

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

**KLONOVÁNÍ, EXPRESE A PURIFIKACE
MYKOBAKTERIÁLNÍ DIHYDROFOLÁTREDUKTASY**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Eva Novotná, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Kateřina Šedivá

Prohlášení:

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

Dne

Kateřina Šedivá

Poděkování

Děkuji vedoucí své diplomové práce Mgr. Evě Novotné, Ph.D. za její odborné vedení, důležité rady, obrovskou pomoc a trpělivost.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Řešitel: Kateřina Šedivá

Školitel: Mgr. Eva Novotná, Ph.D.

Název diplomové práce: Klonování, exprese a purifikace mykobakteriální dihydrofolátreduktasy

Dihydrofolátreduktasa je enzym nezbytný pro metabolismus kyseliny listové – katalyzuje redukci dihydrofolátu na tetrahydrofolát. Tetrahydrofolát je důležitým kofaktorem při reakcích přenášejících jednouhlíkaté zbytky. Hraje klíčovou roli v syntéze DNA, RNA a proteinů.

Dihydrofolátreduktasa se nachází také u *M. tuberculosis*. Tato bakterie je nejčastějším původcem tuberkulózy u lidí. Právě dihydrofolátreduktasa by mohla být potenciálním cílem pro vývoj nových antituberkulotik.

Rekombinantní protein dihydrofolátreduktasa byl připraven v několika krocích. Sekvence kódující protein byla nejprve amplifikována polymerásovou řetězovou reakcí. Ligací namnoženého úseku DNA a plazmidu pET-28b(+) vznikl rekombinantní plazmid, který byl metodou tepelného šoku transformován do kompetentních buněk *E. coli* kmen HB101. K expresi proteinu byly použity buňky *E. coli* kmen BL21(DE3). Samotná exprese byla indukována přidáním isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu (IPTG). Získaný rekombinantní protein byl izolován a purifikován metodou afinitní chromatografie. Metodou dle Bradfordové byla určena koncentrace enzymu. Aktivita enzymu byla ověřena reakcí enzymu s dihydrofolátem za přítomnosti NADPH. Tento enzym může být použit k dalšímu výzkumu, zejména k hledání látek inhibujících jeho aktivitu.

Klíčová slova:

mykobakterium, dihydrofolátreduktasa, klonování, exprese, purifikace, aktivita

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Kateřina Šedivá

Supervisor: Mgr. Eva Novotná, Ph.D.

Title of diploma thesis: Cloning, expression and purification of mycobacterial dihydrofolate reductase

Dihydrofolate reductase is an enzyme essential for the metabolism of folic acid – it catalyzes the reduction of dihydrofolate to tetrahydrofolate. Tetrahydrofolate is an important cofactor involved in one-carbon transfer reactions. Dihydrofolate reductase plays a key role in the synthesis of DNA, RNA and proteins.

Dihydrofolate reductase was also found in *M. tuberculosis*. This bacterium is the most common causative agent of tuberculosis in humans. Thus dihydrofolate reductase could be a potential target for the design of new antituberculars.

The recombinant protein dihydrofolate reductase was prepared in several steps. The coding sequence of the protein was first amplified by polymerase chain reaction. A recombinant plasmid, obtained by the ligation of an amplified segment of DNA with plasmid pET-28b(+), was transformed into competent cells *E. coli* strain BH101 by the heat shock method. Cells *E. coli* strain BL21(DE3) were used for the protein expression. The expression was induced by the addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG). The prepared recombinant protein was isolated and purified by the affinity chromatography method. The concentration of the enzyme was determined by the Bradford method. The activity of the enzyme was verified by the reaction of the enzyme with dihydrofolate in the presence of NADPH. This enzyme can be used for further research, particularly to search compounds inhibiting its activity.

Key words:

mycobacterium, dihydrofolate reductase, cloning, expression, purification, activity

Obsah

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
1. Úvod.....	9
2. Teoretická část	10
2.1 Tuberkulóza	10
2.2 Rod Mycobacterium	11
2.2.1 Obecná charakteristika	12
2.2.2 Mycobacterium tuberculosis.....	13
2.2.3 Genom.....	14
2.3 Léčba tuberkulózy	14
2.3.1 Antituberkulotika	16
2.3.1.1 Léčiva první volby	17
2.3.1.2 Léčiva druhé linie	20
2.3.1.3 Potenciální nová léčiva	20
2.4 Dihydrofolátreduktasa	22
2.4.1 Charakteristika	23
2.4.2 Struktura	23
2.4.3 Význam.....	25
2.4.4 Kyselina listová a tetrahydrofolát.....	26
2.4.4.1 Porovnání u lidí a bakterií.....	27
2.5 Léčiva působící na DHFR	29
2.5.1 Trimetoprim.....	29
2.5.2 Metotrexát.....	30
2.5.3 Kyselina p-aminosalicylová	31
2.5.4 Potenciální nové inhibitory DHFR u mykobakterií.....	31
3. Cíl práce	35

4.	Experimentální část	36
4.1	Použité materiály.....	36
4.1.1	Chemikálie	36
4.1.2	Enzymy	37
4.1.3	Biologický materiál	38
4.1.4	Markery.....	38
4.1.5	Kity.....	38
4.1.6	Roztoky a pufrů	38
4.1.6.1	Zásobní roztoky	38
4.1.6.2	Složení pufrů.....	39
4.1.6.3	Složení roztoků pro SDS-PAGE	39
4.1.7	Živná média	40
4.2	Použité přístroje a pracovní pomůcky.....	41
4.2.1	Přístroje	41
4.2.2	Pracovní pomůcky.....	42
4.3	Pracovní postupy a jejich základní principy	42
4.3.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	42
4.3.2	Restrikce.....	45
4.3.3	Odsolení a zakoncentrování roztoků DNA.....	46
4.3.4	Změření koncentrace DNA.....	47
4.3.5	Ligace	47
4.3.6	Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i>	48
4.3.7	Transformace.....	49
4.3.8	MIDI purifikace	50
4.3.9	MINI purifikace	51
4.3.10	Zpětná restrikce, restrikce dalšími restrikčními endonukleasami	52
4.3.11	Exprese.....	52
4.3.12	Uvolnění proteinu z buňky pomocí BugBuster.....	53

4.3.13	Purifikace čistého proteinu pomocí His-tag kotvy	53
4.3.14	Převádění proteinu do uchovávacího pufru	54
4.3.15	Měření koncentrace proteinu.....	54
4.3.16	Ověření aktivity připraveného enzymu	55
4.3.17	Gelová elektroforéza	56
4.3.17.1	Horizontální elektroforéza	56
4.3.17.2	Vertikální SDS-polyakrylamidová elektroforéza proteinů	57
5.	Výsledky	60
5.1	PCR	60
5.2	Restrikce a změření koncentrace DNA.....	61
5.3	Ligace	62
5.4	Transformace, MINI purifikace	63
5.5	Zpětná restrikce, restrikce dalšími restrikčními endonukleasami, koncentrace DNA po ligaci.....	64
5.6	Exprese proteinu	68
5.7	Izolace čistého enzymu	69
5.8	Koncentrace proteinu	70
5.9	Ověření aktivity enzymu	70
6.	Diskuze	72
7.	Závěr	74
8.	Seznam zkratk.....	75
9.	Literatura	78

1. Úvod

M. tuberculosis je patogenní bakterie, která je nejčastějším původcem tuberkulózy u lidí. V poslední době se stále častěji vyskytují kmeny *M. tuberculosis* vykazující rezistenci k rozšiřujícímu se spektru používaných antituberkulotik. Léčebné režimy používané v současnosti tak přestávají být dostačující a je třeba objevit antituberkulotika s novým mechanismem účinku, ke kterým by *M. tuberculosis* opět vykazovala citlivost. Z toho důvodu jsou intenzivně studovány enzymy katalyzující esenciálně důležité metabolické dráhy u mykobakterií jako vhodná místa účinku pro nová antituberkulotika.

V této práci byla vybrána mykobakteriální dihydrofolátreduktasa. Jedná se o klíčový enzym v metabolismu kyseliny listové. Katalyzuje vznik tetrahydrofolátu, který je nezbytný pro správnou syntézu DNA, RNA a proteinů. Dihydrofolátreduktasa se tak jeví jako vhodný cíl pro potenciální nová antituberkulotika.

Při hledání látek inhibujících aktivitu enzymu je nejprve potřeba tento enzym připravit v dostatečném množství, aby mohl být podroben dalšímu studiu. K tomu jsou využívány metody molekulární genetiky, které umožňují ze sekvence DNA kódující požadovaný enzym tento enzym v rekombinantní formě připravit.

2. Teoretická část

2.1 Tuberkulóza

Tuberkulóza (TBC), dříve nazývaná souchotiny nebo úbytě, je celosvětově rozšířenou infekcí, jejíž latentní formou je nakažena přibližně jedna třetina světové populace (WHO, 2013). Tuberkulóza lidstvo doprovází již od počátku jeho historie (Homolka a Votava, 2003). Jedná se o onemocnění, které je ve většině případů léčitelné, dá se mu předcházet a existuje proti němu očkování. Podle údajů Světové zdravotnické organizace (WHO) v roce 2012 tuberkulózou onemocnělo 8,6 milionů lidí, v témže roce na toto onemocnění zemřelo 1,3 milionů nemocných (WHO, 2013). Nejvíce postižená území jsou rozvojové oblasti světa (Bednář et al., 1996). Česká republika se řadí k evropským zemím s nízkou nemocností TBC. V roce 2012 bylo v ČR hlášeno 611 případů tuberkulózy (ÚZIS ČR, 2013).

V polovině 20. století se předpokládalo, že TBC bude po roce 2000 eradikována. Bohužel se tento předpoklad nenaplnil. Důvodem jsou především chudoba a neuspokojivá hygienická a preventivní opatření, zejména v rozvojových a zaostalých oblastech, ale také zvyšující se incidence kmenů rezistentních na antituberkulotika. TBC ovšem nepostihuje jen lidi žijící v rozvojových zemích, představuje závažný problém i pro rozvinuté země, ve kterých jsou hlavními rizikovými skupinami lidé na okraji společnosti (bezdomovci, alkoholici, drogově závislí, imigranti apod.) (Julák, 2006). K současné situaci přispívá i stále se zvyšující množství nakažených HIV, kteří jsou k nákaze TBC mnohem více citliví (Netval et al., 2004). Dochází také k zanedbávání programů na kontrolu TBC, i díky názorům tvrdícím, že většina nových onemocnění byla zachycena v rámci preventivních prohlídek (Homolka a Votava, 2003).

Původcem tohoto infekčního onemocnění je tzv. komplex *Mycobacterium tuberculosis* (Hrdina, 2012/2013). Do něj jsou řazeny příbuzné druhy mykobakterií: např. *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* a *M. microti*, přičemž *M. tuberculosis* je jako původce u lidí nejčastější (Greenwood et al., 1999). K nákaze stačí jen několik málo bakterií (Julák, 2006). Jedná se o obligátní patogeny (Bednář et al., 1996), které nejčastěji vstupují do organismu inhalací. Dochází ke vdechování kapének s mykobakteriemi vylučovanými jedinci nakaženými aktivní tuberkulózou (Netval et al., 2004; Julák, 2006).

Toto onemocnění vyvolané *M. tuberculosis* se většinou projevuje jako plicní TBC. Jejím charakteristickým rysem je chronicita (Julák, 2006). Infekce ve většině případů začíná v plicích. U třetiny pacientů se objevuje postižení i dalších orgánů (Hrdina, 2012/2013). Tento stav se nazývá mimoplicní tuberkulóza, která může postihovat kosti, klouby, urogenitální trakt, ORL oblast, ale i GIT, meningy, kůži a další (Netval et al., 2004; Julák, 2006). Klinický obraz aktivní plicní TBC ve většině případů zahrnuje dlouhotrvající kašel, únavu, febrilie, noční pocení, nechutenství, katechizaci, dušnost, bolest na hrudi, až hemoptýzu, někdy však může TBC plic probíhat asymptomaticky (Netval et al., 2004).

Onemocnění vzniká v závislosti na virulenci mykobakterií a na stavu obranného systému hostitele. Rozlišuje se tzv. primární a postprimární TBC. Tyto dvě formy mají odlišné patologické znaky, proces patogeneze je poměrně složitý (Greenwood et al., 1999). U primární TBC infekce propukne po kontaktu hostitele s mykobakterií (Netval et al., 2004). Po nákaze bakterií vznikají primární ložiska, která se mohou buď zcela vyléčit nebo přejdou do klidového stadia, ve kterém mohou mykobakterie setrávat i několik desítek let. Asi u 10 % infikovaných se během let vyvine tzv. postprimární tuberkulóza (Bednář et al., 1996). Ta vzniká jako důsledek endogenní reaktivace infekce či exogenní reinfekce, a toto propuknutí nemoci je podporováno více faktory, záleží jak na hostiteli, tak na vlastním vyvolávajícím agens (Greenwood et al., 1999; Homolka a Votava, 2003). Významným faktorem je obranyschopnost daného jedince. Pokud má jedinec slabší imunitní systém, dochází k rozvoji nemoci (Greenwood et al., 1999). U většiny infikovaných jedinců však k rozvoji nemoci nedojde. Bakteriální nákaza probíhá asymptomaticky, nakažení nemohou infekci přenášet, pouze mají pozitivní tuberkulinovou reakci (Todar, ©2008–2012).

2.2 Rod *Mycobacterium*

Rod *Mycobacterium* se taxonomicky řadí do čeledi *Mycobacteriaceae*, podřádu *Corynebacterineae*, řádu *Actinomycetales*, kmene *Actinobacteria*, domény *Bacteria* (Todar, ©2008–2012).

Rod *Mycobacterium* v roce 1999 zahrnoval 80 druhů, v roce 2005 bylo uznáváno již 115 druhů. Jsou v něm zahrnuty příležitostné patogeny, dále málo běžné nebo jen saprofytické druhy a několik častých obligátních patogenů (Julák, 2006).

2.2.1 Obecná charakteristika

Zástupce rodu *Mycobacterium* tvoří obligátně aerobní bakterie (Greenwood et al., 1999). Patří do skupiny acidorezistentních tyček, které mají různou délku, od kokovitých forem po vláknité. Pro mnohé bakterie, mimo skupinu rychle rostoucích mykobakterií, je charakteristický velmi pomalý růst. Tento pomalý růst je zapříčiněn jejich nezvykle dlouhou generační dobou (Bednář et al., 1996).

Mykobakterie mají nezvyklou a pro tento rod charakteristickou strukturu buněčné stěny. Kromě peptidoglykanu a arabinogalaktanu je v buněčné stěně obsažena vrstva s neobyčejně vysokým obsahem lipidů, volných i vázaných (Bednář et al., 1996; Julák 2006). Lipidy mykobakterií jsou tvořeny neobvyklými mastnými kyselinami (např. tuberkulostearová kyselina), především však větvenými mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem – mykolovými kyselinami (Julák, 2006). Některé mykobakterie obsahují neobvyklou alkoholickou složku – disacharid trehalosu (Hartl et al., 2006). V bakteriální stěně se může nacházet množství neobvyklých lipidových komponent, např. glykolipidy (mykosidy, cord-factor), fosfolipidy, sulfolipidy, lipoproteiny, vosky a další (Bednář et al., 1996; Julák, 2006).

Lipidová vrstva mykobakterií je hydrofobní ochrannou bariérou, která chrání buňky proti vnějším vlivům, zejména vyschnutí nebo působení detergentů. Je také zodpovědná za typickou acidorezistenci mykobakterií. Znesnadňuje přijímání barviv, po obarvení pak je naopak velice obtížné až nemožné tato barviva odstranit působením kyselin, alkálií a organických rozpouštědel (Julák, 2006; Bednář et al., 1996). Proto se používá barvení podle Ziehl-Neelsena (barvení na acidorezistenci) nebo fluorescenční barvení auraminem O a rhodaminem, jelikož se jen velmi těžko barví postupem podle Grama (Pharma-reports, 2012).

Mykobakterie postrádají specifické nástroje virulence, resp. toxiny. Imunologická odezva na mykobakterie je buněčná (Julák, 2006). Za poškození organismu a vznik příznaků je zodpovědná reakce pozdní přecitlivělosti na mykobakteriální antigeny, kdy organismus obrannou reakcí destruuje vlastní tkáň (Julák, 2006; Greenwood et al., 1999). Největší patogenní účinek u mykobakterií je přisuzován složkám jejich buněčné stěny, zejména lipidům (např. cord-factor, izolovaný především z virulentních kmenů) (Bednář et al., 1996).

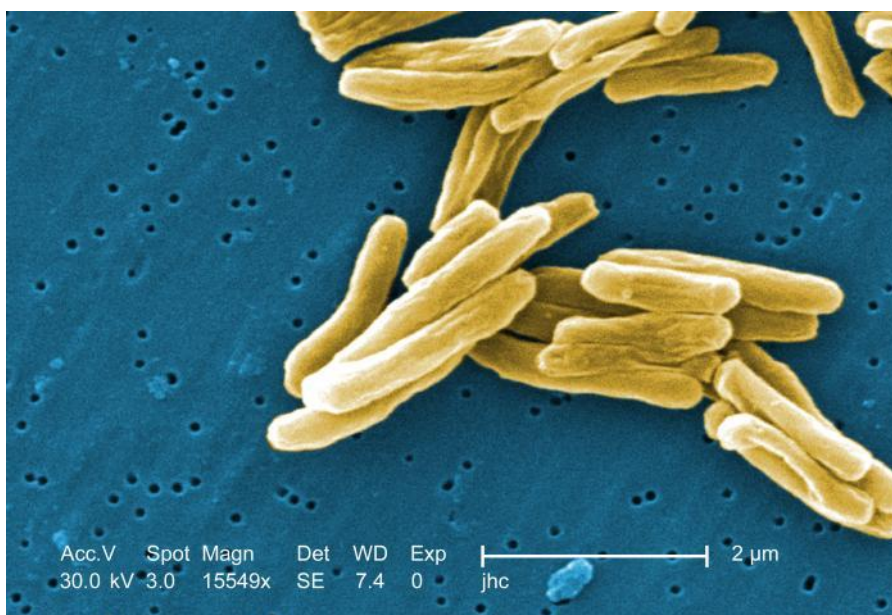
2.2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis, též nazývaná Kochův bacil, patří mezi obligátně patogenní druhy. Je to nejčastější a nejzávažnější patogen z rodu *Mycobacterium*. Tato bakterie byla objevena v roce 1882 Robertem Kochem. Je původcem různých forem tuberkulózy u lidí (Julák, 2006).

Odpovídá obecné charakteristice rodu *Mycobacterium*. Jedná se o nepohyblivou, nesporulující bakterii, která nemá pouzdro (Greenwood et al., 1999). Má tvar malých tyčinek (Obr. 1), fyziologie je striktně aerobní (Phrama-reports, 2012). Generační doba trvá 20–30 hodin, kolonie jsou viditelné až po několika týdnech (Bednář et al., 1996).

Virulence *M. tuberculosis* je dána tím, že i když jsou bakterie po vniknutí do plic fagocytovány alveolárními makrofágy, tak mají schopnost v nich přežívat (Greenwood et al., 1999). Jedním z mechanismů, jak znemožní svému zničení, je schopnost mykobakterií díky své buněčné stěně zabránit fúzi fagosomu s lysosomem (Pharma-reports, 2012; Lüllmann et al., 2007).

Pro kultivaci, která trvá několik týdnů, se používají speciální média, nejčastěji Löwensteinova-Jensenova půda nebo tekutá Šulova půda. Diagnostika *M. tuberculosis* se provádí několika způsoby – pomocí tuberkulinových testů u osob, v laboratoři se provádí diagnostika mikroskopicky, kultivací (inkubace pūd při 37 °C) nebo pomocí molekulárně genetických metod, případně dalšími metodami (Bednář et al., 1996; Netval et al., 2004). Růst je inhibován antituberkulotiky (Bednář et al., 1996).



Obrázek 1: *Mycobacterium tuberculosis* v elektronovém mikroskopu (Převzato z: <http://www.cdc.gov/nchhstp/newsroom/DiseaseAgents.htm>)

2.2.3 Genom

Mykobakterie mají relativně velký genom (3 až 4×10^9 bp). Je pro něj typický velký podíl 65 až 70 mol% guaninu-cytosinu. Některé druhy mají navíc v plazmidech obsaženou extrachromozomální DNA (Bednář et al., 1996).

Nejlépe prozkoumaným kmenem *M. tuberculosis* je kmen H37Rv. Je známa kompletní sekvence jeho genomu, která se skládá z 4 411 529 párů bází (bp) (Cole et al., 1998). Sekvence genomu *M. tuberculosis* byla stanovena v roce 1998 (Pharma-reports, 2012). Genom *M. tuberculosis* obsahuje asi 4000 genů, 525 je zapojeno do buněčné stěny a buněčných procesů, 188 genů kóduje regulační proteiny, 91 genů se podílí na virulenci, detoxikaci a adaptaci. Přes 200 genů kóduje enzymy pro metabolismus mastných kyselin (Todar, ©2008–2012). *M. tuberculosis* se liší od ostatních bakterií tím, že velká část její kódovací kapacity je určena k produkci enzymů účastnících se lipogeneze a lipolýzy (Cole et al., 1998).

Pro mykobakteriální genom jsou charakteristické repetitivní sekvence o velikosti asi 5 kb. Sledování těchto repetitivních elementů je metodou tzv. molekulární epidemiologie (Bednář et al., 1996).

2.3 Léčba tuberkulózy

M. tuberculosis je přirozeně rezistentní k mnoha antibiotikům. Tato rezistence je způsobena zejména vysoce hydrofobním buněčným obalem, ale mnoho faktorů zodpovědných za rezistenci je zakódováno i v genomu. Patří k nim hydrolytické nebo léčivo modifikující enzymy, a mnoho potenciálních efluxních systémů (Cole et al., 1998).

Léčba tuberkulózy je tak složitá, její původce *M. tuberculosis* je odolnou bakterií, navíc často skrytou uvnitř buňky. Jedná se o dlouhodobý proces. Dříve nemocní byli izolováni v sanatoriích, prováděly se chirurgické zákroky (Julák, 2006). Od těchto metod se v dnešní době již upustilo. Nyní tvoří základ léčby tuberkulózy terapie antibakteriálními látkami ze skupiny antituberkulotik, chirurgická léčba je indikována v ojedinělých a závažných případech (Homolka a Votava, 2003).

Výskyt TBC je třeba kontrolovat. Kromě terapie antituberkulotiky u aktivní formy onemocnění je nezbytná i prevence. Tu lze provádět očkováním pomocí vakcíny BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) a zejména zlepšením životních podmínek. Dále je důležité vyhledávat neznámé nemocné a léčit je (Bednář et al., 1996; Julák, 2006).

V rámci kontroly TBC by se měla hodnotit rezistence všech nově izolovaných mykobakterií na antituberkulotika (Homolka a Votava, 2003).

Při léčbě tuberkulózy je důležité zvolit správnou strategii chemoterapie. Existují různé léčebné režimy tuberkulózy podle klinické formy tuberkulózy, závažnosti poškození, zasažené tkáně, přidružených nemocí, stavu pacienta, výskytu rezistence a dalších okolností (Homolka a Votava, 2003; Julák, 2006; Simon a Stille, 1998). V dnešní době jsou nejčastěji využívány krátkodobé režimy (Netval et al., 2004). Jednotlivé režimy mají stanovenou délku podávání léčiv a jejich kombinaci. Tato obecná schémata by se však měla přizpůsobit individuálně konkrétnímu pacientovi (Bednář et al., 1996).

Každý léčebný režim je složen ze dvou fází: fáze iniciální, která probíhá během hospitalizace, a fáze pokračovací, která je vedená ambulantně (Slíva a Votava, 2010). Hlavní zásadou léčby je dlouhodobé a kombinované podávání antituberkulotik (Simon a Stille, 1998). Celková délka léčby je závislá na více faktorech. Léčiva se podávají denně nebo třikrát týdně. Obvykle se při léčbě TBC u nových pacientů v iniciálním (intenzivním) stadiu podává čtyřkombinace antituberkulotik první linie po dobu 2 měsíců. V pokračovací fázi se užívá dvojkombinace antituberkulotik první linie po dobu 4 měsíců. V obou fázích je použit isoniazid a rifampicin (WHO, 2010).

Léčbu může často zkomplikovat vznik rezistence na antituberkulotika. Vzniká zejména u těch antituberkulotik, která jsou podávána v monoterapii (Bednář et al., 1996). Proto režimy léčby TBC obsahují více léčiv podávaných současně, kdy každé z nich zabraňuje vzniku bakterií odolných vůči ostatním léčivům (Todar, ©2008–2012). Každá populace mykobakterií obsahuje již geneticky dané malé množství primárně rezistentních mutant (Bednář et al., 1996). Sekundární rezistence je výsledkem nesprávně vedené chemoterapie buď ze strany nemocného nebo lékaře (Homolka a Votava, 2003). V případě výskytu rezistence je třeba specificky upravená léčba (WHO, 2010).

Závažný problém jak pro nemocného, tak i pro okolí, představuje multirezistentní TBC (MDR-TB), která vzniká jako důsledek nedodržování zásad chemoterapie tuberkulózy. Multirezistence je definována jako rezistence na rifampicin a isoniazid (Homolka a Votava, 2003). U těchto nemocných je většinou k léčbě nutné použít kombinaci základních antituberkulotik, na něž jsou mykobakterie citlivé, s vedlejšími antituberkulotiky (Homolka a Votava, 2003). Léčba MDR-TB je zdlouhavá, složitá, neefektivní, špatně tolerovaná a drahá (Brigden et al., 2014). Vzácným typem MDR-TB je extenzivně rezistentní TBC (XDR-TB), která je definována jako TBC rezistentní k isoniazidu a rifampicinu a dále odolná k fluorochinolonům a nejméně jednomu ze tří

injekčních léků druhé linie (amikacin, kanamycin nebo kapreomycin) (Todar, ©2008–2012). Před několika lety byla identifikována další forma rezistentní TBC, tzv. totálně rezistentní tuberkulóza (TDR-TB). Jedná se o neléčitelnou formu TBC, která se zatím objevila pouze v několika zemích (Itálie, Irán, Indie, nyní i jižní Afrika) (Rowland, 2012; Velayati et al., 2013). Jako TDR-TB se dá nazvat TBC způsobená kmeny, které vykazují *in vitro* rezistenci ke všem testovaným léčivům první a druhé generace (Velayati et al., 2013). Nicméně WHO pojem totálně rezistentní tuberkulóza považuje za neadekvátní vzhledem k obtížím souvisejícím s testováním citlivosti mnoha antituberkulotik, a také protože se v budoucnosti očekává vstup nových léčiv do klinické praxe, která mohou být proti extenzivně rezistentním kmenům účinná. Nová definice rezistence závažnější než u XDR-TB se proto nedoporučuje (WHO, 2012).

S nástupem nových léčiv účinných proti MDR-TB je potřeba stanovit i nový léčebný režim při výskytu multirezistentní TBC. Je potřeba najít vhodnou strategii a důkazy o tom jak maximalizovat potenciál nových léčiv s cílem zlepšit léčbu a zkrátit dobu jejího trvání. Pouhým přidáním nových léčiv do současného léčebného režimu by nový režim měl stejné nevýhody jako režim již existující. Proto bylo stanoveno několik klíčových zásad pro navrhování budoucích léčebných režimů – léčebný režim by měl obsahovat alespoň jednu novou třídu léčiva, být široce použitelný při MRD-TB a XDR-TB, obsahovat tři až pět účinných léčiv, každé z jiné lékové skupiny, léčiva by měla být podávána orálně, mít jednoduché dávkovací schéma, mít dobrý profil vedlejších účinků, které umožňují monitorování, léčba by měla trvat maximálně 6 měsíců a minimálně interagovat s antiretroviroty (Brigden et al., 2014).

2.3.1 Antituberkulotika

Antituberkulotika v sobě zahrnují heterogenní skupinu látek, jejichž společnou vlastností je účinnost proti mykobakteriím jako původcům TBC, případně i dalším nemocem způsobených mykobakteriemi (Julák, 2006). Jedná se o látky různého původu, s rozdílnou strukturou, působící na *M. tuberculosis* odlišným mechanismem (Hartl et al., 2006). Antituberkulotika je nutné podávat dlouhodobě a kombinovat je kvůli heterogenitě populace mykobakterií, aby se předešlo vzniku rezistence (Homolka a Votava, 2003). Antituberkulotika často mívají nežádoucí účinky, což může léčbu komplikovat (Hartl et al., 2006).

Antituberkulotika lze rozdělit na dvě linie. Léčiva první linie neboli esenciální jsou tvořena isoniazidem, rifampicinem, pyrazinamidem, etambutolem a streptomycinem. (WHO, 2010). Jedná se o léčiva první volby (Lüllmann et al., 2007). Léčiva druhé linie neboli rezervní jsou více toxická a méně účinná proti TBC než léčiva první linie,

používají se u infekcí rezistentních na léčiva první volby nebo pokud látky první linie nemohou být z nějakého důvodu použity (Hrdina, 2012/2013). Řadí se sem různá léčiva. Nejčastěji jsou do druhé linie zařazovány kanamycin, amikacin, kapreomycin, flourochinolony, rifabutin, kyselina *p*-aminosalicylová, viomycin, ethionamid, prothionamid, cykloserin, případně další (Lüllmann et al., 2007; WHO, 2010).

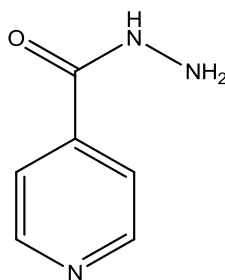
V dnešní době je třeba hledat i nová antituberkulotika, zejména kvůli zvyšující se četnosti multirezistentních až extenzivně rezistentních mykobakterií. Hledají se látky s novým mechanismem účinku, který není využíván u standardních antituberkulotik, a selektivním působením na mykobakterie. Některé nadějně látky jsou ve fázi klinického zkoušení (Barry a Blanchard, 2010). Jsou testovány i nové látky působící na mykobakteriální dihydrofolátreduktasu.

2.3.1.1 Léčiva první volby

Isoniazid (INH)

Isoniazid (Obr. 2) je hydrazid kyseliny isonikotinové. Je to celosvětově nejvíce používaná látka na léčbu TBC díky své snadné výrobě, nízké ceně a vysoké účinnosti (Homolka a Votava, 2003). INH je proléčivo, které je katalasou-peroxidasou, kódovanou genem *katG*, přeměněno na aktivní formu (Zhang et al., 1992). Jedná se o chemoterapeutikum, které inhibuje syntézu mykolových kyselin důležitých pro stavbu buněčné stěny mykobakterií (Slíva a Votava, 2010; Simon a Stille, 1998). Primárním cílem INH je enoyl-ACP reduktasa (InhA). Po aktivaci INH vzniká adukt s NAD⁺, který právě InhA inhibuje (Wang et al., 2007). Má baktericidní účinek na extra- a intracelulárně uložené rostoucí *M. tuberculosis* (Slíva a Votava, 2010). U klidových stádií působí bakteriostaticky (Hrdina, 2012/2013). Nejlépe účinkuje v alkalickém prostředí (Netval et al., 2004).

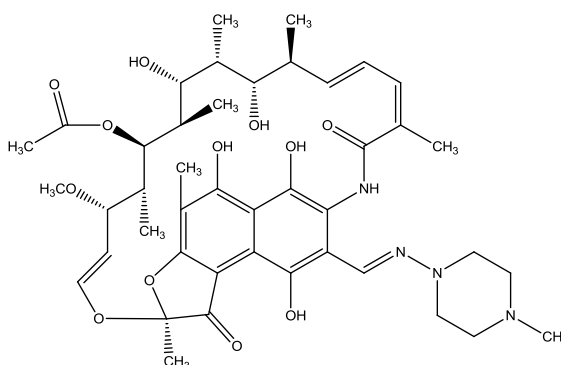
Při nesprávně vedené léčbě na něj snadno vzniká rezistence, nejčastěji se přirozeně rezistentní mutanty vyskytují právě na isoniazid (Homolka a Votava, 2003).



Obrázek 2: Isoniazid (Hartl et al., 2006)

Rifampicin (RMP)

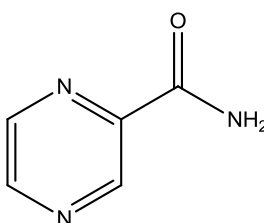
Rifampicin (Obr. 3) je jedno z nejúčinnějších antituberkulotik (Homolka a Votava, 2003). Jedná se o semisyntetické širokospektré ansamycinové ATB. Mechanismem účinku je zásah do syntézy RNA vazbou na β podjednotku RNA polymerasy mykobakterií (Zhang a Yew, 2009). Účinkuje na intra- a extracelulárně uložené bakterie, v alkalickém i neutrálním prostředí (Netval et al., 2004). Působí baktericidně na rostoucí bakterie i na bakterie v klidové fázi. Má výraznou sterilizační aktivitu (Zhang a Yew, 2009). Používá se i látka podobná rifampicinu – rifabutin, který může být účinný i při rezistenci na RMP (Lüllmann et al., 2007).



Obrázek 3: Rifampicin (Hartl et al. 2006)

Pyrazinamid (PZA)

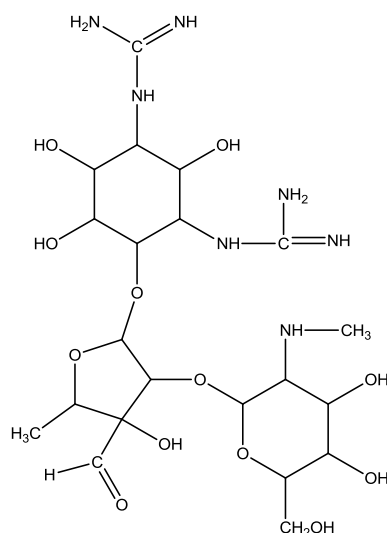
Tato látka je pyrazinovým analogem nikotinamidu (Obr. 4) (Hartl et al., 2006). Jedná se o proléčivo, které je na aktivní formu, pyrazinkarboxylovou kyselinu, přeměněno pomocí bakteriální nikotinamidasy/pyrazinamidasy. Předpokládaným mechanismem účinku je narušení membránové energetiky a inhibice membránového transportu působením pyrazinkarboxylové kyseliny (Zhang et al., 2003). Toto chemoterapeutikum působí baktericidně pouze na intracelulárně fagocytované mykobakterie v kyselém prostředí (Homolka a Votava, 2003). Vykazuje sterilizační účinek (Zhang et al., 2003). Je účinný proti mykobakteriím v tzv. latentní formě (Bednář et al., 1996).



Obrázek 4: Pyrazinamid (Hartl et al., 2006)

Streptomycin (STM)

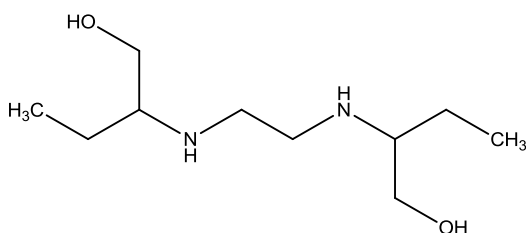
Streptomycin (Obr. 5) je aminoglykosidové ATB. Působí jako inhibitor syntézy bílkovin, váže se na 30S podjednotku bakteriálního ribozomu (Zhang a Yew, 2009). Má baktericidní účinek na rychle se množící bakterie uložené extracelulárně v alkalickém prostředí za přístupu kyslíku (Homolka a Votava, 2003). Nemá účinek na mykobakterie uvnitř makrofágů a v kyselé zanícené tkáni (Greenwood et al., 1999). Méně působí na formy klidové (Lüllmann et al., 2007).



Obrázek 5: Streptomycin (Lüllmann et al., 2007)

Etambutol (EMB)

Jedná se o chemoterapeutikum typu aminoalkoholu (Obr. 6), účinný je pouze pravotočivý *S,S*(+)-izomer (Hartl et al., 2006). Mechanismem účinku je inhibice syntézy buněčné stěny. EMB inhibuje zabudování D-arabiny do arabinogalaktanu (Takayama a Kilburn, 1989). Dochází k polymerizaci arabinosy v buněčné stěně, místem účinku je arabinofuranosyltransferasa (Hartl et al., 2006). Působí mykobakteriostaticky, avšak pouze na rostoucí a dělící se mykobakterie, intra- i extracelulární. Při podávání v monoterapii na něj rychle vzniká rezistence (Netval et al., 2004).



Obrázek 6: Etambutol (Hartl et al., 2006)

2.3.1.2 Léčiva druhé linie

Fluorochinolony

Ze skupiny fluorochinolonů proti *M. tuberculosis* vykazují určitou aktivitu ciprofloxacin a ofloxacin. Tyto látky zasahují do procesu replikace DNA (Hartl et al., 2006). Mají baktericidní účinek (Zhang, 2005). Mechanismus účinku spočívá v inhibici bakteriální DNA gyrazy, složené z A a B podjednotek. V současné době jsou v klinickém hodnocení látky z nové generace fluorochinolonů – moxifloxacin a gatifloxacin (Da Silva a Palomino, 2011).

Kanamycin, amikacin, viomycin, kapreomycin

Kanamycin a amikacin jsou aminoglykosidová ATB, viomycin a kapreomycin patří do skupiny cyklických peptidových ATB (Da Silva a Palomino, 2011). Všechny tyto látky inhibují syntézu proteinů modifikací 16S rRNA ve 30S podjednotce ribozomů (Zhang, 2005). Kapreomycin proti mykobakteriím způsobujícím TBC vykazuje bakteriostatický účinek. Působí také proti kmenům rezistentním na streptomycin (Simon a Stille, 1998).

Ethionamid, prothionamid

Tyto látky jsou deriváty kyseliny isonikotinové, které narušují syntézu mykolové kyseliny (Hartl et al., 2006). Ethioamid je strukturně blízký analog isoniazidu. Jedná se o proléčivo, které je aktivováno monooxygenasou (EtaA) (Baulard et al., 2000). Stejně jako u isoniazidu u obou těchto látek po aktivaci vzniká adukt s NAD⁺, který inhibuje InhA. Obě látky jsou baktericidní (Wang et al., 2007).

Cykloserin

Jedná se o analog D-alaninu (Da Silva a Palomino, 2011). Tato látka inhibuje syntézu peptidoglykanu v buněčné stěně zablokováním účinku D-alaninracemasy (Alr) a D-alanin-D-alaninligasy. D-alanin racemasa se účastní přeměny L-alaninu na D-lalanin, což je substrát pro D-alanin ligasu. Působí bakteriostaticky (Zhang, 2005).

2.3.1.3 Potenciální nová léčiva

Bedaquilin (Diarylchinoliny)

Bedaquilin (R207910 nebo TMC-207) působí jak proti citlivým, tak i rezistentním kmenům *M. tuberculosis* (Brigden et al., 2014; Barry a Blanchard, 2010). Má úzké spektrum účinku. Hlavní roli v mechanismu účinku hraje specifická inhibice mykobakteriální ATP syntasy (Da Silva a Palomino, 2011). V závislosti na dávce působí i na perzistentní bakterie. Toto léčivo se jeví jako jeden z nejslibnějších

kandidátů z nových léčiv pro léčbu TBC (Barry a Blanchard, 2010). Očekává se, že v brzké době bude k dispozici pro léčbu MDR-TB (Brigden et al., 2014). Avšak objevuje se u něj problém, látka je rychle metabolizována cytochromem P450, konkrétně jeho isoformou 3A4, která je významně indukována rifampicinem (Barry a Blanchard, 2010).

PA-824 a delamanid (Nitroimidazoly)

PA-824 je nitroimidazopyranový derivát, který vychází ze struktury antiprotozoika metronidazolu, nemá však mutagenní účinky. Jedná se o proléčivo, které pro svoji aktivaci vyžaduje *in vivo* redukci nitroskupiny na aminoskupinu (Hartl et al., 2006). Mechanismem účinku je inhibice syntézy ketomykolové kyseliny a bílkovin. PA-824 inhibuje respiraci a syntézu buněčné stěny (Barry a Blanchard, 2010). Je aktivní proti replikujícím se a částečně i proti klidovým bakteriím v anaerobním prostředí (Hartl et al., 2006). Vzhledem k účinku proti nereplikujícím se bakteriím se zdá, že inhibice syntézy buněčné stěny není jediným mechanismem účinku (Da Silva a Palomino, 2011).

Delamanid (OPC67683) je taktéž proléčivem, které po aktivaci inhibuje syntézu mykolových kyselin v buněčné stěně (Brigden et al., 2014; Barry a Blanchard, 2010). Vykazuje baktericidní a sterilizační aktivitu *in vitro* (Shi a Sugawara, 2010). Jedná se o léčivo působící na MDR-TB, a je možné že v brzké době bude k její léčbě také využíváno (Brigden et al., 2014).

SQ109 (Diaminy)

Jedná se o analog etambutolu. Mechanismus účinku není plně znám, ale předpokládá se, že zasahuje do biosyntézy buněčné stěny. Je aktivní proti kmenům rezistentním na isoniazid, rifampicin i etambutol (Barry a Blanchard, 2010). Pro zlepšení biodostupnosti se testují jeho karbamátová proléčiva (Shi a Sugawara, 2010).

Sutezolid a linezolid (Oxazolidinony)

Linezolid se váže na 50S podjednotku ribozomu a inhibuje proteosyntézu. Používá se k léčbě závažných kožních infekcí způsobených grampozitivními bakteriemi a nosokomiální pneumonie. Při dlouhodobém podávání TBC může způsobit vážné vedlejší účinky (Barry a Blanchard, 2010).

Sutezolid (PNU-100480) je blízkým strukturním analogem linezolidu. Obě látky prokázaly antimykobakteriální aktivitu. I další oxazolidinony (např. AZD-5847) by mohly mít využití při léčbě TBC (Barry a Blanchard, 2010; Brigden et al., 2014).

Klavulanát/karbapenemy (β -laktamy)

M. tuberculosis produkuje β -laktamasy, které brání β -laktamovým antibiotikům inhibovat růst mykobakterií. Proto se testovalo podávání těchto antibiotik s inhibitory β -laktamasy. Nejlépe účinkovala kombinace meropenemu s klavulanátem, která působila baktericidně na rostoucí bakterie a v závislosti na dávce i na klidové bakterie v anaerobním prostředí (Barry a Blanchard, 2010).

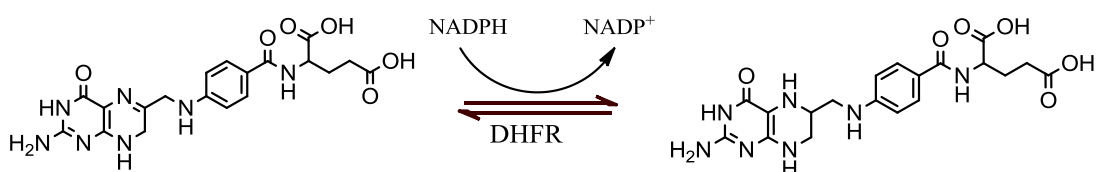
Látky ovlivňující syntézu cord factoru

Cord factor (TDM, trehalosa 6,6'-diylkolát) je jedním z nejunikátnějších faktorů určujících virulenci *M. tuberculosis*. TDM je součástí vnějšího obalu buněčné stěny spolu s TMM (trehalosa 6,6'-monomykolát), což je biosyntetický prekurzor TDM (Elamin et al., 2012).

Jedním z kroků v biosyntéze cord factoru je přenos mykolové kyseliny z TMM do jiné TMM, čímž vzniká TDM za účasti komplexu enzymů Ag85. Komplex antigen 85, skládající se z Ag85A, Ag85B a Ag85C, by se tak mohl stát cílem v léčbě mykobakteriálních infekcí. Proti aktivitě Ag85 a syntéze cord factoru působí například analog trehalosy, 6-azido-6-deoxy- α , α' -trehalosa (ADT), který inhibuje aktivitu všech členů komplexu Ag85 *in vitro*. Na komplex Ag85 působí kromě ADT také další analoga trehalosy a fosfonátové sloučeniny. Přímě na Ag85C působí metyl- β -D-arabinofuranosid, analoga 5-S-alkyl-5-thioarabinofuranosidu a dietylfosfát. Některé další enzymy účastníci se syntézy cord factoru by se také mohly stát cílem pro nová antimykobakteriální léčiva (Elamin et al., 2012).

2.4 Dihydrofolátreduktasa

Dihydrofolátreduktasa je enzym katalyzující redukci 7,8-dihydrofolátu na 5,6,7,8-tetrahydrofolát a, mnohem pomaleji, přeměnu folátu na tetrahydrofolát. (Obr. 7). Tato reakce je NADPH-dependentní (Schweitzer et al., 1990).



Obrázek 7: Redukce dihydrofolátu na tetrahydrofolát katalyzovaná dihydrofolátreduktasou

2.4.1 Charakteristika

Název genu kódujícího dihydrofolátreduktasu zní *dfrA*, další možné názvy jsou *folA* nebo *dhfr*. Rv číslo genu je Rv2763c. Gen má délku 480 bp (TubercuList). Poloha genu v genomové DNA je od 3073130 do 3073609 (NCBI). Jedná se o gen kódující protein. Produktem tohoto genu je enzym dihydrofolátreduktasa DfrA (DHFR), lze ho nazvat i tetrahydrofolátdehydrogenasa (EC 1.5.1.3.) (TubercuList).

Dihydrofolátreduktasa (DHFR) náleží do rodiny dihydrofolátreduktas. Řadí se do funkční kategorie intermediární metabolismus a respirace. Enzym se skládá ze 159 aminokyselin. Molekulová hmotnost činí 17640 Da. Isoelektrický bod má hodnotu 6,8 (TubercuList).

Sekvence genu (NCBI):

```
1  atggtggggc  tgatctgggc  tcaagcgaca  tcgggtgtca  tcggcccgcg  cggcgacatc
61  ccctggcgct  tgcccgagga  ccaggcgcat  ttccgggaga  tcacatggg  gcacacgatc
121 gtgatgggcc  ggcgcacatg  ggattcgctg  ccggctaaag  tccggccgct  gcccggccgg
181 cgaaatgtcg  tactgagccg  ccaagctgac  tttatggcca  gcggggctga  ggttgcggt
241 tcactcgagg  aggcgctgac  cagcccggag  acgtgggtga  tcggaggcgg  acaagtctat
301 gcgctggcgc  tgccgtacgc  gaccagatgt  gaggttaccg  aggtcgacat  cggcctgccg
361 cgcaagccg  gtgacgcgct  ggccccctg  ctggacgaga  catggcgggg  cgagacgggg
421 gagtggcgct  tcagccggtc  cgggttgccg  taccggtgt  acagctacca  ccgctcatga
```

Sekvence proteinu (NCBI):

```
MVGLIWAQATSGVIGRGGDIPWRLPEDQAHFREITMGHTIVMGRRTWDSLPAKVRPL
PGRRNVLRSQADFMASGAEVVGSLEEALTSPEWVIGGGQVYALALPYATRCEVTE
VDIGLPREAGDALAPVLDETWRGETGEWRFSRSGRLRYRLYSYHRS
```

2.4.2 Struktura

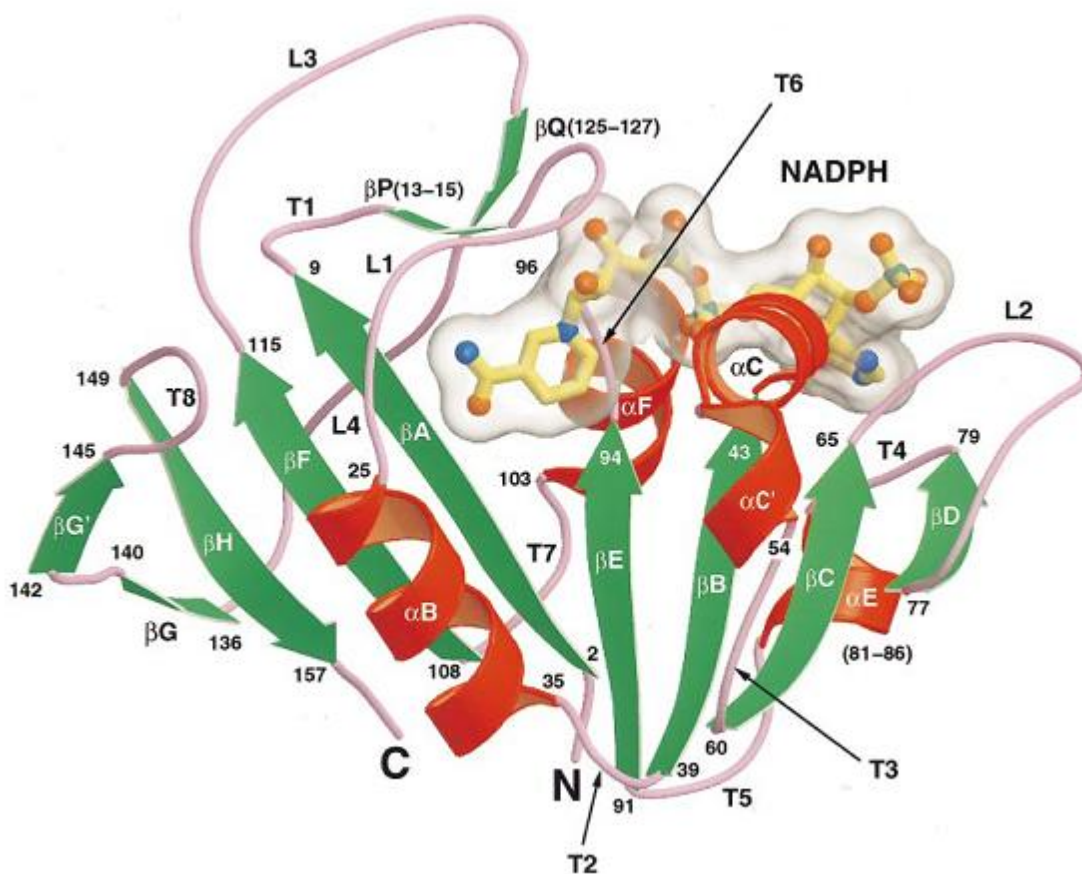
Většina živých buněk obsahuje DHFR. Enzym se však mezi hlavními skupinami organismů liší v detailech své struktury. Je tak možná určitá druhová specifita v účinku inhibitorů DHFR (Franklin a Snow, 2005). I přesto, že mezi jednotlivými druhy organismů existují velké rozdíly v sekvenci dihydrofolátreduktasy (DHFR), ve všech strukturách DHFR se vyskytuje stejná obecná část, ve které dominuje centrální β -skládaný list se čtyřmi doprovodnými α -helixy. U *M. tuberculosis* se tento centrální

β -skládání list skládá ze sedmi paralelních vláken a jednoho C-koncového antiparalelního vlákna. β -skládání list má levotočivou otočku, která se stáčí o 130° (Li et al., 2000). Struktura DHFR u *M. tuberculosis* je ukázána na obrázku 8.

Jak již bylo řečeno, DHFR potřebuje pro svou funkci NADPH. V holoenzymu je tento koenzym vázán v místě rozšíření konformace u C-konce β -skládaného listu, jeho nikotinamidový kruh je vložený do štěrbin vytvořené řetězci β -A a β -F. NADP^+ značně interaguje s proteinem, dochází k interakci s mnoha aminokyselinovými zbytky pomocí různých typů vazeb (Li et al., 2000).

Enzym obsahuje vazebná místa pro folát a NADP^+ . DHFR má 7 vazebných míst pro folát v polohách 5, 22, 27, 60, 94, 100 a 113. Vazebných míst pro NADP^+ je 10, jsou umístěné v polohách 7, 14, 44, 45, 46, 67, 95, 96, 97 a 98 (NCBI).

Lidský enzym obsahující 187 aminokyselin je podstatně delší než enzym u *M. tuberculosis* skládající se ze 159 aminokyselin. Sekvence dihydrofolátreduktasy u lidí a u *M. tuberculosis* je totožná jen z 26 %. Přesto se i v jejich struktuře objevuje stejná obecná část (Franklin a Snow, 2005). Hlavní složení mykobakteriální DHFR je v podstatě stejné jako u té lidské, DHFR je u lidí a u *M. tuberculosis* podobná. Strukturální odlišnosti se vyskytují na N-konci β -skládaného listu, který je vzdálen od aktivního místa umístěného na C-konci β -skládaného listu. Většina strukturálních vlastností DHFR je podobná u patogenu i u hostitele, avšak existují zde rozdíly. Totožnost sekvencí je v aktivním místě a v místě vázajícím ligandy výrazně vyšší (okolo 55 %) než ve zbytku řetězce (přibližně 17 %), nicméně některé aspekty v oblasti vázajícím ligandy u *M. tuberculosis* se zdají být odlišné významným a pro výzkum slibným způsobem od těch v lidském enzymu. V místě vázajícím NADP^+ se také nachází několik rozdílů. Tyto strukturální rozdíly v aktivním místě, v místě vázajícím ligandy nebo NADP^+ mezi enzymem člověka a *M. tuberculosis* by mohly být využity při tvorbě návrhu účinných látek, které by specificky inhibovaly DHFR u mykobakterií a nepůsobily by na normální funkci lidského enzymu (Li et al., 2000).



Obrázek 8: Dihydrofolátreduktasa *Mycobacterium tuberculosis* v komplexu s NADPH (Li et al., 2000)

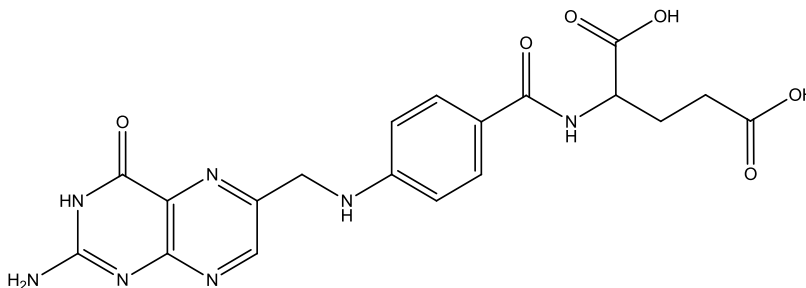
2.4.3 Význam

Dihydrofolátreduktasa se nachází ve všech buňkách, u eukaryot i prokaryot (Li et al., 2000), a je nezbytná pro udržování potřebné intracelulární hladiny folátů v biochemicky aktivním redukovaném stavu (Suling et al., 2000).

Jedná se o klíčový enzym v metabolismu folátů (Suling et al., 2000). Díky tomuto enzymu vzniká tetrahydrofolát (THF), který má funkci přenašeče jednonukleotidových zbytků, a prekuzory z tetrahydrofolátu vytvořené se podílí na řadě významných biochemických reakcí (Li et al., 2000). Inhibice aktivity enzymu vede v konečném důsledku k zástavě syntézy DNA, RNA a proteinů (Suling et al., 2005). Nedostatek folátu tak může vést až k buněčné smrti (Li et al., 2000).

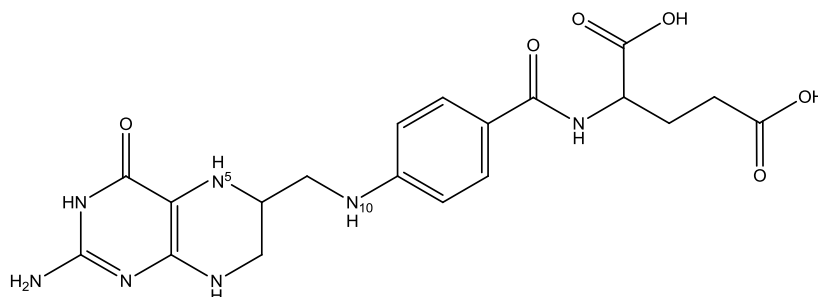
2.4.4 Kyselina listová a tetrahydrofolát

Kyselina listová (syn. kyselina pteroylmonoglutamová) (Obr. 9) je organická sloučenina, též označovaná jako vitamin B₉ (Stránský, 2011; Ledvina et al., 2009b). Její molekula je tvořena derivátem heterocyklu pteridinu, *p*-aminobenzoátem (PAB) a na něj peptidovou vazbou připojeným glutamátem (Ledvina et al., 2009a). V potravě se příliš často nevyskytuje čistá forma kyseliny listové (Žamboch, 1996). Může obsahovat až 8 glutamových zbytků. Deriváty kyseliny listové se nazývají foláty (Stránský, 2011).



Obrázek 9: Kyselina listová (Schweitzer et al., 1990)

Kyselina listová je významná proto, že zastává důležité místo v biochemických procesech probíhajících v organismech. V těchto procesech je potřeba jen v malém množství (Koolman a Röhm, 2012). Samotná kyselina listová ovšem nemá biologický účinek, je potřeba získat její aktivní formu, tetrahydroderivát, dvoustupňovou hydrogenací heterocyklického pterinového kruhu (Hartl et al., 2006; Koolman a Röhm, 2012). Nejprve vzniká kyselina dihydrolistová. Kyselina tetrahydrolistová (tetrahydrofolát) vznikne její redukcí katalytickým působením dihydrofolátreduktasy (Hartl et al., 2006).



Obrázek 10: Tetrahydrofolát (Zheng et al., 2013)

Tetrahydrofolát (THF) (Obr. 10) je koenzym, který hraje významnou roli v metabolismu jednonhlíkatých zbytků, kde slouží jako jejich přenašeč (Hartl et al., 2006; Ledvina et al., 2009a). Tyto zbytky jsou přenášeny v různých oxidačních stupních jako metyl,

metylen, metenyl, formyl a formimin. Mohou se vázat na heterocyklus a na PAB ve dvou možných místech – na dusíky N⁵ nebo N¹⁰ nebo na oba tyto dusíkové atomy. Redoxními reakcemi mohou jednotlivé zbytky přecházet mezi sebou (Ledvina et al., 2009a).

Kyselina listová, přesněji řečeno tetrahydrofolát, zastává významnou roli při růstu, reprodukci a diferenciaci buněk (Stránský, 2011). Uplatňuje se jako koenzym v řadě reakcí, podílí se na funkci enzymů účastnících se metabolismu některých aminokyselin nebo v syntéze purinových bází a pyrimidinové báze thymimu, hraje roli v metabolismu fosfolipidů a tvorbě krve, ovlivňuje metabolismus homocysteinu (Stránský, 2011; Hartl et al., 2006). THF je nepostradatelný pro přeměnu glycinu, serinu, threoninu, methioninu, tryptofanu a histidinu (Ledvina et al., 2009a). Díky své funkci při syntéze purinových nukleotidů a pyrimidinového nukleotidu (přeměna dUMP na dTMP) má významné místo i při syntéze nukleových kyselin, DNA i RNA. Folátový koenzym je důležitý pro proliferující buňky, proto se velké množství kyseliny listové nachází především v buňkách, které se rychle dělí, například v krvetvorných buňkách kostní dřeně (Koolman a Röhm, 2012).

S výjimkou reakcí katalyzovaných thymidylátsyntasou, se tetrahydrofolát regeneruje ve většině reakcí, při kterých jsou přenášeny jednouhlíkaté zbytky. Proto v buňkách, které aktivně nesyntetizují thymidylát a DNA, nemůže inhibice DHFR vést v přerušení těchto metabolických drah. Nicméně v buňkách nacházejících se v S-fázi vede inhibice tohoto enzymu ke snížení hladiny tetrahydrofolátu, což následně vede k inhibici biosyntézy thymidylátu a purinových nukleotidů (Schweitzer et al., 1990).

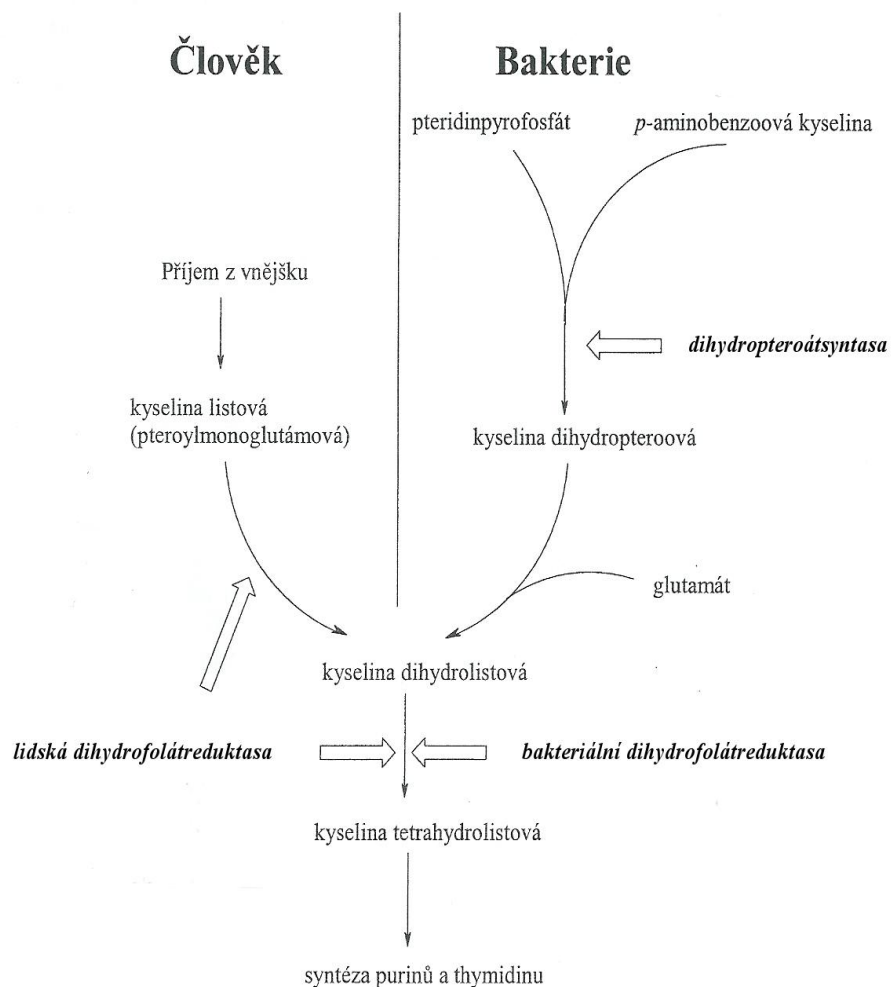
Metabolismus folátů je místem, kde lze terapeuticky zasáhnout (Koolman a Röhm, 2012). V terapii nádorů se mimo jiné používají antagonisté folátů, u bakteriálních infekcí se využívají chemoterapeutika sulfonamidy, které blokují syntézu folátu u bakterií a tím jejich růst (Ledvina et al., 2009b).

2.4.4.1 Porovnání u lidí a bakterií

Živočišný organismus není schopen sám si syntetizovat kyselinu listovou (Koolman a Röhm, 2012), neumí syntetizovat PAB ani připojit glutamát (Ledvina et al., 2009a). Člověk kyselinu listovou proto musí přijímat z okolí potravou (Ledvina et al., 2009b). Nejprve je ovšem potřeba ji upravit, roli zde hraje i vitamin B₁₂ (Žamboch, 1996). Z molekuly folátu přijatého potravou se díky působení střevní konjugasy odštěpují glutamové zbytky za vzniku monoglutamátu, takto upravená molekula se poté vstřebává v trávicím traktu. Po vstřebání se v buňkách střeva hydrogenuje na aktivní tetrahydrofolát (Ledvina et al., 2009b; Stránský, 2012).

Pro člověka je kyselina listová esenciálním vitamínem. Denní příjem potravou by měl být 0,4 mg pro dospělé (Stránský, 2011). Potřeba vitamínu závisí na věku, pohlaví a fyziologickém stavu (Koolman a Röhm, 2012). V případě přerušení příjmu potravou má člověk v těle značné rezervy (Ledvina et al., 2009b). Jedná se o vitamin rozpustný ve vodě, termolabilní a citlivý na světlo (Stránský, 2011).

Většina bakterií nemusí kyselinu listovou přijímat zvenčí (Lüllmann et al., 2007). Téměř všechny bakterie jsou schopny oproti lidem kyselinu listovou, přesněji kyselinu dihydrolistovou, samy syntetizovat z prekurzorů (Lüllmann et al., 2007). Odlišnosti od syntézy u lidí jsou ukázány na obrázku 11. U bakterií syntéza tetrahydrofolátu začíná kondenzací *p*-aminobenzoové kyseliny s 6-hydroxymetyl-7,8-dihydropterinpyrofosfátem katalytickým působením dihydropteroátsyntasy za vzniku dihydropteroátu. V dalším kroku dochází k připojení kyseliny glutamové a vzniká dihydrofolát, reakce je katalyzována dihydrofolátsyntasou. Dihydrofolát je poté dihydrofolátreduktasou redukován na tetrahydrofolát (Zheng et al., 2013; Hartl et al., 2006). Kyselina listová i pro bakterie představuje nezbytný růstový faktor (Ledvina et al., 2009b).

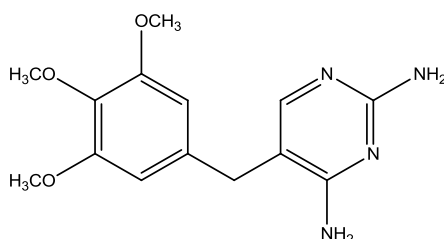


Obrázek 11: Syntéza tetrahydrofolátu u lidí a bakterií (Hartl et al., 2006)

2.5 Léčiva působící na DHFR

Existují léčiva, která zasahují do metabolismu kyseliny listové v různých místech. Například chemoterapeutika sulfonamidy u bakterií kompetitivně inhibují enzym dihydropteroátsyntasu a blokují tak přeměnu *p*-amonibenzoátu a pteridinofsfátu na kyselinu dihydrolistovou (Hartl et al., 2006). Přímo na enzym dihydrofolátreduktasu působí chemoterapeutikum trimetoprim a cytostatikum metotrexát (Hartl et al., 2006), dále antimalarika pyrimetamin a proguanil (proléčivo, které se metabolizuje na aktivní cykloguanil) (Franklin a Snow, 2005), cytostatikum pemetrexed (Slíva a Votava, 2010), antibakteriální látka tetroxoprim (Simon a Stille, 1998), Br-WR99210, což je analog antimalarika WR99210, a některé další látky (Li et al., 2000). DHFR byla studována jako cílové místo pro léčiva bakteriálních, protozoálních a fungálních infekcí, a také pro neoplastická a autoimunitní onemocnění. V současné době se zkoumají i nová antituberkulotika, jejichž mechanismus účinku by zahrnoval DHFR, a která by působila selektivně proti *M. tuberculosis* (Li et al., 2000).

2.5.1 Trimetoprim



Obrázek 12: Trimetoprim (Hartl et al., 2006)

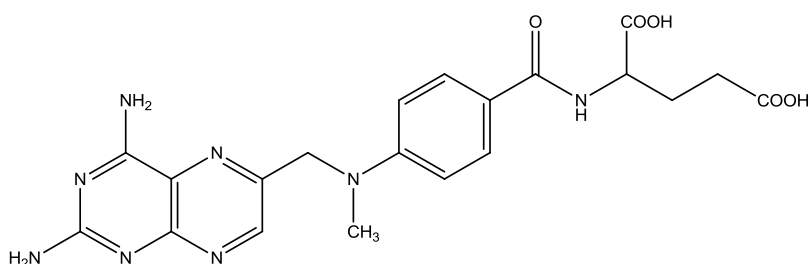
Trimetoprim (TMP) (Obr. 12) patří do skupiny diaminopyrimidinů, která kromě již zmiňovaného trimetoprimu zahrnuje ještě pyrimetamin a cykloguanil (Greenwood et al., 1999). Strukturně se sice podobá antimalarikům, ale proti plasmodiím nevykazuje příliš dobré účinky (Hartl et al., 2006). Jedná se o antibakteriální chemoterapeutikum, které narušuje metabolismus kyseliny listové a nepřímo tak působí na syntézu DNA (Lüllmann et al., 2007; Greenwood et al., 1999). TMP se velice pevně váže na DHFR, blokuje ji a tím brání redukci dihydrofolátu na tetrahydrofolát (Julák, 2006).

Trimetoprim vykazuje výraznou selektivitu k bakteriální dihydrofolátreduktase (Franklin a Snow, 2005). Důvodem jsou rozdíly mezi lidskou a bakteriální dihydrofolátreduktasou (Hartl et al., 2006). Lidská DHFR je inhibována až při 50 000krát vyšší koncentraci

trimetoprimu (Simon a Stille, 1998). I přesto však TMP částečně inhibuje i lidský enzym (Hartl et al., 2006).

Trimetoprim má široké spektrum účinku, působí bakteriostaticky (Lüllmann et al., 2007). Lze ho podávat samostatně v případě lehčích nekomplikovaných infekcí močových cest. Ovšem při použití v monoterapii hrozí riziko vzniku rezistence (Hartl et al., 2006). Často se užívá v kombinaci se sulfonamidy, TMP vhodně doplňuje spektrum sulfonamidů. Nejčastěji se podává se sulfametoxazolem, tento kombinovaný přípravek se nazývá kotrimoxazol (Julák, 2006). Účinné látky v kotrimoxazolu působí synergickým účinkem, obě inhibují syntézu kyseliny listové, ale odlišným mechanismem. Působí ve dvou za sebou následujících stupních syntézy kyseliny listové (Greenwood et al., 1999). V této kombinaci působí až baktericidně. Rezistence na kotrimoxazol vzniká vzácně (Lüllmann et al., 2007).

2.5.2 Metotrexát



Obrázek 13: Metotrexát (Hartl et al., 2006)

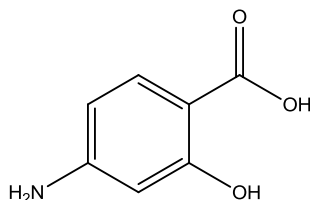
Metotrexát (MTX) (Obr. 13) patří do skupiny antimetabolitů. Je antagonistou kyseliny listové, tzv. antifolikum. Molekula MTX je strukturně blízkým analogem kyseliny listové (Hartl et al., 2006). MTX kompetitivně inhibuje dihydrofolátreduktasu (Koolman a Röhm, 2012), váže se na ni jako falešný substrát a narušuje její normální funkci. Inhibuje tak biosyntézu prekurzorů nukleových kyselin a tím proliferaci buněk (Hartl et al., 2006). Do buněk je MTX transportován pomocí přenašeče využívaného pro aktivní transport redukováných folátů (Schweitzer et al., 1990).

Používá se zejména v onkologii jako cytostatikum, ale lze ho užít i jako imunosupresivum a protizánětlivou látku, např. při léčbě revmatoidní artritidy (Slíva a Votava, 2010) nebo psoriazy (Franklin a Snow, 2005). Antimetabolity narušují buněčné funkce především u nádorových buněk, protože mají zvýšený metabolismus. V chemoterapii nádorů se podává ve vysokých dávkách (Hartl et al., 2006).

Metotrexát má toxický vliv i na normální buňky (Hartl et al., 2006). Je proto důležité snažit se minimalizovat riziko vzniku závažných vedlejších účinků (Franklin a Snow, 2005). Při použití MTX v terapii nádorů se pro snížení toxicity podává antidotum leukovorin (kys. folinová, 5-formyl-THL) (Lüllmann et al., 2007).

2.5.3 Kyselina *p*-aminosalicylová

Kyseliny *p*-aminosalicylová (PAS) byla jednou z prvních látek, u které byl prokázán antituberkulotický účinek a která se začala používat k léčbě TBC v kombinaci s INH a STM (Da Silva a Palomino, 2011). Kyselina *p*-aminosalicylová (Obr. 14) je strukturně podobná kyselině *p*-aminobenzoové. Je jedním z léčiv používaných při multirezistentní TBC. Ačkoliv je užívána již dlouhou dobu, přesný mechanismus účinku nebyl plně objasněn (Zheng et al., 2013). Dříve se předpokládalo, že PAS soutěží mechanismem kompetitivní inhibice s *p*-aminobenzoovou kyselinou o vazbu na dihydropteroátsyntasu. Jako pravděpodobnější mechanismus účinku se však jeví schopnost PAS chelatovat kationty železa (Hartl et al., 2006). Nedávno ve své studii Zheng et al. (2013) prokázali, že PAS je prekurzorem, který po přeměně na aktivní metabolit inhibuje DHFR u *M. tuberculosis*. Díky enzymům dihydropteroátsyntasa a dihydrofolátsyntasa je PAS zapojena do metabolismu folátů namísto běžného substrátu PAB. Vznikne tak antimetabolit hydroxydihydrofolát, který inhibuje enzymatickou aktivitu DHFR (Zheng et al., 2013). Tato látka působí bakteriostaticky (Zhang, 2005).



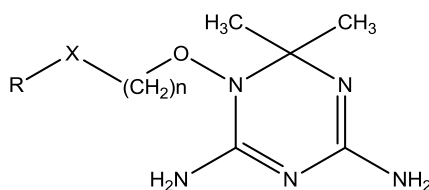
Obrázek 14: Kyselina *p*-aminosalicylová (Zheng et al., 2013)

2.5.4 Potenciální nové inhibitory DHFR u mykobakterií

Kvůli zvyšující se rezistenci TBC na standardně podávaná antituberkulotika je třeba hledat nové možnosti chemoterapeutické léčby (Suling et al., 1998). Jednou z možností by mohl být vývoj léčiv, která by cíleně působila na bakteriální dihydrofolátreduktasu, ale ne na tento enzym u lidí (Li et al., 2000). Jediným rysem DHFR je totiž selektivita, která poskytuje možnost v navrhování inhibitorů. DHFR tak představuje ideální cíl pro racionální a efektivní vývoj antimykobakteriálních léčiv (Suling et al., 2000).

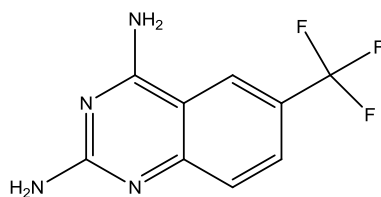
Porovnáním struktury lidské a mykobakteriální DHFR lze najít odlišnosti (např. v aktivním místě enzymu, v oblastech vázajících ligandy nebo NADP⁺). Taktéž byly studovány komplexy DHFR z *M. tuberculosis* s inhibitory (metotrexát, trimetoprim a Br-WR99210) a NADP⁺ nebo jen s NADP⁺ a byly porovnány s lidskou DHFR. Jejich srovnání ukázalo, že v okolí NADP⁺ a inhibitorů se objevují zajímavé rozdíly mezi enzymy hostitele a patogena. Všechny tyto zjištěné odlišnosti mezi enzymy *M. tuberculosis* a člověka poskytují příležitost pro vývoj nových nebo vylepšených selektivních inhibitorů DHFR u *M. tuberculosis* (Li et al., 2000).

Schopnost sloučeniny WR99210 inhibovat mykobakteriální dihydrofolátreduktasu byla prokázána, avšak její inhibiční schopnost nikdy nebylo testována u *M. tuberculosis*. Gerum et al. (2002) ukázali, že WR99210 inhibuje DHFR a *in vitro* i růst *M. tuberculosis*. Testováním sloučenin odvozených od WR99210 (Obr. 15) bylo objeveno několik látek, které také vykazovaly inhibiční vliv na DHFR u *M. tuberculosis*, některé inhibovaly více než samotný WR99210. Tato skupina sloučenin tak projevila dobrý potenciál pro vývoj nových léčiv účinných proti *M. tuberculosis* (Gerum et al., 2002).



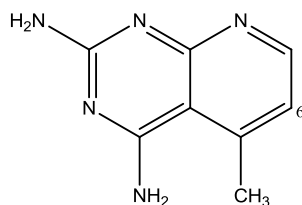
Obrázek 15: Testované deriváty odvozené od RW99210 (Gerum et al., 2002)

Sloučenina NC00094221 (Obr. 16), patřící do diaminochinazolinové skupiny sloučenin vykazovala na dávce závislou inhibici vůči rekombinantní DHFR z *M. tuberculosis*. Byla pozorována i určitá aktivita proti celým buňkám *M. tuberculosis*. V její struktuře je obsažen chinazolinový kruh, který je rozpoznán jako aktivní inhibitor DHFR, ale nebyl až do této studie zkoumán ve vztahu k DHFR u *M. tuberculosis*. Důkladnější výzkum dalších již dříve zjištěných antifolátů by mohl odhalit další účinné antimykobakteriální látky se specifickou aktivitou proti DHFR (Kumar et al., 2012).



Obrázek 16: NC00094221 (Kumar et al., 2012)

Dostupné zprávy ukazují, že taktéž deriváty 2,4-diamino-5-metyl-5-deazapteridinu (Obr. 17) by mohly být vyvinuty do klinicky použitelných antimykobakteriálních léčiv. Zkoumané deriváty obsahovaly v pozici 6 spojovací můstky, většinou ve formě aminoskupiny, který k základnímu cyklu připojoval aromatický zbytek (Suling et al., 2000; Suling et al., 1998).

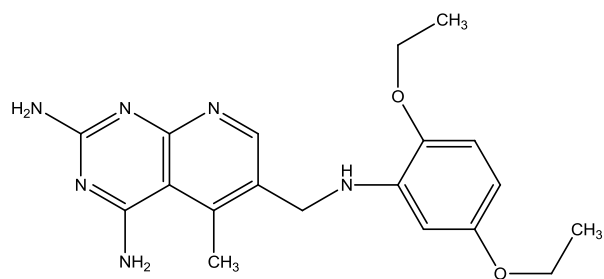


Obrázek 17: 2,4-diamino-5-metyl-5-deazapteridin (Suling et al., 1998)

Proběhlo testování několika 2,4-diamino-5-methyl-5-deazapteridinových derivátů. Cílem bylo ohodnotit *in vitro* aktivitu řady lipofilních deazapteridinových derivátů jako inhibitorů dihydrofolátreduktasy proti *M. tuberculosis* a *M. avium*. Získané hodnoty byly porovnávány s trimetoprimem. Účinek testovaných látek byl závislý na dalších substitucích základní struktury. Aktivitu různě ovlivňovaly například rozdílné typy substituce fenylového zbytku vázaného na deazapteridinový cyklus nebo substituce spojovacího můstku v podobě aminoskupiny. Výsledky ukázaly, že mohou být syntetizovány lipofilní antifoláty s větší aktivitou proti mykobakteriím než TMP a které by měly selektivní toxicitu (Suling et al., 1998).

Jiná studie testovala *in vitro* aktivitu derivátů 2,4-diamino-5-metyl-5-deazapteridinu u komplexu *M. avium* a u její DHFR připravené rekombinantně. Antifoláty hodnocené ve studii se strukturálně podobají trimetrexátu a piritreximu z třídy antifolátů. Analoga 2,4-diamino-5-metyl-5-deazapteridinu obsahovala modifikace ve třech oblastech – v pozici 5, na spojovacím můstku v poloze 10 a aromatickém jádře připojeném k poloze 10. Aktivita opět závisela na typu a poloze substituentu. Výsledky prokázaly, že lze syntetizovat pteridinové deriváty působící selektivně proti komplexu *M. avium* (Suling et al., 2000).

Na tuto studii navázala další (Suling et al., 2005), ve které byl testován SRI-8858. Tento nový antifolát SRI-8858 {6-[(2,5-diethoxyfenylamino)metyl]-2,4-diamino-5-methylpyrido[2,3-d]pyrimidin} je hydrochloridem SRI-8686 (Obr. 18), což je látka u které byla prokázána selektivní inhibice proti komplexu *M. avium* v jiné Sulingově studii (2000). Aktivita SRI-8858 byla testována v kombinaci s látkami inhibujícími dyhydropteroátsyntasu – sulfametoxazolem a dapsonem. Tato látka prokázala synergický účinek v kombinaci s oběma inhibitory (Suling et al., 2005).



Obrázek 18: SRI-8686 (Suling et al., 2000)

3. Cíl práce

Cílem diplomové práce Klonování, exprese a purifikace mykobakteriální dihydrofolátreduktasy bylo připravit mykobakteriální enzym dihydrofolátreduktasu v rekombinantní formě. Toho bylo dosaženo provedením několika dílčích kroků:

1. Namnožení požadovaného úseku DNA pomocí polymerázové řetězové reakce
2. Úprava PCR produktu pomocí restričních endonukleas a jeho ligace do vektoru pET-28b(+), taktéž upraveného stejnými restričními endonukleasami jako PCR produkt
3. Transformace plazmidu se zaligovaným inzertem do kompetentních buněk HB101
4. Izolace plazmidu se zaligovaným inzertem a ověření úspěšnosti ligace pomocí zpětné restrikce
5. Transformace plazmidu s ověřenou zaklonovanou sekvencí do kompetentních buněk BL21(DE3) a exprese proteinu
6. Izolace a purifikace proteinu metodou afinitní chromatografie
7. Stanovení koncentrace připraveného enzymu a ověření jeho aktivity

4. Experimentální část

4.1 Použité materiály

4.1.1 Chemikálie

2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Agarosa pro DNA analýzu	Serva (Heidelberg, Německo)
Akrylamid, f.e. ≥ 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
APS (persíran amonný), f.e. ≥ 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Bacto Agar	Becton (Le Pont de Claix, Francie)
Bacto Tryptone	Becton (Le Pont de Claix, Francie)
Bacto Yeast extract	Becton (Le Pont de Claix, Francie)
Bradford reagent	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Bromfenolová modř – sodná sůl	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
BSA (100×)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
BSA ≥ 99,9%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
BugBuster Protein Extraction Reagent	Novagen (Darmstadt, Německo)
Coomassie brilliant blue G-250	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Dihydrofolát	Sigma-Aldrich(Steinheim, Německo)
Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
dNTP Mix	Finnzymes (Espoo, Finsko)
EDTA ≥ 99% (m/m)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Etanol 99% (v/v)	Dr. Krulich (Hradec Králové, ČR)
Glycerol 85% (v/v)	Dr. Krulich (Hradec Králové, ČR)
Hydrogenfosforečnan didraselný dihydrát, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
Hydroxid sodný, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)

Chlorid hořečnatý hexahydrát p.a.	Lachema
Chlorid hořečnatý (50 mM)	Finnzymes (Espoo, Finsko)
Chlorid sodný, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
Chlorid vápenatý dihydrát, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
IPTG	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Isopropanol ≥ 99%, pro molekulární biologii	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Kyselina boritá, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
Kyselina chlorovodíková 36% (v/v)	Penta (Chrudim, ČR)
NADPH	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
NEBuffer 3 (10×)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
NEBuffer 4 (10×)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
N,N'-Methylenbis(akrylamid), f.e. ≥ 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Phusion HF Reaction Buffer (5×)	Finnzymes (Espoo, Finsko)
T4 DNA Ligase Buffer (5×)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, p.a.	Penta (Chrudim, ČR)
TEMED, f.e. ≥ 99%	Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
Ultra-pure LMP Agarose	Invitrogen (Carlsbad, USA)

4.1.2 Enzymy

Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA polymerasa (100 U)	Finnzymes (Espoo, Finsko)
Restrikční endonukleasa <i>NdeI</i> (20 000 U/ml)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
Restrikční endonukleasa <i>EcoRI</i> (20 000 U/ml)	NEB Frankfurt am Main, Německo)
Restrikční endonukleasa <i>XhoI</i> (20 000 U/ml)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
Restrikční endonukleasa <i>PvuI</i> (10 000 U/ml)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
Restrikční endonukleasa <i>EcoRV</i> (20 000 U/ml)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
T4 DNA Ligasa (2 000 000 U/ml)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)

4.1.3 Biologický materiál

Reverse primer	GeneriBiotech (Hradec Králové, ČR)
5'-CCG AGA ATT CTC ATG AGC GGT GGT-3'	
Forward primer	GeneriBiotech (Hradec Králové, ČR)
5'-GCA CAC CAT ATG GTG GGG CTG AT-3'	
pET-28b(+) vektor	Novagen (Darmstadt, Německo)
<i>E. coli</i> HB101	Promega (Madison, USA)
(F ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>hsdS20</i> (rB ⁻ , mB ⁻), <i>supE44</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>lacY1</i> , <i>galK2</i> , <i>rpsL20</i> (strr), <i>xyf-5</i> , <i>mtl-1</i>)	
<i>E. coli</i> BL21	Promega (Madison, USA)
(F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ(DE3), pLysS, Cmr)	

4.1.4 Markery

2-log DNA Ladder	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
Supercoiled DNA Ladder	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
Loading Dye Solution (6×)	NEB (Frankfurt am Main, Německo)
GelRed Nucleic Acid Gel Stain 10000x in water	C-Consulting Labtechnologies
Precision Plus Protein Standard All Blue	Bio-Rad (Hercules, USA)

4.1.5 Kity

QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Hilden, Německo)
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden, Německo)
QIAexpress Ni-NTA Fast Start Kit	QIAGEN (Hilden, Německo)
Nucleospin Extract II Kit	Macherey-Nagel (Düren, Německo)

4.1.6 Roztoky a pufry

4.1.6.1 Zásobní roztoky

EDTA 0,5M, pH 8,0

Ethanol 70% → sterilizace: filtrace

Glycerol 85% → sterilizace: 1 hodina při 121 °C

IPTG 1M (skladování při -20 °C)

Kanamycin 10 mg/ml (skladování při -20 °C)

4.1.6.2 Složení pufrů

Tris-HCl pufr: 10mM Tris, pH 8,5

TBE pufr (5×): 45mM Tris, 45mM kyselina boritá, 10mM EDTA, pH 8,3

Draselno-fosfátový pufr (1M): 1M KH_2PO_4 , 1M $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$

Pozn.: Všechny tyto pufrы byly sterilizovány filtrací a uchovávány v lednici.

4.1.6.3 Složení roztoků pro SDS-PAGE

Zásobní roztoky

30% akrylamid (AA) + 0,8% bisakrylamid (bis-AA)

(30 g AA + 0,8 g bis-AA do 100 ml H_2O)

1,5M Tris-HCl pufr (pH 8,8)

(18,5 g Tris do 100 ml H_2O ; úprava pH koncentrovanou HCl)

0,5M Tris-HCl pufr (pH 6,8)

(6 g Tris do 100 ml H_2O)

10% SDS

(10 g SDS do 100 ml H_2O)

0,5% bromfenolová modř (BFB)

(5 mg BFB do 10 ml H_2O)

10% APS (připravován vždy čerstvý)

(20 mg persíranu amonného do 200 μl H_2O)

Elektrodový pufr (5× koncentrovaný): 125mM Tris, 1M glycin, 0,5% SDS, pH 8,3

(72 g glycinu, 15 g Tris, 5 g SDS do 100 ml H_2O ; úprava pH koncentrovanou HCl)

Naředěný elektrodový pufr

(70 ml 5× koncentrovaného elektrodového pufru + 280 ml destilované vody)

Vzorkový pufr: 50mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glycerol, 2% SDS, 0,04% bromfenolová modř, 0,05% 2-merkptoethanol

(1,3 ml H₂O, 1,0 ml 0,5M Tris-HCl, 2,0 ml glycerolu, 3,0 ml 10% SDS, 0,6 ml 0,5% BFB)

Barvicí roztok: 0,25% Coomassie Brilliant Blue G250 (CBBG) v 10% kyselině octové
(0,25 g CBBG do 100 ml 10% kyseliny octové)

Odbarvovací roztok: 10% kyselina octová
(50,5 ml 99% kyselina octová do 449,5 ml H₂O)

Isobutanol nasycený vodou

(čistý isobutanol smíchaný s destilovanou vodou, nasycený isobutanol se nachází v horní vrstvě)

Roztoky pro přípravu gelu

Separáčnı gel (spodnı gel)

3,2 ml H₂O, 2,5 ml 1,5M Tris-HCl, 0,1 ml 10% SDS, 4,2 ml 30% AA + 0,8% bis-AA, pH 8,8

Iniciace polymerace: 58 μ l 10 APS, 4 μ l TEMEDu

Zaostřovací gel (hornı gel)

3,125 ml H₂O, 1,25 ml 0,5M Tris-HCl, 0,05 ml 10% SDS, 0,5 ml 30% AA + 0,8% bis-AA, pH 6,8

Iniciace polymerace: 30 μ l 10% APS, 2,5 μ l TEMEDu

4.1.7 Živná média

LB médium (Luria-Bertani médium)

Složení: 1 g trypton (Bacto tryptone), 0,5 g kvasničný extrakt (Bacto yeast), 1 g NaCl, ultra čistá voda na 100 ml. Úprava pH na 7 0,1M NaOH. Sterilizace v autoklávu.

LB médium s agarem

Složení: jako LB médium + 2 g agaru (Bacto agar) na 100 ml. Úprava pH na 7 a sterilizace v autoklávu. Po zchlazení na cca 50 °C lze přidat antibiotikum. Médium se vylije na Petriho misky.

Pozn.: LB média se uchovávají v lednici.

4.2 Použité přístroje a pracovní pomůcky

4.2.1 Přístroje

Analytické váhy Scaltec SBC22	Sartorius
Autokláv	Vaposteri
Box s laminárním prouděním Faster TWO 30	Chemos CZ
Centrifuga BiofugeStratos	Heraeus
Centrifuga MiniSpin	Eppendorf
Denzitometr Infinite M200	Tecan
Hlubokomrazicí box Herafreeze	Heraeus
Horizontální elektroforéza Easycast B1	ThermoScientific
Horizontální elektroforéza Mini Horizontal HE33	Hofer
Horkovzdušný sterilizátor BD 400	Binder
Inkubátor s třepací jednotkou NB-205	n-Biotek
Inkubátor INB 200	Memmert
Kahan	
Magnetické míchadlo Big-squid	IKA
Mikrovlňná trouba	Zanussi
Personal Thermal Cycler MJ Mini	Bio-Rad
PH metr Orion 410A	Thermo
Předvážky PT310	Sartorius
Spektrofotometr ND-1000	NanoDrop
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Ultradestilační přístroj Milli-Q	Millipore
Vertikální elektroforéza Mini Protean 3	Bio-Rad
Vodní lázeň s termostatem P5 + DC10	Thermo Haake
Výrobník ledové tříště AF 80	Scotsman
UV transluminátor s kamerou GelDoc XR	Bio-Rad

Zdroj pro elektroforézu PowerPac Universal Bio-Rad

4.2.2 Pracovní pomůcky

Amicon Ultra-4, Ultracel-10	Milipore
Automatické pipety, špičky (0,5 µl–5 ml)	Eppendorf
Mikrozkumavky (1,5 ml)	Eppendorf
PCR mikrozkumavky (0,2 ml)	Eppendorf

Laboratorní sklo: Erlenmeyerovy baňky, kádinky, odměrné válce, skleněné zkumavky, tyčinky, odměrné baňky, lahve se šroubovacím víkem

Stojan na zkumavky

Sterilní plastové pomůcky: očkovací nástroje (hokejky), Petriho misky, mikrotitrační destičky, zkumavky se šroubovacím víčkem

4.3 Pracovní postupy a jejich základní principy

4.3.1 Polymerásová řetězová reakce (PCR)

Polymerásová řetězová reakce (PCR) je biochemickou reakcí, při které dochází k mnohonásobnému selektivnímu namnožení krátkého úseku molekuly DNA za využití enzymu DNA polymerasa (Brown, 2007). Množství produktu přibývá geometrickou řadou (Raclavský, 2003). PCR je extrémně senzitivní metoda. Umožňuje amplifikovat molekuly DNA ze stopového množství matrice (Kotrba et al.).

Reakce probíhá v termocykléru, což je zařízení umožňující automatické střídání teplot podle předem navoleného programu (Brown, 2007). PCR zahrnuje tři kroky, které se cyklicky opakují (Snustad a Simmons, 2009). V prvním kroku se reakční směs zahřeje na vysokou teplotu (92–95 °C), při které denaturuje dvouřetězcová DNA, a oddělí se od sebe vlákna DNA, která slouží jako templát. Poté se směs ochladí na tzv. annealing teplotu, při které dojde k hybridizaci primerů s denaturovanou DNA (Brown, 2007; Snustad a Simmons, 2009). Primery nasedají na protilehlé řetězce, jejich 3'-konce směřují proti sobě (Šmarda et al., 2008). Tato teplota je specifická pro konkrétní reakci. V posledním kroku se směs zahřeje na extenzní teplotu (70–72 °C), která je optimální pro aktivitu DNA polymerasy, a probíhá syntéza nového vlákna DNA komplementárního k templátové molekule DNA (Brown, 2007; Snustad a Simmons, 2009). DNA polymerasa se připojí k jednomu konci každého primeru a od něj ve směru

5' → 3' katalyzuje prodlužování nového řetězce přidáváním nukleotidů, tzv. extenzi primeru (Brown, 2007; Snustad a Simmons, 2009; Raclavský, 2003). Nakonec je reakční teplota opět navýšena na hodnotu, kdy dochází k denaturaci DNA a celý proces se několikrát opakuje (Brown, 2007). Každý cyklus trvá 2 až 5 min, obvykle se opakují 20 až 30× (Kotrba et al.).

K provedení PCR musíme znát okrajové nukleotidové sekvence ohraničující požadovaný úsek DNA (Brown, 2007). Podle těchto sekvencí se navrhnou a syntetizují dva vhodné oligonukleotidy, každý je komplementární k jednomu řetězci DNA (Kotrba et al.). Tyto oligonukleotidy při reakci hybridizují s příslušným vláknem DNA a ohraničují tak z obou stran úsek, který má být namnožen (Brown, 2007). Slouží jako primery k zahájení amplifikace (Snustad a Simmons, 2009).

Pro amplifikace úseku DNA kódujícího dihydrofolátreduktasu byly navrženy primery, které obsahovaly rozpoznávací místa pro restriční endonukleasy *NdeI* a *EcoRI* (Tab. 1). Za sterilních podmínek je potřeba tyto primery nejprve naředit dle návodu výrobce (GeneriBiotech). Tím se získá 0,1mM zásobní roztok, z něhož se naředěním sterilní vodou připraví 10µM pracovní roztoky. V laminárním boxu se připraví MasterMix na tři nebo čtyři reakce, který se rozpipetuje do PCR zkumavek. Celkový objem jedné reakce je 20 µl. Reakční směs je složená z HF-pufu s obsahem hořečnatých iontů, deoxynukleosidtrifosfátů (dNTPs), primerů, templátové DNA, sterilní vody a DNA polymerasy, která se do reakce přidává jako poslední (Tab. 2). V tomto případě byla použita Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA polymerasa, která je kombinací DNA polymerasy s reverzibilně navázaným proteinem blokujícím aktivitu DNA polymerasy a uvolňujícím se při teplotě polymerace. Tato polymerasa vykazuje 3' → 5' exonukleasovou aktivitu, čímž je umožněna oprava chybně vložených nukleotidů. Výsledkem její aktivity jsou amplifikované produkty s tupými konci (Finnzymes, 2010).

Tabulka 1: Primery navržené pro PCR

Primer	Sekvence	Restriční endonukleasa
Forward	5'-GCA CAC CAT ATG GTG GGG CTG ATC-3'	<i>NdeI</i>
Reverse	5'-CCG AGA ATT CTC ATG AGC GGT GGT-3'	<i>EcoRI</i>

Pozn.: tučně rozpoznávací místo enzymu

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro PCR (Finnzymes, 2010)

Složka	Zásobní roztok	Požadovaná koncentrace v reakci	20 µl reakce
Voda			do 20 µl
HF-pufr	5x	1x	4 µl
dNTPs	10 mM	200 µM každý	0,4 µl
Primer F	10 µM	0,5 µM	1 µl
Primer R	10 µM	0,5 µM	1 µl
Templát			1 µl
DNA polymerasa	2 U/µl	0,02 U/µl	0,2 µl

Pro správný průběh reakce jsou důležité hořečnaté ionty. Samotný HF-pufr již obsahuje 7,5mM MgCl₂. Každá reakce ovšem vyžaduje specifické množství hořečnatých iontů, PCR reakci lze optimalizovat jejich dalším přidáním.

V termocykléru byl pro PCR zvolen námi přednastavený program Finnzyme. Parametry tohoto programu jsou uvedeny v tabulce 3. Při PCR byly u jednotlivých směsí nastaveny různé teploty nasednutí primerů (annealing) (Tab. 4).

Tabulka 3: Parametry termocykléru při programu Finnzyme (Finnzymes, 2010)

Fáze	Teplota (°C)	Doba trvání	Počet cyklů
Úvodní denaturace	98	30 s	1
Denaturace	98	10 s	
Annealing	50–65 gradient	30 s	32
Extenze	72	30 s	
Závěrečná extenze	72	10 min	1

Tabulka 4: Annealing teplota vzorků při programu Finnzyme

Vzorek	Annealing (°C)
1	65
2	62
3	59,3
4	53,2

Po ukončení PCR se pro kontrolu výsledku provede gelová horizontální elektroforéza. Získaný PCR produkt je uchováván při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Produkt PCR je následně přečištěn za použití komerčně dostupného kitu (NucleoSpin Kit, Macherey-Nagel). Jeden objem vzorku se smíchá se dvěma objemy NT pufru. Směs se přenesse do kolonky umístěné ve sběrné zkumavce a je centrifugována 1 min při $11\ 000 \times g$. Kolonka se zachycenou DNA se promyje $600\ \mu\text{l}$ pufru NT3 a je centrifugována 1 min při $11\ 000 \times g$. Po odebrání supernatantu se k odstranění NT3 pufru opět provede centrifugace po dobu 2 min při $11\ 000 \times g$. Kolonka se umístí do čisté zkumavky, přidá se eluční NE pufr a směs se nechá 1 min inkubovat při laboratorní teplotě. Poté se centrifuguje 1 min při $11\ 000 \times g$ (Macherey-Nagel, 2008). Po přečištění PCR produktu je opět provedena kontrolní elektroforéza.

4.3.2 Restrikce

Restrikční endonukleasy jsou enzymy produkované různými mikroorganismy, které porušením fosfodiesterových vazeb štěpí dvouvláknovou DNA (Brown, 2007). Nejvýznamnější jsou restrikční endonukleasy II. typu, které rozpoznávají v dvouřetězcové molekule DNA krátké specifické nukleotidové sekvence, obvykle o délce 4 až 8 nukleotidů. Rozpoznávací sekvence často tvoří palindrom (Šmarda et al., 2008). Enzym molekulu DNA štěpí pouze v místě této rozpoznávací sekvence, v tzv. restrikčním místě (Brown, 2007; Snustad a Simmons, 2009). Vytvářejí tak fragmenty definované délky. Rozdílné enzymy rozpoznávají v DNA různé specifické sekvence (Kotrba et al.).

Fragmenty vytvořené restrikčními endonukleasami mohou mít rozdílné zakončení. Některé restrikční endonukleasy štěpí dvojici řetězců dvoušroubovice ve stejném místě (Snustad a Simmons, 2009) a fragmenty jsou pak zakončeny tupým koncem, což ztěžuje následnou ligaci (Brown, 2007). Tyto zarovnané konce je třeba před klonováním upravit (Snustad a Simmons, 2009). Mnohé restrikční endonukleasy ovšem dvě vlákna DNA neštěpí přesně ve stejných místech, ale místo štěpení je posunuté o několik nukleotidů, a vzniklé fragmenty tak obsahují kohezní konce (Brown, 2007). Druhý typ štěpení je výhodný, protože vzniknou segmenty s přečnívajícími stejnými komplementárními jednořetězcovými konci, které mohou být znovu spojeny (Snustad a Simmons, 2009). Spojení probíhá na základě komplementarity bází s koncem jiného fragmentu DNA vytvořeného stejným enzymem, případně enzymem produkujícím stejné kohezní konce (Kotrba et al.).

Roztok DNA je nutné před přidáním restriční endonukleasy náležitě upravit, aby vytvářel vhodné podmínky pro maximální účinnost daného enzymu. Po ukončení restrikce je třeba enzym inaktivovat, aby neštěpil případné další molekuly DNA přidané v následujících fázích (Brown, 2007).

Na restrikci se použijí přečištěné PCR produkty i prázdný plazmid získaný purifikací z namnožené bakteriální kultury. Reakční směs má celkový objem 20 μ l, je v ní obsažena kromě vzorku také voda, vhodný pufr, BSA (bovinní sérový albumin) a restriční endonukleasy. V tomto pokusu byly použity restriční endonukleasy *NdeI* a *EcoRI*, protože plazmid i PCR produkty obsahují štěpící místa pro tyto enzymy a zároveň tyto enzymy neštěpí sekvenci kódující gen pro DHFR. Vhodný pufr se zvolí podle použitých restričních endonukleas. Dle instrukcí výrobce byl zvolen jako reakční pufr NEB4 pufr, protože zajišťuje 100% aktivitu obou zvolených restričních endonukleas. Přesný rozpis složek na jednu reakci je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro restrikci

Složka	Množství (μ l)
Voda	9
NEB4 pufr (10 \times)	2
BSA	2
Vzorek	5
<i>NdeI</i>	1
<i>EcoRI</i>	1

Reakční směs připravená za sterilních podmínek se inkubuje 120 minut při 37 $^{\circ}$ C, každých 10 minut se protřepe. Po inkubaci se restriční endonukleasy inaktivují zahříváním směsi na 65 $^{\circ}$ C po dobu 30 min.

4.3.3 Odsolení a zakoncentrování roztoků DNA

Vzorky získané restrikcí se přečistí a zakoncentrují pomocí komerčně dostupného kitu (Gel Extraction Kit, QIAGEN). Principem je absorpce fragmentů DNA na částice oxidu křemičitého obsažené v QIAEX II (silikagel) v přítomnosti vysoké koncentrace solí. Takto vzniklé částice jsou separovány krátkou centrifugací. Následně se promytím odstraní nečistoty a DNA je poté eluována přidáním Tris-HCl (10mM, pH 8,5) nebo vodou.

K jednomu objemu vzorku (PCR produktu i plazmidu) se přidají tři objemy QX1 pufru (20 μ l vzorku + 60 μ l QX1 pufru). Pokud roztok změní zbarvení ze žluté na oranžovou

nebo růžovou, je třeba upravit pH roztoku na 5,0 přidáním 10 µl 3M octanu sodného. QIAEX II se resuspenduje pomocí vortexu po dobu 30 s. 10 µl QIAEX II se přidá do roztoku, směs se promíchá a nechá se inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Směs se každé 2 minuty musí promíchat, aby QIAEX II zůstal v suspenzi. Při tomto kroku dochází k navázání DNA na polymer QIAEX II. Po inkubaci se roztok centrifuguje 30 s při 13 000 rpm. Odstraní se supernatant a peleta se dvakrát promyje 500 µl PE pufru (předem je do něj přidán etanol). Po promytí se peleta 10 až 15 minut suší na vzduchu dokud nezíská bílou barvu. DNA se z pelety eluuje přidáním 20 µl Tris-HCl (10mM, pH 8,5) přehřátého na 37 °C. Takto připravená směs se centrifuguje 30 s při 13 000 rpm. Poté se pečlivě odstraní supernatant do sterilní zkumavky. Získaný supernatant obsahuje přečištěnou DNA (QIAGEN, 2008).

4.3.4 Změření koncentrace DNA

Koncentrace nukleových kyselin obsažených v PCR produktu a ve vzorku plazmidu se stanoví metodou ultrafialové (UV) absorpční spektrofotometrie pomocí spektrofotometru NanoDrop. Množství UV záření absorbovaného roztokem DNA odpovídá koncentraci DNA ve vzorku. Absorbance se obvykle měří při 260 nm. Jako blank se použije pufr, ve kterém je měřený roztok uchovávaný. Pufr i vzorky se nanáší po 1 µl, každý vzorek je změřen alespoň dvakrát. Pokud vzorek obsahuje nečistoty (nejčastěji bílkoviny), projeví se to zvýšením absorbance při 280 nm. Poměrem hodnot absorbance naměřených při 260 nm a 280 nm tak lze určit čistotu vzorku DNA. U čistého vzorku má tento poměr hodnotu 2, pro běžné použití postačuje pokud se tento poměr pohybuje v rozmezí 1,8–2,0 (Raclavský, 2003).

4.3.5 Ligace

Ligace je posledním krokem konstrukce rekombinantní molekuly DNA. Dochází při ní ke spojení molekuly vektoru s klonovanou molekulou DNA. Ligaci katalyzuje enzym DNA ligasa. DNA ligasa umí mimo jiné spojit dva jednotlivé fragmenty dvouvláknové DNA za vzniku dvou fosfodiesterových vazeb (Brown, 2007).

Reakce probíhá v celkovém objemu 10 µl. Reakční směs se skládá z pufru pro T4 DNA ligasu, T4 DNA ligasy o koncentraci 2,000,000 U/ml, 50–100 ng plazmidu pET-28b(+), trojnásobného množství PCR produktu v porovnání s plazmidem a vody. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 6. Potřebné množství inzertu se vypočítá podle vzorce:

$$m_{\text{insertu}} (\text{ng}) = 3 * \frac{M_{\text{insertu}} (\text{bp})}{M_{\text{plazmidu}} (\text{bp})} * m_{\text{plazmidu}} (\text{ng})$$

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro ligaci

Složka	Množství (μl)
Pufr	2
Ligasa	1
50–100 ng plazmidu	X
PCR produkt	X
H ₂ O	do 10

Reakční směs se připravuje za sterilních podmínek, přes noc se nechá inkubovat při 16 °C. Produkt ligace se uchovává při 4 °C.

4.3.6 Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Je známo, že buňky ve stavu kompetence jsou schopné přijmout cizorodou DNA (Šmarda et al., 2008.) Pro buňky *E. coli* bylo zjištěno, že mnohem účinněji přijímají DNA pokud jsou namočené v ledově studeném roztoku soli, běžně se používá 50mM roztok chloridu vápenatého. Pokud je k takto upraveným buňkám přidána DNA, dojde k přichycení molekuly DNA na buněčný povrch, ale ne již k jejímu průchodu do cytoplazmy. Přestup DNA dovnitř kompetentních buněk nastane po rychlém zahřátí kompetentních buněk na teplotu 42 °C. Přesný mechanismus toho, jak tyto procesy fungují, není dosud znám (Brown, 2007).

Kompetentní buňky lze buď komerčně zakoupit nebo připravit následujícím postupem: Do 2 ml LB média bez ATB zahřátého na laboratorní teplotu se vnese 100 μl *E. coli* HB101 nebo BL21(DE3). Bakteriální kultura se inkubuje přes noc při 37 °C a 180 rpm. Druhý den se ze 2 ml noční kultury odebere 0,5 ml. Zbytek se uskladní v ledničce (4 °C). Takto se získá Stock 1, který má stabilitu 1 měsíc. 0,5 ml kultury se vnese do 3 ml LB média bez ATB a nechá se inkubovat přibližně 4 hodiny při 37 °C a 180 rpm. Inkubuje se do hodnoty optické hustoty (OD) 0,4–0,6. Hodnota OD se průběžně kontroluje měřením absorbance při 600 nm, začíná se měřit po 2 hodinách od začátku inkubace. Po dosažení požadované hodnoty OD se odebere 1 ml, zbytek se uloží do ledničky (4 °C). Takto je získán Stock 2, jehož stabilita je přibližně 14 dní. Pro přípravu kompetentních buněk se odebraný vzorek dále zchladí na ledu a stočí se na centrifuze 30 s při 13 000 rpm. Supernatant se slije a k peletě se přidá 1 ml ledově vychlazeného

0,1M CaCl₂. Peleta se 30 s resuspenduje protřepáváním na vortexu a 30 min se inkubuje na ledu. Po inkubaci se vzorek stočí na centrifuze 30 s při 13 000 rpm. Supernatant se slijí a k peletě se přidá 500 µl ledově vychlazeného 0,1M CaCl₂. Peleta se lehce resuspenduje a nechá se 30 minut na ledu. Takto se získá Stock 3, který má stabilitu přibližně týden.

4.3.7 Transformace

Transformací se označuje příjem molekuly DNA hostitelskými buňkami. Rekombinantní molekuly DNA se ve většině případů přenáší do bakterií, nejčastěji do *E. coli*. Tyto bakterie se množí a produkují klony obsahující rekombinantní DNA. Většina bakterií je schopna přijmout molekuly DNA z média, ve kterém rostou, ale jen ve velmi omezeném množství. Aby byla transformace úspěšná, je třeba použít tzv. kompetentní buňky, které vzniknou úpravou buněk fyzikálně nebo chemicky, případně oběma způsoby. Jejich schopnost přijmout DNA se tak zvýší (Brown, 2007). Selektce úspěšně transformovaných buněk se provádí kultivací za podmínek, ve kterých je pro růst nezbytná přítomnost plazmidu s genem pro selekční marker (Snustad a Simmons, 2009). V tomto případě byla molekula DNA do buněk transformována metodou tepelného šoku.

Transformace je na našem pracovišti prováděna dle následujícího postupu: Ze vzorku plazmidu pET-28b(+) obsahujícího inzert se odeberou 3 µl a vnesou se do 50 µl kompetentních buněk *E. coli* HB101. Tato směs se 30 min inkubuje na ledu. K transformaci zaligovaného plazmidu do buněk se použije metoda tepelného šoku (Heat shock), při které se vzorek přesně na 90 s vloží do vodní lázně s teplotou 42 °C. Ihned potom se zkumavky vloží na 5 min na led. Přidá se 400 µl LB média předehřátého na 37 °C a inkubuje se 60 minut při 37 °C a 110 rpm. Po hodině se obsah zkumavky přenesou na Petriho misky, obsahující LB médium s agarem a kanamycinem (50 µg/ml), nahřáté na 37 °C, rozetře se pomocí očkovacího nástroje, tzv. hokejky, nechá se půl hodiny schnout a poté se inkubuje přes noc při 37 °C.

Druhý den se do připravených sterilních zkumavek s víčkem, z nichž každá obsahuje 3 ml LB média a 15 µl ATB kanamycinu (50 µg/ml), opatrně přenesou kolonie narostlé na kultivačních miskách. Na špičku od pipety se nabere vždy jen jedna kolonie a celá špička se pustí do připravené zkumavky. Zavřené zkumavky se inkubují až do vzniku zřetelného zákalu, přibližně 4 až 8 hodin, při 37 °C a 180 rpm. Takto získané kolonie se přečistí MINI purifikací.

Transformace prázdného plazmidu

Při transformaci prázdného plazmidu pET-28b(+) se postupuje obdobně jako v případě transformace plazmidu s inzertem, je zde pouze několik odlišností. Ze vzorku prázdného plazmidu pET-28b(+) se odebere 1 μ l a vnese se do 100 μ l kompetentních buněk *E. coli* HB101. Transformace se opět provádí metodou tepelného šoku. Po hodinové inkubaci v LB médiu se obsah zkumavky přenesse do 20 ml LB média s kanamycinem předehřátého na 37 °C a inkubuje se přes noc při 37 °C a 180 rpm. Druhý den se noční kultura přenesse do falkonky a stočí se 15 min při 6000 \times g a při 4 °C. Plazmid se izoluje pomocí MIDI purifikace.

4.3.8 MIDI purifikace

K izolaci plazmidu a jeho přečištění byla zvolena metoda založená na principu různé konformace. Konkrétně se jedná o alkalickou denaturaci. Tato metoda je založená na skutečnosti, že lineární DNA je na rozdíl od plazmidové DNA v nadšroubovicové formě (supercoiled) denaturována v úzkém rozsahu pH (Brown, 2007). V průběhu lyze buněk dochází k částečné fragmentaci DNA. Chromozomová DNA se tak v extraktu bakteriálních buněk nachází ve formě lineárních fragmentů. Zvýšením pH na hodnotu 12 dochází k přerušení vodíkových vazeb mezi nukleotidy a k denaturaci DNA. Plazmidy běžné velikosti jsou stabilnější. Zůstávají v nadšroubovicové formě a nejsou tak díky tomu v průběhu lyze buňky rozrušeny. V přítomnosti SDS, který je součástí lyzačního pufru, dochází k agregaci oddělených řetězců chromozomové DNA, která může být následně odstraněna centrifugací (Šmarda et al., 2008).

K MIDI purifikaci plazmidu pET-28b(+) se použije komerčně dodávaný kit (Plasmid Midi Kit, QIAGEN). Při purifikaci dochází k alkalické lýze buněk, která je následována vazbou plazmidu na iontoměničový resin. Po vymytí nečistot se plazmid eluuje puftrem s vysokou koncentrací solí. Do pufru P1 se přidává RNAsa A a skladuje se v ledničce. Pufr P3 je potřeba před začátkem purifikace uložit do ledničky, aby se ochladil na 4 °C.

Noční bakteriální kultura získaná po transformaci se stočí na centrifuze při 6000 \times g po dobu 15 minut a teplotě 4 °C. Odstraní se supernatant a získaná bakteriální peleta se resuspenduje ve 4 ml P1 pufru. Poté se přidají 4 ml P2 pufru, směs se promíchá a nechá se inkubovat přesně 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci se přidají 4 ml vychlazeného P3 pufru, směs se okamžitě promíchá a nechá se inkubovat 15 minut na ledu. Po uplynutí 15 minut se vzorek centrifuguje 30 minut při 20 000 \times g a teplotě 4 °C. Supernatant obsahující plazmid se okamžitě přelije do sterilní zkumavky.

Kolonka QIAGEN-tip 100 se aktivuje promytím 4 ml pufru QBT, který se po aplikaci na kolonku nechá volně protéci. Následně se nanese získaný supernatant a také se nechá volně protéci kolonkou. Je vhodnější filtrovat supernatant na kolonku přes filtrační papír. Kolonka se dvakrát promyje 10 ml pufru QC. Požadovaná DNA se získá promytím kolonky pomocí 5 ml pufru QF. Produkt je potřeba jímat do nové sterilní zkumavky.

Eluovaná DNA se precipituje přidáním 3,5 ml isopropanolu. Směs se promíchá a centrifuguje 30 minut při $15\,000 \times g$ a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Odstraní se supernatant a peleta se promyje 2 ml 70% etanolu. Následně se centrifuguje 10 minut při $15\,000 \times g$ a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pečlivě se odstraní supernatant a peleta se suší 5–10 minut na vzduchu ve sterilním prostředí. Prosušená peleta se rozpustí ve 100 μl Tris-HCl (10mM, pH 8,5) a získaný plazmid se skladuje při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (QIAGEN, 2005).

4.3.9 MINI purifikace

Princip purifikace je stejný jako u MIDI purifikace. Po skončení inkubace se kultura s rekombinantním plazmidem za sterilních podmínek rozdělí na dvě poloviny, jedna polovina se uloží do lednice, druhá polovina kultury se převede do sterilní mikrozkuavky. Tato část kultury se stočí 10–15 minut centrifugací při $6\,400 \times g$ a odstraní se supernatant. Peleta se resuspenduje ve sterilní mikrozkuavce s 200 μl P1 pufru (kvůli přidání RNase je uchovávaný v ledničce), poté se přidá 200 μl P2 pufru, směs se promíchá a inkubuje se přesně 5 minut při laboratorní teplotě. Přidá se 200 μl vychlazeného P3 pufru, směs se lehce promíchá a inkubuje se 15 minut na ledu. Po inkubaci se kultura stočí 15 minut při 13 000 rpm v centrifuze. Pečlivě se odebere supernatant, ke kterému se přidá 600 μl isopropanolu, směs se promíchá a inkubuje se 5 minut na ledu. Touto reakcí dojde k vysrážení plazmidu. Následně se směs centrifuguje 10 minut při 13 000 rpm. Odstraní se supernatant, k peletě se pro promytí přidá 500 μl 70% etanolu a promíchá se. Centrifuguje se 10 minut při 13 000 rpm. Izoluje se peleta, která se suší 10 minut na stole, poté se za sterilních podmínek rozpustí v 20 μl Tris HCl (10mM, pH 8,5) pufru předehřátém na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a uchovává se při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (QIAGEN, 2005). Po provedení MINI purifikace se k ověření úspěšnosti ligace provede gelová elektroforéza.

4.3.10 Zpětná restrikce, restrikce dalšími restrikčními endonukleasami

Kolonie, u kterých byla po MINI purifikaci gelovou elektroforézou prokázána úspěšnost ligace, se namnoží ve 2 ml LB média. Plazmid se zaligovaným inzertem se poté izoluje MIDI purifikací pomocí Plasmid Midi Kit. Následně se provede zpětná restrikce za sterilních podmínek lišící se od restrikce tím, že inkubace probíhá přes noc a není nutná inaktivace restrikčních endonukleas. Výsledek zpětné restrikce se ověří elektroforézou.

K provedení restrikce dalšími restrikčními endonukleasami, sloužící k ověření správnosti vložené DNA sekvence, je nejprve potřeba najít vhodné enzymy, které vzorky rozštěpí v různých vhodných místech. K vybraným restrikčním endonukleasám je nutno vybrat příslušné pufrы. V tomto experimentu byly použity restrikční endonukleasy *PvuI*, *EcoRV* a *XhoI* a pufr NEB3. Restrikce se provádí za sterilních podmínek. Délka vyštěpených fragmentů se opět ověří gelovou elektroforézou.

Spektrofotometrickou metodou se určí koncentrace zaligovaného plazmidu a jeho čistota. Poté je vzorek odeslán na sekvenaci do společnosti GeneriBiotech, aby se ověřila správnost sekvence vložené do plazmidu. Společnost GeneriBiotech sekvenaci provádí pomocí automatického sekvenátoru ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer. Podstatou je kapilární elektroforéza s fluorescenčním detektorem. Při reakci jsou využity fluorescenčně značené terminační dideoxyribonukleotidy. Výsledky jsou zpracovány v programu FinchTV, který je dostupný online ke stažení (Geospiza, ©2013). Kódová sekvence je zkontrolována v programu ClustalW (GenomeNet).

4.3.11 Expresse

Jako expresní vektor je použit plazmid pET-28b(+), ve kterém se nachází lac represor. Aby exprese mohla proběhnout, je potřeba ji indukovat přidáním isopropyl- β -D-galaktopyranosidu (IPTG).

Plazmid se zaligovaným inzertem potvrzeným sekvenací je transformován metodou tepelného šoku do kompetentních *E. coli* BL21(DE3). Směs se přes noc kultivuje ve 2 ml LB média. Namnožená kultura se přenesse do 50 ml LB média s kanamycinem a kultivuje se přes noc při 180 rpm a 37 °C do hodnoty OD 0,9. Expresse je indukována přidáním 25 μ l IPTG (výsledná koncentrace 0,5mM). Směs se kultivuje 10 hodin při 150 rpm za laboratorní teploty. Po ukončení exprese se vzorek zchladí na ledu. Poté

se vzorek centrifuguje 30 min při $6400 \times g$. Peletu lze uchovávat při $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$, supernatant při $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.12 Uvolnění proteinu z buňky pomocí BugBuster

Pomocí činidla BugBuster se rozbijí buňky *E. coli* a uvolní se protein. Peleta po expresi se zváží, přidá se k ní příslušné množství činidla BugBuster, na 1 g pelety se dává 5 ml činidla BugBuster, a resuspenduje se. Vzorek se nechá 20 min inkubovat při laboratorní teplotě a 110 rpm. Vznikne buněčný lyzát, který se stočí 30 min při $13\,400 \times g$. Supernatant, ve kterém se nachází požadovaný protein, se oddělí od pelety. Supernatant se uchovává při $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, peleta při $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. K ověření výsledku se provede SDS elektroforéza (Novagen, 2000).

4.3.13 Purifikace čistého proteinu pomocí His-tag kotvy

Požadovaný protein lze oddělit od zbytku směsi metodou afinitní chromatografie. Principem této metody je vazba purifikovaného proteinu na ligand ukotvený na koloně, promytí nežádoucích proteinů a uvolnění purifikovaného proteinu. V tomto případě obsahuje purifikovaný protein histidinovou kotvu, díky které se v chromatografické koloně váže na částice kovu (Ni^{2+}). Po důkladném vymytí nenačíslených proteinů je histidinová kotva uvolněna z vazby pomocí imidazolu a purifikovaný protein se uvolní do eluční fáze. Imidazol totiž vykazuje vyšší afinitu k částicím kovu a vytěsňuje tak histidinovou kotvu (Expresie rekombinantních proteinů).

Zkumavka se vzorkem supernatantu po BugBuster se stočí na centrifuze vychlazené na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min při $11\,000 \times g$. Supernatant se vylíje. Peleta se resuspenduje v 5 ml činidla BugBuster. Inkubuje se 20 min při 110 rpm. Poté se stočí 20 min při $16\,000 \times g$ na centrifuze vychlazené na $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci se přeplní supernatant, peleta se uloží do lednice. Dále se postupuje dle návodu, který je přiložen u Ni-NTA Fast Start Kit (QIAGEN).

Celá purifikace probíhá v chladu, aby enzym neztratil aktivitu. Kolonka se promíchá několikerým otočením. Odstřihne se její spodní díl a sundá se víčko. Kolonka se vloží do nástavce, položí se na zkumavku a pufr se nechá volně překapat. Na aktivovanou kolonku se poté nanese supernatant obsahující buněčný lyzát, ze kterého se ještě předtím odebralo 10 μl na následnou SDS elektroforézu. Z překapaného supernatantu se opět odebere 10 μl . Každý produkt z kolonky se vždy jímá do nové zkumavky a odebere se z něj 10 μl na kontrolní SDS elektroforézu. Dvakrát se nanese 4 ml promývacího pufru. Odstraní se tak ostatní proteiny zachycené ze supernatantu,

purifikovaný enzym zůstane přichycený díky His-tag kotvě na iontu Ni obsaženém v kolonce. Kolonka se poté dvakrát promyje 1 ml elučního pufru s vyšším obsahem imidazolu a uvolní se požadovaný enzym. Vzorky získané elucí se uchovávají v lednici. Promývací a eluční pufr se liší pouze koncentrací imidazolu (QIAGEN, 2004). Provede se SDS elektroforéza, kterou se ověří úspěšnost izolace a čistota enzymu.

4.3.14 Převádění proteinu do uchovávacího pufru

Enzym se nachází rozpuštěný v pufru obsahujícím imidazol, který může mít výrazně negativní vliv na aktivitu enzymu, a proto je třeba tento enzym převést do 0,2M draselno-fosfátového pufru. Používá se kolonka Amicon. Do zkumavky se přenes 1 ml pufru a centrifuguje se 10 min při $4000 \times g$ a při $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Je potřeba dávat pozor, aby membrána byla neustále namočená, podle potřeby se může přidat další pufr. Na kolonku se následně nanese fosfátový pufr a protein rozpuštěný v imidazolovém pufru a centrifuguje se za stejných podmínek. Postupné přidávání fosfátového pufru a enzymu v imidazolovém pufru se provede ještě několikrát, kolonka je centrifugována vždy za stejných podmínek. Vzorek je potřeba promíchávat, aby se enzym nezamotal do membrány. Po převedení je protein ve fosfátovém pufru přenesen do sterilní zkumavky. Z ní se za sterilních podmínek odebere 40 μl vzorku pro následné změření koncentrace. Poté je do vzorku přidán 85% glycerol, tvoří 25 % výsledného vzorku. Směs se dostatečně promíchá a je uložena k dlouhodobému skladování při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.3.15 Měření koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu se stanovuje metodou dle Bradfordové. Tato metoda je založeno na interakci proteinu s barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250. Barvivo po vazbě na protein změni barvu, což způsobí posun absorpčního maxima tohoto barviva z 365 nm na 595 nm, a právě absorbance při 595 nm je sledována (Bradford, 1976).

Jako standard se používá BSA, který se naředí s 0,2M fosfátovým pufrům na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Takto se získá zásobní roztok, ze kterého se naředěním pomocí fosfátového pufru připraví kalibrační řada o koncentraci od 0,1 do 1 mg/ml (Tab. 7). Na mikrotitrační destičku se nanáší BSA o různých koncentracích, slepý vzorek (fosfátový pufr), 5x naředěný vzorek enzymu a čistý enzym. Každý vzorek se nanese třikrát, vždy v objemu 10 μl . Následně se ke všem vzorkům přidá 240 μl Bradfordova činidla a destička se nechá 10 minut inkubovat při laboratorní teplotě. Poté se pomocí spektrofotometru určí absorbance vzorků při 592 nm a z hodnot

absorbance roztoků BSA se vytvoří kalibrační křivka. Pomocí této křivky se stanoví koncentrace proteinu.

Tabulka 7: Kalibrační řada naředěného standardu BSA

Koncentrace BSA (mg/ml)	Objem BSA (μl)	Objem pufru (μl)
0,1	50	450
0,2	100	400
0,4	200	300
0,6	300	200
0,8	400	100
1,0	500	0

4.3.16 Ověření aktivity připraveného enzymu

Aktivita enzymu dihydrofolátreduktasy byla stanovena měřením absorbance v průběhu reakce enzymu se substrátem dihydrofolátem za přítomnosti kofaktoru NADPH. Na spektrofotometru byla měřena absorbance při 340 nm odpovídající spotřebě NADPH v reakci.

Příprava pufru

Nejprve je potřeba připravit pufr tvořící prostředí pro substrát a enzym. Připravuje se v celkovém objemu 50 ml a je v něm obsažen 2-merkptoetanol, NADPH, EDTA a dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) (Tab. 8).

Tabulka 8: Složení pufru pro měření aktivity

Složka	Koncentrace v pufru (mM)	množství v 50 ml
NADPH	0,1	4,17 mg
EDTA	1	14,6 mg
KH_2PO_4	55	374 mg
2-merkptoetanol	10	35 μl
H_2O		do 50 ml

Naváží se NADPH, KH_2PO_4 a EDTA, přilije se část vody a směs se nechá chvíli rozpouštět. Přidá se 2-merkaptoetanol, pomocí KOH se upraví pH na 7,0 a celkový objem roztoku se v odměrné baňce doplní vodou na 50 ml.

Příprava substrátu a enzymu

Substrátem enzymu je dihydrofolát. Připraví se zásobní roztok o koncentraci 2,222 mM. Tento roztok se naředí tak, aby výsledné koncentrace substrátu na destičce byly 1; 5; 7,25; 10; 20; 50 a 100 μM .

Enzym se připraví smísením s pufrům v poměru 3 μl enzymu o koncentraci 0,6 mg/ml do 2 ml pufru.

Měření absorbance

Absorbance se měří na mikrotitrační destičce v přístroji TECAN. Enzymová reakce probíhá za přesně stanovených podmínek, pufr má hodnotu pH 7,0 a reakce ve spektrofotometru probíhá při 30 °C. Naměřený úbytek absorbance odpovídá spotřebě kofaktoru NADPH. Při 30 °C reakce probíhá 2 minuty.

Získané údaje se vyhodnotí pomocí programu GraphPad Prism 6.0. K výpočtu se využívá Lambert-Beerův zákon, následně jsou hodnoty dopočítány na specifickou aktivitu. Hodnota specifické aktivity je spočítána pro různé koncentrace substrátu. Podle získaných údajů program GraphPad vypočítá aktivitu podle Michaelise a Mentena.

4.3.17 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je technika, která slouží k separaci makromolekul na základě jejich velikosti a náboje (Snustad a Simmons, 2009). Principem elektroforetické separace je pohyb molekul v elektrickém poli (Šmarda et al., 2008). Separačním prostředím je tenká gelová deska (Snustad a Simmons, 2009). Čím je molekula menší, tím rychleji se pohybuje gelem směrem ke kladnému pólu (Brown, 2007). Podle polohy gelu při elektroforéze se rozlišuje horizontální a vertikální elektroforéza (Šmarda et al., 2008).

4.3.17.1 Horizontální elektroforéza

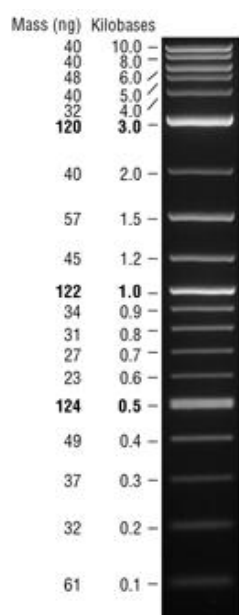
Příprava gelu a elektroforéza

Smísením 0,32 g agarosy se 40 ml TBE pufru (0,5 \times) získáme 0,8% roztok agarosy. Tato směs se rozehřeje v mikrovlnné troubě do rozpuštění agarosy. Do mírně zchlazeného roztoku se přidají 4 μl roztoku barviva GelRed a tekutý gel se nalije do

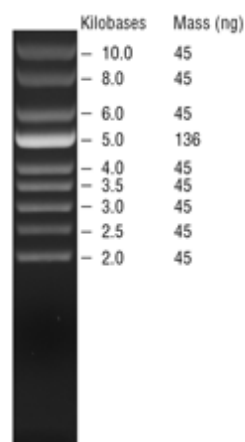
elektroforetické vany. Vloží se do ní hřebínek a gel se nechá ztuhnout. Po ztuhnutí gelu se elektroforetická vana upraví ke spuštění, vyjme se hřebínek a gel se zalije potřebným množstvím TBE pufru (0,5×). Následně se nanese vzorky a spustí se samotná elektroforéza. Na jejím začátku se po dobu 5–10 minut nechá elektroforetickou vanou procházet elektrický proud o napětí 60 V. Poté se napětí zvýší na 90 V a elektroforéza se nechá běžet do dvou třetin gelu. Jednotlivé fragmenty na gelu jsou vizualizovány pomocí přístroje UV transluminátore GelDoc XR, který ozařuje gel UV zářením o vlnové délce 254 nm.

Příprava vzorků

4 µl vzorku se smíchají s 1 µl nanášecího pufru (Gel Loading Dye). Současně se vzorky se vždy nanáší také 1 µl roztoku žebříčku – 2-log DNA Ladder (Obr. 19), v případě plazmidu Supercoiled DNA Ladder (Obr. 20). Roztok žebříčku se připraví smícháním 1 µl žebříčku se 3 µl nanášecího pufru.



Obrázek 19: 2-log DNA Ladder
(NEB, ©2014)



Obrázek 20: Supercoiled DNA Ladder
(NEB, ©2014)

4.3.17.2 Vertikální SDS-polyakrylamidová elektroforéza proteinů

Příprava gelu

Skla a hřeben se důkladně umyjí jarem a vodou, opláchnou se destilovanou vodou a lihometanolem a nechají se oschnout. Po usušení se skla k sobě spojí sponami a přichytí se do nalévacího stojánku. Namíchá se roztok na spodní gel, promíchá se a pomocí pipety se ihned nalije mezi skla přibližně do tří čtvrtin výšky skla. Gel se

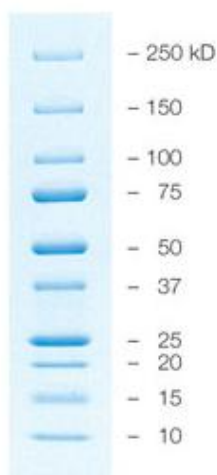
opatrně převrství nasyceným isobutanolem a nechá se polymerovat minimálně 45 min. Po ztuhnutí gelu se opatrně slijí isobutanol, gel se propláchne destilovanou vodou a vysuší se. Poté se namíchá roztok na zaostřovací gel, promíchá se a ihned se pipetou nalije mezi skla až k hornímu okraji. Do gelu se zasune hřebínek a nechá se polymerovat minimálně 1,5 hodiny.

Příprava vzorků

Vzorky proteinu se smíchají se vzorkovým pufrem obsahujícím 2-merkaptoetanol, množství vzorku závisí na koncentraci proteinu. K 10 μ l supernatantu získanému pomocí činidla BugBuster se přidá 2,5 μ l vzorkového pufru, ke 2 μ l pelety se přidá 1 μ l vzorkového pufru. Poté se vzorky povaří 3 minuty v termobloku předehřátém na 95 °C.

Elektroforéza

Z gelu se opatrně vyndá hřebínek a jamky se propláchnou destilovanou vodou. Do očištěného stojánku s těsněním natřeným malým množstvím škrobového mazu se zasunou skla s gelem a přitáhnou se sponami. Silná skla musí být na vnější straně. Stojánek se vloží do elektroforetické cely a celá elektrodová cela se umístí do nádoby s ledem a vodou kvůli následnému chlazení. Do horního elektrodového prostoru se nalije přibližně do tří čtvrtin naředěný elektrodový pufr a zkontroluje se zda nepodtéká. Do jamek se nanese připravené vzorky a do jedné jamky 5 μ l molekulárního standardu – Precision Plus Protein Standard All Blue (Obr. 21), krajní jamky se nepoužívají. Všechny jamky se doplní elektrodovým pufrem a doplní se také celý horní elektrodový prostor, tak aby bylo spodní sklo ponořené v pufru. Do spodní vaničky elektrodové cely se nalije zbytek naředěného elektrodového pufru, cela se přiklopí víčkem a připojí se ke zdroji. Nejdříve se pro separaci v zaostřovacím gelu na 10–15 minut nastaví konstantní napětí 100 V, pro separační gel se pak změní napětí na 200 V na dobu přibližně 30–45 minut. Po doběhnutí čela na konec gelu se z elektroforetické cely vyndají skla s gelem. Rozevřou se pomocí klínku, kterým se také odřízne gel od spacerů a zaostřovacího gelu.



Obrázek 21: Precision Plus Protein Standard All Blue (Bio-Rad, ©2014)

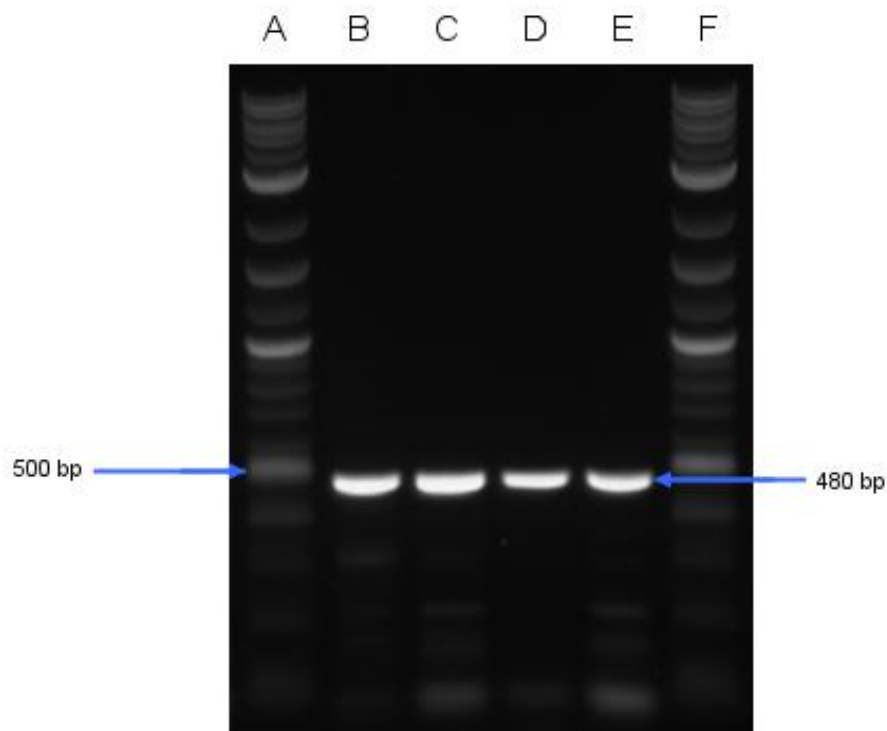
Barvení gelů Coomassie Blue (CBBG)

Do umělohmotné krabičky se nalije 0,25% CBBG v 10% kyselině octové. Do ní se vloží oříznutý gel a nechá se barvit 20 min při 50 °C nebo 15 min při 60 °C. Pro odbarvení gelu se použije 10% kyselina octová, kterou lze recyklovat na aktivním uhlí. Poprvé se gel jen rychle opláchne od největšího množství CBBG barvy a ihned se slije, poté se vždy přibližně po půlhodině několikrát (2–3x) vymění kyselina octová za čistou a gel se nechá odbarvovat na kývačce. Nakonec se gel nechá v kyselině octové přes noc, případně se podle potřeby ještě druhý den odbarvuje do čistého pozadí. Gel se vyhodnotí pomocí UV transluminátoru GelDoc XR. Gel lze uchovávat v 1% kyselině octové.

5. Výsledky

5.1 PCR

PCR proběhla v termocykléru dle navoleného programu Finnzyme, jednotlivé vzorky měly rozlišnou teplotou nasednutí primerů. DNA, která sloužila jako templát pro PCR byla vyizolována z kmene *M. tuberculosis* H37Rv ve Státním Zdravotním Ústavě v Ostravě. Navržené primery obsahující restriční místa byly komerčně připraveny. Horizontální gelovou elektroforézou bylo ověřeno zda došlo k amplifikaci požadovaného úseku DNA (Obr. 22).



Obrázek 22: Zobrazení výsledků PCR po elektroforéze. V jamkách A a F se nachází žebříček 2-log DNA ladder, jamkách B až E se nachází PCR produkty s různou teplotou nasednutí primerů (65 °C, 62 °C, 59,3 °C, 53,2 °C).

PCR proběhla úspěšně na první pokus. Pro správný průběh reakce nebylo potřeba přidávat další hořčičnaté ionty nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Vznik požadovaného úseku DNA byl potvrzen ve všech vzorcích. Pruhy se nacházely přibližně v pozici 480 bp, což odpovídá délce genu pro DHFR. Nebyly viditelné rozdíly při odlišných teplotách nasednutí primerů.

Dva PCR produkty vybrané pro další zacházení byly následně přečištěny, úspěšnost přečištění byla zkontrolována gelovou elektroforézou. Pruhy se nacházely v požadované vzdálenosti a vzorky měly dostatečnou čistotu.

Průběh PCR a složení reakční směsi byly zvoleny podle návodu příslušejícího k použité Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes, 2010).

5.2 Restrikce a změření koncentrace DNA

Oba produkty PCR a plazmid pET-28b(+) bylo třeba nejprve rozštěpit restrikčními endonukleasami, aby mohlo dojít k jejich ligaci. Byly vybrány enzymy *NdeI* a *EcoRI*, jejich restrikční místa v dvouřetězcové DNA jsou uvedena v tabulce 9.

Tabulka 9: Rozpoznávací sekvence restrikčních endonukleas

Restrikční endonukleasa	Restrikční místo
<i>NdeI</i>	5'...CA TATG...3'
	3'...GTAT AC...5'
<i>EcoRI</i>	5'...G AATTC...3'
	3'...CTTAA G...5'

Po restrikci byly PCR produkty i plazmid přečištěny a byla stanovena jejich koncentrace metodou UV absorpční spektrofotometrie. Absorbance byla změřena při 260 nm, z poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm lze také určit čistotu vzorku. V čistém vzorku je tento poměr 1,8, nižší hodnota ukazuje kontaminaci vzorku. Každý vzorek byl změřen dvakrát. Získané hodnoty pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulkách 10–12.

Tabulka 10: Koncentrace a čistota PCR vzorku č. 1 naměřená absorpční spektrofotometrií

Číslo měření	Koncentrace (ng/μl)	Čistota 260/280	Čistota 260/230
1.	10,1	1,74	0,95
2.	8,0	1,69	0,92

Tabulka 11: Koncentrace a čistota PCR vzorku č. 2 naměřená absorpční spektrofotometrií

Číslo měření	Koncentrace (ng/μl)	Čistota 260/280	Čistota 260/230
1.	13,9	1,45	0,72
2.	12,5	1,53	0,69

Tabulka 12: Koncentrace a čistota plazmidu naměřená absorpční spektrofotometrií

Číslo měření	Koncentrace (ng/μl)	Čistota 260/280	Čistota 260/230
1.	116,5	1,82	1,76
2.	105,6	1,88	2,11

5.3 Ligace

Z údajů získaných UV absorpční spektrofotometrií byla vypočítána průměrná hodnota koncentrace plazmidu stanovená ze dvou měření. Tato hodnota bylo 111,05 ng/μl. Mohlo tak být stanoveno množství plazmidu potřebného pro ligaci a následně i potřebné množství insertu získaného z PCR přidávaného do reakční směsi pro ligaci. Konečné složení reakčních směsí pro PCR produkty je uvedeno v tabulce 13 a 14.

Ligace byla provedena se 2 vzorky, výpočet pro stanovení jejich množství v reakční směsi je uveden dále:

$$m_{\text{insertu}} (\text{ng}) = 3 * \frac{M_{\text{insertu}} (\text{bp})}{M_{\text{plazmidu}} (\text{bp})} * m_{\text{plazmidu}} (\text{ng})$$

$$m_{\text{insertu}} = 3 * \frac{480}{5368} * 83,29$$

$$m_{\text{insertu}} = 22,34 \text{ ng}$$

1 μl plazmidu obsahuje 111,05 ng. 0,75 μl obsahuje 83,29 ng, což odpovídá požadovaným 50–100 ng plazmidu.

PCR produkt č. 1 obsahuje v 1 μl 8,0 ng. Požadovaných 22,34 ng je obsaženo přibližně ve 3 μl.

PCR produkt č. 2 obsahuje v 1 μl 12,5 ng. Požadovaných 22,34 je obsaženo přibližně ve 2 μl.

Tabulka 13: Složení reakční směsi pro ligaci pro PCR produkt č. 1

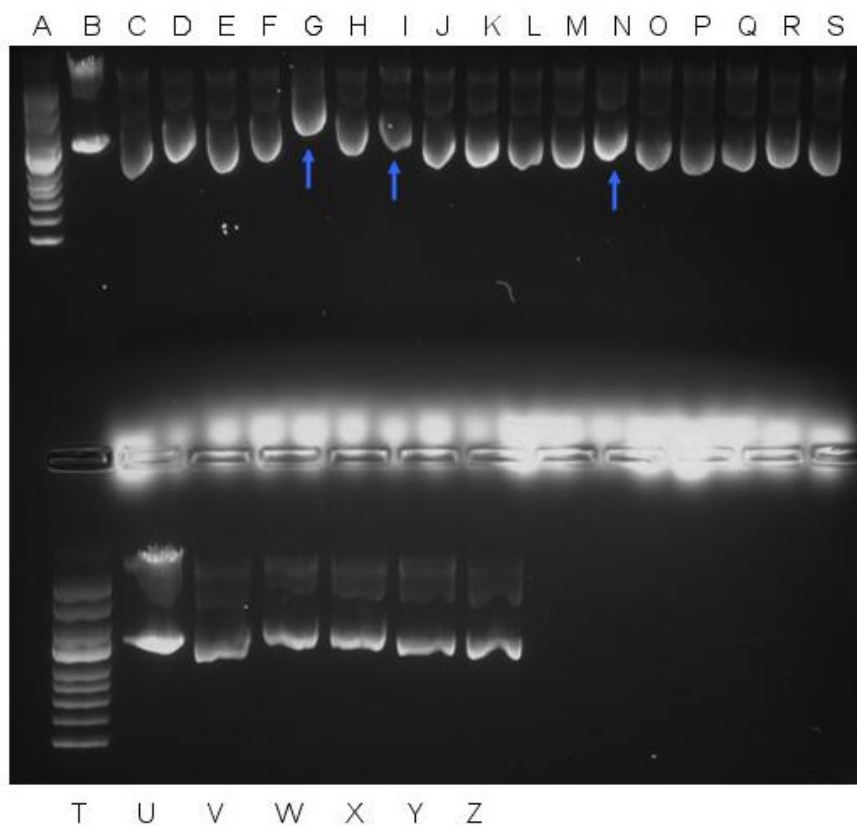
Složka	Množství (μ l)
Pufr	2
Ligasa	1
Plazmid	0,75
PCR 1	3
H ₂ O	3,25

Tabulka 14: Složení reakční směsi pro ligaci pro PCR produkt č. 2

Složka	Množství (μ l)
Pufr	2
Ligasa	1
Plazmid	0,75
PCR 2	2
H ₂ O	4,25

5.4 Transformace, MINI purifikace

Zaligovaný plazmid se transformoval s kompetentními buňkami *E. coli* HB101 metodou tepelného šoku a buňky se nechaly inkubovat na Petriho miskách s kanamycinem (50 μ g/ml). Z Petriho misek bylo odebráno do samostatných zkumavek 22 narostlých kolonií. Tyto kolonie byly kultivovány v LB médiu s kanamycinem (50 μ g/ml) přes noc a následně upraveny MINI purifikací. Úspěšnost transformace byla ověřena gelovou elektroforézou. Na elektroforetický gel byl přidán jako kontrolní vzorek i prázdný plazmid. Výsledky této elektroforézy jsou uvedeny na obrázku 23.



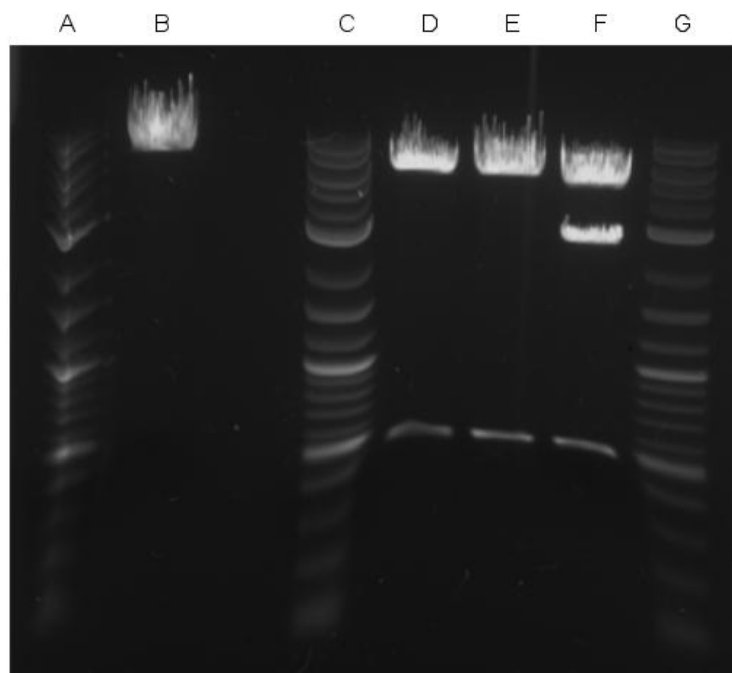
Obrázek 23: MINI purifikace transformovaných buněk. Jamky A a D obsahují žebříček Supercoiled DNA ladder, jamky B a U prázdný plazmid. Zbytek jamek obsahuje kolonie narostlé na Petriho miskách. Vzorky označené šipkou ukazují pravděpodobně úspěšně zaligované plazmidy.

Elektroforéza provedená po MINI purifikaci ukázala 3 vzorky, které by mohly obsahovat plazmid se zaligovaným inzertem. Jeden ze vzorků byl výrazně blíže startu gelu v porovnání s prázdným plazmidem, zbylé 2 vzorky byly vybrány i díky svému umístění vůči ostatním vzorkům.

5.5 Zpětná restrikce, restrikce dalšími restrikčními endonukleasami, koncentrace DNA po ligaci

Plazmidy s úspěšně zaligovaným inzertem byly pomnoženy v LB médiu a přečištěny MIDI purifikací. Zpětnou restrikcí s restrikčními endonukleasami *NdeI* a *EcoRI* bylo ověřeno, že do plazmidu byl zaligován skutečně náš vzorek. Délky restrikčních fragmentů odpovídaly restrikčním místům použitých endonukleas. U vzorků G a N z MINI purifikace bylo zpětnou restrikcí ověřeno, že do plazmidu byla vnesena žádaná sekvence enzymu, získané fragmenty svou délkou odpovídaly délce plazmidu a délce zkoumaného enzymu. U vzorku I se ukázalo, že sekvence byla do plazmidu ligována

pravděpodobně dvakrát, proto se s tímto vzorkem již dále nepracovalo. Výsledky z elektroforézy po zpětné restrikci jsou ukázány na obrázku 24.



Obrázek 24: Elektroforéza po zpětné restrikci. Jamky A, C a G obsahují žebříček 2-log DNA Ladder, jamka B prázdný plazmid. Jamky D až F obsahují fragmenty z prázdného plazmidu a zaligovaného inzertu. Ve vzorku F byl insert pravděpodobně zaligován dvakrát.

Pro další ověření správnosti zaligované sekvence se provedla restrikce s jinými restrikčními endonukleasami. Pomocí aplikace Nucleic Acid Sequence massager dostupné online (Sequence Massager) byla upravena nukleotidová sekvence genu pro DHFR a následně byly pomocí online aplikace NEBcutter (NEBcutter V2.0) vybrány vhodné restrikční endonukleasy – *PvuI*, *EcoRV* a *XhoI*. Byly provedeny dvě restrikce se dvěma rozdílnými sadami restrikčních endonukleas (Tab. 15).

Tabulka 15: Sady restrikčních endonukleas použité při zpětné restrikci

Sada restrikčních endonukleas	Restrikční endonukleasy	Pufr
1	<i>PvuI</i> , <i>EcoRV</i>	NEB3
2	<i>PvuI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>XhoI</i>	NEB3

Ze známé pozice restrikčních míst ve struktuře plazmidu se zaligovaným inzertem se výpočtem určila předpokládaná délka restrikčních fragmentů. Pro kontrolu zda ve vzorcích není přítomen prázdný plazmid byla vypočítána délka předpokládaných fragmentů i u prázdného plazmidu pET-28b(+). Vypočítaná délka fragmentů

vzniklých štěpením první sadou endonukleas je ukázána v tabulce 16, délka fragmentů vypočítaná při použití druhé sady endonukleas je uvedena v tabulce 17.

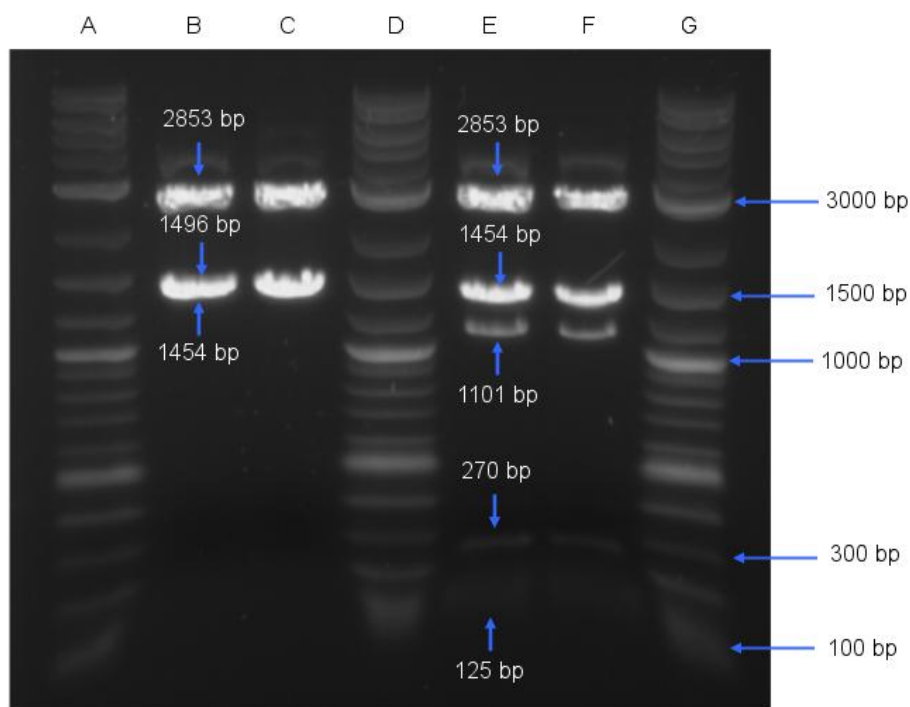
Tabulka 16: Restrikční fragmenty naštěpené první sadou restrikčních endonukleas

Štěpený plazmid	Štěpený úsek	Délka fragmentu (bp)	Celková délka (bp)
Plazmid s inzertem	<i>PvuI</i> : <i>PvuI</i> _{in}	1496	5803
	<i>PvuI</i> _{in} : <i>EcoRV</i>	1454	
	<i>EcoRV</i> : <i>PvuI</i>	2853	
Prázdný plazmid	<i>PvuI</i> : <i>EcoRV</i>	2515	5368
	<i>EcoRV</i> : <i>PvuI</i>	2853	

Tabulka 17: Restrikční fragmenty naštěpené druhou sadou restrikčních endonukleas

Štěpený plazmid	Štěpený úsek	Délka fragmentu (bp)	Celková délka (bp)
Plazmid s inzertem	<i>PvuI</i> : <i>XhoI</i>	1101	5803
	<i>XhoI</i> : <i>XhoI</i> _{in}	270	
	<i>XhoI</i> _{in} : <i>PvuI</i> _{in}	125	
	<i>PvuI</i> _{in} : <i>EcoRV</i>	1454	
	<i>EcoRV</i> : <i>PvuI</i>	2853	
Prázdný plazmid	<i>PvuI</i> : <i>XhoI</i>	1101	5368
	<i>XhoI</i> : <i>EcoRV</i>	1414	
	<i>EcoRV</i> : <i>PvuI</i>	2853	

Délka fragmentů, které skutečně vznikly restrikcí, se ověří elektroforézou (Obr. 25). U fragmentů vzniklých štěpením první sadou restrikčních endonukleas elektroforéza prokázala, že ve vzorcích není přítomen prázdný plazmid. Fragmenty štěpené druhou sadou restrikčních endonukleas také odpovídají vypočítané délce fragmentů, avšak nelze s jistotou potvrdit nepřítomnost prázdného plazmidu, protože fragmenty vzniklé štěpením prázdného plazmidu a plazmidu s inzertem mají podobnou délku.



Obrázek 25: Elektroforéza po restrikci. Jamky: A, D a G – žebříček 2-log DNA ladder, B a C - vzorky štěpené první sadou restrikčních endonukleas (*PvuI*, *EcoRV*), E a F – vzorky štěpené druhou sadou restrikčních endonukleas (*PvuI*, *EcoRV*, *XhoI*)

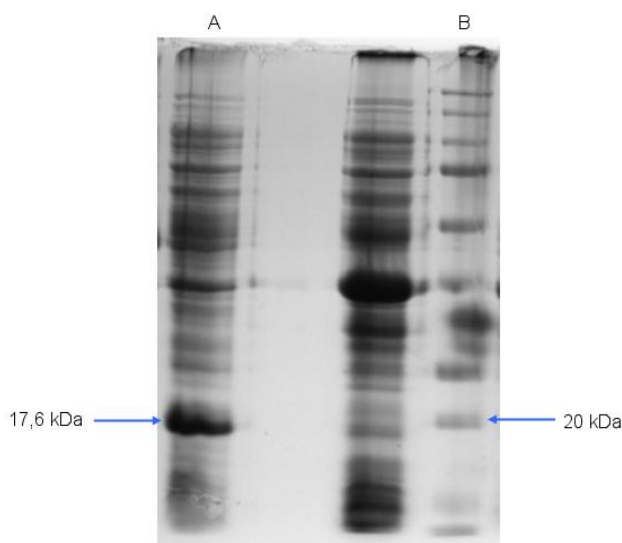
Po potvrzení správnosti ligace byla u těchto vzorků stanovena koncentrace pomocí absorpční spektrofotometrie, každý vzorek byl změřen dvakrát (Tab. 18). Průměrná hodnota koncentrace vzorku č. 1 byla 185,55 ng/μl, vzorku č. 2 pak 128,65 ng/μl. Vzorek č. 1 s vyšší koncentrací DNA měl i dostatečnou čistotu a mohl být odeslán na sekvenaci. Výsledek sekvenace byl zpracován v programu FinchTV (Geospiza, ©2013) a sekvence zkontrolována v programu ClustalW (GenomeNet). Bylo potvrzena správnost vložené sekvence a v sekвени se neobjevily žádné mutace.

Tabulka 18: Koncentrace úspěšně zaligovaných plazmidů po MIDI purifikaci

Vzorek	Číslo měření	Koncentrace (ng/μl)	Čistota 260/280	Čistota 260/230
1	1.	184,9	1,86	2,06
	2.	186,2	1,85	2,05
2	1.	132,3	1,88	1,98
	2.	125,0	1,86	1,96

5.6 Expres proteinu

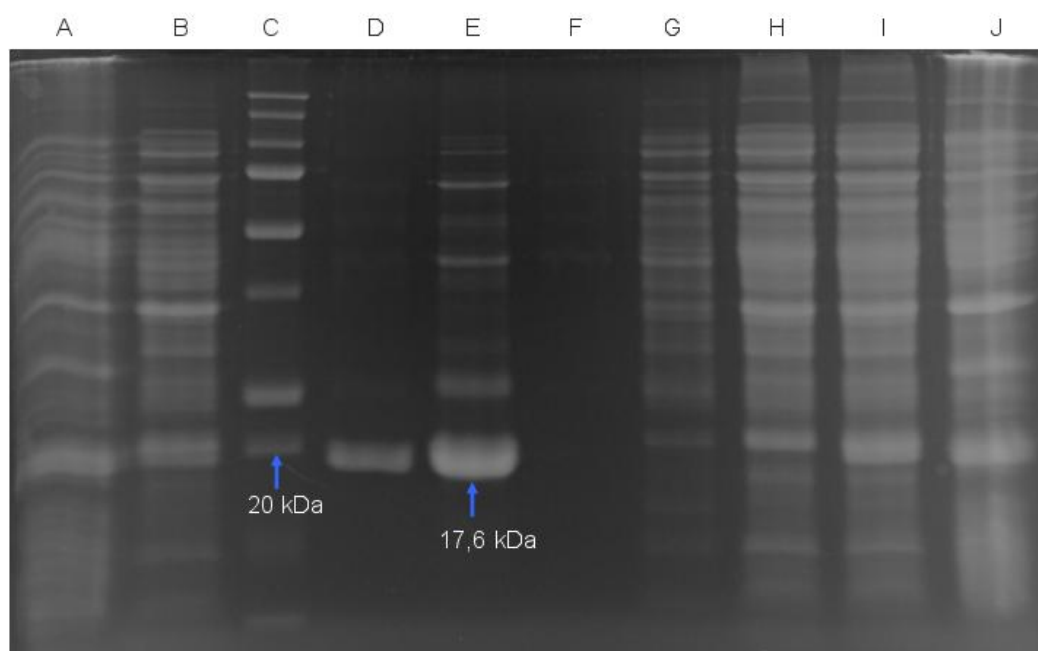
Po potvrzení správné sekvence dihydrofolátreduktasy byl plazmid s inzertem transformován do kompetentních buněk BL21(DE3). Po inkubaci kultury v LB médiu byla provedena exprese rekombinantního plazmidu. Byla vyzkoušena exprese a následné rozbití buněk pomocí činidla BugBuster za různých podmínek. U prvního vzorku byla kultura inkubována do hodnoty OD 0,5. Poté byla provedena indukce pomocí 25 μ l IPTG (výsledná koncentrace 0,5mM) a inkubace probíhala 14 dní za mírného protřepávání (110 rpm) na ledové lázni. Takto namnožená kultura se zchladila na ledu, stočila se na centrifuze 10 min při 10 000 \times g , odstranil se supernatant a přidalo se činidlo BugBuster. Směs se tato směs nechala inkubovat 20 min při 37 $^{\circ}$ C za mírného protřepávání. Následně se stočila 30 min při 13 400 \times g a oddělil se supernatant a peleta (Obr. 27, jamky I a J). Druhý vzorek byl inkubován do hodnoty OD 0,9. Po indukci přidáním 25 μ l IPTG (výsledná koncentrace 0,5mM) inkubace probíhala 10 hodin při 150 rpm a laboratorní teplotě. Kultura se zchladila na ledu, stočila se 30 min při 6 400 \times g , po odstranění supernatantu se přidalo činidlo BugBuster a směs se nechala inkubovat 20 min při laboratorní teplotě a 110 rpm. Poté se stočila 30 min při 13 400 \times g . Jako úspěšnější se nakonec ukázala exprese při které byl vzorek po indukci IPTG inkubován přes noc za laboratorní teploty. Rekombinantní protein získaný expresí a nacházející se v supernatantu po použití činidla BugBuster je uveden na obrázku 26 a 27 (jamka B). Pruh ze vzorku získaného elektroforézou se nachází v pozici odpovídající velikosti dihydrofolátreduktasy. Na gelu je vidět, že izolovaný protein obsahuje nečistoty, které je potřeba odstranit. Tyto nečistoty pravděpodobně vznikly expresí proteinů, které si buňka *E. coli* syntetizuje pro svoji vlastní potřebu.



Obrázek 26: Elektroforéza po expresi (inkubace 10 hod, na ledové lázni). Jamka A obsahuje rekombinantní protein. Jamka B obsahuje žebříček Precision Plus Protein Standard All Blue.

5.7 Izolace čistého enzymu

Rekombinantní protein izolovaný působením činidla BugBuster byl purifikován metodou afinitní chromatografie pomocí komerčně dostupného kitu (Ni-NTA Fast Start Kit, QIAGEN). Purifikovaný enzym a vzorky odebírané v průběhu této purifikace byly separovány pomocí SDS elektroforézy (Obr. 27). Na gel byly naneseny i vzorky získané expresí rekombinantního plazmidu a izolované pomocí činidla BugBuster. Je patrné, že enzym se po reakci s činidlem BugBuster nachází v peletě i supernatantu.



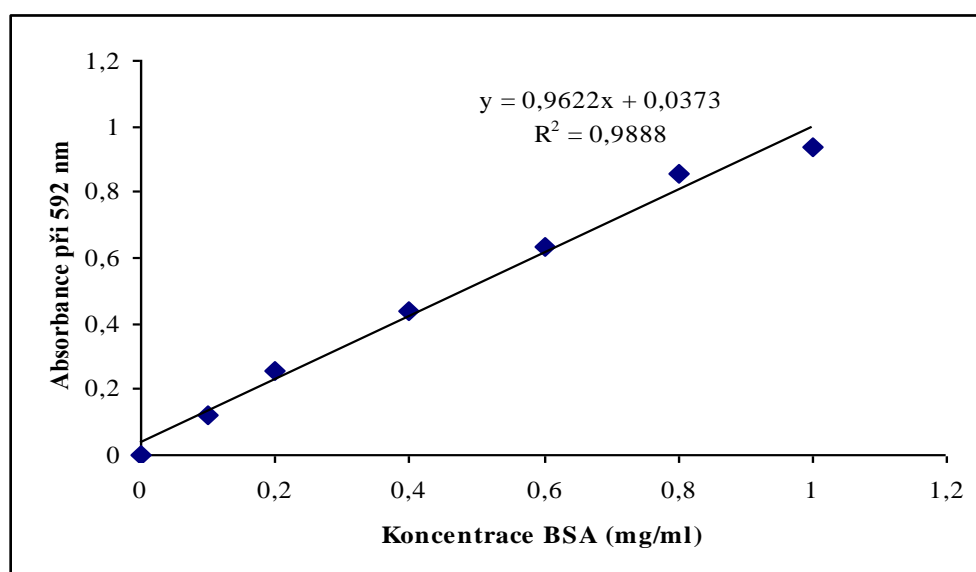
Obrázek 27: SDS elektroforéza. Jamky: A a B – peleta a supernatant po BugBuster (inkubace přes noc při 25 °C), C – žebříček Precision Plus Protein Standard All Blue, D a E – eluovaný protein, F a H – vzorky odebrané po přečištění promývacím pufrém, H – vzorek supetnatantu z BugBuster přečištěný přes kolonku (protein zachycený na membráně), I a J – supernatant a peleta po BugBuster (inkubace 14 dní na ledové lázni)

Přečištění enzymu metodou afinitní chromatografie lze provést i pomocí purifikátoru Äkta. DHFR však snadno precipituje a proto bylo raději zvoleno přečištění za použití Ni-NTA Fast Start Kit, aby se předešlo zneprůchodnění některé součásti purifikátoru.

Purifikovaný protein byl převeden do draselno-fosfátového pufru. Následně bylo ke vzorku přidáno takové množství 85% glycerolu, aby ve výsledném vzorku tvořil 25 %, a enzym byl k dlouhodobému skladování uložen při -20 °C.

5.8 Koncentrace proteinu

Pro další laboratorní testování enzymu bylo potřeba stanovit koncentraci připraveného rekombinantního proteinu. K tomu byla použita metoda dle Bradfordové. Získaná kalibrační křivka s různými koncentracemi BSA je uvedena na obrázku 28. Pomocí této kalibrační křivky byla z naměřených hodnot absorbance u vzorku proteinu určena koncentrace enzymu. Koncentrace proteinu používaného v dalších pokusech byla 0,8004 mg/ml. Po smísení vzorku s 85% glycerolem pro dlouhodobé uložení byl získán protein o koncentraci 0,6002 mg/ml.



Obrázek 28: Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinu

5.9 Ověření aktivity enzymu

Aktivita enzymu byla stanovena reakcí dihydrofolátreduktasy s dihydrofolátem za přítomnosti kofaktoru NADPH. Byl sledován úbytek absorbance při 340 nm odpovídající spotřebě NADPH. Ze získaných údajů byl vyhotoven graf závislosti specifické aktivity na koncentraci substrátu (Obr. 29).



Obrázek 29: Závislost specifické aktivity enzymu na koncentraci dihydrofolátreduktasy

Pomocí programu GraphPad Prism 6,0 byla určena hodnota Michaelisova konstanta K_m a maximální rychlosti V_{\max} .

$$K_m = 4,652 \mu\text{M}$$

$$V_{\max} = 18,23 \pm 1,98 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$$

6. Diskuze

Tuberkulóza je infekční nemoc, která provází lidstvo již od jeho počátku. V dnešní době se však stává významnou hrozbou, protože se objevují kmeny *M. tuberculosis* rezistentní ke stále širšímu spektru užívaných antituberkulotik. Je proto nezbytné hledat nová léčiva, jejichž cílem by se mohly stát enzymy přítomné v mykobakteriích.

Dihydrofolátreduktasa je enzym katalyzující vznik kofaktoru tetrahydrofolátu, přenašeče jednonuhlíkatých zbytků. Tetrahydrofolát je nezbytný pro syntézu proteinů, DNA a RNA. Dihydrofolátreduktasa se nachází u lidí i u *M. tuberculosis*, avšak u jednotlivých forem byly objeveny rozdíly v sekvenci DNA a ve struktuře. Díky strukturním rozdílům a klíčové roli tohoto enzymu ve správném vývoji buňky se dihydrofolátreduktasa jeví jako vhodný cíl pro nová antituberkulotika. Nejprve je však potřeba tento enzym důkladně prozkoumat. K tomu slouží metody molekulární genetiky, díky kterým se po stanovení vhodných podmínek připraví rekombinantní forma enzymu určená k dalšímu studiu.

Gen kódující dihydrofolátreduktasu byl amplifikován pomocí PCR. Jako templát byla použita genomová DNA získaná z kmene *M. tuberculosis* H37Rv ve spolupráci se Státním zdravotním ústavem v Ostravě. Kmen H37Rv je na tomto pracovišti standardně používán pro testování všech potenciálních antituberkulotik připravených na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové. Genom tohoto kmene je také velice dobře prozkoumán a popsán v literatuře (Cole et al., 1998). Proto byl tento kmen *M. tuberculosis* zvolen jako nejvhodnější. Na základě genomové sekvence publikované v GenBank (NC_000962) byly navrženy následující primery: 5'-GCA CAC CAT ATG GTG GGG CTG ATC-3' a 5'-CCG AGA ATT CTC ATG AGC GGT GGT-3'. Tyto primery obsahovaly rozpoznávací místa pro restriční endonukleasy *NdeI* a *EcoRI*. Pro správný průběh PCR nebylo potřeba přidávat další hořčičnaté ionty ani DMSO.

Přečištěný PCR produkt byl společně s expresním vektorem pET-28b(+) ošetřen uvedenými restričními endonukleasami. Po dalším přečištění byly PCR produkt a plazmid spojeny ligací pomocí T4 DNA ligasy. Tato ligace probíhala přes noc při 16 °C. Sekvenací bylo potvrzeno, že plazmid obsahuje správnou zaklonovanou sekvenci a nevyskytují se v ní mutace. Plazmid se zaligovaným inzertem byl pomnožen v buňkách *E. coli* HB101 a následně izolován, přečištěn a transformací přenesen do buněk BL21(DE3), které umožňují expresi genu a tvorbu proteinu.

Buňky *E. coli* BL21(DE3) byly kultivovány v LB médiu při 37 °C do hodnoty optické hustoty (OD₆₀₀) 0,9. Poté byla provedena indukce exprese přidáním IPTG (0,5mM)

a buňky byly kultivovány dalších 10 hodin za laboratorní teploty. Byla vyzkoušena exprese i za jiných podmínek, kdy exprese probíhala 14 dní a inkubace probíhala na ledové lázni. K expresi proteinu došlo v obou případech, avšak při prodloužené expresi byla připravená kultura značně viskózní, což stěžovalo další manipulaci. Proto se s touto kulturou dále nepracovalo. Jako vhodnější a pro naše účely dostačující se ukázala exprese provedená při laboratorní teplotě po dobu 10 hodin.

V literatuře je často popisována exprese při 37 °C s dobou inkubace 3 hodiny. Za těchto podmínek však často dochází k tvorbě inkluzních tělísek, která jsou méně vhodná pro následnou izolaci čistého proteinu. Toto je prokázáno v publikaci autorů White et al. (2004), kteří popisují tvorbu inkluzních tělísek při použití 1mM IPTG, teplotě 37 °C a expresi po dobu 3 hodin. V této práci bylo zvoleno stejné kultivační médium (LB médium), jako expresní buňky byl však použit kmen *E. coli* BL21STAR a vektor pET-11a. Buňky *E. coli* BL21STAR jsou odvozeny od *E. coli* BL21(DE3), obsahují však navíc mutaci v genu pro RNAsu E degradující mRNA. V konečném důsledku tato mutace vede ke vyššímu výtěžku proteinů než v případě použití buněk *E. coli* BL21(DE3). Z důvodu časté tvorby inkluzních tělísek u mykobakteriálních enzymů však lze předpokládat, že tyto proteiny mohou být pro buňky *E. coli* toxické a proto vyšší výtěžnost nemusí být vždy výhodou. Prodloužená doba exprese proteinu byla ověřena v práci autorů Kumar et al. (2012). Ti úspěšně exprimovali dihydrofolátreduktasu v buňkách *E. coli* BL21(DE3) (vektor pET-28a(+)) při 0,2mM koncentraci IPTG, teplotě 18 °C a době 20 hodin.

Jelikož dihydrofolátreduktasa snadno precipituje (Dias, 2012), byl pro purifikace namísto přístroje Äkta purifier raději zvolen Ni-NTA Fast Start Kit. Především se tak případným škodám na přístroji Äkta, u kterého by mohlo dojít k zanesení jeho součástí (např. hadičky apod.). Pomocí kitu Ni-NTA Fast Start Kit byla z 250 ml kultury získána čistá dihydrofolátreduktasa o koncentraci 0,8 mg/ml. Jedná se o nižší výtěžek v porovnání s prací autorů Kumar et al. (2012), kteří uvádí přípravu čistého proteinu o koncentraci 2–10 mg/ml. Není zde však uvedeno s jak velkou kulturou *E. coli* pracovali.

Funkčnost rekombinantně připravené dihydrofolátreduktasy byla ověřena spektrofotometrickou metodou, při které se měří úbytek NADPH. Podmínky měření a složení reakčního pufru byly zvoleny dle práce White et al. (2004). Pomocí programu GraphPad Prism 6,0 byla vypočítána Michaelisova konstanta K_m (4,652 μM) a maximální rychlost V_{\max} ($18,23 \pm 1,98 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$). V publikaci (White et al. 2004) naměřené hodnoty ($K_m = 4,5 \mu\text{M}$ a $V_{\max} = 16,0 \pm 0,6 \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) přibližně odpovídají námi naměřeným hodnotám.

7. Závěr

Cíl stanovený na začátku práce se podařilo splnit, byl připraven mykobakteriální enzym dihydrofolátreduktasa v rekombinantní podobě a byla ověřena jeho aktivita.

Metodou PCR byla amplifikovaná příslušná sekvence DNA kódující enzym DHFR. PCR produkty byly na svých koncích upraveny restričními endonukleasami *NdeI* a *EcoRI* a ligovány do vektoru pET-28b(+) ošetřeného stejnými restričními endonukleasami. Takto připravený rekombinantní plazmid byl metodou tepelného šoku transformován do kompetentních buněk *E. coli* HB101. Úspěšnost ligace byla ověřena zpětnou restrikcí plazmidu různými kombinacemi restričních endonukleas. Poté byl vzorek plazmidu se zaligovaným inzertem odeslán na sekvenaci, kde byla potvrzena správnost vložené sekvence. Plazmid se zaligovanou sekvencí byl transformován do kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3). Po stanovení vhodných podmínek proběhla v buňkách BL21(DE3) exprese proteinu, která byla indukována pomocí IPTG. Získaný protein byl izolován a purifikován metodou afinitní chromatografie. Metodou dle Bradfordové byla stanovena jeho koncentrace. Nakonec byla ověřena aktivita proteinu metodou založenou na měření úbytku NADPH při reakci enzymu s dihydrofolátem. Pro další použití je dihydrofolátreduktasa uchovávána v draselno-fosfátovém pufru s glycerolem.

Všechny kroky vedoucí k syntéze rekombinantního enzymu probíhaly bez větších komplikací. Podařilo se nalézt vhodné podmínky, které vedly k přípravě aktivního enzymu.

Mykobakteriální dihydrofolátreduktasa se jeví jako vhodný cíl pro nová antituberkulotika. Proto bude tento rekombinantně připravený enzym sloužit k dalšímu studiu, zejména k hledání látek inhibujících jeho aktivitu.

8. Seznam zkratek

AA	akrylamid
ADT	6-azido-6-deoxy- α,α' -trehalosa
APS	persíran amonný
ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BFB	bromfenolová modř
bis-AA	bisakrylamid
BSA	bovinní sérový albumin
bp	pár bází (base pair)
CBBG	Coomassie Brilliant Blue G250
DHFR	dihydrofolátreduktasa
DMSO	dimetylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxynukleosidtrifosfáty
dUMP	deoxyuridinmonofosfát
dTMP	deoxythymidinmonofosfát
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EMB	etambutol
f.e.	pro elektroforézu (for electrophoresis)
GIT	gastrointestinální trakt
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti (Human Immunodeficiency Virus)
INH	isoniazid
InhA	enoyl-ACP reduktasa
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

kb	kilobáze
K_m	Michaelisova konstanta
LB médium	Luria-Bertani médium
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza (multidrug-resistant tuberculosis)
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
MTX	metotrexát
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NEB	New England Biolabs
OD	optická hustota (optical density)
ORL	otorhinolaryngologie
p.a.	pro analýzu (pro analysis)
PAB	kyseliny <i>p</i> -aminobenzoová
PAS	kyselina <i>p</i> -aminosalicylová
PCR	polymerásová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PZA	pyrazinamid
RMP	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
rRNA	ribozomální RNA
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza
STM	streptomycin
TBC	tuberkulóza
TBE	tris-borát-EDTA
TDM	trehalosa 6,6'-dimykolát (cord factor)

TDR-TB	totálně rezistentní tuberkulóza (totally drug-resistant tuberculosis)
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyletylendiamin
THF	tetrahydrofolát
TMM	trehalosa 6,6'-monomykolát
TMP	trimetoprim
Tris	tris(hydroxymetyl)aminometan
UV	ultrafialový
V_{\max}	maximální rychlost
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
XDR-TB	extenzivně rezistentní tuberkulóza (extensively drug-resistant tuberculosis)

9. Literatura

Barry, C.E. 3rd a Blanchard, J.S. (2010). The chemical biology of new drugs in the development for tuberculosis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 14 (4), 456-466.

Baulard, A.R. et al. (2000). Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (36), 28326-28331.

Bednář, M. et al. (1996). *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil.

Bio-Rad (©2014). Precision Plus Protein™ All Blue Standards #161-0373 [online]. [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/en-us/sku/161-0373-precision-plus-protein-all-blue-standards>.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.

Brigden, G. et al. (2014). Principles for designing future regimens for multidrug-resistant tuberculosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 92 (1), 68-74.

Brown, T.A. (2007). *Klonování a analýza genů: úvod*. 1. české vyd. (M. Fellner, překl.), Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.

Cole, S.T. et al. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 393 (6685), 537-544.

Da Silva, P.E.A. a Palomino, J.C. (2011). Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 (7), 1417-1430.

Dias, M.V. (2012). *Tuberculosis 2012: biology, pathogenesis, intervention strategies*. Paris: Institut Pasteur, 11–15. září 2012. Osobní konzultace (zprostředkovaně).

Elamin, A. A., Stehr, M. a Singh, M. (2012). The cord factor: structure, biosynthesis and application in drug research – Achilles heel of *Mycobacterium tuberculosis*? In: *Understanding Tuberculosis – New Approaches to Fighting Against Drug Resistance*. (P. J. Cardona, ed.). *InTech*, Chapter 8.

Expres rekombinantních proteinů [online]. [cit. 2014-04-27]. Dostupné z: <http://alfa.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Expres-rekombinantnich-proteinu-teoreticky-zaklad.pdf>.

Finnzymes (2010). *Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA polymerase* Espoo: Finnzymes.

Franklin., T.J. a Snow, G.A. (2005). *Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action*. 6th ed. New York: Springer.

GenomeNet. *Multiple Sequence Alignment - CLUSTALW* [online]. [cit. 2014-05-05]. Dostupné z: <http://www.genome.jp/tools/clustalw/>.

Geospiza (©2013). FinchTV [online]. [cit. 2014-05-05]. Dostupné z : <http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>.

Gerum, A..B. et al. (2002). Novel *Saccharomyces cerevisiae* screen identifies WR99210 analogues that inhibit *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (11), 3362-3369.

Greenwood, D. et al. (1999). *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. české vyd. (J. Schindler, překl.), Praha: Grada.

Hartl, J. et al (2006). *Farmaceutická chemie IV*. Praha: Karolinum.

Homolka, J. a Votava, V. (2003). *Tuberkulóza*. 3. vyd. Praha: Karolinum.

Hrdina, R. (2012/2013). *Antimykobakteriální látky: antituberkulóza, antileprotika*. Přednáška z farmakologie. Katedra farmakologie a toxikologie. Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy: Hradec Králové.

Julák, J. (2006). *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum.

Koolman, J. a Röhm, K.H. (2012). *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada.

Kotrba, P., Knejzlík, Z. a Chodora, Z. *Izolace, klonování a analýza DNA* [online]. [cit. 2014-04-20]. Dostupné z: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/Biolog/1kotrba.pdf>.

Kumar, A. et al. (2012). High-throughput screening and sensitized bacteria identify an *M. tuberculosis* dihydrofolate reductase inhibitor with whole cell activity. *PLoS ONE*, 7 (6), e39961.

Ledvina, M., Stoklasová A. a Cerman J. (2009a). *Biochemie pro studující medicíny: I. díl*. 2. vyd. Praha: Karolinum.

Ledvina, M., Stoklasová, A. a Cerman, J. (2009b). *Biochemie pro studující medicíny: II. díl*. 2. vyd. Praha: Karolinum.

Li, R. et al. (2000). Three-dimensional structure of *M. tuberculosis* dihydrofolate reductase reveals opportunities for the design of novel tuberculosis drugs. *Journal of Molecular Biology*, 295 (2), 307-323.

Lüllmann, H., Mohr, K. a Hein, L. (2007). *Barevný atlas farmakologie*. 3. české vyd. Praha: Grada.

Macherey-Nagel (2008). *PCR clean-up, Gel extraction. User manual Nucleospin Extract II*. Düren: Macherey-Nagel.

NCBI. *Mycobacterium tuberculosis H37Rv complete genome: nucleotide*. [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_000962.3?report=genbank&from=3073130&to=3073609&strand=true.

NEB (©2014). *2-log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)*. New England Biolabs [online]. [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: <https://www.neb.com/products/n3200-2-log-dna-ladder-01-100-kb>.

NEB (©2014). *Supercoiled DNA Ladder*. New England Biolabs [online]. [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: <https://www.neb.com/products/n0472-supercoiled-dna-ladder>.

NEBcutter V2.0. New England Biolabs [online]. [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>.

Netval, M. et al. (2004). *Mimoplicní tuberkulóza: hlavní lokalizace*. Praha: Grada.

Novagen (2000). *BugBuster Protein Extraction Reagent* [online]. [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Expression_Extraction/NOVAGEN_BugBuster_protein_extraction.pdf.

Pharma-reports (2012). *Klinicky významné bakterie*. (J. Julák, překl.), Praha: Triton.

QIAGEN (2008). *QIAEX II Handbook*. Hilden: QIAGEN.

QIAGEN (2005). *QIAGEN Plasmid Purification Handbook*. Hilden: QIAGEN.

QIAGEN (2004). *QIApress Ni-NTA Fast Start Handbook*. Hilden: QIAGEN.

Raclavský, V. (2003) *Metody molekulární genetiky* [online]. Olomouc. [cit. 2014-04-18]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/>.

Rowland, K. (2012). *Totally drug-resistant TB emerges in India*. *Nature News*, doi:10.1038/nature.2012.9797.

Sequence Massager [online]. [cit. 2014-05-01]. Dostupné z: <http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.htm>.

Shi, R. a Sugawara, I. (2010). Development of new anti-tuberculosis drug candidates. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 221 (2), 97-106.

Schweitzer, B.I., Dicker, A.P. a Bertino, J.R. (1990). Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *The FASEB Journal*, 4 (8), 2441-2452.

Simon, C. a Stille, W. (1998). *Antibiotika v současné lékařské praxi*. Praha: Grada.

Slíva, J. a Votava, M. (2010). *Farmakologie*. Praha: Triton.

Snustad, D.P. a Simmons, M.J. (2009). *Genetika*. (J. Relichová, překl.) Brno: Masarykova univerzita.

Stránský, M. (2011). Preventivní účinky kyseliny listové. *Interní medicína pro praxi*, 13 (4), 159-162.

Suling, W. J. et al. (2005). New *Mycobacterium avium* antifolate shows synergistic effect when used in combination with dihydropteroate synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (11), 4801-4803.

Suling, W. J. et al. (2000). Antimycobacterila activities of 2,4-diamino-5-deazapteridine derivates and effects on mycobacterial dihydrofolate reductase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (10), 2784-2793.

Suling, W. J. et al. (1998). Susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium complex* to lipophilic deazapteridine derivates, inhibitors of dihydrofolate reductase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42 (6), 811-815.

Šmarda, J. et al. (2008). *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita.

Takayama, K. a Kilburn, J.O. (1989). Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33 (9), 1493-1499.

Todar, K. (©2008-2012). *Mycobacterium tuberculosis and Tuberculosis*. Todar's online textbook of bacteriology [online]. [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://textbookofbacteriology.net/tuberculosis.html>.

TubercuList. *Mycobacterium tuberculosis database* [online]. [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://tuberculist.epfl.ch/quicksearch.php?gene+name=dfrA&submit=Search>.

ÚZIS ČR (2013). *Tuberkulóza a respirační nemoci 2012* [online]. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/publikace/tuberkuloza-respiracni-nemoci-2012>.

Velayati, A.A., Farnia, P. a Masjedi, M.R. (2013). Letter to editor: the totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). *International journal of clinical and experimental medicine*, 6 (4), 307-309.

Wang, F. et al. (2007). Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *The Journal of Experimental Medicine*, 204 (1), 73-78.

White, E.L. et al. (2004). Cloning, expression, and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase. *FEMS Microbiology Letters*, 232 (1), 101-105.

WHO (2013). *Global tuberculosis report 2013* [online]. Geneva: World Health Organization. Dostupné z: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.

WHO (2012). "Totally drug resistant TB": a WHO consultation on the diagnostic definition and treatment options [online]. Meeting report. Geneva: World Health Organization. Dostupné z: <http://www.who.int/tb/challenges/xdr/xdrconsultation/en/>.

WHO (2010). *Treatment of tuberculosis: guidelines* [online]. 4th ed. Geneva: World Health Organization. Dostupné z: <http://www.who.int/tb/publications/2010/9789241547833/en/>.

Zhang, Y. a Yew, W.W. (2009). Mechanism of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13 (11), 1320-1330.

Zhang Y. (2005). The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45 (1), 529-564.

Zhang, Y. et al. (2003). Mode of action of pyrazinamide: disruption of *Mycobacterium tuberculosis* membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 (5), 790-795.

Zhang, Y. et al. (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Nature*, 358 (6387), 591-593.

Zheng, J. et al. (2013). *para*-Aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 288 (32), 23447-23456.

Žamboch, J. (1996). *Vitamíny*. Praha: Grada.