

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Příprava rekombinantního serpinu Iripin-4 z klíštěte
***Ixodes ricinus* a ověření jeho funkce**

Diplomová práce

Bc. Lucie Charvátová

Školitel: Doc. RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2023

Charvátová, L., 2023: Příprava rekombinantního serpinu Iripin-4 z klíštěte *Ixodes ricinus* a ověření jeho funkce. [Preparation of the recombinant serpin Iripin-4 from the tick *Ixodes Ricinus* and verification of its function. Mgr. Thesis, in Czech.] – 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

In this work, tick recombinant protein Iripin-4 was expressed in competent *E. coli* cells, extracted and purified by affinity and size-exclusion chromatography. The inhibitory function of Iripin-4 was tested using inhibition enzyme assays.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 8. 4. 2023

.....

podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, trpělivost a čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Ľubici Makušové za pomoc při práci v laboratoři a Mgr. Barboře Kašćákové, Ph. D. za pomoc s provedením chromatografických metod a enzymatických esejí. Velké poděkování patří také mé rodině, a hlavně manželovi a dceři, bez kterých by tato práce nevznikla.

Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1.	Proteázy.....	1
1.2.	Inhibitory proteáz.....	2
1.3.	Inhibitory serinových proteáz.....	3
1.4.	Serpiny	3
1.4.1.	Funkce serpinů.....	3
1.4.2.	Struktura serpinů.....	4
1.4.3.	Mechanismus fungování serpinů.....	6
1.4.4.	Serpiny ve slinách klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	7
2.	Cíle práce.....	9
3.	Materiál a metody	10
3.1.	Pomůcky a chemikálie, složení pufrů a gelů.....	10
3.2.	Klonování.....	14
3.2.1.	Navržení primerů.....	14
3.2.2.	Gradientová PCR.....	14
3.2.3.	High-fidelity PCR.....	16
3.2.4.	Příprava plazmidu pro klonování.....	17
3.2.5.	Restrikční štěpení.....	17
3.2.6.	Ligace.....	18
3.2.7.	Transformace.....	19
3.2.8.	Colony PCR.....	19
3.2.9.	Transformace do BL21 buněk.....	21
3.3.	Pilotní exprese a SDS-PAGE	21
3.4.	Western blot	23
3.5.	Large-scale exprese.....	24

3.6.	Afinitní chromatografie.....	25
3.7.	Rozměrově vylučovací chromatografie	26
3.8.	Inhibiční enzymatické eseje	27
4.	Výsledky	28
4.1.	Příprava plazmidu pET-19b se zaklonovaným proteinem Iripin-4	29
4.2.	Pilotní exprese	31
4.3.	Large-scale exprese.....	37
4.4.	Afinitní chromatografie.....	40
4.5.	Rozměrově vylučovací chromatografie	46
4.6.	Inhibiční enzymatické eseje	50
5.	Diskuze.....	51
6.	Závěr	54
7.	Seznam literatury	55

1. Úvod

Klíšťata patří mezi ektoparazitické členovce, kteří sají krev savců, ptáků, plazů a obojživelníků ve všech oblastech Země (Anderson a Magnarelli, 2008). Klíšťata nejen poškozují kůži svého hostitele, ale také přenášejí patogeny a řadí se mezi jedny z nejvýznamnějších přenašečů nemocí u lidí i zvířat (Estrada-Peña a Jongejan, 1999; Aounallah *et al.*, 2020). Při sání klíštěte se do hostitele uvolňují klíštěcí sliny, které obsahují směs proteinů, peptidů i nepeptidových molekul. Tyto složky klíštěcích slin zabraňují srážení krve hostitele, rozšiřují kožní kapiláry, rozkládají hostitelskou tkáň a ovlivňují vrozenou i adaptivní imunitní odpověď (Anderson a Magnarelli, 2008; Aounallah *et al.*, 2020).

Jak již bylo zmíněno, sliny klíšťat obsahují mnoho proteinů z různých proteinových rodin, které mají anti-hemostatické účinky. Mezi tyto proteiny se řadí také proteázové inhibitory. Za fyziologických podmínek zpomalují proteázové inhibitory proteolýzu, čímž regulují hemostatické děje, jako jsou koagulace či agregace krevních destiček nebo aktivace komplementu. Přítomnost exogenních proteázových inhibitorů může tyto děje ovlivnit. Klíšťata vylučují inhibitory proteáz v místě kousnutí, čímž narušují proteolytickou rovnováhu a usnadňují sání krve hostitele (Chmelar *et al.*, 2012).

Mezi nejvíce zkoumané klíštěcí proteázové inhibitory se řadí inhibitory s Kunitzovými doménami, serpiny a cystatiny (Chmelar *et al.*, 2012). Serpiny, inhibitory serinových proteáz, jsou předmětem této práce.

1.1. Proteázy

Proteázy jsou enzymy proteolyticky štěpící peptidové vazby pomocí hydrolýzy. Jsou přítomné ve zvířatech, rostlinách i mikroorganismech a hrají klíčovou roli ve většině fyziologických procesů, jako jsou trávení potravy a signální a aktivační kaskády, například koagulační, komplementová či apoptotická kaskáda (Jmel *et al.*, 2021; Schauperl *et al.*, 2015).

Organismy tvořené převážně proteiny získávají aminokyseliny štěpením již existujících proteinů. Proteázy se tudíž účastní procesu růstu i přestavby buněk a tkání mnohobuněčných organismů. Dále jsou využívány pro úpravu nově vzniklých proteinů odstraněním signální sekvence a k přeměně proteinů na jejich biologicky aktivní formu (aktivace proenzymů) či naopak k deaktivaci proteinů (Barrett, 2000). Kromě životně důležitých biologických procesů

se proteázy podílejí i na různých onemocněních, jako jsou rakovina, krvácivé poruchy, záněty a virová onemocnění (Jmel *et al.*, 2021).

Některé proteázy mohou štěpit různé substráty, zatímco jiné jsou vysoce specifické. Substrátová specifita je dána aminokyselinami, které sousedí s místem štěpení (Schauperl *et al.*, 2015). Proteázy se dělí podle místa štěpení bílkoviny na endproteázy a exoproteázy. Exoproteázy odštěpují aminokyseliny od terminálních konců proteinů, zatímco endoproteázy štěpí vazby uvnitř polypeptidového řetězce (Barrett, 2000).

Podle aminokyseliny v aktivním místě enzymu se proteázy dělí do sedmi tříd: cysteinové, serinové, aspartátové, glutamátové, threoninové, metaloproteázy a asparginová peptidová lyáza (Da Silva, 2017, Jmel *et al.*, 2021, Johnson a Pellicchia, 2006). U serinového, threoninového a cysteinového typu proteáz dochází při katalýze k tvorbě acylenzymového komplexu a k následnému uvolňování karboxylátových a aminových produktů. Aspartátové, glutamátové proteázy a metaloproteázy využívají molekulu vody jako nukleofil, který poté hydrolyzuje peptidový substrát (Agbowuro *et al.*, 2017).

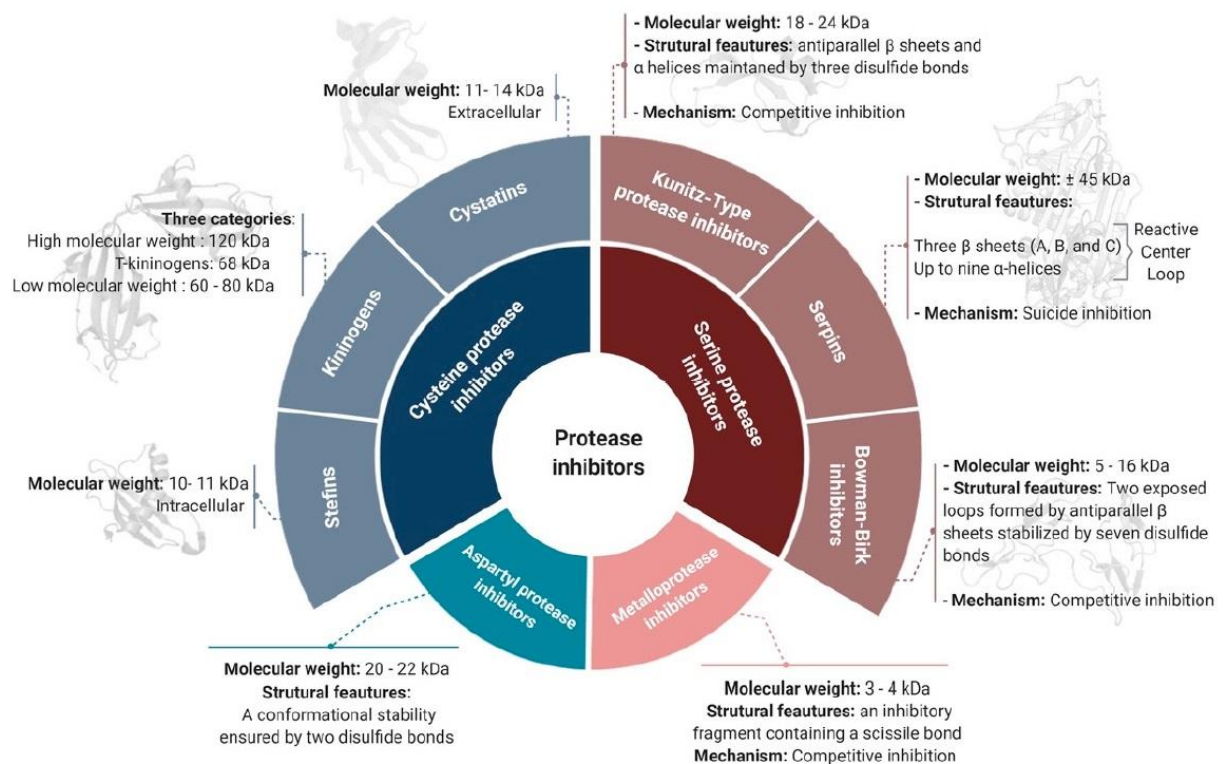
1.2. Inhibitory proteáz

Při neregulované proteolytické aktivitě dochází k narušení homeostatické rovnováhy organismu. Proto musí být aktivita proteáz, štěpení proteinů, přísně kontrolována. Ke kontrole aktivity proteáz slouží jejich inhibitory. Podle mechanismu inhibice můžeme inhibitory proteáz rozdělit do několika skupin: kompetitivní inhibitory, kompetitivní inhibitory se sekundárním vazebným místem a ireversibilní inhibitory (Farady a Craik, 2010).

Naprostá většina inhibitorů proteáz jsou kompetitivní inhibitory. Inhibitory se vážou v aktivním místě proteázy způsobem podobným substrátu tak, že blokují přístup k aktivnímu místu proteázy. Příbuzné proteázy mají často vysoký stupeň homologie v aktivním místě, proto mohou inhibitory inhibovat více proteáz. Některé inhibitory proteáz jsou kompetitivní a vážou se v aktivním místě proteázy, ale mají ještě sekundární vazebné místo mimo aktivní místo proteázy. Sekundární vazebné místo zvětšuje plochu povrchu interakce protein-protein a tím zvyšuje afinitu. Má také vliv na specifitu inhibitoru. Při ireversibilní inhibici působí inhibitor jako substrát a využívá katalytické mechanismy enzymů k jejich inhibici (Farady a Craik, 2010).

Inhibitory proteáz lze podle jejich cílové proteázy rozdělit do šesti skupin: serinové, cysteinové, aspartátové, glutamátové, threoninové a inhibitory metaloproteáz (Jmel *et al.*,

2021). Obrázek 1 vyobrazuje seznam nejběžnějších skupin inhibitorů proteáz a jejich hlavní vlastnosti.



Obr. 1: Rozdělení inhibitorů proteáz na základě jejich cílové proteázy. Převzato z Jmel *et al.*, 2021.

1.3. Inhibitory serinových proteáz

U klíšťat byly popsány čtyři skupiny inhibitorů serinových proteáz: serpiny, inhibitory s Kunitzovou doménou, inhibitory s Kazalovou doménou a inhibitory obsahující doménu bohatou na cysteiny podobnou inhibitorům trypsinu. Inhibitory s 1-7 Kunitzovými doménami působí u klíšťat jako antihemostatika, funkce inhibitorů Kazalových domén je u klíšťat stále neznámá (Chmelař *et al.*, 2017).

1.4. Serpiny

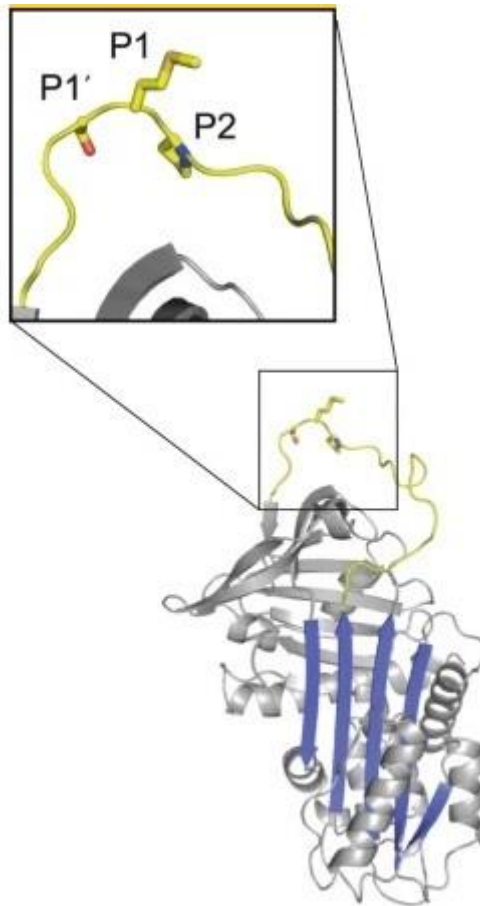
1.4.1. Funkce serpinů

Serpiny tvoří největší skupinu inhibitorů proteáz, v přírodě jsou všudypřítomné a lze je najít i u virů a prokaryot (Law *et al.*, 2006). V lidském genomu je kódováno 37 serpinů, z toho 30 jich slouží jako inhibitory proteáz (Kellici *et al.*, 2020). Serpiny zajišťují některé důležité

fyziologické funkce organismu, při jejich disfunkci proto dochází k nemocem. Regulují například tvorbu sraženiny i trombolýzu, zánět a imunitní reakci, transport hormonů a podílí se i na progresi rakoviny (Lucas *et al.*, 2018). U členovců, žvivících se krví, slouží serpiny jako modulátory hostitelské imunity a hemostázy (Chmelař *et al.*, 2017).

1.4.2. Struktura serpinů

Serpiny se skládají z přibližně 400 aminokyselin, které tvoří N-terminální helikální doménu a C-terminální doménu. Oblast odpovědná za interakci s cílovou proteázou se nazývá smyčka reaktivního centra (reactive centre loop, RCL). RCL se nachází na povrchu serpinu a obsahuje štěpnou vazbu P1-P1' (viz Obr. 2), jež je rozpoznávána serinovými proteázami jako substrát (Huntington, 2011). Pomocí RCL se serpiny váží na cílovou proteázu a tvoří s ní stabilní komplex (Stein a Chothia, 1991). Serpiny se dále skládají z β -listů A, B a C a osmi až devíti α helixů. β -list A obsahuje dvě paralelní β -vlákna (Huntington, 2011).



Obr. 2: Serpin se žlutě zvýrazněnou RCL a vazbou P1-P1'. Převzato z Polderdijk a Huntington, 2018. RCL vyčnívá z povrchu serpinu mezi β -listy A a C (znázorněn modře) a je připravena navázat cílovou proteázu.

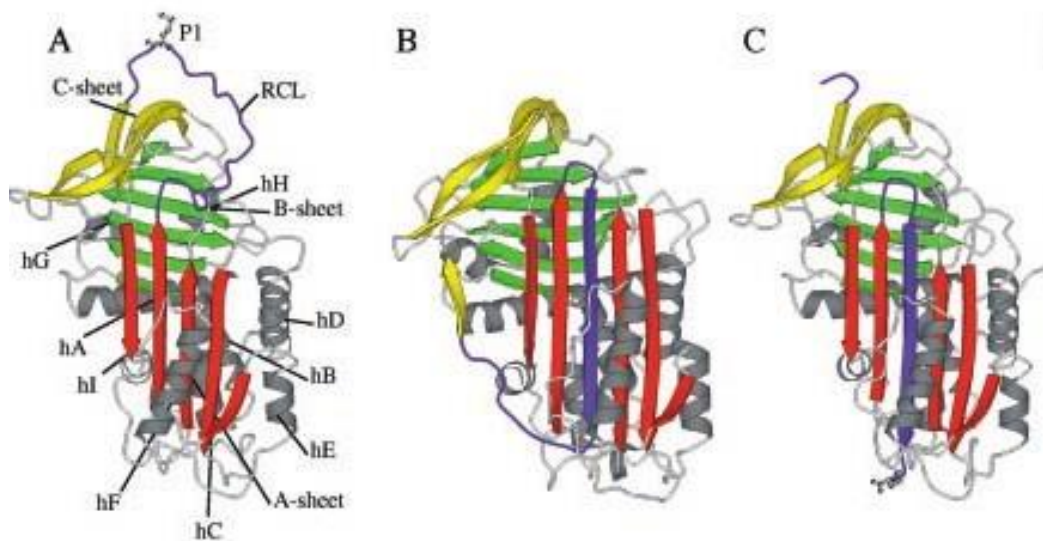
Serpiny mohou zaujmout několik různých konformací, přičemž nativní forma není jejich nejstabilnější (Huntington, 2011). Nativní forma (S forma- „stressed“) je aktivní forma serpinu, ve které může inhibitor interagovat s proteázou. V této formě se nerozštěpená RCL nachází na vnější části serpinu a je připravena navázat cílovou proteázu (Whisstock *et al.*, 1998).

Z nativní formy mohou serpiny přejít do latentní formy, která je více stabilní. Při přechodu do latentní formy dochází k vložení nerozštěpené RCL do β -listu A přesunem s1C vláknem z β -listu C, čímž vznikne antiparalelní vlákno. Serpiny v latentní formě ztrácejí své

inhibiční schopnosti, mohou však být přeměněny zpět na aktivní formu denaturací a následným refoldingem (Silverman *et al.*, 2001).

Rozštěpená forma serpinu (R forma- „relaxed“) je jeho nejstabilnější forma. V této formě je RCL zcela vložena do β -listu A, na rozdíl od latentní formy však nedochází k přesunu vláknů s1C z β -listu C (Silverman *et al.*, 2001). K rozštěpení vazby P1-P1' a změně konformace serpinu na rozštěpenou formu probíhá v komplexu s proteázou (Whisstock *et al.*, 1998).

Obrázek 3 znázorňuje jednotlivé konformace serpinu.



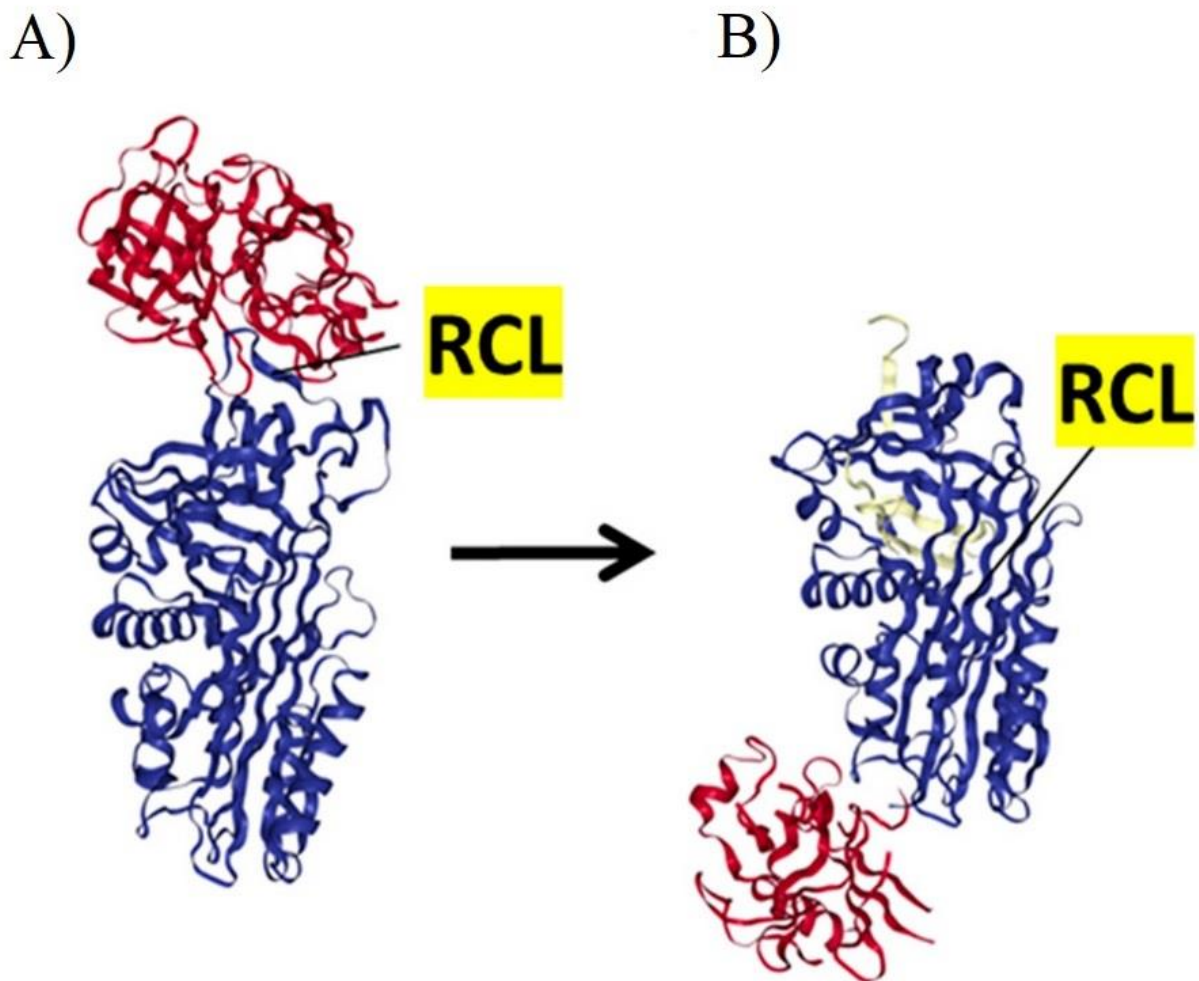
Obr. 3: Konformace serpinu. A-nativní forma, B-latentní forma, C-rozštěpená forma.

Převzato ze Silverman *et al.*, 2001. Písmenem A je označena nativní forma serpinu s popsánymi β -listy (červené, žluté a zelené), α helixy (šedé) a RCL (fialová) s vazbou P1-P1'. Písmenem B je označena latentní forma serpinu a písmeno C označuje rozštěpenou formu serpinu.

1.4.3. Mechanismus fungování serpinů

RCL se nachází na vnější části serpinu a slouží jako návnada pro cílové proteázy. Cílová proteáza zprvu tvoří s RCL nekovalentní Michaelisův komplex v místě P1-P1' (Obr. 4A), kde následně dochází k rozštěpení vazby P1-P1' a proteáza vytvoří s RCL kovalentní vazbu (Lucas *et al.*, 2018, Silverman *et al.*, 2001). N-terminální část smyčky s kovalentně uchycenou proteázou se následně vloží mezi β -list A, čímž vznikne další, antiparalelní β -vlákně (Obr. 4B). Tímto přeskupením dochází k destabilizaci struktury proteázy a ke stabilizaci serpinu (Marszal

a Shrake, 2006). Serpiny se řadí mezi ireverzibilní sebevražedné inhibitory. Každý serpin trvale inaktivuje jen jednu molekulu proteázy a je funkční pouze jednou (Gettins, 2002).



Obr. 4: A-Michaelisův komplex mezi serpinem a proteázou s označeným RCL, B-kovalentní vazba mezi serpinem a proteázou s označeným RCL. Převzato z Kryvalap a Czyzyk, 2022. Písmenem A je označen serpin s nekovalentně navázanou proteázou pomocí Michaelisova komplexu, písmeno B označuje kovalentně vázanou proteázu k serpinu.

1.4.4. Serpiny ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*

Mezi mechanismy, které znesnadňují klíšťatům sání krve hostitele, patří mimo jiné hemostáza či vrozené imunitní reakce. Klíšťata z čeledi Ixodidae sají krev hostitele po dobu až dvou týdnů a jsou vystavena všem obranným mechanismům hostitele. Vyvinuly se proto u nich mechanismy, kterými obcházejí hostitelskou obranu, a které jim usnadňují sání krve. Mezi tyto mechanismy se řadí také inhibice proteáz, mimo jiné pomocí serpinů (Chmelař *et al.*, 2012). U klíštěte *I. ricinus* bylo na základě transkriptomických dat odhaleno nejméně 36 serpinů, funkčně

popsáno však bylo zatím pouze 5 serpinů (Chmelař *et al.*, 2012; Kotál *et al.*, 2021). Nová analýza genomu *I. ricinus* naznačuje přítomnost až 60 serpinů, z nichž některé mohou být pseudogeny (ústní sdělení školitele).

Protein pojmenovaný **Iris** (*Ixodes ricinus* immunosuppressor) byl prvním serpinem popsáným u klíštěte *I. ricinus* a mezi jeho popsánymi aktivitami byla inhibice T-lymfocytů a fibrinolýzy. Potlačoval koagulaci a neznámým mechanismem bránil adhezi krevních destiček. Iris také inhiboval sekreci TNF a prozánětlivých cytokinů, zejména IFN- γ a IL-6 (Chmelař *et al.*, 2017; Meekins *et al.*, 2017).

IRS-2 byl druhým serpinem popsáným u klíštěte *I. ricinus*. Inhiboval zejména prozánětlivé proteázy katepsin G a chymázu a při vyšších koncentracích také trombin. Dále zabraňoval agregaci krevních destiček vyvolanou katepsinem G a inhiboval produkci IL-6, čímž narušoval signální dráhu IL-6/STAT-3 (Chmelař *et al.*, 2011; Chmelař *et al.*, 2017; Meekins *et al.*, 2017, Páleníková *et al.*, 2015).

Iripin-3 je serpinem inhibujícím serinové proteázy kallikrein a matriptázu. Při *in vitro* pokusech inhiboval vnější hemokoagulační kaskádu, inhiboval produkci IL-6 makrofágy a snižoval proliferaci CD4⁺ T lymfocytů (Chlastáková *et al.*, 2021).

Mezi funkce **Iripinu-5** patří potlačení produkce oxidu dusnatého makrofágy, narušení migrace neutrofilů a pozměnění funkce komplementu (Kaščáková *et al.*, 2021).

Iripin-8 inhibuje proteázy podílející se na hemokoagulaci a blokuje koagulační kaskádu a dále inhibuje lýzu erytrocytů komplementem. Mezi proteázy inhibované Iripinem-8 patří trombin, trypsin, kallikrein, plasmin, akřivovaný protein C (APC), faktor VIIa, faktor IXa, faktor Xa, faktor XIa a faktor XIIa (Kotál *et al.*, 2021).

Nejnověji popsáným serpinem z *I. ricinus* je **Iripin-1** (Chlastáková *et al.*, 2023), který potlačoval zánět v myším modelu peritonitidy, pravděpodobně ovlivněním adheze neutrofilů a monocytů na endoteliální buňky.

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na produkci a funkční charakterizaci dalšího serpinu, **Iripin-4**.

2. Cíle práce

1. Připravit Iripin-4 v bakteriálním expresním systému s plazmidem pET-19b a následně ho přečistit pomocí chromatografických metod
2. Ověřit funkci rekombinantního proteinu pomocí enzymatických esejí enzym-substrát-inhibitor

3. Materiál a metody

3.1. Pomůcky a chemikálie, složení pufrů a gelů

V tabulkách 1 a 2 jsou uvedeny seznamy všech použitých chemikálií a komerčních kitů.

Tabulka 1: Seznam chemikálií použitých v jednotlivých metodách.

Název chemikálie	Firma, kat. číslo
Gradientová PCR	
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, #R0581
Primer Iripin-4 BamHI Reverse	Generi biotech
Primer Iripin-4 NdeI Forward	Generi biotech
Templát	Iripin-4 zaklonovaný do plazmidu pET-17b
PCR Master Mix 2X	ThermoFisher, #K0171
High fidelity PCR	
Q5 reakční pufr	NE BioLabs, #B9027S
dNTPs	NE BioLabs, #N0447S
Iripin-4 primery Reverse a Forward	viz Gradientová PCR
Templát	Iripin-4 zaklonovaný do plazmidu pET-17b v koncentraci 100 ng/μl
Q5 High-Fidelity DNA Polymeráza	NE BioLabs, #M0491S
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, #R0581
Gelová elektroforéza	
Agarózový gel (1%)	složení viz tabulka 3
1x TAE pufr	40mM TRIS, 20mM kyselina octová a 1mM EDTA
6x Loading Dye	ThermoFisher, #R0611
SYBR Safe DNA gel stain	ThermoFisher, #S33102
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	ThermoFisher, #SM0323
Restrikční štěpení	
rCutSmart pufr	NE BioLabs, #B6004S
vektor (pET-19b) nebo inzert (Iripin-4)	
restrikční endonukleáza NdeI	NE BioLabs, #R0111S
restrikční endonukleáza BamHI	NE BioLabs, #R0136S
Alkalická fosfatáza	NE BioLabs, #M0371S
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, #R0581
Ligace	
T4 DNA Ligáza	NE BioLabs, #M0202S
T4 DNA ligační pufr (10x)	NE BioLabs, #B0202A
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, #R0581
Naštěpený inzert a vektor	
Transformace do kompetentních buněk	

DH5 alpha Competent E. coli pro namnožení plazmidu s inzertem	NE BioLabs, #C2987H
One Shot BL21 pro expresi proteinu zásobní plazmid/plazmid s inzertem	Invitrogen, #C600003 pET-19b/pET-19b s Iripin-4
SOC médium	NE BioLabs, #B9020S
LB médium	15,5 g Luria Broth Base, Miller (Duchefa Biochemie, #L1717.1000) v 1 l dH ₂ O
Ampicilin	koncentrace 50 mg/μl
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, #R0581
Colony PCR	
PCR Master Mix	ThermoFisher, #K0171
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, #R0581
T7 Forward primer	Generi Biotech
T7 Reverse primer	Generi Biotech
LB médium	15,5 g Luria Broth Base, Miller (Duchefa Biochemie, #L1717.1000) v 1 l dH ₂ O
Ampicilin	koncentrace 50 mg/μl
Pilotní exprese	
LB médium	15,5 g Luria Broth Base, Miller (Duchefa Biochemie, #L1717.1000) v 1 l dH ₂ O
OmniPur IPTG	Calbiochem, #367-93-1
Ampicilin	koncentrace 50 mg/μl
SDS-PAGE	
Polyakrylamidový gel (12%)	složení viz tabulka 3
1x ELFO pufr	5x zředěný 5x ELFO pufr v dH ₂ O
5x ELFO pufr	15,1 g TRIS, 72 g glycinu, 5 g SDS, doplněno do 1 l dH ₂ O
Merkaptoethanol	
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	ThermoFisher, #26619
Coomassie Brilliant Blue R-250 barvicí roztok	Bio-Rad, #161-0436
Odbarvovací roztok	100 ml kyseliny octové, 200 ml methanolu, 700 ml dH ₂ O
dH ₂ O	
Western blot	
PVDF membrána	ThermoFisher, #88518
10x transferový pufr	30,2 g TRIS, 144 g glycinu, doplněno do 1 l dH ₂ O
1x transferový pufr	100 ml 10x transferového pufru, 200 ml methanolu, 700 ml dH ₂ O
Methanol	
10x TBS	24,2 g TRIS, 87,6 g 1,5M NaCl, pH 7,5, doplněno do 1 l dH ₂ O
1x TBS	10x zředěný 10x TBS v dH ₂ O

Promývací pufr (TBS-T)	1x TBS, 0,1% Tween
Blokovací pufr	5% sušené mléko v TBS-T
Monoklonální anti-polyhistidinová protilátka (primární Ig, myši)	Sigma-Aldrich, #H1029-100UL, ředěná v 1% sušeném mléce v TBS-T (ředění 1:2000)
Anti-mouse IgG značená peroxidázou (sekundární Ig, koňská)	Vector Labs, #PI-2000, ředěná v 1% sušeném mléce v TBS-T (ředění 1:2000)
Pufr na ředění protilátek	1% sušené mléko v TBS-T
Vyvíjecí roztok	1 ml Detection Reagent 1 Peroxide Solution (ThermoFisher, #1859701), 1 ml Detection Reagent 2 Luminol Enhancer Solution (ThermoFisher, #1859698)
Large-scale exprese	
Ampicilin	koncentrace 50 mg/μl
LB médium	15,5 g Luria Broth Base, Miller (Duchefa Biochemie, #L1717.1000) v 1 l dH ₂ O
OmniPur IPTG	Calbiochem, #367-93-1
Základní solubilizační pufr	20mM TRIS-HCl, pH 8
Solubilizační pufr 1	20mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, pH 8,5
Solubilizační pufr 2	20mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, pH 8
Solubilizační pufr 3	20mM TRIS-HCl, 150mM NaCl, pH 8
Solubilizační pufr 4	20mM TRIS-HCl, 240mM NaCl, 10mM KCl, 2mM MgCl ₂ , pH 8
Solubilizační pufr 5	PBS (8 g NaCl, 2,9 g Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O, 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 0,2 g KCl, doplněné do 1 l dH ₂ O)
Afinitní chromatografie	
SIGMAFAST tablety se směsí inhibitorů proteáz	Sigma-Aldrich, #SLCJ9272
DNáza I	NE BioLabs, #M0303S
kolona pro afinitní chromatografii HisTrap HP (5 ml)	GE Healthcare, #71-5027-68 AF
Ekvilibrační pufr	20mM TRIS, 300mM NaCl, pH 8,5 (přefiltrovaný, degasovaný)
Eluční pufr	20mM TRIS, 300mM NaCl, pH 8,5, 1M imidazol (přefiltrovaný, degasovaný)
Milli-Q H ₂ O	
Rozměrově-vylučovací chromatografie	
kolona Superdex 75 Increase 10/300 GL	Cytiva, #29148721
Solubilizační pufr 3	20mM TRIS-HCl, 150mM NaCl, pH 8 (přefiltrovaný, degasovaný)
Inhibiční enzymatické eseje	
Pufr	20mM TRIS, 150mM NaCl, 0,01% Triton X-100, pH 7,4
Amicon 0,5 ml	Sigma Aldrich, #UFC500308
Triton X-100	Sigma Aldrich, #T8787

elastáza	Serva, #20927
katepsin G	Sigma Aldrich, #C4428-25U
plasmin	Sigma Aldrich, #SLCJ1058
granzym B	Enzo Life Sciences, #BML-SE238-5000
Substrát elastáza	Sigma Aldrich, #S4760
Substrát katepsin G	Sigma Aldrich, #S7388
Substrát plasmin	Sigma Aldrich, #V0882
Substrát granzym B	Enzo Life Sciences, #BML-P133

Tabulka 2: Seznam komerčních kitů použitých v jednotlivých metodách.

Název kitu	Firma, kat. číslo
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit	Macherey-Nagel, #740609.250
NucleoSpin Plasmid kit	Macherey-Nagel, #740588.250
BCA Protein Assay Kit	Millipore, #71285-3
Amicon Ultra – 15 Centrifugal Filters (Ultracel – 10K)	Millipore, #UFC901024
Amicon Ultra – 2mL Centrifugal Filters (Ultracel – 10K)	Millipore, #UFC201024

V tabulce 3 jsou uvedeny složení gelů pro elektroforézu.

Tabulka 3: Složení gelů pro elektroforézu.

1% agarózový gel		
1x TAE pufr	70 ml	
Agaróza (Life Technologies, 15510-027)	0,7 g	
SYBR Safe DNA gel stain, ThermoFisher, #S33102	7 μ l	
12% polyakrylamidový gel		
Chemikálie	Running gel	Stacking gel
dH ₂ O	3,375 ml	1,6 ml
TRIS-HCl/SDS, pH 8,8 (1,5M TRIS, 0,4% SDS)	1,375 ml	-
TRIS-HCl/SDS, pH 6,8 (0,5M TRIS, 0,4% SDS)	-	0,625 ml
Acryl/Bis 29:1, 40% (VWR, #0311-500ml)	2,25 ml	0,245 ml
Ammonium persulfate, 10% (Sigma-Aldrich, #7727-54-0)	30 μ l	15 μ l
TEMED (VWR, #110-18-9)	6 μ l	3 μ l
Izopropanol	500 μ l	-

3.2. Klonování

3.2.1. Navržení primerů

Na základě sekvence Iripinu-4 jsem navrhla forward a reverse primery. Ve forward primeru se nachází štěpné místo pro restriční enzym NdeI a v reverse primeru se nachází štěpné místo pro restriční enzym BamHI. Sekvence primerů jsou zobrazeny na obrázku 5.

Forward primer

5'-ATT**CATATG**CTCCACGAAGATAGACTGACCCTC-3'

Reverse primer

5'-ATT**GGATC**CTTAAAGATGATTGACCTGTCCCAC-3'

Obr. 5: Sekvence forward a reverse primeru. Zvýrazněna jsou štěpná místa pro restriční enzymy NdeI a BamHI.

Primery jsem naředila vodou bez nukleáz tak, abych získala 10 μ M koncentraci.

3.2.2. Gradientová PCR

Pro zjištění optimální teploty nasedání primerů jsem na ledu připravila reakční směs o celkovém objemu 80 μ l.

Složení reakční směsi:	PCR Master Mix 2x.....	40 μ l
	Forward primer (10 μ M).....	4 μ l
	Reverse primer (10 μ M).....	4 μ l
	Templát	0,5 μ l
	Voda bez nukleáz	31,5 μ l

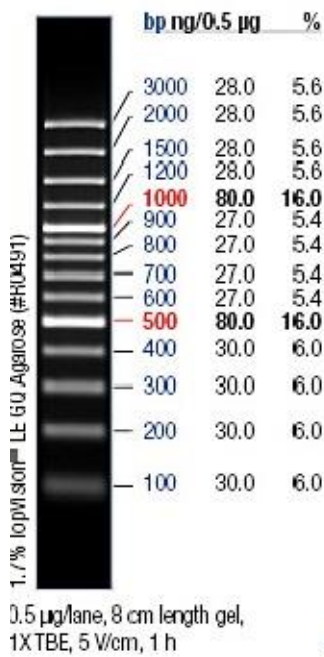
Reakční směs jsem rozdělila do 5 PCR mikrozkušavek po 15 μ l a následně jsem je podrobila PCR při rozdílných teplotách. Testované teploty byly 46,2 $^{\circ}$ C, 50,5 $^{\circ}$ C, 56 $^{\circ}$ C, 58,5 $^{\circ}$ C a 60,3 $^{\circ}$ C.

Program v cycleru byl nastaven následovně:

95 °C 1-3 min
95 °C 30 s
46,2-60,3 °C 30 s
72 °C 75 s
72 °C 5-15 min
4 °C ∞

} 35 x

Připravila jsem 1% agarózový gel a do vzorků po PCR jsem napipetovala 2,5 µl 6x Loading Dye a do první jamky jsem napipetovala 10 µl GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. Do dalších jamek jsem napipetovala 17,5 µl každého vzorku a elektroforézu jsem pustila na 150 V, 100 W, 100 mA a 45 minut. Obrázek 6 zobrazuje použitý DNA marker.



Obr. 6: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder. Převzato z BIOGEN PRAHA s.r.o., 2022.

Po skončení gelové elektroforézy jsem gely vyfotila pod UV filtrem pomocí zařízení UVITEC Alliance 4.7 (Uvitec Cambridge).

3.2.3. High-fidelity PCR

Pro amplifikaci Iripin-4 s primery při optimální teplotě jsem provedla PCR s high-fidelity polymerázou.

Na ledu jsem připravila reakční směs o celkovém objemu 50 μ l.

Složení reakční směsi:	Q5 reakční pufr.....	10 μ l
	dNTPs	1 μ l
	Forward primer	2,5 μ l
	Reverse primer	2,5 μ l
	Templát	1 μ l
	Q5 High-Fidelity DNA Polymeráza	0,5 μ l
	Voda bez nukleáz	32,5 μ l

Reakční směs jsem jemně stočila a spustila PCR v cycleru. Program v cycleru byl nastaven následovně:

98 °C	30 s	
98 °C	10 s	} 35 x
60 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	2 min	
4 °C	∞	

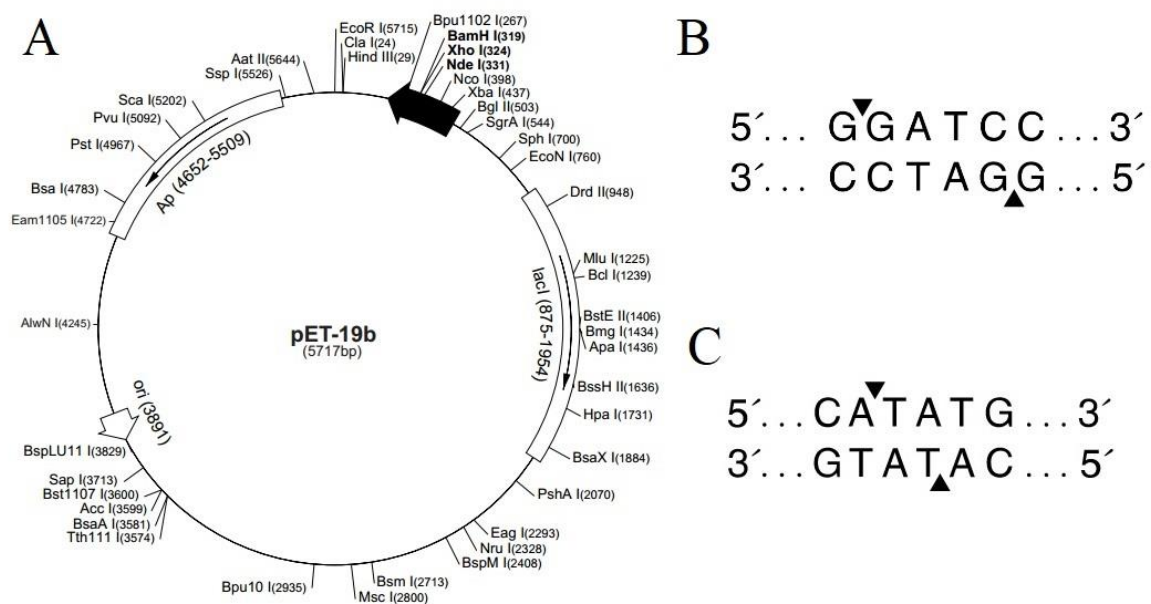
Nachystala jsem si 1% agarózový gel. Do vzorku po proběhlé PCR jsem napipetovala 9 μ l 6x DNA Loading Dye. Do první jamky jsem napipetovala 10 μ l GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (viz Obr. 6). Do dalších dvou jamek jsem napipetovala vzorek po 30 μ l. Elektroforézu jsem pustila na 150 V, 100 W, 100 mA a 45 minut.

Následně jsem gel vyfotila pod UV světlem a pomocí skalpelu jsem z gelu vyřízla oba proužky velikostně odpovídající naamplifikovaným inzertům (1200 bp). Vyřízlé proužky gelu jsem vložila do zkumavky, zvážila jejich hmotnost a přečistila PCR produkt pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up dle návodu. Koncentraci přečištěné DNA jsem změřila na spektrofotometru NanoDrop.

3.2.4. Příprava plazmidu pro klonování

Pro zaklonování Iripinu-4 jsem jako vektor použila plazmid pET-19b. Tento plazmid obsahuje štěpná místa pro restriční enzymy NdeI a BamHI. pET-19b dále nese rezistenci na antibiotikum ampicilin a obsahuje polyhistidinovou sekvenci s 10 histidiny, čehož jsem využila při přečišťování Iripinu-4 pomocí afinitní chromatografie (viz kapitola 3.6. Afinitní chromatografie).

Na obrázku 7A je schematicky znázorněn plazmid pET-19b. Obrázek 7B znázorňuje restriční místo restričního enzymu BamHI a obrázek 7C vyobrazuje restriční místo restričního enzymu NdeI.



Obr. 7: Schematické znázornění plazmidu pET-19b a restričních míst restričních enzymů BamHI (7B) a NdeI (7C). Převzato z Axybio, 2018 a New England Biolabs, 2023.

3.2.5. Restriční štěpení

Plazmid i inzert (Iripin-4) bylo potřeba naštěpit pomocí restričních enzymů NdeI a BamHI, abych je mohla posléze pomocí ligace spojit. Štěpná místa pro tyto restriční enzymy jsou u plazmidu pET-19b přítomna v jeho klonovacím místě. Do inzertu jsem štěpná místa vnesla pomocí Forward (NdeI) a Reverse (BamHI) primeru (viz kapitola 3.2.2. Gradientová PCR). Koncentrace plazmidu byla 232 ng/μl a koncentrace inzertu byla 115 ng/μl.

Připravila jsem si dvě reakční směsi o celkovém objemu 50 μ l, jednu pro štěpení inzertu a druhou pro štěpení plazmidu.

Složení reakčních směsí: DNA takový objem, aby v reakci byl celkem 1 μ g
10x rCutSmart pufr 5 μ l
NdeI 1 μ l
BamHI 1 μ l
Voda bez nukleáz doplnit do 50 μ l

Každou reakci jsem namíchala do 200 μ l mikrozkušavky a roztoky jsem inkubovala 15 min na 37 °C v PCR cycleru. Následně došlo k deaktivaci restrikčních enzymů při teplotě 65 °C na 20 min, opět v PCR cycleru. Mikrozkušavku s insertem jsem vložila na led a do mikrozkušavky s vektorem jsem přidala 2,5 μ l alkalické fosfatázy a inkubovala v PCR cycleru 30 minut při 37 °C a poté 5 minut při 65 °C. Alkalická fosfatáza zabraňuje opětovnému spojení konců plazmidu.

Po restrikčním štěpení jsem vzorky přečistila od restrikčních enzymů pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up dle návodu a vyeluovala do 100 μ l vody bez endonukleáz. Koncentraci vzorků jsem změřila na spektrofotometru NanoDrop.

3.2.6. Ligace

Ihned po restrikčním štěpení jsem naštěpený plazmid a vektor spojila pomocí ligace. Poměr insertu a vektoru při ligaci byl 3:1, dle výrobce 0,060 pmol insertu: 0,020 pmol vektoru. Pro výpočet potřebného množství DNA na základě velikosti a koncentrace jsem použila online kalkulačtor NEBBioCalculator (New England Biolabs, 2021)

Vektor: velikost 5700 bp

koncentrace 39,5 ng/ μ l

potřebné množství 1,8 μ l

Inzert: velikost 1200 bp

koncentrace: 31 ng/ μ l

potřebné množství 1,5 μ l

Celkový objem ligační reakce byl 20 μ l, reakci jsem míchala do 200 μ l mikrozkušavky.

Složení reakční směsi:	T4 DNA ligační pufr	2 μ l
	Naštěpený vektor	1,8 μ l
	Naštěpený inzert	1,5 μ l
	T4 DNA ligáza	1 μ l
	Voda bez nukleáz	13,7 μ l

Směs jsem inkubovala v PCR cycleru přes noc při 16 °C a následně jsem deaktivovala ligázu 10 min při 65 °C. Po skončení ligace jsem ligační směs přenesla na led a provedla transformaci do DH5 α buněk (viz kapitola 3.2.7. Transformace).

3.2.7. Transformace

Nejprve jsem mikrozkuhavku s 25 μ l buněk DH5 α inkubovala na ledu 15 minut. Následně jsem k buňkám napipetovala 2 μ l ligační reakce a jemným kroužením špičkou jsem směs promíchala. Vzorek jsem inkubovala 30 minut na ledu. Následně jsem provedla heat shock vložením mikrozkuhavky do vodní lázně při 42 °C na 30 s. Poté jsem mikrozkuhavku inkubovala na ledu 2 minuty. Ke vzorku jsem přidala 250 μ l SOC média přehřátého na pokojovou teplotu. Buňky jsem nechala třepat v inkubátoru na 220 rpm ve vodorovné poloze 1 hodinu při 37 °C.

Přehřála jsem si dvě Petriho misky s LB agarem a ampicilinem na 37 °C. Po skončení inkubace jsem v laminárním boxu na jednu plotnu vysela 50 μ l vzorku a na druhou plotnu 200 μ l vzorku, abych zkontrolovala funkci antibiotik. Na plotně s vyšetými 50 μ l buněk by mělo vyrůst mnohem méně kolonií. Plotny jsem nechala inkubovat přes noc při 37 °C.

3.2.8. Colony PCR

Na novou Petriho misku s LB agarem a ampicilinem jsem na spodní straně naznačila 24 políček. Připravila jsem si 24 PCR mikrozkuhovek a do každé napipetovala 20 μ l vody bez nukleáz. Střídavě z obou ploten s vyrostlými koloniemi z transformace jsem v laminárním boxu špičkou pipety vypíchl jednu kolonii, přenesla ji do očíslované PCR mikrozkuhavky s 20 μ l vody bez nukleáz, a poté udělala špičkou křížek v políčku se stejným číslem na Petriho misce s LB agarem a ampicilinem. Celkem jsem takto překřížkovala 23 kolonií, 24. vzorek sloužil jako negativní kontrola, překřížkovala jsem místo bez kolonie.

Nachystala jsem si reakční směs pro 24 PCR reakcí o celkovém objemu 216 μ l.

Složení reakční směsi:	2x PCR master mix	120 μ l
	Voda bez nukleáz	81,6 μ l
	T7 forward primer	7,2 μ l
	T7 reverse primer	7,2 μ l

Tuto směs jsem po 9 μ l rozpipetovala do 24 PCR mikrozkušavek označených číslem kolonie. Do každé mikrozkušavky s reakční směsí jsem poté přidala 1 μ l roztoku z mikrozkušavky s koloniemi s odpovídajícím číslem. Mikrozkušavky jsem vložila do cycleru a spustila PCR.

Program v cycleru byl nastaven následovně:

94 °C	6 min	
94 °C	15 s	} 35x
54 °C	15 s (teplota nasedání primerů)	
72 °C	1 min (čas závisí na délce inzertu, 1 min/ 1 kb)	
72 °C	7 min	
16 °C	∞	

Připravila jsem si 1% agarózový gel a po skončení PCR jsem do vzorků přidala 2 μ l 6x DNA Loading Dye. Do první jamky jsem napipetovala 10 μ l GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (viz obr. 6). Elektroforézu jsem spustila na 150 V, 100 W, 100 mA a 45 minut. Po skončení elektroforézy jsem gel vyfotila pod UV filtrem a podle přítomnosti produktu o velikosti 1200 bp jsem určila, které kolonie obsahují zatransformovaný plazmid pET-19b s inzertem Iripin-4.

Každou kolonii se zatransformovaným plazmidem a inzertem jsem pomocí špičky přenesla do 50 ml centrifugační zkumavky (falkonky) s 10 ml LB média a 10 μ l ampicilinu tak, aby konečná koncentrace antibiotika byla 50 μ g/ml. Bakterie jsem nechala třepat na 220 rpm při 37 °C přes noc. Druhý den jsem z buněk plazmid s inzertem vyizolovala pomocí NucleoSpin Plasmid kitu dle návodu. Koncentraci vyizolované DNA jsem změřila na spektrofotometru NanoDrop a plazmid s inzertem jsem zaslala na sekvenaci do firmy SEQme. Sekvenací se ověřilo, že plazmid opravdu obsahuje zaklonovaný inzert Iripin-4.

3.2.9. Transformace do BL21 buněk

Zkumavku s 50 μ l buněk BL21 jsem nechala rozmrazit na ledu. Poté jsem k buňkám přidala 2,5 μ l plazmidu pET-19b s inzertem Iripin-4 a opatrně zamíchala špičkou. Mikrozkumavku jsem inkubovala 30 min na ledu, poté jsem provedla heat shock vložím mikrozkumavky na 10 s do heat bloku nastaveného na 42 °C. Následně jsem mikrozkumavku inkubovala na ledu 5 min. Poté jsem přidala 950 μ l SOC média předeřátého na pokojovou teplotu a mikrozkumavku jsem dala třepat ve vodorovné poloze při 250 rpm, 37 °C na 60 min. Do 50 ml Erlenmeyerovy baňky jsem napipetovala 10 ml LB média a 10 μ l ampicilinu. Po skončení inkubace jsem suspenzi buněk přenesla do Erlenmeyerovy baňky a inkubovala přes noc při 37 °C a třepání 150 rpm.

Z narostlé kultury jsem připravila glycerol stock smícháním 250 μ l suspenze buněk a 750 μ l 87% glycerolu.

3.3. Pilotní exprese a SDS-PAGE

Do 500 ml Erlenmeyerovy baňky jsem v laminárním boxu nalila 60 ml LB media a přidala 60 μ l ampicilinu. K tomu jsem přidala 4 ml kultury buněk BL21 obsahující plazmid pET19-b s inzertem Iripin-4 (viz kapitola 3.2.9. Transformace do BL21 buněk). Pomocí spektrofotometru NanoDrop jsem změřila optickou denzitu roztoku buněk při 600 nm (OD_{600}) a porovnála ji s OD_{600} samotného LB média. Pro další postup bylo potřeba OD_{600} roztoku buněk 0,6 - 0,8. Baňku s buňkami jsem proto inkubovala 50 min při 37 °C a 150 rpm. Poté jsem opět změřila OD_{600} , která byla 0,89.

Do mikrozkumavky jsem odebrala 1 ml buněčné suspenze jako vzorek T0 (vzorek odebraný v čase 0) a stočila jsem ho při 10 000 rpm na 1 min. Supernatant jsem vylila a pelet jsem uskladnila při -20 °C. Do dvou 150 ml Erlenmeyerových baněk jsem po 14 ml rozpipetovala buněčnou suspenzi. Do obou baněk jsem přidala 14 μ l 1M IPTG pro indukci exprese proteinů. Jednu baňku jsem dala třepat na 150 rpm při 37 °C. Druhou baňku jsem dala třepat na 150 rpm při 20 °C. V časech T1, T2, T3, T4, T6, T8 a T24 po přidání IPTG jsem ze všech baněk odebrala do mikrozkumavky 1 ml vzorku. Vzorky jsem ihned po odebrání centrifugovala 1 min na 10 000 rcf, supernatant jsem vylila a pelet jsem uložila do mrazáku na -20 °C.

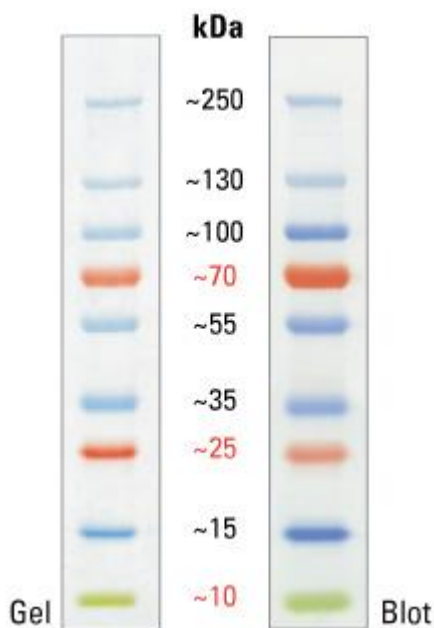
Připravila jsem 12% polyakrylamidové gely. Pelety z pilotní exprese jsem rozsuspendovala v 500 μ l PBS. Poté jsem je rychle zmrazila v tekutém dusíku pro rozbití buněk, zahřála na termobloku na 56 °C a 10 s vortexovala. Tyto 3 kroky jsem zopakovala

celkem 4x. Následně jsem vzorky centrifugovala 10 min na 10 000 rcf, čímž vznikl pelet a supernatant. Dále jsem pracovala zvlášť se supernatantem a peletem.

Do mikroskopické zkumavky jsem odebrala 20 μ l supernatantu a zbytek supernatantů jsem zmrazila na -20 °C. Ke 20 μ l supernatantu jsem přidala 7 μ l Laemmliho pufru a merkaptoethanolu v poměru 9:1 a povařila na termobloku 10 min na 90 °C. Vzorky jsem krátce stočila a po 25 μ l napipetovala na 12% polyakrylamidový gel.

Pelety obsahující hlavně inkluzní tělíska s proteiny jsem rozsuspendovala v 250 μ l PBS a povařila na termobloku 10 min na 90 °C. Vzorky jsem krátce stočila a z každého vzorku odebrala do mikroskopické zkumavky 20 μ l, zbytek jsem opět zamrazila na -20 °C. K 20 μ l peletů jsem přidala 7 μ l směsi Laemmliho pufru a merkaptoethanolu v poměru 9:1. Vzorky jsem opět povařila v termobloku 10 min na 90 °C a krátce stočila. Po 25 μ l jsem vzorky napipetovala na 12% polyakrylamidový gel.

Spustila jsem SDS-PAGE s nastavením 250 V, 160 mA, 60 W a 45 min. Jako marker jsem použila PageRuler Plus Prestained Protein Ladder vyobrazený na obrázku 8.

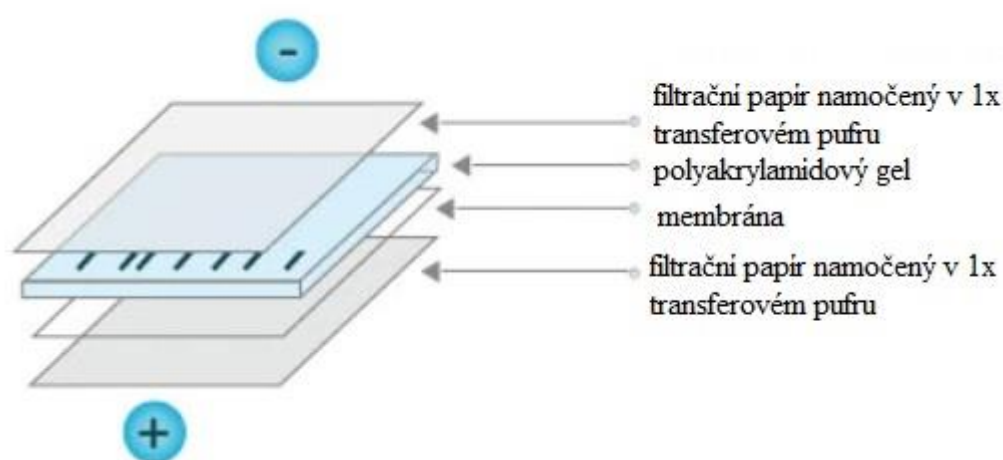


Obr. 8: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. Převzato z BIOGEN PRAHA s.r.o., 2022.

Po skončení SDS-PAGE jsem gely obarvila 20 min v Coomassie Brilliant Blue a odbarvila 15 min v odbarvovacím roztoku za stálého míchání. Poté jsem gely 3x promyla v destilované vodě a nechala za mírného míchání v destilované vodě přes noc.

3.4. Western blot

Vzorky supernatantu z obou teplot (20 °C a 37 °C) získané při pilotní expresi (viz kapitola 3.3. Pilotní exprese a SDS-PAGE) jsem rozseparovala na 12% polyakrylamidovém gelu. Po skončení SDS-PAGE jsem vzorky přeblotovala z gelu na blotovací PVDF membránu. Schéma přeblotování gelu z SDS-PAGE na membránu je vyobrazeno na obrázku 9.



Obr. 9: Sestavení aparatury pro Western blot. Převzato z Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates, 2021.

3 filtrační papíry jsem namočila v 1x transferovém pufru a položila jsem je na blotovací desku. Membránu jsem 1 min aktivovala v methanolu, poté jsem ji namočila do 1x transferového pufru a položila na filtrační papíry na blotovací desce. Válečkem omytým v 1x transferovém pufru jsem opatrně vytlačila vzduchové bubliny zpod membrány. Na membránu jsem položila polyakrylamidový gel se vzorky a něj dala další 3 filtrační papíry namočené v 1x transferovém pufru. Opět jsem válečkem vytlačila bubliny a aparaturu uzavřela. Protein z gelu jsem nechala přenést na membránu s nastavením aparatury na 126 mA, 300 V, 60 W, 60 min.

Po přeblotování jsem membránu 2x promyla v TBS-T pufru na 5 min. Po promytí jsem zablokovala nespecifická vazebná místa na membráně pomocí 5% mléka po dobu 1 h. Poté jsem membránu 2x promyla v TBS-T pufru na 5 min. K membráně jsem přidala 5 ml naředěné primární protilátky a nechala inkubovat 2 h při pokojové teplotě. Po skončení inkubace

s primární protilátkou jsem membránu promyla 3x na 5 min v TBS-T pufru. K membráně jsem přidala 5 ml naředěné sekundární protilátky a inkubovala 1 h při pokojové teplotě. Následně jsem membránu 3x promyla na 5 min v TBS-T pufru a na membránu jsem nanasla vyvíjecí roztok.

3.5. Large-scale exprese

Z glycerol stocku, který byl připraven v kapitole 3.2.9. Transformace do BL21 buněk, jsem buňky BL21 s plazmidem pET-19b a inzertem Iripin-4 vložila do 150 ml LB média se 150 μ l ampicilinu. Kulturu jsem nechala inkubovat přes noc při 37 °C za třepání 150 rpm.

Druhý den jsem do 2,5 l Erlenmeyerovy baňky nalila 1900 ml LB média, 1,9 ml ampicilinu a 100 ml buněčné kultury z předchozího dne. Změřila jsem optickou denzitu roztoku (OD_{600}) a baňku jsem nechala třepat na 150 rpm při 37 °C (teplota určená z pilotní exprese jako nejvýtečnější). Pro další postup bylo opět potřeba dosáhnout OD_{600} 0,6 - 0,8. Po 105 min inkubace dosáhla hodnota OD_{600} požadovaného rozmezí a byla zahájena exprese proteinu pomocí 1M IPTG. Baňku jsem nechala třepat při 37 °C 8 h (tento čas byl při pilotní expresi stanoven jako nejvýtečnější). Po skončení inkubace jsem odebrala 1 ml kultury, stočila na 10 000 rcf na 1 min, supernatant jsem vylila a pelet jsem uložila na -20 °C.

Kulturu jsem centrifugovala na 4200 rpm po dobu 30 min při teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant jsem vylila a pelet jsem rozsuspendovala ve 20 ml 20 mM TRIS, pH 8. Rozsuspendovaný pelet jsem stočila na 4200 rpm po dobu 20 minut při 4 °C. Vzniklý supernatant jsem odstranila a pelet (T8) jsem zamrazila na -80 °C.

Dále bylo potřeba zjistit, jaký pufr je nejvhodnější pro uskladnění peletu. Testovala jsem 5 různých solubilizačních pufrů (uvedené v Tabulce 1). Pelet T8 z large-scale exprese jsem rozpustila v 1 ml 20mM TRIS, pH 8. Roztok jsem po 200 μ l rozdělila do 5 zkumavek, které jsem stočila 1 min na 10 000 rcf. Supernatant jsem pipetou odebrala a k peletům jsem přidala 100 μ l jednotlivých testovaných pufrů, pelety jsem rozsuspendovala. Následně jsem roztoky zmrazila v tekutém dusíku, ohřála v termobloku na 56 °C a zvortexovala. Tyto tři kroky jsem opakovala celkem 4x. Poté jsem zkumavky stočila 10 min na 14 000 rcf. Ze vzorků jsem odebrala 25 μ l supernatantu pro změření koncentrace proteinu pomocí BCA Protein Assay kitu, Zbytek supernatantu a pelet, který jsem nejprve rozsuspendovala v 50 μ l daného roztoku, povařila 10 min na 90 °C a stočila, jsem pustila na SDS-PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu. Gely jsem poté obarvila 20 min v Coomassie Brilliant Blue a odbarvila 15 min v odbarvovacím roztoku za stálého míchání. Poté jsem gely 3x promyla v destilované vodě a

nechala za mírného míchání v destilované vodě přes noc. Solubilizační roztok, který jsem zvolila jako nejvhodnější pro rozsuspendování peletu, jsem dále využila při afinitní chromatografii.

3.6. Afinitní chromatografie

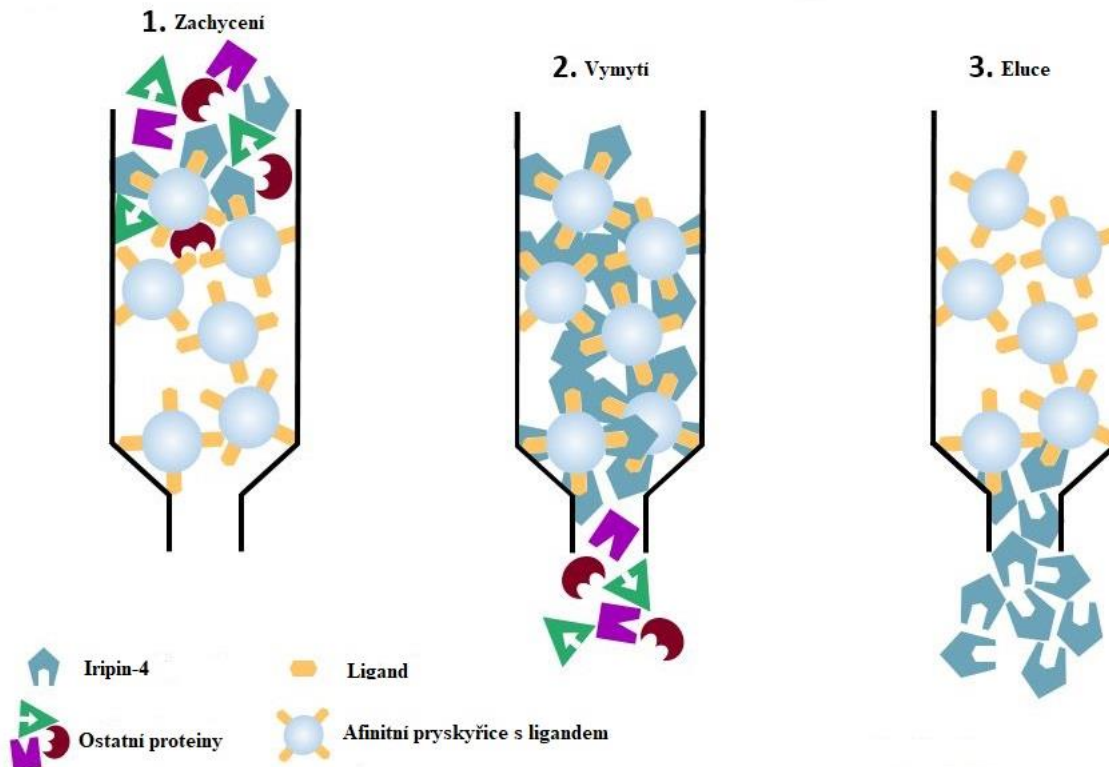
Pelet vzniklý při Large-scale expresi (viz kapitola 3.5. Large-scale exprese) jsem rozsuspendovala v solubilizačním roztoku 3, dále jako eluční pufr (EP). Polovinu peletu jsem rozsuspendovala v 5 ml EP s inhibitory proteáz (ve formě tablet rozpuštěny ve 100 ml degasovaného roztoku) a druhou polovinu v 5 ml EP bez inhibitorů proteáz, vzorky jsem zvortexovala.

Součástí inhibitorů proteáz přidaných k polovině peletu je i aprotinin, který však může inhibovat účinky trypsinu. Jelikož jsem původně při enzymatických esejích chtěla otestovat také vliv Iripin-4 na trypsin, polovinu vzorku jsem nechala bez inhibitorů proteáz.

Přidala jsem k oběma vzorkům DNázu I tak, abych dosáhla celkového ředění 1:1000. Vzorky jsem promíchala a 20 min inkubovala na ledu. Následně jsem buňky rozbila pomocí French pressu a stočila 1 h na 40 000 rcf při 4 °C.

5 ml kolonu v chromatografu jsem promyla 5 min degasovanou Mili-Q vodou rychlostí 5 ml/min. Následně jsem kolonu promyla 5 min ekvilibračním pufrem rychlostí 3 ml/min a 5 min elučním pufrem rychlostí 5 ml/min. Tím jsem kolonu připravila pro nanesení vzorků.

Ze vzorků po centrifugaci jsem slila supernatant do 50 ml falkony. Zbylý pelet z obou vzorků jsem rozsuspendovala v solubilizačním roztoku, stočila 10 min na 4000 rcf při 4 °C a uskladnila na -80 °C. Supernatant z falkony (s inhibitory proteáz i bez) jsem nanesla na kolonu. Po nanesení vzorků na kolonu jsem promyla přístroj 5% EP (tzv. soft wash). Tím byly odmyty proteiny, které se na koloně pomocí his-tagu nezachytily. Dále jsem za průtoku elučního pufru chromatografem sbírala jednotlivé proteinové frakce o objemu cca 2 ml. Rychlost toku EP byla 1 ml/min. Schematický průběh afinitní chromatografie je zachycen na obrázku 10.



Obr. 10: Průběh afinitní chromatografie. Převzato z Caframo Limited, 2022. V levé části obrázku je zachycena kolona naplněna směsí proteinů, Iripin-4 se pomocí his-tagu zachytil na afinitní pryskyřici. Uprostřed se nachází kolona, z níž byly nezachycené proteiny vymyty 5% elučním pufrem. V pravé části je vyobrazena kolona, z níž je elučním pufrem uvolňován protein Iripin-4.

Frakce získané afinitní chromatografií jsem rozdělila na 12% polyakrylamidovém gelu pomocí SDS-PAGE. Tím jsem zjistila, v jakých frakcích se nachází Iripin-4. Pro ověření přítomnosti proteinu jsem provedla také Western blot s anti-polyhistidinovou protilátkou. Frakce obsahující Iripin-4 jsem slila dohromady a pomocí amikonů dle návodu zakoncentrovala do 1 ml. Koncentraci proteinu jsem změřila pomocí BCA Protein Assay kitu.

3.7. Rozměrově vylučovací chromatografie

Pomocí rozměrově vylučovací chromatografie jsem vyčistila frakce získané afinitní chromatografií od proteinů jiných velikostí. Zakoncentrované vzorky (s inhibitory proteáz a bez inhibitorů proteáz) jsem stočila 5 min na 10 000 rcf. Vzorky byly vloženy do chromatografu a opět jsem získala jednotlivé eluční frakce, každou o objemu 0,5 ml. Eluční pufř jsem použila stejný, jako při afinitní chromatografii. Získané frakce jsem poté rozseparovala na 12%

polyakrylamidovém gelu pomocí SDS-PAGE pro zjištění přítomnosti Iripin-4. Frakce obsahující daný protein jsem slila dohromady a pomocí BCA Protein Assay kitu jsem změřila koncentraci proteinu. Vzorky jsem následně zmrazila v tekutém dusíku a uskladnila při -80 °C.

3.8. Inhibiční enzymatické eseje

Inhibičními enzymatickými esejemi jsem ověřila funkčnost rekombinantního proteinu Iripin-4, tedy jeho schopnost inhibovat proteázy. Testované proteázy byly elastáza, katepsin G, plasmin, a granzym B. Každá reakce byla provedena v triplikátech.

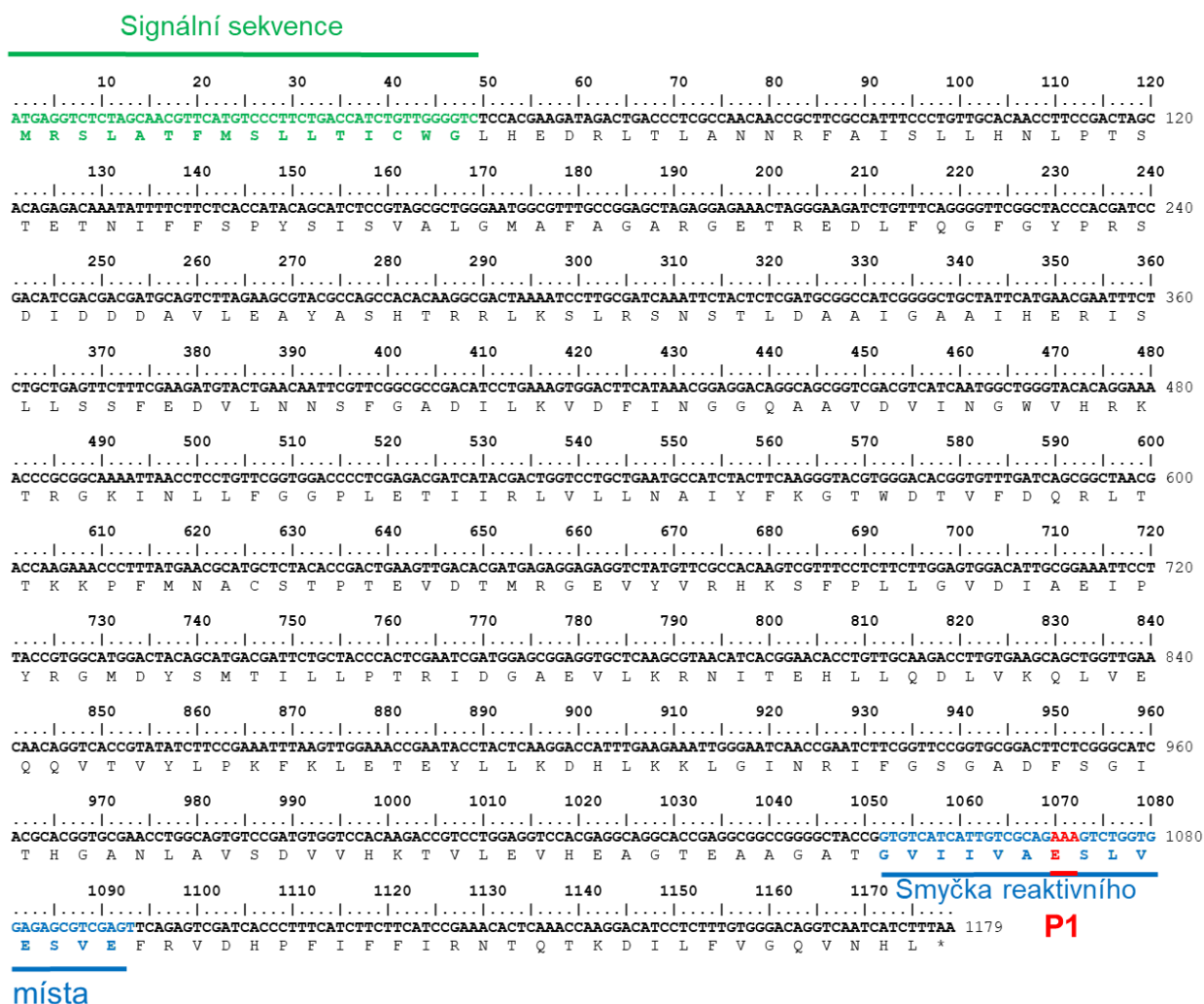
Připravila jsem pufr (složení viz. Tabulka 1) a 600 μ l proteinu Iripin-4, o koncentraci 549 μ g/ml, získaného při rozměrově vylučovací chromatografii (viz kapitola 3.7. Rozměrově vylučovací chromatografie), jsem rozaliquetovala po 200 μ l. Na amiconu o objemu 0,5 ml jsem protein převedla do připraveného pufru.

Pro každý testovaný enzym jsem připravila reakci o celkovém objemu 100 μ l tak, aby byl substrát 200 μ M, proteáza 20nM a Iripin-4 500nM. Před přidáním odpovídajícího substrátu jsem směs enzymu s Iripinem-4 inkubovala 10 min při pokojové teplotě.

Rychlost hydrolýzy substrátu jsem změřila pomocí absorbance spektrofotometrem při 410 nm a měření probíhalo po dobu 30 minut.

4. Výsledky

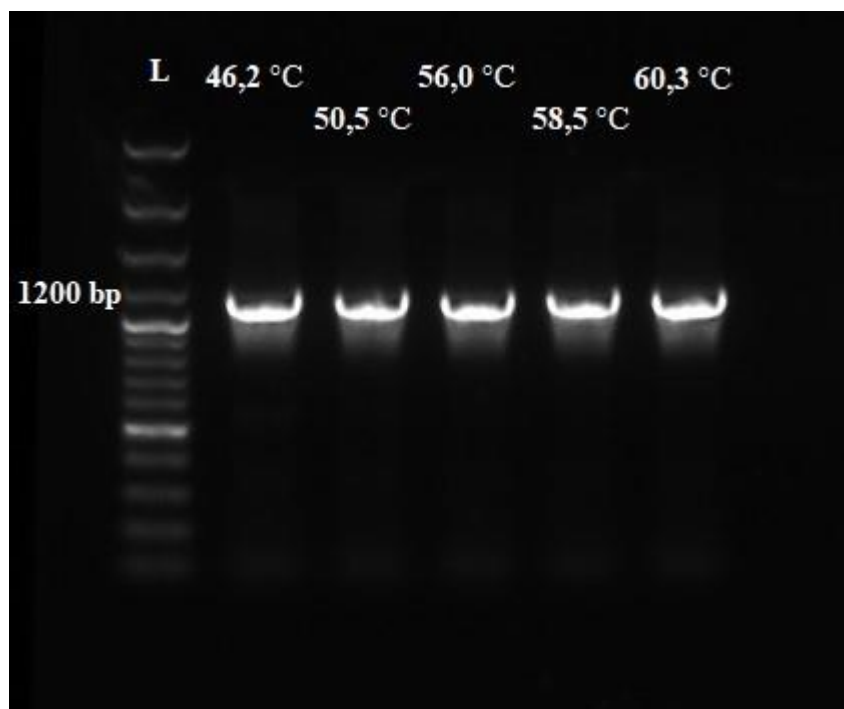
Iripin-4 je protein skládající se ze 400 aminokyselin, v jehož P1 místě se nachází aminokyselina glutamát. Molekulární hmotnost tohoto proteinu je 44 833,21 g/mol a jeho pI je 6,1 (ProtParam). Sekvence Iripinu-4 je vyobrazena na obrázku 11.



Obr. 11: Sekvence Iripinu-4. Převzato z Kašćáková *et al.*, 2023. Iripin-4 je složený ze 400 aminokyselin, aminokyselina v místě P1 (glutamát) je označena červeně. Modře je označena sekvence RCL. Zeleně je označena signální sekvence, která predikuje sekretovaný protein.

4.1. Příprava plazmidu pET-19b se zaklonovaným proteinem Iripin-4

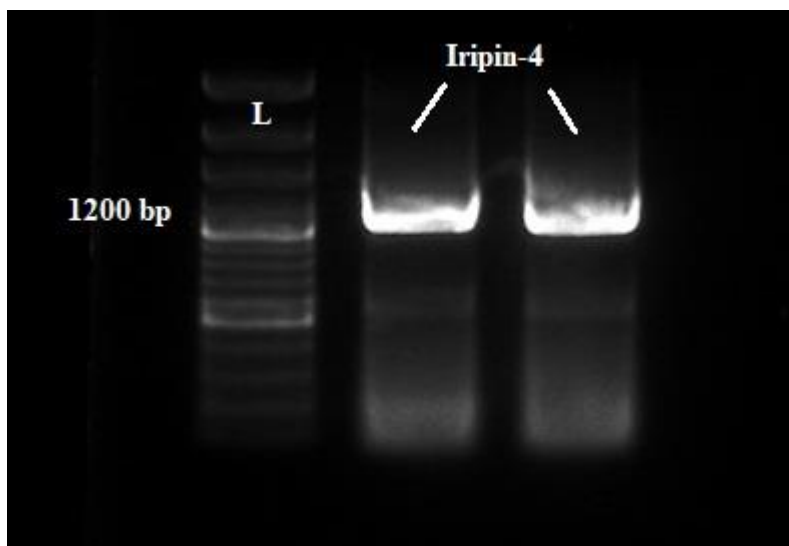
Výsledek gradientové PCR je vyobrazen na obrázku 12.



Obr. 12: Agarózový gel s produkty gradientové PCR. Písmenem L je označen velikostní žebříček (ladder). Dále je 5 produktů o velikosti přibližně 1200 bp amplifikovaných při teplotách 46,2 °C, 50,5 °C, 56,0 °C, 58,5 °C a 60,3 °C.

Intenzita proužků byla u všech testovaných teplot přibližně stejná a pro High-fidelity PCR jsem zvolila teplotu 60,3 °C (zaokrouhleno na 60 °C).

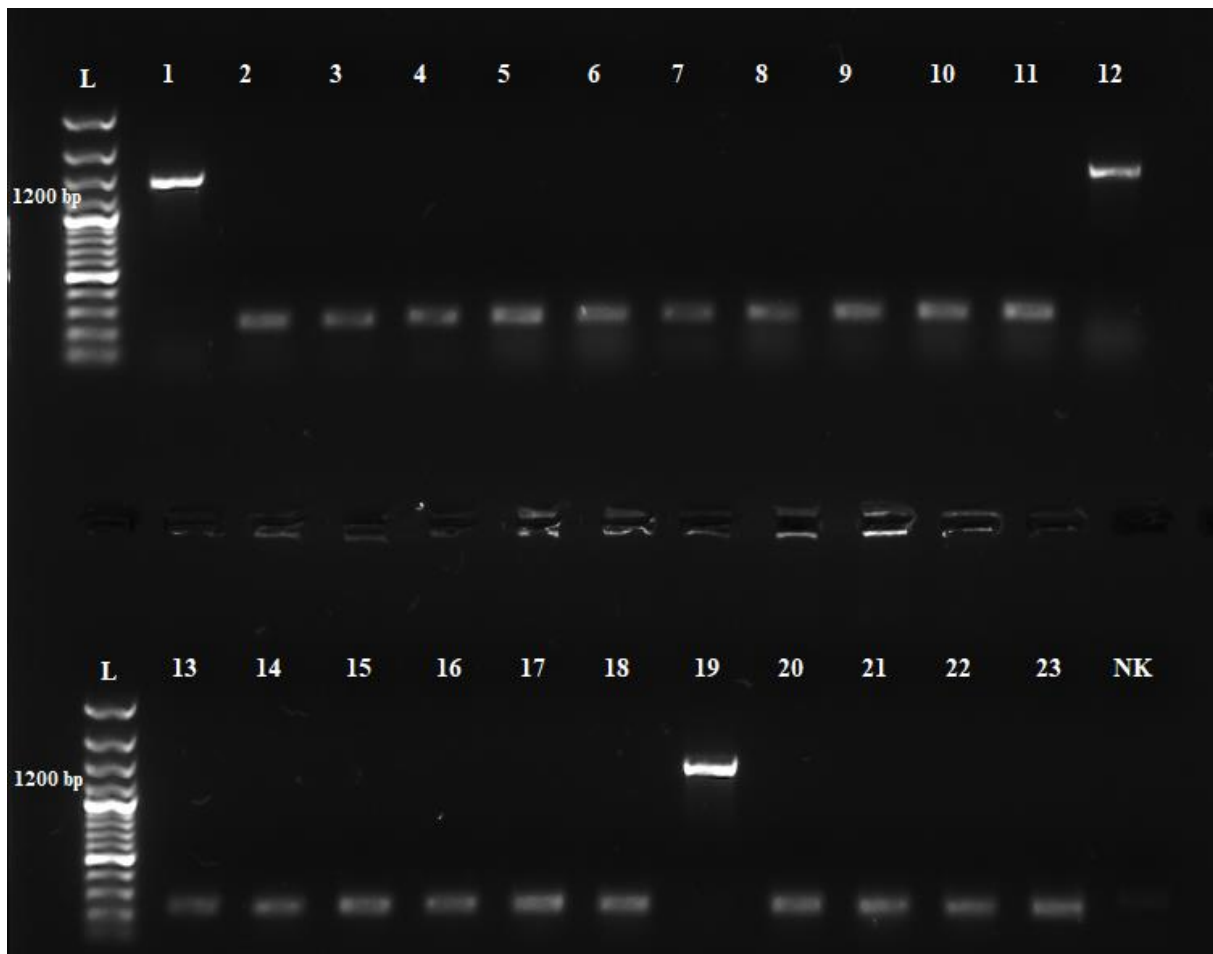
Výsledek High-fidelity PCR je zobrazen na obrázku 13.



Obr. 13: Agarózový gel s produkty High-fidelity PCR. Písmenem L je označen velikostní žebříček (ladder), dále dva proužky naamplifikovaného genu pro Iripin-4 o velikosti cca 1200 bp.

Koncentrace DNA Iripin-4 po vyizolování z agarózového gelu byla 115 ng/ μ l. Koncentrace plazmidové DNA byla 232 ng/ μ l. Po restričním štěpení byla koncentrace inzertu Iripin-4 31,0 ng/ μ l a koncentrace plazmidu pET-19b 39,5 ng/ μ l.

Plazmid jsem následně transformovala do kompetentních buněk DH5 α a buňky vysela na Petriho misku s ampicilinem. Vybrala jsem 23 vyrostlých kolonií, které jsem přenesla na novou Petriho misku a provedla jsem ověření přítomnosti plazmidu s inzertem pomocí PCR (colony PCR). Výsledek colony PCR je zobrazen na obrázku 14.



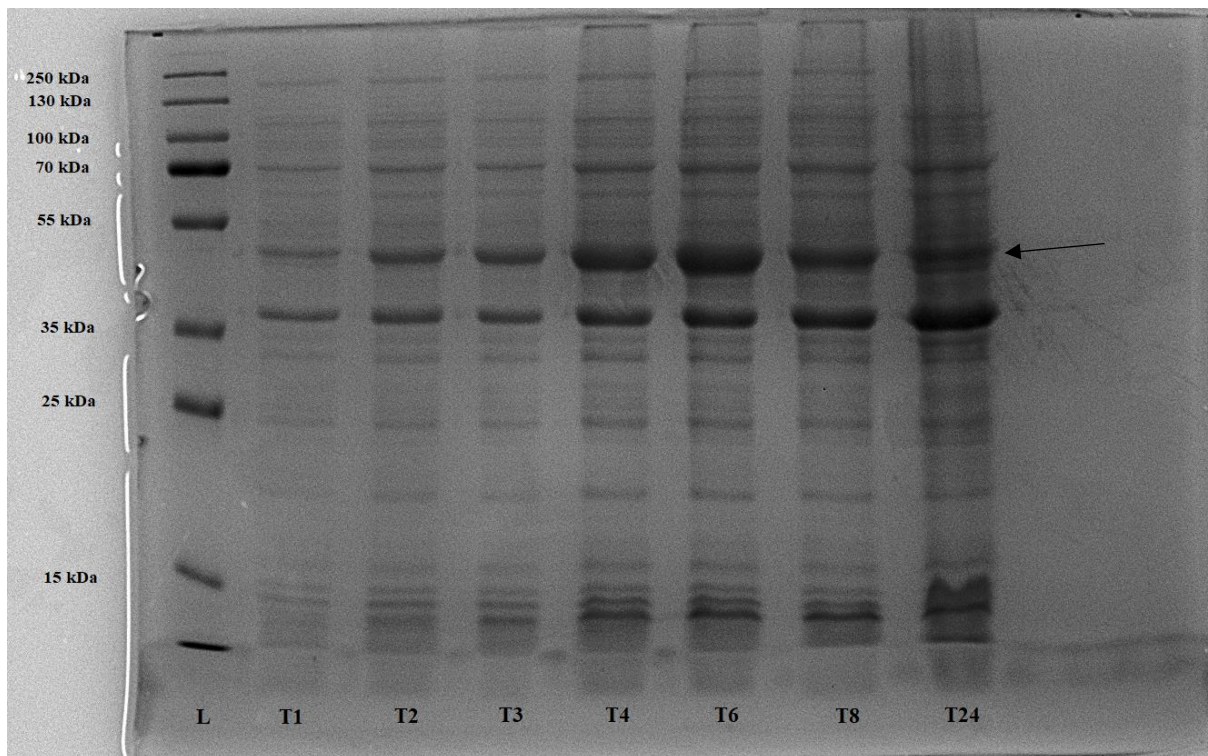
Obr. 14: Agrózový gel s produkty colony PCR. Písmenem L je označen velikostní žebříček (ladder), jednotlivá čísla odpovídají číslu kolonie buněk a v poslední jamce je zobrazena negativní kontrola (NK). Očekávaný produkt o velikosti cca 1200 bp se nachází v koloniích s číslem 1, 12 a 19.

Bakterie z kolonií č. 1, 12 a 19 jsem namnožila v LB médiu a pomocí komerčního kitu jsem vyizolovala plazmid se zaklonovaným inzertem. Koncentrace vyizolované DNA z kolonie č. 1 byla 107,8 ng/μl, z kolonie č. 12 81,7 ng/μl a z kolonie č. 19 93,4 ng/μl.

Pro kontrolu správnosti zaklonované sekvence jsem plazmid s inzertem ze všech 3 kolonií poslala na sekvenaci. Ta potvrdila přítomnost sekvence kódující Iripin-4 ve všech 3 vzorcích.

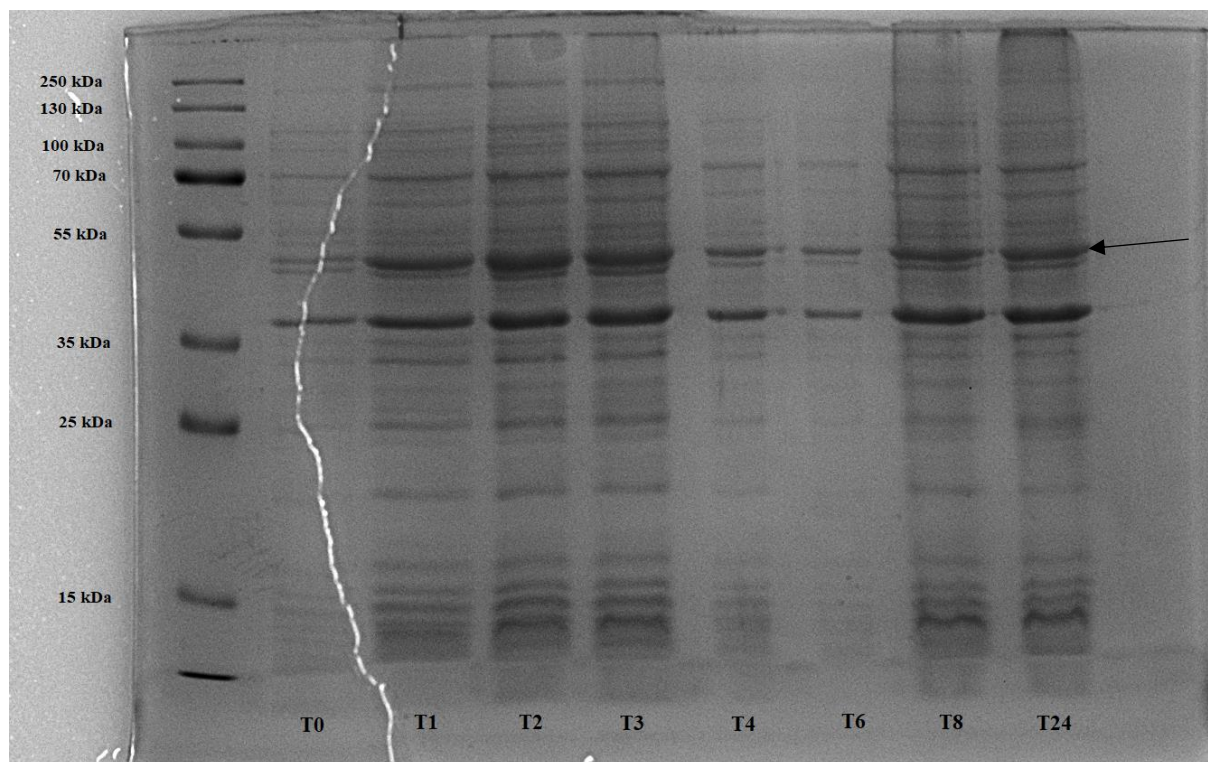
4.2. Pilotní exprese

Na obrázcích 15 a 16 jsou vyobrazeny gely z SDS-PAGE se vzorky peletů inkubovaných během pilotní exprese při teplotách 20 °C a 37 °C.



Obr. 15: Vzorky peletu z pilotní exprese inkubované při 20 °C. Písmenem L je označen velikostní žebříček (ladder), dále následují vzorky v čase 1 hod, 2 hod, 3 hod, 4 hod, 6 hod, 8 hod a 24 hod od přidání IPTG.

Řádek proužků označený šipkou vykazuje postupný nárůst proteinové exprese s postupující dobou kultivace buněk.

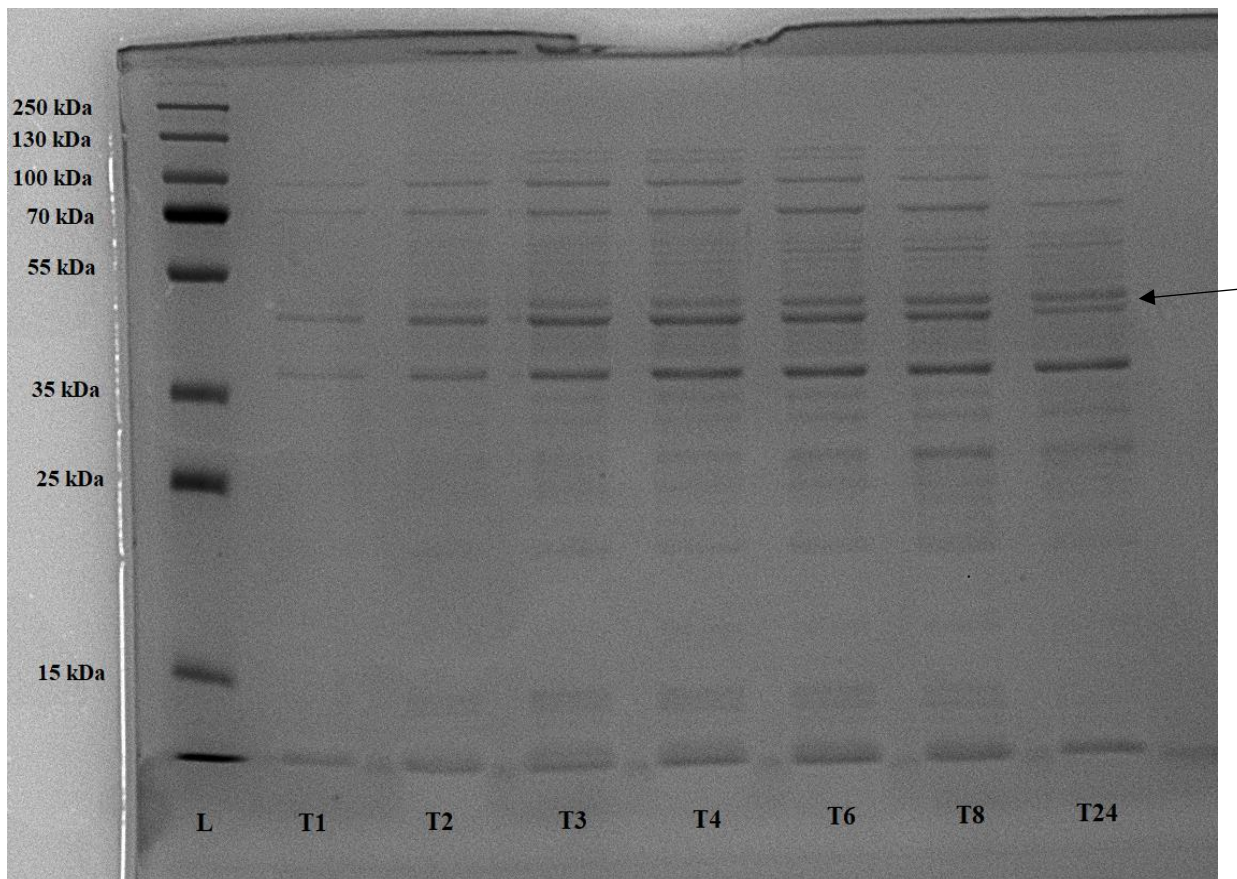


Obr. 16: Vzorky peletu z pilotní exprese inkubované při 37 °C. Písmenem L je označen žebříček (ladder), dále jsou vzorky v čase 0 hod, 1 hod, 2 hod, 3 hod, 4 hod, 6 hod, 8 hod a 24 hod od přidání IPTG.

Řádek proužků označený šipkou opět vykazuje postupný nárůst proteinové exprese s postupující dobou kultivace buněk. Vzorky T4 a T6 se mi částečně vylily, proto je proužek slabší.

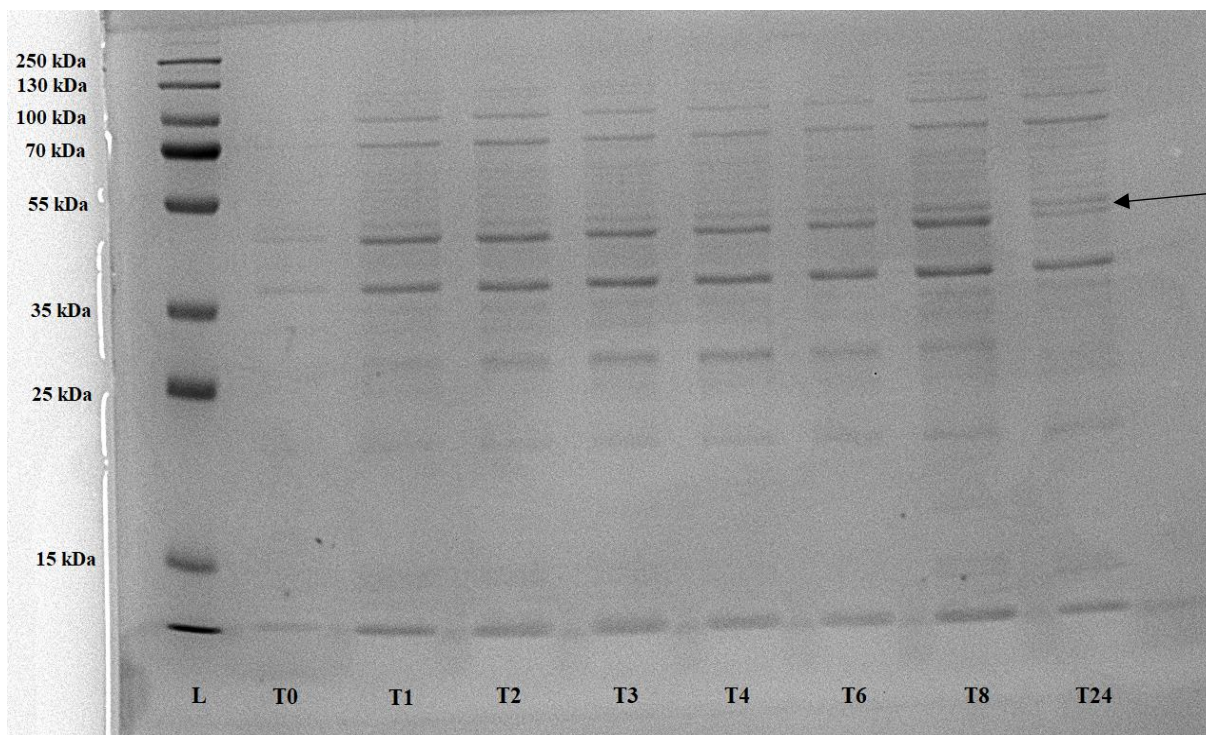
Výsledky inkubace vzorků při 20 °C i 37 °C si vzájemně odpovídají, ačkoli u inkubace při 20 °C je patrný mohutnější nárůst proteinové exprese. Velikost Iripin-4 spolu s histidinovou kotvou je přibližně 44,8 kDa.

Gely z SDS-PAGE se vzorky supernatantu inkubované během pilotní exprese při teplotách 20 °C a 37 °C jsou vyobrazeny na obrázcích 17 a 18.



Obr. 17: Vzorky supernatantu z pilotní exprese inkubované při 20 °C. Písmenem L je označen velikostní žebříček (ladder), dále jsou vzorky v čase 1 hod, 2 hod, 3 hod, 4 hod, 6 hod, 8 hod a 24 hod od přidání IPTG.

Řádek proužků označený šipkou zobrazuje mírný postupný nárůst proteinové exprese s postupující dobou kultivace buněk.



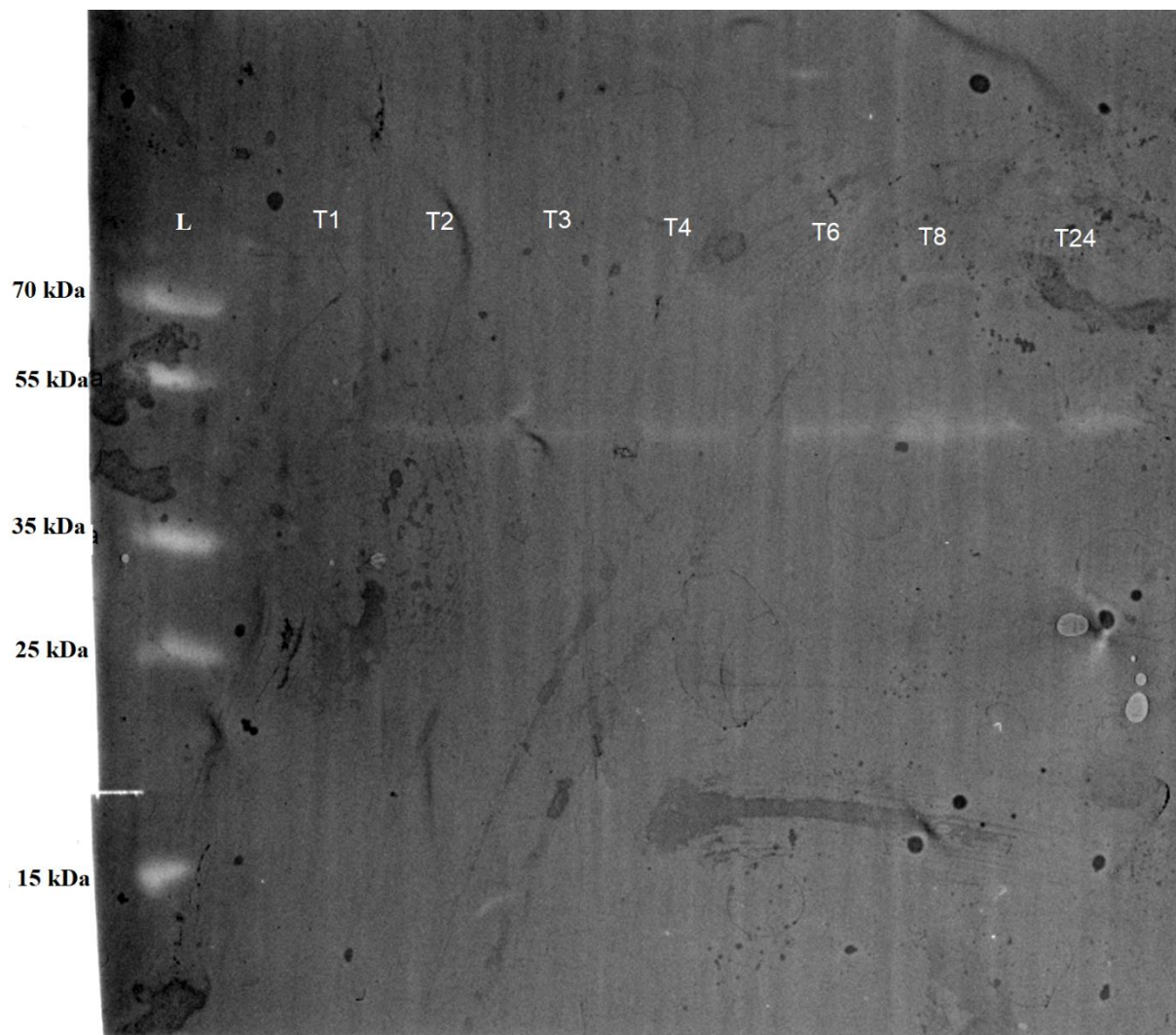
Obr. 18: Vzorky supernatantu z pilotní exprese inkubované při 37 °C. Písmenem L je označen velikostní žebříček (ladder), dále jsou vzorky v čase 0 hod, 1 hod, 2 hod, 3 hod, 4 hod, 6 hod, 8 hod a 24 hod od přidání IPTG.

Řádek proužků označený šipkou opět zobrazuje mírný postupný nárůst proteinové exprese s postupující dobou kultivace buněk.

Oproti obrázkům 15 a 16 je proteinová exprese u vzorků supernatantu inkubovaného při 20 °C i 37 °C mnohem nižší. Proteinový produkt o dané velikosti je přítomen, avšak v mnohem menším množství. Z toho vyplývá, že Iripin-4 se především shromažďuje v inkluzních tělískách uvnitř kompetentních buněk *E. coli* a jeho množství kontinuálně narůstá s dobou kultivace buněk.

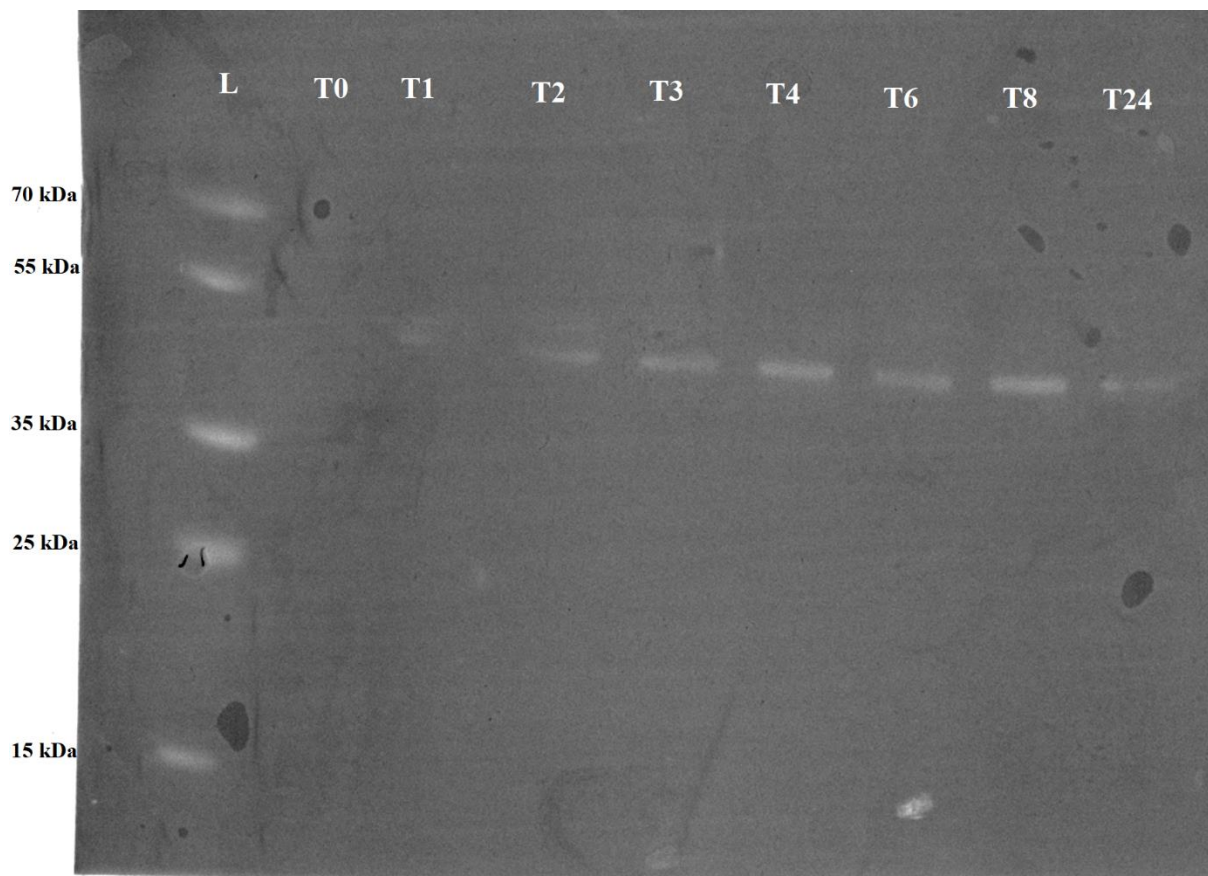
Pro další postup bylo výhodnější pracovat se supernatantem, protože není nutné získaný protein refoldovat, na rozdíl od proteinu získaného z inkluzních tělísek.

Dále jsem pomocí Western blotu ověřila, zda je protein získaný ze supernatantu z pilotní exprese opravdu Iripin-4 s navázanou polyhistidinovou značkou, jehož očekávaná velikost je 44,8 kDa. Na obrázcích 19 a 20 je vyobrazeno ověření přítomnosti Iripin-4 v supernatantu z inkubace při 20 °C i 37 °C pomocí Western blotu s anti-polyhistidinovou protilátkou.



Obr. 19: Western blot vzorků supernatantu inkubovaných při 20 °C. Písmenem L je označen velikostní žebříček (ladder), následují vzorky supernatantu odebrané v časech 1 hod, 2 hod, 3 hod, 4 hod, 6 hod, 8 hod a 24 hod po indukci exprese proteinu přidáním IPTG.

V místě očekávané molekulární velikosti proteinu jsou zřetelné proužky, čímž se prokázalo, že protein v supernatantu inkubovaném při 20 °C je opravdu Iripin-4. V čase T1 byla exprese proteinu nulová, v časech T2, T3 a T4 byla exprese velmi nízká. V čase T6 se produkce proteinu navýšila a nejvýznamnější byla v čase T8. V čase T24 exprese proteinu opět klesla.



Obr. 20: Western blot vzorků supernatantu inkubovaných při 37 °C. Písmenem L je označen velikostní žebříček (ladder), následují vzorky supernatantu odebrané v časech 0 hod, 1 hod, 2 hod, 3 hod, 4 hod, 6 hod, 8 hod a 24 hod po indukci exprese proteinu přidáním IPTG.

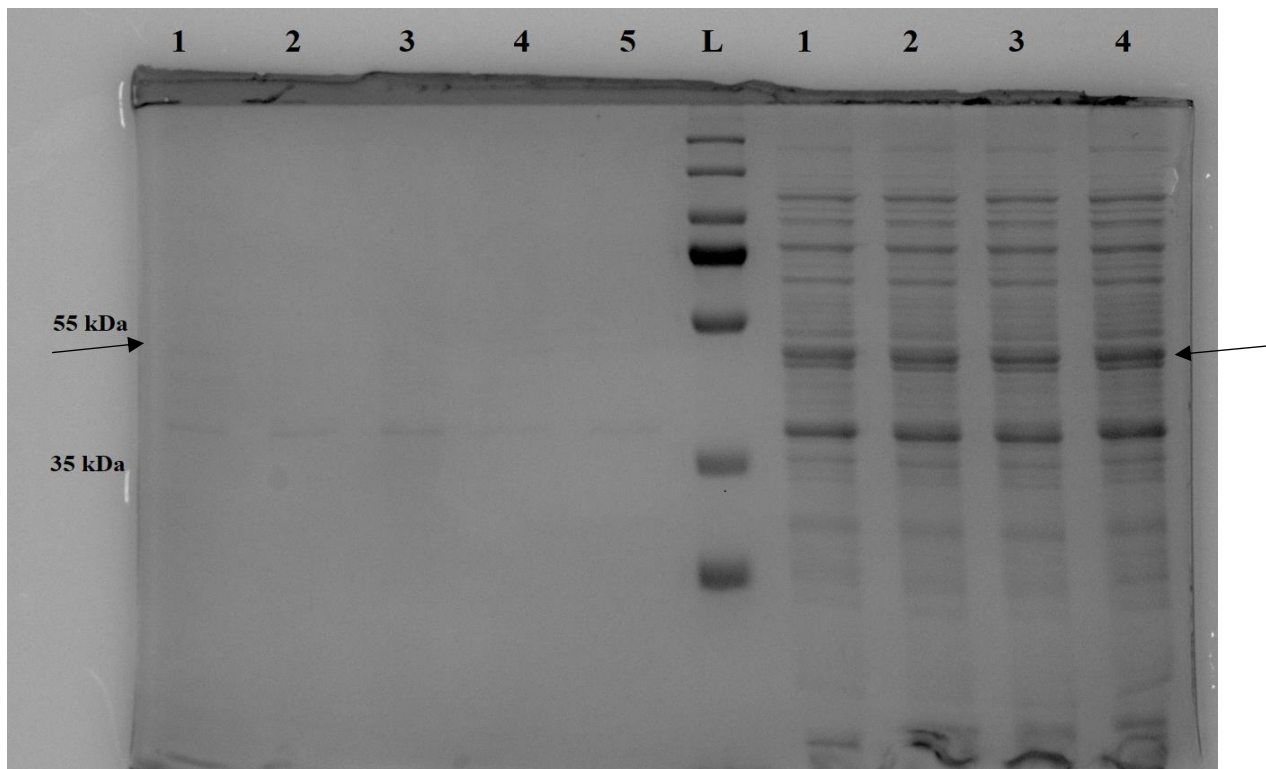
Opět jsou v příslušné molekulární velikosti (cca 44,8 kDa) patrné proužky, protein v supernatantu inkubovaném při 37 °C je tedy také Iripin-4. V čase T0 byla exprese proteinu nulová, poté s přibývajícím časem inkubace exprese sílila. Největší exprese proteinu je patrná v čase T8, v čase T24 míra exprese opět poklesla.

Oproti vzorkům supernatantu inkubovaných při 20 °C (Obr. 19) jsou proužky na obrázku 20 výraznější, exprese proteinu je tedy při 37 °C vyšší než při 20 °C. U obou teplot je exprese nejvyšší 8 hodin po přidání IPTG.

4.3. Large-scale exprese

Pro získání většího množství proteinu Iripin-4 ze supernatantu jsem provedla large-scale expresi, tedy intenzivní pomnožení buněk BL21 s plazmidem pET-19b se zaklonovaným Iripinem-4. Jako nejvhodnější teplotu inkubace jsem dle pilotní exprese (viz kapitola 4.2. Pilotní exprese) zvolila 37 °C a čas odběru po spuštění exprese IPTG 8 hod.

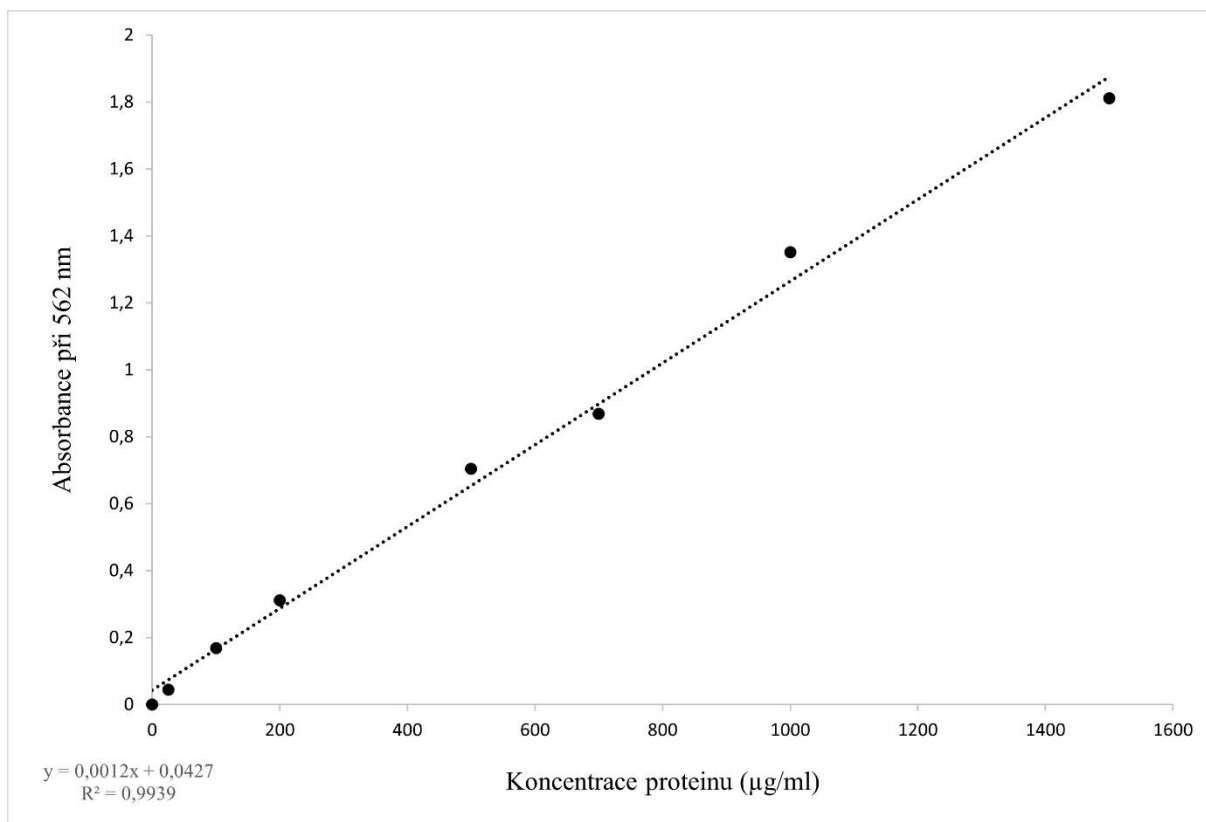
Následně bylo potřeba zjistit, jaký pufr je nejvhodnější pro uskladnění peletu získaného z large-scale exprese. Testovala jsem 5 různých solubilizačních pufrů (uvedené v Tabulce 1). Výsledek SDS-PAGE pro zjištění nejvhodnějšího solubilizačního pufru je vyobrazen na obrázku 21.



Obr. 21: SDS-PAGE vzorků supernatantu z large-scale exprese rozpuštěných v 5 různých solubilizačních pufrech. V prvních pěti jamkách se nachází vzorky supernatantu rozpuštěné v roztocích: solubilizační pufr 1- 20mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, pH 8,5, solubilizační pufr 2- 20mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, pH 8, solubilizační pufr 3- 20mM TRIS-HCl, 150mM NaCl, pH 8, solubilizační pufr 4- 20mM TRIS-HCl, 240mM NaCl, 10mM KCl, 2mM MgCl₂, pH 8, solubilizační pufr 5- PBS. Písmenem L je označen velikostní žebříček (ladder). V posledních 4 jamkách se nachází vzorky peletu rozpuštěné ve stejných roztocích, jako vzorky supernatantu (kromě solubilizačního pufru 5). Proužky označující Iripin-4 jsou zvýrazněny šipkami.

Z obrázku 21 je opět patrný rozdíl v množství proteinu v cytoplazmě a v inkluzních těliscích. Na vzorcích není patrný žádný rozdíl v souvislosti s použitým solubilizačním pufrem.

U vzorků supernatantu rozpuštěného v jednotlivých solubilizačních pufrech jsem pomocí BCA Protein Assay kitu změřila koncentraci proteinu. Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci proteinu ve vzorcích je zobrazena na obrázku 22.



Obr. 22: Kalibrační křivka BCA Protein Assay kit, závislost absorbance při 562 nm na koncentraci proteinu ve vzorku.

Z rovnice grafu jsem vypočítala rovnici pro výpočet koncentrace proteinu ve vzorcích (1),

$$(1) x = \frac{y - 0,0427}{0,0012}$$

kde x je výsledná koncentrace proteinu (µg/ml) a y je hodnota absorbance po odečtení kontrolního vzorku.

V tabulce 4 jsou zaneseny naměřené hodnoty absorbance a vypočítané koncentrace proteinu Iripin-4 rozpuštěného v jednotlivých solubilizačních pufrech.

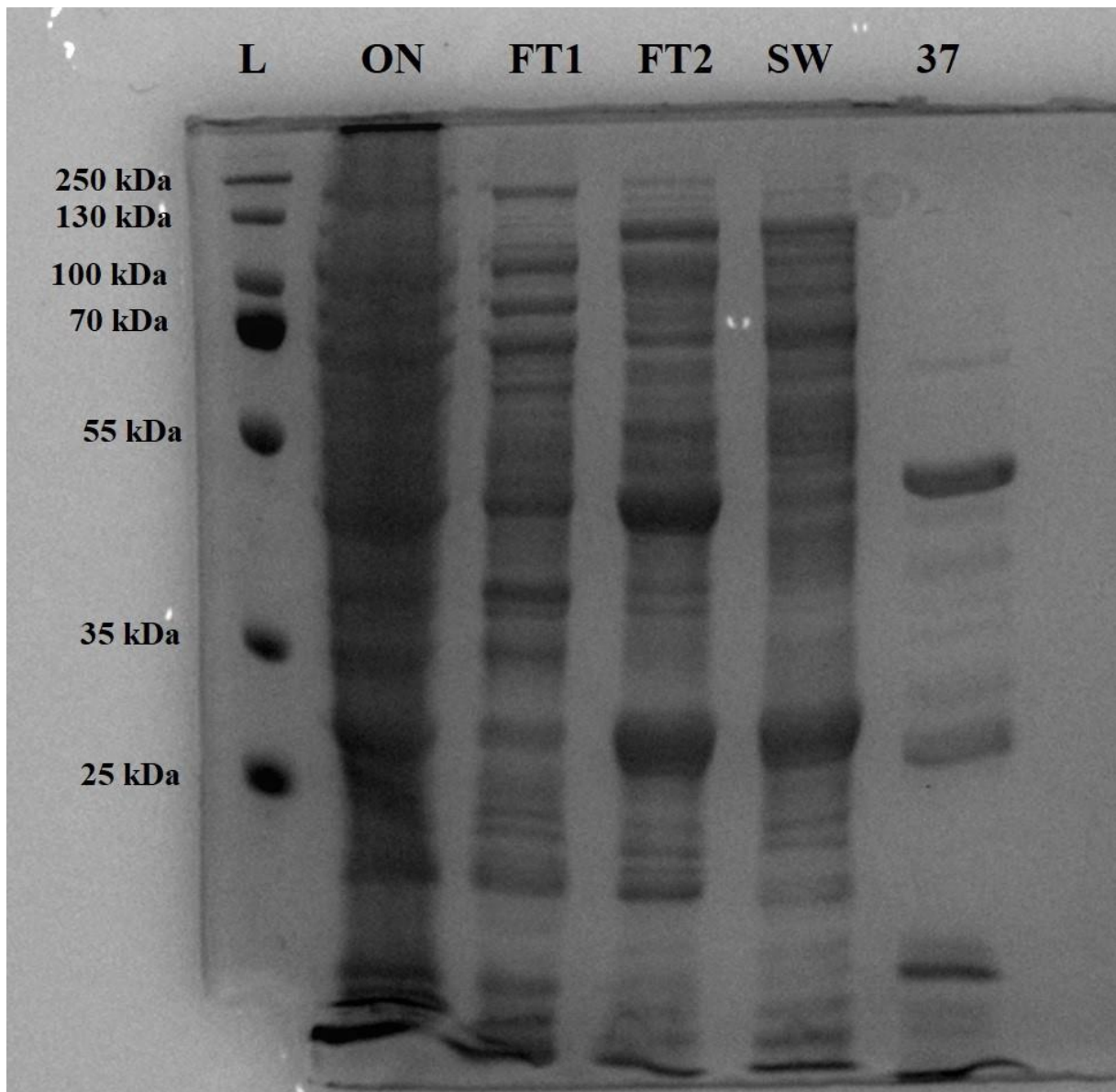
Tabulka 4: Absorbance vzorků proteinu v jednotlivých solubilizačních pufrch při 562 nm a výsledná koncentrace proteinu.

vzorek	A (562 nm)	odečtený kontrolní vzorek	c proteinu (µg/ml)
solubilizační pufr 1	0,438	0,106	52,750
solubilizační pufr 2	0,462	0,130	72,750
solubilizační pufr 3	0,463	0,131	73,583
solubilizační pufr 4	0,446	0,114	59,417
solubilizační pufr 5	0,457	0,125	68,583

Tabulka 4 ukazuje, že koncentrace proteinu byla v jednotlivých solubilizačních pufrch rozdílná. Na základě těchto výsledků jsem stanovila, že pro další práci budu používat solubilizační pufr 3, tedy 20mM TRIS-HCl, 150mM NaCl, pH 8.

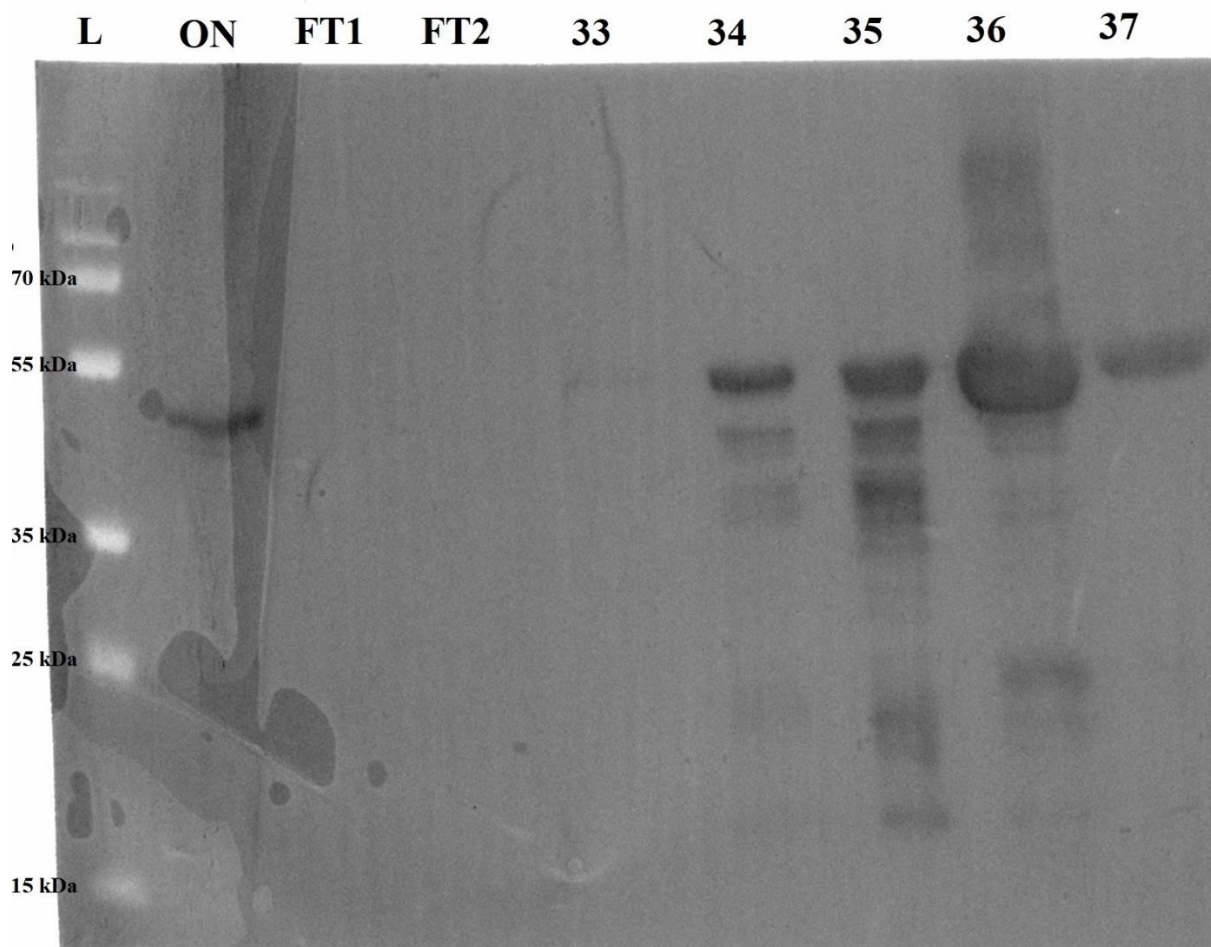
4.4. Afinitní chromatografie

Na obrázcích 23 a 24 jsou vyobrazeny výsledky SDS-PAGE a Western blot jednotlivých frakcí s inhibitory proteáz z afinitní chromatografie.



Obr. 23: SDS-PAGE vzorků z afinitní chromatografie s inhibitory proteáz. V první jamce se nachází velikostní žebříček (ladder), následuje vzorek nanášený na kolonu chromatografu (ON), dále dvě jamky s flow-through (FT1 a FT2), poté 5% promytí EP (SW) a číselně označená frakce.

Z obrázku 23 je patrné, že ve vzorku naneseném na kolonu chromatografu (ON) se nachází směs proteinů včetně Iripin-4. V jamce se SW je znatelný jen slabý proužek o velikosti Iripin-4, protein se tedy z velké části zachytil na afinitní koloně a nedošlo k jeho vymytí. V jamce s frakcí (37) je v očekávání velikosti proteinu viditelný proužek. Frakce 33-36 nebyly rozděleny na 12% polyakrylamidovém gelu pomocí SDS-PAGE, ale na 15% polyakrylamidovém gelu pro vyloučení přítomnosti aprotininu, tento gel jsem však nevyfotila.



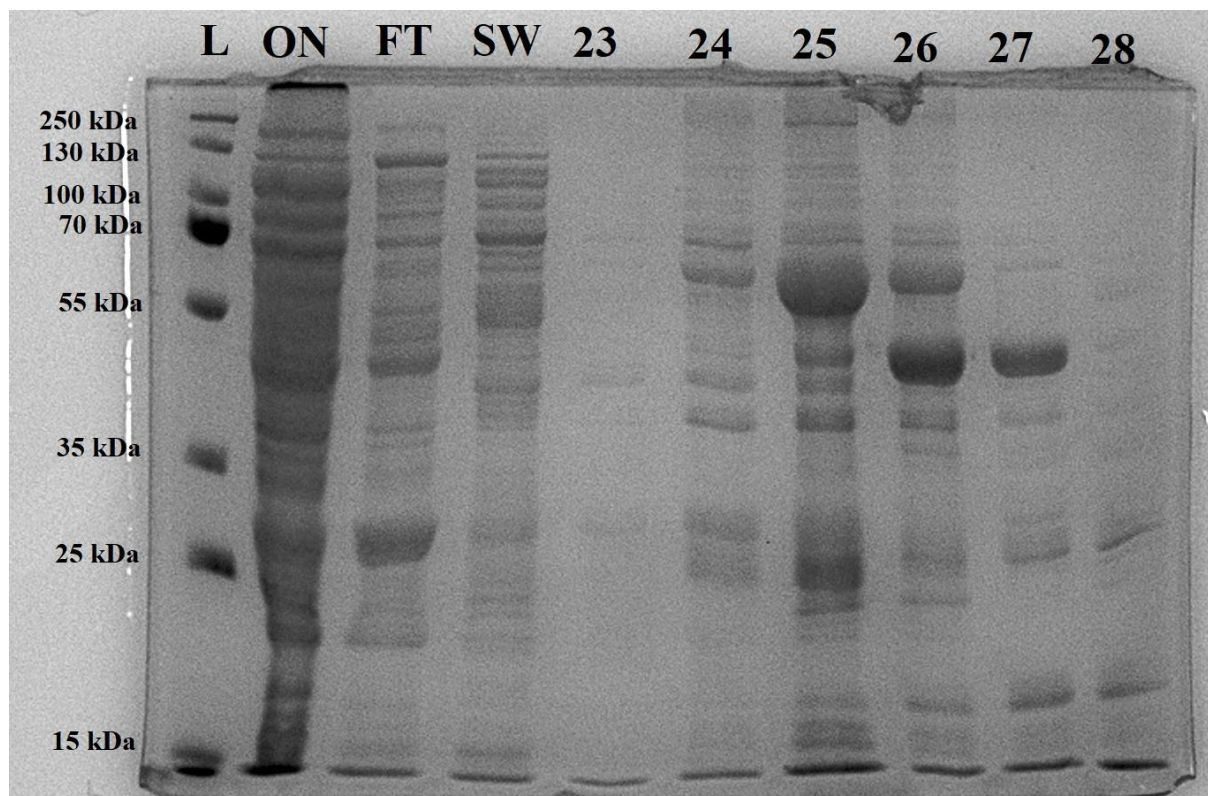
Obr. 24: Western blot frakcí s inhibitory proteáz z afinitní chromatografie. V první jamce se nachází velikostní žebříček (ladder), následuje vzorek nanášený na kolonu (ON), následují dvě jamky obsahující flow-through (FT1, FT2) a dále číselně označené frakce (33-37).

Z obrázku 24 vyplývá, že ve vzorku nanášeném na kolonu (ON) se anti-polyhistidinová protilátka navázala, což značí přítomnost Iripinnu-4. Ve vzorcích FT1 a FT2 nedošlo k navázání protilátky, nedošlo tedy k vymytí a ztrátě Iripinnu-4. Ve frakci 33 je slabě viditelný proužek označující Iripin-4. Ve frakci 34 je tento proužek nejsilnější, ve frakcích 35, 36 a 37 tento proužek postupně slábne. U frakcí 34-36 došlo k navázání anti-polyhistidinové protilátky i na proteiny o menší velikosti.

Pro další postup jsem vybrala frakce 34, 36 a 37, spojila jsem je dohromady, zakoncentrovala do 1 ml a změřila koncentraci proteinu pomocí BCA Protein Assay kitu. Dále

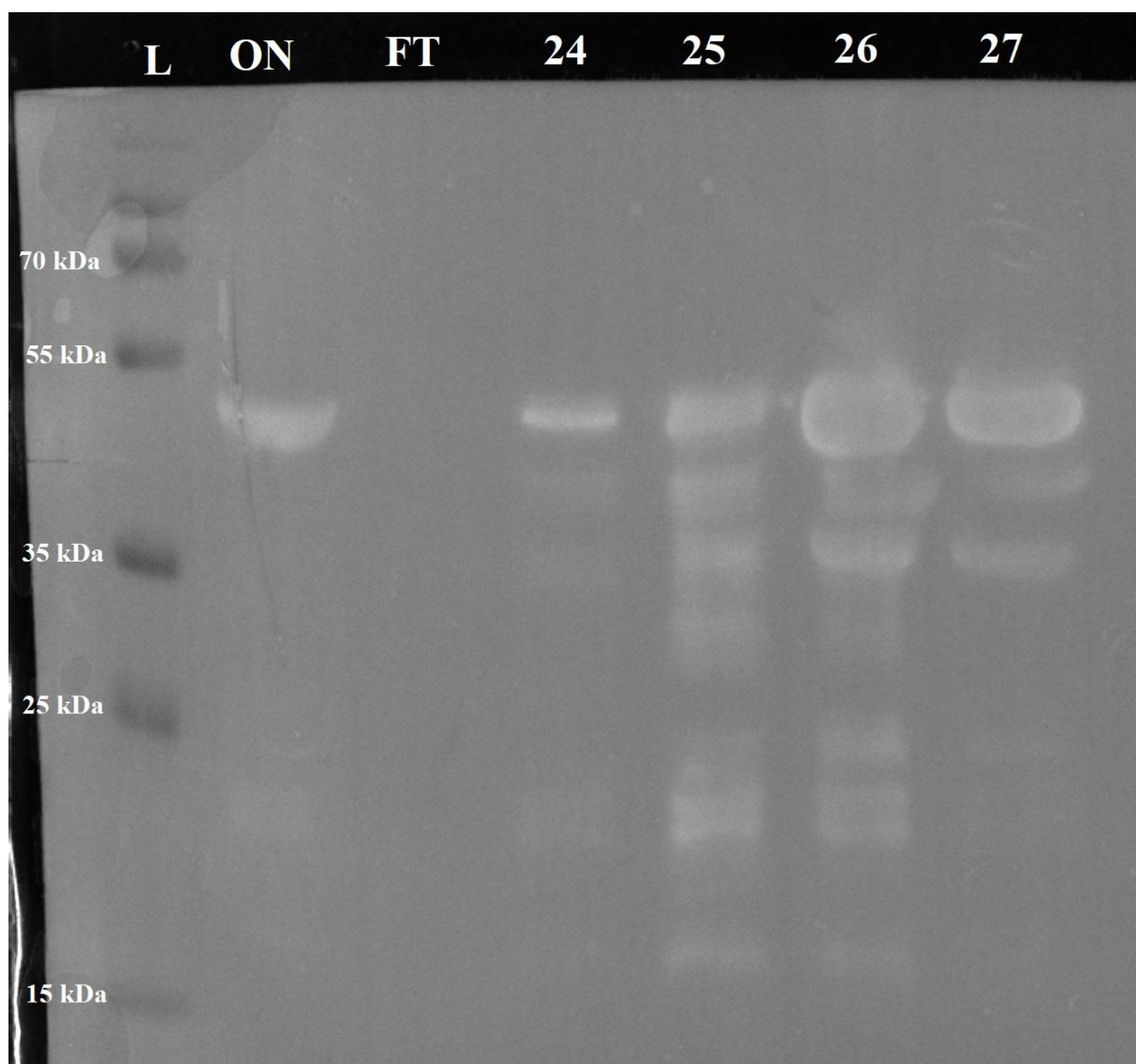
jsem vzorek přečistila pomocí rozměrově vylučovací chromatografie (viz kapitola 4.5. Rozměrově vylučovací chromatografie).

Na obrázcích 25 a 26 jsou vyobrazeny výsledky SDS-PAGE a Western blot jednotlivých frakcí bez inhibitorů proteáz z afinitní chromatografie.



Obr. 25: SDS-PAGE vzorků z afinitní chromatografie bez inhibitorů proteáz. V první jamce se nachází velikostní žebříček (ladder), následuje vzorek nanášený na kolonu chromatografu (ON), dále vzorek flow-through (FT), poté 5% promytí EP (SW) a číselně označené frakce (23-28).

Ve vzorku ON lze opět vidět směs proteinů o různých velikostech. Ve vzorku SW není proužek patrný, došlo tedy k navázání proteinu na afinitní kolonu. Ve frakci 23 lze vidět velice slabý proužek v očekávané velikosti Iripin-4. U frakcí 24 a 25 je tento proužek výraznější, nejsilnější je ve frakcích 26 a 27. Naopak ve frakci 28 je proužek opět velice slabý.

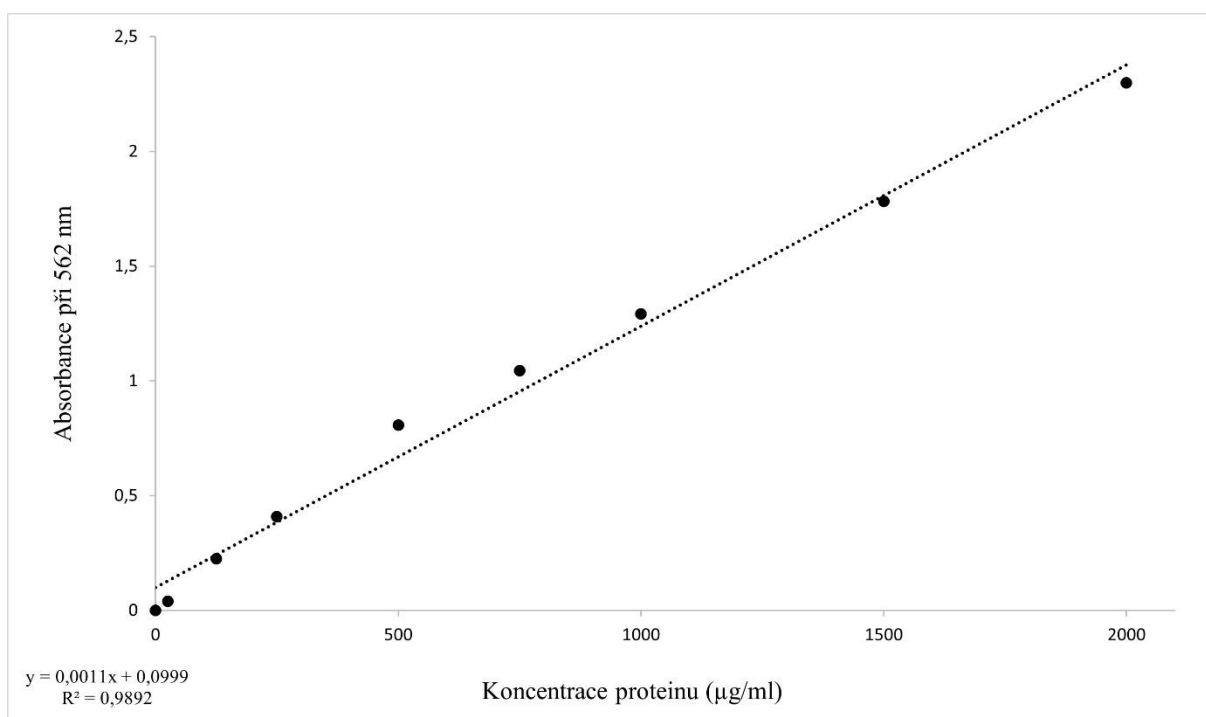


Obr. 26: Western blot frakcí bez inhibitorů proteáz z afinitní chromatografie. V první jamce se nachází velikostní žebříček (ladder), následuje vzorek nanášený na kolonu (ON), dále jamka obsahující flow-through (FT) a následují číselně označené frakce (24-27).

Z obrázku lze vyčíst, že ve vzorku nanášeném na kolonu (ON) se anti-polyhistidinová protilátka navázala, což opět značí přítomnost Iripin-4. Ve vzorku FT nedošlo k navázání protilátky. Ve frakci 24 je viditelný proužek označující Iripin-4, tento proužek je ve frakci 25 výraznější a největší je ve frakcích 26 a 27, což koreluje s výsledky z SDS-PAGE (Obr. 24), kde lze spatřit nejsilnější proužek také u frakcí 26 a 27. U všech 4 frakcí došlo k navázání anti-polyhistidinové protilátky i na proteiny o menší velikosti. Frakce 23 a 28 jsem nepodrobila metodě Western blot, neboť se v těchto frakcích dle výsledků z SDS-PAGE (Obr. 25) nacházelo jen minimální množství proteinu.

Pro další postup jsem vybrala frakce 24 a 27, protože dle metody Western blot (viz Obr. 26) tyto frakce obsahovaly nejmenší množství proteinů o menší velikosti. Spojila jsem je dohromady, zakoncentrovala do 1 ml a změřila koncentraci proteinu pomocí BCA Protein Assay kitu.

Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci proteinu ve vzorcích je zobrazena na obrázku 27.



Obr. 27: Kalibrační křivka BCA Protein Assay kit, závislost absorbance při 562 nm na koncentraci proteinu ve vzorku s inhibitory proteáz a bez inhibitorů proteáz po afinitní chromatografii.

Z rovnice grafu jsem vypočítala rovnici pro výpočet koncentrace proteinu ve vzorcích (2),

$$(2) x = \frac{y - 0,0999}{0,0011}$$

kde x je výsledná koncentrace proteinu (µg/ml) a y je hodnota absorbance po odečtení kontrolního vzorku.

V tabulce 5 jsou zaneseny naměřené hodnoty absorbance a vypočítané koncentrace proteinu Iripin-4 ve vzorku s inhibitory proteáz a bez inhibitorů proteáz.

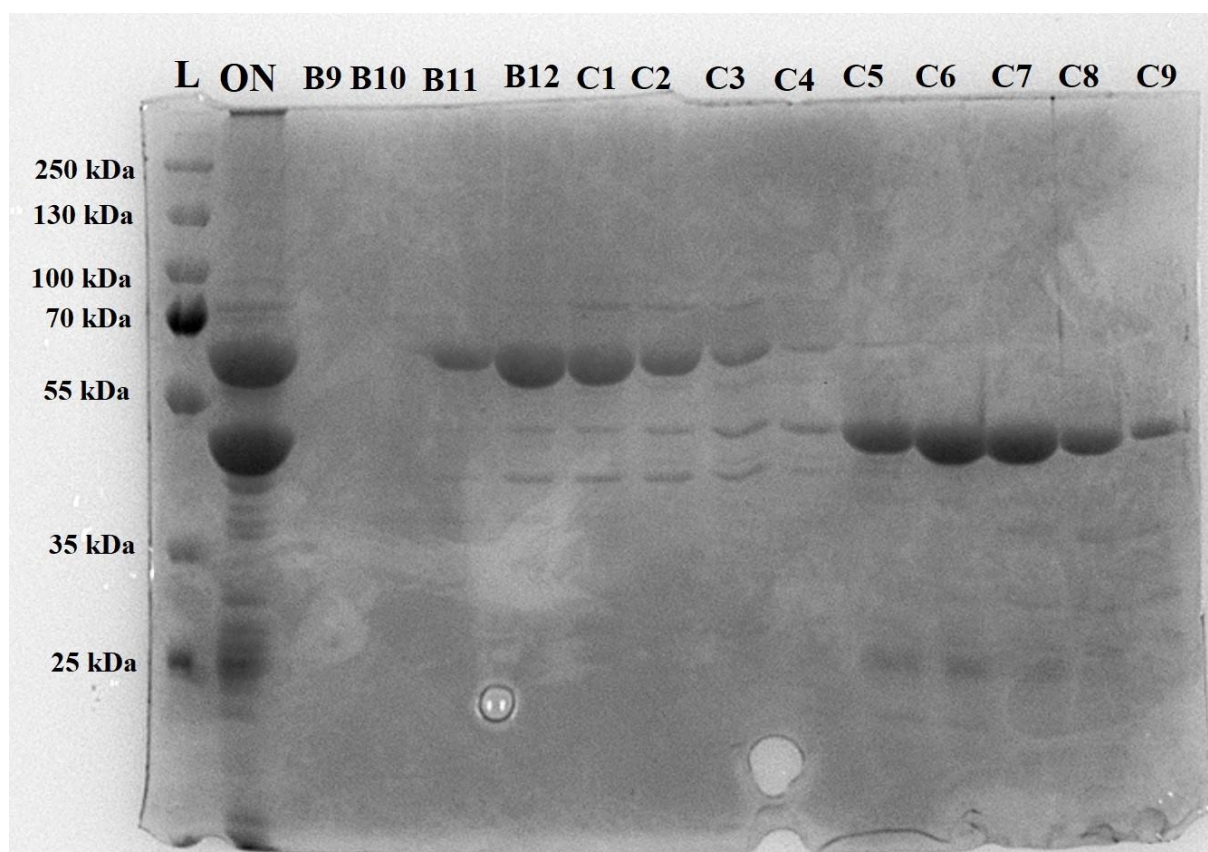
Tabulka 5: Absorbance vzorků proteinu s inhibitory proteáz a bez inhibitorů proteáz při 562 nm a výsledná koncentrace proteinu po afinitní chromatografii.

vzorek	A (562 nm)	odečtený kontrolní vzorek	c proteinu (μg/ml)
s inhibitory proteáz	1,294	1,134	940,091
bez inhibitorů proteáz	0,837	0,677	524,636

Z tabulky 5 je patrné, že koncentrace proteinu ve vzorku s inhibitory proteáz byla téměř dvojnásobně vyšší, oproti vzorku bez inhibitorů proteáz. Následně jsem vzorky přečistila pomocí rozměrově vylučovací chromatografie.

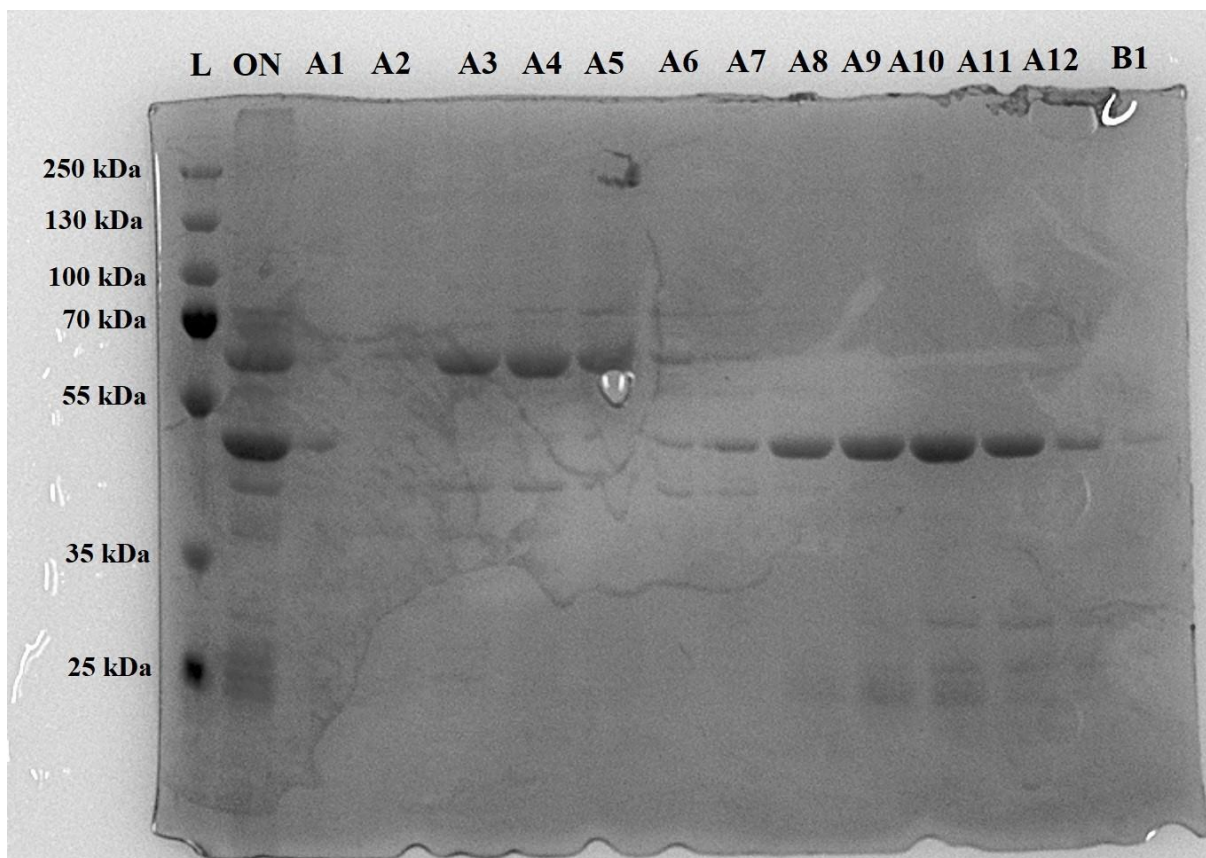
4.5. Rozměrově vylučovací chromatografie

Výsledky SDS-PAGE jednotlivých frakcí vzorků s inhibitory proteáz i bez inhibitorů proteáz z rozměrově vylučovací chromatografie jsou vyobrazeny na obrázcích 28 a 29.



Obr. 28: SDS-PAGE frakcí z rozměrově vylučovací chromatografie, vzorek s inhibitory proteáz. V první jamce se nachází velikostní žebříček (ladder), následuje vzorek pipetovaný na kolonu (ON) a dále jednotlivé frakce značené příslušným písmenem a číslem (B9-C9).

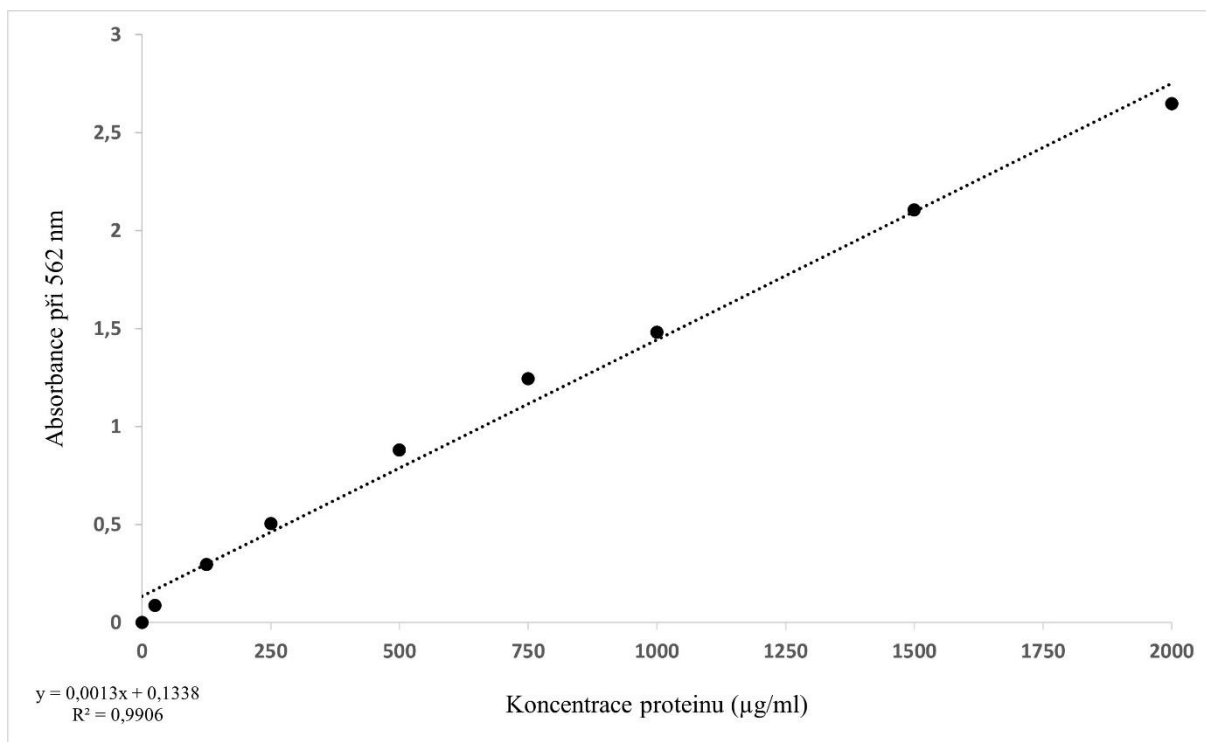
Z obrázku 28 lze vyčíst, že Iripin-4 se nacházel ve frakcích C5-C9. Ve vzorku daném na kolonu (ON) lze vidět proteiny o různých velikostech, které se podařilo z frakcí C5-C9 odstranit, zejména proteiny v rozmezí velikosti 55-70 kDa. Frakce C5-C9 jsem následně spojila a pomocí BCA Protein Assay kitu jsem změřila koncentraci proteinu.



Obr. 29: SDS-PAGE frakcí z rozměrově vylučovací chromatografie, vzorek bez inhibitorů proteáz. V první jamce se nachází velikostní žebříček (ladder), následuje vzorek pipetovaný na kolonu (ON) a dále jednotlivé frakce značené příslušným písmenem a číslem (A1-B1).

Na obrázku 29 je patrná přítomnost Iripin-4 zejména ve frakcích A8-B1. Koncentrace proteinu v těchto frakcích je poměrně velká, obsahují však i proteiny o menší velikosti. U frakce B1 je patrný pouze slabý proužek naznačující nízkou koncentraci proteinu Iripin-4. Ve frakcích A6 a A7 lze také vidět proužek v předpokládané velikosti Iripin-4, avšak tyto frakce obsahují i další proteiny o menší i větší velikosti. Ve vzorku daném na kolonu (ON) lze vidět proteiny o různých velikostech. Z frakcí A8-B1 se podařilo odstranit hlavně proteiny o větší velikosti než Iripin-4, zejména proteiny v rozmezí velikosti 55-70 kDa. Frakce A8-A12 jsem také spojila a pomocí BCA Protein Assay kit jsem změřila koncentraci proteinu.

Kalibrační křivka závislosti absorbance na koncentraci proteinu ve vzorcích je zobrazena na obrázku 30.



Obr. 30: Kalibrační křivka BCA Protein Assay kit, závislost absorpce při 562 nm na koncentraci proteinu ve vzorku s inhibitory proteáz i bez inhibitorů proteáz po rozměrově vylučovací chromatografii.

Z rovnice grafu jsem vypočítala rovnici pro výpočet koncentrace proteinu ve vzorcích (3),

$$(3) \ x = \frac{y - 0,1338}{0,0013}$$

kde x je výsledná koncentrace proteinu (µg/ml) a y je hodnota absorpce po odečtení kontrolního vzorku.

V tabulce 6 jsou zapsány naměřené hodnoty absorpce a vypočítané koncentrace proteinu Iripin-4 ve vzorku s inhibitory proteáz a bez inhibitorů proteáz.

Tabulka 6: Absorbance vzorků proteinu s inhibitory proteáz a bez inhibitorů proteáz při 562 nm a výsledná koncentrace proteinu po rozměrově vylučovací chromatografii.

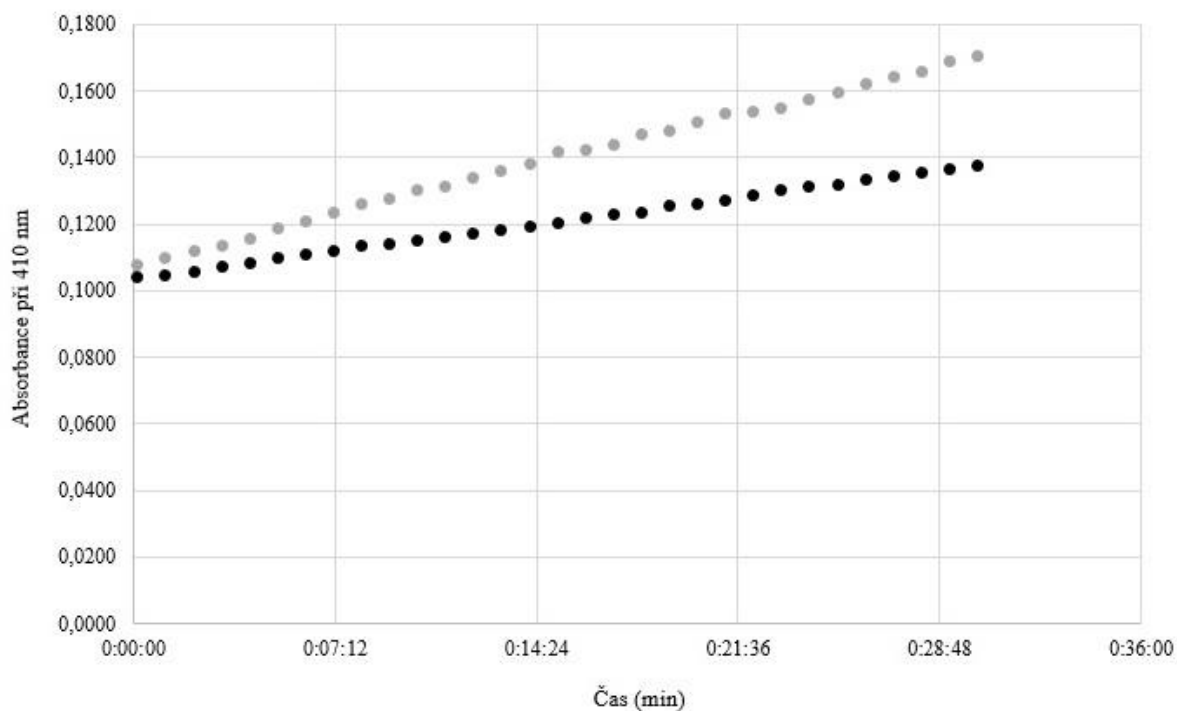
vzorek	A (562 nm)	odečtený kontrolní vzorek	c proteinu (µg/ml)
s inhibitory proteáz	1,072	0,848	549,385
bez inhibitorů proteáz	0,515	0,291	120,923

Z tabulky 6 vyplývá, že koncentrace proteinu ve vzorku s inhibitory proteáz byla vyšší než ve vzorku bez inhibitorů proteáz. V porovnání s koncentracemi proteinu ve vzorcích před rozměrově vylučovací chromatografií (viz Tabulka 5) došlo u vzorku s inhibitory proteáz k úbytku proteinu téměř o polovinu, v případě vzorku bez inhibitorů proteáz byla koncentrace proteinu téměř 5x nižší.

4.6. Inhibiční enzymatické eseje

U proteáz plasminu, elastázy a katepsinu G nebyla pozorována žádná inhibice hydrolýzy substrátu Iripinem-4. Ačkoli byla očekávána inhibice granzymu B, nepodařilo se tento předpoklad potvrdit.

Na obrázku 31 je vyobrazen graf závislosti absorbance při 410 nm na trvání enzymatické reakce granzymu B.



Obr. 31: Závislost absorbance při 410 nm na čase reakce granzymu B se substrátem. Černé body označují reakci bez Iripinu-4, šedé body označují reakci inhibovanou Iripinem-4.

Z obrázku 31 je patrné, že ačkoli by Iripin-4 měl reakci granzymu B se substrátem inhibovat, došlo naopak k rychlejší hydrolýze substrátu.

5. Diskuze

Serpiny jsou inhibitory serinových proteáz regulující protolýzou řízené fyziologické funkce organismu. Podílejí se na koagulaci, zánětu, imunitních reakcích a dalších homeostatických procesech. Serpiny jsou pro své anti-hemostatické a imunomodulační účinky přítomné ve slinách klíšťat, čímž klíšťatům usnadňují sání krve hostitele. Cílem mé práce bylo vytvořit rekombinantní klíšťecí serpin Iripin-4 a následně pomocí enzymatických esejí ověřit jeho funkčnost.

Problémem, který nastal při restričním štěpení plazmidu, bylo zpětné spojování konců naštěpeného plazmidu. Ani po použití dvou různých restriktáz a alkalické fosfatázy se tento problém nepodařilo odstranit a po transformaci do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α rostly na Petriho miskách s LB agarem kolonie bakterií obsahující plazmid bez inzertu Iripin-4. Z celkem 23 testovaných kolonií se nacházel plazmid se zaklonovaným inzertem pouze ve 3 koloniích, jak je vidět na výsledcích z colony PCR (viz Obr. 14).

Po colony PCR následovala pilotní exprese s cílem zjistit optimální teplotu a dobu kultivace buněk pro nejvyšší expresi proteinu. Po rozbití buněk získaných při pilotní expresi a jejich následné centrifugaci byl získán supernatant a pelet. Pro další postup byly zvoleny vzorky supernatantu, tedy cytoplazmatické frakce proteinu, ačkoli dle výsledků z pilotní exprese (viz. kapitola 4.2. Pilotní exprese) byla koncentrace proteinu v peletu vyšší. K tomuto rozhodnutí bylo přistoupeno z důvodu toho, že proteiny v peletu se nacházejí v inkluzních tělíscích a jsou denaturovány a agregovány. Proto by pro další postup byl potřebný refolding těchto proteinů. Práce s inkluzními tělísky je časově náročná a neexistuje jednotný postup pro všechny proteiny (Cabrita a Bottomley, 2004). Nejprve je zapotřebí inkluzní tělíska purifikovat, následuje solubilizace inkluzních tělísek, refoldace solubilizovaného proteinu a purifikace refoldovaného proteinu (Singh *et al.*, 2015). Samotný refolding solubilizovaného proteinu závisí na mnoha proměnných, jako jsou teplota, pH, koncentrace soli, redoxní prostředí a přítomnost dvojmocných iontů (Burgess, 2009). Naopak proteiny přítomné v supernatantu jsou již v biologicky aktivním stavu správně sbalené.

Při afinitní chromatografii nedošlo k dokonalému vyčištění jednotlivých frakcí od dalších proteinů (viz Obr. 23 a Obr. 25), i když kontaminace byly přítomné v mnohem menším množství než před přečištěním afinitní chromatografií. Toto nedokonalé přečištění bylo pravděpodobně způsobeno navázáním jiných proteinů obsahujících více histidinů blízko u sebe na kolonu. Přečištění Iripinu-4 od těchto kontaminantů by mohlo být provedeno pomocí dalších

purifikačních kroků, např. pomocí ion exchange (iontová výměna) chromatografie. Koncentrace proteinu však po přečištění pomocí afinitní chromatografie značně klesla a opětovná purifikace by vedla k dalším ztrátám. Výsledek Western blotu frakcí z afinitní chromatografie naznačuje, že mohlo dojít k degradaci proteinu, jelikož je u frakcí na obrázcích (Obr. 24 a 26) patrné větší množství proužků. Tyto proužky se nacházejí pod očekávanou velikostí proteinu Iripin-4.

Dalším krokem bylo přečistit vzorek od zbylých proteinů pomocí rozměrově vylučovací chromatografie. Touto metodou došlo k odstranění velikostně odlišných proteinů. Ze vzorku se podařilo odstranit především proteiny o velikosti 55-70 kDa. Proteiny o menší velikosti, než je Iripin-4, se ze vzorku nepodařilo zcela odstranit. Po tomto přečištění však koncentrace proteinu značně klesla.

Inhibiční enzymatické eseje byly využity k ověření funkce rekombinantního Iripinu-4. Inhibiční charakter Iripinu-4 byl testován na čtyřech proteázách: elastáze, katepsinu G, plasminu a granzymu B. Typickou aminokyselinou přítomnou v P1 místě, hlavním místě, které rozpoznává proteáza, je u většiny strukturně popsaných serpinů z klišéte *I. ricinus* arginin. Pouze u serpinu IRS-2 se v P1 místě nachází tyrosin. Iripin-4 má v P1 místě glutamát, což vysvětluje, proč nedochází k inhibici proteáz, které štěpí svůj substrát za argininem (Chmelař, 2022). Jediná inhibice Iripinem-4 byla pozorovaná ve spolupracující laboratoři u granzymu B (ústní sdělení školitele). Inhibice granzymu B Iripinem-4 se mi však nepodařila potvrdit. Naopak jsem pozorovala mírné zvýšení proteolytické aktivity, což lze ovšem těžko vysvětlit. V literatuře není zmínka o aktivačním účinku serpinů na proteázy. Výsledek mohl být způsoben nefunkčností serpinu. Pro ověření inhibičních vlastností Iripinu-4 by bylo nutné připravit nový rekombinantní protein.

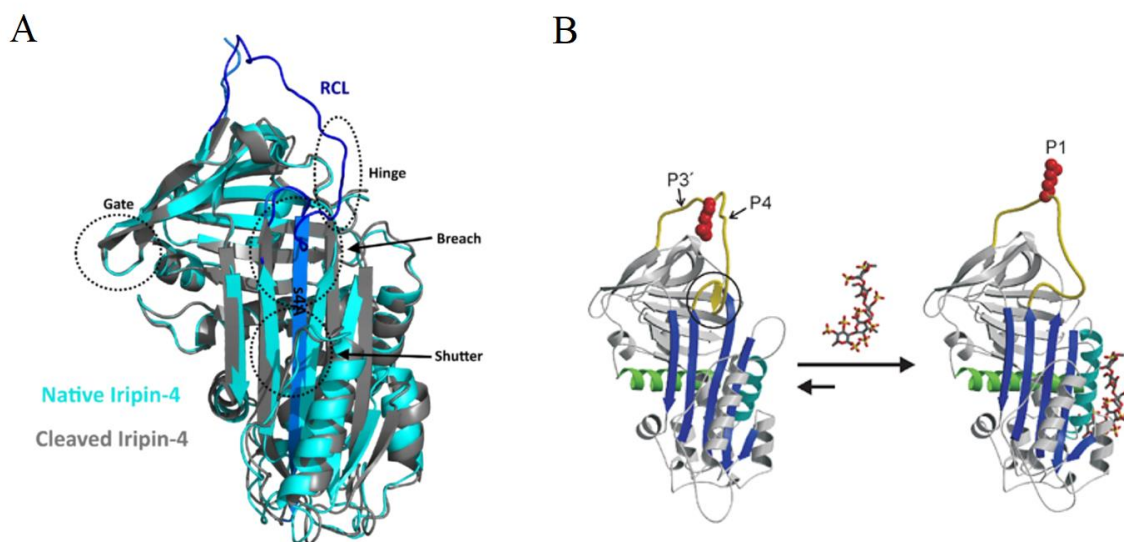
Dalším známým serpinem majícím v P1 místě aminokyselinu glutamát je dle Ulbricht *et al.*, 2015 SerpinA12 neboli vaspin, patřící mezi tzv. adipokiny, tj. cytokiny produkované tukovou tkání. Vaspin má pozitivní účinky na metabolismus a jedinou dosud známou cílovou proteázou vaspinu je kalikrein 7. Schopnost vaspinu inhibovat kalikrein 7 lze mírně zvýšit navázáním heparinu na vaspin. Vaspin je tedy, podobně jako antitrombin (viz níže), heparin vázající serpin.

U serpinu α -1-antitrypsinu byla u králíka nalezena izoforma E s aminokyselinou glutamátem v P1 místě. Tato izoforma sice tvoří komplex s trypsinem i elastázou, ale na rozdíl od izoform F a S-1, které mají v P1 místě methionin a serin, neinhibuje jejich proteolytickou

aktivitu. Změna aminokyseliny v P1 místě je zodpovědná za ztrátu inhibiční aktivity tohoto serpinu (Saito a Sinohara, 1995).

Jedním z principů regulace koagulace je aktivace serpinu antitrombinu pomocí heparinu. Navázáním heparinu na antitrombin dochází k urychlení inhibice cílových koagulačních proteáz až 10 000x, heparin tedy slouží jako kofaktor. Antitrombin má ve své nativní formě N-terminální oblast RCL (hinge region) začleněnou jako vlákno 4 do β -listu A, což omezuje funkci RCL. Po navázání heparinu na antitrombin dochází ke konformačním změnám, z nichž nejdůležitější je uvolnění hinge regionu z β -listu A, a tím umožnění funkce RCL (Johnson *et al.*, 2006).

Na obrázku 32A je vyobrazen Iripin-4 ve své nativní (modrá) a rozštěpené (šedá) formě s označeným „hinge regionem“ (pant). Na obrázku 32B je vyobrazen nativní antitrombin s označeným hinge regionem a antitrombin s navázaným heparinem.



Obr. 32: A-Iripin-4 v nativní (modrá) a rozštěpené (šedá) formě. B-Nativní antitrombin a antitrombin s navázaným heparinem. Převzato z Johnson *et al.*, 2006 a Kaščáková *et al.*, 2023.

Z obrázku 32 vyplývá podobnost struktury hinge regionu u Iripinu-4 a antitrombinu před navázáním heparinu. Z toho lze usuzovat, že by funkce Iripinu-4 jako inhibitoru serinových proteáz mohla být také ovlivňována přítomností kofaktoru. Tato domněnka však nebyla ověřována a zůstává předmětem dalšího výzkumu.

6. Závěr

V této práci se podařilo zaklonovat plazmid pET-19b se zaklonovanou sekvencí Iripinu-4 do kompetentních buněk DH5 α a získat klíčící rekombinantní protein Iripin-4, ačkoli jeho množství bylo poměrně nízké. Nízká koncentrace proteinu byla způsobena prací s cytoplazmatickou frakcí proteinu (supernatantem), neboť práce s inkluzními tělísky, kde byla koncentrace proteinu dle výsledků z SDS-PAGE mnohonásobně vyšší, je náročná z hlediska získání aktivního proteinu.

Iripin-4 se podařilo pomocí afinitní a rozměrově vylučovací chromatografie přečistit od ostatních proteinů, avšak zejména proteiny o menší velikosti, než je velikost Iripinu-4, se nepodařilo zcela odstranit. Větší čistoty proteinu by bylo dosaženo dalšími purifikačními metodami, např. ion exchange chromatografií. Další purifikací proteinu by však došlo k větší ztrátě proteinu.

Při ověření inhibiční funkce rekombinantního Iripinu-4 pomocí enzymatických esejí nedošlo k inhibici ani jedné z testovaných proteáz. Inhibiční funkce Iripinu-4 by mohla být ovlivňována přítomností kofaktoru, avšak tato domněnka zůstává předmětem dalšího výzkumu.

7. Seznam literatury

Agbowuro, A. A., Huston, W. M., Gamble, A. B., & Tyndall, J. D. A. (2017). „Proteases and protease inhibitors in infectious diseases“, *Medicinal Research Reviews*, 38(4), 1295–1331. doi:10.1002/med.21475

Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). „Biology of Ticks“, *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 195–215. doi:10.1016/j.idc.2007.12.006

Aounallah, H., Bensaoud, C., M'ghirbi, Y., Faria, F., Chmelař, J., & Kotsyfakis, M. (2020). „Tick Salivary Compounds for Targeted Immunomodulatory Therapy“, *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.583845

Axybio (2018) pET-19b. Dostupné z: <https://www.axybio.com/?ext-page=vector-show&vector=pET-19b&ID=423>

Barrett, A. J. (2000). „Proteases“, *Current Protocols in Protein Science*, 21(1), 21.1.1–21.1.12. doi:10.1002/0471140864.ps2101s21

BIOGEN PRAHA (2022) GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. Dostupné z: <https://eshop.biogen.cz/generuler-100-bp-plus-dna-ladder>

BIOGEN PRAHA (2022) PageRuler Plus Prestained Protein Ladder. Dostupné z: <https://eshop.biogen.cz/pageruler-plus-prestained-protein-ladder--1>

Burgess, R. R. (2009). „Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins“, *Guide to Protein Purification, 2nd Edition*, 259–282. doi:10.1016/s0076-6879(09)63017-2

Cabrita, L. D., & Bottomley, S. P. (2004). „Protein expression and refolding – A practical guide to getting the most out of inclusion bodies“, *Biotechnology Annual Review*, 31–50. doi:10.1016/s1387-2656(04)10002-1

Caframo Limited (2022) Protein Affinity Chromatography. Dostupné z: <https://www.caframolabsolutions.com/application/homogenizing/protein-affinity-chromatography/>

Da Silva, R. R. (2017). „Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes: Production, Catalysis and Potential Applications“, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183(1), 1–19. doi:10.1007/s12010-017-2427-2

Estrada-Peña, A., & Jongejan, F. (1999). „Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission“, *Experimental and Applied Acarology*, 23(9), 685–715. doi:10.1023/a:1006241108739

Farady, C. J., & Craik, C. S. (2010). „Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors“, *ChemBioChem*, 11(17), 2341–2346. doi:10.1002/cbic.201000442

Gettins, P. G. W. (2002). „Serpine structure, mechanism, and function“, *Chemical Reviews*, 102(12), 4751–4804. doi:10.1021/cr010170

Huntington, J. A. (2011). „Serpine structure, function and dysfunction“, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, 26–34. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.0436

Chlastáková, A., Kotál, J., Beránková, Z., Kaščáková, B., Martins, L. A., Langhansová, H., Prudnikova, T., Ederová, M., Kutá Smatanová, I., Kotsyfakis, M., & Chmelař, J. (2021). „Iripin-3, a New Salivary Protein Isolated From Ixodes ricinus Ticks, Displays Immunomodulatory and Anti-Hemostatic Properties In Vitro“, *Frontiers in Immunology*, 12, 1–20. doi:10.3389/fimmu.2021.626200

Chlastáková, A., Kaščáková, B., Kotál, J., Langhansová, H., Kotsyfakis, M., Kutá, Smatanová, I., Tirloni, L., & Chmelař, J. (2023). „Iripin-1, a new anti-inflammatory tick serpin, inhibits leukocyte recruitment *in vivo* while altering the levels of chemokines and adhesion molecules“, *Frontiers in Immunology*, 14, 1664–3224. doi:10.3389/fimmu.2023.1116324

Chmelař, J., Oliveira, C. J., Rezacova, P., Francischetti, I. M. B., Kovarova, Z., Pejler, G., Kopacek, P., Ribeiro, J. M., Mares, M., Kopecky, J., & Kotsyfakis, M. (2011). „A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation“, *Blood*, 117(2), 736–744. doi:10.1182/blood-2010-06-293241

Chmelař, J., Calvo, E., Pedra, J. H. F., Francischetti, I. M. B., & Kotsyfakis, M. (2012). „Tick salivary secretion as a source of antihemostatics“, *Journal of Proteomics*, 75(13), 3842–3854. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.026

Chmelař, J., Kotál, J., Langhansová, H., & Kotsyfakis, M. (2017). „Protease Inhibitors in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystatins in Tick-host-Pathogen Interaction“, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00216

Chmelař, J. „The role of tick salivary serpins in the modulation of host’s immune system“, České Budějovice, 2022. Habilitation thesis. University of South Bohemia. Faculty of Science

Jmel, M. A., Aounallah, H., Bensaoud, Ch., Mekki, I., Chmelař, J., Faria, F., M’ghirbi, Y., & Kotsyfakis, M. (2021). „Insights into the Role of Tick Salivary Protease Inhibitors during Ectoparasite–Host Crosstalk“, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1422-0067. doi:10.3390/ijms22020892

Johnson, S., & Pellecchia, M. (2006). „Structure- and Fragment-Based Approaches to Protease Inhibition“, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6(4), 317–329. doi:10.2174/156802606776287072

Johnson, D. J. D., Li, W., Adams, T. E., & Huntington, J. A. (2006). „Antithrombin–S195A factor Xa-heparin structure reveals the allosteric mechanism of antithrombin activation“, *The EMBO Journal*, 25(9), 2029–2037. doi:10.1038/sj.emboj.7601089

Kašćáková, B., Kotál, J., Martins, L. A., Beránková, Z., Langhansová, H., Calvo, E., Crossley, J. A., Havlíčková, P., Dyčka, F., & Prudnikova, T. (2021). „Structural and biochemical characterization of the novel serpin Iripin-5 from *Ixodes ricinus*“, *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, 77(9). doi: 10.1107/S2059798321007920

Kašćáková, B., Kotál, J., Havlíčková, P., Vopátková, V., Prudnikova, T., Grinkevich, P., Kutý, M., Chmelař, J., & Kutá Smananová, I. (2023). „Conformational transition of the salivary serpin Iripin-4“, *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*. doi: 10.1107/S2059798323002322

Kellici, T. F., Pilka, E. S., & Bodkin, M. J. (2020). „Small-molecule modulators of serine protease inhibitor proteins (serpins)“, *Drug Discovery Today*, 26(2), 442-454. doi:10.1016/j.drudis.2020.11.012

Kotál, J., Polderdijk, S. G. I., Langhansová, H., Ederová, M., Martins, L. A., Beránková, Z., Chlastáková, A., Hajdušek, O., Kotsyfakis, M., Huntington, J. A., & Chmelař, J. (2021). „Ixodes ricinus Salivary Serpin Iripin-8 Inhibits the Intrinsic Pathway of Coagulation and Complement“, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 1-18. doi:10.3390/ijms22179480

Kryvalap, Y., Czyzyk, J. (2022). „The Role of Proteases and Serpin Protease Inhibitors in β -Cell Biology and Diabetes“, *Biomolecules*, 12(1), 67. doi:10.3390/biom12010067

Law, R. H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., Whisstock, J. C. (2006). „An overview of the serpin superfamily“, *Genome Biology*, 7(5), 216. doi:10.1186/gb-2006-7-5-216

Lucas, A., Yaron, J. R., Zhang, L., & Ambadapadi, S. (2018). „Overview of Serpins and Their Roles in Biological Systems“, *Serpins*, 1–7. doi:10.1007/978-1-4939-8645-3_1

Marszal, E., & Shrake, A. (2006). „Serpín crystal structure and serpin polymer structure“, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453(1), 123–129. doi:10.1016/j.abb.2006.03.006

Meekins, D. A., Kanost, M. R., & Michel, K. (2017). „Serpins in arthropod biology“, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 62, 105–119. doi:10.1016/j.semcdb.2016.09.001

Merck KGaA (2021) Water for Western Blotting. Dostupné z: <https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/water-purification/learning-centers/applications/proteins/Western-blotting/6MOB.qB.w.IAAAFANOCENFtx,nav>

New England Biolabs (2023) BamHI. Dostupné z: <https://international.neb.com/products/r0136-bamhi#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage>

New England Biolabs (2023) NdeI. Dostupné z: <https://international.neb.com/products/r0111-ndei#Product%20Information>

Páleníková, A., Martínez-Domínguez, G., Arrebola, F. J., Romero-González, R., Hrouzková, S., & Frenich, A. G. (2015). „Multifamily determination of pesticide residues in soya-based nutraceutical products by GC/MS–MS“, *Food Chemistry*, 173, 796–807. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.10

Polderdijk, S. G. I., & Huntington, J. A. (2018). „Identification of serpins specific for activated protein C using a lysate-based screening assay“, *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-27067-z

ProtParam, Swiss Institute of Bioinformatics. Dostupné z: <https://web.expasy.org/protparam/>

Saito, A., Sinohara, H. (1995). „Rabbit alpha-1-antiproteinase E: a novel recombinant serpin which does not inhibit proteinases“, *Biochem*, 307, 369-75. doi:10.1042/bj3070369

Schauperl, M., Fuchs, J. E., Waldner, B. J., Huber, R. G., Kramer, C., & Liedl, K. R. (2015). „Characterizing Protease Specificity: How Many Substrates Do We Need?“, *PLOS ONE*, 10(11), e0142658. doi:10.1371/journal.pone.0142658

Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G. W., Irving, J. A., Lomas, D. A., Luke, C. J., Moyer, R. W., Pemberton, P. A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G. S., Travis, J., & Whisstock, J. C. (2001). „The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins“, *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33293–33296. doi:10.1074/jbc.r100016200

Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). „Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process“, *Microbial Cell Factories*, 14(1). doi:10.1186/s12934-015-0222-8

Stein, P., & Chothia, C. (1991). „Serpins tertiary structure transformation“, *Journal of Molecular Biology*, 221(2), 615–621. doi:10.1016/0022-2836(91)80076-7

Ulbricht, D., Pippel, J., Schultz, S., Meier, R., Strater, N., & Heiker, J. T. (2015). „A unique serpin P1' glutamate and a conserved β -sheet C arginine are key residues for activity, protease recognition and stability of serpinA12 (vaspin)“, *Biochemical Journal*, 470(3), 357–367. doi:10.1042/bj20150643

Whisstock, J. C., Silverman, G. A., Bird, P. I., Bottomley, S. P., Kaiserman, D., Luke, C. J., Huntington, J. A. (2010). „Serpins Flex Their Muscle“, *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24307–24312. doi:10.1074/jbc.r110.141408

Whisstock, J., Skinner, R., & Lesk, A. M. (1998). „An atlas of serpin conformations“, *Trends in Biochemical Sciences*, 23(2), 63–67. doi:10.1016/s0968-0004(97)01172-9