

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2016

Veronika Valášková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Rekombinantní proteiny v současné medicíně

Bakalářská práce

Veronika Valášková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: Mgr. Michal Křupka, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala během bakalářského studia samostatně pod vedením Mgr. Michala Křupky, Ph.D., a to s použitím uvedených pramenů a literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Souhrn

Bakalářská práce se zabývá problematikou rekombinantních molekul DNA od etap vývoje této technologie přes její aplikaci při tvorbě biologických léčiv. Součástí této práce je i přehled širokého využití biologických léčiv v praxi. Tato práce také zasahuje do oblasti schvalování léčiv včetně demonstrace rozdílů schválení biosimilars (follow on biologics) a generických léčiv. V neposlední řadě se práce zabývá základními přístupy procesu tvorby rekombinantní DNA. Experimentální část je zaměřena na problematiku lymfské boreliózy, konkrétně na purifikaci povrchových antigenů OspC a OspA *Borrelia burgdorferi* s odstraněnou lipidizační sekvencí na N-terminálním konci. Oba proteiny byly úspěšně purifikovány a výsledky této práce přispěly k optimalizaci podmínek purifikace těchto proteinů. Ústav imunologie Univerzity Palackého navazuje na tyto výsledky s cílem potenciální možnosti vývoje vakcíny jak pro účely veterinární, tak následně i humánní medicíny.

Summary

The thesis deals with the issue of recombinant DNA molecules from the stages of the development of this technology through its application in the biological drugs production. A part of this thesis involves an overview of the wide use of biological drugs in practice. The thesis, however, focuses also on the area of drug approval, including a demonstration of differences in the approval of biosimilars (follow on biologics) and generic pharmaceuticals. Last but not least, the thesis discusses the basic process approaches of the recombinant DNA production. The experimental part focuses on the issue of Lyme borreliosis, specifically on the purification of surface antigens OspC and OspA of *Borrelia burgdorferi* including the removed lipid sequencing to the N-terminal end. Both proteins were successfully purified and results of this thesis have contributed to the optimization of purification conditions of these proteins. Moreover, the Department of Immunology at Palacky University followed up on these results with an aim of a potential possibility for development of a vaccine both for veterinary purposes and, consequently, human medicine.

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především svému vedoucímu bakalářské práce, Mgr. Michalu Křupkovi, Ph.D., za trpělivost a pomoc při vypracování této bakalářské práce. Neméně bych chtěla dále poděkovat svému příteli, rodině a přátelům, kteří mě podporovali nejen při vypracování této práce, ale i během studia.

Obsah

1. Úvod	9
2. Cíle práce	10
3. Současný stav řešené problematiky	11
3.1. Historie rekombinantních proteinů	11
3.1.1. Počátky molekulární biologie a biotechnologie	11
3.1.2. Raná éra genetického inženýrství	12
3.1.3. Pozdní éra genetického inženýrství	14
3.2. Požadavky na kvalitu biologických léčiv	15
3.2.1. Preklinická fáze vývoje léčiv	16
3.2.2. Klinická fáze vývoje léčiv	17
3.2.3. Proces registrace nových léčiv v České republice	18
3.2.4. Registrace biosimilars a generických léčiv	19
3.3. Klinicky schválené přípravky	21
3.3.1. Hormony	21
3.3.2. Enzymy	22
3.3.3. Interferony	22
3.3.4. Terapeutické monoklonální protilátky	23
3.3.5. Antisenc oligonukleotidy a DNA vakcíny	25
3.4. Postup tvorby rekombinantních proteinů	25
3.4.1. Izolace cílových genů	27
3.4.2. Restrikční endonukleázy	28
3.4.3. Spojení DNA fragmentů – ligace	30
3.4.4. Vektory	31
3.4.5. Vnesení DNA do expresního systému a selekce	33
3.4.6. Expresní systémy	34
3.4.6.1 Prokaryotní expresní systémy	34

3.4.6.2	Eukaryotické expresní systémy	36
3.4.7.	Purifikace	44
4.	Materiál a vybavení	48
4.1.	Biologický materiál	48
4.2.	Chemikálie	48
4.3.	Příprava roztoků	50
4.4.	Ostatní materiál	52
4.5.	Laboratorní vybavení	52
5.	Metodika	53
5.1.	Kultivace bakterií	53
5.2.	Indukce exprese proteinů	54
5.3.	Purifikace rekombinantních proteinů	55
5.4.	Dialýza	56
5.5.	SDS-PAGE – Gelová elektroforéza za denaturujících podmínek	57
5.6.	Barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250	59
5.7.	Semi-dry blotting	59
5.8.	Imunochemická detekce	60
6.	Výsledky	60
6.1.	OspC <i>Borrelia burgdorferi</i>	60
6.2.	OspA <i>Borrelia burgdorferi</i>	62
7.	Diskuze	65
8.	Závěr	67
9.	Literatura	68

1. Úvod

Dnešní farmaceutický průmysl vkládá velké naděje do biotechnologií, jež by měly významně rozšířit paletu terapeuticky aplikovatelných léčiv v nastávajících letech (Cvak *et Fusek*, 2004). Ústřední postavení při řešení této problematiky získaly molekulárně biologické přístupy v podobě tvorby rekombinantních molekul DNA. Tato technologie prošla rozmanitými etapami vývoje, které vyústily k transformaci hospodářských plodin a zvířat, využití v rámci diagnostických přístupů, léčby onemocnění i výroby léků a vakcín. Na farmaceutickém trhu hrají tedy biologická léčiva významnou roli, která je do jisté míry ovlivněna patentovou politikou a obecným procesem tvorby a schválení léčiv. Na základě těchto faktů nám vyvstávají otázky týkající se biosimilars a jejich aplikace, stejně jako specifikace ve srovnání s originálním biologickým léčivem. V neposlední řadě se tato práce zaměřuje na samotný proces tvorby rekombinantní DNA, který je ovšem tak široký, že tato práce nastiňuje především nejdůležitější principy a aplikace používané v praxi.

Experimentální část této práce se potýká s problematikou lymské boreliózy, konkrétně původcem *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, který způsobuje tuto infekci jak u lidí v Evropě, tak v USA. Toto onemocnění má širokou škálu příznaků od těch poměrně banálních v podobě erythema migrans až k neurologickým poruchám a závažným formám artritidy (Rudenko *et al*, 2011). Cílem laboratorní práce byla purifikace povrchových antigenů OspC a OspA *Borrelia burgdorferi* s odstraněnou lipidizační sekvencí na N-terminálním konci. Na tuto práci oddělení imunologie na Lékařské fakultě Univerzity Palackého navazuje další kroky, jejichž výsledkem by mělo být získání vakcíny proti lymské borelióze, která by sloužila nejen k veterinárním účelům, ale později i k účelům humánní medicíny.

2. Cíle práce

Cíle bakalářské práce lze shrnout do těchto bodů:

1. Zvládnutí práce s odbornými literárními databázemi;
2. Vypracování literární rešerše soustředěné na:
 - a) technologii přípravy rekombinantních proteinů a využívané expresní systémy;
 - b) specifické požadavky na kvalitu proteinů a expresních systémů z pohledu klinických aplikací, především imunologických;
 - c) základní přehled klinicky schválených a používaných přípravků dle mechanismu účinku a indikačních skupin;
3. Zvládnutí exprese a purifikace OspC a OspA *Borrelia burgdorferi* rekombinantního antigenu a metod jeho identifikace a charakterizace.

3. Současný stav řešené problematiky

3.1. Historie rekombinantních proteinů

Objevu tvorby a využití rekombinantních proteinů předcházelo mnoho kroků. Důležitou roli zde sehrála biotechnologie a její postupy. Biotechnologii lze definovat jako vědu využívající ke zpracování materiálů biologických činitelů za účelem produkce nebo modifikace výrobku či procesu (Glick *et al*, 2010). S prvními biotechnologickými postupy přišli již Sumerové a Babyloňané, když používali kvasinky k produkci alkoholu přibližně 7000 let př. n. l. Taktéž Egypťané si před 4000 př. n. l. osvojili biotechnologické metody, např. při přípravě kvašeného chleba. Lidé ve starověku taktéž využívali bakterie a plísňe k produkci octu a sýru (Harzevili *et al*, 2015). Přestože nás tedy biotechnologické přístupy provázely téměř od počátku naší civilizace, s termínem biotechnologie jsme se mohli setkat až ve 20. století. Za osobu, jež zavedla tento termín, je považován Karel Ereky, který tak učinil prostřednictvím stejnojmenné publikace v roce 1919. On sám také již uvažoval o spojení mezi biotechnologií a molekulární biologii (Fári. *et al*, 2006).

3.1.1. Počátky molekulární biologie a biotechnologie

První kroky za objevem rekombinantní technologie vedly ke snaze pochopit funkci genů. Práce Beadle a Tatum s mutanty plísně *Neurospora* roku 1941 položila základ teorie jeden gen = jeden enzym. Tato studie se stala odrazecím můstkem ve studii funkce genů a v průběhu let prodělala úpravy znění na jeden gen = jeden protein a následně na jeden gen = polypeptid. Dnes již víme, že ani tento popis není zcela správný a že například u eukaryot vede jeden gen ke vzniku více polypeptidů z důvodu uspořádání exonů a intronů a jejich sestřihu, a také víme, že některé geny nekódují polypeptid vůbec (Horowitz *et al*, 2004). Klíčový okamžik ve směru zrodu nové technologie mají na svědomí také Avery, Macleod a McCarty, kteří potvrdili roku 1944, že DNA je nositelkou genetické informace (Avery *et al*, 1979). Jakmile byla pochopena úloha DNA, bylo nezbytné najít prostředníka pro přenos genetické informace. Tím se stal později plazmid jakožto extrachromozomální genetická částice. Tento termín byl prvně použit před 63 lety ve spojení s objevem transdukce (Lederberg, 1998). Objev plazmidu byl stejně nezbytný ve směru objevu rekombinantní technologie jako popis struktury DNA, což dokázali pánové D. Watson a H. C. Crick (1953). Práce Watsona a Cricka dokonce navrhuje princip semikonzervativní replikace DNA. Tento

klíčový děj ovšem prokázali až Meselson a Stahl svým experimentem roku 1958, který je přezdíván také nejkrásnějším experimentem v biologii provedeným na *E. coli*. Principem experimentu bylo začlenění izotopů těžkých kovů do DNA s následným sledováním distribuce DNA do potomstva pomocí centrifugační separace (Holmes, 2001). V tomtéž roce také objevil A. Kornberg a jeho kolegové DNA polymerázu I., za což mu rok po vydání publikace byla udělena Nobelova cena za fyziologii a lékařství za objev mechanismu biologické syntézy ribonukleových a deoxyribonukleových kyselin (Kresge *et al*, 2005). Tento objev byl klíčový pro následnou syntézu DNA *in vitro*. V rozmezí let 1961 až 1966 následoval intenzivní výzkum genetického kódu, který je složen z mnoha střípků historických událostí (Glick *et al*, 2010). Ty umožnily lépe pochopit genetický aparát buňky. Poslední kroky vstřícné nové technologii vedly přes izolaci ligázy roku 1967 M. Gellertem a restriční endonukleázou, o což se zasloužili Smith a Wilcox (Heinrichs, 2007). Nebýt těchto enzymů, byla by cesta k rekombinantní technologii ještě dlouho uzavřena.

3.1.2. Raná éra genetického inženýrství

Po prohloubení znalostí z oblastí genetiky, biochemie a molekulární biologie mikroorganismů mohli lidé začít izolovat gen a přenášet ho z jednoho organismu do druhého, jenž účelně tvoří produkt na základě izolovaného genu. Tento proces označujeme jako technologii rekombinantní DNA. U jeho zrození stáli Jackson, Symons a Berg (1972), kteří jako první připravili rekombinantní molekulu DNA. Jako vektor pro cizorodou buněčnou DNA použili DNA vir SV40. Za svůj vědecký přínos v oblasti rekombinantní DNA obdržel Berg Nobelovu cenu za chemii roku 1980. Stalo se tak v tomtéž roce, kdy byla vytvořena první rekombinantní molekula. Stanley N. Cohen a Herbert Boyer s kolegy započali cestu rekombinantní technologie plazmidových vektorů (Jackson *et al*, 1972; Vondrejs, 2008), ovšem k publikaci jejich díla došlo, až v roce 1973 (Cohen *et al*, 1973).

Nicméně k využití průmyslového potenciálu této technologie došlo až o šest let později, kdy vědci z rodící se firmy Genetech vložili gen pro lidský inzulin do bakteriálního plazmidu, čímž zajistili dostatečnou produkci inzulinu pro trh a zamezili nežádoucím imunitním reakcím u pacientů, které byly dříve značnou komplikací (www.med.uni-giessen.de). Problémy inzulinu izolovaného ze zvířecí slinivky spočívaly především v imunogenicitě, což mělo za následek imunologické reakce, které mohly znemožnit další aplikaci přípravku (Rybka *et al*, 2006; Werner *et al*, 2011; www.med.uni-giessen.de).

Po objevení potenciálu této technologie jsme stáli na počátku nové éry biotechnologií a ta byla, stejně jako dnes, spjata s finančním obratem. K zajištění maximálního výtěžku z nově objeveného léčiva slouží dnes firmám patentová ochrana, která zajistí výrobku jedinečnost na trhu, čímž dává firmám vlastnícím patentovou licenci možnost určit si cenu produktu a tím získat vynaložené investice na vývoj léku zpět (Bains, 2007; Metyš *et al.*, 2006). Ovšem do roku 1980 tomu tak nebylo. Farmaceutické firmy v USA si mohly patentovat metodiku výroby, nicméně si nemohly patentovat mikrobiální kmeny, tedy živé objekty k tomu používané. Tento fakt vyústil v nutnost patentovat geneticky modifikované organismy, k čemuž došlo právě roku 1980 prostřednictvím kauzy Diamond v. Chakrabarty (Eisenberg, 2006). Hlavním aktérem této kauzy byl Ananda Chakrabarty. Jednalo se o vědce pracujícího pro firmu General Electric, který se pokoušel patentovat svůj bakteriální kmen, který je schopen rozkládat ropné skvrny. Jeho žádost byla zprvu zamítnuta americkým patentovým úřadem (US Patent Office) v roce 1972. Vše dospělo až k nejvyššímu soudu (Supreme Court of the United States), kdy zástupcem US Patent and Trademark Office (USTO) byl Diamond, čímž se tato jména zapsala ve spojitosti s touto legendární kauzou do historie (Sateesh, 2008; Ede *et al.*, 2012). Komerční využití rekombinantní technologie se poté rozšířilo i na produkci vakcín. První rekombinantní vakcíny, která byla i licenčně definována jako rekombinantní, jsme se dočkali až v roce 1986. Jednalo se o vakcínu proti hepatitidě typu B (Plotkin *et al.*, 2004).

O otevření dalšího cíle využití této technologie se zasloužil o tři roky později Rosenberg a kolektiv. Tito lidé se pokoušeli o transdukcí genu do lidských nádorových buněk pomocí retroviru. Svou studií položili základ genové terapii, která je i dnes velmi aktuálním předmětem výzkumu (Edelstein *et al.*, 2004). Následně technologie rekombinantní DNA nachází využití v rozdílných oblastech průmyslu. V roce 1990 proniká do potravinářského průmyslu, a to prostřednictvím chymozinu pocházejícího z *Escherichia coli* K-12, který byl použit pro výrobu mléčných výrobků, především sýra (Olempska-Beer *et al.*, 2006; Flamm, 1991). V tomto případě nám rekombinantní technologie umožnila izolovat chymozin nejen ve vyšší koncentraci, ale také dosáhnout větší čistoty u jinak obtížně získávaného chymozinu z telecího slezu, který často vykazoval proměnlivé složení. Praktickým důsledkem je, že rekombinantně připravený chymozin je identický s chymozinem telecím, neobsahuje ovšem pepsin a další enzymy, které jinak vedou k předvídatelnosti koagulační reakce. Dalšími benefity takto připraveného enzymu byla nízká výrobní cena a specifická aktivita (Currell *et al.*, 1991; Ross *et al.*, 2000; Rogelj *et al.*, 2001). O čtyři roky později rekombinantní technologie výrazně demonstruje svůj potenciál v zemědělství uvedením kultivaru rajčat

FLAVR SAVRTM (*Lycopersicon esculentum* Mill.), u kterého byla ovlivněna exprese polygalakturonasy, což je enzym ovlivňující proces dozrávání a s tím spojený proces měknutí rajčat. Takto modifikované rajče vykazovalo lepší vůni a déle trvající čerstvost (Kramer *et al*, 1994).

3.1.3. Pozdní éra genetického inženýrství

Koncem dvacátého století se rekombinantní technologie začaly již podstatně výrazněji uplatňovat v zemědělství, a to při snaze o tvorbu transgenních rostlin za účelem zvýšení výnosu či výživových hodnot. Příkladem byla tvorba zlaté rýže, do jejíhož genomu byly vloženy sekvence umožňující biochemickým drahám v endospermu syntézu provitaminu A (Potrykus I., 2001). Byly vytvořeny programy se složitými algoritmy umožňující sestavení krátkých sekvencí do větších celků. Mezi prvními průkopníky byly programy Pherd, Phrap a Consed (Gunter, 2007), které umožnily osekvenování lidského genomu (McPherson *et al*, 2001). V roce 2009 byl v USA schválen první lék pocházející z geneticky modifikované kozy (Glick *et al*, 2010). Jednalo se o lidský antitrombin určený k léčbě dědičné insuficience antitrombinu (Hughes, 2010). Při nepřítomnosti tohoto inhibitoru koagulace dochází v krevním řečišti k tvorbě trombů, což může vyústit k embolizaci uvolněného trombu do plicnice, žilní insuficienci až k tvorbě bércových vředů (www.angisrevue.cz) Vědci dnes intenzivně usilují nejen o prohloubení vědomostí týkajících se buněčného cyklu, metabolismu, vlastností vektorů a jejich vlivu na znaky transgenního organismu, ale také usilují o zabránění nežádoucímu přenosu genetické informace, čímž přispívají k vytvoření bezpečných GMO – genetically modified organism (Mandell *et al*, 2015).

Ze zde uvedených milníků vyplývá, že rekombinantní technologie má širokou historickou základnu a je neustále rozvíjena spolu s korespondujícími objevy nových technologií. Tato technologie má dnes centrální postavení v oblasti molekulární biotechnologie. V současnosti je její potenciál využíván k diagnostice patologických stavů, výrobě širokého spektra léčivých přípravků včetně rekombinantních hormonů, enzymů i vakcín, ale i při tvorbě hospodářsky využívaných plodin či k transformaci hospodářských zvířat.

3.2. Požadavky na kvalitu biologických léčiv

V České republice nejsou přesně kodifikovány termíny bioléčiva, biologika a biologická léčiva. Tyto pojmy bývají nejednotně vymezeny jednotlivými autory či dokonce překládány jako synonyma. Tento problém je zaviněn nejednotností anglické literatury, ale také pomalejší tvorbou literatury domácí (Fusek *et al*, 2012). Vycházejme tedy z předpokladu, kdy biologická léčiva definujeme jako produkty vzniklé činností biologických systémů, kdy genetická informace pro jejich tvorbu bývá do systému vnesena uměle v podobě genových konstruktů (Křupka *et al*, 2014). Rozvoj farmaceutického průmyslu byl a stále je ovlivněn patentovou politikou, což vyústilo v polovině osmdesátých let k výrobě tzv. generických léčiv. Jedná se o léčiva, kterým vypršela patentová ochrana. Tyto léky bývají prodávány generickými výrobci za nižší ceny (Cvak *et Fusek*, 2004). Generickým léčivem (generikem) rozumíme nízkomolekulární či syntetické látky. Farmaka, kterým též vypršela patentová ochrana, ale mají i makromolekulární strukturu, například peptidy, bílkoviny či segmenty nukleových kyselin, označujeme pojmem biosimilars (Fusek *et al*, 2012). Rozdíl mezi konvenčním generikem a biosimilars (v Evropské unii označovaný pod pojmem follow on biologics = FOB) spočívá také v procesu registrace, kdy u konvenčních generik není nutné dokládat studie prokazující bezpečnost a účinnost, zatímco u biosimilars tato povinnost je (Křupka *et al*, 2014; Roger *et Goldsmith*, 2008), viz kapitola Registrace biosimilars a generických léčiv.

Vývoj biologických léčiv je odlišný od klasických nízkomolekulárních látek. Tato odlišnost je způsobena rozdílným procesem výroby a nestálými vlastnostmi výchozích produktů (Fusek *et al*, 2012). Nejenže se stejný protein využívaný jako léčivo může lišit v rámci různých firem, taktéž se může lišit v rámci jednotlivých šarží produktu. Pro přípravu biologických léčiv jsou používány živé organismy, takže výsledný produkt je modifikován přirozenými procesy buňky. Jedná se například o proces glykosylace, kdy jakákoliv změna v navázání cukerné jednotky na náš produkt může vést k rozdílné imunogenitě nebo účinnosti produktu (Vetchý *et Vetchá*, 2010).

3.2.1 Preklinická fáze vývoje léčiv

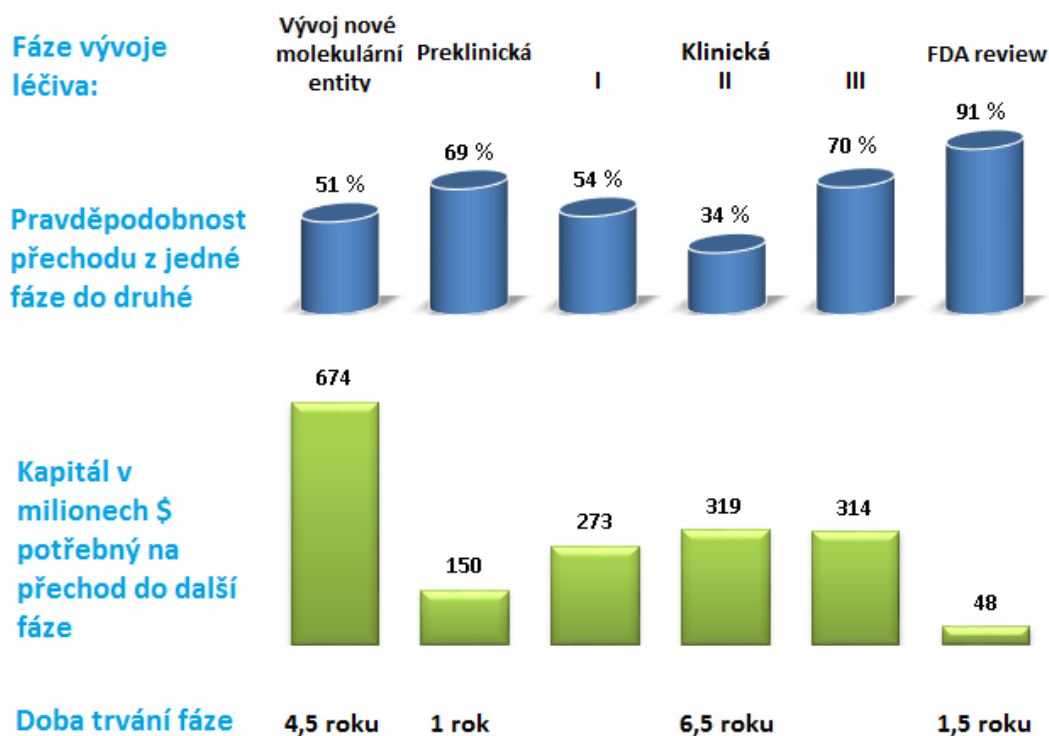
Proces vývoje léčiv můžeme rozdělit na preklinickou a klinickou část. Preklinická studia zahrnují v první řadě objev nového léku. Při tomto procesu vědci usilují buď o modifikaci chemické struktury již známého léčiva, provádějí screening nových přírodních látek, prověřují potenciál již známých chemických sloučenin, anebo účelově navrhnu strukturu léku dle biologického mechanismu (tzv. lékový design). Farmakologický screening je proces série testů zaměřující se na široké spektrum mechanismů účinku. Díky tomuto přístupu je možné odhalit další účinky. Testy jsou koncipovány na úrovni molekulární (např. vazba ligandu na receptor), subcelulární a buněčné (zjišťuje se např. účinnost léku či konkrétní mechanismus účinku, tedy zda je látka agonistou, antagonistou atd.). Pokud jsou výsledky pozitivní a potenciální lék vyhovuje specifickým parametrům, přejde se na úroveň orgánovou a systémovou. Tyto pokusy se provádějí na pokusném zvířeti s modelovým onemocněním a na zvířeti zdravém.

Jelikož náhodné screeningové testy jsou často zdlouhavé a výsledek se nedá dopředu nijak předpokládat, přišli vědci s přístupem racionálního lékového designu. Lékový design je proces, při němž na základě znalosti etiologie a patofyziologie choroby navrhnu vědci léčivo s klíčovou molekulární strukturou ovlivňující dané onemocnění. Využívají při tom nejnovější programové vybavení pro výpočetní techniku – „computer-assisted drug design“ neboli CADD (Starobová *et al.*, 2006). Do budoucna se zdají být zajímavé i vyhlídky multidisciplinárního racionálního lékového designu. Jedná se o kombinaci přístupu profilování genové exprese, bioinformatických metod a racionálního lékového designu, kterou by vědci chtěli zacílit převážně na eliminaci vedlejších účinků, zlepšení imunitní reakce a distribuce léku v organismu včetně snížení výrobní ceny a s tím spojeného ušetření času na vývoj léčiva. Genové profilování využívá dva přístupy, a to SAGE (serial analysis of gene expression) a Microarray (MA). SAGE nám poskytuje ucelený profil genové exprese bez zaměření na cílovou genetickou sekvenci, kdy výsledkem analýzy je identifikace nových transkriptů. MA nám nabízí řadu komerčně dostupných platform, které nám umožní vyhodnocení určité genové exprese. Bioinformační nástroje nám pak umožní uspořádat expresní data do různých drah a sítí. Přestože nám začlenění dat genové exprese společně s daty návrhu struktury léku pomocí racionálního designu poskytuje nové možnosti, je třeba si uvědomit, že tento přístup potřebuje čas pro rozvoj sofistikovanější metodiky (Mandal, 2009).

3.2.2 Klinická fáze vývoje léčiv

Účelem klinické fáze testování je shromáždění objektivních výsledků o účinnosti léčiva pro člověka a také o spektru možných nežádoucích účinků. Nicméně toto dělení je již částečně zastaralé a nepřesné, neboť dochází k prolínání jednotlivých celků. Objevují se například charakteristiky na základě klinického záměru nebo dle uspořádání (otevřené/randomizované) studie (Suchý *et al*, 2009). Pojem randomizovaná studie označuje zcela náhodný proces výběru pacientů do jednotlivých skupin. Opakem je otevřená studie, kdy je pacientům známá léčba. Tuto fázi můžeme rozdělit celkem do čtyř oddělených celků. Průběh klinické fáze je předdefinován na základě jasných kritérií. První část klinické fáze je zaměřena na studium farmakodynamického rozsahu dávkování, farmakokinetických parametrů a především vyhodnocení bezpečnosti. Dávky podávané člověku odpovídají ještě menší dávce, než byla u zvířat vyhodnocena jako pořad netoxická (Suchý *et al*, 2009). Počet dobrovolníků bývá zhruba několik desítek (Starobová *et al*, 2006). Druhá část má dva primární cíle, a to prokázání účinnosti a bezpečnosti u skupiny kolem 200 pacientů a hodnocení účinnosti dávky léku. Cíle třetí fáze jsou stejné jako u druhé s tím rozdílem, že zde již dochází ke srovnání s aktuálně používaným lékem či placebem (Suchý *et al*, 2009). Placebem rozumíme farmaceutický preparát bez účinku, který slouží jako standard pro srovnání (Martin, 2015). Výzkum probíhá až na tisícovkách pacientů. Za tímto účelem jsou navrženy různé designy studií tak, aby bylo zajištěno rovnoměrné rozložení prognostických faktorů pro zajištění srovnatelnosti obou skupin, např. paralelní (zařazení do odlišných skupin léčby), cross-over (všechny hodnocené subjekty léčby podstoupí všechny srovnávané léčby) atd. Poslední, tedy čtvrtá fáze, probíhá po registraci léčiva. Počet zkoumaných pacientů bývá v této části obvykle největší, zde dochází také k objevu velké části nežádoucích účinků (Suchý *et al*, 2009).

Celý proces vývoje nového léčiva je časově a finančně náročný, což je dobře patrné i z následujícího schématu (Obr. 1).



Obr. 1: Schéma modelu úspěšného vývoje nové molekulární entity demonstrující průměrnou časovou a finanční náročnost včetně rozdělení vývojových etap v USA (upraveno dle Schuhmacher, 2016; Paul et al, 2010)

3.2.3 Proces registrace nových léčiv v České republice

Tento proces je přísně kontrolován národními, případně nadnárodními orgány. V České republice se jedná o organizaci SÚKL (Státní ústav pro kontrolu léčiv), jehož povolení je nutné k distribuci a následnému používání léku na území ČR. Činnost tohoto orgánu je vymezena zákonnou normou č. 79/1997 Sb., o léčivu, která za pomoci novely zákona č. 129/2003 Sb. transponuje evropskou směrnici 27/2004/EC. Registraci podléhají HVLP (hromadně vyráběné léčivé přípravky) spadající pod zákon č. 79/1997 Sb. a vyhlášku č. 476 MZ. Léčiva, která jsou dovážena pro vědecké účely nebo se jedná o malé množství určené pro léčbu jednoho pacienta, a také léčiva, která jsou připravována v lékárně, tzv. IVLP (individuálně vyráběné léčivé přípravky), registraci nepodléhají (Metyš *et al*, 2006; Starobová *et al*, 2006). K úspěšné registraci je nutné doložit výsledky preklinického a klinického výzkumu včetně kompletní technické dokumentace obsahující informace o výrobě přípravku a jeho kvalitativních parametrech. Po zhodnocení těchto parametrů uvedených v příslušné dokumentaci provede SÚKL rozhodnutí o registraci, kdy součástí tohoto dokumentu je souhrn údajů o přípravku (SPC) a příbalové informace (Starobová *et al*,

2006). SÚKL se také podílí na přípravě Českého lékopisu a provádí i přípravy k tvorbě Evropského lékopisu. Pod pojmem lékopis se rozumí ustanovení kvalitativních požadavků na léčivo, které musí být splněny na území dané země. Ministerstvo zdravotnictví ČR nese odpovědnost za přípravu a zveřejnění lékopisu na území českého státu (Metyš *et al*, 2006). SÚKL taktéž stanovuje, zda bude lék vydáván v lékárně na předpis či nikoliv, nebo jestli bude zařazen mezi vyhrazená léčiva, což povoluje prodej produktu ve speciálních sítích mimo lékárny. V rámci EU došlo ke standardizaci procesu registrace, což znamená, že proces registrace léčiva může probíhat jak na národní úrovni, tedy registrace je omezena pouze na stát, v němž proběhla, nebo může dojít k procesu vzájemného uznávání, kdy stát, v němž proběhla registrace léčiva, garantuje ostatním státům, že došlo ke splnění standardů v rámci EU. Registrace může proběhnout i prostřednictvím Evropské lékové agentury, která je uznávána celou EU. Food and Drug Administration (FDA) je kontrolní úřad pro potraviny a léky v USA (Starobová *et al*, 2006).

3.2.4 Registrace biosimilars a generických léčiv

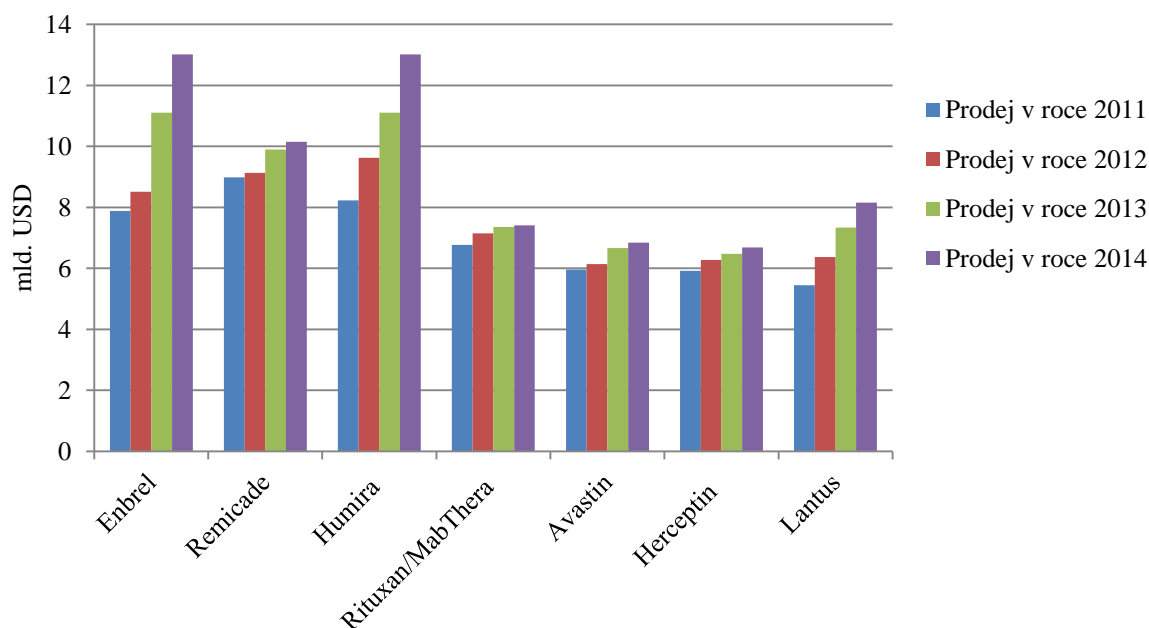
Je třeba vzít v úvahu, že registrace biosimilars, tedy analogů biologických léčiv, kterým vypršela patentová ochrana, je mnohem náročnější v případě, kdy se jedná o velké molekuly, než u molekul malých (Berkowitz *et al*, 2012). Obecně lze říct, že schválení chemicky syntetizovaných generik je jednodušší než registrace biosimilars. Pro registraci klasického generika je potřeba mnohem méně podkladových dat, jelikož výrobce je schopen zajistit chemickou identitu s originálním přípravkem. Jak již bylo naznačeno v úvodu, problém biosimilars je především jejich velikost a s tím spojená komplexita struktury molekuly přípravku (Strojil, 2014). Při registraci analogu malých peptidů (např. rekombinantního inzulínu) lze poměrně snadno provést jejich charakterizaci analytickými přístupy, čímž dochází k výraznému zkrácení procesu registrace. U takovýchto molekul je možné vycházet i z dat originálního léku a v omezených případech i části dat klinických (Berkowitz *et al*, 2012). Ovšem velkou část biologických léčiv tvoří proteiny nebo polypeptidy. Při jejich registraci jsou v případě Evropské unie vyžadovány studie prokazující kvalitu, účinnost a bezpečnost podobnou originálnímu léčivu (Vetchý *et al*, 2010).

EMA (Evropská léková agentura) podnikla první administrativní kroky již v roce 2005, čímž se stala EU prozíravější než USA. Cílem této regulace schvalování byla především redukce opakování klinických hodnocení. Pokud lék vykazuje stejné fyzikálně-chemické vlastnosti jako originál, není nutný standardní schvalovací proces. V roce 2012 EMA vydala

předpis (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010), ve kterém zdůrazňuje nutnost individuálního přístupu vůči každému přípravku a doporučuje co nejpřesnější indikaci vycházející z originálního léčiva. Odchylky od originálu by měly být zdůvodněny a dále hodnoceny (Strojil, 2014). Nicméně automatická záměna biosimilars za originální přípravek je ve většině Evropy zakázána (Německo, Francie, Španělsko atd.), čímž nám vyplývá potřeba odlišit originál od generika (ať chemicky vyráběného nebo biotechnologicky = biosimilars). Jedná se o povinnost explicitně používat obchodní názvy, které nenaznačují spojitost s originálním léčivem (Svoboda, 2010).

V USA byl v roce 2009 vytvořen návrh zmocňující organizaci Biologics Price Competition and Innovation (BPCI) a FDA k úpravě procesu registrace biosimilars. Zákon, který tento proces upravoval, nabyl ovšem platnosti až 9. dubna 2012 (Berkowitz *et al*, 2012).

Nyní stojíme na prahu dlouho očekávaného razantního příchodu biosimilars. V roce 2017 má vypršet patentová ochrana lékům s obratem vyšším než 70 miliard \$ (Strojil, 2014). Problémem biosimilars je vysoká cena, a to jak tržní, tak výrobní. Taktéž jejich podobnost přirozeným ligandům může způsobit nepřiměřenou imunitní reakci (Vetchý *et Vetchá*, 2010). V roce 2013 bylo na trhu ve Spojených státech amerických a Evropské unii k dostání 425 produktů připravených biotechnologickými postupy, včetně více než 140 rekombinantních proteinů s prodejním obratem vyšším než 100 mld. \$ (Rader, 2013). Růst zisku z prodeje těchto produktů můžete vidět na Obr. 2, z nichž všechny biologické přípravky patřily v porovnávaných letech opakovaně k top 10 nejprodávanějším léčivům světa.



Obr. 2: Graf vývoje zisku v miliardách \$ z prodeje vybraných biologických léčiv, z nichž všechny za zvolené časové období patřily mezi TOP 10 nejprodávanějších léčiv na celém světě (upraveno dle www.pmlive.com)

3.3. Klinicky schválené přípravky

Biologická léčiva hrají na farmakologickém trhu důležitou roli. Jejich finanční podíl na trhu by měl činit v příštích letech více než 50 % (Svoboda, 2010). Tyto produkty zasahují do širokého odvětví klinické praxe, ať už se jedná o terapie využívající hormonální produkty přes přípravky ovlivňující cytopenii či homeostázu, přes využití enzymů při insuficiencích nebo onkologii, léčbu virových hepatitid a roztroušené sklerózy až k vakcínám. Výhledově se nám nabízí „antisense“ oligonukleotidy a s tím spojená léčba přístupy genové terapie a DNA vakcín (Fusek *et al*, 2012). Pro demonstraci širokého spektra využití těchto léčiv jsem zvolila přípravky jak s krátkou historií, tak i velmi úspěšné biologické přípravky, které byly řazeny mezi top 10 nejprodávanějších léků pro stanovený rok.

3.3.1. Hormony

Mezi tyto léky patří jednoznačně rekombinantně připravený inzulin, u kterého často dochází k modifikaci primární struktury za účelem změny farmakokinetiky. Těmito modifikacemi se vytváří inzulin, který je schopný se velmi rychle vstřebat do krve a tím snížit postprandiální hyperglykémii. Dostupný je i naopak pomalu a dlouhodobě působící inzulin

s depotním účinkem. Mezi tyto přípravky patří i LANTUS, což je inzulin nesoucí modifikaci aminokyselin v obou řetězcích. Výsledkem po subkutánní injekci tohoto přípravku je vytvoření hexamerní struktury, která se pomalu vstřebává a tím je zaručena kontinuální absorpce inzulinu v krevním řečišti (Valla, 2010). EPOGEN je jednou z mnoha látek používaných při léčbě anémie. Jedná se o erythropoetin s antiapoptotickým účinkem ovlivňující erytropoézu. Nedávné studie ovšem naznačují, že jeho role je mnohem složitější, jelikož mRNA pro tento hormon byla detekována kromě ledvin a jater i v jiných tkáních. (Mocini *et al*, 2007).

3.3.2. Enzymy

Krom hormonů můžeme poukázat na enzymové náhrady používající se například při různých dědičně-metabolických poruchách. Například CERZYME se používá při léčbě Gaucherovy choroby, což je onemocnění způsobené insuficiencí lyzozomálního enzymu glukocerebrosidázy (4.2.1.25; Grabowski, 2008; Fusek *et al*, 2012). Toto onemocnění se projevuje anémií, hepatomegalií, splenomegalií či trombocytopenií (Masi *et al*; 2015)

3.3.3. Interferony

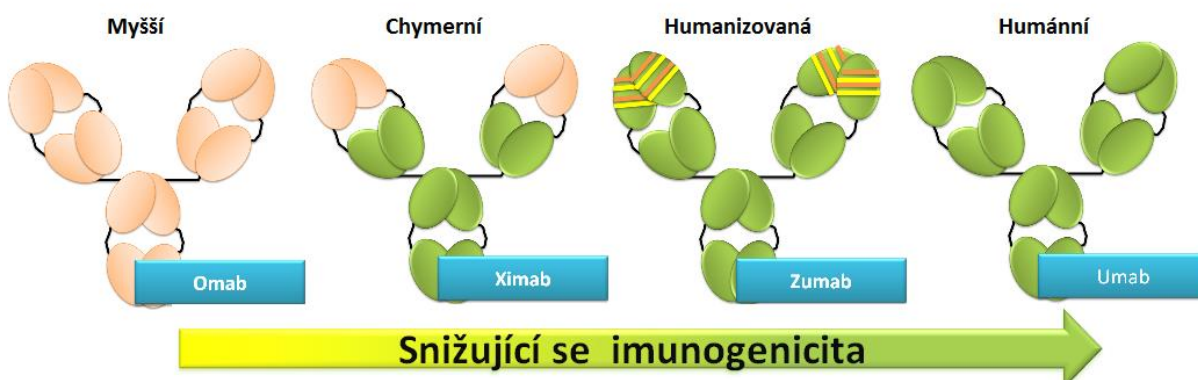
Další velkou skupinou jsou interferony (IFN), které jsou souhrnně řazeny mezi cytokoniny, což jsou polypeptidy regulující imunitní reakce. Například pod IFN prvního typu řadíme INF- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- ϵ a IFN- κ (Klener *et al*, 2010; Křupka *et al*, 2014). IFN využíváme k léčbě virových hepatitid, myeloproliferativních a lymfoproliferativních onemocnění či jako součást léčby roztroušené sklerózy. Existují jak konvenční (nativní forma; význam spíše historický), tak konsenzuální (v těle se přirozeně nevyskytují; dříve byl očekáván velký potenciál, dnes mají okrajový význam) formy IFN. Nejvíce využívány v praxi jsou pegylované IFN. Jedná se o IFN, ke kterým byla navázána molekula polyethylenglykolu, a to především za účelem prodloužení biologického poločasu za současného zachování co největší biologické aktivity (antivirové i imunoregulační). PEGASYS nám demonstruje tento typ léčiva. Proces výroby je založen na vazbě IFN- α -2a a větveného monometoxyPEGu. Absorpční poločas je zvýšen až 7 \times oproti nativní formě a sérový poločas je dokonce delší 10 \times . Změny farmakokinetických parametrů umožňují aplikaci tohoto léku v jednotýdenním intervalu (Fusek *et al*, 2012).

3.3.4. Terapeutické monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky tvoří jednu samotnou důležitou kapitolu mezi biologickými léčivy. Základ působení cytotoxického účinku vychází ze tří mechanismů. Asi nejdůležitějším je aktivace klasické dráhy komplementu. Tuto vlastnost nemají všechny protilátky (u lidí se jedná hlavně o IgG1). Dochází zde k vazbě protilátky na cílový subjekt (bakteriální, eukaryotická nebo transformovaná nádorová buňka), kdy výsledkem je atak složek komplementu C5-C9 za současného uvolnění chemotaktických fragmentů C3a a C5a. Tím dochází k usmrcení cílového subjektu komplementy penetrujícími cytoplazmatickou membránou buňky. Současně dojde k uvolnění chemoatraktantů, což způsobí kumulaci leukocytů a iniciaci zánětlivé odpovědi. Další mechanismus vychází z funkce některých leukocytů, které exprimují Fc receptor a díky Fc konci protilátky rozpoznají a následně fagocytují buňky. Jsou zde zprostředkovateli umožňujícími rozpoznání buňky s pozměněnou povrchovou strukturou (např. buňky nádorové). Poslední mechanismus vychází z Jerneho koncepce idiotypové a antiidiotypové sítě. V praxi se jedná o vytvoření protilátky proti jejímu konkrétnímu idiotypu, jejímž výsledkem je antiidiotypová protilátka, která napodobuje strukturu původního antigenu (Cwiertka, 2004).

Jelikož původní monoklonální protilátky připravené hybridomovou technologií byly myší, docházelo k imunitní odpovědi proti těmto protilátkám. Tento fakt vedl k vývoji chimerických (humánních/myších) a humanizovaných protilátek (viz Obr. 3). V terapeutické praxi jsou dnes používány i protilátky konjugovány s různými efektorovými složkami, např. toxiny, cytostatika, radionuklidy (Cwiertka, 2004). Mezi úspěšné přípravky z této kategorie patří ENBREL, REMICADE, HUMIRA, které jsou využívány k léčbě autoimunitních či imunitně podmíněných onemocnění. Jedná se o nespecifické střevní záněty (ulcerózní kolitida, Crohnova choroba) revmatoidní (revmatoidní artritida, psoriatická artritida atd.) a dermatologické onemocnění (psoriáza). Všechny tyto přípravky patří mezi blokátory cytokoninu TNF- α (anti-TNF protilátky), kdy výsledkem je potlačení nadměrné imunitní reakce (Fusek *et al*, 2012). ENBREL je dimerický fúzní protein složený z extracelulární části lidského p75 receptoru, odvozeného od lidského TNF- α (TNFR2/p75), spojené s Fc doménou lidského IgG1 (Spencer-Green, 2015; Křupka *et al*, 2014). REMICADE je chimerická monoklonální protilátka, která se s velkou afinitou a specifíčností váže na membránové formy TNF- α na povrchu zánětlivých buněk, čímž způsobuje apoptózu buňky (Wilhelm *et al*, 2008). HUMIRA je čistě humánní monoklonální protilátka z třídy IgG1. Mechanismus účinku

spočívá ve vazbě léčiva na TNF- α , čímž dojde k blokaci p55 a p75 receptorů na povrchu buněk (www.centerwatch.com).



Obr. 3: Schéma vývoje terapeuticky využívaných monoklonálních protilátek, myšší část barvena béžově, lidská zeleně (upraveno dle www.studyblue.com)

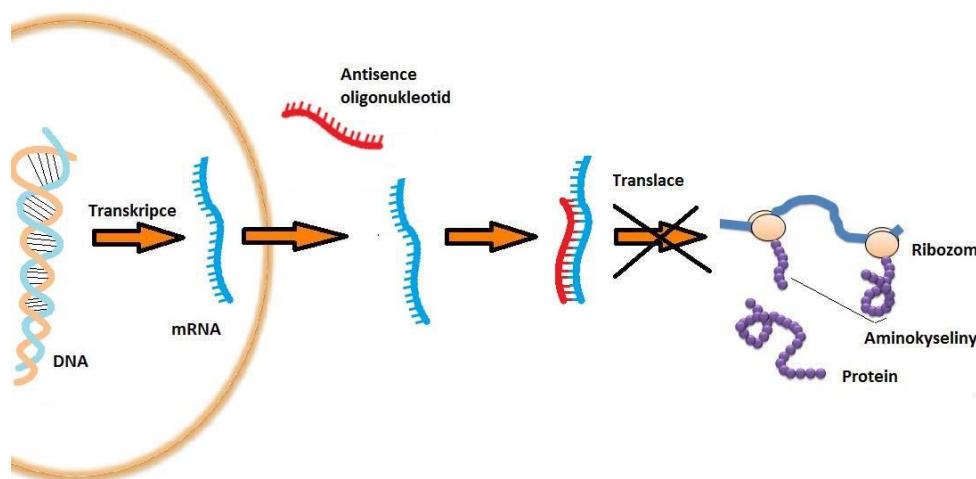
Protilátky mají také důležitou roli v onkologii, kde jsou používány nekonjugované i konjugované protilátky. RITUXIMAB je monoklonální, humanizovaná, nekonjugovaná protilátka anti-CD20. Mechanismus účinku spočívá ve vazbě na specifický receptor B-buněk, čímž dojde k apoptóze (Cwiertka, 2004). BRENTUXIMAB VEDOTIN je příkladem protilátky konjugované s toxinem, využívané v klinické praxi. Tato chimerická protilátka má uplatnění při léčbě Hodgkinova lymfomu, kdy mechanismus účinku spočívá v inhibici organizace mikrotubulů (Růčková *et al*, 2015) konjugovaným monomethyl auristatinem E (Younes *et al*, 2012). Konjugáty s radioaktivním izotopem nám v této době reprezentuje pouze přípravek IBRITUMOMAB TIUXETAN. Tyto přípravky jsou zaměřeny na CD20 a určeny k léčbě nehodgkinových lymfomů. Jakousi nadskupinu nám vytváří biospecifické protilátky, které rozpoznávají od svých předchůdkyň dva různé antigeny. V praxi se jedná například o CATUMAXOMAB, který se váže na CD3 a EpCAM. Roku 2013 se dále na trhu objevily protilátky tzv. druhé generace. U těchto protilátek došlo k modifikaci glykosylace v oblasti Fc-fragmentu za účelem posílení ADCC (antibody-dependent cytotoxicity). Do této kategorie spadá OBINUTUZUMAB, který je určen k léčbě chronické lymfatické leukemie, se zacílením na CD20 (Růčková *et al*, 2015).

3.3.5. Antisenc oligonukleotidy a DNA vakcíny

S rozvíjejícími vědomostmi na poli genetiky docházíme k závěrům, že řada onemocnění je spojena s chybnou funkcí genů. Dnešní farmakologie se tedy pokouší ovlivňovat chybnou DNA či regulaci genové exprese (Fusek *et al*, 2012).

Princip DNA vakcín je vpravení DNA prostřednictvím lipozomů nebo virů, kdy buňka organismu zprostředkovává sama výrobu vakcíny na základě vložené DNA. Tyto vakcíny tedy vychází z plazmidové DNA technologie (Beneš, 2007). Benefitem tohoto typu vakcín je podmínění jak humorální, tak buněčné imunitní odpovědi, a nemožnost návratu do virulentního stavu, jako je tomu u živých vakcín. Taktéž je možné je poměrně snadno a levně vyrábět ve velkém měřítku a dlouhodobě skladovat, čemuž napomáhá fakt vyšší teplotní stability, než je tomu u běžných vakcín. Hlavní nevýhodou je poměrně nízká imunogenita (Shedlock, 2000). V současnosti jsou již registrovány DNA vakcíny pro veterinární medicínu (Křupka *et al*, 2014)

Chybnou regulaci genů je možno řešit pomocí interferující RNA (RNAi), což jsou uměle vytvořené krátké úseky RNA. Po jejich aplikaci do buňky jsou tyto úseky RNA schopny selektivně napomáhat degradaci mRNA (Fusek *et al*, 2012), viz Obr. 4.

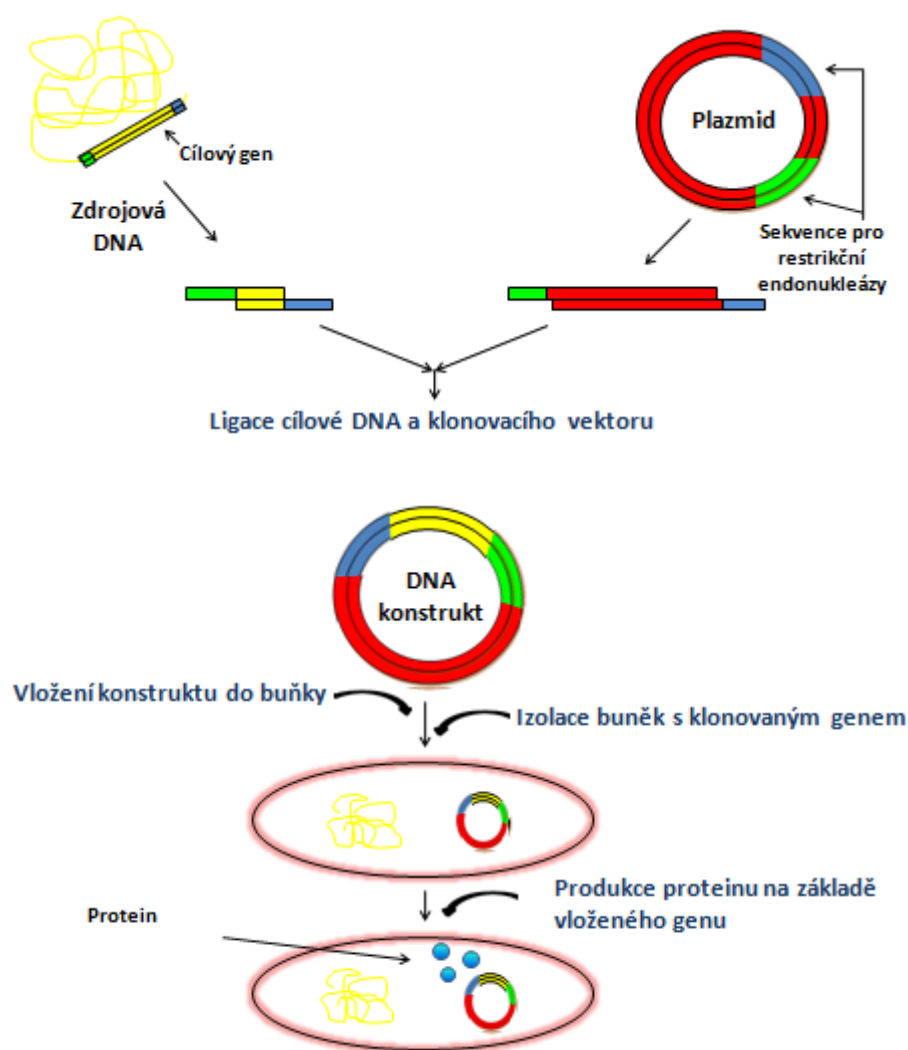


Obr. 4: Princip regulace antisence RNA oligonukleotidy inhibující translaci proteinu (upraveno dle Robinson, 2004)

3.4. Postup tvorby rekombinantních proteinů

Rekombinantní technologie neboli molekulární klonování nevychází při procesu přenosu DNA fragmentů pouze z jednoho protokolu, což je patrné již z široké škály

současných nabízených vektorů. Přestože neexistuje pouze jedna univerzální metoda pro tvorbu rekombinantních DNA molekul, bývá za účelem exprese dodržován nejčastěji následující formát (Obr. 5). DNA z donorového organismu je extrahována, enzymaticky vyčištěna a připojena ke klonovacímu vektoru. Výsledkem je DNA konstrukt (klonovací vektor + inzert). Nově vzniklý konstrukt je přenesen do hostitelské buňky. Následně dojde k identifikaci a selekci transformovaných hostitelských buněk. Požadované buňky pak na základě vloženého DNA konstruktů začnou produkovat výsledný protein, který je purifikován (Glick *et al*, 2010).



Obr. 5: Schéma procesu tvorby rekombinantních DNA ze zdrojové DNA a klonovacího vektoru procesem štěpení odlišnými restričními endonukleázami, následnou ligací, izolací buněk s klonovaným genem a výslednou expresí (transkripce a translace) proteinu (upraveno dle Glick *et al*, 2010)

3.4.1. Izolace cílových genů

Jak vyplývá již z Obr. 5, je nutné nejprve získat výchozí kódující gen v dostatečném množství. Zdrojovou DNA pro klonování do vektoru volíme dle cíle. Může se jednat o fragment představující celý gen nebo jeho část, případně o sekvence celého genomu organismu. Výsledným vkládaným inzertem může být nejen genomová DNA, ale i cDNA, produkty polymerázové řetězové reakce i chemicky syntetizované oligonukleotidy (Allison, 2007).

Pokud je námi zvolený inzert prokaryotického původu, stačí nám prostřednictvím genomových knihoven a internetových databází vyhledat přesnou sekvenci námi zvoleného genu. Na základě dohledaných informací je navržen vhodný primer pro syntézu polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Pozor je třeba si dát v případě, že námi zvolený gen je eukaryotického původu. Pro expresi v prokaryotním klonovacím vektoru musí být tato DNA přepsána do komplementární DNA (cDNA) reverzní transkripcí izolované mRNA kódující požadovaný gen. (Fusek *et al*, 2012). Reverzní transkriptáza nasynthetizuje na základě komplementarity k mRNA molekulu DNA. Výsledný hybrid DNA:mRNA je přepsán na dsDNA díky DNA polymeráze, která syntetizuje nový DNA řetězec a RNázy H, které štěpí kostru izolované mRNA (Clark *et Pazdernik*, 2009; Fusek *et al*, 2012). Výsledná cDNA obsahuje pouze exprimované geny bez intronů a regulačních oblastí (Allison, 2007).

Za účelem izolace mRNA pro tvorbu cDNA využíváme pouze jedinou metodu, a to afinitní chromatografii s imobilizovaným oligotymidinem. Ten je komplementární k polyadenylátovaným koncům eukaryotické mRNA (Clark *et Pazdernik*, 2009; Fusek *et al*, 2012).

Ovšem pro izolaci buněčné DNA, která je potřebná jak pro průběh PCR, tak jako inzert (viz výše), můžeme zvolit více postupů. Prvním krokem při izolaci DNA bývá rozrušení buněčné stěny s ohledem na typ buňky (např. chemickou cestou působením lyozymu na peptidoglykan v buněčné stěně bakterií). Pak se nejčastěji detergentem rozruší lipidová dvojvrstva tvořící cytoplazmatickou membránu. Jakmile dojde k uvolnění intracelulárních struktur, je nutné jednotlivé komponenty separovat, což se často děje chemickou extrakcí nebo centrifugací. Při chemické extrakci se běžně používá fenol 60 až 70 % za účelem vymytí balastních proteinů. Fenol je nemísitelný s vodou, ve které se nachází vzorek DNA, a tudíž dojde k vytvoření dvou fází, přičemž proteiny zůstanou rozpuštěné ve fenolové vrstvě, která je odstraněna centrifugací. Centrifugace pracuje na principu hmotnostního gradientu, kdy částice větší molekulové hmotnosti sedimentují rychleji než ty

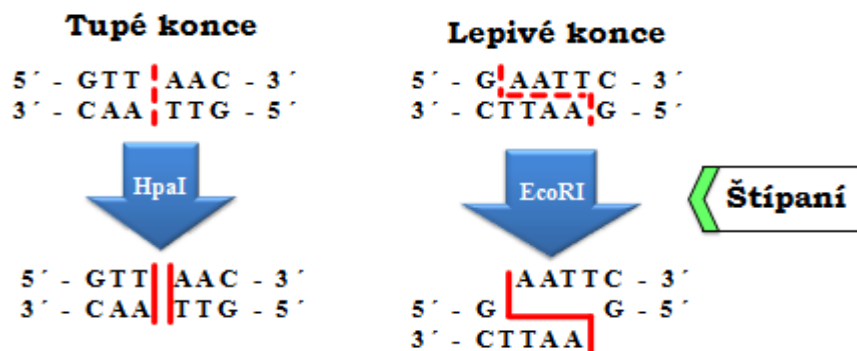
s nižší. Je třeba si uvědomit, že intracelulární prostor buňky obsahuje nejen proteiny, ale i molekuly RNA, které kontaminují vzorek. Tyto molekuly odstraňujeme působením ribonukleázy, která rozštěpí RNA na malé kousky ribonukleotidů. Pokud přidáme stejný objem alkoholu, jako je vzorku, dojde k převodu velkých fragmentů DNA do alkoholové fáze, zatímco ribonukleotidy zůstanou ve fázi fenolové (Clark *et Pazdernik*, 2009).

3.4.2. Restrikční endonukleázy

Po izolaci DNA je nutné získat požadovaný fragment DNA, k čemuž využíváme restrikční enzymy. Ty mají exo- (štěpí DNA na koncích) nebo endonukleázovou aktivitu (rozštěpí ji uvnitř), přičemž za účelem tvorby rekombinantních molekul využíváme ty, které štěpí DNA uvnitř (Glick *et al*, 2010). Tyto enzymy specificky rozpoznávají sekvence na obou vlákních dvoušroubovice a štěpí je. Na základě komplementarity bází pak může dojít k párování konců štěpených stejnou endonukleázou, čehož využíváme při tvorbě rekombinantních molekul (Clark *et Pazdernik*, 2009).

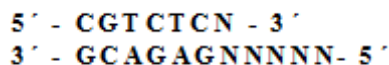
Za účelem tvorby těchto fúzních molekul používáme II. typ restrikčních endonukleáz. Existují, ale i typy I, III, IV, ty ovšem nesplňují potřebná kritéria. Například endonukleázy I. typu mají mnohem menší výskyt než II. typu, které jsou velmi běžné. Taktéž jsou tvořeny komplexem tří podjednotek, které mají rozpoznávací, endonukleázovou a methylační aktivitu, což je pro nás při procesu tvorby nevýhodné (u druhého typu je endonukleázová a methylační aktivita oddělena). Ani schopnost rozpoznat specifické místo štěpení není optimální. Rozptyl je větší než 1000 bp (Allison, 2007).

II. typ restrikčních endonukleáz štěpí dvoušroubovici DNA buď ve stejném místě, v tom případě mluvíme o tupých koncích (viz Obr. 6), nebo ji štěpí na odlišných stranách a vytváří různě velké přesahy (viz Obr. 6), kdy výsledkem jsou takzvané lepivé či „kohezivní“ konce. Specifické místo, kde dochází ke štěpení, nazýváme v tomto případě palindrom. Jedná se o sekvenci nukleotidů, která se nachází na obou řetězcích DNA, které, pokud čteny se stejnou polaritou (to jest 5' k 3'), mají identickou sekvenci (Clark *et Pazdernik*, 2009; Glick *et al*, 2010).



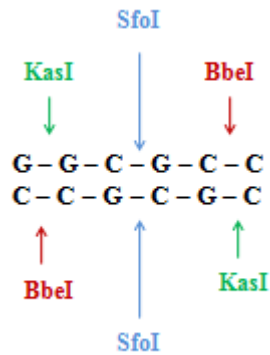
Obr. 6: Srovnání restričních endonukleáz štěpících specifickou sekvencí na tupé nebo lepivé konce (upraveno dle Clark et Pazdernik, 2009)

V praxi se můžeme setkat i se situací, kdy kohezivní konce vytváří asymetricky dlouhé přesahy. To pak znamená, že specifické místo štěpení neodpovídá místu (tedy sekvenci nukleotidů), kde dojde ke spojení konců vzniklých štěpením tímto typem restriční endonukleázy. Například u BsmBI má výsledná sekvence po štěpení na kódujícím řetězci DNA přesah jednoho nukleotidu a na nekódujícím přesah pět nukleotidů (viz Obr. 7), čímž je způsoben rozdíl.



Obr. 7: Specifické sekvence pro BsmBI restriční endonukleázu demonstrující štěpení vlákna 5' – 3' a 3' – 5'; N značí nukleotidy (A, T, C, G), které se komplementárně párují: A-T, C-G (upraveno dle Glick et al, 2010).

První restriční endonukleázy, které byly objeveny, nazýváme prototypy. Všechny ostatní se stejnou rozpoznávací sekvencí ve stejném místě nazýváme „isoschizomerní“. Ty, které rozpoznávají stejnou specifickou sekvenci, ale štěpí ji v jiném místě, dále nazýváme „neoschizomerní“, viz Obr. 8 (Glick et al, 2010).

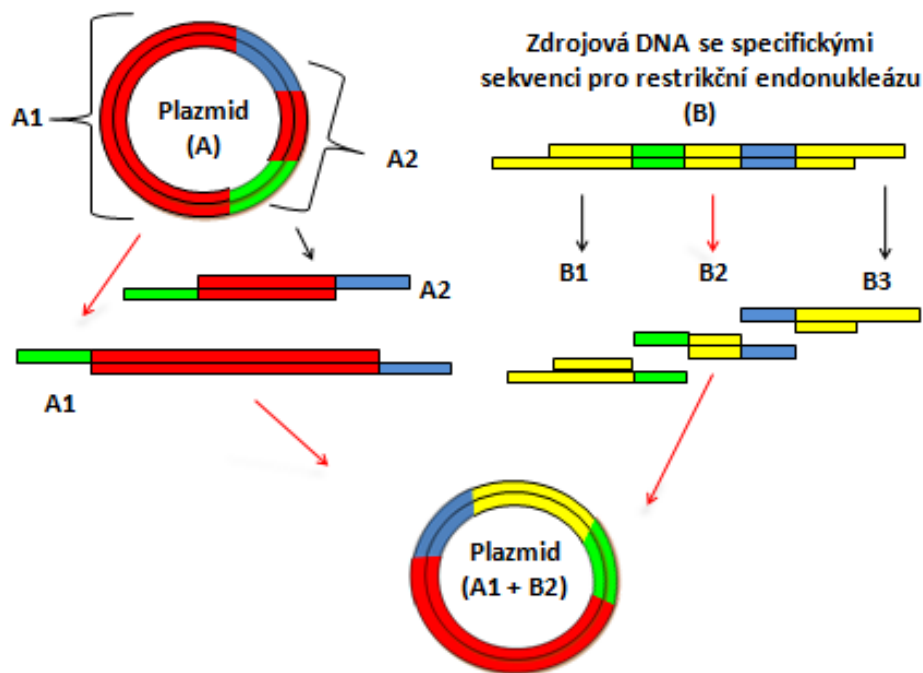


Obr. 8: Neoschizomerní restriční endonukleázy, které rozpoznávají stejnou specifickou sekvenci, ale štěpí ji na odlišných místech (upraveno dle Glick et al, 2010)

3.4.3. Spojení DNA fragmentů – ligace

Fragmenty DNA vytvořené působením restriční endonukleázy následně spojujeme DNA-ligázou, což je enzym schopný katalyzovat fosfodiesterové vazby mezi fosfátem na 5' konci a hydroxylem na 3' konci vlákna (Allison, 2007).

V našem případě, pokud přidáme fragment DNA (obsahující požadovaný gen či geny), upravený štěpením dvou endonukleáz rozpoznávajících odlišné sekvence, a plazmid, který byl také štěpen stejným párem endonukleáz, získáme za vhodných podmínek rekombinantní molekulu. Výsledkem je tedy spojení kohezivních (lepivých) konců obou fragmentů DNA, které se spojí na základě komplementarity bází vodíkovými vazbami. Za účelem tvorby kovalentních vazeb a cirkulárního konstruktů přidáme již zmiňovanou DNA-ligázu včetně kofaktoru v podobě ATP (viz Obr. 9). Ligáza je používána i ke spojování tupých konců, ovšem s nižší účinností. Z tohoto důvodu vystavujeme tupé konce působení terminální deoxynukleotid-transferázy, která modifikuje tyto konce přidáním nukleotidů, které jsou vzájemně komplementární, čímž mezi těmito konci může vzniknout vodíková vazba (Allison, 2007; Raška et al, 2010).

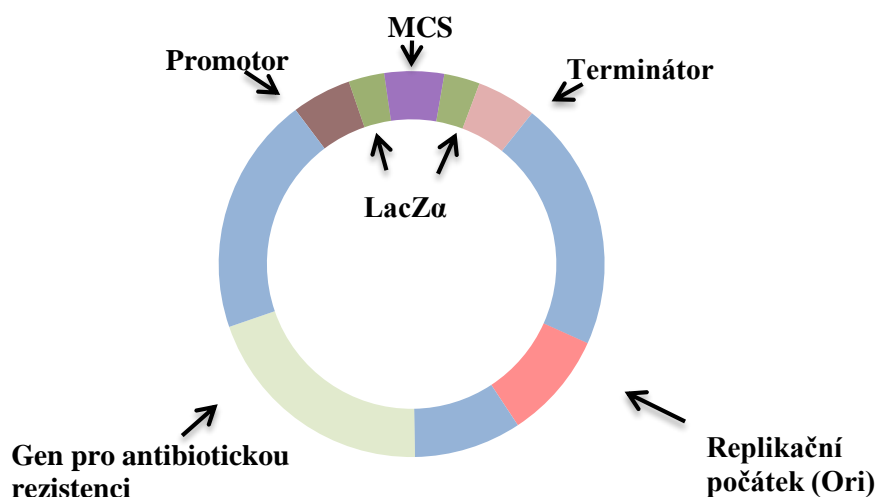


Obr. 9: Využití dvou restričních endonukleáz při jednosměrném klonování (upraveno dle Raška *et al*, 2010)

3.4.4. Vektory

Vektorem v obecném smyslu rozumíme případ, kdy rekombinantní molekuly tvoříme za účelem přenosu DNA. Existují ovšem i další typy vektorů. Jestliže je naším cílem nejen vložení, ale i amplifikace, mluvíme o tzv. klonovacím vektoru. Dalším typem je poté expresní vektor, který je určen k syntéze proteinu (Růčková *et al*, 2014; <http://biologie.upol.cz>).

Klonovacích vektorů je velké množství a mnohé se od sebe liší různými principy použití. V zásadě ovšem všechny obsahují několik nezbytných sekvencí, mezi nimiž je replikační počátek (*ori*), který umožňuje nasednutí DNA polymerázy a následnou replikaci, dále polyklonovací místo (multiple cloning site = MCS), jež obsahuje různé sekvence pro odlišné restriční endonukleázy. Často se MCS nachází v plasmidech jako součást *lac* operonu uvnitř genu *lacZ* (gen pro β -galaktozidázu), který je v nepřítomnosti induktoru blokován represorem (Raška *et al*, 2010; Fusek *et al*, 2012). Taktéž klonovací vektory obsahují regulační sekvence pro transkripci, to jest promotor, operátor a terminátor. Sekvence zvýhodňující růst buněk a zajišťující přenos do další generace nazýváme selekční markery. Nejčastěji se jedná o rezistenci k antibiotikům jako ampicilin nebo kanamycin, která při růstu buněk v prostředí s tímto antibiotikem umožňuje jejich přežití. (Obr. 10).



Obr. 10: Typický bakteriální vektor (upraveno dle Clark et Pazdernik, 2009)

Za účelem purifikace lze také vytvářet fúzní proteiny s tzv. tagy (afinitní značky), díky nimž jsme schopni zvýšit výtěžek i čistotu. Taktéž jsme schopni vybavit konstrukt reportérovými sekvencemi, které nám umožňují pozorovat expresi proteinů v buňce *in vivo* (Fusek *et al*, 2012; <http://biologie.upol.cz>; Růčková *et al*, 2014).

Mezi základní klonovací vektory patří plazmid, umělé bakteriální (BAC = bacterial artificial chromosome), kvasinkové (YAC = yeast artificial chromosome), savčí chromozomy (MAC = mammalian artificial chromosome), bakteriofág a kosmid (Allison, 2007). Nejdůležitějším vektorem je plazmid, který je schopný autonomní replikace. Tohoto faktu využíváme při amplifikaci veškerých plazmidů v *E. coli* (Fusek *et al*, 2012), nicméně neupravený plazmid má poměrně malou kapacitu pro vkládaný inzert, což nás při tvorbě rekombinantní DNA značně limituje.

Tento problém byl odstraněn použitím vektorů virového původu (např. bakteriofág) či tvorbou rekombinantních virových vektorů (např. kosmid, fasmid), které již mají kapacitu pro vkládaný inzert od 20–45 kb. Rekombinantním virovým vektorem rozumíme plazmid, který má část genomu nahrazenou expresní kazetou, jež po transdukci do hostitelské buňky zajistí lepší prostorovou organizaci velkých molekul DNA a tím i expresi genu (Růčková *et al*, 2014). Mezi vektory s velmi velkou kapacitou řadíme BAC, YAC a MAC. YAC mají často replikační počátky dvou různých organizmů, tzv. „shuttle vector“ (Clark *et Pazdernik*, 2009).

Kromě běžných klonovacích vektorů můžeme použít systémy založené na principu restričního štěpení a následné ligaci. Například systém Gateway ulehčuje klonování genů prostřednictvím místně specifické rekombinace. Pokud jsme vytvořili tzv. vstupní klon, lze

přesunout inzert ohraničený att sekvencemi do různých cílových vektorů současně (např. do hmyzího a kvasinkového). Dalšími systémy je TOPO nebo LIC klonování = ligation independent cloning (www.thermofisher.com; Růčková *et al*, 2014).

Tabulka 1: Použití a funkce odlišných klonovacích vektorů (upravena dle Casali *et al*, 2003)

Vektor	Bazální informace	Velikost inzertu	Preferované použití
Plazmid	Přírodně se vyskytující extrachromozomální DNA	15 kb	cDNA klonování, testy exprese proteinů
Fág	Bakteriofág λ	5–20 kb	Klonování genomové DNA, cDNA klonování, genomové knihovny
Kosmid	Plazmid obsahující cos sekvenci z bakteriofága λ	35–45 kb	Genomové knihovny
BAC (bacterial artificial chromosome)	F plazmid <i>Escherichia Coli</i>	75–300 kb	Analýza velkých genomů
YAC (yeast artificial chromosome)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> centromera a telomera	100–1000 kb	Analýza velkých genomů, YAC transgenní myši
MAC (mammalian artificial chromosome)	Savčí centromera, telomera a počátek replikace	100 kb > 1 Mb	Vývoj za účelem použití v biotechnologických metodách pracujících se zvířaty, lidská genová terapie

3.4.5. Vnesení DNA do expresního systému a selekce

Pokud máme vytvořený požadovaný konstrukt (inzert – vektor), je nutné zvolit vhodný expresní systém neboli buňku pro syntézu námi zvoleného genu. Pro proces vnesení DNA do cílové hostitelské buňky rozlišujeme tři termíny. Dle odborného Mosbyho slovníku byly tyto termíny definovány následovně:

Transdukce – metoda genetické rekombinace, ve které je DNA přenášeno z jedné buňky do druhé virálním vektorem. Různé bakteriofágy přenášejí DNA z jednoho druhu bakterie do druhého.

Transfekce – proces, ve kterém je bakteriální buňka infikována s purifikovanou DNA nebo RNA, izolovanou z viru po specifické předúpravě (předošetřením).

Transformace – integrace exogenních genů do chromozomů ve formě, která je rozpoznána replikačním a transkripčním aparátem hostitelské buňky (Anderson *et al*, 2002).

Transformací se rozumí v pravém slova smyslu přenos DNA do bakteriální buňky. Nicméně molekulární biologové opomněli vytvořit termín pro přenos do kvasinek, hub, zvířat a rostlin, tudíž se s tímto termínem můžeme setkat i ve spojení s těmito organismy (Brown, 2016).

Buňky, které jsou schopné přijmout tuto cizí DNA (konstrukt), nazýváme kompetentní. Tohoto stavu u hostitelských buněk dosáhneme inkubací ve studeném roztoku kationtů vápníku, při čemž dojde k „proděravění“ buněčné membrány, a následným tepelným šokem, kdy za pomoci náhlé vyšší teploty dosáhneme přenosu konstruktů do buňky. Další častou metodou přenosu DNA do buňky je elektroporace, kdy je DNA tlačena do buňky silným elektrickým proudem. Jakmile DNA překoná bariéry buňky, musí být hostitelská buňka schopna uchovat DNA v intracelulárním prostoru. Toho je dosaženo modifikací v podobě inaktivace produkce endonukleáz, které by tuto cizí nemetylovanou DNA odstranily (Allison, 2007; Glick *et al*, 2010).

Po přenosu námi vytvořeného konstruktů do buněk je třeba tyto buňky odlišit od těch, kde proces přenosu nebyl úspěšný. K tomu nám slouží selekční markery. Může se jednat o geny udělující rezistenci antibiotikům. Nicméně se tento systém prezentuje z dlouhodobého hlediska jako rizikový, tudíž se přistupuje k vektorům s modifikací esenciálních genů, jejichž defekt znamená pro buňku smrt, jedná se o tzv. nonantibiotic selection (Sodoyer, 2004; Glick *et al*, 2010).

3.4.6. Expresní systémy

Hostitelské buňky, jež jsou využívány k účelům exprese rekombinantních proteinů, nazýváme expresní systémy. V korelaci se současnou technologií a širokým výběrem těchto systémů musíme při tvorbě námi zvoleného proteinu zohlednit, zda je eukaryotického nebo prokaryotického původu, a z toho plynoucí rizika. Taktéž je nutné zvážit finanční náročnost, čistotu purifikovaného proteinu a časovou náročnost. U expresních systémů virového původu je nutné věnovat zvýšenou pozornost také bezpečnostním požadavkům a legislativě (Růčková *et al*, 2014).

3.4.6.1 Prokaryotní expresní systémy

Ústřední postavení mezi prokaryotickými mikroorganismy používaným pro expresi rekombinantních proteinů patří bakteriím. Zejména se jedná o *E. coli* (Fusek *et al*, 2012). Především naše dobrá znalost její genetiky, molekulární biologie, biochemie a fyziologie z ní dělá upřednostňovaný bakteriální organismus (Glick *et al*, 2010). Taktéž vyniká vysokou výtěžností v krátké generační době a poměrně nízkou finanční náročností na kultivaci (Fusek

et al, 2012). V neposlední řadě nám umožňuje amplifikovat nejen malé plazmidy, ale i velké bacmidy velikosti až několika stovek bází. Nicméně disponuje omezením posttranslační modifikace proteinů (glykosylace), která u ní z důvodu absence odpovídajících enzymů není přirozeně možná (Raška *et al*, 2010). V dnešní době je tento problém aktivně řešen zejména N-glykosylačním systémem pocházejícím z bakterie *Campylobacter jejuni*, kdy tento systém je vložen do *E. coli* a své uplatnění nachází například při vývoji vakcín (Nothhaft *et al*, 2013; Sodoyer, 2004). Problémy také nastávají při produkci proteinů s disulfidickými vazbami, které se těžko exprimují. Záporom je i produkce výsledných proteinů kontaminovaných bakteriálními s-endotoxiny či jejich acetátová forma, která působí toxicky na samotný produkční systém. V neposlední řadě může být komplikací tohoto systému produkce proteinů ve formě inkluzních tělísek, což jsou biologicky neaktivní, nerozpustné agregáty s nadbytečnými inter- nebo intramolekulovými disulfidickými vazbami (Demain *et al*, 2009).

Mezi úspěšné systémy patří dále *Bacillus*, což je gram-pozitivní bakterie, z níž pro expresi používáme druhy jako *B. subtilis*, *B. licheniformis* a *B. brevis*. Tyto systémy se staly zajímavou alternativou *E. coli* zejména z důvodu možnosti vyšší hustoty bakterií v kultivačním médiu. Taktéž tyto systémy nabízí širokou škálu silných promotorů a v neposlední řadě i TAT (Twin Arginine Translocation) sekreční dráhu, která umožňuje transport rekombinantních proteinů přes buněčnou stěnu (Demain *et al*, 2009; Sodoyer, 2004).

Potenciál bakterií mléčného kvašení již byl využit pro přípravu více než 400 plazmidových vektorů. Různě modifikované plazmidy těchto gram-pozitivních bakterií umožňují bezpečnou syntézu široké škály produktů, jako např. odlišných antigenů proti malárii nebo tzv. „živých slizničních vakcín“. K tvorbě těchto proteinů jsou používány odlišné druhy jako *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* atd. (Cui *et al*, 2015; Sodoyer, 2004; Wyszynska *et al*, 2015).

Plazmidy psychrofilních a psychrotrofních bakterií (pPSYCH) nám taktéž otevírají dveře k novým možnostem v podobě exprese termolabilních proteinů a enzymů při nízkých teplotách. Tyto plazmidy nesou geny např. pro „cold shock“ proteiny umožňující biologické procesy v buňce při nízké teplotě, proteiny umožňující opravy poruch DNA způsobených UV zářením atd. (Dziewit *et al*, 2014; Margesin *et al*, 2008). Duilio *et al* připravili první „replikon za studena“ poměrně nedávno, v roce 2004 z gram-negativní bakterie *Pseudoalteromonas haloplanktis* kmene TAC125 z Antarktidy, který byl schopný exprese enzymu za studena.

Taktéž se můžeme setkat s bakteriálními systémy *Pseudomonas* různých druhů jako *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, a *P. putida*, které dosahují v některých případech i vyšší exprese než *E. coli* (Chen, 2012). Gram-pozitivní bakterie rodu *Streptomyces* jsou pro vědce

taktéž zajímavé, zejména kvůli produkci proteinů přímo do kultivačního média. Hlavní problém řešený u tohoto systému je výtěžnost. Preferovaným druhem je systém *Streptomyces lividans* (Chen, 2012; Vrancken *et Anné*, 2009). Koryneformní gram-pozitivní bakterie, jako *Corynebacterium glutamicum* a *Corynebacterium ammoniagenes*, jsou v biotechnologii používány za účelem produkce aminokyselin a nukleotidů. Vědci Itaya a Kikuchi ovšem ve své práci ukazují jejich expresní potenciál v podobě TAT sekreční dráhy (Itaya *et Kikuchi*, 2008). *Caulobacter crescentus* je gram-negativní bakterie, jejíž I. typ sekreční dráhy, který umožňuje transport proteinů na povrch buňky, z ní dělá dalšího adepta pro volbu expresního systému (Terpe, 2006; Chen, 2012). Jako expresní vektory byly použity i *Methylobacterium extorquens* (Gutiérrez *et al*, 2005), nepatogenní gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus carnosus* (Hansson *et al*, 2002) nebo cyanobakterie *Anabaena sp.* (Desplancq *et al*, 2005).

Jako expresní vektor pro expresi heterologních proteinů by v principu mohly být použity všechny bakterie. Nicméně limitujícím faktorem, proč tomu tak v praxi není, jsou naše vědomosti o těchto systémech (Terpe, 2006). Do budoucna ovšem můžeme očekávat, že i tyto alternativní systémy najdou své uplatnění po boku s vylepšenými verzemi *E. coli* (Chen, 2012).

3.4.6.2 Eukaryotické expresní systémy

Kvasinky

Tyto jednobuněčné eukaryotické organismy, které jsou řazeny mezi houby, hrají důležitou roli v průmyslu, životním prostředí i lékařství (Schaechter, 2009). Jsou používány i jako expresní systémy pro přípravu rekombinantních proteinů, a to zejména z důvodu schopnosti posttranslačních modifikací. Samozřejmě tyto systémy disponují i dalšími výhodami, bohužel i včetně řady nevýhod, viz Tabulka 2 (Demain *et al*, 2009).

Tabulka 2: *Výhody a nevýhody kvasinkových expresních systémů (upraveno dle Demain et al, 2009; Clark et Pazdernik, 2009)*

Výhody	Nevýhody
Odolnost	Ztráta plazmidu při kultivaci ve velkých bioreaktorech
Snadnější a levnější kultivace, než je tomu u hmyzích či savčích buněk	Sekrece proteinu do periplasmatického prostoru
Vysoká hustota růstu v médiu	Hyperglykosylace, což způsobuje ztrátu biologické aktivity proteinu
Vysoká exprese	Glykosylované proteiny jsou pouze ty, které jsou sekretovány do média
Proces tvorby proteinů je podobný savčím buňkám	

Genetická stabilita produkčních kmenů	
Vhodný k produkci S-S bohatých proteinů	
Glykosylace proteinů (<i>O</i> -glykosylace)	
Snadnější purifikace, pokud je protein sekretován do média	

Nejpoužívanějším, prvním a zároveň nejlépe charakterizovaným systémem tohoto druhu je *Saccharomyces cerevisiae*. Je označen jako GRAS (generally recognized as safe), což z něj dělá bezpečného producenta farmaceutických látek (Çelik *et* Çalık, 2012; Fusek *et al*, 2012). Tento systém je používán např. pro výrobu inzulínu, růstových faktorů, proteinů a pro výrobu vakcín, kde mezi příklady patří povrchový antigen hepatitidy typu B (Clark *et* Pazdernik, 2009; Demain *et al*, 2009). Pro průmyslové využití byly vytvořeny kmeny s omezenou produkcí proteáz a zvýšenou genetickou stabilitou. Plazmidy kvasinek obsahují podobné sekvence jako bakteriální (specifický promotor, polyklonovací místo atd.). Nicméně je třeba principiálně odlišovat kvasinkový integrační plazmid (YIp-Yeast integrative plasmid), jehož cílem je integrace do chromozomu hostitelské buňky, a replikační plazmid (YRp- Yeast replicative plasmid), který má schopnost autonomní replikace (Fusek *et al*, 2012).

Na trhu se kromě dominantně zastoupené *S. cerevisiae* můžeme setkat s kvasinkou *Kluyveromyces lactis*, jejíž význam na poli biotechnologií i genetického inženýrství v posledních letech výrazně stoupá. Za posledních 25 let byl tento systém použit k přípravě více než 100 rekombinantních proteinů a z toho 20 % bylo připraveno v posledních dvou letech. Nejdůležitější výhodou oproti ostatním kvasinkám je schopnost růstu v syrovátce, což má ekonomické i ekologické výhody (Spohner *et al*, 2016). Taktéž se můžeme setkat s kvasinkami se schopností metabolizovat methanol jako zdroj uhlíku a energie. Do této skupiny řadíme *Pichia pastoris* a *Hansenula polymorpha*. Další, *Schizosaccharomyces pombe*, se stala třetím eukaryotickým organismem s kompletně známým proteomem a šestým kompletně osekvenovaným eukaryotickým organismem. Nicméně v praxi tento organismus není příliš využíván. Jako poslední významné alternativy bych chtěla zmínit dimorfní kvasinky *Arxula adenivorans* a *Yarrowia lipolytica* (Çelik *et* Çalık, 2012). Dimorfní kvasinky mohou žít jak ve formě kvasinky tak i mycelia. *A. adenivorans* je halotolerantní, což v praxi znamená, že může růst v médiu obsahujícím více než 20% NaCl. Termostabilita je taktéž její předností, kmen LS3 může růst bez předchozí adaptace při 48°C (Wartmann *et al*, 2000). Vědci doufají, že by *Yarrowia lipolytica* mohla být klíčem k vyřešení hypermanosylace proteinů, a tudíž bychom byli o krok blíže k tvorbě lidského typu glykosylačního systému (Callewaert *et al*, 2001; Çelik *et* Çalık, 2012).

Hmyzí expresní (bakulovirové) systémy

Hmyzí expresní vektory vytváří jakousi spojnicí mezi prokaryotními a eukaryotními systémy. Jako jejich preferenční přednost řadíme schopnost glykosylace proteinů, které jsou pak více podobné savčím, ale také schopnost růstu na méně náročném médiu, než je tomu u savčích buněk (Clark *et Pazdernik*, 2009; Raška *et al*, 2010). Tyto systémy nám ovšem nabízí další výhody včetně jistých omezení, viz Tabulka 3.

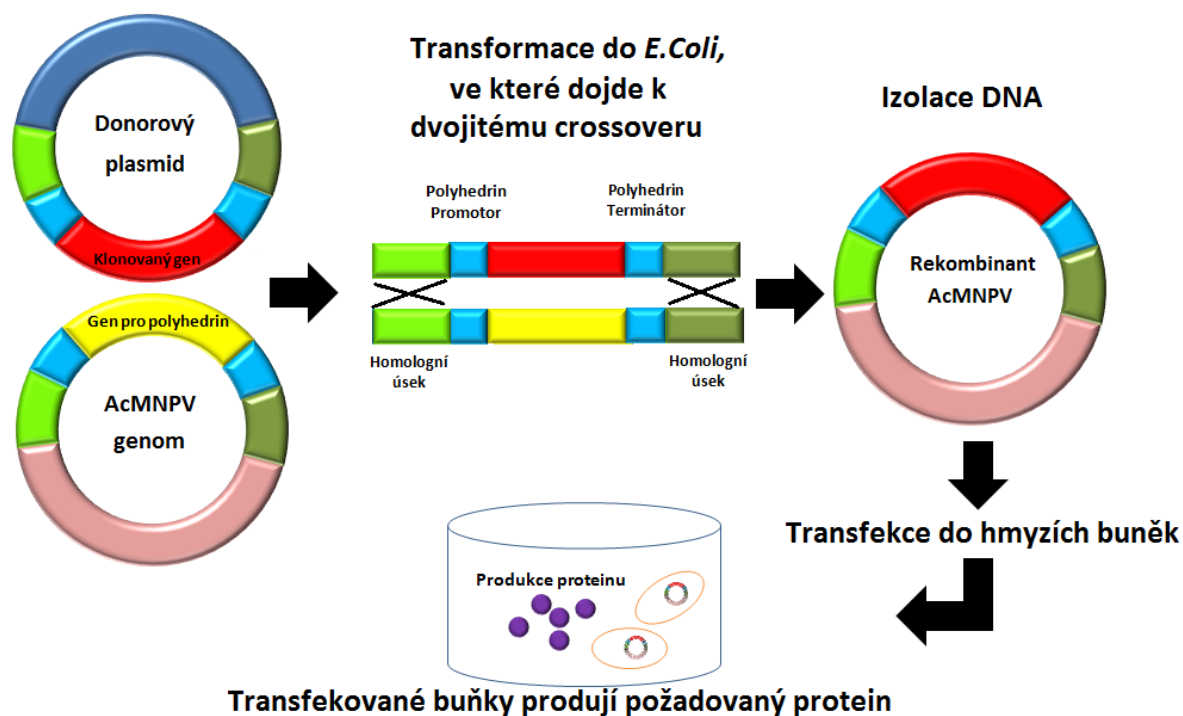
Tabulka 3: *Výhody a nevýhody hmyzích expresních systémů (upraveno dle Demain et al, 2009; Raška et al, 2010; Kost et Condreay, 2002)*

Výhody	Nevýhody
Posttranslační modifikace <ul style="list-style-type: none">• N-glykosylace• O-glykosylace	Chybná posttranslační modifikace
Vysoká exprese proteinu bez endotoxinů	Náročná příprava, ověření a udržování infekčních virových částic (nejsou-li koupeny komerčně dostupné linie)
Účinné štěpení signálního peptidu	
Správné skládání proteinů včetně S-S můstků	Nesprávné složení => intracelulární shluky
Vysoká hustota růstu v médiu	Proces exprese a posttranslační modifikace musí být empiricky stanoven pro každý konstrukt
Simultánní exprese genů	
Bezpečnost	
Stabilita velkých inzertů (38 kb)	
Nereplikuje se v savčích buňkách	

Bakuloviry jsou viry infikující specificky *Antropoda* včetně dalších hmyzích druhů. Nejprozkoumanějším a nejpoužívanějším virem za účelem tvorby rekombinantních proteinů je *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus => AcMNPV, což je obalený dsDNA virus s cirkulárním genomem o velikosti ~130 kb. (Kost *et Condreay*, 2002; Glick *et al*, 2010). Jako hostitelské buňky jsou nejčastěji používané buněčné linie Sf9 a Sf21AE, pocházející z larev můry *Spodoptera frugiperda*, a BTI-Tn-5B1-4 linie známá také jako „High 5 cells“, pocházející z vajíček můry *Trichoplusia ni* (Ikonomou *et al*, 2002; Kost *et Condreay*, 2002). Méně používaný je virus *Bombyx mori*, což je polyedrický virus, u kterého využíváme jako hostitelské buňky larvy bource morušového (Glick *et al*, 2010)

Při tvorbě bakulovirového expresního systému vycházíme ze schopnosti viru vytvářet polyedrickou částici, tedy částici tvořenou polyhedrinem (proteinem), která umožní viru přežít i po úmrtí hostitelské buňky. Promotor pro tvorbu polyhedrinu je velmi silný. Zajišťuje transkripci více než 25% mRNA v buňce infikované virem. My tento promotor využíváme

pro expresi našeho rekombinantního proteinu, kdy namísto genu pro polyhedrin vkládáme ve formě cDNA náš protein prostřednictvím donorového plazmidu, viz Obr. 11 (Clark *et Pazdernik*, 2009; Glick *et al*, 2010).



Obr. 11: Schématické znázornění procesu tvorby bakulovirového expresního vektoru s následnou produkcí požadovaného proteinu transfekovanými buňkami (upraveno dle Clark *et Pazdernik*, 2009)

Další možností je kombinace plazmidu *E. coli* a viru napadajícího hmyzí buňky. Výsledkem je tzv. bacmid. Bacmid je složen primárně z baculovirové DNA, ale obsahuje bakteriální replikační počátek, MCS a geny mající funkci selekčních markerů. Tyto sekvence umožňují přežít konstruktu v *E. coli*, odkud je konstrukt purifikován a následně transfekován do hmyzích buněk, kde se replikuje (Clark *et Pazdernik*, 2009).

Savčí tkáňové systémy

Savčí systémy se staly dominantní v produkci rekombinantních proteinů pro klinické účely, zejména díky jejich možnostem posttranslační modifikace proteinů. V současné době jsou tyto systémy používány k produkci více než 60 % terapeutických rekombinantních proteinů (Wurm, 2004). Stejně jako ostatní systémy disponují ty savčí jistými omezeními, viz Tabulka 4.

Tabulka 4: Výhody a nevýhody savčích expresních systémů (Fusek *et al*, 2012, Demain *et al*, 2009)

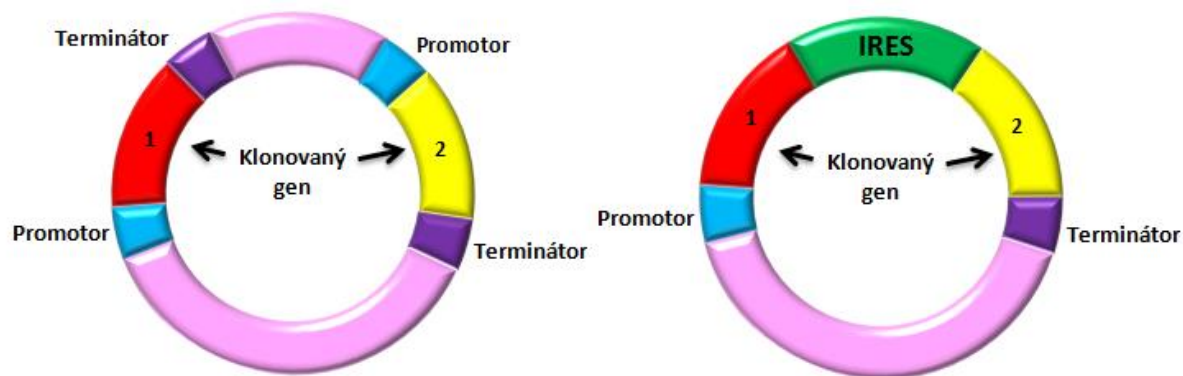
Výhody	Nevýhody
Pozitivní determinace farmakokinetických a farmakodynamických vlastností	Riziko kontaminace
Při správném složení proteinu není nutné protein renaturovat	Cena médií pro kultivaci
	Nutnost pěstovat v atmosféře s 5% CO ₂
	Pomalý růst

Za účelem syntézy proteinů jsou nejčastěji produkovány liniemi vaječníku křečka čínského (CHO – Chinese hamster ovary), ale také se můžeme setkat s liniemi myšího myelomu NS0 a Sp2/0-Ag14, které jsou určeny především pro produkci chimerních humanizovaných protilátek. Taktéž se můžeme setkat s embryonálními buňkami lidských ledvin (HEK-293), buňkami BHK (baby hamster kidney) a Vero (endotelové buňky z opičích ledvin), které jsou nejběžněji používány pro produkci rekombinantních vakcín (Wurm, 2004; Fusek *et al*, 2012).

Tyto linie mohou být kultivovány ve dvou formách. Buď jako adherentní buněčné linie, anebo v podobě buněčné suspenze (Wurm, 2004).

Procesem optimalizace savčích systémů bylo dosaženo výtěžku v řádu gramů na litr. Výsledné produkční buňky včetně vektorů, kultivačních podmínek a médií jsou často předmětem utajení firem (Fusek *et al*, 2012). Základní produkční schéma se skládá z vektoru založeného na bázi virů infikujících savčí buňky. Tento vektor má silný promotor (nejčastěji virový, např. SV40), selekční marker (např. dihydrofosfát reduktáza – DHFR, glutamin syntáza – GS), kdy v případě těchto markerů dojde ke smrti buňky, pokud není transformována, a regulační elementy pro transkripci jako enhancery transkripce nebo promotorové proximální elementy (Wurm, 2004; Fusek *et al*, 2012).

Za účelem zvýšení exprese proteinu byly vyvinuty různé konstrukty. Jsou jimi jak konstrukty s dvěma oddělenými geny, tak plazmidy se sekvencí IRES (internal ribosomal entry sites), které umožňují nasednutí ribozomu a translaci dvou genů zároveň, viz Obr. 12. Zvýšení exprese lze dosáhnout i místně specifickou rekombinací transkripčně aktivních oblastí či housekeeping geny, které zajišťují snadný přístup pro RNA polymerázu (Fusek *et al*, 2012; Clark *et Pazdernik*, 2009).



Obr. 12: Expresní vektor kódují dva polypeptidy, z nichž ten se sekvencí IRES umožňuje translaci obou polypeptidů v rámci jedné mRNA (upraveno dle Clark et Pazdernik, 2009)

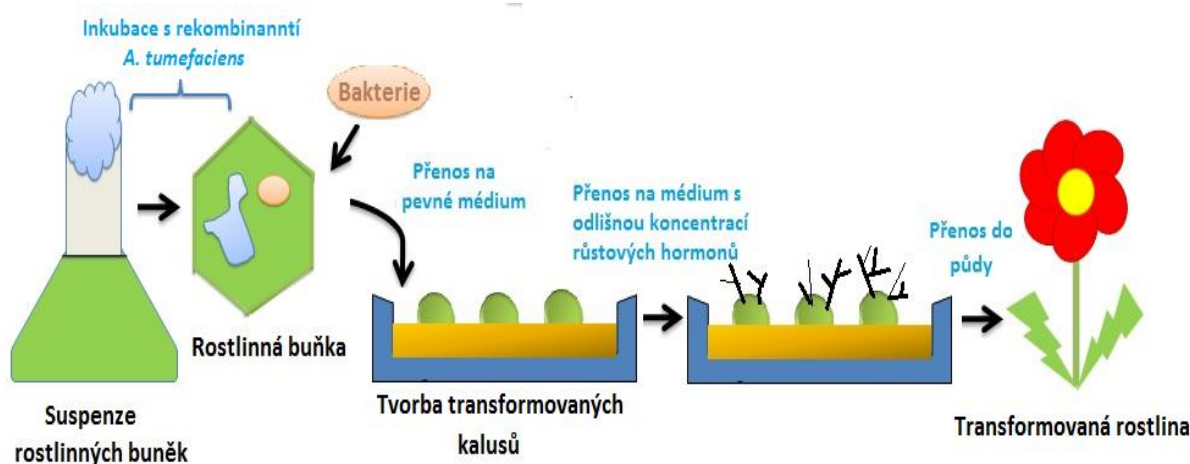
Transgenní rostliny

Další typem expresních systémů jsou transgenní rostliny včetně rostlinných pletiv z různých druhů a odrůd brambor, semen rýže, fazolí, kukuřice, tabáku, jahod, kořenové zeleniny, rajčat a vodních plevelů. Můžeme se také setkat i s kořenovými, listovými i stonkovými kulturami, s jednobuněčnými kulturami řas *Chlorella* a *Chlamydomonas* nebo transformovanými chloroplasty (Ganapathy, 2016). Nedávné výzkumy ukazují, že transgenní rostliny disponují mnoha benefity. I zde je nutné ovšem poukázat na jistá rizika a výhody, viz Tabulka 5. Tyto systémy již byly úspěšně použity k produkci řady proteinů pro terapeutické nebo diagnostické použití (Ma *et al*, 2005).

Tabulka 5: Výhody a nevýhody transgenních rostlin (upraveno dle Ma *et al*, 2003; Demain *et al*, 2009)

Výhody	Nevýhody
Absence lidských patogenů	Možnost kontaminace rostlin pesticidy, herbicidy
Nízká produkční cena	Toxické metabolity rostliny
Relativně nízká náročnost purifikace	
Posttranslační modifikace	
Správné složení proteinů a tedy zachování biologické aktivity (využití hlavně pro tvorbu protilátek)	

Linie těchto rostlin získáváme obecně třemi hlavními způsoby. První způsob využívá Ti plazmid z *Agrobacterium tumefaciens* (viz Obr. 13). Druhý způsob spočívá v přímé aplikaci DNA ve formě mikroprojektilů do rostlinné tkáně. Další způsoby jako elektroporace a transformace protoplastů nejsou používány ve velkém měřítku, tedy mj. nikoliv pro zemědělské účely (Ma *et al*, 2003). Při využití vektoru na bázi Ti plazmidu je transgen děděn až od následných generací rostlin. Toto náhodné začleňování do genomu se může projevit i opakovaným vložením inzertu a následnou nestabilitou transgenů, umlčením genu nebo nízkou expresí (Shih *et al*, 2009). Mezi další způsob transformace řadíme vektory na virové bázi, kdy jako výchozí nebuněčný organismus nám může posloužit virus mozaiky květáku (CaMV – Cauliflower mosaic virus), virus mozaiky tabáku či geminivirus. Tyto vektory nesou svá omezení. Některé již byly vyřešeny (nízká kapacita vkládaného inzertu u CaMV), jiné (např. omezený počet hostitelských rostlin CaMV) se stále musí řešit (Brown, 2016; Shih *et al*, 2009).



Obr. 13: Transformace suspenze rostlinných buněk rekombinantním *A. tumefaciens*, kdy výsledkem je transformace všech konečných rostlin (upraveno dle Brown, 2016)

Transgen může být začleněn buď do jaderného genomu nebo do chloroplastového genomu. Transformace chloroplastového genomu je možná pouze v případě, že vkládaný inzert je ohraničen sekvencemi o velikosti 500 bp nebo delší, které jsou homologní k chloroplastové DNA, a tudíž zde může dojít k homologní rekombinaci (Brown, 2016). Tento způsob transformace zcela omezuje riziko nechtěného přenosu rekombinantních genů do přírody, jelikož transgen nemůže být přenesen pylem (Ganapathy, 2016). Vzhledem k tomu, že genom chloroplastů je polyploidní, je možné do genomu transformovat tisíce kopií a tím dosáhnout vysoké hladiny exprese. Tento systém disponuje mnoha dalšími výhodami ve

srovnání s transgenními rostlinami a zdá se být lepší alternativou pro produkci jedlých vakcín (Daniell *et al*, 2002).

U rostlin je taktéž možné využít kultivaci buněk *in vitro*, čímž dosahujeme jednak vysoké exprese produktu, jednak také nízké výrobní ceny (Ganapathy, 2016). Tyto buňky jsou taktéž nezávislé na environmentálních podmínkách narozdíl od pěstovaných rostlin. Taktéž u nich není možná kontaminace herbicidy, pesticidy nebo mykotoxiny a je zde i méně vedlejších produktů (oleje, vosky atd.). Velkým plusem je snadná purifikace, jelikož produkty jsou sekretovány do média (Hellwig *et al*, 2004). Negativem rostlinných kultur je extracelulární absorpce proteinů v médiu nebo post-syntetické intracelulární degradace rostlinnými proteázami (Shih *et* Doran, 2009). Nyní se ukazuje, že tyto systémy budou schopné konkurence běžným expresním systémům, např. žaludeční lipáza firmy Meristem Therapeutics z Francie vstoupila do klinické fáze testování (Ganapathy, 2016).

Transgenní živočichové

Zejména finanční náročnost přípravy rekombinantních proteinů v dostatečné kvalitě vedla k využití transgenních rostlin a živočichů jako „bioreaktorů“ pro jejich přípravu (Larrick *et* Thomas, 2001).

Proces výroby proteinů využívající transgenní živočichy je stále nedokonalý a je nutné jej optimalizovat pro specifické účely produkce proteinů. Nejběžněji se využívá sekrece požadovaného proteinu do mléka. Nicméně se můžeme setkat i se systémy sekrece proteinu do krve, vaječného bílku, moči, hedvábné žlázy, hemolymfy larev hmyzu nebo spermatu (Houdebine, 2009; Larrick *et* Thomas, 2001). Tento systém disponuje preferenční výhodou v podobě posttranslační modifikace (stejně jako savčí systém), ale dosahuje větších výtěžků. Nevýhodou živočišných transgenních systémů může být riziko prionové infekce, proto je třeba zvolit vhodný systém – např. králík nevykazuje citlivost k prionovým infekcím, ale oproti krávě dosahuje nižších výtěžků proteinu za rok při extrakci z mléka (0,02/40 kg za rok), ovšem kráva je zase citlivá na prionové onemocnění (Houdebine, 2009). Dalším parametrem, který musí být při produkci posouzen, je délka chovu – např. myš je schopna produkce po 3,5 měsících, zatímco u krávy činí doba vývoje v dospělého jedince 32 měsíců (Demain *et al*, 2009).

Ostatní

Vláknité houby jsou v dnešní době řazeny mezi systémy, jejichž produkty nacházejí uplatnění na ekonomickém trhu. Můžeme se setkat s jednoduchými organickými kyselinami, ale i složitými sekundárními metabolity jako penicilin či cyklosporin. V současné době jsou tyto produkty vyráběny především z *Aspergillus niger*, *A. oryzae* a *Trichoderma reesei*, jiné kmeny jsou aktuálně ve vývoji (Meyer, 2008).

Jako další z možných alternativ se můžeme setkat se zástupci protozoa jako je trypanosoma (*Leishmania tarentolae*). Z této autonomní formy života byl vytvořen nepatogenní kmen, který dle Breitling *et al* dosahuje exprese 30 mg/l kultury. Výhodou použití tohoto systému je stabilní a přesná integrace do genomu a snadné pěstování v médiu o vysoké hustotě buněk (Breitling *et al*, 2002; Demain *et al*, 2009).

Bezbuňčné expresní systémy oproti tradičním systémům na bázi buněk nabízí výhody v podobě syntézy proteinů, jejichž produkce je v buňce fyziologicky omezena (např. toxické, nestabilní nebo proteolyticky citlivé proteiny), snadné regulace reakčních podmínek, snížení doby exprese či umožnění syntézy více typů proteinů dle předlohy (Katzen *et al*, 2005; Jackson *et al*, 2004). Ve své jednodušší formě se může tento systém skládat ze surového lyzátu daného organismu v kombinaci s přídáním mRNA produktu, aminokyselin a dávky energie prostřednictvím hydrolýzy trifosfátů – ATP a GTP (Katzen *et al*, 2005; Jermutus *et al*, 1998). Jako zdroj lyzátu je nejčastěji používána *E. coli*, králičí retikulocyty nebo pšeničné klíčky (Jackson *et al*, 2004). Tento systém má ovšem velké prostory pro zlepšování – např. koncentrace 1 g/ml nestačí na veškeré aplikace, nalezení efektivního energetického zdroje (recyklace ADP), atd. (Katzen *et al*, 2005; Schwarz *et al*, 2008). Bezbuňčné expresní systémy v současnosti lákají pozornost vědců např. pro syntézu membránových proteinů (Schwarz *et al*, 2008), ale i pro aplikace funkční a strukturální proteomiky (Katzen *et al*, 2005).

3.4.7. Purifikace

Purifikace je nedílnou součástí tvorby rekombinantních proteinů. Předtím, než zvolíme vhodný způsob purifikace, musíme vzít v úvahu rozpustnost, konformaci proteinu, jeho stabilitu a strukturální flexibilitu, jakož i nízké purifikační výtěžky či toxicitu hostitelské buňky (Young *et al*, 2012). Systém afinitní chromatografie, u kterého využíváme tyto tagy, nám umožňuje specifickou interakci mezi dvěma druhy látek: antigen – protilátka, enzym – substrát, enzym – koenzym nebo protein – specifický ligand (Raška *et al*, 2010). Proteiny,

u kterých došlo ke specifické interakci, jsou odmyty a následně jsou navázané proteiny uvolněny změnou pH, polaritoy či iontové síly nebo specificky přidáním kompetitivního ligandu (Růčková *et al*, 2014).

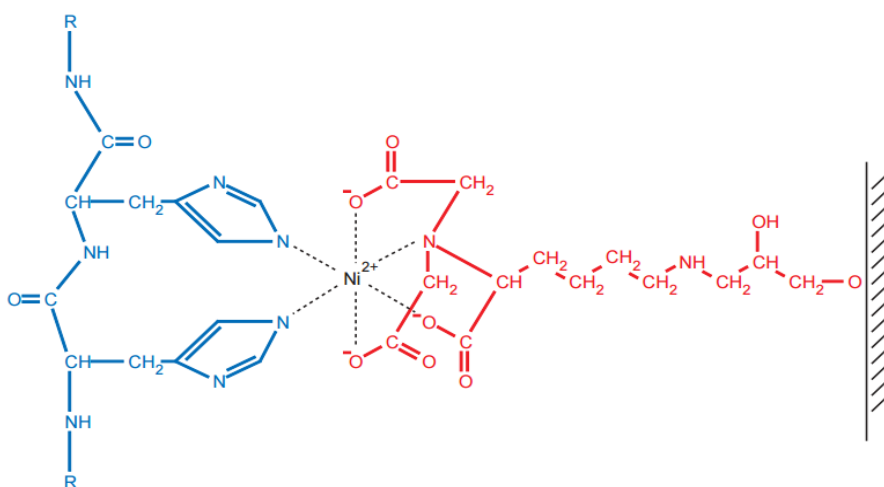
Na trhu se můžeme setkat s vektory obsahujícími celou řadu afinitních značek umožňujících purifikaci, detekci, zvyšujících nebo snižujících rozpustnost, tagů s autokatalytickou doménou, která umožní odstranění tagu od produktu, či tagů se sekvencemi, které jsou cíleně štěpeny pomocí proteáz, čímž opět získáme samotný produkt bez značky (viz Tabulka 6).

Tabulka 6: Peptidové, proteinové a doménové značky určené k purifikaci rekombinantních proteinů

Značka	Velikost (kDa)	Stěžejní funkce	Reference
Poly Arg-tag	0,80	Optimalizace pro purifikaci za různých podmínek	(Young <i>et al</i> , 2012); (Terpe, 2003)
Poly His-tag	0,84	Metaloafinitní chromatografie	(Young <i>et al</i> , 2012); (Terpe, 2003)
3× FLAG	2,73	Purifikace protilátek; odstranění enterokinázou	(Maroux <i>et al</i> , 1971); (Terpe, 2003)
Chitin-binding domain	5,59	Purifikační dvousložkový tag (chitin vázající doména + autokatalytická doména)	(Szweda <i>et al</i> , 2001); (Terpe, 2003)
KSI (ketosteroid isomerase)	13,00	Snižuje rozpustnost	(Young <i>et al</i> , 2012)
TAP (tandem affinity purification)	21,00	Purifikace multiproteinových komplexů	(Gloeckner <i>et al</i> , 2007)
Glutathione S-transferase	26,00	Obecně zvyšuje rozpustnost	(Frangioni <i>et Neel</i> , 1993); (Smyth <i>et al</i> , 2003)
Maltose binding protein	40,00	Zvyšuje rozpustnost	(Fox <i>et Waugh</i> , 2003); (Terpe, 2003)

Bohužel pro purifikaci proteinů neexistuje univerzální protokol. Dle souhrnného review Gräslunda *et al*, 2008, vyplývá, že nejpoužívanějším purifikačním systémem je IMAC (immobilized metal affinity chromatography). Taktéž je třeba si uvědomit, že 60 % rekombinantně připravených proteinů pro strukturní studie neslo poly His-tag afinitní značku (Derewenda 2004). Z těchto dat vyplývá, že způsob purifikace proteinů využívající poly His-tag sekvenci, která vykazuje afinitu k imobilizovanému iontu přechodného kovu, má v současné praxi dominantní postavení.

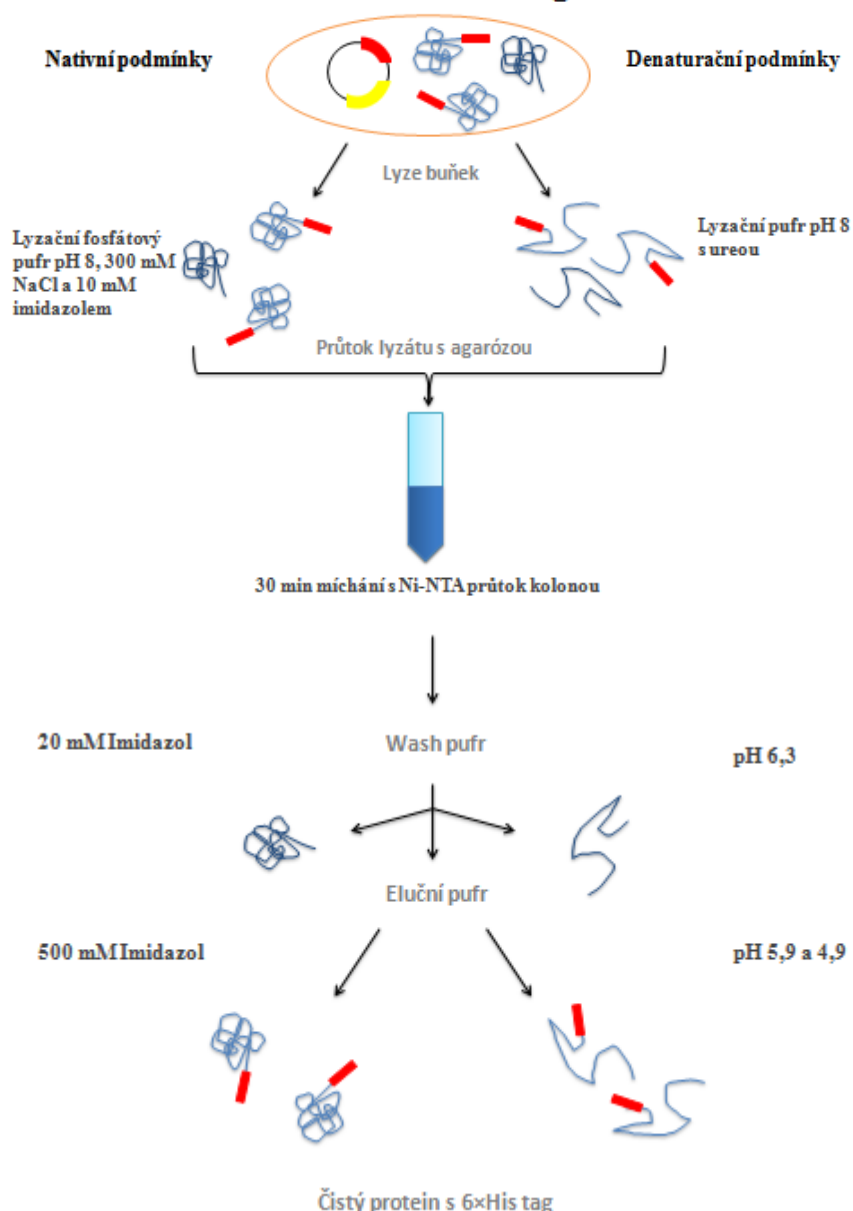
Principem afinitní chromatografie IMAC je tedy chelatační vazba iontů přechodných kovů k imobilizované chromatografické matici (agaróze). Chelatační vazba iontů je zprostředkována buď kyselinou iminodioctovou (IDA), která tvoří cheláty s Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} a Cu^{2+} , ale má k dispozici pouze tři vazebné elektronové páry (Zouhar, 1999), anebo kyselinou nitrilotrioctovou, která váže iont Ni^{2+} čtyřmi vazbami, čímž je zabráněno jeho uvolnění z agarózové matrice. Takto vázaný iont má pak ještě dvě volná vazebná místa umožňující interakci s polyhistidinovým peptidem, viz Obr. 14 (Hochuli, 1989; Zouhar, 1999).



Obr. 14: Interakce mezi Ni-NTA a 6× His-tag protein (převzato z manuálu Ni-NTA Agarose firmy Qiagen, 2003)

V rámci IMAC se tedy setkáváme s širokou škálou pryskyřic lišících se ve vazebné kapacitě a síle vazby. Příkladem může být afinitní chromatografie firmy Clontech nebo Qiagen, viz Obr. 15 (Clontech Laboratories, 2012; QIAexpressionist, 2003; Gräslund *et al*, 2008). Velmi důležitou vlastností této chromatografie je také možnost průběhu jak za nativních, tak denaturačních podmínek, což v praxi znamená možnost purifikovat i nerozpustné proteinové agregáty a také možnost opětovného získání nativní formy např. dialýzou (Zouhar, 1999).

Purifikace s Ni-NTA agarózou



Obr. 15: Schéma purifikace za nativních a denaturačních podmínek (upraveno dle manuálu Ni-NTA Agarose firmy Qiagen, 2003)

Pokud není při afinitní purifikaci dosaženo dostatečné čistoty, je možné ji doplnit metodami, které separují proteiny podle specifických vlastností. Jedná se o gelovou filtraci, která separuje molekuly na základě velikosti, nebo iontově výměnné chromatografie, při kterých dochází k separaci dle povrchového náboje. Dále také můžeme použít hydrofobní interakční chromatografii či reverzně fázovou chromatografii, které využívají rozdílné hydrofobicity (Růčková *et al*, 2014). Dnes je kromě klasické jednokrokové purifikace možné čistit i proteinové komplexy v dvoukrokové purifikaci pomocí speciálních tagů (Gloeckner *et al*, 2007).

4. Materiál a vybavení

4.1. Biologický materiál

Pracovala jsem s transformovanými kmeny *E. coli*, které obsahovaly sekvence OspC a OspA druhu *Borrelia burgdorferi*. Tyto geny byly izolovány na Ústavu Imunologie Univerzity Palackého v Olomouci prostřednictvím cDNA technologie (Běláková *et al*, 2005; Křupka *et al* 2005). Vkládaný gen pro OspC *B. burgdorferi* neobsahoval na N-terminálním konci lipidizační sekvenci a C-konec byl volný, bez přidaných vektorem kódovaných aminokyselin. Tato varianta byla zkonstruována kvůli předpokládané lepší dostupnosti C-terminálního imunodominantního epitopu. Sekvence pro gen OspA byla upravena do podoby spojených fragmentů dvou antigenních verzí a opět neobsahovala na N-terminálním konci lipidizační sekvenci. Od této varianty se očekává vyvolání imunitní odpovědi vůči oběma obsaženým, antigenně odlišným variantám. Výsledné sekvence pro OspC i OspA nesly na N-terminálním konci poly His-tag.

OspC *Borrelia burgdorferi*

Bakterie: *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) (Thermo Fisher scientific)

Genotyp: F⁻ *ompT hsdSB* (rB⁻, mB⁻) *gal dcm rne131* (DE3)

Plasmid: pET 200 (Thermo Fisher scientific)

OspA *Borrelia burgdorferi*

Bakterie: *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) (Thermo Fisher scientific)

Genotyp: F⁻ *ompT hsdSB* (rB⁻, mB⁻) *gal dcm rne131* (DE3)

Plasmid: pET 200 (Thermo Fisher scientific)

4.2. Chemikálie

Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards (Bio Rad)

Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific)

Akrylamid-bisakrylamid – 30% roztok (Serva)

N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin, TEMED (Serva)

PBS Dulbecco w/o Ca⁺, w/o Mg²⁺ low endotoxin (Biochrom GmbH)

LB Medium Powder (Serva)
Butan-1-ol (Lach-Ner)
Methanol (Sigma Aldrich)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (kit) (Thermo Fisher Scientific)
Dodecylsulfát sodný, SDS (Merck)
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner)
Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva)
Chlorid sodný (Lach-Ner)
Chlorid draselný (Lach-Ner)
Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner)
Glycerol (Sigma Aldrich)
2-merkapt ethanol (Lach-Ner)
Glycin (Lach-Ner)
Kyselina octová 99,8 % (Lach-Ner)
Isopropanol (Lach-Ner)
Hovězí sérový albumin, BSA (Calbiochem)
Developer G150, „vývojka“ (AGFA)
Manul fixing bath G354, „ustalovač“ (AGFA)
HisPur™ Ni-NTA Superflow agarose (Thermo Fisher Scientific)
Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner)
Triton™ X-100 (Sigma Aldrich)
Kanamycin sulfate from Streptomyces kanamyceticus, K4000 (Sigma Aldrich)
Phenylmethylsulfonylfluoride (Serva)
Tween-20 (Calbiochem)
Urea (Serva)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, IPTG (OmniPur)
Lysozym (Serva)
Hydroxid sodný (Penta)
Ethanol 96 % (VWR)
Imidazol (SIGMA)
Leupeptin (Serva)
Aprotinin (Serva)
Kyselina ethylendiamintetraoctová, EDTA (Sigma)
Peroxid síran amonný (OmniPur)

TRIS (hydroxymethyl) aminomethane (OmniPur)
Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Lach-Ner)

Protilátky

Penta His HRP Conjugate (QIAGEN)
Anti-V5-HRP (Thermo Fisher Scientific)

4.3. Příprava roztoků

<p><u>Lyzační pufr N</u> (pro purifikaci za nativních podmínek)</p> <p>základní roztok (100 ml)</p> <ul style="list-style-type: none">• 0,780 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mM)• 1,754 g NaCl (300 mM)• 0,068 g Imidazol (10 mM) <p>Po rozpuštění doplnit na 100 ml.</p> <p>přidavky na 10 ml základního roztoku</p> <ul style="list-style-type: none">• 20 μl phenylmethylsulfonylfluoride (Mr 174,2 g/mol) v ethanol (11,14 g/250 ml (250 mM))• 4 μl leupeptin• 5,25 μl aprotinin• 10 μl triton X100• 5 mg lysozym• 10 μl EDTA (0,1 M) <p>Upravit na pH 8 (na 1 g buněk použít 8 ml roztoku).</p>	<p><u>Wash pufr N</u> (pro purifikaci za nativních podmínek)</p> <p>základní roztok (100 ml)</p> <ul style="list-style-type: none">• 0,780 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mM)• 1,754 g NaCl (300 mM)• 0,136 g imidazol (20 mM) <p>Po rozpuštění doplnit na 100 ml.</p> <p>přidavky na 10 ml základního roztoku</p> <ul style="list-style-type: none">• 20 μl phenylmethylsulfonylfluoride• 4 μl leupeptin• 5,25 μl aprotinin <p>Upravit na pH 8.</p>
<p><u>Eluční pufr N</u> (pro purifikaci za nativních podmínek)</p> <p>základní roztok (100 ml)</p> <ul style="list-style-type: none">• 0,780 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50 mM)• 1,754 g NaCl (300 mM)• 3,4 g imidazol (500 mM) <p>Po rozpuštění doplnit na 100 ml.</p> <p>přidavky na 10 ml základního roztoku</p> <ul style="list-style-type: none">• 20 μl phenylmethylsulfonylfluoride• 4 μl leupeptin• 5,25 μl aprotinin <p>Upravit na pH 8.</p>	<p><u>PBS pufr</u></p> <ul style="list-style-type: none">• 240 g NaCl• 6 g KCl• 40 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$• 6 g KH_2PO_4 <p>Upravit na pH 7,4.</p>

<p><u>PBST (PBS s Tween-20)</u></p> <p>Do 1 l PBS pufru přidat 0,5 ml Tween-20.</p>	<p><u>2x vzorkovací pufr (redukující)</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 0,755 g TRIS • 7,95 ml glycerol • 2,3 g SDS • 5 ml 2-merkptoethanol • 37,5 ml dd H₂O <p>Upravit na pH 6,8 (pozn.: bez přídavku 2-merkptoethanolu se jedná o neredukující vzorkovací pufr).</p>
<p><u>1% BSA/PBST</u> (blokovací pufr)</p> <p>Do 500 ml PBST pufru přidat 5 g BSA.</p>	<p><u>Tobwinův roztok</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 9,09 g TRIS • 43,2 g glycinu • 600 ml methanolu <p>Doplnit na 3 l dd H₂O.</p>
<p><u>Roztok 10% peroxidisíranu amonného, APS:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 1 g peroxidisíranu amonného (NH₄)₂S₂O₈ rozpustit v 10 ml deionizované vody <p>Uchovávat v chladničce.</p>	<p><u>Fixační roztok na 3 l:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 750 ml isopropanolu • 300 ml kyseliny octové • 1950 dd H₂O
<p><u>Odbarvovací roztok na 3 l</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 150 ml methanolu • 210 ml kyseliny octové • 2640 ml dd H₂O 	<p><u>Elektrodový pufr = 1× SDS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 1600 ml dd H₂O • 400 ml 5x SDS
<p><u>5× SDS na 3 l</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 45,3 g TRIS • 2,6 g Glycinu • 15 g SDS <p>Doplnit na 3 l dd H₂O.</p>	<p><u>4x TRIS pufr, pH 6,8</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 15,125 g TRIS • 1 g SDS • 150 ml dd H₂O <p>Upravit na pH 6,8.</p>
<p><u>4x TRIS pufr, pH 8,8</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 45,5 g TRIS • 1 g SDS • 150 ml dd H₂O <p>Upravit na pH 8,8.</p>	<p><u>4x TRIS pufr, pH 6,8</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 15,125 g TRIS • 1 g SDS • 150 ml dd H₂O <p>Upravit na pH 6,8.</p>

<p><u>Lyzační pufr D</u> (pro purifikaci za denaturačních podmínek)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 13,8 g NaH₂PO₄·H₂O (100 mM) • 1,2 g Tris·Cl (10 mM) • 480,5 g urea (8 M) <p>Upravit na pH 8 použitím NaOH.</p>	<p><u>Wash pufr D</u> (pro purifikaci za denaturačních podmínek)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 13,8 g NaH₂PO₄·H₂O (100 mM) • 1,2 g Tris·Cl (10 mM) • 480,5 g urea (8 M) <p>Upravit na pH 6,3 použitím HCl.</p>
<p><u>Eluční pufr D₁</u> (pro purifikaci za denaturačních podmínek)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 13,8 g NaH₂PO₄·H₂O (100 mM) • 1,2 g Tris·Cl (10 mM) • 480,5 g urea (8 M) <p>Upravit na pH 5,9 použitím HCl.</p>	<p><u>Eluční pufr D₂</u> (pro purifikaci za denaturačních podmínek)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 13,8 g NaH₂PO₄·H₂O (100 mM) • 1,2 g Tris·Cl (10 mM) • 480,5 g urea (8 M) <p>Upravit na pH 4,5 použitím HCl.</p>
<p><u>Barvicí roztok</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • 10% kyselina octová • 70 mM Coomassie Brilliant Blue R-250 	

4.4. Ostatní materiál

PVDF membrána (Bio Rad)

Blotovací papíry (Bio Rad)

Polypropylene Columns (1 ml) (QIAGEN)

VIVASPIN 6 a 20 ml (sartorius stedim, Biotech)

Slide-A-Lyzer[®]Dialysis Cassette, Dialyzační kazeta (3–12 ml) (Thermo Fisher Scientific)

Fotografický papír, CL-XPosure[™]Film (Thermo Fisher Scientific)

Liquid chromatography columns 18 ml (Sigma Aldrich)

4.5. Laboratorní vybavení

Centrifuga, mikro 22 R (Hettich)

Mikropipety 100 µl až 1000 ml (Thermo Fisher Scientific)

Mikropipety 20 µl až 200 ml (Thermo Fisher Scientific)

Mikropipety 5 µl až 50 µl (Thermo Fisher Scientific)

Mikropipety 2 µl až 20 µl (Thermo Fisher Scientific)

Mikropipety 0,2 µl až 2 µl (Thermo Fisher Scientific)

Laboratorní váha 440-33N (Kern)
Třepačka včetně inkubátoru TH30 + SM30 (Edmund Bühler)
Elektroforetický zdroj POWER PAC 3000 (Bio Rad)
Termoblok SBH130D (Stuart)
Laboratorní drtič ledu (WARING COMMERCIAL)
Výrobník ledu (BREMA Ice Makers)
Sterilizátor DX-90 (Systec)
Cetrifuga KR25i (Jouan)
Třepačka KS 130 basic (IKA)
Tank elektroforetický horizontální s nalévací vaničkou (BioRad)
Blotovací jednotka Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell 221BR (BioRad)
Zdroj napětí 2197 pro Trans-Blot (LKB Bromma)
Sušič gelů (Major science)
Sonikátor UP200S (Hielscher)
Centrifuga Z32 HK (Hermle Labortechnik)
Třepačka rolovací SRT6D (Stuart)
Jednomístná míchačka bez ohřevu (IKA)
Kazeta pro expozici chemiluminiscenčního signálu na film (Eastman Kodak)
Svářečka fólií Electronic (ETA)
pH metr Jenway 3310 se skleněnou elektrodou (Hanna Instruments)

5. Metodika

5.1. Kultivace bakterií

Příprava živného média

Do kultivační láhve o objemu 2 l bylo přidáno 20 g LB Media Powder a 1 l deionizované vody. Láhev se uzavřela gumovou zátkou, která se z boku zajistila hliníkovým kroužkem. Do gumové zátky byla zapíchnuta injekční jehla, aby z láhve při sterilizaci mohl odcházet vzduch a nedošlo vlivem vysokého tlaku k roztržení.

Sterilizace

Sterilizaci živných médií a laboratorního vybavení provedl vedoucí bakalářské práce.

Kultivace bakterií

Do 1 l živného média pokojové teploty byl přidán 1 ml kanamycinu. Z takto připraveného roztoku byl připraven startovací roztok smícháním transformovaných bakterií a kultivačního média v poměru 1:100. Následovala 24-hodinová inkubace startovací kultury při 37 °C v inkubátoru s třepačkou při 200 rpm. Pak bylo startovací médium přidáno do zbylého množství kultivačního média s kanamycinem. Kultivace probíhala za stejných podmínek do okamžiku, kdy byla na spektrofotometru naměřena absorbance při 600 nm v rozmezí 0,6–0,8 proti blanku (LB médium s kanamycinem).

Při přípravě menších objemů byl analogicky připraven startovací roztok za stejných podmínek, viz výše. Startovací roztok byl ovšem po inkubaci přelit do námi zvoleného objemu média a kultivován do optimální hustoty.

Centrifugace kultivovaných bakterií

Suspenze s nakultivovanými bakteriemi o odpovídající hustotě byla přelita do dvou centrifugačních zkumavek o objemu 250 ml. Tyto zkumavky byly pak vyváženy. Následoval proces centrifugace při 10 000 rpm po dobu 10 min při 4 °C. Supernatant byl slit do odpadu a do centrifugačních zkumavek byla dolita další nezcentrifugovaná bakteriální suspenze. Celý proces se analogicky opakoval, dokud nebyl stočen celý objem bakteriální suspenze.

Nahromaděný pelet byl rozsuspendován v 1×PBS, a to v poměru 1 g peletu na 9 ml 1×PBS. Bakteriální suspenze v PBS byla vždy rozdělena dle množství do 50 ml plastových zkumavek. Takto vzniklý roztok byl jedenkrát centrifugován při 9000 rpm po dobu 10 min při 4 °C. Výsledný pelet byl zamražen pro další použití.

5.2. Indukce exprese proteinů

Před indukcí byly odebrány 2 ml nakultivované bakteriální suspenze o objemu 150 ml. Do zbylé suspenze bylo přidáno 1,5 ml IPTG stimulujícího indukcí genu, aby výsledná koncentrace roztoku byla 100 µM. Následoval odběr tří bakteriálních vzorků po 2 ml s odstupem 1 hod.

5.3. Purifikace rekombinantních proteinů

Lýza transformovaných bakterií *E. coli*

Zamražený pelet byl rozmrazen při pokojové teplotě. Následně byl zvážen a dle hmotnosti byl k peletu přidán lyzační pufr buď pro purifikaci za nativních, nebo denaturačních podmínek, viz příprava roztoků.

U lyzačního pufu k purifikaci za nativních podmínek bylo na 1 g peletu přidáno 8 ml lyzačního pufu. K předem připravenému základnímu roztoku lyzačního pufu byly pipetovány jednotlivé přísady až bezprostředně před sonikací. Výsledný roztok byl důkladně promíchán.

U lyzačního pufu za denaturačních podmínek bylo taktéž pipetováno 8 ml pufu na 1 g peletu.

Sonikace

Veškerá dezintegrace biomasy proběhla na sonikátoru během cyklu 1 při 100% amplitudě. Sonikační nástavec byl nejprve omyt destilovanou vodou a osušen buničinou. Do vzorku v plastové zkumavce (bakteriální pelet + lyzační pufr dle volby) byl poté ponořen sonikační nástavec. Sonikátor vždy běžel 10 s a pak byla sonikace na 1 min ukončena. Celý cyklus se 10× opakoval.

V případě, že se jednalo o vzorek v nativním lyzačním pufu, byl vzorek v době, kdy neprobíhala sonikace, chlazen v kádince s ledem. Pokud se jednalo o vzorek v denaturačním lyzačním pufu, bylo chlazení nežádoucí z důvodu snížení rozpustnosti urey při nižší teplotě.

Purifikace za nativních podmínek

Po ukončení sonikace byl výsledný lyzát stočen v centrifuze po dobu 30 min při 8800 rpm a 16 °C. Supernatant byl slit z 50ml plastové zkumavky do 15ml zkumavky a pelet byl vyhozen do odpadu. V této fázi bylo odebráno 50 µl pro SDS-PAGE (krok proveden pouze u OspC). K supernatantu bylo přidána Ni-NTA agaróza v poměru 1:10. Výsledný roztok byl 30 min promícháván v chladovce na rolovací třepačce. Mezitím byla připravena kolona, která byla promyta deionizovanou vodou. Po uplynutí doby promíchávání v chladovce byl roztok supernatantu s Ni-NTA agarózou nalit do kolony. Po protečení veškerého roztoku byl odebrán vzorek o objemu 50 µl pro SDS-PAGE (krok proveden pouze u OspA).

Pak byla kolona promývána 2× wash pufrem N, jehož množství pro jednotlivé promytí odpovídalo trojnásobku objemu použitého lyzačního pufru N. Následně byla kolona promyta 5× elučním pufrem N, jehož objem pro jednu frakci byl roven 1/2 objemu použité agarózy. Počet frakcí byl stanoven na základě předchozí laboratorní optimalizace. Na závěr byla kolona promyta EDTou (krok proveden pouze u OspC). Ze všech jednotlivých frakcí bylo odebráno 50 µl pro SDS-PAGE.

Purifikace za denaturujících podmínek

Proces přípravy purifikace za denaturujících podmínek byl téměř stejný jako za podmínek nativních, viz první odstavec purifikace za nativních podmínek. Rozdíl spočíval v použití lyzačního pufru, ve kterém probíhala sonikace. Ten měl denaturační účinky (lyzační pufr D).

Po protečení supernatantu s Ni-NTA agarózou kolonou byla jedenkrát promyta lyzačním pufrem D a poté wash pufrem D, jehož množství odpovídalo dvojnásobku objemu lyzačního pufru, který byl použit při sonikaci. Na závěr byla kolona 1× promyta elučním pufrem D₁ a 4× elučním pufrem D₂, jejichž množství odpovídalo 1/2 objemu agarózy.

5.4. Dialýza

Frakce, které byly připraveny za denaturujících a nativních podmínek, byly každá zvlášť slity do jedné zkumavky. Pro oba roztoky bylo připraveno vlastní dialyzační okénko o objemu 3–12 ml, které separovalo částice menší než 3,5 kDa. To bylo nejprve 2 minuty hydratováno v deionizované vodě. Následně bylo naplněno roztokem s frakcí pomocí injekční stříkačky tak, aby nedošlo k probodnutí membrány. Po naplnění byl z okénka odsátý přebytečný vzduch. Na okénko byl umístěn plovák, se kterým bylo okénko umístěno do kádinky s 1 l 1×TRIS a ta byla poté seshora přikryta alobalem. Dialýza probíhala 24 hodin a pak byl 1×TRIS vyměněn za stejné množství pufru. Následně probíhala dialýza ještě dalších 6 hodin. Po ukončení procesu byly vzorky pomocí injekční stříkačky přemístěny do zkumavky. Z těchto vzorků byly připraveny vzorky pro SDS-PAGE.

Zakoncentrování dialyzovaného roztoku

Koncentrátor byl nejprve promyt deionizovanou vodou a centrifugován při 3000 rpm po dobu 10 min při 21 °C. Všechna voda pak byla odstraněna. Následně bylo do koncentrátoru napipetováno maximální množství vzorku (6 ml) a následoval proces

centrifugace za stejných podmínek. Permeát byl po ukončení centrifugace odstraněn, retentát byl přelit do označené zkumavky a celý proces se opakoval až do zakoncentrování veškerého vzorku.

5.5. SDS-PAGE – Gelová elektroforéza za denaturujících podmínek

Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Příprava vzorků po indukci

Vzorky o objemu 2 ml, které byly odebrány během indukce, byly stočeny na centrifuze při 13000 rpm po dobu 10 min při 21 °C. Supernatant byl slit do odpadu a pelet byl rozsuspendován v 0,5 ml PBS a 0,5 ml SDS. Takto připravené vzorky byly 10 min povařeny v termobloku při 97 °C.

Příprava vzorků z purifikace

Ze všech ostatních vzorků bylo pouze odebráno 50 µl. K tomuto množství bylo přidáno 50 µl SDS, aby byl výsledný vzorek ředěn v poměru 1:1. Připravené vzorky byly 10 min povařeny v termobloku při 97 °C.

Příprava 12% polyakrylamidového gelu

Nejprve byla připravena podložní skla se spacery 0,75 mm a krycí skla. Skla byla odmaštěna etanolem a pak do sucha vysušena buničinou. Takto připravená skla byla umístěna do svěřacího držáku a ten pak do stojanu opatřeného zespodu gumou, která zabraňovala úniku gelu. Před nalitím bylo testováno těsnění nalitím deionizované vody mezi skla. Pokud nedocházelo k úniku, byla tekutina vyklepána do umyvadla a zbylá voda byla odsáta filtračním papírem. V opačném případě byla celá sestava rozložena, složena a opět testována.

Příprava 12% gelu spočívala v napipetování jednotlivých reagentů v daném pořadí a množství, viz Tabulka 7. TEMED, působící jako akcelerátor reakce, a persíran amonný, jenž byl zdrojem volných radikálů, byly pipetovány úplně nakonec, aby nedošlo k předčasné polymerizaci. Směs byla promíchána a napipetována do připravených skel do 2/3. Gel byl převrstven *n*-butanolem, aby se odstranily případné vzduchové bubliny a nerovnoměrnosti.

Tabulka 7: Dělicí gel

Roztok	12%
30% H ₂ O roztok akrylamid-bisakrylamid	6 ml
4x Tris pufr pH 8,8	3,75 ml
deionizovaná H ₂ O	5,25 ml
10% H ₂ O roztok persíranu amonného	75 µl
TEMED	15 µl

Po ztuhnutí dělicího gelu (cca 30 min za pokojové teploty) byl filtračním papírem odsát *n*-butanol na povrchu. Následně byla připravena směs zaostřovacího gelu, viz Tabulka 8. TEMED a persíran amonný byly opět pipetovány nakonec. Směs byla lehce promíchána nasátím do pipety a opětovným vypuzením. Následně byla napipetována mezi skla. Do tohoto gelu byly pak umístěny buď 10-, anebo 15-jamkové hřebínky o tloušťce 0,75 mm. Zaostřovací gel polymerizoval cca 25 min při pokojové teplotě.

Tabulka 8: Zaostřovací gel

Roztok	4%
30% H ₂ O roztok akrylamid-bisakrylamid	1,3 ml
4x Tris pufr pH 6,8	2,5 ml
deionizovaná H ₂ O	6,2 ml
10% H ₂ O roztok persíranu amonného	50 µl
TEMED	10 µl

Příprava vzorku pro elektroforetickou separaci, nanášení a separace

Dva připravené polyakrylamidové gely se skly byly umístěny do elektroforetické komůrky hřebínkem směrem nahoru. Následně byly gely upevněny pomocí fixačních pantů. Po vytažení hřebínků byla elektroforetická komora zalita elektrodovým pufrům. Vzorky byly nanášeny do jednotlivých jamek dle jejich kapacity. U 10jamkového gelu bylo pipetováno 15 µl a u 15jamkového 10 µl vzorku. Marker molekulové hmotnosti byl vždy pipetován po 2 µl nejméně do jedné jamky na každém gelu. Poté byla elektroforetická komůrka uzavřena víkem s elektrodami, které byly připojeny ke zdroji stejnosměrného elektrického proudu dle návodu stanového výrobcem. Jakožto výchozí hodnota pro separaci bylo nastaveno napětí 150 V.

Po doputování bromfenolové modři těsně nad konec gelu (60–75 min) byla separace ukončena odpojením od zdroje. Elektrodový pufr byl vylit a skla s gely byla vyjmuta. Pomocí špachtle došlo k oddělení podložního skla se spacers od krycího a odstranění zaostřovacího gelu. Podle následné metody byl gel buď umístěn do fixačního roztoku (v případě barvení) nebo Tobwinova roztoku (semi-dry blotting).

5.6. Barvení pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250

Gel po elektroforetické separaci byl umístěn po 20 min v misce obsahující fixační roztok. Tato miska byla mírně promíchávána ve stanoveném čase na třepačce. Následně byl fixační roztok slit a na gel byl nalit barvicí roztok. Gel a roztok byl opět lehce promícháván na třepačce. Po 30–40 minutách byl barvicí roztok z gelu taktéž slit a na gel byl nalit odbarvovací roztok, který byl obvykle 3× vyměněn po 30 minutách (pozn.: někdy trvalo kvalitní odbarvení gelu i přes noc).

5.7. Semi-dry blotting

Při této metodě byl gel po elektroforetické separaci umístěn do nádoby s Tobwinovým roztokem stejně jako blotovací papíry. Příprava PVDF spočívala v hydrataci methanolem po dobu 1 min a následném opláchnutí v deionizované vodě. Takto připravená membrána byla umístěna do Tobwinova roztoku. Do Transfer Cell 221BR (Semi-dry blotting) byly sendvičovitě skládány jednotlivé komponenty v následujícím pořadí: blotovací papír, membrána, gel, blotovací papír.

Gel byl na membránu umístěn tak, aby mezi ním a membránou nebyly vzduchové bubliny. Nakonec byla na přístroj umístěna katoda, která byla kryta víkem. Přístroj byl připojen ke zdroji stejnosměrného elektrického napětí v souladu s návodem stanoveným výrobcem. Na zdroji byly nastaveny výchozí hodnoty 120 mA a napětí 20 V s časem přenosu 60 min. Po ukončení přenosu byla membrána připravena k imunochemické detekci.

5.8. Imunochemická detekce

Membrána s přeblovanými proteiny byla umístěna do 1% BSA/PBST, poté na 1 hodinu na třepačku za účelem tzv. zablokování membrány a tím snížení nespecifické vazby protilátky. Po uplynutí tohoto intervalu byl BSA/PBST slit a na membránu byly napipetovány protilátky s BSA/PBST v odpovídajícím ředění (Anti-V5-HRP 1:5000; Penta His HRP Conjugate 1:10000). Inkubace s protilátkami probíhala za mírného třepání 1 hodinu při pokojové teplotě. Pak byly protilátky odstraněny a membrána byla promývána v PBST po 20 min. Toto promývání se opakovalo 4×. Následně byla membrána 2× promývána v PBS po 15 min.

Na takto připravenou membránu byl nanesen chemiluminiscenční substrát SuperSignal West Pico (jednotlivé reagentie toho kitu se aplikují v poměru 1:1). Po 5-minutové inkubaci byla membrána zatavena do plastové folie a přenesena do fotografické kazety pro expozici. Na membránu v kazetě byl položen fotografický papír a celá kazeta byla uzavřena. Veškerá manipulace s fotografickým papírem do jeho vyvolání probíhala bez přítomnosti viditelného světla.

Expoziční časy byly do jisté míry individuální (dle síly signálu), nejčastěji se jednalo o 30 s nebo 15 min. Fotografický papír byl po uplynutí expozičního času nejprve umístěn na cca 3 min do vývojky, pak byl opláchnut v deionizované vodě a přenesen do ustalovače, poté opět opláchnut v deionizované vodě a usušen.

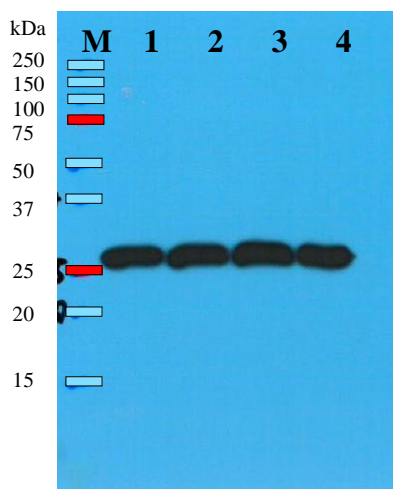
6. Výsledky

6.1. OspC *Borrelia burgdorferi*

Do expresního systému *E. coli* BL21 Star™ (DE3) byl vložen upravený gen pro OspC *B. burgdorferi* prostřednictvím vektoru pET 200. Za účelem indukce genu u takto transformovaných buněk byl použit IPTG. Výsledkem měla být syntéza T7-RNA polymerázy, která měla přepisovat OspC, jenž byl vložen pod T7 promotorem. Předpokládaná molekulová hmotnost našeho produktu byla ~ 23,96 kDa.

Vzorky pro detekci indukce byly odebrány před přidáním IPTG a pak vždy s odstupem 1 hod. Celkový čas sledování byl 3 hod. Výsledná detekce byla provedena prostřednictvím SDS-PAGE s následným western blotem, viz Obr. 16. K imunochemické

detekci byla použita protilátka Penta His HRP Conjugate (1:10000), která se měla specificky navázat na 6×His tag, který byl na N terminálním konci OspC.

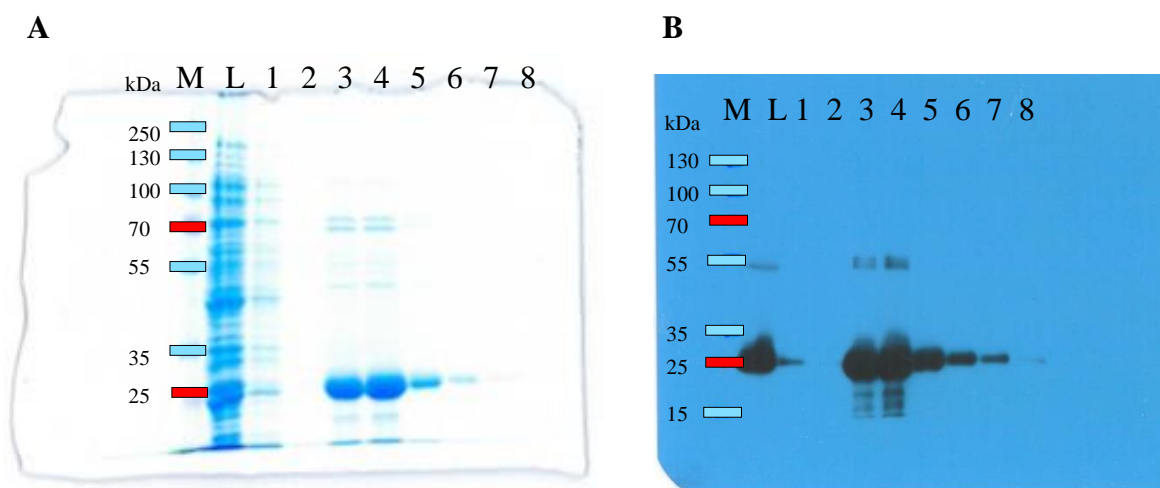


Obr. 16: Transformovaný kmen *E. coli* s inzertem *OspC* *Borrelia burgdorferi* před a po indukci pomocí western blottingu po 5min expozici; M – marker molekulové hmotnosti; 1 – vzorek před indukci; 2 – vzorek po 1 hod indukce; 3 – vzorek po 2 hod indukce; 4 – vzorek po 3 hod indukce

Z výsledků screeningu indukce exprese je patrné, že docházelo pravděpodobně k bazální expresi proteinu, jelikož jeho přítomnost byla detekována i ve vzorku před samotným zahájením indukce. Protože produkt genu nebyl pro buňky letální, nebylo nutné tuto bazální expresi potlačit např. použitím plazmidu pET s pLysS nebo pLysL, exprimujícího lysozym, který působí jako přírodní inhibitor T7 RNA polymerázy (Studier; 1991). Taktéž velikost produktu přibližně odpovídala předpokladu.

Purifikace *OspC* tedy proběhla s výchozím inzertem za nativních podmínek prostřednictvím Ni-NTA agarózy vázající His-tag. Po protečení bakteriálního lyzátu s agarózovou kolonou byla sedimentovaná agaróza promyta 2× wash pufrem, 5× elučním pufrem a 1× EDTou.

Výsledky purifikace byly nejprve detekovány pomocí SDS-PAGE a poté následným barvením 12% gelu za účelem zjištění, zda byla purifikace úspěšná či nikoliv, viz Obr. 17 A. Následně pro ověření, že se nejedná o balastní proteiny, byl gel po SDS-PAGE se vzorky po purifikaci blotován a následně detekován pomocí penta His HRP Conjugate a SuperSignal West Pico.



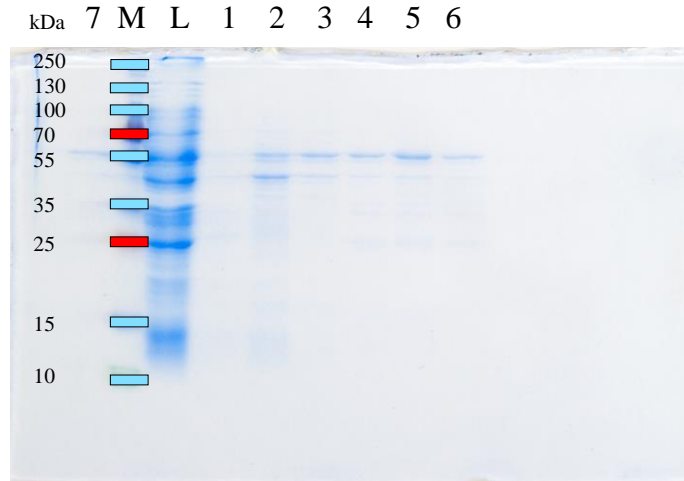
Obr. 17: **A)** Vizualizace frakcí po purifikaci za nativních podmínek pomocí barvicího roztoku s Coomassie Brilliant Blue R-250, **B)** Vizualizace pomocí Semi-Dry Transfer Cell 221BR a následné chemiluminiscenční detekce po 5s expozici; *M* – marker molekulové hmotnosti; *L* – lyzát; 1 – frakce po prvním promytí wash pufrem N; 2 – frakce po druhém promytí wash pufrem N; 3–7 – frakce po promytí elučním pufrem N; 8 – frakce po promytí EDTOU

Na vyvolaném negativu po 5s expozici (viz Obr. 17 B) je detekován protein OspC jak v oblasti 27 kDa tak v oblasti 55 kDa. Tento fakt je pravděpodobně způsoben nedostatečnou denaturací, jelikož OspC má schopnost vytvářet dimery (Kumaran *et al*, 2001).

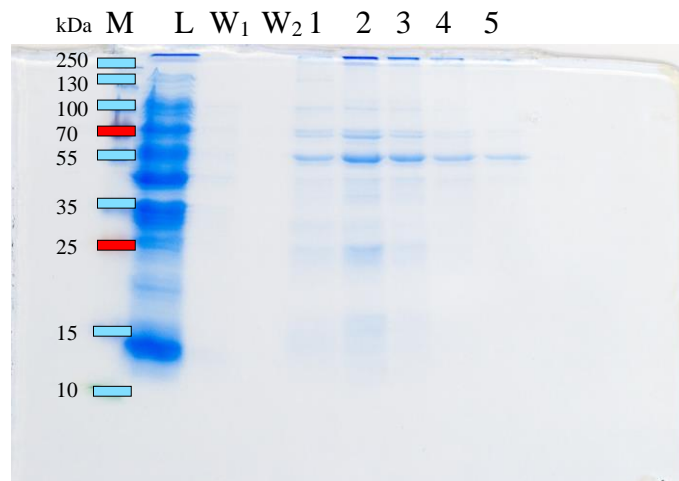
6.2. OspA *Borrelia burgdorferi*

Upravený gen OspA *B. burgdorferi* byl vložen do stejného vektoru a typu buněk jako OspC. U tohoto genu nebyla provedena indukce, jelikož byla provedena již dříve vedoucím bakalářské práce.

Za účelem optimalizace podmínek pro extrakci daného proteinu byla provedena purifikace za nativních i denaturačních podmínek. Předpokládaná molekulová hmotnost produktu byla 62 kDa. Pro ověření úspěšnosti obou purifikací byla provedena SDS-PAGE s následným barvením gelů, viz Obr. 18 a 19.

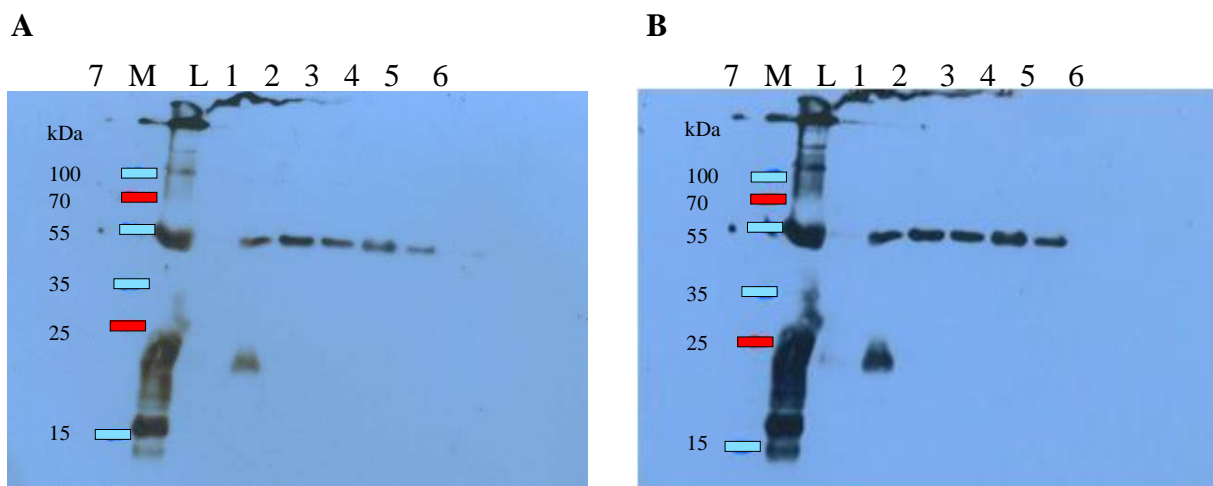


Obr. 18: Vizualizace frakcí po purifikaci za denaturačních podmínek pomocí barvicího roztoku s Coomassie Brilliant Blue R-250; M – marker molekulové hmotnosti; L – lyzát; 1 – frakce po prvním promytí lyzačním pufrem D; 2 – frakce po promytí wash pufrem D; 3 – frakce po promytí elučním pufrem D₁; 4–7 – frakce po promytí elučním pufrem D₂

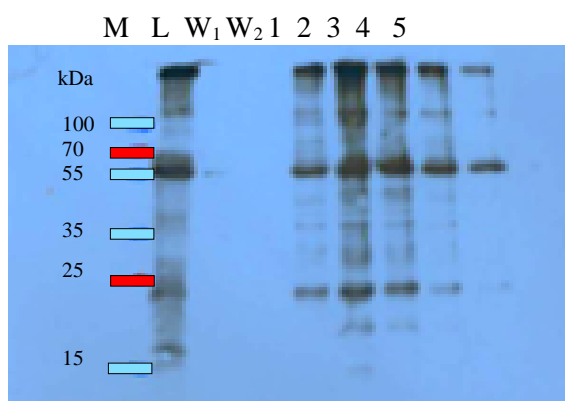


Obr. 19: Vizualizace frakcí po purifikaci za nativních podmínek pomocí barvicího roztoku s Coomassie Brilliant Blue R-250; M – marker molekulové hmotnosti; L – lyzát; W₁ – frakce po prvním promytí wash pufrem N; W₂ – frakce po druhém promytí wash pufrem N; 1–5 – frakce po promytí elučním pufrem N

Jelikož bylo nutné vyvrátit možnost, že protein v oblasti 55 kDa je balast, byla provedena specifická detekce pomocí SDS-PAGE a western blotu s imunochemickou detekcí s protilátkami Anti-V5-HRP a SuperSignal West Pico.

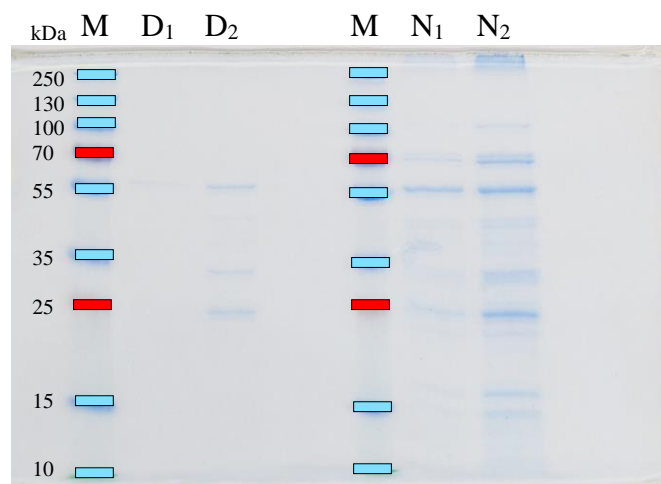


Obr. 20: Vizualizace frakcí po purifikaci za denaturačních podmínek pomocí Semi-Dry Transfer Cell 221BR a následné chemiluminiscenční detekce **A)** po 30s expozici **B)** po 15min expozici; M – marker molekulové hmotnosti; L – lyzát; 1 – frakce po prvním promytí lyzačním pufrem D; 2 – frakce po promytí wash pufrem D; 3 – frakce po promytí elučním pufrem D₁; 4–7 – frakce po promytí elučním pufrem D₂



Obr. 21: Vizualizace frakcí po purifikaci za nativních podmínek pomocí Semi-Dry Transfer Cell 221BR a následné chemiluminiscenční detekce po 30s expozici; M – marker molekulové hmotnosti; L – lyzát; W₁ – frakce po prvním promytí wash pufrem N; W₂ – frakce po druhém promytí wash pufrem N; 1–5 – frakce po promytí elučním pufrem N

Z výsledků je patrné, že při purifikaci za denaturačních podmínek (Obr. 20) bylo dosaženo mnohem větší čistoty proteinu, než za podmínek nativních (Obr. 21). Bylo tedy nutné zjistit, zda je OspA schopno refoldingu, tedy zda protein neztratil schopnost poskládání se do nativní podoby. Proto byla provedena dialýza směsi frakcí po purifikaci za denaturačních podmínek. Dialýza frakcí po purifikaci za nativních podmínek měla odstranit především imidazol z elučního pufru.



Obr. 22: Vizualizace vzorků po purifikaci za nativních a denaturačních podmínek před a po zakoncentrování pomocí barvicího roztoku s Coomassie Brilliant Blue R-250; M – marker molekulové hmotnosti; D₁ – OspA *B. burgdorferi* po denaturační purifikaci před zakoncentrováním; D₂ – OspA *B. burgdorferi* po denaturační purifikaci po zakoncentrování; N₁ – OspA *B. burgdorferi* po nativní purifikaci před zakoncentrováním; N₂ – OspA *B. burgdorferi* po nativní purifikaci po zakoncentrování

Výsledky byly detekovány pomocí barvení 12% gelu (Obr. 22). Z výsledků je patrné, že OspA má schopnost renaturace. Z toho vyplývá, že denaturační podmínky jsou optimální pro purifikaci. Dialýza nativních frakcí byla taktéž úspěšná.

7. Diskuze

Lymfská borelióza je způsobena spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Tento komplex má několik druhů, jako například *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, lišících se celosvětovým výskytem (Murray *et al*, 2010). *B. burgdorferi* sensu stricto způsobuje lymfskou boreliózu u lidí jak v USA, tak Evropě. Tento druh způsobuje širokou škálu příznaků od drobných kožních projevů (erythema migrans) až k závažným formám artritidy a neurologických poruch (Rudenko *et al*, 2011). Je důležité zaměřit se na určitý druh, protože každý má odlišné vlastnosti projevu infekce, kde u *B. burgdorferi* sensu stricto je předpoklad vzniku artritidy, zatímco *B. garinii* je asociovaná především s neurologickými poruchami (Murray *et al*, 2010). Biologický cyklus těchto bakterií zahrnuje ptačí i savčí hostitele včetně klíšťat rodu *Ixodes*, která jsou v současnosti jediným známým patogenním vektorem.

Humánní infekce je spojena schopností *B. burgdorferi* exprimovat různé povrchové proteiny (Osp). OspA je exprimován v období podzimu a zimy, kdy jsou spirochety v zaživacím traktu nymf. Po oteplení a přisátí dochází k inhibici OspA a expresi OspC (Bartůněk *et al*, 2013), které hraje roli v migraci a infekčnosti spirochet (Murray *et al*, 2010). OspA i OspC jsou považovány za důležité antigeny pro tvorbu vakcíny.

Přirozeně se vyskytující antigen OspC má lipidizační sekvenci na N-terminálním konci, která je důležitá pro integraci proteinu do membrány (Křupka *et al*, 2016). Stejně tak i OspA má na N-terminálním konci lipidickou strukturu, přičemž při jejím odstranění dochází ke snížení imunogenicity (Erdile *et al*, 1993).

Lipidizovaný protein se těžko exprimuje či izoluje ve vysoké kvalitě a čistotě potřebné pro imunizaci zvířat. Nelipidizovaný OspC se na rozdíl od původní varianty snadno exprimuje, avšak je málo imunogenní (Křupka *et al*, 2012). Volný C-terminální konec OspC se zdá být zásadní pro vyvolání imunitní odpovědi (Křupka *et al*, 2016), proto náš upravený gen OspC neobsahoval na tomto konci žádné další aminokyseliny.

Cílem mé práce bylo purifikovat nelipidizované proteiny OspC a OspA *B. burgdorferi* v případě, že docházelo k jejich expresi na základě vložených inzertů, a to prostřednictvím afinitní chromatografie s Ni-NTA agarózou vázající His-tag, který byl umístěn na N-terminálním konci obou proteinů. K expresi proteinu OspC docházelo a taktéž purifikace OspC za nativních podmínek byla úspěšná. OspA byl purifikován za nativních i denaturačních podmínek, přičemž za denaturačních podmínek bylo dosaženo vyšší čistoty. Nelipidizovaný OspA má taktéž schopnost renaturace, což je důležité pro následnou práci za účelem vývoje vakcíny, jelikož protein s touto vlastností mívá schopnost opakovaně se rozpouštět v různých pufrch (Raška *et al*, 2010).

S OspC bylo již dále pracováno, kdy se sledovala imunogenicita v závislosti na pozici His-tag sekvence. Výsledky ukazují, že OspC s His-Tag sekvencí na N-terminální části dosahují společně s adjuvans MPLA nebo MT06 větší imunitní reakce než ty, u kterých byl His-tag na C-konci (Křupka *et al*, 2016).

8. Závěr

První část této práce je věnována historii rekombinantních proteinů, biologickým léčivům a požadavkům na jejich kvalitu včetně stručného přehledu aktuálně schválených významných biologických léčiv. Samotný závěr této části je věnován postupu tvorby rekombinantních proteinů.

Experimentální část dokazuje expresi genů OspC a OspA *Borrelia burgdorferi* v systémech *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3), kdy jako klonovací vektor byl použit pET 200. Protein OspA *Borrelia burgdorferi* byl purifikován jak za nativních tak i denaturačních podmínek. Tento protein dosahoval při denaturační purifikaci vyšší čistoty než při nativní. Taktéž u něj byla zachována schopnost refoldingu a tedy získání aktivní formy. Buňky *Escherichia coli* s inzertem OspC *Borrelia burgdorferi* vykazovaly bazální expresi. Translatovaný gen ovšem nebyl pro buňky toxický, tudíž nebyla nutná další manipulace. OspC byl úspěšně purifikován za podmínek nativních. Výsledky této práce byly použity k optimalizaci podmínek purifikace těchto proteinů a následné práci za účelem vývoje potenciální zvířecí či humánní vakcíny proti lymfské borelióze.

9. Literatura

Allison, L. A. (2007): *Fundamental Molecular Biology*, Blackwell publishing, Blackwell publishing, ISBN 978-1-4051-0379-4

Anderson, D. M., Keith, J., Novak, P. D., et Elliot, M. A. (2002): *Medical model. Mosby's medical, nursing & allied health dictionary*, 6th ed, St. Louis: Mosby, ISBN 0323014305

Avery, O. T., MacLeod, C. M., McCarty, M. (1979): Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types, Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *The Journal of experimental medicine*, 149 (2), 297–326

Bains, W. (2007): *Biotechnology from A to Z*, 3rd edition, New York:Oxford university press, ISBN 978-0-19-852498-4

Bartůněk, P. a kolektiv (2013): *Lymfická borelióza*, 4. přepracované a doplněné vydání, Grada Publishing, ISBN 978-80-247-4355-4

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 Papers*, 149, 257–259

Beneš, L. (2007): *Biofarmaceutika (bioléčiva)*, *Chem. Listy*, 101, 18–24

Berkowitz, S. A., Engen, J. R., Mazzeo, J. R., Jones, G. B. (2012): Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars, *Nature Reviews Drug Discovery*, 11 (7), 527–540

Brar, D. [online]. Dostupné z: <http://www.med.uni-giessen.de/itr/history/inshist.html>, [cit. 10. 10. 2015]

Breitling, R., Klingner, S., Callewaert, N., Pietrucha, R., Geyer, A., Ehrlich, G., Hartung, R., Müller, A., Contreras, R., Beverley, S. M., Alexandrov, K. (2002): Non-pathogenic

trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein expression and purification*, 25 (2), 209–218

Brown, T. (2016): *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*, Seventh edition, Chichester: Wiley Blackwell, ISBN 978-1-119-07256-0

Callewaert, N., Laroy, W., Cadirgi, H., Geysens, S., Saelens, X., Min, J. W., Contreras, R. (2001): Use of HDEL-tagged *Trichoderma reesei* mannosyl oligosaccharide 1, 2-alpha-D-mannosidase for N-glycan engineering in *Pichia pastoris*. *FEBS letters*, 503 (2-3), 173–178

Casali, N., Preston, A. (2003): *E. coli plasmid vectors: Methods and applications*. *Methods in Molecular Biology* (235), Humana press, ISBN 1-58829-151-0

Çelik, E., Çalık, P. (2012): Production of recombinant proteins by yeast cells, *Biotechnology advances*, 30 (5), 1108–1118

Clark, D. P., Pazdernik, N. J. (2009): *Biotechnology: applying the genetic revolution*, Elvise Academic Press, ISBN: 978-0-12-175552-2

Clontech Laboratories, Inc [online] (2012): TALON® Metal Affinity Resins User Manual

Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., Helling, R. B. (1973): Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 70, 3240–3244

Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S., Price, D. (2013): The future of peptide-based drugs, *Chemical biology & drug design*, 81 (1), 136–147

Cui, Y., Hu, T., Qu, X., Zhang, L., Ding, Z., Dong, A. (2015): Plasmids from Food Lactic Acid Bacteria: Diversity, Similarity, and New Developments. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (6), 13172–13202

Currell B. C., Dam-Mieras R. C. E. (1991): *Biotechnological Innovations in Food Processing*, BIOTOL series, Butterworth-Heinemann Ltd, ISBN 0750615133

Cwiertka, K., Trojanec, R., Špačková, K., Hajdúch, M. (2004): Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii, *Klin Farmakol Farm*, 18, 165–170

Daniell, H., Khan, M. S., Allison, L. (2002): Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology, *Trends in plant science*, 7 (2), 84–91

Demain, A. L., Vaishnav, P. (2009): Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms, *Biotechnology advances*, 27 (3), 297–306

Derewenda, Z. S. (2004): The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. *Methods*, 34 (3), 354–363

Desplancq, D., Bernard, C., Sibler, A., Kieffer, B., Miguet, L., Potier, N., Van Dorsselaer A, Weiss, E. (2005): Combining inducible protein overexpression with NMR-grade triple isotope labeling in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Biotechniques*, 39 (3), 405–411.

Dostupné z:

https://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjMk_XPpsDLAhVn4XIKHcbhB0wQFggcMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.clontech.com%2Fxxclt_ibcGetAttachment.jsp%3FItemId%3D17512&usg=AFQjCNFwiHCJKL0i4X3GmcJndTdsNvfZzQ&sig2=XPA2kFPWOSHJqDy9zWxumQ [cit. 21. 3. 2016]

Duilio, A., Tutino, M. L., Marino, G. (2004): Recombinant protein production in Antarctic Gram-negative bacteria, *Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols*, 225–237

Dziewit, L., Bartosik, D. (2014): Plasmids of psychrophilic and psychrotolerant bacteria and their role in adaptation to cold environments. *Frontiers in Microbiology*, 5, 596

Ede A., Cormack L. B. (2012): *A History of Science in Society: From Philosophy to Utility*, 2nd edition, Canada:University of Toronto Press, ISBN 978-1-4426-0446-9

Edelstein, M. L., Abedi, M. R., Wixon, J., Edelstein, R. M. (2004): Gene therapy clinical trials worldwide 1989–2004 — an overview, *The journal of gene medicine*, 6 (6), 597–602.

Eisenberg, R. S. (2006): Biotech patents, looking backward while moving forward. *Nature biotechnology*, 24 (3), 317–319

Erdile, L. F., Brandt, M. A., Warakomski, D. J., Westrack, G. J., Sadziene, A., Barbour, A. G., Mays, J. P. (1993). Role of attached lipid in immunogenicity of *Borrelia burgdorferi* OspA. *Infection and Immunity*, 61 (1), 81–90.

Fári, M. G., Kralovánszky, U. P. (2006): The founding father of biotechnology, Károly (Karl) Ereky, *International journal of horticultural science*, 12 (1), 9–12

Flamm, E. L. (1991): How FDA approved chymosin: a case history, *Bio/Technology*, (9), 349–351

Fox, J. D., Waugh, D. S. (2003): Maltose-binding protein as a solubility enhancer. *E. coli Gene Expression Protocols*, 99–117

Frangioni, J. V., Neel, B. G. (1993): Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical biochemistry*, 210 (1), 179–187

Fusek, M., Víték, L., Blahoš, J., Hajdúch, M., Ruml, T. a kolektiv (2012): *Biologická léčiva: teoretické základy klinické praxe*, 1. vyd., Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3727-0

Ganapathy, M. (2016): Plants as Bioreactors – A Review. *Adv Tech Biol Med*, 4 (161), 2379–1764

Glick, B. R., Pasternak, J. J., et Patten, Ch. L. (2010): *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*, 4th edition, Washington: ASM Press, ISBN 978-1-55581-498-4

Gloeckner, C. J., Boldt, K., Schumacher, A., Roepman, R., Ueffing, M. (2007): A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes, *Proteomics*, 7 (23), 4228–4234

Grabowski, G. A. (2008): Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease, *The Lancet*, 372 (9645), 1263–1271

Gräslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, Ch., Hui R., Ming J., dhe-Paganon S., Park H., Savchenko A., Yee A., Edwards A., Vincentelli R., Cambillau C., Kim R., Kim S.-H., Rao Z., Shi Y., Terwilliger C. T., Kim Ch.-Y., Hung L.-W., Waldo S. G., Peleg Y., Albeck S., Unger T., Dym O., Prilusky J., Sussman L. J., Stevens C. R., Lesley A. S., Wilson A. I., Joachimiak A., Collart F., Dementieva I., Donnelly I. M., Eschenfeldt H. W., Kim Y., Stols L., Wu R., Zhou M., Burley K. S., Emtage S. J., Sauder M. J., Thompson D., Bain K., Luz J., Gheyi T., Zhang F., Atwell S., Almo C. S., Bonanno B. J., Fiser A., Swaminathan S., Studier W. F., Chance R. M., Sali A., Acton B. T., Xiao R., Zhao L., Ma C. L., Hunt F. J., Tong L., Cunningham K., Inouye M., Anderson S., Janjua H., Shastry R., Ho K. C., Wang D., Wang H., Jiang M., Montelione T. G., Stuart I. D., Owens J. R., Daenke S., Schütz A., Heinemann U., Yokoyama S., Büssow K., Gunsalus C. K., (2008): Protein production and purification, *Nature methods*, 5 (2), 135–146

Gutiérrez, J., Bourque, D., Criado, R., Choi, Y. J., Cintas, L. M., Hernández, P. E., Míguez, C. B. (2005): Heterologous extracellular production of enterocin P from *Enterococcus faecium* P13 in the methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens*. *FEMS microbiology letters*, 248 (1), 125–131

Hansson, M., Samuelson, P., Nguyen, T. N., Ståhl, S. (2002): General expression vectors for *Staphylococcus carnosus* enabled efficient production of the outer membrane protein A of *Klebsiella pneumoniae*. *FEMS microbiology letters*, 210 (2), 263–270

Harzevili, F. D., Chen, H. (2015): *Microbial Biotechnology, Progress and Trends*, CRC press, ISB: 978-1-4822-4521-9

Heinrichs, A. [online] (2007): Nature Milestones in DNA technologies, Milestone 4, Making the cut, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Dostupné z: <http://www.nature.com/milestones/miledna/full/miledna04.html> [cit. 20. 9. 2015]

Hellwig, S., Drossard, J., Twyman, R. M., Fischer, R. (2004): Plant cell cultures for the production of recombinant proteins, *Nature biotechnology*, 22 (11), 1415–1422

Hillier, L., Marra, M., McPherson, J. D., Waterston, R. H., Chinwalla, A., Wallis, J., Sekhon, M., Wylie, K., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Fulton, R., Kucaba, T. A., Wagner-McPherson, C., Barbazuk, W. B., Gregory, S. G., Humphray, S. J., French, L., Evans, R. S., Bethel, G., Whittaker, A., Holden, J. L., McCann, O. T., Dunham, A., Soderlund, C., Scott, C. E., Bentley, D. R., Schuler, G., Chen, H.-C., Jang, W., Green, E. D., Idol, J. R., Maduro, V. V. B., Montgomery, K. T., Lee, E., Miller, A., Emerling, S., Kucherlapati, R., Gibbs, R., Scherer, S., Gorrell, J. H., Sodergren, E., Clerc-Blankenburg, K., Tabor, P., Naylor, S., Garcia, D., de Jong, P. J., Catanese, J. J., Nowak, N., Osoegawa, K., Hood, L., Qin, S., Rowen, L., Madan, A., Dors, M., Trask, B., Friedman, C., Massa, H., Cheung, V. G., Kirsch, I. R., Reid, T., Yonescu, R., Weissenbach, J., Bruls, T., Heilig, R., Branscomb, E., Olsen, A., Doggett, N., Cheng, J.-F., Hawkins, T., Myers, R. M., Shang, J., Ramirez, L., Schmutz, J., Velasquez, O., Dixon, K., Stone, N. E., Cox, D. R., Haussler, D., Kent, W. J., Furey, T., Rogic, S., Kennedy, S., Jones, S., Rosenthal, A., Wen, G., Schilhabel, M., Gloeckner, G., Nyakatura, G., Siebert, R., Schlegelberger, B., Korenberg, J., Chen, X.-N., Fujiyama, A., Hattori, M., Toyoda, A., Yada, T., Park, H.-S., Sakaki, Y., Shimizu, N., Asakawa, S., Kawasaki, K., Sasaki, T., Shintani, A., Shimizu, A., Shibuya, K., Kudoh, J., Minoshima, S., Ramser, J., Seranski, P., Hoff, C., Poustka, A., Reinhardt, R., Lehrach, H., Stone, N. E., Cox, D. R., Haussler, D., Kent, W. J., Furey, T., Rogic, S., Kennedy, S., Jones, S., Rosenthal, A., Wen, G., Schilhabel, M., Gloeckner, G., Nyakatura, G., Siebert, R., Schlegelberger, B., Korenberg, J., Chen, X.-N., Fujiyama, A., Hattori, M., Toyoda, A., Yada, T., Park, H.-S., Sakaki, Y., Shimizu, N., Asakawa, S., Kawasaki, K., Sasaki, T., Shintani, A., Shimizu, A., Shibuya, K., Kudoh, J., Minoshima, S., Ramser, J., Seranski, P., Hoff, C., Poustka, A., Reinhardt, R., Lehrach, H. (2001): A physical map of the human genome, *Nature*, 409 (6822), 934–941

Hochuli, E. (1989): Genetically designed affinity chromatography using a novel metal chelate absorbent, In *Biologically active molecules*, Springer Berlin Heidelberg, 217–239

Holmes, F. L., (2001): Meselson, Stahl, and the Replication of DNA, A History of „The Most Beautiful Experiment in Biology“, New Haven: Yale University Press, ISBN 0-300-08540-0

Horowitz, N. H., Berg, P., Singer, M., Lederberg, J., Susman, M., Doebley, J., Crow, J. F. (2004): A Centennial: George W. Beadle, 1903–1989. *Genetics*, 166 (1), 1–10

- Houdebine, L. M. (2009): Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals, *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 32 (2), 107–121
- Hughes, B. (2010): 2009 FDA drug approvals, *Nature Reviews Drug Discovery*, 9 (2), 89–92
- Humira (adalimumab) [online]. Dostupné z: <http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/drug/814/humira-adalimumab/?mp=amf> [cit. 9. 10. 2015]
- Chen, R. (2012): Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. *Biotechnology advances*, 30 (5), 1102–1107
- Chris Gunter [online] (2007): Nature Milestones in DNA technologies, Milestone 20, Putting it all together, *Nature*.
Dostupné z: <http://www.nature.com/milestones/miledna/full/miledna20.html> [cit. 22. 9. 2015]
- Ikonomou, L., Drugmand, J. C., Bastin, G., Schneider, Y. J., Agathos, S. N. (2002): Microcarrier culture of lepidopteran cell lines: implications for growth and recombinant protein production. *Biotechnology progress*, 18 (6), 1345–1355
- Itaya, H., Kikuchi, Y. (2008): Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase by coryneform bacteria, *Applied microbiology and biotechnology*, 78 (4), 621–625
- Jackson, A. M., Boutell, J., Cooley, N., He, M. (2004): Cell-free protein synthesis for proteomics, *Briefings in functional genomics & proteomics*, 2 (4), 308–319
- Jackson, D. A., Symons, R. H., 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69 (10), 2904–2909
- Jermutus, L., Ryabova, L. A., Plückthun, A. (1998): Recent advances in producing and selecting functional proteins by using cell-free translation, *Current opinion in biotechnology*, 9 (5), 534–548

Katzen, F., Chang, G., Kudlicki, W. (2005): The past, present and future of cell-free protein synthesis, *Trends in biotechnology*, 23 (3), 150–156

Klener P, Klener P. jr. (2010): *Nová protinádorová léčiva a léčebné strategie v onkologii*, Praha: Granada Publishing, ISBN 978-80-247-2808-7

Klonování DNA [online].

Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Klonovani%20DNA.htm> [cit. 19. 12. 2015]

Kost, T. A., Condeary, J. P. (2002): Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors, *Trends in biotechnology*, 20 (4), 173–180.

Kramer, M. G., Redenbaugh, K. (1994): Commercialization of a tomato with an antisense, polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story, *Euphytica*, 79 (3), 293–297

Kresge, N., Simoni, R. D., Hill, R. L. (2005): Arthur Kornberg's discovery of DNA polymerase I, *Journal of Biological Chemistry*, 280 (49), e46–e46

Křupka, M., Braunová, J., Raška, M., Strojil, J. (2014): *Současné možnosti imunologické intervence*, Univerzita Palackého v Olomouci, ISBN 978-80-244-4850-3

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 Czech Repub*, 149 (2), 261–264

Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Luft, B. J., Koide, S., Dunn, J. J., Lawson, C. L., Swaminathan, S. (2001): Crystal structure of outer surface protein C (OspC) from the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, *The EMBO journal*, 20 (5), 971–978

Kvasnička J. [online]: *Revue-články-trombofilie*.

Dostupné z: <http://www.angisrevue.cz/revue/archiv/cislo/detail/86> [cit. 14. 4. 2016]

Cvak, L., Fusek, M. (2004): Moderní biotechnologie a farmaceutický průmysl, Chem. listy 98, 1087–1095

Larrick, J. W., Thomas, D. W. (2001): Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current opinion in biotechnology*, 12 (4), 411–418

Lederberg, J. (1998): Plasmid (1952–1997). *Plasmid*, 39 (1), 1–9

Ma, J. K., Drake, P. M., Christou, P. (2003): The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4 (10), 794–805

Ma, J. K., Chikwamba, R., Sparrow, P., Fischer, R., Mahoney, R., Twyman, R. M. (2005): Plant-derived pharmaceuticals – the road forward, *Trends in plant science*, 10 (12), 580–585

Mandal, S., Moudgil, M. N., Mandal, S. K. (2009). Rational drug design, *European journal of pharmacology*, 625 (1), 90–100

Mandell, D. J., Lajoie, M. J., Mee, M. T., Takeuchi, R., Kuznetsov, G., Norville, J. E., Church, G. M. (2015): Biocontainment of genetically modified organisms by synthetic protein design, *Nature*, 518 (7537), 55–56

Margesin, R., Schinner, F., Marx, J., Gerday, Ch. (2008): Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology, Springer, ISBN 978-3-540-74334-7

Maroux, S., Baratti, J., Desnuelle, P. (1971): Purification and specificity of porcine enterokinase. *Journal of Biological Chemistry*, 246 (16), 5031–5039

Martin, E. (2015): Concise Medical Dictionary, 9th edition, Great Britain:Oxford University Press, ISBN 978-0-19-968781-7

Masi, L., Brandi, M. L. (2015): Gaucher disease: the role of the specialist on metabolic bone diseases, *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 12 (2), 165

Metyš K., Balog P. (2006): Marketing ve farmacii, Praha: Granada, ISBN 80-247-0830

Meyer, V. (2008): Genetic engineering of filamentous fungi — progress, obstacles and future trends, *Biotechnology advances*, 26 (2), 177–185

Mocini, D., Leone, T., Tubaro, M., Santini, M., Penco, M. (2007): Structure, production and function of erythropoietin: implications for therapeutical use in cardiovascular disease, *Current medicinal chemistry*, 14 (21), 2278–2287

Murray, T. S., Shapiro, E. D. (2010): Lyme Disease, *Clinics in Laboratory Medicine*, 30 (1), 311–328

Nothaft, H., Szymanski, C. M. (2013): Bacterial Protein N-Glycosylation: New Perspectives and Applications, *The Journal of Biological Chemistry*, 288 (10), 6912–6920

Olempska-Beer, Z. S., Merker, R. I., Ditto, M. D., DiNovi, M. J. (2006): Food-processing enzymes from recombinant microorganisms — a review, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 45 (2), 144–158

Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., Schacht, A. L. (2010): How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge, *Nature reviews Drug discovery*, 9 (3), 203–214

Plotkin, S., Orenstein, W., Offit P. (2013): *Vaccines*, 6st edition, Saunder Elsevier, ISBN: 978-1-4557-0090-5

PMGroup Worldwide [online]: Top 50 pharmaceutical products by global sales. Dostupné z: http://www.pmlive.com/top_pharma_list/Top_50_pharmaceutical_products_by_global_sales [cit. 2. 4. 2016]

Potrykus, I. (2001): Golden rice and beyond. *Plant Physiology*, 125 (3), 1157–1161

Raška, M., Šíma, P., Turánek, J., Rašková Kafková, L., Frömmel, J. (2010): Škola molekulárních biotechnologií, Profession. Olomouc. Dostupné z: http://webcast.skola-profession.cz/Contexts/profession/Documents/SMB_Profession_Teorie.pdf

Rader, R. A. (2013): An analysis of the US biosimilars development pipeline and likely market evolution, *BioProcess Int*, 11 (6)

Robinson, R. (2004): RNAi therapeutics: how likely, how soon?, *PLoS biology*, 2 (1)

Rogelj, I., Perko, B., Francky, A., Penca, V., Pungercar, J. (2001): Recombinant lamb chymosin as an alternative coagulating enzyme in cheese production, *Journal of dairy science*, 84 (5), 1020–1026

Roger, S. D., Goldsmith, D. (2008): Biosimilars: it's not as simple as cost alone, *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 33 (5), 459–464

Ross, R. P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G. F., Coffey, A. (2000): Novel cultures for cheese improvement, *Trends in Food Science & Technology*, 11 (3), 96–104

Růčková, E., Müller, P., Vojtěšek, B. (2014): Exprese a purifikace proteinů, *Klinická onkologie, časopis České a Slovenské onkologické společnosti*, 27, 92–97

Růčková, E., Müller, P., Vojtěšek, B. (2015): Rekombinantní protilátky a jejich využití v protinádorové terapii., *KLINICKÁ ONKOLOGIE*, 28, 2552–2559

Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J. H. (2011): Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health, *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2 (3), 123–128

Rybka, J. a kolektiv (2006): *Diabetologie pro sestry*, Granada, ISBN: 80-247-1612-7

Sateesh, M. K. (2008): *Bioethics and Biosafety*, International Publishing House Pvt., ISBN: 978-81-906757-0-3

Shedlock, D. J., Weiner, D. B. (2000): DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity, *Journal of leukocyte biology*, 68 (6), 793–806

Shih, S. M. H., Doran, P. M. (2009): Foreign protein production using plant cell and organ cultures: advantages and limitations, *Biotechnology advances*, 27 (6), 1036–1042

Schaechter, M. (2009): *Encyclopedia of microbiology*, 3rd edition, Amsterdam: Elsevier, ISBN: 978-0-12-373939-1

Schuhmacher, A., Hinder, M., Gassmann, O. (2016): *Value Creation in the Pharmaceutical Industry: The Critical Path to Innovation*, Weinheim: Wiley-VCH, ISBN: 978-3-527-33913-6

Schwarz, D., Dötsch, V., Bernhard, F. (2008): Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Proteomics*, 8 (19), 3933–3946

Smyth, D. R., Mrozkiewicz, M. K., McGrath, W. J., Listwan, P., Kobe, B. (2003): Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags. *Protein Science*, 12 (7), 1313–1322

Sodoyer, R. (2004): Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals, *BioDrugs*, 18 (1), 51–62

Spencer-Green, G. (2000): Etanercept (Enbrel): update on therapeutic use, *Annals of the rheumatic diseases*, 59 (suppl 1), i46–i49

Spohner, S. C., Schaum, V., Quitmann, H., Czermak, P. (2016): *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology, *Journal of Biotechnology*, 222, 104–116

Starobová, O., Landa, L., Nováková, J., Šulcová, A. [online] (2015): Výzkum nových léčiv od zrodu k registraci. Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity. [cit. 18. 12. 2015]

Strojil, J. (2014): Biosimilars – specifika schvalovacího procesu v EU, *Klinická farmakologie a farmacie*, 28 (1): 14–18

Studier, F. W. (1991): Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system, *Journal of molecular biology*, 219 (1), 37–44

Suchý, D., Hora, M., Fínek, J. (2009): Vývoj a klinické hodnocení nových léčiv, *Ces Urol*, 13 (2), 141–148

Svoboda, T. (2010): Problematika originálních léčiv, generických přípravků a biosimilars – záměny léků dnes a zítra s hlavním zacílením na rizika spojená s bio technologiemi, *Klin Onkol*, 23 (6), 416–420

Szweda, P., Pladzyk, R., Kotlowski, R., Kur, J. (2001): Cloning, expression, and purification of the *Staphylococcus simulans* lysostaphin using the intein-chitin-binding domain (CBD) system. *Protein expression and purification*, 22 (3), 467–471

Terpe, K. (2003): Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 60 (5), 523–533

Terpe, K. (2006): Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*, 72 (2), 211–222

The QIAexpressionist [online] (2003): A handbook for high-level expression and purification of 6×His-tagged proteins, 5th edition. Dostupné z: http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAexpressionist_EN.pdf [cit. 21. 3. 2016]

Thermo Fisher Scientific Inc [online] (2015): Gateway Recombination Cloning Technology. Dostupné z: <http://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/gateway-technology.html> [cit. 19. 12. 2015]

Valla, V. (2010): Therapeutics of diabetes mellitus: focus on insulin analogues and insulin pumps, *Experimental diabetes research*, 2010

Vetchý D., Vetchá M. (2010): Biosimilars – podobné biologické léčivé přípravky, *Remedia*, 20, 74–77

Vondrejs, V. (2008): Spory kolem genového inženýrství 3, Vesmír 87, 291

Vrancken, K., Anné, J. (2009). Secretory production of recombinant proteins by *Streptomyces*, *Future microbiology*, 4 (2), 181–188

Wartmann, T., Kunze, G. (2000): Genetic transformation and biotechnological application of the yeast *Arxula adenivorans*, *Applied microbiology and biotechnology*, 54 (5), 619–624

Watson, J. D., Crick, F. H. (1953). Molecular structure of nucleic acids, *Nature*, 171 (4356), 737–738

Werner, H., Chantelau, E. A. (2011): Differences in bioactivity between human insulin and insulin analogues approved for therapeutic use-Compilation of reports from the past 20 years. *Diabetology & metabolic syndrome*, 3 (1), 1

StudyBlue [online]: What are the other names for each of the types of mAb, and explain their order in decreased immunogenicity. Dostupné z:

<https://www.studyblue.com/#flashcard/flip/13092920> [cit. 17. 4. 2016]

Wilhelm, S. M., McKenney, K. A., Rivait, K. N., Kale-Pradhan, P. B. (2008): A review of infliximab use in ulcerative colitis, *Clinical therapeutics*, 30 (2), 223–230

Wurm, F. M. (2004): Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells, *Nature biotechnology*, 22 (11), 1393–1398

Wyszyńska, A., Kobierecka, P., Bardowski, J., Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2015): Lactic acid bacteria — 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99 (7), 2967–2977

Younes, A., Gopal, A. K., Smith, S. E., Ansell, S. M., Rosenblatt, J. D., Savage, K. J., Ramchandren, R., Bartlett, L. N., Cheson, B. D., Vos, de S., Forero-Torres, A., Moskowitz, H. C., Connors, M. J., Engert, A., Larsen, K. E., Kennedy, D. A., Sievers, E. L., Chen, R. (2012): Results of a pivotal phase II study of brentuximab vedotin for patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma., *Journal of Clinical Oncology*, 30 (18), 2183–2189

Young, C. L., Britton, Z. T., Robinson, A. S. (2012): Recombinant protein expression and purification: a comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology journal*, 7 (5), 620–634

Zouhar, J. (1999): Afinitní chromatografie proteinu na vázaných kovových iontech. *Chem. Listy*, 93, 683–685