

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Mgr. Michal Křupka

## **Příprava a purifikace rekombinantních proteinů**

Dizertační práce

Ústav Imunologie

Školitel: Prof. MUDr. Evžen Weigl, CSc.

Olomouc 2011

# Obsah

1	SOUHRN .....	4
2	SUMMARY .....	4
3	ÚVOD .....	5
3.1	Rekombinantní proteiny .....	5
3.2	Historie biotechnologií a jejich využití v medicíně .....	6
3.3	Postup tvorby rekombinantního proteinu .....	8
3.4	Expresní systémy .....	12
3.4.1	Bakteriální expresní systémy .....	13
3.4.2	Kvasinkové expresní systémy .....	15
3.4.3	Expresní systémy využívající hmyzí buňky a bakulovirové vektory .....	16
3.4.4	Savčí tkáňové kultury .....	17
3.4.5	Ostatní .....	18
3.5	Izolace, purifikace a charakterizace rekombinantních proteinů .....	21
3.5.1	Dezintegrace biomasy .....	21
3.5.2	Purifikace rekombinantních proteinů .....	23
4	SOUHRN CÍLŮ EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI .....	29
4.1	Povrchové antigeny spirochety <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	29
4.2	Antigenní vlastnosti Heat shock proteinu 90 (Hsp90) kvasinky <i>Candida albicans</i> .....	32
4.3	Expresse myšího Heat shock proteinu 70 (Hsp70) pro vakcinační experimenty .....	34
5	LITERATURA .....	36
6	PŘEHLED VLASTNÍCH PUBLIKACÍ .....	44
6.1	Publikace předkládané v dizertační práci, .....	44
6.2	Přehled ostatních vlastních publikací, abstrakt a přednášek .....	46
6.2.1	Časopisecké publikace .....	46
6.2.2	Přednášky .....	46
6.2.3	Postery: .....	49
6.2.4	Abstrakta .....	50
6.3	Řešené granty .....	51
7	PŘÍLOHY DIZERTAČNÍ PRÁCE .....	53

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracoval samostatně za využití citované literatury.

V Olomouci dne 2. 5. 2011

Mgr. Michal Křupka

### **Poděkování**

Děkuji svému školiteli Prof. MUDr. Evženu Weiglovi, CSc za vedení práce, Doc. MUDr. Mgr. Milanu Raškovi, Ph. D. a celému kolektivu ústavu imunologie. Práce byla podpořena výzkumným záměrem MSM6198959223 a vnitřním grantem Univerzity Palackého LF-2011-002.

## 1 Souhrn

Cílem první části dizertační práce je podat ucelený přehled problematiky přípravy a purifikace rekombinantních proteinů a možností jejich využití v diagnostice a terapii lidských chorob. Jsou zde popsány technologické postupy izolace cílového genu, tvorby rekombinantního expresního vektoru, vlastnosti jednotlivých expresních systémů a metodiky purifikace rekombinantních proteinů.

Druhá část práce obsahuje shrnutí řešené problematiky. Při přípravě rekombinantních proteinů jsem se zabýval třemi dílčími tématy. Prvním tématem byla příprava povrchových antigenů spirochety *Borrelia burgdorferi* a testování jejich imunogenních vlastností na myším modelu. Druhým tématem byla purifikace rekombinantního proteinu Hsp90 kvasinky *Candida albicans* a testování jeho využitelnosti jako antigenu pro přípravu preventivní vakcíny proti kandidóze. Posledním tématem byla exprese a purifikace rekombinantního myšího proteinu Hsp70 pro vakcinační experimenty. Výsledky práce na uvedených tématech vedly k publikaci 8 prací v recenzovaných časopisech. Výtisky prací tvoří třetí část dizertační práce.

## 2 Summary

The aim of the first part of the PhD thesis is to bring the comprehensive overview of preparation and purification of recombinant proteins and their utilization in diagnosis and therapy of human diseases. Here are described technological procedures of target gene isolation, construction of recombinant vectors, properties of expression systems and methods of recombinant protein purification.

The second part contains summary of experimental work on recombinant protein production which is divided in three subjects. First, the production of surface antigens from spirochete *Borrelia burgdorferi* and testing their immunogenic properties on mouse model. Second, the purification of recombinant protein Hsp90 from yeast *Candida albicans* and testing of its applicability as antigen for preparation of preventive vaccine against candidiosis. Third, the expression and purification of recombinant mouse Hsp70 protein for vaccination experiments.

The results of the investigation were published in eight papers of which five are in journals with impact factor and rest in per-reviewed journals. Copies of these papers are attached in the third part of the thesis.

## **3 Úvod**

### **3.1 Rekombinantní proteiny**

Rekombinantní proteiny jsou obecně definovány jako proteiny kódované rekombinantní DNA nebo tvořené na základě rekombinantního genu, kdy rekombinantní DNA je DNA vzniklá umělým spojením dvou nebo více genových úseků z různých zdrojů a je schopna se replikovat v hostitelském organismu, případně se integrovat do jeho chromozomu. Rekombinantní protein je exprimován hostitelským proteosyntetickým aparátem. Protein je z produkujícího organismu izolován a purifikován. Rekombinantní technologie je alternativou k izolaci proteinů z přirozených zdrojů jako jsou živočišné tkáně, rostlinná pletiva nebo mikroorganismy. Organismy používané pro expresi rekombinantních proteinů jsou většinou snadno kultivovatelné a protein je možno díky fúzi s peptidovými značkami izolovat jedno- nebo několikasrokovým postupem ve vysoké čistotě. Na rozdíl od rekombinantních technologií, izolace proteinů z přirozených zdrojů často vyžaduje mnohokrátové purifikační postupy a často vyžaduje velké množství vstupní suroviny, úměrně ke koncentraci cílového proteinu ve výchozím materiálu. Při izolaci proteinů z lidského nebo zvířecího zdroje navíc nelze zcela vyloučit infekční rizika v průběhu izolace nebo ve výsledném produktu (BSE při izolaci z bovinních tkání, HIV a hepatitida při izolaci z krve...). Podobná rizika připadají v úvahu i při přípravě proteinů z patogenních mikroorganismů, které navíc často vyžadují specifické a nákladné kultivační podmínky (například kultivace virů na tkáňových kulturách nebo kuřecích embryích). Biotechnologie tvorby rekombinantních proteinů jsou schopny vyhnout se těmto problémům a proto nachází široké využití jak v základním výzkumu struktury a funkce proteinů, tak i v průmyslu při výrobě proteinů a enzymů používaných v terapii, diagnostice a dalších aplikacích.

### 3.2 Historie biotechnologií a jejich využití v medicíně

Za autora pojmu biotechnologie se v současné době považuje maďarský zemědělský inženýr Károly Ereky, který biotechnologie v roce 1919 definoval jako technologie přeměny surovin na využitelné produkty pomocí živých organismů. Biotechnologie v té době byly chápány hlavně v souvislosti se zemědělskými technologiemi, Ereky však již uvažoval o podobnosti složení proteinů a nukleových kyselin v rostlinných a živočišných buňkách, zatím samozřejmě bez znalosti hlubších souvislostí (Fári et Kralovánszky, 2006).

Přelomem se stala práce Watsona a Cricka z roku 1953 popisující strukturu DNA. Na konci 60. a začátku 70. let dvacátého století byl popsán zásadní nástroj pro práci s genovými sekvencemi – restriční endonukleázy (Meselson and Yuan 1968, Smith and Wilcox 1970). Tvorba první rekombinantní DNA molekuly byla publikována Jacksonem, Symonsem a Bergem (Jackson et al, 1972). Autorům se podařilo pomocí endonukleázy *E. coli* RI vložit do molekuly DNA viru SV40 sekvenci DNA pocházející z *E. coli* nesoucí geny fága  $\lambda$  a galaktózový operon. Na základě této práce byla Paulu Bergovi v roce 1980 za studium rekombinantní DNA udělena Nobelova cena za chemii. V roce 1973 byl popsán rekombinantní plasmid vzniklý ligací fragmentů vytvořených restriční endonukleázou *EcoRI* ze sekvence plasmidu rezistence R6-5 a z autoreplikačního fragmentu stejného plasmidu nazvaného pSC101. Po vložení do *E. coli* byl plasmid plně biologicky funkční a poskytl hostitelským bakteriím rezistenci na antibiotikum (Cohen et al. 1973). Na základě stejného plasmidu pSC101 byl o rok později vytvořen první konstrukt obsahující heterologní sekvenci DNA – *EcoRI* fragment plasmidu pI258 *Staphylococcus aureus* nesoucí gen rezistence k penicilinu (Chang and Cohen, 1974). V roce 1977 byla publikována exprese rekombinantního somatostatinu, peptidového hormonu složeného ze 14 aminokyselin, fúzovaného s  $\beta$ -galaktosidázou pod kontrolou laktózového promotoru a operátoru indukovatelného isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosidem (IPTG) z plasmidu odvozeného od již dříve popsaném pBR322 (Itakura et al. 1977). Na použití indukibilního laktózového operonu je dosud založeno mnoho prokaryotických expresních systémů a tak lze tuto práci považovat za základ biotechnologické přípravy rekombinantních proteinů. Stejný přístup byl použit o dva roky později firmou Genentech při expresi lidského inzulinu. Prekurzor inzulinu však prochází v savčích buňkách odštěpením prostřední části sekvence a aktivní hormon se tak skládá ze dvou řetězců spojených disulfidickými můstky, jejichž tvorba v *E. coli*

je také problematická Tvůrci rekombinantního inzulínu tento problém vyřešili oddělenou expresí řetězců A a B a jejich následným chemickým spojením (Goeddel et al, 1979). V roce 1982 bylo U.S. Food and Drug Administration (FDA) schváleno uvedení rekombinantního inzulínu jako prvního terapeutického rekombinantního polypeptidu na trh firmou Eli Lilly pod názvem Humulin. Tento produkt zcela nahradil do té doby používaný inzulín izolovaný ze slinivky vepřů a skotu. Ten byl kvůli drobnému rozdílu v sekvenci u části pacientů imunogenní a vzhledem k tomu, že byl získáván z vedlejších produktů masného průmyslu bylo obtížné zajistit stabilní a dostatečný zdroj surovin a jejich standardizaci. Rokem 1982 tak začíná rozvoj biotechnologického průmyslu a medicínských aplikací rekombinantních produktů.

Postupně se dostávaly na trh další substituční rekombinantní preparáty jako například růstový hormon Protropin<sup>®</sup> (Genentech, 1985), interferon  $\alpha$  Roferon A<sup>®</sup> (Hoffmann-La Roche, 1986), ale i první rekombinantní vakcína proti hepatitidě B Recombivax<sup>®</sup> exprimovaná v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (Merck, 1986) a první přípavek založený na monoklonální protilátce Orthoclone OKT 3 (Janssen-Ortho, 1986)(Cvak a Fusek, 2004). Ve roce 1986 Environmental Protection Agency v USA také schválila využití první transgenní rostliny – tabáku nesoucího vložený gen pro rezistenci k herbicidu. Během dalších dvaceti let obor biotechnologií zaznamenal přímo explozivní rozvoj a v roce 2006 bylo jen v USA registrováno 1452 biotechnologických firem s hodnotou 360 miliard dolarů, zaměstnávajících 180.000 pracovníků a investujících 27 miliard dolarů ročně do výzkumu a vývoje (www.bio.org).

V roce 1998 byla v USA uvedena na trh celosvětově druhá rekombinantní vakcína. Tato vakcína proti Lymeské borelióze nesla název Lymerix a jejím základem byl Outer surface protein A *Borrelia burgdorferi* exprimovaný v *E. coli*. (Steere et al, 1998). V roce 2002 byla stažena z trhu kvůli obavám z vedlejších účinků, které však nebyly nikdy signifikantně prokázány Vakcína proti hepatitidě B tak až do roku 2006 zůstala jako jediná rekombinantní vakcína schválená k použití v humánní medicíně. V roce 2006 přibyla tetravalentní vakcína proti lidskému papilomaviru (HPV) s názvem Gargasil, která byla uvedena na evropský trh pod názvem Silgard (Bryan 2007; „Silgard European Public Assessment Report". European Medicines Agency. September 25, 2009. Retrieved 2009-12-05). Vakcína je složena z kapsidových proteinů (L) z dominantních HPV kmenů – 16, 18, 6 a 11 exprimovaných v *S. cerevisiae*. Rekombinantní proteiny L HPV kmenů 16 a 18 exprimované v hmyzí linii druhu *Trichoplusia* ni jsou základem druhé vakcíny s podobnou indikací distribuované pod

názvem Cervarix. Ve fázi klinického testování je několik dalších antiinfekčních vakcín, např. přípavek Optaflu® produkovaný psími ledvinými buňkami (Frey et al, 2010).

### 3.3 Postup tvorby rekombinantního proteinu

Základem produkce jakéhokoliv rekombinantního proteinu exprimovaného v jakémkoliv expresním systému je izolace jeho kódujícího genu. Při práci s prokaryotickými geny je zpravidla dostačující izolace celkové DNA a namnožení cílového genu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). U eukaryot je situace značně složitější. Strukturální gen totiž obsahuje většinou nepřepisované 3' a 5' sekvence a introny, tj. sekvence nepřepisující se do sekvence mRNA. Zde je proto výhodnější izolovat mRNA a tuto zpětně přepsat do komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkriptázy (většinou virového původu). K provedení reverzní transkripce je možno použít komerční kity. V současnosti je možné připravit gen i synteticky, tj. chemickou cestou.

Druhým krokem přípravy rekombinantního proteinu je vložení genové sekvence do vhodného vektoru, jehož typ závisí na použitém expresním systému. Nejjednodušší je tvorba bakteriálního plazmidu, která je znázorněna na obr. 1. V praxi jsou použitelné tři základní metody – běžná ligace fragmentů DNA pomocí DNA ligázy, přímé klonování PCR produktů (např. za použití plasmidů aktivovaných topoizomerázou I), případně specifická rekombinace DNA katalyzovaná enzymy.

Následujícím krokem je vnesení rekombinované DNA do buněk určených pro expresi rekombinantního proteinu. Obecně se vnesení rekombinantní DNA do prokaryotické buňky označuje jako transformace, vnesení do eukaryotické buňky jako transfekce. Základním předpokladem pro přestup DNA do cytoplasmy prokaryot a jádra eukaryot je permeabilizace buněčných membrán. Ta může probíhat chemicky (např. působením  $\text{CaCl}_2$ ) za vzniku tzv. chemokompetentních buněk, které jsou následně snadno transformovatelné tepelným šokem po přidání DNA. Druhá nejčastější metoda, tzv. elektroporace je založena na dočasné destabilizaci buněčné membrány, navozené elektrickým pulsem. Tato metoda se častěji používá pro transfekci eukaryotických buněk. Kromě elektroporace se k transfekci eukaryotických buněk často používají komplexy rekombinantní DNA s kationickými polymery nebo lipozomy, které jsou schopny adherovat na buněčný povrch a následně projít přes cytoplasmatickou



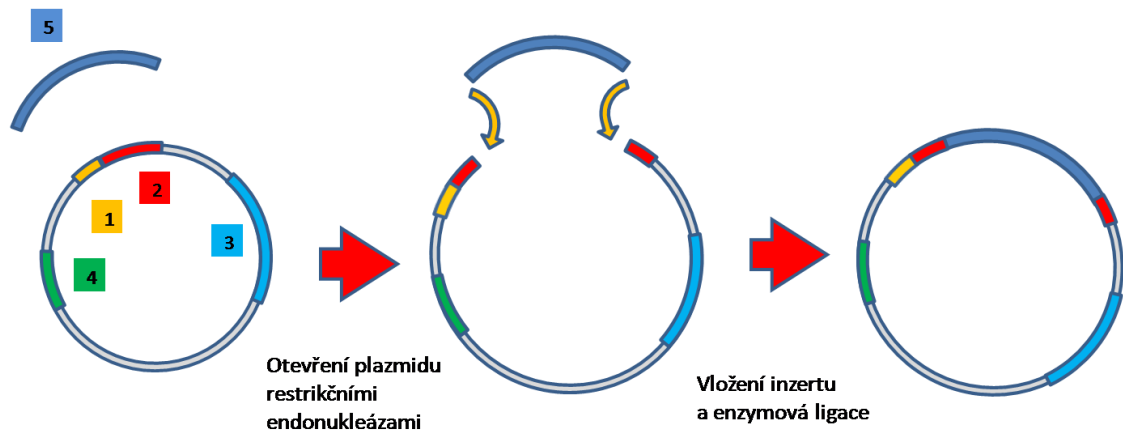
membránu. Pro přechodnou transfekci hmyzích buněk se používá infekce rekombinantními bakuloviry, virové systémy se používají i u některých eukaryotických buněk. Obecně se buňky použité k expresi dají geneticky pozměnit přechodně nebo lze tvořit stabilní linie nesoucí genový konstrukt na plasmidu nebo stabilně integrovaný do genomu. V případě tvorby stabilních linií je třeba selektovat transformované či transfekované klony buněk pomocí selekčních markerů, což bývají nejčastěji produkty genů zajišťujících rezistenci k antibiotikům, nebo enzymy v nichž je hostitelská buněčná linie deficientní, a dodání enzymu umožní přežití buněk v normálních kultivačních podmínkách. Expresní systémy se liší také produkcí cílového proteinu. Ta může být kontinuální nebo indukovatelná, např. derepresí laktózového operonu nemetabolizovaným analogem laktózy isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosidem u *E. coli*.

Finálním krokem přípravy rekombinantního proteinu je jeho purifikace. Technologicky výhodnější je purifikace sekreční varianty rekombinantního proteinu, tj. arteficiálně modifikovaného proteinu, který je expresními buňkami produkován do média. Složitější je postup u proteinů produkovaných jako cytoplasmatické, tj. nesekretované. Zde je nutné vložit lyzační krok, jehož cílem je rozrušit membránu a buněčnou stěnu buněk a uvolnit jejich obsah do roztoku. Lýzu buněk lze provést enzymatickými (např. použití lysozymu u bakterií) nebo fyzikálními (sonikace, opakované zamražení, mletí...) metodami, většinou však jejich kombinací. K purifikaci rekombinantních proteinů se s výhodou používají připojené purifikační značky, která umožňuje využití metodik afinitní chromatografie (např. metaloafinitní chromatografie při použití histidinové značky). Kromě afinitní chromatografie se často využívají i další chromatografické metody – gelová permeační chromatografie, iontoměničová chromatografie nebo hydrofobní chromatografie. Pro některé proteiny je použitelná také metoda selektivní precipitace síranem amonným. U proteinů exprimovaných v *E. coli* je pro většinu aplikací ještě nutné vložit purifikační krok odstraňující lipopolysacharid, který by při parenterálním podáním vyvolával pyrogenní reakci. Dalším problémem proteinů z *E. coli* je, že jsou často produkovány ve formě tzv. inkluzních tělísek, což jsou nerozpustné agregáty tvořené nerozpustným proteinem. V takovém případě je nutno použít denaturační metody purifikace následované složením proteinu do správné konformace, tzv. refoldingem. Purifikovaný produkt je na závěr nutno charakterizovat, tj. potvrdit identitu a zjistit čistotu a koncentraci proteinu. Pro stanovení čistoty většinou postačuje analýza pomocí denaturační gelové elektroforézy s následným denzitometrickým vyhodnocením. Identitu proteinu potvrzujeme imunologickými metodami jako je

imunoanalýza na western-blotu, případně pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization - time-of-flight). Většinou je nutné také prokázání nativní konformace a funkčnosti proteinů. Pro enzymově aktivní proteiny je nutné stanovit aktivitu, pro antigenní proteiny se stanovuje jejich imunogenita a schopnost navozených specifických imunitních mechanismů reagovat proti nativnímu antigenu. Neméně důležité je stanovení koncentrace produktu. Zde zpravidla plně dostačují spektrofotometrické metody, jako je metoda dle Bradfordové nebo metoda využívající sodné soli kyseliny bichoninové (BCA). Složitější je stanovení obsahu lipopolysacharidu vzhledem k jeho vysokému biologickému účinku již při nízkých koncentracích. Původní metodou k jeho stanovení byl test *in vivo* na laboratorních králících. V současnosti je tato metoda nahrazena testy *in vitro* s pomocí testu LAL (Limulus amoebocyte lysate). Na závěr je třeba najít optimální skladovací podmínky, za kterých je produkt stabilní po co nejdelší dobu. Optimální podmínky je nutné určit individuálně pro každý protein, obecně je ale pro dlouhodobější uchování většinou výhodné mrazové vysušení (lyofilizace) proteinu.

Produkcí rekombinantního proteinu lze tedy optimalizovat na několika úrovních:

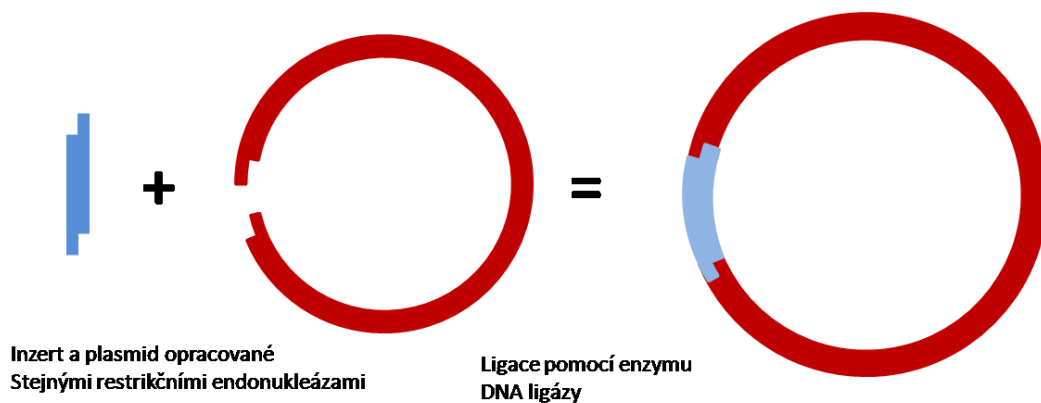
1. Výběr expresního systému a způsobu kultivace
2. Použití purifikační značky tzv. „tagu“
3. Výběr purifikačních metod



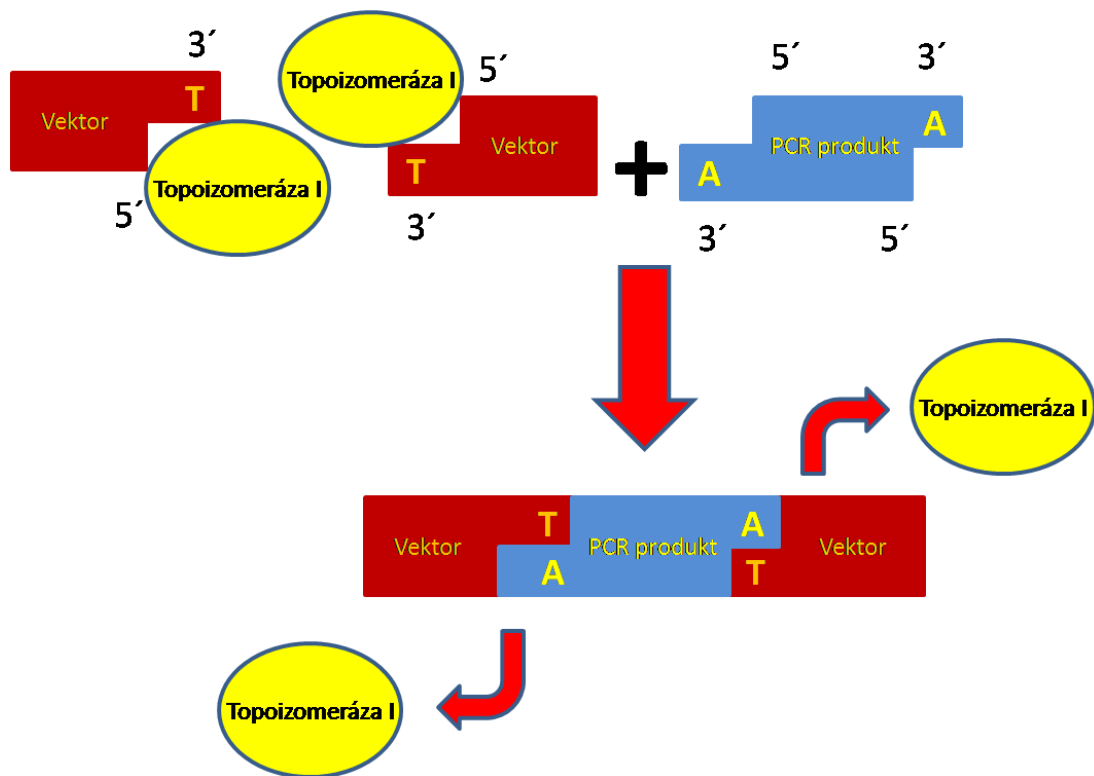
### Obr. 1

Schéma tvorby a struktury rekombinatního plazmidu:

1. Regulační oblast obsahující promotor.
2. „Multiple cloning site“ (polylinker) – úsek DNA obsahující za sebou seřazená místa rozeznávaná restrikčními endonukleázami. Může být následována terminační sekvencí a obsahovat sekvenci pro purifikační značky.
3. Gen rezistence – umožňuje selekci transformovaných hostitelů např. na médiu obsahujícím antibiotikum.
4. Počátek replikace – sekvence umožňující po svém rozeznání iniciaci replikace.
5. Inzert jehož konce jsou opracovány stejnými endonukleázami, které jsou použity k otevření plazmidu.



Obr. 2: Schéma ligace inzertu do plazmidu



**Obr. 3:** Přímé klonování PCR produktu do plazmidu aktivovaného topoizomerázou – „TOPO cloning“

### 3.4 Expresní systémy

Pro úspěšnou produkci rekombinantního proteinu je klíčová volba expresního systému. Nesprávná volba může vést k expresi proteinu s chybnou konfigurací nebo proteinu s nedostatečnými nebo nesprávnými posttranslačními modifikacemi. Je nutné brát v úvahu rozdíly mezi prokaryotickými a eukaryotickými translačními aparáty a je výhodné znát specifika požadovaného proteinu (počet cysteinových můstků, glykosylace, buněčná lokalizace apod.). Na druhou stranu je však nutné brát v úvahu náročnost expresního systému jak po stránce ekonomické tak časové. V dnešní době je již k dispozici široké spektrum expresních organismů, které se dají rozdělit do několika základních skupin:

- 1) Bakteriální expresní systémy
- 2) Kvasinkové expresní systémy
- 3) Expresní systémy využívající hmyzí buňky a bakulovirové vektory
- 4) Savčí tkáňové kultury
- 5) Ostatní – rostliny, bezbuněčné systémy...

Srovnání základních vlastností expresních systémů a posttranslačních modifikací je uvedeno v tabulkách 1 a 2.

**Tab. 1:** Srovnání základních vlastností expresních systémů (upraveno z Yin et al., 2007).

Expresní systém	Náklady na kultivaci	Rychlost růstu	Úroveň exprese	Konformace proteinu
<i>E. coli</i>	nízké	vysoká	vysoká	často nutný refolding
Kvasinky	nízké	vysoká	nízká až vysoká	někdy nutný refolding
Hmyzí buňky	vysoké	nízká	nízká až vysoká	většinou správná
Savčí buňky	vysoké	nízká	většinou nízká	většinou správná

**Tab. 2:** Srovnání posttranslačních modifikací proteinů exprimovaných v jednotlivých expresních systémech (upraveno z Yin et al., 2007).

Expresní systém	Posttranslační modifikace					
	N-glykosylace	O-glykosylace	Fosforylace	Acetylace	Acylace	$\gamma$ -karboxylace
<i>E. coli</i>	chybí	-	-	-	-	-
Kvasinky	vysoce manosilované glykany	+	+	+	+	-
Hmyzí buňky	jednoduchá, bez sializace	+	+	+	+	-
Savčí buňky	komplexní	+	+	+	+	+

### 3.4.1 Bakteriální expresní systémy

Hlavními výhodami exprese rekombinantních proteinů v bakteriálních buňkách je jejich snadná kultivace, krátký generační čas a snadná tvorba klonu nesoucího expresní vektor. Nejčastěji používanou produkční bakterií je *E. coli*, jejíž další výhodou je široké spektrum použitelných plasmidů nesoucích celou řadu značek použitelných pro detekci a purifikaci proteinu a výběr expresních i klonovacích linií. Nevýhodou zůstává častá tvorba proteinů ve formě inkluzních tělísek, z nichž je nutné protein izolovat za použití denaturačních metod a následně protein renaturovat. Izolace proteinu z inkluzních

tělisek poskytuje sice většinou protein o vysoké čistotě a koncentraci, jeho renaturace však bývá často problematická a ne vždy úspěšná. Tento problém lze řešit připojením sekreční značky, která vznikající protein směřuje do periplazmatického prostoru nebo do kultivačního média. Sekrece do média je ale omezena velikostí proteinu a nízkou kapacitou sekrečního systému (Mergulhao et al, 2005).

V současné době je k dispozici široké spektrum kmenů odvozených od *E. coli* kmene K12 nebo *E. coli* kmene B, které dodává několik komerčních výrobců. Je také možné použít speciální kmeny podporující vznik disulfidických můstků v cytoplasmě, určené k expresi eukaryotických či toxických proteinů (Tab. 3).

Druhou nejpoužívanější skupinou bakterií používaných při expresi rekombinantních proteinů jsou grampozitivní tyčinky rodu *Bacillus*. Oproti *E. coli* má *Bacillus* výhodu v absenci lipopolysacharidu, pyrogenní složky stěny gramnegativních bakterií, která po zlyzování bakteriálních buněk kontaminuje proteinový produkt a pro aplikace jako je parenterální podání do savčího organismu či použití v tkáňových kulturách je třeba ji pracně odstraňovat. Další výhodná vlastnost je vyšší výskyt kodonů, které se u *E. coli* objevují v nízké frekvenci, tj. AGG, AGA, CUA, AUA, CCC a CGA, a mohou tak limitovat míru exprese heterologních proteinů. Rod *Bacillus* má ve srovnání s *E. coli* velkou sekreční kapacitu a je možná exprese přímo do kultivačního média (Terpe, 2006). Nejvíce používaným zástupcem rodu je *B. subtilis* využívající účinnou sekreční cestu Sec-SRP a méně se uplatňující sekreční cesty Tat (twin-arginine translocation) a ABC (ATP-binding cassette transporters). Zpočátku byla sekrece komplikována vysokou produkcí extracelulárním proteáz, ale problém byl časem vyřešen vytvořením kmenů deficientních v genech jedolivých proteáz – v prvním deficientním kmeni neutrální (*nprE*) a serin (*aprA*) proteázy (Kawamura and Doi, 1984), čtyř proteáz - *nprE*, *aprA*, *epr* a *bpf* v kmeni DB428 (He et al, 1991), šesti proteáz - *nprE*, *aprA*, *epr*, *bpf*, *mpr* a *nprB* v kmeni WB600 (Wu et al, 1991), a všech osmi extracelulárních proteáz popsanych u *B. subtilis* v kmeni WB800 (Murashima et al. 2002). V kombinaci s *B. subtilis* byla popsána celá řada promotorových systému, např. vegetativní promotor *vegI*, xylózový inducibilní promotor nebo tetracyklinový inducibilní promotor (Ref. in Terpe, 2006). Nevýhodou *B. subtilis* zůstává obtížnější transformace a její nižší efektivita. Kromě *B. subtilis* se ze zástupců rodu *Bacillus* v menší míře používá ještě *B. megaterium* a *B. brevis*. Kromě *E. coli* a rodu *Bacillus* byla publikována řada prací o produkci rekombinantních proteinů v dalších bakteriálních druzích, např. grampozitivní půdní bakterii *Streptomyces lividans* (Koller et al, 1989), grampozitivních bakteriích

využívaných v potravinářství *Lactococcus lactis* (Linears et al, 2010) a *Corynebacterium glutamicum* (Date et al, 2006), gramnegativních tyčinkách *Pseudomonas aeruginosa* (Derouazi et al, 2008), metylotrofních bakteriích *Methylobacterium extorquens* (Belanger et al, 2004) nebo grampozitivních bakteriích *Staphylococcus carnosus* (Dilsen et al, 2000; Hansson et al, 2002).

V budoucnu lze pravděpodobně očekávat rozvoj komerčně dostupných bakteriálních expresních systémů založených na jiných druzích než *E. coli*. Hlavní výhodou takových systémů by byla sekreční exprese, která by zvýšila efektivitu systému a umožnila by vyhnout se purifikačním krokům nutným k odstranění lipopolysacharidu.

**Tab. 3:** Expresní kmeny *E. coli* určené k expresi eukaryotických nebo cytotoxických proteinů

<b>Origami</b>	Kmen odvozený z <i>E. coli</i> K-12 mutantní v genu pro thioredoxin reduktázu ( <i>trxB</i> ) a glutathion reduktázu ( <i>gor</i> ), zvyšuje tvorbu cysteinových můstků v cytoplasmě
<b>Rosetta</b>	Obsahuje sekvence pro tRNA pro kodony AUA, AGG, AGA, CUA, CCC a GGA vzácné u <i>E. coli</i>
<b>Rosetta – gami</b>	Kombinuje vlastnosti obou předchozích kmeny, tj, tvorbu disulfidových můstků s rozeznáváním eukaryotických kodonů
<b>BL21(DE3)pLysS</b>	Snížená úroveň bazální exprese, kmen určen pro expresi toxických proteinů

### 3.4.2 Kvasinkové expresní systémy

Kvasinkové expresní systémy nacházejí široké využití při expresi proteinů hlavně eukaryotického původu, jejichž produkce v prokaryotických systémech bývá často problematická. Spojují snadnou genetickou manipulaci a kultivaci se schopností posttranslačně modifikovat a sekretovat tvořený produkt (Böer et al, 2007).

Prvním eukaryotickým organismem použitým pro expresi rekombinantního proteinu se stala pekařská kvasinka druhu *Saccharomyces cerevisiae*. Ta našla široké uplatnění při biotechnologické výrobě farmaceutických produktů jako je inzulin, somatotropin, glukagon, hirudin a hlavně HBsAg antigen používaný pro vakcinaci proti hepatitidě B (Mishra a Baranwal, 2009). Výhodou této kvasinky je její bezpečnost (je zařazena na seznamu mikroorganismů „Generally Recognised and Safe“) a snadná kultivace, nevýhodou je vysoká produkce sekundárních metabolitů, které limitují dosažitelnou

buněčnou denzitu. Problémem může být typ N-glykosylace. *S. cerevisiae* tvoří hypermanosilované glykoproteiny obsahující terminální molekuly manózy spojené vazbou  $\alpha$  1,3, které mohou vyvolat u člověka imunologickou reakci. K transformaci *S. cerevisiae* se používají dva základní typy vektorů – epizomální (plazmid YEp) nebo integrující plazmid YIp, který poskytuje po integraci do chromozomu stabilní transformanty. Pro kontrolu exprese se obvykle používají promotory alkohol dehydrogenázy nebo enzymů metabolismu galaktózy (Mishra a Baranwal, 2009; Böer et al, 2007).

Postupem času *S. cerevisiae* odsunul do pozadí jiný kvasinkový druh – *Pichia pastoris*. Tento metyltrofní organismus je možno kultivovat ve velmi vysoké denzitě a má velkou sekreční kapacitu. Od *S. cerevisiae* se liší hlavně typem N-glykosylace. Glykany připojované k aminokyselinám obsahují jen 8 – 17 molekul manózy zatímco glykany *S. cerevisiae* obsahují manóz 50 – 150, navíc jsou spojeny pouze vazbou  $\alpha$  1,2 a postrádají tak imunogenní motiv vazbou  $\alpha$  1,3 terminálně připojené manózy (Trimble et al, 1991; Gemmill a Trimble, 1999; Celik et al, 2007). Proteiny jsou kvasinkou syntetizovány intracelulárně nebo sekretovány do média, pokud je k nim připojen sekreční signál, např. alpha mating factor secretion signal sequence ( $\alpha$ MF). Pro snížení proteolytické degradace produktu byly připraveny kmeny s mutovaným genem *PEP4*, který je zodpovědný za aktivaci vakuolárních proteáz (Cregg et al, 2009). Transformace se provádí pomocí integrujících vektorů, takže vznikají kmeny stabilně nesoucí vložený inzert. Exprese proteinu je většinou regulovaná promotorem genu alkohol oxidázy (AOX), který umožňuje indukci pomocí přídatku metanolu do média. Zmíněné vlastnosti tak činí z *P. pastoris* nejvýhodnější používaný kvasinkový expresní systém. Kromě dvou výše zmíněných druhů byly k produkci rekombinantních proteinů použity i další druhy kvasinek jako je *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica*, *Candida boidinii*, *Kluyveromyces lactis*, *Blastobotrys adenivorans* nebo *Yarrowia lipolytica*, avšak v menším měřítku (Böer et al, 2007; Cregg et al, 2009).

### **3.4.3 Expresní systémy využívající hmyzí buňky a bakulovirové vektory**

Tyto expresní systémy jsou založeny na infekci kultivovaných hmyzích buněk rekombinantním dvouvláknovým DNA virem - *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) nesoucím gen pro tvorbu cílového proteinu. Jako



produkční organismus jsou využívány kultury ovariálních buněk motýlů druhu *Spodoptera frugiperda* (kmeny Sf9 a Sf21) nebo *Trichoplusia ni* (kmen High Five™)(Jarvis, 2009). Gen pro tvorbu proteinu je tak do produkčních buněk přechodně vnášen formou infekce bakulovirem a nedochází ke stabilní transfekci. Příprava rekombinantní bacmidové DNA se provádí v bakterii *E. coli*. Nejnáročnějším krokem se tak stává tvorba a udržování suspenze rekombinovaných virů. Tento expresní systém je obecně vhodný pro expresi proteinů pocházejících z vyšších eukaryot. Hmyzí buňky jsou schopny O-glykosylace podobně jako buňky savčí, ne vždy však rozeznávají stejnou signální aminokyselinou glykosylační sekvenci. N-glykosylace probíhá většinou prostřednictvím manosilovaných krátkých glykanů a liší se tak od savčí glykosylace. Problém byl vyřešen konstrukcí kmene hmyzích buněk nesoucího stabilně geny několika savčích glykosyltransferáz a tvořícího tak glykany podobné savčím. Kmen je komerčně dostupný pod názvem Mimic™ Sf9 (Jarvis et al, 1998). Bakulovirový expresní systém je ve srovnání s bakteriálním a kvasinkovým již výrazně náročnější jak po stránce časové a pracovní, tak po stránce finanční a používá se proto především pro aplikace, kde je podmínkou správná posttranslační modifikace eukaryotického proteinu. Nevýhodné je také to, že buňky nejsou schopny kontinuální produkce proteinu a pro každou dávku exprimovaného proteinu je třeba infikovat čerstvé buňky. Ve srovnání s předešlými systémy má bakulovirový systém také obvykle výrazně nižší výtěžnost (Yin et al, 2007).

#### **3.4.4 Savčí tkáňové kultury**

Savčí expresní systémy jsou nejvhodnější pro produkci savčích a lidských proteinů, protože jen tyto systémy jsou schopny, na rozdíl od předchozích evolučně nižších systémů, zajistit adekvátní posttranslační modifikace, jako je O- a N-glykosylace, acetylace, acylace, fosforylace a další. K expresi se používají virově immortalizované nebo z tumorů odvozené buněčné linie. Pro produkci rekombinantního proteinu se používají dva metodické přístupy – přechodná (transientní) nebo stabilní transfekce. Při stabilní transfekci dochází k integraci cílového genu do genomu produkční buňky a získáváme tak stabilně exprimující linii, ale za cenu vysoké časové náročnosti transfekce a následné selekce nejlépe exprimujících klonů. Přechodná transfekce je výhodná svojí nižší náročností na čas i pracnost, ale výtěžek je omezen jednorázovou

expresí. Pro přechodnou expresi se používají především tři buněčné linie HEK-293 (**H**uman **E**mbrionic **K**idney 293 cells), COS (CV-1 [simian] in **O**igin, and carrying the SV40) a BHK (**B**aby **H**amster **K**idney). Pro transfekci plasmidy, zpravidla namnoženými v *E. coli*, se používají různá vehikula umožňující vstup do buňky (fosforečnan vápenatý, polyethylenimin, DEAE dextran, liposomy) nebo elektroporace, nebo lze využít transfekci virovými vektory (Alphavirus, Adenovirus, Vaccinia) (Wurm a Bernard, 1999).

Pro stabilní transfekci se používají linearizované vektory, umožňující za využití podobných metod jako u transientní transfekce vstup transgenní sekvence do jádra a její rekombinaci do genomové DNA. Efektivní je také využití retrovirových vektorů. Pro zajištění vysoké exprese je možné amplifikovat DNA transgen pomocí recesivní selekce například použitím konstruktů obsahujícího dihydrofolát reduktázu v kombinaci s buněčnou linií deficientní v tomto enzymu za přítomnosti metotrexátu (Kingston et al, 2002). Jako první byla ke stabilní transfekci použita linie CHO (**C**hinese **H**amster **O**vary)(Davis et al, 1990). Tato linie je v současnosti vedle *E. coli* a kvasinkových organismů hlavním zdrojem rekombinantních proteinů používaných v humánní medicíně, jako jsou faktory krevní srážlivosti (faktory VIII a IX), antikoagulans (plasminogen aktivátory), hormony (folikuly stimulující hormon, luteinizační hormon, erythropoetin), cytokiny (interferon  $\beta$ ), specifické protilátky (ibritumomab, efalizumab, bavacizumab), enzymy (glukosidáza, sulfatáza, galaktosidáza, DNása...)(Walsh, 2006). Ačkoliv proteiny exprimované v savčích buňkách mají pro humánní použití nejpřesnější posttranslační modifikace, ukazuje se, že glykosylace proteinů je závislá na typu a původu expresních buněk a může tak být různá podle použité linie (Raška et al, 2010). Nevýhodou savčích expresních systémů zůstávají vysoké náklady na jejich kultivaci v kombinaci s nižší výtěžností a nebezpečí kontaminace kultury lidskými patogeny (Yin et al, 2007).

### 3.4.5 Ostatní

Kromě výše uvedených expresních organismů jsou v menším měřítku používány pro vývoj terapeutických proteinů i organismy další, zatím však pouze v experimentální fázi.

Pro svoji vysokou sekreční kapacitu dosahující řádově gramy až desítky gramů na litr kultury a glykosylaci podobnou savčí se využívají vláknité houby jako *Aspergillus niger*, *Aspergillus Awamori*, *Chrysosporium lucknowense*, *Acremonium chrysogenum* nebo *Trichoderma reesei* (Ward et al, 2006; Demain a Vaishnav, 2009). Druhy *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus foetidus* a *Chrysosporium lucknowense* jsou úspěšně používány k produkci enzymů pro průmyslové použití (web firmy Dyadic Netherlands, www.dyadic.nl). Druh *Aspergillus niger* byl úspěšně použitý v experimentu k sekreci monoklonálních protilátek s terapeutickým potenciálem (Ward et al, 2004). Obecně výhodou využití vláknitých hub je jejich kultivační nenáročnost a vysoká sekreční kapacita, která ale bývá často vyvážena vysokou produkcí proteolytických enzymů (Demain a Vaishnav, 2009).

Jako slibné se jeví i využití protozoálního parazita *Leishmania tarentolae* z řádu Trypanozom. Tento pro savce nepatogenní organismus je schopen glykosylace podobné jako u savců, včetně biantenárních N-glykanů. Nevýhodou zůstává požadavek na komplexní růstové médium, např. Brain Heart Infusion broth a ve srovnání s bakteriemi pomalejší růst (Basile and Peticca, 2009; Breton et al, 2007). K dispozici je již komerční expresní systém založený na využití *Leishmania tarentolae* – systém Lexy firmy Jena Bioscience.

Pro tvorbu nanogramového až mikrogramového množství proteinu v laboratorním měřítku se osvědčily bezbuněčné expresní systémy, založené na použití buněčných lyzátů bez přítomnosti živých buněk, které eliminují nutnost tvorby a selekce buněčných linií a umožňují expresi toxických proteinů nebo jejich radioaktivní značení inkorporací značených aminokyselin. Vyvinuty byly systémy založené na extraktu *E. coli*, extraktu *Leishmania tarentolae*, lyzátu králičích retikulocytů nebo extraktu pšeničného klíčku (Endo a Sawasaki, 2006; Kovtun et al, 2010). Několik bezbuněčných expresních systémů lze již získat komerčně, např. Expressway™ firmy Invitrogen nebo TNT® firmy Promega.

Dalším nadějným směrem je exprese rekombinantních proteinů v transgenních rostlinách. První práce na toto téma se objevují již na konci osmdesátých let (Keller et al, 1989). Rostlinné expresní systémy by mohly být přínosem díky nízkým nákladům na pěstování a poměrně jednoduchému převedení z laboratorního do průmyslového měřítko, zjednodušeně řečeno, čím víc potřebujeme proteinu, tím víc nasadíme rostlin bez nutnosti optimalizace velkoobjemových fermentačních technologií. Podobně jako u savčích kultur tak i u rostlin lze použít metody stabilní nebo přechodné transfekce.

Stabilní linie lze tvořit vnesením genu do jádra rostlinných buněk pomocí „genového děla“ nebo vektorů odvozených od Ti plasmidu bakterie *Agrobacterium tumefaciens in vitro* a následnou regenerací celé rostliny. Přechodnou expresi lze navodit infekcí rostlin transgenním virem (např. tobacco mosaic virus) nebo bakterií *A. tumefaciens* nesoucí rekombinovaný Ti plasmid (Casper a Holt, 1998; Desai et al, 2010). Ačkoliv na trh dosud nebyl uveden žádný terapeutický rekombinantní přípravek pocházející z rostlin, celá řada proteinů je v pokročilých fázích testování, např. monoklonální protilátka proti bakterii *Streptococcus mutans* exprimovaná transgenním tabákem určená k prevenci zubního kazu (Wycoff, 2005) nebo lysozym exprimovaný kulturou buněk rýže (Huang et al, 2002). Velké naděje jsou vkládány do produkce „jedlých vakcín“, tj. vakcinačních antigenů produkovaných jedlými rostlinami použitelných pro orální imunizaci proti infekčním chorobám. Tyto produkty by mohly díky vysoké stabilitě a snadnosti aplikace zlepšit úroveň vakcinace zejména v zemích s nízkou ekonomickou úrovní, kde je problematické skladovat a distribuovat klasické vakcíny vyžadující uchovávání v chladu a k jejichž aplikaci je potřeba kvalifikovaný personál (Boehm, 2007).

Zatím jen experimentální význam má exprese rekombinantních proteinů za využití geneticky modifikovaných obratlovců. Strategie spočívá ve využití přirozené sekrece proteinů živočichy a směřování exprese do mléčné žlázy užitkových zvířat za využití regulačních elementů mléčného proteinu (Clarck, 1998). Produkt by tak mohl být ve vysoké kvantitě izolován z mléka transgenních zvířat. Alternativní možností by byla produkce rekombinantního proteinu ve vaječném bílku vajec geneticky modifikované drůbeže (Ivarie, 2006). Tyto metody mají velký potenciál především ve farmaceutickém průmyslu, kde by mohly najít uplatnění při produkci terapeutických přípravků ve velkoobjemovém měřítku. Kromě technologických problémů se však pravděpodobně v budoucnu budeme potýkat hlavně s bariérami legislativními a etickými. Problémem by také mohla být možnost kontaminace potenciálně imunogenními nebo alergizujícími zvířecími proteiny či pro člověka patogenními viry, podobně jako při izolaci proteinu ze zvířecích tkání, což by vyžadovalo pečlivé testování a kontrolu především parenterálních přípravků.

### 3.5 Izolace, purifikace a charakterizace rekombinantních proteinů

Pro produkci rekombinantních proteinů určených pro medicínské využití je důležité získat produkt o vysoké čistotě, neobsahující nežádoucí kontaminanty, ať už nízkomolekulární, které by mohly působit toxicky, tak vysokomolekulární, kde častěji než přímý toxický účinek může být problémem imunogenita nebo obecně nežádoucí imunomodulační účinek. Dále musí být produkt dobře charakterizovaný co se týče koncentrace, stability, čistoty apod.

#### 3.5.1 Dezintegrace biomasy

Obecně je technologicky jednodušší purifikace proteinů exprimovaných v sekretované formě do kultivačního média. Po separaci média od produkčních buněk tak lze získat rozpustný protein v poměrně vysoké čistotě, zvláště pokud je použito bezproteinové médium. Produkt je většinou přímo z média izolovatelný pomocí chromatografických nebo precipitačních metod. Izolace proteinů exprimovaných intracelulárně bývá značně pracnější. V prvním kroku je nutné zlyzovat produkční buňky pomocí fyzikálních, chemických nebo enzymatických metod, nejčastěji však jejich kombinací.

Z fyzikálních metod lze použít sonikaci ultrazvukem, působení tlaku v přístroji French press případně střížných sil v různých typech mechanických mlýnku a homogenizátorů nebo zvýšeným či sníženým osmotickým tlakem. Při sonikaci a mechanických dezintegračních metodách je třeba zajistit dostatečné chlazení, protože zde dochází k zahřívání vzorku, které by mohlo vést k denaturaci cílového proteinu.

Chemickými metodami lze narušit buněčnou membránu přidávkem detergentů nebo chelátorů do lyzačního pufru, případně pomocí organických rozpouštědel. Je však třeba myslet na následné purifikační kroky, s nimiž mohou některé látky interferovat (např. EDTA ve vyšší koncentraci znemožňuje použití metaloafinitní chromatografie).

Enzymatické metody je nutné volit podle expresního organismu, pro lýzu bakterií lze užít lysozym (muramidáza), pro lýzu kvasinek lytikázu nebo zymolázu (glukanázy). Je možné také využít komerčně dostupné vysoce účinné rekombinantní enzymy jako fágové lysozymy rLysozyme™ a Ready-Lyse™, nespecifické nukleázy jako Benzonase® a OmniCleave™, nebo lysozymo-nukleázové koktejly Liquisonic™, Lysonase™, EasyLyse™, které mají mnohonásobně vyšší efektivitu než klasicky používaný lysozym z vaječných bílků a pankreatická DnazaI (Grabski, 2009). Podobně

jsou dostupné komerční přípravky pro chemickou lýzu založenou na obsahu detergentů jako BugBuster®, B-Per®, PopCulture™ a FastBreak™, které jsou použitelné samostatně, nebo v kombinaci s výše uvedenými enzymy (Grabski et al, 1999; Grabski, 2009). Tyto produkty sice zvyšují výnosnost izolace, ale až mnohonásobně zvyšují jeho finanční náročnost a jsou tak použitelné hlavně v experimentálním měřítku.

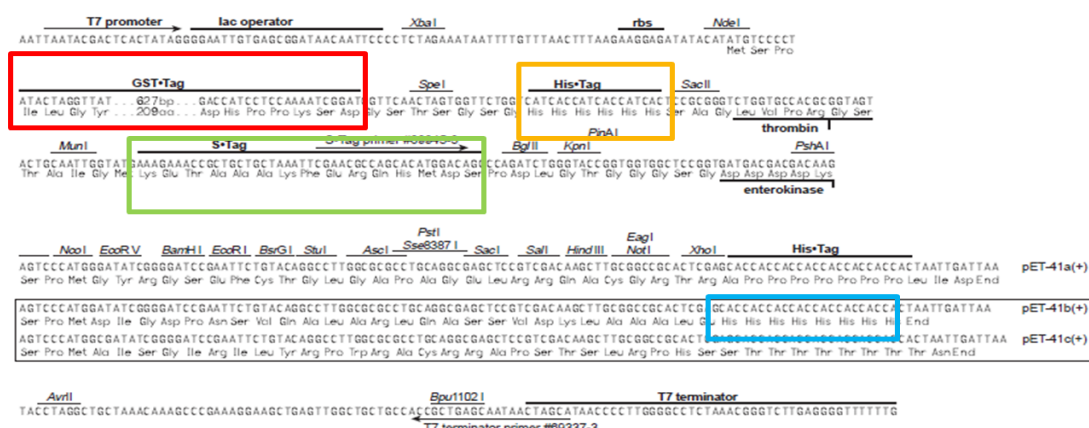
Při všech lyzačních postupech dochází k destrukci buněk a uvolnění jejich obsahu včetně proteolytických enzymů. Proto je vhodné do lyzačního pufru přidávat inhibitory proteáz, které v průběhu dezintegrace i dalších kroků zabrání degradaci produktu. Používají se směsi specifických inhibitorů serinových (Aprotinin, Benzamidin, fenylmetylsulfonyl fluorid, Leupeptin), cysteinových (E-64, Leupeptin), metalo- (EDTA) a aspartátových (Pepstatin A) proteáz. Ve finálním produktu určeném pro experimentální či terapeutickou aplikaci již ale inhibitory proteáz nesmí být obsaženy vzhledem k možnému toxickému působení většiny z nich.

Specifickým problémem je izolace proteinů produkovaných bakterií *E.coli* ve formě nerozpustných inkluzních tělísek – proteinových agregátů s nesprávnou konformací. Literární údaje udávají, že ve formě inkluzních tělísek se exprimují až tři čtvrtiny proteinů exprimovaných v *E.coli*, hlavně proteiny eukaryotického původu. Důvod vzniku inkluzních tělísek dosud není plně objasněn, ale předpokládá se, že proteiny jsou exprimovány ve větším množství, než jaká je kapacita bakteriální buňky pro jejich správné skládání. Inkluzní tělíška lze získat z buněk jejich zlyzováním, centrifugací a promytím pelety roztokem Tritonu X-100 nebo deoxycholátu. K solubilizaci inkluzních tělísek je nutno použít denaturační prostředky – chaotropní činidla (8 M močovina, 6 M guanidin) nebo detergenty (SDS, sarkosyl) a redukční činidla (merkaptoetanol, ditiotreitol). Je tak možné získat protein o vysoké koncentraci a čistotě, avšak v denaturované formě. Protein s nativní konformací lze získat renaturací, která však má u různých proteinů rozdílnou efektivitu a někdy není vůbec možná. Při renaturaci jsou solubilizační činidla odstraněna a nahrazena puftrem, jenž podporuje správné složení proteinu do aktivní formy a umožňuje následné použití proteinu, tj. má pokud možno fyziologické pH a osmotický tlak. Mezi základní metodiky renaturace patří dialýza (prostá nebo gradientová) a diluční metoda, kdy je protein po malých dávkách přidáván do nadbytku renaturačního pufru za intenzivního míchání. Odstranění solubilizačních činidel a jejich nahrazení nativním puftrem může být také provedeno přímo na koloně při afinitní purifikaci, kdy eluován je již refoldovaný protein. Do renaturačních pufrů se často přidávají aditiva snižující agregaci proteinů a/nebo usnadňující tvorbu

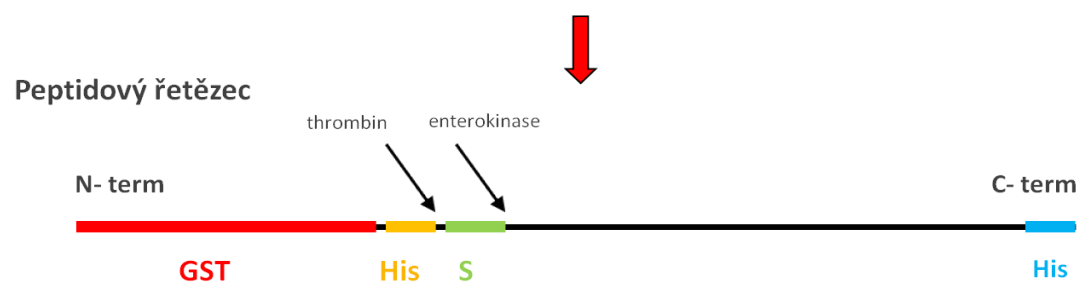
disulfidických vazeb. Patří mezi ně hlavně arginin (0,5 – 1M), glycerol, oxidovaný a redukovaný glutathion, dithiotreitol, polyethylen glykol, detergenty nebo EDTA. Efektivita aditiv je jen obtížně predikovatelná a jejich účinnost je nutno ověřovat empiricky. Je také možno zakoupit komerční „refoldovací kity“ obsahující různé koncentrace a poměry aditiv, které mohou poskytnout za spotřeby minima vzorku cenné informace pro refolding ve větším měřítku. Produkce rekombinantních proteinů do inkluzních tělísek může být v některých případech výhodná, protože protein je obvykle získán ve vysoké koncentraci. Pokud se však chceme tvorbě inkluzních tělísek vyhnout, lze tak učinit zpomalením exprese kultivací při nižší teplotě nebo fúzováním proteinu s některou ze solubilitu zvyšujících proteinových značek (viz Tab. 4).

### **3.5.2 Purifikace rekombinantních proteinů**

Pro purifikaci rekombinantních proteinů se používají nejčastěji různé chromatografické metody (chromatografie afinitní, iontoměničová, gelová permeační nebo hydrofobní chromatografie) případně metody precipitační. Na následnou purifikaci je třeba myslet již při konstrukci rekombinantního plasmidu. Expresní plasmidy totiž obsahují sekvence pro purifikační a/nebo detekční značky, tzv. tagy, případně polypeptidové sekvence ovlivňující rozpustnost. Značky mohou být obsaženy v kombinacích umožňujících dvoukrokovou afinitní purifikaci. Některé plasmidy obsahují i sekvence rozeznávané endoproteázami, což umožňuje odstranění značek z purifikovaného proteinu. Schéma přepisu těchto nukleotidových sekvencí do proteinového řetězce je uvedeno na obr. 4.



**pET-41a(+) cloning/expression regions**

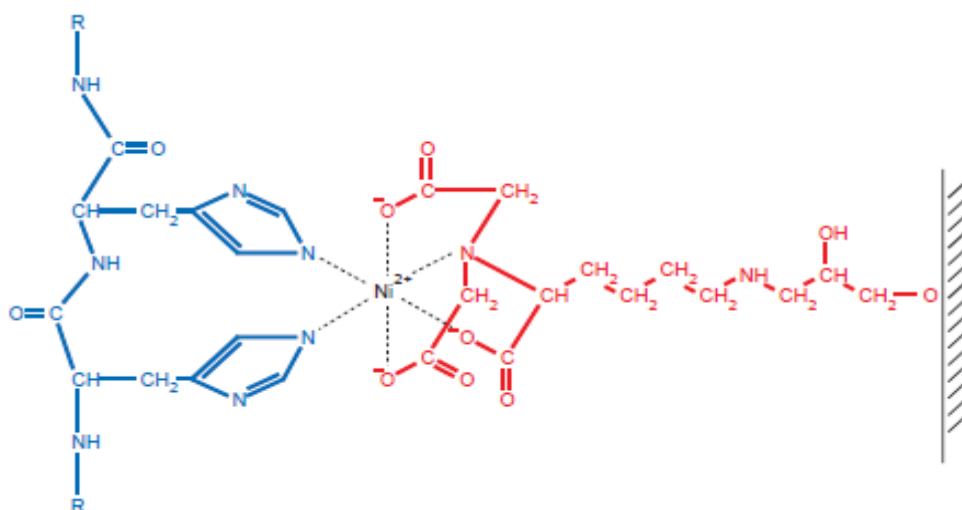


Obr. 4: Schéma prepisu nukleotidové sekvence proteinu z plasmidu obsahujícího větší množství fúzních značek (pET41 firmy Novagen)

Afinitní chromatografie bývá obvykle prvním krokem v purifikačním protokolu, protože umožňuje svou vysokou specifitou pevné navázání cílového proteinu a odmytí ostatních složek buněčného lyzátu nebo kultivačního média. Umožňuje tak v jediném kroku získat produkt o poměrně vysoké čistotě a zároveň produkt výrazně zakoncentrovává. Jako první byla použita značka zvaná FLAG, hydrofilní sekvence 8 aminokyselin rozeznávaná monoklonální protilátkou. Tato protilátka umožňuje detekci a identifikaci rekombinantního fúzního proteinu a při immobilizaci na vhodnou matici i jeho purifikaci (Hopp et al, 1988). Daleko větší popularity se však dostalo značce složené ze sekvence několika po sobě následujících histidinů nazvané His-tag (Janknecht et al, 1991). Histidinová sekvence má výraznou afinitu k iontům přechodných kovů jako jsou  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  nebo  $Zn^{2+}$ . Tato vlastnost se stala základem metody IMAC (Immobilized metal ion affinity chromatography) využívající immobilizace kovových iontů na agarózovou matici pomocí chelatační vazby s kyselinou imidodiocetovou (IDA) nebo kyselinou nitrilotriocetovou (NTA)(Porath et al, 1975; Zouhar, 1999) Taková matrice je použitelná pro purifikaci His-tagem značených



proteinů za nativních i denaturačních (v přítomnosti močoviny nebo guanidinu) podmínek s výtežkem v řádu až desítek mg proteinu na ml matrice. Eluci navázaného proteinu lze provést kompetitivně pufrům s vysokou koncentrací imidazolu nebo přerušáním vazby mezi proteinem a kovem snížením pH nebo zvýšením iontové síly elučního pufru. Nejpoužívanější afinitní matricí je kombinace NTA-Ni<sup>2+</sup> agaróza díky své vysoké afinitě k His-tagu. Menší afinitu ale větší specifitu než Ni<sup>2+</sup> má Co<sup>2+</sup>. Kromě His-tagem značených proteinů se totiž vždy v určité míře váží i proteiny pocházející z produkčního organismu obsahující přirozeně se vyskytující histidinové repetice (např. glukosamin-6-fosfát syntáza nebo peptidyl prolin cis-trans izomeráza) nebo mající obecně afinitu ke kovům (např. Ferric uptake regulator nebo metal-binding lipocalin). Konkrétní postup a použití nejvhodnějšího kovového iontu je tak třeba optimalizovat pro každý protein zvlášť, vzhledem k jejich rozdílným fyziologickým vlastnostem (Bolanos-Garcia a Davies, 2006). Plasmidy obsahující sekvence His-tagu a chromatografické produkty založené na chelátové vazbě kovových iontů (chelatační polysacharidové matrice, předplněné kolony, kolony pro FPLC) jsou již dlouhou dobu komerčně dostupné od celé řady výrobců. Modifikací His-tagu jsou HAT-tag a MAT-tag, které mají mezi molekuly histidinu vložené další aminokyseliny (viz Tab. 3).



Obr.5. Schéma vazby histidinové značky na Ni-NTA (převzato z manuálu k Ni-NTA Agarose firmy Quiagen)

Kromě již zmíněných značek se běžně využívá celá řada dalších fúzních sekvencí, které lze rozdělit podle velikosti na peptidové značky (Tab. 4) a doménové nebo proteinové značky (Tab. 5). Tyto značky mají své specifické ligandy použitelné v imobilizované podobě pro afinitní purifikaci, případně jsou rozeznávány specifickými monoklonálními protilátkami a jsou tak použitelné především pro detekci značeného proteinu nebo pro imunoafinitní purifikaci, která je však metodicky a materiálně náročnější než např. IMAC. Některé z používaných proteinových fúzních sekvencí nejsou přímo používány pro detekci nebo purifikaci proteinů, ale především pro zlepšení rozpustnosti a stability vznikajícího rekombinantního proteinu a zabraňují tak např. vzniku inkluzních tělísek v *E. coli*. Pro purifikaci se k těmto sekvencím přidává ještě další, většinou krátký peptidový tag.

**Tab. 4:** Peptidové značky (Terpe, 2003; Malhotra, 2009)

Značka	Sekvence	Ligand
<b>Calmodulin binding peptide</b>	Lys-Arg-Arg-Trp-Lys-Lys-Asn-Phe-Ile-Ala-Val-Ser-Ala-Ala-Asn-Arg-Phe-Lys-Lys-Ile-Ser-Ser-Ser-Gly-Ala-Leu	Calmodulin
<b>C-myc</b>	Glu-Gln-Lys-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu	Spec. protilátka
<b>FLAG-Tag</b>	N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C	Spec. protilátka
<b>HA-tag</b>	Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala	Spec. protilátka
<b>HAT-tag</b>	Lys-Asp-His-Leu-Ile-His-Asn-Val-His-Lys-Glu-Phe-His-Ala-His-Ala-His-Asn-Lys	Kovové ionty
<b>His-tag</b>	His-His-His-His-His-His	kovové ionty
<b>MAT-Tag</b>	N-His-Asn-His-Arg-His-Lys-His	kovové ionty
<b>Poly-arginine-tag</b>	Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg	Iontoměnič
<b>SBP-tag</b>	Met-Asp-Glu-Lys-Thr-Thr-Gly-Trp-Arg-Gly-Gly-His-Val-Val-Glu-Gly-Leu-Ala-Gly-Glu-Leu-Glu-Gln-Leu-Arg-Ala-Arg-Leu-Glu-His-His-Pro-Gln-Gly-Gln-Arg-Glu-Pro	Streptavidin
<b>S-tag</b>	Lys-Glu-Thr-Ala-Ala-Ala-Lys-Phe-Glu-Arg-Gln-His-Met-Asp-Ser	S fragment RNázy
<b>Strep-Tag</b>	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	Streptavidin
<b>T7-tag</b>	Met-Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly	Spec. protilátka
<b>V5-tag</b>	Gly-Lys-Pro-Ile-Pro-Asn-Pro-Leu-Leu-Gly-Leu-Asp-Ser-Thr	Spec. protilátka
<b>Xpress epitope</b>	Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys	Spec. protilátka

**Tab. 5:** Doménové a proteinové značky (Terpe, 2003; Malhotra, 2009; Los, 2008)

Značka	Ligand
<b>Calmodulin-binding domain</b>	Kalmodulin
<b>Celulose binding domain</b>	Celulóza
<b>Glutathione S-transferase tag (GST)</b>	Glutathion
<b>HaloTag® haloalkan dehalogenáza</b>	Haloalkany
<b>Chitin-binding domain</b>	Chitin
<b>Maltose-binding protein (MBP)</b>	Maltóza
<b>Protein A</b>	IgG
<b>IgG doména B1streptokokového proteinu G (GB1)</b>	Nelze využít pro purifikaci, pouze zvyšují rozpustnost a stabilitu
<b>Protein disulfide isomerase I (DsbA)</b>	
<b>Small ubiquitin-like modifier (SUMO)</b>	
<b>Thioredoxin (TrxA)</b>	
<b>Transcription termination anti-termination factor (NusA)</b>	

Ačkoliv krátké peptidové značky, jako je His-tag, většinou výrazněji neovlivňují aktivitu a imunogenitu proteinů, pro některé aplikace je vhodné použít protein bez značky. Výrazně více ovlivňují vlastnosti proteinů značky doménové a proteinové, které je většinou nutné z rekombinantního proteinu odstranit. Z tohoto důvodu bývá v expresním plasmidu obsažena nukleotidová sekvence kódující skupinu aminokyselin rozeznávanou některou endoproteázou. K tomuto účelu se používá několik enzymů – enterokináza (rozeznávající sekvenci Asp-Asp-Asp-Asp-Lys↑), faktor Xa (rozeznávající Ile-Glu-Gly-Arg↑), trombin (Leu-Val-Pro-Arg↑Gly-Ser), PreScission (proteáza lidského rhinoviru 3C, Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln↑Gly-Pro), TEV (tobacco etch virus, Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↑Gly), TVMV (tobacco vein mottling virus protease, Glu-Thr-Val-Arg-Phe-Gln-Gly↑Ser) a SUMO proteáza (katalytická doména Ulp1 rozeznávající a štěpící vazbu Gly-Gly na C-konci sekvence SUMO)(Malhotra, 2009; Jenny et al, 2003). Před použitím těchto enzymů je třeba ověřit, zda sekvence cílového proteinu neobsahuje sekvenci rozeznávanou danou proteázou. Poměrně často se také může objevit nespecifická aktivita enzymu projevující se degradací produktu. Vzhledem k tomu, že je proteiny většinou nutné převést do optimálního pufru pro daný enzym a směs inkubovat při pokojové teplotě, může se u méně stabilních proteinů objevit degradace i bez vlivu použitého enzymu. Kromě toho může být sekvence rozeznávaná enzymem nepřístupná díky konformaci proteinu, navíc je enzymové štěpení nákladné kvůli jednorázovému použití drahých enzymů.

Sofistikovanější, ale dosud nepříliš rozšířené je použití „samosestřížných“ motivů jako systém IMPACT (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag)

firmy New England BioLabs založený na dithiotreiolem indukovatelném štěpení mezi inteinovou značkou a cílovým proteinem. Další systémy založené na použití autokatalytického jádra sortázy A bakterie *Staphylococcus aureus* (SrtAc) nebo domény proteinu FrpC bakterie *Neisserie meningitidis* jsou indukovatelné přidavkem vápenatých iontů (Mao, 2004; Sadilkova et al, 2008). Tyto metodiky umožňují štěpení přímo na afinitní chromatografické koloně a použití odštěpení autokatalytické domény jako elučního kroku. Takto je možné se vyhnout složitějšímu, nákladnějšímu a rizikovějšímu enzymatickému štěpení již eluovaného proteinu.

Pokud afinitní chromatografie neposkytuje produkt o požadované čistotě, lze v dalším kroku použít jiné chromatografické metody. Vhodnou metodou je chromatografie na iontoměničích (iontoměničová, ionexová), která dělí molekuly na základě jejich náboje. Stacionární fázi tvoří matrice s kyselými nebo bazickými funkčními skupinami - iontoměnič. Iontoměniče s bazickými funkčními skupinami (např. DEAE – dietylaminoetyl, TEAE – trietylaminoetyl, Q – kvarterní amin, QAE – kvarterní aminoetyl) se nazývají anexy, s kyselými funkčními skupinami (např. CM – karboxymetyl, SP – sulfopropyl, S - metylsulfonát) katexy. Nosičem funkčních skupin bývají deriváty dextranu (např. Sephadex) nebo agarózy (Sepharosa, Bio-gel). Po absorpci vzorku na matrici se provádí postupná desorpce změnou pH nebo iontové síly pufru a získáváme tak frakce proteinů lišících se pevností vazby na funkční skupiny matrice, tj. i svým povrchovým nábojem. Iontoměničová chromatografie je obecně použitelná nejen k purifikaci proteinů, ale i k jejich zakoncentrování. Další možností je gelová permeační chromatografie, metoda dělicí molekuly na základě jejich velikosti.

Při expresi proteinů určených k parenterální aplikaci v *E. coli* je nutné použít další purifikační krok, určený k odstranění lipopolysacharidu. Jednokroková metaloafinitní purifikace je pro odstranění lipopolysacharidu nedostačující, ale za použití apyrogenních pufrů a chromatografického materiálu lze využít iontoměničovou nebo gelovou permeační chromatografii. Efektivní metodou je také dvoufázová separace za použití detergentu Triton X-114 (Aida et Pabst, 1990).

## 4 Souhrn cílů experimentální části

Předkládaný soubor prací se zabývá přípravou a testováním imunologických vlastností rekombinantních antigenů a imunomodulačních molekul. Práce se zabývají třemi dílčími tématy:

- 1) Povrchové antigeny spirochety *Borrelia burgdorferi*  
Byly připraveny rekombinantní antigeny Outer surface protein (Osp) A a C a testovány možné postupy jejich purifikace.
- 2) Antigenní vlastnosti Heat shock proteinu 90 (Hsp90) kvasinky *Candida albicans*  
Rekombinantní protein Hsp90 byl exprimován v *E. coli* a purifikován jako vysoce čistý a apyrogenní. Tento antigen byl následně testován ve spojení s imunostimulačními molekulami (nor-muramyl dipeptidy).
- 3) Exprese myšího Heat shock proteinu 70 (Hsp70) pro vakcinační experimenty  
Rekombinantní protein Hsp70 byl exprimován v *E.coli* a byly optimalizovány kultivační podmínky k odstranění kontaminujícího proteinu kopurifikovaného při afinitní chromatografii.

### 4.1 Povrchové antigeny spirochety *Borrelia burgdorferi*

Příznaky Lymské boreliózy jsou popisovány různými autory již z přelomu devatenáctého a dvacátého století (Bartůněk, 2006), ale až v roce 1982 došlo k popisu původce popisovaných příznaků – spirochety později nazvané *Borrelia burgdorferi*. Postupně došlo k popisu dalších blízce příbuzných druhů, takže druhová skupina *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) v současnosti čítá dvanáct druhů a je možné, že toto číslo není dosud konečné (Křupka et al, 2007). Z popsáných druhů se jako patogeny na Euroasijském kontinentu uplatňují hlavně tři – *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (s. s.), *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*. Vzácněji jsou hlášeny případy patogenity *Borrelia valaisiana* a *Borrelia lusitaniae*. Na severoamerickém kontinentu se jako patogen uplatňuje pouze *B. burgdorferi* s. s., která byla do Ameriky dle výsledků fylogenetických studií přenesena z Evropy.

*Borrelie* se během svého vývojového cyklu musejí vyrovnat s velmi odlišnými podmínkami okolního prostředí – musí být schopny osídlit trávící trakt klíštěte, po nasátí krve se skrze slinné žlázy klíštěte dostat do krevního oběhu hostitele, zde uniknout imunitním mechanismům hostitele a rozšířit se do cílových orgánů. To je

umožněno přesnou regulací exprese povrchových proteinů, hlavně ze skupiny Outer surface proteins (Osp).

V trávicím traktu klíštěte jsou na povrchu borelií exprimovány hlavně proteiny OspA a OspB, které mají hlavně funkci adhezivních molekul. V průběhu sání krve klíštětem se snižuje exprese těchto proteinů a zvyšuje se exprese OspC, což umožňuje bakteriím opuštění trávicího traktu a přechod do slinných žláz klíštěte. OspC má schopnost vázat imunoregulační protein Salp15 obsažený ve slinách klíštěte a pomáhá tak boreliím přežít imunitní reakci v iniciální fázi infekce hostitele. Během přechodu do diseminované fáze choroby dochází k poklesu exprese OspC a na povrchu borelie se objevuje protein VlsE vyznačující se vysokou antigenní variabilitou, která je podmíněna genovou rekombinací multidoménového VlsE genu. Expresí VlsE borelie aktivně omezuje působení rozvíjející se specifické imunitní odpovědi hostitele a umožňuje přechod do chronické fáze infekce. V těle teplokrevného hostitele borelie dále exprimují molekuly vážící H-faktor zapojený do regulace aktivace komplementové kaskády. Tyto molekuly pomáhají uniknout mechanismům nespecifické imunity. Patří sem povrchové proteiny z rodiny Erp (OspE/F related proteins). Dále borelie exprimují adhezivní molekuly umožňující uchycení v hlavním cíli – pojivové tkáni. Mezi nejvýznamnější se řadí tzv. Decorin binding protein (Dbp) A a B, Fibronectin binding protein (BBK 32) a *Borrelia glycosaminoglycans binding protein* (Bgp). V pozdní fázi infekce se na povrchu borelií znovu objevují adhezivní proteiny OspA a OspB (Křupka et al, 2007; Křupka et al, 2008; Křupka et al, 2011).

Na našem pracovišti jsme izolovali geny *OspA*, *OspB*, *OspC* a *DbpA* druhů *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* a *Borrelia garinii* pomocí cDNA technologie. Sekvence byly zaklonovány do expresních vektorů a jejich pomocí byly transformovány expresní kmeny *E. coli*. Za nativních podmínek jsme však získali proteiny pouze s velice nízkým výtěžkem. Pro purifikaci proteinu OspC bylo nutné použít denaturační izolaci pomocí 8M močoviny s následnou renaturací dialýzou ve fosfátovém pufru. Část výsledků těchto experimentů byla publikována (Běláková et al, 2005 – předkládaná publikace číslo 1; Křupka et al, 2005 – předkládaná publikace číslo 2; Tuháčková et al, 2008 – předkládaná publikace číslo 3).

V další etapě jsme odstranili ze sekvencí OspA, OspC a DbpA *Borrelie burgdorferi* s. s. pomocí PCR (obr. 7) a TOPO klonováním je vložili do plasmidu pET 200. Vložení do expresních kmenů *E. coli* vedlo k expresi proteinů s výtěžkem cca o jeden až dva řády vyšším než při purifikaci proteinů o plné délce při použití stejné metody metaloafinitní

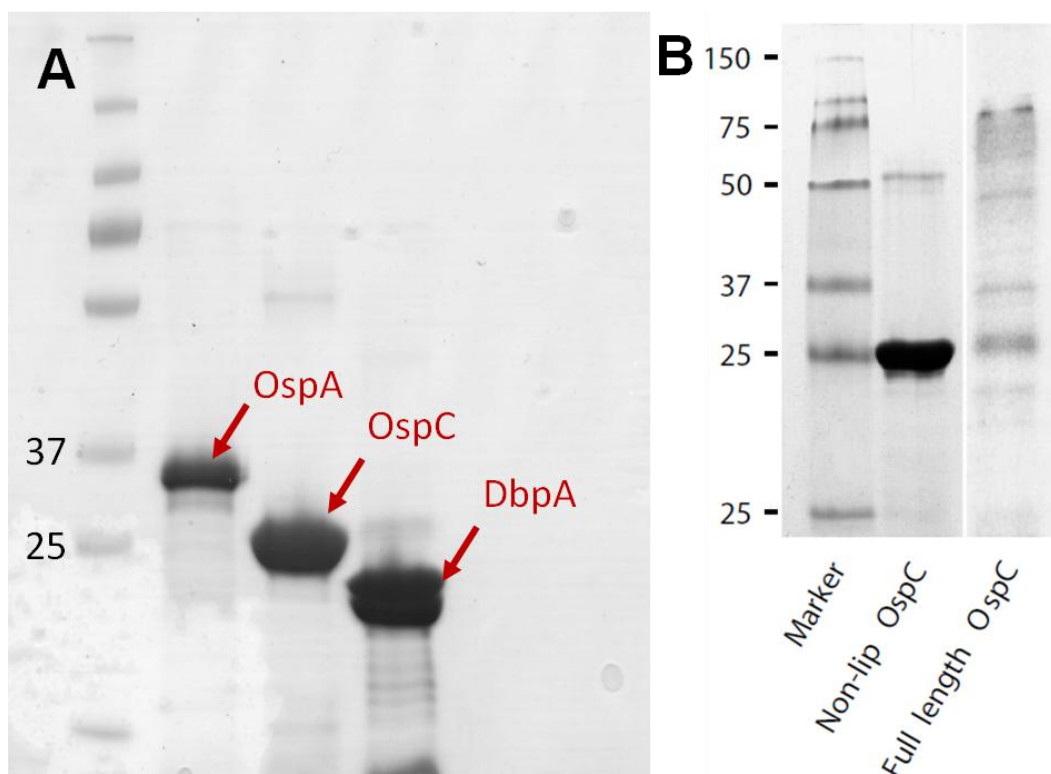
purifikace (viz obr. 8). Experimentálně byla prokázána imunogenita těchto proteinů na myším modelu při použití vhodného adjuvans. Samotné proteiny byly prokázány jako pouze slabé imunogeny (nepublikovaná data).

Zkrácený protein OspC byl následně po depyrogenaci použit jako modelový antigen pro testování imunoregulačních vlastností ve spojení s metalochelatačními nanoliposomy se zabudovanými syntetickými lipofilními deriváty Nor muramyl aminobutyryl dipeptidů. Tento konstrukt v experimentu vykazoval imunostimulační a imunoregulační vlastnosti projevující se hlavně zvýšením produkce specifických protilátek ve třídách IgG2a a IgG3. Získaná data byla prezentována formou dvou posterů a dvou přednášek.

Připravena je také původní časopisecká práce, která v je v současné době v recenzním řízení v časopise Vaccine. Na téma biologie, imunologie a možnosti profylaxe Lymské boreliózy byly také publikovány tři přehledové práce (Křupka et al, 2007- předkládaná publikace číslo 4; Křupka et al, 2008; Křupka et al, 2011- předkládaná publikace číslo 8). Získaná data byla také podkladem pro získání grantů Grantové agentury a Technologické agentury České republiky (GA ČR, kód GA ČR: P304/10/1951; TA ČR, kód: TA 01011165). Cílem grantu TA ČR je na základě povrchových antigenů *B. burgdorferi* vytvořit preventivní vakcínu proti Lymské borelióze pro veterinární použití.



Obr. 7. Schéma nasedání primerů na genovou sekvenci OspC.



Obr.8. Expresse nelipidizovaných antigenů *B. burgdorferi*

A) Elektroforetický gel s purifikovanými antigeny OspA, OspC a DbpA.

B) Srovnání exprese zkrácené a nezkrácené verze OspC.

## 4.2 Antigenní vlastnosti Heat shock proteinu 90 (Hsp90) kvasinky

### *Candida albicans*

*Candida albicans* je v současnosti nejčastějším houbovým patogenem napadajícím lidský organismus. Nejčastěji způsobuje pouze povrchové infekce sliznic, ale u imunosuprimovaných pacientů může způsobovat i systémové infekce. Ty mohou poškozovat životně důležité orgány a až v 50 % mohou končit letálně bez ohledu na nasazenou léčbu. Z povrchových infekcí se mohou u imunosuprimovaných pacientů objevovat oropharyngeální, kožní nebo eosophageální. Tyto postižení se objevují u jedinců s diabetem, HIV infekcí, primárními imunodeficiencemi nebo u pacientů léčených imunosupresivními přípravky.



Specifickým případem je vulvovaginální kandidóza, která postihuje pacientky s plně funkčním imunitním systémem. Vulvovaginální kandidóza postihuje v průběhu života až 75 % žen, hlavně během těhotenství (Raška et al, 2007).

Protein Hsp90 se uplatňuje při morfologické přeměně mezi kvasinkovými blastokonidii a vláknitými pseudohyfy a hyfami. Tvorba vláknitých forem je u *C. albicans* považována za hlavní faktor virulence umožňující penetraci do tkání. Bylo zjištěno, že již dříve známý imunodominantní protein o velikosti 47 kDa je fragmentem Hsp90 a tento heat shock protein je tak rozeznáván lidským imunitním systémem (Matthews et Burnie, 1989). Následně bylo prokázáno že Hsp90 specifické protilátky poskytují částečnou protekci proti rozvoji systémové kandidózy na myším modelu (Matthews et al, 1991). Do stádia klinických zkoušek se dokonce dostal přípravek Mycograb – rekombinantní lidská protilátka proti Hsp90 *C. albicans* namířená proti epitopu NKILKVIRKNIVKK, poskytujícímu protektivní imunitní reakci (Matthews et al, 2003; Pachtl et al, 2006). Přípravek byl určen k podání v kombinaci s antimykotickým přípravkem Amphotericin B. Přestože přípravek nakonec nebyl lékovými agenturami doporučen k uvedení na trh, výzkumy ukázaly statisticky signifikantní zvýšení přežívání pacientů se systémovou kandidózou po podání kombinace přípravků oproti skupině, u které byl nasazen pouze Amphotericin. Podobně bylo prokázáno synergistické působení této protilátky s novým antifungálním přípravkem Caspofungin (Hotgetts et al, 2008).

Na ústavu imunologie byly již v dřívější době prováděny experimenty s aktivní imunizací antigenem Hsp90 *C. albicans* ve formě DNA nebo rekombinantní proteinové vakcíny. Oba postupy zvyšovaly přežití experimentálních myší po navození systémové infekce (Raška et al, 2005). Během svého postgraduálního studia jsem se zapojil do pozdějších studií zabývajících se vlivem imunizace rekombinantním apyrogenním Hsp90 *C. albicans* na průběh mukózní kandidózy. Bylo zjištěno, že vakcinace rekombinantním proteinem vyvolává přítomnost Hsp90 specifických protilátek ve vagíně experimentálních myší. Nejvyšší titry byly produkovány po vakcinaci intradermálně následované revakcinací intranasálně. Titry specifických protilátek se ještě zvýšily po experimentální infekci. Míru protektivity sprostředkovanou vzniklými protilátkami se nepodařilo stanovit kvůli vysoké variabilitě průběhu infekce v rámci jednotlivých experimentálních skupin a její vyhodnocení bude vyžadovat další práci a optimalizaci metodik (Raška et al, 2008, předkládaná publikace číslo 5). Antigen Hsp90 byl také použit pro testování imunomodulačních nanoliposomů. Výsledky

experimentů byly již přijaty k publikaci v recenzovaném časopise (Mašek et al, 2011, předkládaná publikace č. 7). Protein byl úspěšně navázán na povrch lipozomů prostřednictvím metaloafinitní vazby a vzniklý komplex byl dobře rozeznán a fagocytován lidskými dendritickými buňkami *in vitro*. Imunitní odpověď po vakcinaci liposomálním preparátem laboratorních myší byla srovnatelná s aplikací antigenu s Freundovým adjuvans. Nebyly však zaznamenány vedlejší účinky, které jsou pro aplikaci Freundova adjuvans typické a znemožňují jeho klinickou aplikaci. Byly tak získány slibné výsledky pro další vývoj účinného adjuvantního systému aplikovatelného v humánní medicíně.

### **4.3 Exprese myšního Heat shock proteinu 70 (Hsp70) pro vakcinační experimenty**

Heat shock protein 70 kDa (Hsp70) je chaperon účastnící se skládání nascentního proteinu do správné konformace a účastní se také procesu „refoldingu“ proteinů s chybnou konformací. Vyskytuje se jak u eukaryot, tak u bakterií (pod názvem DnaK). Jeho aktivita je spojená s hydrolýzou ATP (Mayer et Bukau, 2005). Kromě toho je autologní Hsp70 schopen indukovat imunitní odpověď CD8<sup>+</sup> Th lymfocytů směřovanou vůči peptidu na Hsp70 nekovalentně navázanému, aktivovat antigen prezentující buňky a zvyšovat tvorbu prozánětlivých cytokinů a chemokinů pomocí vazby na celé spektrum buněčných receptorů (Toll-like receptor 4 – TLR-4, TLR-2, CD14, CD91, CD94, LOX-1, SR-A)(Kumar et al, 2009; Raška et Weigl, 2005). Komplexy Hsp70 a vázaného antigenu jsou po vazbě na receptory endocytovány buňkami imunitního systému a antigenní peptidy jsou následně prezentovány ve vazbě s molekulami MHC I. třídy (Nishikawa et al, 2008).

Na našem ústavu se zabýváme imunomodulačním účinkem proteinu Hsp70 fúzovaného s proteinem p24, slibným antigenem pro konstrukci preventivní vakcíny namířené proti infekci virem HIV (Peters, 2001). Sekvence p24 byla získána ze spolupracujícího pracoviště (BioMérieux, Lyon, Francie) v rámci grantu 6. rámcového programu EU STREP MuNanoVac LSHP-CT-2006-03720

Byly připraveny čtyři konstrukty – dva fúzní geny p24 s Hsp70 na N nebo C konci a jako kontrola samotný Hsp70 a p24 (Obr. 9). Konstrukty byly zaklonovány do plasmidu pET101 a vloženy do expresních linií bakterie *E. coli* BL21. Při expresi samotného

Hsp70 a následné metaloafinitní purifikaci tohoto rekombinantního proteinu jsme zaznamenali kontaminaci produktu proteinem *E. coli*, který byl pomocí MALDI-TOF identifikován jako L-glutamin-D-fruktóza-6-fosfát aminotransferáza. Tento protein má podobné pI a molekulovou hmotnost jako Hsp70 a proto se nám jej nepodařilo odstranit chromatografickými metodami, jako je iontoměničová a gelová chromatografie. Proto jsme testovali možnost inhibice exprese tohoto enzymu nízkomolekulárními látkami zahrnutými v hexózaminové dráze, které se tento enzym účastní. Testovány byly L-glutamin, N-acetyl-D-glukosamin, D-glukosamin-6-fosfát a D-glukosamin. Po kultivaci v médiu s přídavkem N-acetyl-D-glukosaminu jsme zaznamenali inhibici exprese enzymu projevující se absencí kontaminace v purifikovaném produktu. Po odstranění lipopolysacharidu fázovou extrakcí jsme tak získali čistý apyrogenní protein Hsp70 vhodný k imunizačním experimentům (Zachová et al, 2009, předkládaná publikace číslo 6).

## 5 Literatura

1. Aida Y, Pabst J (1990) Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J Immunol Methods* 132: 191 – 195.
2. Bartůněk P. (2006) Historie. In: Bartůněk P, a kol. *Lymeská borelióza*. Praha: Grada publishing: 11.
3. Basile G, Peticca M (2009) Recombinant protein expresion in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol.* 43: 273 – 279.
4. Běláková J., Křupka M., Šebestova M., Tuháčkova J., Vrzal V., Raska M., Weigl E. (2005) Preparation and purification of recombinant outer surface protein A (rOspA) of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc* 149(2):257-9.
5. Bélanger L, Figueira MM, Bourque D, Morel L, Béland M, Laramée L, Groleau D, Míguez CB (2004) Production of heterologous protein by *Methylobacterium extorquens* in high cell density fermentation. *FEMS Microbiol Lett.* 231:197-204.
6. Boehm R. (2007) Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Ann N Y Acad Sci.* 1102:121-34.
7. Böer E, Steinborn G, Kunze G, Gellissen G (2007) Yeast expression platforms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77: 513 – 523.
8. Breton M, Zhao C, Ouellette M, Tremblay MJ, Papadopoulou B. (2007) A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection. *J Gen Virol.* 88(Pt 1):217-25.
9. Bryan JT (2007) Developing an HPV vaccine to prevent cervical cancer and genital warts. *Vaccine* 25(16): 3001 – 3006.
10. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. (1982) Lyme disease-a tickborne spirochetosis? *Science.* 216:1317–1319.
11. Casper SJ, Holt CA. (1998) Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector. *Gene.* 173(1 Spec No):69-73.
12. Celik E, Calik P, Halloran SM, Oliver SG (2007) Production of recombinant human erythropoietin from *Pichia pastoris* and its structural analysis. *J Appl Microbiol.* 103(6):2084-94.

13. Chang AC, Cohen SN. (1974) Genome construction between bacterial species in vitro: replication and expression of *Staphylococcus* plasmid genes in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA.; 71(4): 1030-4.
14. Clark AJ (1998) The mammary gland as a bioreactor: expression, processing, and production of recombinant proteins. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 3(3):337-50.
15. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1973; 70(11): 3240-4.
16. Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K Chappell T (2009) Expression in the yeast *Pichia pastoris*. In: Abelson JN, Simon MI (editors) Guide to protein purification. Methods in enzymology 463. Elsevier. pp: 170 – 187.
17. Cvak L, Fusek M (2004) Moderní biotechnologie a farmaceutický průmysl. Chem. Listy 98: 1087 – 1095.
18. Date M, Itaya H, Matsui H, Kikuchi Y (2006) Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum*. Lett Appl Microbiol. 42: 66 – 70.
19. Davis SJ, Ward HA, Puklavec MJ, Willis AC, Williams AF, Barclay AN. (1990) High level expression in Chinese hamster ovary cells of soluble forms of CD4 T lymphocyte glycoprotein including glycosylation variants. J Biol Chem. 265(18):10410-8.
20. Derouazi M, Toussaint B, Quénee 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. Appl Environ Microbiol. 74: 3601–3604.
21. Desai PN, Shrivastava N, Padh H. (2010) Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. Biotechnol Adv. 28(4):427-35.
22. Dilsen S, Paul W, Sandgathe A, Tippe D, Freudl R, Thömmes J, Kula MR, Takors R, Wandrey C, Weuster-Botz D. (2000) Fed-batch production of recombinant human calcitonin precursor fusion protein using *Staphylococcus carnosus* as an expression-secretion system. Appl Microbiol Biotechnol. 54:361-9.
23. Endo Y, Sawasaki T. (2006) Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. Curr Opin Biotechnol. 17(4):373-80.

24. Fári, M.G. & Kralovánszky, U. P. (2006) The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky. *International Journal of Horticultural Science* 2006, 12 (1): 9–12
25. Frey S, Vesikari T, Szymczakiewicz-Multanowska A, Lattanzi M, Izu A, Groth N, Holmes S. (2010) Clinical efficacy of cell culture–derived and egg-derived inactivated subunit influenza vaccines in healthy adults. *Clin Infect Dis.* 51(9):997-1004.
26. Gemmill TR, Trimble RB (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta.* 1426(2):227-37.
27. Goeddel DV, Kleid DG, Bolivar F, Heyneker HL, Yansura DG, Crea R, Hirose T, Kraszewski A, Itakura K, Riggs AD. (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA.*; 76(1):106-10.
28. Grabski A (2009) Advances in preparation of biological extracts for protein purification. In: Abelson JN, Simon MI (editors) *Guide to protein purification. Methods in enzymology* 463. Elsevier. 286 – 301.
29. Grabski A, McCormick M, Mierendorf R (1999) BugBuster™ and Benzonase®: The clear solutions to simple efficient extraction of *E. coli* proteins. *InNovations newsletter* 10: 17-19.
30. He XS, Shyu YT, Nathoo S, Wong SL, Doi RH. (1991) Construction and use of a *Bacillus subtilis* mutant deficient in multiple protease genes for the expression of eukaryotic genes. *Ann N Y Acad Sci.* 646:69-77.
31. Hodgetts S, Nooney L, Al-Akeel R, Curry A, Awad S, Matthews R, Burnie J. (2008) Efungumab and caspofungin: pre-clinical data supporting synergy. *Antimicrob Chemother.* 61(5):1132-9.
32. Hopp TP, Prickett KS, Price VL, Libby RT, March CJ, Cerretti DP, Urdal DL, Conlon PJ (1988) A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *BioTechnology* 6, 1204-1210.
33. Huang J, Wu L, Yalda D, Adkins Y, Kelleher SL, Crane M, Lonnerdal B, Rodriguez RL, Huang N. (2002) Expression of functional recombinant human lysozyme in transgenic rice cell culture. *Transgenic Res.* 11(3):229-39.
34. Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, Boyer HW. (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science.* 1977;198(4321):1056-63.

35. Ivarie R. (2006) Competitive bioreactor hens on the horizon. Trends Biotechnol. 24(3):99-101.
36. Jackson DA, Symons RH, Berg P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA; 69(10): 2904-9.
37. Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind RA, Nordheim A, Stunnenberg HG. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(20):8972-6.
38. Jarvis DL (2009) Baculovirus – insect cell expression systems. In: Abelson JN, Simon MI (editors) Guide to protein purification. Methods in enzymology 463. Elsevier. pp: 192 – 218.
39. Jarvis DL, Kowar ZS, and Hollister JR (1998) Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. Curr Opin Biotechnol. 9: 528–33
40. Jenny RJ, Mann KG, Lundblad RL (2003) A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. Protein Expr Purif. 31(1):1-11.
41. Kawamura F. and Doi RH (1984) Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases. J Bacteriol. 160(1): 442–444.
42. Keller JM, Shanklin J, Vierstra RD, Hershey HP. (1989) Expression of a functional monocotyledonous phytochrome in transgenic tobacco. EMBO J. 8(4):1005-12.
43. Kingston RE, Kaufman RJ, Bebbington CR, Rolfe MR. (2002) Amplification using CHO cell expression vectors. Curr Protoc Mol Biol. Chapter 16:Unit 16.23.
44. Koller KP, Rieß G, Sauber K, Uhlmann E, Wallmeier H (1989) Recombinant *Streptomyces lividans* secretes a fusion protein of tendamistat and prosinsulin. Nature Biotechnology 7: 1055 – 1059.
45. 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.
46. Křupka M., Běláková J., Šebestová M., Tuháčková J., Raška M., Vrzal V., Weigl E. (2005) Isolation and purification of recombinant outer surface protein C (rOspC)

- of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 149(2):261-4.
47. Krupka M., Raska M., Belakova J., Horynova M., Novotny R., Weigl E. (2007) Biological aspects of Lyme disease spirochetes: Unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 151(2):175-86.
48. Křupka M., Raška M., Weigl E. (2008) Lymfská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. Dermatologie pro praxi 2 (5-6):236-239
49. Křupka M., Zachová K., Weigl E., Raska M. (2011) Prevention of Lyme disease: promising research or Sisyphean task? Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (in press)
50. Kumar S, Deepak P, Kumar S Jr, Kishore D, Acharya A. (2009) Autologous Hsp70 induces antigen specific Th1 immune responses in a murine T-cell lymphoma. Immunol Invest. 38(6):449-65.
51. Linares DM, Geertsma ER, Poolman B (2010) Evolved *Lactococcus lactis* strains for enhanced expression of recombinant membrane proteins. J Mol Biol. 401: 45 – 55.
52. Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karassina N, Zimprich C, Wood MG, Learish R, Ohana RF, Urh M, Simpson D, Mendez J, Zimmerman K, Otto P, Vidugiris G, Zhu J, Darzins A, Klaubert DH, Bulleit RF, Wood KV. (2008) HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. ACS Chem Biol. 20;3(6):373-82.
53. Malhotra A. (2009) Tagging for protein expression. In: Abelson JN, Simon MI (editors) Guide to protein purification. Methods in enzymology 463. Elsevier. 240 – 254.
54. Mao H (2004) A self-cleavable sortase fusion for one-step purification of free recombinant proteins. Protein Expr Purif. 37(1):253-63.
55. Marianne Hansson M, Patrik Samuelson P, Nguyen TN, Ståh S (2002) General expression vectors for *Staphylococcus carnosus* enabled efficient production of the outer membrane protein A of *Klebsiella pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett. 210: 263-70.
56. Mašek J, Bartheldyová E, Turánek-Knotigová P, Skrabalová M, Korvasová Z, Plocková J, Koudelka S, Skodová P, Kulich P, Křupka M, Zachová K, Czerneková L, Horynová M, Kratochvílová I, Miller AD, Zýka D, Michálek J, Vrbková J,



- Sebela M, Ledvina M, Raška M, Turánek J. (2011) Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: Preparation, structural study and immune response towards rHsp90. *Journal of Controlled Release* (in press)
57. Matthews RC, Burnie JP, Howat D, Rowland T, and Walton F. (1991) Autoantibody to HSP90 can mediate protection against systemic candidosis. *Immunology* 74:20–24.
  58. Matthews RC, Burnie JP. (1989) Cloning of a DNA sequence encoding a major fragment of the 47 kilodalton stress protein homologue of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60:25–30.
  59. Matthews RC, Rigg G, Hodgetts S, Carter T, Chapman C, Gregory C, Illidge C, Burnie J. (2003) Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(7):2208-16.
  60. Mayer MP, Bukau B. (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci.* 62(6):670-84.
  61. Mergulhão FJ, Summers DK, Monteiro GA (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnol Adv.* 23(3):177-202.
  62. Meselson, M. and Yuan, R. (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*, *Nature*, 217 (5134): 1110 – 1114.
  63. Mishra S, Baranwal R (2009) Yeast genetics and biotechnological applications. In: Satyanarayana T, Kunze G (editors): *Yeast biotechnology: Diversity and applications*. Springer. pp: 324 – 351.
  64. Murashima K, Chen CL, Kosugi A, Tamaru Y, Doi RH, Wong SL. (2002) Heterologous Production of *Clostridium cellulovorans* engB, Using Protease-Deficient *Bacillus subtilis*, and Preparation of Active Recombinant Cellulosomes. *J Bacteriol.* 184(1): 76-81.
  65. Nishikawa M, Takemoto S, Takakura Y. (2008). Heat shock protein derivatives for delivery of antigens to antigen presenting cells. *Int J Pharm.* 354(1-2):23-7.
  66. Pachtl J, Svoboda P, Jacobs F, Vandewoude K, van der Hoven B, Spronk P, Masterson G, Malbrain M, Aoun M, Garbino J, Takala J, Drgona L, Burnie J, Matthews R. (2006) A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of

- heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis.* 42(10):1404-13.
67. Peters BS. (2001) The basis for HIV immunotherapeutic vaccines. *Vaccine.* 20(5-6):688-705.
68. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258(5536):598-9.
69. Puyet A, Sandoval H, Lopez P, Aguilar A, Martin JF, Espinosa M (1987) A simple medium for rapid regeneration of *Bacillus subtilis* protoplasts transformed with plasmid DNA. *GEMS Microbiol Lett* 40: 1-5.
70. Raška M, Běláková J, Wudattu NK, Kafková L, Růžičková K, Šebestová M, Kolář Z, Weigl E. (2005) Comparison of protective effect of protein and DNA vaccines hsp90 in murine model of systemic candidiasis. *Folia Microbiol (Praha).* 50(1):77-82.
71. Raška M, Weigl E. (2005) Heat shock proteins in autoimmune diseases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005 Dec;149(2):243-9.
72. Raška M., Běláková J., Horynová M., Křupka M., Novotný J., Šebestová M., Weigl E. (2008) Systemic and mucosal immunization with *Candida albicans* hsp90 elicits hsp90-specific humoral response in vaginal mucosa which is further enhanced during experimental vaginal candidiasis. *Med Mycol.* 46(5):411-20.
73. Raška M., Běláková J., Křupka M., Weigl E. (2007) Candidiasis--do we need to fight or to tolerate the *Candida* fungus? *Folia Microbiol* 52(3):297-312.
74. Raska M., Takahashi K., Czernekova L., Zachova K., Hall S., Moldoveanu Z., Elliott M.C., Wilson L., Brown R., Jancova D., Barnes S., Vrbkova J., Tomana M., Smith P.D., Mestecky J., Renfrow M.B., Novak J. (2010) Glycosylation patterns of HIV-1 gp120 depend on the type of expressing cells and affect antibody recognition. *J Biol Chem* 285(27): pp.20860-20869.
75. Sadilkova L, Osicka R, Sulc M, Linhartova I, Novak P, Sebo P (2008) Single-step affinity purification of recombinant proteins using a self-excising module from *Neisseria meningitidis* FrpC. *Protein Sci.* 17(10):1834-43.
76. Smith H.O., Wilcox K.W. (1970) A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol.*; 51(2): 379-91.
77. Steere AC, Sikand VK, Meurice F, Parenti DL, Fikrig E, Schoen RT, Nowakowski J, Schmid CH, Laukamp S, Buscarino C, Krause DS. (1998) Vaccination against

- Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. N Engl J Med. 339(4):209-15.
78. Swoboda RK, Bertram G, Budge S, Gooday GW, Gow NA, Brown AJ. (1995) Structure and regulation of the HSP90 gene from the pathogenic fungus *Candida albicans*. Infect Immun. 63(11):4506-14.
  79. Terpe K. (2003) Overview of tag protein fusion: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol. 60:523-533.
  80. Terpe K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol. 72(2):211-22.
  81. Trimble RB, Atkinson PH, Tschopp JF, Townsend RR, Maley F (1991) Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces* SUC2 invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. J Biol Chem. 266(34): 22807-17.
  82. Tuháčková J., Běláková .J, Křupka M., Nepeřený J., Chumela J., Weigl E., Vrzal V. (2005) Testing of the Biocan B inj. ad us. vet. vaccine and development of the new recombinant vaccine against canine borreliosis. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 149(2):297-302.
  83. Walsh G. (2006) Biopharmaceutical benchmarks 2010. Nat Biotechnol. 24(7):769-76.
  84. Ward M, Lin C, Victoria DC, Fox BP, Fox JA, Wong DL, Meerman HJ, Pucci JP, Fong RB, Heng MH, Tsurushita N, Gieswein C, Park M, Wang H. (2004) Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. Appl Environ Microbiol. 70(5):2567-76.
  85. Ward OP, Qin WM, Dhanjoon J, Ye J, Singh A. (2006) Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. Adv Appl Microbiol. 58:1-75.
  86. Watson J.D., Crick F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature.1953; 171(4356):737-8.
  87. Wu XC, Lee W, Tran L, Wong SL. (1991) Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. J Bacteriol. 173(16):4952-8.
  88. Wurm F, Bernard A. (1999) Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. Curr Opin Biotechnol. 10(2):156-9.
  89. Wycoff KL. (2005) Secretory IgA antibodies from plants. Curr Pharm Des. 11(19):2429-37.

90. Yin J, Li G, Ren X, Harrler G (2007) Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *J Biotechnol* 127: 335 – 347.
91. Zachová K, Křupka M, Chamrad I, Běláková J, Horynová M, Weigl E, Šebela M, Raška M. (2009) Novel modification of growth medium enables efficient *E. coli* expression and simple purification of an endotoxin-free recombinant murine hsp70 protein. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (7): 727 – 733.
92. Zouhar J (1999) Afinitní chromatografie proteinů na vázaných kovových iontech. *Chem. Listy* 9:, 683 – 685.

## 6 Přehled vlastních publikací

### 6.1 Publikace předkládané v dizertační práci, vymezení podílu dizertanta na jejich provedení

1. Běláková J, **Křupka M**, Šebestová M, Tuháčková J, Vrzal V, Raška M, Weigl E. (2005) Preparation and purification of recombinant outer surface protein A (rOspA) of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc* 149(2): 257-9.  
- druhý autor: částečný podíl na purifikaci a detekci rekombinantního proteinu OspA *Borrelie burgdorferi*.
2. **Křupka M**, Běláková J, Šebestová M, Tuháčková J, Raška M, Vrzal V, Weigl E. (2005) Isolation and purification of recombinant outer surface protein C (rOspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc* 149(2):261-4.  
- první autor: zásadní podíl na purifikaci a detekci rekombinantního proteinu OspC *Borrelie burgdorferi*.
3. Tuháčková J, Běláková J, **Křupka M**, Nepeřený J, Chumela J, Weigl E, Vrzal V. (2005) Testing of the Biocan B inj. ad us. vet. vaccine and development of the new

recombinant vaccine against canine borreliosis. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 149(2):297-302.

- třetí autor: zásadní podíl na expresi rekombinantních proteinů testovaných spoluautory na myším modelu.

4. **Křupka M**, Raška M, Běláková J, Horynova M, Novotný R, Weigl E. (2007) Biological aspects of Lyme disease spirochetes: Unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 151(2):175-86.

- první autor přehledové práce.

5. Raska M, Belakova J, Horynova M, **Krupka M**, Novotny J, Sebestova M, Weigl E. (2008) Systemic and mucosal immunization with *Candida albicans* hsp90 elicits hsp90-specific humoral response in vaginal mucosa which is further enhanced during experimental vaginal candidiasis. Med Mycol. 46(5):411-20.

IF (2009) = 2.133

- čtvrtý autor: částečný podíl na expresi a purifikaci rekombinantního proteinu Hsp90 *Candida albicans* a částečný podíl na vyhodnocení indukované imunologické odpovědi.

6. Zachová K, **Křupka M**, Chamrad I, Běláková J, Horynová M, Weigl E, Šebela M, Raška M. (2009) Novel modification of growth medium enables efficient *E. coli* expression and simple purification of an endotoxin-free recombinant murine hsp70 protein. Journal of Microbiology and Biotechnology 19 (7): 727 – 733.

IF (2007) = 2.062

- druhý autor: částečný podíl na expresi a purifikaci rekombinantního proteinu Hsp70 *Mus musculus* a na vyhodnocení vlivu aditiv v kultivačním médiu na čistotu výsledného produktu.

-

7. Mašek J, Bartheldyová E, Turánek-Knotigová P, Skrabalová M, Korvasová Z, Plocková J, Koudelka S, Skodová P, Kulich P, **Křupka M**, Zachová K, Czerneková L, Horynová M, Kratochvílová I, Miller AD, Zýka D, Michálek J, Vrbková J, Sebel M, Ledvina M, Raška M, Turánek J. (2011) Metallochelating

liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: Preparation, structural study and immune response towards rHsp90. *Journal of Controlled Release* (in press)

IF (2009) = 5.949

- desátý autor: zásadní podíl na expresi a purifikaci rekombinantního proteinu Hsp90 *Candida albicans*.

8. **Křupka M**, Zachová K, Weigl E, Raska M. (2011) Prevention of Lyme disease: promising research or Sisyphean task? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (in press, zařazeno do no. 4, vol. 59, 2011)

IF (2009) = **1.989**

- první autor přehledové práce.

## **6.2 Přehled ostatních vlastních publikací, abstrakt a přednášek**

### **6.2.1 Časopisecké publikace**

1. Raška M, Běláková J, **Křupka M**, Weigl E. (2007) Candidiasis--do we need to fight or to tolerate the *Candida* fungus? *Folia Microbiol* 52(3):297-312. Review
2. Běláková J, Horynová M, **Křupka M**, Weigl E, Raška M. (2007) DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 55(6): 387-98. Review.
3. **Křupka M**, Raška M, Weigl E. (2008) Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Dermatologie pro praxi* 2 (5-6) pp.236-239

### **6.2.2 Přednášky**

1. **Křupka M**, Běláková J, Šebestová M, Tuháčková J, Raška M, Vrzal V, Weigl E. Izolace a purifikace rekombinantního Outer surface proteinu C *Borrelie burgdorferi* sensu lato. 22. pracovní imunologická konference, Rožnov pod Radhoštěm, 10. 6. – 12. 6. 2005.
2. Běláková J, **Křupka M**, Šebestová M, Tuháčková J, Vrzal V, Weigl E. Příprava a purifikace rekombinantního OspA. 22. pracovní imunologická konference, Rožnov pod Radhoštěm, 10. 6. – 12. 6. 2005.
3. Tuháčková J, Vrzal V, Nepeřený j, Chumela J, Běláková J, **Křupka M**, Weigl E. Testování vakcíny Biocan B a vývoj nové rekombinantní vakcíny proti borelióze psů. 22. pracovní imunologická konference, Rožnov pod Radhoštěm, 10. 6. – 12. 6. 2005.
4. **Křupka M**. Úloha povrchových proteinů *Borrelia burgdorferi* sensu lato v patogenezi a profylaxi lymské boreliózy. Seminář Ústavu imunologie LF UP a FN v Olomouci, místní pobočky ČIS v Olomouci a České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii. 23. 5. 2006.
5. **Křupka M**, Weigl E. Vakcinace proti Lymeské borelióze, minulost, současnost a výhledy do budoucna. VI. Den laboratorní diagnostiky nejen lymské boreliózy, Masarykova kolej, Praha. 12. 4. 2007.
6. Raška M, Běláková J, Horynová M, **Křupka M**, Weigl E. Kandidóza – imunitní obrana a tolerance. Slovenská mykopatologická konference, Nový Smokovec, Slovenská republika, 21. 9. 2007.
7. **Křupka M**, Weigl E. Biologické a imunologické aspekty Lymské boreliózy VII. Den laboratorní diagnostiky nejen lymské boreliózy, Masarykova kolej, Praha. 16. 4. 2008
8. Zachová (Kolaříková) K, **Křupka M**, Raška M. (2008) Příprava rekombinantního myšního hsp70 pro vakcinační účely. Konference vědeckých prací studentů DSP Olomouc, 3. – 4. 9. 2008

9. **Křupka M**, Zachová K, Raška M. - Lipopolysacharid: významná kontaminace rekombinantních vakcinačních proteinů exprimovaných v *Escherichia coli*. Seminář Ústavu imunologie LF UP a FN v Olomouci, místní pobočky ČIS v Olomouci a České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii. 17. 3. 2009.
10. **Křupka M**, Běláková J, Horynová M, Zachová K, Weigl E, Raška M. Využití molekulárních adjuvans pro DNA vakcinaci. 17. Severočeská imunologická konference Ústí nad Labem, 18. – 19. 9. 2009
11. **Křupka M**, Zachová K, Raška M. Využití molekulárních adjuvans pro DNA vakcinaci. Seminář Ústavu imunologie LF UP a FN v Olomouci, místní pobočky ČIS v Olomouci a České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii. 22. 10. 2009.
12. **Křupka M**. Lipopolysacharid jako významný kontaminace proteinů exprimovaných v *E. coli*: metody detekce a odstranění. Seminář Proteomika 2010 firmy Merck, Fakultní nemocnice Brno-Bohunice, 20. 5. 2010
13. **Křupka M**, Czerneková L, Mašek J, Turánek J, Ledvina M, Šebela M, Weigl E, Raška M. Metallochelating OspC-nanoliposomes with synthetic nor-muramyl dipeptides are immunogenic and safe. 1<sup>st</sup> International Conference on Advances in Cell and Gene Therapy and Immunotherapy: from basic research to clinical applications and 3<sup>rd</sup> Workshop on Immunotherapy, Mikulov, 23. -25. 9. 2010
14. **Křupka M**, Czerneková L, Mašek J, Bartheldyová E, Kulich P, Turánek J, Ledvina M, Šebela M, Raška M, Weigl E. Metallochelatační vazba rekombinantního proteinu OspC *Borrelia burgdorferi* na povrch nanoliposomů se zabudovanými syntetickými analogy nor-muramyl dipeptidu zvyšuje antigenicitu a umožňuje modulovat specifickou imunitní odpověď. Seminář Ústavu imunologie LF UP a FN v Olomouci, místní pobočky ČIS v Olomouci a České společnosti pro alergologii a klinickou imunologii. 26.10.2010



### 6.2.3 Postery:

1. Horynová M, Běláková J, **Křupka M**, Raška M. Identifikace fragmentů Hsp90 *Candida albicans* indukujících silnou imunitní odpověď po hydrodynamické DNA vakcinaci myši. XXIII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů. XI. Kongres českých a slovenských imunologů. Hradec Králové, 25. – 28. 10. 2006.
2. Zachová K, **Křupka M**, Běláková J, Horynová M, Raška M. Příprava rekombinantních fúzních heat shock proteinů pro vakcinační účely. XXI. biochemický sjezd České společnosti pro biochemii a molekulární biologii a Slovenské spoločnosti pre biochémiu a molekulárnu biológiu. České Budějovice, Czech Republic 14. – 17. 9. 2008
3. **Křupka M**, Raška M, Horynová M, Mašek J, Turánek J, Weigl E. Příprava rekombinantního nelipidovaného apyrogenního Outer Surface Proteinu C *Borrelia burgdorferi*. XXV. sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů a XII. kongres českých a slovenských imunologů. Praha. 29. 10. – 1. 11. 2008.
4. **Křupka M**, Zachová K, Bari L, Horynová M, Weigl E, Raška M. Hsp70 - p24 fusion DNA vaccines as a new candidates for HIV vaccines. 27th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases. Brussels, Belgium, 9. – 13. 6. 2009.
5. **Křupka M**, Zachová K, Czerneková L, Weigl E, Raška M. Immunization of mice with HIV-1 p24 antigen fused on its N- or C-terminus with autologous Hsp70 induces p24-specific antibodies, whose isotype is affected by the orientation of both fusion partners. The Student Scientific Conference on GMO, Brno, Czech Republic, 8. -9. 4. 2010.
6. Zachová K, **Křupka M**, Raška M. Construction of recombinant plasmids for prokaryote and mammalian expression of HIV-1 p24-hsp70 fusion proteins as novel HIV-1 vaccine candidates. The Student Scientific Conference on GMO, Brno, Czech Republic, 8.-9. 4. 2010.

7. **Křupka M**, Czerneková L, Mašek J, Turánek J, Ledvina M, Šebela M, Weigl E, Raška M. Metallochelating OspC-nanoliposomes with synthetic nor-muramyl dipeptides are immunogenic and safe. 1<sup>st</sup> International Conference on Advances in Cell and Gene Therapy and Immunotherapy: from basic research to clinical applications and 3<sup>rd</sup> Workshop on Immunotherapy, Mikulov, 23. -25. 9. 2010
8. **Křupka M**, Czerneková L, Mašek J, Bartheldyová E, Kulich P, Turánek J, Ledvina M, Šebela M, Weigl E, Raška M. Metallochelatační vazba rekombinantního proteinu OspC *Borrelia burgdorferi* na povrch nanoliposomu se zabudovanými syntetickými analogy nor-muramyl dipeptidu zvyšuje imunogenicitu a umožňuje modulovat specifickou imunitní odpověď. XXVII. Sjezd českých a slovenských alergologů a klinických imunologů s mezinárodní účastí, Olomouc, 6. -9. 9. 2010

#### 6.2.4 Abstrakta

1. Raška M, Běláková J, Horynová M, **Křupka M**, Weigl E. (2007) Kandidóza – imunitní obrana a tolerance. *Derma* 7 (3), p.31
2. Zachová (Kolaříková) K, **Křupka M**, Raška M. (2008) Příprava rekombinantního myšího hsp70 pro vakcinační účely. Konference vědeckých prací studentů DSP, Abstrakta. Olomouc, p.41
3. Zachová (Kolaříková) K, **Křupka M**, Běláková J, Horynová M, Raška M. (2008) Příprava fúzních antigenů vyvolávajících specifickou buněčnou imunitní odpověď. In Sborník přednášek a posterů XXI. biochemický sjezd. České Budějovice, p.55
4. **Křupka M**, Raška M, Horynová M, Mašek J, Turánek J, Weigl E. (2008) Příprava rekombinantního nelipidovaného apyrogenního Outer Surface Proteinu C *Borrelia burgdorferi*. *Alergie* 10 Suppl.2, p.88

5. **Křupka M**, Zachová K, Bari L, Horynová M, Weigl E, Raška M. (2009) Hsp70 - p24 fusion DNA vaccines as a new candidates for HIV vaccines. The Pediatric Infectious Disease Journal 28 (6), p.181.
6. **Křupka M**, Czerneková L, Mašek J, Turánek J, Ledvina M, Šebela M, Weigl E, Raška M. (2010) Metallochelating OspC-nanoliposomes with synthetic nor-muramyl dipeptides are immunogenic and safe. Abstract book of the 1<sup>st</sup> International Conference on Advances in Cell and Gene Therapy and Immunotherapy: from basic research to clinical applications and 3<sup>rd</sup> Workshop on Immunotherapy, Mikulov, p.29.
7. **Křupka M**, Czerneková L, Mašek J, Bartheldyová E, Kulich P. Turánek J, Ledvina M, Šebela M, Weigl E, Raška M. (2010) Metallochelatační vazba rekombinantního proteinu OspC *Borrelia burgdorferi* na povrch nanoliposomu se zabudovanými syntetickými analogy nor-muramyl dipeptidu zvyšuje imunogenicitu a umožňuje modulovat specifickou imunitní odpověď. Alergie 12 Suppl. 1, **p.71**

### 6.3 Řešené granty

Multiepitopová syntetická vakcína proti borelióze pro veterinární aplikace (2011-2014)

TA ČR, kód: TA 01011165

Člen řešitelského týmu

Molekulární detekce mikrobů a jejich vlastností, konstrukce a testování polyepitopových antigenů *B. burgdorferi* (2011-2012)

**Studentská grantová soutěž UP**, kód: LF 2011,002

Hlavní řešitel za řešitelský tým Imunologie

Konstrukce a testování nelipidizovaných forem antigenů pro vývoj vakcíny proti

Lymeské borelióze (2010-2011)**I. ročník studentské grantové soutěže UP**, kód: LF 2010-014

Hlavní řešitel

Úspěšně obhájeno

Nanoliposomy pro vývoj rekombinantních vakcín a cílených imunoterapeutik (2010 – 2013)

**GA ČR**, kód GA ČR: P304/10/1951

Člen řešitelského týmu

Nové možnosti diagnostiky a imunomodulace u infekčních onemocnění a imunopatologických stavů

**Výzkumný záměr MŠMT** (2007-2011), kód MŠMT: MSM6198959223

Člen řešitelského týmu

Sledování vybraných imunologických parametrů při experimentální infekci a vakcinaci rekombinantními antigeny *Borrelie burgdorferi* sensu stricto.

**Vnitřní grant LF UP** (2006 – 2007)

Hlavní řešitel

Úspěšně obhájeno

## 7 Přílohy dizertační práce

### Práce číslo 1

Běláková J, **Křupka M**, Šebestová M, Tuháčková J, Vrzal V, Raška M, Weigl E. (2005) Preparation and purification of recombinant outer surface protein A (rOspA) of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 149(2): 257-9.

### Práce číslo 2

**Křupka M**, Běláková J, Šebestová M, Tuháčková J, Raška M, Vrzal V, Weigl E. (2005) Isolation and purification of recombinant outer surface protein C (rOspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 149(2):261-4.

### Práce číslo 3

Tuháčková J, Běláková J, **Křupka M**, Nepeřený J, Chumela J, Weigl E, Vrzal V. (2005) Testing of the Biocan B inj. ad us. vet. vaccine and development of the new recombinant vaccine against canine borreliosis. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 149(2):297-302.

### Práce číslo 4

**Křupka M**, Raška M, Běláková J, Horynova M, Novotný R, Weigl E. (2007) Biological aspects of Lyme disease spirochetes: Unique bacteria of the *Borrelia burgdorferi* species group. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc 151(2):175-86.

### Práce číslo 5

Raska M, Belakova J, Horynova M, **Krupka M**, Novotny J, Sebestova M, Weigl E. (2008) Systemic and mucosal immunization with *Candida albicans* hsp90 elicits hsp90-specific humoral response in vaginal mucosa which is further enhanced during experimental vaginal candidiasis. Med Mycol. 46(5):411-20.

### **Práce číslo 6**

Zachová K, **Křupka M**, Chamrad I, Běláková J, Horynová M, Weigl E, Šebela M, Raška M. (2009) Novel modification of growth medium enables efficient *E. coli* expression and simple purification of an endotoxin-free recombinant murine hsp70 protein. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (7): 727 – 733.

### **Práce číslo 7**

Mašek J, Bartheldyová E, Turánek-Knotigová P, Skrabalová M, Korvasová Z, Plocková J, Koudelka S, Skodová P, Kulich P, **Křupka M**, Zachová K, Czerneková L, Horynová M, Kratochvílová I, Miller AD, Zýka D, Michálek J, Vrbková J, Sebel M, Ledvina M, Raška M, Turánek J. (2011) Metallochelating liposomes with associated lipophilised norAbuMDP as biocompatible platform for construction of vaccines with recombinant His-tagged antigens: Preparation, structural study and immune response towards rHsp90. *Journal of Controlled Release* (in press)

### **Práce číslo 8**

**Křupka M**, Zachová K, Weigl E, Raska M. (2011) Prevention of Lyme disease: promising research or Sisyphian task? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (in press, zařazeno do no. 4, vol. 59, 2011)