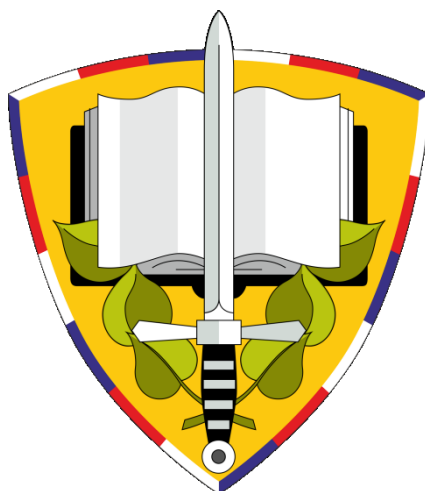


UNIVERZITA OBRANY
FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ

Doktorský studijní program TOXIKOLOGIE



DISERTAČNÍ PRÁCE

Název: Vývoj metod pro testování látek ovlivňujících
CNS

Zpracoval: Mgr. Martina Hrabínová
Školitel: plk. gšt. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2020

Písenné zadání disertační práce

Mgr. Martina HRABINOVÁ

Stanovení tématu disertační práce

Student: **Mgr. Martina HRABINOVÁ**

Stanovené téma disertační práce: Vývoj metod pro testování látek ovlivňujících CNS

Klíčová slova v ČJ (5-10): Neurodegenerativní onemocnění, Alzheimerova choroba, betasekretasa, amyloid beta, inhibitor,

Klíčová slova v AJ (5-10): Neurodegenerative disorders, Alzheimer's disease, beta secretase, beta amyloid, inhibitor

Stručná anotace disertační práce v ČJ (v rozsahu 5 řádků):


Cílem disertační práce bude zavedení jednoduchých biochemických a analytických *in vitro* metod pro vývoj potenciálních léčiv ovlivňujících centrální nervový systém. Práce se bude týkat důležitých markerů (např. betasekretasy, betaamyloidu, cholinesteras) zapojených v patogenezi neurodegenerativních onemocnění nebo využitelných v terapii otrav organofosforovými sloučeninami. Vyvinuté metody budou využity pro screeningové hodnocení látek navržených jako potencionální léčiva těchto nemocí.

Stručná anotace disertační práce v AJ (v rozsahu 5 řádků): The aim of the thesis will be to introduce simple biochemical analysis and *in vitro* methods for the development of potential drugs affecting the central nervous system. The work will cover the important markers (eg. beta secretase, beta amyloid, cholinesterases) involved in the pathogenesis of neurodegenerative diseases or useful in the treatment of poisoning with organophosphorus compounds. Develop methods will be used for screening assessment of substances proposed as potential drugs for these diseases.

Stanovisko oborové rady:

Souhlasím – ~~nesouhlasím~~*/ se stanoveným tématem disertační práce.

18. 11. 2014
.....
datum


.....
předseda oborové rady

Schvaluji.

24. 11. 2014
.....
datum


.....
děkan

Poděkování

Děkuji plk. gšt. doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D. za vedení mé disertační práce, Mgr. Monice Schmidt, Ph.D. za uvedení do problematiky praktické části molekulární biologie, plk. gšt. doc. RNDr. Zuzaně Kročové, Ph.D. za možnost práce na Katedře molekulární patologie a biologie, kolektivu Katedry molekulární patologie a biologie za pomoc, podporu a cenné rady během mé práce na jejich pracovišti, pplk. doc. MUDr. Jaroslavu Pejchalovi Ph.D. et Ph.D a Mgr. Ľubici Múčkové, Ph.D. za cenné rady v průběhu mé disertační práce a též všem kolegům z Katedry toxikologie a vojenské farmacie za pomoc a podporu v průběhu celého doktorského studia na Fakultě vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany.

Děkuji za finanční podporu projektu specifického výzkumu, MŠMT (SV/FVZ201810) a (SV/FVZ201506), projektu DZRO ZHN, Fakulty vojenského zdravotnictví, Univerzity obrany v Brně a interní grantové soutěži FNHK, UHHK, 8117.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala pod vedením školitele samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato disertační práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 21. 12. 2020

Mgr. Martina Hrabínová

.....

Abstrakt a klíčová slova

Stávající disertační práce je zaměřena na produkci tří enzymů beta-sekretasy 1 (BACE1; beta-štěpící enzym APP-1), acetylcholinesterasy (AChE) a butyrylcholinesterasy (BChE). BACE1 je integrální membránový protein, který hraje ústřední roli při štěpení amyloidního prekursorového proteinu. Produkt tohoto procesu je následně štěpen y-sekretasou, přičemž v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou (AD) vznikají amyloid-beta peptidy a nerozpustné amyloidové plaky. Podle výroční zprávy České alzheimerovské společnosti bylo v roce 2019 diagnostikováno 158 000 pacientů s touto nemocí. Předpokládá se, že v roce 2050 dosáhne tento počet hranici 300 000 pacientů. Inhibitory AChE a antagonist N-methyl-D-aspartát receptorů jsou v současné době jedinou alternativou pro terapii AD. Význam AChE spočívá nejen v tom, že je cílovým enzymem při terapii AD, ale je taktéž cílovým proteinem při otravách nervově paralytickými látkami (NPL). Katedra toxikologie a vojenské farmacie je pracovištěm, které se zaměřuje na studium účinku těchto látek a zdravotnické ochrany proti nim. Hodnocení nově syntetizovaných reaktivátorů cholinesteras (ChE) inhibovaných NPL a inhibitorů, jakožto profylaktik při otravách NPL je spojeno s testováním na enzymech AChE a BChE.

Předkládaná práce byla zaměřena na zavedení expresního systému Expi293 pro produkci lidských rekombinantních enzymů: BACE1, AChE a BChE. Pro každý enzym jsou popsány jednotlivé kroky, které jsou potřeba k získání dostatečného množství aktivního proteinu. Jelikož BACE1 je transmembránový protein, bylo u něj nutné provést izolaci z buněk, na rozdíl od ChE, které byly sekretovány do media.

Pro každý exprimovaný enzym byl zaveden jednoduchý purifikační protokol: pomocí kobaltové afinitní chromatografie pro BACE1, Sefarosa4B/prokainamidové pryskyřice pro AChE a Hupresinové pryskyřice pro BChE. Po purifikaci enzymů následovala identifikace proteinů s použitím gelové elektroforézy, pro stanovení přibližné molekulové hmotnosti purifikovaných enzymů. Identita rekombinantního proteinu byla potvrzena western blotem pomocí protilátky anti-His. Obě tyto metody ukázaly proužek maturované BACE1 v pozici ~75 kDa, proužek maturované AChE v pozici ~70 kDa a proužek maturované BChE v pozici ~100 kDa.

U každého enzymu bylo provedeno hodnocení kinetických vlastností stanovením specifické aktivity, hodnoty K_m a IC_{50} pro jejich selektivní inhibitor. Specifická aktivita lidské rekombinantní BACE1 se pohybovala $\sim 120\,000 \pm 4\,000 \text{ RFU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$. Hodnota K_m pro substrát 7-methoxykumarinu-4-acetyl-[Asn670, Lue671]-amyloidu $\beta/A4$ prekursorového proteinu 770 fragmentu 667-676-(2,4-dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amidu trifluorooctové soli nebyla stanovena vzhledem k jeho špatné rozpustnosti. Naměřená hodnota IC_{50} pro verubecestat byla $1,765 \pm 0,036 \text{ nM}$.

Specifická aktivita lidské rekombinantní AChE činila $\sim 20\,000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Hodnota K_m pro substrát ATChI byla $0,288 \pm 0,020 \text{ mM}$. Hodnota IC_{50} pro inhibitor donepezil byla $7,834 \pm 0,054 \text{ nM}$.

Specifická aktivita lidské rekombinantní BChE dosahovala $\sim 50\,000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Hodnota K_m pro substrát BTChI byla $0,256 \pm 0,003 \text{ mM}$. Hodnota IC_{50} pro selektivní inhibitor etopropazin byla $0,477 \pm 0,045 \mu\text{M}$.

Enzymy BACE1 a AChE byly stabilizovány lyofilizací. Enzym BChE vzhledem ke své známe dlouhodobé stabilitě, byl ponechán v 20 mM Tris pufru o pH 7,5. Všechny tyto produkty byly skladovány při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, což zajišťovalo jejich dlouhodobou stabilitu a aktivitu enzymů pro jejich další použití.

Klíčová slova: beta-sekretasa 1, acetylcholinesterasa, butyrylcholinesterasa, Alzheimerova choroba, expresního systém Expi293, produkce proteinů, purifikace, inhibitory

Abstract and keywords

The current thesis aims at the production of three enzymes, including beta-secretase 1 (BACE1; beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1), acetylcholinesterase (AChE), and butyrylcholinesterase (BChE). BACE1 is an integral membrane protein that plays a crucial role in the amyloid precursor protein's cleavage. The product is subsequently processed by γ -secretase, producing amyloid-beta peptides and insoluble amyloid plaques in Alzheimer's patients (AD). According to the Annual Report of the Czech Alzheimer's Society, 158,000 patients were diagnosed in 2019. By 2050, this number is supposed to reach 300,000 patients. AChE inhibitors and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists are currently the only alternatives for AD therapy. AChE is also a target enzyme in nerve agent (NA) poisoning (together with BChE). The Department of Toxicology and Military Pharmacy focuses on studying NA effects and medical protection against them. From this perspective, the production of AChE and BChE is essential for developing and evaluating newly synthesized cholinesterase (ChE) reactivators and inhibitors.

The thesis focuses on introducing the expression system Expi293 to produce human recombinant enzymes BACE1, AChE, and BChE. For each enzyme, the individual steps required to obtain a sufficient amount of active protein are described. Because BACE1 is a transmembrane protein, it was isolated from cells, while ChEs were secreted into the medium.

A simple purification protocol was established for each expressed enzyme, utilizing cobalt affinity chromatography, Sepharose4B/procainamide resins, and Hupressin resins for BACE1, AChE, and BChE, respectively. Purification of the enzymes was followed by protein identification, using gel electrophoresis, to determine the approximate molecular weight of the purified enzymes. Recombinant proteins were subsequently verified by western blotting with an anti-His antibody. Both methods showed a band of mature BACE1 at position ~ 75 kDa, a band of mature AChE at position ~ 70 kDa, and a band of mature BChE at position 100 kDa.

For each enzyme, kinetic properties were determined, including specific activity and K_m and IC_{50} values for their selective inhibitors. The specific activity of human recombinant BACE1 was approximately $120,000 \pm 4,000$ RFU \cdot min $^{-1}\cdot\mu$ g $^{-1}$. The K_m

value of 7-methoxycoumarin-4-acetyl-[Asn670, Leu671]-amyloid β /A4 precursor protein 770 fragment 667-676-(2,4-dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amide trifluoroacetate salt was not determined due to its poor solubility. Verubecestat IC_{50} was 1.765 ± 0.036 nM.

Human recombinant AChE specific activity was $20,000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$. The K_m value of acetylthiocholine was 0.288 ± 0.020 mM. Donepezil IC_{50} was 7.834 ± 0.054 nM.

Human recombinant BChE specific activity was $50,000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$. The K_m value for the butyrylthiocholine was 0.256 ± 0.003 mM. The IC_{50} value for the selective inhibitor ethopropazine was 0.477 ± 0.045 μM .

Both BACE1 and AChE were stabilized by lyophilization. Due to its known long-term stability, BChE was dissolved in 20 mM Tris buffer pH 7.5. All enzymes were stored at -80 °C, which ensured their long-term stability and activity for their further use.

Keywords: beta-secretase 1, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, Alzheimer's disease, Expi293 expression system, protein production, purification, inhibitors

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	15
Seznam obrázků.....	19
Seznam tabulek	21
1. Úvod.....	23
1.1 Alzheimerova choroba.....	24
1.1.1 Amyloidní teorie.....	26
1.1.1.1 BACE	28
1.1.1.2 BACE1 struktura a lokalizace	29
1.1.1.3 Syntéza a degradace BACE1	29
1.1.1.4 Inhibitory BACE1	32
1.1.2 Cholinergní teorie.....	34
1.1.2.1 Acetylcholinesterasa.....	35
1.1.2.2 Inhibitory AChE	37
1.1.2.3 Butyrylcholinesterasa	38
1.1.3 Význam AChE a BChE ve vojenství.....	40
1.2 Produkce rekombinantních proteinů.....	43
1.2.1 Rekombinantní proteiny	43
1.2.2 Expresní systémy.....	44
1.2.2.1 Bakteriální systémy	44
1.2.2.2 Kvasinkové systémy.....	45
1.2.2.3 Houbové systémy	45
1.2.2.4 Další expresní systémy.....	45
1.2.2.5 Hmyzí systémy	46
1.2.2.6 Savčí systémy	46

2.	Cíl práce	48
3.	Materiál metodika	49
3.1	Chemikálie a kity	49
3.1.1	Chemikálie.....	49
3.1.2	Kity	50
3.2	Biologický materiál.....	50
3.2.1	Gen	50
3.2.2	Primery	50
3.2.3	Buňky a enzymy	50
3.3	Sterilní plast a spotřební materiál	50
3.4	Instrumentace.....	51
3.5	Vypracování metodické práce	52
3.6	Produkce lidské rekombinantní BACE1 v Expi293F buňkách	52
3.6.1	Amplifikace genu BACE1	52
3.6.1.1	Gen	52
3.6.1.2	Amplifikace DNA	53
3.6.1.3	Izolace amplifikované DNA.....	56
3.6.1.4	Topoklonování.....	57
3.6.1.5	Izolace pozitivních kolonií	58
3.6.1.6	Izolace plazmidové DNA	59
3.6.1.7	Produkce plazmidové DNA pro expresi	60
3.6.2	Kultivace a pasážování buněk	60
3.6.3	Exprese lidské rekombinantní BACE1	61
3.6.4	Izolace lidské rekombinantní BACE1	62
3.6.4.1	Izolace BACE1- fragment 1 - 501 AMK.....	62

3.6.4.2	Izolace BACE1 fragmentu 22 - 501 AMK, 46 - 501 AMK, 22 - 454 AMK, 46 - 454 AMK, 22 - 454 AMK + sekreční signál a 46 - 454 AMK + sekreční signál.....	62
3.6.4.3	Stanovení koncentrace proteinu.....	63
3.6.5	Purifikace lidské rekombinantní BACE1	63
3.6.6	Analýza proteinů gelovou elektroforézou a western blot.....	64
3.6.6.1	Gelová elektroforéza.....	64
3.6.6.2	Western blot.....	67
3.6.7	Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní BACE1	68
3.6.7.1	Stanovení aktivity	68
3.6.7.2	Stanovení IC ₅₀ standardního inhibitoru BACE1	69
3.7	Produkce lidské rekombinantní AChE v Expi293F buňkách	69
3.7.1	Amplifikace genu AChE	69
3.7.1.1	Gen ACHE.....	69
3.7.1.1	Amplifikace AChE	70
3.7.2	Exprese lidské rekombinantní AChE	71
3.7.3	Purifikace lidské rekombinantní AChE.....	71
3.7.4	Analýza proteinů gelovou elektroforézou a western blot.....	72
3.7.5	Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní AChE	72
3.7.5.1	Princip Ellmanovy metody	72
3.7.5.2	Stanovení aktivity	73
3.7.5.3	Stanovení Michaelisovy konstanty	74
3.7.5.4	Stanovení IC ₅₀ standardního inhibitoru AChE	74
3.8	Produkce lidské rekombinantní BChE v Expi293F buňkách	74
3.8.1	Amplifikace genu BCHE.....	74
3.8.1.1	Gen BCHE	74

3.8.1.2	Amplifikace BChE	75
3.8.2	Expres lidské rekombinantní BChE.....	76
3.8.3	Purifikace lidské rekombinantní BChE	76
3.8.4	Analýza proteinů gelovou elektroforézou a western blot.....	76
3.8.5	Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní BChE	76
3.8.5.1	Stanovení aktivity	76
3.8.5.2	Stanovení Michaelisovy konstanty	77
3.8.5.3	Stanovení IC ₅₀ standardního inhibitoru BChE	77
4.	Výsledky	78
4.1	Produkce lidské rekombinantní BACE1 v Expi293F buňkách	78
4.1.1	BACE1 fragment 1-501 AMK	78
4.1.1.1	Amplifikace metodou PCR.....	78
4.1.1.2	PCR na koloniích.....	79
4.1.1.3	Stanovení koncentrace plazmidové DNA.....	80
4.1.1.4	Kultivace a pasážování buněk	80
4.1.1.5	Expres lidské rekombinantní BACE1	81
4.1.1.6	Izolace lidské rekombinantní BACE1	82
4.1.1.7	Purifikace lidské rekombinantní BACE1	84
4.1.1.8	SDS a western blot	84
4.1.2	Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní BACE1	85
4.1.2.1	Specifická aktivita	85
4.1.2.2	IC ₅₀ verubecestatu.....	86
4.1.3	Produkce BACE1 fragmentu 22-501 AMK, 46-501 AMK, 22-454 AMK, 46-454 AMK, 22-454 AMK + sekreční signál, 46-454 AMK + sekreční signál	87
4.2	Produkce lidské rekombinantní AChE v Expi293F buňkách	89

4.2.1	Amplifikace metodou PCR.....	89
4.2.1.1	PCR na koloniích.....	90
4.2.1.2	Stanovení koncentrace plazmidové DNA.....	91
4.2.2	Kultivace a pasážování buněk	91
4.2.3	Expres lidské rekombinantní AChE	91
4.2.4	Purifikace lidské rekombinantní AChE.....	92
4.2.5	SDS-PAGE a western blot.....	93
4.2.6	Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní AChE	94
4.2.6.1	Specifická aktivita	94
4.2.6.2	Michaelisova konstanta	94
4.2.6.3	IC ₅₀ donepezilu.....	95
4.3	Produkce lidské rekombinantní BChE v Expi293F buňkách	96
4.3.1	Amplifikace metodou PCR.....	96
4.3.1.1	PCR na koloniích.....	97
4.3.1.2	Stanovení koncentrace plazmidové DNA.....	97
4.3.2	Kultivace a pasážování buněk	97
4.3.3	Expres lidské rekombinantní BChE.....	98
4.3.4	Purifikace lidské rekombinantní BChE	98
4.3.5	SDS-PAGE a western blot.....	99
4.3.6	Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní BChE	100
4.3.6.1	Specifická aktivita	100
4.3.6.2	Michaelisova konstanta	100
4.3.6.3	IC ₅₀ etopropazinu.....	101
5.	Diskuze.....	103
5.1	Produkce lidské rekombinantní BACE1	103

5.2	Produkce lidských rekombinantních ChE.....	107
6.	Přínos práce.....	114
7.	Závěr	115
8.	Seznam použité literatury.....	116
	Seznam příloh.....	142
	Přílohy	143

Seznam použitých zkratk

Å	angstrom
ABAD	amyloid vázající alkoholdehydrogenasa
AD	Alzheimerova choroba
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AICD	intracelulární doména amyloidového prekurzorového proteinu
Ala	alanin
AMK	aminokyselina
APP	amyloidový prekurzorový protein
APH-1	anterior pharynx-defective 1
ApoE	apolipoprotein E
APS	peroxodisíran amonný
ATChI	acetylthiocholin jodid
AV ČR	Akademie věd České republiky
Asn	asparagin
BACE1	beta-sekretasa 1
BACE2	beta-sekretasa 2
BCA	bicinchoninová kyselina
BChE	butyrylcholinesterasa
bp	pár bází
BTChI	butyrylthiocholin jodid
BSA	hovězí sérový albumin
C-24	uhlík 24
CD	cytosolická doména

CNS	centrální nervová soustava
CO ₂	oxid uhličitý
Co-IMAC	kobalt-imobilizovaná karboxymethylasparátová pryskyřice
CTFβ	membránový C-koncový fragment
Cys	cystein
ČR	Česká republika
DMB	dekametonium bromid
DMSO	dimetylsulfoxid
DTNB	5,5'-dithiobis-2- nitrobenzoová kyselina
EC	Enzyme Commision
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	endoplazmatické retikulum
FP	fosfátový pufr
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
FVZ UO	Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany
GA	Golgiho aparát
GGA	ADP-ribosylační faktor vázající proteiny
Glu	kyselina glutamová
GSK-3β	glykogen syntasa kinasa 3β
HEB	hematoencefalická bariera
His	histidin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát hydrát
ChE	cholinesterasa
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru, při níž aktivita enzymu klesne na 50 % původní aktivity
KH ₂ PO ₄	dihydrogen fosforečnan draselný

KaD	katalytická doména
kDa	kilodalton
K_i	inhibiční konstanta
K_m	Michaelisova konstanta
KTVF	Katedra toxikologie a vojenské farmacie
LB	Luria Broth
Leu	leucin
Lys	lysin
MeOH	metanol
Met	methionin
NaCl	chlorid sodný
NaF	fluorid sodný
Na_2HPO_4	hydrogen fosforečnan sodný
NMND	antagonista N-methyl-D-aspartat
Ni-NTA	nikl-nitriltriocetová kyselina
NPL	nervově paralytická látka
PCR	polymerázová řetězová reakce
PD	prodoména
Phe	fenylalanin
PEN-2	presenilinový zesilovač 2
PRiMA	proline-rich membrane anchor
PX	phox doména
RPM	otáčky za minutu
RTG	rentgenologická (kazeta)
RTN	retikulony/Nogo proteiny

TBS	solný tris pufr
TNB	5-merkapt-2-nitrobenzoový aniont
TD	transmembránová doména
Thr	threonin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametyletan-1,2-diamin
TMACl	tetrametylamonium chlorid
TMAI	tetrametylamonium jodid
Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
V_{\max}	maximální rychlost reakce
Val	valin
Ser	serin
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s přidavkem SDS
SOC	Super Optimal Broth
SNX	sortující nexiny
SP	signální peptid

Seznam obrázků

Obrázek 1 – Štěpení amyloidového prekurzorového proteinu.....	27
Obrázek 2 – Strukturní složení BACE1	29
Obrázek 3 – Cesta syntézy BACE1.....	31
Obrázek 4 – Kavita AChE obsahující periferní anionické místo (PAS), katalytické anionické místo (CAS), acylovou kapsu a katalytickou triádu.....	37
Obrázek 5 – Kavita BChE obsahující periferní anionické místo (PAS), vazebné místo pro cholin, oxianionickou prohlubeň, acylovou kapsu a katalytickou triádu	40
Obrázek 6 – Sekvence BACE1 v délce 501 AMK a molekulové hmotnosti 55,764 kDa (převzato z databáze UniProt Knowledgebase)	53
Obrázek 7 – Sekvence AChE v délce 614 AMK a molekulové hmotnosti 67,796 kDa (převzato z databáze UniProt Knowledgebase) . Chyba! Záložka není definována.	
Obrázek 8 – Rozštěpení ATChI acetylcholinesterasou.....	72
Obrázek 9 – Redukce S-S můstku a vazba thiocholinu na DTNB.....	73
Obrázek 10 – Konjugace dvojných vazeb kyseliny 5-merkapt-2-nitrobenzoové ..	73
Obrázek 11 – Sekvence BChE v délce 602 AMK a molekulové hmotnosti 68,418 kDa (převzato z databáze UniProt Knowledgebase)	75
Obrázek 12 – Agarózová elektroforéza amplifikované cílové DNA	78
Obrázek 13 – PCR na koloniích: Identifikace plazmidové DNA po transformaci do chemicky kompetentních buněk <i>E. coli</i> TOP10,	79
Obrázek 14 – Western blot analýza pomocí protilátky - izolace BACE1 pomocí detergentů.....	83
Obrázek 15 – SDS-PAGE a western blot purifikované BACE1	84
Obrázek 16 – Sken excitačního spektra BACE1.	85
Obrázek 17 – Sken emisního spektra BACE1	86
Obrázek 18 – Inhibiční účinek různých koncentrací verubecestatu na BACE1	87

Obrázek 19 – Western blot analýza za použití protilátky proti histidinové kotvě: ..	88
Obrázek 20 – Western blot analýza za použití protilátky proti histidinové kotvě: M - hmotnostní marker, identifikace produkce BACE1 (46-501 AMK) po 96-168 hodinách	88
Obrázek 21 – Western blot analýza za použití protilátky proti histidinové kotvě: ..	89
Obrázek 22 – Agarózová elektroforéza amplifikované cílové DNA	90
Obrázek 23 – PCR na koloniích: Identifikace plazmidové DNA po transformaci do chemicky kompetentních buněk <i>E. coli</i> TOP10	91
Obrázek 24 – SDS-PAGE a western blot purifikované AChE	94
Obrázek 25 – Zobrazení průběhu inhibice lidské rekombinantní AChE nadbytkem ATChI.	95
Obrázek 26 – Inhibiční účinek různých koncentrací donepezilu vůči AChE	96
Obrázek 27 – Agarózová elektroforéza amplifikované cílové DNA	96
Obrázek 28 – PCR na koloniích: Identifikace požadované plazmidové DNA po transformaci do chemicky kompetentních buněk <i>E. coli</i> TOP10.	97
Obrázek 29 – SDS-PAGE a western blot purifikované BChE.....	100
Obrázek 30 – Zobrazení průběhu inhibice lidské rekombinantní BChE nadbytkem BTChI.	101
Obrázek 31 – Inhibiční účinek různých koncentrací etopropazinu na BChE	102

Seznam tabulek

Tabulka 1 – II/III fáze klinické studie BACE1 inhibitorů	33
Tabulka 2 – Dávky inhibitorů ve II. a III. fázi klinického testování.....	33
Tabulka 3 – Výhody a nevýhody expresních systémů	47
Tabulka 4 – Sekvence primerů.....	54
Tabulka 5 – Složení PCR reakce.....	55
Tabulka 6 – Průběh amplifikační PCR reakce	56
Tabulka 7 – Ligační směs.....	57
Tabulka 8 – Složení topoklonovací směsi.....	57
Tabulka 9 – Složení PCR reakce na koloniích.....	58
Tabulka 10 – Průběh PCR na koloniích	59
Tabulka 11 – Složení 12% separačního gelu (pro dva mini gely)	64
Tabulka 12 – Složení 4% zaostřovacího gelu (pro dva mini gely)	65
Tabulka 13 – Složení vzorkového pufru	65
Tabulka 14 – Složení elektrodového pufru	66
Tabulka 15 – Složení roztoku pro modření gelů	66
Tabulka 16 – Složení odbarvovacího roztoku.....	66
Tabulka 17 – Složení transfer pufru	67
Tabulka 18 – Složení základního 10× koncentrovaného TBS pufru o pH 7,6 pro Western blot.....	68
Tabulka 19 – Sekvence primerů.....	70
Tabulka 20 – Složení elučního roztoku.....	72
Tabulka 21 – Sekvence primerů.....	75
Tabulka 22 – Složení elučního roztoku.....	76
Tabulka 23 – Schéma pasážování buněk Expi293F	80

Tabulka 24 – Produkce proteinu v buňkách po jednotlivých dnech po transfekci ..	81
Tabulka 25 – Složení roztoků pro izolaci BACE1 z buněk	82
Tabulka 26 – Ukázka zvyšující se aktivity AChE monitorující produkci proteinu sekretujícího se do média.....	92
Tabulka 27 – Ukázka změny aktivity enzymu v souvislosti s jednotlivými kroky purifikace	93
Tabulka 28 – Ukázka zvyšující se aktivity BChE monitorující produkci proteinu sekretujícího se do média.....	98
Tabulka 29 – Ukázka změny aktivity proteinu v souvislosti s jednotlivými kroky purifikace	99

1. Úvod

Předkládaná disertační práce se zabývá produkcí lidských rekombinantních enzymů, a to betasekretasy (BACE1, EC 3.4.23.46), acetylcholinesterasy (AChE, EC 3.1.1.7) a butyrylcholinesterasy (BChE, EC 3.1.1.8). Tyto rekombinantní proteiny je možné produkovat v prokaryotních nebo v eukaryotních buňkách. Oba tyto systémy mají své klady a zápory. Je proto důležité vybrat vhodný expresní systém, aby vyprodukovaný enzym byl vyhovující pro jeho další využití. Z důvodu předpokládaného stabilního výtěžku enzymu o vysoké aktivitě byl zvolen lidský expresní systém Expi293. Tento systém zároveň zajišťuje posttranslační modifikace proteinu, které jsou zárukou dostatečné aktivity enzymu.

BACE1 je důležitým markerem v patofyziologii Alzheimerovy nemoci (AD). Současná terapie AD je zaměřená pouze na léčbu inhibitory AChE a antagonistu N-methyl-D-aspartát (NMDA) receptorů (Sharma 2019; Gauthier et al. 2006). Jelikož se jedná o multifaktoriální onemocnění, je vhodné testovat nové inhibitory na další možné proteiny zapojené v patologii AD, ke kterým je možné zařadit právě BACE1. Získání aktivního enzymu umožňuje rozšířit portfolio našich biochemických metod pro screening látek určených k terapii AD. Komerčně dodávaná lidská rekombinantní BACE1 je totiž velice nestabilní a její aktivita není zpravidla výrobcí zaručena.

Katedra toxikologie a vojenské farmacie (KTVF) je rovněž jedinečným pracovištěm jak v armádě České republiky (ČR), tak i v celé ČR, které se zaměřuje na studium účinku různých toxických látek včetně nervově paralytických látek (NPL) a zdravotnické ochraně proti nim. Hodnocení nově syntetizovaných reaktivátorů NPL a inhibitorů, jakožto profylaktik při otravách NPL je tak vždy spojeno s testováním na enzymech AChE a BChE. Časté výpadky v dodávkách těchto enzymů komerčními dodavateli vedly k produkci AChE a BChE z lidské krve. Tato produkce je relativně jednoduchá a poskytuje dostatečné množství cholinesteras (ChE) pro hodnocení látek modifikovanou Ellmanovou metodou (Ellman et al. 1961). Aktivita a množství enzymů nicméně není dostačující pro jejich využití s dalšími fyzikálně-chemickými metodami, využívanými v experimentální práci. Zavedení rychlé a jednoduché produkce lidské rekombinantní AChE a BChE v dostatečné množství, vysoké aktivitě a čistotě nahradí produkci těchto enzymů z lidské krve a poskytne nové možnosti při hodnocení látek na naší katedře jak *in vitro*, tak *in vivo* metodami.

1.1 Alzheimerova choroba

AD je multifaktoriální, chronické onemocnění, které je charakterizováno progresivním snížením kognitivních funkcí, abnormalitami ve vyjadřování, změnou sociálního chování a postupnou ztrátou paměti. Osoba v pokročilém stadiu nemoci ztrácí schopnost komunikace či rozpoznávání svých nejbližších osob a okolí. Pacienti většinou umírají v důsledku sekundárních infekcí kolem 10. roku od začátku prvních příznaků onemocnění (tzv. sporadická AD). Sporadická forma AD je dnes nejčastější příčinou demence středního a vyššího věku (Bature et al. 2017). Vzhledem k neustálému zvyšování věku obyvatelstva se tak stává celosvětovým socioekonomickým a zdravotnickým problémem (Marešová et al. 2015). Etiopatogeneze AD není stále zcela jasná. Existuje však několik hypotéz o vzniku této nemoci. Ty, které jsou nejvíce v pozornosti vědecké obce, patří hypotézy zahrnující proteiny tau, glykogen syntasu kinasu 3β (GSK- 3β), a dále cholesterolová, mitochondriální, amyloidní a cholinergní hypotéza.

Tau hypotéza je založena na hromadění špatně rozpustných hyperfosforylovaných izoform tau proteinu uvnitř mozkových buněk. Tento protein se nachází v hojném množství v axonech neuronů, interaguje s tubulinem a stabilizuje mikrotubuly. Jeho funkce je regulována hlavně fosforylací. Za patologického stavu dochází k vyvázání tau proteinu z povrchu mikrotubul a následnému rozpadu cytoskeletu. Tím je porušena funkce mikrotubulů sloužících k transportu látek uvnitř buněk. Nedochází tak k axonálnímu transportu, což přispívá k postupné neurodegeneraci (Yates a McLoughlin 2008; Barbier et al. 2019). Bylo potvrzeno, že zvýšená aktivita GSK- 3β je zodpovědná za hyperfosforylaci tau proteinu. Postupným zkoumáním bylo pozorováno, že GSK- 3β potencuje zvýšenou produkci β -amyloidu ($A\beta$) a tím zánětlivou odpověď. Tento enzym je navíc klíčovým mediátorem apoptózy, a může tak přímo přispívat ke ztrátě neuronů při AD. Toto zjištění vedlo k vytvoření samostatné hypotézy o zapojení GSK- 3β v AD (Beurel et al. 2015; Muyllaert et al. 2008).

Vysoká hladina cholesterolu v druhé polovině života představuje zvýšené riziko pro vznik AD. Cholesterolová hypotéza je spojena s mutací v genu CYP46, který kóduje cholesterol 24-hydroxylasu (EC 1.14.13.98). Tento enzym hraje hlavní úlohu v homeostáze cholesterolu v mozku, kde katalyzuje hydroxylaci na C-24 cholesterolu, což vyvolává difúzi cholesterolu z neuronů a jeho další degradaci. Patologická vysoká

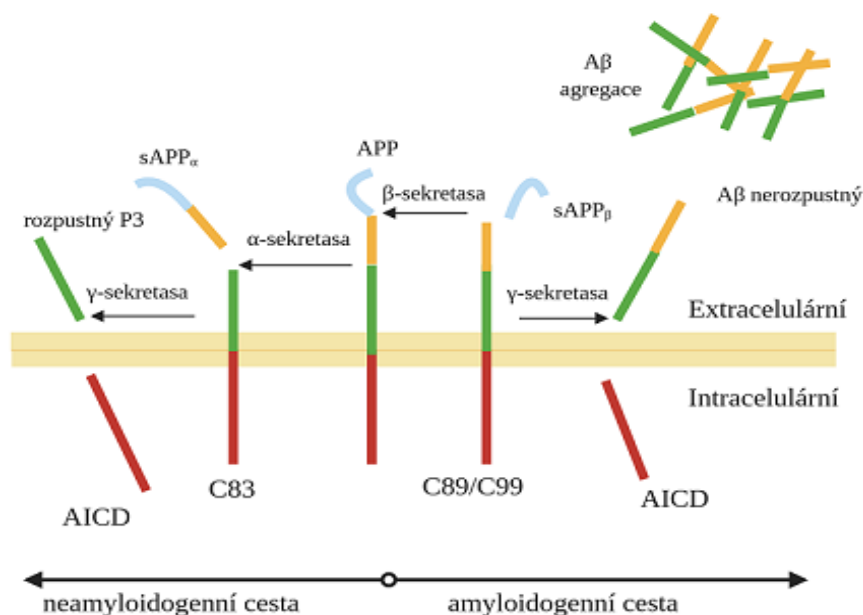
hladina cholesterolu v druhé polovině života představuje riziko pro vznik AD (Sjögren a Blennow 2005; Lund et al. 1999). Součástí nejdůležitějšího transportního mechanismu cholesterolu a fosfolipidů v mozkomíšním moku je apolipoprotein E (ApoE). Tento protein je rovněž zodpovědný za udržování strukturální integrity mikrotubulů cytoskeletálního systému neuronů (Liu et al. 2013). Byly identifikovány tři alely genu pro ApoE na 19. chromosomu: epsilon2 ($\epsilon 2$), epsilon3 ($\epsilon 3$) a epsilon4 ($\epsilon 4$) kódující tři izoformy lipoproteinu: ApoE- $\epsilon 2$, ApoE- $\epsilon 3$ a ApoE- $\epsilon 4$. Ačkoliv se jednotlivé alely liší pouze ve dvou aminokyselinách (AMK) v pozici 112 a 158, tak tyto drobné rozdíly mění jejich strukturu a funkci. Alela $\epsilon 4$ bývá často spojená s familiární hypercholesterolemií, bylo však potvrzeno riziko i pro cerebrální amyloidní angiopatii. Dědičný výskyt alely $\epsilon 4$ významně zvyšuje pravděpodobnost AD v mladším věku. ApoE- $\epsilon 4$ představuje zvýšené riziko AD, přičemž jedna kopie zvyšuje riziko přibližně 4krát, zatímco dvě kopie přibližně 15krát ve srovnání s těmi, které mají alelu ApoE- $\epsilon 3$ (Yamazaki et al. 2019; Kloske a Wilcock 2020).

Existuje mnoho důkazů, které potvrdily, že mitochondrie jsou hlavním místem toxicity intracelulárního A β . Vazba A β na mitochondriální enzym amyloid vázající alkoholdehydrogenasa (ABAD, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenasa typu 10), který je jako multifunkční protein zapojený v mnoha enzymatických a strukturních procesech v mitochondriích, poškozuje zatím ne zcela známým mechanismem tyto buněčné struktury. Vazba A β způsobí poškození dýchacího řetězce, snížení membránového potenciálu, únik cytochromu C, zvýšenou tvorbu mitochondriálního permeabilního tranzitního kanálu a zvýšenou tvorbu volných radikálů, což v konečném důsledku vede až k zániku buňky. Předpokládá se, že ABAD je zapojený nejen do AD, ale též do dalších neurologických onemocnění např. mentální retardace a Parkinsonovy choroby, u nichž bylo prokázáno, že interagují s A β (Schmidt et al. 2020; Benek et al. 2012).

Dalšími významnými teoriemi rozvoje AD, jejichž enzymy se zabývá tato práce, jsou amyloidní a cholinergní hypotéza. Amyloidní hypotéza je založená na vzniku nerozpustných plaků v mozku, které jsou tvořeny A β . (Sathya et al. 2012; Selkoe a Hardy 2016). Cholinergní teorie je spojena s deficitem neurotransmiteru acetylcholinu (ACh) (Francis et al. 1999; Ferreira-Vieira et al. 2016).

1.1.1 Amyloidní teorie

A β vzniká štěpením amyloidového prekurzorového proteinu (APP) (Cole a Vassar 2008; Decourt a Sabbagh 2011). Bylo popsáno celkem 6 různých sekretas štěpících APP: α -, β -, δ -, γ -, η - a θ -sekretasa a meprin β (Norstrom 2017). Za fyziologických podmínek je APP štěpeno α -sekretasou, za vzniku rozpustného N-terminálního fragmentu (sAPP α) a α -karboxylového koncového fragmentu C83. C83 může být dále štěpen γ -sekretasou za vzniku krátkého rozpustného fragmentu P3 a intracelulární domény amyloidového prekurzorového proteinu (AICD) (Vardy et al. 2005). Za fyziologických podmínek je v menším rozsahu štěpen také prostřednictvím BACE1 v místě Glu₁₁, kde výsledkem je vznik neamyloidního fragmentu C89. Za patologických podmínek je však APP štěpen enzymy BACE1 a γ -sekretasou ve vyšším rozsahu. BACE1 navíc štěpí APP v místě Asn₁ a dochází tak ke vzniku ~100 kDa velkého rozpustného N-terminálního fragmentu (APPs β) a 12 kDa membránového C-koncového fragmentu (CTF β) o délce 99 AMK (C99). Oba fragmenty C89 nebo C99 pak mohou být štěpeny γ -sekretasou (Deng et al. 2013b). Enzym γ -sekretasa je komplex, který se skládá ze čtyř komponentů: presenilinů (PS1, PS2), presenilinového zesilovače 2 (PEN-2), *anterior pharynx-defective 1* (APH-1) a nicastrinu (Zhang et al. 2014; Lu et al. 2014). Štěpením C99 řetězce vznikají různě velké fragmenty A β o délce 37 až 49 AMK. Agregovaný amyloid je většinou složen z fragmentů o délce 40 a 42 AMK (A β ₁₋₄₀/A β ₁₋₄₂), z nichž A β ₁₋₄₂ je klíčovým fragmentem v patogenezi AD. Druhý fragment A β ₁₋₄₀ má mnohem nižší schopnost agregace a je méně neurotoxický než A β ₁₋₄₂. Patologický A β se hromadí v extracelulárním prostoru mozku v okolí neuronů ve formě amyloidních plaků (Obrázek 1). Tyto plaky mají vliv na vznik zánětu a vývoj AD (Morimoto et al. 2004; Somavarapu a Kepp 2017).



Obrázek 1 – Štěpení amyloidového prekurzorového proteinu

Neamyloidogenní cesta: Proteolytické štěpení α - a γ -sekretasou nevede ke vzniku $A\beta$. Tato cesta je iniciována α -sekretasou, která produkuje solubilní N-terminální fragmenty amyloidového prekurzorového proteinu ($sAPP\alpha$) a α -C-terminální fragment C83. Ten je pak podroben dalšímu štěpení γ -sekretasou za vzniku fragmentu P3 a APP intracelulární domény (AICD).

Amyloidogenní cesta: Postupné proteolytické štěpení APP β - a γ -sekretasou vede ke vzniku $A\beta$. β -sekretasa produkuje $sAPP\beta$ a β -C-terminální fragment C99. Tento fragment je dále štěpen γ -sekretasou za vzniku $A\beta$ a fragmentu AICD.

Mimo sporadické formy AD existuje několik variant familiární formy AD, které se projevují již v raném věku u asi 5 % nemocných AD. Tato forma obvykle zasahuje skupinu lidí ve věku od 30 do 60 let a je spojená s polymorfismy na chromozomech. Přítomnost mutace mnohonásobně zvyšuje schopnost BACE1 štěpit řetězec APP v místě Asp₁, což způsobuje nárůst patologického $A\beta$. K těmto mutacím je možné zařadit:

- mutace genu pro APP na 21. chromozomu (Cheon et al. 2008),
- mutace genu pro ApoE-ε4 na 19. chromozomu (Safieh et al. 2019),
- defekt v genu pro membránový protein PS1 na 14. chromozomu (Sun et al. 2005),
- defekt v genu pro membránový protein PS2 na 1. chromozomu (Cai et al. 2015).

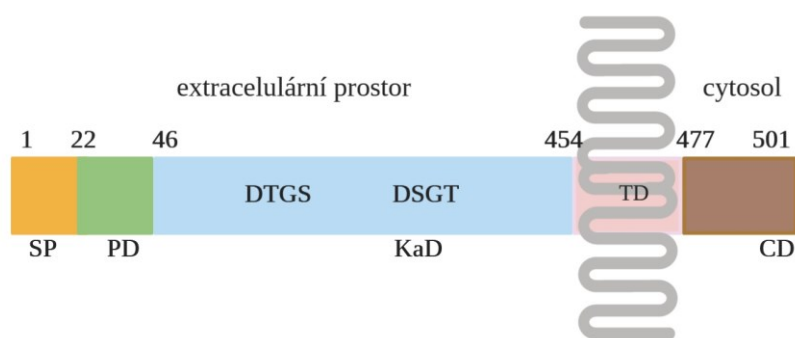
Bylo popsáno celkem 24 genetických mutací a duplikací v genu pro APP vedoucí ke změnám ve složení AMK řetězce. Jejich pojmenování často souvisí s etnikem, v němž byly poprvé popsány (například francouzská, holandská, japonská, švédská varianta) a jsou přímo spojeny s patogenezí AD (Tanzi 2012). Nejznámější z nich, švédská varianta (K595N/M596L), obsahuje dvojitou záměnu AMK: Lys₅₉₅ za Asn₅₉₅ a Met₅₉₆ za Leu₅₉₆. Poprvé byla tato varianta APP diagnostikována u dvou rodin, které byly spolu genealogicky propojené. Tato záměna je zodpovědná za 3- až 6krát vyšší produkci Aβ (Haass et al. 1995; Mullan et al. 1992; Zhang et al. 2017; Shin et al. 2010). Naproti tomu tzv. islandská mutace (A673T), u které je Ala v pozici 673 nahrazen Thr, chrání před pozdní formou AD, jelikož BACE1 má 50× nižší afinitu štěpit APP v pozici Thr než v místě Ala (Jonsson et al. 2012; Maloney et al. 2014).

1.1.1.1 BACE

BACE existuje ve dvou formách, BACE1 je složena z 501 AMK, zatímco BACE2 (EC 3.4.23.45) tvoří 518 AMK. Obě formy vykazují přibližně 75% homologii. BACE1 byla objevena v roce 1991 nezávisle pěti výzkumnými skupinami, které shodně popsaly objev nové integrální membránově vázané aspartylové proteasy (Hussain et al. 1999; Sinha et al. 1999; Vassar et al. 1999; Yan et al. 1999; Lin et al. 2000). Maturovaná BACE1, jež má schopnost štěpit APP, byla nalezena na povrchu buněk a v endosomech (Huse et al. 2000). Stále není zřejmé, ve kterém subcelulárním kompartmentu dochází ke štěpení APP vedoucí k produkci Aβ. Taktéž role BACE2 v organismu není stále jasně definována. Výsledky biochemických a morfologických analýz ukazují na roli BACE2 v regulaci glukózového metabolismu, stejně tak jako na amyloidní roli BACE2 v pigmentových buňkách (Barão et al. 2016).

1.1.1.2 BACE1 struktura a lokalizace

BACE1 je ~75 kDa velký integrální membránový protein, který je kódován na chromozomu 11 v pozici 11q23.2–11q23.3. BACE1 je aktivní v acidických intracelulárních kompartmentech, například v endosomech, trans části Golgiho aparátu (GA), kde je nízké pH. Nachází se v mnoha tkáních, nejvíce v mozku a slinivce (Murphy a LeVine 2010; Vassar et al. 1999). Nejvyšší exprese enzymu v mozku byla nalezena v *substantia nigra*, *locus coruleus* a *medulla oblongata* (Christensen et al. 2004; Cole a Vassar 2007). BACE1 se skládá z N-koncového signálního peptidu (SP, 1-21 AMK), následuje prodoména (PD, 22-45 AMK) a katalytická doména (KaD, 46-460 AMK). Tato doména má dvě aktivní místa charakteristická pro aspartylové proteasy DTGS (D-kyselina asparagová, T – threonin, G – glycin, S – serin, 93-96 AMK) a DSGT (289-292 AMK). Obě místa jsou důležitá pro aktivitu enzymu, a pokud jsou tato místa zaměněna, enzym je neaktivní (Kandalepas a Vassar 2014; Vassar 2004). Blízko C-konce enzymu je transmembránová doména (TD, 461-477 AMK). Enzym je zakončen krátkou cytosolickou doménou (CD, 478-501 AMK, Obrázek 2) (Koelsch 2017).



Obrázek 2 – Strukturní složení BACE1

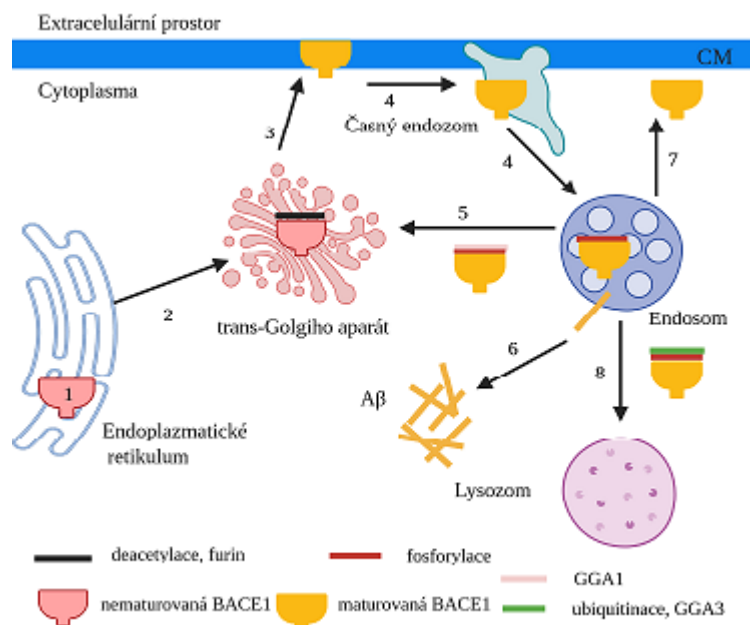
SP - signální peptid, PD - prodoména,

KaD - katalytická doména, TD - transmembránová doména, CD - cytosolická doména

1.1.1.3 Syntéza a degradace BACE1

Enzym BACE1 má standardní délku 501 AMK, může ale existovat i v kratších variantách. Existují tři izoformy, které byly izolovány z lidského mozku, a to BACE1₄₃₂, BACE1₄₅₇ a BACE1₄₇₆. Všechny tyto izoformy obsahují katalytickou doménu a jsou plně aktivní (Holsinger et al. 2013; Tanahashi a Tabira 2001). BACE1 je

syntetizována v endoplazmatickém retikulu (ER) podobně jako ostatní aspartylové proteasy. V prostoru ER je BACE1 podrobena různým posttranslačním modifikacím: jednoduché glykosylaci na čtyřech asparaginech (Asn₁₅₃, Asn₁₇₂, Asn₂₂₃, a Asn₃₅₄) a přechodné acetylaci na sedmi lysinech (Lys₁₂₆, Lys₂₇₅, Lys₂₇₉, Lys₂₈₅, Lys₂₉₉, Lys₃₀₀ a Lys₃₀₇) (Vassar et al. 2009; Haniu et al. 2000; Araki 2016). V GA dochází k deacetylaci, glykosylaci a následně je pomocí furin konvertasy (EC 3.4.21.75) odstraněna prodoména enzymu (Cole a Vassar 2007; Costantini et al. 2007). Maturovaná BACE1 je fosforylována na Ser₄₉₈ pomocí kasein kinasy 1 (EC 2.7.11.1). Fosforylace a defosforylace enzymu ovlivňuje jeho subcelulární lokalizaci. Nefosforylovaná BACE1 je uchovávána uvnitř časného endozomu, zatímco fosforylovaná BACE1 je na buněčném povrchu a pomocí defosforylace může být vrácena zpět do časných endozomů (Walter et al. 2001; Yang et al. 2004). BACE1 podstupuje také S-palmitoylaci na čtyřech cysteinech, které jsou umístěny na přechodu transmembránové (Cys₄₇₄) a cytosolické domény (Cys₄₇₈, Cys₄₈₂ a Cys₄₈₅). S-palmitoylace membránových proteinů je důležitá pro sbalení proteinu, funkci vzájemných protein-proteinových interakcí, přechod mezi kompartmenty a spojení s lipidovou membránou (Motoki et al. 2012; Vetrivel et al. 2009). Vědecké studie ukázaly, že lipidové rafty jsou důležité pro vznik a akumulaci A β . BACE1 a γ -sekretasový komplex jsou převážně umístěny v lipidových raftech. Snížením hladin cholesterolu a sfingolipidů, které jsou hlavní součástí lipidových raftů, dochází k redukci β -štěpení (Kalvodova et al. 2005; Cordy et al. 2006). Intracelulární lokalizace a přestup BACE1 z kompartmentu do kompartmentu může být ovlivněn i několika dalšími faktory: například ADP-ribosylačními faktory vázající proteiny (GGA), Retikulony/Nogo proteiny (RTN) a sortujícími nexiny (SNX). GGA proteiny obsahují tři členy: GGA1, GGA2 a GGA3 (Hirst et al. 2000; Ghosh a Kornfeld 2004; He et al. 2003). Snížením hladiny GGA3 se zvýší koncentrace BACE1, která je ukládána do lysozomu, kde je degradována. Tento mechanismus však také závisí na ubikvitinaci BACE1 (Tesco et al. 2007). GGA1 protein má částečně vliv na přenos a ukládání BACE1 v endozomálních a Golgiho kompartmentech (Obrázek 3). Zvýšení koncentrace GGA1 koreluje se zvýšením koncentrace intracelulárního APP β , zatímco koncentrace extracelulárního APP a A β se snižuje (Ghosh a Kornfeld 2004; Einem et al. 2015). RTN3 a RTN4-B/C interagují s BACE1. Dochází tím k negativní modulaci její aktivity a je ovlivněna produkce A β v mozku (Deng et al. 2013a).



Obrázek 3 – Cesta syntézy BACE1

1. BACE1 je syntetizována jako zymogen v endoplazmatickém retikulu, kde také probíhají její posttranslační modifikace: glykosylace, palmitoylace, přechodná acetylace a formace disulfidických můstků
2. Plně maturovaná BACE1 je transportována do trans-Golgiho aparátu, kde je furinem odstraněna prodoména a plně glykosylovaná BACE1 dosáhne molekulové hmotnosti 75 kDa
3. BACE1 je transportována z trans-Golgiho aparátu do cytoplazmatické membrány
4. BACE1 může být přemístěna z trans-Golgiho aparátu do endozomu
5. BACE1 se váže k GGA1. Tato vazba ovlivňuje transport z endozomu do trans-Golgiho aparátu
6. BACE1 štěpí amyloidový prekurzorový protein v endozomech. Toto štěpení vede k produkci amyloidu β
7. Fosforylace Ser₄₉₈ reguluje transport BACE1. Fosforylovaná BACE1 je vychytána z buněčného povrchu do časných endozomů. Nefosforylovaná BACE1 je naopak recyklována zpět do cytoplazmatické membrány
8. BACE1 je nakonec označena v pozici lyzinu 501 ubikvitinem, na který má navázaný GGA3. Oba signály jsou důležité pro její degradaci v lysozomech (Kang et al. 2012)

SNX představují velkou skupinu proteinů obsahujících ve své struktuře phox (PX) doménu, díky níž se vážou na membránách. Tyto proteiny regulují ukládání proteinů v časných endozomech, signalizaci na membráně a endocytózu. Například snížením SNX12 se zvyšuje endocytóza BACE1 a zároveň dochází k poklesu hladiny tohoto enzymu na buněčném povrchu. SNX6 byl identifikován jako další negativní regulátor zpětného transportu BACE1 z buněčného povrchu (Zhao et al. 2012; Okada et al. 2010).

1.1.1.4 Inhibitory BACE1

Prvotní vývoj léčiv, která by inhibovala vznik A β , cílil na γ -sekretasu. Vzhledem k tomu, že tento enzym má velké množství substrátů například Notch protein regulující proliferaci, diferenciaci a růst buněk, byla její inhibice spojena s řadou nežádoucích účinků. Vývoj léčiv se proto zaměřil na BACE1. Doposud byly vyvinuty čtyři generace inhibitorů BACE1, které se od sebe odlišují molekulovou hmotností a selektivitou vůči BACE1, BACE2 a dalším proteasam (Hrabínova et al. 2020). V průběhu předešlých 7 let se do poslední fáze klinického testování dostalo celkem 5 inhibitorů BACE1, avšak všechny tyto klinické studie byly předčasně zastaveny (Tabulka 1). Ačkoliv v prvotních testech byl ověřován vliv různých dávek inhibitorů, pacientům v klinických studiích byly podávány vysoké dávky, které redukovaly A β z více jak 50 %. Takto vysoká inhibice BACE1 byla nicméně spojena s vedlejšími účinky, které jsou pravděpodobně dány velkým množstvím substrátů BACE1. Doposud bylo potvrzeno celkem 68 substrátů, jejichž fyziologická role není zcela jasně prozkoumána (Hemming et al. 2009). Příkladem je inhibitor Elenebecestat, kdy ve II. fázi klinického testování byla podávána dávka 25 mg a 50 mg. Ve III. fázi pak byla testována pouze dávka 50 mg, jež redukovala A β o ~60 % (Tabulka 2) (Koelsch 2017; Albala et al. 2012). Jiným příkladem je Atabecestat testovaný v dávkách 1 a 3 mg. Obě dávky poskytovaly lepší terapeutickou odpověď (zlepšení řeči) než u pacientů s placebem, avšak u obou dávek nebyla pozorována žádná redukce A β_{1-40} (Timmers et al. 2016).

Tabulka 1 – II/III fáze klinické studie BACE1 inhibitorů

Inhibitor	Společnost	Fáze	Testovaná populace	Začátek	Konec
Verubecestat (MK-8931)	Merck	III	Prodromální stadium AD	10/2013	3/2018
Lanabecestat (LY3314814)	Eli Lilly	II/III	Časně stádium AD	5/2016	6/2018
Atabecestat (JNJ-4861911)	Janssen	IIb/III	Prodromální fáze a asymptomatické riziko vzniku AD	10/2015	1/2019
Umibecestat (CNP520)	Novartis, Amgen a Banner	II/III	Homozygoti nesoucí alelu genu pro APOE4	4/2015	6/2019
Elenbecestat (E2609)	Eisai a Biogen	III	Časně stádium AD	11/2016	9/2019

Tabulka 2 – Dávky inhibitorů ve II. a III. fázi klinického testování

Inhibitor	Dávka	Redukce	Dávka	Redukce	Dávka	Redukce
	(mg)	Aβ (%)	(mg)	Aβ (%)	(mg)	Aβ (%)
Verubecestat	12	50-75	40	80-90	-	-
Lanabecestat	15	63	50	79	-	-
Atabecestat	5	50	30	80-85	50	90
Umibecestat	15	95	50	95	-	-
Elenbecestat	25	43.6	50	59.4	100	71,3

Doposud tak nebyl nalezen a zaveden lék pro terapii AD na bázi inhibitorů tohoto enzymu, ačkoliv od objevu BACE1 uběhlo téměř 30 let. Výsledky hodnocení inhibitorů

BACE1 na zvířecích modelech potvrdily jejich účinnost, avšak v klinických studiích vykázaly mnoho vedlejších účinků a velmi malé benefity, jako například zlepšení řeči v porovnání s placebem. Některé významné farmaceutické firmy vzhledem k obrovským vynaloženým finančním prostředkům zastavily vývoj inhibitorů BACE1. Na druhou stranu ale vývoj, hledání vhodné terapeutické dávky a časnost podání inhibitorů zůstaly v pozornosti vědecké obce. Znalost biologie BACE1 je také velmi důležitá vzhledem k velkému množství jejích substrátů, které se mohou stát významným biologickým markerem při terapeutické léčbě dalších onemocnění.

1.1.2 Cholinerní teorie

Cholinerní hypotéza byla první teorií navrženou k vysvětlení mechanismu patologie AD. Zakládá se na poznacích vycházejících z nálezů postupné ztráty cholinerní aktivity neuronálních buněk v průběhu patogeneze choroby. V 70. letech 20. století byl u pacientů, u kterých byla histologicky potvrzena AD *post mortem*, zaznamenán velký úbytek v aktivitě enzymu zodpovědného za syntézu ACh (Davies a Maloney 1976). Cholinerní neurony podléhají u lidí s AD rozsáhlé degeneraci. Farmakologické studie účinků skopolaminu a vlivu fysostigminu na kognitivní výkon prokázaly při stejných testech paměti u mladých jedinců výsledky srovnatelné s neléčenými starými jedinci. Testovaným byl nejprve podán skopolamin, který centrálně blokuje muskarinové receptory a vyvolává účinky podobné u pacientů s demencí. Následně byl podán fysostigmin, který rovněž prochází přes hematoencefalickou bariéru (HEB), inhibuje AChE a vykazuje tak centrální cholinerní efekt, jímž bylo možné vliv skopolaminu zvrátit. Tato studie prokázala možné postižení cholinerní transmise, jako je například poškozená syntéza a blokace receptorů u stárnoucí populace (Drachman a Leavitt 1974). Následně bylo zjištěno, že vysoké dávky fysostigminu vedou ke zlepšení paměti u starých, ale ne u mladých primátů (Bartus 1979). Na těchto podkladech byla v roce 1982 formulována cholinerní hypotéza dysfunkce geriatrické paměti (Bartus et al. 1982). Jelikož fysostigmin je kovalentním reverzibilním inhibitorem AChE, vedla tato teorie ke klinickým studiím využívajícím další nepřímá cholinomimetika, inhibitory AChE, k vývoji léčiv AD (Francis et al. 1999).

1.1.2.1 Acetylcholinesterasa

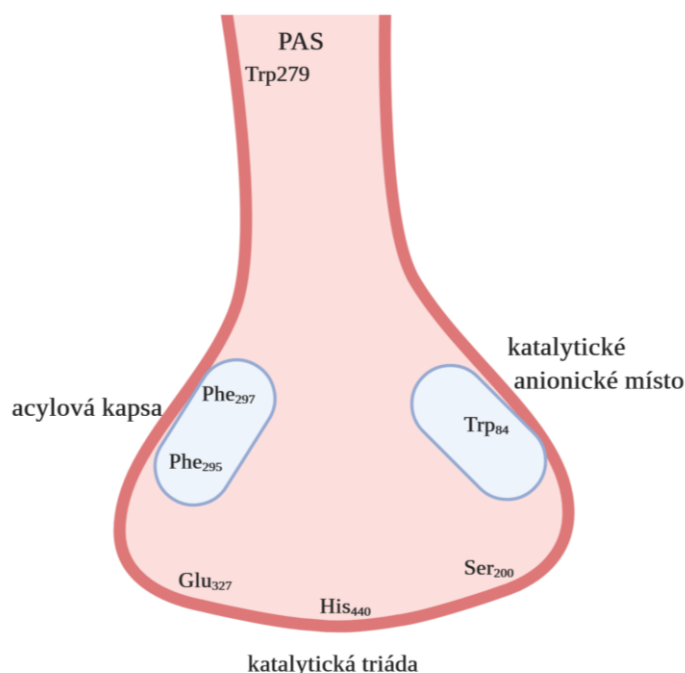
AChE patří do skupiny serinových proteas a lze ji nalézt v centrálním i periferním nervovém systému (neuromuskulárních spojích) a v neposlední řadě i na povrchu červených krvinek, kde se uplatňuje jako jeden z jejich antigenů. AChE existuje v asymetrických a globulárních formách, které se liší na základě své kvarterní struktury. Alternativními sestřihy genu AChE vznikají tři C-terminální varianty proteinu. Synaptická AChE-S je multimerním enzymem, který je zastoupen hlavně v mozku a ve svalu. Jedná se o tetramerní formu (G4). Hydrofobní doména této formy je připojena na membránu nekatalytickou hydrofobní P-podjednotkou o velikosti 20 kDa, která je připojena disulfidickými můstky k jednomu z dimerů. Monomerní forma (G1) AChE-R se objevuje v embryonálních a nádorových buňkách a její exprese je indukována psychickým, chemickým a fyzickým stresem. Tato forma je složena z 12 β -skládaných centrálně smíšených listů, které obklopuje 14 α -helixů. Další variantou je glykovaný dimer (G2) AChE-E, jenž je ukotven k buněčné membráně erytrocytů glykofosfatidylinositolovou kotvou (Grisaru et al. 1999; Massoulié et al. 1993). V nervosvalových ploténkách se vyskytuje asymetrická forma, která se skládá ze 4 (A4), 8 (A8) nebo 12 (A12) podjednotek AChE-T a kotvícího kolagenu Q. V nervové soustavě se vyskytují především komplexy tetramerních globulárních forem spolu s kotvícím transmembránovým proteinem PRiMA („*proline-rich membrane anchor*“) (Massoulié 2002).

Hlavní funkcí AChE je rychlá hydrolyza neurotransmiteru ACh na cholinergních synapsích. Jedna molekula AChE je schopna hydrolyzovat 6×10^5 molekul ACh za minutu (Abou-Donia et al. 2016; Quinn 1987; Patočka et al. 2004). Intracelulární účinky ACh jsou zprostředkovány aktivací nikotinových a muskarinových ACh receptorů. Jakmile se ACh uvolní z axonu, začne se pohybovat napříč synaptickou štěrbinou, aby se navázal na receptor na postsynaptické membráně. Pro ukončení signálu dochází k nukleofilní interakci acylové skupiny ACh s hydroxylovou skupinou serinu, který se nachází v aktivním místě AChE. Výsledkem reakce je tvorba přechodného kovalentně vázaného komplexu mezi substrátem a enzymem. Inhibice aktivního místa způsobí dočasnou inaktivaci enzymu. Funkce enzymu je obnovena až hydrolyzou kovalentně vázaného komplexu, za současného uvolnění acetátu a cholinu. Volný cholin je pak transportován zpět do nervových zakončení, kde slouží

jako prekurzor k syntéze nových molekul ACh. V periferním nervovém systému se AChE nachází na neuromuskulárním spojení, kde řídí svalovou kontrakci. Kromě této funkce ovlivňuje AChE buněčnou proliferaci a diferenciaci (Patočka et al. 2004; Barnard 1974; Nachmansohn 1973; Grisaru et al. 1999).

Pro strukturu AChE (Obrázek 4) je charakteristická úzká přibližně 20 angstromů (Å) hluboká štěrbina, jež proniká téměř celou polovinou enzymu rozšiřující se směrem k aktivnímu místu, nacházejícím se na jejím dně. Důležitými částmi, které jsou součástí štěrby, jsou dvě vazebná místa, periferní anionické místo (PAS) a katalytické anionické místo (CAS), dále katalytická triáda a acylová kapsa. PAS, známé také jako β-anionické místo, je oblastí nacházející se na vstupu katalytické kavity přibližně ve vzdálenosti 14 Å od aktivního centra. Ligandy obsazující PAS často mění konformaci aktivního centra. PAS obsahuje 5 residuí, a to Tyr₇₀, Asp₇₂, Tyr₁₂₁, Trp₂₇₉ a Tyr₃₃₄. Mezi těmito AMK je klíčovým Trp₂₇₉ zodpovědný za adhezni funkci AChE (Johnson a Moore 2006). Prvním krokem v katalytické dráze je přechodná vazba substrátu na PAS, který váže kladný kvarterní amin cholinové části ACh. Vysoká koncentrace substrát inhibuje AChE. Naopak snížením jeho koncentrace se může zrychlit acylační krok v jeho katalytické cestě (Silman a Sussman 2008; Szegletes et al. 1999; Johnson et al. 2003). Anionická podjednotka je zodpovědná za vazbu kvarterních ligandů, působících jako kompetitivní inhibitory, a kvarterních oximů, jež účinně reaktivují AChE inhibovanou organofosfáty a organofosfonáty (Dvir et al. 2010). Aktivní místo je lemováno čtrnácti aromatickými AMK, jejichž zbytky interagují se substráty (Sussman a Silman 1992). Všechny tyto AMK jsou vysoce konzervativní napříč AChE jednotlivých druhů. Nedaleko dna kavity se nachází CAS, jehož součástí jsou AMK Phe₃₃₀, Phe₃₃₁ a Trp₈₄. Trp₈₄ je zodpovědný za interakci s kvarterním aminem ACh. Acetylová skupina je vázaná v acylové kapse, která je tvořena dalšími aromatickými zbytky, lemujícími vnitřní stěnu kavity. AChE obsahuje, podobně jako ostatní serinové hydrolasy, katalytickou triádu AMK. Triádu tvoří AMK Ser₂₀₀, His₄₄₀ a Glu₃₂₇ (Sussman et al. 1991). Vazba ACh v CAS a acylové kapse umožňuje interakci ACh s aktivním místem. Hydrolýzou karboxylu vzniká acylderivát enzymu a volný cholin, který v přítomnosti His₄₄₀ podléhá nukleofilnímu ataku molekulou vody. Následuje uvolnění kyseliny octové a regenerovaného volného enzymu (Nachmansohn a Wilson 1951). Znalost struktury a katalytické účinnosti AChE jsou nezbytné

pro racionální návrh nových inhibitorů AChE a vývoj nových terapeutických přístupů k otravě NPL.



Obrázek 4 – Kavita AChE obsahující periferní anionické místo (PAS), katalytické anionické místo (CAS), acylovou kapsu a katalytickou triádu

1.1.2.2 Inhibitory AChE

Inhibitory AChE blokují tento enzym, čímž prodlužují účinek ACh na postsynaptických cholinergních receptorech a zvyšují tak cholinergní odpověď (Lancôt et al. 2003). Současná farmakoterapie AD je založena na 3 inhibitorech: donepezilu (Aricept), rivastigminu (Exolon) a galantaminu (Reminyl), které zvyšují hladinu neurotransmiteru ACh (Čolović et al. 2013). Donepezil je selektivní inhibitor AChE. Rivastigmin inhibuje jak AChE, tak enzym BChE. Galantamin inhibuje AChE, ale taktéž je alosterický modulátor nikotinových receptorů a tímto mechanismem zvyšuje jejich sensitivitu k ACh (Fisher 2008). Problémem je, že pouze 20-30 % pacientů odpovídá na tuto léčbu pozitivně. U pacientů nastává často kontraindikace a intolerance těchto léčiv (Sharma 2019). Celkovou nevýhodou inhibitorů AChE je

rovněž neschopnost zpomalit či zastavit progresi onemocnění. Jejich potenciál je pouze v dočasném zlepšení kognitivních funkcí.

Další uplatnění inhibitorů AChE je v léčbě onemocnění *myasthenia gravis*. Jedná se o autoimunitní neuromuskulární onemocnění, které je způsobeno autoprotilátkami zaměřenými na nikotinový ACh receptor kosterního svalu, svalové specifické kinasy, receptorové tyrosinkinasy, proteinu 4 a dalších svalových „*endplate*“ proteinů. Kromě výše titru protilátek je závažnost této nemoci hodnocena podle umístění postižení svalů, věku nástupu příznaků a dle povahy patologie brzlíku, se kterou je nemoc spojována. Léčba inhibitory AChE je zde obvykle první volbou. Vede ke stabilizaci pacienta a poskytuje symptomatickou úlevu (Guptill et al. 2016; Wang et al. 2018).

1.1.2.3 Butyrylcholinesterasa

Druhým typem ChE je BChE nebo též acylcholin acylhydrolasa, či plazmatická, sérová, falešná, nespecifická ChE nebo ChE typu 2. Tento enzym je syntetizován v játrech a sekretován do krve. Jeho nejvyšší koncentrace je v plazmě. Dále je zastoupen v hladké svalovině, střevech, pankreatu, srdci a bílé hmotě mozkové. Důkaz o roli BChE v cholinergní signalizaci u lidí pochází ze studie, která prokázala, že BChE může hydrolyzovat acetylthiocholin v lidské mozkové tkáni inhibované inhibitorem AChE BW-284C515. Tyto studie na AChE-knockoutovaných myších a lidské mozkové tkáni ukázaly, že BChE může hydrolyzovat ACh a je schopna kompenzovat funkci AChE v případě, že je její aktivita vyčerpána (Mesulam et al. 2002). Význam BChE spočívá nejen v metabolismu lipoproteinů. Má zásadní úlohu v buněčné adhezi, neurogenezi a udržování myelinu. BChE je zapojena v degradaci řady léčiv a toxických látek, např. kokainu. Byla připravena mutovaná BChE (kokainhydrolasa), u které se zvýšila katalytická účinnost vůči kokainu 1800krát ve srovnání s přirozeným typem BChE (Xue et al. 2011). Mutovaná BChE by se mohla stát velmi důležitým léčivem pro prevenci opětovného přechodu na užívání drog. BChE kovalentně vyvazuje organofosfátové a karbamátové inhibitory. Na základě těchto vlastností se uvažuje o jejím využití jako bioscavengeru pro detoxifikaci toxických esterů (Lockridge et al. 2011; Nordberg et al. 2013).

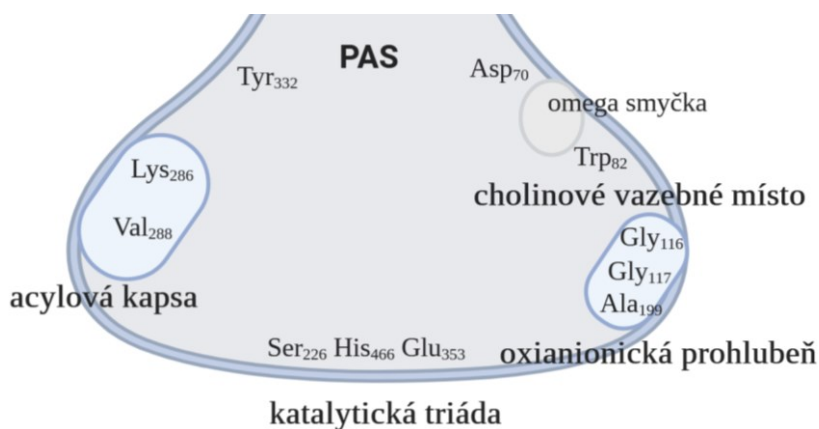
Zavedení sukcinylcholinu jako svalového relaxancia v 50. letech přineslo poznání, že existují různé dědičné formy BChE. Jednou z nich je například forma, která není schopna hydrolyzovat sukcinylcholin. Tato forma je označována jako BChE-K, podle

jména svého objevitele Kalowa. BChE-K varianta je charakterizovaná záměnou Ala₅₃₈ na Thr. Homozygotní K-varianta obsahuje o 33 % méně molekul BChE na ml plazmy ve srovnání s klasickým typem BChE, aniž by to mělo vliv na zdravotní stav nositele. Nevýhoda této BChE je při onemocnění AD, kdy takto mutované typy enzymu snižují odpověď na terapii inhibitory AChE. Inhibice AChE v neuromuskulárním spojení způsobuje svalovou slabost a selhání dýchání. (Doenicke et al. 1963; Lehmann a Simmons 1958; Kalow a Staron 1957; Bartels et al. 1992; Lockridge et al. 2016). Lepší porozumění funkci BChE a AChE během patogeneze AD by pomohlo optimalizovat léčebné postupy pro každého pacienta (Jasiecki a Wasąg 2019).

Stejně jako AChE existuje BChE jako monomerní forma (G1) a dimerní forma (G2), která se skládá ze dvou monomerů spojených disulfidickým můstkem mezi Cys₅₇₁ každého monomeru. Tato forma BChE převládá v lidské plazmě. Dvě formy G2 mohou být spojeny dohromady pomocí hydrofobních interakcí za vzniku tetramerní globulární formy (G4). BChE tetramer je složen ze 4 identických glykoproteinových podjednotek a nekovalentně vázaného peptidu bohatého na prolin. Každá podjednotka BChE má 574 AMK a 9 N-vázaných glykanů. Tetramerizační doména tvoří 40 zbytků na C-konci každé podjednotky BChE. Peptidy bohaté na polyprolin se v této doméně prolínají s tryptofany a působí jako „lepidlo“, které spojuje 4 podjednotky do tetrameru BChE. Existují i další formy BChE, které jsou asymetrické, sestavené z tetramerů katalytických podjednotek a k membránám jsou připojeny trojitou, nekatalytickou, kolagenovou kotvou. Tyto tetramery označujeme jako A4, dva označujeme jako formu A8 a tři vytváří formu A12. Kolagen, který sestavuje BChE do heteromerických multimerů, označujeme jako kolagen Q. Zmiňovaný kolagen má vazebnou doménu bohatou na prolin (Darvesh et al. 2003; Massoulié et al. 1993; Larson et al. 2014; Schopfer et al. 2017).

Monomer BChE má 20 Å hlubokou kavitu (Obrázek 5) lemovanou přibližně 55 AMK zbytky. Na dně kavity se nachází katalytická triáda, která je složená ze Ser₂₂₆, His₄₆₆ a Glu₃₅₃. Imidazolový kruh His₄₆₆ přenáší elektrony z Glu₃₅₃ na Ser₂₂₆ a hydroxylový kyslík Ser₂₂₆ se stává nukleofilem. Ten atakuje esterovou vazbu substrátu, což má za následek vznik meziproductu acyl-enzym a volného cholinu. Následně je acylová skupina hydrolyzována ze Ser₂₂₆ nukleofilní molekulou vody, jež je aktivována převzetím protonu z His₄₆₆ (Darvesh et al. 2003). Kromě katalytické triády obsahuje štěrbina anionické místo, jež může vázat kationtový kvarterní dusík cholinu. PAS

obsahuje AMK Trp₈₂, Asp₇₀ a Tyr₃₃₂, které jsou umístěny na okraji prohlubně aktivního místa. Mezi Asp₇₀ a Tyr₃₃₂ se nachází vodíková vazba udržující funkční stavbu aktivního místa BChE. Navázáním kladně nabitého substrátu na enzym dojde ke vzniku komplexu kation- π s aromatickým kruhem Tyr₃₃₂, současně substrát interaguje s negativně nabitým Asp₇₀, což vede ke konformačním změnám v monomeru (Masson et al. 1999). Ohebná ramena omega smyčky se k sobě přiblíží a následně substrát sklouzne ke zbytku Trp₈₂, jenž je součástí cholinového vazebného místa a má důležitou roli při stabilizaci kvarterního dusíku substrátu (Masson et al. 1996). V rámci prohlubně se také nachází acylová kapsa, lemovaná Lys₂₈₆ a Val₂₈₈. Oxianionická prohlubeň, ležící v blízkosti cholinového vazebného místa, zahrnuje Gly₁₁₆, Gly₁₁₇ a Ala₁₉₉ a pomáhá otáčet substrát z vertikální do vodorovné polohy, v níž může být substrát hydrolyzován za účasti Ser₂₂₆. Díky větší acylové kapse může BChE přijímat větší acylové skupiny, a tudíž i větší substráty, jako je například butyrylcholin. BChE je glykosylována na devíti Asp v pozici 17, 57, 106, 241, 256, 341, 455, 481 a 486 (Lockridge et al. 1987; Lockridge 2015a).



Obrázek 5 – Kavita BChE obsahující periferní anionické místo (PAS), vazebné místo pro cholin, oxianionickou prohlubeň, acylovou kapsu a katalytickou triádu

1.1.3 Význam AChE a BChE ve vojenství

Mechanismus inhibice AChE se uplatňuje také při vývoji profylaktik pro léčbu otrav NPL. Mezi hlavní zástupce NPL patří sarin, soman, tabun, cyklosin a látka VX.

NPL reaguje s aktivním centrem AChE, kde způsobuje fosforylaci hydroxylové skupiny serinu. Vzniká tak kovalentně vázaný komplex NPL s AChE a fyziologická funkce enzymu je zablokována (Hulse et al. 2019). Inhibice enzymu NPL způsobí akumulaci ACh v místech jeho fyziologického působení, která postupně vede k nadměrné stimulaci nikotinových a muskarinových receptorů cholinergního systému. Nastane konstantní depolarizace postsynaptických neuronů. V důsledku zvýšené cholinergní aktivity dochází u exponovaného jedince k rozvoji klinických příznaků, označovaných jako tzv. akutní cholinergní krize, která přetrvává do doby, dokud není nasyntetizována nová AChE nebo je použit reaktivátor (Eddleston et al. 2002).

Aktivitu AChE lze po inhibici NPL zpětně obnovit. Vzniklý komplex NPL s AChE je hydrolýzou kovalentní vazby mezi atomem fosforu NPL a serinem AChE zpětně reaktivován. V některých případech ale dochází k tzv. procesu „stárnutí“, přesněji k dealkylaci fosforylované AChE. Během tohoto procesu vzniká v molekule záporně nabitý fosfát, vytvářející solný můstek s katalytickým histidinem. Komplex se tak dostává do již nereaktivovatelné formy. Jediným způsobem, jak obnovit aktivitu takové AChE, je syntéza nového enzymu (Worek et al. 2007). BChE je výborný marker otrav NPL. Tento enzym má v oběhu poločas 12 dní, což znamená, že krev odebraná několik dní po incidentu může stále obsahovat detekovatelné množství aduktu NPL-BChE (Lockridge 2015b).

Jedním z vojensky významných profylaktik intoxikace NPL je pyridostigmin, jenž je zaveden ve výbavě některých armád. Pyridostigmin je pseudoreversibilní inhibitor AChE, který patří do skupiny karbamátů. AChE inhibovaná karbamáty je rezistentní k inhibici NPL. Po spontánním obnovení aktivity (dekarbamylaci) se AChE stává opět aktivní a je schopna plnit svoji fyziologickou funkci. Nevýhodou pyridostigminu je, že se zvýšenou dávkou jsou spojeny vedlejší účinky, a to nauzea, průjem, bolesti břicha, nízký krevní tlak, slabost a alergické reakce (Xia et al. 1981; Dawson 1995). V české armádě je zavedena trojkombinace profylaktik pyridostigminu, trihexyfenidylu a benaktyzinu pod názvem PANPAL. Pyridostigmin není schopen prostupu do mozku a působí především periferně. Další dvě léčiva jsou anticholinergika, která odstraňují nežádoucí účinky pyridostigminu (Kassa et al. 2008; Patocka et al. 2006).

Standardním postupem v léčbě otrav NPL je kombinace reaktivátorů s antagonisty muskarinových receptorů, které blokují jejich nadměrnou stimulaci a antikonvulzivními léčivy tlumící tonicko-klonické křeče. Mezi komerční zástupce reaktivátorů patří

methoxim, obidoxim, trimedoxim, asoxim a monokvarterní reaktivátor pralidoxim (Bajgar et al. 2007). V současné době používané oximy mají několik nevýhod, jako je relativně vysoká toxicita některých látek a neschopnost pronikat přes HEB v důsledku trvalého náboje. Další nevýhodou je, že neexistuje širokospektrální reaktivátor, který by léčil otravu všemi typy NPL (Soukup et al. 2018). Tento problém je proto neustále řešen výzkumnými laboratořemi po celém světě.

Z důvodu omezených terapeutických účinků reaktivátorů AChE je zvažováno zavedení stechiometrických nebo katalytických bioscavengerů, které by měly být schopny vázat nebo rozložit NPL v organismu (Aurbek et al. 2009). Klinické studie fáze I s lidskou plazmatickou BChE dospěly k závěru, že BChE je bezpečná, pokud je podávána lidem intravenózně nebo intramuskulárně. Doposud byla připravena a otestována jako stechiometrický bioscavenger rekombinantní BChE, vyprodukovaná z kozího mléka transgenních zvířat nebo z geneticky modifikovaných tabákových rostlin (Doctor a Saxena 2005; Chilukuri et al. 2005). Takto připravená rekombinantní BChE má však svá omezení v rámci chybějících posttranslačních modifikací a může tedy dojít k nežádoucí imunitní odpovědi po opakovaném podání. V uvedených případech má rekombinantní lidská BChE nehumánní glykanovou strukturu. Ta způsobuje, že rekombinantní BChE je rozpoznána jako imunogen (Rice et al. 2016). Další nevýhodou rekombinantní BChE je krátký poločas v krevním oběhu, nestabilita purifikovaného enzymu a variabilita glykosylace mezi šaržemi v závislosti na podmínkách kultivace (Nachon et al. 2002). Krátký poločas je vysvětlen neúplnou glykosylací enzymu. Plazmatická BChE má až devět glykosylačních míst. Neschopnost podjednotek BChE vytvořit tetramer z důvodu nedostatečného množství peptidů bohatých na polyprolin, způsobuje zkrácení poločasu v krevním oběhu. Poločas enzymu v krevním oběhu je možné prodloužit PEGylací BChE (Chilukuri et al. 2005) nebo expresí BChE jako fúzního proteinu s albuminem (Huang et al. 2007). Podání rekombinantní BChE u zvířat je často spojeno s imunitní odpovědí, jelikož lidská proteinová sekvence je rozpoznána jako cizí. Tento problém lze vyřešit použitím BChE stejného druhu jako je testovaný druh, na kterém je prováděno testování (Rosenberg et al. 2010; Parikh et al. 2011). Enkapsulace rekombinantní BChE do nanočástic je zkoumána jako metoda, která by mohla zlepšit farmakokinetické vlastnosti tohoto proteinu.

BChE funguje jako stechiometrický vychytávač, jehož hlavní omezení spočívá ve schopnosti vázat pouze jednu molekulu NPL na jednu molekulu BChE. Pro dosažení dobré profylaktické nebo terapeutické účinnosti je tedy nutné podat velmi vysokou dávku enzymu před nebo po otravě NPL (Cerasoli et al. 2020). Tento problém by mohlo částečně odstranit současné podání selektivního reaktivátoru BChE, jež by mohl štěpit ireverzibilně vázanou NPL z aktivního místa BChE a obnovit tak její funkci. V tomto případě BChE funguje jako pseudokatalytický vychytávač, který je použitelný jako profylaxe otravy NPL nebo jako léčebný prostředek po intoxikaci (Masson a Lushchekina 2016). Dalším možným dosud nerealizovatelným léčebným přístupem je zvýšení exprese BChE v těle pacienta, avšak o regulaci exprese BChE není mnoho známo. U člověka byla nalezena varianta BChE tzv. Cynthiana vyznačující se vysokou plazmatickou hladinou BChE. Nebyly však nalezeny žádné mutace v kódující oblasti genu BChE. Lidé s touto variantou BChE jsou zcela zdraví jedinci.

Z výše popsaných důvodů a vzhledem k nárokům na dostatečné množství aktivních a stabilních enzymů pro testování nových inhibitorů BACE1 a AChE, jakožto potenciálních léčiv AD, vývoje širokospektrých reaktivátorů AChE a potřeby produkce rekombinantní BChE jako potenciálního bioscavegeru pro léčbu otrav kokainem, NPL a pesticidy, vyvstal požadavek na produkci těchto rekombinantních proteinů.

1.2 Produkce rekombinantních proteinů

Pokrok ve vývoji genetického inženýrství a nových technologií umožnil realizovat produkci rekombinantních proteinů a monoklonálních protilátek ve velkém měřítku. Optimalizace jednotlivých kroků produkce rekombinantních proteinů vedla k zisku velkého množství nových enzymů a pomohla tak k mnoha novým objevům v léčbě různých onemocnění.

1.2.1 Rekombinantní proteiny

Tvorba první rekombinantní DNA molekuly byla popsána Jacksonem, Symonsem a Bergem v roce 1972. Na základě této publikace byla Paulu Bergovi v roce 1980 za studium rekombinantní DNA udělena Nobelova cena za chemii. Zároveň s ním obdrželi tuto cenu Walter Gilbert a Frederik Sanger za stanovení sekvencí bazí v DNA. Insulin byl první protein, který byl Sangerem sekvenován (Jackson et al. 1972; Sanger a

Dowding 1996). Od roku 1982, kdy byl poprvé rekombinantní inzulin použit k léčbě pacienta, je produkce rekombinantních proteinů rychle se rozvíjející odvětví. Postup tvorby rekombinantního proteinu lze rozdělit do jednotlivých kroků:

- izolace genu kódujícího cílový protein,
- vložení genové sekvence do vhodného vektoru,
- vnesení rekombinantní DNA do buněk určených k expresi proteinu,
- purifikace proteinu.

Produkcí rekombinantního proteinu je pak možné optimalizovat po jednotlivých krocích celého procesu (Wurm 2004).

Následně po purifikaci je pak nutné získaný protein charakterizovat:

- určením čistoty proteinu pomocí denaturační gelové elektroforézy,
- identifikací proteinu pomocí protilátky analýzou western blot nebo pomocí hmotnostní spektrometrie,
- stanovením koncentrace proteinu pomocí spektrofotometrických metod,
- stanovením aktivity proteinu a určení kinetických konstant (enzym/substrát),
- dále je možné určit nativní konformaci enzymu, glykosylaci, optimalizovat skladovací podmínky atd.

1.2.2 Expresní systémy

Zavedení nových expresních systémů umožnilo zvýšit produkci virových vakcín a diagnostických a terapeutických proteinů pro farmaceutický průmysl. Expresní systémy lze rozdělit do dvou hlavních tříd: prokaryotní a eukaryotní (Ahmadi et al. 2016; Baranyi et al. 2013).

1.2.2.1 Bakteriální systémy

Průkopnickým hostitelem při produkci rekombinantních proteinů byla *Escherichia coli* (*E. coli*). Tato bakterie je častou volbou pro svůj rychlý růst a jednoduchou kultivaci s obrovským benefitem v podobě nízké ceny produkovaného proteinu. Nevýhodou bakteriálních systémů je absence posttranslačních modifikací, díky čemuž může enzym postrádat katalytickou aktivitu. Častá je též agregace produkovaného

proteinu nebo kontaminace produkovaného proteinu bakteriálním endotoxinem (Tucci et al. 2016). Doposud bylo popsáno dalších 26 bakteriálních systémů užívaných pro produkci rekombinantních proteinů (například *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces lividans*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus megaterium* a *Lactococcus lactis*). Výhodou těchto systémů je jejich metabolická rozmanitost a schopnost přizpůsobit se různému prostředí, což může významně ovlivnit produkovaný protein. Zvýšené rozpustnosti proteinů lze dosáhnout při expresi v halofilních a psychrofilních bakteriích. Ke zvýšení sekrece proteinů lze použít bakterie mléčného kvašení. Použití Gram-pozitivních bakterií snižuje riziko kontaminace endotoxiny a posttranslačních modifikací lze dosáhnout v mykobakteriích (Ferrer-Miralles a Villaverde 2013).

1.2.2.2 Kvasinkové systémy

Méně konvenční systémy pro produkci rekombinantních proteinů jsou například různé druhy kvasinek. Nejčastěji používanými jsou *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* a *Hansenula polymorpha*. Kvasinkové buňky kombinují výhody prokaryotických buněk, jako je rychlý růst nebo snadná genetická manipulace, a eukaryotické rysy včetně sekreční cesty vedoucí ke správnému zpracování proteinů a posttranslačním modifikacím. Různé vědecké skupiny se zaměřily na vývoj kvasinek, které jsou schopny glykosylace za účelem produkce glykoproteinů odpovídající lidským glykanovým strukturám (Mattanovich et al. 2012; Hamilton a Gerngross 2007).

1.2.2.3 Houbové systémy

Dalším systémem, který slouží k produkci rekombinantních proteinů, jsou vláknité houby. Nejčastějším druhem jsou *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* a *Rhizopus*. Houbové systémy obecně nejsou vhodné pro produkci lidských rekombinantních proteinů, jelikož poskytují enzymy s odlišnou glykosylací. Zajímavé jsou spíše z hlediska exprese primárních nebo sekundárních metabolitů otrav houbami (Ward 2012).

1.2.2.4 Další expresní systémy

Méně využívané systémy pro produkci rekombinantních proteinů jsou hlenky, mechy a řasy. Zelené řasy, jakožto systém pro produkci rekombinantních proteinů a dalších biomateriálů pro průmysl, mají mnoho výhod z hlediska nízkých výrobních

nákladů, bezpečnosti, metabolické rozmanitosti nebo nenáročnosti na růst. Mnoho studií ukázalo, že chloroplast podporuje vznik komplexů a správné sbalení enzymů (Rasala a Mayfield 2015; Top et al. 2019; Arya et al. 2008).

1.2.2.5 Hmyzí systémy

Hmyzí buněčné systémy jsou z pohledu produkce rekombinantních proteinů kompromisem mezi bakteriálními a savčími systémy. Rostou ve vysoké hustotě v suspenzních kulturách. Je proto možné použít menší objem kultury pro produkci rekombinantních proteinů než u savčích buněk. Nepotřebují pro svůj růst CO₂ atmosféru, jsou však citlivější na sterilitu práce než savčí buňky. Glykosylace v hmyzích buňkách je podobná, není ale identická s glykosylací v savčích buňkách (Kollewe a Vilcinskas 2013). Nejčastěji využívanou buněčnou linií je ovariální buněčná linie *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) odvozená rodičovské buněčné linie *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf-21-AE (Sf-21). Sf-9 linie se často používá k produkci intracelulárních nebo membránových proteinů. *Trichoplusia ni* (známá jak „High Five“) je vhodná pro produkci proteinů s vyšším výtěžkem. Hmyzí buňky rostou při teplotě 28 °C a produkční systém je založen na infekci kultivovaných hmyzích buněk bakuloviry. Buňky jsou infikovány DNA virem *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV). Tento rekombinantní DNA virus je dvouvláknový a nese gen pro expresi cílového proteinu. Pro izolaci a propagaci bakulovirů je preferovanou buněčnou kulturou Sf-21. Kultivace těchto buněk je časově i finančně náročná. Nevýhodou je, že buňky nejsou schopny kontinuální produkce proteinu a pro každou dávku exprimovaného proteinu je nutné infikovat čerstvé buňky (Weber a Fussenegger 2009; Kitajima a Takaku 2008).

1.2.2.6 Savčí systémy

Savčí buněčné systémy jsou na rozdíl od předchozích systémů schopny zajistit adekvátní posttranslační modifikace produkovaného rekombinantního proteinu. Mezi tyto modifikace patří metylace, fosforylace, acetylace, glykosylace atd. Nevýhodou je cena celého procesu produkce proteinu. Tyto systémy bývají též náročnější na složení médií. K expresi se používají virově imortalizované nebo buněčné linie odvozené z tumoru. K významným liniím pro produkci ve farmaceutickém průmyslu patří buňky ovarií křečka čínského (CHO), myší myelomové buňky (NS0), hybridní

B lymfocytárních myší buňky (Sp2/O-Ag14) a lidské embryonální ledvinné buňky (HEK293) (Dhara et al. 2018; Khan 2013).

Námi zvolená buněčná linie Expi293F vychází z buněk HEK293. Tato linie byla upravena pro vyšší produkci rekombinantního proteinu. Poskytuje veškeré posttranslační modifikace a tím je, dle výrobce, zárukou kvality, aktivity a stability budoucího rekombinantního proteinu (ThermoFisher Scientific nedatováno). V následující tabulce 3 jsou shrnuty vlastnosti jednotlivých zástupců expresních systémů.

Tabulka 3 – Výhody a nevýhody expresních systémů

Expresní systém	Nároky na kultivaci	Rychlost růstu	Úroveň exprese	Konformace	Posttranslační modifikace (glykosylace)
Bakteriální	nízké	vysoká	vysoká	nutný refolding	chybí
Kvasinkový	nízké	vysoká	nízká/vysoká	někdy nutný refolding	jiné zdroje cukrů
Hmyzí	vysoké	nízká	nízká/vysoká	většinou správná	jednoduchá, nízká
Savčí	vysoké	nízká	nízká	většinou správná	komplexní

2. Cíl práce

Cílem předkládané disertační práce je zavedení produkce lidských rekombinantních proteinů BACE1, AChE a BChE. V rámci řešení dané problematiky byly stanoveny tyto dílčí cíle:

- zavést a validovat produkci lidských proteinů BACE1, AChE a BChE v Expi293 expresním systému,
- optimalizovat izolaci aktivní lidské rekombinantní BACE1 z Expi293F buněk,
- validovat purifikaci všech výše zmiňovaných proteinů,
- provést charakterizaci jednotlivých proteinů: určení čistoty, identifikace proteinu protilátkou, stanovení koncentrace, stanovení aktivity, určení kinetických konstant a určení hodnoty IC_{50} pro selektivní inhibitory jednotlivých proteinů.

3. Materiál metodika

3.1 Chemikálie a kity

3.1.1 Chemikálie

Dimethylsulfoxid (DMSO), fluorid sodný (NaF), acetylthiocholin jodid (ATChI), butyrylthiocholin jodid (BTChI), Comassie brilantní modř G-250, metanol (MeOH), isopropanol, dodecylsírán sodný (SDS), kyselina octová, Triton X-100, TWEEN-20, Tris-HCl, Tris-báze, akrylamid, kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA), imidazol, dodecyl maltosid, *N,N,N',N'*-tetrametyletan-1,2-diamin (TEMED), tetrametylamonium chlorid (TMACl), tetrametylamonium jodid (TMAI), dekametonium bromid (DMB), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), peroxodisírán amonný (APS), octan draselný, digitonin, β -merkaptoetanol, glycerol, glycin, bromfenolová modř, chlorid sodný (NaCl), dihydrogen fosforečnan draselný (KH₂PO₄), hydrogen fosforečnan sodný (Na₂HPO₄), imidazol, 7-Methoxykumarin-4-acetyl-[Asn670, Lue671]-amyloid β /A4 prekursorový protein 770 fragment 667-676-(2,4-dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amid trifluoroctová sůl, 6-aminokapronová kyselina, donepezil, etopropazin, Luria Broth (LB) médium, trypanová modř, agar, 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonát hydrát (CHAPS) a saponin byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Syber Safe DNA gel stain 10 000x koncentrovaná barva Generuler 1kb DNA ladder, *N*-octyl- β -D-glukopyranosid, protilátka proti histidinové kotvě, Opti-MEM® a HisPur-kobaltová pryskyřice byly zakoupeny u Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Inhibitor proteolýzy byl zakoupen u firmy Roche (Basilej, Švýcarsko).

Pufr Tris-HCl pH 8,8, Precision Plus Protein kaleidoskop a odstředěné sušené mléko byly zakoupeny u Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Karbenicilin, akrylamid a agaróza pro rutinní DNA elektroforézu byly zakoupeny u SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Německo).

Agaróza SeaKem GTG byla zakoupena u Lonza (Basilej, Švýcarsko).

Verubecestat byl zakoupen u Selleckchem (Houston, TX, USA).

Sefarosa4B/prokainamid byla zakoupena u GE Healthcare (Chicago, IL, USA).

Hupresinová pryskyřice byla zakoupena u Chemforase (Paříž, Francie).

MUSE Count and Viability roztok byl pořízen u Merck Millipore (Darmstadt, Německo).

3.1.2 Kity

QIAquick gel extrakční kit byl zakoupen u Qiagen (Venlo, Nizozemí).

BM Chemiluminescence Western Blotting Kit byl pořízen u Roche (Basilej, Švýcarsko).

PureLink Quik plasmid MiniprepKit a MidiprepKit, pcDNA3.4-TOPO® klonovací kit, ExpiFectamine293 transfekční kit, Mem-PER Plus extrakční kit pro membránové proteiny a Micro BCA Protein Assay kit byly zakoupeny u Thermo Fisher Scientific.

3.2 Biologický materiál

3.2.1 Gen

Templátové DNA obsahující lidskou BACE1, ACHE a BCHE byly syntetizovány *de novo* firmou GeneArt™ gene synthesis service (Thermo Fisher Scientific) jako fragmenty DNA.

3.2.2 Primery

Forward a reverse primery pro geny BACE1, ACHE a BCHE byly syntetizovány u Generi Biotech (Hradec Králové, ČR).

3.2.3 Buňky a enzymy

Buněčná linie Expi293F, PFU Ultra II DNA polymerasa a chemicky kompetentní *E. coli* TOP10 byly zakoupeny u Thermo Fisher Scientific.

Taq DNA polymerasa byla zakoupena u New England Biolabs (Ipswich, MA USA).

3.3 Sterilní plast a spotřební materiál

Erlenmeyerovy baňky s trny a ventilací a Coolcell kontejner byly zakoupeny u Corning (New York, NY, USA).

96jamkové černé polystyrenové destičky byly zakoupeny u Brand (Wertheim, Německo).

96jamkové destičky číré byly zakoupeny u Nalge Nunc International (New York, NY, USA).

Sérologické pipety (10, 25 ml) centrifugační zkumavky (15, 50 ml), kryovialky byly zakoupeny u Techno Plastic Product (Trasadingen, Švýcarsko).

Centrifugační mikrozukavky (0,5, 1,5, 2 a 5 ml) byly zakoupeny u Eppendorf (Hamburk, Německo).

Kolonky Econo-Pac® column byly zakoupeny u Bio-Rad.

Dialyzační kazety byly zakoupeny u Thermo Fisher Scientific.

3.4 Instrumentace

Termotřepačka MTC-100 Thermoshaker Incubator (MIU Instruments, Hanzghou, Čína),

orbitální třepačka CO₂ Plus (Thermo Fisher Scientific),

inkubátor CB 160 (Binder, Tuttlingen, Německo),

box s laminárním prouděním Bioair safe flow 1.2 (EuroClone, Pero MI, Itálie),

pH metr-Titrando 842 (Metrohm, Herisau, Švýcarsko),

výrobník ultračisté vody (H₂O) na bázi reverzní osmózy typ 06 (AquaOsmotic, Tišnov, Česká republika),

centrifuga U-320 R, centrifuga M-240 R (Boeco, Hamburk, Německo),

Martin Christ Freeze Dryer (ALPHA 1-4 LSC, Osterode, Německo),

míchačka big squide, Vortex Lab Dancer, Třepačka destiček (IKA, Staufen v Breisgau, Německo),

třepačka/Kývačka MR-1 (Biosan, Riga, Lotyšsko),

elektroforéza (Bio-Rad),

UV transiluminátor s kamerou Infinity-3026 (Vilber, ZAC de Lamirault, Francie),

nanofotometr (Implen, Mnichov, Německo),

přístroj AGFA (Healthcare, Mortsels, Belgie),
Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, Darmstadt, Německo),
mikroskop Nikon Elipse TS 100 (Nikon, Minato, Japonsko),
PCR thermocykler (SensQuest, Göttingen, Německo),
hlubokomrazicí box -80 °C (ESCO, Horsham, PA, USA),
hlubokomrazicí box -150 °C (Ultra-Low Temperature freezer MDF-1156, Sanyo Electric Company, Ósaka, Japonsko),
lednice (Liebherr, Bulle, Švýcarsko),
multifunkční destičkový reader Synergy 2 (BioTek, Winooski, VT, USA),
multifunkční destičkový reader Spark (Tecan, Mänedorf, Švýcarsko),
laboratorní váhy CPA 225D (Sartorius, Göttingen, Německo),
výrobek ledu CB 249 A HC (Brema, Modletice, Česká republika),
Azure c280 (Azure biosystems, Dublin, CA, USA).

3.5 Vypracování metodické práce

Optimalizace nukleotidové sekvence genu BACE1, ACHE a BCHE a návrh primerů provedla Mgr. Monika Schmidt, Ph.D.

Veškeré práce počínaje amplifikací genu BACE1, ACHE a BCHE až po expresi proteinů v Expi293F buňkách proběhly na Katedře molekulární patologie a biologie FVZ UO. Následná purifikace, identifikace a validace kinetických vlastností enzymů BACE1, AChE a BChE byly provedeny na KTVF FVZ UO.

3.6 Produkce lidské rekombinantní BACE1 v Expi293F buňkách

3.6.1 Amplifikace genu BACE1

3.6.1.1 Gen

Sekvence genu lidské BACE1 (isoforma A) o velikosti 1545 páru bází (bp) byla získána z databáze UniProt Knowledgebase (P56817). Tato sekvence byla optimalizována pro expresi v daném expresním systému a syntetizovaná *de novo* jako

DNA fragment firmou GeneArt™ gene synthesis service. Obrázek 6 znázorňuje AMK sekvenci BACE1 o celkové délce 501 AMK.

10	20	30	40	50
MAQALPWLLL	WMGAGVLP AH	GTQHGIRLPL	RSGLGGA PLG	LRLPRETDEE
60	70	80	90	100
PEEPGRRGSF	VEMVDNLRGK	SGQGYVEMT	VGSP PQTLNI	LVDTGSSNFA
110	120	130	140	150
VGAAPHFPLH	RYYQRQLSST	YRDLRKG VYV	PYTQ GKWEGE	LGTDLVSIPH
160	170	180	190	200
GPNVTVRANI	AAITESDKFF	INGSNWEGIL	GLAYAEIARP	DDSLEPFFDS
210	220	230	240	250
LVKQTHV PNL	FSLQLCGAGF	PLNQSEVLAS	VGGSMIIGGI	DHSLYTGSLW
260	270	280	290	300
YTPIRREWYY	EVIIIVRVEIN	GQDLKMDCKE	YNYDKSIVDS	GTTNLR LPRK
310	320	330	340	350
VFEAAVKS IK	AASSTEKFPD	GFWLGEQLVC	WQAGTTPWNI	FPVISLYLMG
360	370	380	390	400
EVTNQSF RIT	ILPQQYLRPV	EDVATSQDDC	YKFAISQSST	GTVMGAVIME
410	420	430	440	450
GFYVVFDRAR	KRIGFAVSAC	HVHDEFRTAA	VEGPFVTLDM	EDCGYNIPQT
460	470	480	490	500
DESTLMTIAY	VMAAICALFM	LPLCLMVCQW	RCLRCLRQQH	DDFADDISLL
K				



Obrázek 6 – Sekvence BACE1 v délce 501 AMK a molekulové hmotnosti 55,764 kDa (převzato z databáze UniProt Knowledgebase)

3.6.1.2 Amplifikace DNA

Pro amplifikaci DNA byly navrženy specifické oligonukleotidy (primery; Tabulka 4), které zavedly Kozakovu sekvenci na 5' konec genu spolu se sekvencí pro histidinovou kotvu na 3' konec genu BACE1. Pomocí specifických primerů bylo připraveno celkem sedm fragmentů DNA o odlišných délkách kódující různé kombinace domén proteinu BACE1. Finální sekvence obsahující konstrukty lidské BACE1 o různých velikostech byly syntetizovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Složení PCR reakce je popsáno v tabulce 5 a teplotní parametry nastavené pro amplifikaci jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 4 – Sekvence primerů

BACE1 22-501 AMK	
Forward primer	CCACCATGACACAGCACGGAATCAGACT
Reverse primer	TCAATGGTGATGATGGTGGTG
BACE1 46-501 AMK	
Forward primer	CCACCATGGAGACAGACGAGGAACCTG
Reverse primer	TCAATGGTGATGATGGTGGTG
BACE1 22-454 AMK	
Forward primer	CCACCATGACACAGCACGGAATCAGACT
Reverse primer	TTAATGGTGATGGTGGTGGTGGTTCGACGGCGCT ATTGTCATCAGGGTGCTCTC
BACE1 46-454 AMK	
Forward primer	CCACCATGGAGACAGACGAGGAACCTG
Reverse primer	TTAATGGTGATGGTGGTGGTGGTTCGACGGCGCT ATTGTCATCAGGGTGCTCTC
BACE1 22-454 AMK + sekreční signál	
Forward primer	CCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGG TACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA

	CACACAGCACGGAATCAGA
Reverse primer	TTAATGGTGATGGTGATGGTGGTTCGACGGCGCT ATTTGTCATCAGGGTGCTCTC
BACE1 46-454 AMK+ sekreční signál	
Forward primer	CCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGG TACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA CGAGACAGACGAGGAACCT
Reverse primer	TTAATGGTGATGGTGATGGTGGTTCGACGGCGCT ATTTGTCATCAGGGTGCTCTC
BACE1 1-501 AMK	
Forward primer	CCACCATGGCTCAGGCTCT
Reverse primer	TCAATGGTGATGATGGTGGTG

Tabulka 5 – Složení PCR reakce

Složka	Množství (μl)
DNA templát, 10ng.μl ⁻¹	2,5
10x koncentrovaný reakční pufr	2,5
dNTP – deoxynukleosidtrifosfát 10 mM	0,65
Primer reverse 10 μM	0,5
Primer forward 10 μM	0,5
PFU Ultra II DNA polymerasa	0,5
Destilovaná voda	17,85
Celkový objem směsi	25

Tabulka 6 – Průběh amplifikační PCR reakce

Fáze	Teplota (°C)	Čas	Opakování
1.	95	2 minuty	1
2.	95	20 sekund	30
	56	20 sekund	
	72	45 sekund	
3.	72	3 minuty	1
4.	4	∞	1

3.6.1.3 Izolace amplifikované DNA

Amplifikovaná DNA byla izolována pomocí preparativní gelové elektroforézy. Pro zjištění velikosti amplifikované DNA byl použit standard Generuler 1kb DNA ladder se známou velikostí jednotlivých fragmentů. Byla připravena 1% agaróza SeaKem GTG v TAE (Tris + EDTA) pufru, do které bylo přidáno barvivo Syber Safe DNA gel stain, jež se váže na DNA a obarví ji. Na 10 ml roztoku byl přidán 1 µl barviva. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V po dobu 30 minut a DNA v gelu byla vizualizována pomocí UV transiluminátoru. Fragment s odpovídající velikostí byl pod UV lampou vyříznut z gelu a zvážen. Izolace DNA probíhala pomocí QIAquick gel extrakčního kitu. Při práci bylo postupováno v souladu s návodem výrobce a všechny centrifugační kroky probíhaly po dobu 1 minuty při 14 000 x g. K fragmentu gelu bylo na každých 100 mg jeho váhy přidáno 300 µl QG pufru. Vzorek byl 10 minut zahříván při teplotě 50 °C a v průběhu zahřívání byl každé 2 minuty promíchán. Po rozpuštění agarózy bylo do směsi na každých 100 mg gelu přidáno 100 µl isopropanolu. Vzniklá směs byla nanášena postupně na kolonu z kitu pomocí centrifugace. Kolona byla promyta nejprve 500 µl QG pufru a následně 750 µl PE pufru. Následně byla kolona přemístěna do čisté 1,5 zkumavky a pomocí 30 µl destilované H₂O byla DNA centrifugací eluována. Takto připravená DNA byla poté ihned použita pro topoklonování.

3.6.1.4 Topoklonování

Pro úspěšné klonování bylo nutné vyizolovanou DNA (PCR produkt) upravit přidáním adenosinu (3'- A přesahů) na obou 3' koncích. Ligační směs (Tabulka 7) byla zahřívána při teplotě ~72 °C po dobu 10–15 minut. Poté byl vzorek přemístěn na led.

Tabulka 7 – Ligační směs

Složka	Objem (μl)
PCR produkt	10
Taq pufr	2
Taq polymerasa	1
dATP	1

Pro topoklonování byl použit pcDNA 3.4-TOPO TA Cloning Kit. Topoklonovací směs byla namíchána dle doporučení výrobce kitu (Tabulka 8) a inkubována 10 minut při pokojové teplotě.

Tabulka 8 – Složení topoklonovací směsi

Složka	Objem (μl)
PCR produkt s A přesahy na 3' koncích	4
pcDNA 3.4 TOPO® vektor	1
Roztok soli	1
Celkový objem směsi	6

Z této směsi byly transformovány 2 μl do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10. Buňky byly po inkubaci s topoklonovací směsí transformovány metodou teplotního šoku (42 °C po dobu 30 sekund), okamžitě byly ochlazeny na 2 minuty

v ledové tříšti a k buňkám bylo přidáno 950 μl Super Optimal Broth (SOC) média. SOC medium je bakteriální růstové médium, které je bohaté na živiny a podporuje vyšší účinnost transformace plazmidů. Kultura buněk byla inkubována po dobu 1 hodiny při teplotě 37 °C, v třepačce za míchání při 200 rpm. Po inkubaci byly buňky vysety na selekční LB bakteriální plotny obsahující antibiotikum karbenicilin v koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ média. Petriho misky obsahující bakteriální kulturu byly obráceny dnem vzhůru a inkubovány přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C.

3.6.1.5 Izolace pozitivních kolonií

Druhý den po inkubaci byl sterilní špičkou proveden odpich několika kolonií. Buňky byly resuspendovány v 50 μl destilované H_2O a kultura byla rozdělena do dvou zkumavek: 30 μl vzorku bylo uchováno v lednici a 20 μl vzorku bylo povařeno 5 minut při 95 °C. Tento vzorek byl použit jako templátová DNA pro PCR reakci za použití PPP Master Mixu (Tabulka 9). Průběh reakce je uveden v tabulce 10. PCR na koloniích byla analyzována pomocí gelové elektroforéz a amplifikovaná DNA byla detekována pomocí UV transiluminátoru.

Tabulka 9 – Složení PCR reakce na koloniích

Složka	Objem (μl)
PPP master mix 2x	12,5
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
Templátová DNA	3
Destilovaná voda	7,5
Celkový objem směsi	25

Tabulka 10 – Průběh PCR na koloniích

Fáze	Teplota (°C)	Čas
1	94	1
2 (30 cyklů)	94	15
	55	15
	72	1 minuta 40 sekund
3	72	7 minut
4	4	∞

3.6.1.6 Izolace plazmidové DNA

Kultura PCR pozitivních kolonií byla inokulována do LB média s karbenicilinem (100 µg.ml⁻¹ média) a inkubována přes noc při 37 °C za míchání v třepačce při 200 rpm. Druhý den byly z narostlé bakteriální kultury připraveny bakteriální konzervy: 400 µl noční kultury bylo smícháno s 600 µl 50% glycerolu, který slouží jako kryoprotektivum. Tato konzerva byla skladována při -80 °C. Zbytek narostlé bakteriální kultury byl použit pro izolaci plazmidové DNA pomocí PureLink Quick plasmid Midiprep Kit. Při práci bylo postupováno podle návodu výrobce. Peleta odpovídající 5-10 ml bakteriální kultury kultivované přes noc (kultura ve stacionární fázi, noční kultura) byla resuspendována v 250 µl pufru R3. Ke vzorku bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru. Zkumavka byla jemně promíchána a inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Ke vzorku bylo přidáno 350 µl precipitačního pufru, zkumavka byla promíchána a 10 minut centrifugována při 12 000 × g. Supernatant byl přepipetován do kolony a centrifugován 1 minutu za stejných podmínek. Ke vzorku bylo přidáno 500 µl promývacího pufru. Následně byl 1 minutu inkubován při laboratorní teplotě a poté 1 minutu centrifugován při 12 000 × g. Dalším krokem bylo přidání 700 µl W9 pufru a centrifugace při 12 000 × g po dobu 1 minuty. Pro úplné odstranění veškerého W9 pufru byl vzorek centrifugován ještě jednou 1 minutu při 12 000 × g. Kolona se vzorkem byla umístěna do čisté zkumavky a DNA byla eluována 30 µl destilované H₂O. Vzorek byl 1 minutu inkubován při laboratorní teplotě a 2 minuty centrifugován při 12 000 × g.

Pro potvrzení správnosti DNA sekvence byl vzorek izolované plazmidové DNA sekvenován Sangerovou metodou na Mikrobiologickém ústavu Akademie věd České republiky (AV ČR). Zbytek izolované plazmidové DNA byl zamražen při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další použití.

3.6.1.7 Produkce plazmidové DNA pro expresi

Pro expresi rekombinantního proteinu bylo nutné izolovat plazmidovou DNA ve větším množství a vyšší čistotě. Pro izolaci byla použita noční bakteriální kultura o objemu 50 ml a izolace DNA byla provedena pomocí komerčního kitu PureLink HiPure Plasmid MidiPrep, kdy bylo postupováno podle doporučeného protokolu. Buňky byly centrifugovány při $4\ 000 \times g$ 10 minut. Peleta byla resuspendována v 4 ml resuspendačního pufru. K homogenizovanému vzorku byly přidány 4 ml lyzačního pufru. Vzorek byl jemně promíchán do vzniku kompaktní suspenze a dále 5 minut inkubován při laboratorní teplotě. Ke vzorku byly přidány 4 ml precipitačního pufru a směs byla ihned jemně promíchána. Vzorek byl centrifugován při $14\ 000 \times g$ 10 minut za laboratorní teploty. Supernatant byl nalit na ekvilibrovanou kolonu. Kolona byla 2krát promyta 10 ml promývacího pufru. Do sterilní zkumavky byla pomocí 5 ml elučního pufru eluována DNA. K eluátu bylo přidáno 3,5 ml isopropanolu, vzorek byl promíchán a zkumavka byla centrifugována při $14\ 000 \times g$ 30 minut za při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a k peletě byly přidány 3 ml 70% etanolu. Zkumavka byla centrifugována při $14\ 000 \times g$ 5 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a supernatant byl odstraněn. Izolovaná DNA byla 10 minut sušena na vzduchu a následně rozpuštěna ve 100 μl TE pufru. U izolované DNA byla stanovena její koncentrace a čistota a v ten samý den byla použita pro transfekce.

3.6.2 Kultivace a pasážování buněk

Kultura Expi293F buněk je komerčně dodávaná linie upravených Hek293 buněk, které jsou schopny růst v suspenzi do vysokého počtu buněk. Tyto buňky jsou vhodnými hostiteli pro přechodné transfekce pro produkci rekombinantních proteinů a protilátek a jejich kultivace probíhá v bezproteinovém a bezsérovém médiu. Po rozmražení byl 1 ml Expi293F buněk přidán k 29 ml předehřátého ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) Expi293 kultivačního média. Buňky byly kultivovány jako buněčná suspenze v jednorázových plastových Erlenmeyerových sterilních lahvích s trny a s ventilačním otvorem

v inkubátoru při teplotě 37 °C v atmosféře obsahující 8 % CO₂. Orbitální třepačka umístěná v inkubátoru a trny Erlenmeyerovy baňky zajišťovaly neustálý pohyb suspenze při rychlosti 130 rpm. Množství buněk a jejich viabilita byla sledována s využitím mikrokapilárního průtokového cytometru Muse. Muse reagentie odlišně barví viabilní a mrtvé buňky na základě jejich propustnosti pro dvě barviva vázající DNA, která jsou přítomná v činidle.

Buňky byly kultivovány do maximálního množství 5×10^6 buněk na 1 ml média. Pro expresi rekombinantního proteinu bylo $7,5 \times 10^7$ buněk centrifugováno při $500 \times g$ při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Získaná peleta byla rozpuštěna v 25,5 ml čerstvého Expi293 média a takto připravená suspenze buněk byla použita pro expresi rekombinantního proteinu BACE1. Zbytek buněk byl použit pro následnou produkci či uchován jako zásobní buněčné kultury při teplotě -150 °C.

3.6.3 Exprese lidské rekombinantní BACE1

Exprese lidské rekombinantní BACE1 (1-501 AMK) probíhala pomocí ExpiFectamine 293 transfekčního kitu podle doporučeného pracovního postupu výrobcem pro kulturu o objemu 30 ml. Plazmidová DNA o koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ transfekce byla naředěna v OPTI-MEM I médiu s redukováným sérem do celkového objemu 1,5 ml. Současně bylo 81 μl ExpiFectamine 293 činidla naředěno v OPTI-MEM do celkového objemu 1,5 ml. Oba roztoky byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě. Po této době byly roztoky pozvolna spojeny a inkubovány dalších 20 minut při laboratorní teplotě. Tato směs byla přidána k suspenzi Expi293F buněk o koncentraci $7,5 \times 10^7$ v 25,5 ml přehřátého Expi293 kultivačního média. Transfekované buňky byly inkubovány při teplotě 37 °C, míchány pomocí orbitální třepačky rychlostí 130 rpm v atmosféře 8 % CO₂ a relativní vlhkosti 95 % v inkubátoru. Po 20 hodinách od transfekce byla přidána směs zesilovačů transfekce 1 (150 μl) a 2 (1350 μl) v celkovém objemu 1,5 ml. Objem transfekce, tak dosáhl 30 ml. Po třech až sedmi dnech byly buňky centrifugovány při $1\,000 \times g$ při laboratorní teplotě 15 minut. Z buněčné pelety byl izolován enzym.

3.6.4 Izolace lidské rekombinantní BACE1

3.6.4.1 Izolace BACE1- fragment 1 - 501 AMK

Pro izolaci BACE1 z buněčné pelety byl použitý Mem-PER Plus membránový proteinový extrakční kit. Tento kit obsahoval promývací, permeabilizační a solubilizační pufr. Izolace probíhala podle doporučeného pracovního postupu s několika drobnými úpravami. Peleta byla resuspendována v 3 ml promývacího pufru a centrifugována při $1\ 000 \times g$ při teplotě $4\ ^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut. Tento postup byl opakován 3krát. Poté byly k vzniklé peletě buněk přidány 3 ml permeabilizačního pufru. Takto upravený vzorek byl promíchán a inkubován v termotřepačce za míchání 300 rpm při teplotě $4\ ^\circ\text{C}$ po dobu 10 minut. Po uplynutí této doby byl vzorek centrifugován při $18\ 600 \times g$ při $4\ ^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut. Supernatant obsahující cytosolické proteiny byl odstraněn a ke vzorku byly přidány 3 ml solubilizačního pufru. Peleta byla resuspendována pipetováním a inkubována za míchání 300 rpm při teplotě $4\ ^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut v termotřepačce. Suspenze buněk byla centrifugována při $18\ 600 \times g$ teplotě $4\ ^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut. Supernatant, který obsahoval lidskou rekombinantní BACE1, byl odebrán pro další zpracování.

3.6.4.2 Izolace BACE1 fragmentu 22 - 501 AMK, 46 - 501 AMK, 22 - 454 AMK, 46 - 454 AMK, 22 - 454 AMK + sekreční signál a 46 - 454 AMK + sekreční signál

Ve snaze získat výše uvedené fragmenty proteinu BACE1 enzymaticky aktivní, byly použity následující způsoby izolace enzymu z buněk: lyzace buněk pomocí pufrů, sonikace buněk ultrazvukovou sondou, centrifugace, mechanické narušení membrány buněk a pufrů obsahující tenzidy.

Byl připraven lyzační pufr obsahující: 137 mM NaCl, 10 % glycerol, 1 % *N*-octyl- β -D-glukopyranosid, 50 mM NaF v 20mM Tris pufru o pH 8,0. Na 10 ml roztoku byla přidána 1 tableta inhibitorů proteas. K 0,5 ml buněčné suspenze byl přidán 1 ml lyzačního pufru (objem pufru se zvyšoval s objemem buněk). Vzorek byl resuspendován a ponechán v klidu stát 30 minut na ledu. Poté byly buňky mechanicky rozrušeny protažením pístem injekční jehly. Následně byl vzorek centrifugován 20 minut při $16\ 300 \times g$ při $4\ ^\circ\text{C}$. Postupně byl neionický detergent *N*-octyl- β -D-glukopyranosid, který je doporučován pro solubilizaci a izolaci

membránových proteinů nahrazen jinými detergenty, byl použit např. Triton X-100, Tween 20, CHAPS nebo saponin. Místo mechanického rozrušení buněk byl použit ultrazvukový homogenizátor, kdy resuspendovaný vzorek buněk v lyzačním pufru byl sonikován krátkými 15 sekundovými pulzy celkem 2 minuty. Vzorek byl chlazen na ledu.

3.6.4.3 Stanovení koncentrace proteinu

V buněčném lyzátu byl stanoven celkový obsah proteinů pomocí kolorimetrické metody, která je založena na redukci měďnatého iontu po reakci s peptidovou vazbou, na měďný a jeho následné reakci s kyselinou bicinchoninovou (BCA). Protein Assay komerční kit byl použit pro vlastní měření. Standardem byl hovězí sérový albumin (BSA), který byl součástí kitu, v koncentračním rozmezí 1 až 200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorky i standard byly ředěny 0,1M fosfátovým pufrům (FP) pH 7,4. Pracovní roztok byl připraven smícháním roztoků A, B a C podle doporučeného postupu výrobce. Do jamky mikrotitrační desky bylo napipetováno 150 μl pracovního roztoku a 150 μl naředěného lyzátu. Směs byla promíchána a inkubována 2 hodiny při 37 °C. Barevná změna byla měřena spektrofotometricky v 96jamkových mikrotitračních destičkách pomocí multifunkčního destičkového readeru Synergy při vlnové délce 562 nm.

3.6.5 Purifikace lidské rekombinantní BACE1

BACE1 byla purifikována pomocí afinitní chromatografie s využitím kobalt-imobilizované karboxymetylasparatové pryskyřice (Co-IMAC). Do 20 ml Econo-Pac kolony byly odměřeny 2 ml Co-IMAC pryskyřice, která byla promyta 10 ml 20mM Tris pufrům o pH 7,5 a ekvilibrována vazebným pufrům obsahujícím 10 mM imidazol v 20mM Tris pufru o pH 7,5. Supernatant obsahující lidskou BACE1 o objemu 3 ml byl přidán k pryskyřici a doplněn na objem 10 ml ekvilibračním pufrům. Kolona byla inkubována na Mini Rocker MR/1 kývačce při 4 °C přes noc. Druhý den byl roztok z kolony vypuštěn a kolona byla promyta 20mM Tris pufrům pH 7,5, 25 a 50mM roztokem imidazolu v 20mM Tris pufru pH 7,5. BACE1 byla eluována 250mM roztokem imidazolu v 20mM Tris pufru pH 7,5 o objemu 3 ml. Eluát byl dialyzován 3x v dialyzační kazetě Slide-A-Lyzer (MW 10.000) v 20mM Tris pufru pH 7,5, který byl vždy po 2 hodinách vyměněn. Koncentrace lidské rekombinantní BACE1 byla stanovena dle postupu v kapitole 3.5.4.2. Enzym byl zmražen v hlubokomrazícím boxu

na -80 °C. Druhý den byla provedena lyofilizace proteinu v ALPHA 1-4 LSC lyofilizátoru. První sušící fáze probíhala při teplotě -5 °C, která byla zaznamenána na desce lyofilizátoru a vakuu 0,52 mbar po dobu 8 hodin. Druhá sušící fáze byla při teplotě 4 °C a vakuu 0,001 mbar po dobu 1 h. Lyofilizovaný enzym byl skladován v hlubokomrazícím boxu na -80 °C.

3.6.6 Analýza proteinů gelovou elektroforézou a western blot

3.6.6.1 Gelová elektroforéza

Purifikovaný protein byl analyzován 12% polyakryl gelovou elektroforézou v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Složení použitých gelů je uvedeno v tabulce 11 a tabulce 12. Tato metoda využívá k rozdělení proteinu jeho elektroforetické pohyblivosti, která závisí na délce polypeptidového řetězce, na jeho molekulární hmotnosti a dalších faktorech.

Tabulka 11 – Složení 12% separačního gelu (pro dva mini gely)

Složka	Objem
destilovaná voda	5 ml
1,5M Tris - HCl pH 8,8	3,8 ml
40% akrylamid	6,0 ml
10% SDS	150 µl
10% APS	50 µl
TEMED	6 µl

Tabulka 12 – Složení 4% zaostřovacího gelu (pro dva mini gely)

Složka	Objem
destilovaná voda	3,05 ml
0,5M Tris - HCl pH 6,8	1,25 ml
40% akrylamid	0,65 ml
10% SDS	50 μ l
10% APS	25 μ l
TEMED	5 μ l

Vzorkový pufr o objemu 85 μ l (Tabulka 13, uchovávan při -20 °C) byl smísen s 15 μ l β -merkaptoetanolu. Vzorek byl smísen v poměru 2 díly vzorku s 1 dílem vzorkového pufru a povařen při teplotě 95 °C po dobu 5 minut. Vzorky o objemu 30 μ l a 5 μ l hmotnostního markeru (Precision Plus Protein kaleidoskop) byly naneseny na gel. Elektroforéza probíhala v prostředí elektrodového pufru pH 8,5 (Tabulka 14) za konstantního napětí 200 V, proudu 60 mA na 1 gel po dobu ~1 hodiny.

Tabulka 13 – Složení vzorkového pufru

Složka	Množství
0,5M TRIS - HCl pH 6,8	3,75 ml
glycerol	3 ml
SDS	0,69 g
destilovaná voda	do celkového objemu 8,5 ml

Tabulka 14 – Složení elektrodového pufru

Složka	Množství (g)
50 mM Tris - báze	15
384 mM glycinu	72
0,1 % SDS	2,5
destilovaná voda	do celkového objemu 2,5 l

Po skončení elektroforézy byl gel opláchnut destilovanou vodou a barven na modro po dobu 10 minut (Tabulka 15) a poté byl odbarvován odbarvovacím roztokem (Tabulka 16).

Tabulka 15 – Složení roztoku pro modření gelů

Složka	Množství
Comassie Brillant Blue R 250	1,25 g
metanol	227 ml
kyselina octová	46 ml
destilovaná voda	do celkového objemu 500 ml

Tabulka 16 – Složení odbarvovacího roztoku

Složka	Množství (ml)
metanol	300
kyselina octová	100
destilovaná voda	600

3.6.6.2 Western blot

Gel byl před analýzou western blot promyt 10 minut transfer pufrem (Tabulka 17). Polyvinylfluoridová membrána byla aktivována smočením v metanolu po dobu 1 minuty a následně spolu s filtračními papíry byla 3krát po 10 minutách promyta transfer pufrem. Na anodu byl postupně na sebe navrstven originální filtrační papír, membrána, gel a 5 ks filtračních papírů. Vše bylo stlačeno válením pomocí zkumavky. Přenos gelu na membránu probíhal za konstantního proudu 0,17 A a maximálního napětí 25 V. Doba přenosu byla 30 minut na 2 membrány.

Tabulka 17 – Složení transfer pufru

Složka	Množství
25 mM Tris - báze	15,15 g
192 mM glycinu	72 g
metanol	1000 ml
destilovaná voda	do celkového objemu 5000 ml

Membrána byla po blotu promyta TBS pufrem (Tabulka 18) při laboratorní teplotě a následně 1 hodinu blokována v 5% sušeném mléce, které bylo rozpuštěno v TBS pufru s obsahem 0,05% Tween 20. Membrána byla promyta v tomto pufru 3krát po 5 minutách. Protilátka proti histidinové kotvě byla naředěna v 5% mléce, které bylo rozpuštěno v TBS pufru s 0,05 % Tween 20 v poměru 1:5 000. Inkubace membrány s protilátkou probíhala ~2 hodiny a následné promytí membrány v 10 ml TBS s 0,05% Tween 20 bylo provedeno ve falkonce umístěné v Mini rotátoru. Promývací krok byl opakován 5krát po 5 minutách. V posledním kroku byla membrána promyta v TBS pufru po dobu 5 minut. Vazba Anti-His protilátky na protein byla vizualizována pomocí BM chemiluminescenčního western blotting kitu. Při práci bylo postupováno podle návodu výrobce. Roztok A o objemu 3,2 ml byl smísen s 32 ml roztoku B a ponechán po dobu 30 minut ve tmě. Membrána byla ihned po promývacích krocích smočena na 1 minutu v 1,6 ml připraveného chemiluminescenčního roztoku. Poté byla vložena

mezi celofán, který byl umístěný v rentgenologické (RTG) kazetě. Do RTG kazety byl vložen modrocitlivý film na 1 minutu a následně vyvolán pomocí automatu AGFA. Později byl pro detekci chemiluminiscence a SDS-PAGE použitý přístroj Azure c280.

Tabulka 18 – Složení základního 10× koncentrovaného TBS pufru o pH 7,6 pro western blot

Složka	Množství
20 mM Tris – báze	48,8 g
137 mM NaCl	160 g
destilovaná voda	do celkového objemu 2000 ml

3.6.7 Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní BACE1

3.6.7.1 Stanovení aktivity

Aktivita lidské rekombinantní BACE1 byla měřena technologií přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET) fluorometrickou instrumentací s použitím substrátu 7-methoxykumarinu-4-acetyl-[Asn670, Lue671]-amyloidu β /A4 prekursorového proteinu 770 fragmentu 667-676-(2,4-dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amidu trifluoroctové soli. Enzym byl naředěn v 0,1M FP pH 7,4 o finální koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. V průběhu měření byl enzym uchováván na ledu. Vzorek pro měření o objemu 100 μl obsahoval 10 μl roztoku enzymu, 80 μl 20 mM acetátového pufru o pH 4,5, 0,1 % Triton X-100 a 10 μl 0,25 μM substrátu. Reakce byla měřena ihned po přidání substrátu v 96jamkových černých destičkách s plochým dnem při excitatační a emisní vlnové délce 330 nm a 390 nm a teplotě 37 °C. V průběhu 15 minut byl každých 30 sekund odečten fluorescenční signál. Experiment byl proveden v triplicátu a opakován třemi nezávislými měřeními. Specifická aktivita byla stanovena jako průměr měření \pm SEM ($\text{RFU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$).

3.6.7.2 Stanovení IC₅₀ standardního inhibitoru BACE1

Vzorek pro měření o objemu 100 µl obsahoval 10 µl roztoku enzymu, 70 µl 20 mM acetátového pufru o pH 4,5, 0,1 % Triton X-100 a 10 µl roztoku inhibitoru dané koncentrace. Inhibice probíhala 5 minut při 37 °C. Reakce byla započata přidáním 10 µl 0,25 µM substrátu, měření proběhlo v 96jamkových černých destičkách s plochým dnem při excitační a emisní vlnové délce 330 nm a 390 nm a teplotě 37 °C. V průběhu 2 hodin byl každých 30 sekund odečten fluorescenční signál. Experiment byl proveden v triplicátu na multifunkčním destičkovém readeru Spark. Pro statistické hodnocení naměřených dat byl použit program GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

3.7 Produkce lidské rekombinantní AChE v Expi293F buňkách

3.7.1 Amplifikace genu AChE

3.7.1.1 Gen ACHE

Sekvence genu lidské ACHE o velikosti 1 878 bp byla získána z databáze UniProt Knowledgebase (P22303). Tato sekvence byla optimalizována pro expresi v daném expresním systému a syntetizována *de novo* jako DNA fragment firmou firmou GeneArt™ gene synthesis service. Obrázek 7 znázorňuje AMK sekvenci AChE o celkové délce 614 AMK.

```

10      20      30      40      50
MRPPQCLLHT PSLASPLLLL LLWLLGGGVG AEGREDAELL VTVRGGRLRG
60      70      80      90      100
IRLKTGGGPV SAFLGIPFAE PPMGPRRFLP PEPKQPWSGV VDATTFQSVC
110     120     130     140     150
YQYVDTLYPG FEGTEMWNPV RELSEDCLYL NVWTPYPRPT SPTPVLVWIY
160     170     180     190     200
GGGFYSGASS LDVYDGRFLV QAERTVLVSM NYRVGAFGFL ALPGSREAPG
210     220     230     240     250
NVGLLDQRLA LQWVQENVAA FGGDPTSVTL FGESAGAASV GMHLLSPPSR
260     270     280     290     300
GLFHRAVLQS GAPNGPWATV GMGEARRRAT QLAHLVGCPP GGTGGNDTEL
310     320     330     340     350
VACLRTSPAQ VLVNHEWHVL PQESVFRFSF VPVVDGDFLS DTPEALINAG
360     370     380     390     400
DFHGLQVLVG VVKDEGSYFL VYGAPGFSKD NESLISRAEF LAGVRVGVPO
410     420     430     440     450
VSDLAAEAVV LHYTDWLHPE DPARLREALS DVVGDHNVVC PVAQLAGRLA
460     470     480     490     500
AQGARVYAYV FEHRASTLSW PLWMGVPHGY EIEFIFGIPL DPSRNYTAAE
510     520     530     540     550
KIFAQRLMRY WANFARTGDP NEPRDPKAPQ WPPYTAGAQQ YVSLDLRPLE
560     570     580     590     600
VRRGLRAQAC AFWNRFLPKL LSATDTLDEA ERQWKAEFHR WSSYMHVWKN
610
QFDHYSKQDR CSDL

```

Obrázek 7 – Sekvence AChE v délce 614 AMK a molekulové hmotnosti 67,796 kDa (převzato z databáze UniProt Knowledgebase)

3.7.1.1 Amplifikace AChE

Pro amplifikaci DNA byly navrženy specifické primery (Tabulka 19), které zavedly Kozakovu sekvenci na 5' konec genu spolu se sekvencí pro histidinovou kotvu na 3' konec sekvence genu ACHE. Pomocí těchto specifických primerů byl připraven fragment lidské AChE o velikosti 1 878 bp. Produkce probíhala postupem popsáním v kapitole 3.5.1.2 až 3.5.1.8.

Tabulka 19 – Sekvence primerů

AChE	
Forward primer	ACCATGAGGCCTCCACAGT
Reverse primer	TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGACCACCTCCACT TCCTCCTCCTCCCAGATCGCTGCACCGGTC

3.7.2 Exprese lidské rekombinantní AChE

Exprese lidské rekombinantní AChE probíhala postupem popsáným v kapitole 3.5.3. Jelikož se jednalo o expresi proteinu sekretovaného do média, byla suspenze buněk 7. dne centrifugována při $500 \times g$ teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut. Supernatant byl oddělen od pelety a uskladněn v hlubokomrazícím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo byl enzym ihned purifikován.

3.7.3 Purifikace lidské rekombinantní AChE

Purifikace lidské rekombinantní AChE probíhala dle postupu popsáného Carletti a kolektivem s drobnými modifikacemi (Carletti et al. 2010). Supernatant byl naředěn 20mM Tris pufrem o pH 7,5 na aktivitu enzymu $\sim 2,000\text{ }\Delta A_{412}\cdot\text{min}^{-1}$ a dialyzován v dialyzační kazetě Slide-A-Lyzer (MW 10.000) 20mM Tris pufrem o pH 7,5 při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po 2 hodinách byl pufr vyměněn a tento proces se zopakoval 3krát. Sefarosa4B/prokainamid pryskyřice byla napipetována do 20 ml Econo-Pac kolony. Na 8 ml supernatantu byly použity 2 ml pryskyřice. Objem pryskyřice se zvyšoval s objemem supernatantu. Kolona s pryskyřicí byla ekvilibrována 10 ml 20mM Tris pufrem s 0,3 M NaCl o pH 7,5. Supernatant o objemu 8 ml byl přidán k pryskyřici, rolován na Mini Rocker MR/1 kývačce a inkubován při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. V průběhu vazby enzymu na pryskyřici byl sledován pokles aktivity enzymu modifikovanou Ellmanovou metodou (postup měření popsán v kapitole 3.6.5.1). Jakmile již nebyla pozorována žádná aktivita, byl roztok z kolony vypuštěn. Navázaná AChE byla nejprve promyta 20mM Tris pufrem o pH 7,5 a poté stejným pufrem, který v první eluci obsahoval 0,1M NaCl a v druhé 0,3M NaCl. Následně byl enzym z pryskyřice uvolněn pomocí 8 ml elučního roztoku o pH 7,5 (Tabulka 20). Objem elučního roztoku se zvyšoval s objemem supernatantu. Eluát byl dialyzován 3krát v dialyzační kazetě Slide-A-Lyzer (MW 10.000) v 20mM Tris pufru o pH 7,5. Roztok pufru byl vždy po 2 hodinách vyměněn. Enzym byl zmražen v hlubokomrazícím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Druhý den byla provedena lyofilizace proteinu v ALPHA 1-4 LSC lyofilizátoru. Lyofilizace probíhala postupem popsáným v kapitole 3.5.5.

Tabulka 20 – Složení elučního roztoku

Složka	Množství (g)
20 mM Tris-báze	2,422
1 M NaCl	58,44
10 mM TMAI	2,105
1 mM DMB	0,418

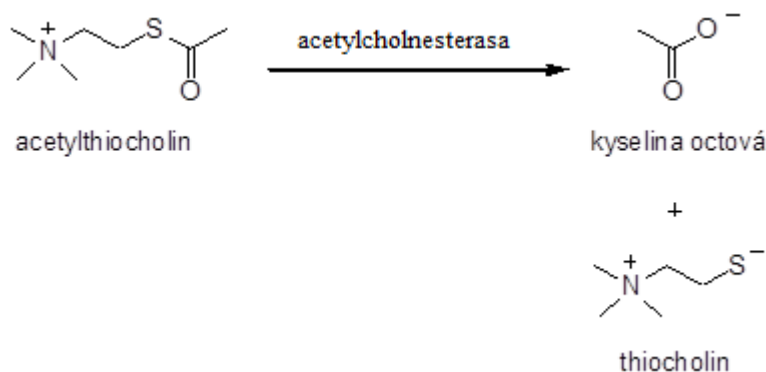
3.7.4 Analýza proteinů gelovou elektroforézou a western blot

Analýza proteinů gelovou elektroforézou a western blot probíhala postupem popsaným v kapitole 3.5.6.

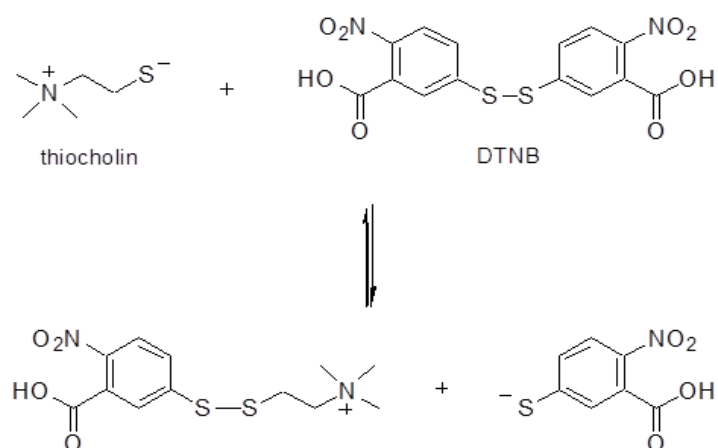
3.7.5 Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní AChE

3.7.5.1 Princip Ellmanovy metody

Aktivita AChE byla stanovena pomocí modifikované kolorimetrické metody dle Ellmana (Ellman et al. 1961). Princip této metody je založen na hydrolýze ATChI katalytickým působením AChE za vzniku kyseliny octové a thiocholinu (Obrázek 8). Thiocholin obsahuje ve své molekule SH skupinu, která reaguje s DTNB. Thiocholin redukuje disulfidický můstek a sám se váže na jednu vzniklou -SH skupinu (Obrázek 9). U uvolněného 5-merkaptu-2-nitrobenzoového aniontu (TNB) dochází ke konjugaci dvojných vazeb (Obrázek 10). Žlutě zbarvený chromofor (5-thio-2-nitrobenzoový aniont) je spektrofotometricky detekován při vlnové délce 412 nm.



Obrázek 8 – Rozštěpení ATChI acetylcholinesterasou



Obrázek 9 – Redukce S-S můstku a vazba thiocholinu na DTNB



Obrázek 10 – Konjugace dvojných vazeb kyseliny 5-merkapt-2-nitrobenzoové

3.7.5.2 Stanovení aktivity

AChE byla naředěna 0,1M FP pH 7,4 a stabilizována přidáním lidského albuminu 1 mg na 1 ml roztoku. V průběhu měření byl enzym uchovávan v ledové tříšti. Aktivita lidské rekombinantní AChE byla měřena v 96jamkových čirých destičkách s plochým dnem. Do testovacích jamek bylo pipetováno 10 μ l roztoku AChE, 50 μ l 0,1M FP o pH 7,4, 20 μ l 2,5mM DTNB. Obsah titrační destičky byl promíchán a destička byla vložena do spektrofotometru, kde byla po dobu 5 minut inkubována při 37 °C za kontinuálního protřepávání. Po uplynutí inkubační doby byla reakce odstartována přidáním 20 μ l substrátu 10mM ATChI. Změna absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm. Experiment byl proveden v triplicátu a byl opakován třemi nezávislými měřeními. Pro statistické hodnocení naměřených dat byl použit program GraphPad Prism 5

3.7.5.3 Stanovení Michaelisovy konstanty

Michaelisova konstanta byla změřena výše popsanou modifikovanou Ellmanovou metodou. Tato konstanta charakterizuje afinitu enzymu k substrátu a je pro každý substrát specifická. Pro její zjištění je sledována závislost rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu. Byly připraveny různé koncentrace substrátu ATChI, které byly proměřeny v triplikátu a opakovány třemi nezávislými měřeními. Pro statistické hodnocení naměřených dat byl použit program GraphPad Prism 5.

3.7.5.4 Stanovení IC₅₀ standardního inhibitoru AChE

Jako standard byl vybrán reverzibilní nekompetitivní inhibitor donepezil, který vykazuje vysokou inhibiční selektivitu vůči AChE. Pro vlastní experiment byly připraveny vzorky inhibitoru v koncentračním rozmezí od 10^{-3} do 10^{-9} M v destilované H₂O. Aktivita lidské rekombinantní AChE byla měřena v 96jamkových čirých destičkách s plochým dnem. Do testovacích jamek bylo pipetováno 10 μ l roztoku AChE, 40 μ l 0,1M FP pH 7,4, 20 μ l 2,5mM DTNB a 10 μ l inhibitoru dané koncentrace. Obsah titrační destičky byl promíchán a destička byla vložena do spektrofotometru, kde probíhala po dobu 5 minut inhibice enzymu při 37 °C za kontinuálního protřepávání. Po uplynutí inkubační doby byla reakce započata přidáním 20 μ l substrátu (10mM ATChI). Změna absorbance byla měřena při vlnové délce 412 nm. Experiment byl proveden v triplikátu a opakován třemi nezávislými měřeními. Pro statistické hodnocení naměřených dat byl použit program GraphPad Prism 5.

3.8 Produkce lidské rekombinantní BChE v Expi293F buňkách

3.8.1 Amplifikace genu BCHE

3.8.1.1 Gen BCHE

Sekvence genu lidské BCHE o velikosti 1 842 bp byla získána z databáze UniProt Knowledgebase (P06276). Tato sekvence byla optimalizována pro expresi v daném expresním systému a syntetizována *de novo* jako DNA fragment firmou GeneArt™ gene synthesis service. Obrázek 11 ukazuje AMK sekvenci BChE v délce 602 AMK.

```

      10          20          30          40          50
MHSKVTIICI RFLFWFLLLC MLIGKSHTED DIIIATKNGK VRGMNLTVFG
      60          70          80          90         100
GTVTAFLGIP YAQPPLGRLR FKKPQSLTKW SDIWNATKYA NSCCQNIDQS
      110         120         130         140         150
FPGFHHGSEM NPNTDLSEDC LYLNWVWIPAP KPKNATVLIW IYGGGFQGTGT
      160         170         180         190         200
SSLHVDGKFL ARVERVIVV SMNYRVGALG FLALPGNPEA PGNMGLFDQQ
      210         220         230         240         250
LALQWVQKNI AAFGGNPKSV TLFGESAGAA SVSLHLLSPG SHSLFTRAIL
      260         270         280         290         300
QSGSFNAPWA VTSLYEARNR TLNLAKLTGC SRENETEIIK CLRNKDPQEI
      310         320         330         340         350
LLNEAFVVPY GTPLSVNFPG TVDGDFLTDM PDILLELGQF KKTQILVGVN
      360         370         380         390         400
KDEGTAFLVY GAPGFSKDNN SIITRKEFQE GLKIFFPGVS EFGKESILFH
      410         420         430         440         450
YTDWVDDQRP ENYREALGDV VGDYNFICPA LEFTKKFSEW GNNAFFYYFE
      460         470         480         490         500
HRSSKLPWPE WMGVMHGYEI EFVFGLEPLER RDNYTKAEEI LSRSIVKRWA
      510         520         530         540         550
NFAKYGNPNE TQNNSTSWPV FKSTEQKYL T LNTSTRIMT KLRAQQCRFW
      560         570         580         590         600
TSFFPKVLEM TGNIDEAEWE WKAGFHRWNN YMDWKNQFN DYTSKKEESC

```

GL

Obrázek 11 – Sekvence BChE v délce 602 AMK a molekulové hmotnosti 68,418 kDa (převzato z databáze UniProt Knowledgebase)

3.8.1.2 Amplifikace BChE

Pro amplifikaci DNA byly navrženy specifické primery (Tabulka 21), které zavedly Kozakovu sekvenci na 5' konec genu spolu se sekvencí pro histidinovou kotvu na 3' konec sekvence genu BCHE. Pomocí těchto specifických primerů byl připraven fragment lidské BChE o velikosti 1 842 bp. Produkce probíhala postupem popsáným v kapitole 3.5.1.2 až 3.5.1.8.

Tabulka 21 – Sekvence primerů

BChE	
Forward primer	CCACCATGCACAGCAAAGTGA
Reverse primer	TCAATGATGGTGGTGGTGGTGACCACCTCCACTT CCTCCTCCTCCCAGGCCACGCAGCTTTCTT

3.8.2 Exprese lidské rekombinantní BChE

Exprese lidské rekombinantní BChE probíhala postupem popsáním v kapitole 3.6.2.

3.8.3 Purifikace lidské rekombinantní BChE

Purifikace lidské rekombinantní BChE probíhala dle modifikovaného postupu (Onder et al. 2017). Následující purifikační kroky byly stejné jako u purifikace lidské rekombinantní AChE popsané v kapitole 3.6.3 pouze se dvěma rozdíly. Byla použita Hupresinová pryskyřice, která je selektivní pro purifikaci BChE. Rovněž bylo odlišné složení elučního roztoku o pH 7,5, jež je popsáno v Tabulka 22.

Tabulka 22 – Složení elučního roztoku

Složka	Množství (g)
20 mM Tris báze	2,422
300 mM NaCl	58,4
100 mM TMACl	0,956

3.8.4 Analýza proteinů gelovou elektroforézou a western blot

Analýza proteinů gelovou elektroforézou a western blot probíhala postupem popsáním v kapitole 3.5.6.

3.8.5 Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní BChE

3.8.5.1 Stanovení aktivity

Enzym byl zředěn 0,1M FP pH 7,4 a stabilizován 1 mg lidského albuminu na 1 ml roztoku. Aktivita BChE byl stanovena pomocí modifikované kolorimetrické metody dle Ellmana. Postup byl totožný s postupem popsáním v kapitole 3.6.5.1. Substrátem v měření byl BTChI. Při reakci dochází k hydrolyze BTChI katalytickým působením BChE za vzniku kyseliny máselné a thiocholinu. Experiment byl proveden v triplicátu a

opakován třemi nezávislými měřeními. Pro statistické hodnocení naměřených dat byl použit program GraphPad Prism 5.

3.8.5.2 Stanovení Michaelisovy konstanty

Postup stanovení Michaelisovy konstanty byl totožný s postupem popsáním v kapitole 3.6.5.3. Pouze substrát ATChI byl nahrazen BTChI.

3.8.5.3 Stanovení IC_{50} standardního inhibitoru BChE

Etopropazin, který vykazuje vysokou inhibiční selektivitu vůči BChE, byl vybrán jako standard pro hodnocení tohoto enzymu. Průběh měření a statistické vyhodnocení bylo pak totožné s měřením popsáním v kapitole 3.6.5.4.

4. Výsledky

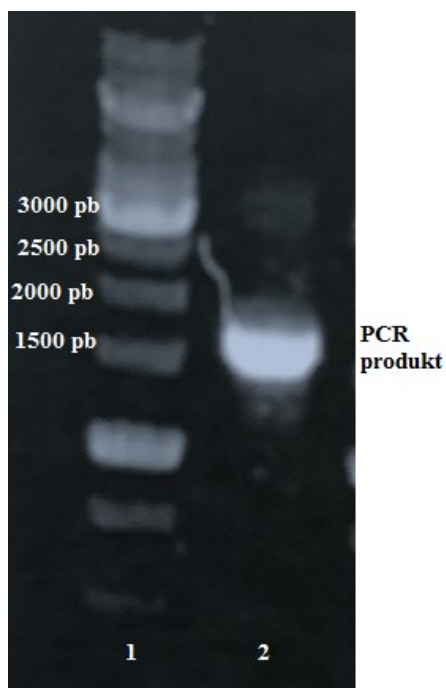
4.1 Produkce lidské rekombinantní BACE1 v Expi293F buňkách

V průběhu řešení disertační práce bylo připraveno celkem 7 fragmentů DNA. Fragmentem, který byl amplifikován a úspěšně izolován v enzymaticky aktivní formě, byla celá sekvence BACE1 o délce 1-501 AMK.

4.1.1 BACE1 fragment 1-501 AMK

4.1.1.1 Amplifikace metodou PCR

Gen BACE1 byl amplifikován PCR reakcí. Po reakci byla provedena horizontální elektroforéza na 1% agarózovém gelu. Fragменты DNA byly na gelu vizualizovány pomocí UV transiluminátoru. Na gelu byly viditelné fragmenty o přibližné velikosti 1 500 bp, což odpovídá velikosti BACE1 (Obrázek 12).



Obrázek 12 – Agarózová elektroforéza amplifikované cílové DNA

1 - Velikostní standard molekulových hmotností DNA (O'GeneRuller™ 1kb DNA ladder), 2 - produkt reakce PCR

Amplifikovaná DNA byla z gelu vyříznuta a extrahována pomocí QIAquick gel extrakčního kitu. Izolovaná DNA byla upravena přidáním adenosinu na obou 3' koncích. Takto upravený DNA fragment je pak s 95-99% úspěšností zaklonován (Beránek 2016). Získaná DNA byla ihned použita pro topoklonování. K topoklonování byl použit pcDNA 3.4-TOPO TA Cloning Kit. Klonovacím vektorem byl pcDNA 3.4 TOPO® vektor a přijímacím organismem byly chemicky kompetentní buňky *E. coli* TOP10. Topoklonovací směs byla vyseta na bakteriální plotny s antibiotikem karbencilin o koncentraci 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ média. Po ~18hodinové inkubaci bylo odpíchnuto osm kolonií, které byly následně analyzovány pomocí PCR.

4.1.1.2 PCR na koloniích

Pro PCR reakci na koloniích byla použita směs Fast master mix. Reakce byla analyzována gelovou elektroforézou a vizualizována pomocí UV transiluminátoru. Odpovídající velikost DNA byla nalezena u kolonií číslo 2, 6 a 8 (Obrázek 13).



Obrázek 13 – PCR na koloniích: Identifikace plazmidové DNA po transformaci do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10,
1-8 - produkty PCR, M - velikostní standardy molekulových hmotností DNA
O´GeneRuller 1kb DNA ladder

Noční kultura byla zaočkována z pozitivních kolonií, která byla následně použita pro izolaci plazmidové DNA pomocí Quick Plasmid Midiprep Kitu. Izolovaná plazmidová DNA byla odeslána na sekvenaci do Mikrobiologického ústavu AV ČR. Pomocí Sagnerovy metody byla potvrzena sekvence BACE1 u kolonie číslo 6.

4.1.1.3 Stanovení koncentrace plazmidové DNA

Koncentrace plazmidové DNA byla zjištěna pomocí nanofotometru při vlnové délce 260 nm. Čistota DNA byla stanovena jako poměr měření při vlnových délkách 260 nm a 280 nm, který je ukazatelem znečištění produktu proteiny a jako poměr měření při 260 nm a 320 nm, který je ukazatelem znečištění produktu organickými látkami. Čistota DNA se pohybovala mezi hodnotami 1,8-2,0. Koncentrace izolované plazmidové DNA se průměrně pohybovala $\sim 3000 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

4.1.1.4 Kultivace a pasážování buněk

Buňky byly kultivovány během 14 dnů jako buněčná suspenze za podmínek, jak je popsáno v kapitole 3.5.2. Míchání buněk pomocí orbitální třepačky a trny v Erlenmayerově baňce zajišťovaly neustálý pohyb, který je důležitý pro viabilitu buněk. Pokud není zajištěn pohyb, nebo není dostatečně rychlý, dochází k shlukování buněk a tím i ke snížení jejich životnosti. Pasážování buněk probíhalo podle následujícího postupu (Tabulka 23).

Tabulka 23 – Schéma pasážování buněk Expi293F

Pasáž	Kultivační čas (dny)	Objem kultury (ml)	Hustota (počet buněk/ml)	Viabilita buněk (%)	Ředění pro další pasáž (počet buněk/ml)
0	4	30	$\sim 1 \times 10^6$	~ 80	$0,3 \times 10^6$
1	4	30	$\sim 1 \times 10^6$	~ 90	$0,3 \times 10^6$
2	3	30	$\sim 3 \times 10^6$	~ 93	$1,0 \times 10^6$
3	3	30	$\sim 5-7 \times 10^6$	~ 96	$0,3 \times 10^6$

Pro expresi rekombinantního proteinu bylo použito $7,5 \times 10^7$ buněk ve 25,5 ml média. Zbytek buněčné kultury o koncentraci 1×10^7 buněk v 1 ml média byl uchován při teplotě $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ jako zásobní kultura.

4.1.1.5 Expres lidské rekombinantní BACE1

Expres lidské rekombinantní BACE1 probíhala za specifických podmínek popsaných v kapitole 3.5.3, které vedly k rychlé produkci proteinu. Nejprve byla produkce proteinu sledována v průběhu 7 dnů, kdy od druhého dne transfekce byl odebrán stejný objem buněk (5 ml). Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí BCA proteinového kitu. Naměřená data ukázala, že nejvyšší produkce proteinu byla dosažena třetí den po transfekci DNA. Následující čtvrtý den již docházelo k poklesu koncentrace proteinu v expresi (Tabulka 24). Koncentrace buněk se třetí den pohybovala $\sim 9 \times 10^6$ na 1 ml média. Čtvrtý dne došlo ke kontinuálnímu poklesu koncentrace buněk na $\sim 7,5 \times 10^6$, s vizuálním záznamem mrtvých buněk, které byly nalepeny na povrchu Erlenmayerovy baňky. Na základě tohoto experimentu následující produkce proteinu probíhaly pouze 3 dny.

Tabulka 24 – Produkce proteinu v buňkách po jednotlivých dnech po transfekci

Dny po transfekci	Koncentrace proteinu \pm SEM ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Viabilita buněk %
2	$0,70 \pm 0,03$	94,7
3	$2,30 \pm 0,02$	90,1
4	$0,60 \pm 0,05$	86,0
5	$0,40 \pm 0,04$	78,8
6	$0,27 \pm 0,02$	69,7
7	$0,20 \pm 0,02$	56,2

4.1.1.6 Izolace lidské rekombinantní BACE1

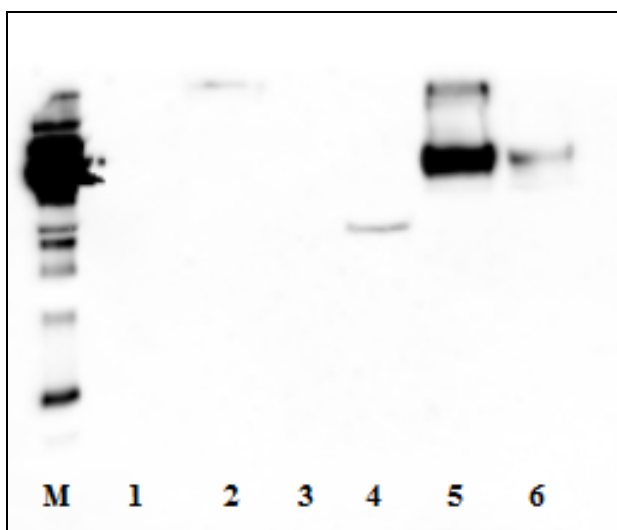
Peleta buněk, která byla získána centrifugací suspenze po expresi plazmidové DNA v Expi293F buňkách, byla použita pro izolaci lidské rekombinantní BACE1. K extrakci membránových proteinů z fosfolipidové vrstvy se často využívají různé detergenty (Cuozzo a Soutter 2014b). Na základě dostupné literatury či informací od kolegů bylo vyzkoušeno celé spektrum ionických a neionických komerčně dostupných detergentů, které měly pomoci uvolnit BACE1 z membrány v aktivní formě. V tabulce 25 je přehled připravených a použitých roztoků.

Tabulka 25 – Složení roztoků pro izolaci BACE1 z buněk

	1	2	3	4
Složka	Nonidet-P40(NP-40) pufr	Dodecylmaltosid solubilizační pufr	Triton-X-100 solubilizační pufr	Digitonin solubilizační pufr
A detergent	1 % NP-40 (1 ml)	Dodecyl maltosid (0,1-2,0 %)	TritonX-100 (0,1-2,0 %)	Digitonin (1-10 %)
B pufr	50 mM Tris-HCl pH 8,0 – 5 ml	50 mM Tris, pH 8,5	50 mM imidazol-HCl, pH 8,5	30 mM Hepes, pH 8,5
C sůl	150 mM NaCl 15 ml	750 mM 6-aminokapronová kyselina	50 mM NaCl/2mM 6-aminokapronová kyselina	150 mM octan draselný
D ochrana proteolýzy	2 mM PMSF	0,5m M EDTA, 2 mM inhibitor proteolýzy	0,5 mM EDTA, 2 mM inhibitor proteolýzy	2 mM inhibitor proteolýzy
E další			10 % glycerol	10 % glycerol

Solubilizační pufr na bázi dodecylmaltosidu a komerční kit pro izolaci membránových Mem-PER Plus, který se objevil na trhu v průběhu řešení disertační práce, byly schopny uvolnit BACE1 z buněk v enzymaticky aktivní formě. Izolace

proteinu z buněk pomocí kitu probíhala dle postupu doporučeným výrobcem. V konečné fázi byl zvolen komerční kit Mem-PER Plus, jelikož poskytl z izolované pelety nejvyšší koncentraci BACE1 s vysokou aktivitou z izolované pelety. Toto bylo potvrzeno jak velikostí proužku na western blotu (Obrázek 14), tak i změřenou koncentrací proteinu ve vzorku. Vzorek číslo 5 a 6 byl izolován z pelety, která obsahovala BACE1 o délce 1-501 AMK. Koncentrace proteinu ve vzorku číslo 5 byla $30,8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorek číslo 6 obsahoval pouze $5,9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinu.



Obrázek 14 – Western blot analýza pomocí protilátky - izolace BACE1 pomocí detergentů

M - hmotnostní marker; sloupec 1 – fragment 45-454 AMK, izolace pomocí dodecylmaltosidového pufru; sloupec 2 – fragment 45-454 AMK, izolace pomocí Triton X100; sloupec 3 fragment 22-454 AMK, izolace pomocí dodecylmaltosidového pufru; sloupec 4 - fragment 22-454 AMK, izolace pomocí Triton X100; sloupec 5 - fragment 1-501, izolace pomocí komerčního kitu; sloupec 6 - izolace dodecylmaltosidového pufru

Doporučený postup výrobce k izolaci membránových proteinů, který byl validován pro počet 5×10^6 buněk, byl dále modifikován. Promývací krok „wash” pufrem byl opakován 3krát. V původní verzi je tento krok doporučeno provést pouze jednou. Z buněk bylo postupně vymýváno médium. Dále byl zvýšen objem permeabilizačního

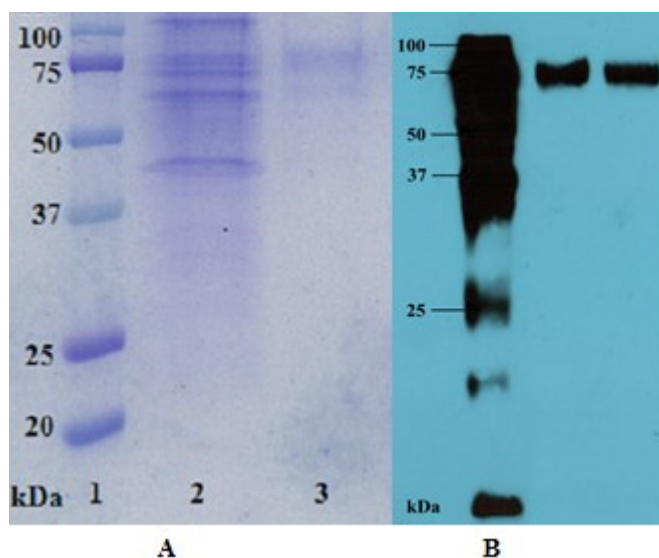
pufu z 0,75 ml na 3 ml. Relativní odstředivá síla byla z původních $16\ 000 \times g$ zvýšena na $18\ 600 \times g$, kdy bylo využito maximálních parametrů použité centrifugy. Taktéž byl zvýšen objem solubilizačního roztoku z původního objemu 0,5 ml na 3 ml.

4.1.1.7 Purifikace lidské rekombinantní BACE1

Na konci celého procesu byla BACE1 purifikována dvěma kroky, a to využitím iontové afinitní chromatografie a dialýzy. HisPur kobaltová pryskyřice byla použita pro purifikaci proteinu. Po dialyzaci byl produkt lyofilizován. Průměrný zisk lyofilizovaného enzymu byl $1,3 \pm 0,3$ mg na 1 litr média. Lyofilizovaný protein byl skladován při $-80\ ^\circ\text{C}$, což zajišťovalo stabilitu a aktivitu enzymu pro jeho další použití.

4.1.1.8 SDS a western blot

Reprezentativní výsledky SDS-PAGE a western blotu BACE1 jsou uvedeny na obrázku 15. Oba výsledky ukazují proužek maturované BACE1 v pozici ~ 75 kDa.



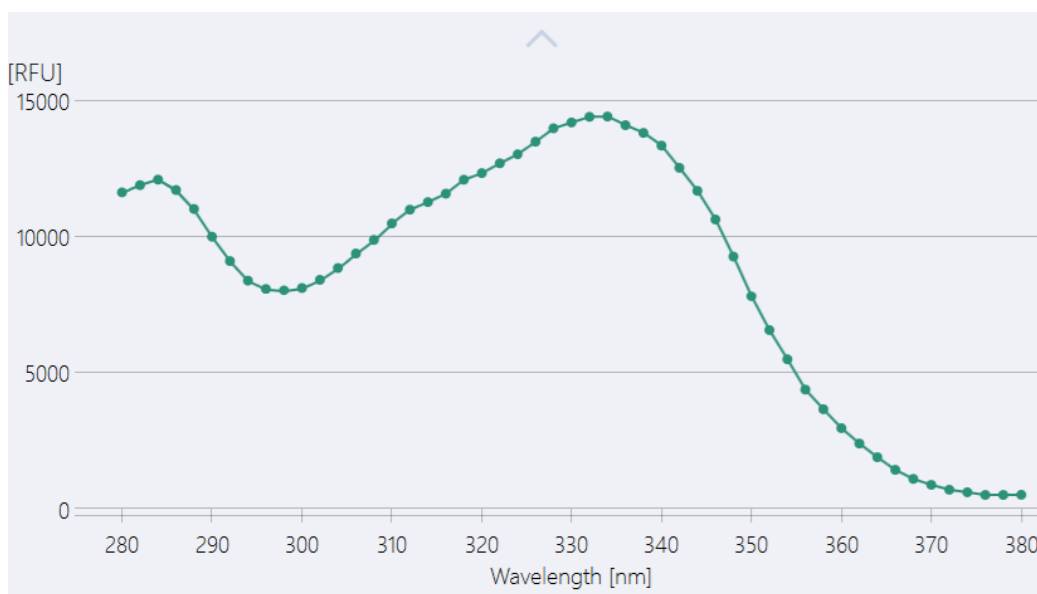
Obrázek 15 – SDS-PAGE a western blot purifikované BACE1

A - SDS-PAGE: sloupec 1 - hmotnostní marker; sloupec 2 - supernatant; sloupec 3 purifikovaná a dialyzovaná BACE1. B - western blot analýza za použití protilátky proti histidinové kotvě: sloupec 1 - hmotnostní marker; sloupec 2 - supernatant; sloupec 3 - purifikovaná a dialyzovaná BACE1

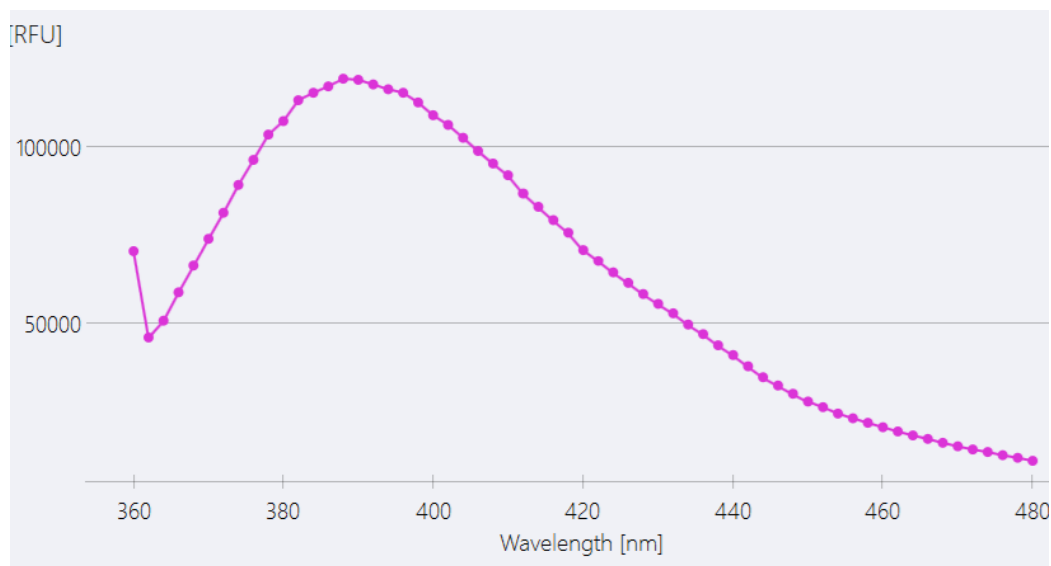
4.1.2 Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní BACE1

4.1.2.1 Specifická aktivita

Aktivita BACE1 byla měřena dle postupu v detekčním kitu od firmy Sigma-Aldrich (k. č. CS0010). Fluorescenční substrát 7-metoxykumarin-4-acetyl-[Asn670, Lue671]-amyloid β /A4 prekursorový protein 770 fragment 667-676-(2,4 dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amid trifluoroacetátová sůl, který je používán v tomto kitu, byl využit pro hodnocení aktivity měření. Substrát byl rozpouštěn v DMSO a následně ředěn v acetátovém pufru o pH 4,5 na finální koncentraci 0,25 μ M. Jelikož BACE1 se nachází v endozomech a Golgiho aparátu, kde se pH pohybuje v oblasti 4,0-5,5, je takto nízké pH optimální pro aktivitu BACE1 (Tan a Evin 2012). Enzym bylo nutné ředit ve 0,1M FP o pH 7,4. Při ředění acetátovým pufrům o pH 4,5 docházelo k precipitaci enzymu. Emisní a excitační vlnové délky byly nastaveny v jejich maximu, a to na 330 a 390 nm v porovnání s 320 and 405 nm, které deklaroval výrobce fluorescenčního kitu (Obrázek 16, Obrázek 17). Specifická aktivita lidské rekombinantní BACE1 se pohybovala $\sim 120\,000 \pm 4,000 \text{ RFU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$.



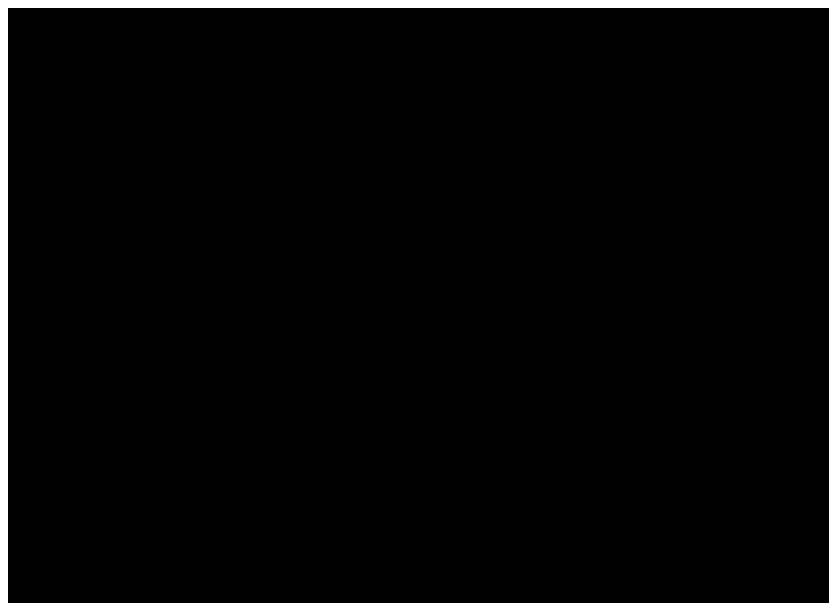
Obrázek 16 – Sken excitačního spektra BACE1.



Obrázek 17 – Sken emisního spektra BACE1

4.1.2.2 IC₅₀ verubecestatu

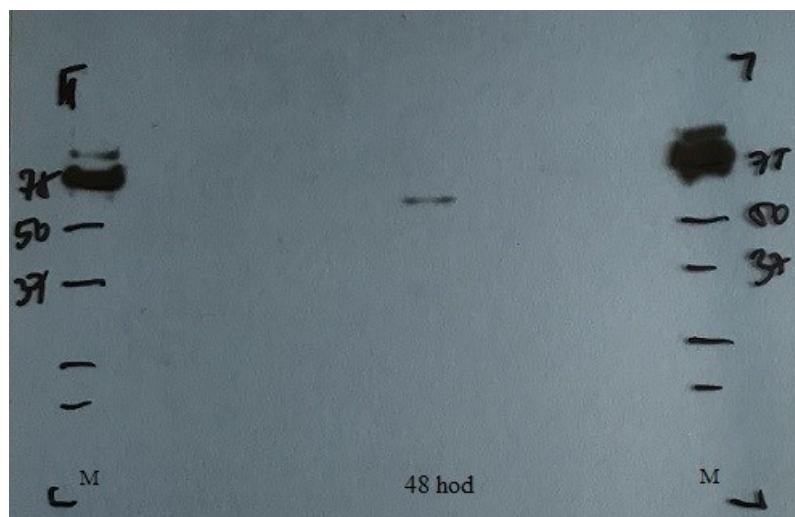
Verubecestat byl první inhibitor BACE1, jenž se dostal do poslední fáze klinického testování. V současné době je používán jako referenční standard (Egan et al. 2019). Enzym BACE1 byl charakterizován hodnotou IC₅₀ pro tento inhibitor. Tato hodnota udává koncentraci inhibitoru, při které za daných podmínek dochází k 50% poklesu aktivity sledovaného enzymu. Hodnota IC₅₀ pro verubecestat byla $1,765 \pm 0,036$ nM (Obrázek 18). Výsledek je vyjádřen jako hodnota průměru z 3 stanovení \pm SEM. Pro výpočet byl použit program GraphPad Prism 5. Naměřená hodnota IC₅₀ byla porovnána s výsledky zveřejněnými v odborné literatuře.



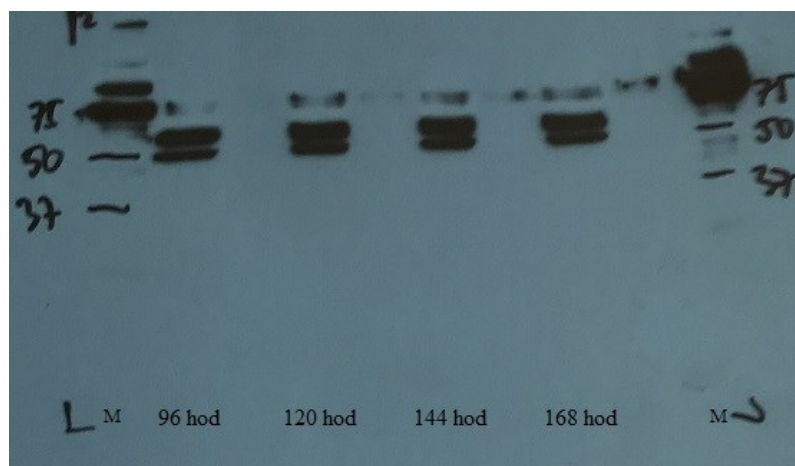
Obrázek 18 – Inhibiční účinek různých koncentrací verubecestatu na BACE1

4.1.3 Produkce BACE1 fragmentu 22-501 AMK, 46-501 AMK, 22-454 AMK, 46-454 AMK, 22-454 AMK + sekreční signál, 46-454 AMK + sekreční signál

Během řešení předkládané disertační práce byl také připraven konstrukt kódující protein BACE1 s prodoménou a bez prodomény (22-501 AMK, 46-501 AMK). Exprese v Expi293F buňkách byla prokázána u konstruktů 46-501 AMK pomocí imunoblotu za použití protilátky proti histidinové kotvě. Na western blotu byly přítomny dva proužky o velikostech okolo 50 kDa a 75 kDa (Obrázek 19, Obrázek 20), což odpovídá teoretické molekulové hmotnosti vypočtené pomocí programu ExPASy (http://web.expasy.org/compute_pi/), která je 50,903 kDa pro neglykosylovaný protein a ~75 kDa pro glykosylovaný protein. Protein se v buňkách začal tvořit již po 48 hodinách po transfekci, což naznačuje vhodně zvolenou metodu transfekce a množství použité DNA. Bohužel se nepodařilo protein izolovat v enzymaticky aktivní formě tak, aby mohl být použit pro stanovení jeho aktivity.



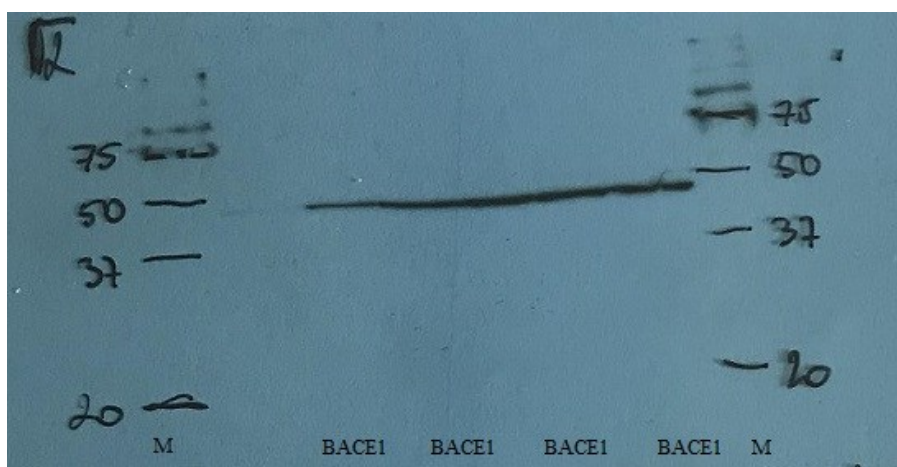
Obrázek 19 – Western blot analýza za použití protilátky proti histidinové kotvě:
M - hmotnostní marker, identifikace produkce BACE1 (46-501 AMK) po 48
hodinách



Obrázek 20 – Western blot analýza za použití protilátky proti histidinové kotvě:
M - hmotnostní marker, identifikace produkce BACE1 (46-501 AMK) po 96-168
hodinách

Z tohoto důvodu byly vytvořeny další konstrukty s delecí transmembránové části proteinu (22-454 AMK + sekreční signál, 46-454 AMK + sekreční signál). Bohužel ani u jednoho z konstruktů nebyla detekována exprese požadovaného proteinu v buňkách, ani sekrece proteinu do média. Vzhledem k předchozím výsledkům byla u dalších konstruktů zvolena kombinace delecí transmembránové části spolu s delecí

lokalizačního signálu pro Golgiho aparát. Byly vytvořeny dva konstrukty, z nichž jeden konstrukt obsahoval pouze katalytickou část (46-454 AMK) a druhý konstrukt obsahoval ještě prodoménu (22-454 AMK). Z analýzy prvních výsledků bylo patrné, že dochází k expresi rekombinantního proteinu u konstrukt (46-454 AMK), který byl potvrzen protilátkou proti histidinové kotvě. Velikost zkráceného proteinu se pohybovala okolo 50 kDa (Obrázek 21). Analýzou cílové sekvence DNA pomocí programu ExPASy byla vypočtena teoretická molekulová hmotnost rekombinantního proteinu bez glykosylací 48,51 kDa. Nebyla však potvrzena jeho aktivita fluorescenční metodou.



Obrázek 21 – Western blot analýza za použití protilátky proti histidinové kotvě:
M - hmotnostní marker, identifikace produkce BACE1 (46-454 AMK)

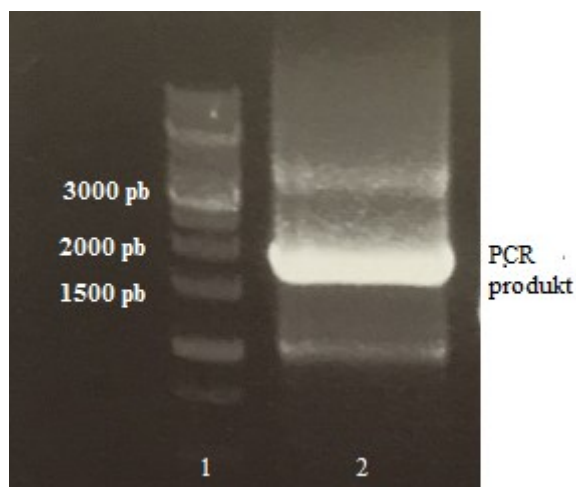
Byla provedena pouze jedna purifikace rekombinantního proteinu, avšak protein nebyl izolován v dostatečném množství pro další měření. Nebyla proto potvrzena jeho aktivita fluorescenční metodou. Ačkoli byla po odstranění transmembránové domény potvrzena exprese proteinu v buňce, nebylo možné získat protein v potřebné čistotě a kvantitě pro další analýzy.

4.2 Produkce lidské rekombinantní AChE v Expi293F buňkách

4.2.1 Amplifikace metodou PCR

Gen ACHE byl amplifikován PCR reakcí. Po reakci byla provedena horizontální elektroforéza na 1% agarózovém gelu. Fragmenty DNA byly na gelu vizualizovány

pomocí UV transiluminátoru. Na gelu byly viditelné fragmenty o přibližné velikosti 1 800 bp, což odpovídá velikosti AChE (Obrázek 22).

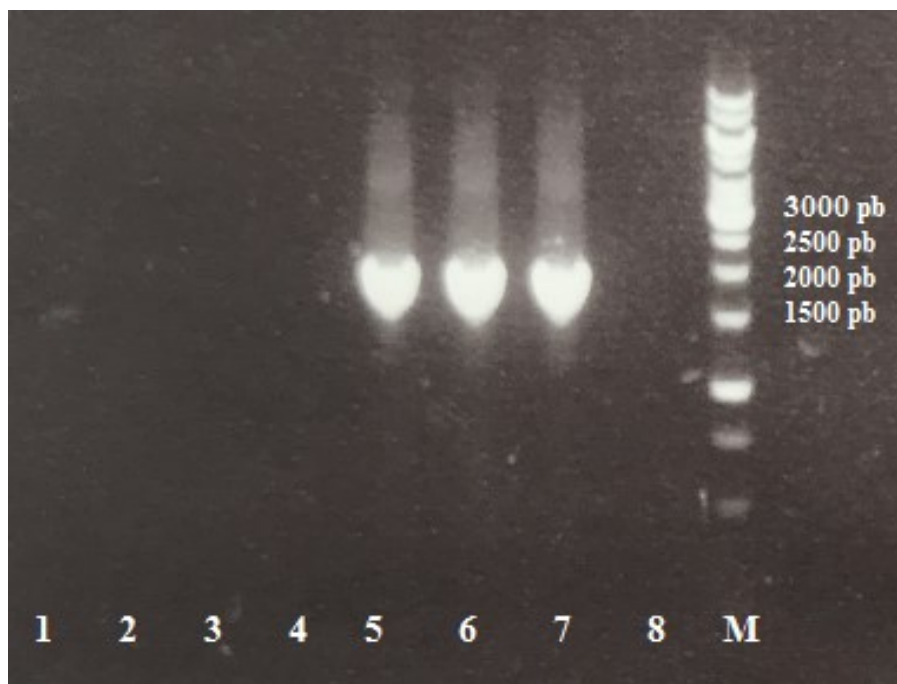


Obrázek 22 – Agarózová elektroforéza amplifikované cílové DNA

1 - Velikostní standard molekulových hmotností DNA O'GeneRuller™ 1kb DNA ladder. 2 - produkt PCR reakce

4.2.1.1 PCR na koloniích

PCR reakce na koloniích probíhala postupem popsáním v kapitole 4.1.2.2. Pozitivní DNA byla potvrzena u kolonie číslo 5, 6 a 7 (Obrázek 23). Izolovaná plazmidová DNA byla odeslána do Mikrobiologického ústavu AV ČR na sekvenaci, která ověřila správnost sekvence genu ACHE. Na Mikrobiologickém ústavu byla pomocí Sangerovy metody potvrzena sekvence AChE u kolonie číslo 5.



Obrázek 23 – PCR na koloniích: Identifikace plazmidové DNA po transformaci do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10

1-8 - produkty PCR, M - Velikostní standardy molekulových hmotností DNAO'GeneRuller 1kb DNA ladder

4.2.1.2 Stanovení koncentrace plazmidové DNA

Stanovení koncentrace plazmidové DNA probíhalo postupem popsaným v kapitole 4.1.2.3. Koncentrace izolované plazmidové DNA se průměrně pohybovala $\sim 1000\text{-}2000 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

4.2.2 Kultivace a pasážování buněk

Pasážování buněk probíhalo podle následujícího postupu popsaného v kapitole 4.1.3 do té doby, než bylo dosaženo počtu $7,5 \times 10^7$ buněk potřebných pro expresi DNA AChE.

4.2.3 Expese lidské rekombinantní AChE

Expese lidské rekombinantní AChE probíhala za podmínek popsaných v kapitole 4.1.4. Produkce proteinu byla sledována Ellmanovou metodou. Vzhledem k tomu, že AChE byla sekretována do média, byl v průběhu expese proteinu odebrán vzorek

média a poté měřena zvyšující se aktivita AChE (Tabulka 26). Sedmý den, kdy byla exprese proteinu ukončena, se viabilita buněk v expresi pohybovala kolem 60 %. Koncentrace proteinu v supernatantu se průměrně pohybovala nad 1 mg.ml⁻¹ média.

Tabulka 26 – Ukázka zvyšující se aktivity AChE monitorující produkci proteinu sekretujícího se do média

Den	Aktivita supernatantu ($\Delta A_{412} \cdot \text{min}^{-1}$)
1	nasazena exprese
2	přidány zesilovače
3	3,600
4	8,000
5	10,190
6	12,073
7	13,000

4.2.4 Purifikace lidské rekombinantní AChE

Po expresi byla AChE purifikována dvěma kroky, a to využitím chromatografie a dialýzy. Pro lepší manipulaci a zabránění ztrátám proteinu byl vysokoaktivní supernatant naředěn 20 mM Tris pufrem pH 7,5 na aktivitu $\sim 2,000 \Delta A_{412} \cdot \text{min}^{-1}$. Před vazbou na pryskyřici byla provedena 3krát opakovaná dialýza 20mM Tris pufrem pH 7,5. Pro purifikaci AChE byla použita Sefarosa4B/prokainamidová pryskyřice. Poté následovala opětovná 3kroková dialýza 20mM Tris pufrem pH 7,5. Celý proces purifikace byl monitorován měřením aktivity AChE modifikovanou Ellmanovou metodou (Tabulka 27). Roztok proteinu byl zmražen na -80 °C a lyofilizován.

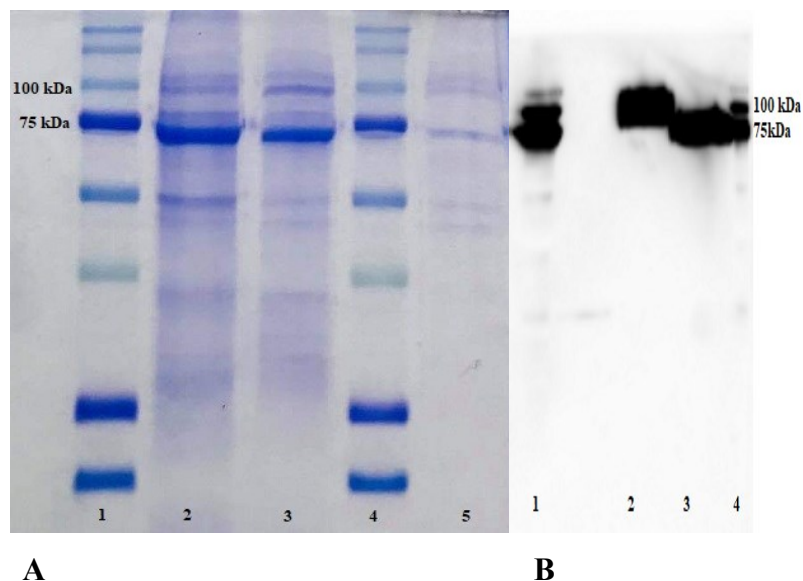
Lyofilizovaný protein byl skladován při -80 °C, což zajišťovalo stabilitu enzymu pro jeho další využití.

Tabulka 27 – Ukázka změny aktivity enzymu v souvislosti s jednotlivými kroky purifikace

Jednotlivé kroky purifikace	Aktivita enzymu ($\Delta A_{412} \cdot \text{min}^{-1}$)
Supernatant	1,831
Dialýza	1,659
Vazba na pryskyřici	0,001
Pufr	0,001
Pufr/0,1M NaCl	0,004
Pufr/0,3M NaCl	0,005
Eluční roztok	1,425
Dialýza	0,810

4.2.5 SDS-PAGE a western blot

Reprezentativní výsledky SDS-PAGE a western blotu AChE jsou uvedeny na obrázku 24. Oba výsledky ukazují proužek maturované AChE v pozici ~70 kDa.



Obrázek 24 – SDS-PAGE a western blot purifikované AChE

A - SDS-PAGE: sloupec 1 - hmotnostní marker; sloupec 2 - supernatant; sloupec 3 - dialyzovaná AChE; sloupec 4 - hmotnostní marker; sloupec 5 - purifikovaná AChE.

B: western blot analýza za použití protilátky proti histidinové kotvě: sloupec 1 - hmotnostní marker; sloupec 2 - purifikovaná BChE; sloupec 3 - purifikovaná AChE; sloupec 4 - hmotnostní marker

4.2.6 Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní AChE

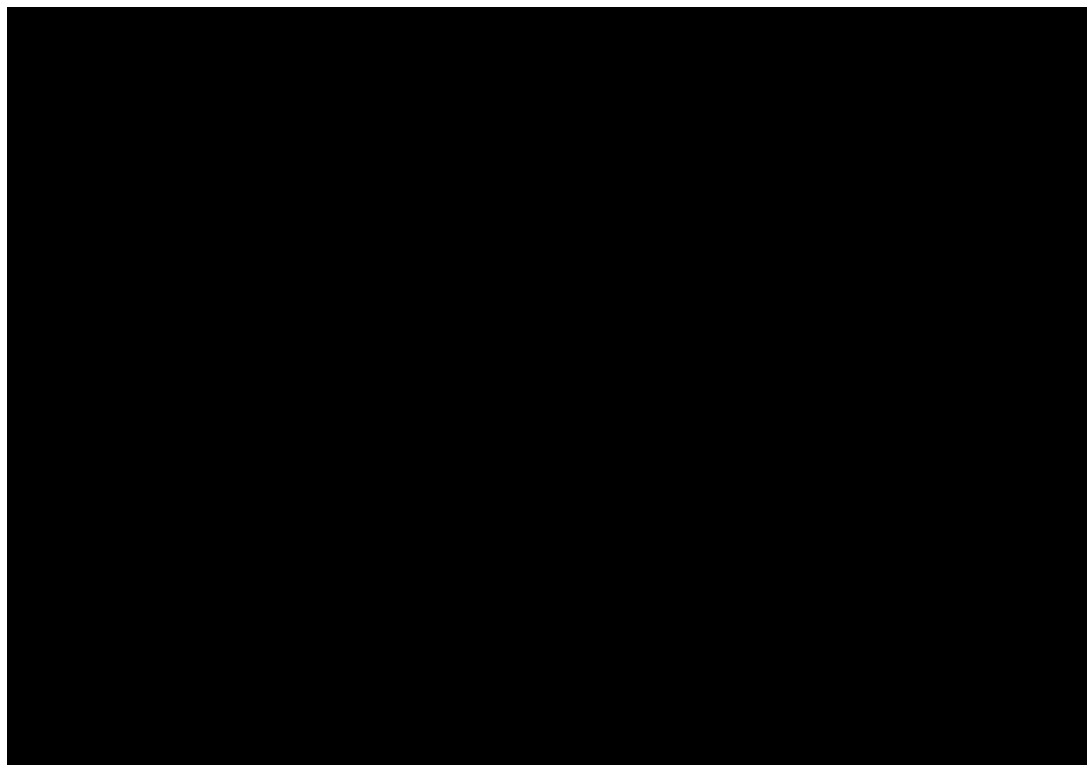
4.2.6.1 Specifická aktivita

Aktivita AChE byla měřena optimalizovanou Ellmanovou metodou. Enzym byl naředěn 0,1M FP o pH 7,4 na aktivitu $\sim 0,3 \Delta A_{412} \cdot \text{min}^{-1}$. Specifická aktivita lidské rekombinantní AChE se pak pohybovala $\sim 20\,000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Následně byl enzym stabilizován přidávkem albuminu $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ roztoku. Takto připravený enzym byl pak použit pro následná měření Michaelisovy konstanty a stanovení hodnoty IC_{50} selektivního inhibitoru AChE.

4.2.6.2 Michaelisova konstanta

Enzym byl charakterizován pomocí Michaelisovy konstanty (K_m) a maximální rychlosti (V_{max}) reakce. Tato konstanta označuje takovou látkovou koncentraci substrátu, při níž je rychlost enzymové reakce (v) polovinou rychlosti maximální. Kinetické parametry lidské rekombinantní AChE K_m a V_{max} , byly získány s pomocí

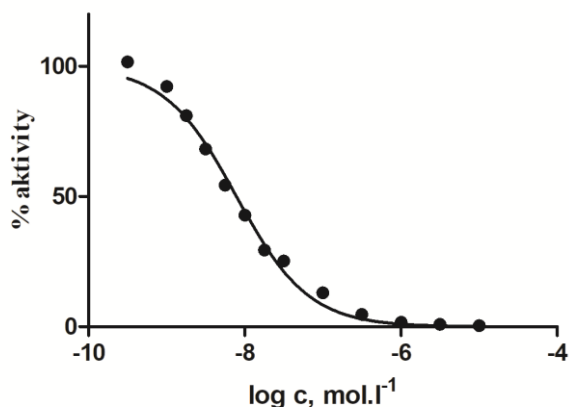
programu GraphPad Prism 5 (Obrázek 25). Hodnota K_m pro substrát ATChI byla $0,288 \pm 0,020$ mM a hodnota V_{max} byla $0,373 \pm 0,010 \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$. Výsledek je vyjádřen jako hodnota průměru z 3 nezávislých stanovení \pm SEM. Hodnota K_m byla porovnána s výsledky zveřejněnými v odborné literatuře.



Obrázek 25 – Zobrazení průběhu inhibice lidské rekombinantní AChE nadbytkem ATChI.

4.2.6.3 IC_{50} donepezilu

Enzym byl charakterizován hodnotou IC_{50} pro selektivní inhibitor AChE donepezil (Obrázek 26). Hodnota IC_{50} byla $7,834 \pm 0,054$ nM. Výsledek je vyjádřen jako hodnota průměru z 3 nezávislých stanovení \pm SEM. Pro výpočet byl použit program GraphPad Prism 5. Získaná hodnota IC_{50} byla porovnána s výsledky zveřejněnými v odborné literatuře.

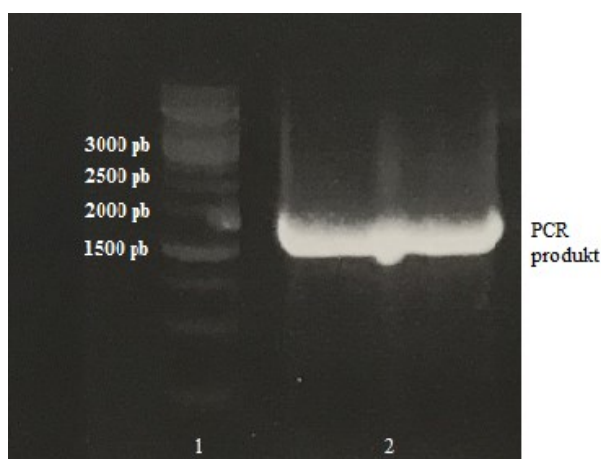


Obrázek 26 – Inhibiční účinek různých koncentrací donepezilu vůči AChE

4.3 Produkce lidské rekombinantní BChE v Expi293F buňkách

4.3.1 Amplifikace metodou PCR

Gen BCHE byl amplifikován PCR reakcí. Po reakci byla provedena horizontální elektroforéza na 1% agarózovém gelu. Fragменты DNA byly na gelu vizualizovány pomocí UV transiluminátoru. Na gelu byly viditelné fragmenty o přibližné velikosti 1 800 bp, což odpovídá velikosti BChE (Obrázek 27).

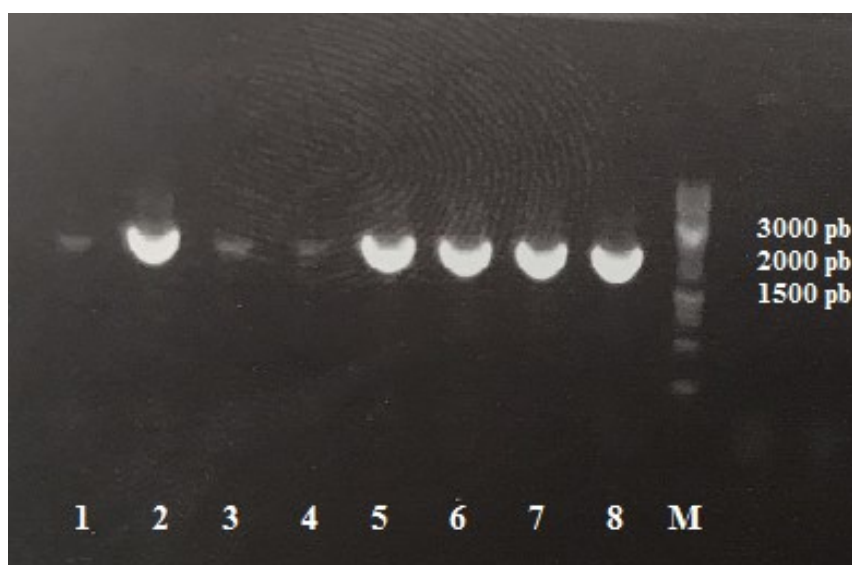


Obrázek 27 – Agarózová elektroforéza amplifikované cílové DNA

1 - Velikostní standard molekulových hmotností DNA O'GeneRuller™ 1kb DNA ladder. 2 - produkt reakce PCR

4.3.1.1 PCR na koloniích

PCR reakce na koloniích probíhala postupem popsaným v kapitole 4.1.2.2. Pozitivní DNA byla potvrzena u kolonie číslo 2, 5, 6, 7 a 8 (Obrázek 28). Izolovaná plazmidová DNA byla odeslána na sekvenaci do Mikrobiologického ústavu AV ČR. Pomocí Sangerovy metody zde byla potvrzena sekvence BChE u kolonie číslo 6.



Obrázek 28 – PCR na koloniích: Identifikace požadované plazmidové DNA po transformaci do chemicky kompetentních buněk *E. coli* TOP10. 1-8 - produkty PCR. M - Velikostní standardy molekulových hmotností DNA O'GeneRuller™ 1kb DNA ladder

4.3.1.2 Stanovení koncentrace plazmidové DNA

Určení koncentrace plazmidové DNA probíhala postupem popsaným v kapitole 4.1.2.3. Koncentrace izolované plazmidové DNA se pak průměrně pohybovala $\sim 1000 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

4.3.2 Kultivace a pasážování buněk

Pasážování buněk probíhalo podle následujícího postupu popsaného v kapitole 4.1.3 do té doby, než bylo dosaženo počtu $7,5 \times 10^7$ buněk potřebných pro expresi DNA BChE.

4.3.3 Exprese lidské rekombinantní BChE

Exprese lidské rekombinantní BChE probíhala za podmínek popsaných v kapitole 4.1.4. Produkce proteinu byla sledována Ellmanovou metodou. Vzhledem k tomu, že BChE byla sekretována do média byl v průběhu 7denní exprese proteinu odebrán vzorek média a poté sledována zvyšující se aktivita BChE (Tabulka 28). Sedmý den, kdy byla exprese ukončena se viabilita buněk pohybovala kolem 60 %. Koncentrace proteinu v supernatantu se průměrně pohybovala nad 1 mg.ml⁻¹ média.

Tabulka 28 – Ukázka zvyšující se aktivity BChE monitorující produkci proteinu sekretujícího se do média

Den	Aktivita supernatantu ($\Delta A_{412} \cdot \text{min}^{-1}$)
1	nasazena exprese
2	přidány zesilovače
3	0,698
4	1,230
5	1,870
6	1,922
7	2,467

4.3.4 Purifikace lidské rekombinantní BChE

Po expresi proteinu byla BChE purifikována dvěma kroky, a to využitím dialýzy a chromatografie. Před vazbou na pryskyřici byla provedena 3krát opakovaná dialýza 20mM Tris pufrém pH 7,5. Pro purifikaci BChE byla použita Hupresinová pryskyřice. Celý proces purifikace byl monitorován měřením aktivity BChE Ellmanovou metodou

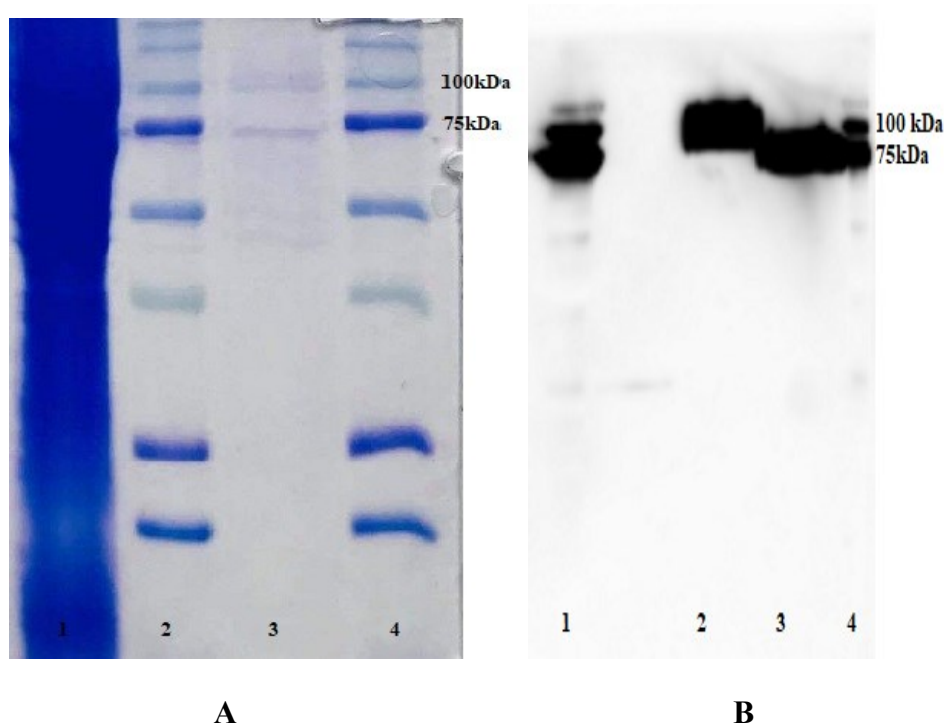
(Tabulka 29). Následovala opět 3kroková dialýza 20mM Tris pufrem o pH 7,5. Poté byl roztok proteinu zmražen na -80 °C. Vzhledem k vysoké stabilitě BChE nebyl produkt lyofilizován.

Tabulka 29 – Ukázka změny aktivity proteinu v souvislosti s jednotlivými kroky purifikace

Jednotlivé kroky purifikace	Aktivita enzymu ($\Delta A_{412} \cdot \text{min}^{-1}$)
Supernatant	2,467
Dialýza	2,200
Vazba na pryskyřici	0,001
Pufr	0,003
Pufr/0,1 M NaCl	0,003
Pufr/0,3 M NaCl	0,005
Eluční roztok	1,693
Dialýza	1,440

4.3.5 SDS-PAGE a western blot

Reprezentativní výsledky SDS-PAGE a western blotu BChE jsou ukázány na obrázku 29. Výsledky SDS-PAGE ukazuje dva pruhy maturované BChE v pozici ~100 kDa. Na western blotu jsou oba pruhy slité v jeden pruh v pozici ~100 kDa.



Obrázek 29 – SDS-PAGE a western blot purifikované BChE

A - SDS-PAGE: sloupec 1 - supernatant; sloupec 2 - hmotnostní marker; sloupec 3 - purifikovaná BChE; sloupec 4 - hmotnostní marker.

B - western blot analýza za použití protilátky proti histidinové kotvě: sloupec 1 - hmotnostní marker; sloupec 2 - purifikovaná BChE

4.3.6 Validace kinetických vlastností lidské rekombinantní BhCE

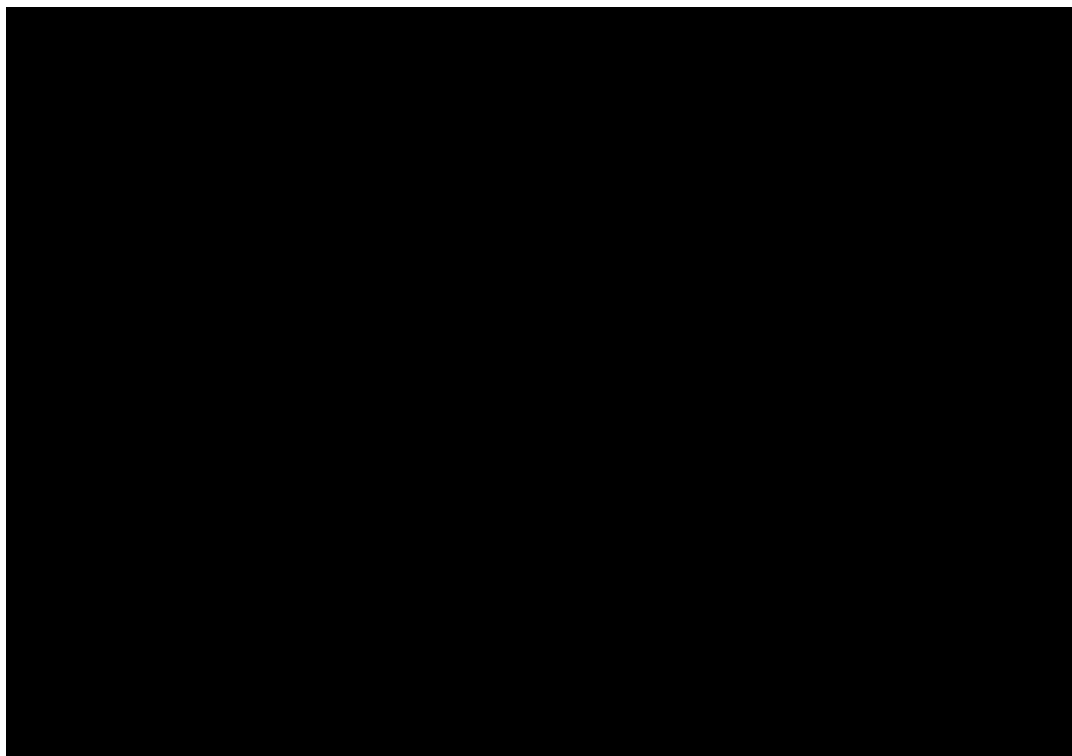
4.3.6.1 Specifická aktivita

Aktivita BChE byla měřena optimalizovanou Ellmanovou metodou. Enzym byl naředěn 0,1M FP o pH 7,4 na aktivitu $\sim 0,300 \Delta A_{412} \cdot \text{min}^{-1}$. Specifická aktivita lidské rekombinantní BChE se pak pohybovala $\sim 50\,000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Následně byl enzym stabilizován přidavkem albuminu $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ roztoku. Takto připravený enzym byl pak použit pro následná měření K_m a stanovení hodnoty IC_{50} selektivního inhibitoru BChE.

4.3.6.2 Michaelisova konstanta

Enzym byl charakterizován pomocí hodnot K_m a V_{max} . Kinetické parametry lidské rekombinantní BChE K_m a V_{max} , byly získány výpočtem s pomocí programu GraphPad Prism 5. Hodnota K_m pro substrát BTChI byla $0,256 \pm 0,003 \text{ mM}$ a hodnota V_{max} byla

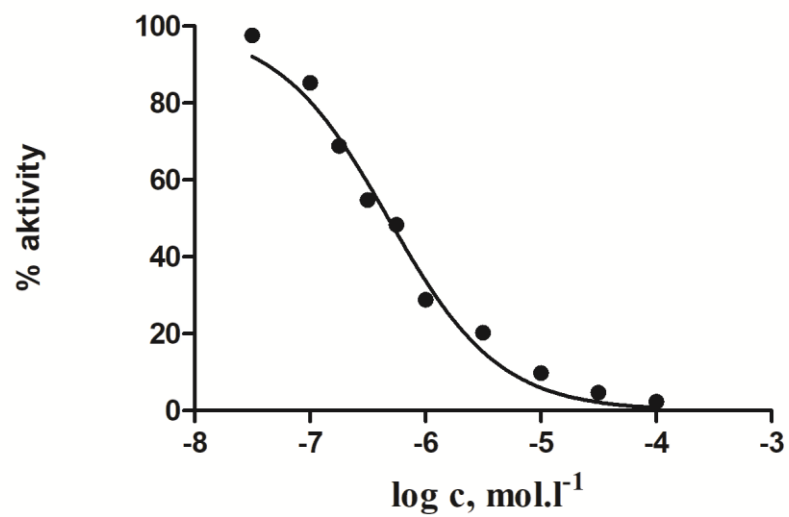
$0,615 \pm 0,0144 \Delta A \cdot \text{min}^{-1}$ (Obrázek 30). Výsledek je vyjádřen jako hodnota průměru z 3 nezávislých stanovení \pm SEM. Hodnota K_m byla porovnána s výsledky zveřejněnými v odborné literatuře.



Obrázek 30 – Zobrazení průběhu inhibice lidské rekombinantní BChE nadbytkem BTChI.

4.3.6.3 IC_{50} etopropazinu

Enzym byl charakterizován hodnotou IC_{50} pro selektivní inhibitor BChE etopropazin. Hodnota IC_{50} byla $0,477 \pm 0,045 \mu\text{M}$ (Obrázek 31). Výsledek je vyjádřen jako hodnota průměru z 3 nezávislých stanovení \pm SEM. Pro výpočet byl použit program GraphPad Prism 5. Získaná hodnota IC_{50} byla porovnána s výsledky zveřejněnými v odborné literatuře.



Obrázek 31 – Inhibiční účinek různých koncentrací etopropazinu na BChE

5. Diskuze

V rámci této disertační práce byla na KTVF zavedena metoda pro produkci lidských rekombinantních proteinů, a to BACE1, AChE a BChE. Pro expresi výše zmíněných enzymů byl vybrán komerčně dostupný Expi systém, jehož součástí jsou Expi293F buňky. Tato buněčná kultura je linie upravených HEK293 buněk, které jsou schopny růst v suspenzi až do dosažení vysokého počtu buněk. Linie je vhodným hostitelem pro přechodné transfekce pro následnou produkci rekombinantních proteinů a protilátek a jejich kultivace probíhá v bezproteinovém a bezsérovém médiu.

5.1 Produkce lidské rekombinantní BACE1

V průběhu řešení disertační práce byl validován ~14denní protokol pro kultivaci Expi293F buněk nutných k expresi proteinu. Pro přípravu rekombinantní lidské BACE1 byly optimalizovány a validovány jednotlivé kroky exprese a purifikace v Expi293F buňkách.

U firmy GeneArt gene syntetický servis byla připravena nukleotidová sekvence genu lidské BACE1 o velikosti 1 545 bp. Tato sekvence byla při klonování postupně upravována, pro dosažení optimální exprese. V průběhu disertační práce bylo připraveno celkem 7 fragmentů DNA o různých délkách kódujících různé kombinace domén proteinu BACE1. Všechny konstrukty kódovaly na C-konci histidinovou kotvu pro potřeby detekce proteinu a jeho následné purifikace. Výběr jednotlivých délek fragmentů byl proveden na základě rešeršní práce. Z dostupných literárních zdrojů byly vybrány následující fragmenty, které se mezi sebou liší svou délkou:

- BACE1: 1-460 AMK (Yang et al. 2004)
- BACE1: 14-454, 22-454, 41-454, 56-454 (Sardana et al. 2004)
- BACE1: 1-454 (Bruinzeel et al. 2002)
- BACE1 1-501 AMK (Kalvodova et al. 2005; Westmeyer et al. 2004).

Produkce těchto fragmentů probíhala v různých expresních systémech jak prokaryotních tak i v eukaryotních buňkách. Jak už bylo v teoretické části popsáno, jednotlivé systémy mají své výhody a nevýhody. Enzymy produkované v prokaryotních systémech, jako je *E. coli* sloužily například pouze ke strukturním studiím (Tomasseli et

al. 2008). V těchto buňkách také často probíhá produkce v inkluzních těliscích obsahujících pouze monomerní enzym. Při izolaci enzymu tak může dojít ke ztrátám jeho aktivity (Sardana et al. 2004; Thermofisher Scientific 2020).

Objevuje se stále více důkazů, že BACE1 existuje i v dimerní formě, jež je aktivnější než monomer. Tato zjištění byla potvrzena *in vitro* při expresi BACE1 v HEK293 buňkách a taktéž i při izolaci buněk z mozkové tkáně (Schmechel et al. 2004). Dokonce byl potvrzen i vznik oligomeru u BACE1 produkované v HEK293 buňkách. Oligomery byly viditelné v čerstvě produkovaném a purifikovaném enzymu, avšak častěji se vyskytovaly v déle skladovaných vzorcích. Příčinou tohoto jevu by mohla být nespecifická agregace proteinu (Sidera et al. 2002). Výhodou savčích buněk je taktéž to, že poskytují veškeré posttranslační modifikace, které jsou důležité pro aktivitu enzymu. Správná glykosylace v savčích buňkách je klíčová pro interakci BACE1 s jeho substrátem APP. Srovnáme-li glykosylovanou BACE1 s modifikovanou neglykosylovanou BACE1, která byla produkována v CHO buňkách, aktivita enzymu se ukázala o 40 % nižší. BACE1, která byla exprimována v hmyzích buňkách, kde je cukerná složka je spíše manosového typu, měla o 50 % nižší aktivitu než BACE1 produkovaná v savčích buňkách (Charlwood et al. 2001). Aktivitu BACE1, produkované v hmyzích buňkách je možné zvýšit až o 260 % přidáním glykanových složek (Chang et al. 2005). Na základě těchto zjištění byla pro expresi BACE1 použita právě lidská Expi293F buněčná kultura, která vychází z HEK293 buněk.

Jediným fragmentem BACE1, který se podařilo úspěšně připravit a purifikovat v enzymaticky aktivní formě byl fragment o délce 1-501 AMK. Velkým problémem byla izolace enzymu v aktivní podobě. BACE1 má jako transmembránový protein jak hydrofobní, tak hydrofilní část. Hydrofobní region enzymu prochází skrz fosfolipidovou membránu. Transmembránová doména je důležitá pro *in vivo* enzymatickou aktivitu BACE1 vůči jejímu substrátu APP, tedy pro vznik koncového fragmentu C99 (Yan et al. 2001). Produkce rozpustných a membránově lokalizovaných proteinů, které jsou určeny jak pro strukturální analýzu, tak i pro screening, je obvykle považována za velice náročný cíl. Detergenty, které jsou součástí extrakčních roztoků pro izolaci membránových proteinů, mohou často snižovat aktivitu enzymu. (Sidera et al. 2002). Existují alternativní postupy, jimiž je možné i vysoké koncentrace detergentů odstranit. Jedná se např. o využití afinitních pryskyřic, které jsou dodávány komerčními firmami. Ty však mohou mít opět negativní vliv na stabilitu enzymu (Cuzzo a Soutter 2014a).

V průběhu řešení disertační práce bylo vyzkoušeno celé spektrum extračních roztoků. Nejvyšší výtěžek proteinu při jeho izolaci z buněk poskytlo použití kitu pro izolaci transmembránových proteinů, který zavedla na trh firma Thermofisher v průběhu řešení této práce. Kratší fragmenty o délce 22-501 a 46-501 AMK nebylo možné pomocí použitých detergentů izolovat v dostatečné kvalitě a kvantitě. Jelikož tyto fragmenty mají zachovanou transmembránovou část, je možné předpokládat, že pomocí výše zmíněného kitu by byla možná jejich izolace z buněčné membrány. V další izolaci těchto fragmentů pomocí membránového kitu již nebylo pokračováno, jelikož získání enzymu v jeho plné délce sliboval vysokou aktivitu, selektivitu a stabilitu pro následný screening inhibitorů BACE1.

Finálním krokem produkce rekombinantního proteinu je jeho purifikace. Krátká histidinová sekvence AMK (nejvíce využívané je šestinásobné opakování histidinu) patří k nejčastěji používaným afinitním značkám pro purifikaci rekombinantních proteinů. Tuto doménu většinou není nutné odstranit, protože nemá vliv na biologickou aktivitu proteinu. Následná purifikace takto označeného proteinu je založena na schopnosti histidinu vázat se s vysokou afinitou na ionty některých kovů jako je Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} nebo Zn^{2+} . Eluce proteinu obvykle probíhá za využití gradientu imidazolu. V případě purifikace enzymu BACE1 touto metodou je v odborné literatuře nejčastěji popisována afinitní chromatografie využívající nikl-nitriltriocetovou (Ni-NTA) pryskyřici (Bruinzeel et al. 2002; 2002; Sidera et al. 2002; Mallender et al. 2001). Kromě niklu se u afinitní pryskyřice také používají ionty kobaltu. Ačkoliv vazebná kapacita obou pryskyřic se pohybuje podobně mezi 5-10 mg proteinu na 1 ml, je vazba na kobaltovou pryskyřici méně specifická než na niklovou, na druhou stranu purifikace vykazuje vyšší čistotu výsledného produktu (Bornhorst a Falke 2000). V této disertační práci jsme proto zvolili způsob purifikace s prvotním odsolením supernatantu, získaného izolací z buněk, pomocí dialýzy, následnou vazbou na kobalt-chelatační pryskyřici a konečnou dialýzou eluovaného enzymu.

Po purifikačním kroku, kdy byl získaný enzym dostatečně vyčištěn, následovala jeho identifikace, která proběhla pomocí dvou metod, a to gelové elektroforézy a western blotu. Sekvence BACE1 o délce 501 AMK dle databáze UniProt Knowledgebase má molekulovou hmotnost 55,764 kDa. Výsledky SDS-PAGE a western blotu BACE1 ukázaly proužek BACE1 v pozici ~75 kDa. Toto zjištění

odpovídá již dříve publikovaným datům. Nezralá N-glykosylovaná BACE1, která je produkována v HEK293 buňkách, je na začátku syntetizována jako protein o velikosti ~70 kDa. Během zrání se N-vázané cukry modifikují, což vede ke zvýšení molekulové hmotnosti na ~75 kDa (Haniu et al. 2000; Capell et al. 2000).

S objevem BACE1 začalo intenzivní hledání nových inhibitorů, jak ve farmaceutickém průmyslu, tak v akademické sféře. Tyto látky by mohly sloužit jako nové léky pro léčbu AD. Velký zájem v poslední době se zaměřil na selektivní malé nepeptidové molekuly s optimálními farmakokinetickými vlastnostmi, které by byly schopny proniknout do centrálního nervového systému (CNS). Pro screening a charakterizaci inhibitorů BACE1 je rozhodující vybrat vhodnou metodu. *In vitro* aktivita BACE1 je v současné době obvykle měřena pomocí FRET technologie. Tato metoda využívá řadu fluorescenčních substrátů na bázi peptidů. Variabilita enzymatických metod daná typem enzymu, jeho koncentrací, pH, výběrem pufru, koncentrací substrátu a inkubací inhibitoru může modifikovat konečný výsledek a může tak mít vliv na porovnání jednotlivých výsledků inhibitorů. Doporučuje se tedy provést experimenty s alespoň dvěma různými FRET substráty a poté zhodnotit konečný výsledek měření. Problémem je, že komerční firmy mají tyto substráty v omezené nabídce. Navíc jsou často součástí kitu, tudíž málokdy samostatně prodejné nebo si je vědecká pracoviště sama syntetizují (Mancini et al. 2011). Další nevýhodou fluorescenčních substrátů je jejich omezená rozpustnost ve vodném prostředí, která je často limitující pro určení K_m a tak i nastavení dostatečné koncentrace substrátu v měření. V tomto případě pak nelze provést kinetickou charakterizaci BACE1 inhibitorů. V literatuře byly popsány metody stanovení aktivity BACE1 s použitím chromogenního substrátu N- α -benzoyl-D,L-arginin p-nitro-anilid (BAPNA). Tato metoda je založena na odštěpení p-nitroanilidu, kdy měření pak probíhá při vlnové délce 405 nm. Ačkoliv byla zakoupena L-variantu substrátu, která měla mít vyšší specifitu než racemát, nepodařilo se metodu zopakovat ani při dostatečné aktivitě enzymu (nepublikované údaje). Zajímavé je, že tato skupina následně publikovala článek, kdy měření aktivity BACE1 bylo založeno pouze na fluorescenčních metodách a tato kolorimetrická metoda již dále nebyla publikována s naměřenými daty (Mancini et al. 2007; 2011). Na základě těchto informací bylo měření aktivity BACE1 uskutečněné pomocí fluorescenčního substrátu 7-methoxykumarin-4-acetyl-[Asn670, Lue671]-amyloid β /A4 prekursorový protein 770

fragment 667-676-(2,4-dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amid trifluoroctová sůl. Tento fluorescenční substrát je součástí kitu pro měření aktivity BACE1 od firmy Sigma Aldrich. Lze ho však zakoupit i samostatně. Jak už bylo výše popsáno, nevýhodou je jeho nízká rozpustnost, proto nebylo možné určit K_m . Ačkoliv se jedná o sůl je nutné substrát rozpustit v DMSO, který interferuje při vyšších koncentracích s měřením. V publikacích byly popsány metody měření aktivity BACE1, které obsahovaly až 10 % DMSO v experimentu, naše zkušenost však připouští maximálně 1% DMSO, aby nedocházelo k ovlivnění výsledku (Sardana et al. 2004).

Pomocí tohoto substrátu byla změřena jak aktivita vyprodukovaného enzymu, tak inhibiční vlastnosti verubecestatu. Vzhledem ke zvolenému savčímu buněčnému modelu a následných extrakčních a purifikačních krocích se podařilo izolovat enzym s dostatečnou aktivitou. Specifická aktivita lidské rekombinantní BACE1 se po purifikaci pohybovala $\sim 120\,000 \pm 4,000 \text{ RFU}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$. Objem substrátu tak bylo možné snížit v měření na polovinu oproti koncentraci, která byla doporučena výrobcem. Finální koncentrace substrátu $0,25 \mu\text{M}$ byla dostatečná pro naše měření.

Jako standard byl vybrán inhibitor verubecestat, který byl vyvinut farmaceutickou firmou Merk a byl jeden z posledních inhibitorů BACE1, který se dostal do III. fáze klinického testování (Das a Yan 2019; Hrabínova et al. 2020). Výsledná hodnota IC_{50} pro verubecestat ($1,765 \pm 0,036 \text{ nM}$) koreluje s publikovanými výsledky, které se pohybovaly v rozmezí 2,1-3,4 nM. Tyto hodnoty nicméně nelze úplně porovnat, jelikož publikovaná data byla měřena jinými metodami nebo nebyl výsledek vyjádřen jako hodnota IC_{50} , ale jako inhibiční konstanta (K_i) (Kennedy et al. 2016; Scott et al. 2016). Proto byl pro další validaci zakoupen inhibitor lanabecestat, pro jehož hodnocení byla použita metoda FRET. V publikaci je uvedena hodnota K_i $0,40 \pm 0,03$ i hodnota IC_{50} $0,60 \pm 0,04 \text{ nM}$ (Eketjäll et al. 2016). Pro další hodnocení a validaci inhibitorů BACE1 uvažujeme o nákupu dalšího fluorescenčního substrátu, který by poskytl lepší charakterizaci inhibitorů BACE1.

5.2 Produkce lidských rekombinantních ChE

AChE i BChE jsou zajímavé z hlediska fyziologického i patologického a obzvláště z pohledu naší katedry, z hlediska toxikologického. Lidská BChE hydrolyzuje nebo zachycuje širokou škálu toxických sloučenin včetně kokainu, organofosforových pesticidů a NPL. Lidská AChE je zajímavá z hlediska otrav NPL, pesticidy a

neurodegenerativních onemocnění, jako je AD. Jelikož se naše katedra zabývá výše uvedenou problematikou, je nutné mít k dispozici dostatečné množství obou enzymů s vysokou stabilitou a dostatečnou aktivitou.

Obě tyto ChE lze snadno izolovat z lidské heparinované krve. Krev je centrifugována při $2\,300 \times g$ a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 20 minut. Centrifugací se oddělí plazma od krevního koláče. Z odebrané lidské plazmy lze izolovat enzym BChE z tzv. Cohnovy frakce. Tento postup využívá rozdílů vlastností plazmatických proteinů, kdy je plazma postupně srážena různými koncentracemi etanolu (0-40 %). V každém kroku dojde k vysrážení určitých plazmatických proteinů (Mousavi Hosseini a Ghasemzadeh 2016). BChE se nachází ve frakci IV a její koncentrace se pohybuje $\sim 4\text{-}9\text{ mg}$ v 1 litru plazmy (Grunwald et al. 1997a; Das a Liddell 1970; Muensch et al. 1976). Novější informace v literatuře popisují získání $\sim 7\text{ g}$ čisté BChE po následném dvoukrokovém purifikačním kroku a filtraci z Cohnovy frakce IV, která vážila 80 kg, což odpovídá $\sim 4\,000\text{ l}$ lidské plasmy (Saxena et al. 2010). Nevýhodou tohoto postupu je, že obsah proteinů je velmi nízký a aktivita enzymu po následné purifikaci není dostatečně vysoká (Schopfer et al. 2019). Lidská BChE, která je velmi účinná jako bioscavenger před účinky otrav NPL, dokáže v dávce 200 mg proteinu ochránit před $2 \times \text{LD}_{50}$ somanu (Nachon et al. 2013a).

AChE se v krvi nachází na povrchu erytrocytů. Erytrocyty získané centrifugací jsou opakovaně promývány 0,1M FP o pH 7,4 a centrifugovány. Následně jsou hemolyzovány. Hemolyzát je zmražen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po rozmražení hemolyzátu je možné odstranit hemoglobin a uvolnit AChE, která je ukotvena k buněčné membráně erytrocytů glykofosfatidylinositolovou kotvou, ultracentrifugací při $20\,800 \times g$ a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Pro získání dostatečného množství aktivní AChE i BChE je tak zapotřebí zpracovat velké objemy plné krve. Vlastní produkce lidských rekombinantních ChE umožňuje potřebu plné krve pro přípravu enzymů eliminovat.

Lidská rekombinantní AChE byla v minulosti připravena jak ve standardních expresních systémech jako jsou prokaryotní buňky např. *E. coli* (Fisher et al. 1993), v metylotrofních kvasinkách *Pichia pastoris* (Heim et al. 1998), tak i eukaryotních buňkách HEK293 (Franklin et al. 2016), HeLa (Kronman et al. 1992a) nebo CHO (Nachon et al. 2013b). Dále je možné získat rekombinantní lidskou AChE např. i z geneticky upravených rajčat, u kterých byla produkce AChE potvrzena jak v listech, tak i v plodech této rostliny (Mor et al. 2001).

Lidská rekombinantní BChE byla rovněž připravena v prokaryotních a eukaryotních systémech. Exprese aktivní rekombinantní lidské BChE v prokaryotickém systému nebyla zcela úspěšná, jelikož vedla k produkci nerozpustného, neaktivního proteinu z důvodu jeho nesprávnému složení do výsledné struktury, která je dána přítomností tří disulfidických můstků, po jeho izolaci z inkluzních tělísek. Pro úspěšnou produkci enzymu v těchto systémech musela být DNA BChE geneticky upravena (Brazzolotto et al. 2017). Aktivní lidská rekombinantní BChE byla produkována v savčích buňkách (Ilyushin et al. 2013; Xue et al. 2011; Lockridge et al. 1997), hmyzích buňkách (Brazzolotto et al. 2012), bourci morušovém (Wei et al. 2000), kozím mléce transgenních koz (Huang et al. 2007) a tabákových listech (Schneider et al. 2014).

Jak už bylo výše popsáno u produkce BACE1 je pro expresi enzymu, který má všechny posttranslační modifikace a podobá se tak své fyziologické formě, vhodné zvolit eukaryotní systém. Proto byl pro produkci lidských rekombinantních ChE využit stejný expresní Expi293 systém.

U firmy GeneArt gene syntetický servis byly připraveny sekvence genu lidské AChE o velikosti 1 878 bp a lidské BChE o velikosti 1 842 bp. Tyto fragmenty byly úspěšně nasyntetizovány, zaklonovány do expresního vektoru a po potvrzení DNA sekvenací. Izolované plazmidy získané z bakteriální noční kultury byly použity pro následnou expresi lidské rekombinantní AChE a BChE v Expi293 buňkách. Lidské rekombinantní ChE byly sekretovány do buněčného média, což je technologicky výhodnější, jelikož tak byl odstraněn lyzační krok, který je nutný k uvolnění enzymu do roztoku, jako tomu bylo u lidské rekombinantní BACE1.

Důležitým mílníkem pro purifikaci ChE bylo zavedení afinitní chromatografie za použití prokainamidové Sefarosy v roce 1978. V případě enzymu AChE je tato pryskyřice stále jednou z nejvyužívanějších (Carletti et al. 2008; Lockridge et al. 2018). Jednokroková purifikace BChE s použitím prokainamid Sefarosy, která je úspěšně používána pro purifikaci AChE, poskytuje částečně purifikovaný enzym z ~10 % (Lockridge et al. 2018). Tento fakt vedl k vývoji dalších pryskyřic, které by byly vhodnější pro purifikaci BChE. Pro enzym AChE byly v literatuře popsány další vhodné afinitní nosiče, například Q Sefarosa (Ma et al. 2006), diethylaminoethanol-Sefarosa (DEAE- Sefarosa) (Geyer et al. 2005) a Ni-NTA resin (Ceylan a Erdogan 2017).

Pro následnou purifikaci lidské rekombinantní AChE jsme zvolili způsob purifikace bez úprav supernatantu, pouze s prvotním odsolením supernatantu pomocí dialýzy a

následnou vazbou na Sefarosu4B/prokainamidovou pryskyřici, která byla již v minulosti na naší katedře využívána pro purifikaci muší AChE. Jednotlivé kroky purifikace byly sledovány záznamem změny aktivity enzymu modifikovanou Ellmanovou metodou. Ta po expresi dosahovala hodnoty až $\sim 12,000 \Delta A_{412} \cdot \text{min}^{-1}$. Vzorek enzymu byl před následnou vazbou na pryskyřici naředěn Tris puforem o pH 7,5 na aktivitu $\sim 2,000 \Delta A_{412} \cdot \text{min}^{-1}$. Bez této úpravy docházelo k vysokým ztrátám aktivity AChE. Celý proces byl zakončen dialýzou eluovaného enzymu.

Nová pryskyřice Hupresin, která byla vyvinuta pro purifikaci BChE, startupovou firmou Chemforase ve Francii, spojuje inhibitor BChE huprin, který je navázán pomocí kyseliny 6-aminohexanové na Sefarosu (Brazzolotto et al. 2012). Experimentálně bylo prokázáno, že purifikace s použitím pryskyřice Hupresin umožňuje získání BChE dosahující čistoty v rozmezí 54–90 % (Lockridge 2015c). Hupresinovou pryskyřici není možné použít pro purifikaci obou ChE, jako je tomu u pryskyřice prokainamid Sefarosy, jelikož huprin váže AChE velmi silně a nelze ji poté z této vazby uvolnit (Lockridge et al. 2018). Tuto pryskyřici je možné dekontaminovat pomocí 0,1M NaOH a použít až 7krát bez ztráty vazebné kapacity (Onder et al. 2017). Tato obnova vazebné kapacity byla popsána v odborné literatuře při purifikaci plazmatické BChE z Cohnovy frakce, avšak tento poznatek u purifikace naší lidské rekombinantní BChE v našich laboratorních podmínkách nepotvrdil (nepublikované údaje). Ačkoliv jsme postupovali podle literárně popsaného postupu, při následném použití vyčištěné Hupresinové pryskyřice, jsme nedosáhli podobných výsledků čistoty proteinu jako při použití nové pryskyřice.

Jak je patrné z výsledků SDS-PAGE je Hupresinová pryskyřice velmi účinná pro purifikaci lidské rekombinantní BChE. Jelikož je námi připravená lidská rekombinantní BChE označena krátkou sekvencí $6 \times \text{His}$, je možné využít k její purifikaci iontově afinitní chromatografií. Nejčastěji je v literatuře popsáno využití Ni-NTA pryskyřice. V budoucnosti je tak možné uvažovat o použití pouze jediné pryskyřice, a to Ni-NTA, jak pro purifikaci AChE, BChE, tak i BACE1, kde by výsledky purifikace při použití niklové místo kobaltové afinitní pryskyřice nemusely být příliš rozdílné. Hlavní přínos lze spatřit v:

- zavedení jednotného postupu pro všechny tři enzymy,

- časové úspore při přípravě velkého množství roztoku pro jednotlivé purifikační postupy,
- výrazná finanční úspore vzhledem k vysoké ceně Hupresinové pryskyřice (cena za 10 ml je v současnosti 20 000 Kč) oproti ceně Ni-NTA resinu (25 ml za 11 900 Kč).

Po purifikačním kroku pryskyřicemi následovala identifikace proteinů, která proběhla pomocí dvou metod, a to gelové elektroforézy a western blotu.

Sekvence AChE o délce 614 AMK má dle databáze UniProt Knowledgebase molekulovou hmotnost 67,796 kDa. Výsledky SDS-PAGE a western blotu lidské rekombinantní AChE ukázaly proužek v pozici ~70 kDa. Toto zjištění odpovídá již dříve publikovaným datům. Molekulová hmotnost lidské rekombinantní AChE, která je HEK293 buňkách produkovaná často jako dimer, dosahovala po redukci na monomerní podjednotky potvrzena o velikosti 67 a 70 kDa (Kronman et al. 1992b).

Sekvence BChE o délce 602 AMK má dle databáze UniProt Knowledgebase molekulovou hmotnost 68,418 kDa. Výsledky SDS-PAGE a western blotu lidské rekombinantní BChE ukázaly proužek v pozici ~100 kDa. Toto zjištění nicméně odpovídá již dříve publikovaným datům. Nativní lidská BChE je tetramer o molekulové hmotnosti 340 kDa, což znamená, že jedna monomerní jednotka má molekulovou hmotnost 85 kDa. Z čehož ~65 kDa je protein a ~20 kDa jsou cukerné jednotky. Podle stupně glykosylace se velikost monomerní jednotky u rekombinantní BChE pohybuje mezi ~85-110 kDa (Saxena et al. 2010; Chilukuri et al. 2008; Huang et al. 2007).

Specifická aktivita lidské rekombinantní AChE, která byla použita pro následnou charakterizaci jejích kinetických parametrů se pohybovala ~20 000 U.min⁻¹.mg⁻¹. Pro následnou stabilizaci enzymu, který byl na tuto specifickou aktivitu naředěn 0,1M FP pH 7,4, byl přidán albuminu (1 mg.ml⁻¹ roztoku). Zředěný roztok lidské AChE, který není stabilizován albuminem, může ztratit svou aktivitu již za 1 hodinu (Lockridge 2015b).

Pro charakterizaci lidské rekombinantní AChE jsme stanovili hodnotu K_m pro substrát ATChI. Jelikož hodnota K_m je pro daný enzym a substrát konstantní, lze pomocí této hodnoty porovnat jednotlivé enzymy produkované různými pracovišti.

Námi naměřená hodnota K_m pro substrát ATChI byla $0,288 \pm 0,020$ mM a odpovídala hodnotě K_m 0,210 mM publikované v práci Geyer a kolektivu (Geyer et al. 2005). Často citovaná K_m 0,120-0,150 mM, se pouze řádově shoduje s našimi daty. Je však důležité zmínit, že se jedná o lidskou rekombinantní AChE exprimovanou v HEK buňkách bez její následné purifikace (Velan et al. 1991; Wang et al. 2014).

Jako standardní inhibitor AChE byl vybrán donepezil, který je jedním z léčiv používaných k léčbě mírné až středně těžké formy AD. Výsledná hodnota IC_{50} pro donepezil byla $7,834 \pm 0,054$ nM. Tato hodnota koreluje s publikovanými výsledky 6,7-14,8 nM (Ogura et al. 2000; Costanzo et al. 2016; Wang et al. 2014).

Specifická aktivita lidské rekombinantní BChE, která byla použita pro následnou charakterizaci jejích kinetických parametrů, se pohybovala $\sim 50\,000$ U.min⁻¹.mg⁻¹. Pro stabilizaci enzymu, který byl na tuto specifickou aktivitu naředěn 0,1M FP pH 7,4, byl rovněž přidán albumin (1 mg na 1 ml roztoku).

Při charakterizaci lidské rekombinantní BChE jsme stanovili hodnotu K_m $0,256 \pm 0,003$ mM pro substrát BTChI. V dostupných literárních zdrojích je hodnota K_m uváděna v rozmezích 0,01-0,035 mM. Tyto výsledky byly nicméně publikovány pro enzymy z jiných živočišných druhů, jako např. potkan, myš, nebo jeho produkce probíhala v jiném expresním systému, případně byl enzym geneticky modifikován (Amitai et al. 1998; Ilyushin et al. 2013; Shenouda et al. 2009; Radić et al. 1993). Proto jsme tuto hodnotu ověřili u komerčně dostupné rekombinantní BChE. Zjištěná hodnota K_m pro daný enzym a substrát byla $0,277 \pm 0,030$ a odpovídala hodnotám u námi připravené rekombinantní BChE.

Etopropazin je selektivní inhibitor BChE a antiparkinsonikum užívané pro symptomatickou léčbu této choroby. Snižuje extrapyramidový motorický syndrom charakteristický pro Parkinsonovu chorobu (Tortorice 1993). Afinity etopropazinu k BChE je 1 000krát vyšší než k AChE. Selektivita tohoto inhibitoru souvisí s prostornějším vazebným místem u BChE, které je tak schopné vázat relativně velkou molekulu etopropazinu (Šinko et al. 2011; Simeon-Rudolf et al. 2001)

Z tohoto důvodu byl inhibitor etopropazin vybrán pro charakterizaci naší rekombinantní BChE. Výsledná hodnota IC_{50} pro etopropazin byla $0,477 \pm 0,045$ μ M a

koreluje s literárně publikovanými výsledky, jež se pohybují v rozmezí 0,16–15,14 μM (Ucar et al. 2005; Simeon-Rudolf et al. 2001).

AChE i BChE vykazují odlišnou stabilitu. AChE v roztoku, jak již bylo výše zmíněno, může v prostředí FP ztratit enzymatickou aktivitu během jedné hodiny, pokud není stabilizována přidávkem albuminu. V literatuře bylo popsáno, že ChE obsažené v hemolyzátu plné krve, ztrácí za pokojové teploty až 90 % své aktivity. Jestliže krev zamrazíme, sníží se aktivita ChE pouze o 10 % během 50 dní. Pokud od sebe oddělíme červené krvinky, které obsahují AChE, a plazmu, jež obsahuje BChE, dosáhneme rozdílných stabilit. Hemolyzát z červených krvinek, ztrácí aktivitu mnohem rychleji než plazma jak za laboratorní teploty, tak i při teplotách 4 °C a -20 °C. Aktivita AChE v hemolyzovaných červených krvinkách, které byly skladovány při -20 °C, vymizela během 6 týdnů (Crane et al. 1970).

Aktivita BChE v lidské plazmě, která byla skladována při 4 °C nebo zmrazena při -20° C, poklesla v průběhu 50 dnů o 10 % (Crane et al. 1970). Bylo potvrzeno, že aktivita lyofilizované i rozpuštěné BChE byla stabilní po dobu nejméně 2 let (Doctor et al. 2010). Lockridge ve své publikaci popsala, že pokud je BChE uchovávána ve sterilním roztoku, je plazmatická i rekombinantní forma enzymu stabilní při teplotě 4 °C po dobu nejméně 20 let (Lockridge 2015b).

U lidské BChE nedochází významněji k adsorpci na stěny nádob, ve kterých je uchována. Zředěné roztoky BChE v Tris pufru neztrácejí v průběhu času aktivitu a tak je není třeba je stabilizovat přidáním albuminu. Oproti tomu roztoky ředěné ve FP ztrácejí při pokojové teplotě 50 % aktivity za 24 hodin při pokojové teplotě (Grunwald et al. 1997b). Jelikož při našich měření používáme FP je pro zvýšení stability enzymu přidáván albumin v koncentraci 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ roztoku.

Na základě uvedených poznatků a našich dlouhodobých zkušeností jsme proto nepřistoupili k lyofilizaci BChE tak, jak to bylo provedeno u AChE. Oba enzymy byly uchovány při -80 °C.

6. Přínos práce

Hlavní přínos předložené disertační práce spočívá v zavedení produkce rekombinantní lidské BACE1, AChE a BChE, včetně validace enzymů stanovením jejich čistoty, kinetických parametrů K_m a určení hodnot IC_{50} pro jejich selektivní inhibitory. Ačkoliv prvotní náklady na pořízení jednotlivých komponentů Expi systému pro produkci rekombinantních proteinů přesáhly částku 100 000 Kč, je finanční částka, kterou v budoucnu ušetříme v rámci nákupu jednotlivých enzymů, nevyčísitelná. Ceny komerčně dostupných enzymů, v závislosti na valutovém kurzu, se pohybují v řádech desítek tisíc za setiny až desetiny mg:

- AChE: 0,1 mg ~39 000 Kč (Sigma-Aldrich),
- BChE: 0,05 mg ~14 000 Kč (Sino Biological),
- BACE1: 0,1 mg ~12 000 Kč (Sino Biological).

Občasný výpadek v dodávkách a hlavně kolísající aktivita pořízených enzymů je další nevýhodou, kterou přináší nákup od komerčních firem. Porovnáme-li enzymy dostupné na trhu s námi vyprodukovanými enzymy, mají tyto enzymy vyšší aktivitu a stabilitu, která je zajištěna okamžitou lyofilizací vyprodukovaného proteinu. Lyofilizace enzymů s sebou přináší i lepší manipulaci v rámci přípravy roztoku enzymu o dané specifické aktivitě a dochází tak i k nižším ztrátám při manipulaci s enzymem. Zároveň byla pozorována vyšší stabilita aktivity enzymu v průběhu biochemických měření. Nedochází ke kolísání, či k úplnému poklesu aktivity enzymu během měření v průběhu dne.

Vlastní produkce proteinů umožní rozvoj portfolia *in vitro* a *in vivo* metod v rámci KTVF. Produkce enzymu BACE1 dovolí zavést jednoduchou a finančně výhodnou metodu pro hodnocení nových inhibitorů tohoto proteinu. Přinese tak rozšíření souboru biochemických metod v rámci patologie AD. Vysoká specifická aktivita AChE umožní testovat inhibitory kromě spektrofotometrie i v rámci jiných fyzikálně chemických metod, např. potenciometrie. Homogenní vysoký výtěžek BChE poskytne dostatečné množství enzymu pro jeho využití jako bioscavengeru v dalších experimentech.

7. Závěr

Odvětví zabývající se produkcí rekombinantních proteinů, prošlo obrovským vývojem, který byl provázen řadou významných objevů. Dalo by se předpokládat, že hlavní objevy v této oblasti již byly učiněny. Je však jisté, že s dalším pokrokem v mnoha vědních oborech, které jsou s tímto odvětvím spojeny, bude docházet k neustálému rozvoji této oblasti. V průběhu řešení disertační práce, došlo např. k posunu vývoje expresního systému pro produkci obtížně exprimovatelných membránových proteinů, jež se pak snadno získávají z kultivačního média. V této chvíli se zdá, že by bylo jistě výhodnější použít tento systém pro produkci lidské rekombinantní BACE1, která je transmembránový protein a odstranit tak jeden krok procesu izolace tohoto enzymu z buněčné membrány. Přineslo by to úsporu času i finančních prostředků.

Původní systém Expi293 však vzhledem ke své univerzálnosti umožnil zavést jak expresi lidské rekombinantní BACE1, tak i AChE a BChE, které nejsou transmembránovými proteiny.

U všech enzymů byl validován proces purifikace. Enzymy byly charakterizovány určením kinetických konstant (enzym/substrát), jako jsou K_m , specifická aktivita a IC_{50} pro selektivní inhibitor daného enzymu. Tyto lidské rekombinantní enzymy slouží pro *in vitro* i *in vivo* hodnocení nových potenciálních léčiv, která jsou připravována na pracovišti KTVF FVZ UO.

Všechny produkované proteiny BACE1, AChE a BChE byly podrobeny další charakterizaci, jako je určení nativní konformace enzymu, glykosylace enzymu a identifikace pomocí kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií. Tato data zde nejsou v práci uvedena, jelikož se jedná o práci kolegů.

Na závěr je důležité podotknout, že zvolený systém může sloužit pro produkci dalších rekombinantních enzymů např. pro produkci myších či potkaních ChE. Ty pak mohou být využity jak pro *in vivo*, tak i pro *in vitro* hodnocení potenciálních léčiv a umnožní tak rozšířit další testovací modely na naší katedře.

8. Seznam použité literatury

ABOU-DONIA, Mohamed B., Briana SIRACUSE, I GUPTA a Ashly Sobel SOKOL, 2016. Sarin (GB, O-isopropyl methylphosphonofluoridate) neurotoxicity: critical review. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. **46**(10), 845–875. ISSN 1040-8444. Dostupné z: doi:10.1080/10408444.2016.1220916

AHMADI, Maryam, Narges DAMAVANDI, Mohammad Reza Akbari EIDGAHI a Fatemeh DAVAMI *, 2016. Utilization of Site-Specific Recombination in Biopharmaceutical Production. *Iranian Biomedical Journal*. **20**(2), 68–76. ISSN 1028-852X. Dostupné z: doi: 10.7508/ibj.2016.02.001.

ALBALA, Bruce, June M. KAPLOW, Robert LAI, Mark MATIJEVIC, Jagadeesh ALURI a Andrew SATLIN, 2012. CSF amyloid lowering in human volunteers after 14 days' oral administration of the novel BACE1 inhibitor E2609. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* [online]. **8**(4), S743. ISSN 1552-5260, 1552-5279. Dostupné z: doi:10.1016/j.jalz.2013.08.023

AMITAI, G., D. MOORAD, R. ADANI a B. P. DOCTOR, 1998. Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon. *Biochemical Pharmacology* [online]. **56**(3), 293–299. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/s0006-2952(98)00035-5

ARAKI, Wataru, 2016. Post-translational regulation of the β -secretase BACE1. *Brain Research Bulletin* [online]. **126**(Pt 2), 170–177. ISSN 1873-2747. Dostupné z: doi:10.1016/j.brainresbull.2016.04.009

ARYA, Ranjana, Alok BHATTACHARYA a Kulvinder Singh SAINI, 2008. Dictyostelium discoideum a promising expression system for the production of eukaryotic proteins. *The FASEB Journal* [online]. **22**(12), 4055–4066. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/fj.08-110544

AURBEK, N., H. THIERMANN, F. EYER, P. EYER a F. WOREK, 2009. Suitability of human butyrylcholinesterase as therapeutic marker and pseudo catalytic scavenger in organophosphate poisoning: A kinetic analysis. *Toxicology* [online]. **259**(3), 133–139. ISSN 0300-483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2009.02.014

BAJGAR, Jiri, Josef FUSEK, Kamil KUCA, Lucie BARTOSOVA a Daniel JUN, 2007. Treatment of organophosphate intoxication using cholinesterase reactivators: facts and fiction. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* [online]. **7**(5), 461–466. ISSN 1389-5575. Dostupné z: doi:10.2174/138955707780619581

BARANYI, Lajos, Christopher B. DOERING, Gabriella DENNING, Richard E. GAUTNEY, Kyle T. HARRIS, H. Trent SPENCER, Andre ROY, Hatem ZAYED a Boro DROPULIC, 2013. Rapid Generation of Stable Cell Lines Expressing High Levels of Erythropoietin, Factor VIII, and an Antihuman CD20 Antibody Using Lentiviral Vectors. *Human Gene Therapy Methods* [online]. **24**(4), 214–227. ISSN 1946-6536. Dostupné z: doi:10.1089/hgtb.2013.002

BARÃO, Soraia, Diederik MOECHARS, Stefan F. LICHTENTHALER a Bart DE STROOPER, 2016. BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Trends in Neurosciences* [online]. **39**(3), 158–169. ISSN 0166-2236. Dostupné z: doi:10.1016/j.tins.2016.01.003

BARBIER, Pascale, Orgeta ZEJNELI, Marlène MARTINHO, Alessia LASORSA, Valérie BELLE, Caroline SMET-NOCCA, Philipp O. TSVETKOV, François DEVRED a Isabelle LANDRIEU, 2019. Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects. *Frontiers in Aging Neuroscience* [online]. **11** [vid. 2020-08-03]. ISSN 1663-4365. Dostupné z: doi:10.3389/fnagi.2019.00204

BARNARD, Eric A., 1974. Neuromuscular Transmission Enzymatic Destruction of Acetylcholine. In: John I. HUBBARD, ed. *The Peripheral Nervous System* [online]. Boston, MA: Springer US, s. 201–224 [vid. 2020-07-01]. ISBN 978-1-4615-8699-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4615-8699-9_9

BARTELS, C F, F S JENSEN, O LOCKRIDGE, A F VAN DER SPEK, H M RUBINSTEIN, T LUBRANO a B N LA DU, 1992. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *American Journal of Human Genetics*. **50**(5), 1086–1103. ISSN 0002-9297.

BARTUS, R. T., 1979. Physostigmine and recent memory: effects in young and aged nonhuman primates. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **206**(4422), 1087–1089. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.227061

BARTUS, R. T., R. L. DEAN, B. BEER a A. S. LIPPA, 1982. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science (New York, N.Y.)* [online]. **217**(4558), 408–414. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.7046051

BATURE, Fidelia, Barbara-Ann GUINN, Dong PANG a Yannis PAPPAS, 2017. Signs and symptoms preceding the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic scoping review of literature from 1937 to 2016. *BMJ open* [online]. **7**(8), e015746. ISSN 2044-6055. Dostupné z: doi:10.1136/bmjopen-2016-015746

BENEK, Ondrej, Kamil MUSÍLEK a Kamil KUČA, 2012. Mitochondrial enzyme ABAD and its role in the development and treatment of Alzheimer's disease. *Ceska a Slovenska Farmacie: Casopis Ceske Farmaceuticke Spolecnosti a Slovenske Farmaceuticke Spolecnosti*. **61**(4), 144–149. ISSN 1210-7816.

BERÁNEK, Martin, 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. Praha: Karolinum Press. ISBN 80-246-3224-1.

BEUREL, Eleonore, Steven F. GRIECO a Richard S. JOPE, 2015. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & therapeutics* [online]. **0**, 114–131. ISSN 0163-7258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.016

BORNHORST, Joshua A. a Joseph J. FALKE, 2000. [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In: *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press,

Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins Part A: Gene Expression and Protein Purification, s. 245–254 [vid. 2020-09-17]. Dostupné z: doi:10.1016/S0076-6879(00)26058-8

BRAZZOLOTTO, Xavier, Alexandre IGERT, Virginia GUILLON, Gianluca SANTONI a Florian NACHON, 2017. Bacterial Expression of Human Butyrylcholinesterase as a Tool for Nerve Agent Bioscavengers Development. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* [online]. **22**(11) [vid. 2020-09-23]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22111828

BRAZZOLOTTO, Xavier, Marielle WANDHAMMER, Cyril RONCO, Marie TROVASLET, Ludovic JEAN, Oksana LOCKRIDGE, Pierre-Yves RENARD a Florian NACHON, 2012. Human butyrylcholinesterase produced in insect cells: huprine-based affinity purification and crystal structure. *The FEBS Journal* [online]. **279**(16), 2905–2916. ISSN 1742-4658. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08672.x

BRUINZEEL, Wouter, Jeff YON, Silvio GIOVANNELLI a Stefan MASURE, 2002. Recombinant insect cell expression and purification of human β -secretase (BACE-1) for X-ray crystallography. *Protein Expression and Purification* [online]. **26**(1), 139–148. ISSN 1046-5928. Dostupné z: doi:10.1016/S1046-5928(02)00516-8

CAI, Yan, Seong Soo A AN a SangYun KIM, 2015. Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clinical Interventions in Aging* [online]. **10**, 1163–1172. ISSN 1176-9092. Dostupné z: doi:10.2147/CIA.S85808

CAPELL, Anja, Harald STEINER, Michael WILLEM, Hartmut KAISER, Carmen MEYER, Jochen WALTER, Sven LAMMICH, Gerd MULTHAUP a Christian HAASS, 2000. Maturation and Pro-peptide Cleavage of β -Secretase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **275**(40), 30849–30854. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M003202200

CARLETTI, Eugénie, Jacques-Philippe COLLETIER, Florine DUPEUX, Marie TROVASLET, Patrick MASSON a Florian NACHON, 2010. Structural evidence that human acetylcholinesterase inhibited by tabun ages through O-dealkylation. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **53**(10), 4002–4008. ISSN 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/jm901853b

CARLETTI, Eugénie, He LI, Bin LI, Fredrik EKSTRÖM, Yvain NICOLET, Mélanie LOIODICE, Emilie GILLON, Marie T. FROMENT, Oksana LOCKRIDGE, Lawrence M. SCHOPFER, Patrick MASSON a Florian NACHON, 2008. Aging of cholinesterases phosphorylated by tabun proceeds through O-dealkylation. *Journal of the American Chemical Society* [online]. **130**(47), 16011–16020. ISSN 1520-5126. Dostupné z: doi:10.1021/ja804941z

CERASOLI, Douglas M., Stuart J. ARMSTRONG, Tony E. REEVES, Sean M. HODGINS, Shane A. KASTEN, Robyn B. LEE-STUBBS, C. Linn CADIEUX, Tamara C. OTTO, Benedict R. CAPACIO a David E. LENZ, 2020. Butyrylcholinesterase, a stereospecific in vivo bioscavenger against nerve agent intoxication. *Biochemical*

Pharmacology [online]. **171**, 113670. ISSN 1873-2968. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2019.113670

CEYLAN, Hamid a Orhan ERDOGAN, 2017. Cloning, expression, and characterization of human brain acetylcholinesterase in *Escherichia coli* using a SUMO fusion tag. *Turkish Journal of Biology* [online] [vid. 2020-11-10]. Dostupné z: doi:10.3906/biy-1602-83

COLE, Sarah L. a Robert VASSAR, 2008. The Role of Amyloid Precursor Protein Processing by BACE1, the β -Secretase, in Alzheimer Disease Pathophysiology. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(44), 29621–29625. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R800015200

COLE, S. L. a Robert VASSAR, 2007. The Basic Biology of BACE1: A Key Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Current Genomics* [online]. **8**(8), 509–530. ISSN 1389-2029. Dostupné z: doi:10.2174/138920207783769512

CORDY, Joanna M., Joanna M. CORDY, Nigel M. HOOPER a Anthony J. TURNER, 2006. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease (Review). *Molecular Membrane Biology* [online]. **23**(1), 111–122. ISSN 0968-7688. Dostupné z: doi:10.1080/09687860500496417

COSTANTINI, Claudio, Mi Hee KO, Mary Cabell JONAS a Luigi PUGLIELLI, 2007. A reversible form of lysine acetylation in the ER and Golgi lumen controls the molecular stabilization of BACE1. *The Biochemical Journal* [online]. **407**(Pt 3), 383–395. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20070040

COSTANZO, Paola, Luca CARIATI, Doriana DESIDERIO, Roberta SGAMMATO, Anna LAMBERTI, Rosaria ARCONI, Raffaele SALERNO, Monica NARDI, Marirosario MASULLO a Manuela OLIVERIO, 2016. Design, Synthesis, and Evaluation of Donepezil-Like Compounds as AChE and BACE-1 Inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letters* [online]. **7**(5), 470–475. Dostupné z: doi:10.1021/acsmchemlett.5b00483

CRANE, Ch R, C D SANDERS a J K ABBOT, 1970. Studies on the storage stability of human blood cholinesterases : I.

CUOZZO, J W a H H SOUTTER, 2014a. Overview of Recent Progress in Protein-Expression Technologies for Small-Molecule Screening. *Journal of biomolecular screening* [online] [vid. 2020-09-07]. Dostupné z: doi:10.1177/1087057114520975

CUOZZO, John W. a Holly H. SOUTTER, 2014b. Overview of Recent Progress in Protein-Expression Technologies for Small-Molecule Screening. *Journal of Biomolecular Screening* [online]. **19**(7), 1000–1013. ISSN 1087-0571, 1552-454X. Dostupné z: doi:10.1177/1087057114520975

ČOLOVIĆ, Mirjana B, Danijela Z KRSTIĆ, Tamara D LAZAREVIĆ-PAŠTI, Aleksandra M BONDŽIĆ a Vesna M VASIĆ, 2013. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. **11**(3), 315–335. ISSN 1570-159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X11311030006

DARVESH, Sultan, David A. HOPKINS a Changiz GEULA, 2003. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nature Reviews Neuroscience* [online]. **4**(2), 131–138. ISSN 1471-0048. Dostupné z: doi:10.1038/nrn1035

DAS, Brati a Riqiang YAN, 2019. A Close Look at BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *CNS drugs* [online]. **33**(3), 251–263. ISSN 1172-7047. Dostupné z: doi:10.1007/s40263-019-00613-7

DAS, P. K. a J. LIDDELL, 1970. Purification and properties of human serum cholinesterase. *Biochemical Journal* [online]. **116**(5), 875–881. ISSN 0006-2936. Dostupné z: doi:10.1042/bj1160875

DAVIES, P. a A. J. MALONEY, 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)* [online]. **2**(8000), 1403. ISSN 0140-6736. Dostupné z: doi:10.1016/s0140-6736(76)91936-x

DAWSON, R. M., 1995. Oxime effects on the rate constants of carbamylation and decarbamylation of acetylcholinesterase for pyridostigmine, physostigmine and insecticidal carbamates. *Neurochemistry International* [online]. **26**(6), 643–654. ISSN 0197-0186. Dostupné z: doi:10.1016/0197-0186(94)00161-m

DECOURT, Boris a Marwan N. SABBAGH, 2011. BACE1 as a potential biomarker for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. **24**(Suppl 2), 53–59. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-2011-110017

DENG, Minzi, Wanxia HE, Ya TAN, Hailong HAN, Xiangyou HU, Kun XIA, Zhuohua ZHANG a Riqiang YAN, 2013a. Increased Expression of Reticulon 3 in Neurons Leads to Reduced Axonal Transport of β Site Amyloid Precursor Protein-cleaving Enzyme 1. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **288**(42), 30236–30245. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M113.480079

DENG, Yu, Zhe WANG, Ruitao WANG, Xiaozhu ZHANG, Shuting ZHANG, Yili WU, Matthias STAUFENBIEL, Fang CAI a Weihong SONG, 2013b. Amyloid- β protein (A β) Glu11 is the major β -secretase site of β -site amyloid- β precursor protein-cleaving enzyme 1(BACE1), and shifting the cleavage site to A β Asp1 contributes to Alzheimer pathogenesis. *European Journal of Neuroscience* [online]. **37**(12), 1962–1969. ISSN 1460-9568. Dostupné z: doi:10.1111/ejn.12235

DHARA, Venkata Gayatri, Harnish Mukesh NAIK, Natalia I. MAJEWSKA a Michael J. BETENBAUGH, 2018. Recombinant Antibody Production in CHO and NS0 Cells: Differences and Similarities. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* [online]. **32**(6), 571–584. ISSN 1179-190X. Dostupné z: doi:10.1007/s40259-018-0319-9

DOCTOR, B P, 2010. Large-Scale Production of Human Serum Butyrylcholinesterase as a Bioscavenger. US Patent 7754461 B2. 2010.

DOCTOR, Bhupendra P. a Ashima SAXENA, 2005. Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **157–158**, 167–171. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2005.10.024

DOENICKE, A., Th GÜRTNER, G. KREUTZBERG, I. REMES, W. SPIESS a K. STEINBEREITHNER, 1963. SERUM CHOLINESTERASE ANENZYMIA Report of a Case Confirmed by Enzyme-histochemical Examination of Liver-Biopsy Specimen. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* [online]. 7(2), 59–68. ISSN 1399-6576. Dostupné z: doi:10.1111/j.1399-6576.1963.tb00204.x

DRACHMAN, David A. a Janet LEAVITT, 1974. Human Memory and the Cholinergic System: A Relationship to Aging? *Archives of Neurology* [online]. 30(2), 113–121. ISSN 0003-9942. Dostupné z: doi:10.1001/archneur.1974.00490320001001

DVIR, Hay, Israel SILMAN, Michal HAREL, Terrone L. ROSENBERRY a Joel L. SUSSMAN, 2010. Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chemico-biological interactions* [online]. 187(1–3), 10–22. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2010.01.042

EDDLESTON, Michael, Ladislaus SZINICZ, Peter EYER a Nick BUCKLEY, 2002. Oximes in Acute Organophosphate Pesticide Poisoning: a Systematic Review of Clinical Trials. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. 95(5), 275–283. ISSN 1460-2725. Dostupné z:doi: 10.1093/qjmed/95.5.275

EGAN, Michael F., James KOST, Tiffini VOSS, Yuki MUKAI, Paul S. AISEN, Jeffrey L. CUMMINGS, Pierre N. TARIOT, Bruno VELLAS, Christopher H. VAN DYCK, Merce BOADA, Ying ZHANG, Wen LI, Christine FURTEK, Erin MAHONEY, Lyn HARPER MOZLEY, Yi MO, Cyrille SUR a David MICHELSON, 2019. Randomized Trial of Verubecestat for Prodromal Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* [online]. 380(15), 1408–1420. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1812840

EINEM, Bjoern von, Anke WAHLER, Tobias SCHIPS, Alberto SERRANO-POZO, Christian PROEPPER, Tobias M. BOECKERS, Angelika RUECK, Thomas WIRTH, Bradley T. HYMAN, Karin M. DANZER, Dietmar R. THAL a Christine A. F. von ARNIM, 2015. The Golgi-Localized γ -Ear-Containing ARF-Binding (GGA) Proteins Alter Amyloid- β Precursor Protein (APP) Processing through Interaction of Their GAE Domain with the Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1 (BACE1). *PLOS ONE* [online]. 10(6), e0129047. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0129047

EKETJÄLL, Susanna, Juliette JANSON, Karin KASPERSSON, Anna BOGSTEDT, Fredrik JEPPSSON, Johanna FÄLTING, Samantha Budd HAEBERLEIN, Alan R. KUGLER, Robert C. ALEXANDER a Gvido CEBERS, 2016. AZD3293: A Novel, Orally Active BACE1 Inhibitor with High Potency and Permeability and Markedly Slow Off-Rate Kinetics. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. 50(4), 1109–1123. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-150834

ELLMAN, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES a R. M. FEATHER-STONE, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* [online]. 7, 88–95. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/0006-2952(61)90145-9

FERREIRA-VIEIRA, Talita H., Isabella M. GUIMARAES, Flavia R. SILVA a Fabiola M. RIBEIRO, 2016. Alzheimer's Disease: Targeting the Cholinergic System. *Current*

Neuropharmacology [online]. **14**(1), 101–115. ISSN 1570-159X. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X13666150716165726

FERRER-MIRALLES, Neus a Antonio VILLAVARDE, 2013. Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microbial Cell Factories* [online]. **12**, 113. ISSN 1475-2859. Dostupné z: doi:10.1186/1475-2859-12-113

FISHER, Abraham, 2008. Cholinergic treatments with emphasis on M1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* [online]. **5**(3), 433–442. ISSN 1933-7213. Dostupné z: doi:10.1016/j.nurt.2008.05.002

FISHER, M, Ittah A, Liefer I a Gorecki M, 1993. Expression and Reconstitution of Biologically Active Human Acetylcholinesterase from Escherichia coli. *Cellular and Molecular Neurobiology*. **13**(1), 25–38. ISSN 0272-4340. Dostupné z: doi:10.1007/BF00712987.

FRANCIS, Paul T., Alan M. PALMER, Michael SNAPE a Gordon K. WILCOCK, 1999. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* [online]. **66**(2), 137–147. ISSN 0022-3050, 1468-330X. Dostupné z: doi:10.1136/jnnp.66.2.137

FRANKLIN, Matthew C., Michael J. RUDOLPH, Christopher GINTER, Michael S. CASSIDY a Jonah CHEUNG, 2016. Structures of paraoxon-inhibited human acetylcholinesterase reveal perturbations of the acyl loop and the dimer interface. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* [online]. **84**(9), 1246–1256. ISSN 1097-0134. Dostupné z: doi:10.1002/prot.25073

GAUTHIER, Serge, Nathan HERRMANN, Florian FERRERI a Catherine AGOKOU, 2006. Use of memantine to treat Alzheimer's disease. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal* [online]. **175**(5), 501–502. ISSN 0820-3946. Dostupné z: doi:10.1503/cmaj.1060168

GEYER, Brian C., Mrinalini MURALIDHARAN, Irene CHERNI, Jeffrey DORAN, Samuel P. FLETCHER, Tama EVRON, Hermona SOREQ a Tsafir S. MOR, 2005. Purification of transgenic plant-derived recombinant human acetylcholinesterase-R. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **157–158**, Proceedings of the VIII International Meeting on Cholinesterases, 331–334. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2005.10.097

GHOSH, Pradipta a Stuart KORNFELD, 2004. The GGA proteins: key players in protein sorting at the trans-Golgi network. *European Journal of Cell Biology* [online]. **83**(6), 257–262. ISSN 0171-9335. Dostupné z: doi:10.1078/0171-9335-00374

GRISARU, D., M. STERNFELD, A. ELDOR, D. GLICK a H. SOREQ, 1999. Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *European Journal of Biochemistry* [online]. **264**(3), 672–686. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00693x

GRUNWALD, Jacob, Dino MARCUS, Yoel PAPIER, Lily RAVEH, Zipora PITTEL a Yacov ASHANI, 1997a. Large-scale purification and long-term stability of human butyrylcholinesterase: a potential bioscavenger drug. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. **34**(2), 123–135. ISSN 0165-022X. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-022X(97)01208-6

GRUNWALD, Jacob, Dino MARCUS, Yoel PAPIER, Lily RAVEH, Zipora PITTEL a Yacov ASHANI, 1997b. Large-scale purification and long-term stability of human butyrylcholinesterase: a potential bioscavenger drug. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. **34**(2), 123–135. ISSN 0165-022X. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-022X(97)01208-6

GUPTILL, Jeffrey T., Madhu SONI a Matthew N. MERIGGIOLI, 2016. Current Treatment, Emerging Translational Therapies, and New Therapeutic Targets for Autoimmune Myasthenia Gravis. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* [online]. **13**(1), 118–131. ISSN 1878-7479. Dostupné z: doi:10.1007/s13311-015-0398-y

HAASS, Christian, Cynthia A. LEMERE, Anja CAPELL, Martin CITRON, Peter SEUBERT, Dale SCHENK, Lars LANNFELT a Dennis J. SELKOE, 1995. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nature Medicine* [online]. **1**(12), 1291–1296. ISSN 1546-170X. Dostupné z: doi:10.1038/nm1295-1291

HAMILTON, Stephen R a Tillman U GERNGROSS, 2007. Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. **18**(5), Expression technologies / Tissue and cell engineering, 387–392. ISSN 0958-1669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2007.09.001

HANIU, Mitsuru, Paul DENIS, Yunjen YOUNG, Elizabeth A. MENDIAZ, Janis FULLER, John O. HUI, Brian D. BENNETT, Steven KAHN, Sandra ROSS, Teresa BURGESS, Viswanatham KATTA, Gary ROGERS, Robert VASSAR a Martin CITRON, 2000. Characterization of Alzheimer's β -Secretase Protein BACE A PEPSIN FAMILY MEMBER WITH UNUSUAL PROPERTIES. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **275**(28), 21099–21106. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M002095200

HE, Xiangyuan, Guangyu ZHU, Gerald KOELSCH, Karla K. RODGERS, Xuejun C. ZHANG a Jordan TANG, 2003. Biochemical and Structural Characterization of the Interaction of Memapsin 2 (β -Secretase) Cytosolic Domain with the VHS Domain of GGA Proteins. *Biochemistry* [online]. **42**(42), 12174–12180. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi035199h

HEIM, Jürgen, Claudia SCHMIDT-DANNERT, Haruyuki ATOMI a Rolf D SCHMID, 1998. Functional expression of a mammalian acetylcholinesterase in *Pichia pastoris*: comparison to acetylcholinesterase, expressed and reconstituted from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* [online]. **1396**(3), 306–319. ISSN 0167-4781. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4781(97)00196-6

HEMMING, Matthew L., Joshua E. ELIAS, Steven P. GYGI a Dennis J. SELKOE, 2009. Identification of β -Secretase (BACE1) Substrates Using Quantitative Proteomics. *PLoS ONE* [online]. 4(12) [vid. 2018-11-05]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0008477

HIRST, Jennifer, Winnie W. Y. LUI, Nicholas A. BRIGHT, Nicholas TOTTY, Matthew N. J. SEAMAN a Margaret S. ROBINSON, 2000. A Family of Proteins with γ -Adaptin and Vhs Domains That Facilitate Trafficking between the Trans-Golgi Network and the Vacuole/Lysosome. *The Journal of Cell Biology*. 149(1), 67–80. ISSN 0021-9525.

HOLSINGER, R. M. Damian, Nelleke GOENSE, John BOHORQUEZ a Padraig STRAPPE, 2013. Splice variants of the Alzheimer's disease beta-secretase, BACE1. *neurogenetics* [online]. 14(1), 1–9. ISSN 1364-6753. Dostupné z: doi:10.1007/s10048-012-0348-3

HRABINOVA, Martina, Jaroslav PEJCHAL, Tomas KUCERA, Daniel JUN, Monika SCHMIDT a Ondrej SOUKUP, 2020. Is It the Twilight of BACE1 Inhibitors? *Current Neuropharmacology* [online]. ISSN 1875-6190. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X18666200503023323

HUANG, Yue-Jin, Yue HUANG, Hernan BALDASSARRE, Bin WANG, Anthoula LAZARIS, Martin LEDUC, Annie S. BILODEAU, Annie BELLEMARE, Mélanie CÔTÉ, Peter HERSKOVITS, Madjid TOUATI, Carl TURCOTTE, Loredana VALEANU, Nicolas LEMÉE, Harvey WILGUS, Isabelle BÉGIN, Bhim BHATIA, Khalid RAO, Nathalie NEVEU, Eric BROCHU, Janice PIERSON, Duncan K. HOCKLEY, Douglas M. CERASOLI, David E. LENZ, Costas N. KARATZAS a Solomon LANGERMANN, 2007. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 104(34), 13603–13608. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0702756104

HULSE, Elspeth J., James D. HASLAM, Stevan R. EMMETT a Tom WOOLLEY, 2019. Organophosphorus nerve agent poisoning: managing the poisoned patient. *British Journal of Anaesthesia* [online]. 123(4), 457–463. ISSN 1471-6771. Dostupné z: doi:10.1016/j.bja.2019.04.061

HUSE, J. T., D. S. PIJAK, G. J. LESLIE, V. M. LEE a R. W. DOMS, 2000. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 275(43), 33729–33737. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M004175200

HUSSAIN, Ishrut, David POWELL, David R. HOWLETT, David G. TEW, Thomas D. MEEK, Conrad CHAPMAN, Israel S. GLOGER, Kay E. MURPHY, Christopher D. SOUTHAN, Dominic M. RYAN, Trudi S. SMITH, David L. SIMMONS, Frank S. WALSH, Colin DINGWALL a Gary CHRISTIE, 1999. Identification of a Novel Aspartic Protease (Asp 2) as β -Secretase. *Molecular and Cellular Neuroscience* [online]. 14(6), 419–427. ISSN 1044-7431. Dostupné z: doi:10.1006/mcne.1999.0811

CHANG, K H, Yang JM, Chun HO a Chung IS, 2005. Enhanced activity of recombinant beta-secretase from *Drosophila melanogaster* S2 cells transformed with cDNAs encoding human beta 1,4-galactosyltransferase and Galbeta1,4-GlcNAc alpha2,6-sialyltransferase. *Journal of biotechnology* [online] [vid. 2020-09-09]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jbiotec.2004.12.008

CHARLWOOD, Joanne, Colin DINGWALL, Rosalie MATICO, Ishrut HUSSAIN, Kyung JOHANSON, Stephen MOORE, David J. POWELL, J. Mark SKEHEL, Steve RATCLIFFE, Brian CLARKE, John TRILL, Sharon SWEITZER a Patrick CAMILLERI, 2001. Characterization of the Glycosylation Profiles of Alzheimer's β -Secretase Protein Asp-2 Expressed in a Variety of Cell Lines. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(20), 16739–16748. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M009361200

CHEON, M. S., M. DIERSSEN, S. H. KIM a G. LUBEC, 2008. Protein expression of BACE1, BACE2 and APP in Down syndrome brains. *Amino Acids* [online]. **35**(2), 339–343. ISSN 1438-2199. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-007-0618-9

CHILUKURI, N., K. PARIKH, W. SUN, R. NAIK, P. TIPPARAJU, B. P. DOCTOR a A. SAXENA, 2005. Polyethylene glycosylation prolongs the circulatory stability of recombinant human butyrylcholinesterase. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **157–158**, 115–121. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2005.10.013

CHILUKURI, Nageswararao, Ellen G. DUYSSEN, Kalpana PARIKH, Wei SUN, Bhupendra P. DOCTOR, Oksana LOCKRIDGE a Ashima SAXENA, 2008. Adenovirus-mediated gene transfer of human butyrylcholinesterase results in persistent high-level transgene expression in vivo. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **175**(1), Proceedings of the IX International Meeting on Cholinesterases, 327–331. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2008.04.009

CHRISTENSEN, Michelle A., Weihui ZHOU, Hong QING, Anna LEHMAN, Sjaak PHILIPSEN a Weihong SONG, 2004. Transcriptional Regulation of BACE1, the β -Amyloid Precursor Protein β -Secretase, by Sp1. *Molecular and Cellular Biology* [online]. **24**(2), 865–874. ISSN 0270-7306. Dostupné z: doi:10.1128/MCB.24.2.865-874.2004

ILYUSHIN, D. G., Илюшин Д. Г., О. М. HAERTLEY, Эртле О. М., Т. В. БОБИК, Бобик Т. В., О. G. SHAMBORANT, Шамборант О. Г., Е. А. SURINA, Сурина Е. А., V. D. KNORRE, Кнорре В. Д., P. MASSON, Masson P, I. V. SMIRNOV, Смирнов И. В., А. G. GABIBOV, Габибов А. Г., N. A. PONOMARENKO a Пономаренко Н. А., 2013. Recombinant Human Butyrylcholinesterase As a New-Age Bioscavenger Drug: Development of the Expression System. *Acta Naturae* [online]. **5**(1), 73–84. ISSN 2075-8251. Dostupné z: doi:10.32607/20758251-2013-5-1-73-84

JACKSON, David A., Robert H. SYMONS a Paul BERG, 1972. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **69**(10), 2904–2909. ISSN 0027-8424.

JASIECKI, Jacek a Bartosz WASĄG, 2019. Butyrylcholinesterase Protein Ends in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease-Could BCHE Genotyping Be Helpful in Alzheimer's Therapy? *Biomolecules* [online]. **9**(10). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9100592

JOHNSON, G. a S. W. MOORE, 2006. The peripheral anionic site of acetylcholinesterase: structure, functions and potential role in rational drug design. *Current Pharmaceutical Design* [online]. **12**(2), 217–225. ISSN 1381-6128. Dostupné z: doi:10.2174/138161206775193127

JOHNSON, Joseph L., Bernadette CUSACK, Matthew P. DAVIES, Abdul FAUQ a Terrone L. ROSENBERRY, 2003. Unmasking tandem site interaction in human acetylcholinesterase. Substrate activation with a cationic acetanilide substrate. *Biochemistry* [online]. **42**(18), 5438–5452. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi027065u

JONSSON, Thorlakur, Jasvinder K. ATWAL, Stacy STEINBERG, Jon SNAEDAL, Palmi V. JONSSON, Sigurbjorn BJORNSSON, Hreinn STEFANSSON, Patrick SULEM, Daniel GUDBJARTSSON, Janice MALONEY, Kwame HOYTE, Amy GUSTAFSON, Yichin LIU, Yanmei LU, Tushar BHANGALE, Robert R. GRAHAM, Johanna HUTTENLOCHER, Gyda BJORNSDOTTIR, Ole A. ANDREASSEN, Erik G. JÖNSSON, Aarno PALOTIE, Timothy W. BEHRENS, Olafur T. MAGNUSSON, Augustine KONG, Unnur THORSTEINSDOTTIR, Ryan J. WATTS a Kari STEFANSSON, 2012. A mutation in *APP* protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* [online]. **488**(7409), 96–99. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/nature11283

KALOW, W. a N. STARON, 1957. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **35**(12), 1305–1320.

KALVODOVA, Lucie, Nicoletta KAHYA, Petra SCHWILLE, Robert EHEHALT, Paul VERKADE, David DRECHSEL a Kai SIMONS, 2005. Lipids as Modulators of Proteolytic Activity of BACE INVOLVEMENT OF CHOLESTEROL, GLYCOSPHINGOLIPIDS, AND ANIONIC PHOSPHOLIPIDS IN VITRO. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **280**(44), 36815–36823. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M504484200

KANDALEPAS, Patty C. a Robert VASSAR, 2014. The Normal and Pathologic Roles of the Alzheimer's β -secretase, BACE1. *Current Alzheimer research*. **11**(5), 441–449. ISSN 1567-2050. Dostupné z: doi: 10.2174/1567205011666140604122059.

KANG, Eugene L., Barbara BISCARO, Fabrizio PIAZZA a Giuseppina TESCO, 2012. BACE1 Protein Endocytosis and Trafficking Are Differentially Regulated by Ubiquitination at Lysine 501 and the Di-leucine Motif in the Carboxyl Terminus. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **287**(51), 42867–42880. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112.407072

KASSA, Jiří, Jiří BAJGAR, Kamil KUČA, Kamil MUSÍLEK a Jana KARASOVÁ, 2008. The present approaches to the development of prophylactic and therapeutic

antidotes against nerve agents. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. **1**(1), 18–21. ISSN 1337-6853. Dostupné z: doi:10.2478/v10102-010-0026-y

KENNEDY, Matthew E., Andrew W. STAMFORD, Xia CHEN, Kathleen COX, Jared N. CUMMING, Marissa F. DOCKENDORF, Michael EGAN, Larry ERESHEFSKY, Robert A. HODGSON, Lynn A. HYDE, Stanford JHEE, Huub J. KLEIJN, Reshma KUVELKAR, Wei LI, Britta A. MATTSON, Hong MEI, John PALCZA, Jack D. SCOTT, Michael TANEN, Matthew D. TROYER, Jack L. TSENG, Julie A. STONE, Eric M. PARKER a Mark S. FORMAN, 2016. The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS β -amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. *Science Translational Medicine* [online]. **8**(363), 363ra150-363ra150. ISSN 1946-6234, 1946-6242. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.aad9704

KHAN, Kishwar Hayat, 2013. Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. **3**(2), 257–263. ISSN 2228-5881. Dostupné z: doi:10.5681/apb.2013.042

KITAJIMA, Masayuki a Hiroshi TAKAKU, 2008. Induction of Antitumor Acquired Immunity by Baculovirus Autographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus Infection in Mice. *Clinical and Vaccine Immunology* [online]. **15**(2), 376–378. ISSN 1556-6811, 1556-679X. Dostupné z: doi:10.1128/CVI.00285-07

KLOSKE, Courtney M. a Donna M. WILCOCK, 2020. The Important Interface Between Apolipoprotein E and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Immunology* [online]. **11** [vid. 2020-08-06]. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2020.00754

KOELSCH, Gerald, 2017. BACE1 Function and Inhibition: Implications of Intervention in the Amyloid Pathway of Alzheimer's Disease Pathology. *Molecules* [online]. **22**(10), 1723. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22101723

KOLLEWE, Christian a Andreas VILCINSKAS, 2013. Production of Recombinant Proteins in Insect Cells. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* [online]. **9**(3), 255–271. ISSN 1553-3468, 1558-6332. Dostupné z: doi:10.3844/ajbbbsp.2013.255.271

KRONMAN, Chanoch, Baruch VELAN, Yehoshua GOZES, Moshe LEITNER, Yehuda FLASHNER, Aryeh LAZAR, Dino MARCUS, Tamar SERY, Yoel PAPIER, Haim GROSFELD, Sara COHEN a Avigdor SHAFFERMAN, 1992a. Production and secretion of high levels of recombinant human acetylcholinesterase in cultured cell lines: microheterogeneity of the catalytic subunit. *Gene* [online]. **121**(2), 295–304. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(92)90134-B

KRONMAN, Chanoch, Baruch VELAN, Yehoshua GOZES, Moshe LEITNER, Yehuda FLASHNER, Aryeh LAZAR, Dino MARCUS, Tamar SERY, Yoel PAPIER, Haim GROSFELD, Sara COHEN a Avigdor SHAFFERMAN, 1992b. Production and secretion of high levels of recombinant human acetylcholinesterase in cultured cell lines: microheterogeneity of the catalytic subunit. *Gene* [online]. **121**(2), 295–304. ISSN 0378-1119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(92)90134-B

- LANCTÔT, Krista L., Nathan HERRMANN a Maysoon M. LOULOU, 2003. Correlates of response to acetylcholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*. **28**(1), 13–26. ISSN 1180-4882.
- LARSON, Marilyn A., Oksana LOCKRIDGE a Steven H. HINRICHS, 2014. Polyproline promotes tetramerization of recombinant human butyrylcholinesterase. *The Biochemical Journal* [online]. **462**(2), 329–335. ISSN 1470-8728. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20140421
- LEHMANN, H. a P. H. SIMMONS, 1958. Sensitivity to suxamethonium; apnoea in two brothers. *Lancet (London, England)* [online]. **2**(7054), 981–982. ISSN 0140-6736. Dostupné z: doi:10.1016/s0140-6736(58)90474-4
- LIN, Xinli, Gerald KOELSCH, Shili WU, Debbie DOWNS, Azar DASHTI a Jordan TANG, 2000. Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the β -secretase site of β -amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**(4), 1456–1460. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.97.4.1456.
- LIU, Chia-Chen, Takahisa KANEKIYO, Huaxi XU a Guojun BU, 2013. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nature reviews. Neurology* [online]. **9**(2), 106–118. ISSN 1759-4758. Dostupné z: doi:10.1038/nrneurol.2012.263
- SCHOPFER, Lawrence M., Delacour H, Masson P, Leroy J, Krejci E a Lockridge O, 2017. The C5 Variant of the Butyrylcholinesterase Tetramer Includes a Noncovalently Bound 60 kDa Lamellipodin Fragment. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. **22**(7) [vid. 2020-07-07]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22071083
- LOCKRIDGE, O., C. F. BARTELS, T. A. VAUGHAN, C. K. WONG, S. E. NORTON a L. L. JOHNSON, 1987. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *Journal of Biological Chemistry*. **262**(2), 549–557. ISSN 0021-9258, 1083-351X.
- LOCKRIDGE, Oksana, 2015a. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **148**, 34–46. ISSN 0163-7258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.011
- LOCKRIDGE, Oksana, 2015b. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **148**, 34–46. ISSN 0163-7258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.011
- LOCKRIDGE, Oksana, 2015c. Review of human butyrylcholinesterase structure, function, genetic variants, history of use in the clinic, and potential therapeutic uses. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. **148**, 34–46. ISSN 0163-7258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.011

LOCKRIDGE, Oksana, Renee M. BLONG, Patrick MASSON, Marie-Thérèse FROMENT, Charles B. MILLARD a Clarence A. BROOMFIELD, 1997. A Single Amino Acid Substitution, Gly117His, Confers Phosphotriesterase (Organophosphorus Acid Anhydride Hydrolase) Activity on Human Butyrylcholinesterase. *Biochemistry* [online]. **36**(4), 786–795. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi961412g

LOCKRIDGE, Oksana, Emilie DAVID, Lawrence M. SCHOPFER, Patrick MASSON, Xavier BRAZZOLOTTO a Florian NACHON, 2018. Comparison of Hupresin[®] to Procainamide-Sepharose for Purification of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase [online]. [vid. 2019-06-27]. Dostupné z: doi:10.20944/preprints201806.0443.v1

LOCKRIDGE, Oksana, Ellen G. DUYSSEN a Patrick MASSON, 2011. Butyrylcholinesterase: Overview, Structure, and Function. *Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology*. 25–41. Dostupné z:doi.org/10.1002/9780470640500.ch3

LOCKRIDGE, Oksana, Robert B. NORNGREN, Rudolph C. JOHNSON a Thomas A. BLAKE, 2016. Naturally Occurring Genetic Variants of Human Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase and Their Potential Impact on the Risk of Toxicity from Cholinesterase Inhibitors. *Chemical Research in Toxicology* [online]. **29**(9), 1381–1392. ISSN 1520-5010. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.6b00228

LU, Peilong, Xiao-chen BAI, Dan MA, Tian XIE, Chuangye YAN, Linfeng SUN, Guanghui YANG, Yanyu ZHAO, Rui ZHOU, Sjors H.W. SCHERES a Yigong SHI, 2014. Three-dimensional structure of human γ -secretase. *Nature* [online]. **512**(7513), 166–170. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/nature13567

LUND, E. G., J. M. GUILYARDO a D. W. RUSSELL, 1999. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **96**(13), 7238–7243. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.13.7238

MA, Xingyuan, Jianhua TAN, Dongzhi WEI, Pin ZHU a Manji SUN, 2006. High-level secretion and purification of recombinant acetylcholinesterase from human cerebral tissue in *P. pastoris* and identification by chromogenic reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. **72**(2), 316–322. ISSN 1432-0614. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-005-0260-y

MALLENDER, William D., Debra YAGER, Luisa ONSTEAD, Michael R. NICHOLS, Christopher ECKMAN, Kumar SAMBAMURTI, Lisa M. KOPCHO, Jovita MARCINKEVICIENE, Robert A. COPELAND a Terrone L. ROSENBERY, 2001. Characterization of Recombinant, Soluble β -Secretase from an Insect Cell Expression System. *Molecular Pharmacology* [online]. **59**(3), 619–626. ISSN 0026-895X, 1521-0111. Dostupné z: doi:10.1124/mol.59.3.619

MALONEY, Janice A., Travis BAINBRIDGE, Amy GUSTAFSON, Shuo ZHANG, Roxanne KYAUK, Pascal STEINER, Marcel VAN DER BRUG, Yichin LIU, James A. ERNST, Ryan J. WATTS a Jasvinder K. ATWAL, 2014. Molecular Mechanisms of Alzheimer Disease Protection by the A673T Allele of Amyloid Precursor Protein. *The*

Journal of Biological Chemistry [online]. **289**(45), 30990–31000. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M114.589069

MANCINI, Francesca, Angela DE SIMONE a Vincenza ANDRISANO, 2011. Beta-secretase as a target for Alzheimer's disease drug discovery: an overview of in vitro methods for characterization of inhibitors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **400**(7), 1979–1996. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-011-4963-x

MANCINI, Francesca, Marina NALDI, Vanni CAVRINI a Vincenza ANDRISANO, 2007. Multiwell fluorometric and colorimetric microassays for the evaluation of beta-secretase (BACE-1) inhibitors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. **388**(5), 1175–1183. ISSN 1618-2650. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-007-1356-2

MAREŠOVÁ, Petra, Hana MOHELSKÁ, Josef DOLEJŠ a Kamil KUČA, 2015. Socio-economic Aspects of Alzheimer's Disease. *Current Alzheimer Research* [online]. **12**(9), 903–911. ISSN 1875-5828. Dostupné z: doi:10.2174/156720501209151019111448

MASSON, P., M. T. FROMENT, C. F. BARTELS a O. LOCKRIDGE, 1996. Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *European Journal of Biochemistry* [online]. **235**(1–2), 36–48. ISSN 0014-2956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1996.00036x

MASSON, P., W. XIE, M. T. FROMENT, V. LEVITSKY, P. L. FORTIER, C. ALBARET a O. LOCKRIDGE, 1999. Interaction between the peripheral site residues of human butyrylcholinesterase, D70 and Y332, in binding and hydrolysis of substrates. *Biochimica Et Biophysica Acta* [online]. **1433**(1–2), 281–293. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/s0167-4838(99)00115-6

MASSON, Patrick a Sofya V. LUSHCHEKINA, 2016. Emergence of catalytic bioscavengers against organophosphorus agents. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **259**(Pt B), 319–326. ISSN 1872-7786. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2016.02.010

MASSOULIÉ, Jean, 2002. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neuro-Signals* [online]. **11**(3), 130–143. ISSN 1424-862X. Dostupné z: doi:10.1159/000065054

MASSOULIÉ, Jean, Leo PEZZEMENTI, Suzanne BON, Eric KREJCI a François-Marie VALLETTE, 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology* [online]. **41**(1), 31–91. ISSN 0301-0082. Dostupné z: doi:10.1016/0301-0082(93)90040-Y

MATTANOVICH, Diethard, Paola BRANDUARDI, Laura DATO, Brigitte GASSER, Michael SAUER a Danilo PORRO, 2012. Recombinant Protein Production in Yeasts. In: Argelia LORENCE, ed. *Recombinant Gene Expression* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, Methods in Molecular Biology, s. 329–358 [vid.2020-06-23]. ISBN 978-1-61779-433-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-433-9_17

- MESULAM, Marsel, Angela GUILLOZET, Pamela SHAW a Bruce QUINN, 2002. Widely Spread Butyrylcholinesterase Can Hydrolyze Acetylcholine in the Normal and Alzheimer Brain. *Neurobiology of Disease* [online]. **9**(1), 88–93. ISSN 0969-9961. Dostupné z: doi:10.1006/nbdi.2001.0462
- MOR, Tsafirir S., Meira STERNFELD, Hermona SOREQ, Charles J. ARNTZEN a Hugh S. MASON, 2001. Expression of recombinant human acetylcholinesterase in transgenic tomato plants. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. **75**(3), 259–266. ISSN 1097-0290. Dostupné z: doi:10.1002/bit.10012
- MORIMOTO, Akira, Kazuhiro IRIE, Kazuma MURAKAMI, Yuichi MASUDA, Hajime OHIGASHI, Masaya NAGAO, Hiroyuki FUKUDA, Takahiko SHIMIZU a Takuji SHIRASAWA, 2004. Analysis of the Secondary Structure of β -Amyloid ($A\beta$ 42) Fibrils by Systematic Proline Replacement. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(50), 52781–52788. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M406262200
- MOTOKI, Kazumi, Hideaki KUME, Akiko ODA, Akira TAMAOKA, Ai HOSAKA, Fuyuki KAMETANI a Wataru ARAKI, 2012. Neuronal β -amyloid generation is independent of lipid raft association of β -secretase BACE1: analysis with a palmitoylation-deficient mutant. *Brain and Behavior* [online]. **2**(3), 270–282. ISSN 2162-3279. Dostupné z: doi:10.1002/brb3.52
- MOUSAVI HOSSEINI, Kamran a Mehran GHASEMZADEH, 2016. Implementation of Plasma Fractionation in Biological Medicines Production. *Iranian Journal of Biotechnology* [online]. **14**(4), 213–220. ISSN 1728-3043. Dostupné z: doi:10.15171/ijb.1401
- MUENSCH, Helmut, Heinz-Werner GOEDDE a Akira YOSHIDA, 1976. Human-Serum Cholinesterase Subunits and Number of Active Sites of the Major Component. *European Journal of Biochemistry* [online]. **70**(1), 217–223. ISSN 1432-1033. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1976.tb10972.x
- MULLAN, Mike, Fiona CRAWFORD, Karin AXELMAN, Henry HOULDEN, Lena LILIUS, Bengt WINBLAD a Lars LANNFELT, 1992. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N – terminus of β – amyloid. *Nature Genetics* [online]. **1**(5), 345–347. ISSN 1546-1718. Dostupné z: doi:10.1038/ng0892-345
- MURPHY, M. Paul a Harry LEVINE, 2010. Alzheimer's Disease and the β -Amyloid Peptide. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* [online]. **19**(1), 311. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-2010-1221
- MUYLLAERT, D., A. KREMER, T. JAWORSKI, P. BORGHGRAEF, H. DEVIJVER, S. CROES, I. DEWACHTER a F. VAN LEUVEN, 2008. Glycogen synthase kinase-3beta, or a link between amyloid and tau pathology? *Genes, Brain, and Behavior* [online]. **7 Suppl 1**, 57–66. ISSN 1601-183X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1601-183X.2007.00376x

NACHMANSOHN, D. a I. B. WILSON, 1951. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry* [online]. **12**, 259–339. ISSN 0065-258X. Dostupné z: doi:10.1002/9780470122570.ch5

NACHMANSOHN, DAVID, 1973. 2 - THE NEUROMUSCULAR JUNCTION THE ROLE OF ACETYLCHOLINE IN EXCITABLE MEMBRANES. In: Geoffrey H. BOURNE, ed. *Physiology and Biochemistry (Second Edition)* [online]. B. m.: Academic Press, s. 31–116 [vid. 2020-07-01]. ISBN 978-0-12-119103-0. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-119103-0.50009-5

NACHON, Florian, Xavier BRAZZOLOTTO, Marie TROVASLET a Patrick MASSON, 2013a. Progress in the development of enzyme-based nerve agent bioscavengers. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **206**(3), Translation of experimental research for improved treatment of chemical warfare agent poisoning, 536–544. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2013.06.012

NACHON, Florian, Eugénie CARLETTI, Cyril RONCO, Marie TROVASLET, Yvain NICOLET, Ludovic JEAN a Pierre-Yves RENARD, 2013b. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyryl-cholinesterase. *Biochemical Journal* [online]. **453**(3), 393–399. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20130013

NACHON, Florian, Yvain NICOLET, Nathalie VIGUIÉ, Patrick MASSON, Juan C. FONTECILLA-CAMPS a Oksana LOCKRIDGE, 2002. Engineering of a monomeric and low-glycosylated form of human butyrylcholinesterase. *European Journal of Biochemistry* [online]. **269**(2), 630–637. ISSN 1432-1033. Dostupné z: doi:10.1046/j.0014-2956.2001.02692x

NORDBERG, Agneta, Clive BALLARD, Roger BULLOCK, Taher DARREH-SHORI a Monique SOMOGYI, 2013. A Review of Butyrylcholinesterase as a Therapeutic Target in the Treatment of Alzheimer's Disease. *The Primary Care Companion for CNS Disorders* [online]. **15**(2) [vid. 2020-07-07]. ISSN 2155-7772. Dostupné z: doi:10.4088/PCC.12r01412

NORSTROM, Eric, 2017. Metabolic Processing of the Amyloid Precursor Protein — New Pieces of the Alzheimer's Puzzle. *Discovery Medicine*. **23**(127), 269–276.

OGURA, H., T. KOSASA, Y. KURIYA a Y. YAMANISHI, 2000. Comparison of inhibitory activities of donepezil and other cholinesterase inhibitors on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in vitro. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* [online]. **22**(8), 609–613. Dostupné z: doi:10.1358/MF.2000.22.8.701373

OKADA, Hirokazu, Wenzhu ZHANG, Corrinne PETERHOFF, Jeremy C. HWANG, Ralph A. NIXON, Sung H. RYU a Tae-Wan KIM, 2010. Proteomic identification of sorting nexin 6 as a negative regulator of BACE1-mediated APP processing. *The FASEB Journal* [online]. **24**(8), 2783–2794. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.09-146357

ONDER, Seda, Emilie DAVID, Ozden TACAL, Lawrence M. SCHOPFER a Oksana LOCKRIDGE, 2017. Hupresin Retains Binding Capacity for Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase after Sanitation with Sodium Hydroxide. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **8** [vid. 2017-12-11]. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2017.00713

PARIKH, Kalpana, Ellen G. DUYSEN, Benjamin SNOW, Neil S. JENSEN, Veeraswamy MANNE, Oksana LOCKRIDGE a Nageswararao CHILUKURI, 2011. Gene-delivered butyrylcholinesterase is prophylactic against the toxicity of chemical warfare nerve agents and organophosphorus compounds. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* [online]. **337**(1), 92–101. ISSN 1521-0103. Dostupné z: doi:10.1124/jpet.110.175646

PATOČKA, Jiri, Daniel JUN, Jiri BAJGAR a Kamil KUČA, 2006. Prophylaxis Against Nerve Agent Intoxications. *Defence Science Journal* [online]. **56**(5), 775–784. ISSN 0976-464X. Dostupné z: doi:10.14429/dsj.56.1941

PATOČKA, Jiri, Kamil KUČA a Daniel JUN, 2004. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase--important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. **47**(4), 215–228. ISSN 1211-4286.

PATOČKA, Jiří, Kamil KUČA a Daniel JUN, 2004. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase – Important Enzymes of Human Body. *Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)* [online]. **47**(4), 215–228. ISSN 1211-4286, 1805-9694. Dostupné z: doi:10.14712/18059694.2018.95

QUINN, Daniel M., 1987. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chemical Reviews* [online]. **87**(5), 955–979. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr00081a005

RADIĆ, Z., N. A. PICKERING, D. C. VELLOM, S. CAMP a P. TAYLOR, 1993. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry* [online]. **32**(45), 12074–12084. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00096a018

RASALA, Beth A. a Stephen P. MAYFIELD, 2015. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynthesis Research* [online]. **123**(3), 227–239. ISSN 1573-5079. Dostupné z: doi:10.1007/s11120-014-9994-7

RICE, Helen, Tom M. MANN, Stuart J. ARMSTRONG, Matthew E. PRICE, A. Chris GREEN a John E. H. TATTERSALL, 2016. The potential role of bioscavenger in the medical management of nerve-agent poisoned casualties. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **259**, 12th International Meeting on Cholinesterases and 6th Conference of Paraoxonase, 175–181. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2016.04.038

ROSENBERG, Yvonne J., Ashima SAXENA, Wei SUN, Xiaoming JIANG, Nageswararao CHILUKURI, Chunjuan LUO, Bhupendra P. DOCTOR a Keunmyoung D. LEE, 2010. Demonstration of in vivo stability and lack of immunogenicity of a

polyethyleneglycol-conjugated recombinant CHO-derived butyrylcholinesterase bioscavenger using a homologous macaque model. *Chemico-Biological Interactions* [online]. **187**(1), 10th International Meeting on Cholinesterases, 279–286. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2010.02.042

SAFIEH, Mirna, Amos D. KORCZYN a Daniel M. MICHAELSON, 2019. ApoE4: an emerging therapeutic target for Alzheimer's disease. *BMC Medicine* [online]. **17**(1), 64. ISSN 1741-7015. Dostupné z: doi:10.1186/s12916-019-1299-4

SANGER, Frederick a Margaret DOWDING, 1996. *Selected Papers of Frederick Sanger: With Commentaries*. B. m. World Scientific. ISBN 978-981-02-2430-1.

SARDANA, Vinod, Bei XU, Joan ZUGAY-MURPHY, Zhongguo CHEN, Mohinder SARDANA, Paul L. DARKE, Sanjeev MUNSHI a Lawrence C. KUO, 2004. A general procedure for the purification of human beta-secretase expressed in Escherichia coli. *Protein Expression and Purification* [online]. **34**(2), 190–196. ISSN 1046-5928. Dostupné z: doi:10.1016/j.pep.2003.12.014

SATHYA, M., P. PREMKUMAR, C. KARTHICK, P. MOORTHY, K. S. JAYACHANDRAN a M. ANUSUYADEVI, 2012. BACE1 in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta* [online]. **414**, 171–178. ISSN 0009-8981. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2012.08.013

SAXENA, Ashima, Prasanthi TIPPARAJU, Chunyuan LUO a Bhupendra P. DOCTOR, 2010. Pilot-scale production of human serum butyrylcholinesterase suitable for use as a bioscavenger against nerve agent toxicity. *Process Biochemistry* [online]. **45**(8), 1313–1318. ISSN 1359-5113. Dostupné z: doi:10.1016/j.procbio.2010.04.021

SCOTT, Jack D., Sarah W. LI, Andrew P. J. BRUNSKILL, Xia CHEN, Kathleen COX, Jared N. CUMMING, Mark FORMAN, Eric J. GILBERT, Robert A. HODGSON, Lynn A. HYDE, Qin JIANG, Ulrich ISERLOH, Irina KAZAKEVICH, Reshma KUVELKAR, Hong MEI, John MEREDITH, Jeffrey MISIASZEK, Peter ORTH, Lana M. ROSSITER, Meagan SLATER, Julie STONE, Corey O. STRICKLAND, Johannes H. VOIGT, Ganfeng WANG, Hongwu WANG, Yusheng WU, William J. GREENLEE, Eric M. PARKER, Matthew E. KENNEDY a Andrew W. STAMFORD, 2016. Discovery of the 3-Imino-1,2,4-thiadiazinane 1,1-Dioxide Derivative Verubecestat (MK-8931) A β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 Inhibitor for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **59**(23), 10435–10450. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.6b00307

SELKOE, Dennis J a John HARDY, 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine* [online]. **8**(6), 595–608. ISSN 1757-4676. Dostupné z: doi:10.15252/emmm.201606210

SHARMA, Kamlesh, 2019. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports* [online]. **20**(2), 1479–1487. ISSN 1791-2997. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2019.10374

SHENOUDA, Josephine, Paula GREEN a Lester SULTATOS, 2009. An Evaluation of the Inhibition of Human Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase by the

Organophosphate Chlorpyrifos Oxon. *Toxicology and applied pharmacology* [online]. **241**(2), 135–142. ISSN 0041-008X. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2009.08.014

SHIN, Jongyeon, Saet-Byeol YU, Un Young YU, Sangmee Ahn JO a Jung-Hyuck AHN, 2010. Swedish mutation within amyloid precursor protein modulates global gene expression towards the pathogenesis of Alzheimer's disease. *BMB reports* [online]. **43**(10), 704–709. ISSN 1976-670X. Dostupné z: doi:10.5483/BMBRep.2010.43.10.704

SCHMECHEL, Ariane, Markus STRAUSS, Andrea SCHLICKSUPP, Rüdiger PIPKORN, Christian HAASS, Thomas A. BAYER a Gerd MULTHAUP, 2004. Human BACE Forms Dimers and Colocalizes with APP. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(38), 39710–39717. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M402785200

SCHMIDT, Monika, Ondrej BENEK, Lucie VINKLAROVA, Martina HRABINOVA, Lucie ZEMANOVA, Matej CHRIBEK, Vendula KRALOVA, Lukas HROCH, Rafael DOLEZAL, Antonin LYCKA, Lukas PRCHAL, Daniel JUN, Laura AITKEN, Frank GUNN-MOORE, Kamil KUČA a Kamil MUSILEK, 2020. Benzothiazolyl Ureas are Low Micromolar and Uncompetitive Inhibitors of 17 β -HSD10 with Implications to Alzheimer's Disease Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **21**(6) [vid. 2020-11-21]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21062059

SCHNEIDER, Jeannine D., Sylvestre MARILLONNET, Alexandra CASTILHO, Clemens GRUBER, Stefan WERNER, Lukas MACH, Victor KLIMYUK, Tsafir S. MOR a Herta STEINKELLNER, 2014. Oligomerization status influences subcellular deposition and glycosylation of recombinant butyrylcholinesterase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Biotechnology Journal* [online]. **12**(7), 832–839. ISSN 1467-7652. Dostupné z: doi:10.1111/pbi.12184

SCHOPFER, Lawrence M., Oksana LOCKRIDGE, Emilie DAVID a Steven H. HINRICHS, 2019. Purification of human butyrylcholinesterase from frozen Cohn fraction IV-4 by ion exchange and Hupresin affinity chromatography. *PLOS ONE* [online]. **14**(1), e0209795. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0209795

SIDERA, Christina, Chibuu LIU a Brian AUSTEN, 2002. Pro-domain removal in ASP-2 and the cleavage of the amyloid precursor are influenced by pH. *BMC Biochemistry* [online]. **3**(1), 25. ISSN 1471-2091. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2091-3-25

SILMAN, Israel a Joel L. SUSSMAN, 2008. Acetylcholinesterase: how is structure related to function? *Chemico-Biological Interactions* [online]. **175**(1–3), 3–10. ISSN 0009-2797. Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2008.05.035

SIMEON-RUDOLF, Vera, Goran ŠINKO, Anita ŠTUGLIN a Elsa REINER, 2001. Inhibition of Human Blood Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase by Ethopropazine. *Croatica Chemica Acta*. **74**(1), 173–182. ISSN 0011-1643.

SINHA, Sukanto, John P. ANDERSON, Robin M. BARBOUR, Guriqbal S. BASI, Russell J. CACCAVELLO, David E. DAVIS, Minhtam DOAN, Harry F. DOVEY, Normand FRIGON, Jin HONG, Kirsten JACOBSON-CROAK, Nancy E. JEWETT,

Pamela S. KEIM, Jeroen E. KNOPS, Ivan M. LIEBERBURG, M. POWER, Hua Fang TAN, Gwen P. TATSUNO, Jay S. TUNG, Dale SCHENK, Peter SEUBERT, Susanna M. SUOMENSAARI, Shuwen WANG, Donald WALKER, Jun ZHAO, LISA C. MCCONLOGUE a Varghese JOHN, 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* [online]. **402**, 537–540. Dostupné z: doi:10.1038/990114

SJÖGREN, Magnus a Kaj BLENNOW, 2005. The link between cholesterol and Alzheimer's disease. *The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* [online]. **6**(2), 85–97. ISSN 1562-2975. Dostupné z: doi:10.1080/15622970510029795

SOMAVARAPU, Arun Kumar a Kasper P. KEPP, 2017. Membrane Dynamics of γ -Secretase Provides a Molecular Basis for β -Amyloid Binding and Processing. *ACS Chemical Neuroscience* [online]. **8**(11), 2424–2436. Dostupné z: doi:10.1021/acchemneuro.7b00208

SOUKUP, Ondrej, Jan KORABECNY, David MALINAK, Eugenie NEPOVIMOVA, Ngoc L. PHAM, Kamil MUSILEK, Martina HRABINOVA, Vendula HEPNAROVA, Rafael DOLEZAL, Petr PAVEK, Petr JOST, Tereza KOBRLOVA, Jana JANKOCKOVA, Lukas GORECKI, Miroslav PSOTKA, Thuy D. NGUYEN, Karl BOX, Breeze OUTHWAITE, Martina CECKOVA, Ales SORF, Daniel JUN a Kamil KUČA, 2018. In vitro and in silico Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning - a New Hope or a Blind Alley? *Medicinal Chemistry* [online]. **14**(3), 281–292. Dostupné z: doi:10.2174/1573406414666180112105657

SUN, Xiaoyan, Vassilios BEGLOPOULOS, Mark P. MATTSON a Jie SHEN, 2005. Hippocampal spatial memory impairments caused by the familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 M146V mutation. *Neuro-Degenerative Diseases* [online]. **2**(1), 6–15. ISSN 1660-2854. Dostupné z: doi:10.1159/000086426

SUSSMAN, J. L., M. HAREL, F. FROLOW, C. OEFNER, A. GOLDMAN, L. TOKER a I. SILMAN, 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* [online]. **253**(5022), 872–879. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1678899

SUSSMAN, Joel L. a Israel SILMAN, 1992. Acetylcholinesterase: structure and use as a model for specific cation protein interactions. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. **2**(5), 721–729. ISSN 0959-440X. Dostupné z: doi:10.1016/0959-440X(92)90207-N

SZEGLETES, T., W. D. MALLENDER, P. J. THOMAS a T. L. ROSENBERRY, 1999. Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. *Biochemistry* [online]. **38**(1), 122–133. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi9813577

ŠINKO, Goran, Zrinka KOVARIK, Elsa REINER, Vera SIMEON-RUDOLF a Jure STOJAN, 2011. Mechanism of stereoselective interaction between

butyrylcholinesterase and ethopropazine enantiomers. *Biochimie* [online]. **93**(10), 1797–1807. ISSN 0300-9084. Dostupné z: doi:10.1016/j.biochi.2011.06.023

TAN, Jiangli a Geneviève EVIN, 2012. B-site APP-cleaving enzyme 1 trafficking and Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Neurochemistry* [online]. **120**(6), 869–880. ISSN 1471-4159. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07623x

TANAHASHI, Hiroshi a Takeshi TABIRA, 2001. Three novel alternatively spliced isoforms of the human beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme (BACE) and their effect on amyloid beta-peptide production. *Neuroscience Letters* [online]. **307**(1), 9–12. ISSN 03043940. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-3940(01)01912-7

TANZI, Rudolph E., 2012. The Genetics of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. **2**(10), a006296. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a006296

TESCO, Giuseppina, Young Ho KOH, Eugene KANG, Andrew CAMERON, Shinjita DAS, Miguel SENA-ESTEVEZ, Mikko HILTUNEN, Shao-Hua YANG, Zhenyu ZHONG, Yong SHEN, James SIMPKINS a Rudolph E. TANZI, 2007. Depletion of GGA3 stabilizes BACE and enhances β -secretase activity. *Neuron* [online]. **54**(5), 721–737. ISSN 0896-6273. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuron.2007.05.012

THERMOFISHER SCIENTIFIC, 2020. *Expi293TM Expression System Kit* [online] [vid. 2020-04-20]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A14635>

THERMOFISHER SCIENTIFIC, nedatováno. *Expi293FTM Cells* [online] [vid. 2020-04-20]. Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A14528>

TIMMERS, Maarten, Bianca VAN BROECK, Steven RAMAEL, John SLEMMON, Katja DE WAEPENAERT, Alberto RUSSU, Jennifer BOGERT, Hans STIELTJES, Leslie M. SHAW, Sebastiaan ENGELBORGHES, Dieder MOECHARS, Marc MERCKEN, Enchi LIU, Vikash SINHA, John KEMP, Luc VAN NUETEN, Luc TRITSMANS a Johannes Rolf STREFFER, 2016. Profiling the dynamics of CSF and plasma A β reduction after treatment with JNJ-54861911, a potent oral BACE inhibitor. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* [online]. **2**(3), 202–212. ISSN 2352-8737. Dostupné z: doi:10.1016/j.trci.2016.08.001

TOMASSELLI A. G. Tomasselli, Paddock D. J., Emmons TL, Mildner AM, Leone JW, Lull JM, Cialdella JI, Prince DB, Fischer HD, Heinrikson RL a Benson TE, 2008. High yield expression of human BACE constructs in *Escherichia coli* for refolding, purification, and high resolution diffracting crystal forms. *Protein and peptide letters* [online] [vid. 2020-09-09]. Dostupné z: doi:10.2174/092986608783489553

TOP, Oguz, Juliana PARSONS, Lennard L. BOHLENDER, Stefan MICHELFELDER, Phillipp KOPP, Christian BUSCH-STEENBERG, Sebastian N. W. HOERNSTEIN, Peter F. ZIPFEL, Karsten HÄFFNER, Ralf RESKI a Eva L. DECKER, 2019. Recombinant Production of MFHR1, A Novel Synthetic Multitarget Complement Inhibitor, in Moss Bioreactors. *Frontiers in Plant Science* [online]. **10** [vid. 2020-06-23]. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2019.00260

TORTORICE, Kathryn L., 1993. Parkinson's Disease. *Journal of Pharmacy Practice* [online]. **6**(6), 283–289. ISSN 0897-1900. Dostupné z: doi:10.1177/089719009300600605

TUCCI, Paula, Victoria VEROLI, Mario SEÑORALE a Mónica MARÍN, 2016. Escherichia coli: The Leading Model for the Production of Recombinant Proteins. In: Susana CASTRO-SOWINSKI, ed. *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability* [online]. Singapore: Springer, Microorganisms for Sustainability, s. 119–147 [vid. 2020-06-23]. ISBN 978-981-10-2555-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-10-2555-6_6

UCAR, Gulberk, Nesrin GOKHAN, Akgul YESILADA a A. Altan BILGIN, 2005. 1-N-Substituted thiocarbamoyl-3-phenyl-5-thienyl-2-pyrazolines: A novel cholinesterase and selective monoamine oxidase B inhibitors for the treatment of Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Neuroscience Letters* [online]. **382**(3), 327–331. ISSN 0304-3940. Dostupné z: doi:10.1016/j.neulet.2005.03.028

VARDY, Emma R. L. C., Andrew J. CATTO a Nigel M. HOOPER, 2005. Proteolytic mechanisms in amyloid- β metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine* [online]. **11**(10), 464–472. ISSN 1471-4914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2005.08.004

VASSAR, R., B. D. BENNETT, S. BABU-KHAN, S. KAHN, E. A. MENDIAZ, P. DENIS, D. B. TEFLOW, S. ROSS, P. AMARANTE, R. LOELOFF, Y. LUO, S. FISHER, J. FULLER, S. EDENSON, J. LILE, M. A. JAROSINSKI, A. L. BIERS, E. CURRAN, T. BURGESS, J. C. LOUIS, F. COLLINS, J. TREANOR, G. ROGERS a M. CITRON, 1999. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* [online]. **286**(5440) [vid. 2017-03-21]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/science.286.5440.735

VASSAR, Robert, 2004. BACE1: The β -Secretase Enzyme in Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience* [online]. **23**(1–2), 105–114. ISSN 0895-8696. Dostupné z: doi:10.1385/JMN:23:1-2:105

VASSAR, Robert, Dora M. KOVACS, Riqiang YAN a Philip C. WONG, 2009. The β -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* [online]. **29**(41), 12787–12794. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009

VELAN, B., Kronman C, Grosfeld H, Leitner M, Gozes Y, Flashner Y, Sery T, Cohen S, Ben-Aziz R a Seidman S, 1991. Recombinant human acetylcholinesterase is secreted from transiently transfected 293 cells as a soluble globular enzyme. *Cellular and molecular neurobiology* [online] [vid. 2020-11-10]. Dostupné z: doi:10.1007/BF00712806

VETRIVEL, Kulandaivelu S., Xavier MECKLER, Ying CHEN, Phuong D. NGUYEN, Nabil G. SEIDAH, Robert VASSAR, Philip C. WONG, Masaki FUKATA, Maria Z. KOUNNAS a Gopal THINAKARAN, 2009. Alzheimer Disease A β Production in the Absence of S-Palmitoylation-dependent Targeting of BACE1 to Lipid Rafts. *Journal of*

Biological Chemistry [online]. **284**(6), 3793–3803. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M808920200

WALTER, Jochen, Regina FLUHRER, Bianka HARTUNG, Michael WILLEM, Christoph KAETHER, Anja CAPELL, Sven LAMMICH, Gerd MULTHAUP a Christian HAASS, 2001. Phosphorylation Regulates Intracellular Trafficking of β -Secretase. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(18), 14634–14641. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M011116200

WANG, Shuhui, Iva BRESKOVSKA, Shreya GANDHY, Anna Rostedt PUNGA, Jeffery T. GUPTILL a Henry J. KAMINSKI, 2018. Advances in autoimmune myasthenia gravis management. *Expert review of neurotherapeutics* [online]. **18**(7), 573–588. ISSN 1473-7175. Dostupné z: doi:10.1080/14737175.2018.1491310

WANG, Xiang-Jun, Huai-Xiu WU, Shan-Shan YE, Lan-Ying PAN a Yong-Chang QIAN, 2014. Expression of recombinant human acetylcholinesterase and its application in screening its inhibitors. *Yao Xue Xue Bao = Acta Pharmaceutica Sinica*. **49**(1), 50–54. ISSN 0513-4870.

WARD, Owen P., 2012. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* [online]. **30**(5), 1119–1139. ISSN 0734-9750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.012

WEBER, W. a M. FUSSENEGGER, 2009. Insect Cell-Based Recombinant Protein Production. In: Regine EIBL, Dieter EIBL, Ralf PÖRTNER, Gerardo CATAPANO a Peter CZERMAK, ed. *Cell and Tissue Reaction Engineering: With a Contribution by Martin Fussenegger and Wilfried Weber* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer, Principles and Practice, s. 263–277 [vid. 2020-06-24]. ISBN 978-3-540-68182-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-68182-3_6

WEI, Wan-Li, Jun-Chuan QIN a Man-Ji SUN, 2000. High-level expression of human butyrylcholinesterase gene in *Bombyx mori* and biochemical-pharmacological characteristic study of its product. *Biochemical Pharmacology* [online]. **60**(1), 121–126. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-2952(00)00238-0

WESTMEYER, Gil G., Michael WILLEM, Stefan F. LICHTENTHALER, Glenn LURMAN, Gerd MULTHAUP, Irmgard ASSFALG-MACHLEIDT, Karina REISS, Paul SAFTIG a Christian HAASS, 2004. Dimerization of β -Site β -Amyloid Precursor Protein-cleaving Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **279**(51), 53205–53212. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M410378200

WOREK, Franz, Nadine AURBEK, Marianne KOLLER, Christian BECKER, Peter EYER a Horst THIERMANN, 2007. Kinetic analysis of reactivation and aging of human acetylcholinesterase inhibited by different phosphoramidates. *Biochemical Pharmacology* [online]. **73**(11), 1807–1817. ISSN 0006-2952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2007.02.008

WURM, Florian M., 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* [online]. **22**(11), 1393–1398. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1026

XIA, D. Y., L. X. WANG a S. Q. PEI, 1981. The inhibition and protection of cholinesterase by physostigmine and pyridostigmine against Soman poisoning in vivo. *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* [online]. **1**(2), 217–221. ISSN 0272-0590. Dostupné z: doi:10.1016/s0272-0590(81)80061-9

XUE, Liu, Mei-Chuan KO, Min TONG, Wenchao YANG, Shurong HOU, Lei FANG, Junjun LIU, Fang ZHENG, James H. WOODS, Hsin-Hsiung TAI a Chang-Guo ZHAN, 2011. Design, Preparation, and Characterization of High-Activity Mutants of Human Butyrylcholinesterase Specific for Detoxification of Cocaine. *Molecular Pharmacology* [online]. **79**(2), 290–297. ISSN 0026-895X, 1521-0111. Dostupné z: doi:10.1124/mol.110.068494

YAMAZAKI, Yu, Na ZHAO, Thomas R. CAULFIELD, Chia-Chen LIU a Guojun BU, 2019. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nature Reviews Neurology* [online]. **15**(9), 501–518. ISSN 1759-4766. Dostupné z: doi:10.1038/s41582-019-0228-7

YAN, Riqiang, Michael J. BIENKOWSKI, Mary E. SHUCK, Huiyi MIAO, Monica C. TORY, Adele M. PAULEY, John R. BRASHLER, Nancy C. STRATMAN, W. Rodney MATHEWS, Allen E. BUHL, Donald B. CARTER, Alfredo G. TOMASSELLI, Luis A. PARODI, Robert L. HEINRIKSON a Mark E. GURNEY, 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature* [online]. **402**(6761), 533–537. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/990107

YAN, Riqiang, Ping HAN, Huiyi MIAO, Paul GREENGARD a Huaxi XU, 2001. The Transmembrane Domain of the Alzheimer's β -Secretase (BACE1) Determines Its Late Golgi Localization and Access to β -Amyloid Precursor Protein (APP) Substrate. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **276**(39), 36788–36796. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M104350200

YANG, Hsiu-Chiung, Xiyun CHAI, Marian MOSIOR, Wayne KOHN, Leonard N. BOGGS, Jon A. ERICKSON, Don B. MCCLURE, Wu-Kuang YEH, Lianshen ZHANG, Patricia GONZALEZ-DEWHITT, John P. MAYER, Jose Alfredo MARTIN, Jingdan HU, Shu-hui CHEN, Ana Belen BUENO, Sheila P. LITTLE, James R. MCCARTHY a Patrick C. MAY, 2004. Biochemical and kinetic characterization of BACE1: investigation into the putative species-specificity for β - and β' -cleavage sites by human and murine BACE1. *Journal of Neurochemistry* [online]. **91**(6), 1249–1259. ISSN 1471-4159. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02764x

YATES, Darran a Declan M. MCLOUGHLIN, 2008. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Psychiatry* [online]. **7**(1), Old age psychiatry. Part 2 of 3, 1–5. ISSN 1476-1793. Dostupné z: doi:10.1016/j.mppsy.2007.11.009

ZHANG, Shuting, Zhe WANG, Fang CAI, Mingming ZHANG, Yili WU, Jing ZHANG a Weihong SONG, 2017. BACE1 Cleavage Site Selection Critical for Amyloidogenesis and Alzheimer's Pathogenesis. *Journal of Neuroscience* [online]. **37**(29), 6915–6925. ISSN 0270-6474, 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.0340-17.2017

ZHANG, Xian, Yanfang LI, Huaxi XU a Yun-wu ZHANG, 2014. The γ -secretase complex: from structure to function. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. **8** [vid. 2019-11-21]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2014.00427

ZHAO, Yonghao, Yunshu WANG, Jiaye YANG, Xin WANG, Yingjun ZHAO, Xian ZHANG a Yun-wu ZHANG, 2012. Sorting nexin 12 interacts with BACE1 and regulates BACE1-mediated APP processing. *Molecular Neurodegeneration* [online]. **7**, 30. ISSN 1750-1326. Dostupné z: doi:10.1186/1750-1326-7-30

Seznam příloh

Příloha A Seznam publikací na téma disertační práce

Příloha B Seznam publikací s toxikologickou tematikou

Příloha C Seznam publikací zabývajících se jinou problematikou

Přílohy

Příloha A

1. **HRABINOVA, Martina**, Jaroslav PEJCHAL, Tomas KUCERA, Daniel JUN, Monika SCHMIDT a Ondrej SOUKUP, 2020. Is It the Twilight of BACE1 Inhibitors? *Current Neuropharmacology* [online]. ISSN 1875-6190. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X18666200503023323. [IF₂₀₂₀ = 4.160]. **Podíl práce:** prvoautorská publikace, kritické review na budoucnost inhibitorů BACE v terapii AD
2. SOBOLOVA, Katerina & **Martina HRABINOVA**, Vendula HEPNAROVA, Tomas KUCERA, Tereza KOBRLOVA, Marketa BENKOVA, Jana JANOCKOVA, Rafael DOLEZAL, Lukas PRCHAL, Ondrej BENEK, Eva MEZEIOVA, Daniel JUN, Ondrej SOUKUP a Jan KORABECNY, 2020. Discovery of novel berberine derivatives with balanced cholinesterase and prolyl oligopeptidase inhibition profile. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **203**, 112593. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2020.112593. [IF₂₀₂₀ = 4.940]. **Podíl práce:** prvoautorská publikace, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů prolyl oligo peptidasy (POP), AChE, BChE
3. HAMULAKOVA, Slavka, Patrik POPRAC, Klaudia JOMOVA, Vlasta BREZOVA, Peter LAURO, Lenka DROSTINOVA, Daniel JUN, Vendula SEPISOVA, **Martina HRABINOVA**, Ondrej SOUKUP, Pavol KRISTIAN, Zuzana GAZOVA, Zuzana BEDNARIKOVA, Kamil KUCA a Marian VALKO, 2016. Targeting copper(II)-induced oxidative stress and the acetylcholinesterase system in Alzheimer's disease using multifunctional tacrine-coumarin hybrid molecules. *Journal of Inorganic Biochemistry* [online]. 161, 52–62. ISSN 1873-3344. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.05.001. [IF₂₀₁₆ = 3.348]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE a BChE
4. BENEK, Ondrej, Ondrej SOUKUP, Marketa PASDIOROVA, Lukas HROCH, Vendula SEPISOVA, Petr JOST, **Martina HRABINOVA**, Daniel JUN, Kamil KUCA, Dominykas ZALA, Rona R. RAMSAY, Jose MARCO-CONTELLES a Kamil MUSILEK, 2016. Design, Synthesis and in vitro Evaluation of Indolotacrine Analogues as Multitarget-Directed Ligands for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Chemmedchem* [online]. **11**(12), 1264–1269. ISSN 1860-7179. Dostupné z: doi:10.1002/cmdc.201500383. [IF₂₀₁₆ = 3.225]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE, BChE a jejich antioxidační účinnosti.

5. CAHLIKOVA, Lucie, Lucie HULOVA, **Martina HRABINOVA**, Jakub CHLEBEK, Anna HOST'ALKOVA, Marketa ADAMCOVA, Marcela SAFRATOVA, Daniel JUN, Lubomir OPLETAL, Miroslav LOCAREK a Katerina MACAKOVA, 2015. Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia* [online]. **103**, 192–196. ISSN 0367-326X. Dostupné z: doi:10.1016/j.fitote.2015.04.004. [IF₂₀₁₅ = **2.82**]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů POP

6. HAMULAKOVA, Slavka, Ladislav JANOVEC, Ondrej SOUKUP, Daniel JUN, Jana JANOCKOVA, **Martina HRABINOVA**, Vendula SEPSOVA a Kamil KUCA, 2018. Tacrine-coumarin and Tacrine-7-chloroquinoline Hybrids with Thiourea Linkers: Cholinesterase Inhibition Properties, Kinetic Study, Molecular Docking and Permeability Assay for Blood-brain Barrier. *Current Alzheimer Research* [online]. **15**(12), 1096–1105. ISSN 1875-5828. Dostupné z: doi:10.2174/1567205015666180711110750. [IF₂₀₁₆ = **3.351**]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE a BChE

7. SCHMIDT, Monika, Ondrej BENEK, Lucie VINKLAROVA, **Martina HRABINOVA**, Lucie ZEMANOVA, Matej CHRIBEK, Vendula KRALOVA, Lukas HROCH, Rafael DOLEZAL, Antonin LYCKA, Lukas PRCHAL, Daniel JUN, Laura AITKEN, Frank GUNN-MOORE, Kamil KUCA a Kamil MUSILEK, 2020. Benzothiazolyl Ureas are Low Micromolar and Uncompetitive Inhibitors of 17β-HSD10 with Implications to Alzheimer's Disease Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 21(6) [vid. 2020-11-25]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21062059. [IF₂₀₁₉ = 4.653]. **Podíl práce:** spoluautor, validace metody pro testování inhibitorů 17β-HSD10

8. HEPNAROVA, V., J. KORABECNY, L. MATOUSKOVA, P. JOST, L. MUCKOVA, **Martina HRABINOVA**, N. VYKOUKALOVA, M. KERHARTOVA, T. KUCERA, R. DOLEZAL, E. NEPOVIMOVA, K. SPILOVSKA, E. MEZEIOVA, N. L. PHAM, D. JUN, F. STAUD, D. KAPING, K. KUCA a O. SOUKUP, 2018. The concept of hybrid molecules of tacrine and benzyl quinolone carboxylic acid (BQCA) as multifunctional agents for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **150**, 292–306. ISSN 1768-3254. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2018.02.083 [IF₂₀₁₈ = **4.981**] **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE

9. CHALUPOVA, Katarina, Jan KORABECNY, Manuela BARTOLINI, Barbara MONTI, Dorian LAMBA, Rosanna CALIANDRO, Alessandro PESARESI, Xavier BRAZZOLOTTO, Anne-Julie GASTELLIER, Florian NACHON, Jaroslav PEJCHAL, Michaela JAROSOVA, Vendula HEPNAROVA, Daniel

- JUN, **Martina HRABINOVA**, Rafael DOLEZAL, Jana ZDAROVA KARASOVA, Martin MZIK, Zdena KRISTOFIKOVA, Jan MISIK, Lubica MUCKOVA, Petr JOST, Ondrej SOUKUP, Marketa BENKOVA, Vladimir SETNICKA, Lucie HABARTOVA, Marketa CHVOJKOVA, Lenka KLETECKOVA, Karel VALES, Eva MEZEIOVA, Elisa ULIASSI, Martin VALIS, Eugenie NEPOVIMOVA, Maria Laura BOLOGNESI a Kamil KUČA, 2019. Novel tacrine-tryptophan hybrids: Multi-target directed ligands as potential treatment for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **168**, 491–514. ISSN 1768-3254. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2019.02.021 [IF₂₀₁₄ = **3.866**]. **Podíl práce:**spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE
10. CHLEBEK, Jakub, Jan KORÁBEČNÝ, Rafael DOLEŽAL, Šárka ŠTĚPÁNKOVÁ, Daniel I. PÉREZ, Anna HOŠŤÁLKOVÁ, Lubomír OPLETAL, Lucie CAHLÍKOVÁ, Kateřina MACÁKOVÁ, Tomáš KUČERA, **Martina HRABINOVÁ** a Daniel JUN, 2019. In Vitro and In Silico Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Thalictricavine and Canadine and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. **24**(7). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24071340 [IF₂₀₁₉ = **3.267**]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE
11. CHLEBEK, Jakub, Zdenek NOVAK, Dominika KASSEMOVA, Marcela SAFRATOVA, Jan KOSTELNIK, Lukas MALY, Miroslav LOCAREK, Lubomir OPLETAL, Anna HOST'ALKOVA, **Martina HRABINOVA**, Jiri KUNES, Pavlina NOVOTNA, Marie URBANOVA, Lucie NOVAKOVA, Katerina MACAKOVA, Daniela HULCOVA, Petr SOLICH, Concepcion PEREZ MARTIN, Daniel JUN a Lucie CAHLIKOVA, 2016. Isoquinoline Alkaloids from *Fumaria officinalis* L. and Their Biological Activities Related to Alzheimer's Disease. *Chemistry & Biodiversity* [online]. **13**(1), 91–99. ISSN 1612-1872. Dostupné z: doi:10.1002/cbdv.201500033 [IF₂₀₁₆ = **1.601**]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů POP
12. JEŘÁBEK, Jakub, Elisa ULIASSI, Laura GUIDOTTI, Jan KORÁBEČNÝ, Ondřej SOUKUP, Vendula SEPŠOVA, **Martina HRABINOVA**, Kamil KUČA, Manuela BARTOLINI, Luis Emiliano PEÑA-ALTAMIRA, Sabrina PETRALLA, Barbara MONTI, Marinella ROBERTI a Maria Laura BOLOGNESI, 2017. Tacrine-resveratrol fused hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **127**, 250–262. ISSN 1768-3254. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2016.12.048 [IF₂₀₁₇ = **4.944**]. **Podíl práce:**spoluautor,

biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE, BChE a jejich antioxidační účinnosti

13. KOHELOVÁ, Eliška, Rozálie PEŘINOVÁ, Negar MAAFI, Jan KORÁBEČNÝ, Daniela HULCOVÁ, Jana MAŘÍKOVÁ, Tomáš KUČERA, Loreto MARTÍNEZ GONZÁLEZ, **Martina HRABINOVA**, Katarina VORČÁKOVÁ, Lucie NOVÁKOVÁ, Angela DE SIMONE, Radim HAVELEK a Lucie CAHLÍKOVÁ, 2019. Derivatives of the β -Crinane Amaryllidaceae Alkaloid Haemanthamine as Multi-Target Directed Ligands for Alzheimer's Disease. *Molecules* [online]. **24**(7), 1307. Dostupné z: doi:10.3390/molecules24071307 [IF₂₀ =3.267]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE, BChE
14. KORABECNY, Jan, Martin ANDRS, Eugenie NEPOVIMOVA, Rafael DOLEZAL, Katerina BABKOVA, Anna HOROVA, David MALINAK, Eva MEZEIOVA, Lukas GORECKI, Vendula SEP SOVA, **Martina HRABINOVA**, Ondrej SOUKUP, Daniel JUN a Kamil KUCA, 2015. 7-Methoxytacrine-p-Anisidine Hybrids as Novel Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *Molecules* [online]. **20**(12), 22084–22101. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules201219836 [IF₂₀₁₅ = 2.465]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE, BChE
15. MEZEIOVA, Eva, Jan KORABECNY, Vendula SEP SOVA, **Martina HRABINOVA**, Petr JOST, Lubica MUCKOVA, Tomas KUCERA, Rafael DOLEZAL, Jan MISIK, Katarina SPILOVSKA, Ngoc Lam PHAM, Lucia POKRIEVKOVA, Jaroslav ROH, Daniel JUN, Ondrej SOUKUP, Daniel KAPING a Kamil KUCA, 2017. Development of 2-Methoxyhuprine as Novel Lead for Alzheimer's Disease Therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. **22**(8). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22081265 [IF₂₀₁₇ = 3.098]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE
16. NEPOVIMOVA, Eugenie, Jan KORABECNY, Rafael DOLEZAL, Katerina BABKOVA, Ales ONDREJICEK, Daniel JUN, Vendula SEP SOVA, Anna HOROVA, **Martina HRABINOVA**, Ondrej SOUKUP, Neslihan BUKUM, Petr JOST, Lubica MUCKOVA, Jiri KASSA, David MALINAK, Martin ANDRS a Kamil KUCA, 2015. Tacrine-Troxolone Hybrids: A Novel Class of Centrally Active, Nonhepatotoxic Multi-Target-Directed Ligands Exerting Anticholinesterase and Antioxidant Activities with Low In Vivo Toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **58**(22), 8985–9003. ISSN 0022-2623. Dostupné

z: doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01325 [IF₂₀₁₄ = 5.441]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE, BChE

17. NOVAK, Zdenek, Anna HOST'ALKOVA, Lubomir OPLETAL, Lucie NOVAKOVA, **Martina HRABINOVA**, Jiri KUNES a Lucie CAHLIKOVA, 2015. (+)-Chenabinol (Revised NMR Data) and Two New Alkaloids from Berberis vulgaris and their Biological Activity. *Natural Product Communications* **10**(10), 1695–1697. ISSN 1934-578X. Dostupné z doi.org/10.1177/1934578X1501001015 [IF₂₀₁₅ = 1.008]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů POP
18. SIATKA, Tomáš, Markéta ADAMCOVÁ, Lubomír OPLETAL, Lucie CAHLÍKOVÁ, Daniel JUN, **Martina HRABINOVÁ**, Jiří KUNEŠ a Jakub CHLEBEK, 2017. Cholinesterase and Prolyl Oligopeptidase Inhibitory Activities of Alkaloids from Argemone platyceras (Papaveraceae). *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* [online]. **22**(7) [vid. 2020-11-25]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22071181 [IF₂₀₁₇ = 3.098]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů POP
19. SPILOVSKA, Katarina, Jan KORABECNY, Vendula SEPSOVA, Daniel JUN, **Martina HRABINOVA**, Petr JOST, Lubica MUCKOVA, Ondrej SOUKUP, Jana JANOCKOVA, Tomas KUCERA, Rafael DOLEZAL, Eva MEZEIOVA, Daniel KAPING a Kamil KUCA, 2017. Novel Tacrine-Scutellarin Hybrids as Multipotent Anti-Alzheimer's Agents: Design, Synthesis and Biological Evaluation. *Molecules* [online]. **22**(6), 1006. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22061006 [IF₂₀₁₆ = 2.861]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE, BChE a jejich antioxidační účinnosti
20. ŠAFRATOVÁ, Marcela, Anna HOŠŤÁLKOVÁ, Daniela HULCOVÁ, Kateřina BREITEROVÁ, Veronika HRABCOVÁ, Marta MACHADO, Diana FONTINHA, Miguel PRUDÊNCIO, Jiří KUNEŠ, Jakub CHLEBEK, Daniel JUN, **Martina HRABINOVÁ**, Lucie NOVÁKOVÁ, Radim HAVELEK, Martina SEIFRTOVÁ, Lubomír OPLETAL a Lucie CAHLÍKOVÁ, 2018. Alkaloids from Narcissus poeticus cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Archives of Pharmacal Research* [online]. **41**(2), 208–218. ISSN 0253-6269. Dostupné z: doi:10.1007/s12272-017-1000-4 [IF₂₀₁₈ = 2.529]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů POP

21. VANECKOVA, Nina, Anna HOST'ALKOVA, Marcela SAFRATOVA, Jiri KUNES, Daniela HULCOVA, **Martina HRABINOVA**, Ivo DOSKOCIL, Sarka STEPANKOVA, Lubomir OPLETAL, Lucie NOVAKOVA, Daniel JUN, Jakub CHLEBEK a Lucie CAHLIKOVA, 2016. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *Rsc Advances* [online]. 6(83), 80114–80120. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/c6ra20205e [IF₂₀₁₆ = 3.23]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů POP a AChE
22. SVOBODOVA, Barbora, Eva MEZEIOVA, Vendula HEPNAROVA, **Martina HRABINOVA**, Lubica MUCKOVA, Tereza KOBRLOVA, Daniel JUN, Ondrej SOUKUP, María Luisa JIMENO, José MARCO-CONTELLES a Jan KORABECNY, 2019. Exploring Structure-Activity Relationship in Tacrine-Squaramide Derivatives as Potent Cholinesterase Inhibitors. *Biomolecules* [online]. 9(8). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9080379 [IF₂₀₁₉ = 4.082]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů AChE a BChE
23. AL MAMUN, Abdullah, Jana MAŘÍKOVÁ, Daniela HULCOVÁ, Jiří JANOUŠEK, Marcela ŠAFRATOVÁ, Lucie NOVÁKOVÁ, Tomáš KUČERA, **Martina HRABINOVA**, Jiří KUNEŠ, Jan KORÁBEČNÝ a Lucie CAHLÍKOVÁ, 2020. Amaryllidaceae Alkaloids of Belladine-Type from *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton as New Selective Inhibitors of Butyrylcholinesterase. *Biomolecules* [online]. 10(5), 800. Dostupné z: doi:10.3390/biom10050800 [IF₂₀₁₉ = 4.082] **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení kinetických vlastností inhibitorů POP

Příloha B

1. **HRABINOVA, Martina**, Jan MISIK a Daniel Jun and Kamil KUČA*, 2018. Reactivation Potential of Novel More Lipophilic Pralidoxime Analogs. *Letters in Drug Design & Discovery* [online]. **15**(8), 822–827. Dostupné z: doi:10.2174/1570180814666171013163019 [IF₂₀₁₈ = **0.936**]. **Podíl práce:** prvoautorská publikace, biologické hodnocení reaktivační účinnosti analogů 2-PAM
2. HEPNAROVA, Vendula, Lubica MUCKOVA, Avi RING, Jaroslav PEJCHAL, David HERMAN, Jan MISIK, **Martina HRABINOVA**, Daniel JUN a Ondrej SOUKUP, 2019. Pharmacological and toxicological in vitro and in vivo effect of higher doses of oxime reactivators. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. **383**, 114776. ISSN 1096-0333. Dostupné z: doi:10.1016/j.taap.2019.114776 [IF₂₀₁₉ = **3.740**]. **Podíl práce:** spoluautor, in vivo pokusy, validace metody určení maximální tolerované dávky (MTD)
3. KUČA, Kamil, **Martina HRABINOVA**, Daniel JUN, Kamil MUSILEK, Marek PENHAKER, Ondrej KREJCAR a Ondrej SOUKUP, 2015. Universality of Oxime K203 for Reactivation of Nerve Agent-Inhibited AChE. *Medicinal Chemistry* [online]. **11**(7), 683–686. ISSN 1573-4064. Dostupné z: doi:10.2174/1573406411666150407154204 [IF₂₀₁₅ = **2.763**]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení reaktivační účinnosti antidot
4. KUČA, Kamil, Daniel JUN, Lucie JUNOVA, Kamil MUSILEK, **Martina HRABINOVA**, Jorge Alberto Valle DA SILVA, Teodorico Castro RAMALHO, Marian VALKO, Qinghua WU, Eugenie NEPOVIMOVA a Tanos Celmar Costa FRANÇA, 2018a. Synthesis, Biological Evaluation, and Docking Studies of Novel Bisquaternary Aldoxime Reactivators on Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibited by Paraoxon. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. **23**(5). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23051103 [IF₂₀₁₈ = **3.098**] **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení reaktivační účinnosti antidot
5. KUČA, Kamil, Jana Zdarova KARASOVA, Ondrej SOUKUP, Jiri KASSA, Eva NOVOTNA, Vendula SEPŠOVA, Anna HOROVA, Jaroslav PEJCHAL, **Martina HRABINOVA**, Eva VODAKOVA, Daniel JUN, Eugenie NEPOVIMOVA, Martin VALIS a Kamil MUSILEK, 2018b. Development of small bisquaternary cholinesterase inhibitors as drugs for pre-treatment of nerve agent poisonings. *Drug Design, Development and Therapy* [online]. **12**, 505–512. ISSN 1177-8881. Dostupné z: doi:10.2147/DDDT.S133038 [IF₂₀₁₈ = **3.265**]. **Podíl práce:** spoluautor, in vivo pokusy, biologické hodnocení reaktivační účinnosti antidot

6. KUČA, Kamil, Kamil MUSILEK, Daniel JUN, Jana ZDAROVÁ-KARASOVÁ, Eugenie NEPOVIMOVÁ, Ondřej SOUKUP, **Martina HRABINOVÁ**, John MIKLER, Tanos C. C. FRANCA, Elaine F. F. DA CUNHA, Alexandre A. DE CASTRO, Martin VALIS a Teodorico C. RAMALHO, 2018c. A newly developed oxime K203 is the most effective reactivator of tabun-inhibited acetylcholinesterase. *BMC pharmacology & toxicology* [online]. **19**(1), 8. ISSN 2050-6511. Dostupné z: doi:10.1186/s40360-018-0196-3 [**IF₂₀₁₈ = 2.299**]. **Podíl práce:** spoluautor, biologické hodnocení reaktivační účinnosti antidot

7. SOUKUP, Ondřej, Jan KORABECNÝ, David MALINÁK, Eugenie NEPOVIMOVÁ, Ngoc L. PHAM, Kamil MUSILEK, **Martina HRABINOVÁ**, Vendula HEPNAROVÁ, Rafael DOLEZAL, Petr PÁVEK, Petr JOST, Tereza KOBRLOVÁ, Jana JANKOCKOVÁ, Lukas GORECKI, Miroslav PSOTKA, Thuy D. NGUYEN, Karl BOX, Breeze OUTHWAITE, Martina CECKOVÁ, Ales SORF, Daniel JUN a Kamil KUČA, 2018. In vitro and in silico Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning - a New Hope or a Blind Alley? *Medicinal Chemistry (Sharīqah (United Arab Emirates))* [online]. **14**(3), 281–292. ISSN 1875-6638. Dostupné z: doi:10.2174/1573406414666180112105657 [**IF₂₀₁₈ = 2,577**]. **Podíl práce:** spoluautor, in vivo pokusy, biologické hodnocení reaktivační účinnosti antidot

8. ZDAROVÁ KARASOVÁ, Jana, Ondřej SOUKUP, Jan KORABECNÝ, Milos HROCH, Marketa KREJCIOVÁ, **Martina HRABINOVÁ**, Jan MISIK, Ladislav NOVOTNÝ, Vendula HEPNAROVÁ a Kamil KUČA, 2019. Tacrine and its 7-methoxy derivate; time-change concentration in plasma and brain tissue and basic toxicological profile in rats. *Drug and Chemical Toxicology* [online]. 1–8. ISSN 1525-6014. Dostupné z: doi:10.1080/01480545.2019.1566350 [**IF₂₀₁₉ = 2.405**]. **Podíl práce:** spoluautor, in vivo pokusy

Příloha C

1. BURES, Jan, Daniel JUN, **Martina HRABINOVA**, Ilja TACHECI, Jaroslav KVETINA, Michal PAVLIK, Stanislav REJCHRT, Tomas DOUDA, Martin KUNES, Kamil KUČA a Marcela KOPACOVA, 2015. Impact of tacrine and 7-methoxytacrine on gastric myoelectrical activity assessed using electrogastrography in experimental pigs. *Neuroendocrinology Letters*. **36**, 150–155. ISSN 0172-780X. Dostupné z doi: 10.1016/S0016-5085(16)31247-1 [IF₂₀₁₅ = 1.187]. **Podíl práce:** spoluautor, in vivo pokusy