

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra Biologie

Příprava rekombinantních monoaminoxidáz

Bakalářská práce

Autor:	Kateřina Vašová
Studijní program:	B1501
Studijní obor:	Systematická biologie a ekologie
Vedoucí práce:	Mgr. Monika Schmidt, Ph.D.

Hradec Králové

červen 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Kateřina Vašová

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí mé práce paní Mgr. Monice Schmidt, Ph.D. za její vstřícnost, trpělivost a cenné rady při práci v laboratoři. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Mgr. Lucii Vinklářové za pomoc s ověřením správnosti výsledků.

Anotace česky

VAŠOVÁ, K. *Příprava rekombinantních monoaminoxidáz*. Hradec Králové, 2019. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Monika Schmidt. 55 s.

Enzym monoaminoxidáza (MAO) je enzym lokalizovaný na vnější membráně mitochondrií. Tento enzym je rozdělen do dvou izomerních forem monoaminoxidáza typu A (MAO A) a monoaminoxidáza typu B (MAO B). MAO působí jako katalyzátor metabolismu neurotransmitterových aminů serotoninu, norepinefrinu a dopaminu. Inhibitory MAO A se používají při léčbě deprese, zatímco inhibitory MAO B jsou užitečné k léčbě Parkinsonovy choroby. U tohoto neurodegenerativního onemocnění není známá přesná příčina vzniku.

Rekombinantní enzymy MAO A a MAO B byly připraveny pomocí metod molekulární biologie. Genetická informace enzymů MAO A a MAO B byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a vložena do sekvenačního vektoru pCR4TOPO. Transformace byla provedena metodou teplotního šoku. Genetická informace byla dále subklonována do expresního vektoru pET28b a vzniklý expresní plazmid byl transformován do expresního kmene bakterií *Escherichia coli* BL21 (DE3). Takto připravený expresní kmen nesoucí DNA kódující enzymy MAO A a MAO B je vhodný pro výrobu rekombinantních proteinů.

Klíčová slova

MAO A, MAO B, Parkinsonova choroba, rekombinantní enzym, expresní systém

Anotace anglicky

VAŠOVÁ, K. Preparation of recombinant monoamine oxidases. Hradec Králové, 2015. Bachelor Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Monika Schmidt. 55 p.

Enzyme monoamine oxidase (MAO) is an enzyme located on the outer membrane of mitochondria. This enzyme is divided into two isomeric forms of monoamine oxidase type A (MAO A) and monoamine oxidase type B (MAO B). MAO acts as a catalyst for the metabolism of neurotransmitter amines of serotonin, norepinephrine and dopamine. MAO A is used in the treatment of depression, while MAO B inhibitors are useful for the treatment of Parkinson's disease. The cause of this transmission is not known in this neurodegenerative disease.

Recombinant enzymes MAO A and MAO B were prepared using molecular biology methods. The genetic information of MAO A and MAO B enzymes was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and inserted into the pCR4TOPO sequencing vector. The transformation was performed by the method of thermal shock. The genetic information was further subcloned into the pET28b expression vector and the resulting expression plasmid was transformed into an Escherichia coli expression strain BL21 (DE3). The expression strain thus prepared carrying DNA encoding MAO A and MAO B enzymes is suitable for the production of recombinant proteins.

Keywords

MAO A, MAO B, Parkinson's disease, recombinant enzyme, expression system

Obsah

1 Úvod práce.....	8
2 Teoretická část.....	9
2.1 Enzymy MAO A a MAO B.....	9
2.1.1 MAO A.....	9
2.1.2 MAO B.....	9
2.2 Geny MAO A a MAO B.....	10
2.3 Struktura proteinu MAO A a MAO B.....	10
2.4 Role MAO v organismu.....	12
2.4.1 Funkce MAO v lidském mozku.....	13
2.5 Patologie.....	19
2.5.1 První použití v medicíně.....	19
2.5.2 Inhibitory MAO.....	19
2.5.3 MAO B a Parkinsonova choroba.....	20
2.5.4 Další onemocnění a poruchy způsobené problémy s MAO.....	21
2.6 Rekombinantní proteiny.....	22
2.6.1 Expresní vektory.....	22
2.6.2 Bakteriální expresní systémy.....	22
2.6.3 Další druhy expresních systémů.....	23
3 Cíl práce.....	26
4 Experimentální část.....	27
4.1 Použitý materiál.....	27
4.1.1 Chemikálie.....	27
4.1.2 Biologický materiál.....	27
4.1.3 Kity.....	27
4.1.4 Enzymy.....	28
4.1.5 Přístroje.....	28

4.2 PCR genu MAO A a MAO B.....	29
4.2.1 Návrh sekvence primerů.....	29
4.3 Agarózová gelová elektroforéza	31
4.4 Izolace DNA z gelu.....	32
4.5 TA klonování.....	33
4.5.1 Transformace plazmidu pCR4TOPO do <i>E. coli</i> NEB Turbo.....	33
4.6 Odpich kolonií.....	34
4.7 PCR na koloniích.....	34
4.8 Rozmnožení bakteriálních kolonií	35
4.9 Izolace plazmidové DNA.....	35
4.10 Restrikční štěpení.....	36
4.11 Ligace vektoru a insertu	37
4.12 Příprava chemokompetentních buněk BL21 (DE3).....	39
4.13 Transformace do buněk <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	39
5 Výsledky a diskuse.....	40
5.1 Amplifikace genů MAO A a MAO B metodou PCR.....	40
5.1.1 Amplifikace metodou PCR.....	40
5.1.2 PCR na koloniích pCR4TOPO.....	41
5.1.3 Koncentrace a čistota plazmidové DNA.....	42
5.2 Restrikční štěpení a ligace MAO A a MAO B	43
5.3 Analýza vložení MAO A a MAO B do vektoru pET28b.....	44
5.4 Tvorba expresního kmene <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	46
5.5 Ověření výsledků.....	48
6 Závěr.....	49
7 Seznam použité literatury.....	50

1 Úvod práce

MAO A a MAO B jsou mitochondriální enzymy, které se podílejí na metabolizaci neurotransmiterních aminů jako jsou například serotonin norepinefrin a dopamin a tudíž je jejich funkce v lidském mozku nezbytná. Oba enzymy našly využití také v medicíně. Inhibitory MAO A byly používány při léčbě deprese. Inhibitory MAO B se používají jako jeden ze způsobů léčby Parkinsonovy choroby.

Bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*) je jedním z nejvíce používaných hostitelských organismů pro produkci rekombinantních proteinů. Mezi další organismy používané k expresi patří pekařská kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* dále potom hmyzí, savčí, ale i rostlinné expresní systémy.

MAO A a MAO B jsou targety pro léčbu onemocnění, konkrétně MAO A pro léčbu deprese a MAO B pro léčbu Parkinsonovy choroby. Výzkum inhibitorů MAO by mohl být budoucností léčby těchto chorob, a pro výzkum na tomto poli je nezbytné získat enzymy v rekombinantní formě. Tyto rekombinantní enzymy budou sloužit pro analýzu nových látek jako potenciálních inhibitorů.

2 Teoretická část

2.1 Enzymy MAO A a MAO B

Monoaminoxidáza A (MAO A) a monoaminoxidáza B (MAO B) patří do rodiny enzymů aminooxidáz. Lidské aminooxidázy jsou třídou enzymů zahrnující dvě podtřídy: flavin obsahující monoaminoxidázu (MAO, EC 1.4.3.4) a měď obsahující semikarbazid-senzitivní aminooxidázu (SSAO, EC 1.4.3.6) (Tipton, 2012).

Enzym monoaminoxidáza byl poprvé popsána roku 1928 pod názvem tyramin oxidáza (Hare, 1928). Další názvy tohoto enzymu byly noradrenalin oxidáza či alifatická aminooxidáza. Později bylo zjištěno, že se ve všech případech jedná o stejný enzym schopný metabolizovat primární, sekundární a terciární aminy, který dostal název MAO. Enzym existuje ve dvou izomerních formách MAO A a MAO B (Youdim & Bakhle, 2006). Enzymy mají podobné struktury a molekulové hmotnosti, liší se selektivitou k substrátu a inhibitory (Finberg, 2014).

Enzym MAO je umístěný ve vnější membráně mitochondrie, konkrétně na cytoplazmatické straně membrány (Denney & Denney, 1985; Edmondson et al., 2009). MAO A a MAO B se nacházejí v periferních orgánech a v CNS v neuronech a astroglích (Binda et al., 2005; Ryan & Carrol, 1976; Sims et al., 1989; Son et al., 2008).

2.1.1 MAO A

V centrálním nervovém systému se MAO A vyskytuje především v serotoninergních neuronech. Další důležitá místa výskytu MAO A mimo CNS, jsou játra, plicní cévní endotel a gastrointestinální trakt, kde plní ochrannou funkci především ve střevě. Také se vyskytuje v placentě (Ramsay & Albreht, 2018).

2.1.2 MAO B

V CNS převládá MAO B v serotoninergních neuronech. MAO B má také ochrannou funkci v játrech a v krevních destičkách (Ramsay & Albreht, 2018).

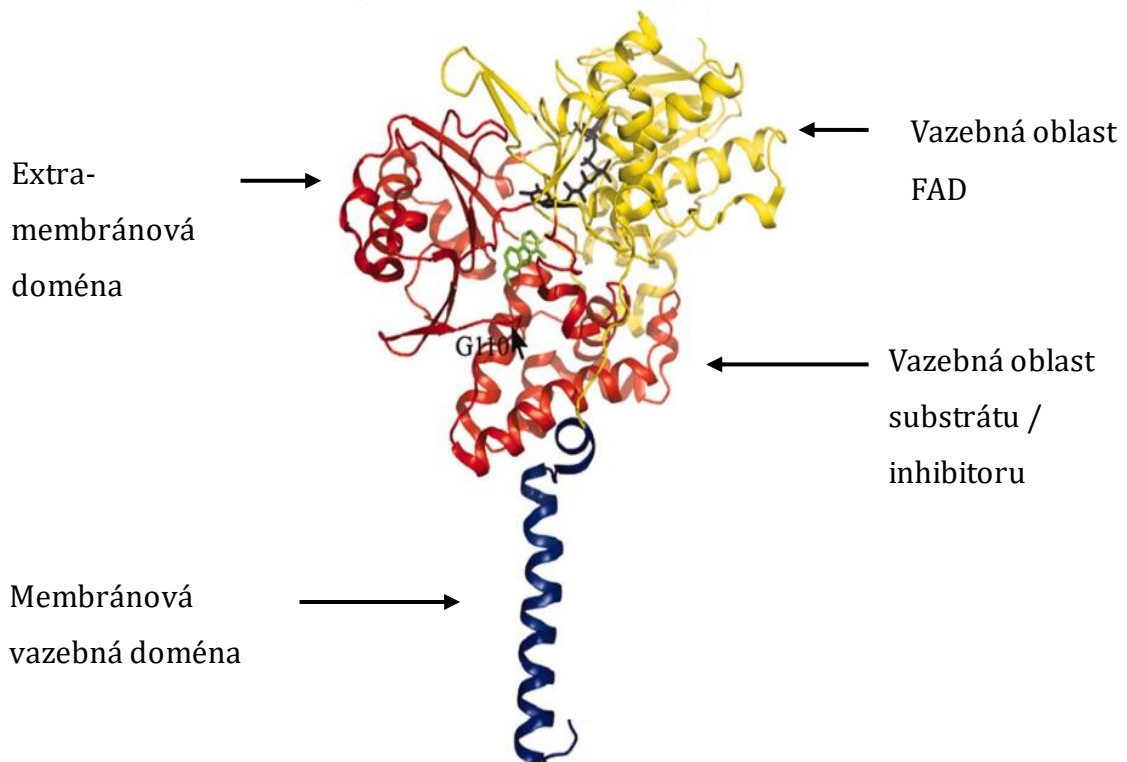
2.2 Geny MAO A a MAO B

Každý MAO izomer je kódován samostatným genem lokalizovaným na X chromozomu (Finberg, 2014), přesněji na krátkém raménku p v oblasti Xp11.23-11.4 (Levy et al., 1989). Geny pro proteiny MAO A a MAO B jsou si podobné a oba enzymy mají 90 % shodu v aminokyselinových sekvencích (Andrés et al., 2004).

Velikost genu MAO A je 1491 bp, jeho molekulová hmotnost je $6\ 0512 \pm 6$ Da a obsahuje 16 exonů. Velikost genu MAO B je 1467 bp, jeho molekulová hmotnost je $59\ 474 \pm 14,0$ Da a obsahuje 18 exonů (Li, Hubálek, Newton-Vinson, & Edmondson, 2002; Qian et al., 2010; Weizmann Institute of Science, 1996-2019).

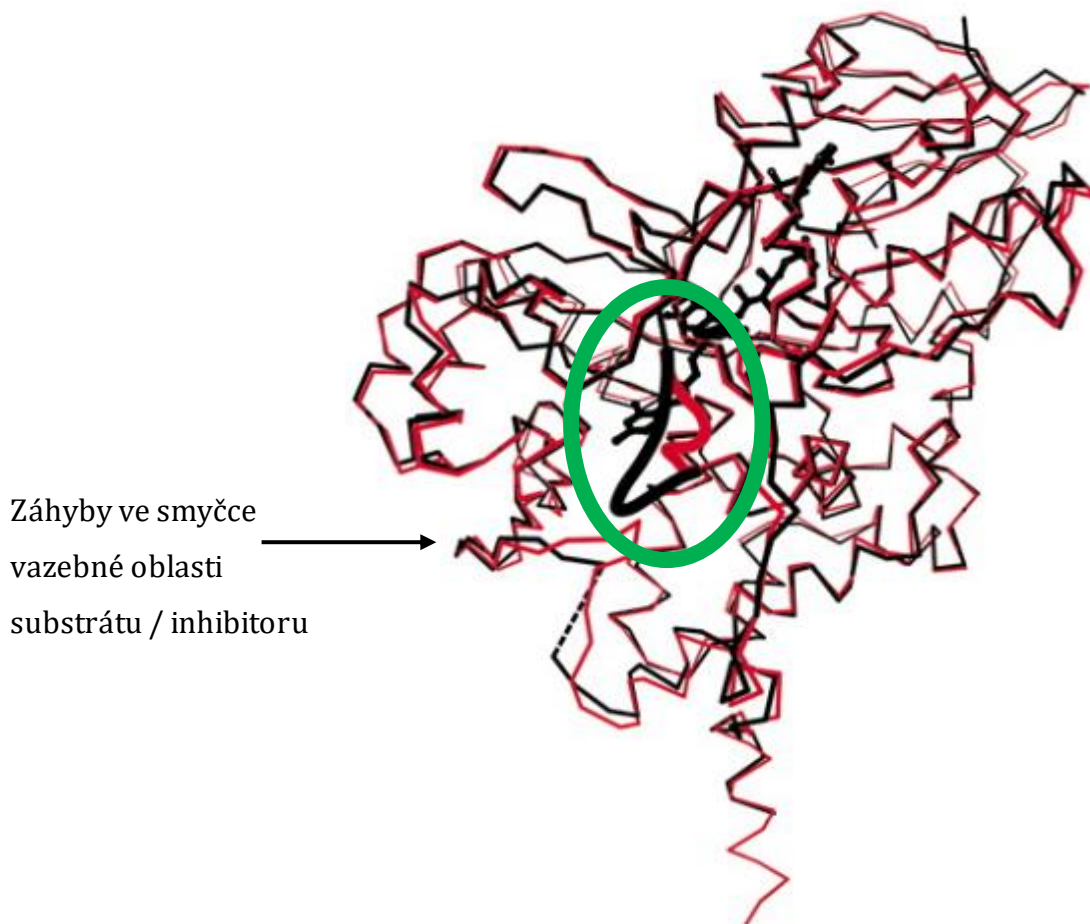
2.3 Struktura proteinu MAO A a MAO B

Protein MAO A je velký 527 aminokyselin, protein MAO B je velký 520 aminokyselin, jejich struktura je velmi podobná a můžeme ji rozdělit na dvě hlavní části: Extra-membránovou doménu a membránovou vazebnou doménu. Extra-membránovou doménu lze rozdělit dále na dvě oblasti, vazebnou oblast flavinadenin dinukleotidu (FAD) a vazebnou oblast substrátu nebo známých inhibitorů (Obr. 1) (Binda et al., 2003; De Colibus et al., 2005; Son et al., 2008). Enzymaticky aktivní kvartérní struktura MAO je monomer (Binda et al., 2005; Weizmann Institute of Science, 1996-2019).



Obrázek č. 1: Struktura proteinu MAO. Modře je znázorněná membránová vazebná doména, červeně extra-membránová doména a žlutě vazebná oblast FAD (upraveno z Son et al., 2008).

Rozdíly ve struktuře MAO A a MAO B jsou viditelné z Obrázku č 2. MAO A a MAO B se liší strukturním uspořádáním vazebné oblasti pro substrát a inhibitor. Porovnáním krystalových struktur obou proteinů bylo možné nalézt drobné strukturní rozdíly, díky kterým je možné nalézt specifické reverzibilní inhibitory pro každý z enzymů. Biochemicky nejrozšířenější specifické inhibitory MAO jsou klogylin a deprenyl. Změny ve struktuře dutiny aktivního místa ukazují specifitu klogylinu pro MAO A a deprenylu pro MAO B (Binda et al., 2005; Johnston, 1968). Dalším rozdílem mezi jednotlivými izoformami je rozdílné pH optimum a citlivost na tepelnou inaktivaci (Youdim & Bakhle, 2006).



Obrázek č 2: Rozdíl ve struktuře MAO A (černá) a MAO B (červená) je nejlépe pozorovatelný v zeleném oválu, kde jsou vyznačeny rozdílné záhyby ve smyčce vazebné oblasti substrátu / inhibitoru (upraveno z Binda et al., 2005).

2.4 Role MAO v organismu

Metabolickou aktivitou enzymu je hlavně schopnost deaminovat primární, sekundární a terciární aminy na odpovídající aldehyd, primární amin a peroxid vodíku. Aldehyd se rychle metabolizuje aldehyddehydrogenázou na kyselý metabolit. Právě tyto kyselý metabolity, jako jsou například kyselina 5-hydroxyindol-octová (5-HIAA) z 5-hydroxytryptaminu (5-HT, serotonin) nebo kyselina dihydroxyfenyloctová (DOPAC) z dopaminu, se běžně používají jako měřítko aktivity MAO enzymů *in vitro* nebo *in vivo* (Youdim & Bakhle, 2006).

Oba enzymy MAO A a MAO B katalyzují oxidaci neurotransmiterů serotoninu, dopaminu, norepinefrinu a tyraminu. Specifické substráty pro MAO A jsou noradrenalin a serotonin. Specifické substráty pro MAO B jsou fenylethylamin a benzylamin (Edmondson et al., 2009; Johnston, 1968; Youdim & Bakhle, 2006).

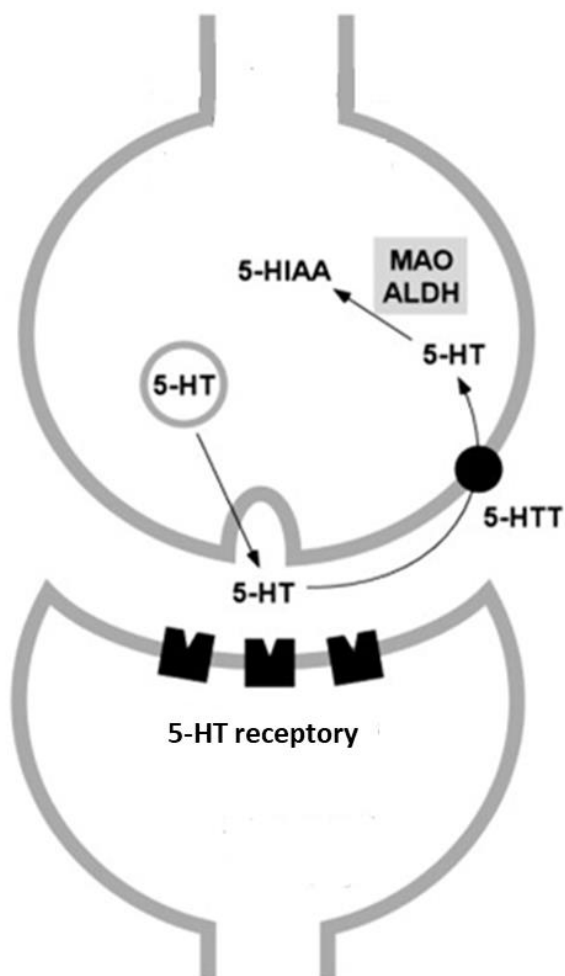
2.4.1 Funkce MAO v lidském mozku

Monoaminoxidáza MAO je enzym vázaný na mitochondrii, který katalyzuje oxidační deaminaci aminů, monoaminových neurotransmiterů a hormonů. Právě rychlá degradace mozkových monoaminů jako je serotonin, norepinefrin a dopamin je důležitá pro správné fungování synaptické štěrbiny neurotransmise. Monoaminergní signalizace je jedním z klíčových mechanismů modulace nálady a emocí, stejně jako i kontroly motorických, percepčních a kognitivních funkcí (Bortolato et al., 2008).

Zpracování serotoninu probíhá v neuronové synapsi (Obr. 3). Po uvolnění a aktivaci serotoninového receptoru a zpětném vychytávání 5-HT transportérem (5-HTT), je serotonin degradován MAO a aldehyddehydrogenázou (ALDH) na kyselinu 5-hydroxyindol-3-octovou (5-HIAA) (Bortolato et al., 2008).

Serotonergní
presynaptický
neuron

Postsynaptický
neuron



Obrázek č. 3: Zpracování serotoninu v neuronové synapsi. Serotonin (5-HT) uvolní a aktivuje 5-HT receptor, poté je zpětně vychytáván 5-HT transportérem (5-HTT). MAO a aldehyddehydrogenáza (ALDH) degradují serotonin na kyselinu 5-hydroxyindol-3-octovou (5-HIAA) (upraveno z Bortolato et al, 2008).

Synaptické zpracování norepinefrinu (NE) v neurosynapsi probíhá ve třech metabolických drahách (Obr. 4). Po uvolnění a aktivaci NE receptoru a zpětném vychytávání NE transportérem (NET) je norepinefrin degradován (Bortolato et al., 2008).

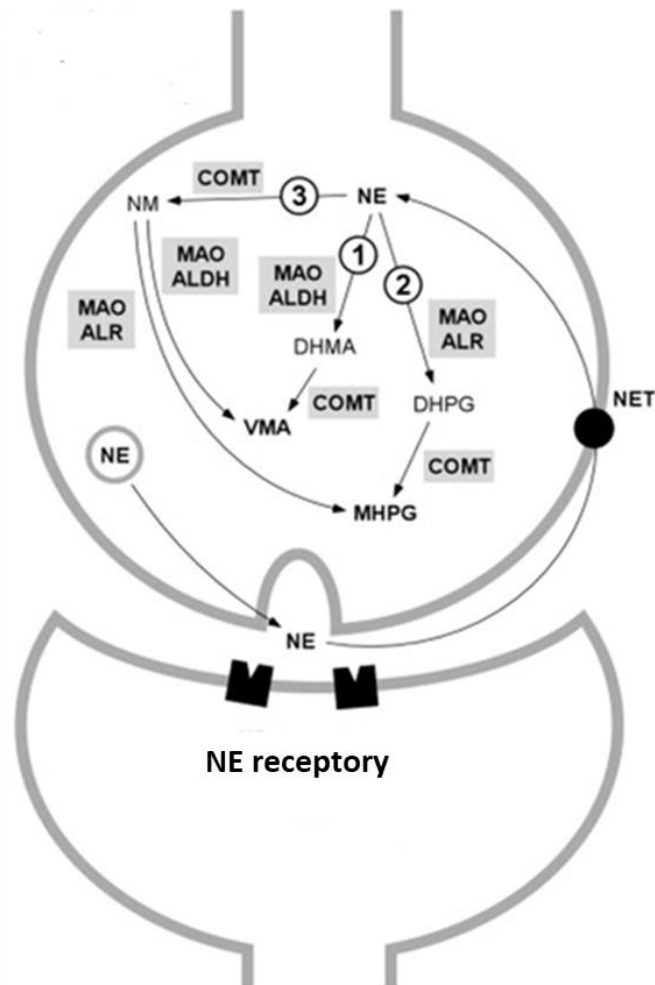
V první dráze MAO a aldehyddehydrogenáza přeměňují norepinefrin na kyselinu 3,4-dihydroxymandlovou (DHMA), tato sloučenina je zpracována katechol-O-methyltransferázou (COMT) na kyselinu vanillylmandlovou (VMA) (Bortolato et al., 2008).

Ve druhé dráze MAO a aldehydreduktáza (ALR) přeměňují norepinefrin na 3,4-dihydroxyfenylglykol (DHPG), který je dále degradován katechol-O-methyltransferázou (COMT) na 3-methoxy-4-hydroxyfenylglykol (MHPG) (Bortolato et al., 2008).

Ve třetí metabolické dráze katechol-O-methyltransferáza (COMT) metabolizuje norepinefrin na normetanefrin (NM). Normetanefrin je buď přeměněn MAO a aldehydreduktázou na 3-methoxy-4-hydroxyfenylglykol (MHPG) nebo MAO a aldehyddehydrogenázou na kyselinu vanillylmandlovou (VMA) (Bortolato et al., 2008).

Noradrenergní
presynaptický
neuron

Postsynaptický
neuron



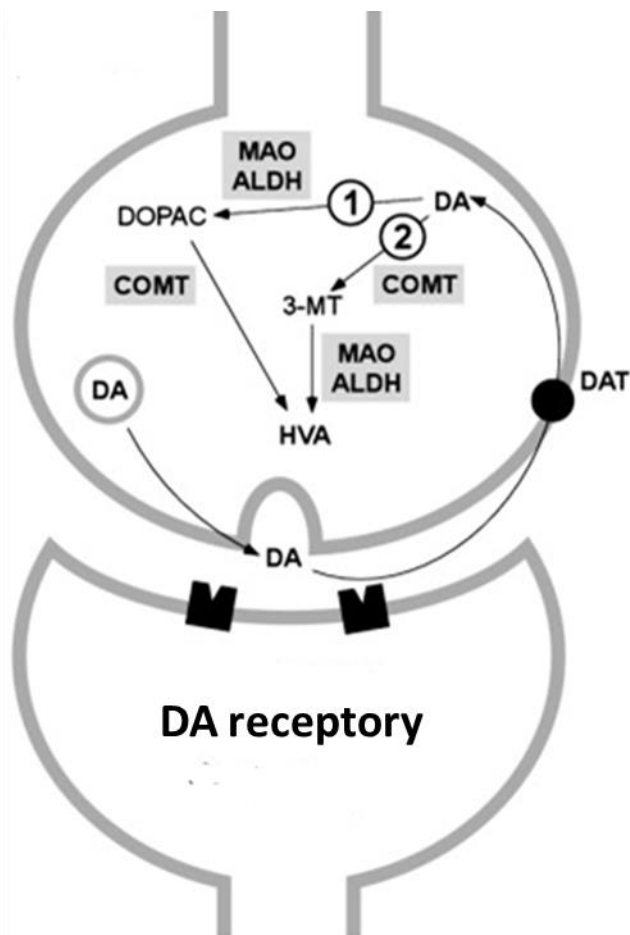
Obrázek č 4: Zpracování norepinefrinu v neuronové synapsi. Norepinefrin (NE) uvolní a aktivuje NE receptor, poté je zpětně vychytáván NE transportérem (NET). Norepinefrin je degradován třemi hlavními enzymatickými cestami. 1. MAO a aldehyddehydrogenáza (ALDH) přeměňují norepinefrin na kyselinu 3,4-dihydroxymandlovou (DHMA). DHMA je zpracována katechol-O-methyltransferázou (COMT) na kyselinu vanillylmandlovou (VMA). 2. MAO a aldehydreduktáza (ALR) přeměňují norepinefrin na 3,4-dihydroxyfenylglykol (DHPG). DHPG je degradován katechol-O-methyltransferázou (COMT) na 3-methoxy-4-hydroxyfenylglykol (MHPG). 3. Katechol-O-methyltransferáza (COMT) metabolizuje norepinefrin na normetanefrin (NM). MAO a aldehydreduktáza (ALR) přeměňují NM na 3-methoxy-4-hydroxyfenylglykol (MHPG), a MAO a aldehyddehydrogenáza (ALDH) přeměňují NM na kyselinu vanillylmandlovou (VMA) (upraveno z Bortolato et al., 2008).

Synaptické zpracování dopaminu (DA) v neurosynapsi probíhá ve dvou metabolických drahách (Obr. 5). Po uvolnění a aktivaci DA receptoru a zpětném vychytávání DA transportérem (DAT) je dopamin degradován (Bortolato et al., 2008).

V první metabolické dráze MAO a aldehyddehydrogenáza metabolizují dopamin na kyselinu 3,4-dihydroxyfenyloctovou (DOPAC). DOPAC je zpracován katechol-O-methyltransferázou (COMT) na kyselinu homovanilovou (HVA) (Bortolato et al., 2008).

Ve druhé dráze katechol-O-methyltransferáza (COMT) metabolizuje dopamin na 3-methoxytyramin (3-MT), který je následně přeměněn MAO a aldehyddehydrogenázou (ALDH) na kyselinu homovanilovou (HVA) (Bortolato et al., 2008).

Dopaminergní
presynaptický
neuron



Postsynaptický
neuron

Obrázek č. 5: Zpracování dopaminu v neuronové synapsi. Dopamin (DA) uvolní a aktivuje DA receptor, poté je zpětně vychytáván DA transportérem (DAT). Dopamin je degradován dvěma hlavními enzymatickými cestami. 1. MAO a aldehyddehydrogenáza (ALDH) přemění DA na kyselinu 3,4-dihydroxyfenyloctovou (DOPAC). DOPAC je zpracován katechol-*O*-methyltransferázou (COMT) na kyselinu homovanilovou (HVA). 2. COMT metabolizuje DA na 3-methoxytyramin (3-MT), který je následně přeměněn MAO a ALDH na kyselinu homovanilovou (HVA) (upraveno z Bortolato et al., 2008).

Hlavním principem těchto tří chemických reakcí, které jsou katalyzovány MAO je degradace monoaminů na odpovídající aldehyd. Aldehydy jsou pak pomocí aldehyddehydrogenázy oxidovány na karboxylové kyseliny, nebo pomocí aldehydreduktázy převedeny na alkoholy nebo glykoly. Vedlejší produkty těchto reakcí jsou například peroxid vodíku a amoniak. Tyto vedlejší produkty jsou vychytávány a metabolizovány enzymy superoxid dismutázou a katalázou.

Dysfunkce těchto enzymových systémů může být spouštěcím faktorem neurodegenerativních onemocnění, protože tyto vedlejší produkty jsou nebezpečné a mohou být neurotoxické. Například peroxid vodíku může vyvolat produkci reaktivních forem kyslíku, které způsobí mitochondriální poškození a apoptózu neuronů (Bortolato et al., 2008; Finberg & Rabey, 2016).

2.5 Patologie

2.5.1 První použití v medicíně

Bylo zjištěno, že antibiotikum isoniazid, který byl používán při léčbě tuberkulózy, je také inhibitorem MAO. Inhibice MAO vykazovala terapeutické vlastnosti při léčbě depresivních onemocnění. Inhibitorem MAO byla také příbuzná sloučenina isoniazidu, iproniazid. Iproniazid byl používán k léčbě depresivních onemocnění jako jedno z prvních antidepresiv, bohužel vykazoval jaterní toxicitu. Proto byla hledána jiná antidepresiva, která nebyla inhibitorem MAO (Youdim & Bakhle, 2006).

2.5.2 Inhibitory MAO

Inhibitory MAO brání degradaci neurotransmiterů uvnitř buňky a jsou rozdělovány podle mechanismu účinku na selektivní a neselektivní. Neselektivní inhibitory mohou inhibovat obě formy enzymu. Další členění inhibitorů je na reverzibilní a ireverzibilní. První používané inhibitory MAO působily ireverzibilně a neselektivně. Komplikace v průběhu léčby způsoboval především „sýrový efekt“, který vznikal při současné konzumaci potravin s vysokým obsahem tyraminu, jako jsou například sýry, mléčné a fermentované výrobky, víno a pivo, a inhibitorů MAO. Tento efekt se projevoval v podobě hypertenze až hypertenzní krize. Později bylo zjištěno, že „sýrový efekt“ způsobují pouze ireverzibilní inhibitory MAO A. Mezi neselektivní ireverzibilní inhibitory MAO patří tranlylcypromin a fenelzin používané jako antidepresiva (Finberg & Rabey, 2016; Youdim & Bakhle, 2006).

Ireverzibilní inhibitory jsou kovalentně vázány na enzymy, proto je jejich inhibice nevratná. Kovalentně vázaný enzym nemůže fungovat a tím je jeho aktivita blokována. Reverzibilní inhibitory MAO A jsou schopny oddělit se od enzymu. Inhibice je tedy vratná a řídí se koncentrací substrátu a inhibitoru. Reverzibilní

inhibitory MAO A v případě požití tyraminu nezpůsobují „sýrový efekt“. Klinicky využívaným reverzibilním inhibitorem MAO A je antidepressivum Moclobemid. Dalším reverzibilním inhibitorem MAO A s antidepressivními vlastnostmi je methylenová modř (Finberg & Rabey, 2016).

Selektivní inhibice MAO A vede ke zvýšeným hladinám neurotransmiteru uvnitř noradrenergního a serotonergního neuronu a má klinický antidepressivní účinek. Selektivní inhibitory MAO A jsou Clorgylin a Moclobemid (Finberg & Rabey, 2016).

Inhibice MAO B vede ke zvýšeným hladinám dopaminu. Selegilin, Rasagilin a Safinamid jsou selektivní inhibitory MAO B, které se používají především jako antiparkinsonika (Finberg & Rabey, 2016).

2.5.3 MAO B a Parkinsonova choroba

Parkinsonova nemoc je neurodegenerativní onemocnění člověka postihující především mozkový kmen a párovou strukturu středního mozku *substantia nigra*. Mohou jí ovšem být postiženy i další oblasti mozku. Onemocnění postihuje asi 0,2 % populace a začíná se projevovat kolem 58–60 let věku. (Jiráček et al., 2009; Silbernagl & Lang, 2001).

Hlavní motorické příznaky Parkinsonovy nemoci jsou třes, svalová ztuhlost, celková zpomalenost pohybu, snížení hybnosti, porucha rovnováhy a chůze. Chůze je pomalá s drobnými šouravými kroky. U pacientů také dochází k zámrzům pohybu. Typické je mírně shrbené držení těla pacientů s pokrčenými pažemi a nohama. Také se mohou objevit poruchy kognitivních funkcí, deprese, úzkost, monotónní řeč, ztráta čichu, mimiky, potíže s polykáním a mastná kůže. U 20–40 % případů se také vyskytuje demence. Pacienti mají problém řadit myšlenky do souvislostí a udržet je. Objevují se také poruchy nálad, změny osobnosti, bludy a halucinace (Jiráček et al., 2009; Roth et al., 1999).

Přesná příčina Parkinsonovy choroby není známá. Její výskyt však u pacientů může souviset s mnoha faktory, jako jsou například genetická porucha, traumata, záněty (encefalitida), porucha krevního zásobení (ateroskleróza), nádory a otravy (především CO, manganem a 1-metyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinem neboli MPTP, který se dříve používal jako náhrada heroínu) (Silbernagl & Lang, 2001).

Při Parkinsonově chorobě dochází k zániku buněk *substantia nigra*. Zánik buněk je pravděpodobně uskutečněný apoptózou z důvodu tvorby volných kyslíkových radikálů. K projevu symptomů onemocnění musí být takto zničeno 70 % buněk *substantia nigra*. Zánik buněk snižuje dopaminergní inervaci *striata*, což je oblast šedé hmoty uvnitř koncového mozku. Je utlumena činnost talamu a dochází k potlačení motoriky. Pacient začíná mít problémy s pohybem a projevují se u něj i další motorické příznaky nemoci (Silbernagl & Lang, 2001).

Jedním ze způsobů léčby Parkinsonovy choroby je podávání L-dopy (levodopa), což je prekurzor dopaminu. Odbourávání dopaminu může být také zpomalováno látkami, které tlumí MAO (inhibitory MAO) (Silbernagl & Lang, 2001). Jedním z používaných inhibitorů je selegilin, který inhibuje MAO B. Selegilin byl vyvinut pro léčbu deprese, díky tomu, že inhibuje MAO B, zabraňuje odbourávání dopaminu z mozku. Proto se tento inhibitor používá k léčbě Parkinsonovy choroby spolu s levodopou. Pro zablokování MAO B je potřebná dávka 5–10 mg Selegilinu denně. Dalším nověji používaným inhibitorem MAO B využívaným pro léčbu Parkinsonovy choroby je rasagilin, který zvyšuje hladinu dopaminu ve *striatu*. Rasagilin je také podáván spolu s levodopou, doporučená dávka rasagilinu je 1 mg denně (Roth et al., 1999; Roth et al., 2009).

2.5.4 Další onemocnění a poruchy způsobené problémy s MAO

Ztráta aktivity MAO je slučitelná s lidským životem (Sims et al., 1989). Pokud u lidí nastanou delece v genové oblasti chromozomu X, kde se vyskytují i geny pro MAO, mohou nastat velké problémy. Tato delece může u lidí způsobit vrozenou slepotu, hluchotu, mentální retardaci nebo psychózy. Delece genu pro MAO A zahrnuje ještě další symptomy, například poruchy chování, kognitivní poruchy a poruchy spánku (Berger et al., 1992; Sims et al., 1989).

Mutace v genech pro MAO A nebo pro MAO B mohou být základem pro syndromy vázané na chromozom X. Některými z klinických příznaků pozorovaných u pacientů s mutací jsou mentální retardace, autistické chování, selhání somatického růstu, abnormální pohlavní zrání, periferní autonomní dysfunkce, motorická hyperaktivita, záchvaty nebo také poruchy spánku (Sims et al., 1989).

2.6 Rekombinantní proteiny

Enzymy se vyskytují ve všech živých organismech a katalyzují biochemické reakce, které v organismech probíhají. Průmyslově se začaly enzymy vyrábět v roce 1874 pro potravinářské využití. Dánský vědec Christian Hansen extrahoval ze žaludků telat enzym rennin (chymosin), který se používal pro výrobu sýrů (Nielsen et al., 2004). Teoreticky je získání rekombinantního proteinu velmi jednoduché. Vzniká z rekombinantní DNA, což je DNA, která vznikla umělým spojením úseků DNA z různých organismů, a má schopnost replikovat se v hostitelském organismu. Tento požadovaný gen (úsek DNA) se klonuje do odpovídajícího vektoru a poté vnese do hostitelských buněk, kde se vektor namnoží. Podle místa exprese je protein vyzolován a purifikován (Rosano & Ceccarelli, 2014).

2.6.1 Expresní vektory

Geny, které kódují rekombinantní enzymy se zavádějí do hostitelských kmenů za použití expresních vektorů. Pomocí pozitivní selekce je zajištěn růst pouze těch buněk, které přijaly expresní vektor. U *E. coli* jsou to obvykle geny pro rezistenci na antibiotika. Rezistence vůči ampicilinu je dána genem *bla*, jehož produktem je periplazmatický enzym, který inaktivuje beta-laktamový kruh beta-laktamových antibiotik. Jelikož se však β -laktamáza kontinuálně vylučuje, dochází k degradaci antibiotika a systém není stabilní. Dalším z používaných antibiotik je tetracyklin, který je během kultivace vysoce stabilní, protože rezistence na něj je založena na aktivním odtoku antibiotika z rezistentních buněk (Korpimäki et al., 2003)

2.6.2 Bakteriální expresní systémy

Bakteriální expresní systémy jsou hojně využívány především pro rychlou a levnou produkci proteinu, a jednoduchou manipulaci s expresním systémem. Hlavní nevýhoda bakteriálních expresních systémů je chybějící posttranslační modifikace proteinů. Dalším problémem bakteriálních expresních systémů je tvorba nerozpustného produktu. Protein je ukládán do inkluzních tělísek, z nichž je nutné ho vyzolovat. Řešením tohoto problému je připojení sekreční značky a následný transport vznikajícího proteinu do periplasmy (Mergulhão et al., 2005; Rosano & Ceccarelli, 2014).

Nejvíce používanou bakterií pro bakteriální expresní systémy je *E. coli*. Nejčastěji používané expresní kmeny jsou *E. coli* BL21 (DE3) a některé linie *E. coli* K-12. Výhodou BL21 (DE3) je to, že kmen je schopný růst v minimálních médiích a není patogenní. Pokud přežije v hostitelské tkáni, tak pravděpodobně nezpůsobí onemocnění. V *E. coli* lze exprimovat většinu prokaryotických a eukaryotických genů jejichž produkty nepodléhají posttranslační modifikaci, dále také mitochondriální a chloroplastovou DNA a všechny geny jejichž produkty nepotřebujeme v aktivní formě (Chart et al., 2000; Rosano & Ceccarelli, 2014).

Druhou hojně používanou bakterií je rod grampozitivních tyčinek *Bacillus*. Výhodou tohoto rodu je velká sekreční kapacita a možnost exprese přímo do kultivačního média. Nejpoužívanějším zástupcem je *Bacillus subtilis*, dále se používají také *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Caulobacter crescentus* (Terpe, 2006). Další bakterie, které lze využít jako expresní jsou například *Lactococcus lactis*, grampozitivní bakterie využívaná v potravinářství (Linares et al., 2010), gramnegativní tyčinka *Pseudomonas aeruginosa* (Derouazi et al., 2008) nebo grampozitivní bakterie *Staphylococcus carnosus* (Dilsen et al., 2000).

2.6.3 Další druhy expresních systémů

Kvůli chybějící schopnosti posttranslační modifikace u bakteriálních expresních systémů jsou používány systémy, které posttranslační modifikaci zvládají. Mezi tyto systémy patří kvasinkové, hmyzí a savčí expresní systémy (Yin et al., 2007).

K výrobě expresních proteinů lze využít velké množství organismů. Mezi základní skupiny mimo bakteriálních expresních systémů patří kvasinkové expresní systémy, hmyzí expresní systémy, savčí tkáňové kultury, rostlinné a bezbuněčné systémy. Bakteriální a kvasinkové expresní systémy se vyznačují nízkými náklady a vysokou rychlostí růstu. Oproti tomu hmyzí a savčí expresní systémy jsou nákladnější a rychlost jejich růstu je pomalejší. Hrozí také nebezpečí kontaminace kultury lidskými patogeny. Výhodou těchto expresních systémů je schopnost posttranslační modifikace. Mezi reakce posttranslační modifikace patří N-glykosylace, O-glykosylace, fosforylace, acetylace, acylace a γ -karboxylace. Kvasinkové a hmyzí expresní systémy zvládají všechny posttranslační modifikace mimo γ -karboxylace, kterou mají jen savčí expresní systémy (Yin et al., 2007).

Kvasinkové expresní systémy jsou často používány k expresi proteinů eukaryotického původu. Jejich výhodou je snadná manipulace se vzorkem, nízká nákladnost a vysoká rychlost růstu. Další výhodou je i možnost posttranslační modifikace. Nevýhodou může být vysoká produkce sekundárních metabolitů (Böer et al., 2007). Prvním a nejčastěji používaným organismem pro expresi je *Saccharomyces cerevisiae* pekařská kvasinka. Její uplatnění je velmi široké hlavně v biotechnologické výrobě farmaceutických produktů. S její pomocí se vyrábí inzulín, glukagon, somatotropin a hirudin. *Saccharomyces cerevisiae* se využívá také při výrobě HBsAg antigenu, který se používá pro vakcinaci proti hepatitidě typu B (Mishra & Baranwal, 2009). Jiné kvasinky používané k produkci rekombinantních proteinů jsou *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica* a *Candida boidinii* (Böer et al., 2007).

Hmyzí expresní systémy jsou založeny na principu infikování kultivovaných hmyzích buněk bakuloviry. Buňky jsou infikovány DNA virem *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV). Tento rekombinantní DNA virus je dvouvláknový a nese gen pro tvorbu cílového proteinu. Jako produkční organismy jsou využívány dva druhy buněk motýlu *Spodoptera frugiperda* (kmene Sf9 a Sf21) a *Trichoplusia ni* (kmen HighFive™), kdy ke kultivaci jsou používány jejich ovariální buňky (Jarvis, 2009).

Savčí tkáňové kultury jsou nejvhodnější pro produkci savčích, a především lidských proteinů, a to hlavně díky schopnosti kompletní posttranslační modifikace. K expresi se používají buď buněčné linie odvozené z tumorů, nebo virově infikované. Při produkci rekombinantních proteinů ze savčích buněk se používají dva hlavní postupy, přechodná nebo stabilní transfekce (Wurm & Bernard, 1999; Yin et al., 2007).

Pro přechodnou expresi jsou používány především tři buněčné linie HEK-293 (Human Embryonic Kidney 293 cells), COS (CV-1 [simian] in Origin, and carrying the SV40) a BHK (Baby Hamster Kidney) (Wurm & Bernard, 1999). Pro stabilní transfekci je používána linie CHO (Chinese Hamster Ovary) (Davis et al., 1990).

Bezbuňkové expresní systémy se používají v laboratořích k výrobě nanogramového až mikrogramového množství proteinu. Tyto systémy jsou

založeny na principu použití buněčných lyzátů bez přítomnosti živých buněk. Velkou výhodou bezbuněčných expresních systémů je možnost exprese toxických proteinů a radioaktivní značení inkorporací značených aminokyselin. K přípravě bezbuněčných lyzátů se používají extrakty z *E. coli*, *Leishmania tarentolae*, další používané lyzáty jsou z extraktu pšeničného klíčku nebo lyzát králičích retikulocytů. Mezi komerčně vyráběné expresní systémy patří TNT® firmy Promega nebo Expressway™ firmy Invitrogen (Endo & Sawasaki, 2006; Kovtun et al., 2010)

3 Cíl práce

Cílem této práce bylo klonovat a exprimovat lidské geny MAO A a MAO B jako rekombinantní enzymy v buňkách bakterie *E. coli*. Práce byla rozdělena do těchto čtyř částí:

1. Literární rešerše – struktura enzymů MAO A a MAO B, jejich funkce v organismu a patologie. Expresní proteiny a druhy rekombinantních organismů.
2. Klonování genů MAO A a MAO B do sekvenačního vektoru pCR4TOPO.
3. Subklonování MAO A a MAO B do expresního vektoru pET28b.
4. Exprese rekombinantního proteinu MAO A a MAO B v buňkách *E. coli* BL21 (DE3).

4 Experimentální část

4.1 Použitý materiál

4.1.1 Chemikálie

- Antibiotikum kanamycin (Serva)
- Antibiotikum karbenicilin
- Agaróza pro rutinní DNA elektroforézu (Serva)
- SYBR safe DNAgel stain 10000x koncentrovaný (Invitrogen)
- Ethanol (VWR)
- Isopropanol (Serva)
- destilovaná voda
- LB Broth (Miler) médium (Sigma-Aldrich)
- LB bakteriální agar (Sigma Aldrich)
- SYBR safe DNAgel stain 10000x koncentrovaný (Invitrogen)
- DNA standard (O'gene Ruler 1kb DNA ladder) (Thermo Fisher)
- Nanášecí pufr (10x Blue Juice – gel loading buffer) (Invitrogen)
- TAE pufr (Serva)

4.1.2 Biologický materiál

- Templátová DNA pro PCR reakci (Gene Art, Thermofisher Scientific)
- Reverse primery pro geny MAO A a MAO B (Generi Biotech)
- Forward primery pro geny MAO A a MAO B (Generi Biotech)
- Chemokompetentní buňky E. coli NEB Turbo (New England Biolabs)
- Buňky E. coli XL-1 obsahující plasmid pET-28b (Novagen)
- Expresní buňky E. coli BL21 (DE3) (Novagen)
- Vektor pCR4 TOPO (Thermo Fisher)

4.1.3 Kity

- Quick Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher)
- QIA quick Gel Extraction kit (Qiagen)

4.1.4 Enzymy

- Easy A DNA polymeráza (Agilent)
- PPP master mix polymeráza (TopBio)
- Restrikční endonukleasy *XhoI*, *NdeI* (New England Biolabs)
- T4 DNA ligasa (Invitrogen)

4.1.5 Přístroje

- Box s laminárním prouděním (Faster Dosit)
- Centrifugy (Eppendorf)
- Horizontální elektroforézy (SciePlas)
- Hluboko mrazící box (ThermoFisher)
- Třepací inkubátor (MiuLab)
- Laboratorní váhy (Kern)
- Mikrovlnná trouba (Gallet)
- Vortex (Grant Instruments)
- Termocycler (Eppendorf)
- UV/VIS spektrofotometr (Tecan Spark)
- UV transiluminátor s kamerou (Uvitec Cambridge)
- Spektrofotometr (TECAN)

4.2 PCR genu MAO A a MAO B

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je technika, která se používá v molekulární biologii k získání milionů kopií DNA. Samotná reakce má tři hlavní části: denaturační, hybridizační (annealingovou) a prodlužovací (elongační). V denaturační fázi dojde vlivem vysoké teploty (95 °C) k rozdělení dvoušroubovice na jednotlivá vlákna. V následné hybridizační fázi vlivem snížení teploty nasednou primery. V prodlužovací fázi probíhá syntéza vláken a vznik dvoušroubovice.

4.2.1 Návrh sekvence primerů

Pro amplifikaci pouze určitého úseku DNA byly navrženy krátké oligonukleotidy (primery), které obsahují na koncích sekvence pro štěpení endonukleázami. Endonukleázy nasedají tak, že vložením do plazmidu pET28b dochází k fúzi genu se sekvencí plazmidu a exprese je získán protein, který má |N-koncovou histidinovou značku. Použité primery jsou uvedeny v tabulce č.1.

Tabulka č. 1: Sekvence primerů

MAO A	
Forward primer:	5'- CATATGGAGAATCAAGAGAAGGCC -3'
Reverse primer:	5'- CTCGAGTCAGCTAGGCAGGTTGCGTTCC -3'
MAO B	
Forward primer:	5'- CATATGAGCAACAAATGCGACGTG -3'
Reverse primer:	5'- CTCGAGTCACACGCTAGGCAGATGGCG -3'

Složení PCR reakce je popsáno v tabulce č. 2. DNA jako templát pro PCR byla upravena pro expresi v bakteriálních buňkách pomocí optimalizace kodonů a nasyntetizovaná *de novo* firmou ThermoFisher.

Tabulka č. 2: Složení PCR reakce

Komponenta	Množství (μl)	Finální koncentrace
destilovaná voda	16,4	
10x koncentrovaný reakční pufr	2,5	1x
dNTP – deoxynukleosidtrifosfát 10mM	0,6	0,25x
DNA templát, 10ng/μl	3	
primer R 010μM	1	
primer F 10μM	1	
Easy A DNA polymeráza 5U/ μl	0,5	
Celkový objem směsi	25 μl	

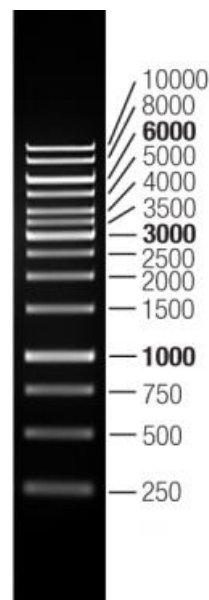
Takto připravená reakční směs byla promíchána a vložena do termocycleru Mastercycler S (Eppendorf) a byly nastaveny odpovídající podmínky pro PCR reakci, viz tabulka č. 3. Reakce probíhala ve 30 cyklech.

Tabulka č. 3: Průběh PCR reakce

1.	Fáze	95 °C	2 min
2.	fáze – 30 cyklů	95 °C	40 sec
		55 °C	30 sec
		72 °C	1 min 40 sec
3.	fáze	72 °C	7 min
4.	fáze	4 °C	∞

4.3 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza je separační metoda založená na pohybu nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, kdy separace probíhá na principu rozlišování velikosti molekul. Agarózový gel tvoří speciální síto, v němž se molekuly separují podle své velikosti. K putování molekul dochází díky stejnosměrnému elektrickému proudu. DNA jako záporně nabitá molekula putuje ke kladně nabitě elektrodě, anodě. Pro zjištění velikosti separovaných molekul DNA se používá standard molekulových hmotností, u kterého jsou známy velikosti jednotlivých fragmentů. Jako DNA standart byl použit Generuler 1kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) (Obr.6).



Obrázek č. 6: DNA standard velikostí Generuler 1kb DNA ladder. Standard slouží pro odečet velikostí DNA v rozsahu od 250 bp do 10 000 bp (upraveno z Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2018)

Do erlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,4 g agarózy a přilito 40 ml pufru. Byla zjištěna váha směsi. Agaróza byla rozpuštěna zahřátím směsi v mikrovlnné troubě. Do směsi byla doplněna odpařená voda a agaróza byla lehce chlazená na asi 50 °C. Do směsi byly přidány 4 µl barvy Syber Safe DNA gel stain 10 000x, která se váže na DNA a barví ji. Agaróza byla nalita do vany pro elektroforézu a ihned byl

umístěn hřebínek pro vytvoření jamek, do kterých budou později pipetovány vzorky. Gel byl ponechán 30 minut do utuhnutí.

Z gelu byl vyjmut hřebínek a byl zalit pufrem. Do jedné z jamek bylo pro kontrolu napipetováno 5 μ l DNA standardu molekulových hmotností (O'GeneRuler DNA 1 kb). Vzorky byly smíchány s nanášecím pufrem (Blue Juice Gel Loading Buffer) a napipetovány do jamek. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 100 V po dobu 30 minut. Po skončení elektroforézy byla DNA v gelu vizualizována pomocí UV trans-iluminátoru. Fragment s odpovídající velikostí byl z gelu izolován pro další použití.

4.4 Izolace DNA z gelu

K izolaci DNA z gelu byl použit QIAquick Gel Extraction kit a při izolaci bylo postupováno podle návodu uvedeného v kitu. Pod UV světlem byl skalpelem vyříznut odpovídající fragment DNA (u obou fragmentů se předpokládána velikost pohybovala okolo 1500 bp). Oba fragmenty byly umístěny do 2 ml zkumavky a byla zjištěna váha gelu. Do zkumavky byl přidán QG pufr dle váhy gelu (ke každému 100 mg gelu bylo přidáno 300 μ l pufru). Vzorek byl rozpuštěn při 50 °C po dobu 10 minut a každé 2 minuty byl promíchán. Do směsi byl přidán 1 objem gelu isopropanolu (ke každému 100 mg gelu bylo tedy přidáno 100 μ l isopropanolu) a vše bylo jednoduše promícháno. Vzniklá směs byla nanesena na kolonu z kitu. Do kolony bylo postupně napipetováno po 750 μ l směsi, která byla zcentrifugována po dobu 1 minuty při 14 000 x g. Tento postup byl opakován pro nanesení celého vzorku. Následně byla kolona promyta 500 μ l QG pufru a opět 1 minutu centrifugována při 14 000 x g. Do kolony bylo přidáno 750 μ l PE pufru. Vzorek byl inkubován po dobu 2-5 minut při laboratorní teplotě, poté byl 1 minutu centrifugován při 14 000 x g. Kolona byla následně znovu stočena 1 minutu při 14 000 x g z důvodu odstranění zbytkového množství pufru. Kolona byla přemístěna do čisté 1,5 ml zkumavky a pro eluci DNA bylo na kolonu napipetováno 30 μ l dH₂O. Vzorek byl 1 minutu inkubován při laboratorní teplotě a potom 1 minutu centrifugován při 14 000 x g. S eluovanou DNA bylo ihned pracováno.

4.5 TA klonování

K topoklonování byl použit pCR4 TOPO™ TA Cloning™ kit vhodný pro sekvenaci a při práci bylo postupováno podle návodu výrobce.

Tabulka č. 4: Složení topoklonovací reakce

Komponenta	Množství (μl)
DNA	4
Vektor pCR4TOPO	1
Salt – solution	1
Celkový objem směsi	6 μl

Byla namíchána topoklonovací směs (Tabulka č. 4), směs byla inkubována 10 minut při pokojové teplotě a následně byl vzorek transformován do chemokompetentních buněk *E. coli* NEB Turbo. Používaná DNA je ta, která byla eluovaná z gelu v předchozím kroku. Jako sekvenační vektor byl použit pCR4TOPO o velikosti 3 950 bp. Na jeho 3' koncích jsou T přesahy. Tento vektor obsahuje gen (kóduje) rezistenci na antibiotikum karbencilin.

4.5.1 Transformace plazmidu pCR4TOPO do *E. coli* NEB Turbo

K transformaci byli použity chemokompetentní buňky *E. coli* NEB Turbo. Chemokompetentní buňky mají na svém povrchu náboj, díky němuž se na krátkou chvíli plazmid naváže k buňce a následným teplotním šokem je vnesen do buněk.

K chemokompetentním buňkám, které byly rozmrazeny na ledu, byla připadána topoklonovací směs (3 μl) a vzorek byl nechán stát 20 minut na ledu, poté byl proveden teplotní šok 30 sekund při 42 °C a buňky byly vráceny po dobu 10 minut na led. K buňkám po teplotním šoku bylo přidáno 950 μl SOC média a kultura byla umístěna do třepacího inkubátoru na 1 hodinu při teplotě 37 °C, 200 rpm. Po inkubaci v třepacím inkubátoru byly buňky vysety na 2 bakteriální plotny obsahující antibiotikum karbencilin v koncentraci 100 μg /ml média.

Na první plotnu bylo vyseto 50 μl kultury. Roztěr kultury byl prováděn mikrobiologickou hokejkou. Zbytek kultury byl zcentrifugován 2 minuty 14 000 x g, přebytečný supernatant byl odlit a peleta resuspendována v jeho zbytku a následně vysetá na druhou plotnu. Práce s bakteriální kulturou byla prováděna v boxu s laminárním prouděním. Petriho misky s bakteriální kulturou byly inkubovány při teplotě 37 °C do druhého dne

4.6 Odpich kolonií

Po 18-ti hodinové inkubaci byly Petriho misky přeneseny do boxu s laminárním prouděním, kde probíhala práce s koloniemi. Sterilní špičkou byl proveden odpich kolonie. Špička byla ponořena do 1,5 ml zkumavky s 50 μl dH₂O a buňky byly resuspendovány. Kultura byla rozdělena do dvou zkumavek. 30 μl vzorku bylo uchováno v lednici a 20 μl vzorku bylo povařeno 5 min / 95 °C a následně použito na PCR reakci na koloniích.

4.7 PCR na koloniích

Pro detekci klonované DNA ve vyrostlých koloniích byla namíchána PCR reakce podle tabulky č. 5. Průběh reakce je uveden v tabulce č. 6.

Tabulka č. 5: Složení kolony PCR reakce na koloniích

Komponenta	Množství (μl)
dH ₂ O	7,5
PPP Master mix 2x	12,5
Primer R 10 μM	1
Primer F 10 μM	1
Templátová DNA	3
Celkový objem směsi	25 μl

Tabulka č. 6: Průběh PCR reakce na koloniích.

Fáze	94 °C	1 min
Fáze - 30 cyklů	94 °C	15 sec
	55 °C	15 sec
	72 °C	1 min 40 sec
Fáze	72 °C	7 min
Fáze	22 °C	∞

PCR na koloniích byla analyzovaná pomocí agarové gelové elektroforézy a detekovaná pomocí UV trans – iluminátoru.

4.8 Rozmnožení bakteriálních kolonií

PCR pozitivní kolonie byly inokulovány do LB média s karbenicilinem (konečná koncentrace 100 µg/ml média) a inkubovány přes noc při 37 °C a 200 rpm ve třepačce. Z narostlé kultury byl vytvořen bakteriální štok (smícháním 600 µl 50% glycerolu se 400 µl noční kultury). Štok byl skladován při -80 °C pro dlouhodobé uchování. Zbytek narostlé kultury byl centrifugován při 4500 x g po dobu 10 minut. Supernatant byl odlit a s bakteriální peletou byla buď provedena izolace plazmidové DNA, anebo byla zamražena při -20 °C do dalšího použití.

4.9 Izolace plazmidové DNA

K izolaci plazmidové DNA byl použit Quick Plasmid Miniprep Kit. Při práci bylo postupováno přesně podle návodu od výrobce. Prvním krokem bylo propipetování a homogenizování bakteriální pelety ve 250 µl pufru R2. Ke vzorku bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru L7. Zkumavka byla 5x otočena dnem vzhůru, aby se celá směs promíchala. Vzorek byl inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. K vzorku bylo přidáno 350 µl precipitačního pufru N4, zkumavka byla 10x otočena dnem vzhůru a 10 minut centrifugována při 14 000 x g. Supernatant byl přepipetován do připravených kolon a centrifugován 1 minutu při 14 000 x g.

K vzorku bylo do kolony přidáno 500 μ l W10 promývacího pufru, vzorek byl 1 minutu inkubován při laboratorní teplotě a poté minutu centrifugován při 14 000 x g. Dalším krokem bylo přidání 700 μ l W9 pufru, vzorek byl 1 minutu centrifugován při 14 000 x g. Pro naprosté dočistění a odstranění veškerého W9 pufru byl vzorek centrifugován ještě jednou po dobu 1 minuty při 14 000 x g. Kolona se vzorkem byla umístěna do čisté zkumavky, do kolony bylo napipetováno 30 μ l dH₂O. Vzorek byl 1 minutu inkubován při laboratorní teplotě a 2 minuty centrifugován při 14 000 x g.

Vzorek izolované plazmidové DNA byl sekvenován na spolupracujícím pracovišti (MBÚ, AV ČR) pro potvrzení správnosti sekvence vkládaných genů.

4.10 Restriční štěpení

Pro ověření správnosti vkládané sekvence DNA byl plazmid pCR4TOPO nesoucí geny MAO A a MAO B štěpen pomocí restričních endonukleáz. Sekvence pro tyto štěpící místa byly do sekvence obou genů přidány pomocí primerů již při první PCR reakci. Pro restriční štěpení se používá izolovaná plazmidová DNA o dostatečné koncentraci uvedené v tabulce č. 7 a čistotě. Restriční směs byla namíchána podle návodu výrobce (Tabulka 8).

Tabulka č. 7: Koncentrace DNA použitá pro restriční štěpení

DNA	Koncentrace (ng/ μ l)
MAO A	156
MAO B	167
pET28b	94

Tabulka č. 8: Složení restriční směsi

Komponenta	Množství (μl)
Reakční pufr (Cut smart 10x koncentrovaný)	2
Plazmidová DNA	16
<i>Xho</i> I (20 000 U/ml)	1
<i>Nde</i> I (20 000 U/ml)	1
Celkový objem směsi	20 μl

Podle tabulky č. 8 byla namíchána restriční směs. Vzorek byl inkubován při 37 °C po dobu 4 hodin.

4.11 Ligace vektoru a insertu

Plazmidová DNA pCR4TOPO nesoucí geny MAO A a MAO B, která byla restričně rozštěpena, byla pomocí agarové gelové elektroforézy rozdělena a příslušné fragmenty. Z gelu byla vyizolovaná DNA odpovídající velikosti pomocí QIAGEN Gel Extraction Kit. U izolovaných fragmentů byla stanovena koncentrace DNA pro přípravu ligační směsi, která byla namíchána v poměru 3:1 a složení směsi bylo dopočítáno do celkového objemu. V případě MAO A byl celkový objem směsi 25 μl, složení ligační směsi je v tabulce č. 9, ligační směs pro MAO B byla dopočítána do 20 μl a složení ligační směsi je v tabulce č. 10. Rozdílné objemy ligačních směsí jsou způsobeny potřebou dosáhnout požadované koncentrace DNA

Tabulka č. 9: Ligační směs MAO A

Komponenta	Množství (μl)
pET	6,26
MAO A	12,25
ligační pufr 5x koncentrovaný	2,5
Ligasa 400 U /μl	1
destilovaná voda	2,99
Celkový objem směsi	25 μl

Tabulka č. 10: Ligační směs MAO B

Komponenta	Množství (μl)
pET	6,26
MAO B	8,66
ligační pufr 5x koncentrovaný	2
Ligasa 400 U /μl	1
destilovaná voda	2,08
Celkový objem směsi	20 μl

Ligační směs byla napipetována do zkumavky, vzorek byl vortexován a ponechán 15 minut inkubovat při laboratorní teplotě. K chemokompetentním buňkám NEB Turbo byly připipetovány 4 μl ligační směsi a vzorek byl inkubován 20 minut na ledu. Následně byla provedena transformace pomocí teplotního šoku. Směs byla po dobu 30 sekund vložena do teploty 42 °C a poté opět inkubována 5 minut na ledu. Do vzorku bylo přidáno 950 μl SOC média. Poté byla směs inkubována 1 hodinu v třepacím inkubátoru při teplotě 37°C. Buňky byly vysety na bakteriální plotny s obsahem antibiotika kanamycinu o koncentraci 50 μl/ml média.

4.12 Příprava chemokompetentních buněk BL21 (DE3)

Do 2 ml LB média bylo zaočkováno 30 μ l noční kultury buněk *E. coli* BL21 (DE3). Vzorek byl ponechán při 37 °C v třepačce při 220 rpm. Inkubace trvala do doby, dokud buňky nenarostly do optické denzity 0,5 měřené při absorbanzi 600 nm (optická denzita O.D.₆₀₀). Do zkumavky byl nabrán 1 ml narostlé kultury a centrifugován na ledu 10 minut při 3 000 rpm. Po zcentrifugování byl supernatant odlit a peleta byla resuspendována v 1 ml 0,1 M CaCl₂. Vzorek byl opět centrifugován na ledu 10 minut při 3 000 rpm, supernatant slit a peleta resuspendována v 1 ml 0,1M CaCl₂. Vzorek byl centrifugován na ledu 10 minut při 3 000 rpm. Supernatant byl slit, peleta byla resuspendována ve 100 μ l 0,1M CaCl₂. Takto připravené buňky jsou chemokompetentní a vhodné pro transformaci plazmidové DNA. Pro přijetí plazmidové DNA je nutné provést teplotní šok.

4.13 Transformace do buněk *E. coli* BL21 (DE3)

Transformace do chemokompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3) byla provedena teplotním šokem. Směs, která byla inkubovaná na ledu, byla po dobu 30 sekund vložena do teploty 42 °C a poté opět inkubována 5 minut na ledu. Do vzorku bylo přidáno 950 μ l SOC média. Poté byla směs inkubována 1 hodinu v třepacím inkubátoru při teplotě 37°C. Vzorek byl vyset na plotnu s antibiotikem kanamycin o konečné koncentraci 50 μ g/ml média.

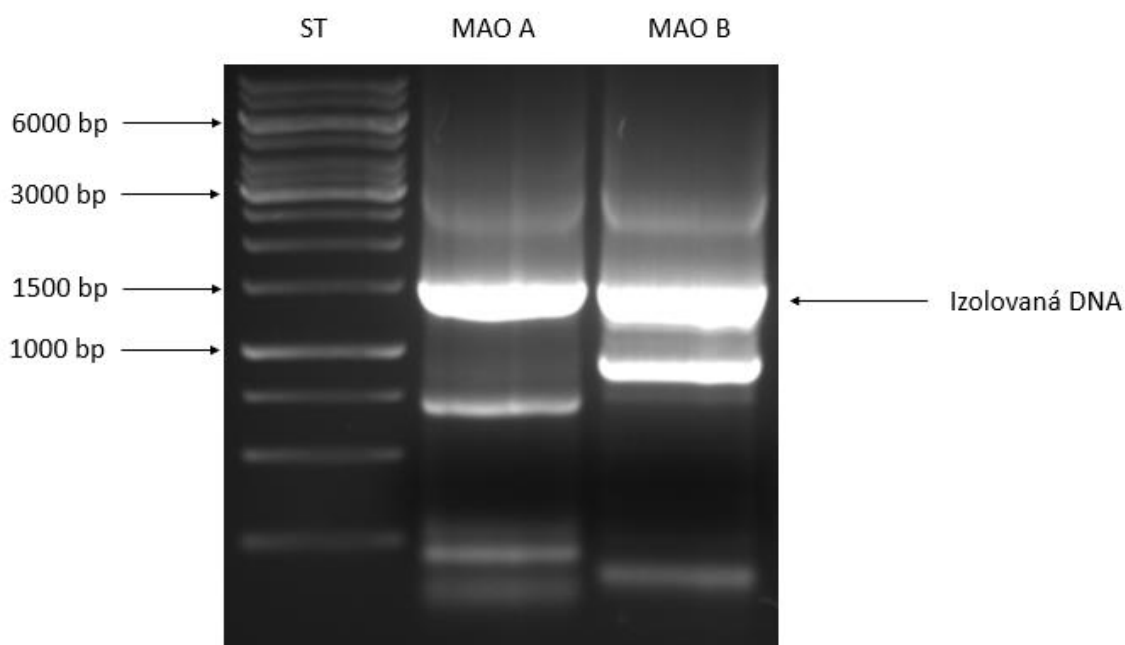
Odpich kolonií a PCR na koloniích byly provedeny stejně jako v předchozích kapitolách 4.6 a 4.7.

5 Výsledky a diskuse

5.1 Amplifikace genů MAO A a MAO B metodou PCR

5.1.1 Amplifikace metodou PCR

Geny MAO A a MAO B byly amplifikovány PCR reakcí. Pro detekci reakce byl vzorek nanesen na 1 % agarový gel a byla provedena DNA gelová horizontální elektroforéza. Fragmenty DNA byly na gelu detekovány pomocí UV transiluminátoru. Na gelu byly viditelné fragmenty přibližně o velikosti 1500 bp. Tato velikost odpovídá velikosti MAO A a MAO B (Obr.7).

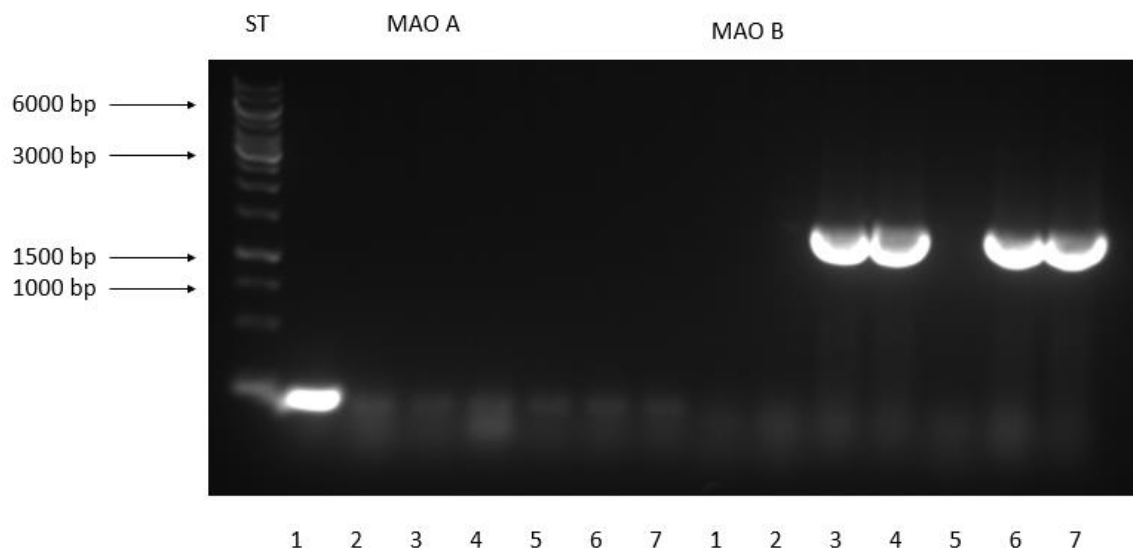


Obrázek č 7: Amplifikace genu MAO A a MAO B

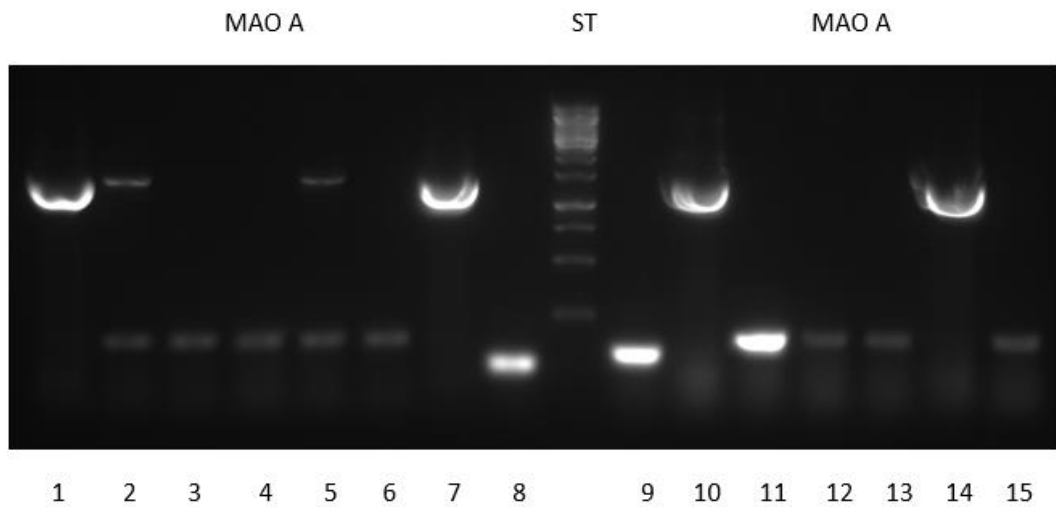
Amplifikovaná DNA byla vyříznuta a extrahována kitem QIAGEN Gel Extraction Kit. Získaná DNA byla použita rovnou pro topoklonování. Jako klonovací vektor byl použit pCR4TOPO a přijímacím organismem byly chemokompetentní buňky *E. coli* NEB Turbo. Topoklonovací směs byla vyseta na bakteriální plotny s antibiotikem karbenicilin o koncentraci 100 µg/ml média. Po 18-ti hodinové inkubaci bylo pro každý klonovaný gen odpíchnuto po sedmi koloniích, které byly následně analyzovány pomocí PCR na koloniích.

5.1.2 PCR na koloniích pCR4TOPO

Pro PCR reakce na koloniích byla použita směs PPPMasterMix (TOP-BIO). Pro analýzu reakcí byla použita gelová elektroforéza. Pro detekci byl použit UV transiluminátor. Prvních 7 vzorků MAO A bylo negativních. Pozitivní kolonie MAO B byly kolonie s čísly 3, 4, 6 a 7 (Obr. 8). Kolonie MAO A byly znovu odpíchnuty a bylo analyzováno dalších 15 kolonií. Při druhé izolaci kolonií MAO A byly pozitivní kolonie 1, 7, 10 a 14 (Obr. 9). Byla zaočkována noční kultura PCR pozitivních kolonií, která byla následně použita pro izolaci plazmidové DNA pomocí sady Quick Plasmid Miniprep Kit.



Obrázek č. 8: MAO A jsou všechny kolonie negativní a MAO B jsou pozitivní kolonie viditelné v jamkách označených čísly 3, 4, 6, 7.



Obrázek č. 9: MAO A pozitivní kolonie jsou viditelné v jamkách označených čísly 1, 7, 10, 14.

5.1.3 Koncentrace a čistota plazmidové DNA

U izolované plazmidové DNA byla stanovena čistota a koncentrace pomocí spektrofotometru Tecan Spark a modulu NanoQuant. Byla měřena absorbance při 260 a 280 nm. Hodnota absorbance při 260 nm udává koncentraci DNA a poměr těchto absorbancí udává čistotu izolované DNA. Výsledky měření jsou v tabulce č. 11.

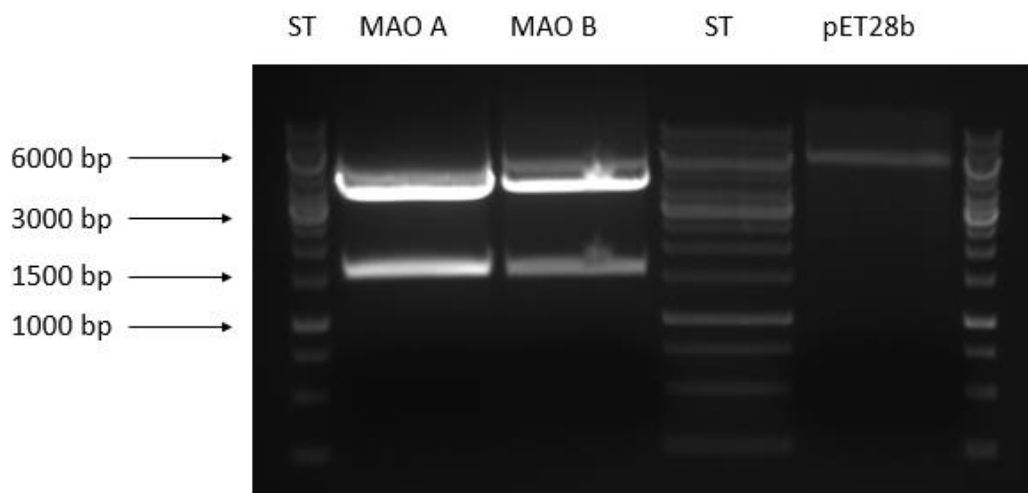
Tabulka č. 11: Koncentrace a čistota plazmidové DNA

	Koncentrace DNA (ng/μl)	Čistota DNA
Plazmidová DNA pCR4TOPO MAO A	168	1,90
Plazmidová DNA pCR4TOPO MAO B	175	1,91

Potřebná čistota DNA se pohybuje mezi hodnotami 1,8-2,0. Hodnoty menší než 1,8 jsou známkou přítomnosti proteinů a hodnoty větší než 2,0 značí přítomnost RNA. V obou případech se jedná o nežádoucí kontaminace plazmidové DNA. Izolovaná plazmidová DNA byla poslána na sekvenaci, která ověří správnost sekvence genů MAO A a MAO B.

5.2 Restrikční štěpení a ligace MAO A a MAO B

Pro další práci byla použita purifikovaná plazmidová DNA pCR4TOPO nesoucí gen MAO A/MAO B a vektor plazmidové DNA pET28b. Izolovaná DNA plazmidu pCR4TOPO byla štěpena restrikčními enzymy *XhoI* a *NdeI* stejně jako vektor pET28b. Rozštěpení restrikční směsi bylo analyzováno pomocí gelové elektroforézy. Na obrázku 10 vidíme vzniklé fragmenty genů MAO A a MAO B, stejně jako rozštěpený plazmid pET28b.



Obrázek č. 10: Na obrázku jsou rozštěpeny MAO A, MAO B a pET28b, štěpení probíhalo pomocí restrikčních endonukleáz *XhoI* a *NdeI*

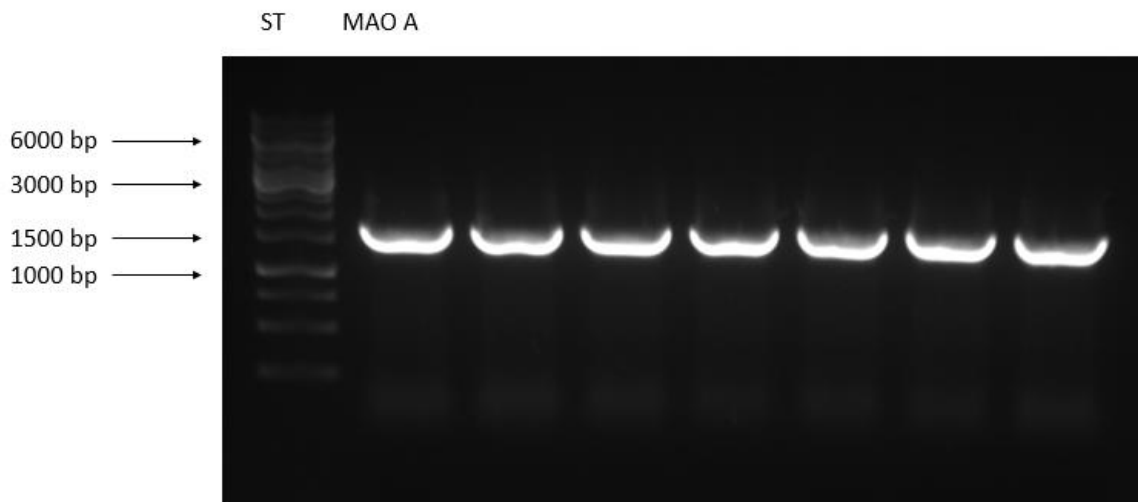
U restriktivně rozštěpené DNA byla měřena koncentrace Spektrofotometr (TECAN), hodnoty koncentrace jsou v tabulce č. 12. Z těchto hodnot bylo vypočítáno složení ligační směsi.

Tabulka č. 12: Koncentrace rozštěpené DNA

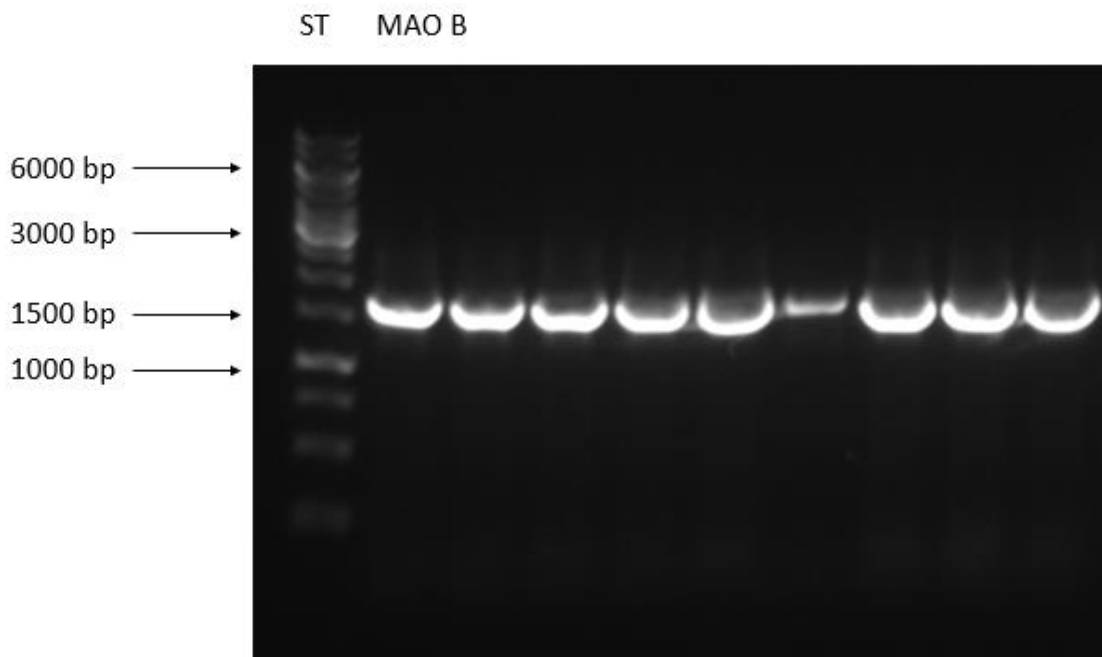
DNA	Koncentrace (ng/ μ l)
pET28b	7,98
MAO A	3,49
MAO B	4,86

5.3 Analýza vložení MAO A a MAO B do vektoru pET28b

Izolované fragmenty MAO A/MAO B a vektoru pET28b byly znovu spojeny pomocí T4 DNA ligázy. Ligační směs byla transformována do chemokompetentních buněk *E. coli* NEB Turbo. Buňky byly vysety na plotny s obsahem antibiotika kanamycinu o koncentraci 50 μ l/ml média a inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C. Vyrostlé kolonie byly odpíchnuty, a izolovány pomocí metody PCR reakcí na koloniích a výsledky reakce byly analyzovány agarovou gelovou elektroforézou. Z analýzy bylo zjištěno, že všechny fragmenty MAO A (Obr. 11) a MAO B (Obr. 12) mají správnou velikost. Z těchto analyzovaných vzorků byly vybrány klony, které byly nechány přes noc růst v LB médiu s kanamycinem o koncentraci 50 μ l/ml média při teplotě 37 °C.



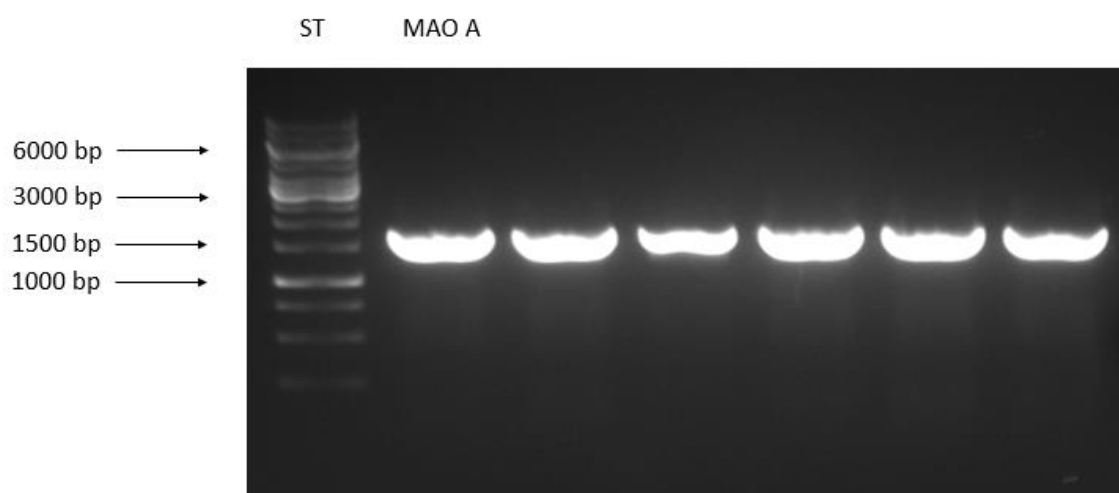
Obrázek č. 11: Pozitivní kolonie MAO A vložené do vektoru pET28b obsahující cílovou DNA jsou viditelné jako zářivě bílé pruhy o přibližné velikosti 1500 bp.



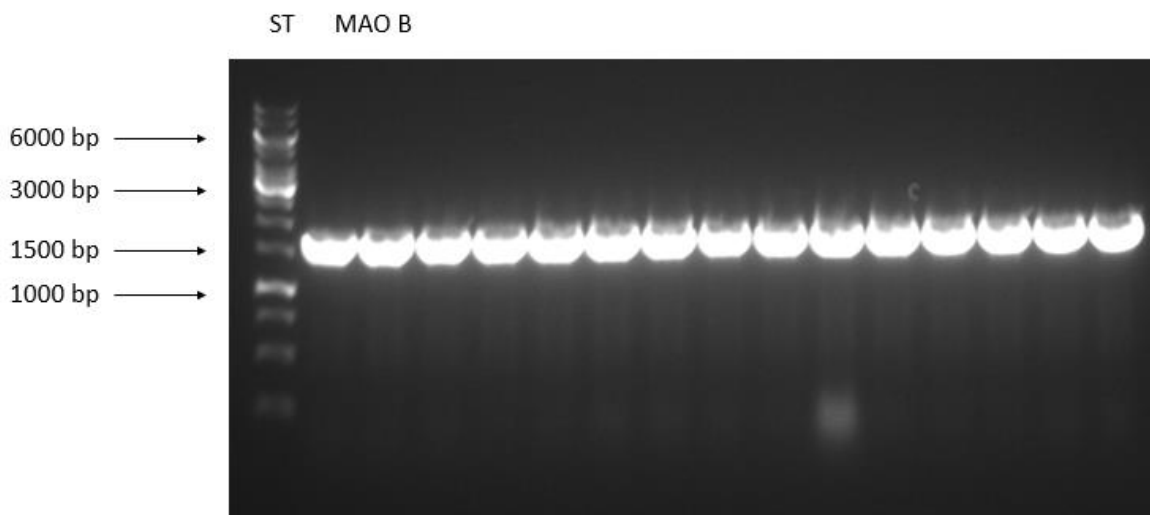
Obrázek č. 12: Pozitivní kolonie MAO B vložené do vektoru pET28b obsahující cílovou DNA jsou viditelné jako zářivě bílé pruhy o přibližné velikosti 1500 bp.

5.4 Tvorba expresního kmene *E. coli* BL21 (DE3)

Expresní kmen se skládá z plazmidu pET28b: MAO A/MAO B a buněk *E. coli* BL21 (DE3). Chemokompetentní buňky *E. coli* BL21 (DE3) byly připraveny těsně před transformací. Pomocí teplotního šoku byl do chemokompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3) vpraven plazmid pET28b: MAO A/MAO B, bylo přidáno SOC médium, po inkubaci byl proveden výsev na plotny s antibiotikem kanamycin o konečné koncentraci 50 µg/ml média. Buňky byly inkubovány do druhého dne při 37 °C. U vyrostlých kolonií byl proveden odpich kolonií a analýza pomocí PCR reakce na koloniích. Analýzou PCR reakce bylo zjištěno, že narostlé kolonie buněk *E. coli* BL21 (DE3) obsahují plazmid pET28b: MAO A (Obr. 13) /MAO B (Obr. 14) a jedná se tedy o expresní buňky.



Obrázek č. 13: Ověření vložení plazmidu pET28b: MAO A do expresního kmene buněk *E. coli* BL21 (DE3). Pozitivní vzorky obsahující cílovou DNA jsou viditelné jako zářivě bílé pruhy o přibližné velikosti 1500 bp.



Obrázek č. 14: Ověření vložení plazmidu pET28b: MAO B do expresního kmene buněk *E. coli* BL21 (DE3). Pozitivní vzorky obsahující cílovou DNA jsou viditelné jako zářivě bílé pruhy o přibližné velikosti 1500 bp.

Pro bakteriální rekombinantní expresi byl použit expresní vektor pCR4TOPO, který byl transformován do chemokompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3). Tyto buňky se běžně používají pro přípravu rekombinantních proteinů. Výhodou kmene *E. coli* BL21 (DE3) je nízká hladina bazální exprese. Hladina bazální exprese se pohybuje kolem 10 %. Takováto příprava různých rekombinantních enzymů je v laboratorní praxi běžná a výsledky dosažené v této práci se neliší od výsledků jiných prací, stejně jako postupy a metody kterými byl rekombinantní enzym vytvořen. Expresní vektory mohou být také transportovány do chemokompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3)LysS, který navíc obsahuje T7 lysozym (produkovaný genem LysS), a výhodou je ještě nižší hladina bazální exprese pohybující se kolem 1-3 %.

5.5 Ověření výsledků

Schopnost produkce proteinu u expresních buněk *E. coli* BL21 (DE3) nesoucí plazmid pET28 s geny MAO A nebo MAO B byla ověřena pilotní expresí proteinů v LB médiu. Expresní buňky byly v exponenciální fázi růstu indukovány 1 mM IPTG po dobu 4 hodin. Buněčná peleta byla resuspendována v 50 mM Tris-HCl a část buněk bylo použito pro analýzu obsahu proteinů pomocí elektroforézy v přítomnosti dodecylsírany sodného. Po elektroforéze byly proteiny přeneseny pomocí metody western-blot na polyvinylfluoridovou membránu a protilátkou proti histidinové kotvě byla zjištěna přítomnost obou proteinů v celobuněčných lyzátech. Pro získání čistého proteinu ve zkumavce bude dalším krokem optimalizace proteinové exprese v čase a purifikace proteinů MAO A a MAO B pomocí afinitní chromatografie.

6 Závěr

Cílem této práce bylo klonování a exprese genů MAO A a MAO B pro přípravu rekombinantního enzymu v expresních buňkách *E. coli* BL21(DE3). Cíle této práce se podařilo naplnit.

MAO A a MAO B jsou mitochondriální enzymy, které metabolizují neurotransmitery jako jsou například serotonin norepinefrin a dopamin. Inhibitory MAO mají široké využití v medicíně. K výzkumu inhibitorů je potřebný purifikovaný protein. Purifikace proteinu z bakteriálního expresního systému není nijak složitá a je logickým pokračováním tohoto výzkumu.

Rekombinantní proteiny se připravují v případě obtížného získávání proteinu z přirozeného zdroje. Mezi velké výhody rekombinantních proteinů patří vysoká produkce proteinů, rychlý růst v poměrně levném médiu a přizpůsobivost systému.

DNA pro geny MAO A a MAO B byly amplifikovány pomocí PCR reakce, poté vyizolovány a vloženy do plazmidu pCR4TOPO. Pomocí štěpení restrikními endonukleázami byla DNA vložena do plazmidu pET28b. Plazmid pET28b: MAO A/MAO B byl transformován do chemokompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3). Vznikly tak buňky *E. coli* BL21 (DE3) pET28b: MAO A/MAO B schopné vytvářet rekombinantní protein.

7 Seznam použité literatury

- Berger, W., Meindl, A., van de Pol, T. J. R., Cremers, F. P. M., Ropers, H. H., Döerner, C., ... Meitinger, T. (1992). Isolation of a candidate gene for Norrie disease by positional cloning. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng0692-199>
- Binda, C., Edmondson, D. E., De Colibus, L., Li, M., Lustig, A., & Mattevi, A. (2005). Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505975102>
- Binda, C., Li, M., Hubalek, F., Restelli, N., Edmondson, D. E., & Mattevi, A. (2003). Insights into the mode of inhibition of human mitochondrial monoamine oxidase B from high-resolution crystal structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(17), 9750–9755. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633804100>
- Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G., & Gellissen, G. (2007). Yeast expression platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *77*(3), 513–523. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1209-0>
- Bortolato, M., Chen, K., & Shih, J. C. (2008). Monoamine oxidase inactivation: From pathophysiology to therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.06.002>
- Chart, H., Smith, H. R., La Ragione, R. M., & Woodward, M. J. (2000). An investigation into the pathogenic properties of Escherichia coli strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1. *Journal of Applied Microbiology*, *89*(6), 1048–1058. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01211.x>
- Davis SJ, Ward HA, Puklavec MJ, Willis AC, Williams AF, Barclay AN. (1990). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY High Level Expression in Chinese Hamster Ovary Cells of Soluble Forms of CD4 T Lymphocyte Glycoprotein Including Glycosylation Variants** (Vol. 265). Retrieved from <http://www.jbc.org/>
- De Colibus, L., Li, M., Binda, C., Lustig, A., Edmondson, D. E., & Mattevi, A. (2005). Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A):

- Relation to the structures of rat MAO A and human MAO B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36), 12684–12689. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505975102>
- Denney, R. M., & Denney, C. B. (1985). An update on the identity crisis of monoamine oxidase: new and old evidence for the independence of mao A and B. *Pharmacology and Therapeutics*. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(85\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(85)90050-6)
- Derouazi, M., Toussaint, B., Quénée, L., Epaulard, O., Guillaume, M., Marlu, R., & Polack, B. (2008). High-yield production of secreted active proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(11), 3601–3604. <https://doi.org/10.1128/AEM.02576-07>
- Dilsen, S., Paul, W., Sandgathe, A., Tippe, D., Freudl, R., Thömmes, J., ... Weuster-Botz, D. (2000). Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(3), 361–369. <https://doi.org/10.1007/s002530000406>
- Edmondson, D. E., Binda, C., Wang, J., Upadhyay, A. K., & Mattevi, A. (2009). Molecular and mechanistic properties of the membrane-bound mitochondrial monoamine oxidases. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi900413g>
- Endo, Y., & Sawasaki, T. (2006). Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(4), 373–380. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2006.06.009>
- Finberg, J. P. M. (2014). Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.02.010>
- Finberg, J. P. M., & Rabey, J. M. (2016). Inhibitors of MAO-A and MAO-B in psychiatry and neurology. *Frontiers in Pharmacology*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00340>

- Hare, M. L. (1928). Tyramine oxidase: A new enzyme system in liver. *The Biochemical Journal*.
- Jarvis, D. L. (2009). Chapter 14 Baculovirus–Insect Cell Expression Systems. *Methods in Enzymology*, 463, 191–222. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63014-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63014-7)
- Jiráček, R., Holmerová, I., & Borzová, C. (2009). *Demence a jiné poruchy paměti: komunikace a každodenní péče*. Praha: Grada, 2009. 40-41s., ISBN 978–80–247–2454–6.
- Johnston, J. P. (1968). Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochemical Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(68\)90066-X](https://doi.org/10.1016/0006-2952(68)90066-X)
- Korpimäki, T., Kurittu, J., & Karp, M. (2003). Surprisingly fast disappearance of beta-lactam selection pressure in cultivation as detected with novel biosensing approaches. *Journal of Microbiological Methods*, 53(1), 37–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12609721>
- Kovtun, O., Mureev, S., Johnston, W., & Alexandrov, K. (2010). Towards the Construction of Expressed Proteomes Using a Leishmania tarentolae Based Cell-Free Expression System. *PLoS ONE*, 5(12), e14388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014388>
- Levy, E. R., Powell, J. F., Buckle, V. J., Hsu, Y. P. P., Breakefield, X. O., & Craig, I. W. (1989). Localization of human monoamine oxidase-A gene to Xp11.23-11.4 by in situ hybridization: Implications for norrie disease. *Genomics*. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(89\)90072-4](https://doi.org/10.1016/0888-7543(89)90072-4)
- Li, M., Hubálek, F., Newton-Vinson, P., & Edmondson, D. E. (2002). High-Level Expression of Human Liver Monoamine Oxidase A in Pichia pastoris: Comparison with the Enzyme Expressed in Saccharomyces cerevisiae. *Protein Expression and Purification*, 24(1), 152–162. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1546>
- Linares, D. M., Geertsma, E. R., & Poolman, B. (2010). Evolved Lactococcus lactis

- Strains for Enhanced Expression of Recombinant Membrane Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 401(1), 45–55. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2010.06.002>
- Mergulhão, F. J. M., Summers, D. K., & Monteiro, G. A. (2005). Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.11.003>
- Mishra, S., & Baranwal, R. (2009). Yeast Genetics and Biotechnological Applications. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pp. 323–355). Dordrecht Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8292-4_16
- Nielsen, P. H., Malmos, H., Damhus, T., Diderichsen, B., Nielsen, H. K., Simonsen, M., ... Nielsen, T. K. (2004). Enzyme Applications, Industrial. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. <https://doi.org/10.1002/0471238961.0914042114090512.a01>
- Qian, Q.-J., Yang, L., Wang, Y.-F., Zhang, H.-B., Guan, L.-L., Chen, Y., ... Faraone, S. V. (2010). Gene-gene interaction between COMT and MAOA potentially predicts the intelligence of attention-deficit hyperactivity disorder boys in China. *Behavior Genetics*, 40(3), 357–365. <https://doi.org/10.1007/s10519-009-9314-8>
- Ramsay, R. R., & Albrecht, A. (2018). Kinetics, mechanism, and inhibition of monoamine oxidase. *Journal of Neural Transmission*. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1861-9>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Roth, J., Sekyrová, M., & Růžička, E. (1999). *Parkinsonova nemoc*. 2. rozš. vyd. Praha: Maxdorf, 1999. 25,50,51. ISBN 80- 85800-63-2.
- Roth, J., Sekyrová, M., & Růžička, E. (2009). *Parkinsonova nemoc*. 4.vyd. Praha: Maxdorf, 2009. 25-47. ISBN 978-80-7345- 178-3.
- Ryan, R. A., & Carrol, J. (1976). Studies on a 3beta-hydroxysteroid sulphotransferase

- from rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 429(2), 391–401. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4129>
- Silbernagl, S., & Lang, F. (2001). *Atlas patofyziologie člověka*. Praha: Grada, 2001. 312-314, ISBN: 80-7169-968-3.
- Sims, K. B., de la Chapelle, A., Norio, R., Sankila, E. M., Hsu, Y. P. P., Rinehart, W. B., ... Breakefield, X. O. (1989). Monoamine oxidase deficiency in males with an X chromosome deletion. *Neuron*. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90231-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90231-6)
- Son, S.-Y., Ma, J., Kondou, Y., Yoshimura, M., Yamashita, E., & Tsukihara, T. (2008). Structure of human monoamine oxidase A at 2.2-Å resolution: The control of opening the entry for substrates/inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5739–5744. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710626105>
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(2), 211–222. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0465-8>
- Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA Ladder*. (2018). Retrieved from www.thermofisher.com
- Tipton, K. F., Boyce, S., O'Sullivan, J., Davey, G. P., & Healy, J. (2012). Monoamine Oxidases: Certainties and Uncertainties. *Current Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.2174/0929867043364810>
- Weizmann Institute of Science, 1996-2019. [online]. [cit. 8. 7. 2019]. Dostupné z WWW: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAOA>>.
- Weizmann Institute of Science, 1996-2019. [online]. [cit. 8. 7. 2019]. Dostupné z WWW: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MAOB>>.
- Wurm, F., & Bernard, A. (1999). Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(2),

156–159. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)80027-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)80027-5)

Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, *127*(3), 335–347. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.012>

Youdim, M. B. H., & Bakhle, Y. S. (2006). Monoamine oxidase: Isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *British Journal of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706464>