

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

**Purifikace rekombinantní vakuolární aminopeptidázy Ape3p patogenní
kvasinky *Candida albicans***

Bc. Ondřej Morávek

Diplomová práce

2022

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ondřej Morávek**
Osobní číslo: **C20477**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Purifikace rekombinantní vakuolární aminopeptidázy Ape3p patogenní kvasinky *Candida albicans***
Téma práce anglicky: **Purification Of Recombinant Vacuolar Aminopeptidase Ape3p From The Pathogenic Yeast *Candida albicans***
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Rekombinantní proteiny – expresní systémy, využití.
2. Metody purifikace rekombinantních proteinů – stručný přehled, uvést konkrétní příklady purifikace aminopeptidáz.
3. Vakuolární aminopeptidázy patogenních kvasinek rodu *Candida* (charakterizace), zaměřit se na aminopeptidázu Ape3p (současný stav poznání).
4. Metody stanovení enzymové aktivity aminopeptidáz.

Experimentální část:

1. Optimalizace přípravy vzorku rekombinantní aminopeptidázy Ape3p kvasinky *C. albicans*.
2. Výběr a zavedení postupu purifikace připravené aminopeptidázy Ape3p s His-kotvou.
3. Výběr a zavedení metody pro stanovení aktivity připravené aminopeptidázy Ape3p.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

K přípravě textu použít relevantní internetové zdroje, průběžně sledovat novinky v dané problematice.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Barbora Jankovičová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultanti diplomové práce: **doc. RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc.**
Přírodovědecká fakulta – Katedra biochemie, Univerzita
Karlova
Ing. Lucie Michalcová
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **6. května 2022**

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.
děkan

L.S.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem **Purifikace rekombinantní vakuolární aminopeptidázy Ape3p patogenní kvasinky *Candida albicans*** jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Poděkování:

Rád bych tímto velmi poděkoval své vedoucí Mgr. Barboře Jankovičové, Ph.D.za odborné vedení diplomové práce, za pomoc a cenné rady při psaní a za čas, který věnovala opravám mé práce. Dále bych chtěl poděkovat školitelce doc. RNDr. Olze Heidingsfeld, CSc. za cenné rady a za poskytovaný materiál a velmi také děkuji konzultantce Ing. Lucii Michalcové a laborantce Bc. Renátě Čukanové za jejich vstřícný přístup k mé práci a za to, že mne seznámily s mnoha metodami a přístroji, které jsem průběžně používal. Jsou to zkušenosti, které budu jistě využívat i nadále.

Děkuji také za veliký kus trpělivosti, který se mnou všechny výše zmíněné měly a veliké díky patří také mé rodině a mým přátelům, kteří mne při této práci, v nelehké době zasažené nejen pandemií viru SARS-CoV-2, podporovali.

ANOTACE:

Tato práce se věnuje rekombinantním proteinům, zejména metodám jejich purifikace. V teoretické části se zabývám expresními systémy pro přípravu rekombinantních proteinů a metodami jejich purifikace. Dále popisuji vakuolární peptidázy s podrobnějším pohledem na aminopeptidázu Ape3p a zmiňuji možnosti, kterými lze stanovit jejich aktivitu. V experimentální části se věnuji optimalizaci izolace rekombinantního proteinu Ape3p kvasinky *Candida albicans*, zavedení postupu jeho purifikace a zavedení metody pro stanovení jeho enzymatické aktivity.

KLÍČOVÁ SLOVA:

Rekombinantní proteiny, metalopeptidázy, purifikace, aminopeptidáza Y

TITLE:

Purification of recombinant vacuolar aminopeptidase Ape3p of pathogenic yeast *Candida albicans*

ANNOTATION:

This thesis deals with recombinant proteins, especially with methods of their purification. The theoretical part deals with expression systems for the preparation of recombinant proteins and methods of their purification. I also describe vacuolar peptidases with a more detailed look at the aminopeptidase Ape3p and I mention the possibilities by which their activity can be determined. In the experimental part, I discuss the optimization of the isolation of the recombinant Ape3p protein of the yeast *Candida albicans*, the introduction of a procedure for its purification and the introduction of a method for the determination of its enzymatic activity.

KEY WORDS:

Recombinant proteins, metallopeptidases, purification, aminopeptidase Y

OBSAH:

SEZNAM OBRÁZKŮ	10
SEZNAM TABULEK	12
SEZNAM ZKRATEK	13
ÚVOD.....	15
1 Teoretická část	16
1.1 Rekombinantní proteiny	16
1.1.1 Expresní systémy	16
1.1.1.1 Bakterie	16
1.1.1.2 Kvasinky	18
1.1.1.3 Mikrořasy	18
1.1.1.4 Vláknité houby	19
1.1.1.5 Hmyzí buňky	20
1.1.1.6 Savčí buňky/kultury	21
1.1.1.7 Transgenní zvířata	22
1.1.1.8 Transgenní rostliny	22
1.1.2 Strategie izolace nerozpustných rekombinantních proteinů	25
1.1.2.1 Rozbití buněk	25
1.1.2.2 Promytí pelety	25
1.1.2.3 Extrakce/rozpuštění proteinu	26
1.1.2.4 Purifikace	27
1.1.2.5 Složení proteinu (refolding)	28
1.1.2.6 Purifikace složeného proteinu	30
1.1.3 Přehled metod purifikace rekombinantních proteinů	30
1.1.3.1 Gelová permeační chromatografie (GPC, SEC)	30
1.1.3.2 Hydrofobní interakční chromatografie (HIC)	31
1.1.3.3 Chromatografie na reverzní fázi (RPC)	31
1.1.3.4 Iontově výměnná chromatografie (IEX)	31
1.1.3.5 Afinitní chromatografie	32
1.1.4 Příklady purifikace aminopeptidáz	34
1.1.4.1 Argininová aminopeptidáza z bakterií <i>Lactobacillus sakei</i>	34
1.1.4.2 Rekombinantní leucinová aminopeptidáza II	34

1.1.4.3	Purifikace rekombinantní prasečí aminopeptidázy N	35
1.2	Vakuolární proteázy kvasinek	35
1.2.1	Proteináza A (PrA)	35
1.2.2	Proteináza B (PrB, cerevisin)	36
1.2.3	Karboxypeptidáza S (CPS).....	36
1.2.4	Karboxypeptidáza Y (CPY)	36
1.2.5	Dipeptidyl aminopeptidáza B (DPAPB)	36
1.2.6	Aminopeptidáza I (API)	37
1.2.7	Aminopeptidáza Y (APY, Ape3, Ape3p).....	37
1.3	Metody stanovení enzymové aktivity aminopeptidáz	38
2	Experimentální část.....	40
2.1	Materiál a přístroje.....	40
2.1.1	Přístroje.....	40
2.1.2	Chemikálie.....	40
2.1.3	Ostatní materiál	42
2.2	Roztoky.....	43
2.2.1	Roztoky pro izolaci a solubilizaci inkluzí	43
2.2.2	Roztoky pro SDS-PAGE	43
2.2.3	Roztoky pro purifikaci na HIS-Selectu®	44
2.2.4	Roztok pro měření aktivity.....	45
2.2.5	Ostatní roztoky	45
2.3	Příprava CaApe3p v systému <i>E. coli</i>	46
2.4	Izolace inkluzí.....	46
2.4.1	Princip metody.....	46
2.4.2	Pracovní postup	47
2.5	Solubilizace inkluzí.....	47
2.5.1	Princip metody.....	47
2.5.2	Pracovní postup	47
2.5.2.1	Solubilizace v 8 M močovíně.....	47
2.5.2.2	Solubilizace v 60% kyselině octové.....	47
2.6	Dialýza rozpuštěných inkluzí.....	48
2.6.1	Princip metody.....	48

2.6.2	Pracovní postup	48
2.6.2.1	Dialýza inkluzí rozpuštěných v 8 M močovíně	48
2.6.2.2	Dialýza inkluzí rozpuštěných v 60% kyselině octové	48
2.7	Diluce.....	49
2.7.1	Princip metody.....	49
2.7.2	Pracovní postup	49
2.8	Nízkotlaká kapalinová chromatografie v kolonovém uspořádání	50
2.8.1	Gelová permeační chromatografie	50
2.8.1.1	Princip metody	50
2.8.1.2	Pracovní postup.....	50
2.8.2	Chelatační afinitní chromatografie	50
2.8.2.1	Princip metody	50
2.8.2.2	Pracovní postup.....	51
2.9	Stanovení koncentrace proteinů biuretovou metodou	51
2.9.1	Princip metody.....	51
2.9.2	Pracovní postup	51
2.10	SDS-PAGE	52
2.10.1	Princip metody.....	52
2.10.2	Pracovní postup	52
2.11	Stanovení aktivity aminopeptidázy CaApe3p.....	53
2.11.1	Princip metody.....	53
2.11.2	Pracovní postup	53
3	Výsledky a diskuze	54
3.1	Biuretová metoda.....	54
3.2	Optimalizace přípravy vzorku rekombinantní aminopeptidázy CaApe3p kvasinky <i>C. albicans</i>	55
3.3	Zavedení postupu purifikace připravené aminopeptidázy CaApe3p s His-kotvou.....	64
3.4	Zavedení a optimalizace stanovení aktivity CaApe3p.....	73
	ZÁVĚR.....	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	78

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Schéma přípravy rekombinantních proteinů	16
Obrázek 2 – Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace celkového proteinu biuretovou metodou	54
Obrázek 3 – Schéma optimalizace zpracování vzorku inkluzních tělísek rozpouštěných v 8 M močovíně	55
Obrázek 4 – Schéma optimalizace zpracování vzorku inkluzních tělísek rozpouštěných v 60% kyselině octové	55
Obrázek 5 – Sraženina vzniklá po dialýze CaApe3p	58
Obrázek 6 – SDS-PAGE gel dialýzy CaApe3p po rozpouštění inkluzí v 8 M močovíně.....	58
Obrázek 7 – SDS-PAGE gel dialýzy CaApe3p po rozpouštění v 60% HAc	58
Obrázek 8 – Chromatografický záznam separace CaApe3p(U) na Sephadexu G-25	59
Obrázek 9 – SDS-PAGE frakcí ze Separace CaApe3p(U) na Sephadexu G-25 (viz Obrázek 8).....	59
Obrázek 10 – Chromatografický záznam separace CaApe3p(HAc) na Sephadexu G-25	60
Obrázek 11 – Separace CaApe3(HAc) na Sephadexu G-25 (viz Obrázek 10)	60
Obrázek 12 – Graf separace CaApe3p(U) na Sephadexu G-50	61
Obrázek 13 – Separace CaApe3(U) na Sephadexu G-50 (viz Obrázek 12).....	61
Obrázek 14 – Graf separace CaApe3p(HAc) na Sephadexu G-50.....	62
Obrázek 15 – Graf separace CaApe3p(HAc) na Sephadexu G-100.....	62
Obrázek 16 – Graf opětovného nanesení CaApe3p(HAc) na Sephadex G-100.....	63
Obrázek 17 – Interakce mezi úsekem proteinu s opakujícími se histidiny (modrá) a Ni-NTA maticí (červená)	64
Obrázek 18 - SDS-PAGE gel zkušební purifikace ve vsádkovém uspořádání, barvení stříbrem	65
Obrázek 19 – Graf purifikace na koloně s IMAC náplní HIS-Select [®] (dále jen HS), podmínky doporučené výrobcem.....	66
Obrázek 20 - SDS-PAGE gel purifikace na HS (viz Obrázek 19)	66
Obrázek 21 – Graf purifikace na HS, nanášecí a promývací pufr bez imidazolu	67
Obrázek 22 – SDS-PAGE gel purifikace na HS (viz Obrázek 21)	67

Obrázek 23 – Graf purifikace na HS při denaturačních podmínkách bez promývání a bez refoldingu	68
Obrázek 24 – SDS-PAGE gel purifikace na HS při denaturačních podmínkách bez promývání a bez refoldingu (viz Obrázek 23)	68
Obrázek 25 – Graf purifikace na HS při denaturačních podmínkách se zahrnutím refoldingu.....	69
Obrázek 26 – Graf purifikace na HS při denaturačních podmínkách (nanášení, promývání i eluce – bez refoldingu)	70
Obrázek 27 – SDS-PAGE gel purifikace na HS při denaturačních podmínkách (nanášení, promývání i eluce, bez refoldingu) (viz Obrázek 26).....	70
Obrázek 28 – Graf purifikace na HS při denaturačních podmínkách (nanášení, promývání i eluce, bez refoldingu), eluce v imidazolovém gradientu.....	71
Obrázek 29 – SDS-PAGE gely purifikace na HS při denaturačních podmínkách (nanášení, promývání i eluce; bez refoldingu), eluce v imidazolovém gradientu (viz Obrázek 28)	71
Obrázek 30 – SDS-PAGE gel solubilizace inkluzních tělísek v 8 M močovně.....	72
Obrázek 31 – Foto 96-jamkové destičky po měření aktivity CaApe3p viz tabulka č. 9 → změna absorbance byla způsobená zákalem v reakční směsi	75

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Přehled metod použitých pro stanovení aktivity aminopeptidáz.....	39
Tabulka 2 – Poměry složek pro přípravu SDS-PAGE gelu	52
Tabulka 3 – Kalibrační řada pro stanovení koncentrace celkového proteinu biuretovou metodou	54
Tabulka 4 – Přehled provedených experimentů s jednotlivými pufrů při zavádění postupu pro purifikaci na HS.....	72
Tabulka 5 – Výsledky (změny absorbance) prvního měření aktivity CaApe3p; lysin- <i>p</i> -nitroanilid	73
Tabulka 6 – Výsledky (změny absorbance) prvního měření aktivity CaApe3p; prolin- <i>p</i> -nitroanilid.....	74
Tabulka 7 – Výsledky (změny absorbance) prvního měření aktivity CaApe3p; leucin- <i>p</i> -nitroanilid	74
Tabulka 8 – Výsledky (změny absorbance) druhého měření aktivity CaApe3p; leucin- <i>p</i> -nitroanilid	74
Tabulka 9 – Výsledky (změny absorbance) třetího měření aktivity CaApe3p; leucin- <i>p</i> -nitroanilid	75

SEZNAM ZKRATEK

- AEBSF – 4-(-2-aminoethyl)-benzensulfonyl fluorid
- Ala – alanin
- API – aminopeptidáza I
- APY, Ape3, Ape3p – aminopeptidáza Y
- Arg – arginin
- BEVS – bakulovirový expresní vektorový systém
- BSA – bovinní sérový albumin
- CM – karboxymethyl
- CPS – karboxypeptidáza S
- CPY – karboxypeptidáza Y
- DEAE – diethylaminoethyl
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DPAPB – dipeptidyl aminopeptidáza B
- DTT – dithiotreitol
- EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
- GPC, SEC – gelová permeační chromatografie (GPC – z angl. gel permeation chromatography, SEC – z angl. size exclusion chromatography)
- GSH – glutathion
- GSSG – glutathion disulfid
- HAc – kyselina octová
- HCl – kyselina chlorovodíková
- hGAD65 – lidská dekarboxyláza kyseliny glutamové
- HIC – hydrofobní interakční chromatografie (HIC – z angl. hydrophobic interaction chromatography)
- CHAPS – 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-2-hydroxy-1-propansulfonát
- IEX – iontově výměnná chromatografie
- IgA – imunoglobulin A
- IMAC – chelatační afinitní chromatografie (z angl. immobilized metal affinity chromatography)
- IPTG – Izopropyl β -D-1-tiogalaktopyranozid

- K-p-NA – lysin-*p*-nitroanilid
- KBBV – katedra biologických a biochemických věd
- L-p-NA – leucin-*p*-nitroanilid
- Leu – leucin
- Lys – lysin
- Met – methionin
- MS – hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
- NTA – nitrilotrioctová kyselina
- OD₆₀₀ – optická denzita při $\lambda=600$ nm
- OD₆₆₀ – optická denzita při $\lambda=660$ nm
- P-p-NA – Prolin-*p*-nitroanilid
- Phe – fenylalanin
- PMSF – fenylmethylsulfonylfluorid
- PrA – proteináza A
- PrB – proteináza B
- Pro – prolin
- RNA – ribonukleová kyselina
- RPC – chromatografie na reverzní fázi (RPC – z angl. reverse phase chromatography)
- SDS – dodecylsírán sodný
- SDS-PAGE –polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti SDS
- Ser – serin
- TFA – trifluoroctová kyselina
- t-PA – tkáňový aktivátor plazminogenu
- Tyr – tyrosin

ÚVOD

Lidský život je ovlivněn několika základními faktory, kterými jsou především jídlo, vliv životního prostředí a zdraví. V těchto oblastech se v posledních letech ukázal vysoký potenciál technologie rekombinantních proteinů, neboť proteiny samy o sobě zastávají v problematice lidského zdraví významnou úlohu (Khan, 2014). Mnoho významných proteinů je získáváno z přírodních zdrojů, ovšem tento přístup je mnohdy časově i materiálově náročný a neefektivní. Technologie rekombinantní DNA tomuto směru otevřela cestu. Kódovací sekvence pro protein, který je zajímavý, může být vložena do vhodného expresního vektoru a transformována do hostitele vybraného pro expresi (Baeshen a Mohammed, 2015). Tímto způsobem lze získat požadovaný protein v mnohonásobně větším množství.

Molekulární klonování, sloužící k přípravě rekombinantních proteinů, poskytuje možnost cíleně modifikovat vlastnosti těchto proteinů za účelem jejich snadnější purifikace a také za účelem zvýšení jejich stability, aktivity či funkce. Díky tomu lze lépe zkoumat proteiny, které dosud nebyly charakterizovány *in vitro*.

Jedním z těchto proteinů je i aminopeptidáza Y (APY, Ape3p) lokalizovaná ve vakuolách patogenních kvasinek *Candida albicans*, které patří mezi časté původce nozokomiálních infekcí. U zdravých a silných jedinců nejsou tyto kvasinky velkým nebezpečím, ovšem jestliže je člověk/pacient imunokompromitován, dochází k převážení rovnováhy ve prospěch patogenní kvasinky, která se následně vymyká imunologickému dozoru. Při tomto procesu se přisuzuje velký význam právě vakuolárním hydrolázám, díky kterým dokáže kvasinka přežít v nehostinném prostředí déle než mnoho jiných mikrobů, vzdorovat imunitnímu systému, a pokud je oslaben, tak jej i přemoct.

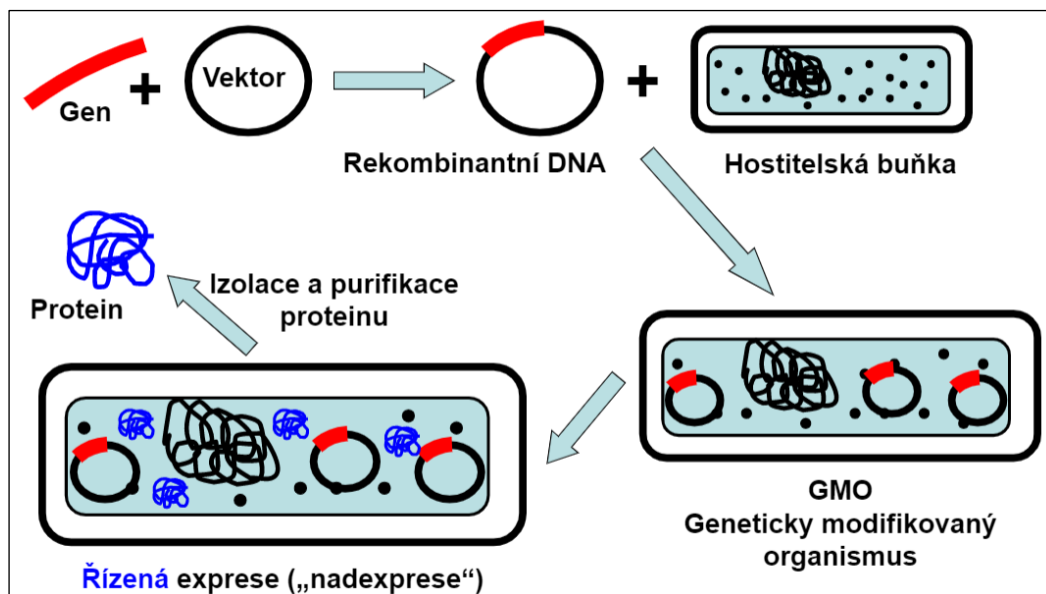
V rámci teoretické části mé diplomové práce se pokusím nastínit možnosti, pomocí jakých expresních systémů lze připravit a jak následně izolovat rekombinantní protein ve vysoké čistotě. Dále se budu věnovat právě proteolytický štěpícím enzymům kvasinek *C. albicans*, včetně aminopeptidázy Ape3p a zmíním, jakými metodami lze aktivitu takových aminopeptidáz zjistit.

V experimentální části se zaměřuji na optimalizaci procesu izolace a purifikace rekombinantního proteinu CaApe3p kvasinky *C. albicans* připravovaného v expresním systému *E. coli* s cílem najít vhodný postup pro jeho přípravu v dostatečně čisté a aktivní formě umožňující jeho následné studium.

1 Teoretická část

1.1 Rekombinantní proteiny

Spojením zájmového úseku DNA a vektorové DNA dochází k vytvoření unikátní DNA, která je nazývána rekombinantní (Glick a Patten, 2017). Tato rekombinantní DNA je následně zavedena do hostitelského organismu, kde je exprimována a dává tak vzniku proteinům, které jsou označovány jako rekombinantní proteiny (Rosano a Ceccarelli, 2014).



Obrázek 1 – Schéma přípravy rekombinantních proteinů (Novák, 2016)

1.1.1 Expresní systémy

Rekombinantní proteiny jsou produkovány prostřednictvím tzv. expresních systémů. Volba, ve kterém systému má k expresi docházet, závisí na požadovaných vlastnostech připravovaného proteinu a na tom, co který systém umožňuje. Často při výběru hraje roli rychlost růstu buněk expresního systému, rychlost produkce rekombinantního proteinu, schopnost provádět posttranslační modifikace a v neposlední řadě také výše nákladů na kultivaci daného organismu.

1.1.1.1 Bakterie

Bakteriální expresní systém rekombinantních proteinů je atraktivní z důvodu nízkých celkových nákladů, snadné kultivace a rychlého růstu bakterií a střední produktivity proteinu. *Escherichia coli* je modelový organismus charakterizovaný dobře známou biochemií a genetikou, proto tento hostitel převládá mezi bakteriálními platformami exprese, mezi které

patří například i systém *Pseudomonas* nebo *Streptomyces*. Genetické manipulace u *E. coli* jsou jednoduché a přímočaré (Chen, 2012). Ovšem pokud se produkce rekombinantních proteinů týká membránových proteinů, běžně se uvažuje o systému *Lactococcus lactis* (Khan, 2014).

Na rozdíl od proteinů produkovaných v eukaryotických buňkách, molekuly syntetizované v *E. coli* nepodléhají posttranslačním modifikacím, jako je glykosylace, tvorba disulfidových vazeb, fosforylace nebo proteolytické zpracování. Protože se posttranslační modifikace účastní procesů skládání (angl. folding), podílejí se tak na stabilitě a ovlivňují biologickou aktivitu proteinu a rekombinantní protein vytvořený prostřednictvím prokaryotického (bakteriálního) expresního systému může být neaktivní. Řešením tohoto problému však může být připojení syntetických posttranslačních modifikací. Další problém týkající se tohoto systému představují geny se vzácnými kodony, které se nacházejí například v lidském genomu, ale v bakteriálním jsou neobvyklé. Jejich exprese je často nízká a spouští předčasné ukončení syntézy molekul proteinu. Lze jej vyřešit unikátní kodonovou místně cílenou náhradou (nebo použitím plazmidu *E. coli*, který je pro vzácné kodony určený). Bakterie produkující rekombinantní proteiny ve vysoké míře jsou náchylné ke konformačnímu nebo metabolickému stresu, který negativně ovlivňuje rozpustnost proteinu. Pro převedení molekuly proteinu do rozpustné formy je třeba brát v úvahu následující faktory: vhodnou teplotu, složení média, počet kopií plazmidu nebo sílu použitého promotoru (Ferrer-Miralles a kol., 2009).

Malé cytosolické proteiny a polypeptidy kódované méně než stovkou nukleotidů jsou pro dosažení nejvyšší účinnosti exprimovány jako fúzní proteiny. Použití *E. coli* pro produkci proteinových terapeutik obvykle umožňuje přeskočit krok optimalizace, protože lze snadno vnést mnoho standardních plazmidových vektorů. Systém *E. coli* spolu s využitím RNA polymerázy bakteriofága T7 je běžně používaný expresní systém, který je běžně doporučován jako systém první volby. Tento systém byl doporučen například k expresi globulárních, rozpustných eukaryotických a prokaryotických proteinů, protože významně zvyšuje úroveň exprese proteinů (Khan, 2014).

Prvním rekombinantně připraveným biofarmaceutikem v systému *E. coli* byl na počátku 80. let 20. století lidský inzulin, který nese komerční název Humulin (Ho a Chien, 2014). Mezi další rekombinantní proteiny využívané v lékařství a produkované v systému *E. coli* dnes patří například interferony, lidský růstový hormon, tumor nekrotizující faktor a některé interleukiny (Jozala a kol., 2016).

1.1.1.2 Kvasinky

Jedním z vysoce účinných expresních systémů, zejména v oblasti farmacie, jsou jednoduché eukaryotické organismy, a to kvasinky. K tomuto účelu se využívají *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis* nebo *Yarrowia lipolytica*, ačkoli mezi kvasinkovými expresními vektory je nejoblíbenější *Saccharomyces cerevisiae* (Khan, 2014). Bakterie i kvasinky jsou ekonomicky výhodné a rychle rostoucí systémy, které lze kultivovat v bioreaktorech s vysokou hustotou buněk (Ferrer-Miralles a kol., 2009).

Skutečnost, že se jedná o eukaryotické organismy, jim dává výhodu v případě posttranslačních modifikací. Kvasinky tedy provádějí například O-vázanou fosforylaci, glykosylaci, acetylaci a tvorbu disulfidových vazeb. Nejsou však schopny poskytnout N-glykosylaci s vysokým obsahem manózy, jako v případě buněk vyšších eukaryot. Pomocí genetického inženýrství byly kvasinky naprogramovány tak, aby prováděly lidskou N-glykosylaci, což dokazuje, že tato platforma je velmi slibná a stojí za to ji rozvíjet (Nielsen, 2013). Kromě toho produkce rekombinantních proteinových terapeutik v kvasinkách usnadňuje krok čištění, protože léčivo může být vylučováno do média. Na druhé straně jsou kvasinky, stejně jako bakteriální systémy, vystaveny konformačnímu stresu, který vede k defektní konformaci konečného produktu.

Mezi hlavní biofarmaceutika získávaná v kvasinkových expresních systémech patří lidský sérový albumin, inzulin a jeho analogy a vakcíny proti papilomavirům a hepatitidě (Ferrer-Miralles a kol., 2009).

1.1.1.3 Mikrořasy

Mikrořasy představují další platformu pro produkci rekombinantních proteinů. Největší pozornost je zaměřena na *Chlamydomonas reinhardtii*, ačkoli existují zprávy týkající se dalších druhů mikrořas, včetně *Phaeodactylum tricorutum*, červených řas *Cyanidioschyzon merolae* a zelených řas *Haematococcus pluvialis* a *Dunaliella tertiolecta* (Dyo a Purton, 2018). *C. reinhardtii* je mimořádně atraktivní alternativou díky nízké ceně a nenáročným podmínkám, v níž dochází ke kultivaci. Velmi účinná technologie výroby

biomasy v těchto jednobuněčných fotosyntetických řasách byla nedávno vyvinuta s využitím fotobioreaktorů (Taunt a kol., 2018). Navíc rozmnožování řas v uzavřených bioreaktorech za kontrolovaných podmínek brání kontaminaci (Dyo a Purton, 2018).

Není to jen možnost získání velkého množství biomasy v krátkém čase, co z nich dělá atraktivního hostitele pro produkci široké škály proteinů včetně biofarmak, ale také mnoho dalších vlastností charakteristických pro tyto jednobuněčné řasy. *C. reinhardtii* je modelový organismus, jehož tři genomy (jaderný, mitochondriální a chloroplastový) byly zcela osekvenovány, což vedlo k možnosti jeho cílené genetické modifikace (Taunt a kol., 2018). Bezesporu je třeba zdůraznit, že v případě řas lze dosáhnout exprese transgenů v jaderném i chloroplastovém genomu, což z tohoto organismu dělá univerzálního hostitele. Zavedení genu zájmu do malého chloroplastového genomu je však mnohem více žádoucí, protože zajišťuje stabilní a vysokou úroveň exprese (Dyo a Purton, 2018), zatímco v jiných organelách mikrořas by třeba glykosylace mohla probíhat trochu jinak, než jak by tomu bylo v savčích buňkách (Dumontier a kol., 2018). Chloroplast tedy může sloužit jako bezpečný subcelulární kompartment pro akumulaci rekombinantního proteinu ve vysoké míře. Navíc tato jednobuněčná řasa nabízí další výhody, včetně správného skládání a tvorby disulfidových vazeb, což je klíčové pro správné sestavení proteinu. Díky všem těmto vlastnostem se řasy používají k výrobě komplexních rekombinantních proteinů a třeba i vakcín (Taunt a kol., 2018). S využitím nástrojů genetického inženýrství je v *C. reinhardtii* produkováno více než 100 rekombinantních proteinů včetně monoklonálních protilátek, podjednotkových vakcín, růstových faktorů (např. hGH), imunotoxinů a proteinů napodobujících protilátky (Dumontier a kol., 2018).

1.1.1.4 Vlákňité houby

Vlákňité houby slouží jako buněčná platforma především pro produkci průmyslových enzymů ve velkém měřítku. Právě vzhledem k vlastnostem, jako je velmi rychlý a silný růst a schopnost uvolňovat velké množství proteinů přímo do substrátu, je tato platforma využívána v širší míře (Havlík a kol., 2017). Bylo hlášeno, že houby jako *Aspergillus niger* byly schopny produkovat a vylučovat cca 30 g/l glukoamylázy a *Trichoderma reesei* dokonce až 100 g/l extracelulárních proteinů. Nicméně byly zjištěny některé nevýhody při využití vláknitých hub jako hostitelské platformy pro produkci rekombinantních proteinů. Mezi tyto nevýhody patří například vznik morfologických defektů, což vede k narušení exprese. Kromě toho se konečný produkt může lišit od savčího proteinu vlivem nesprávného pH, aktivity houbových proteáz nebo rozdílů ve vzorci glykosylace. Pokud jde o problémy s glykosylací,

některé úspěšné pokusy byly provedeny v případě *A. nidulans* a *A. niger* (Anyago a Mortensen, 2015). V případě exprese v *Neurospora crassa* byl za účelem předejití nežádoucí proteolytické degradace finálního produktu přesně nastaven a optimalizován celý výrobní proces, včetně rozhodujících parametrů, jako je pH, které ovlivňuje aktivitu právě již zmíněných houbových proteáz (Havlík a kol., 2017). V současné době se *A. nidulans*, *A. niger*, *N. crassa* a *T. reesei* používají hlavně jako expresní systémy pro získání především rekombinantních protilátek (Zubeita a kol., 2018).

1.1.1.5 Hmyzí buňky

Platforma hmyzích buněk se zdá být kompromisním řešením mezi bakteriálním systémem a systémem savčích buněk. Produkce rekombinantních proteinů v hmyzích buňkách je možná díky vývoji bakulovirového expresního vektorového systému BEVS (Felberbaum, 2015). Proces zahrnuje dvě fáze. Nejprve se hmyzí buňky namnoží na požadovanou koncentraci a poté se infikují vhodně modifikovaným bakulovirem obsahujícím gen zájmu (Gecchele a kol., 2015). Hmyzí buňky používané v tomto systému pocházejí ze *Spodoptera frugiperda*, *Drosophila melanogaster* a *Autographa californica* a jsou citlivé na infekci již zmíněným bakulovirem. Dalším méně používaným hmyzem je *Trichoplusia ni* nebo *Bombyx mori*.

Hmyzí expresní systém má mnoho výhod, pokud jde o expresi rekombinantních proteinů, avšak je nutné kultivovat jejich kultury po menších objemech (Contreras-Gómez a kol., 2014). V případě hmyzích buněčných linií navíc nehrozí kontaminace priony a onkogenní DNA (Le a kol., 2018) a zajišťují vysoký výtěžek proteinů (Gecchele a kol., 2015). V hmyzích buňkách, stejně jako v savčích, dochází ke štěpení signálních peptidů a tvorbě disulfidových vazeb v endoplazmatickém retikulu (Felberbaum, 2015).

Pokud však požadovaný protein vyžaduje složité posttranslační úpravy, systém hmyzích buněk nebude ideálním řešením. Hlavní překážkou jsou rozdíly v glykosylaci, které významně ovlivňují biologickou aktivitu proteinu (Le a kol., 2018). Hmyzí buňky nejsou schopny provádět N-glykosylaci (Felberbaum, 2015). K překonání této překážky byly vyzkoušeny různé přístupy, včetně zavedení savčích glykosyltransferáz do hmyzích buněk nebo koexprese těchto enzymů spolu s genem zájmu v bakulovirech (Le a kol., 2018). Navzdory mnoha výhodám je tento systém poměrně drahý kvůli nákladům na médium pro kultivaci hmyzích buněk (Gecchele a kol., 2015).

S použitím tohoto expresního systému byly získány různé terapeutické proteiny, jako je tkáňový aktivátor plasminogenu (t-PA), lidská dekarboxyláza kyseliny glutamové (hGAD65) a virové a parazitické proteiny (Gecchele a kol., 2015).

1.1.1.6 Savčí buňky/kultury

V případě rekombinantních proteinů s klinickou aplikací dominuje ostatním systémům exprese v savčích buňkách (Khan, 2014). Savčí hostitelské buňky jsou zdrojem enzymů, monoklonálních protilátek, srážecích faktorů, hormonů a cytokinů (Dumont a kol., 2016). Jejich produkce však vyžaduje vhodně vybranou buněčnou linii a metodologii transportu požadovaného genu do buněk. Obvykle se rekombinantní DNA zavádí do živočišné buňky pomocí jedné ze dvou hlavních metod. První zahrnuje infekci virem. Druhá metoda nepoužívá žádné vektory a heterologní DNA je zavedena přímo do buňky za použití např. mikroinjekcí a elektroporačních technik. Promotory z cytomegaloviru a opičí virus jsou široce používány pro konstrukci expresních kazet pro savčí buňky (Khan, 2014).

Kultury savčích buněk jsou schopny syntetizovat velké a složité molekuly proteinů. Nejčastěji používanými liniemi buněčných kultur jsou myší myelomové kultury a buněčné systémy vaječníků čínského křečka. V poslední době však došlo k posunu k lidským buněčným liniím. Je velmi vysoká pravděpodobnost, že cílový protein v tomto systému získá posttranslační modifikace charakteristické pro lidské proteiny. Zde je třeba poznamenat, že obecně mohou příslušné posttranslační modifikace provádět i jiné savčí linie, ačkoli mohou být produkovány i posttranslační modifikace jiné než lidské (například kyselina N-glykolylnauraminová nebo galaktóza- α -1,3-galaktóza), které mohou spouštět imunitní odpověď. Další výhodou savčích kultur je možná sekrece heterologních proteinů v místě extrakce prostřednictvím buněčné lyze. Kromě toho je savčí systém pro expresi proteinů charakterizován vysokou tolerancí ke změnám teploty, kyslíku, pH nebo úrovni tlaku ve fázi produkce (Dumont a kol., 2016).

Systém však není bez omezení. Konkrétně je zde riziko infekce zvířecími viry a úrovně produkce je v porovnání s výše zmíněnými expresními systémy nízká (Houdebine, 2009). Dalším problematickým faktorem je bezpochybně i kultivační médium, které v tomto případě vyžaduje přes padesát různých složek, takže je obtížné optimalizovat jejich koncentrace. Savčí buňky často vyžadují suplementaci růstových faktorů, aminokyselin, redukčních činidel nebo vitamínů, zatímco mikroorganismy často vyžadují pouze jednoduchou kombinaci

základních prvků, jako je dusík, uhlík, fosfor nebo minerální soli, a navíc vykazují podstatně rychlejší růst (Baltz a kol., 2010).

1.1.1.7 Transgenní zvířata

V neposlední řadě lze rekombinantní proteiny připravovat i prostřednictvím transgenních zvířat. První takový schválený protein byl připraven v roce 2006 a to tak, že byl vylučován do mléka transgenních koz. Jednalo se o antitrombin, který brání nadměrné aktivitě koagulačního systému (Maksimenko a kol., 2013). Od té doby transgenní zvířata umožnila syntézu široké škály rekombinantních terapeutik, včetně monoklonálních protilátek, vakcín, cytokinů, hormonů, enzymů, růstových faktorů, fibrinogenu a kolagenu. V současné době se používají dva hlavní způsoby získávání proteinů: mléko od transgenních savců (jako jsou ovce, kozy, krávy, králíci nebo prasata) a vejce od transgenních kuřat. Kromě toho může být protein zájmu produkován např. do krve, moči, hemolymfy larev hmyzu nebo do semenné plazmy (Houdebine, 2009).

Cílem přístupu genetického inženýrství je v tomto případě získat transgenní zvířata s transgenem kódujícím rekombinantní protein integrovaný do genomu všech buněk zvířete a schopným předat jej svým potomkům. Obvykle k integraci DNA do genomu buňky dochází v oblastech chudých na geny. Toho lze dosáhnout aplikací transgenní sekvence do samčího pronuklea zygoty pomocí mikroinjekcí nebo injekcí „somatického“ jádra do oocyty bez vlastního jádra (Maksimenko a kol., 2013).

Výroba terapeutik v platformách transgenních zvířat má výrazné výhody, jako je přirozená sekrece (jako např. v případě mléka) a poskytování správných posttranslačních modifikací. Produkce transgenních zvířat je však eticky sporná. Některé proteinové produkty mohou ovlivnit jejich zdraví, jak se již ukázalo třeba v případě lidského růstového hormonu nebo erythropoetinu, kdy byl kódující transgen exprimován do králičího mléka (Houdebine, 2009). Proto podléhá práce s transgenními zvířaty Zákonu o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty.

1.1.1.8 Transgenní rostliny

Produkce rekombinantních proteinů v rostlinném expresním aparátu začala před více než 30 lety, kdy byl lidský růstový hormon získán z tabáku (Barta a kol., 1986), a stejně jako v případě transgenních zvířat podléhá Zákonu o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty.

Metodologie transformace zahrnuje použití buď bakteriální infekce (agroinfekce), virové infekce, nebo přímý přístup, kterým je například biolistické „nastřelování“ DNA do buněčného jádra (Rech a kol., 2014). V současné době se k zavedení strukturálních genů, kódujících požadovaný terapeutický protein, používají hlavně dvě metody, a to transformace zprostředkovaná bakteriemi rodu *Agrobacterium* nebo prostřednictvím rostlinných virových vektorů (Buyel a kol., 2017). Při prvním způsobu se získají transgenní rostliny nebo rostlinné buňky se stabilní expresí transgenů, zatímco ve druhém případě se získá přechodná exprese cizího genu. Oběma způsoby je protein extrahován a purifikován a následně zkoumán z hlediska jeho aktivity nebo imunogenicity v laboratorních podmínkách na laboratorních zvířatech. Navíc v případě transgenních rostlin může být krok extrakce vynechán, protože některé části rostlin by mohly sloužit jako jedlá vakcína (Loh a kol., 2017).

Použití rostlin pro získávání rekombinantních proteinů má potenciál zvýšit jejich produkci a snížit náklady. Rostlinné expresní systémy mají četné výhody: nízké náklady, bezpečnost, vysokou stabilitu upravených proteinů, jejich sníženou citlivost vůči menším výkyvům pH nebo teploty a toleranci přítomnosti metabolitů, schopnost produkovat N-glykosylované proteiny a snadnější a levnější skladování (Łojewska a kol., 2016). Důležité je, že celkové náklady na produkci transgenních rostlin syntetizujících rekombinantní protein jsou nízké, přičemž je zachován vysoký výtěžek, který ve srovnání s prokaryotickými a jinými eukaryotickými systémy může být 10-50krát nižší (Yao a kol., 2015). Listy, plody nebo semena rostlin jsou hypoteticky neomezeným zdrojem rekombinantních bílkovin. Hladiny exprese těchto proteinů, definované jako podíl exprimovaného rozpustného rekombinantního proteinu v celkových rozpustných proteinech, se u upravených rostlin pohybují od 0,001 % do 46,1 % (Yan a kol., 2016). Možnost akumulace proteinu ve vybraném buněčném kompartmentu (především v endoplazmatickém retikulu) nebo rostlinném orgánu je velkou výhodou transgenního rostlinného systému, který se u ostatních nenachází (Bilas a kol., 2016). Kromě toho je riziko kontaminace živočišnými patogeny sníženo v případě exprese *in planta*. Na rozdíl od prokaryotických buněk jsou rostlinné organismy schopny poskytovat posttranslační modifikace, které poskytují biologickou aktivitu (Wiktorek-Smagur a kol., 2012). Mezi molekulami exprimovanými v rostlinách se však rozlišují hostitelsky specifické odchylky v glykanových strukturách. Lidské farmaceutické proteiny syntetizované v rostlinách často produkují glykosylační vzor spíše rostlinný než lidský. K překonání tohoto problému se vyvíjí strategie speciálních rostlinných expresních systémů (Fischer a kol., 2018).

System musí také čelit některým dalším výzvám, např. potížím při kontrole úrovně exprese daného transgenu (může se lišit v rostlinných orgánech, rostlinných tkáních nebo po sobě jdoucích generacích). Kromě toho je fáze čištění složitější, protože musí být odstraněny například sekundární metabolity nebo pesticidy. Vysoký podíl nákladů na produkci uměle vytvořeného proteinu tedy může vzniknout následným zpracováním. Kroky čištění a uchovávání by však mohly být eliminovány v případě jedlých vakcín, přičemž se potravina stává vakcínou sama. Dochází k tomu tak, že geneticky modifikovaná rostlina začne produkovat složky patogenu, které po pozření vedou k imunizaci spotřebitele/konzumenta (Yao a kol., 2015). Seznam kandidátských rostlin zkoumaných jako potenciální zdroj jedlých vakcín zahrnuje rýži, banány, hrách, brambory, salát a kukuřici.

V současné době některé výzkumné instituce vyvinuly fermentační strategie (např. fed-batch, kontinuální fermentace) založené na rostlinném systému, který lze snadno rozšířit (Xu a Zhang, 2014). Pro systém založený na kultuře rostlinných buněk se obvykle používají bioreaktory pro produkci rekombinantních proteinů ve velkém měřítku s pracovním objemem 1000-25000 litrů (Bandehagh a kol., 2016). Jak dokazují četné studie, systémy rostlinných buněk se úspěšně používají k produkci terapeutických proteinů v průmyslovém měřítku (Moustafa a kol., 2016), avšak doposud bylo komercializováno pouze několik příkladů terapeutik vyrobených tímto způsobem. Po dlouhé roky byl hlavním nedostatkem z hlediska komercializace nízký výtěžek proteinu (0,01-10 mg/l). Nedávný pokrok v genetickém inženýrství rostlin však umožňuje zvýšit výtěžky rekombinantních proteinů na úroveň 100 mg/l nebo dokonce až téměř 250 mg/l, čehož bylo dosaženo v případě α 1-antitrypsinu v kultuře rýžových buněk (Xu a Zhang, 2014).

Dobře známým příkladem terapeutického proteinu produkovaného v průmyslovém měřítku v kulturách mrkvových buněk je lidský rekombinantní enzym β -glukocerebrozidáza používaný při léčbě Gaucherovy choroby (Moustafa a kol., 2016). Nebo například sekreční monoklonální protilátka IgA, která rozpoznává povrchový antigen I/II bakterie *Streptococcus mutans*, byla schválena v Evropě jako řešení pro prevenci zubního kazu (Loh a kol., 2017). Dále existuje přinejmenším šestnáct typů rekombinantních antigenů proti různým onemocněním, jako jsou rotavirové infekce, gastroenteritida, vzteklna nebo cholera, které jsou produkovány *in planta* (Concha a kol., 2017).

1.1.2 Strategie izolace nerozpustných rekombinantních proteinů

Některé rekombinantní proteiny se po expresi nacházejí ve formě tzv. inkluzních tělísek. Ta vznikají při proteinové agregaci v cytoplazmě nebo v periplazmě v závislosti na použitém vektoru. Často k vytvoření této nerozpustné formy proteinu dochází při použití expresního systému bakterie *E. coli* (Wingfield a kol., 1995).

1.1.2.1 Rozbití buněk

Buňky lze účinně rozbít vysokotlakou homogenizací za použití francouzského lisu (French-pressu), který je vhodný pro objemy zpracování 40 až 250 ml. Tento lis mechanicky naruší vnější i vnitřní membránu *E. coli* (Hopkins, 1991). Sonikace je také užitečná pro rozbíjení buněk, ale je nejvhodnější pro objemy menší než 100 ml. Alternativně lze vnější buněčnou stěnu štěpit enzymaticky lysozymem (Kaback, 1971) a buňky rozbít detergenty, sonikací nebo obojím (Burgess a kol., 1975). Rozbití buňky lze napomoci jejich opakovaným zmrazováním a rozmrazováním (Johnson a kol., 1994). Proteiny, které jsou vylučovány do periplazmatického prostoru, mohou být selektivně uvolněny hypotonickým (osmotickým) šokem (Heppel, 1967).

Viskozita buněčného lyzátu může být vysoká v důsledku uvolnění nukleové kyseliny. Před centrifugací musí být viskozita snížena buď sonikací, nebo přidáním DNázy a RNázy. Do pufru by měla být zahrnuta standardní směs inhibitorů proteáz obsahující například 2-5 mM EDTA, 0,5-1,0 mM fenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) nebo 5 mM benzamidin a 1 μ M pepstatin A. Jako náhražku místo PMSF lze použít inhibitor serinových proteáz 4-(2-aminoethyl)-benzensulfonyl fluorid (AEBSF), který má ve vodném prostředí mnohem delší poločas rozpadu. Přidání α 2-makroglobulinu před konečným krokem čištění může také chránit proteiny citlivé na proteázy. Surové extrakty by měly být uchovávány v chladu a rekombinantní protein by měl být rychle převeden do fáze procesu purifikace (tj. proces, kdy dochází k očišťování proteinu zájmu od ostatních proteinů a kontaminantů), kde je stabilní vůči kontaminujícím proteázám (Ultsch a kol., 1991).

1.1.2.2 Promytí pelety

Cílem počáteční nízkootáčkové centrifugace buněčného lyzátu a následným promýváním vzniklých pelet je extrahovat co nejvíce kontaminantů z *E. coli* bez solubilizace rekombinantního proteinu. Je vhodné v průběhu promývání sledovat tento protein v různých

frakcích, a to pomocí SDS-PAGE, případně i testovat jeho biologickou aktivitu (Wingfield, 2015).

Při použití rotoru s pevným úhlem se pelety z nízkootáčkového odstředování skládají z alespoň dvou světlých měkkých/hlenovitých vrstev a tmavší pevné pelety na dně zkumavky. Pevný materiál je pravděpodobně malé množství neporušených buněk. Další vrstva obsahuje protein ve formě inkluzních tělísek a vrchní vrstva (nejméně hustá a nejsvětější barvy) jsou fragmenty vnější membrány a peptidoglykanu. Analýza horní vrstvy pomocí SDS-PAGE (po povaření proteinů ve vzorkovém pufru obsahujícím SDS při teplotě >80 °C) odhalí dva silné pásy při ~ 35 a 38 kDa představující protein OmpA a proteiny OmpC a OmpF, které se vyskytují v matrix a ve vnější membráně *E. coli* (DiRienzo a kol., 1978). Vnější membrána/peptidoglykanová vrstva může být částečně odstraněna resuspendováním a centrifugací při snížené rychlosti (nebo po kratší dobu) nebo zředěním suspenze. Alternativně mohou být buňky předem ošetřeny lysozymem před jejich mechanickým rozbíjením pomocí French-pressu nebo před použitím jiné metody pro lyzi buněk. Ošetření lysozymem snižuje velikost volně peletovaného materiálu vnější membrány/peptidoglykanu, který se poté nachází převážně rozpuštěný v supernatantu. Rekombinantní protein v dobře připravené promyté peletě bude typicky z více než 60 % čistý (Wingfield, 2015).

1.1.2.3 Extrakce/rozpuštění proteinu

Promyté pelety se extrahují vysokými koncentracemi proteinových denaturačních činidel, jako je 6 až 8 M guanidin-HCl nebo močovina. Je třeba poznamenat, že některé proteiny jsou odolné vůči denaturaci vysokými koncentracemi těchto činidel, zejména močoviny. Některé promyté pelety extrahované 8 M guanidin-HCl mohou být viskózní a nevhodné pro chromatografii. V těchto případech může pomoci předextrakce promytých pelet nedenaturující koncentrací (0,5 až 2,0 M) guanidin-HCl (Wingfield, 2015).

Solubilizace s aniontovým detergentem N-lauroylsarkosinem (Nguyen a kol., 1993) a kyselinou octovou je také užitečná (Marston a Hartley, 1990). Pokud protein obsahuje cysteinové zbytky, je nezbytné zahrnout redukční činidlo, ideálně 5-10 mM dithiothreitol (DTT). I v přítomnosti silných proteinových denaturačních činidel může být nutné vzorky krátce sonikovat nebo zahřát, aby se protein úplně rozptýlil a solubilizoval (Tanford, 1968).

Extrakční proces by měl zcela rozložit a denarovat proteinový agregát na jednotlivé molekuly proteinu. Pro počáteční extrakci se nedoporučuje močovina, protože v jejím prostředí mnohdy nedojde k úplnému rozložení agregovaného proteinu. Počáteční extrakční

pokus by měl být proveden s guanidin-HCl, který je účinnější než močovina. Většina proteinů bude extrahována 6 až 8 M guanidin-HCl. Mělo by být přítomno odpovídající redukční činidlo pro udržení sulfhydrylových skupin v redukováném stavu, a tak zabránit tvorbě umělé disulfidové vazby. Přítomnost EDTA a mírně kyselého pH (6,0 až 6,5) pomůže minimalizovat oxidaci cysteinu. Extrakt může vyžadovat vyčeření (zbavení se nerozpustných látek) filtrací nebo odstředěním (Tanford, 1970).

1.1.2.4 Purifikace

Po extrakci proteinu lze pokračovat přímou cestou purifikace, nebo může být protein před purifikací podroben procesu opětovného skládání z denaturované formy (angl. refolding) a purifikován až poté. Zdá se, že skládání proteinu není ovlivněno proteiny z bakteriálního extraktu (London et al., 1974), nicméně bylo popsáno, že odstranění neproteinového materiálu je před opětovným skládáním prospěšné (Darby a Creighton, 1990). Stojí za zvážení, jestli nebudou vysoké koncentrace bakteriálního proteinu v pozadí podporovat agregaci denaturovaného rekombinantního proteinu (kvůli efektu shlukování makromolekul) (Ellis, 2001). Pokud je možná purifikace proteinu v denaturovaném stavu, je vhodné v jednom případě pro proces skládání proteinu použít materiál purifikovaný v denaturačních podmínkách a v druhém případě použít materiál s vyčeřenými proteinovými extrakty, aby se dalo pozorovat, zda má přítomnost kontaminantů nějaký vliv na výtěžek foldovaného proteinu (Darby a Creighton, 1990).

Mohou být i specifické důvody pro čištění proteinů přímo v denaturovaném stavu. Například některé proteolytické enzymy, jako je HIV-1 proteáza, se v neinhibovaném stavu samy tráví (podléhají autoprotolýze) (Mildner a kol., 1994), ale mohou být bezpečně purifikovány v denaturovaném (inaktivním) stavu. Jiné proteiny, jakmile se složí, mohou mít nízkou rozpustnost a být zvláště náchylné k agregaci, což má za následek špatné chování na maticích kolony. Obecně platí, že jsou nesbalené proteiny (tzn. v denaturovaném stavu) náchylnější k chemickým a proteolytickým reakcím (Wingfield, 2015).

Pokud je protein extrahován pomocí guanidin-HCl, je gelová permeační chromatografie užitečnou první metodou čištění, při které lze často získat protein s čistotou >80 %. V denaturačním prostředí existují proteiny jako náhodná vlákna a jejich eluce z kolony by měla být závislá na jejich molekulové hmotnosti a neměla by být ovlivněna tvarem. Pokud se protein nachází v několika píčích, mohlo dojít během extrakce k neúplné solubilizaci. V tomto případě by se měl pro extrakci použít 8 M guanidin-HCl a protein dispergovat

sonikací nebo zahřátím, je-li to nutné. Dalším možným důvodem by byla tvorba intermolekulárních disulfidových vazeb. V tomto případě by měl být přidán DTT ke vzorku a do pufrů v koloně, nebo by měla být jeho koncentrace zvýšena. Kolona může být často ekvilibrována a eluována nižšími koncentracemi guanidinu-HCl (např. 4 M), než jaké se používají pro skutečný extrakční proces. Pro další zpracování by měl být vybrán pouze monomerní protein, který lze skladovat zmrazený, ideálně při -80 °C (Wingfield a kol., 1997).

Částečně purifikovaný protein v guanidinu-HCl lze skládat přímo nebo lze denaturační činidlo vyměnit dialýzou nebo s využitím gelové filtrace (GPC) za přítomnosti 1% až 5% (v/v) kyseliny octové nebo mravenčí a poté může být lyofilizován. Alternativně lze protein okyselit kyselinou trifluoroctovou (TFA; $\leq 0,1$ % (v/v)) a dále čistit chromatografií na reverzní fázi (Wingfield a kol., 1999).

Proteiny označené histidinovými zbytky lze purifikovat v pufrch obsahujících guanidinu-HCl, močovinu nebo dokonce SDS pomocí chromatografie s chelátorem kovů. Existuje mnoho zpráv o „skládání proteinu v kolonovém uspořádání“ při vazbě denaturovaného proteinu v guanidinu-HCl (nebo močovíně) na kolonu a poté provedením refoldingu pomocí reverzního gradientu močoviny (např. Gulnik a kol., 2002).

Proteiny v močovíně a neiontových nebo zwitteriontových detergentech (např. CHAPS) mohou být čištěny iontoměničovou chromatografií (Wingfield a kol., 1991). Pro iontoměničovou chromatografii byly zaznamenány lepší výsledky s použitím proteinu, který byl nejprve extrahován guanidinem-HCl a poté převeden do prostředí obsahujícího močovinu (Shire a kol., 1984).

Pokud se močovina používá buď pro extrakci, nebo pro udržení rozpustnosti během refoldingu, měl by být zahrnut kyanátový lapač, jako je glycin nebo Tris-HCl pufr, aby se zabránilo karbamylaci proteinu (Stark a kol., 1960).

1.1.2.5 Složení proteinu (refolding)

Protokoly pro skládání proteinů v podstatě zahrnují řízené odstraňování denaturačního činidla za podmínek, které minimalizují agregaci a umožňují správnou tvorbu disulfidových vazeb.

Aby se minimalizovala agregace, skládání se normálně provádí při nízkých koncentracích proteinu (např. 0,01-0,10 mg/ml). Pro malé proteiny s jednou doménou mohou být často tolerovány vyšší koncentrace (např. 0,1-1,0 mg/ml). Ředění (diluce) a dialýza jsou nejběžnější

metody pro odstranění denaturačního činidla. Rozpustnost během skládání lze udržovat pomocí pomocných rozpouštědel a v nedenaturujících koncentracích, například 1-4 M močovina (London a kol., 1974) nebo 0,1-1,5 M guanidin-HCl (Orsini a Goldberg, 1978), 0,4-0,8 M arginin (Clark a kol., 1999) nebo pomocí neiontových detergentů a lipidů (Zardeneta a Horowitz, 1994), kationtových detergentů (Puri a kol., 1992) a polyethylenglykolu (Cleland a kol., 1992). Tyto různé přísady fungují tak, že minimalizují mezimolekulární asociace mezi „lepivými“ hydrofobními povrchy přítomnými v meziproduktech skládání. Aditiva, jako je síran amonný, glycerol, sacharóza, enzymové substráty, inhibitory a ligandy byly také použity ke zlepšení skládání proteinů (Clark a kol., 1999).

Protein exprimovaný v cytoplasmě *E. coli* je v redukovaném stavu. To platí pro rozpustné i nerozpustné proteiny. Jakmile je nerozpustný protein solubilizován, je třeba jej udržovat v redukovaném stavu přítomností redukčního činidla, dokud není zahájeno skládání proteinu. Oxidační tvorba disulfidových vazeb (jeden z kroků omezujících rychlost při skládání proteinů) může být katalyzována nízkomolekulárními thiolovými a disulfidovými páry, jako je redukovaný a oxidovaný glutathion (GSH/GSSG). Redoxní pufrů usnadňují oxidaci prostřednictvím výměnných reakcí thiol/disulfid (Gilbert, 1995). Normálně se používají poměry GSH/GSSG = 5-10 s celkovou koncentrací glutathionu 1-5 mmol/l (Wetlaufer, 1984). Aby se snížila rychlost ztráty GSH v důsledku vzdušné oxidace, měla by být v pufru obsažena 1 mM EDTA (Wetlaufer a kol., 1987). Optimální koncentrace a poměry činidel musí být stanoveny empiricky. Skládání a oxidace se normálně provádějí současně (Rudolph a kol., 1997).

Skládání proteinu *in vivo* je u eukaryot i prokaryot podporováno dvěma třídami přídatných proteinů: skládacími (foldingovými) katalyzátory (Schiene a Fischer, 2000) a molekulárními chaperony (Saibil, 2013). Foldingové katalyzátory urychlují kroky omezující rychlost při skládání proteinů, jako je tvorba disulfidových vazeb (Narayan, 2012) a rotace vazeb X-Pro (peptidyl-prolyl cis-trans izomeráza) během skládání proteinů. Chaperony jsou proteiny napomáhající při skládání proteinů (Lennarz a Lane, 2013) tím, že vážou denaturované nebo nesbalené proteiny, čímž zabraňují chybnému skládání a agregaci. Cytoplazma *E. coli* je udržována v redukovaném stavu thioredoxinem a dráhami glutathion/glutaredoxin. U hostitelů, kde je redukce thioredoxinu a glutathionu narušena mutacemi genů pro thioredoxinreduktázy a glutathionreduktázy, umožňují výsledné oxidační podmínky tvorbu disulfidových vazeb v exprimovaných proteinech lokalizovaných

v bakteriální cytoplazmě. Kromě toho, že periplazma *E. coli* poskytuje oxidační prostředí, tak obsahuje také thiol-disulfid oxidoreduktázy, které katalyzují tvorbu disulfidových můstků, stejně jako i další enzymy, které podporují skládání proteinů, konkrétně třeba peptidyl-prolyl cis/trans izomerázy (Bessette a kol., 1999). K produkci oxidovaných proteinů *in vivo* je tedy tradičním přístupem jejich sekrece do periplazmatického prostoru, která je vhodná pro proteiny, jež jsou toxické pro buňku, když jsou exprimovány v cytoplazmě (Cornelis, 2000).

1.1.2.6 Purifikace složeného proteinu

Jakmile je protein složen, lze použít kteroukoli z metod purifikace. Jednou z metod, která by měla být zahrnuta, je gelová filtrace, která může být sama o sobě dostatečnou. Správně vybraný nosič by měl odstranit veškeré zbývající proteiny *E. coli* a oddělit agregovaný a chybně složený protein od nativního sbaleného proteinu. Lze očekávat, že chybně složený protein bude mít větší molekulární poloměr (vyšší zdánlivou hmotnost) než odpovídající nativní protein (Wingfield, 2015).

1.1.3 Přehled metod purifikace rekombinantních proteinů

Při výrobě rekombinantních proteinů se klade stále větší důraz na získání těchto proteinů v relativně čisté formě. Proteiny s terapeutickým využitím, včetně biofarmaceutik, by neměly nebo nesmí obsahovat endotoxiny, kontaminanty ani přebytečné proteiny. Postup čištění spočívá v separaci cílového proteinu při zachování jeho chemické struktury a biologické aktivity (Labrou, 2014).

Zde je uveden přehled vybraných běžně využívaných chromatografických metod čištění. Každá metoda čištění využívá pro separaci konkrétních vlastností proteinů, jako je velikost, náboj, hydrofobicita či specifická afinita (Owczarek a kol., 2019). Velice často bývá zapotřebí zkombinovat několik těchto metod pro získání proteinu o požadované čistotě a požadovaném výtěžku.

1.1.3.1 Gelová permeační chromatografie (GPC, SEC)

Tato metoda využívá rozdílů ve velikosti bílkovin. Směs proteinů se vloží do kolony naplněné porézními gelovými kuličkami, skládajícími se z polysacharidových řetězců (dextran, celulóza, glukóza + akrylamid, ...). Pokud se na kolonu naplněnou touto náplní vpustí velký protein, nemá možnost se dostat do pórů a skrz kolonu putuje velmi rychle. Naproti tomu u proteinů, které se velikostně vejdou do gelových pórů, dochází k retenci

a putují tímto prostředím pomaleji. Tuto strategii nelze použít pro separaci proteinů, jejichž velikosti se liší pouze nepatrně (Owczarek a kol., 2019).

1.1.3.2 Hydrofobní interakční chromatografie (HIC)

Proteiny obsahují aminokyseliny, které mají hydrofobní a hydrofilní postranní řetězce, jenž definují jejich afinitu k molekulám vody. Tato vlastnost hraje hlavní roli při skládání proteinů. Hydrofobní chromatografie využívá hydrofobní interakce k čištění středně hydrofobních proteinů (Owczarek a kol., 2019). Proteiny se díky své hydrofobitě vážou na hydrofobní pryskyřici, ovšem molekuly vody obklopující proteiny této vazbě brání. Z toho důvodu jsou v koloně vyžadovány vysoké koncentrace soli, která molekuly vody vytěsňuje. Pro tyto účely je často využíván například síran amonný. Aby se získaly vázané proteiny, solný gradient se snižuje (Saraswat a kol., 2013). Účinnost elučního procesu se zvyšuje přidáním např. alkoholů (Hegyí a kol., 2013).

1.1.3.3 Chromatografie na reverzní fázi (RPC)

Reakční schéma chromatografie s reverzní fází je podobné hydrofobní interakční chromatografii. Klíčový rozdíl se týká vlastností chromatografických médií. V HIC je koncentrace hydrofobních prvků vázaných na pryskyřici 10-20 $\mu\text{mol/ml}$, zatímco v RPC dosahuje několik stovek $\mu\text{mol/ml}$. To vede k silnější vazbě v chromatografii s reverzní fází. Zahrnuje také použití např. methanolu (rozpuštědlo méně polární než voda) během eluce. Chromatografie s reverzní fází představuje ve srovnání s hydrofobní interakční chromatografií vyšší riziko denaturace molekuly proteinu vlivem přítomnosti organických rozpouštědel v mobilní fázi. Zároveň je ale tato metoda výhodná pro kvalitativní analýzu (Hegyí a kol., 2013).

1.1.3.4 Iontově výměnná chromatografie (IEX)

Tento druh chromatografie je obecně prvním krokem pro separaci proteinových molekul, pakliže není přítomná afinitní značka (Labrou, 2014). Náplní kolony jsou při tomto typu chromatografie gelové kuličky, které mají buď kladný, nebo záporný náboj. Obvykle jsou vyrobeny z polysacharidů, jako je agaróza, celulóza nebo dextran, jež jsou navázané na postranní skupiny, které mohou vyměňovat ionty, například diethyl-aminoethyl (DEAE; anex) a karboxymethyl (CM; katex) (Hegyí a kol., 2013). Vzhledem k tomu, že proteiny jsou amfoterní, mají tendenci vázat se na pryskyřici pro iontové výměny za pH specifických podmínek. V závislosti na pH dostávají proteiny kladný, neutrální nebo záporný náboj. Proto se mohou vázat k pryskyřici nebo nevykazovat žádnou přitažlivost a být vymyty z kolony.

Poté je třeba navázané proteiny eluovat z iontoměničové pryskyřice, a to solným roztokem pufru. Ionty soli přítomné v pufru soutěží s proteiny o místo na pryskyřici. Přitažlivé síly se mezi proteiny a náplní kolony přerušují a proteiny se vyplaví (Owczarek a kol., 2019). Tato metoda se ukázala jako vhodná pro separaci proteinů různého náboje při specifickém pH.

1.1.3.5 Afinitní chromatografie

Afinitní chromatografie je nejoblíbenější metodou ze všech chromatografických přístupů (Davis, 2012). Umožňuje izolovat specifický typ proteinu z komplexní směsi různých proteinů a kontaminantů. Tato metoda je založena na proteinové afinitě k některým specifickým skupinám (ligandům) na chromatografických částicích. Experimentální uspořádání zahrnuje kolonu naplněnou nerozpustnými modifikovanými gelovými částicemi. Na nich je ukotvena specifická molekula (např. protilátka, antigen) či skupina jako třeba iont kovu, které vykazují zvýšenou afinitu vůči komplementární afinitní skupině nebo značce umístěné na proteinu zájmu. Nežádoucí složky směsi se na gelové částice nezachytí a migrují skrz kolonu dál. Poté musí být navázaný protein promyt od případných nežádoucích látek, které se na kolonu třeba slabě vážou, a následně může být eluován. Toho lze dosáhnout nepřímo, a to změnou fyzikálních parametrů (například změnou pH nebo teploty), jakož i změnou iontové síly, složení pufru, přidáním různých chelátorů, nebo lze eluovat vázaný protein přímo, a to s pomocí kompetitivně se vážajících ligandů (Wiktorek-Smagur a kol., 2012).

Podle typu cílových molekul a interagujících ligandů na nosiči rozlišujeme různé techniky afinitní chromatografie např. imunoafinitní chromatografie (interakce mezi antigenem a protilátkou), lektinová afinitní chromatografie (interakce lektinů s cukry), afinitní chromatografie na imobilizovaných barvivech (interakce mezi barvivy a proteiny) nebo afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovů (interakce mezi kovem a proteinem) neboli IMAC, z angl. immobilized metal affinity chromatography. Občas nejsou chemické vlastnosti cílového proteinu zcela identifikovány. V takovém případě se pro získání silné a selektivní vazby cílového proteinu na nosič v koloně používají fúzní (značené) proteiny. Vznikají spojením dvou nebo více genů původně kódujících jednotlivé proteiny. Navíc je na konec genu ligován malý fragment DNA, což umožňuje jeho translaci spolu se zájmovým proteinem. Tato krátká sekvence, známá jako „tag“ (značka), odpovídá za silnou vazbu na modifikovaný nosič. Takto značené proteiny jsou schopny se navázat na afinitní kolonu, zatímco neznačené proteiny a ostatní kontaminanty jsou vymyty (Khan, 2014).

Při přípravě rekombinantních proteinů je často používaná polyhistidinová značka (His-tag / His-kotva), která umožňuje purifikaci pomocí metody IMAC (Coolbaugh a kol., 2017) označované také jako chelatační afinitní chromatografie. His-tag připojený k N- nebo C- konci cílového proteinu obsahuje sekvenci histidinových zbytků (typicky šest nebo více). Zbytky mají vysokou afinitu k některým kovovým iontům, například mědi, kobaltu, niklu a zinku (Bornhorst a Falke, 2000). Polyhistidinový úsek se může vázat nekovalentně a vytvářet koordináční vazby s těmito kovovými ionty imobilizovanými na pryskyřici. Matrice použitá v IMAC obsahuje kov-chelatační skupinu, která váže histidinové zbytky navázané na rekombinantní protein. Nejčastěji se používá Ni^{2+} -nitrilotrioctová kyselina (Ni-NTA) (Zhao a kol., 2013).

His-tag se nejlépe váže na pryskyřici IMAC, když je použit téměř neutrální pufr. Vazebný pufr typicky zároveň obsahuje nízké koncentrace imidazolu, který brání nespecificky se vázajícím molekulám. Existuje ale mírné riziko oslabení aktivity proteinu nebo narušení jeho správného skládání. Když jsou značené proteiny navázané na nosiči, může být aplikováno promývání málo koncentrovaným elučním pufrem. Samotná eluce probíhá za vyšších koncentrací imidazolu vytěsňujícího vázaný protein. V další fázi může být nutné odstranit His-tag, což se může ukázat jako nákladné. Na druhou stranu, jelikož je sekvence His-tag velmi krátká, nemusí mít vliv na konečnou strukturu proteinu. Mohla by však negativně ovlivnit rozpustnost. V takovém případě se zvažují velké afinitní značky, které vedou ke zvýšení celkové rozpustnosti proteinu. Ty jsou poté standardně odstraněny pomocí specifických proteáz v následném kroku afinitní chromatografie (Zhao a kol., 2013).

K tomuto systému eliminace značek existuje alternativa na bázi proteázy, která byla navržena pro snížení nákladů, a to vnesení samoštěpícího inteinu (Coolbaugh a kol., 2017), což je úsek, který dokáže vystříhnout sám sebe z proteinové sekvence (Perler a kol., 1994).

Ni-NTA nosič má četné výhody. Obecně může být použit pro mnoho rekombinantních proteinů, protože His-tag nemá elektrický náboj a není ani imunogenní a ani toxický (Zhao a kol., 2013). Kromě toho jsou činidla komerčně dostupná a vyžaduje se pouze jedna kolona (Coolbaugh a kol., 2017). Na druhé straně se výše uvedené těžké kovy mohou z kolony vymývat, což snižuje produktivitu čištění.

Imunoafinitní chromatografie je další formou afinitní chromatografie, která je s oblibou využívána pro purifikace proteinů. Zde je na gelové kuličky navázána specifická protilátka proti cílovému proteinu. Tato metoda je velmi efektivní z důvodu specifické interakce protilátka-antigen, ačkoli má také své nevýhody. Pokud není dostupná komerční protilátka, tak se musí protilátka získat imunizací zvířete rekombinantním proteinem. To zahrnuje nejprve použití alternativních metod čištění. Navíc protilátky mohou vázat specifické proteiny s vysokou afinitou, což brání eluci proteinů z pryskyřice. K jeho získání se používá např. změna pH, chaotropní činidla nebo močovina, které mohou protein inaktivovat (Owczarek a kol, 2019).

1.1.4 Příklady purifikace aminopeptidáz

1.1.4.1 Argininová aminopeptidáza z bakterií *Lactobacillus sakei*

Argininová aminopeptidáza bakterií *Lactobacillus sakei* byla získána tak, že byl organismus nejprve kultivován v MRS bujónu při 30 °C. Po dosažení $OD_{660}=3,5$ byly buňky odstředěny a následně lyzovány v roztoku obsahujícím lysozym a sonikací. Buněčný extrakt byl frakcionován síranem amonným a peleta obsahující požadovaný protein byla solubilizována v Tris-HCl pufru. Následně byl roztok frakcionován pomocí HIC a frakce vykazující aktivitu byly vysráženy síranem amonným a výsledná peleta byla rozpuštěna v menším množství Tris-HCl pufru s obsahem NaCl. Poté byla provedena gelová permeační chromatografie s nosičem Sephacryl 200 HR a byly jímány 3ml frakce. Aktivní frakce byly v poslední řadě aplikovány na anex (Resource Q) a v průběhu separace byly jímány 1ml frakce, které byly analyzovány pomocí SDS-PAGE. V průběhu purifikace a charakterizace enzymu byla měřena aktivita za použití substrátu L-arginin-7-amido-7-methylkumarinu. Stanovení fluorescence probíhalo při 37 °C při excitační vlnové délce 360 nm a emisní vlnové délce 440 nm (Sanz a Toldrá, 2002).

1.1.4.2 Rekombinantní leucinová aminopeptidáza II

V případě purifikace rekombinantní aminopeptidázy II bakterie *Bacillus stearothermophilus*, která byla připravena v expresním systému *E. coli* ve formě rozpustného proteinu s His-kotvou, byla po lyzi buněk aplikována chelatační afinitní chromatografie. Tato jednokroková purifikace byla v tomto případě zcela dostačující (Kuo a kol., 2003).

1.1.4.3 Purifikace rekombinantní prasečí aminopeptidázy N

Tato rekombinantní aminopeptidáza byla připravena v expresním systému *E. coli*, a to ve formě inkluzních tělísek. Buněčná peleta vzniklá centrifugací buněk po expresi byla inkubována v pufru obsahujícím lysozym a sonikována. Tím došlo k lyzi buněk a takto získaná suspenze byla poté centrifugována za vzniku pelety, která byla promyta pufrem s obsahem Tritonu X-100 a EDTA a opět byla směs centrifugována. Takto vzniklá peleta byla třikrát promyta PBS pufrem, poté byla rozpuštěna v nanášecím pufru SDS-PAGE a povařena po dobu 10 minut. Směs byla následně odstředěna a supernatant byl separován pomocí SDS-PAGE. Vzniklý gel se vzorkem byl 3x promyt deionizovanou vodou, poté PBS pufrem, a nakonec obarven pomocí KCl. Oblast obsahující cílový protein byla vyříznuta a rozpuštěna v PBS. Tento roztok byl 3x zmrazen a rozmrazen, poté centrifugován a supernatant byl následně renaturován pomocí dialýzy proti pufru s obsahem glutathionu v redukované a oxidované formě. Nakonec byla provedena ještě jedna dialýza, a to proti Tris-HCl pufru. Protein byl v posledním kroku zakoncentrován pomocí polyethylenglykolu (Liu a kol., 2009).

1.2 Vakuolární proteázy kvasinek

Vakuola hraje v kvasinkách významnou roli při různých metabolických procesech a stojí za jejich dynamickou adaptabilitou vůči rozsáhlejší změnám okolního prostředí (Hecht a kol., 2014) a za schopností vzdorovat imunitnímu systému (van den Hazel a kol., 1996). Velký podíl na tom mají přítomné proteázy, což jsou enzymy hydrolyticky štěpící proteiny. V kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou v tomto případě modelovým organizmem, bylo charakterizováno 7 vakuolárních proteáz. Dvě endopeptidázy (proteinázy A a B), dvě karboxypeptidázy (S a Y) a tři aminopeptidázy, kterými jsou aminopeptidáza I, Y a dipeptidyl aminopeptidáza B (Hecht a kol., 2014).

1.2.1 Proteináza A (PrA)

Proteináza A je aspartátová endoproteáza spadající do proteázové rodiny A1 (Jones a kol., 1997). Nejochoťněji štěpí substráty mezi dvěma aminokyselinami, které jsou hydrofobní povahy. Proteináza A se stejně jako i Proteináza B účastní degradace proteinů, když se buňka dostává do metabolického stresu, například ve fázi růstu nebo když buňka hladoví (Klionsky a kol., 1990).

Tento enzym je klíčovým aktivátorem nezralých vakuolárních proteáz. Spouští totiž sled na sebe navazujících katalytických reakcí, přičemž po tom, co se dostane jako prekurzor do vnitřního prostředí vakuoly, tak nejprve dochází k samotné autokatalýze této proteinázy, čímž vzniká její aktivní forma. Následně funguje jako jediný aktivátor proteinázy B, přičemž obě tyto hydrolázy následně katalyzují proteolytické štěpení prekurzorů ostatních vakuolárních hydroláz, čímž dojde k jejich aktivaci (Hecht a kol., 2014).

1.2.2 Proteináza B (PrB, cerevisin)

PrB patří mezi serinové endoproteázy a náleží rodině S8 (Barret a Rawlings, 1995). Je exprimována také ve formě inaktivního enzymu, u kterého proběhne v endoplazmatickém retikulu glykosylace a který je posléze ve vakuolárním prostředí aktivován pomocí proteinázy A (Klionsky a kol., 1990). Tato proteáza celkově zastává obdobné funkce jako PrA, jak jsem již zmínil výše.

1.2.3 Karboxypeptidáza S (CPS)

CPS je na zinku závislá karboxypeptidáza, která patří do rodiny M20 (Rawlings a kol., 2014). Je syntetizována ve formě prekurzoru, který obsahuje na svém N-konci membránově vázanou sekvenci a C-konec pak směřuje do vnitřního prostoru endoplazmatického retikula, kde je následně glykosylován dvěma či třemi N-vázanými glykany (Klionsky a kol., 1990). Následně je transportován do vakuoly, kde je proteinázou B odštěpena rozpustná zralá forma od membránově vázaného prekurzoru, který poté sám o sobě vykazuje aktivitu (Jones, 1997).

Bylo také zjištěno, že se karboxypeptidáza S podílí na sporulaci (Hecht a kol., 2014).

1.2.4 Karboxypeptidáza Y (CPY)

Tento enzym je serinová karboxypeptidáza náležící do proteázové rodiny S10. V endoplazmatickém retikulu u něj dochází k navázání čtyř N-vázaných glykanů a vytvoření pěti disulfidických vazeb/můstků. Poté je translokován do vakuoly, kde je působením PrA a PrB odštěpen propeptid a vzniká tak jeho zralá aktivní forma o velikosti 61 kDa (Hecht a kol., 2014).

1.2.5 Dipeptidyl aminopeptidáza B (DPAPB)

Tento enzym spadá do enzymatické rodiny S9, ve které se nacházejí serinové proteázy. DPAPB je integrální membránový glykoprotein o velikosti 120 kDa (Rawlings a kol., 2014), který díky absenci propeptidu není dále proteolyticky štěpen za účelem aktivace (Jones,

1997). Ve vakuolární membráně je ukotven pomocí subterminálního hydrofobního transmembránového segmentu na svém N-konci a do cytoplazmy je nasměrován díky C-koncové luminální doméně (Hecht a kol., 2014).

1.2.6 Aminopeptidáza I (API)

Aminopeptidáza I je zinková metalopeptidáza náležící rodině M18 (Rawlings a kol., 2014). Do vakuoly se dostává ve formě prekurzoru prostřednictvím takzvaných Cvt (z angl. cytoplasm-to-vacuole targeting) vezikul (Jones a kol., 1997) a ve vakuole je následně aktivována odštěpením N-koncového propeptidu proteinázou B a vzniká tak 50kDa aktivní forma API (Kucharczyk a Rytka, 2001).

Tento enzym je charakterizován jako leucinová aminopeptidáza, která zároveň zprostředkovává rezistenci vůči kademnatým iontům. Ty se váží na glutathion (GSH) na jehož homeostáze se API podílí (Hecht a kol., 2014).

1.2.7 Aminopeptidáza Y (APY, Ape3, Ape3p)

Tato aminopeptidáza je závislá na zinku a patří do proteázové rodiny M28. APY kóduje gen *APE3*, který se vyskytuje na druhém chromozomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Aminopeptidáza Y je syntetizována ve formě prekurzoru. V endoplazmatickém retikulu dochází k její glykosylaci a nasměrování skrze receptor Vps10 (z angl. vacuolar protein sorting) do vakuoly, kde dochází k její aktivaci pomocí Proteinázy B. Tím se získá zralá aminopeptidáza, která se vyskytuje ve dvou formách. Jedna je o molekulové hmotnosti 70 kDa, zatímco druhá je nepatrně větší a má molekulovou hmotnost 75 kDa. Tyto odlišnosti vznikají v závislosti na počtu navázaných glykanů, kterých je běžně 5 až 7 (Hecht a kol., 2014).

Vakuolární extrakty z buněk postrádajících proteinázu A, proteinázu B, karboxypeptidázu S a karboxypeptidázu Y nevykazují žádnou enzymatickou aktivitu Ape3p, nicméně přidání purifikované proteinázy B umožňuje štěpení N-terminálního propeptidu a následně dochází ke zvýšení aktivity Ape3p. Aminopeptidáza Y je tedy zpracovávána a aktivována způsobem, který je závislý na proteináze B (Yasuhara a kol., 1994).

Aminopeptidáza Y vykazuje širokou specifitu při štěpení N-terminálních zbytků Lys, Arg, Leu, Met, Ala, Ser, Phe, Tyr a Pro (s různou účinností) a odpovídá za většinu aktivity aminopeptidáz ve vakuole (Yasuhara a kol., 1994). Její biologická funkce však zůstává neznámá (Parzych a Klionsky, 2019). Bylo ale zjištěno, že Ape3p hydrolyzuje mnohem

ochotněji dipeptidyl-NHMec či oligopeptidy, oproti samotnému aminoacyl-NHMec. Na druhou stranu nejcitlivějšími substráty jsou Lys-NHMec a Arg-NHMec. Přídavek kobaltnatých iontů účinně zvyšuje aktivitu této aminopeptidázy (Yasuhara a kol., 1994). Oproti tomu chelátory jako je například EDTA, DDT a 1,10-fenantrolin fungují jako obecné inhibitory pro metalopeptidázy a amastatin a bestatin účinkují jako specifické inhibitory aminopeptidáz, takže i jako inhibitory aminopeptidázy Y (Ferraris a kol., 2012).

Jako u většiny známých vakuolárních proteáz dochází i v případě APY ke zvýšení exprese při hladovění (především při nedostatku dusíkatých sloučenin) a při léčbě rapamycinem, ovšem v menší míře oproti ostatním proteázám (Müller a kol., 2015).

Luis Cortez-Sánchez v roce 2018 při testování Ape3p kvasinky *Candida glabrata* zjistil, že tato aminopeptidáza vykazuje vyšší aktivitu při absenci dusíkatých sloučenin (Cortez-Sánchez a kol., 2018).

V případě kvasinky *Candida albicans* nebyl ortholog této aminopeptidázy doposud charakterizován.

1.3 Metody stanovení enzymové aktivity aminopeptidáz

Aktivita enzymů úzce souvisí s jejich činností, přičemž tato aktivita je definována jako rychlost katalyzované reakce a základní jednotkou aktivity je katal (kat), který vyjadřuje množství enzymu, které přemění jeden mol substrátu za jednu sekundu (Vodrážka a kol., 1998).

Na aktivitu enzymu má vliv mnoho faktorů. Například pH, které je pro aktivitu enzymu zásadní a mnoho enzymů má konkrétní rozsah pH, při kterém jsou aktivní a mimo které se jejich aktivita vytrácí. V některých případech je tento rozsah široký, někdy zase velmi úzký. Dalším faktorem je teplota, kdy obecně platí, že čím vyšší teplota, tím rychleji bude reakce probíhat a naopak. Ovšem začne-li při určité teplotě protein denaturovat, tak přirozeně začne o svou aktivitu přicházet. V neposlední řadě hrají roli i aktivátory či inhibitory daných enzymů. Obecně se těmto látkám říká modulátory (Kodíček, 2003).

Enzymy, které katalyzují štěpení aminokyselin od N-konce peptidů/proteinů, jsou označovány jako aminopeptidázy. Mnoho z těchto enzymů má v aktivním místě vázané ionty přechodných kovů, velmi často ionty zinku, které zprostředkovávají enzymatické štěpení. Tyto enzymy jsou pak označovány jako metalopeptidázy (Taylor, 1993).

Pro přehled metod, které již byly použity při stanovení enzymatické aktivity aminopeptidáz, jsem vytvořil souhrnnou tabulku (Tab. 1).

Tabulka 1 – Přehled metod použitých pro stanovení aktivity aminopeptidáz

metoda	substrát	cílový enzym	zdroj
kolorimetrie/nefelometrie	folin-fenol	aminopeptidáza N	Goldbarg a Rutenburg, 1958
spektrofotometrie	p-nitroanilid	leucinová aminopeptidáza 3	Wu a kol., 2019
fluorimetrie	5-karboxytetramethylrhodamin (TAMRA)	aminopeptidáza P	Cordova a kol., 2016
	bor-dipyromethen (BODIPY)	aminopeptidáza N	Lee a kol., 2021
	7-amido-4-methylkumarin (AMC)	alanin-aminopeptidáza	Šlajsová, 2011
gelová zymografie	4-methoxy- β -naphthylamid	leucinové aminopeptidázy	Ohkubo a kol., 1998
chemiluminiscence	fenoxy-1,2-dioxetan	aminopeptidáza M	Wang a kol., 2022

Velmi oblíbeným substrátem pro svou jednoduchou přípravu a aplikaci se stal v mnoha případech X-*p*-nitroanilid (X = aminokyselina nebo peptid). Například substrát Gly-Pro-*p*-nitroanilid byl úspěšně použit v práci Christiny Durinx v roce 2000, při charakterizaci dipeptidyl peptidázy IV (Durinx a kol., 2000). Při charakterizaci aminopeptidázy Y kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kterou prováděl v roce 1994 Yasuhara a jeho kolektiv, byla zase použita jiná varianta tohoto substrátu, a to Leu-*p*-nitroanilid (Yasuhara a kol., 1994). Proto jsem se tento substrát rozhodl využít i ve své práci a při zavádění metody pro měření aktivity. Vycházel jsem při tom konkrétně ze studie Spungina a Blumberga z roku 1989, kdy zaváděli metodu pro stanovení aktivity aminopeptidázy I bakterií *Streptomyces griseus* (Spinin a Blumberg, 1989).

2 Experimentální část

2.1 Materiál a přístroje

2.1.1 Přístroje

- analytické digitální váhy ABT 220-5DM (Kern & Sohn, GmbH, Balingen, Německo)
- digitální předvážky (Kern & Sohn, GmbH, Balingen, Německo)
- chladnička (Liebherr, Bulle, Švýcarsko)
- set pro SDS-PAGE Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- kapalinový chromatograf BioLogic LP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- mraznička (Liebherr, Bulle, Švýcarsko)
- pH metr Mettler Toledo FiveEasy[™] Plus pH/mV (Mettler-Toledo, Inc., Columbus, Ohio, USA)
- sonikátor UP200H (Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Německo)
- spektrofotometr PDA UV-Vis Bio Spectrophotometer (SCINCO Co. Ltd., Seoul, Korea)
- sterilizátor UV CLAVE (Benchmark, Sayreville, USA)
- třepačka s kontrolovanou teplotou Shaker – Incubator ES-20/60 (Biosan SIA, Riga, Lotyšsko)
- vortex mixer (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Německo)
- výrobník ledu BREMA (Liebherr, Bulle, Švýcarsko)
- vysokootáčková multifunkční centrifuga Sorvall LYNX 6000 Centrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

2.1.2 Chemikálie

- 35% kyselina chlorovodíková, HCl (Penta, Chrudim, Česká republika)
- 96% ethanol (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- 99% kyselina octová, HAc (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- arginin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bisakrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- dodecylsírán sodný, SDS (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- ethylendiamintetraoctová kyselina, EDTA (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)

- glycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- hexahydrát chloridu hořečnatého, $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- hexahydrát chloridu kobaltnatého, $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- hexahydrát síranu nikelnatého, $\text{NiSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (Penta, Chrudim, Česká republika)
- hydroxid sodný, NaOH (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- chlorid sodný, NaCl (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- chlorid vápenatý, CaCl_2 (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- chlorid zinečnatý, ZnCl_2 (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- leucin-*p*-nitroanilid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- lysin-*p*-nitroanilid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- lysozym (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- marker molekulových hmotností Precision Plus ProteinTM Unstained Protein Standards, 10-250 kDa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- methanol (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- močovina / urea (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)
- N, N, N, N – Tetramethylethylendiamin, TEMED (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- persíran amonný (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- prolin-*p*-nitroanilid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tris-HCl (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Triton X-114 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.1.3 Ostatní materiál

- 200 μ l, 1,5ml, 2ml a 5ml mikrokumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- centrifugační filtry Amicon[®] Centrifugal Filter Unit Ultracel-10 a Ultracel-30 (Merck KGaA, Darmstadt, Německo)
- dialyzační střevo SnakeSkin[™], 10.000 MWCO (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Erlenmayerovy baňky
- HIS-Select[®] Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- jednorázové sterilní šroubovací zkumavky 15 ml a 50 ml
- kádinky, lžička, plastové misky pro navažování reagentů
- latexové a nitrilové rukavice
- odměrné válce
- pipety a špičky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- plastové a skleněné Petriho misky
- Sephadex G-100 Medium, velikost částic: 100-310 μ m (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Sephadex G-25 Medium, velikost částic: 100-270 μ m (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Sephadex G-50 Medium, velikost částic: 100-300 μ m (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2.2 Rostoky

2.2.1 Rostoky pro izolaci a solubilizaci inkluzí

- **Lyzační pufr** (100 mM Tris-HCl pH=7,4, 150 mM NaCl, 0,2% Tween-20, lysozym 2 mg/g biomasy)
- **Promývací pufr 1** (100 mM Tris-HCl pH=7, 2 M urea, 2 mM EDTA, 2% Triton X-114)
- **Rozpouštěcí pufr** (50 mM Tris-HCl pH=8, 8 M urea, 0,3 M NaCl, 5% glycerol, 0,1% Triton X-100, 0,1% Tween-20)
- **60% kyselina octová**
- **Refolding pufr 1** (50 mM Tris-HCl pH=6,8, 0,5 M arginin, 0,3 M NaCl, 5% glycerol, 0,05% Tween-20, 0,1% Triton X-100, 1 mM Zn²⁺, 1 mM Ca²⁺, 1 mM Mg²⁺)
- **Refolding pufr 2** (50 mM Tris-HCl pH=6,8, 0,5 M NaCl, 5% glycerol, 0,05% Tween-20, 0,1% Triton X-100, 1 mM Zn²⁺)
- **Dialyzační pufr 1** (20 mM Tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl, 2% glycerol)
- **Dialyzační pufr 2** (50 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20)

2.2.2 Rostoky pro SDS-PAGE

- **Roztok A** (30% směs akrylamidu a bisakrylamidu)
- **Roztok B** (1,5 M Tris-HCl pH=8,8)
- **Roztok C** (1 M Tris-HCl pH=6,8)
- **Roztok D** (10% roztok dodecylsírany sodného)
- **Roztok E** (10% roztok persírany amonného)
- **Roztok F** (vzorkový pufr od firmy Bio-Rad; součástí setu Mini-PROTEAN® Tetra Cell)

2.2.3 Roztoky pro purifikaci na HIS-Selectu®

- **Nanášecí pufr 1** (50 mM Tris-HCl pH=8, 10 mM imidazol, 0,3 M NaCl, 2% glycerol)
- **Nanášecí pufr 2** (50 mM Tris-HCl pH=8, 0,3 M NaCl, 2% glycerol)
- **Nanášecí pufr 3** (50 mM Tris-HCl pH=8, 8 M urea, 0,3 M NaCl, 2% glycerol)
- **Promývací pufr 2** (50 mM Tris-HCl pH=8, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol)
- **Promývací pufr 3** (50 mM Tris-HCl pH=8, 0,3 M NaCl)
- **Promývací pufr 4** (50 mM Tris-HCl pH=8, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol, 0,1% Tween-20, 0,1% Triton X-100)
- **Promývací pufr 5** (50 mM Tris-HCl pH=8, 8 M urea, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol, 0,1% Tween-20, 0,1% Triton X-100)
- **Eluční pufr 1** (50 mM Tris-HCl pH=8, 0,3 M NaCl, 0,25 M imidazol)
- **Eluční pufr 2** (50 mM Tris-HCl pH=8, 0,3 M NaCl, 0,25 M imidazol, 0,1% Tween-20, 0,05% Triton X-100, 2% glycerol)
- **Eluční pufr 3** (50 mM Tris-HCl pH=7, 8 M urea, 0,3 M NaCl, 0,25 M imidazol, 0,1% Tween-20, 0,05% Triton X-100, 2% glycerol)
- **Eluční pufr 4** (50 mM Tris-HCl pH=7, 8 M urea, 0,3 M NaCl, 0,1% Tween-20, 2% glycerol)
- **Eluční pufr 5** (50 mM Tris-HCl pH=7, 8 M urea, 0,5 M imidazol, 0,3 M NaCl, 0,1% Tween-20, 2% glycerol)
- **Refolding pufr 3** (50 mM Tris-HCl pH=7, 0,3 M NaCl, 5% glycerol, 0,1% Tween-20, 0,05% Triton X-100, 1 mM Zn²⁺, 1 mM Ca²⁺, 1 mM Mg²⁺)
- **Uchovávací pufr** (50 mM fosfátový pufr pH=8, 20% ethanol)
- **Čistící pufr** (0,2 M kyselina octová)

2.2.4 Roztok pro měření aktivity

- zásobní roztok 150 mM leucin-*p*-nitroanilidu
- zásobní roztok 150 mM lysin-*p*-nitroanilidu
- zásobní roztok 150 mM prolin-*p*-nitroanilidu

2.2.5 Ostatní roztoky

- zásobní roztok BSA o koncentraci 10 mg/ml
- zásobní roztok 50 mM fosfátového pufru, pH=5,5
- zásobní roztok 100 mM Tris-HCl pufru, pH=8
- zásobní roztok biuretového činidla (36 mM síran měďnatý, 95 mM vinan sodno-draselný, 1,8 M hydroxid sodný a 90 mM jodid draselný – připraveno na pracovišti biochemie, KBBV)

2.3 Příprava CaApe3p v systému *E. coli*

Buněčný materiál připravený prostřednictvím expresního systému *E. coli* poskytla doc. RNDr. Olga Heidingsfeld, Ph.D. Vzorek byl připraven s pomocí primerů navržených a již úspěšně použitých v rámci mé bakalářské práce (Morávek, 2020).

Nejprve byl amplifikován gen *APE3* z DNA kvasinek *Candida albicans*. Amplikon byl poté vnesen do vektoru metodou in-fusion klonování a vektor byl ligován do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α . Při konstrukci vektoru byly použity primery, které zahrnují na N-konci sekvence 6x histidin (neboli tzv. histidinovou kotvu). Buňky DH5 α byly po ligaci vektoru kultivovány na půdách s antibiotikem kanamycinem, přičemž došlo k selekci buněk s vnesenou plazmidovou DNA a následně se hledala kolonie se správně vnesenou plazmidovou DNA obsahující gen *APE3*. Pro ověření správnosti se provedla izolace této plazmidové DNA, amplifikace a pro úplné potvrzení byla plazmidové DNA ověřena sekvenací. DNA obsahující požadovaný gen byla transformována do buněk *E. coli* BL-21(DE3), ve kterých byla po jejich kultivaci na hodnotu OD₆₀₀=0,6-0,8 provedena indukce exprese pomocí IPTG. Po 3 hodinách od indikce exprese byly buňky sklizeny – odstředěny – a zamrazeny. Tento buněčný materiál byl použit jako výchozí materiál pro mou diplomovou práci.

2.4 Izolace inkluzí

2.4.1 Princip metody

Při přípravě rekombinantního proteinu v systému T7 vytváří požadovaný protein struktury nazývané „inkluzní tělíska“, což jsou špatně rozpustné shluky/agregáty chybně složeného rekombinantního proteinu, které vznikají v cytoplazmě bakterie. Tyto struktury je třeba zpřístupnit. Pro získání inkluzí je třeba buňku, ve které se tento proteinový agregát nachází, lyzovat. Toho lze docílit různými metodami. Například chemicky, a to použitím enzymu lysozymu, který narušuje bakteriální stěnu, nebo i fyzikálními metodami, kterými jsou například opakované zmrazování a rozmrazování, sonikace, použití French-pressu nebo vortexování v přítomnosti skleněných korálek, které buňky mechanicky poškodí a buněčný obsah se i s inkluzními tělísky dostane do roztoku. Sonikace zároveň rozrušuje dlouhé molekuly DNA, které zvyšují nežádoucí viskozitu lyzátu (Peternel a Komel, 2010).

2.4.2 Pracovní postup

Peleta buněčného materiálu obsahujícího inkluze byla resuspendována ve 30 ml lyzačního pufru (viz kapitola 2.2.1) s obsahem lysozymu o koncentraci 2 mg lysozymu na jeden gram biomasy (buněčné pelety). Tato směs byla promíchána na vortexu, poté 1 h třepána v třepačce při laboratorní teplotě a následně zmražena v mrazničce na -20 °C. Potom byla směs znovu rozmražena, 30 minut míchána v třepačce a následně sonikována. Samotná sonikace probíhala v 5s intervalech s 10s pauzou po dobu alespoň 15 minut (v závislosti na viskozitě suspenze). Následně byla směs znovu zmražena při -20 °C, rozmražena a půl hodiny třepána v třepačce. Tato směs byla centrifugována 10 minut při 10 000 g. Vzniklá peleta byla 3-5x promyta ve 30 ml promývacího pufru 1 a následně byla použita k solubilizaci inkluzí.

2.5 Solubilizace inkluzí

2.5.1 Princip metody

Inkluzní tělíška jsou agregáty vzniklé intramolekulární asociací hydrofobních úseků ještě nesložených proteinů a nesprávnou tvorbou disulfidických vazeb. K rozrušení vzniklých nekovalentních vazeb (tzv. solubilizaci) se nejvíce využívají vysoce koncentrovaná denaturační činidla, například guanidin hydrochlorid nebo močovina (Singh a kol, 2015).

2.5.2 Pracovní postup

2.5.2.1 Solubilizace v 8 M močovíně

Peletu připravenou dle postupu v kapitole 2.4.2 jsem rozpustil zhruba v 10-15 ml rozpouštěcího pufru na jeden gram pelety s promytými inkluzemi. Z důvodu co nejlepšího rozpuštění vzorku byla směs důkladně míchána na vortexu a přes noc byla třepána v třepačce. Následující den se vzorek odstředil při 50 000 g po dobu 1 h, aby se odstranila většina v močovíně nerozpuštěného materiálu.

2.5.2.2 Solubilizace v 60% kyselině octové

V závislosti na hmotnosti pelety (připravené dle postupu v kapitole 2.4.2) jsem použil patřičné množství kyseliny octové, které odpovídalo přibližně 10-15 ml 60% kyseliny octové na jeden gram pelety. Vzorek byl důkladně míchán na vortexu a stejně jako v případě rozpouštění v 8 M močovíně byl přes noc třepán v třepačce. V případě, že vzorek nebyl následující den zcela rozpuštěn, následovalo opětovné míchání na vortexu, kdy zpravidla došlo k jeho úplnému rozpuštění.

2.6 Dialýza rozpuštěných inkluzí

2.6.1 Princip metody

Při tomto procesu dochází ke snížení koncentrace denaturačních činidel z rozpouštěcího pufru skrze polopropustnou membránu. Ta je definována velikostí pórů, které musí být menší, než je velikost rozpuštěného proteinu, který chceme purifikovat. K dialýze dochází ve velkém objemu roztoku, který denaturační činidla neobsahuje. Skrze póry volně difunduje denaturační činidlo ve směru koncentračního gradientu a dochází tak k jeho odloučení z rozpouštěcího roztoku (Tsumoto, 2003).

2.6.2 Pracovní postup

2.6.2.1 Dialýza inkluzí rozpuštěných v 8 M močovíně

Odstředěným roztokem s rozpuštěnými inkluzemi v 8 M močovíně (10 ml) byla naplněna tři dialyzační střeva s cut-off hodnotou 12-14 kDa a byla provedena dialýza za stálého míchání (na magnetickém míchadle) proti dialyzačnímu pufru 1 a proti refolding pufru 1 a 2 s následnou dialýzou proti Tris-HCl pufru o pH=8. Se všemi možnostmi byly provedeny dva experimenty – v jednom případě probíhal proces v lednici při 4 °C a v druhém případě probíhal proces při laboratorní teplotě (při 22 °C). Dialýza probíhala v 0,5l kádince po dobu 72 hodin s průběžnou výměnou jednotlivých dialyzačních pufrů po 8-16 hodinách. Na každý vzorek jsem použil celkem 2 l dialyzačního pufru.

2.6.2.2 Dialýza inkluzí rozpuštěných v 60% kyselině octové

Roztokem s rozpuštěnými inkluzemi v 60% kyselině octové (10 ml) byla naplněna tři dialyzační střeva s cut-off hodnotou 12-14 kDa a byla provedena dialýza za stálého míchání (na magnetickém míchadle) proti dialyzačnímu pufru 2 a proti refolding pufru 1 a 2 s následnou dialýzou proti Tris-HCl pufru o pH=8. Se všemi možnostmi byly jako v předešlém případě provedeny dva experimenty – v jednom případě probíhal proces v lednici při 4 °C a v druhém případě probíhal proces při laboratorní teplotě (při 22 °C). Dialýza probíhala stejně jako v předešlém případě v 0,5l kádince po dobu 72 hodin s průběžnou výměnou dialyzačních pufrů po 8-16 hodinách a opět jsem na každý vzorek použil celkem 2 l dialyzačního pufru.

2.7 Diluce

2.7.1 Princip metody

Nejjednodušší a nejrychlejší metodou, jak se zbavit vysokých koncentrací denaturačních činidel je jejich několikanásobné naředění (diluce) v požadovaném pufru/roztoku, který neobsahuje denaturační činidla. Tím se jednoduše převede vzorek do vhodného prostředí, a navíc se sníží riziko tvorby agregátů rozpuštěného proteinu (Fischer a kol., 1992). Nevýhodou je snížení koncentrace proteinu, které není žádoucí pro některé analytické metody, například pro krystalografickou analýzu či pro SDS-PAGE analýzu. V tom případě by bylo třeba následné zakoncentrování vzorků například s pomocí centrifugačních filtrů, vypařováním nebo jinými metodami.

2.7.2 Pracovní postup

Provedl jsem tři experimenty. Při prvním experimentu jsem za stálého míchání pomalu přidával 200 μ l vzorku rozpuštěného v kyselině octové k 9,8 ml 50 mM Tris-HCl pufru o pH=8.

V druhém případě jsem za stálého míchání pomalu přidával 200 μ l vzorku rozpuštěného v 8 M močovíně k 9,8 ml 50 mM Tris-HCl pufru o pH=8.

Ve třetím případě jsem za stálého míchání pomalu přidával 1 ml vzorku rozpuštěného v 8 M močovíně ke 4 ml refolding pufru 1. Poté jsem vzorek zakoncentroval na centrifugačním filtru s cut-off hodnotou 10 kDa nebo 30 kDa (dle návodu výrobce) na původní objem 1 ml. Tento proces jsem ještě 4x zopakoval. Následně jsem místo refolding pufru přidával k 1 ml vzorku 4 ml 50 mM Tris-HCl pufru s pH=8 a 4x provedl tentýž proces.

2.8 Nízkotlaká kapalinová chromatografie v kolonovém uspořádání

Izolace proteinu byla provedena v kolonovém uspořádání na kapalinovém chromatografu BioLogic LP. Ten je vybaven UV detektorem (280/254 nm) a vodivostním detektorem. Postupně byly jímány průběžné frakce při změnách absorbance, které byly dále analyzovány.

2.8.1 Gelová permeační chromatografie

2.8.1.1 Princip metody

Při této metodě dochází k separaci molekul analytu na základě jejich velikosti a velikosti pórů náplně chromatografické kolony. Vejde-li se protein do pórů náplně, kterou bývají gelové částice, tak dochází k jeho zpomalení a větší proteiny mezitím putují kolonou rychleji. Pokud je velikost pórů menší, než je velikost proteinů ve vzorku, tak dochází k zadržování nízkomolekulárních látek neboli k takzvanému odsolení analytu, a zároveň lze touto metodou vzorek převést do jiného pufru (Churáček, 1990).

2.8.1.2 Pracovní postup

Připravil jsem si kolony s náplněmi Sephadex G-25, G-50 a G-100. Podle návodu k jednotlivým náplním jsem použil dostatečné množství částic, které jsem nechal po dobu 2 dní hydratovat v destilované vodě. Následně jsem takto připravenou náplň nanesl do 10ml kolony o vnitřním průměru 1 cm a nechal usadit. Následně byl na kolonu aplikován 1 ml vzorku a separace probíhala při průtoku 1 ml/min. Byl zaznamenán chromatografický záznam a v průběhu separace byly jímány jednotlivé frakce. Ty byly následně analyzovány pomocí SDS-PAGE.

2.8.2 Chelatační afinitní chromatografie

2.8.2.1 Princip metody

Chelatační afinitní chromatografie (IMAC) je metoda, při které dochází k navázání určité složky ze směsi v závislosti na její schopnosti vytvořit komplex s ionty kovů vázaných na nosiči. Lze toho využít například značením cílového rekombinantního proteinu pomocí poly-histidinové značky (6x His), která tvoří komplex s ionty niklu (Ni^{2+}) (Hochuli, 1990).

2.8.2.2 Pracovní postup

V tomto případě byla použita náplň HIS-Select[®] Nickel Affinity Gel, která je určena pro purifikaci proteinů značených His-tagem (His-kotvou). K dispozici jsem měl 4,5 ml náplně, která by měla být schopna podle výrobce v ideálním případě vázat až 30 mg cílového proteinu (v závislosti na zvolených podmínkách). Náplň jsem aplikoval do kolony, nechal usadit a promyl jsem ji ekvilibračním pufrem, ve kterém mohla být následně uchovávána. Takto připravenou kolonu stačilo před použitím promýt 15 ml destilované vody a následně požadovaným nanášecím pufrem do ustálení vodivosti a absorbance při 280 nm. Poté mohl být aplikován vzorek, přičemž jsem zpravidla aplikoval 1 ml vzorku. Následovalo promytí promývacím pufrem nebo případně i refoldingovým pufrem do ustálení absorbance a vodivosti a poté byla provedena eluce pufrem obsahujícím vysokou koncentraci imidazolu. Jednotlivé frakce byly jímány a následně nanášeny na SDS-PAGE gel.

2.9 Stanovení koncentrace proteinů biuretovou metodou

2.9.1 Princip metody

Biuretová metoda se zakládá na reakci měďnatých kationtů v alkalickém prostředí s proteiny, popřípadě jejich štěpnými produkty. Sloučeniny, které obsahují 2 a více amidových či peptidových vazeb poskytují s Cu^{2+} ionty modrofialovou (červenofialovou) komplexní měďnatou sůl. Bílkovinu v roztoku lze takto přímo stanovit měřením absorbance při vlnové délce 540 nm (Johnson, 2005).

2.9.2 Pracovní postup

Do 1 ml pracovního roztoku biuretového činidla ředěného destilovanou vodou v poměru 1:5 jsem přidal 40 μl vzorku/standardu a nechal inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě. Následně jsem proměřil absorbance při vlnové délce 540 nm. Pro výpočet koncentrace ve vzorcích jsem si připravil kalibrační řadu BSA s koncentracemi 100, 800, 1400, 2000, 5000 a 10 000 $\mu\text{g/ml}$.

2.10 SDS-PAGE

2.10.1 Princip metody

Pro detekci proteinů je často využívána metoda polyakrylamidové gelové elektroforézy s přidavkem dodecylsírany sodného, při které dochází k rozdělení proteinů především na základě jejich velikosti (délce polypeptidového řetězce). Dodecylsírany sodný (SDS) totiž obalí rozvolněný protein a udělí mu záporný náboj. Následně se protein pohybuje v elektrickém poli v závislosti na jeho velikosti. Čím menší je protein, tím rychleji prostupuje polyakrylamidovým gelem (Smith, 1984).

2.10.2 Pracovní postup

Připravil jsem si 13,5% polyakrylamidový gel podle Tabulky 2. Nanášel jsem na něj 7 μ l markeru a 15 μ l vzorků ředěných v poměru 1:1 se vzorkovým pufrům. Vzorky z rozpouštění jsem dávkoval v menším množství (7 μ l) kvůli předpokládanému vysokému obsahu proteinů.

Nastavení pro elektroforézu bylo následující. Napětí bylo nastaveno vždy na 180 V a proud byl nastaven na 30 mA/gel. Nakonec jsem nastavil časovač, a to na 90 minut.

Po ukončení elektroforézy jsem gel opláchl destilovanou vodou, 30 minut jsem ho fixoval ve fixačním roztoku, poté jsem jej barvil po dobu 30 minut v Coomassie Brilliant Blue a následně jsem gel promýval od přebytečného barviva v destilované vodě. Takto připravený gel jsem sledoval na prohlížeče FastGene Blu/White LED Tab.

Tabulka 2 – Poměry složek pro přípravu SDS-PAGE gelu

reagencie na 1 gel	13,5% dělicí gel	5% zaostřovací gel
1. destilovaná voda	1,4 ml	1,4 ml
2. roztok A	2,26 ml	0,33 ml
3. roztok B	1,25 ml	-
3. roztok C	-	0,25 ml
4. roztok D	0,05 ml	0,02 ml
5. roztok E	0,05 ml	0,02 ml
6. TEMED	0,002 ml	0,002 ml

2.11 Stanovení aktivity aminopeptidázy CaApe3p

2.11.1 Princip metody

Pro stanovení aktivity jsme vybrali spektrofotometrickou metodu, při které je zaznamenána změna absorbance při specifickém štěpení substrátu. Při tomto experimentu jsem používal jako substráty leucin-*p*-nitroanilid, lysin-*p*-nitroanilid a prolin-*p*-nitroanilid, které jsou přímo určeny pro tento druh aminopeptidáz. Při reakci aminopeptidázy s *p*-nitroanilidovými substráty dochází ve vodném prostředí k odštěpení aminokyseliny a uvolnění *p*-nitroanilinu, který absorbuje světlo o vlnové délce 405 nm. Výše zmíněné substráty poskytla doc. RNDr. Olga Heidingsfeld, CSc. z katedry biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

2.11.2 Pracovní postup

Ze zásobních roztoků substrátů jsem si připravil 0,2 mM, 1 mM, 3 mM a 5 mM pracovní roztok příslušného substrátu a následně jsem si připravil 96-jamkovou destičku se substrátem dle tabulek níže (Tab. 5, 6, 7, 8 a 9). Destičku naplněnou substrátem jsem nechal 15 minut temperovat na teplotu 30 °C. Reakční směs jsem vytvořil přidáním 5 µl vzorku do 295 µl substrátu. Následně jsem měřil absorbanci při vlnové délce 405 nm při 30 °C každých 30 sekund po dobu 30 minut s průběžným mícháním směsi. Jako slepý vzorek (blank) bylo místo vzorku nanášeno 5 µl destilované vody.

Při experimentu jsem sledoval aktivitu různě zpracovaných vzorků při různých koncentracích vzorků a substrátu, v prostředí s různým pH a s ionty kovů, které by mohly mít pozitivní vliv na enzymovou aktivitu (Zn^{2+} a Co^{2+}).

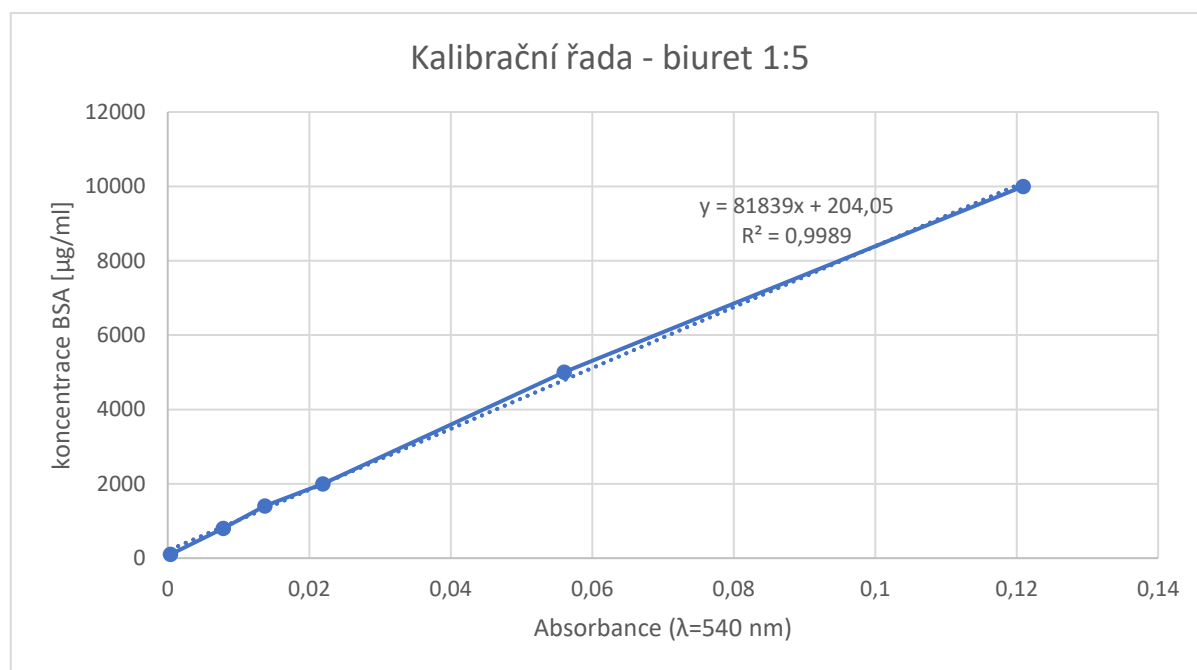
3 Výsledky a diskuze

3.1 Biuretová metoda

Nejprve jsem si vytvořil kalibrační řadu o různých koncentracích proteinu BSA (Tab. 3), kterou jsem použil pro sestavení kalibrační křivky (Obr. 2) umožňující stanovení koncentrace celkové bílkoviny v jednotlivých průběžných vzorcích biuretovou metodou.

Tabulka 3 – Kalibrační řada pro stanovení koncentrace celkového proteinu biuretovou metodou

[$\mu\text{g/ml}$]	A_{540} (BSA)
100	0,00038
800	0,00785
1400	0,01371
2000	0,02193
5000	0,05606
10000	0,12094

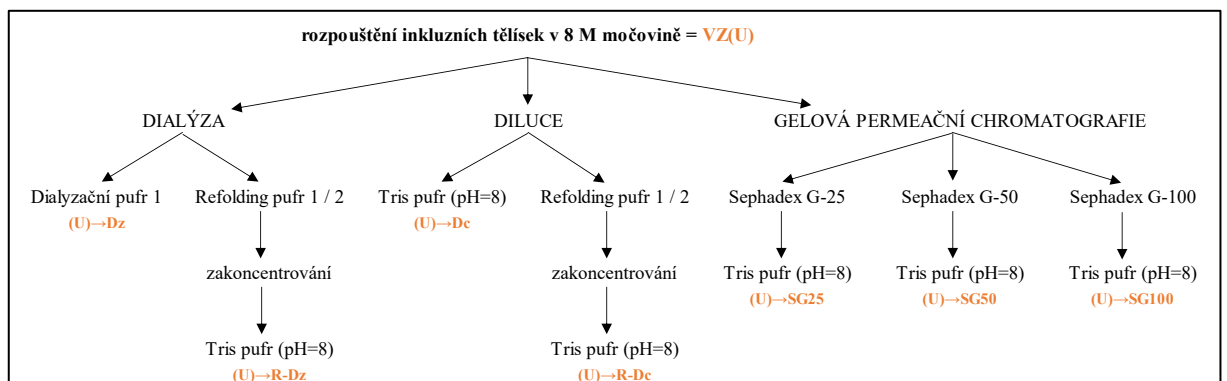


Obrázek 2 – Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace celkového proteinu biuretovou metodou

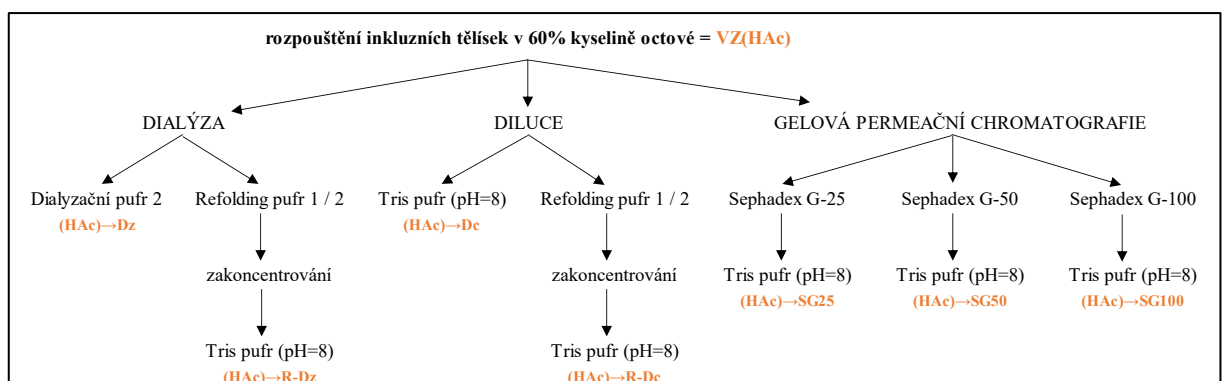
3.2 Optimalizace přípravy vzorku rekombinantní aminopeptidázy CaApe3p kvasinky *C. albicans*

Příprava vzorku rekombinantního proteinu je klíčovým krokem zajišťujícím jeho efektivní purifikaci. Proto byla tomuto kroku věnována velká pozornost. Cílem bylo dosáhnout optimální solubilizace a stability vzorku a zároveň převedení vzorku do roztoku vhodného pro následnou purifikaci na koloně s náplní HIS-Select® Nickel Affinity Gel, pro níž doporučuje výrobce 50 mM fosfátový pufr nebo 50 mM Tris-HCl pufr s pH=7-8.

V rámci přípravy vzorku jsem zkusil porovnat solubilizaci inkluzních tělísek v roztoku 8 M močoviny a v 60% kyselině octové. Oba vzorky jsem zkusil dialyzovat proti dialyzačnímu pufru (viz Obr. 3 a 4) a proti Refolding pufru 1 a 2. Dále jsem zkusil provést diluci a v případě potřeby znovu zakoncentrovat na centrifugačním filtru s cut-off hodnotou 10 kDa. V neposlední řadě jsem oba vzorky zkusil podrobit odsolení na koloně naplněné gelovými částicemi Sephadex G s různou porozitou.



Obrázek 3 – Schéma optimalizace zpracování vzorku inkluzních tělísek rozpouštěných v 8 M močovíně; oranžový text označuje zavedené zkratky používané později v textu



Obrázek 4 – Schéma optimalizace zpracování vzorku inkluzních tělísek rozpouštěných v 60% kyselině octové; oranžový text označuje zavedené zkratky používané později v textu

Ověřování přítomnosti požadovaného proteinu jsem prováděl pomocí SDS-PAGE, přičemž jsem na každém obrázku vyznačil černou šipkou oblast, ve které by se měl tento protein nacházet. Protein má sice vypočítanou molekulovou hmotnost 61,0 kDa (s použitím nástroje Compute pI/MW na stránce https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool), ovšem v rámci mé bakalářské práce bylo zjištěno, že se protein na SDS-PAGE gelech objevuje těsně pod hranicí 75 kDa. To bylo ověřeno vyříznutím proužku z této oblasti a jeho analýzou pomocí MS, která ukázala 32% pokrytí sekvence CaApe3p, čímž došlo k jeho potvrzení.

Jako první způsob převedení vzorku rozpouštěného v 8 M močovíně jsem zkusil dialýzu proti dialyzačnímu pufru 1 a u vzorku rozpuštěného v 60% HAc jsem zkusil dialýzu proti dialyzačnímu pufru 2. Obě varianty jsem provedl v jednom případě při laboratorní teplotě (22 °C) a v druhém případě v lednici při 4 °C. V průběhu dialýzy se vytvořil ve všech případech zákal na vnitřním povrchu dialyzačního střeva (dialyzační membrány). Zkusil jsem proto přemístit vzorky do nových dialyzačních střívek. Ve všech experimentech došlo k nežádoucímu vysrážení cílového proteinu viz Obrázek 5. Pomocí SDS-PAGE jsem analyzoval supernatant a sediment. Na Obrázku 6 lze vidět, že se téměř všechny protein rozpouštěný v 8 M močovíně v průběhu dialýzy vysrážel. Na Obrázku 7 lze vidět, že v případě rozpouštění inkluzí v 60% HAc došlo k vysrážení až po výměně dialyzačního střeva. Když jsem zkusil provést dialýzu v jednom dialyzačním střevu (bez jeho výměny), tak i po celém procesu dialýzy zůstalo pH vzorku nízké (v rozmezí 3,5-4). Pravděpodobně mohlo dojít k zanešení membrány.

K agregaci proteinu mohlo jednak docházet kvůli jeho vysoké koncentraci, při chybném složení (foldingu) proteinu nebo při přechodu CaApe3p přes pH odpovídající hodnotě jeho izoelektrického bodu, která je v tomto případě 5,16 (dle https://web.expasy.org/compute_pi/). Když se protein nachází v prostředí pH, které se blíží hodnotě jeho izoelektrického bodu, tak dochází k tomu, že celkový náboj proteinu mizí, vytrácí se odpudivé síly mezi molekulami proteinů a dochází i k intramolekulárním interakcím a následné agregaci.

Provedl jsem také pokus o opětovnou solubilizaci sraženého proteinu, a to opět v 60% kyselině octové a v 8 M močovíně, avšak toho se docílit nepodařilo a agregovaný protein se už znovu rozpustit nepovedlo.

Jako druhý způsob jsem zkusil vzorky odsolit a převést do 50 mM Tris-HCl pufru o pH=8 prostřednictvím nízkotlaké kapalinové chromatografie přes kolonu s náplněmi Sephadex G-25, G-50 a G-100. U vzorků rozpouštěných v 60% kyselině octové se do následujícího dne v jímaných frakcích vytvořila opět sraženina jako v případě dialýzy a v některých případech pravděpodobně došlo k zachycení proteinu na koloně. Jímané frakce měly pH=3,5-4,5. Při aplikaci těchto frakcí opět na kolonu naplněnou Sephadexem G-100 došlo s největší pravděpodobností k vysrážení proteinu na koloně, protože nastávaly problémy s průtokem a na chromatografu nebyla vidět žádná změna absorbance při 280 nm (viz Obrázek 16).

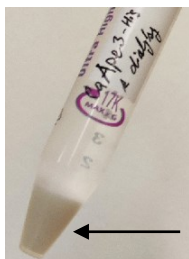
Při průběžném měření pH v různých frakcích (jímaných po aplikaci vzorku na kolony naplněné Sephadexem G) pomocí pH metru Mettler Toledo FiveEasy™ Plus pH/mV jsem zjistil, že ve frakcích s pH < 3,5 ještě k agregaci proteinu nedošlo. K agregaci začalo docházet až když měl roztok pH > 3,5, avšak pro purifikaci na afinitní chromatografické koloně, kterou jsme zvolili, bylo zapotřebí pH=7-8. U vzorku rozpuštěného v kyselině octové nepomohlo ani když jsem odsolení prováděl v prostředí obsahujícím 0,1% Tween-20 a 2% glycerol, které by měly předcházet agregaci. Původní vzorek inkluzí rozpuštěných v 60% HAc měl pH=1,5.

Vzorek rozpouštěný v 8 M močovíně nanášený na kolony plněné různými náplněmi Sephadex G se v jímaných frakcích nesrážel. Při porovnání chromatografů a SDS-PAGE gelů bylo pro odsolení v močovíně rozpuštěného vzorku a jeho převedení do Tris-HCl pufru patrné, že při aplikaci vzorku na kolonu s náplní Sephadex G-25 nedocházelo k tak velkému naředění vzorku, jako při aplikaci vzorku na kolonu s náplní Sephadex G-50. Nosič Sephadex G-50 se zase jevil jako efektivnější pro oddělení velkých proteinů (právě třeba CaApe3p) od menších proteinů. Při aplikaci vzorku o koncentraci proteinu 8,1 mg/ml dosahovala následně v případě kolony s náplní Sephadex G-25 koncentrace proteinu ve vzorku 6,5 mg/ml a při aplikaci vzorku na kolonu s náplní Sephadex G-50 dosahovala hodnota koncentrace proteinu ve vzorku 2,1 mg/ml.

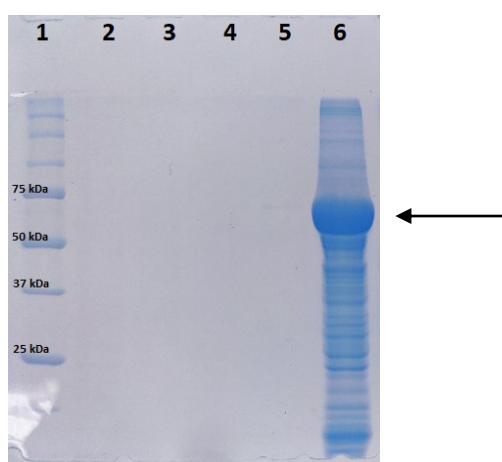
Při pokusu o odsolení vzorku rozpuštěného v 8 M močovíně na koloně naplněné Sephadexem G-100 docházelo v průběhu experimentu velmi často k problémům s průtokem, které končily neprůchodností kolony.

Jako třetí způsob převedení vzorku do vhodného pufru pro purifikaci jsem zkusil možnost vzorek zředit v několikanásobně větším objemu 50 mM Tris-HCl pufru o pH=8.

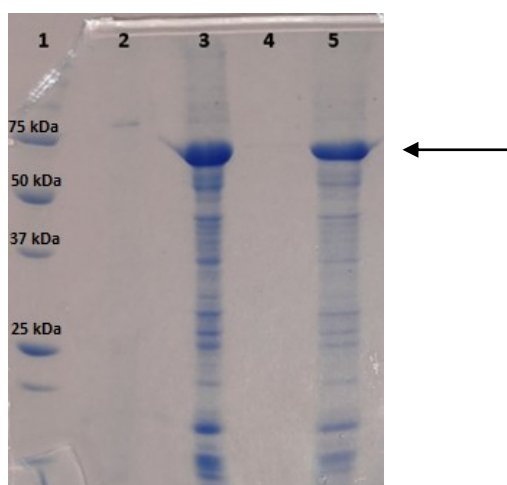
Tato možnost se jevila jako jediná schůdná pro vzorek rozpouštěný v 60% kyselině octové. Při této možnosti totiž nedošlo k agregaci proteinu, nicméně vzorek musel být přidáván velmi pomalu a za stálého míchání. Vzorek byl tímto procesem 50x zředěn.



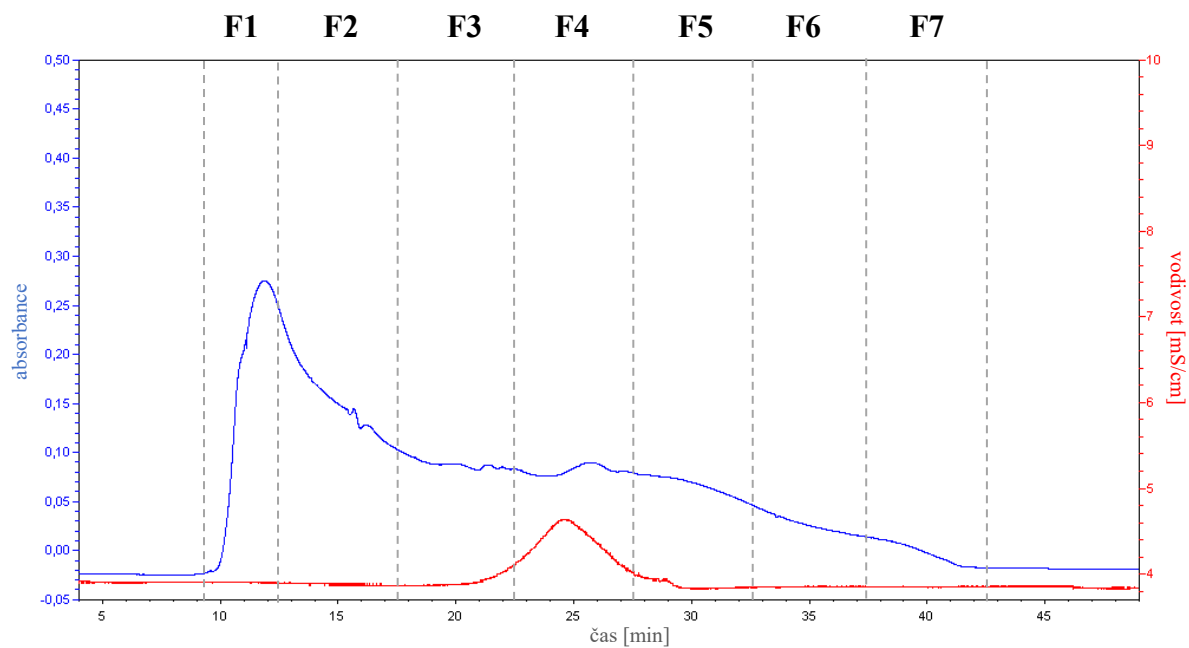
Obrázek 5 – Sraženina vzniklá po dialýze CaApe3p



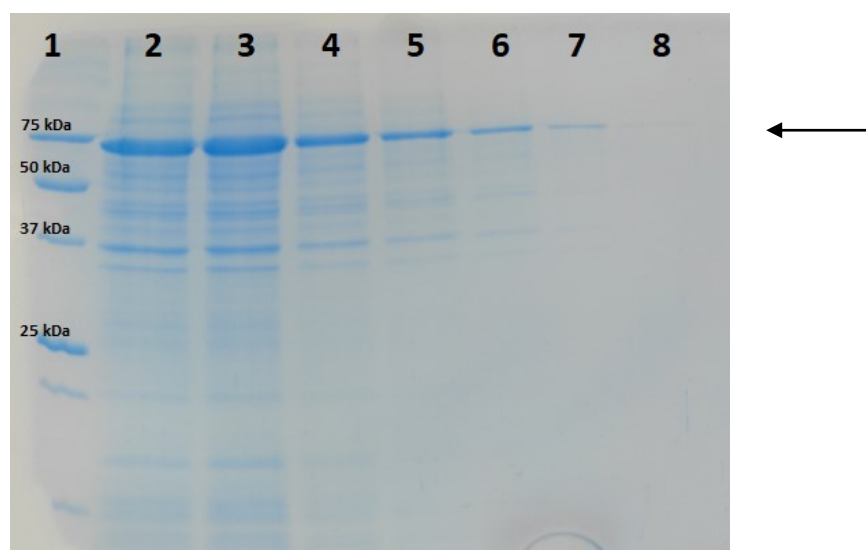
Obrázek 6 – SDS-PAGE gel dialýzy CaApe3p po rozpouštění inkluzí v 8 M močovíně: 1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards (10-250 kDa), 2. prázdná jamka, 3. CaApe3p(U) po dialýze – supernatant, 4. CaApe3p(U) po dialýze – supernatant (25x koncentrovaný), 5. CaApe3p(U) po dialýze – supernatant (75x koncentrovaný), 6. CaApe3p(U) po dialýze – suspenze se sraženinou



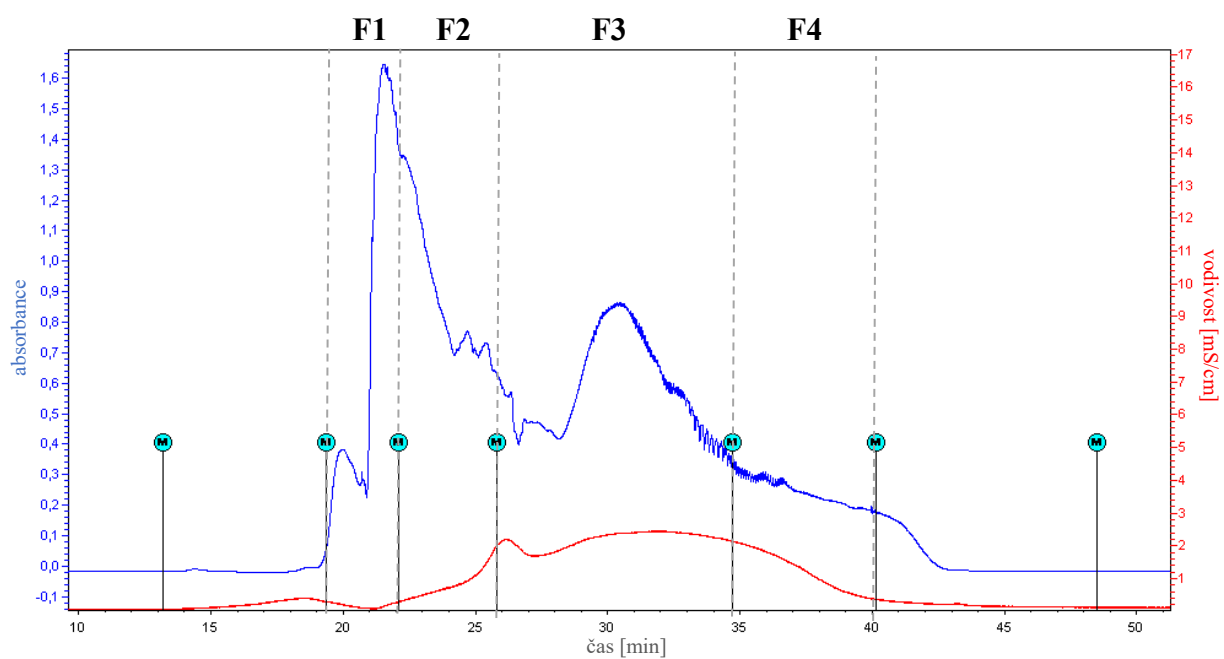
Obrázek 7 – SDS-PAGE gel dialýzy CaApe3p po rozpouštění v 60% HAc: 1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards (10-250 kDa), 2. chybně nanesený vzorek, 3. CaApe3p(HAc) po dialýze v prvním dialyzačním střevu – supernatant (pH=3.5), 4. CaApe3p(HAc) po výměně dialyzačního střeva a následné dialýze – supernatant (pH=6), 5. CaApe3p(HAc) po druhé výměně dialyzačního pufru - suspenze se sraženinou



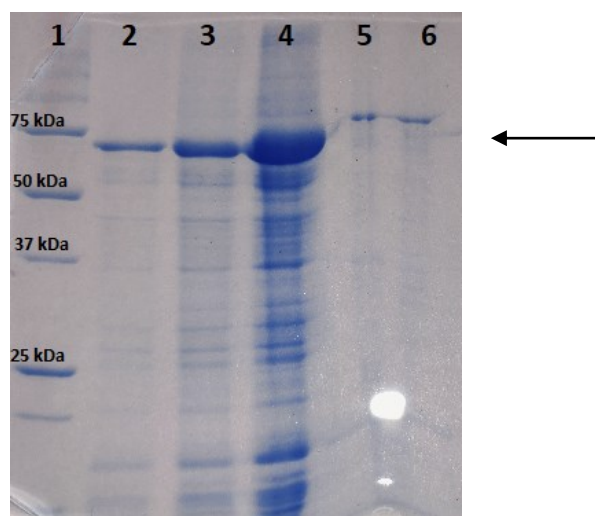
Obrázek 8 – Chromatografický záznam separace CaApe3p(U) na Sephadexu G-25



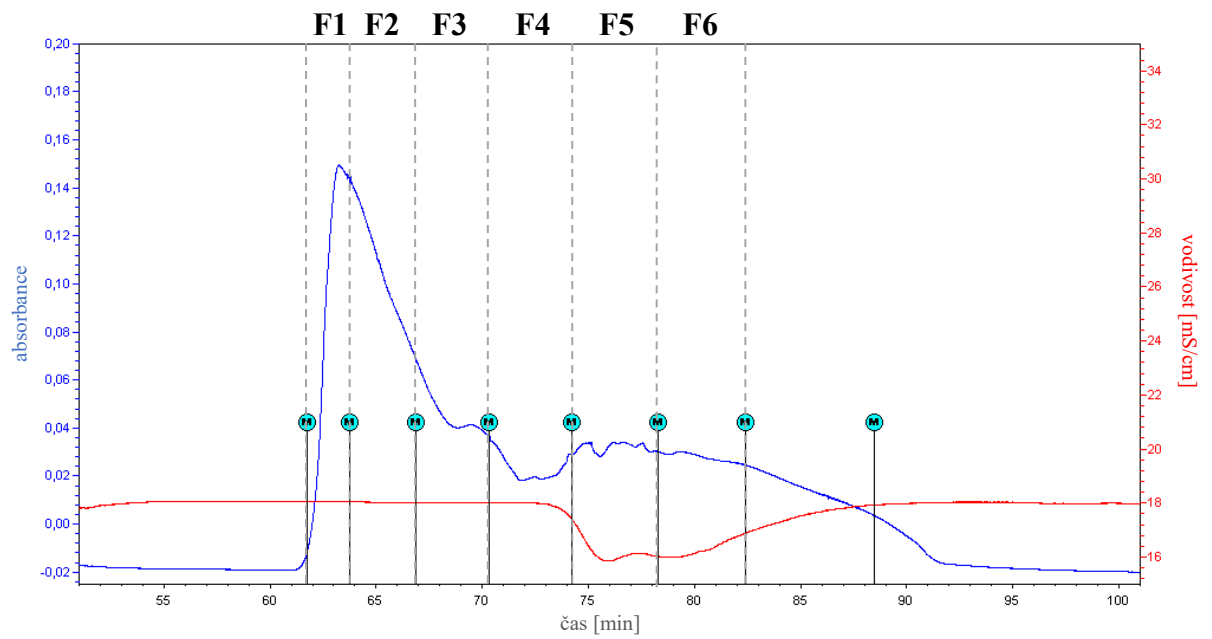
Obrázek 9 – SDS-PAGE frakcí ze Separace CaApe3p(U) na Sephadexu G-25 (viz Obrázek 8): 1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. F1, 3. F2, 4. F3, 5. F4, 6. F5, 7. F6, 8. F7



Obrázek 10 – Chromatografický záznam separace CaApe3p(HAc) na Sephadexu G-25



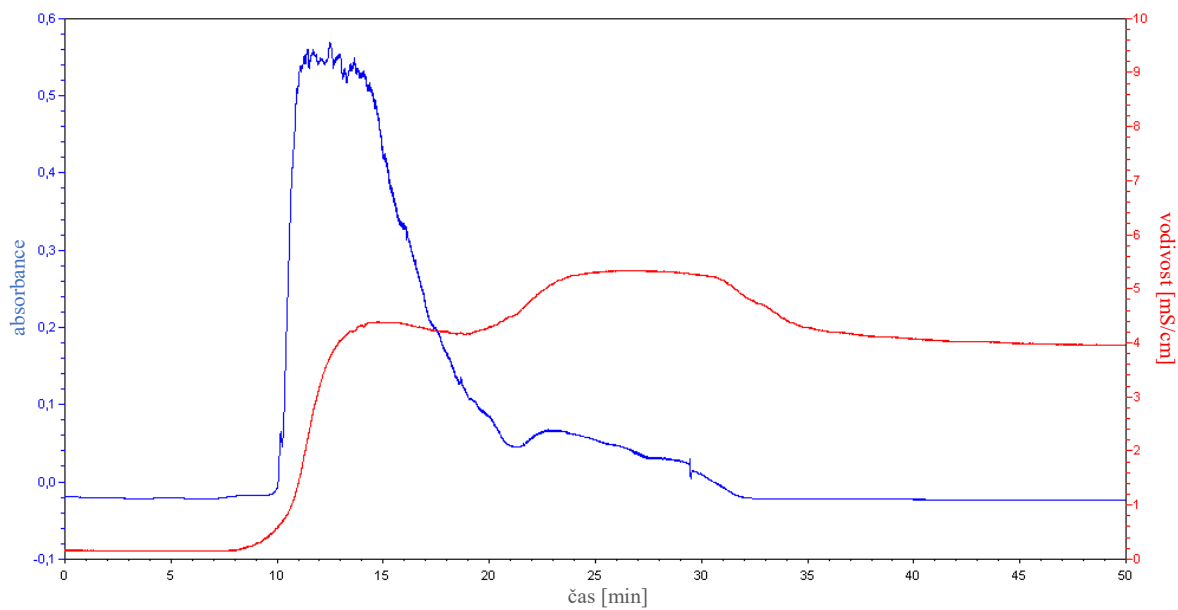
Obrázek 11 – Separace CaApe3(HAc) na Sephadexu G-25 (viz Obrázek 10): 1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. F1 – supernatant, 3. F1 – suspenze se sraženinou, 4. F2, 5. F3, 6. F4



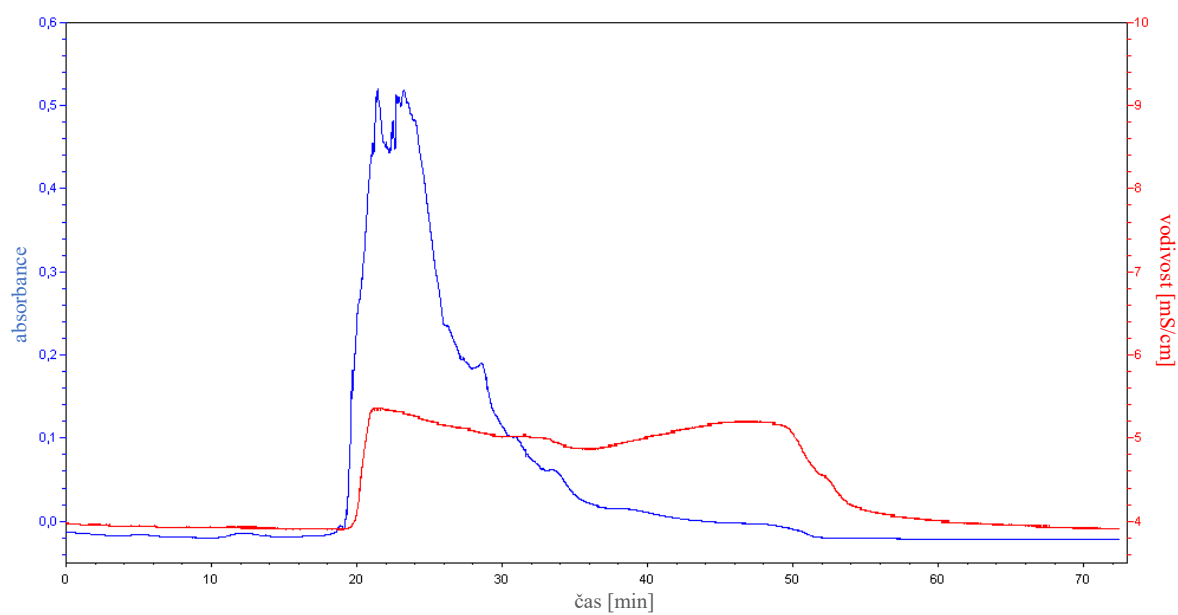
Obrázek 12 – Graf separace CaApe3p(U) na Sephadexu G-50



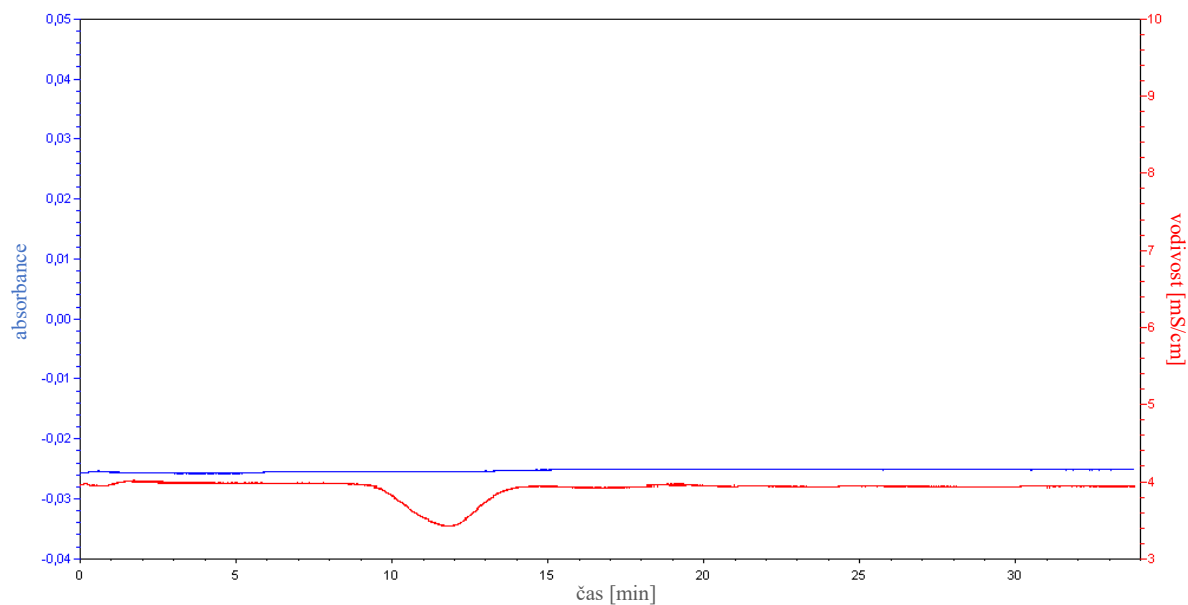
Obrázek 13 – Separace CaApe3(U) na Sephadexu G-50 (viz Obrázek 12): 1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. F1, 3. F2, 4. F3, 5. F4, 6. F5, 7. F6



Obrázek 14 – Graf separace CaApe3p(HAc) na Sephadexu G-50



Obrázek 15 – Graf separace CaApe3p(HAc) na Sephadexu G-100



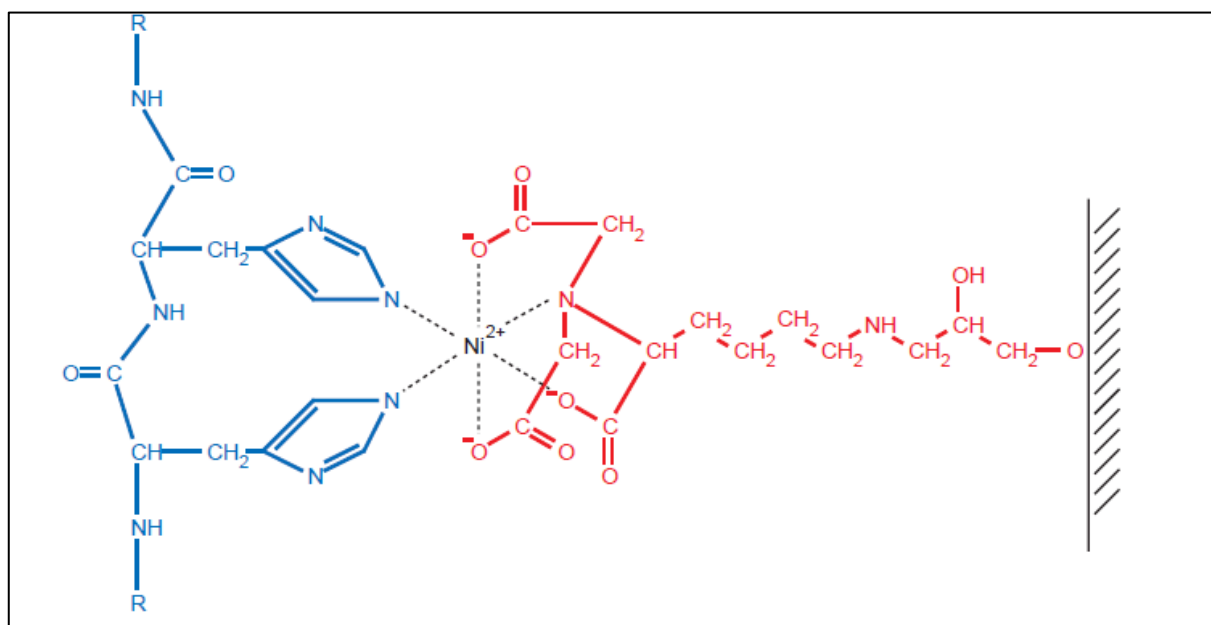
Obrázek 16 – Graf opětovného nanesení CaApe3p(HAc) na Sephadex G-100

Při rozpouštění vzorku v 60% HAc se tedy jevila jako jediná možná cesta pro převod vzorku do vhodného pufru pro purifikaci diluce. V ostatních případech došlo k vysrážení cílového proteinu. Při rozpouštění vzorku v 8 M močovně docházelo ke srážení pouze v případě dialýzy.

Při cestě gelové permeační chromatografie se jako jediná efektivní možnost jevila aplikace vzorku na kolonu naplněnou Sephadexem G-25.

3.3 Zavedení postupu purifikace připravené aminopeptidázy CaApe3p s His-kotvou

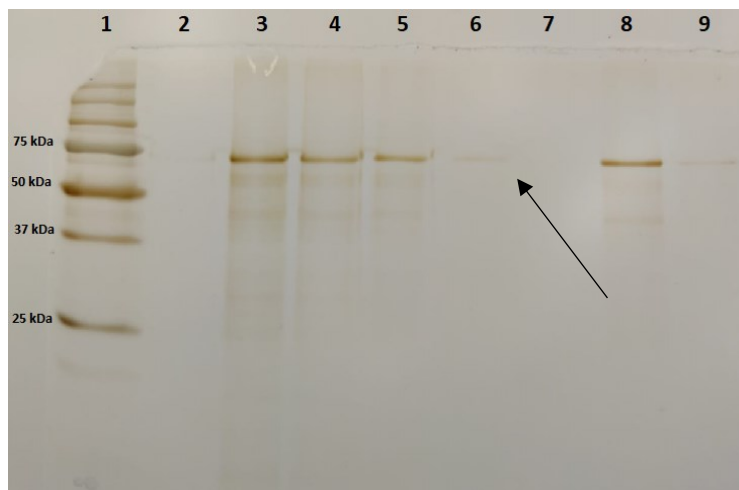
Nejspecifičtější chromatografickou metodou purifikace proteinů je afinitní chromatografie založená na specifické interakci mezi ligandem vázaným na nosiči a cílovým proteinem. V případě proteinů s His-kotvou je vhodnou variantou afinitní chelatační chromatografie (IMAC) založená na interakci mezi dvojmocnými ionty kovů a polyhistidinovou kotvou. Proto jsme hledali nosič, který by byl vhodný právě pro tento protein. Rozhodli jsme se použít nosič, který byl na katedře KBBV již dříve pro obdobné aplikace úspěšně použit. Tímto nosičem je HIS-Select[®] Nickel Affinity Gel, který je přímo určený pro purifikaci proteinů s histidinovou kotvou. Jsou to agarózové částice s navázanou nitrilotrioctovou kyselinou (NTA), která působí jako chelatační činidlo a imobilizuje kovové ionty, v tomto případě nikelnaté ionty, které vykazují vysokou afinitu k polyhistidinové kotvě.



Obrázek 17 – Interakce mezi úsekem proteinu s opakujícími se histidiny (modrá) a Ni-NTA matricí (červená) (Dwivedi, 2011)

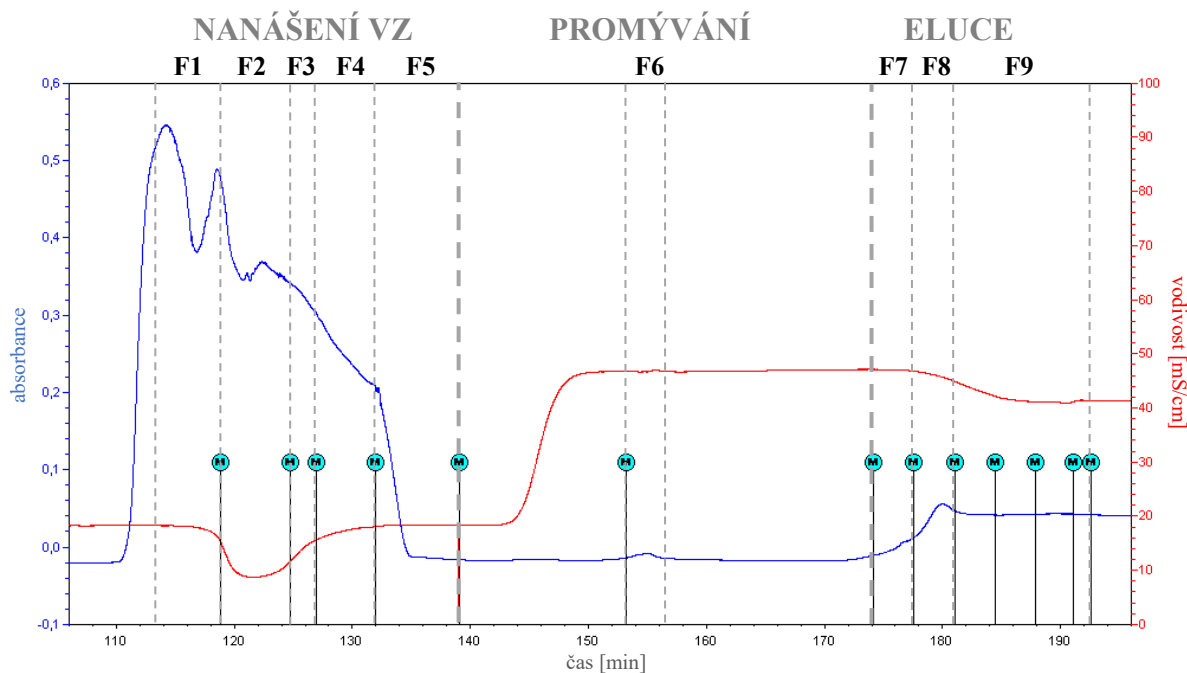
Než jsem začal s náplní HIS-Select[®] pracovat v koloně, provedl jsem dle návodu výrobce s malým množstvím (0,5 ml) tohoto nosiče purifikaci ve vsádkovém uspořádání, kdy byl nosič smíchán s 1 ml vzorku rozpouštěného v 8 M močovíně a ponechán 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě. Následně byl nosič odstředěn (30 s / 5000 g), supernatant byl odebrán a nosič byl 2x promyt v promývacím pufru 1. Poté bylo přidáno 500 µl elučního pufru 1, směs

byla promíchána, potom se nechala 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě a následně byla centrifugována 30 s při 5000 g. Jednotlivé frakce jsem analyzoval pomocí SDS-PAGE viz Obrázek 18. Na SDS-PAGE gelu byl v eluční frakci vidět slabý proužek CaApe3p, proto jsem tedy pokračoval v práci s tímto nosičem s vědomím, že bude třeba proces optimalizovat.

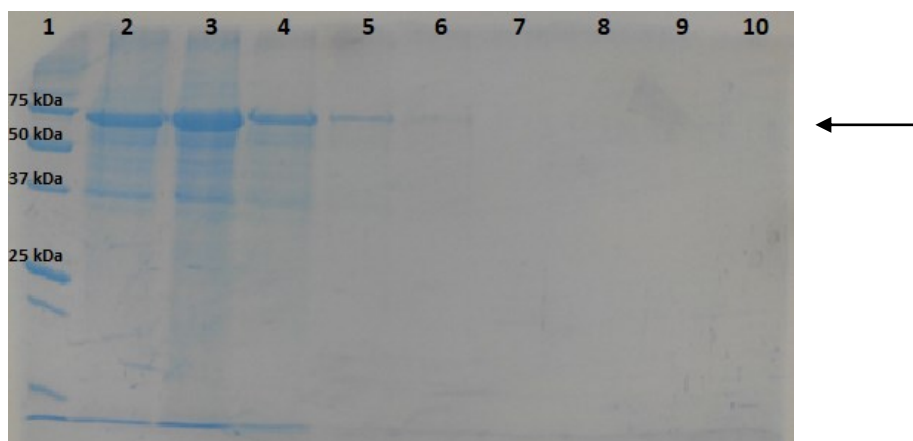


Obrázek 18 - SDS-PAGE gel zkušební purifikace ve vsádkovém uspořádání, barvení stříbrem: **1.** Marker 10-250 kDa Precision Plus ProteinTM Standards, **2.** prázdná jamka, **3.** supernatant po aplikaci vzorku na nosič, **4.** supernatant z prvního promytí, **5.** supernatant z druhého promytí, **6.** první eluce, **7.** druhá eluce, **8.** BSA 1 mg/ml, **9.** BSA 0,1 mg/ml

Při prvním pokusu o purifikaci v kolonovém uspořádání jsem nanášel vzorek separovaný na koloně naplněné Sephadexem G-25. Postupoval jsem dle doporučení výrobce – použil jsem nanášecí pufr 1, promývací pufr 1 a eluční pufr 1. V eluční frakci nebyl viditelný žádný proužek v požadované oblasti na SDS-PAGE gelu (viz Obrázky 19 a 20). Zároveň to vypadá, že se vzorek vymyl při promývání. Jelikož byl nanášen 1 ml vzorku o koncentraci přibližně 6,5 mg/ml a na gelu barveným Coomassie Brilliant Blue nebylo v elučních frakcích vidět nic, tak jsem považoval toto nastavení podmínek jako nedostatečné i přes to, že má barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue nižší citlivost než barvení stříbrem.



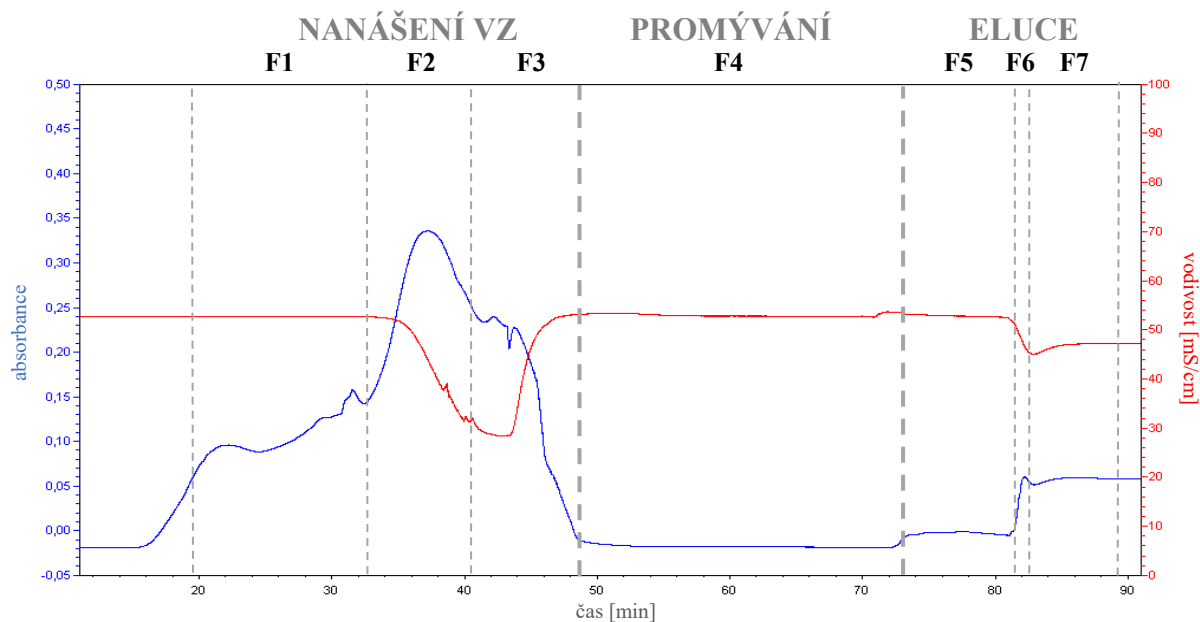
Obrázek 19 – Graf purifikace na koloně s IMAC náplní HIS-Select® (dále jen HS), podmínky doporučené výrobcem



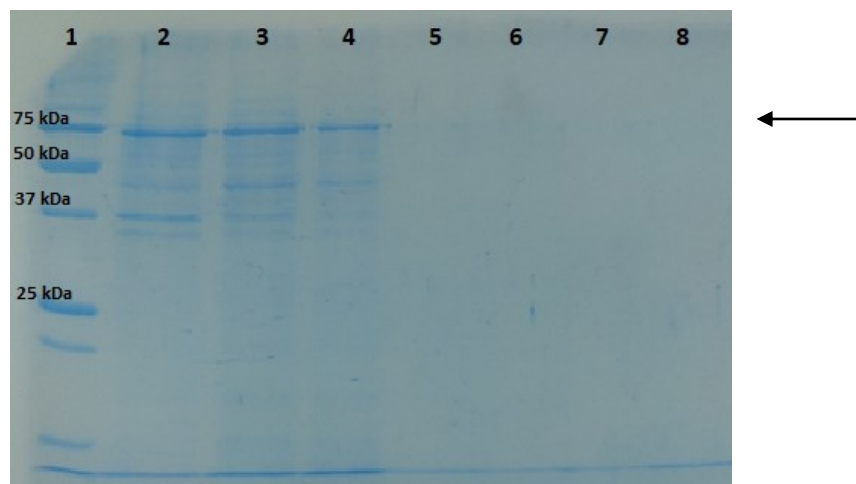
Obrázek 20 - SDS-PAGE gel purifikace na HS (viz Obrázek 19): 1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. F1, 3. F2, 4. F3, 5. F4, 6. F5, 7. F6, 8. F7, 9. F8, 10. F9

Proto jsem zkusil použít nanášecí a promývací pufr bez imidazolu (viz Obrázek 21), který se v koncentracích nad 100 mmol/l používá jako kompetitivní činidlo pro eluci proteinů značených histidinem. Při nízkých koncentracích by měl imidazol vyvázat nespecificky navázané látky, ovšem v rámci doporučení řešení tohoto problému jsem dle návodu imidazol z nanášecího a promývacího pufru vynechal. Na SDS-PAGE gelu (Obrázek 22) bylo viditelné, že nedošlo k vymytí vzorku při promývacím kroku, avšak v eluční frakci opět nebyl viditelný proužek v předpokládané oblasti, a to mohlo znamenat, že nedošlo k efektivnímu uvolnění CaApe3p z kolony, nebo že došlo k jeho vysrážení na koloně. Z toho důvodu jsem

vyzkoušel eluční pufr, který obsahoval Tween-20, Triton X-100 a glycerol, což mělo zvýšit stabilitu proteinu a zamezit jeho nežádoucí agregaci při eluci. Ovšem ani v tomto případě nebyl žádoucí protein na SDS-PAGE gelu patrný, a tudíž jsem se rozhodl zkusit další možnosti.



Obrázek 21 – Graf purifikace na HS, nanášecí a promývací pufr bez imidazolu

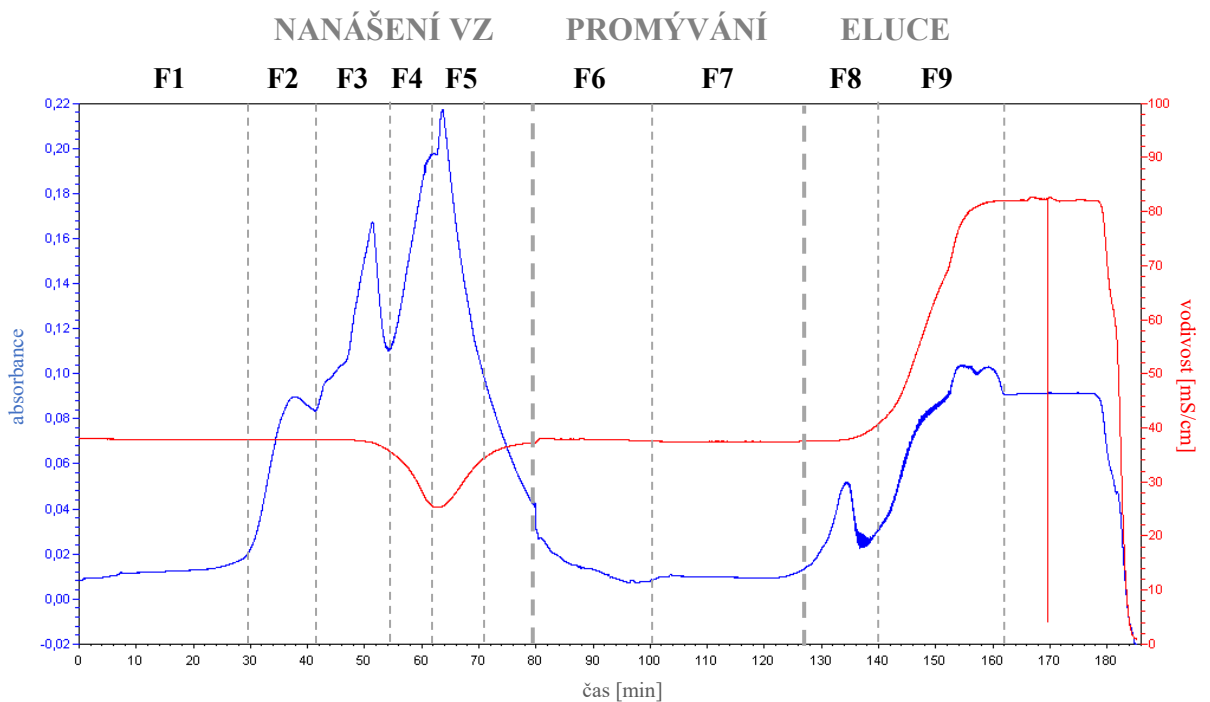


Obrázek 22 – SDS-PAGE gel purifikace na HS (viz Obrázek 21); nanášecí a promývací pufr bez imidazolu: **1.** Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, **2.** F1, **3.** F2, **4.** F3, **5.** F4, **6.** F5, **7.** F6, **8.** F7

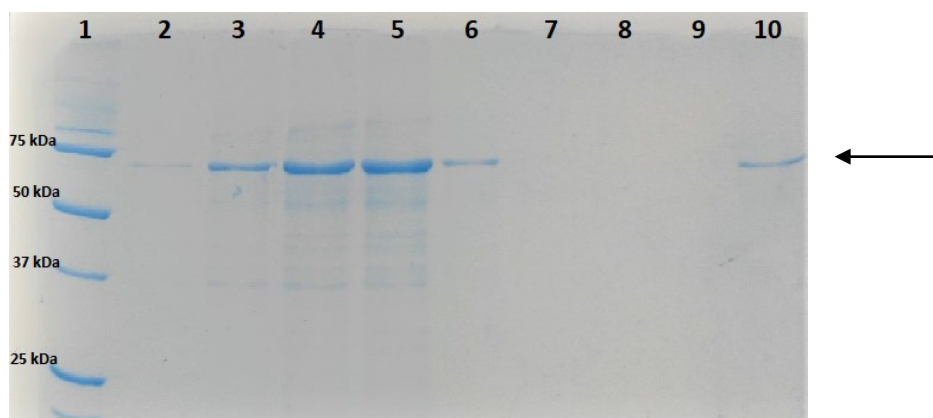
Proto přišla v úvahu purifikace v denaturačních podmínkách, kterou kolona umožňovala. V denaturačním prostředí dochází k rozvolnění proteinu, čímž by měla být omezena jeho

případná tendence k agregaci a také dochází ke zpřístupnění afinitní značky, což by mělo podpořit jeho záchyt na koloně, usnadnit promytí a zefektivnit eluci.

Pro nanesení na kolonu jsem použil přímo vzorek CaApe3p v rozpouštěcím pufru obsahujícím 8 M močovinu. Nanášecí i promývací pufr obsahoval taktéž 8 M močovinu, a také Tween-20, Triton X-100 a glycerol a eluce byla provedena za použití elučního pufru 2. Zde byl poprvé pozorovatelný proužek v eluční frakci v odpovídající oblasti na SDS-PAGE gelu (viz Obrázek 24).

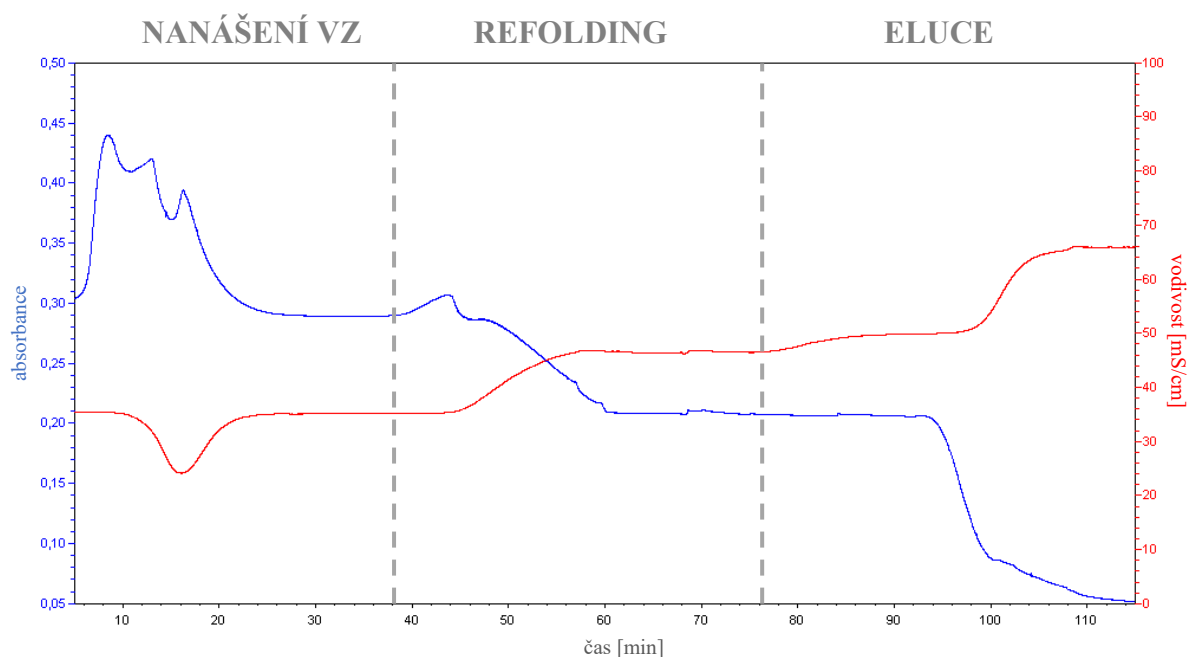


Obrázek 23 – Graf purifikace na HS při denaturačních podmínkách bez promývání a bez refoldingu



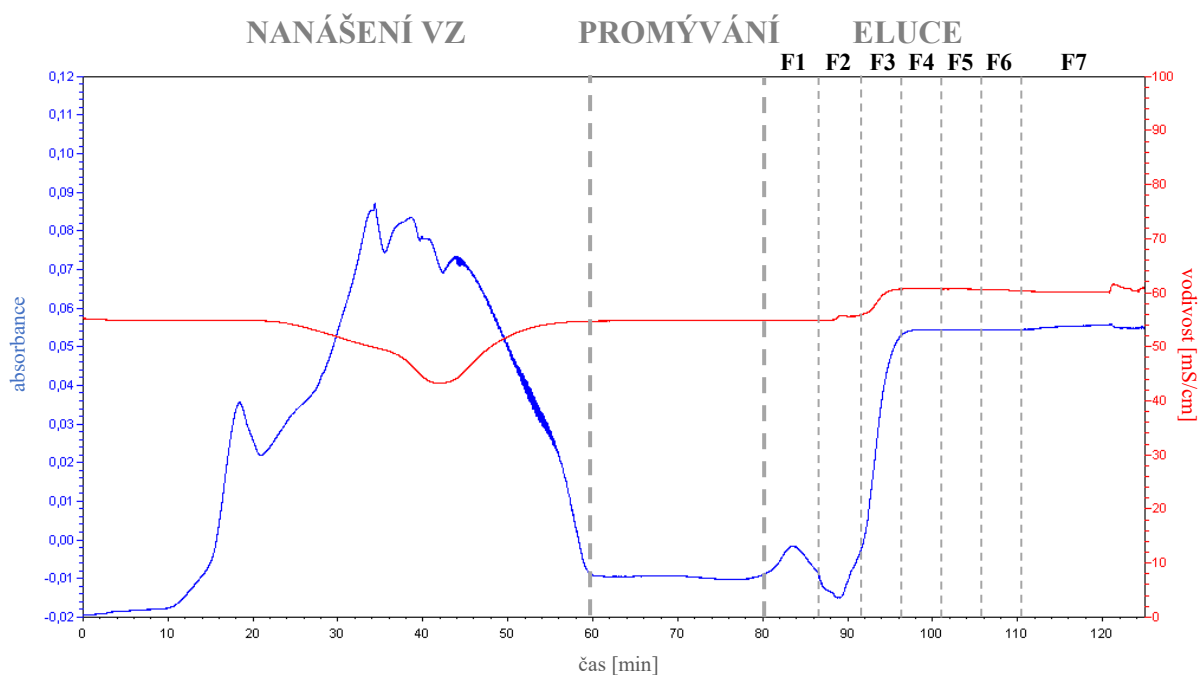
Obrázek 24 – SDS-PAGE gel purifikace na HS při denaturačních podmínkách bez promývání a bez refoldingu (viz Obrázek 23): 1. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, 2. F1, 3. F2, 4. F3, 5. F4, 6. F5, 7. F6, 8. F7, 9. F8, 10. F9

Jelikož se pracovalo v denaturačních podmínkách, tak připadlo v úvahu přidání kroku s refoldingovým pufrem, a to buď přímo na koloně, nebo až dodatečně po eluci. Při pokusu o refolding přímo na koloně (s použitím Refolding pufru 3) nebyl na gelu vzorek patrný ani v refoldingové frakci a ani v elučních frakcích, takže s největší pravděpodobností agregoval v průběhu aplikace refoldingového pufru.

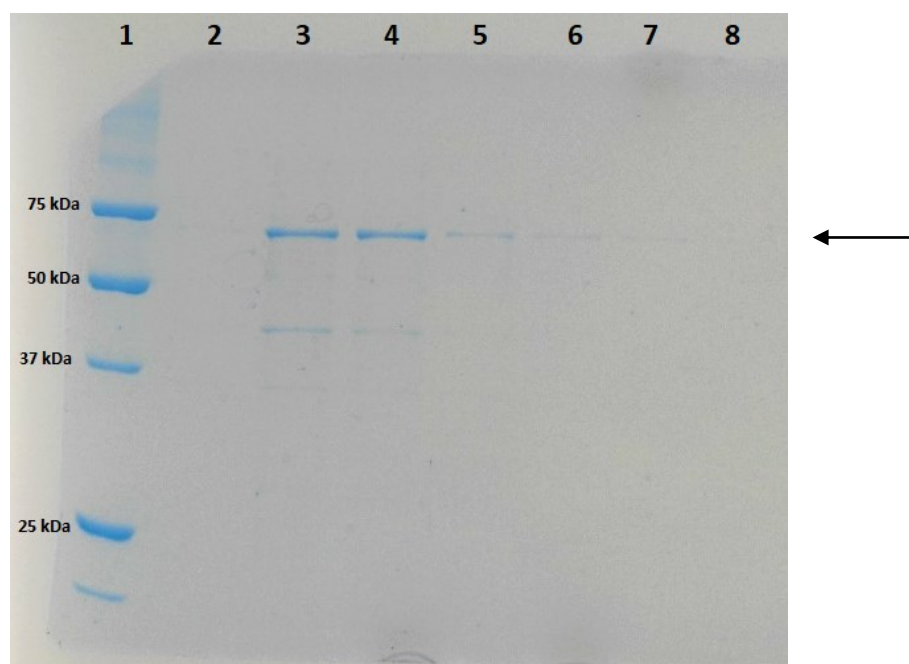


Obrázek 25 – Graf purifikace na HS při denaturačních podmínkách se zahrnutím refoldingu

V neposlední řadě jsem tedy zkusil možnost, kdy jsem použil nanášecí pufr 3, promývací pufr 5 a eluční pufr 3 obsahující taktéž 8 M močovinu. Tato cesta se jevila jako velmi efektivní s vysokým výtěžkem (viz Obrázek 26 a 27). Při tomto pokusu o purifikaci na koloně s HIS-Selectem jsem nanášel přímo vzorek rozpuštěný v 8 M močovíně o koncentraci přibližně 8 mg proteinu na 1 ml roztoku. Koncentrace proteinu v eluční frakci dosahovala při tomto procesu hodnoty 2,0 mg/ml. Takto připravený vzorek jsem následně podrobil v jednom případě dialýze proti Refolding pufru 1 a následně dialýze proti 50 mM Tris-Cl pufru o pH=8, a v druhém případě jsem jej podrobil dialýze rovnou proti 50 mM Tris-Cl pufru o pH=8 vhodného pro sledování případné změny v aktivitě.



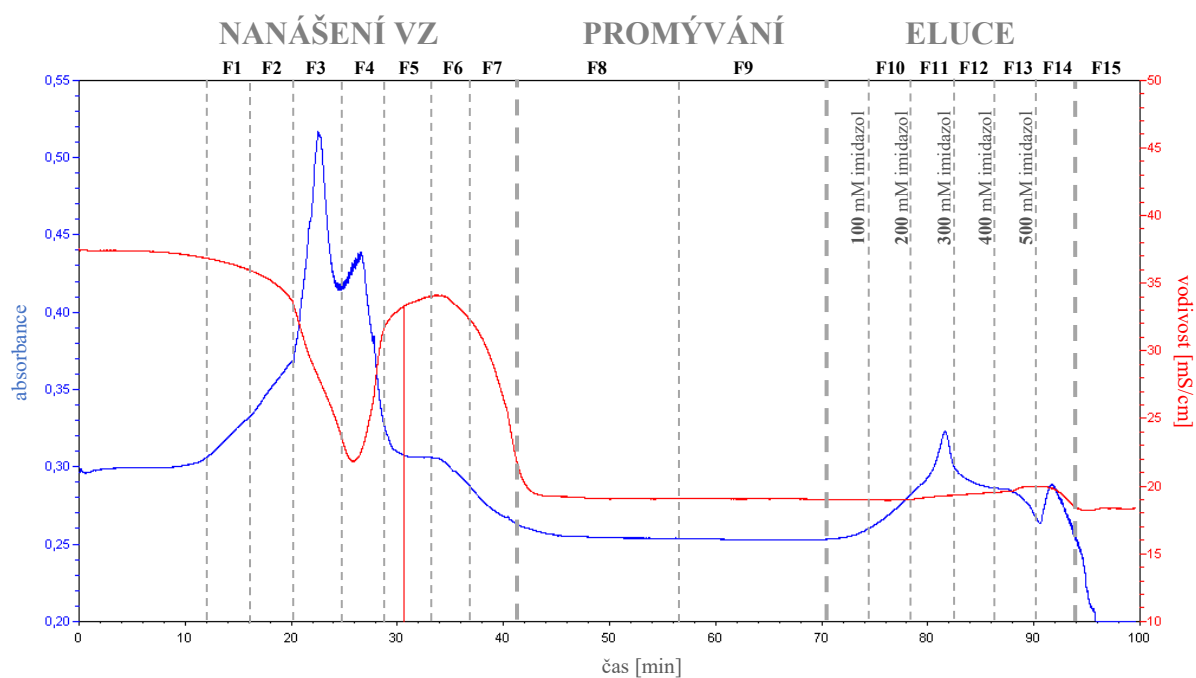
Obrázek 26 – Graf purifikace na HS při denaturačních podmínkách (nanášení, promývání i eluce – bez refoldingu)



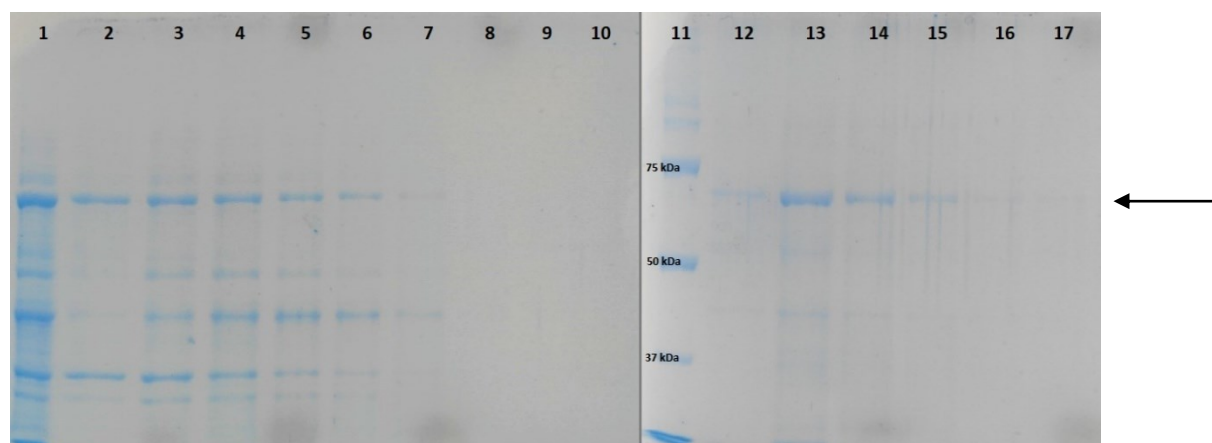
Obrázek 27 – SDS-PAGE gel purifikace na HS při denaturačních podmínkách (nanášení, promývání i eluce, bez refoldingu) (viz Obrázek 26): **1.** Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, **2.** F1, **3.** F2, **4.** F3, **5.** F4, **6.** F5, **7.** F6, **8.** F7

Zkusil jsem také eluci v denaturačních podmínkách s imidazolovým gradientem s rozsahem koncentrace 0-500 mmol/l imidazolu (viz Obrázek 28 a 29) za účelem získání čistší frakce a sledování, při které koncentraci dochází k efektivnímu uvolnění vzorku z kolony. Eluční pufr jsem připravil bez Tritonu X-100. Koncentrace proteinu v nanášeném vzorku byla 8,1 mg/ml.

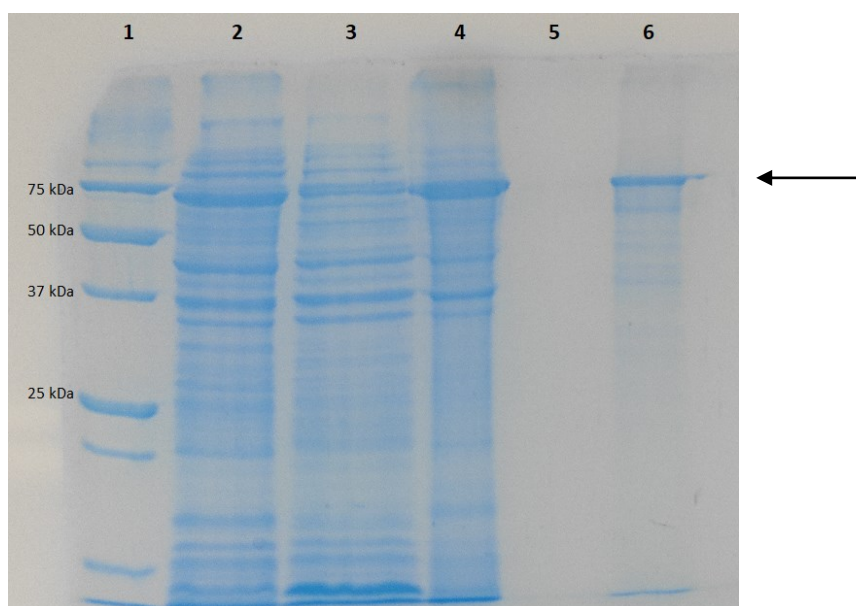
Vzorek se začal uvolňovat již při koncentraci imidazolu nižší než 100 mmol/l. Nejúčinnější pro eluci se zdá být koncentrace imidazolu mezi 250-300 mmol/l, kdy bylo dosaženo nejvyšší koncentrace proteinu v eluční frakci. Zároveň je na SDS-PAGE vidět (pozice 13,14), že došlo k uspokojivé míře purifikace proteinu, kdy ze vzorku vymizely ostatní proteiny a ve vzorku dominuje cílový protein CaApe3p, který dosahoval koncentrace 2,3 mg/ml.



Obrázek 28 – Graf purifikace na HS při denaturačních podmínkách (nanášení, promývání i eluce, bez refoldingu), eluce v imidazolovém gradientu



Obrázek 29 – SDS-PAGE gely purifikace na HS při denaturačních podmínkách (nanášení, promývání i eluce; bez refoldingu), eluce v imidazolovém gradientu (viz Obrázek 28): 1. VZ(U) 2. F1, 3. F2, 4. F3, 5. F4, 6. F5, 7. F6, 8. F7, 9. F8, 10. F9, 11. Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, 12. F10, 13. F11, 14. F12, 15. F13, 16. F14, 17. F15



Obrázek 30 – SDS-PAGE gel solubilizace inkluzních tělísek v 8 M močovíně: **1.** Marker 10-250 kDa Precision Plus Protein™ Standards, **2.** cytosol, **3.** supernatant po odstředění inkluzí, **4.** vzorek rozpouštění inkluzí v 8 M močovíně, **5.** vzorek po purifikaci na HS za podmínek doporučených výrobcem, **6.** vzorek po purifikaci na HS v denaturačním prostředí

V Tabulce 4 je uveden souhrnný přehled provedených purifikačních experimentů.

Tabulka 4 – Přehled provedených experimentů s jednotlivými pufrů při zavádění postupu pro purifikaci na HS

HIS-Select	nanášecí pufr	promývací pufr	refolding pufr	eluční pufr	nejvyšší koncentrace vzorku v eluční frakci	odpovídající graf a SDS-PAGE gel
průtok [ml/min]	0,2	1	0,5	0,5		
Experiment 1	1	2	-	1	-	Obrázek 19 a 20
Experiment 2	2	3	-	1	-	Obrázek 21 a 22
Experiment 3	2	4	-	2	-	-
Experiment 4	3	-	-	2	0,3 mg/ml	Obrázek 23 a 24
Experiment 5	3	-	3	2	-	Obrázek 25
Experiment 6	3	5	-	3	2,0 mg/ml	Obrázek 26 a 27
Experiment 7	3	5	-	4→3	2,3 mg/ml	Obrázek 28 a 29

3.4 Zavedení a optimalizace stanovení aktivity CaApe3p

Při izolaci a purifikaci enzymů je vhodné průběžně sledovat aktivitu, jestli případně v některém kroku nedochází k její potenciaci nebo inhibici. Pro měření enzymatické aktivity je několik způsobů. V tomto případě jsem pro zjišťování aktivity CaApe3p vybral spektrofotometrickou metodu, která je velmi snadno aplikovatelná a sledoval jsem případnou změnu absorbance při vlnové délce 405 nm v připravené 96-jamkové destičce s výškou jamky 1 cm. Do tabulek (Tab. 5-7) jsem doplnil hodnoty rozdílu absorbancí na začátku a konci měření, tj. po 30 minutách. Sledoval jsem vliv hodnoty pH, kterou jsem nastavil tak, abych viděl chování v mírně kyselém, neutrálním a mírně zásaditém prostředí. Zároveň jsem pozoroval vliv přidavku zinečnatých a kobaltnatých iontů, neboť zinečnaté ionty by měly být přítomny v aktivním místě CaApe3p a kobaltnaté ionty jsou aktivátorem orthologního enzymu Ape3p z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*.

Nejprve jsem sledoval vliv zpracování vzorku na aktivitu proteinu v prostředí 3 mM substrátu při různých pH a eventuální přítomnosti 1 mM Zn^{2+} a Co^{2+} (Tab. 5-7). Koncentrace vzorku v reakční směsi byla 10 $\mu\text{g/ml}$. Při měřeních se substrátem lysin-*p*-nitroanilidem a prolin-*p*-nitroanilidem (viz Tabulka 5 a 6) ovšem žádná výrazná změna vidět nebyla. Minimální změna absorbance (o cca 0,05) byla pouze u dvou vzorků v oblasti pH=8,5 a v přítomnosti Zn^{2+} a Co^{2+} při použití leucin-*p*-nitroanilidu jako substrátu (viz Tabulka 7). Proto jsem se rozhodl u těchto dvou vzorků zkusit vliv jejich různých koncentrací (100 ng/ml – 50 $\mu\text{g/ml}$) obdobnými proměnnými (viz Tabulka 8). Změna absorbance byla sice vyšší, ovšem stále relativně nízká. Navíc se mi zdálo, že docházelo k mírnému zakalení v jamkách, kde byla změna absorbance pozorována.

Tabulka 5 – Výsledky (změny absorbance) prvního měření aktivity CaApe3p; lysin-*p*-nitroanilid

[K-p-NA] = 3 mM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	V(vz) = 5 μl
A	0,001	0,001	0,000	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002	0,000	0,001	0,001	0,002	VZ(U)
B	0,002	0,002	0,003	0,002	0,003	0,007	0,001	0,001	0,001	0,003	0,002	0,002	(U)→HS→Dz
C	0,000	0,002	0,001	0,002	0,000	0,006	0,000	0,002	0,002	0,004	0,000	0,003	(U)→HS→R-Dz
D	0,003	0,001	0,000	0,001	0,002	0,000	0,001	0,003	0,001	0,000	0,001	0,001	(U)→Dz
E	0,004	0,000	0,001	0,003	0,001	0,000	0,003	0,001	0,000	0,001	0,001	0,004	VZ(HAc)
F	0,002	0,001	0,004	0,003	0,004	0,008	0,001	0,001	0,001	0,004	0,002	0,001	(HAc)→Dc
G	0,001	0,000	0,002	0,015	0,005	0,010	0,001	0,002	0,002	0,001	0,000	0,007	(HAc)→R-Dc
H	0,002	0,002	0,002	0,014	0,004	0,005	0,002	0,006	0,001	0,003	0,002	0,004	dest. voda = blank (5 μl)
[Me ²⁺] = 1 mmol/l	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	
pH	pH = 5,5				pH = 7				pH = 8,5				

Rozpouštění v HAc

Rozpouštění v 8 M močovíně

Tabulka 6 – Výsledky (změny absorbance) prvního měření aktivity CaApe3p; prolin-*p*-nitroanilid

[P- <i>p</i> -NA] = 3 mM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	V(vz) = 5 µl
A	0,002	0,021	0,001	0,005	0,039	0,009	0,002	0,035	0,001	0,001	0,005	0,009	VZ(U)
B	0,001	0,004	0,001	0,002	0,006	0,006	0,001	0,004	0,001	0,002	0,006	0,002	(U)→HS→Dz
C	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	0,005	0,004	0,001	0,001	0,002	0,002	0,006	(U)→HS→R-Dz
D	0,003	0,003	0,002	0,002	0,004	0,003	0,003	0,001	0,002	0,004	0,004	0,003	(U)→Dz
E	0,002	0,004	0,001	0,001	0,000	0,005	0,002	0,004	0,001	0,005	0,000	0,005	VZ(HAc)
F	0,001	0,023	0,001	0,002	0,019	0,005	0,009	0,003	0,006	0,002	0,014	0,003	(HAc)→Dc
G	0,001	0,003	0,001	0,002	0,002	0,003	0,001	0,003	0,001	0,004	0,002	0,003	(HAc)→R-Dc
H	0,001	0,003	0,002	0,002	0,002	0,005	0,031	0,004	0,002	0,002	0,002	0,005	dest. voda = blank (5 µl)
[Me ²⁺] = 1 mmol/l	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	
pH	pH = 5,5				pH = 7				pH = 8,5				

Rozpuštění v HAc

Rozpuštění v 8 M močovíně

Tabulka 7 – Výsledky (změny absorbance) prvního měření aktivity CaApe3p; leucin-*p*-nitroanilid

[L- <i>p</i> -NA] = 3 mM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	V(vz) = 5 µl
A	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,003	0,002	0,002	0,001	0,005	0,020	0,020	VZ(U)
B	0,002	0,001	0,003	0,001	0,002	0,002	0,003	0,003	0,004	0,001	0,023	0,022	(U)→HS→Dz
C	0,003	0,002	0,005	0,001	0,003	0,001	0,006	0,016	0,004	0,004	0,037	0,045	(U)→HS→R-Dz
D	0,007	0,007	0,002	0,002	0,015	0,009	0,019	0,008	0,004	0,010	0,025	0,000	(U)→Dz
E	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,005	0,003	0,002	0,003	0,003	0,021	0,003	VZ(HAc)
F	0,005	0,005	0,007	0,003	0,004	0,002	0,005	0,008	0,007	0,008	0,025	0,059	(HAc)→Dc
G	0,001	0,001	0,001	0,003	0,005	0,002	0,002	0,002	0,006	0,005	0,024	0,035	(HAc)→R-Dc
H	0,002	0,002	0,003	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,026	0,002	dest. voda = blank (5 µl)
[Me ²⁺] = 1 mmol/l	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	
pH	pH = 5,5				pH = 7				pH = 8,5				

Rozpuštění v HAc

Rozpuštění v 8 M močovíně

Tabulka 8 – Výsledky (změny absorbance) druhého měření aktivity CaApe3p; leucin-*p*-nitroanilid

[L- <i>p</i> -NA] = 3 mM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	[vz]
A	0,011	0,012	0,009	0,022	0,012	0,084	0,015	0,085	0,023	0,021	0,043	0,141	50 µg/ml
B	0,011	0,011	0,007	0,009	0,013	0,011	0,012	0,009	0,025	-0,004	0,039	0,118	10 µg/ml
C	0,011	0,013	0,010	0,011	0,013	0,012	0,015	0,015	0,024	-0,002	0,041	0,095	1 µg/ml
D	0,028	0,037	0,014	0,036	0,023	0,025	0,016	-0,015	-0,016	-0,032	0,028	0,000	100 ng/ml
E	0,012	0,014	0,008	0,012	0,015	0,013	0,013	0,013	0,009	0,000	0,037	0,064	50 µg/ml
F	0,008	0,019	0,012	0,010	0,009	0,008	0,011	0,010	0,013	0,018	0,029	0,018	10 µg/ml
G	0,011	0,011	0,010	0,011	0,009	0,011	0,014	0,012	0,020	0,015	0,039	-0,034	1 µg/ml
H	0,011	0,012	0,004	0,010	0,007	0,011	0,017	0,012	0,006	0,006	0,020	0,010	dest. voda = blank (5 µl)
[Me ²⁺] = 1 mmol/l	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	-	Zn ²⁺	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	
pH	pH = 5,5				pH = 7				pH = 8,5				

(HAc)→Dc

(U)→HS→R-Dz

Proto jsem provedl ještě jedno měření, kdy jsem se zaměřil už konkrétně na pH=7 a pH=8,5 s tím, že v prostředí o pH=7 jsem sledoval pouze vliv přítomnosti Zn²⁺, zatímco v prostředí o pH=8,5 jsem sledoval vliv přítomnosti Co²⁺ a společně přítomnosti Zn²⁺ a Co²⁺ na změnu absorbance a vliv koncentrace substrátu.

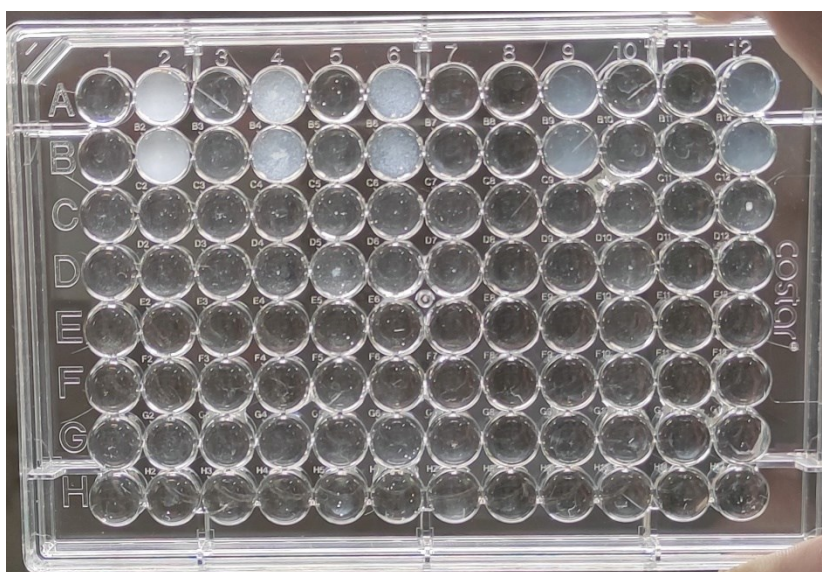
Po měření absorbancí v průběhu 30 minut jsem zanesl výsledné rozdíly počátečních a posledních hodnot absorbancí do Tabulky 9. Po prohlédnutí destičky s reakčními směsmi jsem však zjistil, že byla změna absorbance skutečně způsobena zákalem, který se objevil v průběhu měření (viz Obrázek 31).

Tabulka 9 – Výsledky (změny absorbance) třetího měření aktivity CaApe3p; leucin-*p*-nitroanilid

	0,2 mM L-p-NA		1 mM L-p-NA		5 mM L-p-NA		0,2 mM L-p-NA			1 mM L-p-NA			V(vz) = 5 µl
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	-0,009	0,189	0,000	0,181	0,004	0,059	-0,006	-0,002	0,021	0,001	0,009	0,020	(U)→Dc (cut-off 10K)
B	-0,001	0,240	0,004	0,176	0,014	0,134	0,002	0,007	0,041	0,006	0,020	0,045	(U)→Dc (cut-off 30K)
C	0,005	0,005	0,006	0,004	0,005	0,006	0,002	0,000	0,003	0,004	0,014	0,012	(U)→HS→R-Dz
D	0,003	0,003	0,003	-0,002	0,026	0,005	0,002	0,000	0,000	0,001	0,011	0,004	(U)→HS→Dc
E	0,001	0,002	0,004	0,003	0,012	0,013	0,002	0,003	0,001	0,004	0,009	0,007	VZ(HAc)
F	0,001	0,001	0,002	-0,001	0,013	0,011	0,000	-0,002	-0,006	0,001	0,007	0,003	(HAc)→Dc
G	0,002	0,002	-0,001	0,005	0,000	0,004	0,001	0,005	0,004	0,002	0,012	0,008	(HAc)→R-Dc
H	0,001	0,000	0,004	0,002	0,015	0,014	0,001	0,003	0,003	0,004	0,004	0,011	dest. voda = blank (5 µl)
[Me ²⁺] = 1 mmol/l	-	Zn ²⁺	-	Zn ²⁺	-	Zn ²⁺	-	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	-	Co ²⁺	Zn ²⁺ , Co ²⁺	
pH	pH = 7						pH = 8,5						

Rozpouštění v HAc

Rozpouštění v 8 M močovine



Obrázek 31 – Foto 96-jamkové destičky po měření aktivity CaApe3p viz tabulka č. 9 → změna absorbance byla způsobená zákalem v reakční směsi

ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem vyzkoušel základní cesty přípravy a purifikace rekombinantního proteinu CaApe3p, což je aminopeptidáza nacházející se ve vakuolách patogenních kvasinek *Candida albicans*, která je potenciálním virulentním faktorem a její studium má vysoký potenciál pro využití v medicíně. Cílem bylo získat tento protein nejen ve vysoké čistotě, ale i v biologicky aktivní formě pro budoucí výzkum.

V první řadě jsem hledal vhodný způsob pro izolaci a purifikaci CaApe3p značeného histidinovou kotvou. Protein byl ve zpracovávaném materiálu ve formě tzv. inkluzních tělísek, které jsem zkoušel rozpouštět v 60% kyselině octové a v 8 M močovíně. Hlavním problémem, se kterým jsem se potýkal v průběhu práce se vzorkem, byla jeho agregace, proto bylo potřeba hledat především vhodné podmínky, aby se tomu dařilo předcházet. V průběhu přípravy vzorku jsem se zaměřil na tři různé přístupy vedoucí k odsolení a převedení vzorku do prostředí vhodného pro následnou purifikaci. Jednalo se o dialýzu, diluci a gelovou permeační chromatografii. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při rozpouštění vzorku v 8 M močovíně a pro následné odsolení a převod do jiného pufru se nejlépe jevila chromatografie na Sephadexu G-25.

Během optimalizace purifikace vzorku metodou IMAC jsem zkusil různé kombinace vazebného, promývacího, refoldingového a elučního pufru. Nejlepší variantou byla purifikace v denaturačním prostředí, kdy veškeré použité pufrы obsahovaly močovinu o koncentraci 8 mol/l a protein byl získán v relativně vysoké čistotě a ve vysokém množství. Výtěžnost metody byla ~ 50-60 mg proteinu na 1 litr buněčné kultury.

Na závěr jsem se zaměřil na zavedení metody umožňující stanovení enzymové aktivity CaApe3p. Zkoušel jsem několik substrátů, různé koncentrace a různé složení reakční směsi. I přes toto nemalé úsilí se mi nepodařilo enzymovou aktivitu prokázat.

Pro další studium by bylo jistě zajímavým směrem zkusit rozpouštět inkluze v nedenaturačním prostředí a pokusit se tak zamezit případné ztrátě biologické aktivity. Na biologickou aktivitu může mít také vliv to, že například v případě orthologního Ape3p z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* se vyskytuje tato aminopeptidáza v několika formách s různou modifikací N-vázaného glykanu, pro který má tento protein osm akceptorových míst (převážně je jich ale používáno 5-7). Ke vzniku těchto forem v prokaryotickém systému *Escherichia coli* ale dojít nemůže, protože v něm nedochází k posttranslačním modifikacím

zahrnujícím glykosylace. Z toho důvodu by se nabízelo zkusit přípravu této peptidázy v kvasinkovém expresním systému, což by se jevilo jako další potenciální cesta k zisku tohoto proteinu v biologicky aktivní formě.

V neposlední řadě by se nabízela cesta, kdy by byl rekombinantní CaApe3p inkubován v přítomnosti proteinázy B, která je rovněž obsažena ve vakuolách kvasinek *Candida albicans* a pravděpodobně se účastní procesu zrání tohoto proteinu. Dalo by se také zkusit vystavit rekombinantní CaApe3p buněčné šťávě (tekutému obsahu vakuol) těchto kvasinek a následně znovu provést proces purifikace a pozorovat, zdali nedošlo k pozitivnímu ovlivnění aktivity.

I přes negativní výsledek detekce enzymatické aktivity a přes donedávna probíhající omezení týkající se přítomnosti ve školních laboratořích a práci na experimentální části diplomové práce jsem do značné míry optimalizoval cestu pro izolaci a purifikaci tohoto rekombinantního proteinu. Tím jsem splnil zadání této práce a zároveň jsem naznačil další možné a lákavé možnosti pro pokračování v tomto zajímavém tématu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ANYAOGU, Diana Chinyere; MORTENSEN, Uffe Hasbro. Manipulating the glycosylation pathway in bacterial and lower eukaryotes for production of therapeutic proteins. *Current opinion in biotechnology*, 2015, 36: 122-128.
- BAESHEN, Mohammed N., et al. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: current scenario and future perspectives. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2015, 25.7: 953-962.
- BALTZ, Richard H.; DEMAIN, Arnold L.; DAVIES, Julian E. (ed.). Manual of industrial microbiology and biotechnology. *American Society for Microbiology Press*, 2010.
- BANDEHAGH, Ali; KHODADADI, Ehsaneh; NOPARVAR, Pouya M. Production of therapeutic proteins through plant tissue and cell culture. *J. Biosci. Biotechnol*, 2016, 5.1.
- BARRETT, Alan J.; RAWLINGS, Neil D. Families and clans of serine peptidases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1995, 318.2: 247-250.
- BARTA, Andrea, et al. The expression of a nopaline synthase—human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant molecular biology*, 1986, 6.5: 347-357.
- BESSETTE, Paul H., et al. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96.24: 13703-13708.
- BIŁAS, Róża, et al. Cis-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 2016, 127.2: 269-287.
- BORNHORST, Joshua A.; FALKE, Joseph J. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In: *Methods in enzymology*. *Academic Press*, 2000. p. 245-254.
- BURGESS, Richard R.; JENDRISAK, Jerome J. Procedure for the rapid, large-scale purification of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase involving polymin P precipitation and DNA-cellulose chromatography. *Biochemistry*, 1975, 14.21: 4634-4638.
- BUYEL, Johannes Felix; TWYMAN, Richard M.; FISCHER, Rainer. Very-large-scale production of antibodies in plants: the biologization of manufacturing. *Biotechnology Advances*, 2017, 35.4: 458-465.
- CLARK, Eliana De Bernardez; SCHWARZ, Elisabeth; RUDOLPH, Rainer. Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. In: *Methods in enzymology*. *Academic Press*, 1999. p. 217-236.

- CLELAND, Jeffrey L., et al. Polyethylene glycol enhanced protein refolding. *Bio/Technology*, 1992, 10.9: 1013-1019.
- CONCHA, Christopher, et al. Disease prevention: an opportunity to expand edible plant-based vaccines?. *Vaccines*, 2017, 5.2: 14.
- CONTRERAS-GÓMEZ, A., et al. Protein production using the baculovirus-insect cell expression system. *Biotechnology progress*, 2014, 30.1: 1-18.
- COOLBAUGH, M. J.; TANG, MJ Shakalli; WOOD, D. W. High-throughput purification of recombinant proteins using self-cleaving intein tags. *Analytical Biochemistry*, 2017, 516: 65-74.
- CORDOVA, Antoinette, et al. Aminopeptidase P mediated targeting for breast tissue specific conjugate delivery. *Bioconjugate chemistry*, 2016, 27.9: 1981-1990.
- CORNELIS, Pierre. Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Current opinion in biotechnology*, 2000, 11.5: 450-454.
- CORTEZ-SÁNCHEZ, J. Luis, et al. Activity and expression of *Candida glabrata* vacuolar proteases in autophagy-like conditions. *FEMS yeast research*, 2018, 18.2: foy006.
- DARBY, Nigel J.; CREIGHTON, Thomas E. Folding proteins. *Nature*, 1990, 344.6268: 715-716.
- DAVIS, Leonard. Basic methods in molecular biology. *Elsevier*, 2012.
- DIRIENZO, Joseph M.; NAKAMURA, K.; INOUE, Masayori. The outer membrane proteins of Gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions. Annual review of biochemistry, *Annual Reviews*, 1978, 47.1: 481-532.
- DUMONT, Jennifer, et al. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Critical reviews in biotechnology*, 2016, 36.6: 1110-1122.
- DUMONTIER, Rodolphe, et al. Toward future engineering of the N-glycosylation pathways in microalgae for optimizing the production of biopharmaceuticals. *Microalgal Biotechnology*, 2018, 177-193.
- DURINX, Christine, et al. Molecular characterization of dipeptidyl peptidase activity in serum: soluble CD26/dipeptidyl peptidase IV is responsible for the release of X-Pro dipeptides. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267.17: 5608-5613.
- DWIVEDI, K. Expression of recombinant insecticidal protein (code: NBRI 12) as a fusion protein in *E. coli*, its purification, refolding and evaluation of its biological activity. *Council of scientific and industrial research*, 2011, Dissertation Report.

- DYO, Yuliya M.; PURTON, Saul. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology*, 2018, 164.2: 113-121.
- ELLIS, R. John. Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Current opinion in structural biology*, 2001, 11.1: 114-119.
- FELBERBAUM, Rachael S. The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology journal*, 2015, 10.5: 702-714.
- FERRARIS, D.; SHUKLA, K.; TSUKAMOTO, T. Structure-activity relationships of glutamate carboxypeptidase II (GCPII) inhibitors. *Current medicinal chemistry*, 2012, 19.9: 1282-1294.
- FERRER-MIRALLES, Neus, et al. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial cell factories*, 2009, 8.1: 1-8.
- FISCHER, Bernhard, et al. A novel sequential procedure to enhance the renaturation of recombinant protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1992, 5.6: 593-596.
- FISCHER, Rainer, et al. Glyco-engineering of plant-based expression systems. In: *Advances in Glycobiotechnology*. Springer, Cham, 2018. p. 137-166.
- GECHELE, Elisa, et al. A comparative analysis of recombinant protein expression in different biofactories: bacteria, insect cells and plant systems. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2015, 97: e52459.
- GILBERT, Hiram F. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfidebond stability. *Methods in enzymology*, 1995, 251: 8-28.
- GLICK, Bernard R.; PATTEN, Cheryl L. Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA. *John Wiley & Sons*, 2017.
- GOLDBARG, Julius A.; RUTENBURG, Alexander M. The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subjects and patients with cancer and other diseases. *Cancer*, 1958, 11.2: 283-291.
- GULNIK, Sergei V., et al. Utility of (His) 6 tag for purification and refolding of proplasmepsin-2 and mutants with altered activation properties. *Protein expression and purification*, 2002, 24.3: 412-419.
- HAVLIK, David, et al. Establishment of *Neurospora crassa* as a host for heterologous protein production using a human antibody fragment as a model product. *Microbial cell factories*, 2017, 16.1: 1-15.

- HEGYI, György, et al. Introduction to practical biochemistry. *Eötvös Loránd University*, 2013.
- HECHT, Karen A.; O'DONNELL, Allyson F.; BRODSKY, Jeffrey L. The proteolytic landscape of the yeast vacuole. *Cellular logistics*, 2014, 4.1: e28023.
- HEPPEL, Leon A. Selective Release of Enzymes from Bacteria: Treatments affecting the bacterial wall remove certain enzymes and transport factors from living cells. *Science*, 1967, 156.3781: 1451-1455.
- HO, JY Rodney; CHIEN, Jenny. Trends in translational medicine and drug targeting and delivery: new insights on an old concept—targeted drug delivery with antibody–drug conjugates for cancers. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2014, 103.1: 71-77.
- HOCHULI, Erich. Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Genetic Engineering*, 1990, 87-98.
- HOPKINS, T. R. Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. *Bioprocess Technol*, 1991, 12: 57-83.
- HOUDEBINE, Louis-Marie. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2009, 32.2: 107-121.
- CHEN, Rachel. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology advances*, 2012, 30.5: 1102-1107.
- CHURACEK, J. Analytická separace látek. *Analytical Separation of Substances*, 1990, 71.
- JOHNSON, Brian H.; HECHT, Michael H. Recombinant proteins can be isolated from *E. coli* cells by repeated cycles of freezing and thawing. *Bio/Technology*, 1994, 12.12: 1357-1360.
- JOHNSON, Gareth J. Encyclopedia of Analytical Science. *Reference Reviews*, 2005.
- JONES, E. Webb. Biogenesis and function of the yeast vacuole. *Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, 1997, 3: 363-470.
- JOZALA, Angela Faustino, et al. Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *The Brazilian Journal of Microbiology*, 2016, 47: 51-63.
- KABACK, H. R. Bacterial Membranes. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 1971. p. 99-120.

- KHAN, K. Gene expression systems and recombinant protein purification, *Research Journal of Pharmaceutical. Biological and Chemical Sciences*, 2014, 5.6: 450-463.
- KLIONSKY, Daniel J.; HERMAN, Paul K.; EMR, Scott D. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiological reviews*, 1990, 54.3: 266-292.
- KODÍČEK, Milan. Studijní materiály z enzymologie. *VŠCHT v Praze*, 2003.
- KŘUPKA, Michal. Příprava a purifikace rekombinantních proteinů. *Univerzita Palackého Olomouc*, 2011. Dizertační práce.
- KUCHARCZYK, Roza; RYTKA, Joanna. *Saccharomyces cerevisiae*--a model organism for the studies on vacuolar transport. *Acta biochimica polonica*, 2001, 48.4: 1025-1042.
- KUO, Lih-Ying, et al. Overexpression, purification, and characterization of the recombinant leucine aminopeptidase II of *Bacillus stearothermophilus*. *Current microbiology*, 2003, 47.1: 0040-0045.
- LABROU, Nikolaos E. Protein purification: an overview. *Protein Downstream Processing*, 2014, 3-10.
- LE, Le, et al. Vectors for expression of signal peptide-dependent proteins in baculovirus/insect cell systems and their application to expression and purification of the high-affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I in complex with its gamma chain. *Molecular biotechnology*, 2018, 60.1: 31-40.
- LEE, Uisung, et al. Native Chemical Ligation-Based Fluorescent Probes for Cysteine and Aminopeptidase N Using meso-thioester-BODIPY. *Chemistry—A European Journal*, 2021, 27.49: 12545-12551.
- LENNARZ, William J.; LANE, M. Daniel. *Encyclopedia of biological chemistry. Academic Press*, 2013.
- LIU, Boqi, et al. Expression and functional analysis of porcine aminopeptidase N produced in prokaryotic expression system. *Journal of biotechnology*, 2009, 141.1-2: 91-96.
- LOH, Hwei-San; GREEN, Brian J.; YUSIBOV, Vidadi. Using transgenic plants and modified plant viruses for the development of treatments for human diseases. *Current opinion in virology*, 2017, 26: 81-89.
- ŁOJEWSKA, Ewelina, et al. Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 2016, 120: 110-117.

- LONDON, Jacqueline; SKRZYŃIA, Cécile; GOLDBERG, Michel E. Renaturation of *Escherichia coli* tryptophanase after exposure to 8 M urea: evidence for the existence of nucleation centers. *European Journal of Biochemistry*, 1974, 47.2: 409-415.
- MAKSIMENKO, O. G., et al. Use of transgenic animals in biotechnology: prospects and problems. *Acta Naturae (angloязычная версия)*, 2013, 5.1 (16): 33-46.
- MARSTON, Fiona AO; HARTLEY, Donna L. Solubilization of protein aggregates. In: *Methods in enzymology. Academic Press*, 1990. p. 264-276.
- MILDNER, Ana M., et al. The HIV-1 protease as enzyme and substrate: mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable mutant with retained kinetic properties. *Biochemistry*, 1994, 33.32: 9405-9413.
- MORÁVEK, Ondřej. Aminopeptidázy rodiny M28 v patogenních kvasinkách rodu *Candida*. *Univerzita Pardubice*, 2020. Bakalářská práce.
- MOUSTAFA, Khaled; MAKHZOUM, Abdullah; TRÉMOUILLAUX-GUILLER, Jocelyne. Molecular farming on rescue of pharma industry for next generations. *Critical reviews in biotechnology*, 2016, 36.5: 840-850.
- MÜLLER, Martin, et al. The coordinated action of the MVB pathway and autophagy ensures cell survival during starvation. *Elife*, 2015, 4: e07736.
- NARAYAN, Mahesh. Disulfide bonds: protein folding and subcellular protein trafficking. *The FEBS journal*, 2012, 279.13: 2272-2282.
- NGUYEN, Lam H.; JENSEN, Debra B.; BURGESS, Richard R. Overproduction and purification of σ_{32} , the *Escherichia coli* heat shock transcription factor. *Protein expression and purification*, 1993, 4.5: 425-433.
- NIELSEN, Jens. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered*, 2013, 4.4: 207-211.
- NOVÁK VÍT, Produkce rekombinantních proteinů. *DocPlayer* [online], 2016, [cit. 14.4.2022]. Dostupné z: https://docplayer.cz/14002588-Vektor-produkce-rekombinantnich-proteinu-teoreticky-uvod-gen-rekombinantni-dna-hostitelska-bunka-aplikovana-bioinformatika-jaro-2013.html?fbclid=IwAR0MOYe_QaGiNU7LBQoAwvh2PyqgH2GEjw8CDn9T8-tIMFsJxoV3vYBueKM
- OHKUBO, Kimihiro, et al. Aminopeptidase activity in human nasal mucosa. *Journal of allergy and clinical immunology*, 1998, 102.5: 741-750.
- ORSINI, G.; GOLDBERG, M. E. The renaturation of reduced chymotrypsinogen A in guanidine-HCl. Refolding versus aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253.10: 3453-3458.

- OWCZAREK, B.; GERSZBERG, A.; HNATUSZKO-KONKA, K. A brief reminder of systems of production and chromatography-based recovery of recombinant protein biopharmaceuticals. *BioMed research international*, 2019, 2019.
- PARZYCH, Katherine R.; KLIONSKY, Daniel J. Vacuolar hydrolysis and efflux: current knowledge and unanswered questions. *Autophagy*, 2019, 15.2: 212-227.
- PERLER, Francine B., et al. Protein splicing elements: inteins and exteins--a definition of terms and recommended nomenclature. *Nucleic acids research*, 1994, 22.7: 1125.
- PETERNEL, Špela; KOMEL, Radovan. Isolation of biologically active nanomaterial (inclusion bodies) from bacterial cells. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9.1: 1-16.
- PURI, N. K., et al. Solubilization of growth hormone and other recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies by using a cationic surfactant. *Biochemical Journal*, 1992, 285.3: 871-879.
- RAWLINGS, Neil D., et al. MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*, 2014, 42.D1: D503-D509.
- RECH, Elibio, et al. Recombinant proteins in plants. In: BMC Proceedings. *BioMed Central*, 2014. p. 1-2.
- ROSANO, Germán L.; CECCARELLI, Eduardo A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5: 172.
- RUDOLPH, R., et al. Protein Function: A Practical Approach. *A Practical Approach*, 1997.
- SAIBIL, Helen. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14.10: 630-642.
- SANZ, Yolanda; TOLDRÁ, Fidel. Purification and characterization of an arginine aminopeptidase from *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68.4: 1980-1987.
- SARASWAT, Mayank, et al. Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. *BioMed research international*, 2013, 2013.
- SHIRE, Steven J., et al. Purification and immunogenicity of fusion VP1 protein of foot and mouth disease virus. *Biochemistry*, 1984, 23.26: 6474-6480.
- SCHIENE, Cordelia; FISCHER, Gunter. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Current opinion in structural biology*, 2000, 10.1: 40-45.

- SINGH, Anupam, et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microbial cell factories*, 2015, 14.1: 1-10.
- SMITH, B. J. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: *Proteins*. Humana Press, 1984. p. 41-55.
- SPUNGIN, Anya; BLUMBERG, Shmaryahu. *Streptomyces griseus* aminopeptidase is a calcium-activated zinc metalloprotein: Purification and properties of the enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 1989, 183.2: 471-477.
- STARK, George R.; STEIN, William H.; MOORE, Stanford. Reactions of the cyanate present in aqueous urea with amino acids and proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1960, 235.11: 3177-3181.
- ŠLAJSOVÁ, P. Aktivita půdních enzymů v horských smrčínách napadených lýkožroutem smrkovým, *Jihočeská univerzita České Budějovice*, 2011, Diplomová práce.
- TANFORD, Charles. Protein denaturation. *Advances in protein chemistry*, 1968, 23: 121-282.
- TANFORD, Charles. Protein denaturation: Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Advances in protein chemistry*, 1970, 24: 1-95.
- TAUNT, Henry N.; STOFFELS, Laura; PURTON, Saul. Green biologics: The algal chloroplast as a platform for making biopharmaceuticals. *Bioengineered*, 2018, 9.1: 48-54.
- TAYLOR, Allen. Aminopeptidases: structure and function. *The FASEB journal*, 1993, 7.2: 290-298.
- TSUMOTO, Kouhei, et al. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein expression and purification*, 2003, 28.1: 1-8.
- ULTSCH, Mark; DE VOS, Abraham M.; KOSSIAKOFF, Anthony A. Crystals of the complex between human growth hormone and the extracellular domain of its receptor. *Journal of molecular biology*, 1991, 222.4: 865-868.
- VAN DEN HAZEL, H. Bart; KIELLAND-BRANDT, Morten C.; WINTHER, Jakob R. Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast*, 1996, 12.1: 1-16.
- VODRÁŽKA, Zdeněk; JAN, K. Á. Š. a Pavel RAUCH. Enzymologie. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 1998, 171 s.
- WANG, Baoqu, et al. Highly Selective and Sensitive Chemiluminescent Probe for Leucine Aminopeptidase Detection *in Vitro*, *in Vivo* and *in human Liver Cancer Tissue*. *Chemical Science*, 2022.

- WETLAUFER, Donald B. Nonenzymatic formation and isomerization of protein disulfides. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1984. p. 301-304.
- WETLAUFER, Donald B.; BRANCA, Phillip A.; CHEN, Guo-Xian. The oxidative folding of proteins by disulfide plus thiol does not correlate with redox potential. *Protein Engineering, Design and Selection*, 1987, 1.2: 141-146.
- WIKTOREK-SMAGUR, Aneta, et al. Green way of biomedicine—how to force plants to produce new important proteins. *Transgenic Plants-Advances and Limitations*, 2012, 63-90.
- WINGFIELD, P. T., et al. Functional and biophysical characterization of full length, recombinant human TIMP-2 produced in *Escherichia coli*: Comparison of wild type and N-terminal alanine substituted variant. *J. Biol. Chem*, 1999, 274: 21362-21368.
- WINGFIELD, Paul T. Overview of the purification of recombinant proteins. *Current protocols in protein science*, 2015, 80.1: 6.1. 1-6.1. 35.
- WINGFIELD, Paul T., et al. Hepatitis core antigen produced in *Escherichia coli*: subunit composition, conformation analysis, and *in vitro* capsid assembly. *Biochemistry*, 1995, 34.15: 4919-4932.
- WINGFIELD, Paul T., et al. HIV-1 Rev expressed in recombinant *Escherichia coli*: purification, polymerization, and conformational properties. *Biochemistry*, 1991, 30.30: 7527-7534.
- WINGFIELD, Paul T., et al. The extracellular domain of immunodeficiency virus gp41 protein: expression in *Escherichia coli*, purification, and crystallization. *Protein science*, 1997, 6.8: 1653-1660.
- WU, Huina, et al. A new method to evaluate the enzyme-suppressing activity of a leucine aminopeptidase 3 inhibitor. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2019, 13.1: 17-21.
- XU, Jianfeng; ZHANG, Ningning. On the way to commercializing plant cell culture platform for biopharmaceuticals: present status and prospect. *Pharmaceutical bioprocessing*, 2014, 2.6: 499.
- YAN, Na, et al. The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *International journal of molecular sciences*, 2016, 17.6: 962.
- YAO, Jian, et al. Plants as factories for human pharmaceuticals: applications and challenges. *International journal of molecular sciences*, 2015, 16.12: 28549-28565.

- YASUHARA, Toshimasa; NAKAI, Toshiki; OHASHI, Akira. Aminopeptidase Y, a new aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, properties, localization, and processing by protease B. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269.18: 13644-13650.
- ZARDENETA, Gustavo; HOROWITZ, Paul M. Detergent, liposome, and micelle-assisted protein refolding. *Analytical biochemistry*, 1994, 223.1: 1-6.
- ZHAO, Xinyu; LI, Guoshun; LIANG, Shufang. Several affinity tags commonly used in chromatographic purification. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2013, 2013.
- ZUBIETA, Mariane Paludetti, et al. Protein profile in *Aspergillus nidulans* recombinant strains overproducing heterologous enzymes. *Microbial biotechnology*, 2018, 11.2: 346-358.