli jako stabilizéru mikrotubul stejně jako některé procesy, ve kterých je začleněn. Modifikace tau proteinu fosforylací ovlivňuje jeho interakci s mikrotubuly. Porucha mikrotubulové sítě v ovlivněných neuronech oslabuje axonální transport, toto vede k retrográdní degeneraci, která má za následek demenci. Hyperfosforylovaný tau protein je základní komponentou různých nenormálních agregátů nalezených v neuronech pacientů s neurologickou poruchou nazývanou jako tauopatie [22].

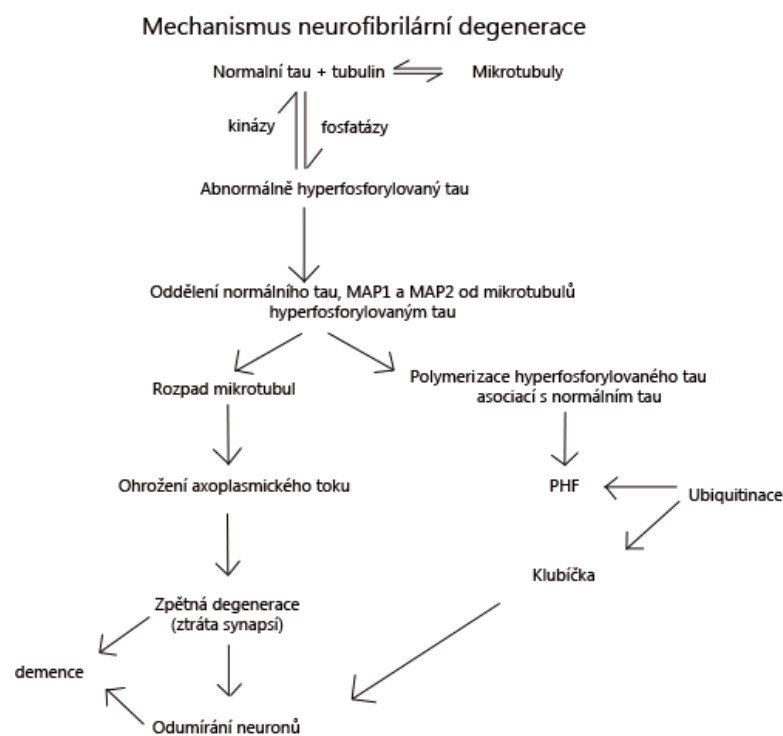
Nejznámější tauopatií je AN, ve které se tvoří dvě hlavní patologické struktury: senilní plaky (složené z  $\beta$ -amyloidu) a neurofibrilární klubíčka (neurofibrilary tangles, NFT). Tyto NFT jsou tvořené párovými helikálními filamenty (PHF) obsahujícími hyperfosforylovaný tau protein. Tau je nejméně třikrát až čtyřikrát více fosforylován v mozku s AN. [28].

Počet NFT koreluje se stupněm demence. Tvorba PHF z tau proteinu je provázána několika kroky, mezi které patří fosforylace jako konformační změna proteinu a jeho konečná polymerizace [22, 29].

Za patologických podmínek je rovnováha vázání tau proteinu k mikrotubulům narušena, což má za následek abnormální zvýšení počtu volného, nenavázaného tau. Větší koncentrace tau v cytosolu zvyšuje šanci, že dojde k patologickým změnám, které postupně povedou k agregaci a fibrilizaci tau proteinu [30]. Cesta od normálního tau vázaného na mikrotubuly k velkým agregovaným strukturám jako NFT je víceřadový fenomén, který začíná právě oddělením tau z mikrotubulů (Obr. 5).

V normálních zralých (dospělých) neuronech je tubulin přítomný v desetinásobném nadbytku k tau proteinu. To znamená, že prakticky všechny tau protein je navázán na

mikrotubuly v buňce. Tau protein polymerizovaný do NFT se neváže k tubulinu, ani nepodporuje vytváření mikrotubul. Tato toxická vlastnost patologického tau proteinu zahrnuje izolaci normálního tau proteinu z mikrotubulů pomocí modifikovaného proteinu. AN cytosolický abnormálně hyperfosforylovaný tau protein (AN P-tau) také izoluje další dva proteiny MAP1 A/B a MAP2. Asi 40 % abnormálně fosforylovaného tau proteinu v mozku s AN je přítomno v cytosolu a není polymerizováno do PHF/NFT. Asociace mezi AN P-tau a normálním proteinem v přítomnosti glykosylace má za následek tvorbu NFT. NFT jsou inertní vůči degradaci na rozdíl od nepolymerizovaného abnormálně hyperfosforylovaného tau proteinu. Léze NFT rostou s vývojem nemoci a eventuálně mohou fyzicky udusit ovlivněné buňky. Protein P-tau pracuje jako faktor, který iniciuje a podporuje agregaci tau [30].

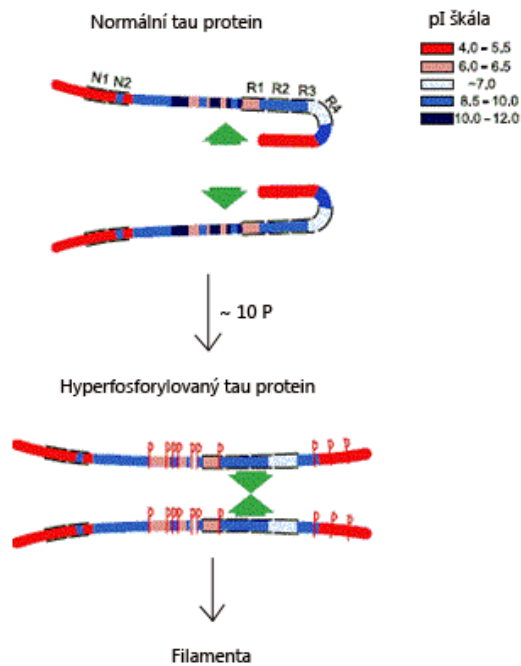


**Obr. 5:** Mechanismus neurofibrilární degenerace. [30]

Tau protein má dlouhé pozitivně i negativně nabitě oblasti, které ale nejsou nápomocné pro intramolekulární hydrofobní asociaci. V tau proteinu je  $\beta$ -struktura koncentrována jen v opakujících se doménách R2 a R3, které se mohou samy shlukovat do filament [31]. Aminokoncové a karboxylkoncové oblasti lemují oblasti proteinu odpovědné za vazbu k mikrotubulům a u normálního tau proteinu, tak inhibují shlukování do filament. Pokud ale



dojde k hyperfosforylaci těchto oblastí, inhibice je eliminována, což má za následek tvorbu klubiček PHF/SF (Obr. 6) [30].



**Obr. 6:** Fosforylace tau proteinu [30]

Abnormální hyperfosforylace předchází tedy akumulaci tau proteinu v postižených neuronech u AN. Byly provedeny kvantitativní imunocytochemické studie s mAb Tau-1, které odhalily depozita pouze abnormálně fosforylovaného tau proteinu (ne normálního) v neuronech bez klubiček (stav „0 tangles“) v AN i v normálním stárnoucím hipokampu. Za použití monoklonální protilátky proti mitotickému fosfoepitopu ukázal tento fenomén Vincent et al.[32].

### 1.6.1 Agregace tau proteinu *in vitro*

Některé modifikace jako např. deamidace usnadňují polymerizaci tau proteinu. Ukázalo se, že deamidace se vyskytuje v tau získaném z PHF. Aby docházelo k polymerizaci samotného proteinu, byly by zapotřebí vysoké koncentrace tau proteinu. Z toho vyplývá, že jsou tu nezbytné další látky, které usnadňují shlukování tau proteinu. Jako první molekuly byly testovány sulfoglykosaminglykany (sGAGs), které jsou přítomné v NFT spolu s tau proteinem. Zjistilo se, že sGAGs usnadňují polymerizaci tau *in vitro*, a to nezávisle na fosforylačním stavu [13]. Protože sGAGs jsou polyanionické sloučeniny,

mohou i jiné polyanionické látky usnadňovat polymerizaci. Takovou látkou je kyselina glutamová, která je přítomná v karboxyl-koncové oblasti tubulinu a může tedy také napomáhat agregaci. Tato agregace vyžaduje přítomnost třetího tubulin-vazebného motivu v tau molekule [22].

Mezi další procesy, které usnadňují agregaci tau proteinu, patří oxidace. Oxidace cysteinů umožňuje disulfidové zesíťování podporující samo-shlukování v molekule tau. V 3R tau proteinu je přítomen jeden cystein. V 4R tau proteinu jsou dva cysteiny, které vytváří intramolekulární disulfidové můstky [22].

Anionické micely a vezikuly indukují také tau fibrilizaci *in vitro*. Arachidonová kyselina může usnadnit agregaci, protože tvoří micely. Tyto micely mohou účinkovat jako polyaniony, pokud jsou jejich kyselé negativně nabitě karboxylové skupiny na povrchu [22].

### 1.6.2 Zkrácení tau proteinu

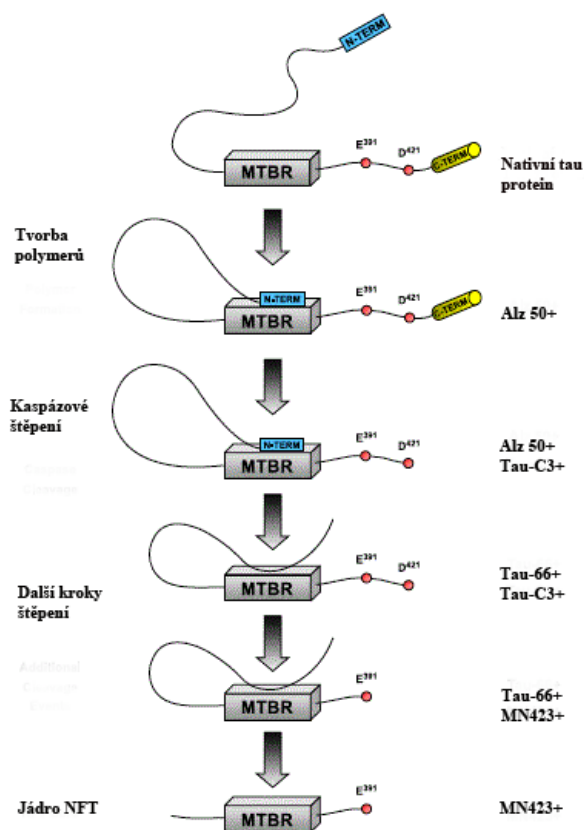
Štěpení tau proteinu je důležitým znakem ve vývoji AN [33]. Při tvorbě párových helikálních filament se uplatňuje několik faktorů, které přispívají k agregaci tau proteinu do PHF. Mezi takové vlivy patří i zkracování molekuly tau proteinu. Bylo to dokázáno tím, že jádra nerozpustných PHF purifikovaných z mozku po pitvě obsahují proteolyticky štěpený tau [34, 35].

Skládání tau molekuly stejně jako schopnost tvořit polymery je řízena nebo doprovázena proteolytickým zkrácením na obou koncích molekuly. Zkrácený tau na obou koncích molekuly se vyskytuje v jádře PHF. SDS-rozpustná PHF z mozku pacientů s AN obsahují normálně dlouhou tau molekulu. Pravděpodobně se tedy zkrácení objevuje až po tvorbě polymerů. Malé vnitřní delece v rámci N-konce (sekvence R<sup>5</sup>-Y<sup>18</sup>) inhibovaly tvorbu filament *in vitro*. Interakce této oblasti v N-konci s oblastmi, které se vážou na mikrotubuly (MTBR), je důležitým předpokladem agregace tau proteinu. Tato konformace je detekována protilátkou anti-tau Alz-50. Zkrácení na N-konci *in situ* by se mělo pravděpodobně vyskytovat po počáteční tvorbě filament [36, 37, 38].

Karboxylový konec molekuly inhibuje tvorbu filament. Fragменты tau proteinu postrádající C-konec se shlukují mnohem rychleji a ve větší míře než nativní tau protein. Kaspázy štěpí tau protein na D<sup>421</sup> a uvolňují tak diskretní peptid (S<sup>422</sup>-L<sup>441</sup>), který je schopný tvořit amfipatický alfa-helix. Tau protein ukončený na D<sup>421</sup> se shlukuje mnohem

rychleji než normálně dlouhá molekula. Když je syntetický peptid přidán zpět do molekuly tau proteinu, shlukování je zastaveno. Místo na molekule rozhodující o inhibici karboxylovým koncem se částečně překrývá s místem, které interaguje s amino-koncem při tvorbě Alz50 epitopu. Z tohoto vyplývá, že karboxylový konec molekuly tau proteinu se chová jako agregační inhibitor, který soutěží s tvorbou konformace Alz50 [36, 39].

Kaspázy jsou cysteinové proteázy, které štěpí na karboxylové straně zbytek kyseliny asparagové v sekvenci DXXD. Tyto enzymy se účastní proteolytické kaskády vedoucí k buněčné smrti skrze apoptózu. V neuronech je hlavní „killer“ kaspáza-3. Zástupci kaspázové rodiny cysteinových proteáz hrají kritickou roli v A $\beta$ -indukované neuronální apoptóze a jsou aktivovány v apoptických neuronech v AN. Byla zkoumána potenciální role kaspázového štěpení ve vývoji tau patogeneze v AN. Místo D<sup>421</sup> v tau proteinu je nejnějněji štěpeno kaspázami *in vitro*. Toto místo je lokalizováno v C-koncové části molekuly a jeho štěpení řídí shlukování tau proteinu *in vitro* [36].



**Obr.7:** Zrání NFT je sled uspořádaných konformačních změn, které zahrnují štěpení tau proteinu. Jsou zde zobrazeny dvě zkrácení karboxylového konce a jedno amino-koncové zkrácení, které ale ještě není zcela objasněno [36].

Koncept konformačních změn v tau proteinu jako alternativní post-translační modifikace u AN, se objevil s vývojem protilátek rozpoznávajících nesouvislé epitopy tvořené vlastním skládáním molekuly tau (Obr. 7). Existuje několik různých protilátek proti různě zkrácené tau molekule [34].

Vývoj struktury NFT v průběhu AN se označuje podle protilátek detekujících určité konformace: Alz50 → Tau-C3 → Tau-66 → MN423. Odvozené struktury jednotlivých epitopů naznačují, že toto pořadí výskytu konformačních změn je spojeno s C-terminálním zkrácením. V tomto schématu je epitop Alz50 vytvořen složením N-konce do kontaktu s MTBR3. Pak dochází ke zkrácení karboxylového konce kaspázou-3 na D<sup>421</sup> a tvorbě Tau-C3 epitopu. Schéma je složitější, když se tvoří Tau-66 epitop. Dochází k posunu konformace z Alz50 do stavu, kde je amino-konec zaměněn za oblast bohatou na prolin v interakci s MTBR3. Tento přechod zahrnuje zkrácení amino-konce tau molekuly. Což bylo dokázáno ztrátou reaktivity NFT k protilátkám proti N-konci. C-konec není zkrácen na D<sup>421</sup> dokud je udržována kolokalizace Alz50/Tau-C3 a Tau-C3/Tau-66. Nakonec stav Tau-66 existuje spolu se stavem MN423 díky ztrátě Tau-C3 epitopu kvůli dalšímu zkrácení z D<sup>421</sup> na E<sup>391</sup>. Tato kolokalizace se nevyskytuje ve všech klubičkách, ale jen v některých. Klubička MN423-pozitivní často nevykazují Tau-66 kolokalizaci, která je dokázána pomocí těchto protilátek [40].

## 1.7 Protilátky

Tau protein je často označován jako protein nesoucí malou nebo žádnou sekundární strukturu [41, 15]. Existují anti-tau monoklonální protilátky, které jsou selektivní k tau proteinu nacházejícímu se ve specifické konformaci. Tento fakt dokazuje, že tau si může osvojit struktury řádově vyšší. Protilátky poskytují důkazy, že tau protein s minimálně uspořádanou strukturou v monomerní formě je schopný podlehnout konformační změně při polymerizaci do uspořádanějších filament během vývoje AN. Tyto nálezy podmiňují další vyšetřování vztahu mezi konformačními změnami tau a vývojem fibrilární patologie v AN. Jsou vyvíjeny anti-tau protilátky, které rozpoznají, v jakém stavu se tau protein nachází v závislosti na jeho konformaci. Tak můžeme porozumět předpokládaným strukturálním změnám tau proteinu během vývoje AN [35].

### 1.7.1 Alz50

Rozsah konformačních změn byl určen až po objevení nesouvislého epitopu monoklonální protilátky Alz50. Analýza epitopů Alz50 odhalila dvě nesouvislé sekvence v molekule tau detekované touto protilátkou, jednu obsahující sekvenci R<sup>5</sup>-A<sup>15</sup> v N-konci a další ve třetí opakující se doméně (sekvence P<sup>312</sup>-C<sup>322</sup>). Tato protilátka se váže účinně k tau, když se N- konec tau dostává do kontaktu s MTBR. Tau molekula musí podlehnout posunu z esenciálně nesložené náhodné konfigurace do kompaktnějšího Alz50 stavu, aby mohla agregovat do filament [36, 42].

### 1.7.2 Tau-66

Protilátka Tau-66 má zvláštní vlastnosti, selhává při vazbě na tau na western blotu a také k tau denaturovanému SDS. Tau-66 vykazuje při ELISE závislost na teplotě a pufru. Tau-66 epitop je nesouvislý s jednou doménou lokalizovanou v oblasti bohaté na prolin (sekvence R<sup>155</sup>-Q<sup>244</sup>) a další doménou vyskytující se v MTBR3 (sekvence S<sup>305</sup>-D<sup>314</sup>). Protilátka Tau-66 odhalila u pacientů s AN spojení tau proteinu s jádry, mikroglie a neneuritickými plaky. Tyto důkazy naznačují, že Tau-66 náleží ke skupině monoklonálních protilátek, které reagují s tau proteinem, jen pokud je konformačně pozměněný (konformačně-závislý typ). Tato konformace je závislá na prolin-bohaté oblasti tau molekuly kontaktující oblast MTBR, která zčásti překrývá údajné místo, kam se váže N-konec v Alz-50 stavu. [35].

### 1.7.3 Tau-C3

Monoklonální protilátka Tau-C3 rozpozná tau zkrácený jen na D<sup>421</sup>. Tato protilátka obarvuje NFT, neuropilová vlákna a dystrofické neurity v mozku pacientů s AN, což jsou 3 nejběžnější patologické manifestace tau agregace *in situ*. Podle výzkumů je karboxylové štěpení na D<sup>421</sup> jediným kaspázovým štěpením v AN. Štěpení na D<sup>421</sup> (pravděpodobně kaspázou-3) se vyskytuje uvnitř většiny kompartmentů napadených neuronů v AN. Tau-C3 reaktivní NFT jsou jen částí celkového počtu klubíček a objevují se až po Alz50 konformaci, která zvěstuje tvorbu prvních polymerů tau proteinu [36].

#### 1.7.4 MN423

Někteří vědci zvažují, že C-terminální zkrácení tau proteinu je primární důvod vedoucí k shlukování tau proteinu do fibril jako jsou PHF a přímá filamenta. Tau protein zkrácený na E<sup>391</sup> je hlavní složkou nejmenších PHF jader, která se získala proteolytickým ošetřením neporušených PHF pronázou. Monoklonální protilátka MN423 specificky rozpozná tau protein zkrácený na E<sup>391</sup>. Tato protilátka dokázala, že zkrácení na tomto místě je spojené s raným i s pokročilým stadiem neurofibrilární patologie v AN [34].

#### 1.7.5 Protilátky proti aminokonci molekuly tau

O zkrácení na N-konci tau molekuly je známo méně než o C-zkrácení. Fosforylace na tyrosinu 18 je spojena s aktivací Fyn, zástupce src rodiny tyrosin protein kináz. Mezi aminokyselinami E<sup>9</sup> a S<sup>210</sup> epitopů Tau-12 a Tau-5 protilátek se objevuje nejméně jedno proteolytické štěpení. Ztráta N-koncové imunoreaktivity (Tau-12) signalizuje vývoj k těžším stádiím AN [33].

Protilátka 5A6 je nezávislá na fosforylaci a je první ze tří N-terminálních protilátek značících rozptýlená klubička. Epitop Tau-12 se objevuje, když léze přejímají fibrilární morfologii. Po odhalení epitopu Tau-12 se ztrácí z klubiček extrémní N-terminální epitop. Toto je proces, který koreluje dočasně s objevením C-terminálního zkrácení kaspázou na D<sup>421</sup> [33].

# Experimentální část

## 2 Úvod do metod

Tato kapitola slouží pro seznámení se s metodami, které byly použity na přípravu, purifikaci a využití tau proteinu.

### 2.1 Rekombinantní exprese proteinu tau

Rekombinantní protein tau byl exprimován v bakteriálních expresních systémech s použitím expresního vektoru pT7c\_hTau40. Tento vektor využívá T7 promotor zajišťující transkripci části nukleotidové sekvence pomocí bakteriofágové T7 RNA polymerázy, která má vyšší aktivitu než bakteriální RNA polymeráza. Za sekvencí T7 promotoru je tzv. polylinker, do nějž je možno vložit sekvenci DNA kódující žádaný protein. Proteinové sekvenci je předřazena sekvence histidinové kotvy. Plazmid obsahuje i selekční marker, kterým je sekvence zajišťující bakteriálnímu kmeni rezistenci k antibiotiku [43].

Použité bakteriální expresní systémy měly gen pro T7 RNA polymerázu integrovaný v bakteriální DNA za lac operátorem. Lac operátor je inhibován lac represorem, což je protein produkovaný lacI genem. K indukci exprese proteinu se používal analog laktózy isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG). IPTG se váže na lac represor a zabraňuje jeho vazbě na operátorovou oblast, čímž je zajištěn přepis žádané sekvence v okamžik přidání induktoru do bakteriální kultury. Výhodou IPTG je jeho snadný transport do buněk a skutečnost, že není buňkami metabolizovaný [44].

Plazmidová DNA byla vnesena do bakteriálních buněk metodou transformace tepelným šokem, která je založena na zvýšení permeability membrány bakterií. Bakterie, které plazmid se selekčním markerem nepřijaly, nemají příslušnou rezistenci vůči antibiotiku a odumírají. Použité recipientní buňky byly uvedeny do stavu kompetence účinkem chloridu vápenatého a byly uskladněny několik měsíců při teplotě  $-70^{\circ}\text{C}$  [45].

Dále je zapotřebí vybrat klon, který dobře roste a produkuje co nejvíce proteinu. Po nalezení dobrého producenta, je vhodné produkci optimalizovat. Podmínky, které ovlivňují produkci proteinu, jsou např. koncentrace induktoru IPTG, teplota a délka inkubace bakterií produkujících protein po přidání induktoru. Změnou těchto faktorů najdeme

optimální podmínky pro produkci proteinu a provedeme velkoobjemovou produkci proteinu.

Rekombinantní protein může být exprimovaný do nerozpustných agregátů, do cytoplazmy nebo do kultivačního média. Před zahájením purifikace je proto nutné zjistit lokalizaci exprimovaného proteinu. Tu je možné zjistit elektroforetickou analýzou frakcí po diferenční centrifugaci buněčného lyzátu.

## **2.2 Purifikace proteinu**

Pro purifikaci proteinu tau byly použity tři metody: afinitní, gelová a ionexová chromatografie. Také zahuštěním proteinu koncentrátory dochází k částečnému přečištění proteinu.

### **2.2.1 Chromatografické metody**

Afinitní chromatografie typu IMAC (**i**mmobilized **m**etal **i**on chromatography) je založena na afinitě proteinu s histidinovou kotvou k imobilizovanému kovu na nosiči (chromatografické koloně) a jeho následném uvolnění kompeticí s imidazolem. Imidazol je heterocyklická sloučenina se strukturou podobnou histidinu. Náplně kolon na afinitní chromatografii obsahují imobilizované ionty niklu, na které se váže histidinová kotva proteinu. Eluce se uskutečňuje elučním pufrem o vysoké koncentraci imidazolu [46].

Ionexová chromatografie využívá k separaci látek vazby na základě iontových interakcí a závislosti náboje biomakromolekul na pH či iontové síle prostředí. Lze použít kolony v podobě anexu, které váží záporně nabitě molekuly nebo katexy, které dělí molekuly kladně nabitě [47].

Gelová chromatografie dělí proteiny na základě jejich velikosti (molekulové hmotnosti). Existují různé typy materiálů pro dělení látek např. dextranové gely, agarózové gely, silikagel atd.

### **2.2.2 Zahušťování roztoku proteinů pomocí centrifugačních koncentrátorů**

Zahušťování roztoku proteinů je metoda, při níž je vzorek odstředivou silou tlačěn přes membránu s póry. Voda a malé molekuly tak prochází na opačnou stranu membrány, zatímco protein zůstává na straně původní. Roztoky proteinů mohou být zahušťovány např.



koncentrátoři Amicon Ultra 4 (4 ml) nebo 15 (15 ml) lišících se objemem s různou velikostí pórů, a tím i propustností pro proteiny od 5 kDa do 300 kDa.

### **2.3 Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové**

Stanovení koncentrace proteinů podle Bradfordové je velmi rychlá a poměrně citlivá metoda kvantifikace proteinů. Princip metody je založen na vazbě barviva Coomassie Brillinat Blue G-250 na bazické a aromatické aminokyseliny proteinu. Po navázání barviva na protein dochází k posunu absorpčního maxima barviva z 470 na 595 nm. Nevýhodou metody je závislost na aminokyselinovém složení stanovovaného proteinu a rušivý vliv detergentů používajících se při izolaci a purifikaci proteinů [48].

### **2.4 Stanovení koncentrace proteinů podle Lowryho**

Lowryho metoda je citlivá na nízké koncentrace proteinu. Její nevýhoda je úzký interval pH reakční směsi, ve kterém je použitelná. Použití malých objemů vzorku (relativně vůči objemu reakční směsi) umožňuje tuto nevýhodu odstranit. Některé interferující látky je nutno před měřením odstranit (např. vysrážením proteinů a následnou centrifugací) [49].

První složkou je biuretové činidlo, druhou složkou činidlo Folin-Ciocalteu. Biuretová metoda je založena na chelataci měďnatého iontu imidovými strukturami polypeptidového řetězce v alkalickém pH. Vzniká červený (/fialový) komplex. Folin-Ciocalteuovo činidlo obsahuje kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové, které se redukují tyrosinovými zbytky proteinů a barví se modře s absorpčním maximem při 750 nm. Metoda je citlivá na změny v pH, pH reakční směsi by mělo být drženo v mezích 10 - 10.5 [49].

## **2.5 Elektromigrační metody**

### **2.5.1 SDS-PAGE elektroforéza**

Elektroforéza v přítomnosti SDS je jednoduchá, rychlá a reprodukovatelná metoda pro charakterizaci a srovnání bílkovin. Tato metoda separuje bílkoviny na základě rozdílné relativní molekulové hmotnosti. SDS (detergent s negativním nábojem) se zde masivně váže na bílkovinný řetězec, naruší jeho sekundární strukturu a prakticky eliminuje rozdíly v izoelektrických bodech. Pohyblivost komplexu SDS-bílkovina je při elektroforéze

nepřímo úměrná jeho molekulové hmotnosti. Na základě srovnání mobilit neznámé bílkoviny a standardů je pak možné určit její relativní molekulovou hmotnost. [50]

### **2.5.2 Western Blotting**

Western blotting patří mezi metody detekce proteinů po elektroforéze v polyakrylamidovém gelu. Princip spočívá v elektropřenosu proteinů z gelu na membránu, která je chemicky i mechanicky odolnější než gel. Protein je pak detekován pomocí primární a sekundární protilátky. Na sekundární protilátku je kovalentně navázán enzym (např. peroxidáza), který katalyzuje přeměnu substrátu na produkt, který je barevný (stanovení spektrofotometricky) nebo fluoreskující (stanovení fluorometricky) [51].

## **2.6 Imunizace**

Purifikované proteiny se upravují na emulzi pomocí různých adjuvancií např. Adjuvant Freund Complete, který obsahuje mykobakterie. Mykobakterie přitahují makrofágy a další buňky k místu injekce a zvyšují tím imunitní odpověď. Z tohoto důvodu se používá pro počáteční injekci proteinu. Adjuvant je přidán k antigenu v poměru 1:1, aby vznikla emulze. Antigen se z emulze uvolňuje postupně, a tím stimuluje vysokou a dlouhodobou tvorbu protilátek. Další injekce proteinu je však realizována v podobě emulze vytvořené z nekompletního adjuvantu a proteinu v poměru 1:1. Nekompletní adjuvant se liší od kompletního tím, že neobsahuje mykobakterie a díky tomu má méně vedlejších účinků. Protein se z emulze uvolňuje také pomalu, a proto stimuluje vyšší tvorbu protilátek dlouhodobě.

## **2.7 ELISA**

ELISA - enzyme-linked immuno sorbent assay, je analytická metoda využívaná ke stanovení různých antigenů nebo protilátek. Metoda je založena na vysoce specifické interakci antigenu a primární protilátky. Na primární protilátku se váže sekundární protilátka, na kterou je kovalentně navázán enzym (nejčastěji peroxidáza nebo alkalická fosfatáza). Tento enzym, který je přidán do reakční směsi, katalyzuje chemickou přeměnu substrátu na produkt, který je barevný nebo fluoreskující. Produkt se pak stanovuje spektrofotometricky nebo fluorometricky. Koncentrace produktu je úměrná koncentraci

antigenu nebo protilátky ve vzorku. Dalším společným znakem metod ELISA je zakotvení (adsorpce nebo kovalentní navázání) antigenu nebo protilátky na nerozpustný nosič (mikrotitrační destičku), což usnadňuje separaci imunochemicky navázaných molekul.

### 3 Cíle práce

Shrnutí literárních poznatků o struktuře, úloze a funkci tau proteinu v neurodegenerativních onemocněních.

Příprava rekombinantního lidského tau proteinu v bakteriích *E. coli*.

Optimalizace velkoobjemové produkce rekombinantního lidského tau proteinu a jeho purifikace.

Stanovení hladiny protilátek proti rekombinantnímu lidskému proteinu v lidském krevním séru.

Porovnání výsledků získaných na rekombinantním lidském tau proteinu s výsledky dosaženými na komerčním bovinním tau proteinu.

Příprava vlastní polyklonální protilátky proti připravenému tau proteinu imunizací králíků.

Další perspektivy:

Optimalizovat purifikaci tau proteinu použitím HPLC na reverzní fázi a využití tepelné stability proteinu tau.

Purifikace králičí polyklonální protilátky proti rekombinantnímu lidskému tau proteinu.

Vývoj ELISA metody na stanovení množství tau proteinu v mozkomíšním moku.

Příprava zkrácených forem tau proteinu.

Vývoj ELISA metody na stanovení protilátek proti zkráceným formám tau proteinu v lidském séru.

## 4 Materiál

### 4.1 Přístroje

Analytické váhy AL54 (Beckman Coulter, USA)

Analytické váhy (Sartorius research, Německo)

Automatické pipety Finnpiquette (Thermo Scientific, USA)

Centrifuga Universal 32 R (Hettich, Německo)

Centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)

Centrifuga Avanti J-26 XP (Beckman Coulter, USA)

Centrifuga Z383K (Hermle, Německo)

Detektor UV-1 (Pharmacia AB, Švédsko)

HPLC systém- pumpa P580, Autosampler Ultimate 3000, Detektor PDA- 100 (Dionex, USA)

Kolona Mono-S 5/50 GL (Pharmacia AB, Švédsko)

Kolona Superose 12 HR 10/30 (Pharmacia AB, Švédsko)

Míchačka Jenway 1000 (P-Lab, ČR)

Magnetická míchačka MM 2A (Laboratorní přístroje Praha, ČR)

Napájecí zdroj Power Pack 1000 (Bio-Rad, Německo)

Nitrocelulózová membrána Trans-Blot 0,45  $\mu\text{m}$  (Bio-Rad, Německo)

pH- metr CyberScan pH 6000 (Eutech, Nizozemsko)

pH-metr  $\Phi$ 200 (Beckman Coulter, USA)

Předvážky Kern EW 120-4NM (Kern, Německo)

Spektrofotometr UV-2101 PC (Shimadzu, Japonsko)

Spektrofotometr DU-70 (Beckman Coulter, USA)

Souprava pro vertikální elektroforézu Protean (Bio-Rad, Německo)

Souprava pro mokrou metodu Western Blotting (Bio-Rad, Německo)

Suchá lázeň (Major Scienis, USA)

Superloop (GE Healthcare, Švédsko)

Třepačka na Erlenmayerovy baňky (Gallenkamp Ltd., UK)

Třepačka na zkumavky BigCer Bill (Thermolyne, USA)

Třepačka Titramax 100 (Heidolph, Německo)

Ultrazvuková sonda Vibracell Bioblock 72442 (Fisher scientific, France)

Ultrazvuková sonda ultrasonic Homogenizer 4710 (Cole-Parmer Instrum. Co., USA)

## 4.2 Chemikálie

Agar (Oxoid, USA)

Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

Ampicilin (Biotika, Slovensko)

Azid sodný (Lachema, ČR)

Trypton (Oxoid, USA)

Kvasničný extrakt (Oxoid, USA)

Bromfenolová modř (Lachema, ČR)

BSA (Reanal, Maďarsko)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Německo)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Thermo, Anglie)

Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich, USA)

DTT (Reanal, Maďarsko)

DMSO (Sigma-Aldrich, USA)

Glycin (Bio-Rad, Německo)

Glycerol (Sigma-Aldrich, USA)

IPTG (Serva, Německo)

$\beta$ -merkaptoethanol (Merck, Německo)

N,N'-metylen-bis-akrylamid (Serva, Německo)

Ni-NTA Agarosa (GE Healthcare, Švédsko)

Peroxodisíran amonný (Serva, Německo)

Sephadex G-25 (Pharmacia AB, Švédsko)

SDS (Sigma-Aldrich, USA)

Standardy pro SDS-PAGE (Bio-Rad, Německo)

Sušené odtučněné mléko (Lactino, ČR)

TEMED (Serva, Německo)

Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich, USA)

Thiomersal (Sigma-Aldrich, USA)

Tris (Sigma-Aldrich, USA)

Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA)

Ostatní chemikálie (Lachema nebo Penta, ČR)

Všechny použité chemikálie byly o minimální čistotě p.a.

Vzorky lidského krevního séra byly získány od doc. MUDr. Aleše Bartoše Ph.D. z Psychiatrického centra Praha.

### **4.3 Enzymy**

Lysozym- z bílků slepičích vajec (Serva, Německo)

### **4.4 Inhibitory proteáz**

PMSF (Janssen, Belgie)

### **4.5 Protilátky**

Anti-tau 46.1 (dar od Dr. Francisca Garcia- Sierry, Mexiko)

Anti- tau 5 (dar od Dr. Francisca Garcia- Sierry, Mexiko)

Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins (Ig)/HRP (Dako Cytomation, Dánsko)

Goat Anti-Human IgG ( $\gamma$  chain specific)/HRP (SouthernBiotech, USA)

Swine Anti-Rabbit Ig/HRP (Dako Cytomation, Dánsko)

### **4.6 Vektory**

pT7c\_hTau40 (dar od profesora Lester I. Bindera, Chicago, USA)

### **4.7 Bakteriální kmeny**

*Escherichia coli* BL21(DE3): *E. coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) *gal*  $\lambda$ (DE3)  
(Stratagene 200131, USA)

*Escherichia coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL: *E. coli* B F<sup>-</sup> *ompT hsdS*(rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) *dcm*<sup>+</sup> Tetr  
*gal*  $\lambda$ (DE3) *endA Hte* [*argU ileYleuW Camr*] (Stratagene 230245, USA)

## 4.8 Software

GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, USA)

STATISTICA 9 (StatSoft, USA)

## 4.9 Roztoky a pufrы

- **TE pufr:**  
10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA pH=8
- **Roztok pro stanovení koncentrace proteinů dle Lowryho:**
  - Reagent A:  
0,025% (w/v) CuSO<sub>4</sub>, 0,05% C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>K<sub>2</sub>, 2,5% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,2 M NaOH
- **Pufrы pro afinitní chromatografii:**
  - **Lyzační pufr:**  
47,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 0,025% (w/v) lysozym, 1mM PMSF pH=8
  - **Promývací pufr:**  
47,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, 20 mM imidazol, pH=8
  - **Eluční pufr:**  
47,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM imidazol, pH=8
- **Pufr pro gelovou chromatografii:**  
20 mM Tris-HCl, 10% (v/v) methanol, pH=7,5
- **Pufrы pro ionexovou chromatografii:**
  - **A:** 3,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10% (v/v) methanol, pH=6,7
  - **B:** 3,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5M NaCl, 10% (v/v) methanol, pH=6,7
  - **C:** 3,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1M NaCl, 10% (v/v) methanol, pH=6,7
- **Roztoky pro SDS elektroforézu:**
  - **Barvicí roztok pro SDS elektroforézu:**  
0,1% (w/v) CBB R-250, 45% (v/v) methanol, 10% (v/v) kyselina octová
  - **Elektrodový pufr (Laemmlí):**  
0,25 M Tris-HCl, 1,92 M glycin, 1% (w/v) SDS, pH=8,3



- **Fixační a odbarvovací roztok pro SDS elektroforézu:**

35% (v/v) ethanol, 10% (v/v) kyselina octová

- **Vzorkový pufr pro SDS-PAGE redukující 5×:**

60 mM Tris-HCl pH= 6,8, 25% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) bromfenolová modř, 14,4 mM β-merkaptoethanol

- **Směs akrylamidu:**

29% (w/v) akrylamid, 1% (w/v) N,N'-metylen-bis-akrylamid

➤ **Roztoky pro Western-Blotting:**

- **Pufr pro elektropřenos:**

25 mM Tris, 192 mM glycin, 20% (v/v) methanol

- **Blokovací roztok:**

7,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0,1% (w/v) Tween-20, 10% (w/v) sušené odtučněné mléko

- **PBST pufr:**

7,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,8 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0,1% (w/v) Tween-20, pH=7,2-7,4

- **Roztok substrátu:**

50 mM CH<sub>3</sub>COONa pH 5,5, 0,5 mg/ml diaminobenzidin, 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

➤ **ELISA pufr:**

- **Uhlíčitánový pufr na pokrytí destičky:**

30,7 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 69,9 mM NaHCO<sub>3</sub> pH=9,5, 5 μg/ml tau

- **PBS:**

0,14 M NaCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

- **Blokující roztok a ředící pufr:**

1% (w/v) BSA v PBS

- **Promývací roztok:**

100 mM NaCl, 0,05% (w/v) Tween 20, 0,013 mM Thiomersal

- **Roztok substrátu:**

0,1 M CH<sub>3</sub>COONa pH=5,5, 0,1mg/ml tetramethylbenzidin, 0,003% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

- **Roztok pro zastavení reakce:**

1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## 4.10 Média

- **Luria Bertani médium:**  
1% (w/v) trypton, 0,5% (w/v) kvasničný extrakt, 1% (w/v) NaCl, pH=7,4
- **LB agar:**  
1,25% (w/v) agar v LB médiu

## 5 Metody

Postupy uvedené v metodické části jsou založeny na dlouholetých zkušenostech pracovníků Laboratoře architektury proteinů a pracovníků PCP, doporučeních výrobců některých chemikálií a přístrojů a dostupné literatury.

### 5.1 Rekombinantní exprese tau proteinu

#### 5.1.1 Transformace kompetentních buněk a selekce produkčních klonů

Transformace kompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3) a BL21 (DE3) (RIL) byla provedena metodou tepelného šoku rekombinantním plazmidem pT7c\_hTau40.

K 50  $\mu$ l kompetentních buněk BL21, které se nechaly rozmrazit v ledové lázni, bylo přidáno 0,5  $\mu$ l plazmidové DNA pT7c\_hTau40 v TE pufru (0,1  $\mu$ g) a směs byla inkubována 1 hod na ledu. Dále byl proveden tepelný šok při 42°C po dobu 45 sekund a pak byly buňky ihned vráceny na 2 min na led. A současně k nim bylo přidáno 0,5 ml sterilního LB média o teplotě 37°C a tato směs byla za třepání inkubována 1 hod při 37°C. Množství 100 a 200  $\mu$ l buněčné suspenze bylo sterilní vychlazenou skleněnou tyčinkou rozprostřeno v Petriho miskách po povrchu LB agaru obsahující ampicilin o konečné koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Petriho misky s inokulovaným LB agarem byly inkubovány při 37°C přes noc. Inkubace by neměla přesáhnout 20 hodin, aby nedošlo k přerůstání bakteriálních kolonií do sebe.

Následovala selekce nejvhodnější bakteriální kolonie pro expresi tau proteinu. Po transformaci kompetentních buněk bylo 10 různých bakteriálních kolonií asepticky vypíchnuto a přeneseno sterilním párátkem do zkumavky obsahující 2 ml LB média s ampicilinem o konečné koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Bakterie byly kultivovány při 37°C s třepáním 220 otáček/min přes noc. Druhý den byl 1 ml bakterií sterilně odpipetován do nových 10 zkumavek s 2 ml LB média s ampicilinem o konečné koncentraci 100  $\mu$ g/ml a směs se inkubovala při 37°C a 220 otáčkách/min 1 hod. Následně byla provedena indukce proteinové exprese induktorem o finální koncentraci 1 mM IPTG. Bakteriální směs byla s induktorem kultivována 4 hod, poté byly bakterie centrifugovány při 5 000 otáčkách/min po dobu 5 min při laboratorní teplotě. Potom byl sediment rozpuštěn v 16  $\mu$ l vody a ve 4  $\mu$ l 5 $\times$  redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Suspenze byla povařena 1 min ve

vodní lázni a znovu odstředěna při 12 000 otáčkách/min v rotoru F-45-24-11 2 min při laboratorní teplotě. Dalším krokem byla SDS elektroforéza v 10% polyakrylamidovém gelu, přičemž do jedné jamky bylo aplikováno 20  $\mu$ l z připraveného supernatantu. Přítomnost exprimovaného proteinu byla potvrzena srovnáním elektroforeticky rozdělených proteinů mezi indukovanými a neindukovanými kulturami jednotlivých kolonií bakterií.

### **5.1.2 Optimalizace produkce rekombinantního proteinu**

Parametry vybranými pro optimalizaci byly čas proteinové produkce, koncentrace induktoru IPTG a typ kompetentních buněk.

Pro optimalizaci proteinové produkce na základě vlivu koncentrace IPTG, bylo 5 zkumavek se 2 ml LB média s antibiotikem inokulováno 300  $\mu$ l bakteriální stacionární kultury jednoho produkčního klonu. Následovala kultivace při 220 otáčkách/min a 37°C 1 hod, kdy se uskutečnila indukce proteinové exprese 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, a 1,0 mM IPTG. Dalším krokem byla 3 hod kultivace při 220 otáčkách/min a 37°C. Poté byly z každé bakteriální kultury připraveny vzorky pro elektroforézu stejným postupem jako v předchozí kapitole a nakonec analyzovány SDS elektroforézou v 10% polyakrylamidovém gelu.

Čas proteinové produkce a typ kompetentních buněk byly testovány souběžně. Pro srovnání byly transformovány nové kompetentní buňky BL21 (RIL) a BL21 (DE3), dále byly použity transformované buňky vybraného produkčního klonu BL21 (DE3) uchovávané více jak měsíc ve 4°C (v lednici) a buňky do čtrnácti dnů po transformaci zamražené na -80°C. Z Petriho misek byly asepticky přeneseny kolonie buněk BL21 (RIL) a BL21(DE3) o průměru 2 mm sterilním párátkem do 25 ml LB média s příslušným antibiotikem. Ekvivalentní množství buněk uchovávaných v lednici a zamražených bylo napipetováno také do 25 ml LB média s antibiotikem. Množství buněk bylo 5  $\mu$ l, aby byla hustota buněk podobná. Bakteriální kultury byly kultivovány při 220 otáčkách/min a teplotě 37°C přes noc. Druhý den bylo 100 ml LB média s příslušným antibiotikem inokulováno 9 ml bakteriální kultury nově transformovaných BL21(DE3) buněk, BL21 (RIL) a 15 ml buněk v předchozí kapitole vybraného produkčního klonu uchovávaných v lednici a 9 ml zamražených. Bakteriální kultury byly kultivovány při 220 otáčkách/min a teplotě 37°C do  $A_{600}=1,3$ , kdy se uskutečnila indukce proteinové exprese 0,5 mM IPTG.

Dále následovala kultivace při 220 otáčkách/min v 37°C, přičemž byly z bakteriální kultury odebírány vzorky o objemu 1 ml bakteriální kultury v čase 1, 2, 3, 4, 5, 6 a 7 hodin po indukci. Ihned po odběru byl vzorek kultury odstředěn při 5 000 otáčkách/min po dobu 5 min při laboratorní teplotě a sediment poté uskladněn v -20°C. Nakonec byly všechny vzorky analyzovány SDS elektroforézou v 10% polyakrylamidovém gelu.

### **5.1.3 Velkoobjemová produkce proteinu**

Bakteriální klon, který exprimoval tau protein nejlépe, byl napěstován v 25 ml LB média s ampicilinem, dále rozdělen do alikvotů a stočen při 4 000 otáčkách/min po dobu 4 minut v malých zkumavkách. Supernatant byl odebrán a pelet resuspendován v 200  $\mu$ l 15% glycerolu a zamražen v -80°C. Velkoobjemová produkce byla prováděna v 0,5 litru kultivačního média - LB médium s ampicilinem o konečné koncentraci 100  $\mu$ g/ml. Pro zajištění dostatečného provzdušnění byl objem použité Erlenmayerovy baňky dvakrát větší než objem média. Před každou velkoobjemovou kultivací jsem nechala 30  $\mu$ l vybraného klonu bakterií narůst v 25 ml LB média s ampicilinem přes noc v 18°C. Takto připravenými 12 ml bakterií jsem inokulovala 0,5 l kultivačního média. Poté následovala kultivace za třepání při 220 otáčkách/min a teplotě 37°C. Proteinová exprese byla indukována při  $A_{600}=1,3$  pomocí IPTG o optimální koncentraci a následovala kultivace při teplotě 37°C za třepání 220 otáček/min po optimální dobu. Nakonec byla buněčná kultura odstředěna 15 min při 5 000 otáčkách/min v rotoru Avanti JA 25.50 a 10°C.

### **5.1.4 Zjištění lokalizace tau proteinu**

Výchozím materiálem byla buněčná kultura po velkoobjemové produkci proteinu, ze které bylo odebráno 0,5 ml. Odebraná buněčná kultura byla odstředěna 15 min při 5 000 otáčkách/min a 10°C. K 16  $\mu$ l supernatantu byly přidány 4  $\mu$ l 5 $\times$  koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Sediment byl resuspendován v 0,5 ml lyzačního pufru a posonikován sonikační sondou pětkrát po 20 sekundách s 30 sekundovými pauzami na ledu a nakonec zamražen v -20°C a rozmražen. Buněčný lyzát byl odstředěn 15 min při 12 000 otáčkách/min a 10°C. K 16  $\mu$ l supernatantu byly přidány 4  $\mu$ l 5 $\times$  koncentrovaného redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Sediment byl resuspendován ve 100  $\mu$ l lyzačního pufru. Z tohoto roztoku bylo odebráno 16  $\mu$ l a přidány 4  $\mu$ l 5 $\times$  redukujícího vzorkového pufru pro SDS-PAGE. Takto připravené vzorky byly

považeny 5 minut na vodní lázni, pak odstředěny při 12 000 otáčkách/min a laboratorní teplotě a nakonec aplikovány na jamky gelu o objemu 20  $\mu$ l a následně analyzovány SDS elektroforézou v 10% polyakrylamidovém gelu.

## **5.2 Purifikace tau proteinu**

### **5.2.1 Afinity chromatografie**

Afinity chromatografie se realizovala na koloně o objemu 25 ml naplněné Ni NTA agarózou. Ni NTA agaróza byla připravena podle návodu od výrobce. 5 ml NTA agarózy bylo stočeno při 1 000 otáčkách/min po dobu 5 min a poté byl oddělen pufr, ve kterém byla skladována. Dále bylo k NTA agaróze přidáno 10 ml 2% NiSO<sub>4</sub> a roztok byl inkubován 2 hod při pokojové teplotě. Nakonec byl roztok NTA agarózy napipetován do kolony a promyt vodou v množství 10 objemů kolony.

Výchozím materiálem bylo 1,5 l buněčné kultury po velkoobjemové produkci proteinu, která byla odstředěna 15 min při 5 000 otáčkách/min a 10°C. Sediment z bakterií byl zamražen v -20°C a následně resuspendován v 20 ml fosfátového lyzačního pufru a posonikován desetkrát po 20 sekundách s 30 sekundovými přestávkami na ledu tak, aby nedocházelo k zahřátí směsi. Buněčný lyzát byl odstředěn 25 minut při 12 000 otáčkách/min při 10°C. Sediment byl znovu resuspendován v 20 ml lyzačního pufru a posonikován stejným postupem. Celý postup sonikace byl zopakován celkem třikrát se stejnou buněčnou kulturou.

Získané lyzáty (celkem 45 ml) byly sloučeny a doplněny na 100 ml lyzačním pufrém. Naředěný lyzát o objemu 100 ml byl nanesen na afinity kolonu přes noc peristaltickou pumpou při průtoku 0,1 ml/min. Obsah kolony byl poté promyt 50 ml lyzačního pufru při průtoku 1 ml/min, dále 50 ml promývacího pufru při stejném průtoku a nakonec byla uskutečněna eluce pomocí 6-10 ml elučního pufru o vysoké koncentraci imidazolu při průtoku 0,5 ml/min. Průběh promývání a eluce afinity chromatografie byly kontrolovány průtokovým UV-detektorem při 280 nm a protein byl jímán manuálně.

### **5.2.2 Gelová chromatografie**

Eluce z afinity chromatografie obsahující tau protein byla zahuštěna v koncentrátoru Amicon Ultra 15, s propustností pro proteiny menší než 30 kDa, na objem 0,75 ml. Při

zahušťování nebyl měněn pufr. Toto množství bylo nanášeno 1 ml smyčkou na kolonu Superose 12 HR 10/30 ekvilibrovanou pufr pro gelovou chromatografii. Proteiny byly eluovány izokraticky při průtokové rychlosti 0,25 ml/min. Eluce proteinů byla monitorována průtokovým fotometrickým detektorem při 280 nm a proteinové frakce byly na základě  $A_{280}$  jímány manuálně. Eluce tau proteinu probíhala od 68. minuty do 84. minuty. Proteinové frakce byly analyzované SDS-PAGE elektroforézou a technikou Western blotting.

### **5.2.3 Ionexová chromatografie**

Sloučené eluce z gelové chromatografie obsahující tau protein o objemu 5 ml a pH 7,5 byly naředěny na 10 ml 10 mM fosfátovým pufr o pH 4,9, aby bylo upraveno pH roztoku proteinů na 6,7, které je vhodné k vazbě na katex. Takto připravený roztok proteinů byl nanášen na kolonu Mono-S 5/50 GL o rozměrech 5,0 × 50,0 mm pomocí kapilární smyčky pro nanášení vzorku o objemu 10 ml. Proteiny byly eluovány lineárním gradientem do 0,5 M NaCl při průtokové rychlosti 0,4 ml/min. Eluce proteinů byla monitorována průtokovým fotometrickým detektorem při 280 nm a proteinové frakce byly jímány manuálně a následně byly analyzovány SDS-PAGE elektroforézou a technikou Western blotting.

Čištění, skladování kolon a HPLC se konalo dle návodu od výrobce.

### **5.2.4 Zahušťování roztoku proteinů pomocí centrifugačních koncentrátorů**

Roztoky proteinů byly zahušťovány na objem 100-1000  $\mu$ l pomocí centrifugačních koncentrátorů Amicon Ultra s maximálním objemem 15 ml a s limitem 30 kDa. Roztok proteinů byl zahušťován v centrifuze Universal 32 R s výkyvným šestimístným rotorem při 3 500 otáčkách/min, teplotě 10°C po dobu 10 až 25 minut. Po zahuštění byl retenát promíchán opakovaným pipetováním a přenesen do čisté mikrokumavky. Centrifugační koncentrátory byly uskladněny pro opakované použití v roztoku 1 mM azidu sodného při 4°C.

### 5.3 Stanovení koncentrace proteinu

Koncentrace byla stanovována spektrofotometricky metodou Bradfordové v plastových kyvetách. K 10  $\mu$ l roztoku proteinu bylo přidáno 90  $\mu$ l vody a následně 2 ml roztoku Coomassie Brilliant Blue G-250. Směs byla následně promíchána a inkubována 10 min při laboratorní teplotě. Všechna stanovení byla prováděna triplicitně, aby byly eliminovány chyby z pipetování malých objemů. Množství proteinu bylo stanoveno měřením absorbance při 595 nm a odčítáním z kalibrační křivky, která byla získána pomocí ředěné řady standardu BSA v rozsahu koncentrací 0,125 až 2 mg/ml. Koncentrace byla vypočtena metodou interpolace koncentrace vzorků z kalibrační křivky ve fitovacím programu GraphPad Prism 3.

Konečná koncentrace proteinu po dokončení purifikace byla určena metodou podle Lowryho [49]. Koncentrace byla stanovována spektrofotometricky v plastových kyvetách. Pro odstranění interferujících látek bylo odebráno 200-400  $\mu$ l vzorku proteinové směsi a k ní bylo přidáno 50-100  $\mu$ l 50% TCA. Precipitace trvala jednu hodinu při pokojové teplotě. Pak byl precipitát odstředěn při 12 000 otáčkách/min 15 minut při 4°C. Supernatant byl slit a sediment byl promyt 10% TCA, aby se vymyly poslední zbytky potenciálních interferujících látek. Vzorky byly znovu odstředěny stejným způsobem a byl ponechán sediment.

Ke vzorkům upraveným precipitací bylo přidáno 100  $\mu$ l 1 M NaOH a 100  $\mu$ l destilované vody a precipitát se nechal při pokojové teplotě rozpustit. Následně byly vzorky doplněny destilovanou vodou na 500  $\mu$ l. Z takto upravených vzorků bylo odebráno 50  $\mu$ l, které byly doplněny na 1 ml destilovanou vodou a poté byl přidán 1 ml reagentu A. Směs se nechala reagovat 15 minut při pokojové teplotě. Nakonec byl přidán 0,5 ml Folin-Ciocalteuova činidla ředěného 1:2 destilovanou vodou a roztok se nechal reagovat 30 minut. Množství proteinu bylo měřeno při 750 nm a zjištěno vypočtením z kalibrační křivky, která byla sestrojena pomocí ředěné řady standardu BSA v rozsahu koncentrací od 0,025 mg/ml do 0,2 mg/ml. Koncentrace byla vypočtena metodou interpolace koncentrace vzorků z kalibrační křivky ve fitovacím programu GraphPad Prism 3.



## 5.4 Elektromigrační metody

### 5.4.1 SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky na elektroforézu byly připraveny smísením s 5× koncentrovaným redukujícím vzorkovým pufrům. Poté byly vzorky 10 min povařeny při 98°C v suchém bloku, dále byly odstředěny při 12 000 otáčkách/min a laboratorní teplotě 1 minutu a nanесeny na gel. Jako standard byl použit standard od firmy Bio-Rad (Precision Plus Protein Standard Dual Color).

Separální gel byl připraven podle Tabulky 1. Směs byla nastříknuta mezi skla a převrstvena vodou či isopropanolem. Po zpolymerování gelu byla voda vylita a stejným postupem byl nanесen koncentrační gel o složení, které vyjadřuje Tabulka 2. Ihned po nanесení koncentračního gelu byl do něj vložen hřeben. Po zpolymerování koncentračního gelu byl hřeben vyjmut, jamky byly promyty vodou a následně elektrodovým pufrům. Dále byla sestavena elektroforetická aparatura a do jamek gelu aplikovány vzorky určené pro analýzu a standardy molekulových hmotností. Elektroforéza proteinů na dvou gelech probíhala při 50 V a 25 mA pro zaostřovací gel a 200 V a 100 mA pro separální gel. Elektroforéza byla ukončena, když čelo elektroforézy opustilo gel. Po ukončení elektroforézy byly gely ihned obarveny.

Gely byly barveny 10 minut v barvicím roztoku pro SDS elektroforézu a potom odbarveny v odbarvovacím roztoku do odbarvení pozadí.

**Tabulka 1: 10% separální gel - složení směsi na dva gely o tloušťce 0,75 mm**

	[ml]
<b>Voda</b>	4
<b>30% směs akrylamid/bisakrylamid (29:1)</b>	3,3
<b>1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)</b>	2,5
<b>10% SDS</b>	0,1
<b>10% persíran amonný</b>	0,1
<b>TEMED</b>	0,004

**Tabulka 2: 5% koncentrační gel - složení směsi na dva gely o tloušťce 0,75 mm**

	[ml]
<b>Voda</b>	1,4
<b>30% směs akrylamid/bisakrylamid (29:1)</b>	0,33
<b>1 M Tris-HCl (pH 6,8)</b>	0,25
<b>10% SDS</b>	0,02
<b>10% persíran amonný</b>	0,02
<b>TEMED</b>	0,002

#### **5.4.2 Western Blotting**

Po elektroforetické separaci byl polyakrylamidový gel ekvilibrován 10 min v transferovém pufru. Nitrocelulosevá membrána společně se čtyřmi kusy Whatman 3 MM filtračního papíru a dvěma houbami byla ekvilibrována 15 min v transferovém pufru. Na spodní černou část kazety byla položena houba, na ní dva kusy Whatman papíru a na papír byl položen ekvilibrovaný gel. Dále byla na gel rozprostřena ekvilibrovaná nitrocelulosevá membrána o velikosti gelu, tak aby mezi membránou a gelem nebyly žádné vzduchové bubliny. Na membránu byly znovu umístěny dva kusy Whatman papíru a nakonec houba namočená v transferovém pufru. Takto uspořádaná souprava byla uzavřena, takže gel byl blíže ke katodě a membrána byla blíže anodě. Souprava byla umístěna do elektroforetické vany naplněné transferovým pufrem a chlazená ledem. Elektropřenos proteinů z gelu na membránu probíhal při 100 V 75 min.

Po elektropřenosu proteinů z gelu na membránu, byla membrána opláchnuta vodou a přenesena do misky a byl zkontrolován elektropřenos roztokem Ponceau Red. Dále byla membrána opláchnuta vodou a přenesena do nové misky s blokujícím roztokem. Blokování trvalo 2 hodiny při laboratorní teplotě a mírném třepání. Takto ošetřená membrána byla přenesena do 3 ml primární protilátky myší anti-tau 46.1 (dar od Dr. Francisca Garcia-Sierry) 60 000× ředěné v PBST a byla inkubována přes noc při laboratorní teplotě. Následně byla membrána propláchnuta 4× 5 minut roztokem PBST a převrstvena 3 ml sekundární protilátky Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP 6 000× ředěné v PBST. Inkubace se sekundární protilátkou byla realizována 2,5 hodiny při laboratorní teplotě. Po inkubaci sekundární protilátkou byla membrána znovu promyta 6×

5 minut roztokem PBST. Nakonec byl přidán na membránu roztok substrátu pro sekundární protilátku. Reakce trvala 2 minuty, poté byla membrána opláchnuta vodou, aby nevzniklo vysoké pozadí.

## **5.5 Imunizace králíků**

Sloučené purifikované frakce z ionexové chromatografie obsahující tau protein byly pro každou imunizaci zakoncentrovány v koncentrátoru Amicon Ultra 15 (30 kDa) na objem cca 1 ml o konečné koncentraci 0,6 mg/ml. Při první imunizaci bylo přidáno stejné množství (poměr 1:1) emulgátoru Adjuvants Freund Complete, který obsahuje mykobakterie. Emulze byla vytvořena prosáváním roztoku mezi dvěma spojenými injekčními stříkačkami (lze také intenzivním třepáním). Vzniklá emulze byla použita pro první imunizaci tří králíků. Každému králíkovi byla vpravena injekce pod kůži za krkem, která obsahovala cca 200 µg tau proteinu. Pro další tři imunizační injekce byl již použit emulgátor Adjuvants Freund Incomplete, který neobsahuje mykobakterie. Emulze byla vytvořena stejným postupem. Druhá imunizace po 26 dnech byla provedena s cca 250 µg proteinu na jednoho králíka. Třetí imunizace proběhla po 20 dnech od druhé imunizace a obsahovala cca 200 µg proteinu tau na jednoho králíka. Po každé injekci byla králíkům minimálně týden od vpichu odebrána krev. Týden po třetí injekci byli dva králíci vykrevni srdeční punkcí. Zbylému králíkovi byla vpravena ještě jedna injekce emulze, která obsahovala cca 350 µg tau proteinu. Celkem bylo na imunizaci spotřebováno cca 2,3 mg tau proteinu.

## **5.6 Odběr a zpracování krevních sér králíků**

Imunizace, odběr krve a zpracování sér byly realizovány na králících z akreditovaného chovu (pracoviště má akreditaci k chovu laboratorních zvířat podle §17 zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání). Tyto úkony byly provedeny na Oddělení biologických kontrol Fyziologického ústavu AV ČR v.v.i., v Praze Krči, Vídeňská 1083, pověřenými a školenými pracovníky v souladu s výše zmíněným zákonem.

Králíci byli týden po dokončení pokusu imunizace vykrevni srdeční punkcí. Krev se nechala koagulovat přes noc v chladové komoře při 4°C a následně byla stočena 30 min při

2 000 otáčkách/min při 4°C. Supernatant, který obsahoval sérum, byl zamražen a uchováván při -80°C. Pro stanovení protilátek proti tau proteinu bylo použito celé sérum.

## **5.7 Odběr a zpracování krevního séra pacientů s AN a normálních kontrol**

Vzorky krevních sér byly získávány ve spolupráci s Doc. MUDr. Alešem Bartošem Ph.D. z Psychiatrického centra Praha. Krevní séra pocházela od 41 pacientů starších 55 let s AN podle kritérií NINCDS-ADRDA [52]. Vzorky od 36 normálních osob starších 55 let do kontrolní skupiny vznikaly přirozeným způsobem z běžné klinické praxe. Podmínkou zařazení byly normální kognitivní funkce podle kognitivních testů (MMSE nebo ACE) [53]. Každý subjekt účastnící se studie měl přiřazeno z Psychiatrického centra v Praze unikátní číslo, pod kterým po dobu trvání výzkumu vystupoval. Výzkumné osoby podepsaly informovaný souhlas s účastí ve studii, která byla schválena etickými komisemi Psychiatrického centra Praha a FN Královské Vinohrady.

Krev odebraná vyšetřovaným osobám se nechala koagulovat při laboratorní teplotě po dobu 20-40 min. Poté byla centrifugována při 3 500 otáčkách/min po dobu 10-15 min při laboratorní teplotě. Získané krevní sérum bylo nejdéle do jedné hodiny od centrifugace zamrazeno na -80°C a při této teplotě bylo dále skladováno. Vzorky byly jednou rozmrazeny pro stanovení s komerčním bovinním tau proteinem. Vzorky pro stanovení protilátek proti rekombinantnímu lidskému tau proteinu ELISA metodou byly rozmrazeny při laboratorní teplotě těsně před samotným stanovením.

## **5.8 ELISA**

### **5.8.1 Kompetitivní ELISA**

Byly použity mikrotitrační polystyrenové destičky NUNC Maxisorp s 96 jamkami o objemu 400 µl/ jamku.

Jamky pro vzorek byly pokryty 0,1 ml/jamku roztoku tau proteinu o koncentraci 5 µg/ml v 0,1 M uhličitanovém pufru o pH 9,5. Každý vzorek byl připraven ve dvou opakováních. Jamky pro kontrolu nebyly pokryty roztokem tau proteinu, ale zůstaly prázdné. Každý vzorek měl k sobě dvě kontroly. Pokryté destičky byly inkubovány 1 hodinu při laboratorní teplotě a dále pak přes noc v lednici při 4°C. Na vysušené destičky

bylo nanášeno 0,25 ml/jamku blokujícího roztoku a inkubace trvala 2 hodiny při pokojové teplotě a při třepání 500 otáček/min na orbitální třepačce. Následně byly destičky promyty 5× 400 µl promývacího roztoku na přístroji Thermo Wellwash 4 Mk 2 a vysušeny při laboratorní teplotě. Na vysušené destičky bylo do každé jamky sedmi řádků nanášeno 50 µl kompetujícího roztoku tau proteinu. Tento roztok byl připraven naředěním tau proteinu ředícím roztokem na 7 koncentrací od 500 ng/jamku do 0,7 ng/jamku. Zbýlý jeden řádek sloužil jako kontrola, a proto bylo do každé jamky nanášeno 50 µl samotného ředícího roztoku. Ihned poté bylo do každé jamky napipetováno 50 µl primární protilátky anti-tau 46.1 ředěné v ředícím pufru. Výsledné ředění bylo v prvních čtyřech sloupcích 120 000×, v dalších čtyřech 60 000× a v posledních čtyřech sloupcích bylo ředění 30 000×. Inkubace trvala 2 hodiny při laboratorní teplotě a třepání 500 otáček/min na orbitální třepačce. Po dvou hodinách byly celé destičky promyty 5× 400 µl promývacího roztoku na jamku a vysušeny při laboratorní teplotě. Do každé jamky bylo nanášeno 0,1 ml sekundární protilátky Polyclonal Rabbit Anti-Mouse immunoglobulins/HRP ve finálním ředění 10 000×. Sekundární protilátka byla ředěna v ředícím pufru. Inkubace se uskutečnila 1,5 hodiny znovu na orbitální třepačce při třepání 500 otáček/min a při laboratorní teplotě. Dále se opakovalo promývání 5× 400 µl/ jamku promývacím roztokem na přístroji Thermo Wellwash 4 Mk 2 a poté bylo do každé jamky pipetováno 0,2 ml roztoku substrátu. Inkubace trvala 20 minut do zabarvení jamek, kdy byl použit roztok pro zastavení reakce v objemu 50 µl na jamku. Směs v jamkách byla promíchána na třepačce a během 10 minut byla změřena absorbance na Elisa Readeru při 450 nm.

### **5.8.2 Stanovení protilátek proti tau proteinu v sérech pacientů s AN a normálních seniorů**

Na ELISA metody byly použity mikrotitrační destičky NUNC Strip MaxiSorp s 96 jamkami s plochým dnem. Maximální objem jamky je 400 µl.

Každá jamka pro vzorek nebo standard byla pokryta 50 µl roztoku tau proteinu o koncentraci 5 µg/ml v 0,1 M uhličitanovém pufru o pH 9,5 a takto připravené destičky byly inkubovány přes noc ve 4°C. Standard i vzorky byly udělány ve dvou opakováních. Pro každý vzorek a jednotlivá ředění standardu byla připravena jen jedna kontrola, která byla postačující podle předchozích pokusů. Druhý den byly destičky blokovány 200 µl blokujícího roztoku v každé jamce po dobu jedné hodiny při laboratorní teplotě. Po blokaci

byly destičky promyty 4× 400 µl promývacího roztoku na jamku a vysušeny při laboratorní teplotě na buničině. Standard byl získán od Mgr. Jany Švarcové, která ho připravila smísením asi 20 sér pacientů i normálních seniorů, která měla při ředění 100× absorbanci ± 1. Standard byl rozpipetován na alikvoty, které byly uchovávány v -80°C. V tomto ELISA stanovení byl standard sériově naředěn ředícím roztokem: 100×, 200×, 400×, 800×, 1600×. Vzorky pacientů byly ředěny 200× ředícím pufrům. Na destičky do každé jamky bylo napipetováno 50 µl roztoku standardu nebo vzorku. Destičky byly inkubovány se vzorky sér pacientů a standardu po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Pak byly destičky znovu promyty 4× 400 µl/jamku promývacím roztokem a vysušeny při laboratorní teplotě na buničině. Sekundární protilátka Goat Anti-Human IgG (γ chain specific)/HRP byla ředěna 1:4000 v ředícím pufru a na jamku bylo nanášeno 100 µl roztoku sekundární protilátky. Destičky byly se sekundární protilátkou inkubovány 1,5 hodiny při laboratorní teplotě. Následovalo znovu promytí 4× 400 µl/jamku promývacím roztokem a vysušení při laboratorní teplotě. Substrát byl připraven bezprostředně před přidáním na destičku. Do každé jamky bylo napipetováno 100 µl roztoku substrátu a destička byla inkubována ve tmě a při třepání 500 otáček/min na orbitální třepače a při laboratorní teplotě podobu 15 minut. Reakce byla zastavena 0,1 ml/jamku 1 M kyseliny sírové a byla změřena absorbance na Elisa Reader při 450 nm a referenční vlnové délce 620 nm.

### **5.8.3 Stanovení protilátek proti tau proteinu v sérech králíků**

Na stanovení protilátek proti tau proteinu v sérech králíků byly použity mikrotitrační polystyrenové destičky NUNC MaxiSorp s 96 jamkami s plochým dnem. Mezi jednotlivými injekcemi emulze byl odstup cca 25 dní. Séra byla králíkům odebrána mezi 8. a 13. dnem po injekci emulze proteinu.

Destičky byly pokryty 100 µl/jamku roztokem tau proteinu o koncentraci 5 µg/ml v 0,1 M uhličitanovém pufru o pH 9,5 a destičky byly inkubovány 3 hodiny za stálého třepání při 500 otáčkách/ min na orbitální třepače při laboratorní teplotě. Vzorky byly připraveny v dubletu a každý vzorek měl jednu kontrolu. Po třech hodinách byly destičky blokovány 5% odtučněným mlékem v 0,1 M uhličitanovém pufru o pH 9,5 po dobu dvou hodin při laboratorní teplotě a třepání. Dále byly destičky promyty 4× 400 µl promývacího roztoku na jamku pomocí přístroje Thermo Wellwash 4 Mk 2. Vzorky sér z králíků, které byly skladovány v -80°C, byly rozmrazeny a ředěny sériově 7× v ředícím roztoku. Ředění bylo

provedeno 1 458 000×, 486 000×, 162 000×, 54 000×, 18 000×, 6 000× a 2 000× (tj. 0,00007-0,05 µl/jamku) pro každý vzorek odebraný z králíků. Jako negativní kontrola bylo použito sérum odebrané z jednoho králíka ještě před imunizací. Kontrolní negativní sérum bylo ředěno 6 000× a 2 000×. Na jamku bylo nanášeno 100 µl roztoku vzorku. Inkubace se séry trvala 2 hodiny při laboratorní teplotě a třepání 500 otáček/min. Po těchto dvou hodinách byly destičky znovu promyty 4× 400 µl promývacího roztoku na jamku v přístroji Wellwash. Poté bylo do všech jamek nanášeno 100 µl sekundární protilátky Swine anti-rabbit Ig/HRP ve finálním ředění 1:10 000. Sekundární protilátka byla ředěna v ředícím roztoku stejně jako vzorky. Destičky se sekundární protilátkou byly inkubovány 2 hodiny při laboratorní teplotě a třepání na orbitální třepačce při 500 otáčkách/min. Před přidáním substrátu byly destičky znovu promyty 5× 400 µl promývacího roztoku na jamku a vysušeny. Do každé jamky bylo napipetováno 200 µl roztoku substrátu. Destičky se substrátem byly inkubovány 45 min při laboratorní teplotě a třepání 500 otáček/min. Reakce byla zastavena 50 µl/jamku 0,5 M kyseliny sírové a během 10 minut byla změřena absorbance na Elisa Readeru při 450 nm.

## 5.9 Statistické analýzy

V této části jsou teoreticky vysvětleny statistické metody použité k analýze získaných dat.

### 5.9.1 Testy normality

#### Kolmogorův-Smirnovův (K-S) test normality

K-S test testuje nulovou hypotézu  $H_0$  říkající, že výběr  $X_1, \dots, X_n$  pochází z rozdělení s distribuční funkcí  $\theta(x)$ . Pokud  $F_n(X)$  je výběrová distribuční funkce, lze vypočítat testovou statistiku jako

$$(1) D_n = \max_{-\infty < x < \infty} |F_n(x) - \theta(x)|$$

V případě, že  $D_n \geq D_n(\alpha)$ , kde  $D_n(\alpha)$  je tabelovaná kritická hodnota, se zamítá  $H_0$  na hladině  $\alpha$ . V programu STATISTICA 9 K-S test poskytuje hodnotu testové statistiky ozn. d a dvě p- hodnoty. První lze použít, pokud jsou známy parametry populačního průměru  $\mu$  a rozptylu  $\sigma^2$  a druhou označenou Lilieforsova p-hodnota, pokud parametry nejsou známy. Testuje se nulová hypotéza, že data pocházejí z normálně distribuované populace, ale bez

upřesnění o jaké normální rozdělení se jedná. Pokud jsou p-hodnoty větší než 0,05, pak se  $H_0$  nezamítá [54, 55].

## Diagramy

Pro zjištění zda data pocházejí z normálního či jiného rozdělení lze ve STATISTICE 9 zkonstruovat normální diagramy (normal probability plot) nebo Q-Q diagramy (Quantil-Quantil diagramy). Na diagramech jsou vidět odchylky od přímky normálního rozdělení. Pokud jsou odchylky výrazné (konvexní či konkávní), nepochází data z normálního rozdělení.

### 5.9.2 Neparаметrický jednovýběrový párový test

V případě, že veličina  $Z_i = X_i - Y_i$  nepochází z normálního rozdělení, ale pouze z nějakého spojitého rozdělení, musí se provést některý z neparаметrických párových testů.

#### Jednovýběrový Wilcoxonův test

Testuje se hypotéza, že medián  $Z_i$  je roven nule proti oboustranné alternativě. Pro velká  $n$  ( $n \geq 30$ ) lze vypočítat statistiku

$$(2) \quad U = \frac{W - \frac{n(n+1)}{4}}{\sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}}},$$

která se v případě nulové hypotézy asymptoticky řídí rozdělením  $N(0,1)$ .  $W$  je součet pořadí  $Z_i$ . Hypotéza  $H_0$  o nulovém mediánu  $Z_i$  (tedy o rovnosti mediánů veličin  $X_i$  a  $Y_i$ ) se zamítá na hladině významnosti přibližně  $\alpha$ , jestliže  $|U| \geq u_{1-\alpha/2}$ . Výstupní data z programu STATISTICA 9 jsou: hodnota testové statistiky (označena T), hodnota asymptotické testové statistiky (ozn. Z) a její p-hodnota. Ve STATISTICE se pracuje se Z bez ohledu na rozsah výběru  $n$ .  $H_0$  se zamítá pokud dosažená hladina testu, p-hodnota je nižší než hladina významnosti  $\alpha$  (0,05) [54, 55].

### 5.9.3 Neparаметrické dvouvýběrové nepárové testy

Neparаметrické dvouvýběrové testy jsou používány v situaci, kdy není splněn předpoklad normality dat.



### Mannův-Whitneyův U (M-W U) test

Předpokládá se, že  $X_1, \dots, X_m$  je náhodný výběr z nějakého spojitého rozdělení a  $Y_1, \dots, Y_n$  je na něm nezávislý náhodný výběr spojitého rozdělení, které je proti prvnímu posunutě o konstantu  $\delta$ . Náhodné veličiny  $X_1, \dots, X_m$  a  $Y_1 - \delta, \dots, Y_n - \delta$  mají tedy vlastně stejné rozdělení. Testovat se bude nulová hypotéza  $H_0: \delta=0$ , tzn., že tato rozdělení jsou totožná (distribuční funkce těchto rozdělení jsou shodné) proti oboustranné alternativě  $H_1: \delta \neq 0$ . Statistiky  $U_1$  a  $U_2$  se vypočítají:

$$(3) U_1 = mn + \frac{n(n+1)}{2} - T_1 \text{ a}$$

$$(4) U_2 = mn + \frac{m(m+1)}{2} - T_2.$$

$T_1$  je součet pořadí hodnot  $X_1, \dots, X_m$  a  $T_2$  je součet pořadí hodnot  $Y_1, \dots, Y_n$ . Pro malá  $m$  a  $n$  se zjistí  $\min(U_1, U_2)$  a porovná se s tabelovanou kritickou hodnotou  $w_{m,nw}(\alpha)$ . V případě, že  $\min(U_1, U_2) \leq w_{m,nw}(\alpha)$  se zamítá  $H_0$  na hladině  $\alpha$ . Pro  $m \rightarrow \infty, n \rightarrow \infty$  (v praxi  $m, n > 30$ ) má statistika  $U_1$  asymptoticky normální rozdělení. Statistika  $U$  se vypočte jako

$$(5) U = \frac{U_1 - \frac{mn}{2}}{\sqrt{\frac{mn(m+n+1)}{12}}}.$$

V případě platnosti  $H_0$  má  $U$  asymptoticky rozdělení  $N(0,1)$ .  $H_0$  se tedy zamítá na hladině  $\alpha$  v případě, že  $|U| \geq u_{1-\alpha/2}$  [54, 55].

V programu STATISTICA 9 tento test poskytuje součty pořadí  $T_1, T_2$  (ozn. Rank sum), hodnotu testové statistiky  $\min(U_1, U_2)$  (ozn. U), hodnotu asymptotické testové statistiky  $U$  (ozn. Z) a její p-hodnotu. Pokud dosažená hladina testu, p-hodnota je menší než 0,05, zamítá se na dané hladině nulová hypotéza [55].

Pokud se rozdělení náhodných výběrů liší nejen posunutím, ale např. rozptylem nebo tvarem, použijeme test Waldův-Wolfowitzův (je ale slabší než M-W U test) nebo Kolmogorovův-Smirnovův test.

### Waldův-Wolfowitzův (W-W) test

Nechť  $m$   $X_1, \dots, X_m$  a  $Y_1, \dots, Y_n$  jsou dva nezávislé náhodné výběry ze dvou spojitých rozdělení. Testuje se hypotéza, že oba výběry pocházejí ze stejného rozdělení oproti alternativě, že pocházejí z rozdělení různých. Opět se uspořádají všechny  $m + n$  hodnoty vzestupně podle velikosti. Jako testová statistika se použije  $R$ , což je počet iterací (počet

posloupností za sebou následujících hodnot patřících do stejného výběru). Pokud  $R \leq r_{m,n}(\alpha)$ , kde  $r_{m,n}(\alpha)$  je tabelovaná kritická hodnota,  $H_0$  se zamítá na hladině významnosti  $\alpha$ .

V případě větších rozsahů výběrů ( $m, n > 20$ ) lze využít asymptotické normality  $R$ .

V případě platnosti  $H_0$  platí

$$(6) E(R) = \frac{2mn}{n+m} + 1$$

$$(7) D(R) = \frac{2mn(2mn-m-n)}{(n+m)^2(n+m-1)} \text{ a statistika}$$

$$(8) U_0 = \frac{R-E(R)}{\sqrt{D(R)}}$$

má asymptoticky rozdělení  $N(0,1)$ .

$H_0$  se zamítá na asymptotické hladině významnosti  $\alpha$ , pokud absolutní hodnota  $U_0 \geq u_{1-\alpha/2}$  [54, 55].

Ve výstupní tabulce ve STATISTICE 9 se objevují rozsahy a průměry obou výběrů, hodnota asymptotické statistiky  $U_0$  (ozn.  $Z$ ), p-hodnota pro  $U_0$ , hodnota asymptotické statistiky s opravou na spojitost ( $Z_{\text{adj}}$ ), p-hodnota pro  $Z_{\text{adj}}$ , počet iterací (No. Of Runs) a počet shodných pozorování (No. Of ties). Pokud dosažená hladina testu, p-hodnota pro  $Z_{\text{adj}}$  je menší než 0,05, zamítá se nulová hypotéza o shodném rozdělení [55].

### Dvouvýběrový Kolmogorovův-Smirnovův (K-S) test

Nechť  $m$   $X_1, \dots, X_m$  a  $n$   $Y_1, \dots, Y_n$  jsou dva nezávislé náhodné výběry ze dvou spojitých rozdělení. Testuje se hypotéza, že distribuční funkce těchto dvou rozdělení jsou shodné, tzn. že všechny  $m+n$  veličiny pochází z téhož rozdělení. Za předpokladu, že  $x$  je dané reálné číslo, se zavedou nejprve náhodné veličiny  $\xi_i(x) = 1$ , je-li  $X_i \leq x$ ,  $\xi_i(x) = 0$ , je-li  $X_i > x$  pro  $i = 1, \dots, m$ .

Funkce  $F_m(x)$  je empirická distribuční funkce.

$$(9) F_m(x) = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m \xi_i(x)$$

Empirická distribuční funkce druhého výběru se vypočítá analogicky a je označena  $G_n(y)$ .

$$(10) D_{m,n} = \max_x |F_m(x) - G_n(x)|.$$

V případě malých hodnot čísel  $m$  a  $n$  se porovnává  $D_{m,n}$  s tabelovanou kritickou hodnotou  $D_{m,n}(\alpha)$ . Nulová hypotéza o rovnosti distribučních funkcí  $F(x)$  a  $G(y)$  se zamítá

na hladině významnosti  $\alpha$ , pokud  $D_{m,n} \geq D_{m,n}(\alpha)$ . V případě větších  $m$  a  $n$  se kritická hodnota aproximuje číslem

$$(11) D_{m,n}^*(\alpha) = \sqrt{\frac{m+n}{2mn}} \ln \frac{2}{\alpha} \text{ a}$$

$H_0$  se zamítá opět pokud  $D_{m,n} \geq D_{m,n}^*(\alpha)$  [54, 55].

Z programu STATISTICA 9 lze získat maximální záporný (ozn. Max. Neg. Difference) a maximální kladný rozdíl (Max. Pos. Difference) mezi hodnotami obou výběrových distribučních funkcí, dolní omezení pro p-hodnotu, průměry, směrodatné odchylky a rozsahy obou výběrů. Pokud je dosažená hladina testu, p-hodnota menší než 0,05, pak se zamítá nulová hypotéza [55].

## **6 Výsledky**

### **6.1 Úvod k výsledkům**

Na přípravu rekombinantního lidského tau proteinu byl použit upravený plazmid, který obsahoval histidinovou kotvu. Konstrukt pT7c\_hTau40 pochází z laboratoře Lester I. Bindera [11].

Aminokyselinová sekvence tau proteinu s histidinovou kotvou obsahuje 461 aminokyselin. Teoretická molekulová hmotnost tau proteinu s histidinovou kotvou je 48013.2 Da a vypočtený izoelektrický bod je 8,52 [56].

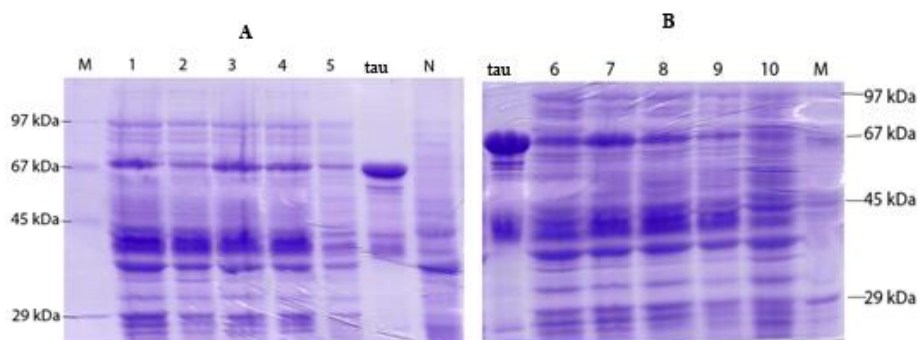
### **6.2 Rekombinantní exprese tau proteinu**

#### **6.2.1 Transformace kompetentních buněk a selekce produkčních klonů**

Nejprve byla v expresi tau proteinu provedena transformace kompetentních buněk BL21(DE3) a BL21(DE3) (RIL) rekombinantním plazmidem pT7c\_hTau40.

Kompetentní buňky byly transformovány metodou tepelného šoku podle postupu 5.1.1. Po 20 hodinové inkubaci vyrostlo na čtyřech LB agarech s obsahem ampicilinu v Petriho miskách několik desítek bakteriálních kolonií.

Dále následovala selekce produkčních klonů podle postupu 5.1.1. Expese rekombinantního proteinu byla analyzována SDS-PAGE elektroforézou v 10% polyakrylamidovém gelu s porovnáním elektroforeticky rozdělených proteinů mezi indukovanou a neindukovanou kulturou transformantů. (Obr. 8). Ve všech drahách elektroforeogramu je významná zóna v oblasti 67 kDa, která velikostí odpovídá exprimovanému proteinu tau.



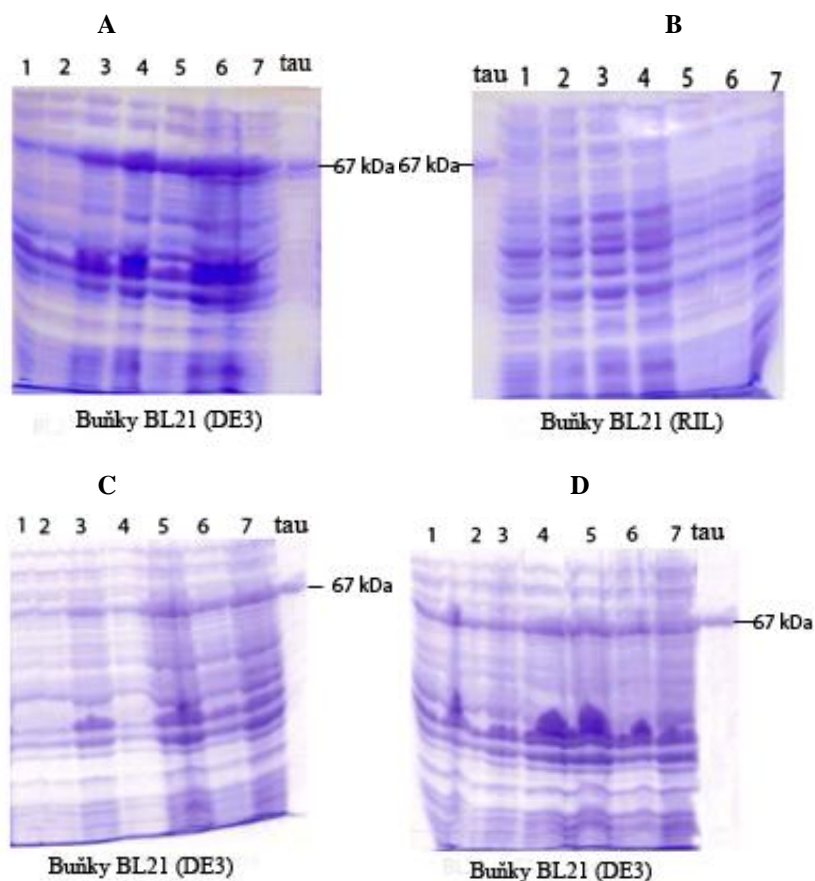
**Obr. 8:** *Selekce vhodného bakteriálního klonu byla provedena na 10% SDS-PAGE gelech. Čísła 1-10 představují jednotlivé bakteriální klony, tau je částečně přečištěný protein již získaný od RNDr. Kateřiny Hofbauerové, Ph.D. a sloužící jako standard, N je označení neindukované bakteriální kultury, M je označení pro standard.*

Za nejvhodnější byla vybrána kolonie číslo sedm. Identifikace rekombinantních proteinů byla provedena metodou Western Blotting pomocí specifické protilátky anti-tau 46.1 proti tau proteinu, viz kapitola 6.4.

## 6.2.2 Optimalizace produkce rekombinantního proteinu

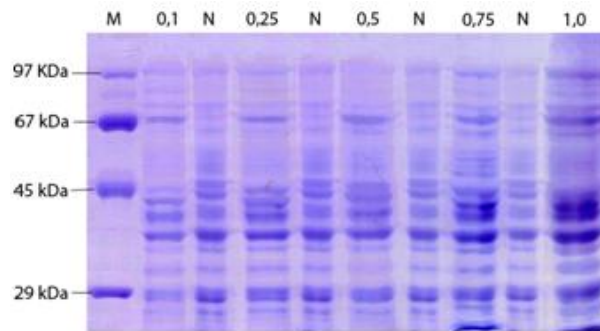
Cílem optimalizace proteinové produkce bylo získat maximální množství proteinu za minimální čas s využitím minimálních finančních prostředků. Optimalizovanými parametry byly čas proteinové produkce, typ kompetentních buněk a koncentrace induktoru IPTG. Při optimalizaci se postupovalo podle kapitoly 5.1.2. Optimalizace byla analyzována SDS elektroforézou v 10% polyakrylamidovém gelu.

Z elektroforeogramů znázorňujících kinetiku produkce rekombinantního proteinu tau vyplývá, že protein je produkován bakteriemi již od 1. hodiny indukce, přičemž jeho produkce postupně stoupá až do 4. hodiny, dále je už množství téměř konstantní. Také je zde vidět, který typ buněk a jak starých, je nejvhodnější pro proteinovou produkci. Z Obr. 9 vyplývá, že jako nejvhodnější se ukázaly buňky čerstvě transformované BL21 (DE3) (Obr. 9A). Buňky vybrané kolonie číslo sedm zamražené po 14 dnech na  $-80^{\circ}\text{C}$  (Obr. 9C) a uchovávané ve  $4^{\circ}\text{C}$  více než 3 týdny (Obr. 9D), také produkují požadovaný protein, ale již v menším množství než čerstvě transformované buňky. Buňky BL21 (RIL) se ukázaly jako nevhodné pro expresi tau proteinu (Obr. 9B).



**Obr. 9:** Optimalizace doby indukce a typu transformovaných buněk. 10% SDS-PAGE gely ukazují (A) buňky BL21 (DE3) čerstvě transformované, (B) buňky BL21 (RIL) čerstvě transformované, (C) buňky BL21 (DE3) po transformaci zamražené v  $-80^{\circ}\text{C}$  a (D) buňky BL21 (DE3) po transformaci uchovávané ve  $4^{\circ}\text{C}$ .

Vliv koncentrace induktoru IPTG na proteinovou produkci je uvedený na Obr. 10. Jak je vidět tak množství indukovaného proteinu se ze zvyšující koncentrací induktoru zvyšuje.

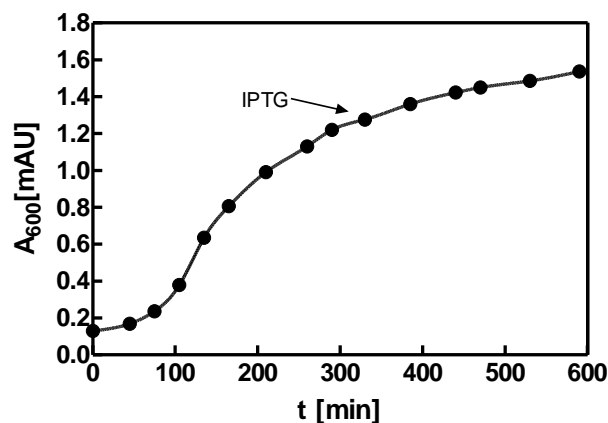


**Obr. 10:** Optimalizace koncentrace induktoru analyzovaná 10% SDS-PAGE gelem. 0,1-1,0 mM je koncentrace iduktoru IPTG, N je negativní kontrola indukce, M je standard molekulových hmotností.

Za optimální podmínky pro proteinovou produkci byly zvoleny 4,5 hodiny indukce proteinové exprese, koncentrace induktoru 0,5 mM IPTG a teplota 37°C.

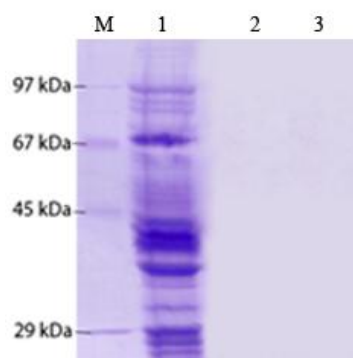
### 6.2.3 Velkoobjemová produkce proteinu a zjištění jeho lokalizace

Velkoobjemová produkce proteinu byla realizována nejčastěji v 0,5 l LB média obsahujícího ampicilin. Při  $A_{600} = 1,3$  se uskutečnila indukce proteinové exprese 0,5 mM IPTG. Bakteriální kultura byla dále kultivována při 220 otáčkách/min a 37°C po dobu 4,5 hodiny. Nakonec byla odstředěna při 5 000 otáčkách/min 15 min v 10°C. Takto získaný bakteriální sediment byl zamražen v -20°C.



**Obr. 11:** Růstová křivka producenta tau proteinu při velkoobjemové produkci stanovená spektrofotometricky při kultivaci na LB médiu. Šipka ukazuje čas, ve kterém byl přidán induktor IPTG.

Dalším krokem bylo zjištění lokalizace exprimovaného proteinu, která byla určena elektroforetickou analýzou frakcí po diferenční centrifugaci buněčného lyzátu. Analýza byla provedena podle kapitoly 5.1.4. Obr. 12 dokazuje, že se tau protein exprimuje do cytoplazmy bakteriálních buněk.



**Obr. 12:** Lokalizace exprimovaného proteinu analyzovaná 10% SDS-PAGE gelem. M je standard molekulových hmotností, 1- supernatant po odstředění rozbitých bakterií, 2- sediment po odstředění rozbitých bakterií, 3- supernatant po odstředění buněk (médiu)

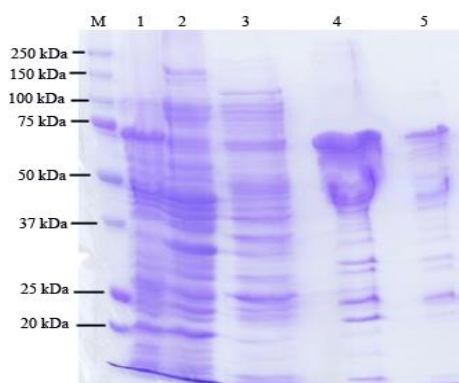
### 6.3 Purifikace proteinu tau

Izolace proteinu a jeho purifikace byly provedeny ve třech hlavních krocích, využívajících laboratorní techniku dostupnou v laboratoři. Purifikace se skládala z afinitní chromatografie, ionexové chromatografie a gelové chromatografie.

#### 6.3.1 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie byla realizována na koloně naplněné Ni NTA agarózou. Eluce navázaného proteinu se uskutečnila vysokou koncentrací imidazolu dle postupu 5.2.1. Na Obr. 13 je vidět průběh afinitní chromatografie.

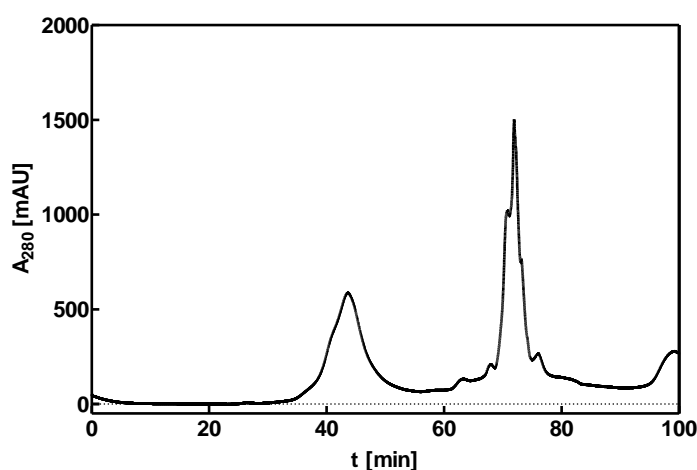




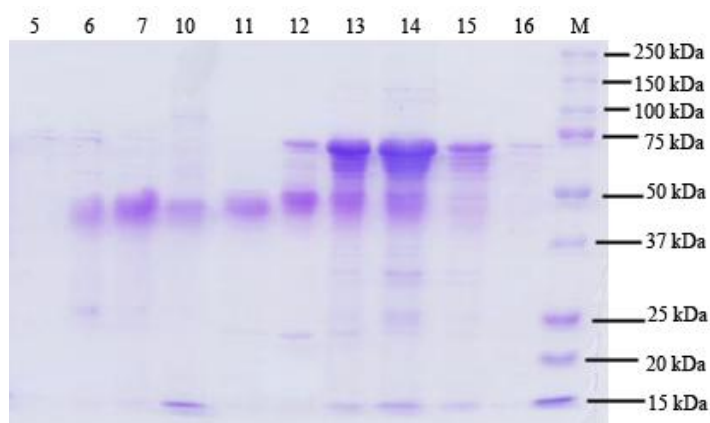
**Obr. 13:** *Jednotlivé kroky afinitní chromatografie analyzované 10% SDS-PAGE gelem; M označení pro standard, 1- lyzát bakterií nanesený na kolonu, 2- proteiny, které se nenavázaly na obsah kolony, 3- vymyté proteiny nízkou koncentrací imidazolu, 4- první eluce proteinu vysokou koncentrací imidazolu, 5- druhá eluce vysokou koncentrací imidazolu*

### 6.3.2 Gelová chromatografie

Eluce z afinitní chromatografie byla zahuštěna dle postupu 5.2.2 v koncentrátoru Amicon Ultra 15 a nanášena na kolonu Superose 12 HR 10/30 ekvilibrovanou pufrům pro gelovou chromatografii. Eluce byla provedena izokraticky. Eluční profil rekombinantního proteinu je znázorněn na Obr. 14, kde  $t$  je retenční čas a  $A_{280}$  je absorbance při 280 nm. Vybrané proteinové frakce 5-7 a 10-16 (tj. 40. - 48. minuta a 60. - 84. minuta) byly analyzovány SDS-PAGE elektroforézou.



**Obr. 14:** *Purifikace tau proteinu gelovou chromatografií na koloně Superose 12 HR 10/30*

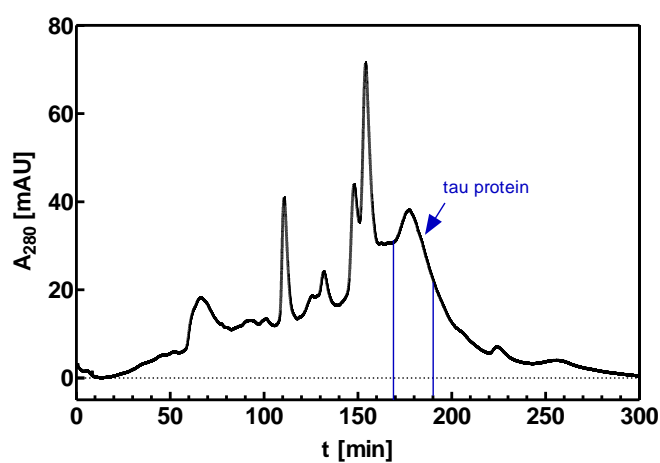


**Obr. 15:** Vybrané frakce (5-16) z gelové chromatografie v redukujícím vzorkovém pufru analyzované 10% SDS-PAGE gelem, M- standard molekulových hmotností

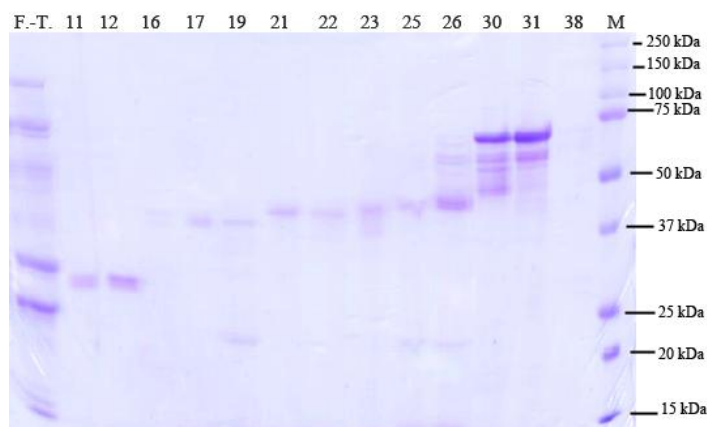
SDS-PAGE elektroforéza (Obr. 15) ukazuje, že tau protein se vyskytuje ve frakcích 12-16 (68. - 84. minuta). Pro ověření, že se jedná skutečně o tau protein, byla provedena metoda Western blotting (viz. kapitola 6.4).

### 6.3.3 Ionexová chromatografie

Sloučené frakce 12-16 z gelové chromatografie obsahující tau protein byly dále přečištěny ionexovou chromatografií na koloně Mono-S 5/50 GL ekvilibrované puftrem A dle postupu 5.2.3. Eluční profil rekombinantního proteinu je znázorněn na Obr. 16, kde  $t$  je retenční čas a  $A_{280}$  je absorbance při 280 nm. Vybrané proteinové frakce 11, 12, 16, 17, 19, 21-26, 30, 31 a 38 (tj. 66. - 156. minuta, 180. - 186. minuta a 228. minuta) byly analyzovány SDS-PAGE elektroforézou.



**Obr.16:** Purifikace tau proteinu ionexovou chromatografií na koloně Mono-S 5/50 GL

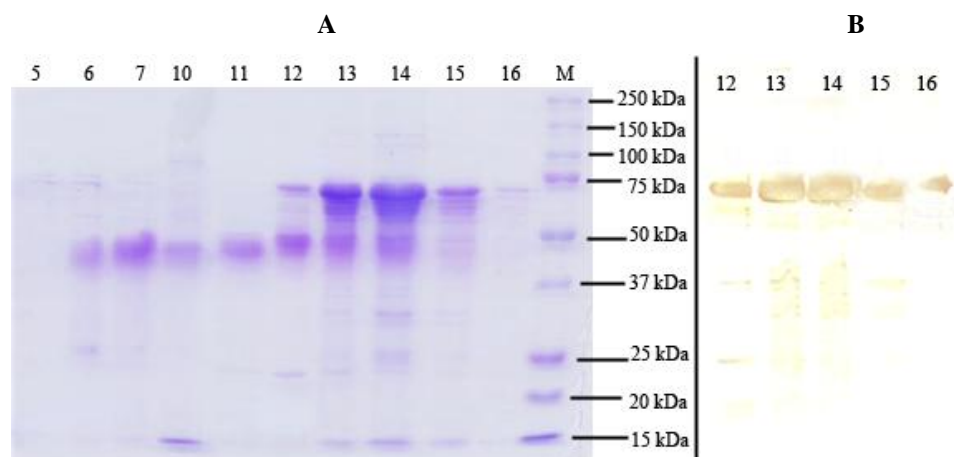


**Obr. 17:** Vybrané frakce (11-38) z ionexové chromatografie analyzované 10% SDS-PAGE gelem, M- standard molekulových hmotností, F.-T.- eluát při nanášení proteinu na kolonu

Tau protein se podle Obr. 17 objevuje ve frakcích 30 a 31 (180. - 186. minuta). Identifikace tau proteinu byla provedena metodou Western blotting. Finálně přečištěný tau protein o koncentraci 0,33 mg/ml byl skladován v 10 mM fosfátovém pufru o pH 6,7 s 1 mM azidem sodným ve 4°C.

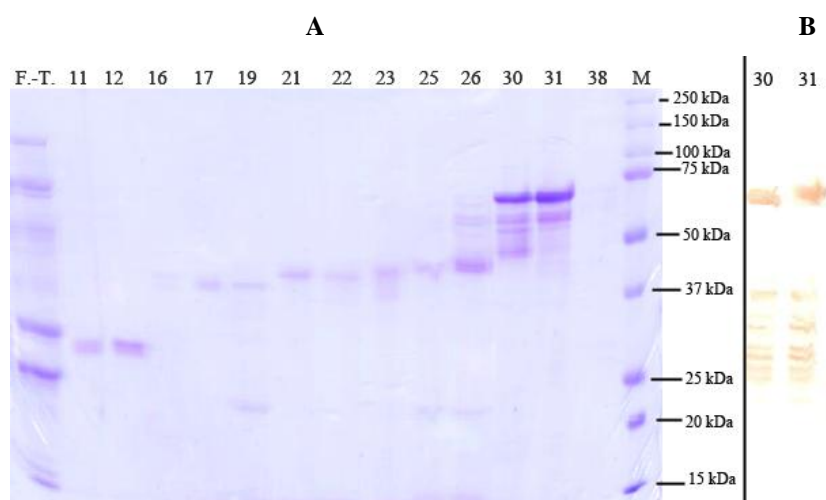
## 6.4 Identifikace tau proteinu

K identifikaci tau proteinu byla použita metoda Western blotting, která je založena na elektropřenosu bílkoviny tau z gelu na membránu a její identifikaci protilátkami. Postup byl proveden podle kapitoly 5.4.2. Na Obr. 18 panel A je vidět 10% polyakrylamidový gel s frakcemi z gelové chromatografie. Obr. 18 panel B ukazuje nitrocelulóзовou membránu s detekovaným tau proteinem pomocí protilátky anti-tau 46.1.



**Obr. 18:** 10% SDS-PAGE gel z gelové chromatografie s membránou. Panel (A) zobrazuje 10% SDS-PAGE gel s frakcemi z gelové chromatografie obarvený CB-R250, panel (B) zobrazuje membránu obarvenou DaB se stejnými frakcemi s předpokládaným tau proteinem detekovaným protilátkou anti-tau 46.1.

Obr. 19 panel A zobrazuje 10% polyakrylamidový gel s frakcemi z ionexové chromatografie. Na Obr. 19 panel B jsou detekované frakce s tau proteinem na nitrocelulózové membráně.



**Obr. 19:** 10% SDS-PAGE gel z ionexové chromatografie s membránou. Panel (A) zobrazuje 10% SDS-PAGE gel z ionexové chromatografie obarvený CB R-250, panel (B) zobrazuje membránu obarvenou DaB se stejnými frakcemi s předpokládaným tau proteinem detekovaným protilátkou anti-tau 46.1.

## 6.5 ELISA

### 6.5.1 Kompetitivní ELISA

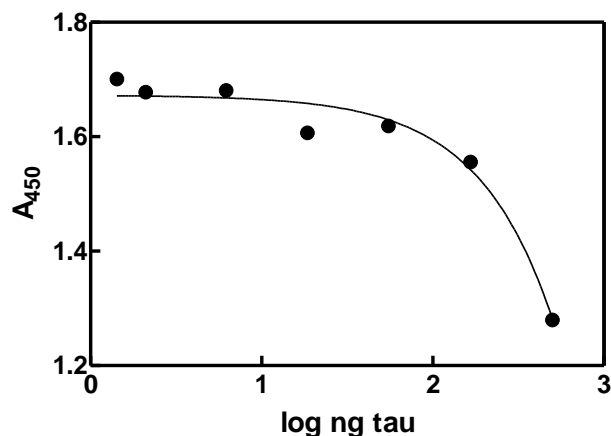
Kompetitivní ELISA byla provedena jako první stanovení, aby se ověřilo vázání tau proteinu na destičku a vyzkoušela se tato metoda. Postup byl proveden podle kapitoly 5.8.1. V Tabulce 3 jsou hodnoty pro ředění primární protilátky anti-tau 46.1 120 000×, 60 000× a 30 000×. Sloupce ng/jamku udávají množství kompetujícího tau proteinu v jamkách. V sloupci A<sub>450</sub> jsou vidět absorbance při 450 nm, které byly vypočteny odečtením absorbancí substrátových kontrol od absorbancí příslušného vzorku. Hodnoty absorbancí ukazují snížení signálu pro největší ředění primární protilátky oproti nejnižšímu ředění. Se zvyšujícím se množstvím kompetujícího proteinu tau se snižuje signál, nejlépe je to vidět pro ředění primární protilátky 60 000× (Obr. 20).

*Tabulka 3: Kompetitivní ELISA: porovnání ředění primární protilátky*

Anti-tau 46.1: 120 000×		
ng/ja mku	log ng/jamku	A <sub>450</sub>
0		1,492
0,7	-0,155	1,424
2,1	0,322	1,247
6,2	0,792	1,310
18,5	1,267	1,193
55	1,740	1,140
166	2,220	1,232
500	2,699	1,091

Anti-tau 46.1: 60 000×		
ng/ja mku	log ng/jamku	A <sub>450</sub>
0		1,674
0,7	-0,155	1,701
2,1	0,322	1,678
6,2	0,792	1,681
18,5	1,267	1,607
55	1,740	1,619
166	2,220	1,556
500	2,699	1,280

Anti-tau 46.1: 30 000×		
ng/ja mku	log ng/jamku	A <sub>450</sub>
0		1,844
0,7	-0,155	1,763
2,1	0,322	1,682
6,2	0,792	1,553
18,5	1,267	1,478
55	1,740	1,724
166	2,220	1,456
500	2,699	1,658



**Obr. 20:** Primární protilátka ředěná 60 000×: snížení signálu kompeticí tau proteinu

Tau protein se na mikrotitrační destičku vázal dobře a mohlo se tedy postoupit ke stanovení protilátek proti tau proteinu v krevních sérech.

### 6.5.2 Stanovení protilátek proti tau proteinu v sérech pacientů s AN a normálních seniorů

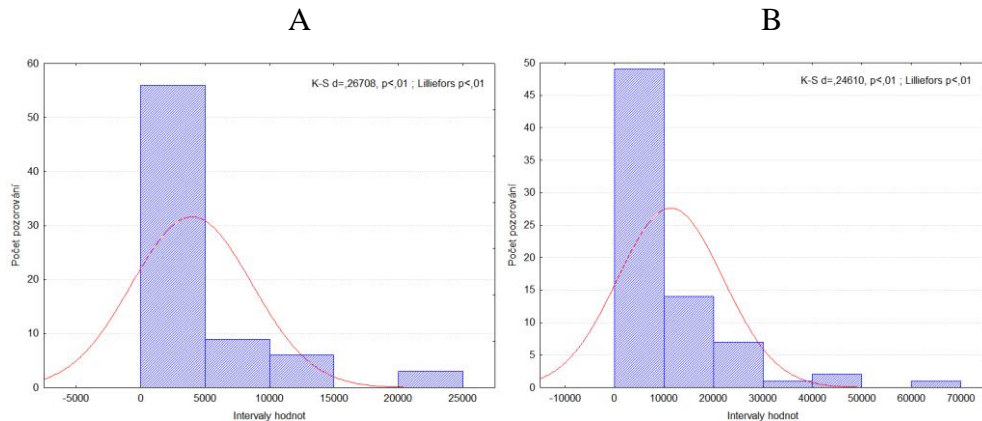
Protilátky v sérech pacientů s AN a normálních seniorů (NOS) byly detekovány pro zjištění, zda mezi nimi nebude markantní rozdíl, který by umožnil diagnostikovat tuto nemoc. Metoda byla provedena s nejdelší izoformou tau proteinu.

Protilátky v krevních sérech pacientů a normálních seniorů byly stanoveny podle postupu v kapitole 5.8.2. Celkem bylo změřeno 77 krevních sér, které byly vždy před pokusem rozmrazeny při laboratorní teplotě. Z kalibrační řady standardu byla sestrojena kalibrační křivka (GraphPad Prism 3), ze které se dále interpolací a případně extrapolací získaly hladiny protilátek v arbitrárních jednotkách [arb.j.] pro jednotlivá séra. Tyto hodnoty byly vynásobeny faktorem ředění a získané hladiny protilátek byly zpracovány v programu STATISTICA 9. Porovnávala jsem výsledky s rekombinantním lidským tau proteinem (2N4R) a výsledky získané stanovením stejných sér pacientů, ale s komerčním bovinním tau proteinem (2N4R). Tři séra se nepodařilo stanovit s vybranou kalibrační řadou ani extrapolací pro rekombinantní lidský tau protein a nebudou zahrnuta ve statistickém zpracování. Normální senioři v počtu 36 sloužili jako kontroly k pacientům s Alzheimerovou nemocí. Výsledky jsou vidět v Tabulce 4 a budou podrobně probrány v diskuzi.

**Tabulka 4: Porovnání hladiny protilátek A) na rekombinantní lidský, B) na bovinní tau protein**

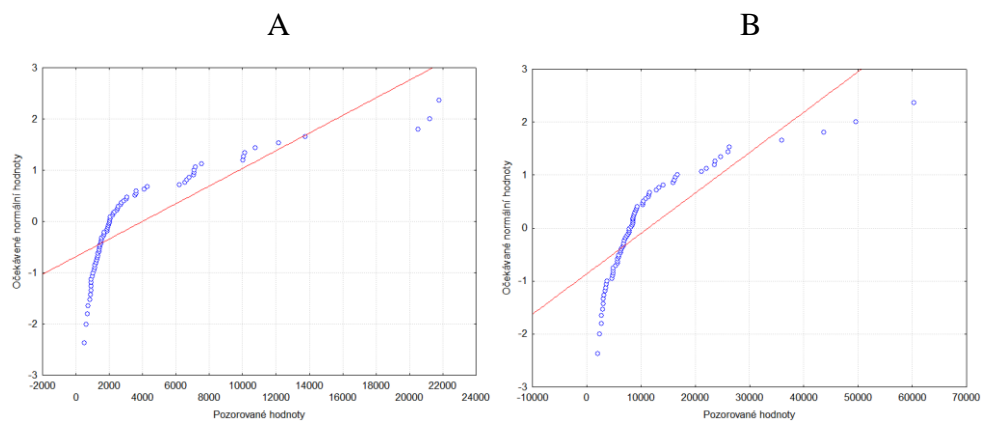
Normální senioři			Pacienti s Alzheimerovou nemocí		
	Hladiny protilátek [arb.j.]			Hladiny protilátek [arb.j.]	
Identifikační číslo séra	Rekombinantní lidský tau protein	Bovinní tau protein	Identifikační číslo séra	Rekombinantní lidský tau protein	Bovinní tau protein
2	13 324	10 775	511	6 296	2 692
3	26 100	1 505	515	60 354	3 072
5	4 877	2 472	516	7 831	1 265
6	6 407	1 668	535	8 735	2 873
8	15 987	21 230	540	8 510	7 107
187	43 721	13 767	544	3 580	1 387
186	24 712	1 413	566	10 993	917
245	-	1 987	570	2 446	3 621
241	7 142	1 302	600	35 959	4 105
194	8 568	12 179	609	11 528	2 718
43	16 776	2 534	685	-	1 434
46	11 621	2 224	686	5 992	931
47	4 966	10 060	179	49 619	2 035
53	6 309	1 204	518	9 387	1 102
54	6 938	10 129	246	8 389	1 958
57	21 162	1 881	190	22 092	6 215
59	9 272	7 114	199	4 761	926
67	8 559	1 921	182	7 859	754
68	26 343	20 542	197	3 659	3 541
201	11 420	2 055	178	23 668	3 026
188	12 836	2 066	612	4 873	1 006
234	4 723	6 808	230	8 195	1 902
208	7 821	1 160	227	-	1 592
214	6 938	10 026	237	3 400	1 331
231	14 138	6 537	502	6 835	7 047
196	8 502	1 556	508	3 165	1 127
210	16 170	21 772	528	9 092	634
211	10 529	4 296	533	5 702	907
213	2 938	1 458	541	23 543	2 329
218	8 621	1 687	561	5 750	900
221	7 464	2 018	562	3 732	1 512
222	3 106	2 518	573	5 985	1 321
231	10 365	6 657	581	6 587	1 542
233	10 412	2 258	587	2 726	702
249	6 843	1 703	615	5 726	1 445
59	8 876	7 551	628	5 332	1 982
			633	2 720	7 172
			644	16 420	3 638
			688	3 091	855
			692	2 112	527
			720	7 682	1 040

Provedením Kolmogorova-Smirnova (K-S) testu normality na datech získaných změřením 74 sér pacientů s AN a normálních seniorů, konstrukcí histogramů, normálního diagramu (normal probability plot, N-P diagram) a Q-Q diagramu (Quantile-Quantile plot) bylo zjištěno, že data nepocházejí z normálního rozdělení. Proto byly použity na vyhodnocení výsledků neparametrické statistické metody.



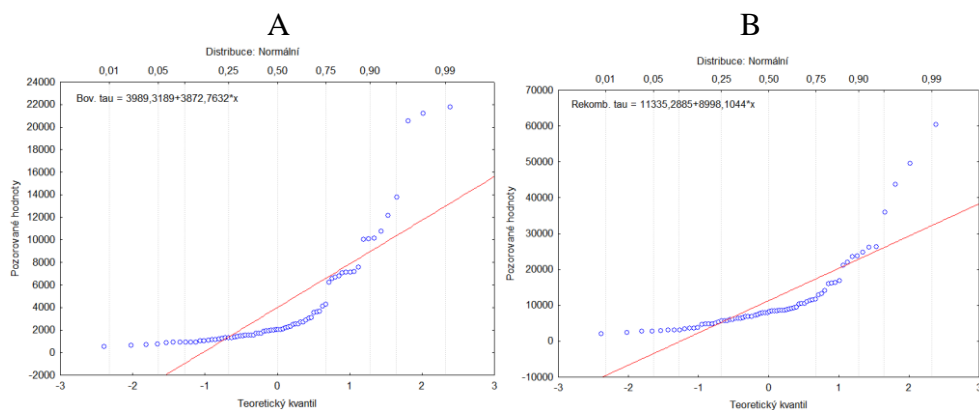
**Obr. 21:** Histogramy hladiny protilátek pro 74 sér (AN+NOS) změřených (A) na komerčním bovinním tau proteinu, (B) na rekombinantním lidském tau proteinu.

Podle dosažené hladiny K-S testu, p-hodnot a Lilieforsova testu (druhá významnější, protože nejsou známe parametry populačního průměru  $\mu$  a rozptylu  $\sigma^2$ ), které jsou menší než 0,05, zamítáme na dané hladině významnosti nulovou hypotézu o normalitě rozdělení výběru.



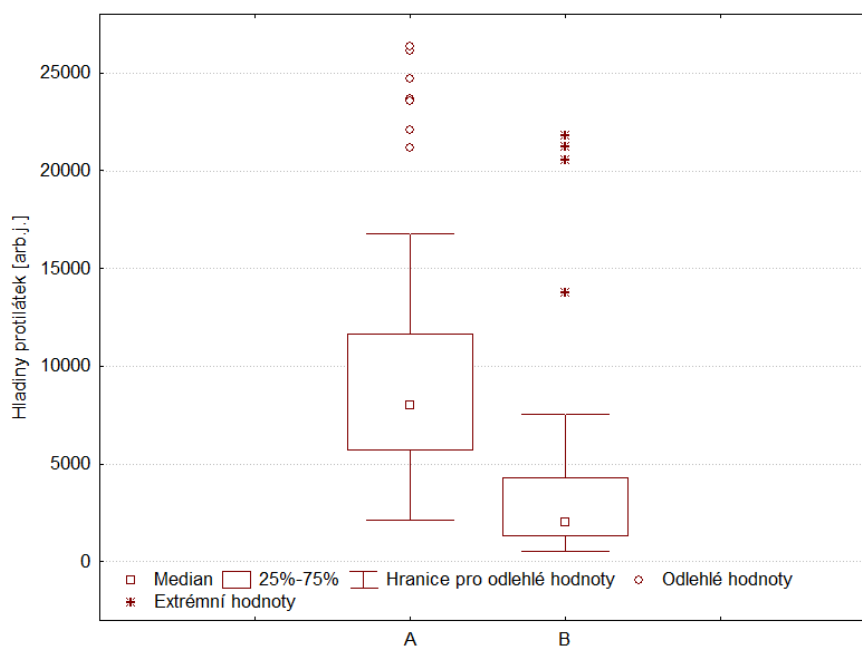
**Obr. 22:** N-P diagramy hladiny protilátek pro 74 sér (AN+NOS) změřených (A) na komerčním bovinním tau proteinu, (B) na rekombinantním lidském tau proteinu.





**Obr. 23:** Q-Q diagramy hladiny protilátek pro 74 sér (AN+NOS) změřených (A) na komerčním bovinním tau proteinu, (B) na rekombinantním lidském tau proteinu.

Na obr. 22 a 23 je vidět, že hodnoty se odklánějí od ideální přímky pro normální rozdělení.

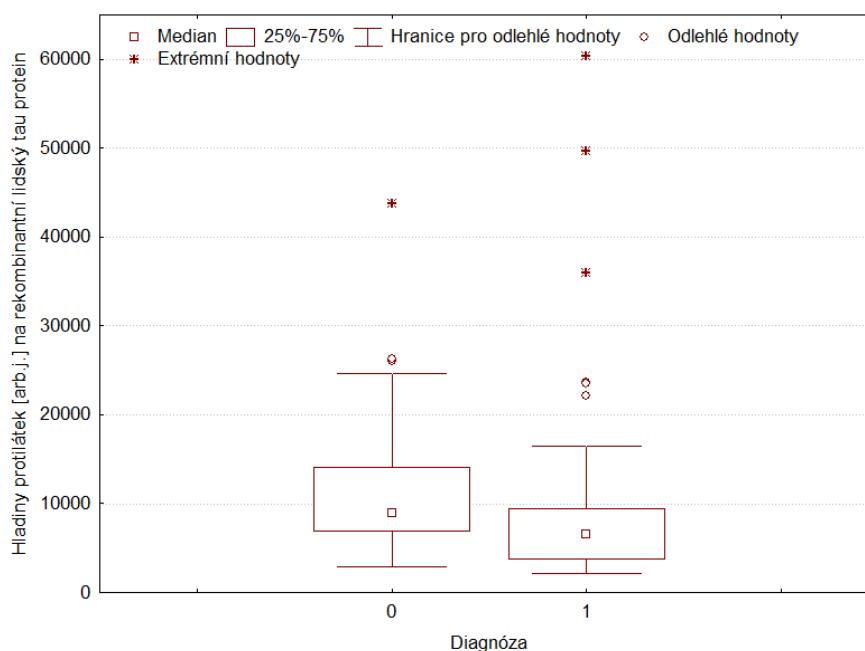


**Obr. 24:** Krabicový graf pro porovnání hladiny protilátek [arb.j.] pro 74 sér (AN+NOS) měřených (A) na rekombinantním lidském a (B) na komerčním bovinním tau proteinu (tabulka 4)

Z obrázku 24 vyplývá, že naměřené hladiny protilátek pro pacienty s AN a normální seniory s rekombinantním lidským a komerčním bovinním tau proteinem se liší. Pro rekombinantní lidský tau protein vychází hladiny protilátek pro jednotlivé vzorky vyšší.

Provedením párového Wilcoxonova testu na 74 vzorcích krevních sér pro AN a NOS byly získány hodnoty: T (hodnota testové statistiky) rovna 221 a p-hodnota rovna 3E-10. T hodnota je mnohem menší než kritická hodnota na hladině významnosti 0,05. Stejně tak p-hodnota je malá a proto zamítáme nulovou hypotézu říkající, že měření hladiny protilátek na rekombinantním lidském tau proteinu je stejné jako na komerčním bovinním tau proteinu.

Dále byly porovnány neparametrickými nepárovými testy výsledky pro pacienty s Alzheimerovou nemocí (diagnóza 1) a pro normální seniory (diagnóza 0). Na Obr. 25 je vidět, že pacienti trpící Alzheimerovou nemocí mají o něco nižší množství protilátek proti tau proteinu v krevních sérech.



**Obr. 254:** Krabicový graf pro porovnání hladiny protilátek [arb.j.] mezi pacienty s AN (1) a normálními seniory (0) pro rekombinantní lidský tau protein (tabulka 4)

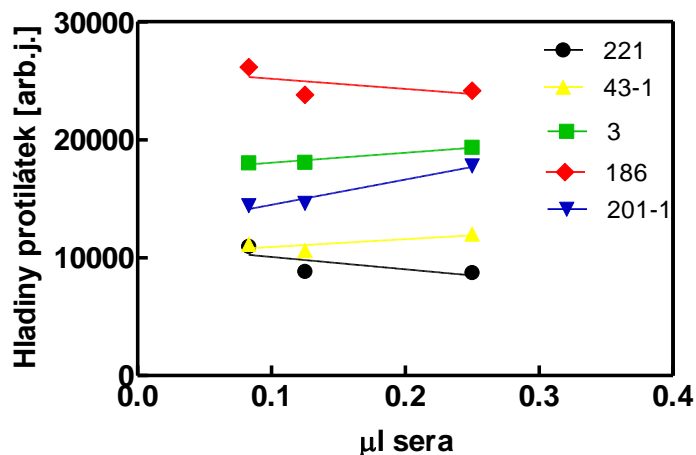
Byly provedeny tři statistické neparametrické dvouvýběrové testy: Mann-Whitneyův, Kolmogorovův-Smirnovův a Waldův-Wolfowitzův test. Pro Mann-Whitneyův U test vyšla p-hodnota 0,02 a tedy menší než 0,05, na dané hladině významnosti se tedy zamítá nulová hypotéza o totožnosti hladiny protilátek proti tau proteinu u pacientů s AN a normálních seniorů. Podle Kolmogorova-Smirnova testu, kde p-hodnota je také menší než 0,05, se také zamítá nulová hypotéza, že hladiny protilátek proti tau proteinu u pacientů s AN a normálních seniorů jsou shodné. Nakonec byl ještě proveden test Waldův-Wolfowitzův,

který je ale slabší a používá se spíše u náhodných výběrů lišících se posunutím, rozptylem nebo tvarem. U tohoto testu vyšla p-hodnota pro asymptotickou testovou statistiku  $Z$  0,57. Na dané hladině významnosti 0,05 se nezamítá nulová hypotéza, že hladiny protilátek proti tau proteinu u pacientů s AN jsou shodné jako u normálních seniorů.

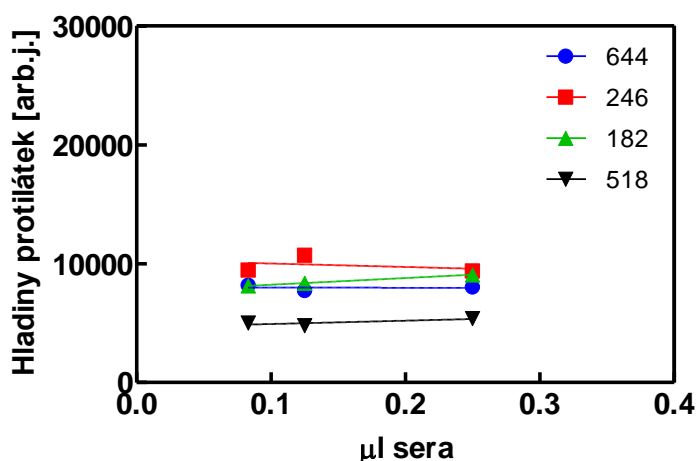
U vybraných vzorků byla testována linearita odezvy proti rekombinantnímu tau proteinu. Příslušné vzorky byly připraveny ve třech různých ředěních (200×, 400× a 600×) a hladiny protilátek byly stanoveny z kalibrační řady standardu (kapitola 5.8.2) interpolací v programu GraphPad Prism 3. Hodnoty byly vynásobeny faktorem ředění a získané hladiny protilátek v arbitrárních jednotkách zpracovány v programu GraphPad Prism 3. Výsledky jsou vidět v Tabulce 5 a na Obr. 26 a 27.

**Tabulka 5:** Linearita odezvy v závislosti na množství protilátek [arb.j.] měřeném na rekombinantním lidském tau proteinu v krevních sérech

Pacienti s Alzheimerovou nemocí				Normální seniori			
Identifikační číslo séra	Ředění	μl sera/jamku	Hladiny protilátek [arb.j.]	Identifikační číslo séra	Ředění	μl sera/jamku	Hladiny protilátek [arb.j.]
644	600×	0,083	8 184	3	600×	0,083	18 034
	400×	0,125	7 730		400×	0,125	18 086
	200×	0,25	8 027		200×	0,25	19 359
246	600×	0,083	9 474	186	600×	0,083	26 160
	400×	0,125	10 724		400×	0,125	23 818
	200×	0,25	9 379		200×	0,25	24 158
182	600×	0,083	8 137	221	600×	0,083	10 959
	400×	0,125	8 357		400×	0,125	8 831
	200×	0,25	9 074		200×	0,25	8 732
518	600×	0,083	5 019	43-1	600×	0,083	11 141
	400×	0,125	4 789		400×	0,125	10 604
	200×	0,25	5 390		200×	0,25	12 015
				201-1	600×	0,083	14 407
					400×	0,125	14 621
					200×	0,25	17 786



Obr. 26: Linearita odezvy pro séra normálních seniorů



Obr. 27: Linearita odezvy pro séra pacientů s AN

Vybrané vzorky vykázaly celkem dobrou linearitu pro tři ředění. Znovu je vidět nižší množství protilátek proti tau proteinu u pacientů s AN.

Dále byla porovnána blokace desky 1% BSA v PBS a 5% odtučněným mlékem (kaseinem) v 0,1 M uhličitanovém pufru. Vybrané vzorky byly připraveny ve dvou ředěních (200× a 400×) a hladiny protilátek pro tyto vzorky byly stanoveny z kalibrační řady standardu uvedeným v postupu 5.8.2. Tyto hodnoty byly vynásobeny faktorem ředění. Deska byla rozdělena na dvě stejné poloviny s obsahem stejných vzorků i standardu. Jedna polovina desky byla blokována 1% BSA a druhá polovina 5% odtučněným mlékem. Jako vhodnější se ukázala blokace 1% BSA, která byla použita na stanovení všech 77 krevních

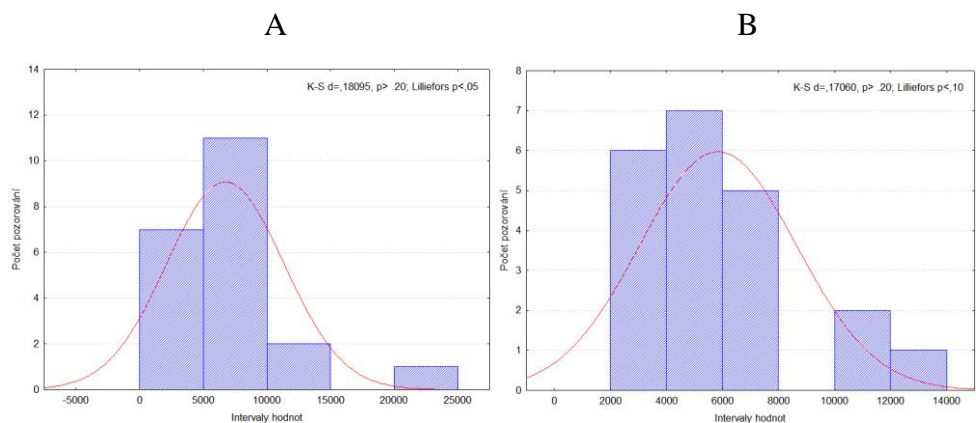
sér. Blokace 5% odtučněným mlékem vykazovala vyšší hodnoty substrátových kontrol jak pro standard, tak pro vzorky.

Týden od stanovení všech 77 krevních sér bylo provedeno ještě jedno stanovení za stejných podmínek, aby se vyzkoušela opakovatelnost měření. Pro opakované měření bylo vybráno 22 krevních sér, 7 krevních sér normálních seniorů a 15 sér pacientů s AN. Výsledky jsou vidět v Tabulce 6. Tyto výsledky byly porovnány v programu STATISTICA 9 neparametrickým párovým testem. Jeden vzorek se nepodařilo stanovit s vybranou kalibrační řadou a nebude zahrnut do statistického zpracování.

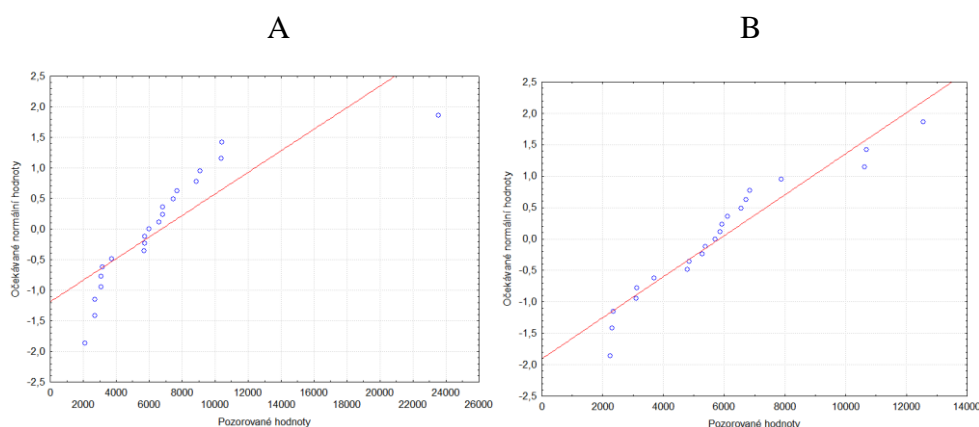
**Tabulka 6:** *Hladiny protilátek [arb.j.] na rekombinantní lidský tau protein v sérech pro opakovatelnost měření*

Normální seniori			Pacienti s Alzheimerovou nemocí		
Identifikační číslo séra	Hladiny protilátek [arb.j.]	Hladiny protilátek [arb.j.]	Identifikační číslo séra	Hladiny protilátek [arb.j.]	Hladiny protilátek [arb.j.]
	1. měření	2. měření		1. měření	2. měření
59	8 876	5 719	502	6 835	7 875
233	10 412	6 840	528	9 092	10 625
57	-	-	541	23 543	10 684
231	10 365	5 869	562	3 732	3 691
249	6 843	4 849	688	3 091	3 131
221	7 464	12 566	720	7 682	5 928
222	3 106	2 357	508	3 165	5 285
			533	5 702	6 108
			561	5 750	5 386
			573	5 985	6 731
			692	2 112	2 321
			581	6 587	6 557
			587	2 726	3 107
			615	5 726	4 800
			633	2 720	2 251

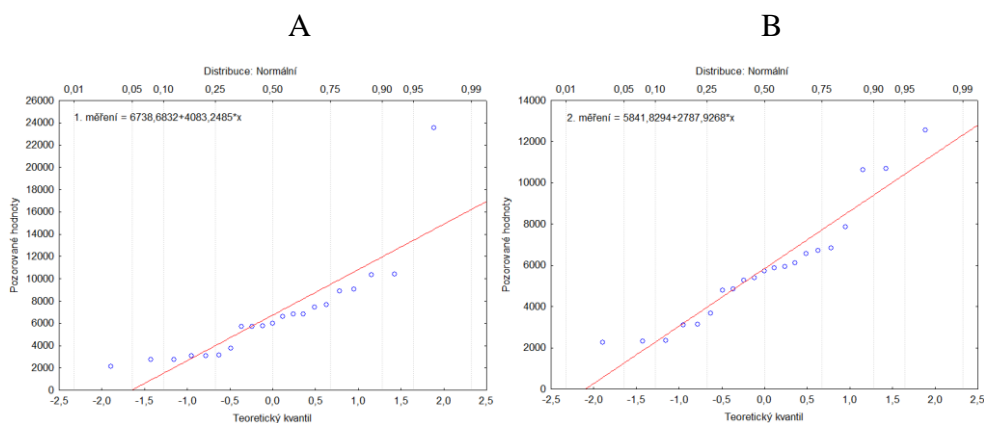
Znovu byl proveden K-S test normality, ve kterém se ukazuje, že data také nepocházejí z normálního rozdělení. Dosažená hladina Lilieforsova testu, p-hodnota je menší než 0,05 a proto zamítáme nulovou hypotézu o normalitě rozdělení dat.



**Obr. 28:** Histogram hladiny protilátek pro 21 sér (AN+NOS) (A) pro 1. měření, (B) pro 2. měření na rekombinantním lidském tau proteinu (tabulka 6)

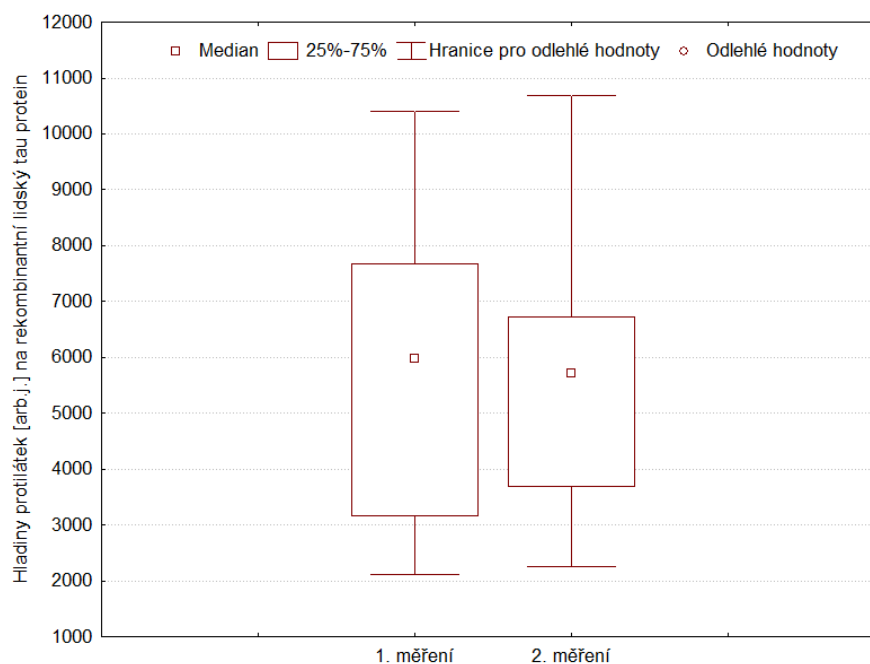


**Obr. 29:** N-P diagram hladiny protilátek pro 21 sér (AN+NOS) (A) pro 1. měření, (B) pro 2. měření na rekombinantním lidském tau proteinu (tabulka 6)



**Obr. 30:** Q-Q diagram hladiny protilátek pro 21 sér (AN+NOS) (A) pro 1. měření, (B) pro 2. měření na rekombinantním lidském tau proteinu (tabulka 6)

Podle diagramů a histogramů (Obr. 28-30) nepocházejí data z normálního rozdělení, proto byl použit neparametrický párový test.



**Obr. 31:** Krabicový graf opakovatelnosti měření pro 21 kreních sér (AN+NOS) na rekombinantním lidském tau proteinu (tabulka 6)

Provedením párového Wilcoxonova testu byly získány hodnoty: T (hodnota testové statistiky) rovna 89 a p-hodnota rovna 0,36. T hodnota je vyšší než kritická hodnota T na hladině významnosti 0,05. Stejně i p-hodnota je vyšší než 0,05, na dané hladině významnosti nezamítáme nulovou hypotézu říkající, že hladiny protilátek proti tau proteinu jsou shodné pro 1. i 2. měření.

### 6.5.3 Stanovení protilátek proti tau proteinu v sérech králíků

Stanovení protilátek proti tau proteinu v sérech králíků mělo potvrdit tvorbu protilátek během imunizace. Každému králíkovi byla minimálně týden po každé injekci odebrána krev a sérum z krve bylo použito na stanovení hladiny protilátek, viz kapitola 4.8.3. První imunizace proběhla 5. 11. 2010 a krev byla odebrána 18. 11. 2010. Druhá injekce byla vpravena 3. 12. 2010 a krev pro stanovení titru protilátek byla odebrána 13. 12. 2010. Poslední imunizace se uskutečnila 21. 12. 2010 a 29. 12. 2010 byli králíci vykřiveni.

Tabulka 7 uvádí absorbance při 450 nm po odečtení substrátové kontroly po první injekci pro králíka 1 Rb1/1, králíka 2 Rb2/1, králíka 3 Rb3/1 a další výsledky po druhé a třetí injekci popsané obdobně. Sloupec  $\mu\text{l}/\text{jamku}$  udává množství séra nanášené na jamku.

Rb kontrola označuje hodnoty pro králíčí sérum bez protilátek proti tau. Průběh imunizace lze vidět na Obr. 32-34.

**Tabulka 7:** Titr protilátek proti tau antigenu při opakované imunizaci tří králíků

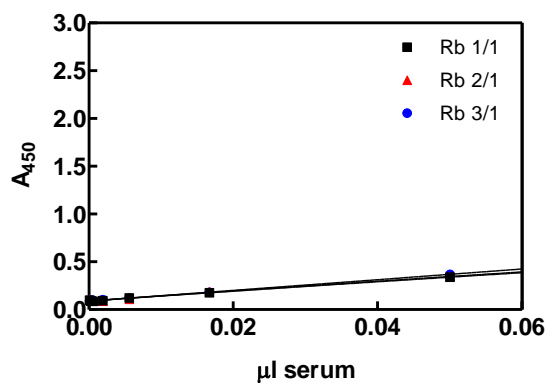
	<b>A<sub>450</sub></b>		
<b>μl/jamku</b>	<b>Rb 1/1</b>	<b>Rb 2/1</b>	<b>Rb 3/1</b>
6,86E-05	0,014	0,005	0,012
2,06E-04	0,010	0,007	0,002
6,17E-04	0,001	0,003	-0,012
1,85E-03	-0,030	0,008	0,017
0,006	0,022	-0,008	0,045
0,017	0,036	0,093	0,077
0,050	0,189	0,231	0,218

	<b>A<sub>450</sub></b>		
<b>μl/jamku</b>	<b>Rb 1/2</b>	<b>Rb 2/2</b>	<b>Rb 3/2</b>
6,86E-05	0,069	0,007	0,009
2,06E-04	0,011	0,003	0,002
6,17E-04	0,018	0,014	0,013
1,85E-03	0,023	0,060	0,029
0,006	0,087	0,050	0,064
0,017	0,208	0,178	0,187
0,050	0,568	0,518	0,441

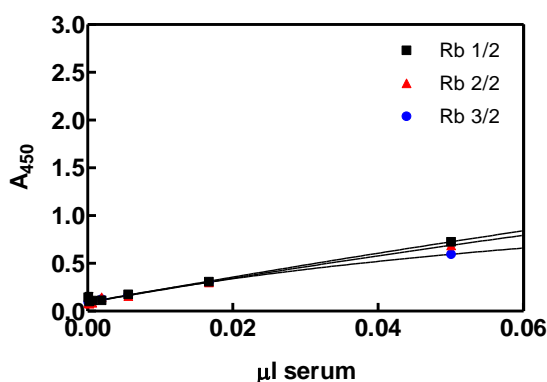
	<b>A<sub>450</sub></b>		
<b>μl/jamku</b>	<b>Rb 1/3</b>	<b>Rb 2/3</b>	<b>Rb3/3</b>
6,86E-05	0,014	0,008	0,012
2,06E-04	0,039	0,022	0,029
6,17E-04	0,101	0,067	0,062
1,85E-03	0,185	0,100	0,131
0,006	0,572	0,381	0,397
0,017	1,835	0,879	1,099
0,050	2,727	1,773	2,167

	<b>A<sub>450</sub></b>
<b>μl/jamku</b>	<b>Rb kontrola</b>
0,050	0,229

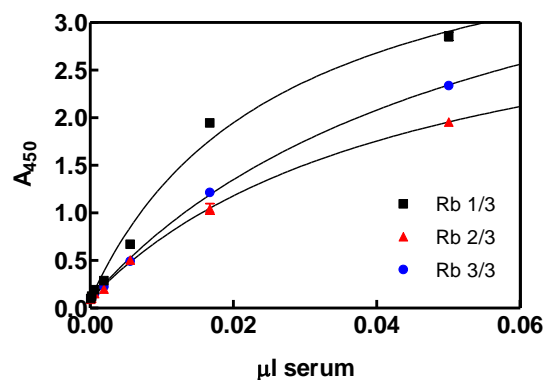




**Obr. 32:** Titr protilátek proti tau antigenu po první imunizaci pro všechny tři králíky

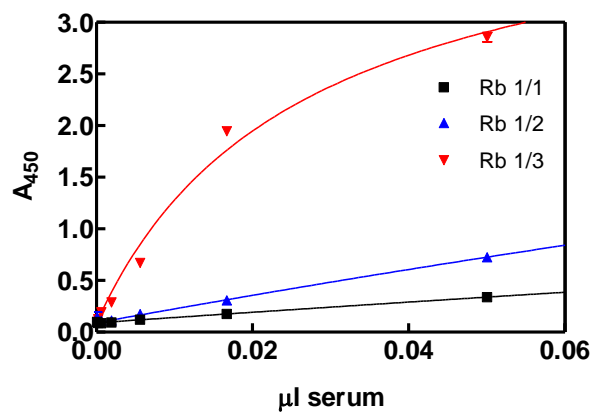


**Obr. 33:** Titr protilátek proti tau antigenu po druhé imunizaci pro všechny tři králíky



**Obr. 34:** Titr protilátek proti tau antigenu po třetí imunizaci pro všechny tři králíky

Obr. 32-34 pro 1., 2. a 3. imunizaci zobrazují nárůst absorbance v závislosti na množství protilátek proti tau proteinu, které se během imunizace u králíků tvořilo.



*Obr. 35: Průběh tvorby protilátek proti tau proteinu během imunizace u prvního králíka*

Obr. 35 ukazuje průběh všech tří imunizací u králíka číslo 1.

## Diskuze

Tato diplomová práce se zabývá přípravou rekombinantního tau proteinu v bakteriích a jeho následným využitím v detekci Alzheimerovy nemoci. Tau je protein asociovaný s mikrotubuly a podílí se na jejich stabilizaci. Nerozpustný tau protein se nachází v intraneuronálních neurofibrilárních klubičkách. Za patologických podmínek je rovnováha vázání tau k mikrotubulům narušena, což má za následek abnormální zvýšení počtu volného nenavázaného tau. Je pravděpodobné, že větší koncentrace tau v cytosolu zvyšuje šanci, že dojde k patologickým změnám, které postupně povedou k agregaci a fibrilizaci tau [13]. Stanovením protilátek proti celkovému tau proteinu se můžeme pokusit diagnostikovat Alzheimerovu nemoc již v raném stadiu.

V této práci bylo stanoveno ELISA metodou množství protilátek proti mnou připravenému rekombinantnímu lidskému tau proteinu v sérech pacientů s AN a normálních seniorů. Cílem bylo odlišit normální seniory od lidí s AN a porovnat tyto výsledky s testy na bovinním tau proteinu. Výsledky na bovinním tau proteinu byly získány od Mgr. Jany Švarcové a nebyly ještě publikovány.

Pro bakteriální rekombinantní expresi tau proteinu byl použit expresní vektor pT7C\_hTau40, který byl darem z laboratoře L. I. Bindera. Plazmid obsahující tento vektor byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3) a BL21 (DE3) (RIL). Tyto buňky se běžně používají pro přípravu proteinů. Při selekci buněk a vhodného klonu se ukázaly jako nejlepší buňky BL21 (DE3). Vyzkoušeno bylo, jak skladování buněk v  $-80^{\circ}\text{C}$  a ve  $4^{\circ}\text{C}$  ovlivňuje výtěžek proteinu. Optimálním řešením bylo použít buňky čerstvě transformované, protože skladováním se snižuje množství exprimovaného proteinu a zvyšuje se množství kontaminantů (Obr. 8 a 9). Dále byly optimalizovány podmínky doby indukce a množství induktoru. Ukázalo se, že se zvyšující se koncentrací induktoru až do 1 mM koncentrace se zvyšuje množství exprimovaného proteinu (Obr. 10). Nakonec byla vybrána koncentrace 0,5 mM IPTG a to z ekonomického důvodu a také kvůli toxicitě IPTG ve vyšších koncentracích. Optimální čas indukce byl 4,5 hodiny. Buňky dobře rostly ve  $37^{\circ}\text{C}$ .

Velkoobjemová produkce byla uskutečněna v 0,5 l Luria-Bertani média s antibiotikem ampicilinem. Výtěžnost velkoobjemové produkce byla okolo 1 mg na 0,5 l LB média. Výtěžnost nebyla vysoká pravděpodobně kvůli částečné degradaci proteinu během

purifikace a to i přes použití inhibitoru proteáz PMSF. Purifikace by měla proběhnout v co nejkratší době (1 den) podle doporučení Dr. Francisca Garcia-Sierry. Bohužel tyto podmínky se nepodařilo splnit.

Proteiny mohou být exprimovány do média, cytoplazmy anebo pokud jsou pro buňky toxické do inkluzních tělísek. Lokalizace proteinu byla zjištěna diferenční centrifugací buněčného lyzátu. Podle Obr. 12 byl tau protein vylučován do cytoplazmy bakteriálních buněk. Tau protein byl z cytoplazmy purifikován afinitní chromatografií, kterou následovala gelová chromatografie. Konečným krokem byla ionexová chromatografie.

Afinitní chromatografie proběhla na koloně naplněné Ni NTA agarózou. Tato metoda nebyla dostatečná pro přečištění proteinu (Obr. 13). Pufr, kterým byla kolona s proteiny promývána, obsahoval vysokou koncentraci NaCl. Vysoká koncentrace NaCl brání vazbě nukleových kyselin na pozitivně nabitě skupiny tau proteinu. Takto jsou také nukleové kyseliny částečně odstraněny z roztoku proteinů [57]. Zpočátku bylo přidáváno do pufrů na afinitní chromatografii DTT o koncentraci 1 mM, aby se zabránilo oxidaci cysteinů v molekule tau proteinu [57]. Bohužel docházelo k poškození Ni NTA agarózy a muselo se od tohoto kroku ustoupit. Dále bylo přidáváno DTT o koncentraci 1 mM jen k proteinu před gelovou a ionexovou chromatografií.

Sloučené frakce z afinitní chromatografie byly zakoncentrovány v koncentrátorech Amicon-Ultra 15 (30K). Zakoncentrované proteiny byly přečištěny dále na koloně Superose 12 HR 10/30 (Obr. 14). Na Obr. 15 je vidět 10% SDS-PAGE gel, který ukazuje proužky proteinů v pořadí, jak se eluovaly z kolony. Je patrné, že nejprve byly eluovány proteiny s menší a pak s větší molekulovou hmotností. U gelové chromatografie by tomu mělo být ale naopak. Molekuly, které se ukazují na gelu kolem hmotnosti 50 kDa, spolu vytvářejí dimery, které jsou ale při elektroforéze s SDS a merkaptoethanolem redukovány na monomery. Proto jsou na gelu vidět s nízkou molekulovou hmotností. Při této purifikaci nebyl použit NaCl. Z několika pokusů bylo zjištěno, že se proteiny na kolonu nevážou nespecifickými vazbami. Proto mohla být tato kolona použita zároveň na odsolení frakcí před ionexovou chromatografií. Nanáška na kolonu byla kolem 0,75 ml roztoku proteinů a byla pro preparativní účely ještě vyhovující. Tento krok byl důležitý hlavně pro odstranění interagujících molekul (pravděpodobně nukleových kyselin), které v ionexové chromatografii způsobovaly špatné dělení proteinů.

Sloučené odsolené frakce obsahující tau protein byly naneseny na kolonu Mono-S 5/50 GL. Po každém purifikačním kroku byla přítomnost tau proteinu ověřena elektroforeticky a metodou Western-blotting (Obr. 13, 15, 17, 18 a 19). Použitou primární protilátkou byla monoklonální protilátka anti-tau 46.1, která je darem od Dr. Francisca Garcia-Sierry. Tato protilátka je specifická jen pro tau protein. Její epitop je v C-konci proteinu (L<sup>428</sup>–L<sup>441</sup>), který obsahuje motivy vázající mikrotubuly [42].

Purifikovaný protein byl využit na kompetitivní ELISA metodu. Experiment byl proveden pro tři ředění primární monoklonální protilátky anti-tau 46.1. Z Obr. 20 je vidět, že ke kompetici dochází. Snížení signálu se projevuje až pro 500 ng tau proteinu v kompetujícím roztoku a není příliš výrazné. Bylo by vhodnější zvolit vyšší množství tau v kompetujícím roztoku. Tento experiment byl proveden pro zjištění, zda se tau protein váže na mikrotitrační destičku a nebyl dále optimalizován.

Hlavním úkolem diplomové práce bylo stanovit protilátky proti tau proteinu v sérech pacientů s AN a normálních seniorů. Vzorky 36 normálních seniorů sloužily jako kontrolní. Celkem bylo změřeno 77 vzorků krevních sér, 36 sér kontrolních a 41 sér pacientů s AN. Metodika byla upravena podle literatury [58] a zkušeností laboratorních pracovníků.

Na změření množství protilátek v lidském krevním séru byly použity trochu jiné desky a sice NUNC Maxisorp Strip, které se podle několika pokusů ukázaly jako vhodnější oproti deskám NUNC Maxisorp použitým v kompetitivní ELISE. Desky NUNC Maxisorp totiž vykazovaly vyšší hodnoty substrátových kontrol pro séra pacientů i normálních seniorů. Cílem bylo, aby substrátové kontroly byly co nejnižší (absorbance maximálně 0,15), protože byly považovány za nulu a nebyly od samotných vzorků odečítány. Toto zpracování dat bylo převzato od Mgr. Jany Švarcové, aby se mohly porovnávat výsledné hladiny protilátek změřené na rekombinantním lidském a komerčním bovinním tau proteinu. Také referenční vlnová délka 620 nm, která měří pozadí destičky, byla zavedena po doporučení Mgr. Jany Švarcové.

Standard pro stanovení množství protilátek v lidském krevním séru byl připraven dle postupu popsaneho v metodách, aby se získala lineární kalibrační řada. Stejně vzorky byly stanoveny jak s rekombinantním lidským tak i s komerčním bovinním tau proteinem a výsledky byly porovnány v programu STATISTICA 9 (Obr. 24). Na krabicovém grafu je vidět, že tato dvě měření se neshodují. Podle výsledků neparametrického párového

Wilcoxonova testu, kde p- hodnota vyšla rovna  $3E-10$ , je jasné, že hladiny protilátek měřené na rekombinantním lidském a komerčním bovinním tau proteinu se liší. Odchytky těchto dvou měření od sebe mohou být způsobeny např. rozdílným původem tau proteinu, protože rekombinantní protein je lidského původu a komerční je bovinní. Tyto dva proteiny se částečně liší svou aminokyselinovou sekvencí a také tím, že jen lidský tau protein je schopen agregovat do PHF [59]. Také přítomnost histidinové kotvy v rekombinantním tau proteinu může hrát jistou roli. Rekombinantní lidský tau protein není zcela čistý. Čistota tau proteinu je asi 80%, nečistoty se mohou podílet na odlišných výsledcích mezi rekombinantním lidským a bovinním tau proteinem. Pro další přečištění bude vyzkoušena HPLC chromatografie na reverzní fázi, protože tau protein je stabilní v roztocích silných kyselin, aniž by ztrácel svou funkci. Dále bude také využita jeho tepelná stabilita [9].

Výsledné hladiny protilátek proti tau proteinu u kontrol a pacientů s AN byly porovnány neparametrickými nepárovými testy: Mann-Whitney U test, Kolmogorovův-Smirnovův test a Waldův-Wolfowitzův test. Podle M-W U testu se hladiny protilátek u pacientů s AN a normálních seniorů proti tau proteinu liší, stejný výsledek vyšel i pro test K-S. W-W test, prokázal shodu mezi hladinami protilátek u AN a NOS. Tento test je ale slabší než M-W U test a závisí nejen na posunutí výběrů, ale také na rozptylu a tvaru výběrů. Obr. 25 potvrzuje, že pacienti s AN mají v sérech nižší množství protilátek proti tau proteinu než normální senioři. Tento výsledek je ve shodě s výsledky na bovinním tau proteinu, které nebyly ještě publikovány. S narůstajícím věkem dochází k fyziologickému zvýšení hladiny celkového tau proteinu, proto mají normální senioři poměrně vysoké hladiny protilátek proti tau proteinu. Vysvětlením nižší hladiny protilátek proti tau proteinu u pacientů s AN může být, že je u takto nemocných lidí snižena imunitní odpověď organismu a tím snižena produkce protilátek. Dalším vysvětlením může být tolerance organismu na vysoké koncentrace tau proteinu. Protože kvůli vysokým koncentracím tau proteinu v mozkomíšním moku, které by odpovídalo nadprodukcí protilátek, by docházelo k negativním vlivům imunitního systému na organismus [60, 61]. Dále může být hladina protilátek snižena kvůli tvorbě imunokomplexů, které nejsou detekovatelné [60]. A v neposlední řadě také proto, že protilátky proti nativnímu tau proteinu mohou být jiné než proti nemocnému proteinu.

U vybraných vzorků bylo testováno, zda se u nich projevuje linearita odezvy proti tau proteinu. Pro vybraná séra byla připravena tři ředění (200×, 400× a 600×). Výsledky jsou u většiny vzorků pozitivní, objevuje se u nich linearita (tabulka 6). Z Obr. 26 a 27 je zřejmé, že hodnoty normálních seniorů jsou vyšší než u pacientů s AN. Pro všechna stanovení sér byla použita blokáce destičky 1% BSA v PBS, protože při blokaci destičky 5% odtučněným mlékem (kaseinem) v uhličitanovém pufru se objevily vysoké hodnoty pro substrátové kontroly. Nevhodnost použití mléka pro blokaci desky může být dána výskytem protilátek proti kaseinu v krevním séru.

Po týdnu od změření všech 77 krevních sér byl zopakován pokus pro jednu desku s 22 krevními séry. Bylo použito 7 krevních sér od normálních seniorů a 15 sér od pacientů s AN. Pro jedno sérum se nepodařilo stanovit hladina protilátek. Podle Obr. 31 a jednovýběrového párového Wilcoxonova testu se tato dvě měření shodují. Byla potvrzena opakovatelnost měření pro 21 krevních sér.

Purifikovaný protein byl použit na imunizaci tří králíků a tím na přípravu polyklonální protilátky proti tau proteinu. Imunizace byla provedena celkem třikrát v intervalu 3-4 týdnů. Pokaždé injekci byla králíkům minimálně týden po vpichu odebrána krev. V těchto vzorcích byl ELISA metodou stanoven titr protilátek pro každého králíka (Tabulka 10). Po každé injekci směsi adjuvants s proteinem došlo k nárůstu absorbance v závislosti na množství protilátky proti tau proteinu v séru králíků (Obr. 32-34). Na Obr. 35 je vidět shrnutí všech tří imunizací pro prvního králíka. Po třetí imunizaci došlo k výraznému nárůstu množství polyklonální protilátky v séru prvního králíka. Protilátka bude v budoucnu přečištěna na imuno-afinitní koloně a bude k tomu zapotřebí několik mg tau proteinu.

Protein použitý na imunizaci obsahoval histidinovou kotvu, která by neměla mít antigenní účinek, a proto nebyla odstraněna před samotnou imunizací.

Nebylo testováno, jestli připravený rekombinantní lidský tau protein stabilizuje mikrotubuly. Při skladování proteinu při 4°C v pufru B na ionexovou chromatografii, který obsahoval 1 mM azid sodný, nedocházelo k degradaci. Pokud byl protein zamražen v tomto pufru docházelo k částečné degradaci, ale pokud pufr obsahoval imidazol docházelo k úplnému vysrážení tau proteinu. Stejně zkušenosti s nestabilitou rekombinantního tau proteinu při zamražení mají i jiné laboratoře. Konzultace týkající se stability tau proteinu proběhla pouze ústně s Mgr. Barborou Jankovičovou z Fakulty

chemicko-technologické v Pardubicích, kde pracují s komerčním rekombinantním lidským tau proteinem.

Další výzkum bude zaměřen na vývoj ELISA metod pro protilátky proti zkráceným formám tau proteinu v krevním séru. Bude přečištěna polyklonální protilátka proti tau proteinu z králičího krevního séra, která bude použita pro zavedení sendvičové ELISA metody na detekci tau proteinu a jeho variant v mozkomíšním moku pacientů s AN.



## **Závěr**

V této diplomové práci se podařilo připravit rekombinantní lidský tau protein v bakteriích *E. coli*. Připravený tau protein byl získán v dostatečné čistotě pro ELISA metody a imunizaci. S relativně čistým tau proteinem se podařilo stanovit množství protilátek v krevních sérech pacientů s AN a normálních seniorů. Prokázala se určitá odlišnost mezi normálními seniory a pacienty s AN. Získané výsledky se shodují s hodnotami získanými na komerčním bovinním tau proteinu.

Imunizace králíků proběhla úspěšně. Hladina protilátek v králičím séru proti rekombinantnímu lidskému tau proteinu byla ověřena ELISA metodou.

## Literatura

- [1] Fišar Z, Jiráček R. Vybrané kapitoly z biologické psychiatrie. Praha: Grada Publishing, 2001.
- [2] Jiráček R, et al. Demence. Praha: MAXDORF, 1999.
- [3] Schaltberg AF, Cole JO, Debatista C. Manual of clinical psychopharmacology. Washington, DC: American Psychiatric Publishing, Inc., 2003.
- [4] van der Flier WM, Pijnenburg YA, Fox NC, Scheltens P. Early-onset versus late-onset Alzheimer's disease: the case of the missing APOE E4 allele. *Lancet Neurology* 2011; 10(3):280-8.
- [5] Dawbarn D., Shelley JA. Neurobiology of Alzheimer's disease. New York: Oxford University Press Inc., 2001.
- [6] Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 1992; 31(43):10626-33.
- [7] Sergeant N, Delacourte A, Buee L. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1739(2-3):179-97.
- [8] Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M *et al.* Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev Proteomics* 2008; 5(2):207-24.
- [9] Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J *et al.* Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol* 2009; 7(2):e34.
- [10] Hasegawa M, Morishima-Kawashima M, Takio K, Suzuki M, Titani K, Ihara Y. Protein-Sequence and Mass-Spectrometric Analyses of Tau in the Alzheimers-Disease Brain. *J Biol Chem* 1992; 267(24):17047-54.
- [11] Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989; 3(4):519-26.
- [12] Couchie D, Mavilia C, Georgieff IS, Liem RKH, Shelanski ML, Nunez J. Primary Structure of High-Molecular-Weight Tau Present in the Peripheral Nervous-System. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(10):4378-81.
- [13] Honson NS, Kuret J. Tau aggregation and toxicity in tauopathic neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 2008; 14(4):417-22.
- [14] Iqbal K, Alonso ADC, Chen S *et al.* Tau Pathology in Alzheimer Disease and Other Tauopathies. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2005; 1739(2-3):198-210.

- [15] Friedhoff P, Von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E. Structure of Tau Protein and Assembly Into Paired Helical Filaments. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 2000; 1502(1):122-32.
- [16] Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry* 1994; 33(32):9511-22.
- [17] Cunningham CC, Leclerc N, Flanagan LA, Lu M, Janmey PA, Kosik KS. Microtubule-associated protein 2c reorganizes both microtubules and microfilaments into distinct cytological structures in an actin-binding protein-280-deficient melanoma cell line. *J Cell Biol* 1997; 136(4):845-57.
- [18] Brandt R, Leger J, Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 1995; 131(5):1327-40.
- [19] Jenkins SM, Johnson GVW. Tau Complexes With Phospholipase C-Gamma in Situ. *Neuroreport* 1998; 9(1):67-71.
- [20] Mandell JW, Banker GA. A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci* 1996; 16(18):5727-40.
- [21] Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007; 8(9):663-72.
- [22] Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 2004; 84(2):361-84.
- [23] Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 1993; 11(1):153-63.
- [24] Jicha GA, Weaver C, Lane E *et al.* cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1999; 19(17):7486-94.
- [25] Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 2001; 32(5):367-81.
- [26] Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(29):10804-9.
- [27] Liu F, Zaidi T, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Merkle RK, Gong CX. Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 2002; 512(1-3):101-6.
- [28] Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem* 1993; 268(32):24374-84.
- [29] Kosik KS, Joachim CL, Selkoe DJ. Microtubule-associated protein tau (tau) is a major

- antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(11):4044-8.
- [30] Iqbal K, Liu F, Gong Ch.-X, Alonso A. del C, Grundke-Iqbal I. Mechanism of tau induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol* 2009; 118(1): 53–69.
- [31] Wille H, Drewes G, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Alzheimer-like paired helical filaments and antiparallel dimers formed from microtubule-associated protein tau in vitro. *J Cell Biol* 1992; 118(3):573-84.
- [32] Vincent I, Zheng JH, Dickson DW, Kress Y, Davies P. Mitotic phosphoepitopes precede paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1998; 19(4):287-96.
- [33] Horowitz PM, Patterson KR, Guillozet-Bongaarts AL *et al.* Early N-terminal changes and caspase-6 cleavage of tau in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2004; 24(36):7895-902.
- [34] Garcia-Sierra F, Ghoshal N, Quinn B, Berry RW, Binder LI. Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2003; 5(2):65-77.
- [35] Ghoshal N, Garcia-Sierra F, Fu Y *et al.* Tau-66: evidence for a novel tau conformation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2001; 77(5):1372-85.
- [36] Binder LI, Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Berry RW. Tau, tangles, and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1739(2-3):216-23.
- [37] Horowitz PM, LaPointe N, Guillozet-Bongaarts AL, Berry RW, Binder LI. N-terminal fragments of tau inhibit full-length tau polymerization in vitro. *Biochemistry* 2006; 45(42):12859-66.
- [38] Mondragon- Rodríguez S, Basurto-Islas G, Binder L. I, García-Sierra F. Conformational changes and cleavage; are these responsible for the tau aggregation in Alzheimer's disease? *Future Neurol.* 2009; 4(1): 39-53.
- [39] Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC *et al.* C-Terminal Inhibition of Tau Assembly in Vitro and in Alzheimer's Disease. *J Cell Sci* 2000; 113(21):3737-45.
- [40] Guillozet-Bongaarts AL, Garcia-Sierra F, Reynolds MR *et al.* Tau truncation during neurofibrillary tangle evolution in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2005; 26(7):1015-22.
- [41] Sevcik J, Skrabana R, Kontsekova E, Novak M. Structure solution of misfolded conformations adopted by intrinsically disordered Alzheimer's tau protein. *Protein Pept Lett* 2009; 16(1):61-4.
- [42] Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J. The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 1996; 271(51):32789-95.
- [43] Vaněk O. Diplomová práce Praha: PšF UK Praha, katedra biochemie, 2005.

- [44] Rozbeský D. Diplomová práce Praha: PřF UK Praha, katedra biochemie, 2009.
- [45] Hanahan D. Studies on Transformation of Escherichia-Coli With Plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166(4):557-80.
- [46] Zouhar J. Affinity Chromatography of Proteins on Immobilized Metal Ions. *Chemické Listy* 1999; 93(11):683-5.
- [47] Rossomando EF. Ion-exchange chromatography. *Methods Enzymol.* 1990; 182: 309-17.
- [48] Bradford MM. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976; 72(1-2):248-54.
- [49] Peterson GL. Simplification of Protein Assay Method of Lowry Et Al - Which Is More Generally Applicable. *Anal Biochem* 1977; 83(2):346-56.
- [50] Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 1970; 227(5259):680-5.
- [51] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(9):4350-4.
- [52] McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34(7):939-44.
- [53] Hummelová-Fanfrdlová Z, Rektorová I, Sheardová K *et al.* Czech Adaptation of Addenbrooke's Cognitive Examination. *Československá Psychologie* 2009; 53(4):376-88.
- [54] Meloun M, Militký J. *Statistická analýza experimentálních dat.* Praha. Academia, 2004.
- [55] Berná Z. *Bakalářská práce.* Brno: PřF Masarykova univerzita Brno, 2006.
- [56] Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13):3784-8.
- [57] Krajciova G, Skrabana R, Filipcik P, Novak M. Preserving free thiols of intrinsically disordered tau protein without the use of a reducing agent. *Anal Biochem* 2008; 383(2):343-5.
- [58] Silber E, Semra YK, Gregson NA, Sharief MK. Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology* 2002; 58(9):1372-81.
- [59] Poulter L, Barratt D, Scott CW, Caputo CB. Locations and immunoreactivities of phosphorylation sites on bovine and porcine tau proteins and PHF-tau fragment. *J Biol Chem* 1993; 268(13): 9636-44.

- [60] Jianping Lv MD, Zhibing Y, Wei Q MD, Zhikai C BS, Jie X, Jinbiao L. Low avidity and level of serum anti-A $\beta$  antibodies in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2006; 20(3): 127-132.
- [61] Rosenmann H, Meiner Z, Geylis V, Abramsky O, Steinitz M. Detection of circulating antibodies against tau protein in its unphosphorylated and in its neurofibrillary tangles-related phosphorylated state in Alzheimer's disease and healthy subjects. *Neuroscience Letters* 2006; 410(2) :90–93.