

Abstrakt

Role glutamátkarboxypeptidasy II v savčím organismu je již poměrně dobře prozkoumaná, avšak o jejím homologu – glutamátkarboxypeptidase III – je známo jen minimum informací.

Pro strukturní a funkční charakterisaci proteinu je zapotřebí velké množství proteinu, který je možno získat expresí v tkáňových kulturách. Vlastnosti proteinu mohou být ovlivněny posttranslačními modifikacemi, přičemž různé organismy provádějí různé posttranslační modifikace. Proto jsme se rozhodli vyvinout systém pro produkci rekombinantního GCPIII v savčích buňkách.

Nejprve byl zaveden savčí expresní systém HEK 293-6E jako náhrada dosavadního hmyzího expresního systému. Výhodou tohoto savčího expresního systému je jeho snadná kultivace v suspenzních podmínkách a možnost transientní transfekce. Dále byly optimalizovány transfekční podmínky pro tento systém pomocí exprese zeleného fluorescenčního proteinu, pro snadnou detekci pomocí průtokové cytometrie.

DNA kódující extracelulární část myší GCPIII (mEXSTII) byla klonována do pěti různých expresních plasmidů s použitím různých značek pro afinitní chromatografii (polyhistidinová kotva nebo tzv. Fc značka) na N- nebo C-konci připravovaného proteinu. Připravenými plasmidy byly transfekovány buňky. Pomocí imunochemické detekce byla v médiích testována přítomnost rekombinantního proteinu a následně jeho aktivita při štěpení specifického substrátu GCPIII β -citrylglutamátu.

Protein byl exprimován ve všech případech, avšak plasmid pYD11, zajišťující objemnou Fc značku na C-konci proteinu, produkoval výrazně nižší množství a aktivita proteinu byla zanedbatelná. Pro expresi mEXSTII ve větším množství je tedy vhodné použít plasmid pTT22SSP4, který produkuje mEXSTII s histidinovou kotvou na N-konci, kterou následuje štěpné místo pro odštěpení kotvy specifickou proteasou, případně plasmid pYD5 produkující mEXSTII s Fc značkou na N-konci, která je také následována štěpným místem.