

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta



Lenka Šimonová

Příprava glutamátcarboxypeptidasy III v savčím expresním systému

Preparation of glutamate carboxypeptidase III using
mammalian expression system

Bakalářská práce

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

Konzultant bakalářské práce: RNDr. Pavel Šácha, Ph.D.

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie

Praha 2017

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

V Praze dne 26. května 2017

Podpis autora

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 -citrullyglutamátu.

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.

Klíčová slova

GCPIII, glutamátkarboxypeptidasa III, HEK 293–6E, exprese proteinů, savčí expresní systém

Abstract

The role of glutamate carboxypeptidase II in mammalian organism is already known quite well but only little is known about its homologue glutamate carboxypeptidase III.

For structural and functional characterization of any protein, a large amount of protein is required. Protein could be obtained by expression in tissue culture. Properties of the protein may be affected by post translational modifications, where different organisms create different modifications. Therefore, we set to develop a system for recombinant expression of GCPIII in mammalian cells.

First the mammalian expression system HEK 293–6E was introduced as a substitute for the current insect expression system. The advantage of this mammalian expression system is its option of transient transfection and that it is easy to cultivate cells under suspension conditions. Further, transfection conditions for this system were optimized by green fluorescent protein expression, for easy detection by flow cytometry.

DNA encoding the extracellular part of mouse GCPIII (mEXSTII) was cloned into five expression plasmids with His or Fc tags attached to N- or C-termini. Cells were transfected with prepared plasmids. The presence of mEXSTII in media was tested using Western blot and subsequently the activity of GCPIII was tested by cleaving its specific substrate β -citrylglutamate.

The protein was expressed in all cases but plasmid pYD11, coding for a large C-terminal Fc tag, produced significantly lower amount of the protein with negligible activity. We conclude that in order to express large amount of the mEXSTII, it is advisable to use plasmid pTT22SSP4 that produce the protein with N-terminal His tag followed by a protease cleavage site for the tag removal or plasmid pYD5 that produces the protein with N-terminal Fc tag followed by the same protease cleavage site.

Keywords

GCPIII, glutamate carboxypeptidase III, HEK 293–6E, protein expression, mammalian expression system

Obsah

Abstrakt	3
Seznam zkratk	6
Úvod	7
1 Glutamátkarboxypeptidasa II a její homology	8
1.1 Glutamátkarboxypeptidasa II	8
1.1.1 Struktura GCPII	8
1.1.2 Enzymové aktivity GCPII	9
1.1.2.1 Inhibitory GCPII	9
1.1.3 Exprese GCPII	10
1.2 Homology GCPII	11
1.2.1 Orthology GCPII	12
1.2.1.1 Potkaní GCPII	12
1.2.1.2 Prasečí GCPII	12
1.2.1.3 Myší GCPII	12
1.2.2 Paralogy GCPII	12
1.2.2.1 PSMA-like	12
1.2.2.2 NAALADasaL	12
1.2.2.3 NAALADasaL2	12
1.2.2.4 Glutamátkarboxypeptidasa III, GCPIII	12
2 Expresní systémy	14
2.1 Plasmidy	14
2.2 Rekombinantní proteiny	14
2.3 Synthesa proteinů v tkáňových kulturách	14
2.3.1 Savčí expresní systémy	16
2.3.1.1 HEK 293	17
2.3.2 Transfekce	17
2.3.2.1 Polyethylenimin jako transfekční činidlo	18
2.4 Posttranslační modifikace	18
2.5 Purifikace rekombinantních proteinů	19
3 Cíle práce	20
4 Materiál a Metody	21
4.1 Chemikálie	21
4.2 Buněčné linie, vektory a jiné	21
4.3 Přístroje	22
4.4 Metody	23
4.4.1 Příprava DNA s mEXSTII se štěpnými místy metodou PCR	23
4.4.2 Horizontální agarosová elektroforesa	23
4.4.3 Izolace DNA z agarosového gelu	24
4.4.4 Štěpení vektorů a PCR produktů restričními endonukleasami	24
4.4.5 Ligace fragmentů mEXSTII a rozštěpených vektorů	24
4.4.6 Transformace <i>E. coli</i> plasmidovou DNA	24
4.4.7 Minipreparace plasmidové DNA	24
4.4.8 Sekvence vektorů	25
4.4.9 Příprava insertu mEXSTII pro plasmid pYD5 (druhý pokus) klonováním do TOPO vektoru	25
4.4.10 Příprava roztoku IPEI na transfekce	26
4.4.11 Transfekce HEK 293-6E připravenými plasmidy	26
4.4.12 Sklizení HEK 293-6E	26
4.4.13 Polyakrylamidová SDS elektroforesa za redukujících a denaturujících podmínek	26
4.4.14 Elektropřenos a imunodetekce GCPIII	26
4.4.15 Stanovení aktivity GCPIII s použitím radioaktivně značeného substrátu BCG	27

5	Výsledky	28
5.1	Příprava DNA s mEXSTII se štěpnými místy metodou PCR	28
5.2	Štěpení vektorů a PCR produktů restrikčními endonukleasami	28
5.3	Ligace fragmentů mEXSTII a rozštěpených vektorů	29
5.4	Kontrolní štěpení vektorů	30
5.5	Sekvenace vektorů	31
5.6	Příprava insertu mEXSTII pro plasmid pYD5 (druhý pokus) klonováním do TOPO vektoru	31
5.7	Transfekce HEK 293–6E	32
5.8	Polyakrylamidová SDS elektroforesa, elektropřenos a imunodetekce mEXSTII .	34
5.9	Stanovení aktivity mEXSTII s použitím radioaktivně značeného substrátu BCG . .	35
6	Diskuse	37
	Závěr	38
	Reference	39
	Seznam obrázků	47
	Seznam tabulek	47

Seznam zkratek

Amp	ampicilin
APS	peroxodisíran amonný (z angl. ammonium persulfate)
bPEI	rozvětvený polyethylenimin (z angl. branched PEI)
BCG	beta-citrylglutamát
DEAE-D	diethylaminoethyl-dextran
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxyribonucleic acid)
EBNA1	jaderný antigen 1 viru Epstein-Barrové (z angl. Epstein-Barr nuclear antigen 1)
EBNA1t	zkrácená forma jaderného antigenu 1 viru Epstein-Barrové (z angl. EBNA1 truncated)
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. Epidermal growth factor receptor)
<i>FOLH1</i>	gen pro foláthydrolasu
FGCP	z angl. foylpoly- γ -glutamate carboxypeptidase
GCPII	glutamátcarboxypeptidasa II (z angl. glutamate carboxypeptidase II)
GCPIII	glutamátcarboxypeptidasa III (z angl. glutamate carboxypeptidase III)
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
HEK	lidské embryonální ledvinné buňky (z angl. human embryonic kidney)
HEK 293-6E	HEK kultura transformovaná genem EBNA1t, uzpůsobená pro kultivaci v suspenzi v bezsérovém prostředí, její plný název je HEK 293F-EBNA1t
HRP	křenová peroxidasa (z angl. horseradish peroxidase)
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
kDa	kilodalton
LB	medium Luria-Bertani
IPEI	lineární polyethylenimin
LNCaP	lidská buněčná linie odvozená od metastáz karcinomu prostaty v lymfatických uzlinách (z angl. lymph node cancer prostate)
mEXSTII	extracelulární část myši GCPIII
2-MPPA	2-(3-merkaptopropyl)pentandiová kyselina
NAA	<i>N</i> -acetyl-L-aspartát
NAAG	<i>N</i> -acetyl-L-aspartyl- α -L-glutamát
NAALADasa	z angl. <i>N</i> -acetylated- α -linked acidic dipeptidase
ORF	otevřený čtecí rámec (z angl. open reading frame)
oriP	replikační počátek viru Epstein-Barrové
PAGE	z angl. polyacrylamid gel electrophoresis
PBS	z angl. phosphate buffer solution
PCR	polymerasová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
2-PMPA	2-fosfonomethylpentandiová kyselina (z angl. 2-phosphonomethyl-pentanedioic acid)
PSMA	membránový antigen specifický pro prostatu (z angl. prostate-specific membrane antigen)
PTM	posttranslační modifikace (z angl. post-translational modification)
RNA	ribonukleová kyselina (z angl. ribonucleic acid)
SDS	dodecylsírán sodný (z angl. sodium dodecyl sulfate)
SV40	Simian Vacuolating Virus 40
SV40 ori	replikační počátek viru SV40
SV40 TAg	velký T-antigen viru SV40
TBS	z angl. tris-buffered saline
TEMED	tetramethylethylendiamin
TEV	rozpoznávací sekvence pro proteasu viru tabákové mozaiky (z angl. tobacco etch virus)
Tween 20	polyoxyethylen-20-sorbitan monolaurát

Úvod

Glutamátkarboxypeptidasa III (GCPIII) je homolog prostatického nádorového markeru glutamátkarboxypeptidasy II (GCPII, E.C. 3.4.17.21). Zdá se však, že GCPIII je neméně důležitá, neboť je schopna v některých funkcích zastoupit GCPII, jak se ukázalo na myších modelech s inaktivovaným genem pro GCPII. Přestože uběhlo již 18 let od doby, kdy byla GCPIII poprvé detekována, stále se toho o ní ví velice málo.

Pro studium funkce GCPIII je tedy v naší laboratoři připravován model myši s vyřazeným genem pro GCPIII. Pro následná enzymologická studia bude potřeba velké množství myšního rekombinantního proteinu. K expresi proteinů byl dříve používán hmyzí expresní systém S2, který se ale může od savčího lišit v posttranslačních modifikacích, z toho důvodu bylo rozhodnuto zavést savčí expresní systém HEK 293–6E a v něm připravit extracelulární část myši GCPIII (mEXSTII).

V této práci se v teoretické části zabývám nejprve glutamátkarboxypeptidasou II a jejími homology, dále potom přípravou rekombinantních proteinů a expresními systémy. V praktické části se potom zabývám optimalizací expresních podmínek pro savčí expresní systém HEK 293–6E, přípravou plasmidů pro tento systém a expresí mEXSTII.

1 Glutamátkarboxypeptidasa II a její homology

1.1 Glutamátkarboxypeptidasa II

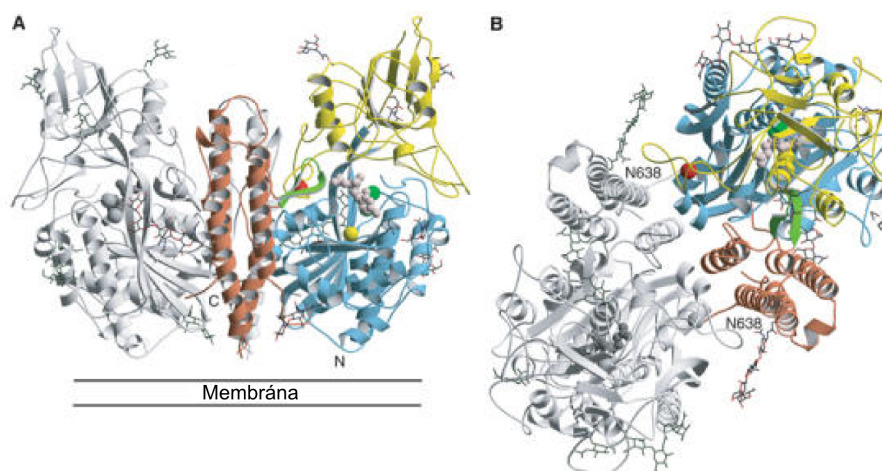
Glutamátkarboxypeptidasa II (GCPII, E.C. 3.4.17.21), také známá jako NAAG peptidasa, NAALADasa I, PSMA či folát hydrolasa, je kódována genem *FOLH1* [1]. GCPII je integrální membránový glykoprotein druhého typu patřící do skupiny zinkových metalopeptidas. Obsahuje 750 aminokyselin a její molekulová hmotnost je přibližně 84 kDa, respektive 110 kDa i s glykosylacemi [2].

GCPII je nejvíce exprimována v epitheliálních buňkách prostaty, proximálních tubulech ledvin, kartáčovém lemu lačnicku a v gangliových buňkách nervového systému [3]. V každé z těchto tkání má odlišnou funkci, což souvisí s různorodostí pojmenování tohoto enzymu, neboť byl zkoumán nezávisle v různých tkáních. Podle štěpení *N*-acetyl-*L*-aspartyl- α -*L*-glutamát (NAAG) v mozku na *N*-acetyl-*L*-aspartát (NAA) a *L*-glutamát získal jméno NAAG peptidasa; pteroylpoly- γ -glutamát hydrolasa či folát hydrolasa se tento enzym jmenuje v tenkém střevě a podle výskytu v prostatě PSMA (membránový antigen specifický pro prostatu, z angl. prostate-specific membrane antigen). Když se později zjistilo, že se jedná stále o jeden a týž protein, Mezinárodní unie biochemie a molekulární biologie (IUBMB) schválila název glutamátkarboxypeptidasa II [4].

1.1.1 Struktura GCPII

GCPII obsahuje 19 aminokyselin dlouhou intracelulární část, poté jediný transmembránový helix složený z 22 aminokyselin a velkou extracelulární část. Extracelulární část je rozdělena na tři domény – proteasovou (I), apikální (II) a C-terminální doménu (III) [5] (viz Obrázek 1 na straně 8). Aktivní formou GCPII je homodimer [6], hlavní kontaktní plocha je mezi doménou III jedné podjednotky a doménami I a II druhé podjednotky. Dále strukturu stabilizují dva intermolekulární solné můstky mezi doménou III jedné a druhé podjednotky, hydrofobní efekt a koordinované ionty (převážně vápenaté).

GCPII je posttranslačně modifikována deseti *N*-glykosylacemi, které také napomáhají stabilitě dimeru [5].



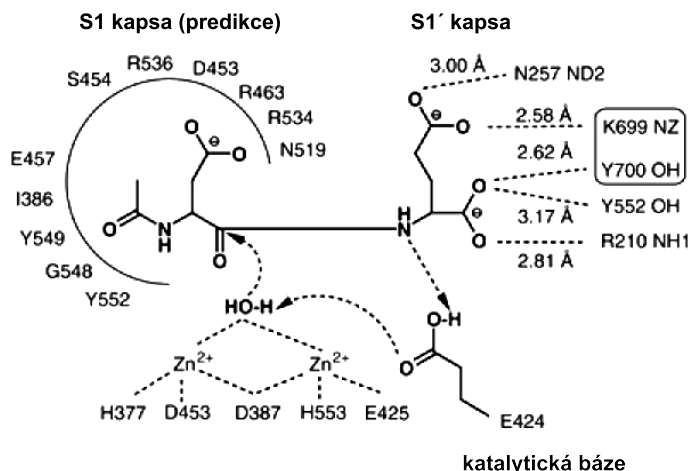
Obrázek 1: Struktura GCPII. (A, B) 3D struktura dimeru. Jedna podjednotka je vyobrazena šedě, druhá barevně (proteasová doména I – světle modře; apikální doména II – žlutě; doména III – hnědě). Koordinačně navázané ionty jsou zobrazeny barevnými kuličkami (Zn²⁺ zeleně, Ca²⁺ červeně, Cl⁻ žlutě). Glutarátový senzor je vybarven zeleně. Na obrázku A je znázorněna pozice enzymu vzhledem k membráně, na obrázku B pohled shora. Vstup do katalytického místa je vyznačen písmenem E.

Převzato z [5]

Aktivní místo

Přibližně 2 nm dlouhý tunel mezi doménou I a II vede do aktivního místa, které obsahuje dva zinečnaté ionty (Zn1, Zn2), oba tetraedricky koordinované. Vzdálenost mezi nimi se pohybuje kolem 0,330 nm (volný stav) až 0,380 nm (navázaný inhibitor) a je přemostěna jednou molekulou vody [5]. Dalšími ligandy jsou His377 (Zn2), Asp387 (Zn1 a Zn2), Glu425 (Zn1), Asp453 (Zn2) a His553 (Zn1) (viz Obrázek 2 na straně 9). Tento motiv je typický pro celou metalopeptidasovou rodinu M28, kam GCPII i její homology patří [7].

Aktivní místo je rozděleno na dvě části – S1 kapsu, kam se váže NAA, a S1' kapsu, kam se váže glutamát. Součástí S1' kapsy jsou také Lys699 a Tyr700, které jsou flexibilní a tvoří tzv. glutarátový senzor.



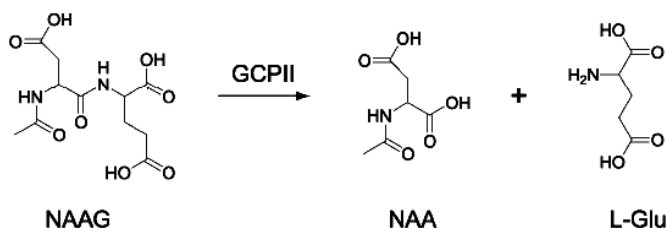
Obrázek 2: Schéma aktivního místa GCPII s navázaným *N*-acetyl-*L*-aspartyl-*L*-glutamátem. NAA se váže do S1 kapsy (odvozeno na základě modelu), glutamát se váže do S1' kapsy (z krystalografických dat). Aminokyseliny v rámečku — lysin a tyrosin — tvoří glutarátový senzor.

Převzato z [5]

1.1.2 Enzymové aktivity GCPII

Dosud byly popsány dvě významné hydrolytické aktivity GCPII.

V mozku GCPII hydrolyzuje peptidový neurotransmitter *N*-acetyl-*L*-aspartyl- α -*L*-glutamát (NAAG) na *N*-acetyl-*L*-aspartát (NAA) a *L*-glutamát (viz Obrázek 3 na straně 9). Vznikající *L*-glutamát je rozšířeným excitačním neurotransmiterem. Inhibice GCPII má na zvířecích modelech neuroprotektivní účinky, což dělá z GCPII potenciální cíl terapeutického zásahu [3]. Tato NAA-LADasová aktivita, jak je také často označována, byla poprvé popsána v krysím mozku [8] s pH optimem mezi 6,0 a 7,4 při 37 °C a pro svoji činnost potřebuje chloridové anionty.



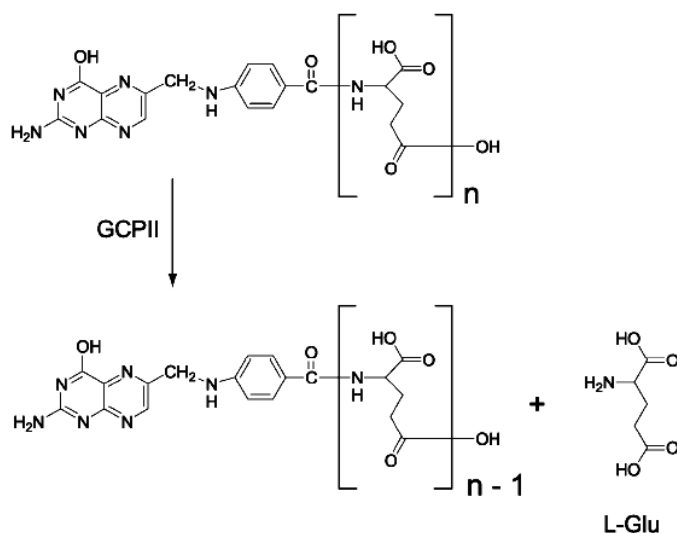
Obrázek 3: Štěpení NAAG v mozku. GCPII štěpí NAAG na NAA a *L*-glutamát, který v mozku působí jako excitační neurotransmitter

Převzato z [9]

V tenkém střevě GCPII odštěpuje glutamátové jednotky z folyl-poly- γ -glutamátu za uvolnění folátu (kyseliny listové) [10] (viz Obrázek 4 na straně 10). Hraje tedy důležitou roli při vstřebávání folátu z potravy. Tato enzymová aktivita byla poprvé popsána na prostatických nádorových buňkách LNCaP (z angl. Lymph Node Carcinoma of the Prostate) exprimujících GCPII [11].

1.1.2.1 Inhibitory GCPII

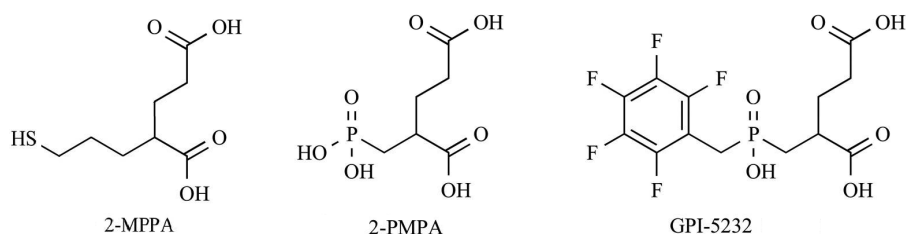
GCPII je nespecificky inhibována chelátory dvojmocných kationtů (jako je EDTA). Znalost substrátové specifity vedla k vývoji celé řady selektivních inhibitorů GCPII, které můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny – deriváty glutamátu (viz Obrázek 5 na straně 10) a peptidomimetika – analoga NAAG (viz Obrázek 6 na straně 11).



Obrázek 4: Štěpení folyl–poly– γ –glutamátu v tenkém střevě. GCPII odštěpuje z folyl–poly– γ –glutamátu glutamátové jednotky. Po odštěpení všech glutamátových jednotek je uvolněna kyselina listová.

Převzato z [9]

Jako první byl navržen a syntetisován derivát kyseliny L–glutarové, kyselina 2–fosfonomethyl–pentandiová (2–PMPA, $K_i=0,3$ nM) [13], která se ukázala být vysoce selektivní pro GCPII [14]. Nahrazením polární fosfonátové skupiny vznikl další účinný inhibitor 2–(3–merkaptopropyl)pentandiová kyselina (2–MPPA, $K_i=90$ nM), která vzhledem k větší lipofilitě prostupuje střevní stěnou do krevního řečiště a částečně i hematoencefalickou bariérou [15] [16]. Její výhodou oproti 2–PMPA tedy je, že je možno ji podávat orálně. Mezi deriváty glutamátu patří také například GPI–5232 [17].



Obrázek 5: Inhibitory GCPII s glutamátovou skupinou. Zleva: první navržený inhibitor GCPII 2–PMPA ($K_i=0,3$ nM), lipofilní 2–MPPA ($K_i=90$ nM) a aromatický inhibitor GPI–5232 ($K_i=82$ nM).

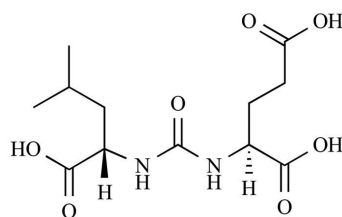
Převzato z [12]

Do druhé skupiny patří deriváty močoviny, která váže Zn^{2+} v aktivním místě. Tato skupina inhibitorů je založena na podobnosti s NAAG, kde dvě aminokyseliny jsou spojeny přes močovinu skrze své NH_2 skupiny, a tedy nejsou hydrolyzovatelné. Do této skupiny patří například ZJ–43 ($K_i=0,8$ nM), neboli kyselina (*N*–[[[(1*S*)–1–karboxy–3–methylbutyl]amino]karbonyl]–L–glutamová) [18] [19]. Bohužel inhibitory založené na močovinně není možné podávat orálně, také velice málo prostupují přes hematoencefalickou bariéru.

Přestože například 2–PMPA či inhibitory založené na močovinně není možné využít k medicinském účelům přímo, mají vysoký potenciál. Mnoho laboratoří tedy pracuje na vylepšení biokompatibility a snížení cytotoxicity těchto látek. Patří mezi ně například deriváty 2–PMPA (např. estery) [20], lipofilnější thiolové sloučeniny [21], nebo alternativní Zn^{2+} vázající inhibitory [22]. Dále byly vyvinuty také inhibitory zcela odlišné od přirozeného substrátu GCPII obsahující indol [23] (viz Obrázek 7 na straně 11).

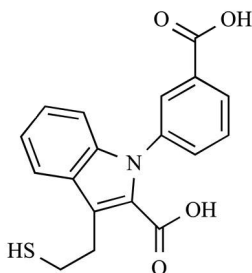
1.1.3 Expres GCPII

GCPII mRNA byla poprvé detekována v prostatě – v nádorové buněčné linii LNCaP [24]. Různé laboratoře nacházejí GCPII či její mRNA v různých tkáních a výsledky se liší podle použí-



ZJ 43

Obrázek 6: ZJ–43. Inhibitor GCPII založený na podobnosti s NAAG ($K_i=0,8$ nM).
Převzato z [12]



17

Obrázek 7: Inhibitor GCPII založený na indolu. Nedávno syntetisovaný inhibitor zcela odlišný od přirozeného substrátu GCPII ($K_i=22$ nM).
Převzato z [12]

tých metod [25]. Ohledně výskytu GCPII v lidských tkáních tedy nepanuje jasná shoda.

Ve zdravých tkáních byla v různých laboratořích GCPII potvrzena v prostatě [26], astrocytech a Schwannových buňkách nervové soustavy [27] [3], proximálních tubulech ledvin a tenkém střevě [28].

V nádorových tkáních se GCPII vyskytuje především v nádoru prostaty [29], kde je oproti zdravé tkáni exprese výrazně zvýšena, a také v metastázách karcinomu prostaty do kostí a lymfatických uzlin [30]. Dále byla nalezena také v nádorech ledvin, močového měchýře, prsu a tlustého střeva [31] [32] [33]. Též se hojně vyskytuje v neovaskulatuře nádorů, avšak nikoliv v normálních cévách [34].

Zdá se, že se stoupající exprese GCPII se zvyšuje i agresivita nádoru. Dokonce byla nalezena korelace mezi její exprese a příjmem folátu buňkou [35]. Naproti tomu byla nalezena i závislost zcela opačná – čím vyšší exprese, tím nižší invazivnost prostatického nádoru [36]. Role GCPII v nádorové tkáni tedy zatím zůstává nevyjasněna.

Pravděpodobně ale hraje významnou roli při patologické angiogenezi, neboť myši s inaktivovaným genem pro GCPII měly oproti kontrolní skupině sníženou schopnost tvorby nových cév k tumorům [37]. Dále byla zjištěna role GCPII i při retinopatii, avšak vývoj normální vaskulatury sítnice nedostatek tohoto enzymu neovlivňuje [38].

Zdá se tedy, že GCPII by mohla být cílem terapeutického zásahu, problematické ovšem je, že je exprimována v různých tkáních, jako je například mozek, kde reguluje množství glutamátu. Systematická inhibice GCPII by tedy mohla mít rozsáhlé negativní vedlejší účinky. Vzhledem k výskytu v neovaskulatuře tumorů však může být použita k diagnostickým účelům [39], možná i jako ukazatel míry agresivity nádoru.

1.2 Homology GCPII

Homologie – příbuznost dvou znaků pocházející ze společného předcházejícího znaku

Orthologie – příbuznost dvou znaků, která vznikla oddělením dvou biologických druhů

Paralogie – příbuznost dvou znaků pocházející z duplikace genu

Takto Fitch rozděluje příbuzné znaky [40]. Homologie je tedy nadřazeným pojmem pro orthologii a paralogii.

1.2.1 Orthology GCPII

1.2.1.1 Potkaní GCPII

Gen *Folh1* u potkana kóduje 752 aminokyselin dlouhý protein s 9 *N*-glykosylačními místy. Jeho aminokyselinová sekvence je z 85 % identická s lidskou GCPII (hGCPII) [41] [42]. Podobně jako hGCPII se vyznačuje NAALADasovou aktivitou v mozku [8], avšak odlišná exprese v prostatě u člověka a potkana znemožňuje využití potkana jako modelového organismu pro výzkum rakoviny prostaty [28] [43].

1.2.1.2 Prasečí GCPII

Gen *Folh1* u prasete kóduje 751 aminokyselin dlouhý protein s 12 *N*-glykosylačními místy. Jeho aminokyselinová sekvence je z 91 % identická s lidskou GCPII [10] [28]. Prasečí GCPII byla poprvé izolována z lačníku prasete, kde se vyznačuje γ -glutamát karboxypeptidasovou aktivitou [10], NAALADasová aktivita byla později potvrzena též [28].

1.2.1.3 Myší GCPII

U myši kóduje gen *Folh1* 752 aminokyselin dlouhý protein, který je z 86 % identický s hGCPII. Vyznačuje se jak γ -glutamátkarboxypeptidasovou, tak NAALADasovou aktivitou, avšak velmi se liší exprese v lidských a myších tkáních. Takže na příklad v lidské prostatě se GCPII exprimuje nejvíce, kdežto v myší prostatě nebyla zaznamenaná exprese žádná [44].

1.2.2 Paralogy GCPII

1.2.2.1 PSMA-like

Gen pro PSMA-like obsahuje rozsáhlou delecí vzhledem k *Folh1* – chybí část odpovídající promotoru, celý první exon a část prvního intronu. Dále však obsahuje jen bodové mutace vzhledem k *Folh1*.

Nejdelší otevřený čtecí rámec mRNA PSMA-like začíná v oblasti, která odpovídá osmému intronu genu GCPII, a jeho translací vzniká 422 aminokyselin dlouhý protein s relativní molekulovou hmotností 46 kDa a 97% sekvenční identitou s GCPII [45]. Tento produkt by však neměl být proteolyticky aktivní, neboť oproti GCPII mu chybí 308 aminokyselin na N-konci, a je známo, že již delece 90 aminokyselin na N-konci vede ke ztrátě proteolytické aktivity [46].

1.2.2.2 NAALADasaL

N-acetylated α -linked acidic dipeptidase-like, neboli NAALADasaL, je 740 aminokyselin dlouhý transmembránový protein s molekulovou hmotností 80 kDa a je kódován genem *NAA-LADL1*. Proteinová sekvence sdílí 35% identitu a 54% podobnost s GCPII [47].

Na rozdíl od GCPII se nejedná o karboxypeptidasu, ale o aminopeptidasu, byl pro ni tedy navržen název HILAP (human ileal aminopeptidase) [48].

1.2.2.3 NAALADasaL2

NAALADasaL2 je kodována genem *NAALADL2*, který leží na třetím chromosomu v lokusu 3q26.3, obsahuje přibližně 32 exonů a celkem zabírá 1,37 Mbp. Tento gen produkuje mRNA podléhající rozsáhlému sestřihu, výsledný protein je složen z 795 aminokyselin a je z 26 % identický s GCPII [49].

1.2.2.4 Glutamátkarboxypeptidasa III, GCPIII

Poprvé byla mRNA GCPIII (též NAALADasa II) detekována již roku 1999 ve vaječnicích, varlatech a některých částech mozku. Ukázalo se, že nejen GCPII štěpí NAAG v mozku, ale u myši s inaktivovaným genem pro GCPII byla stále viditelná NAALADasová aktivita, za kterou je odpovědná právě GCPIII [50]. Na rozdíl od GCPII je ale GCPIII schopná štěpit i β -citryl glutamát (BCG).

Aminokyselinová sekvence GCPIII sdílí 67% identitu a 81% podobnost s GCPII [47] a extracelulární část GCPIII je analogicky ke GCPII rozdělena na tři domény – proteasovou (aminokyseliny 46–106, 342–580), apikální (aminokyseliny 107–341) a helikální (aminokyseliny 581–740) a obsahuje 7 glykosylačních míst [51].

Porovnáním struktur katalytického místa u GCPII a GCPIII se ukázalo, že pouhá záměna jediné aminokyseliny (Asp519 u GCPII, Ser509 u GCPIII) vede ke schopnosti GCPIII štěpit BCG [52]. GCPIII stejně jako GCPII ztrácí aktivitu, pokud je deglykosylována [53].

2 Expresní systémy

2.1 Plasmidy

Plasmid je malá kruhová dvouvláknová molekula DNA, která je schopna replikace nezávisle na chromosomální DNA. Plasmidy se hojně vyskytují u bakterií, kterým pomáhají přežít nestandardní podmínky. Chromosomální DNA nese geny pro život buňky za normálních podmínek, kdežto plasmidy obsahují geny, které mohou být pro buňku prospěšné ve stresujícím prostředí. Plasmidy typicky mohou nést geny pro resistenci vůči antibiotikům. Plasmidy mohou být přenášeny mezi bakteriemi tzv. horizontálním genovým přenosem, jako je transformace (přijetí cizorodé DNA kompetentní buňkou z okolí bez přímého kontaktu s buňkou donorovou), transdukce (přenos je uskutečněn skrze virus) či konjugace (přímý přenos mezi buňkami, které jsou v těsném kontaktu).

Díky svým vlastnostem jsou plasmidy hojně využívány jako vektory v genovém inženýrství, neboť je možné do nich vložit fragment DNA kódující požadovaný protein a ten po vložení do vhodného organismu (bakterie, kvasinky či dokonce i savčí buňky) exprimovat a získat rekombinantní protein.

Důležité části vektoru:

- **Počátek replikace:** sekvence DNA pro nasednutí DNA polymerasy (zajistí replikaci plasmidu)
- **Selekční marker:** gen, který umožní selekci buněk s plasmidem (např. resistance na ampicilin nebo tetracyklin – Amp respektive Tet)
- **Indukovatelný promoter:** sekvence DNA umožňující iniciaci transkripce (nasedá zde RNA polymerasa)
- **Klonovací místo:** úsek DNA obsahující místa pro restriční endonukleasy, též MCS (z angl. *Multiple Cloning Site*)

Dále vektory zpravidla obsahují sekvence pro afinitní označení vzniklého rekombinantního proteinu (viz Purifikace rekombinantních proteinů) a polyadenylační signál, či mohou obsahovat další replikační počátek pro episomální replikaci.

2.2 Rekombinantní proteiny

Příprava proteinů se stává stále významnější, a to nejen v oblasti výzkumu, ale převážně ve farmaceutickém průmyslu (léčiva na bázi proteinů, např. insulin). Jednou z metod je izolace z přirozeného zdroje, což je jednak velice náročné, ale také velice drahé. Přelomový byl tedy objev syntesy peptidů Brucem Merrifieldem v roce 1963 [54], za což dostal roku 1984 Nobelovu cenu. Během 60. let byl v jeho laboratoři poprvé syntetisován například angiotensin a insulin a v roce 1969 ribonukleasa A [55], avšak tato metoda je stále omezena jen na peptidy či malé proteiny.

Roku 1970 byla objevena první restriční endonukleasa [56] a již roku 1977 byl připraven první rekombinantní protein [57]. Velký rozmach na poli biochemie a molekulární biologie, a tedy i usnadnění přípravy rekombinantních proteinů, byl umožněn také díky objevu polymerasové řetězové reakce (PCR) [58] či sekvenačních metod nukleových kyselin [59].

Na Obrázku 8 na straně 15 je schematicky znázorněna příprava rekombinantního proteinu.

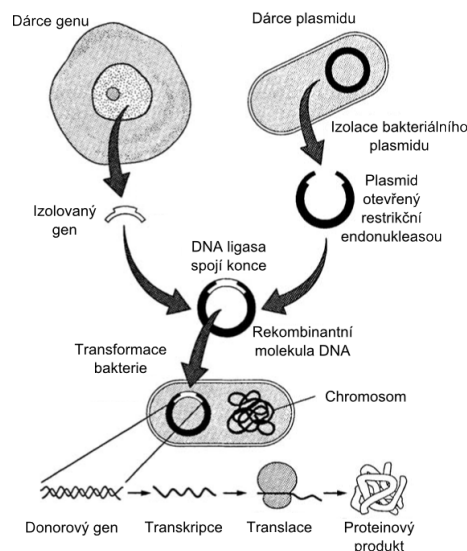
Rekombinantní proteiny jsou tedy takové proteiny, které vznikají expresí cizorodé rekombinantní DNA v námi zvoleném expresním systému. Na rozdíl od proteinů je totiž *in vitro* syntéza DNA podle templátu jednoduchá.

2.3 Synthesa proteinů v tkáňových kulturách

Tkáňové kultury

První pokusy s udržení životaschopných buněk *in vitro* byly provedeny již koncem 19. století, kdy například Wilhelm Roux byl schopen ve slaném roztoku několik dní udržet při životě kuřecí embryonální buňky [61]. Avšak k výraznému zlepšení na poli tkáňových kultur došlo až ve 40. a 50. letech 20. století vlivem virologů, neboť kultivace virů v tkáňových kulturách umožňovala snazší výrobu očkovacích vakcín.

Tkáňové kultury rostou při standardizovaných podmínkách mimo jejich přirozené prostředí v médiu s určeným obsahem výživných látek (aminokyseliny, sacharidy, vitamíny či minerály), při definovaném pH, teplotě a atmosféře plyných látek (O_2 , CO_2). Právě poměrně přesně definované



Obrázek 8: Příprava rekombinantního proteinu v bakteriálním expresním systému. Nejprve je izolován gen kódující protein z původního (např. eukaryotního) organismu, ten je vložen do bakteriálního plasmidu použitím komplementárních restrikčních míst. Tímto vytvořeným vektorem je transformována hostitelská buňka, která následně exprimuje požadovaný rekombinantní protein. Převzato z [60] a upraveno

podmínky jsou velkou výhodou při srovnávání různých metod či opakování experimentů. Zároveň ale to, že se nejedná o přirozené prostředí, může hrát významnou roli v expresi proteinů a lišit se od experimentů prováděných *in vivo*.

Během kultivace tkáňových kultur rozeznáváme čtyři růstové fáze buněk, po vyčerpání živného média je nutné část kultivovaných buněk odebrat a přenést do nového média. Tomuto procesu se říká pasážování.

Růstové fáze tkáňové kultury:

Lag fáze: První fáze nastávající po pasážování buněk, kdy se buňky teprve adaptují na nové prostředí. Množství buněk se nezvětšuje, ba naopak se počet buněk v této fázi mírně snižuje.

Log fáze: Po úvodním šoku se buňky vzpamatovaly a začínají exponenciálně růst. Je možné zachytit velké množství buněk v mitóze.

Stacionární fáze: Rychlost přibývání buněk se významně snižuje z důvodů vyčerpání média, nárůstu odpadních látek a také kvůli kontaktní inhibici.

Fáze odumírání: Buňky rapidně umírají kvůli stále se zhoršujícím podmínkám (vyčerpání média, hromadění odpadních látek metabolismu, změny pH, ...). Může docházet k tvorbě klidových stádií, která dovedu přežít nepříznivé podmínky (tzv. sporulace).

Kromě buněčných linií, jejichž životnost je přibližně 30 až 50 dělení převážně z důvodu zkracování telomer, existují i imortalizované buněčné linie, jejichž životnost není omezena počtem buněčných cyklů, neboť mají aktivní telomerasu [62]. Tyto nesmrtelné linie se získávají buď přímo z rakovinných nádorů (například HeLa buňky) nebo z normálních buněčných kultur působením mutagenů. Spojením buněk s žádanými vlastnostmi (například B-lymfocyty vytvářející protilátky) s buňkami nádorovými vznikají hybridomy, které kombinují vlastnosti obou svých „rodičů“. Tímto způsobem se například vytvářejí nesmrtelné buněčné linie jakožto továrny na výrobu monoklonálních protilátek.

Expresní systémy

Kromě expresních systémů založených na tkáňových kulturách je možné syntetizovat proteiny i *in vitro* ve směsi RNA polymerasy, ribonukleotidů, tRNA a ribosomů, avšak tento způsob je velice finančně náročný a není možné dosáhnout velkých výtěžků proteinu, proto se stále nejčastěji používají systémy buněčné [63].

Expresí rekombinantních proteinů v buněčných kulturách typicky zahrnuje transfekci buněk DNA vektorem, který obsahuje templát pro daný protein, a následnou kultivaci buněk, kdy transfekované buňky samy transkribují a translatují požadovaný protein. Buňky jsou následně lyzovány a protein purifikován. Pro přípravu rekombinantních proteinů jsou hojně používány jak prokaryotní

tak eukaryotní expresní systémy. Volba expresního systému závisí na několika veličinách, mimo jiné na typu proteinu.

Nejpoužívanější systém pro velkou produkci proteinu je ten prokaryotní, a to jak pro laboratorní, tak průmyslové použití. Bakteriální expresní systémy jsou velice populární hlavně kvůli snadné kultivaci, rychlému růstu a vysokým výtěžkům rekombinantního proteinu. Bohužel multi-doménové eukaryotní proteiny exprimované v bakteriích jsou mnohdy nefunkční, neboť prokaryota neumožňují posttranslační modifikace typické pro eukaryota, což může vyústit ve špatné sbalení proteinu. Tyto proteiny poté vytvářejí nerozpustné shluky a hromadí se v inkluzních tělískách [64]. Renaturace z inkluzních tělísek je možná, avšak relativně náročná na provedení. Prokaryotní systém lze obecně použít pro výrobu neglykosylovaných rekombinantních proteinů.

Nejčastěji používaným prokaryotním systémem je bakterie *Escherichia coli* [65]. DNA se klonuje do plasmidu obsahujícího *lac* promotor a indukce se poté provádí pomocí analogu laktosy – IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid). Pro produkci nejrůznějších aminokyselin se často používají grampozitivní bakterie rodu *Corynebacterium* [66], v *C. glutamicum* byl dokonce vyroben plně funkční epidermální růstový faktor [67]. U grampozitivních bakterií je velkou výhodou, že narozdíl od gramnegativních neprodukuje endotoxiny, například *Lactococcus lactis* [68] se používá nejen k produkci proteinů, ale také v potravinářství při výrobě kysaných mléčných výrobků.

Expresní systémy využívající eukaryota

Mezi eukaryotními organismy sloužícími jako expresní systémy můžeme nalézt zástupce od nejnižších eukaryot jako jsou kvasinky a prvoci, až po vyšší eukaryota jako jsou savci, dokonce existují i lidské buněčné linie, které jsou využívány stále častěji. Přestože eukaryotické organismy mají mnohem vyšší kultivační nároky než prokaryota, pro expresi eukaryotních genů jsou mnohem vhodnější kvůli možnosti posttranslačních modifikací vytvořeného proteinu.

Z kvasinkových eukaryotních systémů se nejčastěji používá *Pichia pastoris* [69], která roste relativně rychle, dává vysoké výtěžky a je schopna tvorby disulfidických můstků a glykosylací. Bohužel se jedná o glykosylace vysoce manosového typu, které mohou stát za imunogenicitou některých bioterapeutik vyráběných právě v tomto organismu [70]. Narozdíl od druhé často používané kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* [71] je schopna růst i v prostředí s mnohem větší buněčnou hustotou a také je schopna využívat methanol jako jediný zdroj energie [72].

Savcům podobnější posttranslační glykosylace s *N*-vázanou galaktosou syntetisuje parazitický prvok *Leishmania tarentolae* [73], jehož další výhodou je i nenáročná kultivace až do vysokých hustot.

Z mnohobuněčných organismů bylo nejvíce tkáňových kultur odvozeno od bezobratlých – hmyzu. Například známé Sf9 a Sf21 odvozené od ovariální tkáně můry *Spodoptera frugiperda* [74] či Schneiderovy buňky 2, známé pod zkratkou S2, odvozené z primární kultury embryí octomilky *Drosophila melanogaster* [75], které lze snadno kultivovat v bezsérovém prostředí za pokojové teploty [76].

2.3.1 Savčí expresní systémy

Savčí expresní systémy jsou v poslední době čím dál tím používanější, a to i průmyslově. Jejich hlavní předností je jejich komplexní proteosyntetický aparát umožňující nejrůznější posttranslační modifikace, a tedy obvykle produkují plně funkční protein se správnou terciární i kvartérní strukturou. Savčí linie jsou však velice náročné na kultivaci – mají dlouhou generační dobu v řádu až dní, vyžadují komplexní kultivační médium, stálou teplotu 37 °C a 5% atmosféru CO₂, jsou náchylné ke kontaminaci a výtěžky proteinu nebývají největší.

Savčích systémů je dnes celá řada, zde je výběr těch nejpoužívanějších:

- **CHO (Chinese Hamster Ovary)** – Linie odvozená již v 50. letech 20. století z epitheliálních buněk vaječníku křečička čínského. Tato linie se vyznačuje rychlým růstem, schopností růst v bezsérovém prostředí a je ze savčích linií nejčastěji průmyslově využívána pro tvorbu terapeutik (např. erythropoetin)[77] [78]. Více než 70% rekombinantních proteinů je produkováno právě v CHO buňkách [79]. Jelikož CHO buňky postrádají schopnost tvorby receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), jsou také často využívány pro výzkum mutací EGFR [80].
- **BHK (Baby Hamster Kidney)** – Adherentní buněčná linie odvozená od ledvinných fibroblastů jeden den starých křečků [78].
- **NS0** – Linie odvozená z myších myelomů produkujících imunoglobuliny, velmi často využívána biofarmaceutickými firmami pro výrobu monoklonálních protilátek. Tato buněčná linie není schopna syntetisovat cholesterol, musí být tedy dodáván v médiu [81].

- **COS** – Buněčná linie odvozená z ledvinné tkáně kočkodana zeleného (CV-1) transformací genem pro velký T antigen viru SV40 [82]. Zkratka COS je z angl. „CV-1 in Origin, and carrying the SV40 genetic material“. Používají se linie COS-1 a COS-7.
- **3T3** – Linie myších fibroblastů odvozených z embryonálních buněk laboratorní myši [83]. Zkratka pochází z protokolu, podle kterého byla tato buněčná linie získána (z angl. „3-day transfer, inoculum 3 x 10⁵ cells“).
- **HeLa** – Lidská přirozeně nesmrtelná buněčná linie odvozená z buněk nádoru děložního hrdla pacientky Henrietty Lacks [84], podle níž byla linie pojmenována. Tato linie je dobře prostudovaná a používá se jako model lidských buněk pro nejrůznější pokusy, také jako expresní systém. Jedná se o historický první lidský expresní systém, který se snadno kultivuje, dokonce mají buňky tendenci kontaminovat svoje okolí [85].
- **CAP** – Lidská buněčná linie odvozená od amniocytů immortalizovaná adenovirem 5 [86]. CAP jsou určené pro stabilní produkci proteinu, pro transientní transfekci byla vyvinuta linie CAP-T exprimující velký T antigen viru SV40.
- **HEK 293 (Human Embryonic Kidney)** – Lidská buněčná linie odvozená z embryonální ledvinné tkáně.

2.3.1.1 HEK 293

Lidské embryonální ledvinné buňky č. 293 byly vytvořeny v roce 1973 Frankem Grahamem (v laboratoři Alexe van der Eba v Leidenu) odvozením od normální ledvinné tkáně získané z potravního plodu. Buněčná kultura byla transformována částmi virové DNA z adenoviru 5 v prostředí fosforečnanu vápenatého [87] [88].

- **HEK 293S** — Buněčná kultura uzpůsobená pro suspenzní kultivaci v prostředí s určitým podílem koňského nebo kravského séra.
- **HEK 293F** — Kultura uzpůsobená pro kultivaci suspenzně v bezsérovém prostředí média Freestyle.
- **HEK 293T** — Kultura stabilně transformovaná genem pro velký T antigen polyomaviru SV40 (SV40 TAG), který umožňuje episomální replikaci vektorů obsahujících replikační počátečky SV40.
- **HEK 293E** — Kultura stabilně transformovaná genem pro nukleární antigen 1 viru Epstein–Barrové (EBNA1), který umožňuje episomální replikaci vektorů obsahujících replikační počátečky oriP.
- **HEK 293-6E** — Kultura transformovaná kratší verzí genu EBNA1, tzv. EBNA1t, který vykazuje nižší cytotoxicitu, uzpůsobená pro kultivaci v suspenzi v bezsérovém prostředí, její plný název je HEK 293F-EBNA1t [89].

2.3.2 Transfekce

Slovo transfekce vzniklo složením z *trans* a *infekce*, tedy transformace infekcí. Jedná se o proces vkládání nukleových kyselin do hostitelského organismu. Transfekci rozlišujeme na stabilní a transientní.

V případě stabilní transfekce se jedná o vložení rekombinantní DNA do genomu hostitele, poté je vybrán nejproduktivnější klon. Tento způsob umožňuje dlouhodobou produkci proteinu, a proto se často využívá v biofarmaceutickém průmyslu.

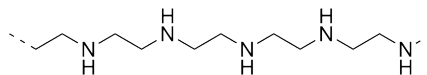
Při transientní transfekci není DNA začleněna do genomu. Po vyčerpání hostitelské buňky je nutné provést transfekci znovu. Tento způsob se využívá pro rychlou produkci proteinu, například pro strukturní a funkční charakterizaci proteinu.

Z mnoha transfekčních metod vybíráme dle typu hostitelského organismu, dále také dle finanční a časové náročnosti a požadovaného výsledku.

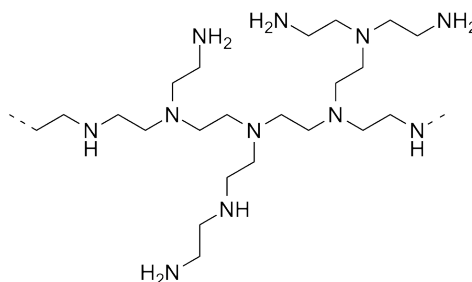
Metody transfekce mohou být založeny na biologickém (přirozená virová či bakteriální infekce), fyzikálním (mikroinjekce, elektroporace, sonoporace, biolistika) či chemickém principu. Z chemických metod je nejlevnější precipitace DNA fosforečnanem vápenatým (Ca₃(PO₄)₂) [90]. Dále mezi chemické metody patří lipofekce (DNA uzavřená v liposomech, které splývají s plazmatickou membránou) [91], tvorba nanočástic – komplexů DNA s polykationty (DEAE-dextran, poly(L-lysin), polyethylenimin [92]), které jsou poté adsorbovány na povrch buňky a endocytovány.

2.3.2.1 Polyethylenimin jako transfekční činidlo

Polyethylenimin (PEI), nazývaný též polyaziridin, je polymer s opakující se jednotkou obsahující aminoskupinu a CH_2CH_2 skupinu. Lineární PEI (IPEI) obsahuje všechny aminy sekundární (viz Obrázek 9 na straně 18), kdežto rozvětvený PEI (bPEI) obsahuje kromě sekundárních aminů i aminy primární a terciární (viz Obrázek 10 na straně 18). Na transfekce se používá více lineární PEI pro svoji vyšší transfekční účinnost a nižší cytotoxicitu.

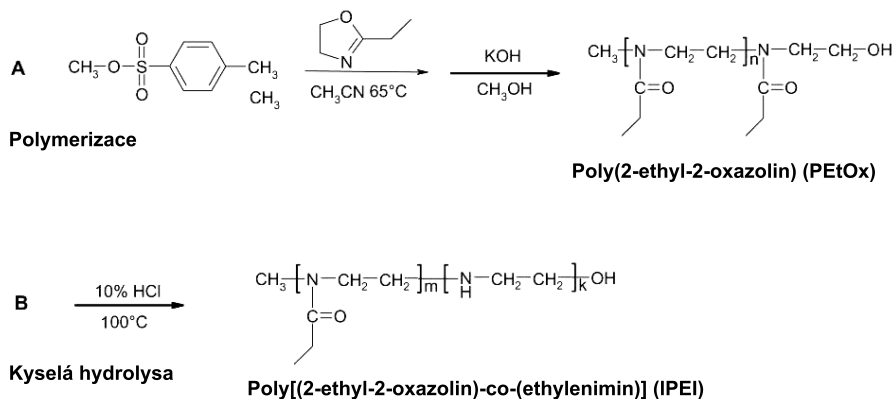


Obrázek 9: Lineární polyethylenimin, nejčastěji používané transfekční činidlo



Obrázek 10: Rozvětvený polyethylenimin

Lineární PEI je syntetisován ve dvou krocích. Nejprve se kationtovou polymerací připraví poly(2-ethyl-2-oxazolin) a tento prekurzor je následně hydrolysován v nadbytku kyseliny chlorovodíkové (viz Obrázek 11 na straně 18). Takto nejprve vzniká kopolymer, s delším reakčním časem se stupeň hydrolysy zvyšuje [93].



Obrázek 11: Příprava lineárního PEI kyselou hydrolysou poly(2-ethyl-2-oxazolinu)
Převzato z [93]

Během transfekce jsou nejprve vytvořeny kladně nabitě komplexy DNA s PEI, které jsou přitahovány k záporně nabitě cytoplasmatické membráně a následně endocytovány. Z těchto endosomů je poté uvolněna DNA do cytoplasmu za přispění efektu „protonové houby“ [94].

2.4 Posttranslační modifikace

Po přeložení mRNA ribosomem mnohdy dochází ještě k posttranslační modifikaci (PTM) vzniklého proteinu. Jedná se o kovalentní modifikace, které pomáhají stabilizovat terciární strukturu či regulují funkci enzymů. PTM jsou také důležité v buněčné signalisaci. Nejčastěji dochází k modifikacím aminokyselin peptidového řetězce adicí nové funkční skupiny, jako je na příklad fosfátová, acetátová či metylová skupina. Fosforylace jsou z PTM nejběžnější a často zajišťují regulaci enzymové aktivity *in vivo*. Mnoho eukaryotních proteinů vyžaduje ke své funkci či stabilitě připojení sacharidových jednotek a podléhají glykosylaci. Připojení lipidické molekuly k proteinu je

často spojeno se zacílením tohoto proteinu k buněčné membráně, která je také lipidická. Označení proteinu ubikvitinem slouží jako signál k degradaci proteinu.

Mezi další formy posttranslační modifikace patří také štěpení původního polypeptidového řetězce či propojování peptidových řetězců přes $-SH$ skupiny cysteinů za vzniku disulfidických můstků.

2.5 Purifikace rekombinantních proteinů

Produkcí proteinu v tkáňových kulturách vzniká směs mnoha proteinu, sacharidů, lipidů a nukleových kyselin. Sérií procesů zvaných proteinová purifikace je možné izolovat z této směsi jediný typ proteinu. Protein by neměl purifikací ztratit svoji aktivitu.

Nejběžnější metodou purifikace rekombinantních proteinů je afinitní chromatografie založená na specifické interakci afinitní značky a matrice. Afinitní značka je již během exprese s proteinem fúzována, a to buď na N- či C-konci. Purifikace probíhá typicky ve třech krocích. Nejprve je protein pomocí afinitní značky zachycen na matrici chromatografické kolony, poté je promýván a ve třetím kroku eluován.

Nejčastěji používané afinitní značky:

- **His-tag** – také známý jako polyhistidinová kotva – je proteinový motiv skládající se alespoň z šesti histidinových zbytků přímo za sebou, které velice dobře chelatují ionty niklu a kobaltu. Právě tato vlastnost se využívá při purifikaci [95]. Jedná se o nejčastěji používaný tag.
- **Avi-Tag** – peptid, který je možné biotinylovat a následně izolovat pomocí streptavidinu [96].
- **FLAG-tag** – peptid rozeznávaný protilátkou [97].
- **Strep-tag** – peptid vázající se na streptavidin nebo modifikovaný streptavidin zvaný streptactin [98].
- **Fc-tag** – odvozený z fc (z angl. fragment crystallizable) domény imunoglobulinu umožňuje purifikaci skrze Protein-A Sepharosu.

Po purifikaci získaného proteinu je tag mnohdy potřeba odstranit – k tomu slouží například proteasa viru tabákové mozaiky (TEV, angl. tobacco etch virus) [99], Thrombin, Factor Xa nebo Enteropeptidasa.

3 Cíle práce

Cílem práce bylo vypracovat metodu pro přípravu rekombinantního proteinu GCPIII v savčích buňkách. K tomu bylo potřeba splnit následující postupné cíle:

- Zavedení kultivace HEK 293–6E v suspenzních podmínkách.
- Optimalizace transfekčních podmínek pro buněčnou linii HEK 293–6E.
- Příprava pěti různých plasmidů s genem pro extracelulární část myší GCPIII (mEXSTII) pro transfekci HEK 293–6E.
- Příprava rekombinantního mEXSTII v buňkách HEK 293–6E z těchto plasmidů a porovnání míry jejich exprese a aktivity.

4 Materiál a Metody

4.1 Chemikálie

Bio–Rad (USA)

All blue standard (Precision Plus Protein Standards), ionex AG[®] 1–X8

Biotika (Česká republika)

ampicilin

Biotium (USA)

GelRed

Finnzymes (Finsko)

Phusion DNA Polymerasa

Invitrogen (USA)

TOPO[®] TA Cloning[®] Kit, TOP10 kompetentní buňky

Lachema (Česká republika)

dihydrogenfosforečnan draselný, glukosa, kyselina mravenčí

New England BioLabs (USA)

restrikční endonukleasy, T₄ DNA–ligasa

Penta (Česká republika)

kyselina chlorovodíková, azid sodný, ethanol, ethanol pro UV spektroskopii, glycerol, hydroxid sodný, chlorid sodný, isopropanol, methanol

Polysciences (USA)

polyethylenimin (PEI)

Qiagen (USA)

GelPilot DNA Weight Marker, MinElute PCR Purification Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, X–Gal

Roth (Německo)

scintilační roztok Rotiszint[®] eco plus

Serva (Německo)

peroxodisíran amonný

Sigma–Aldrich (USA)

bromfenolová modř, EDTA, akrylamid, 2–merkapt ethanol, dodecylsulfát sodný, LB agar, LB medium, sacharosa, TEMED (tetramethylethylendiamin)

ThermoFisher Scientific (USA)

Casein Blocker v TBS, SuperSignal West Femto Chemiluminiscent Substrate

Top–Bio (Česká republika)

PPP Master Mix, deoxyribonukleotidy

United States Biochemical (USA)

N,N'–metylen–bis(akrylamid), Tween 20 (polyoxyetylen sorbitan monolaurate), Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethan)

Zymo Research (USA)

Zippy Plasmid Miniprep Kit

4.2 Buněčné linie, vektory a jiné

Plasmidy:

pTTo–GFPq, pTTo3c–SSH, pTT22SSP4, pTTVH8G, pYD5, pTT28, pYD11 (Y. Durocher, Kanada)

Buněčné linie:

HEK 293–6E (Y. Durocher, Kanada)

Média:

kultivační: Freestyle–293 (Invitrogen, USA)

transfekční: Opti–MEM (ThermoFisher Scientific, USA)

Protilátky:

GCPII–04 (Exbio antibodies, ČR)

sekundární anti–myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou (Pierce, USA)

Programy:

Vector NTI (ThermoFisher Scientific, USA)

4.3 Přístroje

Centrifuga 5415R, **Eppendorf** (Německo)

Centrifuga Allegra X-15R, **Beckman Coulter** (USA)

9450 pH meter, **Unicam** (UK)

Biometra TRIO 48, **Analytik Jena** (SRN)

NanoDrop 1000, **Thermo Scientific** (USA)

laboratorní váhy XA 110/X, **RADWAG** (Polsko)

fluorescenční mikroskop Olympus IX81, **Olympus** (Japonsko)

světelný mikroskop Nikon Eclipse TS 100, **Nikon** (Japonsko)

scintilační kapalinový spektrometr Tri-Carb 2900TR, **Perkin Elmer** (USA)

přístroj na počítání buněk Countess, **Invitrogen** (USA)

rotační inkubátor Innova 44, **Eppendorf** (Německo)

CCD kamera ChemiDoc-It 600, **UVP** (UK)

transiluminátor Quantum ST4, **Vilber** (Německo)

Mini Proban Tetracell, PowerPac HC, **Bio-Rad** (USA)

laminární box Euroflow Serie, typ EF/S, **Telstar** (Španělsko)

4.4 Metody

4.4.1 Příprava DNA s mEXSTII se štěpnými místy metodou PCR

Z plasmidu obsahujícího extracelulární část myši GCPIII (mEXSTII) byl metodou PCR amplifikován jen úsek obsahující mEXSTII a na jeho konce byly přidány úseky DNA kódující místo pro restriční endonukleasy pomocí primerů. Pro každý plasmid byla namíchána reakční směs o objemu 30 μ l obsahující 1x Phusion Buffer HF, 1 μ M kódující a reversní primer dle Tabulky 1 na straně 23 (sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 2 na straně 23), 400 μ M směs deoxyribonukleotidů (dNTPs), templátovou DNA o koncentraci 33 pg/ μ l (pCR TOPO mEXSTII) a Phusion polymerasu (0,6 U). V Tabulce 3 na straně 23 jsou uvedeny reakční podmínky, PCR byla prováděna v přístroji Biometra TRIO 48 (Analytik Jena). Kroky č. 2 až 4 byly pětadvacetkrát opakovány.

Tabulka 1 : Přehled reversních (R) a kódujících (F) primerů pro jednotlivé plasmidy

plasmid	kódující primer	reversní primer
pTT22SSP4	FmEXSTIIXbaI	RmEXSTIIstopBamHI
pTTVH8G	FmEXSTIIBamHI	RmEXSTIIstopXbaI
pYD5	FmEXSTIIBamHI	RmEXSTIIstopEcoRI
pTT28	FmEXSTIIXbaI	RmEXSTIIBamHI
pYD11	FmEXSTIIBamHI	RmEXSTIIXbaI

Tabulka 2 : Sekvence primerů

FmEXSTIIXbaI	5'-aatctagagaacaactacttctgctggttacc-3'
RmEXSTIIstopBamHI	5'-aaaggatccctataacacattggcagtggtcc-3'
FmEXSTIIBamHI	5'-aaaggatccgaacaactacttctgctggttacc-3'
RmEXSTIIstopXbaI	5'-aatctagactataacacattggcagtggtcc-3'
RmEXSTIIstopEcoRI	5'-aaagaattcctataacacattggcagtggtcc-3'
RmEXSTIIBamHI	5'-aaaggatccataacacattggcagtggtccc-3'
RmEXSTIIXbaI	5'-aaaggatccataacacattggcagtggtccc-3'

Tabulka 3 : Reakční podmínky PCR

krok č.	teplota v °C	doba trvání v sekundách
1	98	60
2	98	15
3	50	30
4	72	60
5	72	300

25x

4.4.2 Horizontální agarosová elektroforesa

Elektrodový TAE pufr (50x): 2M Tris, 1M CH₃COOH, 0,05M EDTA, pH 8.0

Vzorkový pufr: 40% (w/v) sacharosa, 0,1 (w/v) bromfenolová modř, 0,02% NaN₃

Příprava agarosového gelu: V 250ml Erlenmayerově baňce bylo připraveno 30 ml 1% roztoku agarosy v TAE pufru – 0,3 g agarosy bylo zahříváno v 30 ml TAE pufru do úplného rozpuštění, poté doplněno do celkového objemu 30 ml destilovanou vodou. Následně byla do roztoku přidána fluorescenční barva GelRed (1:100000) pro vizualizaci DNA.

Roztok agarosy byl nalit do připravené aparatury (Bio-Rad) s příslušnými hřebeny vytvářejícími jamky. Po zatuhnutí byly hřebeny vyjmuty a gel převrstven TAE puftrem. Do jamek byly nanášeny vzorky DNA smíchané se vzorkovacím puftrem v poměru 5:1 a také DNA standard Gel-Pilot 1 kb. Elektroforesa probíhala po dobu 30 minut při napětí 120 V. Po jejím skončení byly fragmenty vizualisovány transiluminátorem Quantum ST4 (Vilber) a vyfoceny.

4.4.3 Izolace DNA z agarosového gelu

Produkty PCR byly vyříznuty pod UV lampou z agarosového gelu a vloženy do 1,5ml zkumavek a DNA izolována dle protokolu „QIAquick Gel Extraction Kit“. Ke gelu bylo přidáno trojnásobné množství QG pufru (600 µl) a směs byla zahřívána 5 minut na 50 °C a poté míchána do úplného rozpuštění. Rozpuštěný gel byl nanesen na Qia Quick spin kolonku a centrifugován 1 minutu při 11000 g. Proteklá tekutina byla vylita. Kolonka byla následně promyta 750 µl PE pufru (dvakrát centrifugace 1 minutu při 11000 g) a poté vložena do čisté 1,5ml zkumavky a DNA z ní eluována 50 µl HPLC H₂O (1 minuta při laboratorní teplotě, poté centrifugace 1 minutu při 11000 g).

4.4.4 Štěpení vektorů a PCR produktů restričními endonukleasami

Pro návrh reakčních podmínek (teplota, čas, pufr) byla použita internetová aplikace „Double Digest Finder“ [100]. V Tabulce 4 na straně 24 jsou shrnuty použité restriční endonukleasy s vhodnými puframi jak pro štěpení plasmidů (vektorů), tak i pro štěpení insertů, které mají být do těchto plasmidů vloženy¹. Jak je vidět, ne všechna štěpení je možno provést současně (odlišný pufr), a tedy musí být nejprve provedeno štěpení jedním enzymem a teprve po pročištění štěpit druhým enzymem v jiném prostředí, tedy sekvenčně.

Všechna štěpení probíhala 1 hodinu při 37 °C v celkovém objemu 50 µl. Reakční směs obsahovala vždy 1 µg DNA, jednu (nebo obě) restriční endonukleasu (dle Tabulky 4) o koncentraci 10 U/50 µl, kde U (unit, jednotka) odpovídá množství enzymu potřebnému ke konverzi 1 µmol substrátu za minutu, a 1x koncentrovaný reakční pufr NEB 3.1, respektive NEB 2.1, jak je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4 : Přehled použitých restričních endonukleas

plasmid	insert				vektor			
	enzym 1	pufr	enzym 2	pufr	enzym 1	pufr	enzym 2	pufr
pTT22SSP4	BamHI	3.1	XbaI	3.1	BamHI	3.1	NheI	2.1
pTTVH8G	BamHI	3.1	XbaI	3.1	BamHI	3.1	NheI	2.1
pYD5	BamHI	3.1	EcoRI	3.1	BamHI	3.1	EcoRI	3.1
pTT28	BamHI	3.1	XbaI	3.1	BamHI	3.1	NheI	2.1
pYD11	BamHI	3.1	XbaI	3.1	BamHI	3.1	XbaI	3.1

4.4.5 Ligace fragmentů mEXSTII a rozštěpených vektorů

Pro ligaci insertů (mEXSTII) s vektory byla namíchána reakční směs o objemu 10 µl, která obsahovala 1x koncentrovaný T4 DNA ligase pufr, 1 µl vektoru, 5 µl insertu a na závěr byl přidán 1 µl T4 DNA ligasy. Jako kontrola byla provedena též nulová ligace, kdy do reakční směsi místo insertu byla přidána voda, a to pro všech pět vektorů. Ligace probíhala při 16 °C přes noc. Následující den byla provedena transformace *E. coli* touto směsí.

4.4.6 Transformace *E. coli* plasmidovou DNA

K 10 µl ligační směsi bylo přidáno 30 µl kompetentních TOP10 buněk a následně byl proveden teplotní šok. Směs byla nejprve inkubována 30 minut na ledu, poté 90 sekund při 42 °C a opět 30 sekund na ledu. Směs byla následně naředěna 300 µl LB média a inkubována 1 hodinu při 37 °C. 250 µl směsi bylo natřeno na agarové plotny obsahující ampicilin, které byly uloženy do 37 °C přes noc. Druhý den byly spočítány narostlé kolonie a v závislosti na počtu narostlých kolonií bylo odebráno 1–6 kolonií od každého plasmidu (viz Tabulka 5 na straně 25). Každá odebraná kolonie byla suspendována v 12,5 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml a přes noc vložena do rotačního inkubátoru s teplotou 37 °C.

4.4.7 Minipreparace plasmidové DNA

Následující den byly buňky centrifugovány při 4000 g po dobu deseti minut a supernatant byl odlit. Peleta byla poté zpracována dle protokolu Zippy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research). Nejprve byla suspendována v 600 µl H₂O a přenesena do 1,5ml zkumavky, k buňkám bylo přidáno 100 µl lyzačního pufru a převrácením zkumavek směs promíchána. Okamžitě bylo přidáno

¹Rozštěpením DNA enzymem XbaI je vytvořen stejný kohezí konec jako při rozštěpení enzymem NheI.

Tabulka 5 : Počty narostlých a odebraných kolonií

	mEXSTII	nulová ligace	odebráno
pTT22SSP4 (3)	21	3	3
pTTVH8G (4)	12	7	3
pYD5 (5)	1	0	1
pTT28 (6)	126	87	6
pYD11 (7)	1	0	1

350 μ l neutralizačního pufru a směs opět důkladně promíchána, dokud nebyla zbarvena zcela žlutě, a centrifugována 3 minuty při 13000 g. Supernatant byl pipetován na Zyppe–Spin kolonky, které byly znovu rychle centrifugovány po dobu 15 sekund a proteklá tekutina byla vylita. DNA na kolonce byla dále promývána nejprve 200 μ l Endo–Wash pufru a dále 400 μ l Zyppe–Wash pufru. Po promytí byla kolonka vložena do čisté 1,5ml zkumavky a DNA eluována 30 μ l HPLC H₂O (30s centrifugace až 1 minutu od napipetování H₂O).

4.4.8 Sekvence vektorů

Každý vektor byl sekvenován natřikrát použitím tří různých primerů – první primer *pYD11 seq FWD* nasedá před hypotetickým začleněním insertu a je kódující, druhý primer *pTT22SSP4 seq R* nasedá za hypotetickým začleněním insertu a je reversní a třetí primer *ZOO 3* nasedá uvnitř insertu a je reversní. Takto by měla být osekvenována celá oblast insertu i přilehlé úseky DNA před i za insertem. Sekvence všech tří primerů jsou uvedeny v Tabulce 6 na straně 25.

K přibližně 450 ng plasmidové DNA (používá se množství DNA v rozmezí od 400 do 500 ng DNA) byl přidán primer tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 2,5 μ M, a směs doplněna vodou do 10 μ l. Sekvenaci provedla firma *GATC Biotech*. Výsledky byly zpracovány v programu Vector NTI.

Tabulka 6 : Sekvence sekvenačních primerů

<i>pYD11 seq FWD</i>	5'–ggggtgagtactcctctca–3'
<i>pTT22SSP4 seq R</i>	5'–cagttggcaagttgtaccaac–3'
<i>ZOO 3</i>	5'–gcctgaagcaattccaagctttgg–3'

4.4.9 Příprava insertu mEXSTII pro plasmid pYD5 (druhý pokus) klonováním do TOPO vektoru

Protože jeden z vektorů se nepodařilo připravit přímým štěpením PCR produktu mEXSTII se štěpnými místy, byl nejprve klonován do TOPO vektoru. Tento PCR produkt byl opatřen tzv. „lepivými konci“ s přesahem deoxyadenosinu na 3' konci za použití PPP Master Mixu (Top Bio), který obsahuje Taq polymerasu, jež je právě syntesy těchto přesahů schopna. K 10 μ l z gelu izolovaného PCR produktu s BamHI a EcoRI místy bylo přidáno 10 μ l 2x PPP Master Mixu. Po 10 minutách při 72 °C byl použit MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) k přečištění DNA. K 20 μ l reakce bylo přidáno 100 μ l PB pufru a celých 120 μ l bylo nanášeno na MinElute kolonku. Směs byla centrifugována 1 minutu při 13000 g, proteklá tekutina byla vylita. Na kolonku bylo nanášeno 750 μ l PE pufru, opět byla provedena centrifugace 1 minutu, proteklá tekutina vylita a kolonka ještě jednou centrifugována pro odstranění zbytků pufru. Kolonka byla následně umístěna do 1,5ml zkumavky. Pro eluci DNA bylo na kolonku nejprve nanášeno 40 μ l destilované vody a po jedné minutě byla provedena minutová centrifugace.

Takto přečištěná DNA byla klonována do pCRTMII–TOPO[®] vektoru podle protokolu TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Invitrogen). K 0,8 μ l DNA bylo přidáno 0,2 μ l roztoku solí (Invitrogen) a 0,2 μ l pCRTMII–TOPO[®] vektoru. Směs byla ponechána 30 minut při laboratorní teplotě.

K 1,2 μ l směsi bylo přidáno 35 μ l TOP10 kompetentních buněk a teplotním šokem byla provedena transformace. Ke směsi bylo přidáno 300 μ l LB média a ponecháno 1 hodinu při 37 °C. Na agarosovou plotnu obsahující ampicilin bylo nanášeno 40 μ l X–Gal² (40 ng/ml) a po vyschnutí

²X–Gal, neboli 5–bromo–4–chloro–3–indolyl– β –D–galaktopyranosid, je analogem laktosy a pokud je rozštěpen, necukernatá složka kondenzuje za vzniku intenzivně modrého 5,5'–dibromo–4,4'–dichloro–indiga. Buňky se správně klonovaným insertem nemají schopnost štěpit laktosu, tedy ani X–Gal, neboť klonovací místo je uvnitř genu nutného pro správnou funkci β –galaktosidasy. Kolonie s klonovaným insertem tedy budou bílé, bez insertu budou modré.

bylo naneseno 300 μ l buněčné směsi a plotny byly inkubovány při 37 °C přes noc. Následující den byly odebrány 4 bílé kolonie, každá do 12,5 ml LB média s ampicilinem. Následovala inkubace přes noc při 37 °C a následující den byla provedena minipreparace DNA. Poté následovalo štěpení restričními endonukleasami. Další postup byl shodný s přípravou ostatních vektorů.

4.4.10 Příprava roztoku IPEI na transfekce

50 mg IPEI bylo rozpuštěno v přibližně 40 ml HPLC H₂O, pH upraveno HCl na hodnotu 2,0 a směs byla míchána do rozpuštění. Následně bylo pH upraveno na 7,0 a doplněno vodou do 50 ml. Výsledná koncentrace IPEI tedy je 1 mg/ml.

4.4.11 Transfekce HEK 293–6E připravenými plasmidy

Veškerá práce s buňkami HEK 293–6E byla prováděna v laminárním boxu, aby se zamezilo kontaminaci. Transfekce v malém objemu byly prováděny na destičkách se šesti jamkami. Den před plánovanou transfekcí byly buňky naředěny tak, aby v den transfekce měly hustotu přibližně 1,7·10⁶ buněk na mililitr. Do každé jamky bylo napipetováno 1,8 ml buněk. Dřívějšími experimenty bylo zjištěno, že nejlepšími výsledky transfekce je dosahováno pokud poměr DNA:PEI je 1:7. K 95 μ l transfekčního média OPTIMEM v 1,5ml zkumavce byly přidány 2 μ g DNA a poté 14 μ l roztoku IPEI (o koncentraci 1 mg/ml). Směs byla ponechána v boxu při laboratorní teplotě 10 minut a poté byl veškerý objem zkumavky pipetován k buňkám. Destičky s buňkami byly umístěny do rotačního inkubátoru (120 rpm) temperovaného na 37 °C s 5% atmosférou CO₂. Pro expresi proteinů je doporučena produkce buňkami 3 až 5 dní.

4.4.12 Sklizení HEK 293–6E

Pro porovnání míry exprese s časem byly buňky sklizeny postupně, a to po 72, 96 a 120 hodinách. Po 120 hodinách byly buňky zcela sklizeny.

Protože buňky mají schopnost částečně adherovat na stěny destiček, nejprve byly suspendovány pipetou. Poté bylo do 1,5ml zkumavky odebráno 500 μ l buněk. Ty byly nejprve centrifugovány 2 minuty při 1200 rpm pro odstranění buněk, médium bylo následně centrifugováno 10 minut při 13000 g. Supernatant byl uchováván před dalšími pokusy při –20 °C.

4.4.13 Polyakrylamidová SDS elektroforesa za redukujících a denaturujících podmínek

Vzorkový pufr (6x): 350mM Tris/HCl (pH 6,8), 30% (v/v) glycerol, 2mM 2–merkptoethanol, 350mM SDS, 180 μ M bromfenolová modř

Elektrodový pufr (5x): 140mM Tris/HCl (pH 8,8), 1,4M glycin, 20mM SDS

Zaostřovací gel (6%): 250mM Tris/HCl (pH 6,8), 6,6% akrylamid, 0,1% (w/v) SDS, 0,2% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS

Separáčnı gel (11%): 375mM Tris/HCl (pH 8,8), 11% akrylamid, 0,1% (w/v) SDS, 0,2% (v/v) TEMED, 0,1% (w/v) APS

K 15 μ l média z transfekovaných buněk byly přidány 3 μ l vzorkového pufru a tato směs byla inkubována 5 minut při 96 °C, aby byly proteiny přítomné v médiu zcela denaturovány. Vertikální elektroforesa všech vzorků byla prováděna 40 minut při napětí 200 V, jako DNA standard byl použit All blue marker (Bio–Rad).

4.4.14 Elektropřenos a imunodetekce GCPIII

Elektrodový přenosový pufr: 192mM glycin, 25mM Tris/HCl, 10% (v/v) methanol

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

Po skončení elektroforesy byl gel nejprve omyt v přenosovém pufru, rovněž nitrocelulosaová membrána byla v tomto pufru omyta, a poté gel na membráně byl obklopen v pufru namočenými filtračními papíry a umístěn do cely Mini Trans–Blot (Bio–Rad). Přenos proteinů na membránu probíhal 60 minut při napětí 100 V v aparatuře od firmy Bio–Rad.

Nitrocelulosaová membrána byla následně blokována 5 ml roztoku kaseinu v PBS (Casein Blocker 1:500). Po jedné hodině byla do blokovacího roztoku k membráně přidán 1 μ g myší primární protilátky GCPII–04 a inkubována přes noc při 4 °C. Následující den byla membrána třikrát

promyta roztokem PBS s 0,05% Tweenem 20. Poté byla uložena na jednu hodinu do roztoku kaseinu v PBS (1:250000) se sekundární proti myší protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidasou (α -M-HRP). Poté byla opět třikrát promyta roztokem PBS+0,05% Tween 20 a následně vyvolána soupravou SuperSignal West Femto (Thermo Scientific), chemiluminiscenční signál byl zachycen CCD kamerou ChemiDoc-It 600 (UVP). Pro odhad relativního množství proteinu pro jednotlivé klony a časy sběru byl použit program ImageJ.

4.4.15 Stanovení aktivity GCPIII s použitím radioaktivně značeného substrátu BCG

Reakční pufr: 20mM Tris/HCl (pH 7,4), 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0,1% Tween 20

Pufr k zastavení reakce (STOP pufr): 200mM KH₂PO₄, 2mM 2-merkptoethanol (pH 7,4)

Substrát: 50nM [3H]BCG značený tritiem na C3 a C4 uhlících skeletu glutamátu (BCG, [GLUTAMATE -3, 4- ³H]), 950nM BCG

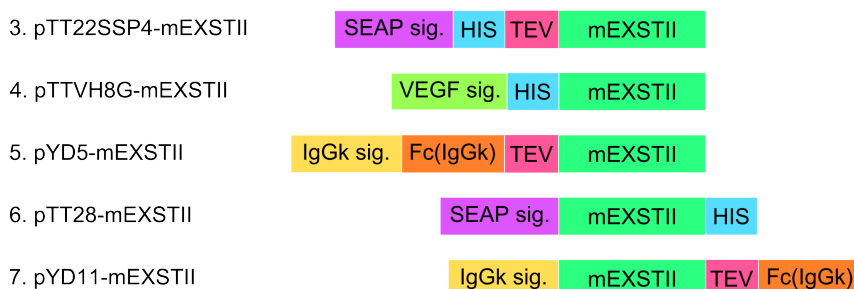
Protože největší množství proteinu obsahovala vždy média z buněk sklizených po 120 hodinách, dále se pracovalo již jen s nimi. Jako negativní kontrola sloužilo médium z buněk transfekovaných plasmidem s genem pro GFP, pro stanovení maximální aktivity enzymu byla použita extracelulární část lidské GCPIII značená Avi tagem (h-AviEXSTII).

K 10 μ l média v 1,5ml zkumavce bylo přidáno 80 μ l pufru. Enzymová reakce byla startována přidáním 10 μ l substrátu a promícháním, poté byly vzorky na 60 minut umístěny do 37 °C.

Ionexová chromatografie: Do skleněných Pasteurových pipet byla vložena skleněná kulička a poté pipetovány 2 ml nosiče AG 1-X8 (Bio-Rad) suspendovaného 1:1 s odvzdušněnou destilovanou vodou (ddH₂O). Poté byla kolona dvakrát promyta přibližně 1,3 ml ddH₂O. Na takto připravenou kolonu bylo nanášeno 200 μ l reakční směsi. Do scintilačních lahvíček bylo dáno 6 ml scintilačního roztoku Rotiszint[®] eco plus (Roth) a do nich eluován na ionexu zachycený glutamát přidávkem dvakrát 1,25 ml 1M HCOOH. Obsah scintilačních lahvíček byl důkladně promíchán a scintilace změřena kapalinovým scintilačním spektrometrem Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer).

5 Výsledky

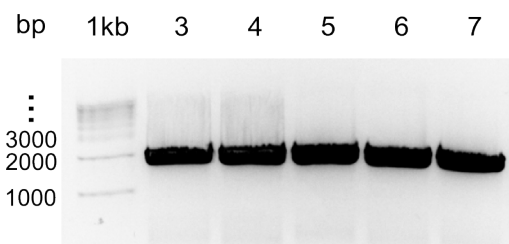
Hlavním cílem bylo vytvořit pět plasmidů pro transfekci buněk HEK 293–6E s genem pro extracelulární část myši GCPIII a dále mezi sebou porovnat množství a aktivitu vzniklých proteinů. Plasmidy se mezi sebou liší v použité značce pro afinitní chromatografii a jejím umístění buď na N– či C– konci proteinu, dále v přítomnosti či nepřítomnosti místa pro odštěpení této značky proteasou viru tabákové mozaiky (TEV, angl. tobacco etch virus) a v signální sekvenci pro sekreci (SEAP – sekretovaná alkalická fosfatasa, VEGF – vaskulární endoteliální růstový faktor, IgGκ – κ řetězec lidské protilátky IgG). Schematické znázornění podstatné části plasmidu s již klonovaným mEXSTII je na Obrázku 12 na straně 28. Plasmidy spolu s plasmidy pro testování účinnosti transfekce (plasmidy s genem pro GFP – zelený fluorescenční protein a SEAP – sekretovaná alkalická fosfatasa) poskytl Yves Durocher (Kanada). Pro zjednodušení práce byly plasmidy očíslovány, a to takto: 1. pTTo–GFPq (test transfekce, GFP), 2. pTTo3c–SSH (test transfekce, SEAP), 3. pTT22SSP4, 4. pTTVH8G, 5. pYD5, 6. pTT28, 7. pYD11.



Obrázek 12: Schematické znázornění plasmidů. mEXSTII: extracelulární část myši GCPIII; SEAP sig.: signální peptid pro sekreci sekretované alkalické fosfatasy; VEGF sig.: signální peptid pro vaskulární endoteliální růstový faktor; IgGκ sig.: signální peptid z κ řetězce lidské protilátky IgG; TEV: rozpoznávací sekvence pro proteasu viru tabákové mozaiky; HIS: histidinová kotva; Fc(IgGκ): Fc část κ řetězce lidské protilátky IgG

5.1 Příprava DNA s mEXSTII se štěpnými místy metodou PCR

Metodou PCR byl amplifikován z templátové DNA úsek obsahující gen pro mEXSTII (pCR TOPO mEXSTII, připravený v naší laboratoři), pro každý plasmid s rozdílnými štěpnými místy na 5' a 3' konci. Agarosovou elektroforezou byla rozdělena směs různě dlouhých částí DNA dle velikosti (viz Obrázek 13 na straně 28). Gen pro mEXSTII je velký přibližně 2000 bp, fragmenty o této velikosti byly vyříznuty z gelu a přečištěny. Dle síly proužků na agaru můžeme usoudit, že amplifikace proběhla úspěšně ve všech případech.



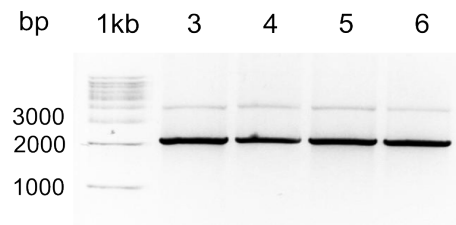
Obrázek 13: Agarosová elektroforeza po PCR. V první jamce je nanesen DNA standard GelPilot 1 kb, který zobrazuje rozmezí 1000 až 10000 bp (proužek každých 1000 bp), v dalších pěti jamkách označených čísly 3 až 7 jsou konstrukty mEXSTII s kombinací štěpných míst vhodných pro následné klonování do plasmidů 3 až 7. Fragmenty o velikosti přibližně 2000 bp byly vyříznuty.

5.2 Štěpení vektorů a PCR produktů restrikními endonukleasami

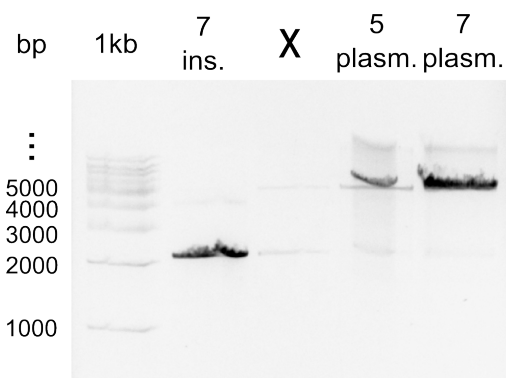
Plasmidy 3 až 7 i fragmenty 3 až 7 získané PCR byly štěpeny restrikními endonukleasami (viz Tabulka 4 na straně 24). Po štěpení byla opět provedena agarosová elektroforeza pro oddělení rozštěpených a nerozštěpených plasmidů, respektive pro oddělení malých fragmentů z konců insertů. V případě insertů byly opět vyřezávány proužky o velikosti přibližně 2000 bp, v případě

plasmidů se velikosti rozštěpených plasmidů mírně liší, avšak všechny se pohybují okolo 5000 bp. Jelikož všechny inserty a také plasmidy 5 a 7 bylo možno štěpit současně dvěma restrikcími endonukleasami, ale plasmidy 3, 4 a 6 bylo nutné štěpit sekvenčně, nejsou všechny plasmidy na jednom gelu.

Úspěšnost štěpení insertů není možné zhodnotit na základě výsledků elektroforesy (viz Obrázek 14 na straně 29), neboť odštěpované části byly velmi malé a na gelu tedy není vidět rozdíl mezi rozštěpeným a nerozštěpeným insertem. Správnost štěpení plasmidů 5 a 7 není zaručena (proužky jsou velice rozmazané – viz Obrázek 15 na straně 29) a obzvlášť u plasmidu 5 je množství rozštěpené části velmi malé. Sekvenční štěpení plasmidů 3, 4 a 6 dopadlo v pořádku (usuzováno dle síly proužku odpovídající velikosti přibližně 5000 bp – viz Obrázek 16 na straně 30),.



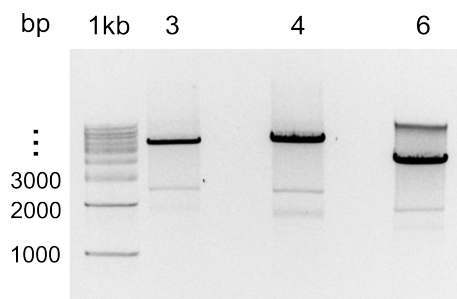
Obrázek 14: Agarosová elektroforesa po štěpení. V první jamce je nanesen DNA standard GelPilot 1 kb, který zobrazuje rozmezí 1000 až 10000 bp (proužek každých 1000 bp), v dalších čtyřech jamkách označených čísly 3 až 6 jsou konstrukty mEXSTII s kombinací štěpných míst vhodných pro následné klonování do plasmidů 3 až 6 (štěpen 1 μ g DNA). Fragmenty o velikosti přibližně 2000 bp byly vyříznuty.



Obrázek 15: Agarosová elektroforesa po štěpení. V první jamce je nanesen DNA standard GelPilot 1 kb, který zobrazuje rozmezí 1000 až 10000 bp (proužek každých 1000 bp), v další jamce označené 7 *ins.* je nanesen konstrukt mEXSTII s kombinací štěpných míst vhodných pro následné klonování do plasmidu 7 – zde byl vyříznut proužek odpovídající velikosti 2000 bp. Další dráha byla vynechaná, a poté následují dvě jamky označené 5 *plasm.* a 7 *plasm.* obsahující rozštěpené plasmidy 5 a 7 – zde byly vyříznuty proužky odpovídající velikosti 5000 bp. Štěpen 1 μ g DNA.

5.3 Ligace fragmentů mEXSTII a rozštěpených vektorů

Po extrakci plasmidů a insertů obsahujících gen pro mEXSTII z gelu byla provedena ligace. Kromě toho byla provedena též kontrolní ligace, kdy do směsi nebyl vložen insert. Všemi těmito deseti vzorky byly transformovány *E. coli*, a protože všechny vektory obsahují gen zajišťující resistenci na antibiotikum ampicilin, byly kultivovány na Petriho miskách s agarem obsahujícím ampicilin. Následující den byly spočítány narostlé kolonie na jednotlivých miskách (viz Tabulka 5 na straně 25) a vybrané kolonie dále kultivovány. Na miskách s plasmidem 5 a plasmidem 7 narostla pouze jediná kolonie, tedy byla odebrána, na miskách bez insertu nevyrostlo nic. Na miskách s plasmidem 3 a 4 byl výrazný rozdíl v počtu kolonií narostlých na misce s insertem a bez insertu, z misek s insertem tedy byly odebrány 3 klony od každého plasmidu. Avšak *E. coli* transformované plasmidem 6 vytvořily mnoho kolonií jak na miskách s insertem, tak na miskách bez insertu, bylo tedy odebráno 6 klonů. Odebrané klony byly pojmenovány 3.1, 3.2, 3.3, 4.1, atd., tedy první číslice označuje plasmid, číslice za tečkou označuje konkrétní klon. Všechny misky byly dále skladovány při 4 °C pro případ, že by žádná odebraná kolonie neobsahovala správně klonovaný plasmid.



Obrázek 16: Agarosová elektroforesa po štěpení. V první jamce je nanesen DNA standard GelPilot 1 kb, který zobrazuje rozmezí 1000 až 10000 bp (proužek každých 1000 bp), v dalších jamkách označených čísly 3, 4 a 6 jsou rozštěpené plasmidy 3, 4 a 6 (štěpen 1 μg DNA). Fragmenty o velikosti přibližně 5000 bp byly vyříznuty.

Množství a čistota minipreparované DNA byla stanovena měřením absorbance na přístroji NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Koncentrace je určována z hodnoty absorbance při 260 nm, čistota DNA z poměru absorbance při 260 nm/280 nm – pro čistou DNA by tento poměr měl být přibližně 1,8. S vyšší kontaminací proteinem se tento poměr snižuje v důsledku absorbance proteinů při 280 nm. Pro kontaminaci jinými látkami než proteiny s absorpčním maximem při 280 nm se také měří absorbance při 230 nm (například znečištění fenolem). Poměr absorbance 260 nm/230 nm by měl pro čistou DNA být 2,0 až 2,2. V tabulce 7 na straně 30 je uvedena jak koncentrace DNA pro jednotlivé klony, tak oba důležité poměry indikující míru znečištění.

Tabulka 7 : Koncentrace a čistota připravených klonů měřená na přístroji NanoDrop 1000

klon	$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	260/280	260/230	klon	$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$	260/280	260/230
3.1	657	1,74	1,41	6.1	368	1,79	1,68
3.2	527	1,79	1,87	6.2	392	1,79	1,68
3.3	514	1,74	1,57	6.3	432	1,78	1,66
4.1	657	1,87	2,35	6.4	416	1,79	1,84
4.2	719	1,89	2,43	6.5	419	1,75	1,48
4.3	651	1,87	2,28	6.6	466	1,68	1,27
5	437	1,79	1,70	7	591	1,81	2,03

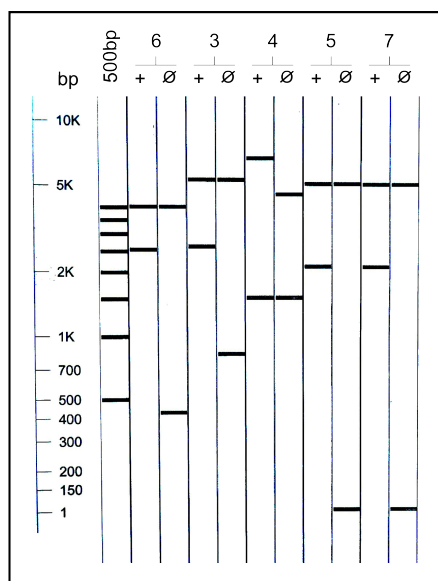
5.4 Kontrolní štěpení vektorů

Pro kontrolu správnosti klonování insertů do plasmidů byla nejprve zvolena metoda kontrolního štěpení. Přehled použitých restričních endonukleas je uveden v Tabulce 8 na straně 30 spolu s pufrům potřebným pro správnou činnost enzymu. Pro návrh reakčních podmínek (teplota, čas, pufr) byla použita internetová aplikace „Double Digest Finder“ [100]. Je vidět, že všechny dvojice enzymů vyžadují stejné podmínky, tedy je možné provést štěpení současně oběma enzymy. Podmínky kontrolního štěpení byly stejné jako v případě štěpení insertů v kapitole 4.4.4. Vzorby byly analysovány agarosovou elektroforesou a porovnány s predikcí vytvořenou v programu VectorNTI (viz Obrázek 17 na straně 31).

Tabulka 8 : Přehled použitých restričních endonukleas pro kontrolní štěpení vytvořených plasmidů

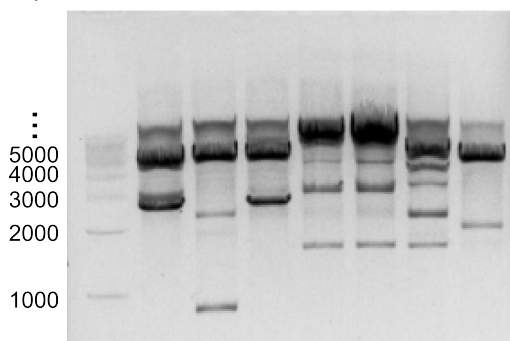
plasmid	enzym 1	pufr 1	enzym 2	pufr 2
pTT22SSP4	BamHI	3.1	XhoI	3.1
pTTVH8G	BamHI	3.1	SalI	3.1
pYD5	BamHI	3.1	EcoRI	3.1
pTT28	BamHI	3.1	XhoI	3.1
pYD11	BamHI	3.1	XbaI	3.1

Porovnáním záznamu z elektroforesy s predikcí můžeme usoudit, že v pořádku jsou pravděpodobně klony 3.1, 3.3, 4.1, 4.2, 5, 6.4 a 7 (Obrázek 18 na straně 31 a Obrázek 19 na straně 32).



Obrázek 17: Predikce kontrolního štěpení v programu VectorNTI. V první dráze je 500bp DNA standard, dráhy 2 až 11 znázorňují štěpení jednotlivých plasmidů jednak se klonovaným genem pro mEXSTII (+), jednak bez klonovaného genu (Ø). Dráhy 2 a 3 – pTT28 (6), 4 a 5 – pTT22SSP4 (3), 6 a 7 – pTTVH8G (4), 8 a 9 – pYD5 (5), 10 a 11 – pYD11 (7).

bp 1kb 3.1 3.2 3.3 4.1 4.2 4.3 5



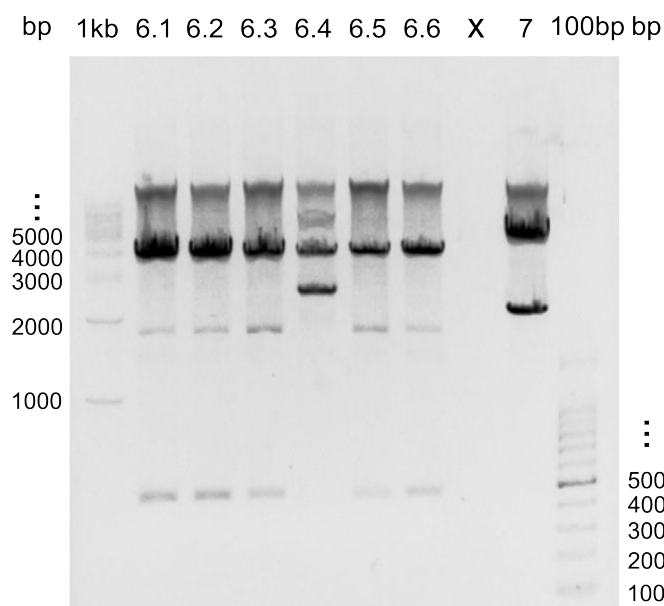
Obrázek 18: Agarosová elektroforesa – kontrolní štěpení. V první jamce je nanesen DNA standard GelPilot 1 kb, který zobrazuje rozmezí 1000 až 10000 bp (proužek každých 1000 bp). Další jamky jsou označeny názvy jednotlivých klonů (štěpen 1 µg DNA).

5.5 Sekvence vektorů

Z připravených klonů, které dle kontrolního štěpení se zdály správné, byly pro sekvenování vybrány klony 3.3, 4.2, 5, 6.4 a klon 7. Sekvenaci provedla firma *GATC Biotech* a v programu VectorNTI byla ověřena správnost jednotlivých klonů. Klony 3.3, 6.4 a 7 byly v pořádku, klon 4.2 vykazoval bodovou mutaci, která však nevyústí v záměnu aminokyseliny, a v klonu 5 nebyl dle sekvenace začleněn insert. Plasmid 5 byl tedy připraven znovu.

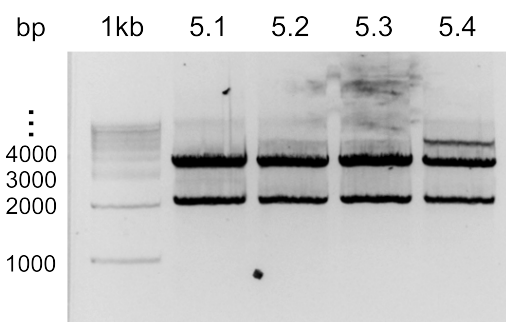
5.6 Příprava insertu mEXSTII pro plasmid pYD5 (druhý pokus) klonováním do TOPO vektoru

Pro přípravu plasmidu 5 s insertem mEXSTII byl nejprve využit amplifikovaný úsek s genem pro mEXSTII, o jehož přípravě hovořím v kapitole 4.4.1. Tento úsek DNA byl klonován do pCR™ II–TOPO® vektoru a osekvenován. Sekvence odhalila chybně amplifikované místo rozeznávané restriktivní endonukleasou. Příprava úseku DNA s genem pro mEXSTII se štěpnými místy na obou stranách metodou PCR byla zopakována a tento úsek byl opět klonován do pCR™ II–TOPO® vektoru, připraveným vektorem byly transformovány *E. coli* a ty kultivovány na Petriho miskách ošetřených ampicilinem a pomocí X–Gal byly rozlišeny kolonie s vektorem od těch bez vektoru. Následující den byly odebrány 4 bílé kolonie, které byly dále kultivovány a plasmidová



Obrázek 19: Agarosová elektroforesa – kontrolní štěpení. V první jamce je nanesen DNA standard GelPilot 1 kb, který zobrazuje rozmezí 1000 až 10000 bp (proužek každých 1000 bp). Další jamky jsou označeny názvy jednotlivých klonů (štěpen 1 μ g DNA). V poslední jamce je nanesen DNA standard GelPilot 100 bp Plus, který zobrazuje rozmezí 100 bp až 1000 bp s rozestupem 100 bp (tučně vyznačeno 500 bp) a nejvyšší proužek zobrazuje 1500 bp.

DNA poté purifikována minipreparací. Klony byly pojmenovány 5.1, 5.2, 5.3 a 5.4. Následovalo štěpení plasmidů restrikními endonukleasami BamHI a EcoRI (viz Obrázek 20 na straně 32).



Obrázek 20: Agarosová elektroforesa – štěpení pCRTM II-TOPO[®] vektoru s klonovanými inserty. V první jamce je nanesen DNA standard GelPilot 1 kb, který zobrazuje rozmezí 1000 až 10000 bp (proužek každých 1000 bp). Další jamky jsou označeny názvy jednotlivých klonů (štěpen 1 μ g DNA).

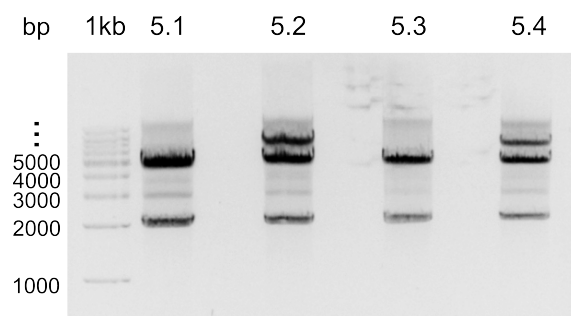
Fragmenty o velikosti 2000 bp byly vyříznuty a extrahovány z gelu. Vzorek 5.1 byl ligován s rozštěpeným vektorem pYD5. Následující postup byl shodný s přípravou ostatních plasmidů. Tedy po ligaci byly transformovány bakterie *E. coli* a kultivovány na Petriho misce s agarem ošetřeným ampicilinem. Následující den byly odebrány a dále kultivovány 4 kolonie (na misce vyrostlo přibližně 80 kolonií, na misce s nulovou ligací 2 kolonie), které byly označeny 5.1, 5.2, 5.3 a 5.4.

Všechny klony byly kontrolně štěpeny restrikními endonukleasami BamHI a EcoRI v prostředí pufru NEB3.1 po dobu jedné hodiny při 37 °C a analysovány agarosovou elektroforesou (viz Obrázek 21 na straně 33).

Klony 5.1 a 5.3 byly odeslány na sekvenaci, oba byly klonované správně, dále však bylo pracováno již jen s klonem 5.3, neboť zde měla plasmidová DNA vyšší čistotu.

5.7 Transfekce HEK 293–6E

Pro optimalizaci transfekčních podmínek byl použit plasmid pTTo-GFPq, který produkuje zelený fluorescenční protein (GFP). Dle doporučení by měl být poměr DNA:PEI mezi 1:2 a 1:3. Nej-



Obrázek 21: Agarosová elektroforesa – kontrolní štěpení. V první jamce je nanesen DNA standard GelPilot 1 kb, který zobrazuje rozmezí 1000 až 10000 bp (proužek každých 1000 bp). Další jamky jsou označeny názvy jednotlivých klonů (štěpen 1 μ g DNA).

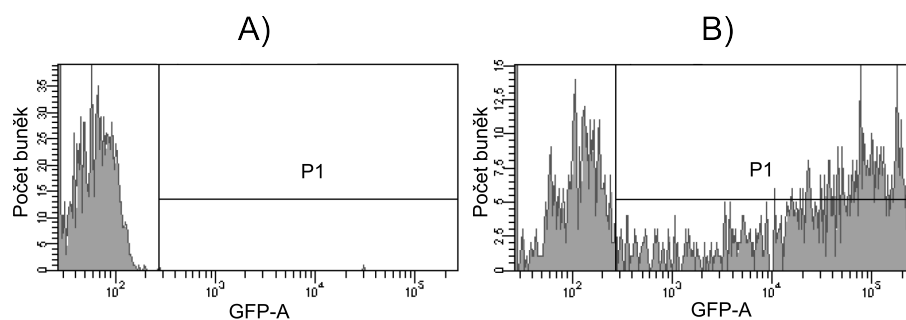
prve tedy byly buňky transfekovány s poměrem DNA:PEI 1:2, 1:2,5 a 1:3. Účinnost transfekce byla stanovována průtokovou cytometrií (FACS, z angl. Fluorescence-Activated Cell Sorting). Vzhledem k tomu, že účinnost transfekce se neustále zvyšovala, v následujícím experimentu byly použity poměry DNA:PEI 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 a 1:10, jako negativní kontrola byly použity buňky transfekované plasmidem pTT22SSP4-mEXSTII.

V Tabulce 9 na straně 33 jsou uvedeny počty živých buněk, účinnost transfekce a průměr fluorescence GFP ze všech živých buněk. Na základě těchto dat byl pro další transfekce zvolen poměr DNA:PEI 1:7 (viz Obrázek 22 na straně 33).

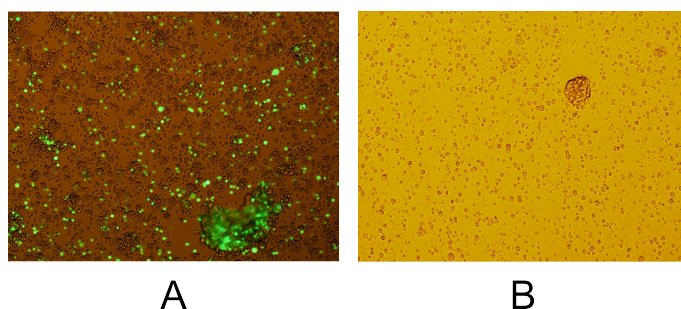
Fluorescence GFP byla též detekována fluorescenčním mikroskopem (viz Obrázek 23 na straně 34).

Tabulka 9 : Optimalizace poměru DNA:PEI průtokovou cytometrií. V prvním sloupci jsou uvedeny poměry DNA:PEI, NC znamená negativní kontrolu, kdy buňky nebyly transfekovány GFP. V dalším sloupci jsou uvedeny počty živých buněk, které FACS detekoval. Poté účinnost transfekce, tedy % buněk, které vykazovaly fluorescenci odpovídající GFP vzhledem ke všem živým buňkám. V posledním sloupci je uveden průměr hodnot fluorescence GFP ze všech živých buněk.

DNA:PEI	Živých buněk	Účinnost transfekce	Průměr fluorescence GFP
NC	1181	0,1	77
1:2	1281	3,0	939
1:3	1382	3,3	2838
1:4	1333	19,8	16203
1:5	1500	48,1	37879
1:6	1437	49,1	40157
1:7	1427	50,7	41174
1:8	1469	52,3	39895
1:9	322	52,5	43802
1:10	1697	53,4	37783



Obrázek 22: Transfekce GFP. Záznam z průtokové cytometrie buněk HEK 293-6E 24 hodin po transfekci. A) negativní kontrola B) buňky transfekované plasmidem s GFP (DNA:PEI 1:7). Na svislé ose grafů je vyneseno počet buněk, na vodorovné ose relativní fluorescence GFP.

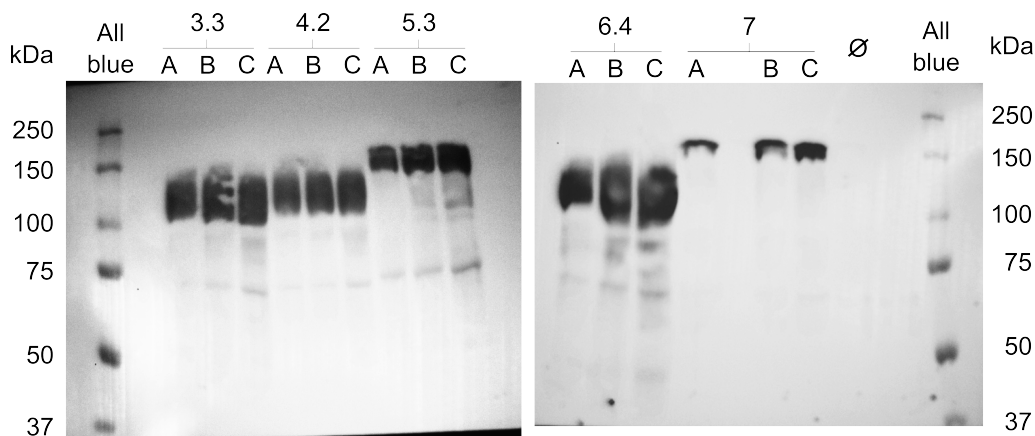


Obrázek 23: Buňky HEK 293–6E tři dny po transfekci. A) Buňky transfekované plasmidem s GFP, B) buňky transfekované plasmidem neobsahujícím GFP. Fluorescence byla detekována fluorescenčním mikroskopem Olympus IX81.

Pro přípravu proteinu mEXSTII byly buňky transfekovány plasmidy 3.3, 4.2, 5.3, 6.4 a 7 s poměrem DNA:PEI 1:7. Buňky byly sklizeny v čase 3, 4 a 5 dnů po transfekci, aby bylo možné porovnat vývoj množství mEXSTII v čase. Sklizená média byla označena stejně jako plasmidy, kterými byly buňky transfekovány, a písmenem A, B nebo C, kde A: exprese proteinu buňkami 72 hodin, B: exprese proteinu buňkami 96 hodin, C: exprese proteinu buňkami 120 hodin. Média byla před další analýsou uložena do -20°C .

5.8 Polyakrylamidová SDS elektroforesa, elektropřenos a imunodetekce mEXSTII

Proteiny v médiích byly rozděleny nejprve polyakrylamidovou SDS elektroforesou za redukujících a denaturujících podmínek, poté přeneseny na nitroceluloseovou membránu. Protilátkou GCPII–04 byl imunodetekován mEXSTII, pomocí sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidasou a soupravy WestFemto (Thermo Scientific) byly proteiny vizualizovány a chemiluminiscenční signál byl zachycen CCD kamerou ChemiDoc–It 600 (UVP) (viz. Obrázek 24 na straně 34).



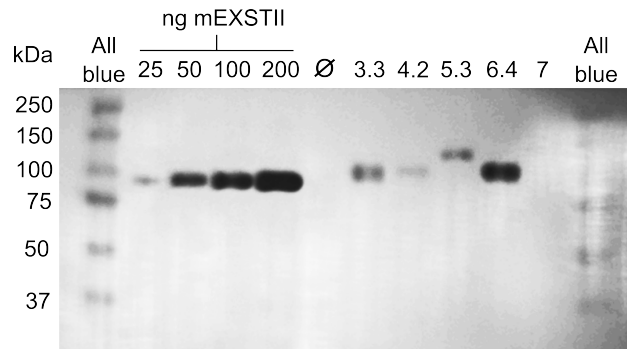
Obrázek 24: Imunodetekce mEXSTII v médiích. Jamky jsou označeny názvem klonu a písmeny A, B, C, kde A: exprese proteinu buňkami 72 hodin, B: exprese proteinu buňkami 96 hodin, C: exprese proteinu buňkami 120 hodin. Symbol \emptyset značí médium z buněk transfekovaných plasmidem pTTo–GPq (negativní kontrola). Vzorky byly nanášeny v množství odpovídajícím 15 μl média. Pro odhad velikostí je též nanášen standard velikostí All blue.

Je vidět, že pro každý klon platí, že největší množství proteinu je ve vzorku C, tedy v médiích sklizených po 120 hodinách. Další analýza byla prováděna již jen s těmito vzorky. Zároveň je vidět, že v médiích z buněk transfekovaných plasmidy 3.3, 4.2, 5.3 a 6.4 je velké množství proteinu na rozdíl od buněk transfekovaných plasmidem 7. Protein produkovaný z plasmidů 5.3 a 7 má vyšší hmotnost kvůli objemné Fc značce.

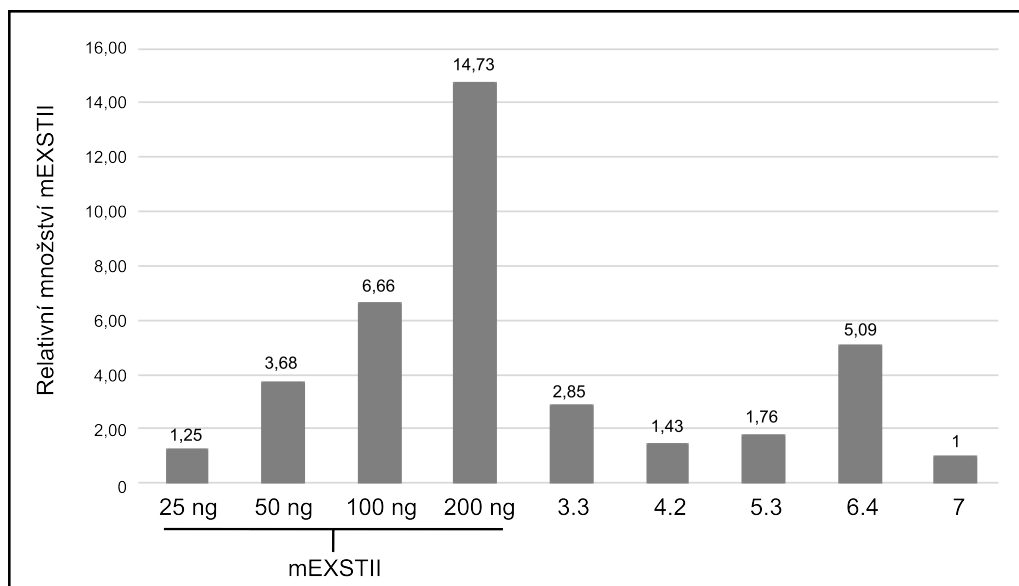
Poté byl experiment proveden ještě jednou s desetkrát nižší nanáškou média na gel, již jen pro porovnání médií z buněk sklizených po 120 hodinách. Z gelu byly proteiny opět přeneseny na nitroceluloseovou membránu a detekovány primární protilátkou GCPII–04, sekundární proti-

látkou konjugovanou s křenovou peroxidasou a vyvolány soupravou West Femto (viz Obrázek 25 na straně 35)).

Při tomto množství již mEXSTII z plasmidu 7 prakticky není vidět, nejvíce je mEXSTII exprimována z buněk transfekovaných plasmidem 6.4. V programu ImageJ byla pro jednotlivé proužky odpovídající mEXSTII na membráně spočítána suma hodnot pixelů pro odhad množství proteinu v jednotlivých proužcích. Na Obrázku 26 na straně 35 je porovnání relativního množství enzymu v jednotlivých proužcích. Proložení kalibrační řady přímkou bylo vypočteno množství mEXSTII na membráně v ng a poté koncentrace mEXSTII v médiích – 3.3 (25,1 ng/μl), 4.2 (12,6 ng/μl), 5.3 (15,5 ng/μl), 6.4 (44,8 ng/μl), 7 (8,8 ng/μl). Hodnota pro plasmid 7 je velice nepřesná, neboť množství mEXSTII bylo mimo kalibrační řadu.



Obrázek 25: Imunodetekce mEXSTII v médiích po 120 h. V první jamce je nanesen standard velikostí proteinů All blue. Další 4 jamky obsahují koncentrační řadu standardu mEXSTII (25 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng). V dalších jamkách jsou nanesena média označená názvy klonů z exprese proteinu buňkami 120 hodin. Symbol Ø značí médium z buněk transfekovaných plasmidem pTTo-GPq (negativní kontrola). Nanesen vzorek odpovídající 1,5 μl média.



Obrázek 26: Semikvantitativní stanovení množství mEXSTII v médiích. První čtyři vzorky na vodorovné ose tvoří kalibrační řadu mEXSTII (25 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng), následují vzorky označené názvy klonů. Na svislé ose je relativní množství proteinu vztažené ke vzorku s nejmenším množstvím proteinu. (Hodnoty získané programem ImageJ)

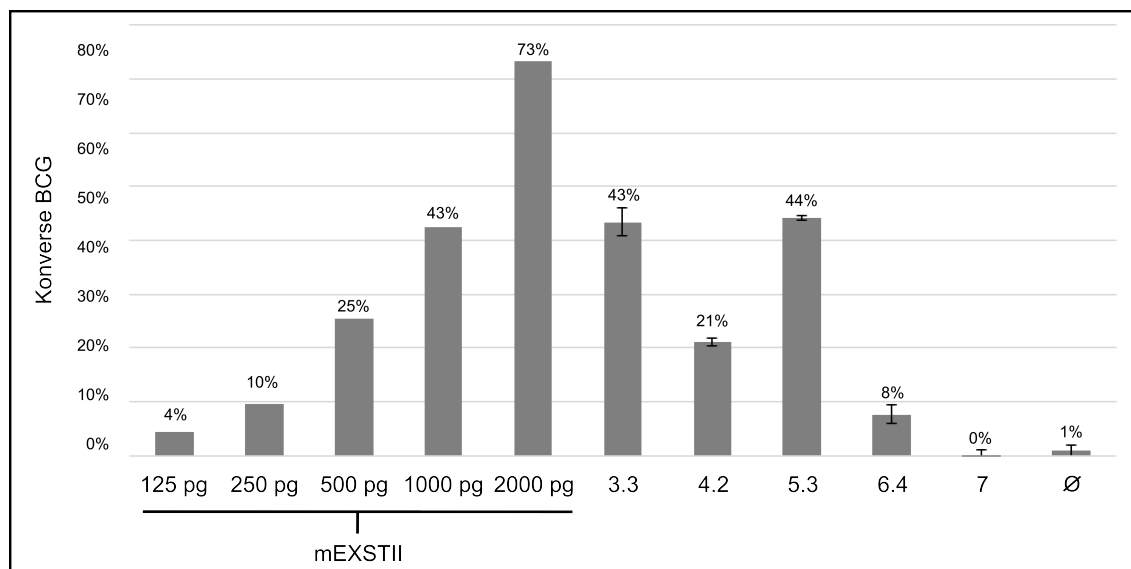
5.9 Stanovení aktivity mEXSTII s použitím radioaktivně značeného substrátu BCG

V médiích z buněk sklizených po 120 hodinách byla měřena aktivita mEXSTII štěpením radioaktivně značeného specifického substrátu GCPIII – $^3\text{[H]BCG}^3$ (viz 1.2.2.4 na straně 12. Po

$^3\text{[H]BCG}$ značený tritiem na uhlíkatém skeletu glutamátu na třetím a čtvrtém uhlíku (C3, C4)

hodinové inkubaci médií se substrátem při 37 °C byla reakce zastavena přidáním stopovacího pufru a ionexovou chromatografií byl oddělen odštěpený radioaktivní glutamát. Ten byl smíchán se scintilačním roztokem a scintilace směsi byla změřena na přístroji Tri-Carb 2900TR (Perkin Elmer).

Pomocí známé hodnoty scintilace vzorků s kompletně rozštěpeným 3[H]BCG byly vypočteny konverze substrátu, tedy míra, do které byl přeměněn v produkt. Nejprve byla měřena aktivita v 10 µl média, kde mEXSTII z buněk transfekovaných plasmidy 3.3, 4.2, 5.3 a 6.4 dosahovala aktivity odpovídající maximálnímu rozštěpení, mEXSTII z buněk transfekovaných plasmidem 7 mělo výrazně sníženou aktivitu. Poté byla nanáška média 100x snížena a experiment byl opakován (viz Obrázek 27 na straně 36). Protein s nejvyšší aktivitou produkovaly plasmidy 3.3 a 5.3, nižší aktivitu vykazoval protein z plasmidu 4.3, výrazně snížená byla aktivita u mEXSTII z plasmidu 6.4. Při tomto ředění již mEXSTII z buněk transfekovaných plasmidem 7 nevykazoval žádnou aktivitu.



Obrázek 27: Graf konverze substrátu BCG rekombinantním extracelulárním GCPIII exprimovaným do média. Prvních pět vzorků tvoří kalibrační řadu (štěpení purifikovaným rekombinantním extracelulárním GCPIII, připraveným v hmyzích buňkách), poté následují média z buněk transfekovaných plasmidy 3.3, 4.2, 5.3, 6.4 a 7, poslední vzorek označený symbolem Ø je médium z buněk transfekovaných plasmidem pTTo-GFPq (negativní kontrola). Aktivita byla měřena v 1 µl 100x ředěného média.

6 Diskuse

Pro přípravu mEXSTII v savčím expresním systému bylo třeba nejprve zavést kultivaci suspenzí HEK 293–6E a následně optimalizovat transfekční podmínky.

Transfekce byla prováděna pomocí lineárního polyethyleniminu (IPEI). Dle doporučení by poměr DNA:PEI měl být mezi 1:2 až 1:3. Pro nalezení vhodného poměru DNA:PEI byl použit plasmid pTTo–GFPq. Buňky exprimující GFP byly poté detekovány průtokovou cytometrií. Při prvním pokusu byly zvoleny poměry DNA:PEI 1:2, 2:5 a 1:3. Jelikož účinnost transfekce rostla se zvětšujícím se množstvím PEI, byl navržen další experiment s poměry DNA:PEI 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 a 1:10. Zohledněním jednak účinnosti transfekce, dále také množstvím živých buněk a průměrem hodnot fluorescence GFP byl vybrán poměr DNA:PEI pro transfekci HEK 293–6E 1:7.

Dále bylo připraveno 5 plasmidů obsahujících značky pro afinitní chromatografii (His, Fc) na N– či C–konci s extracelulární částí myši GCPIII (viz Obrázek 12 na straně 28). Sekvenací bylo zjištěno, že v plasmidu pYD5 není začleněn insert, byl tedy připraven znovu.

Při druhém pokusu o přípravu pYD5–mEXSTII byl insert klonován do TOPO vektoru, z něj teprve štěpen a následně ligován do rozštěpeného vektoru. Jelikož ani tímto způsobem nebyl získán správně klonovaný plasmid, byl insert klonovaný do TOPO vektoru sekvenován. Sekvence odhalila chybně amplifikované místo rozeznávané restriktční endonukleasou, insert tedy nemohl být správně štěpen. Insert byl tedy připraven znovu metodou PCR, opět klonován do TOPO vektoru, štěpen a tentokrát již úspěšně ligován do plasmidu.

Všemi pěti připravenými plasmidy byly následně transfekovány buňky HEK 293–6E. Doporučená doba exprese byla 3 až 5 dní. Proto byly buňky sklizeny postupně, a to 72, 96 a 120 hodin od transfekce. Imunodetekcí bylo zjištěno, že pro všechny plasmidy bylo nejvíce proteinu obsaženo v médiích z buněk sklizených 120 hodin od transfekce. Obsah mEXSTII byl poté porovnáván již jen v těchto médiích. Zároveň byla nanesena i kalibrační řada standardu mEXSTII pro semikvantitativní stanovení mEXSTII v médiích. Jelikož u proteinů nezáleží jen na celkovém množství proteinu, ale na množství aktivního proteinu, byly v médiích měřeny i aktivity štěpením specifického substrátu GCPIII BCG.

Protein se značkou His nebo Fc na C–konci vykazuje sníženou aktivitu, v případě velké Fc značky byla výrazně snížena i exprese. Konstrukty se značkou na N–konci jsou exprimovány dobře a zachovávají i aktivitu. V případě značky připojené bezprostředně k proteinu, byla exprese i aktivita mírně snížena. Citlivost na připojení značky na C–konec odpovídá dříve publikovaným výsledkům [46].

Dále bude možné produkovat mEXSTII ve velkém objemu z plasmidů obsahujících značku na N–konci oddělenou peptidovou sekvencí pro štěpení TEV proteasou. Poté bude mEXSTII purifikována a její fyzikálně–chemické vlastnosti mohou být porovnány s mEXSTII z S2 buněk.

Závěr

Byla úspěšně zavedena metoda kultivace suspenzních savčích buněk HEK 293–6E a byly optimalizovány podmínky pro transfekci pro produkci rekombinantních proteinů.

Ideální poměr DNA a polyethyleniminu PEI pro transfekce byl stanoven jako 1:7 pro buňky transfekované kontrolním plasmidem exprimujícím zelený fluorescenční protein.

Úspěšně bylo připraveno pět plasmidů obsahujících gen pro extracelulární část myší GCPIII s různými afinitními značkami pro purifikaci proteinu.

Těmito plasmidy byly transfekovány buňky HEK 293–6E. Množství a aktivita exprimované mEXSTII byla ve všech případech otestována a porovnána. Koncentrace proteinu v médiích dosáhla maximální hodnoty 25 ng/ μ l.

Bylo zjištěno, že umístění afinitních značek na C–konci (zejména stericky náročné Fc značky) vede k nižší aktivitě výsledného proteinu, pravděpodobně vinou chybného složení fúzního proteinu v roztoku. Umístění značek na N–konci proteinu nemělo na produkci vliv.

Reference

- [1] O’Keefe, D. S., Su, S. L., Bacich, D. J., Horiuchi, Y., Luo, Y., Powell, C. T., Zandvliet, D., Russell, P. J., Molloy, P. L., Nowak, N. J., Shows, T. B., Mullins, C., Vonder Haar, R.A., Fair, W. R., Heston, W. D.: Mapping, genomic organization and promoter analysis of the human prostate-specific membrane antigen gene. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998, **1443**(1–2), 113–127.
PMID 9838072. DOI: 10.1016/s0167-4781(98)00200-0.
- [2] Bařinka, C., řácha, P., Sklenář, J., Man, P., Bezouřka, K., Slusher, B. S., Konvalinka, J.: Identification of the *N*-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity. *Protein Science*. 2004, **13**(6), 1627–1635.
PMID: 15152093. DOI: 10.1110/ps.04622104.
- [3] řácha, P., Zámečník, J., Bařinka, C., Hlouchová, K., Vícha, A., Mlčochová, P., Hilgert, I., Eckschlanger, T., Konvalinka, J.: Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain. *Neuroscience*. 2007, **144**(4), 1361–1372.
PMID 17150306. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2006.10.022.
- [4] Barrett, A. J., Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC–IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions. *European Journal of Biochemistry*. 1997, **250**(1), 1–6.
PMID: 9431984. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.001_1.x.
- [5] Mesters, J. R., Bařinka, C., Li, W., Tsukamoto, T., Majer, P., Slusher, B. S., Konvalinka, J., Hilgenfeld, R.: Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer. *EMBO Journal*. 2006, **25**(6), 1375–1384.
PMID 16467855. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600969.
- [6] Schülke, N., Varlamova, O. A., Donovan, G. P., Ma, D., Gardner, J. P., Morrissey, D. M., Arrigale, R. R., Zhan, C., Chodera, A. J., Surowitz, K. G., Maddon, P. J., Heston, W. D., Olson, W. C.: The homodimer of prostate-specific membrane antigen is a functional target for cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003, **100**(22), 12590–12595.
PMID: 14583590. DOI: 10.1073/pnas.1735443100.
- [7] Rawlings, N. D., Morton, F. R., Barrett, A. J.: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. 2006, **34**(Database issue), D270–D272.
PMID 16381862. DOI: 10.1093/nar/gkj089.
- [8] Robinson, M. B., Blakely, R. D., Couto, R., Coyle, J. T.: Hydrolysis of the brain dipeptide *N*-acetyl–*L*-aspartyl–*L*-glutamate. Identification and characterization of a novel *N*-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat brain. *Journal of Biological Chemistry*. 1987, **262**(30), 14498–14506.
PMID: 3667587.
- [9] Bařinka, C., *Glutamate carboxypeptidase II*. Praha, 2003, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy.
- [10] Halsted, C. H., Ling, E., Luthi–Carter, R., Villanueva, J. A., Gardner, J. M., Coyle, J. T.: Folylpoly– γ -glutamate Carboxypeptidase from Pig Jejunum, molecular characterization and relation to glutamate carboxypeptidase II. *Journal of Biological Chemistry*. 1998, **273**(32), 20417–20424.
PMID: 9685395.
- [11] Pinto, J. T., Suffoletto, B. P., Berzin, T. M., Qiao, C. H., Lin, S., Tonq, W. P., May, F., Mukherjee, B., Heston, W. D.: Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. *Clinical Cancer Research*. 1996, **2**(9), 1445–1451.
PMID: 9816319.
- [12] Bařinka, C., Rojas, C., Slusher, B. S., Pomper, M.: Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer. *Current Medicinal Chemistry*. 2012, **19**(6), 856–870.
PMID: 22214450.

- [13] Jackson, P. F., Cole, D. C., Slusher, B. S., Stetz, S. L., Ross, L. E., Donzanti, B. A., Trainor, D. A.: Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase *N*-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996, **39**(2), 619–622.
PMID: 8558536. DOI: 10.1021/jm950801q.
- [14] Slusher, B. S., Vornov, J. J., Thomas, A. G., Hurn, P. D., Harakuni, I., Bhardwaj, A., Traystman, R. J., Robinson, M. B., Britton, P., Lu, X. C., Tortella, F. C., Wozniak, K. M., Yudkoff, M., Potter, B. M., Jackson, P. F.: Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury. *Nature Medicine*. 1999, **5**(12), 1396–1402.
PMID: 10581082. DOI: 10.1038/70971.
- [15] Zhou, J., Neale, J. H., Pomper, M. G., Kozikowski, A. P.: NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2005, **4**(12), 1015–1026.
PMID: 16341066. DOI: 10.1038/nrd1903.
- [16] Majer, P., Jackson, P. F., Delahanty, G., Grella, B. S., Ko, Y. S., Li, W., Liu, Q., Maclin, K. M., Poláková, J., Shaffer, K. A., Stoermer, D., Vitharana, D., Wang, E. Y., Zakrzewski, A., Rojas, C., Slusher, B. S., Wozniak, K. M., Burak, E., Limsakun, T., Tsukamoto, T.: Synthesis and biological evaluation of thiol-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II: discovery of an orally active GCP II inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2003, **46**(10), 1989–1996.
PMID: 12723961. DOI: 10.1021/jm020515w.
- [17] Jackson, P. F., Slusher, B. S.: Design of NAALADase inhibitors: a novel neuroprotective strategy. *Current Medicinal Chemistry*. 2001, **8**(8), 949–957.
PMID: 11375762. DOI: 10.2174/0929867013372797.
- [18] Kozikowski, A. P., Zhang, J., Nan, F., Petukhov, P. A., Grajkowska, E., Wroblewski, J. T., Yamamoto, T., Bzdega, T., Wroblewska, B., Neale, J. H.: Synthesis of urea-based inhibitors as active site probes of glutamate carboxypeptidase II: efficacy as analgesic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004, **47**(7), 1729–1738.
PMID: 15027864. DOI: 10.1021/jm0306226.
- [19] Olszewski, R. T., Bukhari, N., Zhou, J., Kozikowski, A. P., Wroblewski, J. T., Shamini-Noori, S., Wroblewska, B., Bzdega, T., Vicini, S., Barton, F. B., Neale, J. H.: NAAG peptidase inhibition reduces locomotor activity and some stereotypes in the PCP model of schizophrenia via group II mGluR. *Journal of Neurochemistry*. 2004, **89**(4), 876–885.
PMID: 15140187. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02358.x.
- [20] Harsányi, K., Domány, G., Greiner, I., Forintos, H., Keqlevich, G.: Synthesis of 2-phosphinoxidomethyl- and 2-phosphonomethyl glutaric acid derivatives. *Heteroatom Chemistry*. 2005, **16**(7), 562–565.
DOI: 10.1002/hc.20142.
- [21] Majer, P., Hin, B., Stoermer, D., Adams, J., Xu, W., Duvall, B. R., Delahanty, G., Liu, Q., Stathis, M. J., Wozniak, K. M., Slusher, B. S., Tsukamoto, T.: Structural optimization of thiol-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II by modification of the P1' side chain. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2006, **49**(10), 2876–2885.
PMID: 16686531. DOI: 10.1021/jm051019l.
- [22] Stoermer, D., Liu, Q., Hall, M. R., Flanary, J. M., Thomas, A. G., Rojas, C., Slusher, B. S., Tsukamoto, T.: Synthesis and biological evaluation of hydroxamate-Based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2003, **13**(13), 2097–2100.
PMID: 12798312.
- [23] Grella, B. S., Adams, J., Berry, J. F., Delahanty, G., Ferraris, D. V., Majer, P., Ni, C., Shukla, K., Shuler, S. A., Slusher, B. S., Stathis, M., Tsukamoto, T.: The discovery and structure-activity relationships of indole-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010, **20**(24), 7222–7225.
PMID: 21074428. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.10.109.
- [24] Israeli, R. S., Powell, C. T., Corr, J. G., Fair, W. R., Heston, W. D.: Expression of the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Research*. 1994, **54**(7), 1807–1811.
PMID: 7511053.

- [25] Renneberg, H., Friedetzky, A., Konrad, L., Kurek, R., Weingartner, K., Wennemuth, G., Tunn, U. W., Aumüller, G.: Prostate specific membrane antigen (PSM) is expressed in various human tissues: implication for the use of PSM reverse transcription polymerase chain reaction to detect hematogenous prostate cancer spread. *Urological Research*. 1999, **27**(1), 23–27. PMID: 10092150.
- [26] Silver, D. A., Pellicer, I., Fair, W. R., Heston, W. D., Cordon-Cardo, C.: Prostate-specific membrane antigen expression in normal and malignant human tissues. *Clinical Cancer Research*. 1997, **3**(1), 81–85. PMID: 9815541.
- [27] Berger, U. V., Carter, R. E., McKee, M., Coyle, J. T.: *N*-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase is expressed by non-myelinating Schwann cells in the peripheral nervous system. *Journal of Neurocytology*. 1995, **24**(2), 99–109. PMID: 7745446.
- [28] Rovenská, M., Hlouchová, K., Šácha, P., Mlčochová, P., Horák, V., Zámečník, J., Bařinka, C., Konvalinka, J.: Tissue expression and enzymologic characterization of human prostate specific membrane antigen and its rat and pig orthologs. *Prostate*. 2008, **68**(2), 171–182. PMID: 18076021. DOI: 10.1002/pros.20676.
- [29] Bostwick, D. G., Pacelli, A., Blute, M., Roche, P., Murphy, G. P.: Prostate specific membrane antigen expression in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma: a study of 184 cases. *Cancer*. 1998, **82**(11), 2256–2261. PMID: 9610707.
- [30] Ananias, H. J., van den Heuvel, M. C., Helfrich, W., de Jong, I. J.: Expression of the gastrin-releasing peptide receptor, the prostate stem cell antigen and the prostate-specific membrane antigen in lymph node and bone metastases of prostate cancer. *The Prostate*. 2009, **69**(10), 1101–1108. PMID: 19343734. DOI: 10.1002/pros.20957
- [31] Kinoshita, Y., Kuratsukuri, K., Landas, S., Imaida, K., Rovito, P. M., Wang, C. Y., Haas, G. P.: Expression of prostate-specific membrane antigen in normal and malignant human tissues. *World Journal of Surgery*. 2006, **30**(4), 628–636. PMID: 16555021. DOI: 10.1007/s00268-005-0544-5
- [32] Gala, J. L., Loric, S., Guiot, Y., Denmeade, S. R., Gady, A., Brasseur, F., Heusterspreute, M., Eschw?ge, P., De Nayer, P., Van Cangh, P., Tombal, B.: Expression of prostate-specific membrane antigen in transitional cell carcinoma of the bladder: prognostic value? *Clinical Cancer Research*. 2000, **6**(10), 4049–4054. PMID: 11051255.
- [33] Haffner, M. C., Kronberger, I. E., Ross, J. S., Sheehan, C. E., Zitt, M., Muhlmann, G., Ofner, D., Zelger, B., Ensinger, C., Yang, X. J., Geley, S., Margreiter, R., Bander, N. H.: Prostate-specific membrane antigen expression in the neovasculature of gastric and colorectal cancers. *Human Pathology*. 2009, **40**(12), 1754–1761. PMID: 19716160. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.06.003
- [34] Chang, S. S., O’Keefe, D. S., Bacich, D. J., Reuter, V. E., Heston, W. D. W., Gaudin, P. B.: Prostate-specific membrane antigen is produced in tumour-associated neovasculature. *Clinical Cancer Research*. 1999, **5**(10), 2674–2681. PMID: 10537328.
- [35] Yao, V., Berkman, C. E., Choi, J. K., O’Keefe, D. S., Bacich, D. J.: Expression of prostate-specific membrane antigen (PSMA), increases cell folate uptake and proliferation and suggests a novel role for PSMA in the uptake of the non-polyglutamated folate, folic acid. *Prostate*. 2010, **70**(3), 305–316. PMID: 19830782. DOI: 10.1002/pros.21065
- [36] Ghosh, A., Wang, X., Klein, E., Heston, W. D.: Novel role of prostate-specific membrane antigen in suppressing prostate cancer invasiveness. *Cancer Research*. 2005, **65**(3), 727–731. PMID: 15705868.

- [37] Conway, R. E., Petrovic, N., Li, Z., Heston, W., Wu, D., Shapiro, L. H.: Prostate-specific membrane antigen regulates angiogenesis by modulating integrin signal transduction. *Molecular and Cellular Biology*. 2006, **26**(14), 5310–5324. PMID: 16809768. DOI: 10.1128/MCB.00084-06.
- [38] Grant, C. L., Caromile, L. A., Ho, V., Durrani, K., Rahman, M. M., Claffey, K. P., Fong, G. H., Shapiro, L. H.: Prostate specific membrane antigen (PSMA) regulates angiogenesis independently of VEGF during ocular neovascularization. *PLoS ONE*. 2012, **7**(7), e41285. PMID 22815987. DOI: 10.1371/journal.pone.0041285.
- [39] Milowsky, M. I., Nanus, D. M., Kostakoglu, L., Sheehan, C. E., Vallabhajosula, S., Goldsmith, S. J., Ross, J. S., Bander, N. H.: Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody J591 in advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2007, **25**(5), 540–547. PMID: 17290063. DOI: 10.1200/JCO.2006.07.8097.
- [40] Fitch, W. M.: Homology a personal view on some of the problems. *Trends in Genetics*. 2000, **16**(5), 227–231. PMID: 10782117.
- [41] Slusher, B. S., Robinson, M. B., Tsai, G., Simons, M. L., Richards, S. S., Coyle, J. T.: Rat brain *N*-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity. Purification and immunologic characterization. *Journal of Biological Chemistry*. 1990, **265**(34), 21297–21301. PMID: 2250024.
- [42] Bzdega, T., Turi, T., Wroblewska, B., She, D., Chung, H.S., Kim, H., Neale, J. H.: Molecular cloning of a peptidase against *N*-acetylaspartylglutamate from a rat hippocampal cDNA library. *Journal of Neurochemistry*. 1997, **69**(6), 2270–2277. PMID: 9375657.
- [43] Schneider, B. L., Thevanather, S., Moyer, M. S., Walters, H. C., Rinaldo, P., Devarajan, P., Sun, A. Q., Dawson, P. A., Ananthanarayanan, M.: Cloning and characterization of a novel peptidase from rat and human ileum. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, **272**(49), 31006–31015. PMID: 9388249.
- [44] Bacich, D. J., Pinto, J. T., Tong, W. P., Heston, W. D. W.: Cloning, expression, genomic localization, and enzymatic activities of the mouse homolog of prostate-specific membrane antigen/NAALADase/folate hydrolase. *Mammalian Genome*. 2001, **12**(2), 117–123. PMID: 11210180.
- [45] O’Keefe, D. S., Bacich, D. J., Heston, W. D.: Comparative analysis of prostatespecific membrane antigen (PSMA) versus a prostate-specific membrane antigen-like gene. *Prostate*. 2004, **58**(2), 200–210. PMID: 14716746. DOI: 10.1002/pros.10319.
- [46] Bařinka, C., Mlčochová, P., Šácha, P., Hilgert, I., Majer, P., Slusher, B. S., HOŘEJŠÍ, V., Konvalinka, J.: Amino acids at the *N*- and *C*-termini of human glutamate carboxypeptidase II are required for enzymatic activity and proper folding. *European Journal of Biochemistry*. 2004, **271**(13), 2782–2790. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04209.x.
- [47] Pangalos, M. N., Neefs, J. M., Somers, M., Verhasselt, P., Bekkers, M., van der Helm, L., Fraiponts, E., Ashton, D., Gordon, R. D.: Isolation and expression of novel human glutamate carboxypeptidases with *N*-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1999, **274**(13), 8470–8483. PMID: 10085079.
- [48] Tykvart, J., Bařinka, C., Svoboda, M., Navrátil, V., Souček, R., Hubálek, M., Hradílek, M., Šácha, P., Lubkowski, J., Konvalinka, J.: Structural and Biochemical Characterization of a Novel Aminopeptidase from Human Intestine. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, **290**(18), 11321–11336. DOI: 10.1074/jbc.M114.628149.

- [49] Tonkin, E. T., Smith, M., Eichhorn, P., Jones, S., Imamwerdi, B., Lindsay, S., Jackson, M., Wang, T. J., Ireland, M., Burn, J., Krantz, I. D., Carr, P., Strachan, T.: A giant novel gene undergoing extensive alternative splicing is severed by a Cornelia de Lange-associated translocation breakpoint at 3q26.3. *Human Genetics*. 2004, **115**(2), 139–148. PMID: 15168106.
- [50] Bzdega, T., Crowe, S. L., Ramadan, E. R., Sciarretta, K. H., Olszewski, R. T., Ojeifo, O. A., Rafalski, V. A., Wroblewska, B., Neale, J. H.: The cloning and characterization of a second brain enzyme with NAAG peptidase activity. *Journal of Neurochemistry*. 2004, **89**(3), 627–635. PMID: 15086519. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02361.x
- [51] Hlouchová, K., Bařinka, C., Konvalinka, J., Lubkowski, J.: Structural insight into the evolutionary and pharmacologic homology of glutamate carboxypeptidases II and III. *FEBS Journal*, 2009, **276**(16), 4448–4462. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07152.x
- [52] Collard, F., Vertommen, D., Constantinescu, S., Buts, L., Van Schaftingen, E.: Molecular identification of beta-citrylglutamate hydrolase as glutamate carboxypeptidase 3. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, **286**(44), 38220–38230. DOI: 10.1074/jbc.M111.287318.
- [53] Hlouchová, K., Bařinka, C., Klusák, V., Šácha, P., Mlčochová, P., Majer, P., Rulíšek, L., Konvalinka, J.: Biochemical characterization of human glutamate carboxypeptidase III. *Journal of Neurochemistry*. 2007, **101**(3), 682–696. PMID: 17241121. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.04341.x
- [54] Merrifield, R. B.: Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*. 1962, **85**(14), 2149–2154. DOI:10.1021/ja00897a025.
- [55] Gutte, B., Merrifield, R. B.: The Synthesis of Ribonuclease A. *Journal of Biological Chemistry*. 1971, **246**(6), 1922–1941, PMID: 5102153.
- [56] Smith, H. O., Wilcox, K. W.: A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *Journal of Molecular Biology*. 1970, **51**(2), 379–391. PMID: 5312500. DOI: 10.1016/0022-2836(70)90149-X.
- [57] Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., Boyer, H. W.: Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*. 1977, **198**(4321), 1056–1063. PMID: 412251. DOI: 10.1126/science.412251.
- [58] Mullis, K. F., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H.: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*. 1986, 51, 263–273. PMID: 3472723.
- [59] Sanger, F., Coulson, A. R.: A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 1975, **94**(3), 441–448. PMID: 1100841. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
- [60] Recombinant DNA and Biotechnology. *CliffsNotes* [online]. Boston (Massachusetts): Houghton Mifflin Harcourt, ©2016 [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: <https://www.cliffsnotes.com/study-guides/biology/microbiology/dna-and-gene-expression/recombinant-dna-and-biotechnology>
- [61] Zurlo, J., Rudacille, D., Goldberg, A. M.: *Animals and Alternatives in Testing: History, Science, and Ethics*. New York: Mary Ann Liebert, 1994. ISBN: 9780913113677. Dostupné z: http://caat.jhsph.edu/publications/animal_alternatives/
- [62] Ivanković, M., Cukusić, A., Gotić, I., Skrobot, N., Matijasić, M., Polancec, D., Rubelj, I.: Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology*. 2007, **8**(2), 163–172. PMID: 16955216. DOI: 10.1007/s10522-006-9043-9.

- [63] Rosenblum, G., Cooperman, B. S.: Engine out of the chassis: cell-free protein synthesis and its uses. *FEBS Letters*. 2014, **588**(2), 261–268.
PMID: 24161673. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.10.016.
- [64] Brondyk, W. H.: Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein. *Methods in Enzymology*. 2009, **463**, 131–147.
PMID: 19892171. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63011-1.
- [65] Baneyx, F.: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*. 1999, **10**(5), 411–421.
PMID: 10508629. DOI: 10.1016/S0958-1669(99)00003-8.
- [66] Brinkrolf, K., Schröder, J., Pühler, A., Tauch, A.: The transcriptional regulatory repertoire of *Corynebacterium glutamicum*: reconstruction of the network controlling pathways involved in lysine and glutamate production. *Journal of Biotechnology*. 2010, **149**(3), 173–182.
DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.12.004.
- [67] Date, M., Yokoyama, K., Umezawa, Y., Matsui, H., Kikuchi, Y.: Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, **42**(1), 66–70.
PMID: 16411922. DOI: 10.1111/j.1472-765x.2005.01802.x.
- [68] Jørgensen, C. M., Vrang, A., Madsen, S. M.: Recombinant protein expression in *Lactococcus lactis* using the P170 expression system. *FEMS Microbiology Letters*. 2014, **351**(2), 170–178.
PMID: 24303789. DOI: 10.1111/1574-6968.12351
- [69] Cregg, J. M., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K., Chappell, T.: Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in Enzymology*. 2009, **463**, 169–189.
PMID: 19892173. DOI: 10.1016/S0076-6879(09)63013-5.
- [70] Razaghi, A., Owens, L., Heimann, K.: Is *Pichia pastoris* a realistic platform for industrial production of recombinant human interferon gamma? *Biologicals*. 2016, **45**, 52–60.
DOI: 10.1016/j.biologicals.2016.09.015.
- [71] Malys, N., Wishart, J. A., Oliver, S. G., McCarthy, J. E.: Protein production in *Saccharomyces cerevisiae* for systems biology studies. *Methods in Enzymology*. 2011, 500, 197–212.
PMID: 21943899. DOI: 10.1016/B978-0-12-385118-5.00011-6.
- [72] Khatri, N. K., Hoffmann, F.: Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006, **93**(5), 871–879.
PMID: 16320364. DOI: 10.1002/bit.20773.
- [73] Basile, G., Peticca, M.: Recombinant protein expression in *Leishmania tarentolae*. *Molecular Biotechnology*. 2009, **43**(3), 273–278.
PMID: 19779853. DOI: 10.1007/s12033-009-9213-5
- [74] Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., McCawley, P.: The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro*. 1977, **13**(4), 213–217.
PMID 68913. DOI: 10.1007/BF02615077.
- [75] Schneider, I.: Cell Lines Derived from Late Embryonic Stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1972, **27**(2), 363–365.
PMID: 4625067.
- [76] Dyring, C.: Optimising the drosophila S2 expression system for production of therapeutic vaccines. *BioProcessing Journal*. 2011, **10**(2), 28–35.
DOI: 10.12665/j102.dyring.
- [77] Lin, F. K., Suggs, S., Lin, C. H., Browne, J. K., Smalling, R., Egrie, J. C., Chen, K. K., Fox, G. M., Martin, F., Stabinsky, Z.: Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1985, **82**(22): 7580–7584.
PMID: 3865178.

- [78] Wurm, F. M.: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 2004, **22**(11), 1393–1398.
PMID: 15529164. DOI: 10.1038/nbt1026.
- [79] Butler, M, Spearman, M.: The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Current opinion in biotechnology*. 2014, **30**, 107–112.
PMID: 25005678. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.010
- [80] Ahsan, A., Hiniker, S. M., Davis, M. A., Lawrence, T. S., Nyati, M. K.: Role of Cell Cycle in Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor–Mediated Radiosensitization. *Cancer Research*. 2009, **69**(12), 5108–5114.
PMID: 19509222. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0466.
- [81] Barnes, L. M., Bentley, C. M., Dickson, A. J.: Advances in animal cell recombinant protein production: GS–NS0 expression system. *Cytotechnology*. 2000, **32**(2), 109–123.
PMID: 19002973. DOI: 10.1023/A:1008170710003.
- [82] Gluzman Y.: SV40–transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 1981, **23**(1), 175–182.
PMID: 6260373. DOI: 10.1016/0092-8674(81)90282-8.
- [83] Todaro, G., Green, H.: Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *Journal of Cell Biology*. 1963, **17**(2), 299–313.
PMID: 13985244.
- [84] Scherer, W. F., Syverton, J. T., Gey, G. O.: Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *Journal of Experimental Medicine*. 1953, **97**(5), 695–710.
PMID: 13052828. DOI: 10.1084/jem.97.5.695.
- [85] Capes–Davis, A., Theodosopoulos, G., Atkin, I., Drexler, H. G., Kohara, A., MacLeod, R. A., Masters, J. R., Nakamura, Y., Reid, Y. A., Reddel, R. R., Freshney, R. I.: Check your cultures! A list of cross–contaminated or misidentified cell lines. *International Journal of Cancer*. 2010, **127**(1), 1–8.
PMID: 20143388. DOI: 10.1002/ijc.25242.
- [86] Wölfel, J., Essers, R., Bialek, C., Hertel, S., Scholz–Neumann, N., Schiedner, G.: CAP–T cell expression system: a novel rapid and versatile human cell expression system for fast and high yield transient protein expression. *BMC Proceedings*. 2011, **5**(8), 133.
PMID: 22373426. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S8-P133
- [87] Graham, F. L., Smiley, J., Russel, W. C., Nairn, R.: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*. 1977, **36**(1), 59–74.
PMID: 886304. DOI: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
- [88] Dyson, M. R., Durocher, Y.: *Expression systems*, Bloxham: Scion Publishing Ltd., 2007, ISBN: 9781904842439. 203–223.
- [89] Durocher, Y.: *Expression vectors containing a truncated epstein barr nuclear antigen 1 lacking the Gly–Gly–Ala domain for enhanced transient gene expression*. International Patent Publication WO 2006/096989, publikováno 21. 9. 2006.
Dostupné z: <https://www.google.com/patents/WO2006096989A2?hl=cs&cl=en>
- [90] Graham, F. L., van der Eb, A. J.: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 1973, **52**(2), 456–467.
PMID: 4705382, DOI: 10.1016/0042-6822(73)90341-3.
- [91] Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., Danielsen, M.: Lipofection: a highly efficient, lipid–mediated DNA–transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987, **84**(21), 7413–7417.
PMID: 2823261. DOI: 10.1073/pnas.84.21.7413.

- [92] Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., Behr, J. P.: A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995, **92**(16), 7297–7301.
DOI: 10.1073/pnas.92.16.7297.
- [93] Fernandes, J. C., Qiu, X., Winnik, F. M., Benderdour, M., Zhang, X., Dai, K., Shi, Q.: Linear polyethylenimine produced by partial acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline) for DNA and siRNA delivery in vitro. *International Journal of Nanomedicine*. 2013, **8**, 4091–4102.
PMID: 24204139. DOI: 10.2147/IJN.S47413
- [94] Sonawane, N. D., Szoka, F. C. Jr., Verkman, A. S.: Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine–DNA Polyplexes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, **278**(45), 44826–44831.
PMID: 12944394. DOI: 10.1074/jbc.M308643200
- [95] Hochuli, E., Bannwarth, W., Döbeli, H., Gentz, R., Stüber, D.: Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent. *Nature Biotechnology*. 1988, **6**(11), 1321–1325.
DOI: 10.1038/nbt1188-1321.
- [96] Fairhead, M., Howarth, M.: Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. *Methods in Molecular Biology*. 2015, **1266**, 171–184.
PMID: 25560075. DOI: 10.1007/978-1-4939-2272-7-12
- [97] Einhauer, A., Jungbauer, A.: The FLAG™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2001, **49**(1–3), 455–465.
PMID 11694294. DOI: 10.1016/S0165-022X(01)00213-5.
- [98] Schmidt, T. G. M., Koepke, J., Frank, R., Skerra, A.: Molecular Interaction Between the Strep-tag Affinity Peptide and its Cognate Target, Streptavidin. *Journal of Molecular Biology*. 1996, **255**(5), 753–766.
PMID: 8636976. DOI: 10.1006/jmbi.1996.0061.
- [99] Kapust, R. B., Waugh, D. S.: Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease. *Protein Expression and Purification*. 2000, **19**(2), 312–318.
PMID 10873547. DOI: 10.1006/prep.2000.1251.
- [100] Double Digest Finder. *New England Biolabs* [online]. Ipswich: New England Biolabs, ©2017 [cit. 2017-03-21]. Dostupné z: <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>

Seznam obrázků

1	Struktura GCPII	8
2	Schéma aktivního místa GCPII	9
3	Enzymové aktivity GCPII – A	9
4	Enzymové aktivity GCPII – B	10
5	Inhibitory s glutamátovou skupinou	10
6	ZJ-43, analog NAAG	11
7	Inhibitor obsahující indol	11
8	Příprava rekombinantního proteinu	15
9	Lineární PEI	18
10	Rozvětvený PEI	18
11	Příprava lineárního PEI	18
12	Porovnání plasmidů	28
13	Agarosová elektroforesa – PCR	28
14	Agarosová elektroforesa – štěpení (1)	29
15	Agarosová elektroforesa – štěpení (2)	29
16	Agarosová elektroforesa – štěpení (3)	30
17	Predikce kontrolního štěpení	31
18	Agarosová elektroforesa – kontrolní štěpení (1)	31
19	Agarosová elektroforesa – kontrolní štěpení (2)	32
20	Agarosová elektroforesa – štěpení pCR™ II–TOPO® vektoru s klonovanými inserty	32
21	Agarosová elektroforesa – kontrolní štěpení vektoru 5	33
22	Transfekce GFP – FACS	33
23	Transfekce GFP – fluorescenční mikroskop	34
24	Imunodetekce mEXSTII (1)	34
25	Imunodetekce mEXSTII (3)	35
26	Semikvantitativní stanovení mEXSTII v médiích	35
27	Graf konverse BCG	36

Seznam tabulek

1	Přehled reversních (R) a kódujících (F) primerů pro jednotlivé plasmidy	23
2	Sekvence primerů	23
3	Reakční podmínky PCR	23
4	Přehled použitých restričních endonukleas	24
5	Počty narostlých a odebraných kolonií	25
6	Sekvence sekvenačních primerů	25
7	Koncentrace a čistota připravených klonů (1)	30
8	Přehled restričních endonukleas pro kontrolní štěpení	30
9	Optimalizace poměru DNA:PEI, FACS	33