

## 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  $\sim 120\,000 \pm 4\,000$  RFU $\cdot$ min $^{-1}\cdot$  $\mu$ 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 trifluoroctové soli nebyla stanovena vzhledem k jeho špatné rozpustnosti. Naměřená hodnota  $IC_{50}$  pro verubecestat byla  $1,765 \pm 0,036$  nM.

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

Specifická aktivita lidské rekombinantní BChE dosahovala  $\sim 50\,000$  U $\cdot$ min $^{-1}\cdot$ mg $^{-1}$ . Hodnota  $K_m$  pro substrát BTChI byla  $0,256 \pm 0,003$  mM. Hodnota  $IC_{50}$  pro selektivní inhibitor etopropazin byla  $0,477 \pm 0,045$   $\mu$ 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  $-80$  °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

