

**UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**



Katedra biologických a lékařských věd

**BETASEKRETASA: PRODUKCE A *IN VITRO* TESTOVÁNÍ
INHIBITORŮ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant/ka: RNDr. Martina Hrabínová, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Barbora Hejtmánková

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením konzultantky RNDr. Martiny Hrabínové, Ph.D. a vedoucím práce PharmDr. Miroslava Kovaříka, Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne

.....

podpis autora

PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování za odborné vedení diplomové práce, za její čas, znalosti, rady a ochotu patří především RNDr. Martině Hrabinové, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat PharmDr. Miroslavu Kovaříkovi, Ph.D. za pomoc a cenné rady při vypracování diplomové práce, Ing. Janu Konečnému Ph.D. za cenné rady v oblasti organické chemie a PharmDr. Aleši Šorfovi, Ph.D. za cenné rady při vypracování diplomové práce a Mgr. Valeria Šeško, Ph.D. za pomoc v oblasti molekulární biologie.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Kandidát: Bc. Barbora Hejtmánková

Školitel: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Martina Hrabínová, Ph.D.

Název diplomové práce: Betasekretasa: Produkce a *in vitro* testování inhibitorů

Betasekretasa 1 hraje klíčovou roli v amyloidní teorii vzniku Alzheimerovy choroby. Kde za patologických podmínek společně s γ -sekretasou štěpí amyloidový prekurozorový protein za vzniku amyloidu β ($A\beta_{1-42}$), který se hromadí v extracelulárním prostoru mozku ve formě amyloidových plaků. Ty jsou rozeznány imunitním systémem jako antigeny a vzniká zánětlivá reakce vedoucí až k neurodegeneraci. Alzheimerova choroba je závažné onemocnění projevující se narušením kognitivních funkcí. Je to progresivní onemocnění, které má fatální následky a váže postiženého jedince k péči ostatních členů rodiny.

Tato diplomová práce zahrnuje produkci, purifikaci a validaci vlastního enzymu β -sekterasy 1. Purifikace byla provedena s využitím Ni-NTA agarózy. K jeho charakterizaci byla určena koncentrace proteinu a k identifikaci byla použita metoda western blot.

Rekombinantně připravená β -sekretasa 1 byla použita pro *in vitro* stanovení inhibiční účinnosti u 19 vybraných látek pomocí fluorescenční spektrofotometrické metody. U nejúčinnějšího inhibitoru K1142 byla stanovena hodnota IC_{50} , která byla porovnána s hodnotou IC_{50} standardního inhibitoru Verubecestatu. Bohužel látka K1142 nedosáhla lepší inhibiční účinnosti než Verubecestat. Pro tuto látku byla učena hodnota pK_a , ze které bylo spočteno BBB skóre a predikována prostupnost do mozku.

Klíčová slova: inhibitory, *in vitro* testování, betasekretasa, Alzheimerova choroba, produkce proteinů

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Candidate: Bc. Barbora Hejtmánková

Trainer: PharmDr. Miroslav Kovařík, Ph.D.

Consultant: RNDr. Martina Hrabínová, Ph.D.

Title of the master thesis: Beta-secretase: production and *in vitro* testing of inhibitors.

Beta-secretase 1 plays a major role in the amyloid hypothesis in Alzheimer's disease pathogenesis. Non-physiologically β -secretase together with γ -secretase cleaves amyloid precursor protein and is responsible for the production of amyloid beta peptides ($A\beta_{1-42}$), which accumulates in extracellular space and creates amyloid plaques. These are recognized by immune systems as antigens. Inflammatory response, which appears, can lead into neurodegeneration. Alzheimer's disease is a complex multifactorial progressive disease which cause cognitive decline. Due to fatal consequences a patient depends on the care of other family members.

This master thesis aims to own expression, purification, and validation of recombinant β -secretase 1. It's purification was made using Ni-NTA agarose. Concentration of protein was defined for characterization. For identification, a western blot method was used.

Recombinant β -secretase was used for experimental *in vitro* inhibition efficiency determination of 19 compounds by fluorescence spectrophotometric method. For the most effective inhibitor K1142 was determined IC_{50} value, which was compared to standard inhibitor Verubecestat. Unfortunately, K1142 is not a better inhibitor than standard Verubecestat. In conclusion, a pK_a value was determined and used for the calculation of BBB score, which predicts transport into the brain.

Keywords: inhibitors, *in vitro* determination, beta-secretase, Alzheimer's disease, production of recombinant proteins

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 8 |
| 2. Cíl práce | 9 |
| 3. Teoretická část | 10 |
| 3.1 Alzheimerova choroba..... | 10 |
| 3.1.1 Amyloidní teorie..... | 11 |
| 3.1.2 Hematoencefalická bariéra | 17 |
| 3.1.3 Cholinergní teorie..... | 18 |
| 3.2 Produkce rekombinantních enzymů..... | 19 |
| 3.2.1 Savčí systémy | 20 |
| 3.2.2 Mikrobiální systémy | 21 |
| 3.2.3 Kvasinkové systémy..... | 21 |
| 3.2.4 Hmyzí systémy | 21 |
| 4. Experimentální část..... | 23 |
| 4.1 Použité chemikálie a kity | 23 |
| 4.1.1 Chemikálie..... | 23 |
| 4.1.2 Kity | 23 |
| 4.2 Biologický materiál..... | 24 |
| 4.3 Sterilní plast a spotřební materiál | 24 |
| 4.4 Instrumentace..... | 24 |
| 4.5 Metodika | 25 |
| 4.5.1 Příprava bakteriálních konzerv | 25 |
| 4.5.2 Kultivace buněk..... | 26 |
| 4.5.3 Exprese lidské rekombinantní BACE1 | 27 |
| 4.5.4 Izolace lidské rekombinantní BACE1 | 27 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.5.5 | Purifikace lidské rekombinantní BACE1 | 28 |
| 4.5.6 | Stanovení koncentrace proteinu | 28 |
| 4.5.7 | Detekce BACE1 metodou western blot..... | 29 |
| 4.5.8 | Testování <i>in vitro</i> účinnosti inhibitorů BACE1..... | 33 |
| 4.5.9 | Stanovení IC ₅₀ | 34 |
| 4.5.10 | Výpočet pKa..... | 35 |
| 4.5.11 | Stanovení BBB skóre | 35 |
| 5. | Výsledky | 37 |
| 5.1 | Expres a purifikace BACE1 | 37 |
| 5.2 | Stanovení koncentrace proteinu..... | 37 |
| 5.3 | Analýza proteinu metodou western blot | 37 |
| 5.4 | Stanovení účinnosti vybraných inhibitorů BACE1 | 39 |
| 5.5 | Stanovení IC ₅₀ | 41 |
| 5.6 | Stanovení pKa..... | 43 |
| 5.7 | Stanovení BBB skóre | 43 |
| 6. | Diskuze..... | 44 |
| 7. | Závěr | 49 |
| 8. | Seznam použitých zkratk..... | 51 |
| 9. | Seznam tabulek | 55 |
| 10. | Seznam obrázků..... | 56 |
| 11. | Použitá literatura..... | 57 |
| 12. | Použité obrázky | 64 |

1. Úvod

Předkládaná diplomová práce se zabývá produkcí lidského rekombinantního enzymu betasekretasy 1 (BACE1) a *in vitro* testování jeho inhibitorů.

Experimentální práce byla provedena na Katedře molekulární patologie a biologie a na Katedře toxikologie a vojenské farmacie (KTVF) Vojenské lékařské fakulty (VLF) Univerzity obrany (UO).

KTVF je výjimečným pracovištěm Armády České Republiky (AČR). Toto pracoviště se zaměřuje na výzkum účinku nervově paralytických látek (NPL), (například sarin, soman, VX nebo tabun) (UNOB 2021a). Díky znalostem inhibice cholinesteras (ChE), ke které při otravě NPL dochází, mohou dále využívat své zkušenosti i v civilním výzkumu terapie Alzheimerovy choroby (UNOB 2021b).

BACE1 je důležitým enzymem při vzniku Alzheimerovy choroby (AD). AD je progresivní neurodegenerativní onemocnění, které nejčastěji postihuje osoby v pokročilém věku jejich života. Následky tohoto onemocnění jsou fatální. Projevují se poruchou kognitivních funkcí a demencí. Péče o postiženého člověka touto chorobou je náročná jak finančně, tak i časově pro další členy rodiny. Prozatím neumíme toto onemocnění vyléčit. Je proto důležité intenzivně pracovat na účinné a dostupné léčbě. Velké množství inhibitorů BACE1 bylo efektivních v redukcí amyloidních plaků v mozku a zlepšení kognitivních funkcí na zvířecích modelech a dostaly se až do třetí fáze klinického testování (Das a Yan 2019). Bohužel, zatím byly všechny klinické testování dosavadních inhibitorů BACE1 ukončeny z důvodu vedlejších účinků či bezpečnosti užití (Hampel et al. 2021).

Terapie AD je aktuálně pouze symptomatická a probíhá s použitím inhibitorů ChE, které dočasně zvyšují dostupné množství acetylcholinu v mozku, čímž zlepšují jeho funkci. Dalším schváleným léčivem je antagonist N-methyl-D-asparát (NMDA) receptorů memantin, který přispívá k omezení změn v neurotransmitterovém systému (Ferreira-Vieira et al. 2016). U.S. Food and Drug administration (FDA) schválil v roce 2021 a 2023 ke klinickému použití protilátky proti amyloidovým plakům Aducanumab a Lecanemab (U.S. FDA 2021) (U.S. FDA 2023). Bohužel ani jedna z terapií AD nemoc zcela nevyлéčí, ale pouze zpomalí její progres.

2. Cíl práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo změřit účinnost 19 inhibitorů enzymu BACE1. Součástí experimentu byla vlastní produkce BACE1 s využitím Expi293F buněk, které jsou upravenou linií HEK293 (immortalized human embryonic kidney cells) buněk. Byla připravena a izolována plazmidová DNA, která byla použita pro expresi proteinu. Po expresi byl enzym izolován z buněk a poté purifikován pomocí pryskyřice Ni-NTA agarózy, následně byla stanovena koncentrace proteinu a aktivita BACE1. Enzym byl identifikován metodou western blot. Účinnost inhibitorů byla změřena při koncentraci 10^{-6} M fluorescenční spektrofotometrickou metodou na multifunkčním destičkovém readeru Spark od firmy Tecan. Pro standardní inhibitor Verubecestat a nejúčinnější inhibitor K 1142 byla určena hodnota IC_{50} . Závěrem byla pro nejlepší látku určena hodnota pK_a a vypočteno BBB skóre, které predikuje prostup přes hematoencefalickou bariéru.

3. Teoretická část

3.1 Alzheimerova choroba

AD je multifaktoriální, progresivní onemocnění, projevující se degenerací mozku, které je jednou z nejčastěji se vyskytujících příčin vzniku demence v populaci. Mezi jeho projevy patří především porucha krátkodobé paměti, řeči, úsudku a orientace. Tyto poruchy kognitivních funkcí způsobují potíže s řešením úkolů a mají negativní dopad na život postižené osoby. Dochází k poruše i dalších fyziologických funkcí a následně je pacient vázán na lůžko, kde vyžaduje nepřetržitou péči (Alzheimer's association 2016).

Existuje mnoho hypotéz o vzniku AD (amyloidní, cholinergní, cholesterolová, mitochondriální, proteiny tau atd.) V důsledku nedostatečného objasnění etiopatogeneze onemocnění, a i přes velký zájem v posledních letech, se stále nepodařilo zavést efektivní léčbu a prevenci.

AD se rozděluje na časnou (familiární) a pozdní (sporadickou) formu. Familiární zahrnuje 5 – 10 % postižených, objevuje se v časnějším věku (obvykle 30-60 let) a pojí se s výskytem mutací v genech pro amyloidový prekurzorový protein (APP) či presenilin 1 (PS1), presenilin 2 (PS2), které jsou součástí enzymu γ -sekretasa (Zhang et al. 2014), a mutacemi apoproteinu E (ApoE). ApoE je důležitým receptorem pro transport cholesterolu, který je důležitý pro tvorbu myelinu a normální funkci mozku. ApoE má tři isoformy ApoE2, ApoE3 a ApoE4. Mutace v ApoE4 je významným rizikovým faktorem vzniku časně formy AD a hraje důležitou roli při vzniku amyloidních plaků a cerebrální amyloidní angiopatie (CAA), která je markerem pro diagnostiku AD. (Breijyeh a Karaman 2020).

Sporadická forma souvisí se stárnutím populace. Její příznaky se objevují mezi 60.-70. rokem života (Tobore 2019). Životní styl přímo neovlivňuje patogenezi AD, ale stále může pozitivně přispívat ke zlepšení stavu nemocných jedinců (Scheltens et al. 2021). Kardiovaskulární systém zásobuje mozek, proto řada rizikových faktorů poškození kardiovaskulárního systému, je zároveň rizikovým faktorem i pro AD. Patří sem například hypertenze, dyslipidémie, *diabetes mellitus*, obezita, kouření, pití

alkoholu. Zároveň zdravá strava, dostatek pohybu, společenské a intelektuální vyžití mohou pomoci v prevenci AD (Passeri et al. 2022).

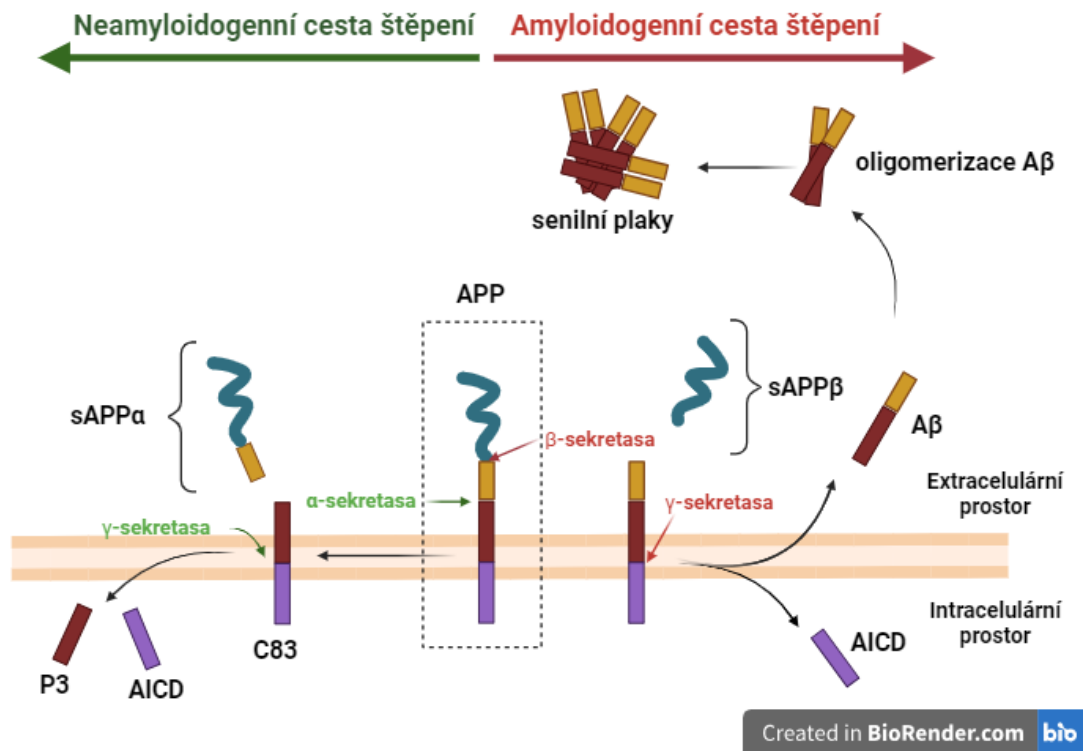
AD zahrnuje 50 až 60 % případů demence a může postihnout kohokoliv a kdykoliv. Vyskytuje se až dvakrát častěji u žen než u mužů. Nejvíce se však vyskytuje u pacientů nad 60 let, kdy AD trpí až 5 % lidí v tomto věku, u osob nad 80 let to může být dokonce až 56 % postižených (Olazarán et al. 2023). V České republice je to jedna z deseti nejčastějších příčin úmrtí (u žen dokonce třetí nejčastější) (World Health Organization 2023). Medián přežití po diagnostikování AD je v Evropě 6 let (Scheltens et al. 2021).

3.1.1 Amyloidní teorie

Již 40 let je známo, že nadměrné ukládání amyloidního β peptidu ($A\beta$) významně koreluje s výskytem demence. Toto zjištění vedlo v roce 1992 k vytvoření tzv. amyloidní teorie (Breijyeh a Karaman 2020; Selkoe a Hardy 2016).

Za fyziologických podmínek je amyloidový prekurzorový protein (APP) štěpen neamyloidogenní cestou pomocí α -sekretasy za vzniku neuroprotektivního N-terminální fragmentu $sAPP\alpha$ a membránového C-terminálního zbytku (C83) o délce 83 aminokyselin (AMK). C83 je dále štěpen γ -sekretasou na P3 a intracelulární doménu amyloidového prekurzorového proteinu AICD (Zhang et al. 2010).

Za patologických podmínek může β -sekretasa (BACE1; beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme) způsobit štěpení APP za vzniku amyloidního β peptidu o velikosti 42 aminokyselin (AMK, $A\beta_{1-42}$) (Breijyeh a Karaman 2020). Štěpení začíná vznikem N-terminálního fragmentu ($sAPP\beta$) a membránového C-koncového fragmentu (CTF β) o délce 99 AMK, který je štěpen γ -sekretasou na $A\beta_{1-42}$ a AICD. $A\beta_{1-42}$ je klíčovým fragmentem v patogenezi AD a hromadí se v extracelulárním prostoru mozku ve formě amyloidových plaků (Obr. 1) (Soria Lopez et al. 2019; Khan et al. 2020).



Obr. 1 Neamyloidogenní a amyloidogenní štěpení amyloidového prekurzorového proteinu

APP - amyloidový prekurzorový protein, sAPP α - neuroprotektivní N-terminální fragment, C83 - membránový C-terminální zbytek, AICD - intracelulární doména amyloidového prekurzorového proteinu, sAPP β - N-terminální fragment, CTF β - C-koncový fragment, A β - amyloid beta, (zdroj: vlastní s využitím BioRender)

Tento peptid je zodpovědný za vznik *in vitro* toxicity pro endoteliální buňky hematoencefalické bariéry („blood-brain barrier“, BBB), kde se váže na receptor pro produkty pokročilé glykace (receptor for advanced glycation end products, RAGE) a indukuje vznik volných radikálů, které narušují těsné spoje mezi endoteliálními buňkami a integritu membrány celkově (Zenaro et al. 2017). Amyloidní plaky jsou rozeznány imunitním systémem jako antigeny a spouští se zánětlivá reakce, dochází k aktivaci mikroglíí, uvolnění cytokinů a eventuálně k buněčné smrti a neurodegeneraci (Khan et al. 2020).

Další důležité dráhy zahrnuté v patogeneze AD jsou glutamátová a monoaminoxidázová dráha. Dva enzymy monoaminoxydasy (MAO-A, MAO-B)

katalyzují oxidativní deaminaci primárních a některých sekundárních aminů a jsou zodpovědné za metabolismus neurotransmiterů. Bohužel produkty toho metabolismu jako aldehyd nebo peroxid vodíku jsou toxické a způsobují neuronální poškození a smrt. Volné kyslíkové radikály jsou produkovány i amyloidními plaky a způsobují dále inaktivaci glutaminsyntetasy (GS), která je klíčovým enzymem v metabolismu astrocytů. GS je potřebná ke konverzi glutamátu na glutamin, čímž zabraňuje vzniku excitotoxicity. GS je však citlivá k oxidaci. Neurony vystavené vlivu $A\beta_{1-42}$ mají dále zvýšenou hladinu intracelulárního vápníku, což způsobuje kalciovou a synaptickou dysfunkci (Svobodova et al. 2023).

Mezi další mikroskopické změny v mozku patří hyperfosforylace tau (τ) proteinu pomocí enzymu glykogen syntasa kinasa-3, což opět přispívá ke vzniku oligomerů $A\beta_{1-42}$. Tau protein stabilizuje neuronální mikrotubuly. Při hyperfosforylaci není τ protein schopen vzájemné komunikace s mikrotubuly, dochází tak k jejich destabilizaci, narušení axonálního transportu, rozpadu cytoskeletu a zániku neuronu (Soria Lopez et al. 2019). Hyperfosforylovaný τ protein agreguje do filament, tvoří párová helikální filamenta a vytváří neurofibrilární klubka. Tato hyperfosorylace ovlivňuje i další signální kaskády, mitochondriální funkci a vznik oxidačního stresu. Následně dochází k mozkové atrofii (Breijyeh a Karaman 2020).

Vznik AD může podpořit i mutace na chromozomu, který obsahuje důležitý gen. Například gen kódující APP je lokalizovaný na 21. chromozomu. Mutace tohoto chromozomu, třeba trisomie známá jako Downův syndrom, může vézt k rozvoji časně AD. Dále mutace na chromozomu 14, který obsahuje gen pro PS1 a chromozom 1 s genem pro PS2, způsobují více než polovinu případů časně familiární AD (Vardy et al. 2005).

3.1.1.1 BACE

BACE se v organismu nachází ve dvou formách a patří do podrodiny membránových aspartylových proteas. BACE1 je složena z 501 AMK a nachází se hlavně v nervové tkáni, ale i v pankreasu a v nižších hladinách v mnoha dalších buňkách (adipocyty, hepatocyty, vaskulární buňky) (Vassar 2004). BACE1 je z 64 % homologní s BACE2, která je tvořena 518 AMK a nachází se hlavně v periferních tkáních (ledviny, placenta, prostata, trachea).

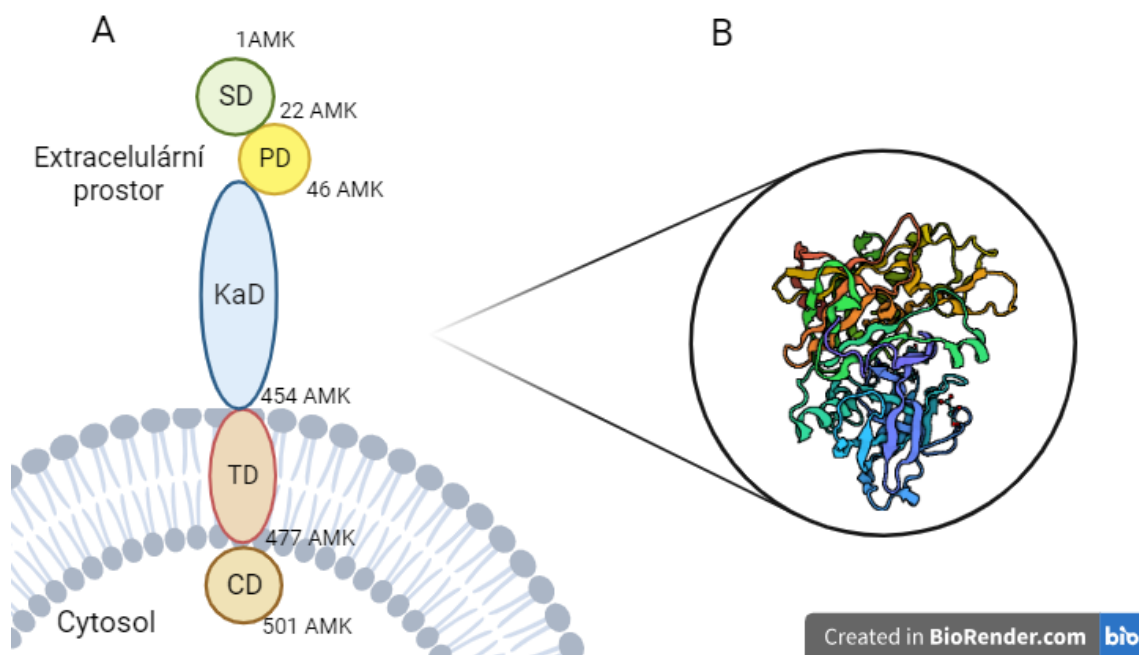
Přesto že se na BACE1 pohlíží hlavně jako na enzym zodpovědný za vznik amyloidních plaků, protože má schopnost štěpit APP, je spojován i se vznikem dalších onemocnění jako je *diabetes mellitus 2*, schizofrenie a epilepsie (Taylor et al. 2022).

Enzym BACE2 podléhá neustále výzkumu. Několik studií uvádí, že BACE2 se nachází v mozkové tkáni a má neuroprotektivní účinky. Může štěpit A β PP amyloidní i neamyloidní cestou a zabránit vzniku A β 42. Ve studii na myších se ukázalo, že zvýšená exprese BACE2 nemá patologický dopad na amyloidogenní cestu štěpení APP a nezpůsobuje kognitivní dysfunkce nebo cholinergní degradaci spojenou se vznikem AD. Naopak bylo prokázáno, že zvýšení exprese BACE2 u buněk, které by jinak produkovaly nízkou hladinu tohoto enzymu, vedlo ke snížení množství fragmentů A β ₁₋₄₀ a A β ₁₋₄₂ (Yeap et al. 2023).

3.1.1.2 BACE1 struktura a lokalizace

BACE1 má nejvyšší aktivitu při acidických hodnotách pH (pH = 4,5), jelikož se nachází v intracelulárních kyselých strukturách jako třeba v endosomech či v trans části Golgiho aparátu (GA) (Vassar 2004).

Gen BACE1 je lokalizován na chromozomu 11 v pozici q23.3 a je přepisován do proteinu dlouhého 501 AMK (Holsinger et al. 2013). Protein se skládá z pěti klíčových domén (Vassar et al. 2009): N-terminální signální peptidové (SP, 1-21 AMK), prodomény (PD, 22 – 45 AMK), katalytické domény (KaD, 46–460 AMK), transmembránové domény (TD, 461 – 477 AMK) a cytosolické domény (CD, 478 – 501 AMK), (Obr. 2). Katalytická doména má dvě aktivní místa aspartylové proteázy: DTGS (D – kyselina asparagová, T – threonin, G – glycin, S – serin, 93 – 96 AMK) a DSGT (289 – 292 AMK). Dojde-li k mutaci byť jen jednoho z aktivních míst, enzym se stává inaktivním (Cole a Vassar 2008).



Obr. 2 Struktura a domény BACE1 (A), krystalická struktura (B)

SD – signální doména, PD – prodoména, KaD – katalytická doména, TD-
transmembránová doména, CD – cytosolická doména (*zdroj: vlastní s využitím
BioRender*)

3.1.1.3 Syntéza BACE1

BACE1 existuje ve třech izoformách BACE₄₇₆, BACE₄₅₇ a BACE₄₃₂, které mají ponechány dvě aktivní místa.

Syntéza BACE1 začíná v endoplazmatickém retikulu (ER), kde vzniká nezralý prekurzorový protein pro BACE1 o molekulové hmotnosti ~60 kDA. (Holsinger et al. 2013). V ER dochází též k post-translačním modifikacím jako je N-glykosylace asparaginových zbytků (Asn153, Asn172, Asn223, a Asn354), přechodná acetylace sedmi lysinových zbytků (Lys₁₂₆, Lys₃₀₀, Lys₃₀₇, Lys₂₇₅, Lys₂₇₉, Lys₂₈₅ a Lys₂₉₉) na N-terminálním konci nascentní BACE1, což umožňuje její transport do GA (Wang et al. 2013).

V GA je pomocí furin proprotein konvertasy provedena deacetylace, glykosylace a odštěpení propeptidové domény. BACE1 dále podstupuje palmytoylaci na čtyřech cysteinových zbytcích, což pravděpodobně ovlivňuje její lokalizaci a transport (Vassar

a Cole 2008). Když dojde k fosforylaci (Ser₄₉₈) pomocí kasein kinasy 1, je BACE1 rozpoznána pomocí GGAs (Golgi-localized γ -ear-containing ARF-binding) a transportována na povrch buňky. Pokud dochází k její defosforylaci, je transportována do časného endosomu (Wang et al. 2013).

Maturovaná BACE1 o molekulové hmotnosti ~75 kDa se převážně nachází na lipidových raftech bohatých na cholesterol a je celkem stabilní s poločasem rozpadu 9 h (Vassar a Cole 2008, Wang et al. 2013).

3.1.1.4 Inhibitory BACE1

První studie zaměřené na redukci amyloidních plaků se soustředily na enzym γ -sekretasa. Bohužel vedlejší nežádoucí účinky měly převahu nad pozitivními účinky terapie. V lidském těle je více než 140 různých substrátů pro γ -sekretasu, například Notch protein, který reguluje buněčnou proliferaci, diferenciaci a růst. Použití těchto inhibitorů vedlo k hematologickým a gastrointestinálním problémům a riziku vzniku rakoviny kůže. S ohledem na tyto informace se výzkum terapie AD zaměřil na BACE1 (Hur 2022). Pomocí proteomické analýzy bylo pro BACE1 určeno až 68 substrátů (například neuregulin-1, adhézní protein CHL1, nebo amyloidu podobný protein 1 (APLP1) důležitých v synaptických procesech, buněčné signalizaci či imunitních reakcích.

Inhibitory BACE1 se dělí do 4 generací na základě molekulové hmotnosti a selektivity vůči BACE1 nebo BACE2 (viz Tab 1). Do poslední fáze klinického testování se dostaly 2 látky z 3. generace. Mezi nimi byl Verubecestat od firmy Merck. Prokázalo se, že Verubecestat redukuje množství amyloidu v mozku, nicméně terapie byla doprovázena nežádoucími účinky jako ztráta váhy, změna barvy vlasů a vyrážkou, v dvakrát větší míře než při použití placebo. Dalším inhibitorem je Lanabecestat od firmy Astra-Zeneca. Terapie Lanabecestatem byla snášena dobře a nedocházelo k dalšímu prohloubení poruchy kognitivních funkcí, bohužel se vyskytovaly stejné nežádoucí účinky jako u Verubecestatu. Ze 4. generace se do poslední fáze dostaly Atabecestat (vyloučen kvůli hepatotoxicitě), Umibecestat (mnohonásobně selektivnější pro BACE1 než BACE2, vyloučen kvůli atrofii mozku) a Elenbecestat (dobře snášen) (Hrabínova et al. 2020).

Tab 1 Přehled inhibitorů BACE1 3. a 4. generace

| Inhibitor | Generace | Fáze klinického testování | Dávka [mg] | Redukce A β [%] |
|--------------|----------|---------------------------|------------|-----------------------|
| Lanabecesat | 3 | III | 12 | 50-75 |
| | | | 40 | 80-90 |
| Verubecestat | 3 | II/III | 15 | 63 |
| | | | 50 | 79 |
| Atabecestat | 3/4 | IIb/III | 5 | 60 |
| | | | 30 | 80-85 |
| | | | 50 | 90 |
| Umibecestat | 4 | II/III | 15 | 95 |
| | | | 50 | 95 |
| Elenbecestat | 4 | III | 25 | 43,6 |
| | | | 50 | 59,4 |
| | | | 100 | 71,3 |

A β – amyloid beta

Vzhledem k těmto neúspěchům FDA navrhla doporučení na zaměření se na léčbu pacientů s časnou formou AD, kdy ještě není demence plně rozvinuta, která kladla důraz i na včasnou diagnostiku AD. Na základě výsledků z třetí fáze klinických studií dosavadních inhibitorů se také řeší optimalizování bezpečné dávky daného inhibitoru. Včasné podání inhibitorů BACE1 by mohlo oddálit nástup AD a zpomalit její progresi (Das a Yan 2019).

3.1.2 Hematoencefalická bariéra

Hematoencefalická bariéra (BBB) byla poprvé pozorována na elektronovém mikroskopu roku 1937. Slouží jako filtrační vrstva krve a je složena z buněk pericytů, astrocytů, neuronů a mikroglií. Zabraňuje vstupu toxických antigenních molekul do mozku. Díky vysokému elektrickému odporu a těsným a adherentním spojmům v endoteliálních buňkách mohou přes BBB prostoupit jen voda a malé molekuly. Pro

pasivní a aktivní přenos makromolekul a proteinů slouží transportéry (kanály) (Zenaro et al. 2017).

V terapii AD je důležité léčiva transportovat přes BBB, jelikož cíl působení je právě v mozku. Léky proti AD často selhávají při přestupu přes BBB. Pro přenos do mozku se využívají nanočástice jako liposomy a exosomy, které jsou schopny léčiva do mozku doručit. Bohužel ani konvenční liposomy nedokážou transportovat léky proti AD do mozku. Kvůli tomu se zvýšil zájem o problematiku transportu léčiva do mozku skrze BBB. Intranasální podání přináší slibnou alternativu k orálnímu podání, kdy léčivo musí překonat trávení, střevní mikrobiotu, „clearance“ ledvin a jater. Je to neinvazivní a bezbolestná metoda. Léčivo se dostává přímo do centrální nervové soustavy přes čichovou sliznici, která je bohatě prokrvená a poskytuje velkou plochu pro vstřebání. Nedávné studie se zaměřily na prostup proteinů a peptidů intranasální cestou, ale zatím ještě žádný z nanosystémů neprošel fází klinického vývoje (Passeri et al. 2022).

3.1.3 Cholinergní teorie

V 70. letech 19. století přispěly k formování cholinergní teorie výsledky histologického *post mortem* vyšetření mozků pacientů s AD a objev účinku cholinergního antagonisty skopolaminu. Podání skopolaminu zdravým lidem narušuje schopnost učení. Zároveň podání inhibitoru acetylcholinesterasy (AChE) fysostigminu, který se používá pro zlepšení dlouhodobé paměti u starých lidí, tento účinek ruší (Patočka et al. 2004).

Nejčastěji postiženou oblastí mozku je temporální a parietální lalok, hippokampus a amygdala. U pacientů je pozorována ztráta a degenerace cholinergních receptorů, kdy počet synapsí koreluje s kognitivní poruchou. V membráně neuronů je štěpen APP za vzniku A β . Oligomery A β usnadňují hyperfosforylaci τ proteinu, který stabilizuje mikrotubuly v neuronu. Dochází k poruše axonálního transportu a rozpadu cytoskeletu což vede k neuronové smrti. Dále je pozorován nedostatek cholin-*O*-acetyltransferasy, která je zodpovědná za tvorbu acetylcholinu (ACh) v mozku, jehož nedostatek negativně ovlivňuje paměť a učení pacienta (Francis et al. 1999).

Současná terapie se opírá o inhibici acetylcholinesterasy, jejíž jedna molekula může hydrolyzovat až 25 000 molekul ACh za sekundu (Pundir a Chauhan 2012). Inhibicí

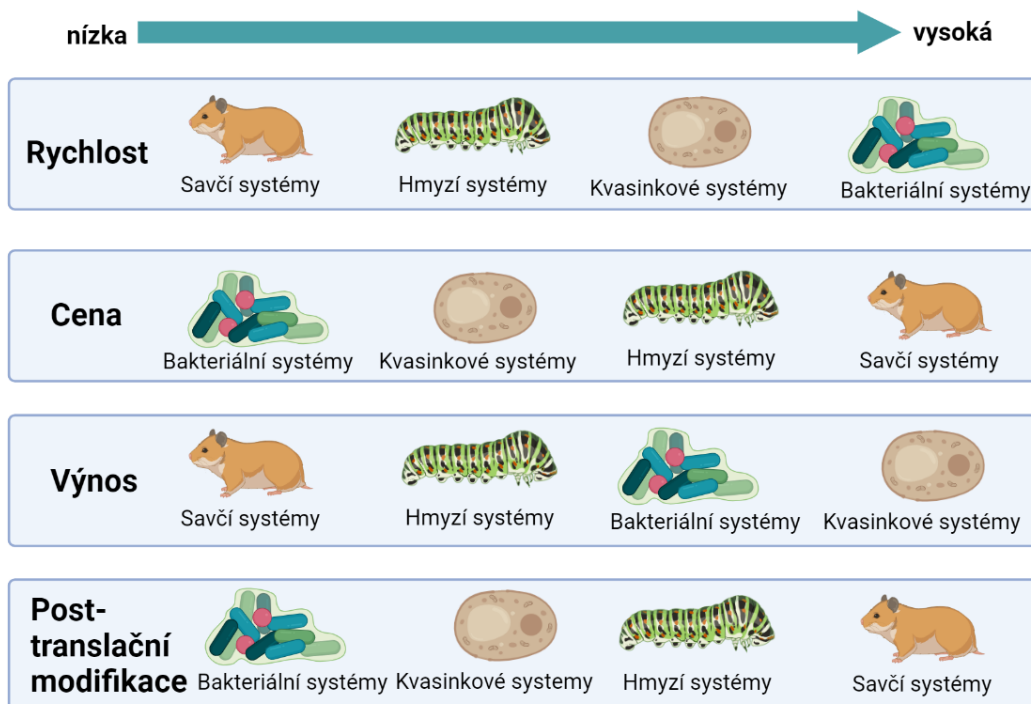
AChE dojde ke zvýšení ACh dostupného pro nervový přenos. Terapie řeší pouze symptomy a zpomaluje progres AD. Prvním látkou použitou v experimentální terapii AD byl sice fyzostigmin, ale prvním léčivem použitým v klinické praxi byl takrin, který je hepatotoxický a dále se nepoužívá. Mezi tři současně nejpoužívanější inhibitory AChE patří donepezil, rivastigmin a galantamin (Patočka et al. 2004).

3.2 Produkce rekombinantních enzymů

Produkce rekombinantních proteinů (r-proteinů) má rozsáhlé využití nejen ve farmaceutickém průmyslu, ale i v potravinářském, papírenském a oděvním. Hlavní výhodou rekombinantních proteinů je jejich reakční rychlost, stereo a enantio selektivita, vysoká čistota a šetrnost k životnímu prostředí. Největší nevýhodou jsou náklady na jejich produkci. Mezi hojně využívané r-proteiny patří cytokiny, hormony, růstové faktory, protilátky, vakcíny (produkce HBsAg v *Saccharomyces cerevisiae* pro léčbu hepatitidy B (Zhao et al. 2020)) a další peptidy (insulin, faktor VIII) (Cacicedo et al. 2019, s. 7).

Pro produkci r-proteinů se využívají různé buněčné systémy (bakteriální, kvasinkový, hmyzí či savčí, viz Obr. 3). Velkou problematikou je získání správně složeného, a tím pádem aktivního, proteinu. Skládání proteinu je ovlivněno posttranslačními modifikacemi, které jsou specifické pro jednotlivé buněčné systémy. Výběr buněčného systému je proto zásadní.

Cílem tedy je exprimovat a purifikovat aktivní r-protein ve velkém množství s co nejnižšími náklady. Optimalizace produkce r-proteinů závisí na typu vektoru, složení růstového média, teplotě a expresi chaperonů. (Beygmoradi et al. 2023).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Obr. 3 Expresní systémy výhody a nevýhody, (zdroj: (Hejtmánková 2022))

3.2.1 Savčí systémy

Mezi nejčastěji používané savčí buňky patří buňky křečka CHO (chinese hamster ovary), lidské buňky (HEK293, HT-1080, PER.C6) a myší buňky (NS0, Sp2/0). Nicméně 70 % r-proteinů je exprimováno v buňkách CHO.

Proteiny produkované v CHO buňkách přináší řadu výhod: r-proteiny mají kompletní posttranslační modifikace podobné proteinům lidským, velký výtěžek, snadno je neovlivňují změny teploty, tlaku, pH či množství kyslíku a nejsou náchylné k infekci lidskými viry. Za několik posledních let se výzkum zabýval právě genetickou modifikací buněk CHO, aby byly získány stabilní nesmrtelné klony s produkcí proteinů více než 7 g/l (Tihanyi a Nyitray 2020).

Současnou novinkou je genetická modifikace CHO buněk pomocí CRISPR-CAS9 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats) a tím umožnění produkce r-proteinů. Pomocí této techniky dokážeme účinně a velice přesně stříhat genetickou informaci a vložit do ní potřebný transgen. Oproti dříve používaným technikám, které používaly programovatelné endonukleasy jako ZFNs (zinc finger nukleasy) nebo

TALENs (transcription activator-like effector nucleases), nám CRISPR-CAS9, CAS12a (cílené na DNA) nebo CAS13 (cílené na RNA) umožňují editovat vícero genů naráz a v porovnání s ZFNs a TALENs jsou jednoduchou, efektivní a levnou metodou. Prováděné úpravy mohou být inhibice apoptózy (prevence akumulace laktátu a amonných iontů), vyšší produkce r-proteinu (inhibice metylace transgenů), zvýšení stability transgenů a hlavně úprava genů pro postranlační modifikace (glykosylace, fukosylace, sialylace, galaktosylace), která je extrémně důležitá pro správné složení, rozpustnost, intracelulární transport, poločas rozpadu, biodistribuci a aktivitu r-proteinů (Kalkan et al. 2023).

3.2.2 Mikrobiální systémy

Prvním jednoduchým systémem využívaným pro produkci r-proteinů byla od roku 1980 *Escherichia coli* (*E. coli*). Výhodou je vysoká produkce r-proteinů. Nevýhodou *E. coli* je absence posttranslačních modifikací, tvorba nerozpustných inkluzních tělísek, omezená schopnost tvorby disulfidických vazeb, chybí sekreční mechanismus pro účinné uvolňování proteinu do kultivačního média (Khow a Suntrarachun 2012).

3.2.3 Kvasinkové systémy

Oproti bakteriálním buňkám kvasinkové systémy (*Saccharomyces cerevisiae*) poskytují mnoho výhod: cenově dostupné růstové médium, rychlost růstu, absence endotoxinů a lepší posttranslační modifikace umožňující skládání proteinu jako je glykosylace. Kvasinky jsou vhodné pro produkci r-proteinů v průmyslu, protože mají silné promotory, které kontrolují genovou expresi. Navzdory potenciálu mikrobiálních systémů, si savčí systémy vydobily pozici primárně užívaných systémů (Beygmoradi et al. 2023).

3.2.4 Hmyzí systémy

Hmyzí buňky jsou alternativou mezi bakteriálními a savčími. Vyžadují podobné podmínky jako savčí buňky, jen rostou při nižší teplotě (28 °C), nižším pH (6,2 – 6,9) a jsou citlivější na čistotu práce než savčí expresní systémy. Pro přenos vektoru se používá bakulovir (Weber a Fussenegger 2009). Nejčastěji používané hmyzí buňky pro produkci rekombinantní proteinů pochází z *Spodoptera frugiperda* (Blýskavka kukuřičná), *Trichoplusia ni* (Kovolesklec cizokrajný) nebo z *Bombyx mori* (Bourec morušový). Hmyzí systémy nejsou schopny produkce glykoproteinu se stejnými

glykacemi jako v lidském těle, což ovlivňuje klinické použití těchto produktů. Kultivace hmyzích buněk je časově i finančně náročná (Geisler et al. 2015).

4. Experimentální část

4.1 Použité chemikálie a kity

4.1.1 Chemikálie

dimethylsulfoxid (DMSO), sterilní filtrovaná voda vhodná pro buněčné kultury, dodecylsírán sodný (SDS), N,N,N',N'-tetramethyletan-1,2-diamin (TEMED), 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina (DTNB), peroxodisírán amonný (APS), β-merkptoethanol, akrylamid, chlorid sodný (NaCl), dihydrogen fosforečnan draselný (KH₂PO₄), hydrogen fosforečnan sodný (Na₂HPO₄), glycin, glycerol, Comassie brilantní modř G-250, metanol (MeOH), isopropanol, 7-methoxykumarinu-4-acetyl-[Asn670, Lue671]-amyloidu β/A4 prekursorového proteinu 770 fragmentu 667-676-(2,4-dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amid trifluorooctová sůl, kyselina octová (CH₃COOH) a octan sodný (CH₃COONa), Triton, Luria Broth (LB) médium a agar byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

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

Ni-NTA agaróza byla zakoupeny u Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

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

BACE1 enzym byl zakoupen u SinoBiological (Peking, Čína).

Hmotnostní marker Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards byl zakoupen i firmy Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Karbenicilin byl zakoupen u SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Německo).

4.1.2 Kity

- BM Chemiluminescence Western Blotting Kit byl zakoupen u Roche (Basilej, Švýcarsko).
- PureLink Quick plasmid MiniprepKit, ExpiFectamine293 transfekční kit, Mem-PER Plus extrakční kit pro membránové proteiny a Micro BCA Protein Assay kit byly zakoupen u Thermo Fisher Scientific.

4.2 Biologický materiál

Buněčná linie Expi293F, a chemicky kompetentní *E. coli* TOP10 byly zakoupeny u Thermo Fisher Scientific.

Bakteriální štok *E. coli* s templátovou DNA.

4.3 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 čiré a černé byly zakoupeny u Nalge Nunc International (New York, NY, USA).
- Sérologické pipety (10, 25 ml) a centrifugační zkumavky (15, 50 ml) 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 Amicon® Ultra Centrifugal Filter byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

4.4 Instrumentace

- Thermostřepačka MTC-100 Thermoshaker Incubator (MI Instruments, Hanzghou, Čína)
- výrobek ultračisté vody (H₂O) na bázi reverzní osmózy typ 06 (AquaOsmotic, Tišnov, Česká republika)
- box s laminárním prouděním Bioair safe flow 1.2 (EuroClone, Pero MI, Itálie),
- inkubátor CB 160 (Binder, Tuttlingen, Německo),
- vodní lázeň (GRANT, Cambridge, Velká Británie)
- centrifuga U-320 R, centrifuga M-240 R (Boeco, Hamburk, Německo)

- míchačka big squide, Vrotex Lab Dancer, Třepačka destiček (IKA, Staufen v Breisgau, Německo)
- třepačka/kývačka MR-1 (Biosan, Riga, Lotyšsko)
- elektroforéza (Bio-Rad)
- hlubokomrazící box -80 °C (ESCO, Horsham, PA, USA)
- lednice (Liebherr, Bulle, Švýcarsko)
- multifukční destičkový reader Synergy 2 (BioTek, Winooski, VT, USA)
- laboratorní váhy CPA 225D (Sartorius, Gottingen, Německo)
- výrobník ledu CB 249 A HC (Berma, Modletice, Česká republika)
- Azure c280 (Azure biosystems, Dublin, CA, USA)
- nanofotometr (Implen, Mnichov, Německo),
- Muse Cell Analyzer (Merck Millipore, Darmstadt, Nemecko),
- multifunkční destičkový reader Spark (Tecan, Mänedorf, Švýcarsko)
- System Trans-blot (Bio-Rad, Herkules, CA, USA)

4.5 Metodika

Amplifikace genu BACE1 a produkce rekombinantní BACE1 v Expi293F buňkách proběhla na Katedře molekulární patologie a biologie VLF UO. Identifikace a validace BACE1, *in vitro* testování účinnosti jejich inhibitorů a stanovení hodnoty IC₅₀ bylo provedeno na KTVF VLF UO.

4.5.1 Příprava bakteriálních konzerv

Bakteriální konzerva obsahující kulturu *E. coli* TOPO10 s plazmidovou DNA BACE1 byla použita pro produkci plazmidové DNA. Bakteriální kultura o objemu 150 µl byla inokulováno do 150 ml LB média (koncentrace kultury v LB médiu 100 mg·ml⁻¹) a přidavkem 75 µl karbenicilinu (ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mg·ml⁻¹) a inkubována v Erlenmayerově baňce o objemu 1000 ml při 37 °C za stálého míchání 200 otáček/min (rpm). Po 24 hodinách byly z části kultury připraveny bakteriální konzervy: 400 µl bakteriální kultury s 600 µl 50 % glycerolu,

který slouží jako kryoprotektivum, bylo smícháno a skladováno při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v hlubokomrazicím boxu pro další produkci.

Zbytek narostlé bakteriální kultury byl použit pro izolaci plazmidové DNA, která byla provedena PureLink Quick plasmid Midiprep Kitem. Bakteriální kultura *E. coli* byla stočena na centrifuze při otáčkách $4000 \times g$ po dobu 10 minut. Supernatant byl odebrán a peleta byla resuspendována v 4 ml pufru R3. Poté byly přidány 4 ml lyzačního pufru L4. Celkový obsah zkumavky byl jemně promíchán a inkubován při laboratorní teplotě, po dobu 5 min. Po inkubaci byly přidány 4 ml precipitačního pufru N3. Obsah zkumavky byl promíchán otáčením do homogenního stavu. Následovala centrifugace při otáčkách $12\ 000 \times g$ po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. HiPure Midi kolony byly zaktivovány puftrem EQ1, který působením gravitační síly protekl kolonou. Supernatant byl převeden na kolonu. Ke vzorku bylo přidáno 10 ml promývacího pufru W8. Tento krok byl opakován dvakrát. Poté byla pod kolonu umístěna sterilní zkumavka a na kolonu bylo nadávkováno 5 ml elučního pufru E4. Eluát ve zkumavce obsahoval purifikovanou DNA. K roztoku bylo přidáno 3,5 ml isopropanolu. Obsah byl dobře promíchán a centrifugován při otáčkách $12\ 000 \times g$ po dobu 30 minut při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odebrán a k peletě byly přidány 3 ml 70 % ethanolu. Zkumavka byla centrifugována při otáčkách $12\ 000 \times g$ po dobu 5 minut při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl odebrán a peleta obsahující plazmidovou DNA se ponechala schnout na vzduchu po dobu 10 minut. Peleta byla resuspendována ve 100 μl TE pufru. Koncentrace a čistota DNA byla změřena pomocí nanofotometru a v ten samý den byla použita pro transfekci.

4.5.2 Kultivace buněk

K 1 ml buněk Expi293 bylo přidáno 29 ml růstového média předehřátého na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Buněčná suspenze byla kultivována v jednorázových plastových Erlemayerových baňkách s trny a ventilačním otvorem, vložené v orbitální třepačce nastavené na 130 rpm, v inkubátoru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a atmosféře 8 % CO_2 . Počet a životnost buněk byla průběžně zjišťována použitím mikrokapilárního průtokového cytometru Muse, který k odlišení živých a mrtvých buněk využívá rozdíly v prostupnosti barviv do buněk a jejich vazbu na DNA.

Buňky byly kultivovány do počtu $3-5 \times 10^6$ na 1 ml média, s životností nad 95 %. Buňky o koncentraci 75×10^6 buněk byly centrifugovány při 500 rpm po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Získaná peleta byla rozpuštěna v 25,5 ml čerstvého kultivačního média a tato suspenze byla použita pro expresi rekombinantního proteinu.

4.5.3 Expese lidské rekombinantní BACE1

Expese lidské rekombinantní BACE1 byla provedena s využitím ExpiFectamine 293 transfekčního kitu. Byl dodržen postup stanovený výrobcem pro kulturu o objemu 30 ml. Plazmidová DNA o koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla naředěna s OPTI-MEM I médiem s redukováným sérem do celkového objemu 1500 μl . Současně bylo 81 μl ExpiFectamine 293 činidla smícháno s 1419 μl OPTI-MEM médiem. Oba roztoky byly inkubovány po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byly roztoky smíchány a ponechány dalších 20 minut k inkubaci při laboratorní teplotě. Vzniklá směs roztoků byla přidána k suspenzi Expi293 buněk o koncentraci $7,5 \times 10^7$ v 25,5 ml předeřátého Expi293 růstového média. Erlenmayerova baňka obsahující transfekované buňky byla vložena do orbitální třepačky nastavené na 130 rpm, umístěné v inkubátoru při 37 °C, v atmosféře 8 % CO₂ a relativní vlhkosti 95 %. Po 20 hodinách byla k transfekovaným buňkám přidána směs zesilovačů transfekce 1 o objemu 150 μl a 2 o objemu 1350 μl (v celkovém objemu 1,5 ml). Celkový objem kultury dosáhl objemu 30 ml. Po třech dnech byly buňky centrifugovány při otáčkách $500 \times g$ po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Peleta byla použita k izolaci enzymu.

4.5.4 Izolace lidské rekombinantní BACE1

Pro izolaci BACE1 byl použit membránový proteinový extrakční kit Mem-PER plus, který obsahoval 3 roztoky: promývací, permeabilizační a solubilizační pufr. Izolace proběhla podle postupu doporučeného výrobcem s drobnými změnami v objemech pufků. Získané pelety byly resuspendovány v 5 ml promývacího pufru a centrifugovány při otáčkách $1000 \times g$ po dobu 5 minut při 4 °C. Promývací krok byl opakován třikrát. K promyté peletě bylo přidáno 5 ml permeabilizačního pufru. Obsah byl promíchán a inkubován v třepačce při 300 rpm po dobu 30 minut při teplotě 4 °C. Po uplynutí této doby byl vzorek centrifugován při $18\,600 \times g$ po dobu 15 minut při teplotě 4 °C. Supernatant obsahující cytosolické proteiny byl odstraněn a ke vzorku bylo přidáno 5 ml solubilizačního pufru. Peleta byla resuspendována a inkubována

při 300 rpm a teplotě 4 °C po dobu 30 minut v termotřepačce. Suspenze buněk byla centrifugována při 18 600 x g teplotě 4 °C po dobu 15 min. Supernatanty, které obsahovaly lidskou rekombinantní BACE1, byly odebrány a spojeny do dvou vzorků pro další zpracování.

4.5.5 Purifikace lidské rekombinantní BACE1

Do Amicon Ultra Cetrifugal Filter kolony bylo napipetováno ~2 ml Ni-NTA agarózy, která slouží jako purifikační pryskyřice a váže na sebe BACE1 pomocí histidinových značek (His-tag). Kolona s pryskyřicí byla stočena na 4000 × g po dobu ~20 minut pro odstranění skladovacího roztoku. Poté bylo do kolony přidáno 5 ml promývacího pufru 1 (TRIS o pH = 7,5) a kolona byla centrifugována na 4000 × g po dobu 30 minut. Následně byl přidán promývací pufr 2 (TRIS o pH = 7,5 s 10 mM roztokem imidazolu) a obsah byl centrifugován na 4000 × g po dobu 10 minut.

Dalším krokem je navázání enzymu. Na kolonu bylo pipetováno ~9 ml supernatantu obsahujícího enzym. Enzym s pryskyřicí byl promíchán pomocí pipety a vložen na 60 minut do lednice za stálého třepání k navázání enzymu na pryskyřici. Po inkubaci byla kolona stočena na 4000 × g po dobu 30 minut při 4 °C.

Eluce vzorku probíhala pomocí koncentračního gradientu roztoku imidazolu. Nejprve bylo přidáno 5 ml 25 mM roztoku imidazolu v 20mM Tris pufru a kolona byla centrifugována na 4000 × g po dobu 30 minut při 4 °C. Následoval krok s 5 ml 50 mM roztoku imidazolu v 20mM Tris pufru. Doba centrifugování byla 30–50 minut. Na závěr bylo přidáno 5 ml 250 mM roztoku imidazolu v 20mM Tris pufru, který slouží jako eluční roztok. Celý obsah byl důkladně promísen a propipetován. Nanesen na kolonu a gravitační silou eluován do centrifugační zkumavky.

K enzymu s imidazolem bylo přidáno 2x 5 ml promývacího pufru (TRIS, pH = 7,5) a centrifugováno na 4000 × g po dobu 2 x 10 minut při 4 °C. Purifikovaný enzym byl rozpipetován do skleněných vialek a lyofilizován.

4.5.6 Stanovení koncentrace proteinu

Celkový obsah proteinu v buněčném lyzátu byl změřen pomocí komerčně dostupného „Protein Assay kitu“. Tato kolorimetrická metoda je založená na principu redukci měďnatého iontu na měďný po reakci s peptidovou vazbou a jeho následnou

reakcí s kyselinou bicinchoninovou (BCA). Byla připravena kalibrační řada se standardem hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentraci v rozmezí 200–1,25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorky i standard byly naředěny 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,4. Pracovní roztok byl vytvořen smícháním reagensů A, B a C dle návodu výrobce. Do jamky mikrotitrační destičky bylo pipetováno 150 μl standardu či vzorku a 150 μl pracovního roztoku. Směs byla promíchána a inkubována 30 min při teplotě 37 °C. Barevná změna byla změřena pomocí spektrofotometru Synergy 2 při vlnové délce 562 nm. Koncentrace proteinu, která je přímo úměrná intenzitě zbarvení, byla spočítána z kalibrační křivky.

4.5.7 Detekce BACE1 metodou western blot

4.5.7.1 Gelová elektroforéza

Pro analýzu purifikované BACE1 byl použita gelová elektroforéza. Analýza proběhla na 12% polyakrylamidovém gelu (PAGE) s přidáním SDS, který umožnil separaci proteinů na základě velikosti molekuly bez ovlivnění analýzy jejich nábojem. Čím byla molekula větší, tím se pohybovala gelem pomaleji. Složení gelu popisují tabulka Tab 2 a Tab 3.

Tab 2 - Složení 12% separačního gelu (2 mini gely), zdroj: Hejtmánková 2022

| Složka | Objem |
|--|-------------------|
| destilovaná voda | 5 ml |
| 1,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan sůl pH 8,8 | 3,8 ml |
| 40% akrylamid | 6,0 ml |
| 10% dodecylsírán sodný | 150 μl |
| 10% peroxodisírán amonný | 50 μl |
| Tetramethylethylendiamin | 6 μl |

Tab 3 - Složení 4% zaostřovacího gelu (2 mini gely), zdroj: (Hejtmánková 2022)

| Složka | Objem |
|--|-------------|
| destilovaná voda | 5 ml |
| 1,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan sůl pH 8,8 | 3,8 ml |
| 40% akrylamid | 6,0 ml |
| 10% dodecylsírán sodný | 150 μ l |
| 10% peroxidisírán amonný | 50 μ l |

60 μ l vzorku bylo smícháno s 30 μ l směsi vzorkovacího pufru (viz Tab 4) a β -merkapt ethanolu (85 μ l vzorkovacího pufru a 15 μ l β -merkapt ethanolu) a zahřáto na 95 °C po dobu 5 minut. Směs byla vytvořena smícháním. Na gel byly naneseny vzorky a pozitivní kontrola (komerční BACE1) o objemu 30 μ l a hmotnostní marker o objemu 5 μ l. Vzorek č. 2 byl naředěn 2x 0,1M fosfátovým pufrem o pH 7,4, vzhledem k 2x vyšší koncentraci proteinu. Elektroforéza proběhla v prostředí elektrodového pufru pH 8,5 (viz Tab 5) za konstantního napětí 200 V v proudu 60 mA na 1 gel po dobu 1 hodiny.

Tab 4 - Složení vzorkového pufru, zdroj: (Hejtmánková 2022)

| Složka | Množství |
|--|--------------------------------------|
| 0,5 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan sůl pH 6,8 | 3,75 ml |
| Glycerol | 3 ml |
| Dodecylsírán sodný | 0,69 g |
| Destilovaná voda | Doplnit do celkového množství 8,5 ml |

Tab 5 – Složení elektrodového pufru, zdroj: (Hejtmánková 2022)

| Složka | Množství |
|--|-------------------------------------|
| 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan báze | 15 g |
| 384 mM Glycin | 72 g |
| 0,1% Dodecylsírán sodný | 2,5 g |
| Destilovaná voda | Doplnit do celkového množství 2,5 l |

4.5.7.2 Western blot

Gel byl promyt transfer puftrem po dobu 10 minut (viz Tab 6). Polyvinilfluoridová membrána byla aktivována ponořením do methanolu po dobu 1 minuty. Poté byla po dobu 10 minut promyta transfer puftrem společně s filtračními papíry. Tento krok byl opakován 3×. Postupně na sebe byly navrstveny originální filtrační papír, membrána, gel a pět kusů filtračních papírů. Všechny vrstvy byly stlačeny poválením zkumavky. Přenos gelu na membránu probíhal za konstantního proudu 0,17 A a maximálního napětí 25 V po dobu 30 minut.

Tab 6 – Složení transfer pufru, zdroj: vlastní

| Složka | Množství |
|------------------|---------------------------------------|
| 25 mM Tris báze | 15,15 g |
| 192 mM glycin | 72 g |
| methanol | 1000 ml |
| Destilovaná voda | Doplnit do celkového množství 5000 ml |

Membrána s přeneseným proteinem byla promyta TBS puftrem (viz Tab 7). Následně byla blokována v 5% mléce rozpuštěném v TBS pufru obsahujícím 0,05% Tween 20 po dobu 1 hodiny. Následně byla membrána promyta v tomto roztoku TBS pufru s 0,05% Tween 20 3x po dobu 5 minut.

Membrána byla inkubována do druhého dne při teplotě 8 °C s primární protilátkou Anti-BACE1, která byla připravena naředěním v poměru 1:1000 v 5% mléce, které bylo rozpuštěno v TBS pufru s 0,05% Tween 20. Další den byla membrána promyta 10 ml TBS s 0,05% Tween 20 ve Falkonově zkumavce za stálého míchání v mini rotátoru 3× po dobu 5 minut. Poté byla membrána inkubována se sekundární protilátkou, která byla naředěna v poměru 1:5000 v 5% mléce, které bylo rozpuštěno v TBS pufru s 0,05% Tween 20 a mícháno v rotátoru po dobu 60 minut. Na závěr byla membrána promyta 4× 15 ml v TBS pufru po dobu 5 minut.

Vizualizace vazby protilátky byla provedena pomocí BM chemiluminescenčního substrátu z Western blotting kitu. Substrát byl inkubován s membránou po dobu 1 minuty a poté byla provedena detekce chemiluminiscence s použitím přístroje Azure c280.

Tab 7 - Složení základního 10× koncentrovaného TBS pufru o pH 7,6

| Složka | Množství |
|------------------|---------------------------------------|
| 25 mM Tris báze | 48,8 g |
| 137 mM NaCl | 160 g |
| Destilovaná voda | Doplnit do celkového množství 2000 ml |

4.5.8 Testování *in vitro* účinnosti inhibitorů BACE1

4.5.8.1 Stanovení aktivity BACE1

Aktivita lidské rekombinantní BACE1 byla měřena na základě přenosu fluorescenční rezonanční energie (FRET). Fluorescenční signál je zaznamenán po štěpení substrátu 7-methoxykumarinu-4-acetyl-[Asn670, Lue671]-amyloidu β /A4 prekurzorového proteinu 770 fragmentu 667-676-(2,4-dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amidu trifluorooctové soli pomocí BACE1.

BACE1 byla naředěna 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,4 na intenzitu fluorescence $\sim 10\,000 \Delta\text{RFU}\cdot\text{hod}^{-1}$ (relativních fluorescenčních jednotek za hodinu) a stabilizována 0,01% albuminem. V průběhu měření se BACE1 uchovávala v ledové tříšti, aby se zamezilo kolísání její aktivity. Vzorek pro měření o celkovém 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 7 μM substrátu. Reakce byla měřena ihned po přidání substrátu v 96jamkových černých destičkách s plochým dnem při excitační a emisní vlnové délce 330 nm a 390 nm a teplotě 37 °C. V průběhu 1 hodiny byl každých 30 sekund odečten fluorescenční signál. Experiment byl proveden v triplicátu a opakován třemi nezávislými měřeními.

4.5.8.2 Stanovení *in vitro* účinnosti inhibitorů

Na základě *in silico* modelování bylo z databáze KTVF zvoleno 19 látek pro *in vitro* testování schopnosti inhibovat enzym BACE1. Průběh inhibice byl monitorován fluorescenční spektrofotometrickou metodou na multifunkčním destičkovém readeru Spark od firmy Tecan. Byla připravena koncentrační řada

inhibitorů. Látky byly naředěny na koncentraci 1×10^{-2} M a 1×10^{-3} M v DMSO a další koncentrace až do 1×10^{-5} M byly naředěny ve sterilní filtrované vodě. Měření probíhalo v 96jamkových černých destičkách s plochým dnem. Do každé jamky bylo napipetováno 10 μ l enzymu BACE1, 70 μ l 20 mM acetátového pufru o pH 4,5, 0,1 % Triton X-100 a 10 μ l inhibitoru o koncentraci 1×10^{-5} M (výsledná koncentrace 1×10^{-6} M). Směs byla promíchána na třepačce a enzym byl inhibován 30 minut na ledu. Po uplynutí inhibiční doby bylo do jamek přidáno 10 μ l 7 μ M substrátu 7-methoxykumarinu-4-acetyl-[Asn670, Lue671]-amyloidu β /A4 prekurzorového proteinu 770 fragmentu 667-676-(2,4-dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amidu trifluorooctové soli, čímž se odstartovala reakce. Měření proběhlo při excitační a emisní vlnové délce 330 nm a 390 nm a teplotě 37 °C. V průběhu 1 hodiny byl každých 30 sekund odečten fluorescenční signál. Experiment byl proveden v triplicátu na multifunkčním destičkovém readeru Spark. Poté byla spočítána aktivita BACE1 v % a účinnost inhibitoru podle následujících vzorců:

$$\text{Aktivita (\%)} = \frac{1 - (\text{aktivita enzymu} - \text{aktivita inhibovaného enzymu})}{\text{aktivita enzymu}} \times 100$$

Výpočet aktivity v procentech (*zdroj: vlastní*)

$$\text{Inhibice (\%)} = 100 - \text{aktivita (\%)}$$

Výpočet inhibice v procentech (*zdroj: vlastní*)

4.5.9 Stanovení IC₅₀

Hodnota IC₅₀ udává takovou koncentraci standardního inhibitoru, která způsobí pokles aktivity enzymu o 50 %. Pro hodnocení inhibitorů BACE1 byl použit standardní inhibitor Verubecestat.

Pro stanovení bylo smícháno 10 μ l enzymu BACE1, 70 μ l 20 mM acetátového pufru o pH 4,5, 0,1 % Triton X-100 a 10 μ l roztoku inhibitoru dané koncentrace (1×10^{-4} - 1×10^{-10} M). Inhibice probíhala 30 min při teplotě 37°C. Po přidání 10 μ l 7 μ M roztoku substrátu 7-methoxykumarinu-4-acetyl-[Asn670, Lue671]-amyloidu β /A4 prekurzorového proteinu 770 fragmentu 667-676-(2,4-dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amidu trifluorooctové soli byla reakce odstartována a měření proběhlo v 96jamkových černých destičkách při excitační a emisní vlnové délce 330 nm a 390 nm při teplotě 37°C na multifunkčním destičkovém readeru Spark. Každých 30 s po dobu 1 hodiny byl odečten fluorescenční signál. Experiment byl proveden v triplikátu a opakován třemi nezávislými měřeními pro standardní inhibitor Verubecestat. U experimentu pro látku K1142 bylo měření provedeno pouze v jednom triplikátu. Pro statistické vyhodnocení byl použit statistický program GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA).

4.5.10 Výpočet pKa

Hodnota pKa pro nejúčinnější inhibitor K1142 byla vypočtena pomocí software MarvinSketch, v. 18.24.0 (Sketch software, The Hague, Netherlands).

4.5.11 Stanovení BBB skóre

V praxi se pro predikci prostupnosti léčiva používá BBB skóre, které je založeno na chemicko-fyzikálních vlastnostech látky: počtu aromatických kruhů, počtu těžkých atomů, molekulové hmotnosti, počtu donorů vodíkové vazby a počtu akceptorů vodíkové vazby, topologické vrstvě polárního povrchu (topological polar surface area, TPSA) hodnotě pak a MWHBN (deskriptor obsahující molekulovou hmotnost, donor vodíkové vazby a akceptory vodíkové vazby) spočítaného podle následujících vzorců:

$$\begin{aligned} HBN &= HBA + HBD \\ MWHBN &= MW^{-0,5} \times HBN \end{aligned}$$

Výpočet MWHBN (deskriptor obsahující molekulovou hmotnost, donor vodíkové vazby a akceptory vodíkové vazby) kde HBN je dáno součtem HBA (počet akceptorů vodíkové vazby) a HBD (počet donorů vodíkové vazby), MW je molekulová hmotnost.

$$BBB \text{ skóre} = AroR + HA + 1,5 \times MWHBN + 2 \times TPSA + 0,5 \times pKa$$

Výpočet BBB skóre: AroR (počet aromatických kruhů), HA (počet těžkých atomů), MWHBN (deskriptor obsahující molekulovou hmotnost, donor vodíkové vazby a akceptory vodíkové vazby, výpočet viz výše), TPSA (topologická vrstva polárního povrchu), pKa (záporný dekadický logaritmus hodnoty disociační konstanty kyseliny Ka)

5. Výsledky

5.1 Exprese a purifikace BACE1

Z narostlé bakteriální konzervy bylo izolováno 100 μl DNA. Koncentrace DNA ve vzorku, změřená pomocí nanofotometru, byla 3370 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Pro koncentraci DNA 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 30 ml celkového objemu buněčné kultury bylo v ten samý den použito 9 μl z toho vzorku DNA pro jednu transfekci Expi293F buněk. Z objemu 100 μl vyizolované plazmidové DNA bylo připraveno 11 expresí. Z pelet buněk byla izolována BACE1, která byla spojena do dvou vzorků, purifikována a pomocí fluorescenční spektrofotometrie byla potvrzena její aktivita.

5.2 Stanovení koncentrace proteinu

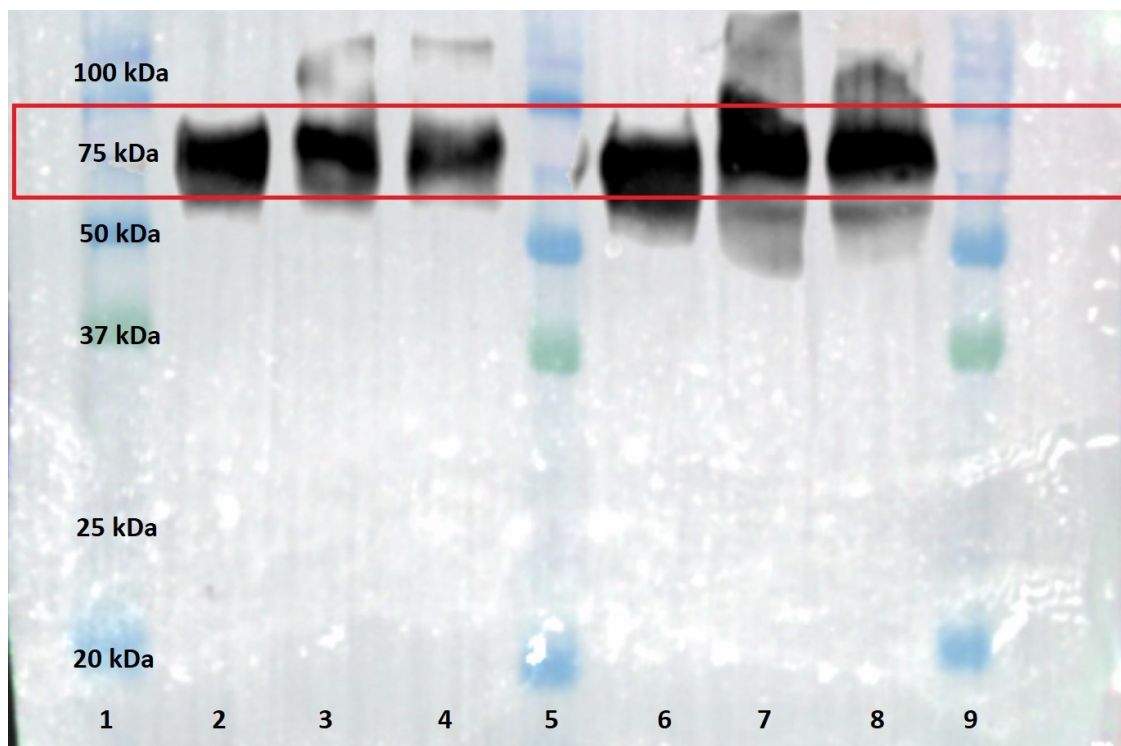
Pomocí BCA kitu byla stanovena koncentrace proteinu pro oba dva purifikované vzorky.

Hodnota koncentrace proteinu BACE1 ve vzorku 1 byla 211,60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Hodnota koncentrace proteinu BACE1 ve vzorku 2 byla 501,11 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

5.3 Analýza proteinu metodou western blot

Reprezentativní výsledky analýzy BACE1 (~75 kDa) s použitím metody western blot jsou ukázány na obrázku 7 (Obr. 4). Před tímto krokem byla provedena SDS-PAGE gelová elektroforéza. Vzorek komerčně dostupné BACE1 byl porovnán se vzorky z expresí a hmotnostním markem. Vzorky byly na gel naneseny podle změřené koncentrace proteinu (viz kapitola 5.1). Vzorek číslo 2 BACE1 byl na gel nanesen v koncentraci 1:1.

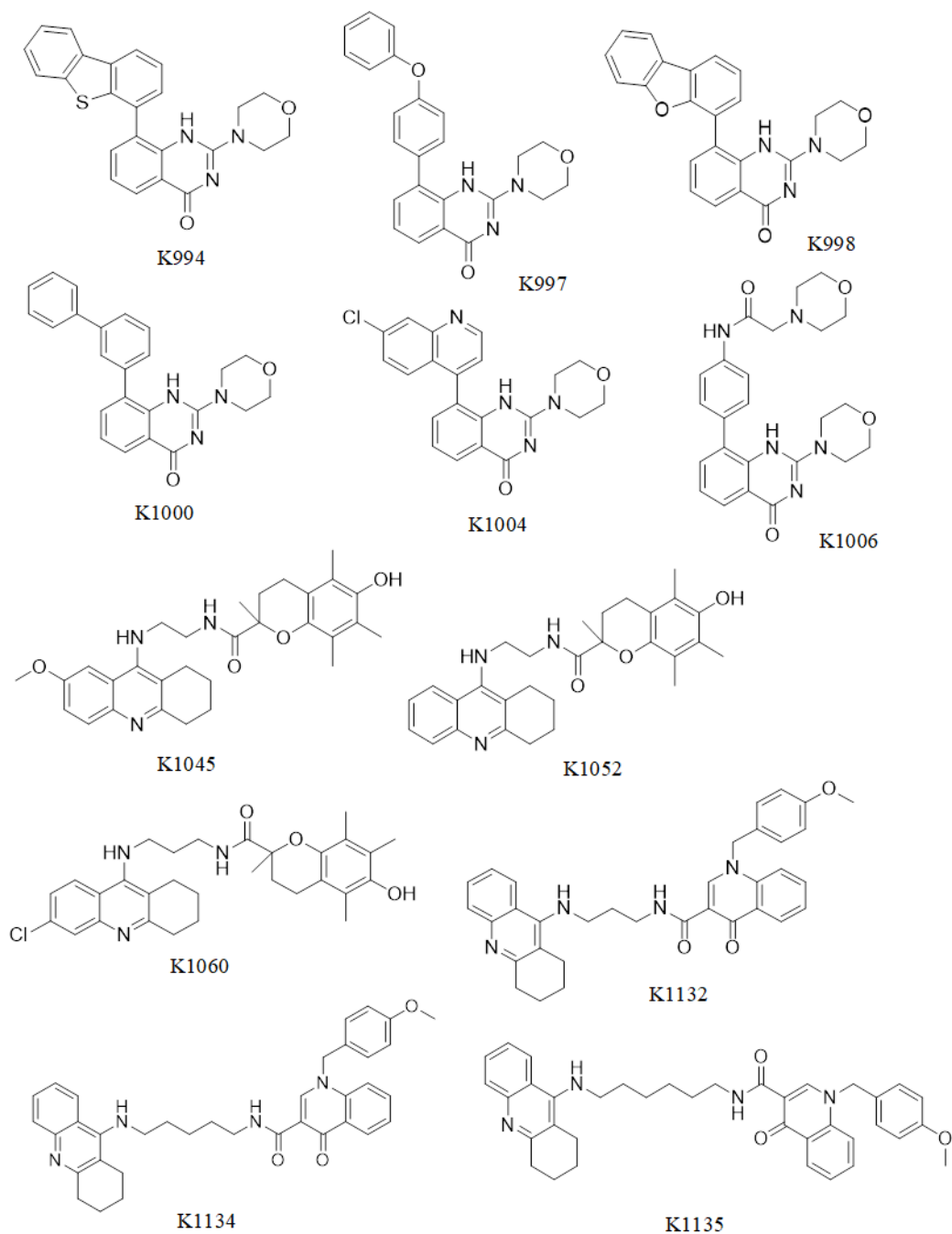


Obr. 4 Western blot analýza purifikované BACE1

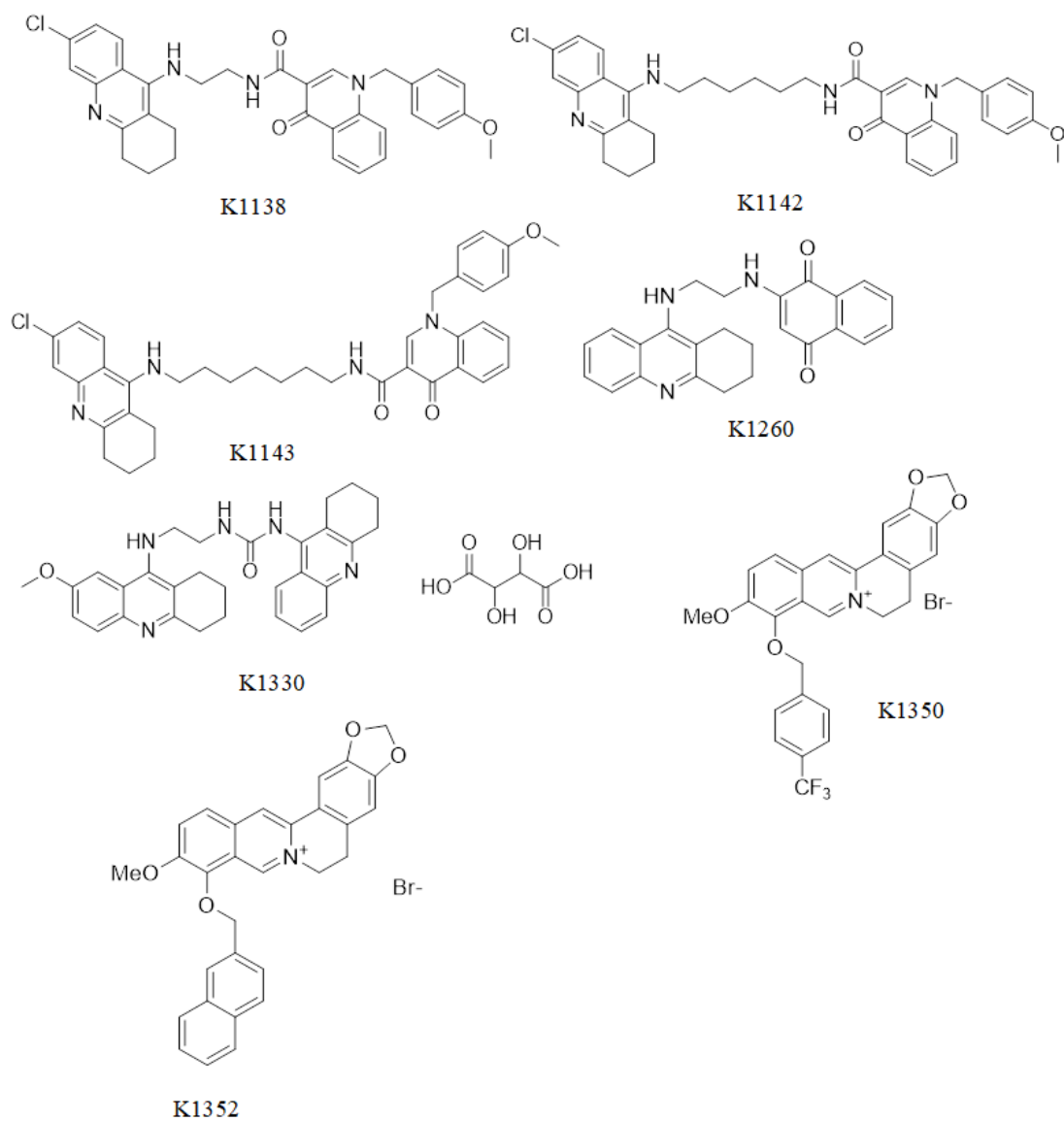
1, 5 a 9 hmotnostní marker, 2 a 6 komerční BACE1, 3 a 7 první vzorek BACE1, 4 a 8 druhý vzorek BACE1 (ředěná 1:1), (*zdroj: vlastní fotografie*)

5.4 Stanovení účinnosti vybraných inhibitorů BACE1

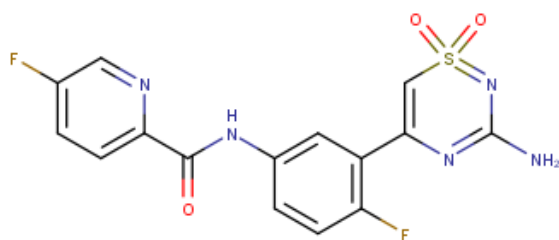
Struktury testovaných inhibitorů se nachází na obrázku Obr. 5 a Obr. 6. Jejich inhibiční účinnost byla porovnána s inhibiční účinností standardního inhibitoru Verubecestatu (jeho strukturu viz Obr. 7).



Obr. 5 Struktury testovaných inhibitorů BACE1 první část



Obr. 6 Struktury testovaných inhibitorů BACE1 druhá část



Obr. 7 Struktura Verubecestatu

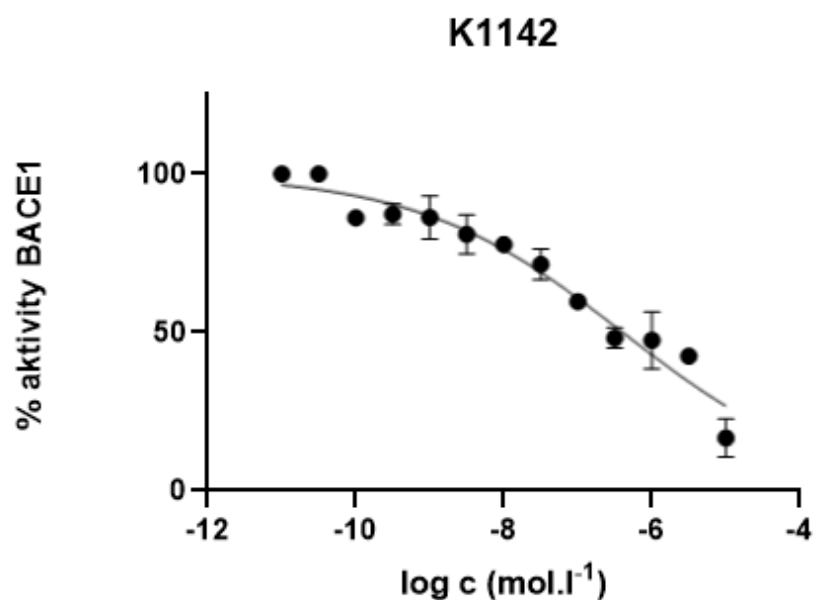
Tab 10 Výsledky stanovení účinnosti inhibitorů BACE1

| Číselné označení | Průměrná hodnota BACE ± SEM (%), $c=1 \times 10^{-6}$ | Číselné označení | Průměrná hodnota BACE ± SEM (%), $c=1 \times 10^{-6}$ |
|------------------|--|------------------|--|
| K994 | 36,17 ± 0,37 | K997 | 29,91 ± 5,46 |
| K998 | 22,9 ± 2,30 | K1000 | 39,89 ± 3,40 |
| K1004 | 33,15 ± 5,78 | K1006 | 40,55 ± 3,00 |
| K1045 | 44,29 ± 3,81 | K1052 | 43,27 ± 2,83 |
| K1060 | 47,42 ± 0,98 | K1132 | 40,84 ± 1,68 |
| K1134 | 50,89 ± 1,59 | K1135 | 40,81 ± 3,22 |
| K1138 | 50,80 ± 6,64 | K1142 | 69,69 ± 7,41 |
| K1143 | 46,66 ± 8,00 | K1260 | 49,61 ± 3,23 |
| K1330 | 40,82 ± 6,91 | K1350 | 53,03 ± 3,65 |
| K1352 | 34,95 ± 0,99 | Verubecestat | 100 ± 0,00 |

Průměrná hodnota BACE ± SEM (%), $c=1 \times 10^{-6}$ – inhibiční účinnost inhibitorů BACE1 byla spočtena z pětiplikátu ze třech nezávislých měření při koncentraci 1×10^{-6} s uvedenou střední chybou průměru

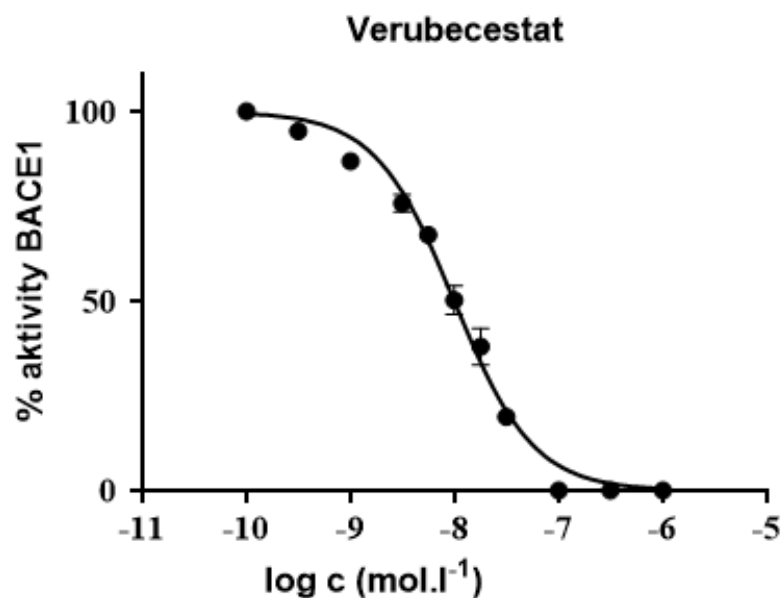
5.5 Stanovení IC₅₀

Hodnota IC₅₀ pro nejúčinnější inhibitor K1142 (viz Obr. 8) byla $407,8 \pm 77,54$ nM. Výsledek je vyjádřen jako hodnota z průměru triplikátů jednoho měření ± SEM. Získaná hodnota byla porovnána s IC₅₀ látky Verubecestat.



Obr. 8 Inhibiční účinek různých koncentrací inhibitoru K1142 na β -sekretasu 1 (BACE1)

Hodnota IC_{50} pro standardní inhibitor Verubecestat (viz Obr. 9) byla $9,945 \pm 0,398$ nM. Výsledek je vyjádřen jako hodnota průměru z 3 nezávislých stanovení \pm SEM.



Obr. 9 Inhibiční účinek různých koncentrací Verubecestatu na K1142 na β -sekretasu 1 (BACE1)

5.6 Stanovení pKa

Hodnota pKa 8,08 pro nejúčinnější inhibitor K1142 byla stanovena pomocí programu MarvinSketch, v. 18.24.0 (Sketch software, The Hague, Netherlands).

5.7 Stanovení BBB skóre

Hodnota BBB skóre pro nejúčinnější inhibitor K1142 byla vypočtena 2,91.

6. Diskuze

BACE1 má klíčovou roli při vzniku AD, kde společně s γ -sekretasou je zodpovědná za patologické štěpení APP a vznik amyloidních plaků v mozku. Tento jev vede ke vzniku kognitivní dysfunkce (Taylor et al. 2022). I přes dosavadní neúspěch v hledání vhodného inhibitoru BACE1 se od amyloidní teorie úplně neodstoupilo. V klinickém testování se zkoumají různá léčiva, které by mohly ovlivnit přítomnost A β plaků. Patří sem látky proti A β agregaci a jejich kombinace v s BACE1 inhibitory, nové inhibitory zesilovače A β transportu, vakcinace proti A β či imunizační terapie proti ukládání A β (Das a Yan 2019; Pratsch et al. 2023; Tarif et al. 2024).

Od roku 2003, kdy byl k terapii AD schválen Memantine, a roku 2006, kdy byl Donepezil rozšířen k léčbě AD, nebylo schváleno žádné další léčivo. Trvalo skoro 20 let k dosažení úspěchu v hledání terapie AD (Espay et al. 2024). Až v roce 2021 a 2023 byly schváleny monoklonální protilátky anti-A β proti amyloidovým plakům. Protilátky Aducanumab a Lecanemab, schválené pouze ve Spojených státech amerických nikoliv v Evropě, progresi AD pouze zpomalují. Současně je známo, že je jejich použití neúčinnější v časně fázi AD. Proto je potřeba se zaměřit na časnou diagnostiku AD onemocnění, ještě než je pozorovatelná akumulace A β , k čemuž jsou potřeba vhodné biomarkery, které by byly neinvazivní a dostupné pro denní použití. Mezi aktuální invazivní metody patří detekce biomarkerů z cerebrospinální tekutiny a pozitronová emisní tomografie, které detekují až vzniklé změny. Problémem je, že hladina neinvazivních biomarkerů (hladina A β ₄₂/A β ₄₂ v plazmě a v séru, τ -protein, lehkých řetězec neurofilamen NfL) se mění i při dalších neurodegenerativních onemocnění (Pernecky et al. 2024). První úspěchem v terapii AD byla anti-A β monoklonální protilátka Aducanumab, která prostupuje přes hematoencefalickou bariéru a selektivně se váže na amyloidní plaky. Stejně jako BACE1 inhibitory i anti-A β protilátky měly dlouhou historii neúspěchů (například Bapineuzumab, PF-05236812 nebo Solanezumab). Úspěch protilátky Aducanumab by mohl oživit případ inhibitorů BACE1 a zesílit tak intenzitu práce v jejich výzkumu (Long et al. 2024). Další úspěch oslavila protilátka Donanemab, která byla schválena v červenci roku 2024 k použití

v imunoterapii AD, která zpomaluje progresi onemocnění až o 40 % (Alzheimers.org.uk 2024).

V rámci této diplomové práce byl pro testování účinnosti inhibitorů BACE1 produkován a validován tento enzym. Pro expresi BACE1 byla použita bakteriální konzerva obsahující kulturu *E. coli* TOPO10 s plazmidovou DNA BACE1. Z narostlé bakteriální kultury bylo izolováno $3370 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ plazmidové DNA ve 100 μl TE pufru. Zbytek bakteriální buněčné kultury byl zamražen pro další využití. Pro expresi BACE1 bylo použito 9 μl plazmidové DNA pro transfekci do Expi293F buněk, o celkovém objemu 30 ml, což odpovídá koncentraci $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Celkem bylo takto připraveno 11 transfekcí, které byly následně spojeny do dvou vzorků. Vzhledem k vysokému počtu expresí a předpokladu zisku dostatečného množství proteinu pro jeho charakterizaci a stanovení účinnosti inhibitorů, byla exprese BACE1 po 3 dnech ukončena. Standardní doba exprese BACE1 je jeden týden. Enzym BACE1 byl izolován pomocí membránového proteinového extrakčního kitu Mem-PER, s mírnými změnami od doporučeného postupu výrobcem. Změny byly v doporučeném objemu jednotlivých pufrů, vzhledem k vyššímu počtu buněk. Dle výrobce bylo doporučeno resuspendovat buněčnou peletu ve 3 ml promývacího pufru. Poté použít 3 ml permeabilizačního a 3 ml solubilizačního pufru. K získané peletě bylo přidáno 5 ml každého pufru. Po izolaci proteinu následovala purifikace pomocí Amicon Ultra Cetrifugal Filter kolon (30kDa) a použitím pryskyřice Ni-NTA agarózy. Membrána o velikosti 30 kDa, která je umístěna v Amicon Ultra Cetrifugal Filter kolonách, umožnila separaci proteinů menší než 30 kDa. BACE1, která má molekulovou hmotnost ~ 75 kDa byla navázána na pryskyřici a potom byla z této pryskyřice uvolněna koncentračním gradientem imidazolu.

Po purifikaci proteinu následovala jeho identifikace. Byla zkontrolována aktivita pomocí fluorescenční spektrofotometrie a stanovena koncentrace proteinu pomocí kitu pro proteiny. Z kalibrační křivky sérového hovězího albuminu byly vypočítány koncentrace proteinu pro vzorek č. 1 $211,60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pro vzorek č. 2 $501,11 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Následovala gelová elektroforéza. Vzhledem k dvojnásobné koncentraci u vzorku č. 2, byl tento vzorek před nanesením na gel naředěn fosfátovým pufrům na stejnou koncentraci, jakou měl vzorek č. 1. BACE1 byla identifikována metodou western blot pomocí protilátky Anti-BACE1, kde bylo potvrzeno, že se BACE1 nachází v okolí

~75 kDa. Což je molekulová hmotnost pro plně maturovaný, glykosylovaný protein (Capell et al. 2000). Jako pozitivní kontrolu jsme použili komerčně dostupnou BACE1, která byla produkována v HEK293 buňkách, a na western blotu byl její pruh ve stejné pozici, jako námi produkový enzym (Sino Biological 2024).

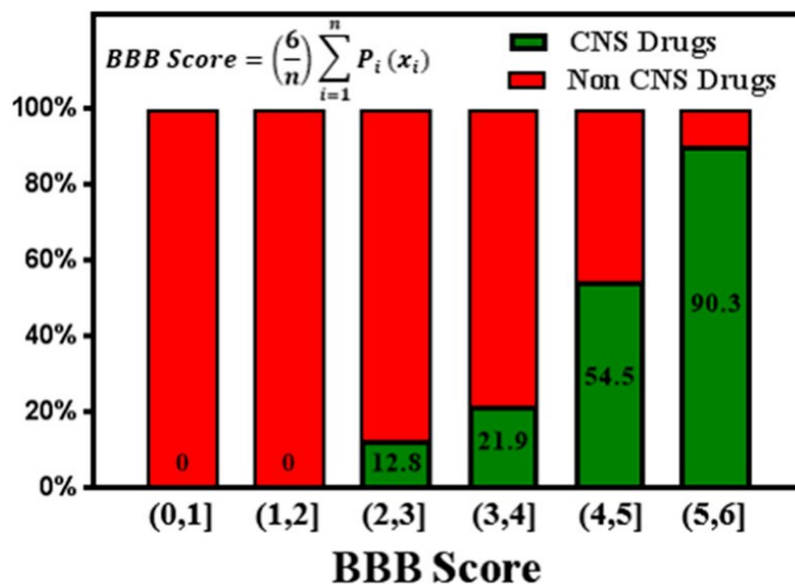
Účinnost 19 vybraných inhibitorů BACE1 byla změřena pomocí fluorescenční spektrofotometrické metody s využitím substrátu 7-methoxykumarin-4-acetyl-[Asn670, Lue671]-amyloid β /A4 prekursorový protein 770 fragment 667-676-(2,4-dinitrophenyl)Lys-Arg-Arg amid trifluorooctová sůl. Účinnost inhibice látek K994, K997, K998, K1000, K1004 a K1352 při koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ M se pohybovala pod 40 %. Účinnost inhibice K1006, K1045, K1052, K1060, K1132, K1134, K1135, K1138, K1143, K1260, K1330 a K1350 při koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ M se pohybovala v rozmezí 40-50 %. V porovnání s účinností látky Verubecestat při koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ M, která byla stanovena $100 \pm 0,00$ %, byly tyto hodnoty velmi nízké. Nejvyšší inhibiční účinnost byla pozorována u látky K1142 a to $69,69 \pm 7,41$ %, proto bylo u této látky stanovena hodnota IC_{50} .

Vzhledem k velmi malému množství látky bylo měření IC_{50} pro látku K1142 provedeno pouze jednou v triplikátu. Experimentálně zjištěná hodnota IC_{50} $407,8 \pm 280,7$ nM byla porovnána se standardním inhibitorem Verubecestatem, který se dostal do 3. fáze klinického testování. Výsledná hodnota IC_{50} pro Verubecestat byla $9,945 \pm 0,398$ nM. Hodnota IC_{50} pro látku K1142 byla tedy 41 \times nižší než hodnota Verubecestatu. V publikacích se pro Verubecestat uvádí hodnoty IC_{50} pohybující se v rozmezí 2,1 – 13 nM (Kennedy et al. 2016; Tocris.com 2024; Yan 2016). Častěji je uváděna hodnota K_i , která je vždy menší než hodnota IC_{50} a závisí na kinetickém mechanismu inhibice (kompetitivní, nekompetitivní a mix inhibice). Hodnota IC_{50} je tedy méně přesnější než hodnota K_i , ale její určení by vyžadovalo provést další experimenty (The Science Snail 2019).

Ve struktuře látky K1142 se nachází 6-chlorotakrin a 1-(4-metoxybenzyl)-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-3-karboxylová kyselina (BQCA). V roce 1993 byl takrin schválen FDA jako první inhibitor AChE v léčbě AD. Pro svoji hepatotoxicitu nebyl ale nadále v terapii užíván (Hepnarova et al. 2018). V dnešní době se používá k designování a syntéze multicílených ligandů v terapii multifaktoriální AD (Long et al. 2024). Hybridizace takrinu vede ke snížení jeho hepatotoxicity a zvýšení jeho biologické

aktivity. BQCA byla syntetizována firmou Merck a je známa jako vysoce selektivní pozitivní alosterický modulátor muskarinových receptorů typu M1, které jsou důležité pro zlepšení kognitivního deficitu, ke snížení fosforylace t-proteinu skrz aktivaci proteinu C a inhibici glykogensynthasy 3 β . K1142 byla v předchozím výzkumu testována jako inhibitor AChE, i když ve výsledku nebyla lepší než standardní inhibitor Donepezil. Její hodnota IC₅₀ byla 51,7 \pm 3,4 nM. (Hepnarova et al. 2018). Hodnota IC₅₀ pro Donepezil pro inhibici AChE je udávána 6,7–35,0 nM (Ogura et al. 2000, Li et al. 2016). *In vivo* výzkum ukázal, že působení BQCA má prokognitivní účinek díky své schopnosti zvrátit skopolaminem-indukovanou paměťovou deficienci (Shirey et al. 2009).

Bohužel rozpustnost nejúčinnějšího inhibitoru K1142 limitovala jeho další *in vitro* testování. Vzhledem k původně plánovanému spektrofotometrickému stanovení hodnoty pKa, kdy při vyšších koncentracích pH docházelo k vysrážení vzorku, byla proto hodnota pKa stanovena pomocí software Swissadme.ch. Hodnota pKa byla 8,08, z této hodnoty bylo spočítáno BBB skóre, které predikuje prostupnost látky do mozku. Jeho hodnoty nabývají 0–6. Hodnota 0-1 znamená 0% šanci prostupu do mozku, hodnota 5-6 90,3% šanci (viz Obr. 10). Všechny testované látky jsou potenciálními léčivy AD. Léky proti AD často selhávají při přestupu přes BBB. Přestup je ale stěžejní v cílení na inhibici BACE1 v mozku a zastavení tvorby amyloidových plaků. Byla spočtena hodnota BBB skóre 2,91, což bohužel predikuje nízkou prostupnost do mozku. Hodnota 2-3 udává 12,8% šanci prostupu do mozku (Gupta et al. 2019).



Obr. 10 BBB skóre: nabývá hodnot 0-6 a udává šanci v % na prostup léčiva přes hematoencefalickou bariéru (BBB), zdroj: (Gupta et al. 2019)

S ohledem na výsledek BBB skóre a velikost molekuly látky K1142 je jasné, že sama nebude mít schopnost prostupu přes BBB, kam prostupují pouze malé molekuly (Zenaro et al. 2017). V hematoencefalické bariéře však fungují transportéry „ATP-binding cassette transportes“ (ABC) například ABCA1, ABCA2 nebo ABCA7, které pomáhají léčivům k jejich prostupu (Pereira et al. 2018). K tomuto zjištění, zda by se naše látka byla schopna vázat na nějaký transportér a prostupovat tak do mozku, by musely být provedeny další *in vitro* testy.

7. Závěr

Po změření inhibiční účinnosti 19 vybraných látek bylo zjištěno, že žádná z nich nedosahuje stejné nebo lepší účinnosti než standardní inhibitor Verubecestat.

Výsledkem této diplomové práce je:

- produkce vlastního rekombinantního enzymu BACE1, která zahrnovala přípravu bakteriálních konzerv, kultivaci transfekovaných buněk, expresi a izolaci enzymu
- jeho purifikace a detekci pomocí metody western blot
- testování *in vitro* účinnosti inhibitorů BACE1
- vybrání nejúčinnějšího inhibitoru K1142, u kterého byla stanovena hodnota IC_{50} $407,8 \pm 77,54$ nM, která je $41\times$ nižší než hodnota Verubecestatu
- stanovení hodnoty pKa 8,08 pro nejúčinnější inhibitor K1142 pomocí programu MarvinSketch
- a výpočet hodnoty BBB skóre 2,91 pro nejúčinnější inhibitor K1142, která predikuje 12,8% šanci prostupu do mozku

Kvůli asociaci se vznikem AD byla BACE1 po dlouhou dobu atraktivním cílem ve výzkumu terapie AD. Bylo vyvinuto několik BACE1 inhibitorů, které se ale nedostaly do širšího klinického použití kvůli nedostatečné účinnosti, vedlejším účinkům nebo dokonce až zhoršení kognitivních funkcí. Úbytek váhy a ztráta apetitu pozorované jako vedlejší účinky u léčby Verubecestatem a Lanabecestatem by ale mohly být využity u léčby metabolického syndromu, čehož si všimla společnost AstraZeneca, která obdržela patent pro léčbu obezity (Taylor et al. 2022).

Všechny klinické fáze testování BACE1 inhibitorů byly doposud ukončeny, nicméně to snad není jejich úplným koncem. BACE1 je nadále nejvíce slibným cílem ve vývoji léčiva AD. Navzdory jejich neúspěchům byly zjištěny nové užitečné informace. Mnohé předešlé testování léků se také potýkalo s neúspěchy. Například imunoterapie v oblasti AD musela překonat spoustu překážek, než byla schválena protilátka proti A β aducanumab nebo lecanemab. Výsledné vedlejší účinky použití BACE1 inhibitorů mohou být možná následkem nespecifického cílení se na isoformu

enzymu BACE2 (Ghosh 2024). BACE2 je nejvíce exprimována ve střevě, ledvinách a slinivce břišní. Štěpí například PMEL (pigment cell-specific melanocyte protein) v pigmentových buňkách. Její inhibice má za následek depigmentaci, která byla pozorována jako častý vedlejší účinek testovaných BACE1 inhibitorů (Hampel et al. 2021). Odhalení všech BACE1 substrátů umožňuje lépe pochopit fyziologickou funkci BACE1 a předem odhadnout k jakým vedlejším efektům může, inhibice BACE1 v terapii AD, vést. Přesné definování BACE1 substrátů je klíčové pro design nových inhibitorů, protože úplná inhibice BACE1 by vedla k hromadění těchto substrátů v buněčném endomembránovém systému včetně ER (Hrabínova et al. 2020).

Výsledky klinického testování BACE1 inhibitorů ukázaly snížení tvorby A β až o 50 %. Tak velká redukce možná vede ke vzniku nežádoucích účinků. Pokud by menší dávka stále zamezovala vzniku A β a nástup AD by se zpomalil byť jen o několik let, a zároveň by došlo i ke snížení výskytu vedlejších účinků, znamenalo by to stále velký úspěch (Ghosh 2024).

Alternativní léčbou pro familiární AD by mohla být úprava genetické informace s využitím CRISPR-Cas9. Mutace v alele e4 ApoE je rizikovým faktorem pro vznik AD. Technologie CRISPR-Cas9 již byla ve výzkumu AD využita pro úpravu švédské mutace APP, tato mutace vede k zvýšenému štěpení APP pomocí BACE1 a vzniku A β . Odstranění této mutace vedlo k redukci vzniku A β . Překážkami takové léčby jsou bohužel přesnost, efektivnost a cena (Yang et al. 2021).

8. Seznam použitých zkratk

| | |
|----------------|---|
| AD | Alzheimerova choroba |
| ACh | acetylcholin |
| AChE | acetylcholinesterasy |
| AČR | Armáda České Republiky |
| AMK | aminokyselina |
| ApoE | apoprotein E |
| APP | amyloidový prekurzorový protein |
| APLP1 | amyloidu podobný protein 1 |
| APS | peroxodisíran amonný |
| AroR | aromatický kruh |
| BACE | beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme |
| BBB | hematoencefalická bariéra |
| BCA | kyselina bicinchoninová |
| CAA | cerebrální amyloidní angiopatie |
| CAS | katalytické anionické místo |
| CD | cytosolická doména |
| CHO | chinese hamster ovary |
| CRISPR-Cas9 | clustred regulatory interspaced short palindromic repeats |
| CTF β | membránový C-koncový fragment β |
| D | kyselina asparágová |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| DTNB | 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina |
| <i>E. Coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |

| | |
|---------------------------------|---|
| ER | endoplazmatické retikulum |
| FRET | přenos fluorescenční rezonanční energie |
| FVZ | Fakulta vojenského zdravotnictví |
| G | glycin |
| GA | Golgiho aparát |
| GGAs | Golgi-localized γ -ear-containing ARF-binding |
| GS | glutaminsyntetasa |
| H ₂ O | voda |
| HBA | počet akceptorů vodíkové vazby (hydrogen bond acceptors) |
| HBD | počet donorů vodíkové vazby (hydrogen bond donors) |
| HBH | HBA + HBD |
| HEK293 | immortalized human embryonic kidney cells |
| ChE | cholinesterasa |
| CH ₃ COOH | kyselina octová |
| CH ₃ COONa | octan sodný |
| IC ₅₀ | koncentrace inhibitoru, při níž aktivita enzymu klesne na 50 % původní aktivity |
| K _a | disociační konstanta |
| K _a D | katalytická doména |
| KH ₂ PO ₄ | dihydrogen fosforečnan draselný |
| KTVF | Katedra toxikologie a vojenského zdravotnictví |
| LB | Luria Broth médium |
| MAO-A | monoaminoxidasa A |
| MAO-B | monoaminoxidasa B |
| MeOH | methanol |
| MWHBN | deskriptor obsahující molekulovou hmotnost |

| | |
|----------------------------------|--|
| MW | molekulová hmotnost |
| NaCl | chlorid sodný |
| Na ₂ HPO ₄ | hydrogenfosforečnan sodný |
| NMDA | N-methyl-D-asparát receptor |
| NPL | nervově paralytické látky |
| PAGE | polyakrylamidový gel |
| PAS | periferní anionické místo |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| PD | prodoména |
| pKa | záporného dekadického logaritmu K _a při standardní teplotě 25°C |
| PS1 | presenilin 1 |
| PS2 | presenilin 2 |
| rpm | otáčky/min |
| r-protein | rekombinantní protein |
| S | serin |
| sAPPβ | N-terminálního fragmentu β |
| SEM | směrodatná odchylka |
| SDS | dodecylsírán sodný |
| SDS-PAGE | elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s přidavkem SDS |
| SP | signální peptidové prodoména |
| τ | tau |
| T | threonin |
| TALENs | transcription activator-like efektor nukleasy |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethyletan-1,2-diamin |
| TD | transmembránová doména |

| | |
|------|--------------------------------------|
| TPSA | topologická vrstva polárního povrchu |
| UO | Univerzita obrany |
| VLF | Vojenská lékařská fakulta |
| ZFNs | zinc finger nukleases |

9. Seznam tabulek

| | |
|--|----|
| Tab 1 Přehled inhibitorů BACE1 3. a 4. generace | 17 |
| Tab 2 - Složení 12% separačního gelu (2 mini gely), zdroj: Hejtmánková 2022 | 29 |
| Tab 3 - Složení 4% zaostřovacího gelu (2 mini gely), zdroj: (Hejtmánková 2022) | 30 |
| Tab 4 - Složení vzorkového pufru, zdroj: (Hejtmánková 2022) | 31 |
| Tab 5 – Složení elektrodového pufru, zdroj: (Hejtmánková 2022) | 31 |
| Tab 6 – Složení transfer pufru, zdroj: vlastní..... | 32 |
| Tab 7 - Složení základního 10× koncentrovaného TBS pufru o pH 7,6 | 33 |

10. Seznam obrázků

| | |
|--|----|
| Obr. 1 Neamyloidogenní a amyloidogenní štěpení amyloidového prekurzorového proteinu | 12 |
| Obr. 2 Struktura a domény BACE1 (A), krystalická struktura (B)..... | 15 |
| Obr. 3 Expresní systémy výhody a nevýhody, (<i>zdroj:</i> (Hejtmánková 2022))..... | 20 |
| Obr. 4 Western blot analýza purifikované BACE1 | 38 |
| Obr. 5 Struktury testovaných inhibitorů BACE1 první část | 39 |
| Obr. 6 Struktury testovaných inhibitorů BACE1 druhá část..... | 40 |
| Obr. 7 Struktura Verubecestatu..... | 40 |
| Obr. 8 Inhibiční účinek různých koncentrací inhibitoru K1142 na β -sekretasu 1 (BACE1)..... | 42 |
| Obr. 9 Inhibiční účinek různých koncentrací Verubecestatu na K1142 na β -sekretasu 1 (BACE1) | 43 |
| Obr. 10 BBB skóre: nabývá hodnot 0-6 a udává šanci v % na prostup léčiva přes hematoencefalickou bariéru (BBB), <i>zdroj:</i> (Gupta et al. 2019)..... | 48 |

11. Použitá literatura

ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2016. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia* [online]. **12**(4), 459–509. ISSN 1552-5279. Dostupné z: doi:10.1016/j.jalz.2016.03.001

ALZHEIMERS.ORG.UK, 2024. *FDA approves new Alzheimer's disease drug donanemab in the US | Alzheimer's Society* [online] [vid. 2024-08-06]. Dostupné z: <https://www.alzheimers.org.uk/news/2024-07-03/fda-approves-new-alzheimers-disease-drug-donanemab-us>

BEYGMORADI, A., A. HOMA EI, R. HEMMATI a P. FERNANDES, 2023. Recombinant protein expression: Challenges in production and folding related matters. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. **233**, 123407. ISSN 0141-8130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.123407

BREIJYEH, Z. a R. KARAMAN, 2020. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)* [online]. **25**(24), 5789. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25245789

CACICEDO, M. L., R. M. MANZO, S. MUNICOY, H. L. BONAZZA, G. A. ISLAN, M. ALI, M. BELLINO, E. J. MAMMARELLA a G. R. CASTRO, 2019. Chapter 7 - Immobilized Enzymes and Their Applications. In: R. S. SINGH, R. R. SINGHANIA, A. PANDEY a Ch. LARROCHE, ed. *Advances in Enzyme Technology* [online]. B.m.: Elsevier, Biomass, Biofuels, Biochemicals, s. 169–200 [vid. 2024-05-06]. ISBN 978-0-444-64114-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-64114-4.00007-8

CAPELL, A., H. STEINER, M. WILLEM, H. KAISER, C. MEYER, J. WALTER, S. LAMMICH, G. MULHAUP a C. HAASS, 2000. Maturation and pro-peptide cleavage of beta-secretase. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **275**(40), 30849–30854. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M003202200

COLE, S. L. a R. VASSAR, 2008. BACE1 structure and function in health and Alzheimer's disease. *Current Alzheimer Research* [online]. **5**(2), 100–120. ISSN 1567-2050. Dostupné z: doi:10.2174/156720508783954758

DAS, B. a R. YAN, 2019. A Close Look at BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *CNS drugs* [online]. **33**(3), 251–263. ISSN 1179-1934. Dostupné z: doi:10.1007/s40263-019-00613-7

ESPAY, A. J., K. P. KEPP a K. HERRUP, 2024. Lecanemab and Donanemab as Therapies for Alzheimer's Disease: An Illustrated Perspective on the Data. *eNeuro* [online]. **11**(7), ENEURO.0319-23.2024. ISSN 2373-2822. Dostupné z: doi:10.1523/ENEURO.0319-23.2024

FERREIRA-VIEIRA, T. H., I. M. GUIMARAES, F. R. SILVA a F. M. RIBEIRO, 2016. Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Current Neuropharmacology*. **14**(1), 101–115.

FRANCIS, P. T., A. M. PALMER, M. SNAPE a G. 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

GEISLER, Ch., H. MABASHI-ASAZUMA a D. L. JARVIS, 2015. An Overview and History of Glyco-Engineering in Insect Expression Systems. In: A. CASTILHO, ed. *Glyco-Engineering: Methods and Protocols* [online]. New York, NY: Springer, Methods in Molecular Biology, s. 131–152 [vid. 2021-08-01]. ISBN 978-1-4939-2760-9. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-2760-9_10

GHOSH, A. K., 2024. BACE1 inhibitor drugs for the treatment of Alzheimer's disease: Lessons learned, challenges to overcome, and future prospects†. *Global Health & Medicine* [online]. **6**(3), 164–168. ISSN 2434-9194. Dostupné z: doi:10.35772/ghm.2024.01033

GUPTA, M., H. J. LEE, Ch. J. BARDEN a D. F. WEAVER, 2019. The Blood–Brain Barrier (BBB) Score. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **62**(21), 9824–9836. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01220

HAMPEL, H., R. VASSAR, B. DE STROOPER, J. HARDY, M. WILLEM, N. SINGH, J. ZHOU, R. YAN, E. VANMECHELEN, A. DE VOS, R. NISTICÒ, M. CORBO, B. P. IMBIMBO, J. STREFFER, I. VOYTYUK, M. TIMMERS, A. A. TAHAMI MONFARED, M. IRIZARRY, B. ALBALA, A. KOYAMA, N. WATANABE, T. KIMURA, L. YARENIS, S. LISTA, L. KRAMER a A. VERGALLO, 2021. The β -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. *Biological Psychiatry* [online]. **89**(8), 745–756. ISSN 1873-2402. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopsych.2020.02.001

HEJTMÁNKOVÁ, B., 2022. Validace purifikace enzymu acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy [online]. [vid. 2024-01-31]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/174702>

HEPNAROVA, V., J. KORABECNY, L. MATOUSKOVA, P. JOST, L. MUCKOVA, M. 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. KUČA 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

HOLSINGER, R. M. D., N. GOENSE, J. BOHORQUEZ a P. 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, M., J. PEJCHAL, T. KUCERA, D. JUN, M. SCHMIDT a O. SOUKUP, 2020. *Is It the Twilight of BACE1 Inhibitors?* - PubMed [online] [vid. 2023-11-14]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32359337/>

HUR, J-Y, 2022. γ -Secretase in Alzheimer's disease. *Experimental & Molecular Medicine* [online]. **54**(4), 433–446. ISSN 2092-6413. Dostupné z: doi:10.1038/s12276-022-00754-8

KALKAN, A. K., F. PALAZ, S. SOFIJA, N. ELMOUSA, Y. LEDEZMA, E. CACHAT a L. RIOS-SOLIS, 2023. Improving recombinant protein production in CHO cells using the CRISPR-Cas system. *Biotechnology Advances* [online]. **64**, 108115. ISSN 1873-1899. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2023.108115

KENNEDY, M. E., A. W. STAMFORD, X. CHEN, K. COX, Jared N. CUMMING, M. F. DOCKENDORF, M. ALI, L. ERESHEFSKY, R. A. HODGSON, L. A. HYDE, S. JHEE, H. J. KLEIJN, R. KUVELKAR, W. LI, B. A. MATTSON, H. MEI, J. PALCZA, J. D. SCOTT, M. TANEN, M. D. TROYER, J. L. TSENG, J. A. STONE, E. M. PARKER a M. 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. ISSN 1946-6242. Dostupné z: doi:10.1126/scitranslmed.aad9704

KHAN, S., K. H. BARVE a M. S. KUMAR, 2020. Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology* [online]. **18**(11), 1106–1125. ISSN 1875-6190. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X18666200528142429

KHOW, O. a S. SUNTRARACHUN, 2012. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* [online]. **2**(2), 159–162. ISSN 2221-1691. Dostupné z: doi:10.1016/S2221-1691(11)60213-X

LI, F., Z. M WANG, J. J WU, J. WANG, S. S XIE, J. S LAN, W. XU, L. Y KONG a X. B WANG, 2016. Synthesis and pharmacological evaluation of donepezil-based agents as new cholinesterase/monoamine oxidase inhibitors for the potential application against Alzheimer's disease. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. **31**(sup3), 41–53. ISSN 1475-6366, 1475-6374. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2016.1201814

LONG, J., F. QIN, J. LUO, G. ZHONG, S. HUANG, L. JING, T. YI, J. LIU a N. JIANG, 2024. Design, synthesis, and biological evaluation of novel capsaicin-tacrine hybrids as multi-target agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Bioorganic Chemistry* [online]. **143**, 107026. ISSN 0045-2068. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2023.107026

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. ISSN 0379-0355. Dostupné z: doi:10.1358/mf.2000.22.8.701373

OLAZARÁN, J., C. CARNERO-PARDO, J. FORTEA, P. SÁNCHEZ-JUAN, G. GARCÍA-RIBAS, F. VIÑUELA, P. MARTÍNEZ-LAGE a M. BOADA, 2023. Prevalence of treated patients with Alzheimer's disease: current trends and COVID-19

impact. *Alzheimer's Research & Therapy* [online]. **15**(1), 130. ISSN 1758-9193. Dostupné z: doi:10.1186/s13195-023-01271-0

PASSERI, E., K. ELKHOURY, M. MORSINK, K. BROERSEN, M. LINDER, A. TAMAYOL, C. MALAPLATE, F. T. YEN a E. ARAB-TEHRANY, 2022. Alzheimer's Disease: Treatment Strategies and Their Limitations. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **23**(22), 13954. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms232213954

PATOČKA, J., K. KUČA a D. 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

PEREIRA, C. D., F. MARTINS, J. WILTFANG, O. A. B. DA CRUZ E SILVA a S. REBELO, 2018. ABC Transporters Are Key Players in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* [online]. **61**(2), 463–485. ISSN 1875-8908. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-170639

PERNECZKY, R., G. DOM, A. CHAN, P. FALKAI a C. BASSETTI, 2024. Anti-amyloid antibody treatments for Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology* [online]. **31**(2), e16049. ISSN 1468-1331. Dostupné z: doi:10.1111/ene.16049

PRATSCH, K., Ch. UNEMURA, M. ITO, S. F. LICHTENTHALER, N. HORIGUCHI a J. HERMS, 2023. New Highly Selective BACE1 Inhibitors and Their Effects on Dendritic Spine Density In Vivo. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **24**(15), 12283. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms241512283

PUNDIR, Ch. S. a N. CHAUHAN, 2012. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: a review. *Analytical Biochemistry* [online]. **429**(1), 19–31. ISSN 1096-0309. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2012.06.025

SELKOE, D. J a J. 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

SHIREY, J. K., A. E. BRADY, P. J. JONES, A. A. DAVIS, T. M. COX, J. P. KENNEDY, S. B. JADHAV, U. N. MENON, Z. XIANG, M. L. WATSON, E. P. CHRISTIAN, J. J. DOHERTY, M. C. QUIRK, D. H. SNYDER, J. J. LAH, A. I. LEVEY, M. M. NICOLLE, C. W. LINDSLEY a P. J. CONN, 2009. A selective allosteric potentiator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor increases activity of medial prefrontal cortical neurons and restores impairments in reversal learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* [online]. **29**(45), 14271–14286. ISSN 1529-2401. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3930-09.2009

SHELTERS, P., B. DE STROOPER, M. KIVIPELTO, H. HOLSTEGE, G. CHÉTELAT, Ch. E. TEUNISSEN, J. CUMMINGS a W. M. VAN DER FLIER, 2021. Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)* [online]. **397**(10284), 1577–1590. ISSN 1474-547X. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(20)32205-4

SINO BIOLOGICAL, 2024. *BACE1 Research Reagents | Sino Biological* [online] [vid. 2024-08-12]. Dostupné z: <https://www.sinobiological.com/category/bace1>

SORIA LOPEZ, J. A., H. M. GONZÁLEZ a G. C. LÉGER, 2019. Alzheimer's disease. *Handbook of Clinical Neurology* [online]. **167**, 231–255. ISSN 0072-9752. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-804766-8.00013-3

SVOBODOVA, B., L. PULKRABKOVA, D. PANEK, A. MISIACHNA, M. KOLCHEVA, R. ANDRYS, J. HANDL, J. CAPEK, P. NYVLTOVA, T. ROUSAR, L. PRCHAL, V. HEPNAROVA, M. HRABINOVA, L. MUCKOVA, D. TOSNEROVA, G. KARABANOVICH, V. FINGER, O. SOUKUP, M. HORAK a J. KORABECNY, 2023. Structure-Guided Design of N-Methylpropargylamino-Quinazoline Derivatives as Multipotent Agents for the Treatment of Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **24**(11), 9124. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms24119124

TARIF, A. M. M., H. HUHE a M. OHNO, 2024. Combination strategy employing BACE1 inhibitor and memantine to boost cognitive benefits in Alzheimer's disease therapy. *Psychopharmacology* [online]. [vid. 2024-02-02]. ISSN 1432-2072. Dostupné z: doi:10.1007/s00213-024-06525-9

TAYLOR, H. A., L. PRZEMYLSKA, E. M. CLAVANE a P. J. MEAKIN, 2022. BACE1: More than just a β -secretase. *Obesity Reviews* [online]. **23**(7), e13430. ISSN 1467-7881. Dostupné z: doi:10.1111/obr.13430

THE SCIENCE SNAIL, 2019. *The difference between Ki, Kd, IC50, and EC50 values - The Science Snail* [online] [vid. 2024-08-14]. Dostupné z: <https://www.sciencesnail.com/science/the-difference-between-ki-kd-ic50-and-ec50-values>

TIHANYI, B. a L. NYITRAY, 2020. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies* [online]. **38**, 25–34. ISSN 1740-6749. Dostupné z: doi:10.1016/j.ddtec.2021.02.003

TOBORE, O., 2019. On the Etiopathogenesis and Pathophysiology of Alzheimer's Disease: A Comprehensive Theoretical Review. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. **68**(2), 417–437. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-181052

TOCRIS.COM, 2024. Verubecestat Supplier | CAS 1286770-55-5. *Tocris Bioscience* [online] [vid. 2024-08-03]. Dostupné z: https://www.tocris.com/products/verubecestat_7659

UNOB, 2021a. *O pracovišti - Katedra toxikologie a vojenské farmacie* [online] [vid. 2022-04-14]. Dostupné z: https://www.unob.cz/fvz/struktura/k304/Stranky/o_pracovisti.aspx

UNOB, 2021b. *Výzkum - Katedra toxikologie a vojenské farmacie* [online] [vid. 2022-04-14]. Dostupné z: <https://www.unob.cz/fvz/struktura/k304/Stranky/vyzkum.aspx>

- U.S. FDA, 2021. FDA's Decision to Approve New Treatment for Alzheimer's Disease. *FDA* [online]. [vid. 2024-01-10]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/our-perspective/fdas-decision-approve-new-treatment-alzheimers-disease>
- U.S. FDA, 2023. FDA Converts Novel Alzheimer's Disease Treatment to Traditional Approval. *FDA* [online]. B.m.: FDA [vid. 2024-01-10]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-converts-novel-alzheimers-disease-treatment-traditional-approval>
- VARDY, E. R. L. C., A. J. CATTO a N. 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, 1471-499X. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2005.08.004
- VASSAR, R., 2004. Bace 1: The β -secretase enzyme in alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience* [online]. **23**(1), 105–113. ISSN 1559-1166. Dostupné z: doi:10.1385/JMN:23:1-2:105
- VASSAR, R. a S. L. COLE, 2008. The Basic Biology of BACE1: A Key Therapeutic Target for Alzheimers Disease. *Current Genomics*. **8**(8), 509–530.
- VASSAR, R., D. M. KOVACS, R. YAN a P. 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* [online]. **29**(41), 12787–12794. ISSN 0270-6474. Dostupné z: doi:10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009
- WANG, H., R. LI a Yong SHEN, 2013. β -Secretase: its biology as a therapeutic target in diseases. *Trends in pharmacological sciences* [online]. **34**(4), 215–225. ISSN 0165-6147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2013.01.008
- WEBER, E. W. a M. FUSSENEGGER, 2009. Insect Cell-Based Recombinant Protein Production. In: R. EIBL, D. EIBL, R. PÖRTNER, G. CATAPANO a P. 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. 2021-08-01]. ISBN 978-3-540-68182-3. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-68182-3_6
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023. *Czechia data | World Health Organization* [online] [vid. 2023-09-27]. Dostupné z: <https://data.who.int/countries/203>
- YAN, R., 2016. Stepping closer to treating Alzheimer's disease patients with BACE1 inhibitor drugs. *Translational Neurodegeneration* [online]. **5**, 13. ISSN 2047-9158. Dostupné z: doi:10.1186/s40035-016-0061-5
- YANG, A., B. KANTOR a O. CHIBA-FALEK, 2021. APOE: The New Frontier in the Development of a Therapeutic Target towards Precision Medicine in Late-Onset Alzheimer's. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **22**(3), 1244. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22031244

YEAP, Y. J., N. KANDIAH, D. NIZETIC a K-L LIM, 2023. BACE2: A Promising Neuroprotective Candidate for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* [online]. **94**(s1), S159–S171. ISSN 1875-8908. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-220867

ZENARO, E., G. PIACENTINO a G. CONSTANTIN, 2017. The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* [online]. **107**, 41–56. ISSN 0969-9961. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbd.2016.07.007

ZHANG, C., A. BROWNE, J. R. DIVITO, J. A. STEVENSON, D. ROMANO, Y. DONG, Z. XIE a R. E. TANZI, 2010. Amyloid- β Production Via Cleavage of Amyloid- β Protein Precursor is Modulated by Cell Density. *Journal of Alzheimer's Disease* [online]. **22**(2), 683–984. ISSN 1387-2877. Dostupné z: doi:10.3233/JAD-2010-100816

ZHANG, X., Y. LI, H. XU a Y-W ZHANG, 2014. The γ -secretase complex: from structure to function. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. **8** [vid. 2023-10-31]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2014.00427>

ZHAO, H., X. ZHOU a Y. H ZHOU, 2020. Hepatitis B vaccine development and implementation. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* [online]. **16**(7), 1533–1544. ISSN 2164-5515. Dostupné z: doi:10.1080/21645515.2020.1732166

12. Použité obrázky

HEJTMÁNKOVÁ, B., 2022. Validace purifikace enzymu acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy [online]. [vid. 2024-01-31]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/174702>

GUPTA, M., H. J. LEE, Ch. J. BARDEN a D. F. WEAVER, 2019. The Blood–Brain Barrier (BBB) Score. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. **62**(21), 9824–9836. ISSN 0022-2623. Dostupné z: [doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01220](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01220)