

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Příprava a testování aktivity klíčícího serpinu
Iripin-5

Diplomová práce

Bc. Nikola Spěvákova

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

Konzultant: Mgr. Barbora Kašćáková, Ph.D.

České Budějovice 2024

Spěváková, N., 2024: Příprava a testování aktivity klíštěcího serpinu Iripin-5. [Preparation and activity testing of the tick serpin Iripin-5. Mgr. Thesis, in Czech] – 62 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The master thesis focuses on tick salivary serpin Iripin-5. Recombinant protein was prepared using molecular cloning, followed by its production using *Escherichia coli* expression system and purified by chromatography methods. Features of Iripin-5 were tested and characterized by performed protease inhibitory assay and various immunological methods.

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

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2024

.....

podpis studenta

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D. za vedení, trpělivost a čas, který mi věnoval při zpracování mé diplomové práce. Velké poděkování patří především Mgr. Anně Kovaříkové za její čas, ochotu a pomoc v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Janu Kotálovi, Ph.D. a RNDr. Zdeňku Frantovi, Ph.D. za pomoc při práci na dílčích experimentech. V neposlední řadě také celé mé rodině a kamarádům za podporu během celého studia.

Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1	Serpiny (serinové proteázové inhibitory).....	1
1.1.1	Struktura serpinů.....	2
1.1.2	Mechanismus inhibice	4
1.2	Serpiny u klíšťat.....	5
1.2.1	Role serpinů ve fyziologii klíštěte	5
1.2.2	Role serpinů při interakci klíště-hostitel.....	6
1.2.3	Iripin-5	9
2.	Cíle práce	11
3.	Materiál a metody	12
3.1	Seznam chemikálií a kitů použitých v jednotlivých metodách, složení pufrů a gelů ...	12
3.2	Buněčné linie.....	17
3.3	Myši.....	17
3.4	Klonování.....	17
3.4.1	Vektor pET-19b.....	17
3.4.2	Restrikční štěpení.....	18
3.4.3	Ligace	20
3.4.4	Transformace do kompetentních buněk.....	20
3.4.5	Colony PCR.....	21
3.4.6	Transformace do BL21 buněk	22
3.5	Pilotní exprese.....	23
3.6	Analýza přítomnosti proteinu.....	23
3.6.1	Příprava vzorků z pilotní exprese	23
3.6.2	SDS-PAGE (SDS – polyakrylamidová gelová elektroforéza).....	24
3.6.3	Western blot	24
3.6.4	Hmotnostní spektrometrie	25

3.7	Expese ve velkém měřítku.....	25
3.8	Afinitní chromatografie.....	26
3.9	Iontově výměnná chromatografie	27
3.10	Gelová chromatografie.....	27
3.11	Ověření biochemické aktivity Iripinu-5	27
3.12	Stanovení produkce oxidu dusnatého makrofágy	28
3.13	Detekce přežívání buněk pomocí alamarBlue™.....	29
3.14	Migrace neutrofilů.....	29
3.15	Proliferace T-lymfocytů	30
3.16	Statistické vyhodnocení dat.....	31
4.	Výsledky	33
4.1	Příprava vektoru pET-19b s inzertem Iripin-5	33
4.2	Pilotní expese.....	34
4.3	Ověření přítomnosti proteinu	36
4.4	Expese ve velkém měřítku.....	38
4.5	Afinitní chromatografie.....	39
4.6	Iontově-výměnná chromatografie	40
4.7	Gelová chromatografie.....	42
4.8	Ověření biochemické aktivity Iripinu-5	44
4.9	Stanovení produkce oxidu dusnatého makrofágy	45
4.10	Detekce přežívání buněk pomocí alamarBlue™.....	45
4.11	Migrace neutrofilů.....	46
4.12	Proliferace T-lymfocytů	47
5.	Diskuze.....	49
6.	Závěr.....	54

7.	Seznam použitých zkratk.....	55
8.	Seznam použité literatury.....	57

1. Úvod

Klíšťata jsou ektoparaziti savců, ptáků a plazů, kteří sají krev. Vzhledem k jejich obligátnímu parazitismu využívají příležitosti a přenáší celou řadu onemocnění. Přenášenými patogeny jsou viry, bakterie, ale i prvoci, houby a hlístice (Cupp *et al.*, 1991). Modelový organismus, použitý v mé práci – klíště obecné (*Ixodes ricinus*), který je rozšířený po celé Evropě, přenáší především virus klíšťové encefalitidy, z bakterií např. rody *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Borrelia* (Sprong *et al.*, 2018; de la Fuente *et al.*, 2017).

Proces sání krve klíštěte *I. ricinus* na hostiteli trvá několik dní, a aby nedošlo k odmítnutí hostitelem, klíště v místě kousnutí musí překonat obranné mechanismy hostitelského organismu. K obranným mechanismům hostitele se řadí hemostáza, reakce imunitního systému a zánětlivé odpovědi, a jejich potlačení je zajištěno farmakologicky aktivními molekulami vylučovanými slinnými žlázami klíštěte (Anderson & Magnarelli, 2008; Martins *et al.*, 2020). Jednotlivé komponenty slin klíštěte jsou nezbytné pro úspěšné krmení, protože díky nim obchází či blokuje obranné mechanismy hostitele. Důležitou skupinou těchto látek jsou inhibitory proteáz, které zpomalují proteolýzu, čímž regulují hemostatické děje – koagulaci, vazokonstrikci a agregaci krevních destiček. Mezi hlavní zástupce se řadí inhibitory s Kunitzovou doménou, serpiny a cystatiny. Poslední dvě zmiňované skupiny mají i imunomodulační účinky (Chmelař *et al.*, 2017). Celkové pochopení role proteázových inhibitorů klíšťat při krmení je podstatné pro objasnění způsobu, jakým klíšťata překonávají obranu hostitele, a k potenciální kontrole těchto molekul (Chudzinski-Tavassi *et al.*, 2016).

Cílem této práce je funkční analýza serpínů – vůbec nejabundantnější skupiny proteázových inhibitorů.

1.1 Serpiny (serinové proteázové inhibitory)

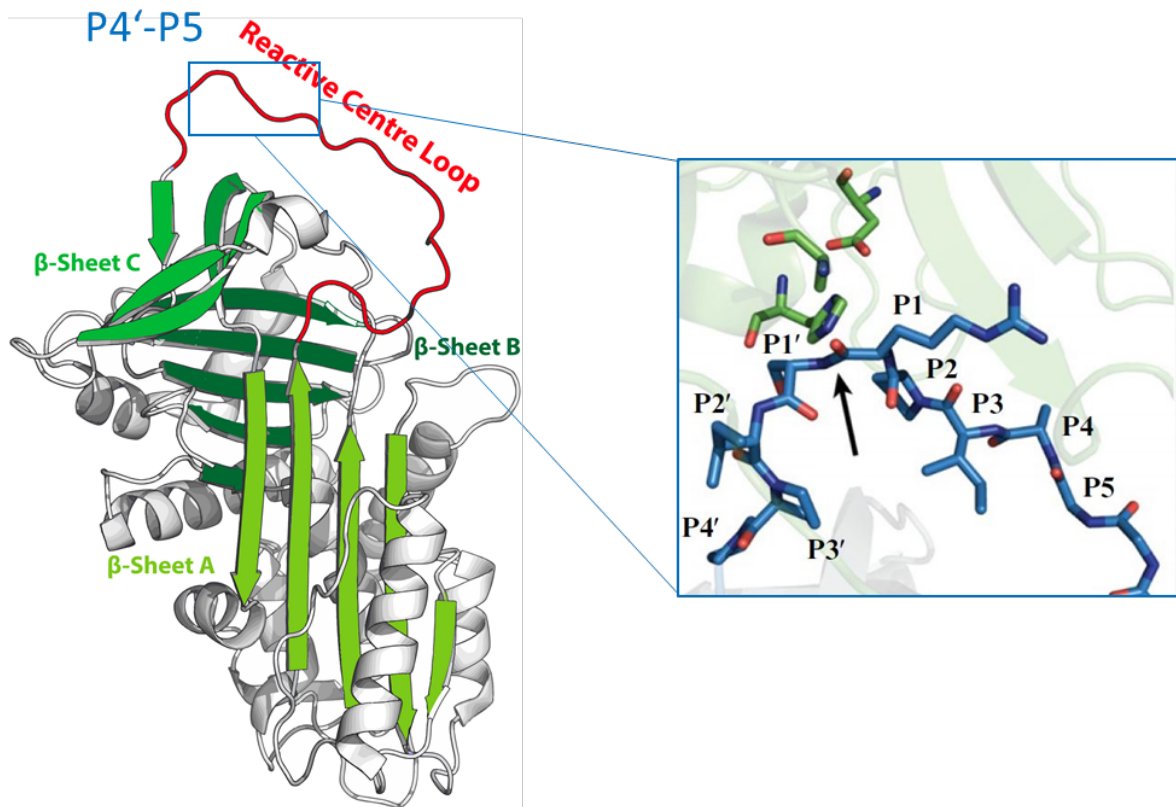
Serpiny jsou důležitou proteinovou rodinou (Gettins *et al.*, 2002), s více než 18 000 členy napříč všemi říšemi života (živočichové, rostliny, houby, protista, archea i houby), přičemž eukaryotické serpiny jsou podstatně rozšířenější než prokaryotické (Huntington *et al.*, 2011; Spence *et al.*, 2021). V lidském těle bylo nalezeno 37 serpínů na desíti chromozomech, které byly rozděleny do devíti podskupin na základě jejich fylogenetického příbuzenského vztahu (Gettins *et al.*, 2002; Irving *et al.*, 2002; Sanrattana *et al.*, 2019).

Vzhledem k velikosti skupiny se u serpinů objevuje široká škála funkcí. Většina serpinů inhibuje zástupce ze skupiny chymotrypsinu podobných, případně trypsinu podobných serinových proteáz (Silverman *et al.*, 2001), ovšem mohou inhibovat i jiné proteázy např. cysteinové (např. katepsiny K, L a S, kaspázy). Některé serpiny ztratily inhibiční funkci a fungují jako přenašeče hormonů (např. globulin vázající tyroxin), molekulární chaperony, tumorové supresory (např. maspin) (Gettins *et al.*, 2002; Law *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2018).

U bezobratlých i u obratlovců zastávají serpiny klíčovou roli v různých fyziologických procesech probíhajících v organismu, především regulačních. Podílí se na srážení krve a hemolymfy, fibrinolýze, zánětu, nebo aktivaci komplementu. U bezobratlých mají serpiny roli v imunoregulaci, vývoji a regulaci apoptózy. U lidí vedle inhibiční funkce modulují biologické procesy jako je krevní tlak nebo transport hormonů (Abbas *et al.*, 2022; Gettins *et al.*, 2002; Huntington *et al.*, 2011).

1.1.1 Struktura serpinů

Primární struktura serpinů zahrnuje okolo 350–500 aminokyselin a molekulová hmotnost se pohybuje mezi 40–100 kDa (Sanrattana *et al.*, 2019; Silverman *et al.*, 2001). Pro správnou funkci zaujímají serpiny metastabilní nativní konformaci, která se stává z konzervované terciální struktury (viz Obr. 1) složené ze tří β -skládaných listů (A, B a C), 7–9 α -šroubovic (A-I) a centrální reaktivní smyčky (reactive centre loop – RCL) (Dunstone & Whisstock, 2011; Rau *et al.*, 2007). Díky konzervované terciální struktuře lze poznatky týkající se jednoho serpinu vztáhnout na ostatní. RCL je tvořena z ~ 17 aminokyselinových zbytků, nachází se mezi β -skládanými listy A a C a je orientována do prostoru nad hlavní strukturu těla serpinu. RCL interaguje s aktivním místem proteázy, rozpoznávací oblast pro cílové proteázy je mezi pozicemi P1-P1' RCL (Huntington *et al.*, 2011; Silverman *et al.*, 2001). Serpiny mohou být post-translačně modifikovány, čímž může být ovlivněna jejich funkce. Mezi tyto modifikace se řadí glykosylace, sulfatace, fosforylace a oxidace (Rau *et al.*, 2007).



Obr. 1: Vlevo: Struktura serpinů (Maas a Maat, 2021). Na obrázku je červeně vyznačena RCL, která vyčnívá do prostoru. β -skládané listy jsou vyznačeny zeleně a α -helixy bíle. Ve výřezu vpravo je vyznačena interakce místa P1-P1' RCL s aktivním místem proteázy (Song *et al.*, 2011).

Serpiny se mohou zaujímat různé konformace. K běžným konformacím se řadí nativní, částečně vložená nativní (Michaelis-Mentelův komplex), rozštěpená a latentní (Dunstone & Whisstock, 2011; Law *et al.*, 2006; Silverman *et al.*, 2001; Whisstock *et al.*, 1998):

- Nativní konformace neboli S (stressed), není nejstabilnější konformací, ale je metastabilní. RCL směřuje do prostoru a dochází k interakci s cílovou proteázou. V této konformaci jsou serpiny náchylné k mutacím nebo chybnému skládání.
- Michaelis-Mentelův komplex vzniká prostřednictvím nekovalentní vazby mezi aktivním místem proteázy a P1-P1' RCL serpinu.
- Rozštěpená forma, konformační přechod známý jako přechod z S do R (relaxed) formy, je nejstabilnější formou, protože došlo k výraznému zvýšení tepelné stability. K vytvoření dochází rozštěpením peptidové vazby P1-P1' a vložením celé RCL do β -listu A.
- Latentní konformace je charakterizována zasunutím RCL do středu β -listu A, a zároveň se přesune 1 vlákno z β -listu C. Tato konformace je více stabilní a inhibiční

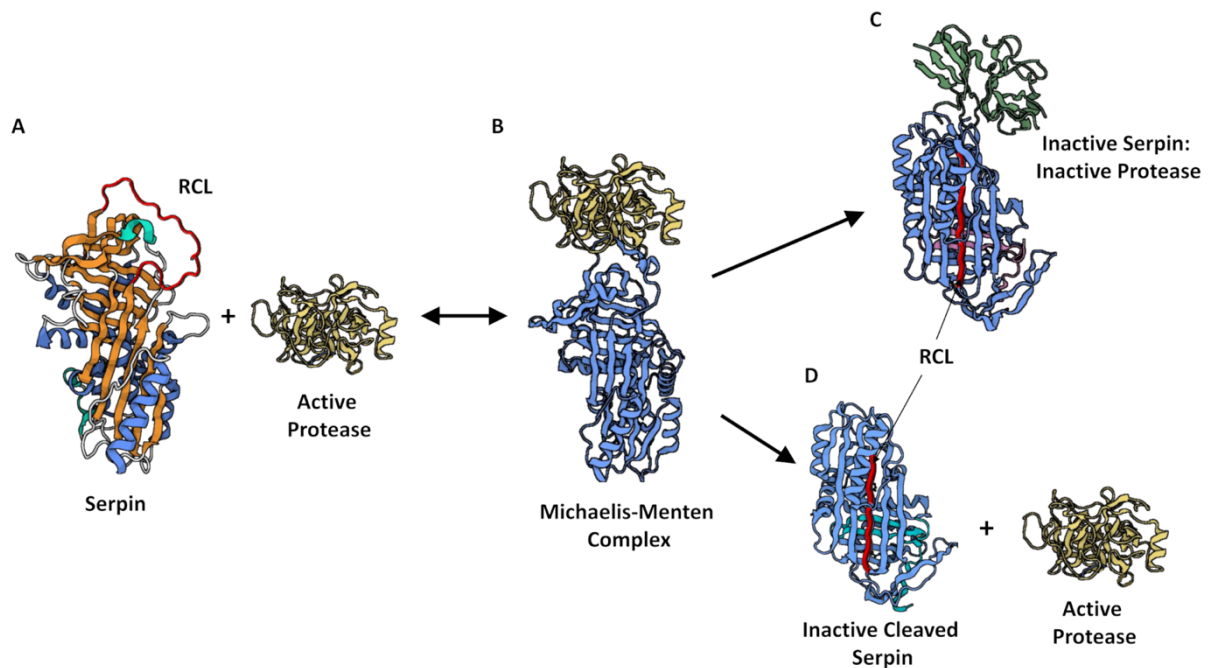
funkce je vyřazena. Serpiny mohou být převedeny zpět na nativní formu pomocí denaturace a opětovným skládáním.

Serpiny mohou zaujímat i abnormální konformace jako jsou polymery serpinů a δ -formy. Polymery serpinů vznikají mutacemi, při kterých dochází ke snížení sekrece serpinů. Tyto dysfunkce serpinů mohou vést k patologickým jevům. Mezi onemocnění se řadí trombóza v případě nedostatku antitrombinu, emfyzém při nedostatku α 1-anti-trypsinu, mutace neuroserpinu jsou spojeny s demencí (Gettins *et al.*, 2002; Huntington *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2001).

Schopnost serpinů podléhat konformačním změnám je klíčová pro jejich funkci, což je zároveň činí náchylnými k mutacím. Mutace narušují jejich skládání, spontánní konformační změnu, což může vést k jejich nedostatku a onemocnění (Huntington *et al.*, 2011; Law *et al.*, 2006).

1.1.2 Mechanismus inhibice

Serpiny inhibují cílové proteázy zvláštním ireverzibilním mechanismem, kdy na konci inhibice jsou proteáza i serpin inaktivovány. Serpiny mohou inhibovat více proteáz. Inhibiční mechanismus lze rozdělit na dva kroky. Nejprve serpiny napodobují strukturu substrátu pro proteázu, aktivní místo proteázy rozpozná místa P1-P1' serpinu a naváže se za vzniku nekovalentního komplexu (Michaelis-Mentelův komplex). Po navázání je vazba P1-P1' nejprve enzymaticky štěpena proteázou, následně dojde k vytvoření kovalentní esterové vazby mezi aktivním místem serinové proteázy a P1 pozicí uhlovodíkového řetězce RCL, zároveň dochází k rozštěpení vlákna v pozici P1-P1'. Následuje konformační změna, která zabraňuje proteáze dokončit katalýzu. RCL je pomalu vsouvána mezi vlákna β -listu A jako nový další řetězec tohoto β -listu, zároveň se přesouvá i kovalentně navázaná proteáza na opačnou stranu serpinu. Kompletním přesunem RCL mezi vlákna β -listu A se proteáza přemístí o více než 70 Å a její aktivní místo se poškodí. Pokud je vložení RCL do β -listu A dostatečně rychlé dojde k vytvoření kovalentního komplexu, v opačném případě je serpin spotřebován jako substrát proteázy a uvolněn ve své neaktivní rozštěpené formě (viz Obr. 2). Mechanismus inhibice serpinů je velice účinný, ale vyžaduje, aby se v organismus vyskytovalo velké množství molekul inhibitoru. Inhibiční účinnost serpinů lze regulovat pomocí kofaktorů (např. antitrombin lze ovlivnit heparinem při jeho inhibici trombinu) (Huntington *et al.*, 2011; Lucas *et al.*, 2018; Silverman *et al.*, 2001).



Obr. 2: Inhibiční nebo alternativní mechanismy interakce serpin – proteáza. A: nativní konformace serpinu s exponovanou RCL jako „substrát“ pro cílovou proteázu. B: cílová proteáza se váže na místo P1 umístěné na RCL a vytváří nekovalentní Michaelis-Mentelův komplex. C: cílová proteáza štěpí cílovou štěpnou vazbu a vyvolává dramatický konformační přesun serpinu, což vede k vytvoření kovalentního komplexu serpin – proteáza, kde je RCL začleněna mezi β -listy A a dochází k inaktivaci cílové proteázy. D: vložení RCL do β -listu A není dostatečně rychlé a proteáza uniká konformační změně. Vznikne neaktivní rozštěpený serpin a volná aktivní proteáza (Kelly-Robinson *et al.*, 2021).

1.2 Serpiny u klíšťat

Serpiny byly identifikovány v různých organismech, a to i u klíšťat. U *Amblyomma americanum* bylo v transkriptomu nalezeno 33 serpinů (Porter *et al.*, 2015), u *Haemaphysalis longicornis* 4 serpiny ve slinách nymf a dospělých samic (Tirloni *et al.*, 2015), u *I. ricinus* 36 serpinů na základě transkriptomických dat (Kotál *et al.*, 2021), v genomu *Ixodes scapularis* 45 serpinů (Mulenga *et al.*, 2009), v transkriptomu slinných žláz samců a samic *Rhipicephalus appendiculatus* během sání krve 17 serpinů (de Castro *et al.*, 2016), u *Rhipicephalus microplus* 22 serpinů (Tirloni *et al.*, 2014). Nejnověji v genomu klíštěte *I. ricinus* bylo nalezeno 80 serpinů, z nichž některé jsou pravděpodobně pseudogeny (de Araujo *et al.*, 2024). Klíštěcí serpiny hrají roli ve fyziologii klíštěte i při interakci hostitel-klíště.

1.2.1 Role serpinů ve fyziologii klíštěte

Ve fyziologii klíšťat mají serpiny biologický význam v procesech jako je krmení krví, koagulace hemolymfy či kladení vajíček, což je podloženo jejich expresí v různých

vývojových stádiích a tkáních klíštěte (Abbas *et al.*, 2022). Např. serpinový gen RHS8 u *Rhipicephalis haemaphysaloides* je exprimován ve všech stádiích, ale hladiny mRNA jsou vyšší u larev a nymf (Xu *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2013). U *R. microplus* je 16 z 18 serpinů exprimováno ve všech tkáních, ale množství serpinů se napříč tkáněmi liší (Tirloni *et al.*, 2014).

Role serpinů při sání krve spočívá v tom, že umožňují příjem krve, dále udržují krev v tekutém stavu v místě sání i po požití ve střevě klíštěte (Tirloni *et al.*, 2014). K trávení krve dochází v lumenu střeva, kdy nejprve dochází k lýze krevních buněk, následně k trávení bílkovin, hemoglobinu a dalších krevních složek (Sojka *et al.*, 2013).

Koagulace hemolymfy je důležitým obranným mechanismem klíštěte, který snižuje ztráty hemolymfy a blokuje vstup do rány, čímž zabraňuje vstupu patogenů a infekci/smrti klíštěte (Abbas *et al.*, 2022). Hemolymfa se skládá z hemocytů (cirkulujících buněk) a plazmy, a právě v hemocytech jsou serpiny produkovány (Kotsyfakis *et al.*, 2015). V hemolymfě též dochází k procesům vrozené imunity, a tím přispívají k ochraně klíštěte před patogeny (Abbas *et al.*, 2022).

Další role serpinů ve fyziologii klíšťat je při kladení vajíček. S dalšími proteiny jako je vitellogenin nebo lipoforin se podílí na rozmnožování. Též jsou vysoce exprimovány ve vajíčkách a larvách (Abbas *et al.*, 2022). Např. serpiny RmS-6, RmS-19 a RmS-20 z *R. microplus* hrají roli při embryogenezi a vitellogenezi (Rodriguez-Valle *et al.*, 2015).

1.2.2 Role serpinů při interakci klíště-hostitel

Klíštěcí sliny obsahují řadu komplexních imunomodulačních látek, které mají význam pro úspěšné přísátí klíštěte na hostitele. Serpiny jako součást klíštěcích slin se zaměřují na hemostázu, vrozenou a získanou imunitu hostitele (Kotál *et al.*, 2015; Tirloni *et al.*, 2014).

1.2.2.1 Hemostáza

Prvním obranným mechanismem hostitele na zranění je hemostáza, která zabraňuje ztrátám krve. Proces hemostázy se skládá z koagulace plazmy, která reaguje na poškozený epitel aktivací vnějších koagulačních drah a produkcí tkáňového faktoru epitelovými buňkami. Další součástí je agregace destiček, které se na sebe shlukují pomocí aktivovaných adhezivních molekul, jako jsou kolagen nebo fibronectin a zároveň jsou uvolňovány prozánětlivé mediátory. Třetím hemostatickým mechanismem je vazokonstrikce, která je zprostředkována hladkou svalovinou a řízena cévním endotelem (Abbas *et al.*, 2022; Chmelař

et al., 2011; LaPelusa *et al.*, 2024; Pekáriková *et al.*, 2015). Klíštěcí slinné sekrety obsahují vazodilátory, inhibitory aktivace krevních destiček a modulátory koagulace, čímž udržují krev v tekutém stavu a brání uzavření zranění (Francischetti *et al.*, 2010).

Na zastavení koagulace se podílí řada molekul, které klíšťata vyvinula a které vstříkují do hostitele prostřednictvím slin. Srážení krve je kaskádovitý proces, který je aktivačně závislý na serinových proteázách, a právě proto jsou inhibitory serinových proteáz hlavními regulačními faktory (Abbas *et al.*, 2022; Chmelař *et al.*, 2012). Klíštěcí serpiny řídí rovnováhu mezi aktivním a neaktivním trombinem, který je hlavním koagulačním enzymem a katalyzuje přeměnu fibrinogenu na fibrin (Abbas *et al.*, 2022).

Agregace krevních destiček je vícestupňový adhezivní proces, na němž se podílí několik receptorů a adhezivních molekul (zejména integriny), a při kterém dochází k tvorbě hemostatické zátky. Některé serinové proteázy jako je katepsin G nebo trombin spouštějí agregaci trombocytů (Abbas *et al.*, 2022; Jackson, 2007; Li *et al.*, 2012). U serpiny IRS-2 z *I. ricinus* bylo prokázáno, že snižuje enzymatickou aktivitu katepsinu G a trombinu, zároveň v *in vitro* experimentu inhiboval agregaci trombocytů vyvolanou těmito dvěma serinovými proteázami (Chmelař *et al.*, 2011).

1.2.2.2 Vrozená imunita

Imunitní odpověď hostitele je vyvolána při poranění hypostomem klíštěte, při kterém zároveň může docházet k přenosu patogenů. Do místa poranění migrují buňky vrozené imunity jako jsou neutrofily a monocyty, které jsou aktivované chemokiny a cytokiny.

Na zesílení zánětlivé reakci se podílí aktivovaný komplement. Funkcí komplementu u obratlovců je zvýšení fagocytózy, podpora zánětu a přímé napadání buněčné membrány patogenů (Cagliani *et al.*, 2016). Ve slinách klíšťat jsou proteiny s anti-komplementovou aktivitou, která byla objevena např. u klíštěte *I. ricinus*, konkrétně u dvou proteinů Iripin-5 a Iripin-8. Inhibiční aktivita Iripinu-5 je závislá na jeho dávce. Při inkubaci erytrocytů se zvyšujícími koncentracemi Iripinu-5 došlo k jejich lýze. Serpin Iripin-8 vykazuje stejný systém inhibice, ale jeho anti-komplementová aktivita je oproti Iripinu-5 nižší. Serpiny se mohou podílet na inhibici komplementu již při přichycení na hostitele (Kašćáková *et al.*, 2021; Kotál *et al.*, 2021).

Serpiny v lidském séru mají protizánětlivý účinek. Je to dáno faktem, že nejvíce zastoupeným serpinem v lidském séru je α -1-antitrypsin, který působí hlavně proti neutrofilní elastáze. Dalším hojně zastoupeným serpinem v lidském séru, který má protizánětlivé účinky,

je antichymotrypsin. Serpiny ze slin klíštěte vykazují protizánětlivou aktivitu, jak v pokusech *in vivo*, tak *in vitro*. Jejich inhibiční specifita je vůči prozánětlivým proteázám jako je neutrofilní elastáza, katepsin G, plazmin nebo chymáza (Mangan *et al.*, 2008; Yaron *et al.*, 2021). Plazmin mimo své funkce v hemostáze (především při fibrinolýze), hraje roli i při rozvoji zánětlivé reakci, při které produkuje zánětlivé cytokiny, reguluje chemotaxi monocytů a dendritických buněk a přitahuje neutrofile do místa zánětu. Inhibice plazminu u klíštěcích serpinů byla prokázána, ale vztah mezi inhibicí a protizánětlivým účinkem nebyl prokázán. Serpiny AamS6, AAS19 a AAS27 z *A. americanum* vykazují antiplasminovou aktivitu. Mezi klíštěcími serpiny z *I. ricinus* měl nejvyšší inhibici Iripin-8, ale v dalších experimentech nevykazoval žádný protizánětlivý ani imunomodulační efekt (Kotál *et al.*, 2022; Syrovets *et al.*, 2012; Tirloni *et al.*, 2019). Mezi další serinové proteázy, na které míří klíšťata, patří neutrofilní elastáza, která zabíjí bakterie a aktivuje zánětlivé mediátory (Prevot *et al.*, 2006). Serpin Iripin-5 z *I. ricinus* inhibuje neutrofilní elastázu, čímž ovlivňuje migraci neutrofilů, dále prokazuje další protizánětlivé účinky tím, že snižuje produkci oxidu dusnatého makrofágy (Kašćáková *et al.*, 2021). Žírné buňky zastávají mnoho funkcí, mezi ně se řadí i regulace zánětu, ve své cytoplazmě obsahují velká granula obsahující zánětlivé mediátory (např. histamin, heparin, cytokiny, neutrální proteázy – chymáza, tryptáza) (Moon *et al.*, 2014). V obraně hostitele proti přisátí klíštěte hrají roli i proteázy katepsin G a chymáza, které jsou produkovány aktivovanými žírnými buňkami a podílejí se na zánětlivé odpovědi (Zarbock *et al.*, 2007). Chymáza žírných buněk ovlivňuje zánět na několika úrovních: štěpí prozánětlivé cytokiny/chemokiny, aktivuje proteázu aktivovaného receptoru 2, degraduje kontakt endotelových buněk, aktivuje eozinofily/neutrofile (Pejler *et al.*, 2010). Serpin IRS-2 z *I. ricinus* inhibuje chymázu, a tím ovlivňuje zánětlivou odpověď hostitele (Abbas *et al.*, 2022; Páleníková *et al.*, 2015). Cytokiny se podílejí na komunikaci mezi imunitními buňkami hostitele, a právě na produkci cytokinů se zaměřují i klíštěcí serpiny, kdy většinou modulují jejich účinek z protizánětlivých nebo prozánětlivé modulátory (Abbas *et al.*, 2022). Studie serpinů H1Serpina a H1Serpina-b z *H. longicornis* ukázala, že potlačují expresi prozánětlivých TNF- α , IL-6 a IL-1. Této skutečnosti bylo dosaženo v pokusu s makrofágy a dendritickými buňkami z kostní dřeně, které byly inkubovány se zmíněnými serpiny a indukovány LPS (Wang *et al.*, 2020).

1.2.2.3 Získaná imunita

Klíšťata *Ixodidae* sají krev několik dní, a tak k rozvinutí adaptivní imunity hostitele dochází až v pozdější fázi sání klíštěte. Získaná imunita se rozvíjí jak humorální, tak buněčná a při primární i opakované expozici. Dochází k uvolňování celé řady cytokinů a vznikají zánětlivé reakce zprostředkované Th1 buňkami, které jsou pro klíšťat škodlivé. Ovšem i na tyto obranné mechanismy hostitele se klíšťat přizpůsobila a ve svých slinách mají farmakologicky aktivní molekuly, které jim pomáhají bojovat proti hostiteli (Abbas *et al.*, 2022).

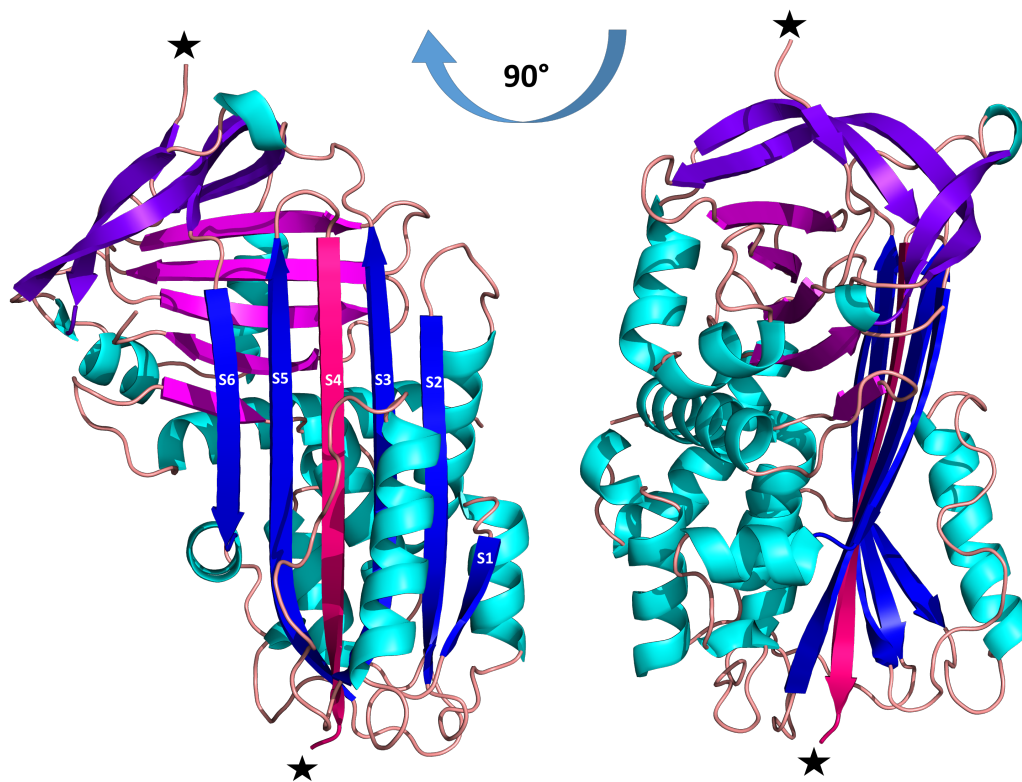
Některé klíštěcí serpiny modulují především proliferaci, přežívání a diferenciaci CD4+ T-lymfocytů, ale i produkci několika cytokinů. Studie Iripinu-3 z *I. ricinus* ukázala, že má imunomodulační a antihemostatické vlastnosti. Iripin-3 narušuje přežívání a proliferaci CD4+ T-lymfocytů, potlačuje diferenciaci pomocných T-lymfocytů na Th1 lymfocyty. Při stimulaci LPS makrofágů z kostní dřeně snižuje produkci IL-6 (Chlastáková *et al.*, 2021). U serpiny Iris bylo pozorováno, že potlačuje proliferaci CD4+ T-lymfocytů a produkci protizánětlivých cytokinů IFN- γ , IL-6, TNF- α a IL-8 (Leboulle *et al.*, 2002).

Dalšími buňkami, které hrají roli v adaptivní imunitě, jsou dendritické buňky tím, že ovlivňují směr imunitní odpovědi. Serpin RHS-2 z *R. haemaphysaloides* blokuje diferenciaci buněk kostní dřeně na dendritické buňky, zrání dendritických buněk, expresi CD80, CD86 a MHC-II, a také diferenciaci Th lymfocytů (Xu *et al.*, 2019).

Dalšími biologickými rolemi aktivovaných buněk je produkce cytokinů, proliferace a chemotaxe (Moro-García *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2020). Byla provedena studie u serpiny RmS-3, RmS-6 a RmS-17 z *R. microplus*, které snižují metabolickou aktivitu splenocytů a produkci cytokinu IFN- γ (Coutinho *et al.*, 2020).

1.2.3 Iripin-5

Ze studie Iripinu-5 (*I. ricinus* serpin-5) bylo zjištěno, že je serpinem vysoce exprimovaným ve slinných žlázách klíštěte obecného. Jeho exprese se zvyšuje při krmení krví na hostiteli. Iripin-5 má velikost 43,62 kDa a jeho izoelektrický bod 5,63. Poslední viditelným zbytkem v RCL neboli v místě P1 má arginin (Arg342). Na základě toho byl měl cílit inhibici na proteázy podobné trypsinu, ale nejvyšší inhibiční účinek Iripin-5 vykazoval proti lidské neutrofilní elastáze a proteináze 3. Rozštěpená forma Iripinu-5 je zachycena na Obr. 3. Iripin-5 je silným protizánětlivým serpinem. Inhibuje migraci neutrofilů, snižuje produkci oxidu dusnatého makrofágy a modifikuje funkce komplementu (Kaščáková *et al.*, 2021).



Obr. 3: Rozštěpená forma Iripinu-5 (Kaščáková *et al.*, 2021). Modře jsou vyznačeny β -skládané listy A, purpurově β -skládané listy B a fialově β -skládané listy C. Vložená RCL je zvýrazněna růžově. Místo, kde došlo ke štěpení s proteázou je označeno černými hvězdičkami.

V předložené práci byla ověřována funkčnost nově vyrobeného rekombinantního serpinu Iripin-5, který je dále funkčně charakterizován.

2. Cíle práce

- Zaklonovat serpin Iripin-5 do vektoru pET-19b.
- Vyrobit rekombinantní Iripin-5 v bakteriálním expresním systému a přečistit pomocí chromatografických metod.
- Ověřit biochemicky inhibiční aktivitu a otestovat biologickou aktivitu na buněčných kulturách.

3. Materiál a metody

3.1 Seznam chemikálií a kitů použitých v jednotlivých metodách, složení pufrů a gelů

Tab. I: Seznam chemikálií použitých během jednotlivých metod.

Název chemikálie	Další informace (výrobce, katalogové číslo)
Restrikce	
Restrikční enzym FastDigest NdeI	ThermoFisher, FD0584
Restrikční enzym FastDigest XhoI	ThermoFisher, FD0694
Pufr 10x FastDigest Green buffer	ThermoFisher, B72
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, R0581
DNA: vektor (pET19b), inzert (Iripin-5)	
Alkalická fosfatáza FastAP	ThermoFisher, EF0651
Marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	ThermoFisher, SM0321
Marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	ThermoFisher, SM1331
Ligace	
T4 DNA ligáza	NE BioLabs, M0202S
T4 DNA ligační pufr (10x)	NE BioLabs, B0202A
Naštěpený vektor a inzert	
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, R0581
Transformace do kompetentních buněk	
One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i> pro namnožení plazmidu s inzertem	ThermoFisher, C404003
One Shot BL21(DE3) pro expresi proteinu	ThermoFisher, C600003
Zásobní plazmid s inzertem	pET-19b s Iripin-5
S.O.C médium	2% bacto-trypton, 0,5% bacto-yeast extract, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukóza, pH 7,0; sterilní
LB médium	Sigma-Aldrich (Merck), L2897-250 (35 g v 1 l H ₂ O)
Ampicilin	Zásobní roztok: 50 mg/ml v H ₂ O
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, R0581
Colony PCR	

PCR master mix (2x)	ThermoFisher, K0171
T7 FWD primer (10 μ M)	Generi Biotech, 1000-020
T7 REV primer (10 μ M)	Generi Biotech, 1000-020
DNA	
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, R0581
LB médium	Viz transformace do kompetentních buněk
Ampicilin	Zásobní roztok: 50 mg/ml v H ₂ O
Pilotní exprese	
OmniPur IPTG	Calbiochem, 5815-25GM
LB médium	Viz transformace do kompetentních buněk
Ampicilin	Zásobní roztok: 50 mg/ml v H ₂ O
Příprava vzorků na SDS-PAGE	
PBS	Biosera, LM-S2043/500 (100 ml PBS + 900 ml H ₂ O)
RIPA filt. pufr	50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,5 % deoxycholát sodný, 0,1 % SDS, 10mM NaF, dH ₂ O
Laemmli pufr (4x)	Bio-Rad, 1610747
2 – Merkaptoetanol	Serva, 28625
SDS-PAGE	
Polyakrylamidový gel (12,5 %)	Složení viz Tab. III
5x ELFO pufr	15,1 g Tris, 72 g glycin, 5 g SDS do 1000 ml H ₂ O
1x ELFO	5x ELFO pufr 5x zředěný v dH ₂ O
PageRuler Prestained Protein Ladder	ThermoFisher, 26616
Coomassie Brilliant Blue R-250 barvicí roztok	Bio-Rad, 161-0436
Odbarvovací roztok	10 % kyselina octová, 20 % methanol, do 1 l dH ₂ O
dH ₂ O	
Western blot	
Materiál pro přípravu vzorků a SDS-PAGE	Viz příprava vzorků a SDS-PAGE
PVDF membrána	ThermoFisher, #88518
10x transferový pufr	25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1 % SDS, dH ₂ O
1x transferový pufr	100 ml 10x transferový pufr, 200 ml metanolu, 700 ml H ₂ O

Metanol	Penta, 21210-11000
TBS-T	1x TBS, 0,1% Tween
5 % odtučněné mléko v TBS-T	
Primární protilátka (monoclonal anti-polyhistidine)	Sigma-Aldrich, H1029
Sekundární protilátka (Goat anti-mouse IgG)	ThermoFisher, G-21040
Detekční roztok	Advansta, K-12042-D20
Expres ve velkém měřítku	
LB médium	Viz transformace do kompetentních buněk
Ampicilin	Zásobní roztok: 50 mg/ml v H ₂ O
OmniPur IPTG	Calbiochem, 5815-25GM
Afinitní chromatografie	
Kolona HisTrap HP (5 ml)	Cytiva, 71-5027-68 AK
Ekvilibrační pufr	20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8 (přefiltrovaný a degasovaný)
Eluční pufr	20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8 (přefiltrovaný a degasovaný)
Mili-Q voda	
Iontově výměnná chromatografie	
Kolona HiTrap Q HP	Cytiva, 71-7149-00 AP
Ekvilibrační pufr	20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8
Eluční pufr	20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 8
Gelová chromatografie	
Kolona Superdex75 10/300	Cytiva, 29163059 AC
Pufr	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8
Ověření biochemické aktivity Iripinu-5	
Iripin-5	Koncentrace 3 mg/ml
Trypsin	Sigma-Aldrich, T4799-5G
Substrát	Sigma-Aldrich, B2133-5MG
Pufr	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,01 % Triton X-100, pH 7,4
Stanovení produkce oxidu dusnatého makrofágy	
Kompletní médium	RPMI 1640 + 10 % BOFES + 1 % ATB + 1 % L-GL + 0,1 % ME
Trypanová modř	
Iripin-5	Koncentrace 3 mg/ml

Iripin-5 II	Koncentrace 58,3 μ M
LPS (zásobní roztok 10 μ g/ml)	Sigma-Aldrich, L2018
IFN- γ (zásobní roztok 100 μ g/ml)	ThermoFisher, PMC4031
Griessova reagens	1 % sulfanamid v 30 % kyselině octové, 0,1 % N(1-naphtyl) ethylendiamin dihydrochlorid 60 % kyselině octové
0,1 mM NaNO ₂	
Detekce přežívání buněk pomocí alamarBlue	
Médium	DMEM (hg) + 10 % BOFES + 1 % GL + 1 % ATB
Trypsin	Sigma-Aldrich, T4799-5G
PBS	Viz příprava vzorků na SDS-PAGE
Iripin-5	Koncentrace 3 mg/ml
BSA (zásobní roztok 30 μ M, rozpuštěn v dH ₂ O)	Biowest, PA0005R036
alamarBlue Cell Viability Reagent	Invitrogen, DAL1025
Migrace neutrofilů	
RPMI 1640	Biosera, LM-R1638/500
0,84% NH ₄ Cl v H ₂ O	
MACS pufr	2 mM EDTA v PBS + 2 % BOFES
Neutrophil Biotin Antibody cocktail	Miltenyi Biotec, 130-097-658
Anti-Biotin Microbread	Miltenyi Biotec, 130-097-658
Médium: RPMI 1640 + 10 % BOFES	
Médium: RPMI 1640 + 0,5 % BSA	
fMLP	Sigma-Aldrich, f3506-5MG
Iripin-5	Koncentrace 3 mg/ml
Proliferace T – lymfocytů	
Kompletní RPMI médium	RPMI 1640 + 10 % BOFES + 1 % ATB + 1 % L-GL + 0,1 % ME
0,84% NH ₄ Cl v H ₂ O	
CellTrace Violet Cell Proliferation kit	Invitrogen, C34557
PBS	Viz příprava vzorků na SDS-PAGE
BSA	Biowest, PA0005R036 (2 mg doplněno na 1 ml RPMI)
Iripin-5	Koncentrace 3 mg/ml
Protilátka anti-CD3	Biologend, 100340

Protilátka anti-CD28	Biolegend, 122022
FACS pufr	1 % BSA + 1 mM EDTA + PBS
Protilátka anti-mouse CD3 FITC	Invitrogen, 11-0031-82
Protilátka anti-mouse CD4 PE	Invitrogen, 12-0041-82
Protilátka anti-mouse CD8 PE-Cy7	Invitrogen, 25-0081-82

Tab. II: Seznam kitů použitých v jednotlivých metodách.

Název kitu	Další informace (výrobce, katalogové číslo)
Nucleospin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, 740410-50
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, 740588-250
ToxinEraser Endotoxin Removal Kit	GenScript, L00338
Neutrophil Isolation Kit	Miltenyi Biotec, 130-097-658
CellTrace Violet Cell Proliferation kit	Invitrogen, C34557

Tab. III: Složení agarózového a poylakrylamidového gelu.

Složení agarózového gelu (1%)	
Agaróza (Life technologies, 15510-027)	0,7 g
TAE pufr (40 mM Tris, 200 mM kyselina octová, 10 mM EDTA)	70 ml
SYBR Safe DNA gel stain (ThermoFisher, S33102)	7 µl
Složení polyakrylamidového gelu (12,5 %)	
Separační gel	
Chemikálie	Objem
dH ₂ O	2,075 ml
40 % acryl/bisakrylamid (ThermoFisher, J63079)	1,575 ml
4x (1,5 M) Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml
TCE (2, 2, 2, - trichloretanol), (Sigma-Aldrich, T54801-100G)	25 µl
10 % SDS	50 µl
TEMED (VWR, 0761-100 ml)	5 µl
10 % APS (Sigma-Aldrich, 7727-54-0)	50 µl
Isopropanol	500 µl pro vyrovnání
Zaostřovací gel	

Chemikálie	Objem
dH ₂ O	1,45 ml
40 % acryl/bisakrylamid (ThermoFisher, J63079)	250 µl
4x (1,5 M) Tris-HCl, pH 6,8	250 µl
TCE (2, 2, 2, - trichlorethanol), (Sigma-Aldrich, T54801-100G)	10 µl
10 % SDS	20 µl
TEMED (VWR, 0761-100 ml)	2 µl
10 % APS (Sigma-Aldrich, 7727-54-0)	20 µl

3.2 Buněčné linie

V rámci diplomové práce byly použity dvě různé buněčné linie (IC-21, HeLa CCL-2). Buněčná linie IC-21 byla kultivovaná při 37 °C v médiu RPMI 1640 + 10 % bovinní hovězí sérum (BOFES) + 1 % směs antibiotik (ATB) + 1 % L-glutamin (L-GL) + 50 mM 2-merkaptoetanol (ME). Buněčná linie HeLa CCL-2 byla kultivovaná při 37 °C s 5 % CO₂ v médiu DMEM (hg) + 10 % BOFES + 2 mM L-GL + 1 % směs ATB.

Linie IC-21 je makrofágovou myší buněčnou linií, která vznikla transformací peritoneálních makrofágů myši kmene C57BL/6 pomocí viru SV40 (simian virus 40).

Linie HeLa CCL-2 jsou první nesmrtelné lidské buňky, které byly vyizolované od pacientky s karcinomem děložního čípku.

3.3 Myši

Při pokusech byly k izolaci buněk použity 6 a 23 týdnů staré inbrední myši kmene C57BL/6N (Velaz s.r.o). Myši byly chovány za standardních podmínek ve zvěřinci na Katedře medicínské biologie Jihočeské univerzity v klecích s HEPA filtry udržujících prostředí prosté specifických patogenů (SPF).

3.4 Klonování

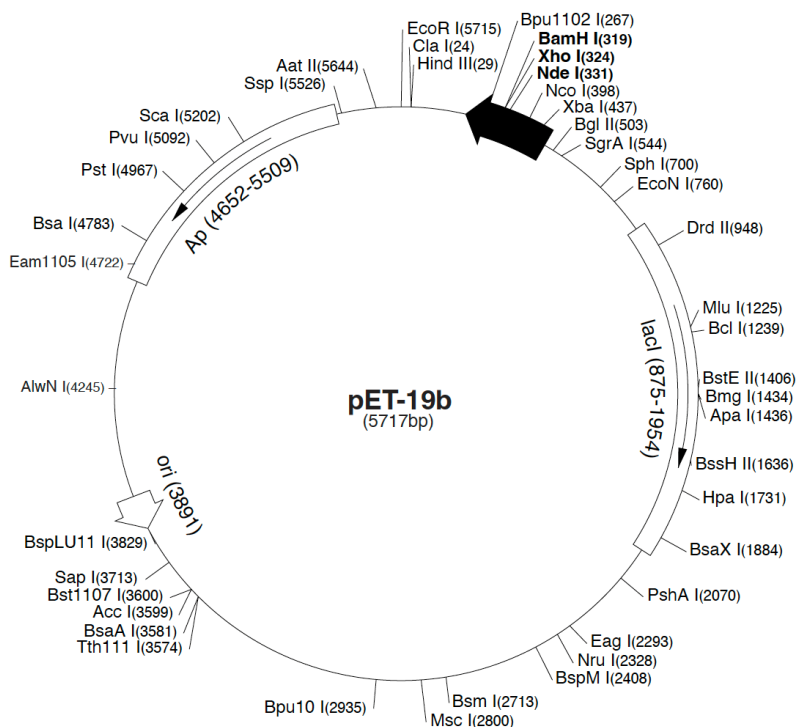
3.4.1 Vektor pET-19b

Pro zaklonování Iripinu-5 byl využit plazmid pET-19b (Obr. 4). Vektor nese rezistenci na antibiotikum ampicilin a obsahuje štěpná místa pro restriční enzymy XhoI a NdeI. Součástí pET-19b je polyhistidinová značka obsahující deset po sobě jdoucích histidinů, která

byla využita při prvotním přečištění (pomocí afinitní chromatografie) rekombinantního proteinu Iripin-5.

pET-19b sequence landmarks

T7 promoter	472-488
T7 transcription start	471
His•Tag coding sequence	366-395
Multiple cloning sites (<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
<i>lac</i> I coding sequence	875-1954
pBR322 origin	3891
<i>bla</i> coding sequence	4652-5509



Obr. 4: Schématické vyobrazení vektoru pET-19b (Novagen, 2022).

3.4.2 Restriční štěpení

Iripin-5 byl dodán v plazmidu pET-17b a byl vyštípnut v restričních místech XhoI a NdeI pomocí restričních enzymů XhoI a NdeI. Restriční reakce byla provedena i pro cílový vektor pET-19b, zde byly také využity restriční místa XhoI a NdeI a tomu příslušné restriční enzymy. Restriční reakce byla připravena dle Tab. IV.

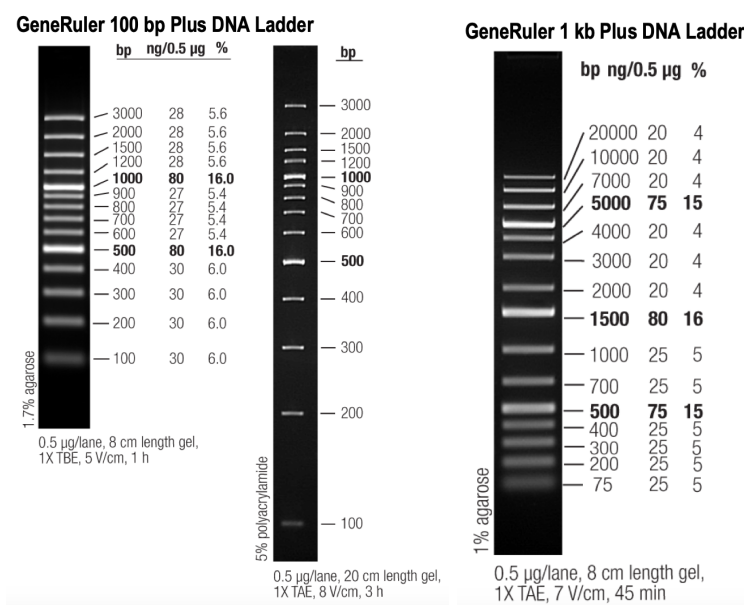
Tab. IV: Složení restriční reakční směsi (pro inzert i vektor).

Chemikálie	Objem
DNA*	takový objem, aby byl v reakci 1 µg
pufr 10x Green Buffer	2 µl
XhoI	1 µl
NdeI	1 µl
voda bez nukleáz	doplnit do 20 µl

*pro restriční reakci byla použita kódující DNA pro Iripin-5 o koncentraci 375 µg/ml a vektor pET-19b o koncentraci 936 µg/ml

Restriční reakční směs byla namíchána ve 200 µl zkumavkách zvlášť pro inzert a vektor. K restričnímu štěpení došlo během inkubace v PCR cycleru 5 minut / 37 °C. Restriční enzymy byly inaktivovány inkubací 5 minut / 80 °C. Po inaktivaci byl do reakční směsi vektoru přidán 1 µl alkalické fosfatázy, aby došlo k zabránění recirkulace vektoru během ligace (viz kapitola 3.2.3). Alkalická fosfatáza s plazmidem byla inkubována 10 minut / 37 °C, alkalická fosfatáza byla deaktivována inkubací 5 minut / 75 °C.

Po restrikci byl k vzorků přidán vzorkový pufr (Loading dye 6x) => k vzorkům byly napipetovány 4 µl a byly zanalyzovány pomocí elektroforézy na 1 % agarózovém gelu (nastavení programu: 100 mA, 100-150 V, 30-45 minut). Do první a do poslední jamky byly napipetovány 2 µl markeru (viz Obr. 5 – GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder). Gel byl po elektroforéze vyfocen pod UV filtrem (Alliance 4.7, UVitec Cambridge), proužky vektoru (4000 bp) a inzertu (cca 1200 bp) byly z gelu vyříznuty a přečištěny pomocí kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up dle návodu a vyeluovány do 30 µl vody bez nukleáz. Koncentrace byla změřena na spektrofotometru (NanoPhotometer P330, Implen).



Obr. 5: Schématické zobrazení markerů. Vlevo: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisher, 2024). Vpravo: GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher, 2024).

3.4.3 Ligace

Po restričním štěpení byl naštípnutý inzert Iripin-5 spolu s vektorem pET-19b zligován. Ligační reakce byla připravena podle protokolu výrobce, kdy byl do reakce přidán inzert a vektor v poměru 3:1. Na základě koncentrace a velikosti inzertu i vektoru bylo vypočteno jejich potřebné množství vstupující do reakce pomocí online kalkulačky NEBioCalculator (New England Biolabs, 2022).

Byla připravena ligační reakce o objemu 20 μl dle Tab. V.

Tab. V: Složení ligační reakční směsi.

Chemikálie	Objem
T4 ligase buffer	2 μl
vektor (pET-19b o koncentraci 30 ng/ μl a velikosti 5700 bp)	1,67 μl
inzert (Iripin-5 o koncentraci 27 ng/ μl a velikosti 1200 bp)	1,2 μl
T4 ligáza	1 μl
voda bez nukleáz	doplnit do 20 μl

Ligační směs byla inkubována přes noc v PCR cycleru při 16 °C, poté byla ligáza inaktivována inkubací v PCR cycleru 10 minut / 65 °C. Po inaktivaci byla reakce přenesena na led a byla provedena transformace do buněk TOP10.

3.4.4 Transformace do kompetentních buněk

Transformace byla provedena podle protokolu kompetentních buněk One Shot TOP10. Nejprve byly buňky rozmrazeny na ledu. K 25 μl buněk bylo přidáno 5 μl ligační reakce, zkumavka byla lehce promíchána lehkým poklepáním. Vzorek byl inkubován na ledu 30 minut. Teplotní šok byl proveden na 30 sekund ve vodní lázni o teplotě 42 °C. Vzorek byl vrácen zpět na led a bylo k němu napipetováno 250 μl předehřátého S.O.C média. Zkumavka byla umístěna do třepacího inkubátoru na 225 rpm / 1 hodinu / 37 °C.

Dvě LB agarové plotny s ampicilinem (finální koncentrace 50 $\mu\text{g/ml}$) byly předehřáty na 37 °C. Na jednu plotnu bylo rozetřeno 50 μl buněčné suspenze a zbytek buněčné suspenze byl rozetřen na druhou plotnu. Obě plotny byly inkubovány přes noc / 37 °C.

3.4.5 Colony PCR

Bylo připraveno a očíslováno 16 zkumavek (o objemu 200 μ l), do kterých bylo napipetováno 20 μ l vody bez nukleáz. Na novou plotnu s LB agarem a ampicilinem byla nakreslena mřížka a jednotlivá políčka byla očíslována, také narostlé kolonie byly očíslovány. Následně byla špičkou vypíchnuta samostatná očíslovaná kolonie, která následně byla přenesena do připravené zkumavky s 20 μ l vody bez nukleáz, a poté byl udělán křížek v políčku nové plotny s mřížkou. Negativní kontrola byla připravena tak, že špičkou bylo vybráno místo na plotně bez kolonií. Plotna s překřížkovanými koloniemi byla dána do inkubátoru přes noc / 37 °C. Následující den byly plotny s vyrostlými koloniemi přeneseny do lednice.

Byla namíchána colony PCR reakce (viz Tab. VI) o celkovém objemu 20 μ l. Pro colony PCR byly využity T7 (FWD a REV) primery. T7 FWD primer ve své sekvenci obsahuje štěpné místo pro restriční enzym NdeI a T7 REV primer štěpné místo pro XhoI. Tato štěpná místa byla využita pro ověření přítomnosti Iripinu-5 ve vektoru pET-19b.

Tab. VI: Složení colony PCR reakce.

Chemikálie	Objem
master mix	10 μ l
T7 FWD primer (10 μ M)	1 μ l
T7 REV primer (10 μ M)	2 μ l
DNA	1 μ l
voda bez nukleáz	5 μ l

Zkumavky byly dány do PCR cycleru a byl spuštěn program, viz Tab. VII.

Tab. VII: Nastavení PCR cycleru pro colony PCR.

95 °C	6 min	úvodní denaturace	} 30x
95 °C	15 s	denaturace	
54 °C	15 s	nasedání primerů	
72 °C	1 min 30 s	extenze (podle délky inzertu, 1 min/1 kb)	
72 °C	7 min	závěrečná extenze	
16 °C	nekonečno	vyzvednutí ze cycleru	

Vzorky po PCR byly smíchány s vzorkovým pufrem (Loading dye 6x) => k vzorkům byly napipetovány 4 μ l a zanalyzovány na 1 % agarózovém gelu (nastavení programu:

100 mA, 100–150 V, 30–45 minut). Do první jamky byly napipetovány 2 μ l markeru (viz Obr. 4). Gel byl po gelové elektroforéze vyfocen pod UV filtrem, na základě velikosti (cca 1200 bp) proužků na gelu bylo vyhodnoceno, které kolonie obsahuje inzert Iripin-5.

Vybrané pozitivní kolonie byly vypíchnuty špičkou a přeneseny do zkumavky (o objemu 50 ml) s 5 ml LB média a 5 μ l ampicilinu (finální koncentrace 50 μ g/ml). Připravené zkumavky byly dány do inkubátoru na 230 rpm / přes noc / 37 °C. Druhý den byl plazmid pET-19b s inzertem Iripin-5 vyizolován pomocí kitu Nucleospin Plazmid Isolation Kit. Bylo postupováno dle protokolu výrobce a plazmid s inzertem byl vyeluován do 30 μ l vody bez nukleáz. Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru (NanoPhotometer P330, Implen). Pro ověření správného zaklonování inzertu Iripin-5 do vektoru pET-19b, byly vzorky poslány na sekvenování do firmy SEQme. Pro sekvenování byly využity T7 primery (FWD a REV).

Byly připraveny glycerol stocky. Z překřížkované plotny byla vybrána pozitivní kolonie a pomocí špičky nabrána a přendána do zkumavky (objem 50 ml) s 5 ml LB média a 5 μ l ampicilinu. Zkumavka byla dána do inkubátoru na 230 rpm / přes noc / 37 °C. Druhý den bylo do kryu zkumavky napipetováno 400 μ l 50 % glycerolu a 400 μ l kultury. Pro Iripin-5 byly připraveny tři glycerol stocky ze tří různých kolonií, které byly uloženy do mrazáku na – 80 °C.

3.4.6 Transformace do BL21(DE3) buněk

Transformace plazmidu pET-19b inzertem Iripin-5 byla provedena do kompetentních buněk BL21(DE3). Zkumavka s 50 μ l buněk byla rozmrazena na ledu během cca 10 minut. K buňkám byl přidán 1 μ l pET-19b s Iripin-5 (podle protokolu by měla být koncentrace plazmidové DNA v 1–5 μ l v rozmezí 5–10 μ g/ml). Zkumavka byla promíchána poklepáním na dno zkumavky, následně byla ponechána na ledu po dobu 30 minut. Teplotní šok byl proveden při 42 °C na 30 sekund a zkumavka s transformační směsí byla položena zpět na led. K buňkám bylo přidáno 250 μ l S.O.C. média pokojové teploty a zkumavka byla dána do inkubátoru na 225 rpm / 1,5 hod / 37 °C. Na dvě předem předeřáté LB agarové plotny s ampicilinem byla vyseta transformační směs, kdy na jednu bylo napipetováno 50 μ l směsi a na druhou zbytek. Plotny byly inkubovány přes noc / 37 °C.

3.5 Pilotní exprese

Pilotní exprese byla zahájena vybráním tří kolonií, které byly vypíchnuty a přeneseny do jednotlivých zkumavek (objem 50 ml) s 10 ml LB média a 10 µl ampicilinu (finální koncentrace 50 µg/ml). Inkubace byla při 230 rpm / přes noc / 37 °C. Takto byla připravena startovací kultura.

Druhý den byly připraveny dvě zkumavky (50 ml) pro každou kolonii, kdy jedna zkumavka byla pro startovací kulturu a druhá zkumavka sloužila jako negativní kontrola. Byly vybrány tři kolonie, pro které byla provedena pilotní exprese. Do každé zkumavky bylo napipetováno 15 ml LB média, 15 µl ampicilinu a 1 ml startovací kultury. Ze zbytku startovací kultury byly připraveny glycerol stocky (viz kapitola 3.2.5). Glycerol stock kolonie s nejlepší expresí byl následně použit k další expresi.

Kultura byla ponechána v inkubátoru při 230 rpm / 37 °C, dokud nebylo dosaženo mid – log fáze neboli podle protokolu buňky nedosáhly OD₆₀₀ (optická denzita při 600 nm). OD₆₀₀ bylo měřeno pomocí spektrofotometru (NanoPhotometer P330, Implen). Po dosažení hodnoty OD₆₀₀ byla započata indukce přidáním induktoru IPTG (finální koncentrace 1 mM), která probíhala při 230 rpm / 37 °C. IPTG bylo přidáno pouze do zkumavek, které nesloužily jako negativní kontrola. Byly sbírány 1 ml vzorky v čase 0, 2, 8, 24 hodin. Odebrané vzorky byly stočeny při 12000 rpm / 1 min. Zbylé médium bylo odstraněno a buněčný pelet byl uložen do mrazáku na – 20 °C.

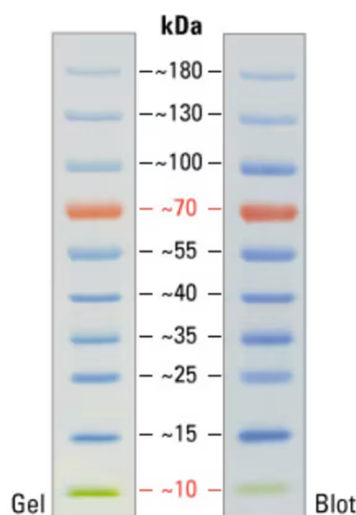
3.6 Analýza přítomnosti proteinu

3.6.1 Příprava vzorků z pilotní exprese

Roztáté buněčné pelety byly promyty 200 µl PBS, stočeny 15000 rpm / 3 minuty, supernatant byl odebrán a vyhozen. Pelety byly resuspendovány v 500 µl RIPA filt. pufru. Vzorky byly rychle zmrazeny v tekutém dusíku a následně zahřáty na 42 °C, tyto dva kroky byly provedeny celkem 4krát. Poté byly vzorky stočeny na 10000 rpm / 10 minut / 4 °C. Supernatanty byly přesunuty do nových zkumavek. Vzorkovací pufr byl připraven smícháním Laemmlí pufru s merkaproetanolem v poměru 1:9. K supernatantům byl přidán vzorkovací pufr v poměru 1:3 (6,5 µl vzorkovacího pufru + 19,5 µl vzorku). K peletům bylo nejprve přidáno 500 µl PBS a poté vzorkovací pufr v poměru 1:3 (6,5 µl vzorkovacího pufru + 19,5 µl vzorku). Připravené vzorky byly povařeny 10 minut / 95 °C. Zbytek peletů a supernatantů byl uložen do mrazáku na – 20 °C.

3.6.2 SDS-PAGE (SDS – polyakrylamidová gelová elektroforéza)

Vzorky získané z pilotní exprese a z některých následujících metod byly zanalyzovány pomocí SDS-PAGE. Metoda byla využita především pro kontrolu studovaného proteinu (čistota a přítomnost ve vzorku). Byl připraven 12,5 % polyakrylamidový gel. Na první pozici na gelu byl napipetován marker o objemu 5 μ l (PageRuler Protein Prestained Ladder, viz Obr. 6), který ukazuje molekulové hmotnosti proteinů od 10–180 kDa. Do dalších jamek gelu byly napipetovány vzorky o objemu 10 μ l. Program byl nastaven na 150 V, 160 mA, 100 W a 1,5 hod. Gel byl vyfocen pod UV filtrem (Alliance 4.7, UVItec Cambridge). Některé gely byly barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue barvicího roztoku po dobu 30 minut. Odbarveny byly v odbarvovacím roztoku, 2x omyty destilovanou vodou a poté ponechány přes noc v destilované vodě.



Obr. 6: Marker PageRuler Protein Prestained Ladder (ThermoFisher, 2024).

3.6.3 Western blot

Pro potvrzení přítomnosti proteinu Iripin-5 byl proveden Western blot. Na základě výsledků z SDS-PAGE byla vybrána kolonie 2. Vzorky supernatantů i peletů (připraveny v kapitole 3.4.1) byly nejprve naředěny 10x pomocí PBS (1,95 μ l vzorku + 17,55 μ l PBS) a poté byl přidán vzorkovací pufr v poměru 1:3 (6,5 μ l vzorkovacího pufru + 19,5 μ l vzorku) s následným povařením 10 minut / 95 °C. Separace vzorků byla provedena pomocí SDS-PAGE ve 12,5 % gelu. Blotování proběhlo v Semi-Dry aparatuře, kdy nejprve byly namočený 3 filtrační papíry v 1x transferovém pufru a umístěny na blotovací desku. Membrána byla aktivována v metanolu, poté byla omyta v 1x transferovém pufru a položena na filtrační

papíry. Na membránu byl položen gel z SDS-PAGE s rozseparovanými vzorky a na něj nakonec byly umístěny 3 filtrační papíry namočené v 1x transferovém pufru. Nastavení elektrického zdroje pro přenášení proteinů z gelu na membránu bylo: 63 mA, 150 V, 60 minut.

Přeblotovaná membrána byla promyta v roztoku TBS – T. Zablokování nespecifických vazebných míst proběhlo v 5 % odtučněném mléce s TBS – T na třepačce po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Primární protilátka byla naředěna 1:10 000 do 10 ml 5 % odtučněného mléka s TBS – T. Membrána s roztokem primární protilátky byla inkubována přes noc v chladové místnosti. Druhý den byla membrána 2x rychle promyta v TBS – T s následným 15 minutovým promýváním v TBS – T na třepačce. Nakonec byla membrána ještě promyta 2x 5 minut v TBS-T na třepačce. Sekundární protilátka byla naředěna v poměru 1:20 000 v 10 ml 5 % odtučněného mléka s TBS – T. Membrána byla inkubována s naředěnou sekundární protilátkou 1 hodinu při pokojové teplotě na třepačce. Po ukončení inkubace byla membrána ještě 3x 5 minut promyta v TBS – T. Detekční roztok byl nakapán na membránu a inkubován 1 minutu. Membrána byla vyfocena na chemiluminiscenci (Alliance 4.7, UVItec Cambridge).

3.6.4 Hmotnostní spektrometrie

Byla provedena SDS-PAGE pro vzorek z kolonie dva – supernatant, odebraný po 8 hodinách, bez induktoru, který byl připraven viz kapitola o přípravě vzorků z pilotní exprese. Po separaci na 12,5 % gelu byl vyříznut pruh odpovídající velikosti a poslán na analýzu pomocí hmotnostní spektrometrie.

3.7 Exprese ve velkém měřítku

Do čtyřech skleněných Erlenmayerových lahví bylo napipetováno 125 ml LB média, ampicilin (finální koncentrace 50 µg/ml) a k tomu do každé lahve byl špičkou vypíchnut Iripin-5 v plazmidu pET-19b z kolonie 2 z pilotní exprese v glycerol stocku (připraven dle kapitoly 3.2.5). Připravené kultury byly dány do třepačky na 180 rpm / přes noc / 37 °C.

Druhý den byly připraveny čtyři 2 l Erlenmayerové kultivační lahve. Bylo do nich napipetováno 200 ml LB média, 200 µl ampicilinu (finální koncentrace 50 µg/ml) a noční kultura. Láhve byly dány do třepačky na 220 rpm / 37 °C. Po jedné hodině bylo přidáno 600 ml LB média s ampicilem. Po dosažení hodnoty OD₆₀₀ byly odebrány 1 ml vzorky z každé lahve, které byly zpracovány jako v kapitole 3.4.1 (centrifugace 10000 rpm / 1 minuta, odstranění supernatantu a uskladnění peletu v mrazáku na – 20 °C). Indukce proteinů byla zahájena přidáním IPTG (finální koncentrace 1 mM) do třech lahví, čtvrtá lahev sloužila jako

kontrola. Kultury byly ponechány v třepačce na 220 rpm / přes noc / 37 °C (na základě výsledků z pilotní exprese).

Následující den bylo odebráno 1 ml vzorků, které byly zpracovány viz kapitola 3.4.1 (centrifugace 10000 rpm / 1 minuta, odstranění supernatantu a uskladnění peletu v mrazáku na – 20 °C). Kultury byly přesunuty do speciálních lahví a stočeny na centrifuze 4200 rpm / 30 minut / 4 °C. Supernatantu bylo ponecháno cca 20 ml a resuspendované buňky byly znovu zcentrifugovány v 50 ml zkumavkách na 4500 rpm / 20 minut / 4 °C. Supernatant byl vylit a pelet byl uchován v mrazáku při – 80 °C pro další purifikační kroky. Po dokončení exprese ve velkém měřítku byla provedena SDS-PAGE.

3.8 Afinitní chromatografie

Získané pelety z exprese ve velkém měřítku byly resuspendovány v cca 50 ml ekvilibračního pufru A pro afinitní chromatografii, pro lepší rozpuštění byly buňky zvortexovány. Buněčná suspenze byla přelita do microfluidizeru (LM20 Microfluidizer, MFIC, USA), pomocí kterého byly buňky rozbity. Suspenze byla stočena v centrifuze na 40695 rcf / 1 hod / 4 °C. Supernatanty byly slity k sobě do jedné zkumavky (50 ml) a pelety byly uloženy do nové zkumavky (50 ml) do mrazáku na – 80 °C.

Pro prvotní purifikaci Iripinu-5 byla použita afinitní chromatografie s kolonou HisTrap HP o objemu 5 ml, při které byla využita zavedená polyhistidinová značka na Iripin-5. Kolona byla udržována v 20 % etanolu, tzn., že před samotnou purifikací byla nejprve promyta destilovanou vodou a následně ekvilibračním a elučním pufrem. Po promytí byl vzorek nanesen na kolonu. Průtok byl nastaven na 2 ml/min. Po nanesení vzorku na kolonu byl proveden „soft wash (SW)“ = promytí kolony nízkou koncentrací imidazolu (finální koncentrace 50 mM), průtok kolonou byl nastaven na 1 ml/min. Tímto krokem byly odstraněny proteiny z *E. coli*, které byly slabě navázány na kolonu tím, že mohou obsahovat několik histidinů. Polyhistidinová značka, která byla zavedena k Iripinu-5, obsahuje 10 histidinů jdoucích po sobě, tudíž je vazba na kolonu daleko silnější. Po zvýšení UV absorbance byl pro eluci proteinu nastaven gradient, bylo pumpováno 100 % elučního pufru, 20 minut, velikost frakcí byla nastavena na 2 ml. Nakonec byla kolona promyta při průtoku 5 ml/min ekvilibračním a elučním pufrem, destilovanou vodou a etanolem. Informace z průběhu chromatografie byly zaznamenány na chromatogram. Získané frakce afinitní chromatografií byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

3.9 Iontově výměnná chromatografie

Na základě výsledků z afinitní chromatografie byly spojeny vybrané frakce do jednoho vzorku a ten byl přečištěn pomocí iontově výměnné chromatografie za využití kolony HiTrap Q HP o objemu 5 ml. Kolona byla udržována ve 20 % etanolu, takže nejprve byla promyta destilovanou vodou, ekvilibračním a elučním pufrem pro iontově výměnnou chromatografii. Po promytí byl nanesen vzorek na kolonu. Průtok byl nastaven na 2 ml/min. Po zvýšení UV absorbance byl nastaven gradient: 100 % elučního pufru, 40 minut. Frakce byly sbírány o objemu 2 ml. Po dokončení frakcionace byla kolona promyta elučním a ekvilibračním pufrem, destilovanou vodou a 20 % etanolem. Informace potřebné k purifikaci byly zaznamenány do chromatogramu. Získané frakce byly zanalyzovány pomocí SDS-PAGE. Vzorky získaných frakcí pro analýzu SDS-PAGE byly naředěny 10x v PBS.

3.10 Gelová chromatografie

Pro další přečištění byla vybrána nejkonzentrovanejší frakce z iontově výměnné chromatografie. Pro gelovou chromatografii byla využita kolona Superdex75 10/300. Kolona byla skladována v 20 % etanolu, před počítím purifikace byla promyta destilovanou vodou a pufrem pro gelovou chromatografii. Vzorky před nanesením na kolonu byly stočeny na 14000 rpm / 5 minut / 4 °C. Na kolonu byly nanášeny vzorky o objemu 500 µl. Průtok na purifikaci byl nastaven na 0,3 ml/min. Frakcionace byla zahájena se zvyšující se UV absorbancí a byly sbírány jednotlivé frakce o objemu 500 µl. Celkem byly provedeny čtyři samostatné purifikace pro vybranou frakci z iontově výměnné chromatografie. Po ukončení sběru frakcí byla kolona promyta destilovanou vodou a uchována v 20 % etanolu. Průběhy chromatografií byly zaznamenány do chromatogramu. Nasbírané frakce byly zanalyzovány pomocí SDS-PAGE, byla u nich změřena koncentrace pomocí Nanodrop One (ThermoFisher). Pro ověření, že byl opravdu přečištěn Iripin-5, byl vzorek pro potvrzení ověřen hmotnostní spektrometrií. Posbírané frakce byly uloženy do zkumavek po 500 µl do mrazáku na – 80 °C a uchovány pro další experimenty. Byl proveden pokus o dekontaminaci LPS Iripinu-5 pomocí kitu ToxinEraser Endotoxin Removal Kit dle návodu výrobce.

3.11 Ověření biochemické aktivity Iripinu-5

Pro ověření biochemické aktivity Iripinu-5 byla provedena enzymatická inhibiční esej. Inhibiční reakce byly provedeny v 96-jamkové destičce v triplikátech při pokojové teplotě. Inhibiční schopnost rekombinantního proteinu Iripin-5 byla vyzkoušena s různými finálními

koncentracemi: 300 nM, 100 nM, 50 nM a 25 nM. Proteáza, vstupující do reakce, byl trypsin, který byl přidán o finální koncentraci 50 nM. Použitá koncentrace proteázy byla zvolena na základě jejích biochemických vlastností, aby byla detekována hydrolýza substrátu a zároveň bylo dosaženo nasycení reakce. Nejprve byl rekombinantní protein inkubován s proteázou deset minut, poté byl do reakce přidán chromogenní substrát finální koncentrace 200 μ M. Rychlost hydrolýzy v přítomnosti i nepřítomnosti Iripinu-5 byla stanovena pomocí změření absorbance spektrometrem (Tecan Infinite M Plex, Tecan Group Ltd.) při 412 nm a teplotě 30 °C.

3.12 Stanovení produkce oxidu dusnatého makrofágy

Pro stanovení oxidu dusnatého (NO) byla vybrána makrofágová buněčná linie IC-21. Pro získání buněčné suspenze byly buňky seškrábány ze dna kultivační láhve a spočítány v Bürkerově komůrce. Potřebné množství buněk bylo odebráno do centrifugační zkumavky a stočeno 250 *rcf* / 6 minut / 4 °C. Vzniklý pelet byl resuspendován v kompletním médiu (složení kompletního média viz Tab. I).

Buňky byly rozpipetovány po 100 μ l (1 x 10⁵ buněk na jamku) do 96 jamkové destičky. K buňkám byl přidán Iripin-5 (nově vyizolovaný Iripin-5, se kterým se pracuje v rámci této diplomové práce) ve finální koncentraci 6 μ M, Iripin-5 II (starší várka Iripin-5 ze zásoby Katedry medicínské biologie, byl přečištěn od LPS) ve finální koncentraci 6 μ M. Iripiny byly inkubovány s buňkami 2 hodiny / 37 °C s 5 % CO₂. Po inkubaci byly k buňkám přidány aktivátory: LPS (finální koncentrace 500 ng/ml) a IFN- γ (finální koncentrace 50 ng/ml). Pro pokus byly připraveny kontroly negativní a pozitivní. Negativní kontrola byly pouze inkubované buňky v kompletním médiu. Pozitivní kontrola byly buňky v kompletním médiu aktivované aktivátory. Buňky byly inkubovány 24 hod / 37 °C s 5 % CO₂. Pokus byl proveden v triplikátech.

Koncentrace NO byla stanovena po inkubaci pomocí Griessova testu. Griessův test je založen na detekci dusitanů. Po přidání Griessova činidla dojde v přítomnosti dusitanů ke změně zbarvení substrátu – změna zbarvení je detekována pomocí spektrometru. Do 96 jamkové destičky byla připravena kalibrační řada 0,1 mM NaNO₂, která byla vyředěna dvojkovou řadou. Supernatant kultury o objemu 100 μ l byl smíchán se 100 μ l Griessova reagens. Blank byl použité kultivační médium. Panel se vzorky byl inkubován 10 minut ve tmě při pokojové teplotě. Absorbance byla změřena na spektrometru (Tecan Infinite M Plex, Tecan Group Ltd.) při 540 nm.

3.13 Detekce přežívání buněk pomocí alamarBlue™

Pro detekci přežívání buněk byla vybrána buněčná linie HeLa CCL-2. Buňky byly kultivovány v médiu (viz Tab. I) při 37 °C s 5 % CO₂. Pokus byl proveden na 96 jamkové destičce v triplicátech. Buňky byly nasazeny po 100 µl na jamku v množství 2 x 10⁴ buněk/ml a inkubovány cca 3 hod / 37 °C s 5 % CO₂, aby došlo k adhezii buněk na dna jamek. Po inkubaci bylo k buňkám přidáno 100 µl Iripin-5 (finální koncentrace 6 µM) nebo 100 µl proteinového standardu BSA (finální koncentrace 6 µM). Kultivační destičky byly inkubovány v termostatu při 37 °C a 5 % CO₂. Přežívání buněk bylo stanoveno v časových intervalech 24 a 48 hodin.

Pro stanovení přežívání buněk byl využit roztok alamarBlue™, který obsahuje fluorescenční barvivo resazurin modré barvy. Metabolicky aktivní buňky redukují modré barvivo resazurin na silně růžový fluorescenční resorufin. Resorufin lze detekovat pomocí fluorescence. Před přidáním do jamek byl alamarBlue™ předředěn v médiu (viz Tab. I), aby bylo finální ředění v jamce 10x. V určených časových intervalech bylo od buněk odebráno veškeré médium a přidáno 100 µl 10x naředěného roztoku alamarBlue™. Buňky byly inkubovány v termostatu 3 hod / 37 °C s 5 % CO₂.

Po uplynutí doby inkubace byl obsah jamek přenesen do nových jamek. Fluorescence (excitační vlnová délka: 560 nm, emisní vlnová délka: 590 nm) byla změřena na spektrometru (Tecan Infinite M Plex, Tecan Group Ltd.). Z naměřených hodnot byl odečten blank (médium bez buněk) a hodnota nestimulovaných buněk byla považována za 100 %.

3.14 Migrace neutrofilů

Neutrofilů byly izolovány z kostní dřeně myši. Myš byla usmrcena zlomením vazů, zadní končetiny byly odděleny. Stehenní a holenní kosti byly zbaveny kůže, důkladně očištěny a omyty v médiu RPMI. Konce kostí byly odstraněny a kostní dřeň byla získána promytím injekční stříkačkou s jehlou RPMI médiem. Buněčná suspenze byla separována přes sítko (70 µm) do centrifugační zkumavky a zcentrifugována 1200 rpm / 5 minut / 4 °C. Pelet byl resuspendován v 1 ml NH₄Cl v H₂O ohřátým na 37 °C za účelem eliminace kontaminujících erytrocytů osmotickou lýzou. Po 2 minutách byla reakce zastavena přidáním 10 ml RPMI média (přidán desetinasobek vůči NH₄Cl v H₂O), aby nedošlo k lýze dalších krevních buněk. Buňky byly zcentrifugovány 250 g / 5 minut / 4 °C. Vzniklý pelet byl resuspendován v MACS pufu.

Ze suspenze buněk kostní dřeně byly neutrofilily získány magnetickou separací (negativní selekce) pomocí soupravy pro izolaci neutrofilů podle protokolu výrobce. Získané neutrofilily byly resuspendovány v médiu RPMI + 10% BOFES. Iripin-5 (finální koncentrace: 3 μ M a 6 μ M) byl předinkubován s vyizolovanými neutrofilily (5×10^5 buněk / 100 μ l insert) v inkubátoru 1 hod / 37 °C. Předinkubovány byly i buňky pro pozitivní a negativní kontrolu.

Pro analýzu byla využita 24 jamková migrační destička s velikostí pórů 5 μ m (Transwell Corning, 3421). Pokus byl prováděn v duplikátech. Po inkubaci byla do horní části insertu destičky napipetována směs neutrofilů s Iripinem-5, pozitivní a negativní kontrola. Do spodní části insertu bylo napipetováno 600 μ l RPMI + 0,5% BSA s nebo bez fMLP (N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin) (finální koncentrace 1 μ M). Inkubace byla v inkubátoru 1 hod / 37 °C s 5 % CO₂. Následně byla do spodní části insertu napipetována EDTA (finální koncentrace 3 μ M), aby byly buňky uvolněny z insertu. Migrace byla stanovena počítáním buněk ve spodní části insertu pomocí Bürkerovy komůrky. Pokus byl opakován třikrát.

3.15 Proliferace T-lymfocytů

Pro pokus byly použity myši slezinné buňky (splenocyty). Myš byla usmrcena zlomením vazy. Vyizolovaná slezina byla protlačena přes sítko (70 μ m) do kompletního média (10 ml, viz Tab. I) v centrifugační zkumavce a stočena 300 g / 5 minut / 4 °C. Vzniklý pelet byl resuspendován v 0,84% NH₄Cl v H₂O ohřátým na 37 °C za účelem lýzování červených krvinek. Reakce byla zastavena po 2 minutách přidáním 10 ml kompletního média. Buňky byly počítány a příslušné množství bylo odebráno na pokus a pro kompenzační kontroly (na nastavení průtokového cytometru). Obě skupiny buněk byly zcentrifugovány 300 g / 5 minut / 4 °C. Vzniklý pelet buněk na kompenzační kontroly byl resuspendován v kompletním médiu, aby dosažena koncentrace buněk byla 1×10^6 buněk/ml. K peletu buněk na pokus byla přidána proliferační barva CellTrace Violet (CTV). CTV je fluorescenční barva, která má excitační vlnovou délku 405 nm a emisní vlnovou délku 450 nm, je detekována v kanálu Pacific Blue. CTV byla přidána ve finální koncentraci 5 μ M a inkubována s buňkami ve tmě 20 min / 37 °C. Reakce byla zastavena přidáním 5 ml kompletního média a inkubována 5 minut / 37 °C.

Pro experiment bylo třeba 2×10^5 buněk na jamku ve 200 μ l. Vzniklý pelet byl resuspendován kompletním médiu, aby bylo dosaženo požadované koncentrace buněk. Pro každou skupinu byl odebrán příslušný objem buněk do zkumavek a inkubován s Iripinem-5

(finální koncentrace 3 μ M a 6 μ M), či BSA (6 μ M) 1 hod / 37 °C. Po uplynutí doby inkubace byly buňky stimulovány přidáním protilátek anti-CD3 a anti-CD28 v poměru 1:1 (finální koncentrace 2 μ M) do příslušných zkumavek. Nakonec byly obsahy zkumavek rozpipetovány do 96 jamkové destičky (viz Tab. VIII) v triplicátech a inkubovány 72 hod / 37 °C s 5 % CO₂. Inkubovány byly i kompenzační kontroly.

Tab. VIII: Schéma 96 jamkové destičky.

Číslo skupiny	1	2	3	4	5	6
Iripin-5 [3 μ M]	+	-	-	-	-	-
Iripin-5 [6 μ M]	-	+	-	-	-	-
BSA [6 μ M]	-	-	+	-	-	-
Protilátky anti-CD3, anti-CD28	+	+	+	+	-	+
CTV	+	+	+	+	+	-

Po uplynutí doby inkubace byl obsah jamek propipetováno a přenesen do FACS zkumavek. Objem z přepipetovaných zkumavek byl doplněn PBS na 1 ml. Zkumavky byly zcentrifugovány 500 g / 5 minut / 4 °C. Pelet byl resuspendován v 1 ml FACS pufru a stočen 500 g / 5 minut / 4 °C. Tento proces byl proveden 2krát. Vzniklý pelet byl resuspendován v 90 μ l FACS pufru.

Nakonec byl resuspendovaný pelet buněk kromě kompenzačních kontrol obarven myšími protilátkami anti-mouse CD3 s fluorescenčním barvivem FITC (fluorescein isothiocyanate) (ředění 100x), anti-mouse CD4 s fluorescenčním barvivem PE (phycoerythrin) (ředění 200x), anti-mouse CD8 s fluorescenčním barvivem PE – Cy7 (phycoerythrin – Cyanin 7) (ředění 400x). Ke kompenzačním kontrolám byla přidána vždy jedna protilátka (ve stejném ředění jako k vzorkům), plus jedna kontrola byla nebarvená. Po přidání protilátek byly vzorky mírně zvortexovány a inkubovány 20 minut v lednici. Nakonec byly obsahy zkumavek doplněn na 2 ml FACS pufrem, stočen 500 g / 5 minut / 4 °C. Vzniklý pelet byl resuspendován ve 200 μ l FACS pufru.

Proliferace T – lymfocytů byla analyzována průtokovou cytometrií na přístroji NovoCyte 3000 (Acea) pomocí softwaru NovoExpressSoftware. Pokus byl zopakován třikrát.

3.16 Statistické vyhodnocení dat

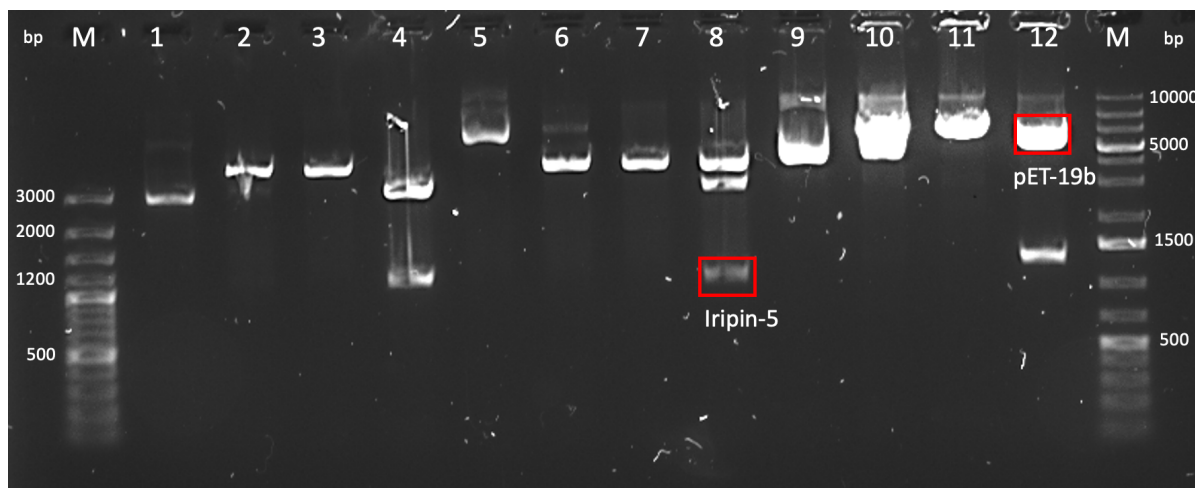
Veškeré grafy a statistické analýzy byly provedeny v programu GraphPad Prism 9.4.1. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Rozdíly mezi dvěma a více skupinami byly

vyhodnoceny metodou jednocestné analýzy variace (ANOVA). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou v grafech označeny hvězdičkami (* $P \leq 0,0332$; ** $P \leq 0,0021$; *** $P \leq 0,0002$; **** $P \leq 0,0001$; *ns* = nesignifikantní). Všechny grafy ve výsledcích zobrazují aritmetické průměry ze stanovených hodnot a chybové úsečky v grafech představují \pm střední chybu průměru (SEM).

4. Výsledky

4.1 Příprava vektoru pET-19b s inzertem Iripin-5

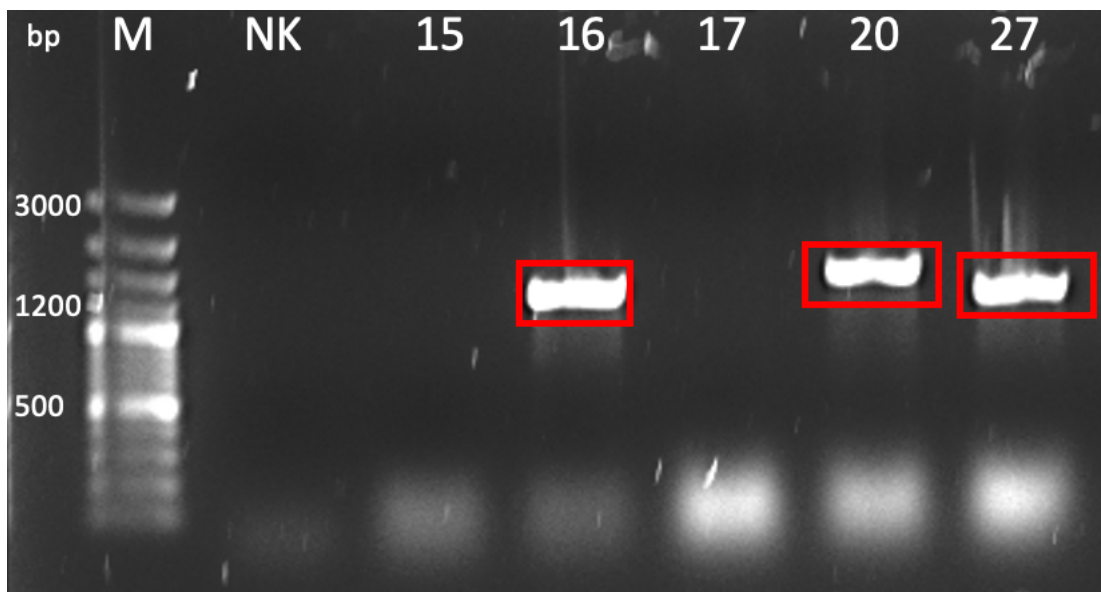
Výsledek restrikce inzertu Iripinu-5 a vektoru pET-19b byl vyobrazen na Obr. 7.



Obr. 7: Gel restrikčního štěpení. Vlevo M – marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, vpravo M – marker (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder), inzert Iripinu-5 (červený rámeček) a vektoru pET-19b (červený rámeček).

Na Obr. 7 je vidět vyštípnutý inzert Iripin-5 (cca 1200 bp) a vektor pET-19b (cca 5000 bp) (inzert i vektor jsou vyobrazeny v červených rámečcích), čímž bylo potvrzeno, že restrikce proběhla správně. Koncentrace Iripinu-5 vyizolovaného z agarózového gelu byla 13,75 ng/μl a plazmidu pET-19b 16 ng/μl.

Po restrikci byla provedena ligace, následována transformací do kompetentních buněk, které byly vysety na plotnu s LB agarem s ampicilinem. Bylo vybráno 16 kolonií, které byly otestovány na přítomnost Iripinu-5. Výsledek colony PCR je vyobrazen na Obr. 8.



Obr. 8: Colony PCR: M – marker, NK – negativní kontrola, 15–27 – testované kolonie. Označené proužky představují pozitivní kolonie.

Iripin-5 by se měl pohybovat okolo velikosti 1200 bp. Na gelu jsou celkem tři pozitivní kolonie (tři pruhy okolo velikosti 1200 bp). Prostřední band pozitivní kolonie 20 je větší v porovnání s ostatními pozitivními koloniemi. Negativní kontrola vyloučila kontaminaci.

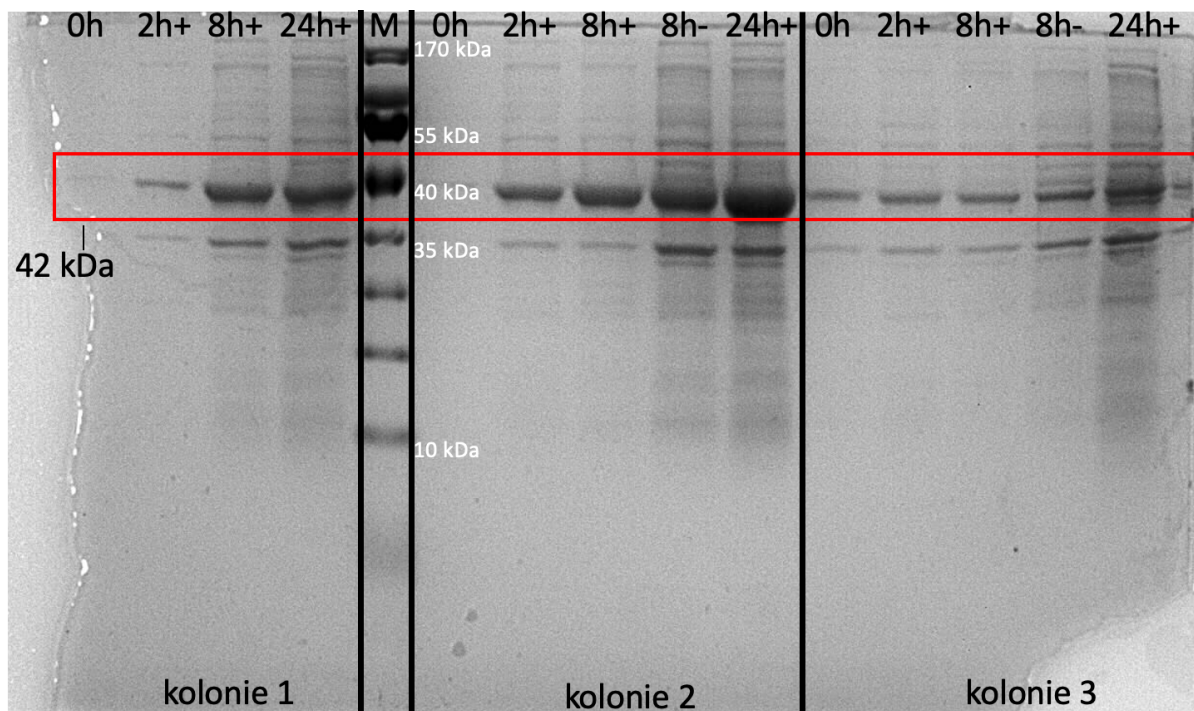
Pozitivní kolonie byly namnoženy v LB médiu s ampicilinem. K vyizolování vektoru pET-19b s Iripinem-5 byl využit Nucleospin Plasmid Isolation Kit (Macherey Nagel). Naměřená koncentrace vyizolované DNA činila 89 ng/μl.

Pro ověření, zda byl Iripin-5 zaklonován do plazmidu pET-19b, byl vzorek poslán na sekvenování. Dále byla přítomnost Iripinu-5 otestována pomocí hmotnostní spektrometrie. Obě tyto metody potvrdily přítomnost Iripinu-5.

4.2 Pilotní exprese

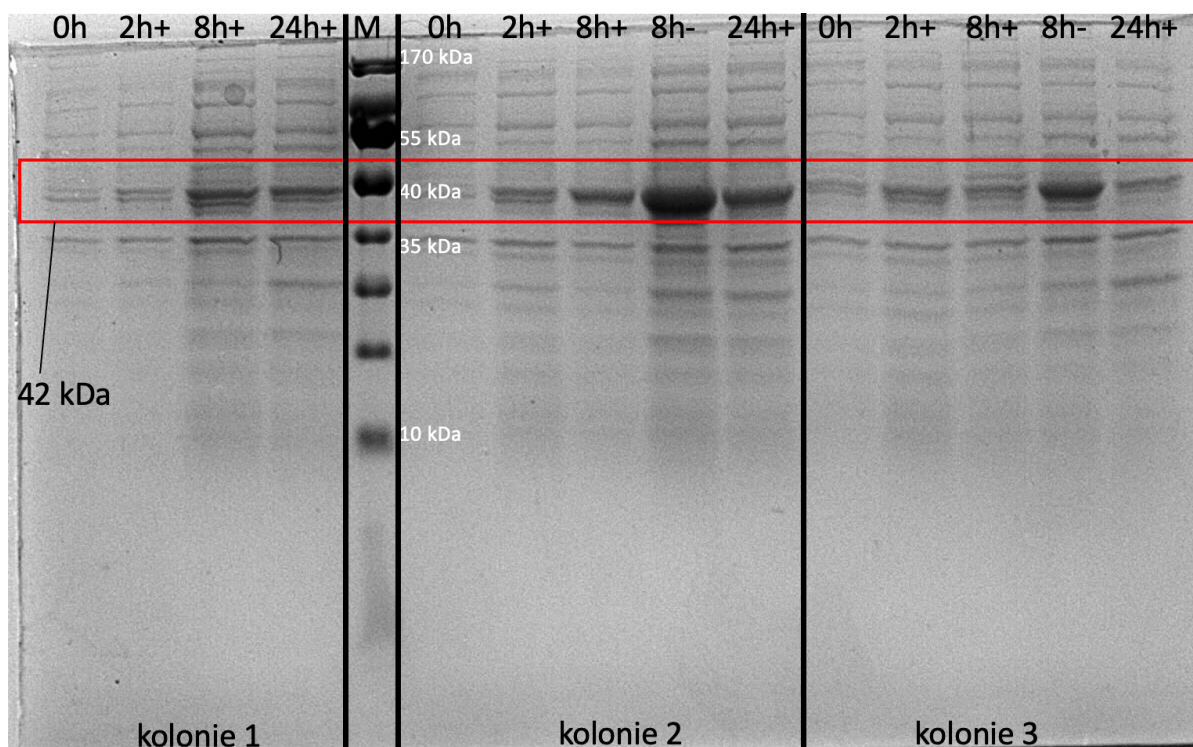
Pilotní exprese byla provedena za účelem zjištění ideálních podmínek pro namnožení Iripinu-5 v expresních systémech. Studovaný protein v plazmidu pET-19b byl transformován do kompetentních buněk BL21(DE3). Pilotní exprese byla provedena pro tři kolonie.

Na Obr. 9 a 10 jsou zachyceny výsledky pilotní exprese kolonií 1, 2, 3.



Obr. 9: Pilotní exprese kolonií 1, 2, 3 Iripinu-5, BL21(DE3), LB médium, pelety, M – marker, 0h – nula hodin, 2h – dvě hodiny, 8h – osm hodin, 24h – přes noc, [+] - 1mM IPTG, [-] – negativní kontrola.

Na Obr. 9 je zachycen výsledek pilotní exprese pro pelety Iripinu-5 v kompetentních buňkách BL21(DE3). Studovaný protein se nachází okolo velikosti 42 kDa a je vyznačen červeným rámečkem. Se vzrůstajícím časem se zvyšovala i exprese proteinu. Iripin-5 byl nejvíce produkován kolonií 2.



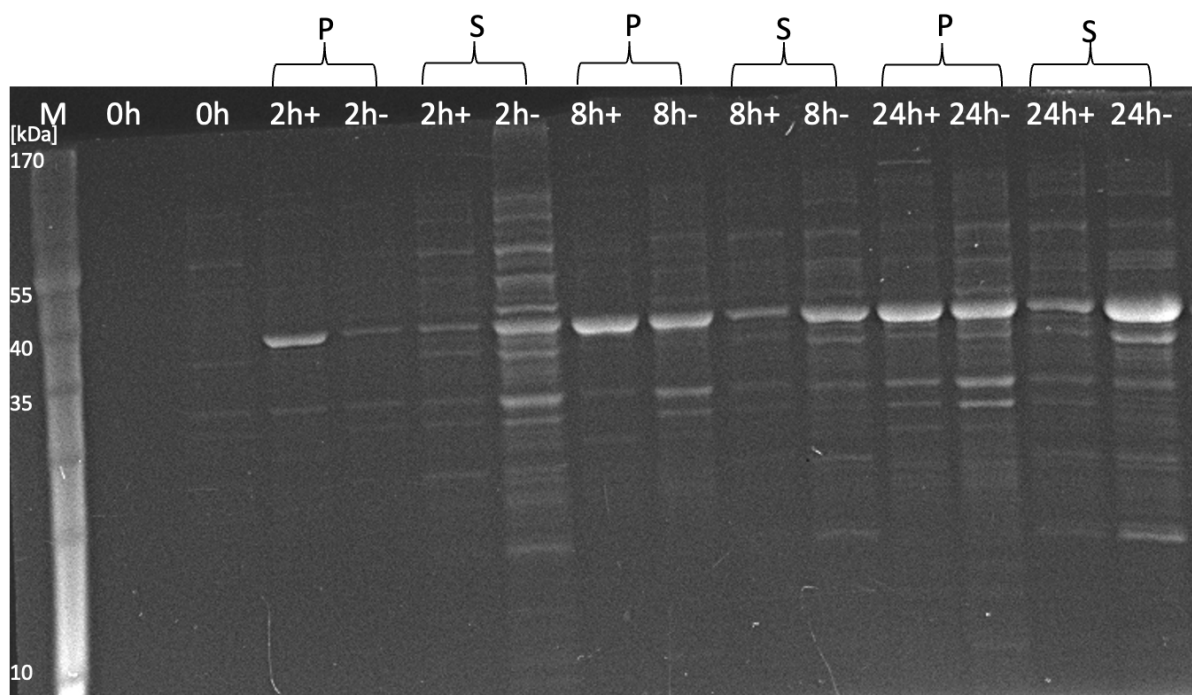
Obr. 10: Pilotní exprese kolonií 1, 2, 3, BL21(DE3), LB médium, supernatanty, M – marker, 0h – nula hodin, 2h – dvě hodiny, 8h – osm hodin, 24h – přes noc, [+] - 1mM IPTG, [-] – negativní kontrola.

Na Obr. 10 je zachycen výsledek pilotní exprese pro solubilní část Iripinu-5 v kompetentních buňkách BL21(DE3). I zde se studovaný protein nachází okolo velikosti 42 kDa (zvýrazněn v červeném rámečku). Zvýšení množství proteinu v kompetentních buňkách odpovídá zvyšujícímu se času. Iripin-5 byl nejvíce produkován opět v kolonii 2.

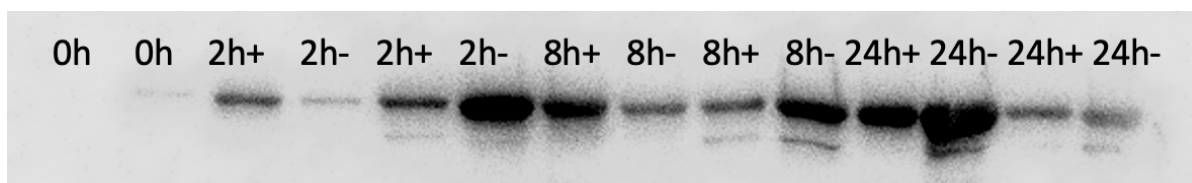
Na základě porovnání výsledků SDS-PAGE gelů pilotní exprese byla vybrána podmínka: kolonie 2, solubilní část proteinu, 24 hod, IPTG, 37 °C. Pro cytoplazmatickou frakci bylo rozhodnuto z důvodu výhodnější manipulace proteinu v dalších experimentech, jelikož protein nebude muset být refoldován z inkluzních tělísek. Zároveň byl protein produkován i v neindukovaném vzorku.

4.3 Ověření přítomnosti proteinu

Přítomnost Iripinu-5 s navázanou polyhistidinovou značkou byla ověřena pomocí Western blotu, při kterém byla využita anti-polyhistidinová protilátka a také byl pozorován trend zvyšování proteinové exprese. Nejprve byla provedena SDS-PAGE pro všechny vzorky (pelety i supernatanty) z kolonie dva (Obr. 11). Gel byl přebílotován na membránu, která byla inkubována s anti-polyhistidinovou protilátkou a výsledek Western blotu je zachycen na Obr. 12.



Obr. 11: SDS-PAGE pro kolonii č. 2, M – marker, 0h – nula hodin, 2h – dvě hodiny, 8h – osm hodin, 24h – přes noc, [+] – 1 mM IPTG, [-] – negativní kontrola, P – pelet, S – supernatant.



Obr. 12: Western blot pro kolonii dva, 0h – nula hodin, 2h – dvě hodiny, 8h – osm hodin, 24h – přes noc, [+] – 1 mM IPTG, [-] – negativní kontrola.

Anti-polyhistidinová protilátka se navázala v místě očekávané molekulární velikosti. Došlo k prokázání přítomnosti Iripinu-5 jak ve vzorcích supernatantu, tak peletu. Míra vazby anti-polyhistidinové protilátky se výrazně nelišila v různých časových odběrech.

Pro další ověření přítomnosti Iripinu-5 s polyhistidinovou značkou byl vyříznutý proužek z SDS-PAGE zanalyzován pomocí hmotnostní spektrometrie (Obr. 13). Celkem bylo identifikováno 67,7 % peptidů přiřazených k proteinu Iripin-5.

GADI01002653.1, 230725_irs-5_10x

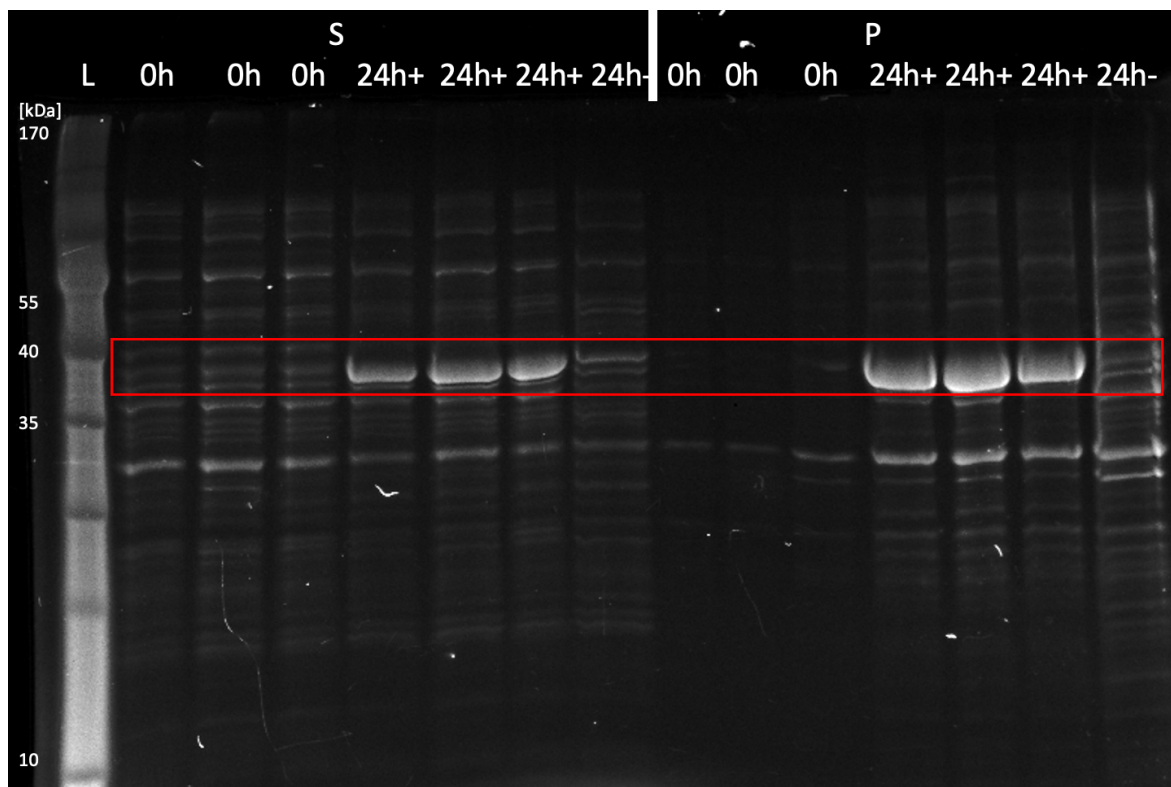
MKTLIVLMCSLVVVWARYENEMRLANNRFAVDLLRGLPSSPEKNIFFSPYSISTAMGMVF
AGAKGETLKNLYDGFYLRSGLKEDWVLQAYADHAKQLQVGQSSTFDVANAAAIHERLA
LLSAYENTLDSTFHAQLLKVDFVNGGPAIDEINRWVKQKTHDKIDKLFDGPLDPLTRLV
LLNAIFFKGVWSTKFDENATTKKQFLNGGTTPTQVDTMTKSIRIGYKLLPTMRLEIAELP
YDGGNYSMVILLPRGSEGIEAFKHSLTDHRLQDYIGHVELREVAVSLPKFKLETEYSLKD
SLKSLGITEIFGTQADLSGISSDGELVVSDVVHKAVVEVNEEGTEAAAVSGVAVVTRLIE
VPTLELNVNQPFLLFIRNTHTKDLLFAGQVNHL

Obr. 13: Pokrytí sekvence proteinu Iripin-5 s polyhistidinovou značkou analyzovaného pomocí přístroje timsTOF Pro. Identifikované aminokyseliny byly zvýrazněny červeně.

4.4 Exprese ve velkém měřítku

Přítomnost Iripinu-5 s navázanou polyhistidinovou značkou v cytoplazmatické části byla potvrzena (viz Obr. 12). Pro získání většího množství proteinu byla provedena exprese ve velkém měřítku. Zaklonovaný Iripin-5 v pET-19b byl pomnožen v buňkách BL21(DE3) při 37 °C, s IPTG (finální koncentrace 1 mM), 24 hodin.

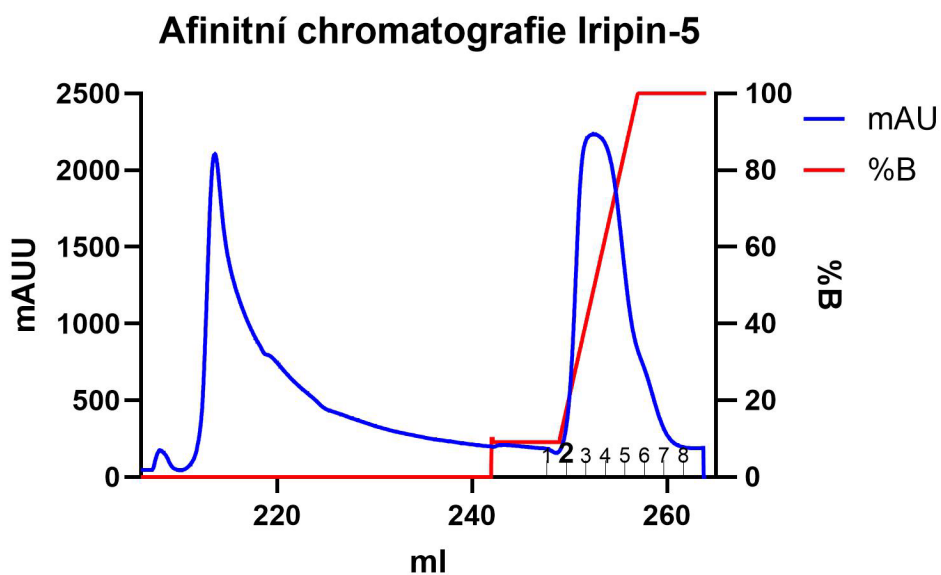
Na Obr. 14 je zachycený výsledek z SDS-PAGE exprese ve velkém měřítku. Protein je produkován v inkluzních tělíkách i v solubilní části. U neindukovaných vzorků je protein indukovan v menší míře.



Obr. 14: Expres ve velkém měřítku BL21(DE3), LB médium, 37 °C, M – marker, P – pelet, S – supernatant, 0h – nula hodin, 24h – přes noc, [+] – 1mM IPTG, [-] – negativní kontrola.

4.5 Afinitní chromatografie

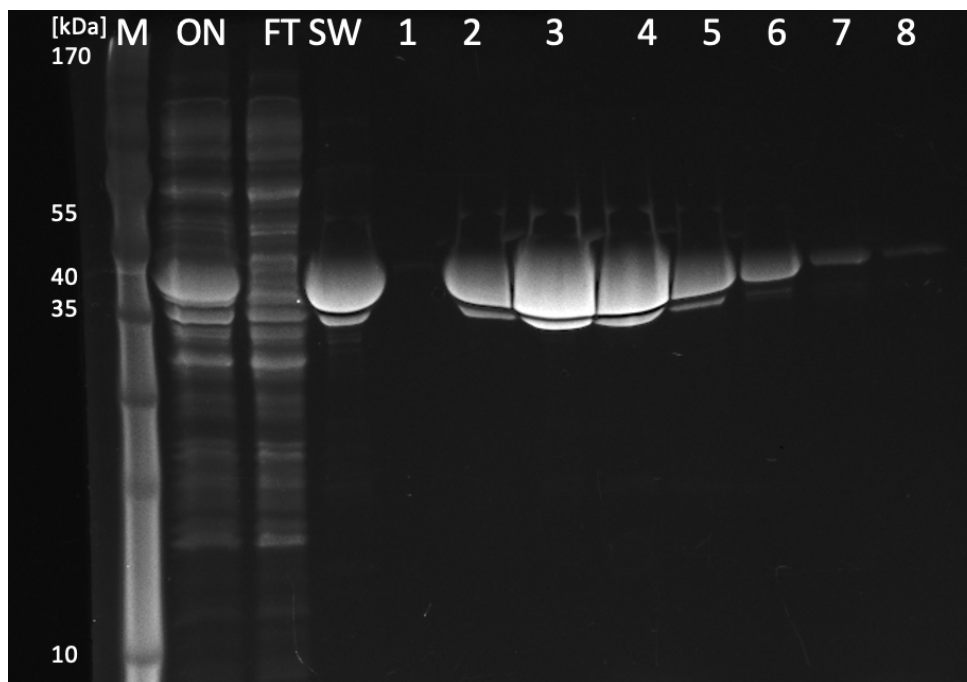
Na chromatogramu (Obr. 15) je zachycen průběh purifikace solubilní části vzorku Iripin-5.



Obr. 15: Afinitní chromatografie vzorku Iripin-5. Čísly 1-8 označeny sbírané frakce s proteinem. Modrá linie představuje absorbanci při 280 nm, červená linie procento elučního pufu B.

Frakce (1-8) byly sbírány od 40 % koncentrace elučního pufru afinitní chromatografie. První pík označuje flow through (FT). Na druhém píku je soft wash spolu s elucí Iripinu-5 pomocí polyhistidinové značky. Průtok soft washe byl na začátku omylem nastaven na 5ml/ml a ne na 1 ml/ml, proto se částečně eluoval i studovaný protein a nejsou dva oddělené píky pro soft wash a eluci proteinu.

Posbírané frakce byly zanalyzovány pomocí SDS-PAGE na Obr. 16.



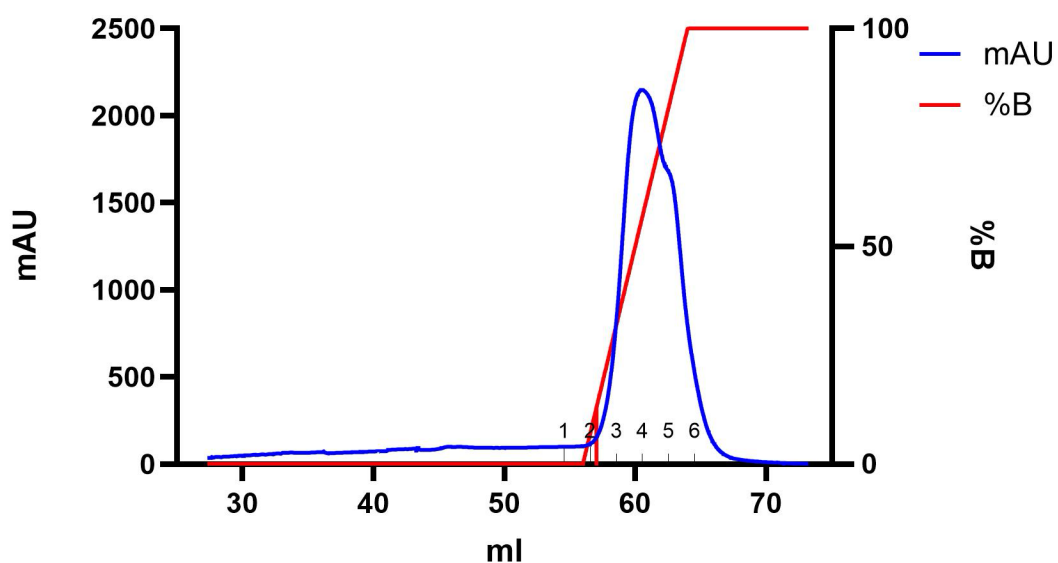
Obr. 16: SDS-PAGE afinitní chromatografie Iripinu-5 (M – marker, ON – on column, FT – flow through, SW – soft wash, 1-8 – sbírané frakce s proteinem).

Na základě SDS-PAGE gelu lze vidět, že ve flow through bylo zachyceno minimální množství studovaného proteinu. V SW už Iripin-5 pravděpodobně byl zachycen z důvodu omylem nastaveného vyššího průtoku na koloně. Celkově se podařilo získat celkem čisté frakce, ovšem zvláštní je vyskytující se menší pruh pod hlavním pruhem, kde by se měl vyskytovat studovaný protein. Z toho důvodu bylo provedeno další přečištění pomocí iontově výměnné chromatografie, před kterou byly spojeny frakce 2-8 do jednoho vzorku. Pruhy na gelu jsou rozteklé, protože vzorky nanesené na gel byly moc koncentrované.

4.6 Iontově výměnná chromatografie

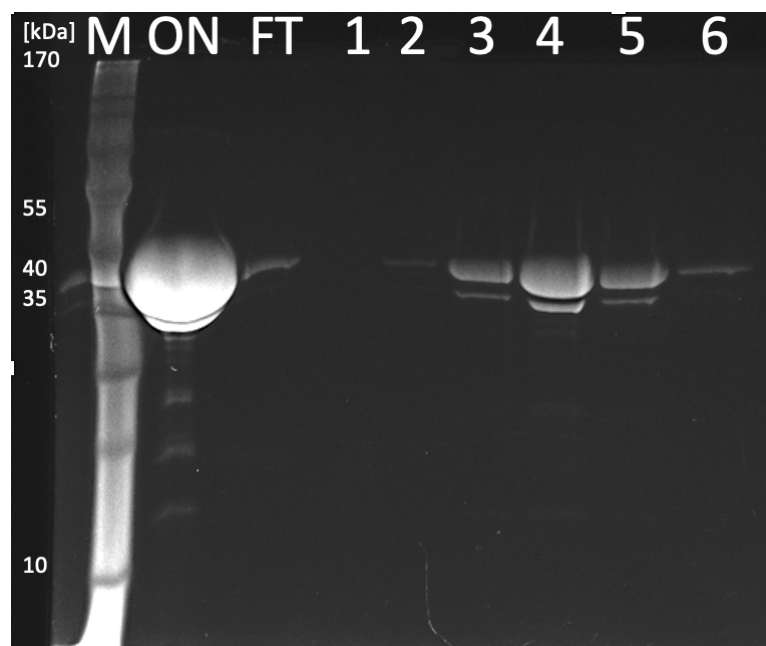
Chromatogram z iontově výměnné chromatografie je zaznamenán na Obr. 17.

Iontově výměnná chromatografie Iripin-5



Obr. 17: Iontově výměnná chromatografie Iripinu-5. Čísly 1-6 jsou označeny sbírané frakce s proteinem. Modrá linie představuje absorbanci při 280 nm, červená linie procento elučního pufru B.

Frakce byly sbírány od 17% koncentrace elučního pufru iontově výměnné chromatografie. Po proběhnutí purifikace byly posbírané frakce a vzorek ON (sloučené frakce 2-8 z afinitní chromatografie) zanalyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 18).

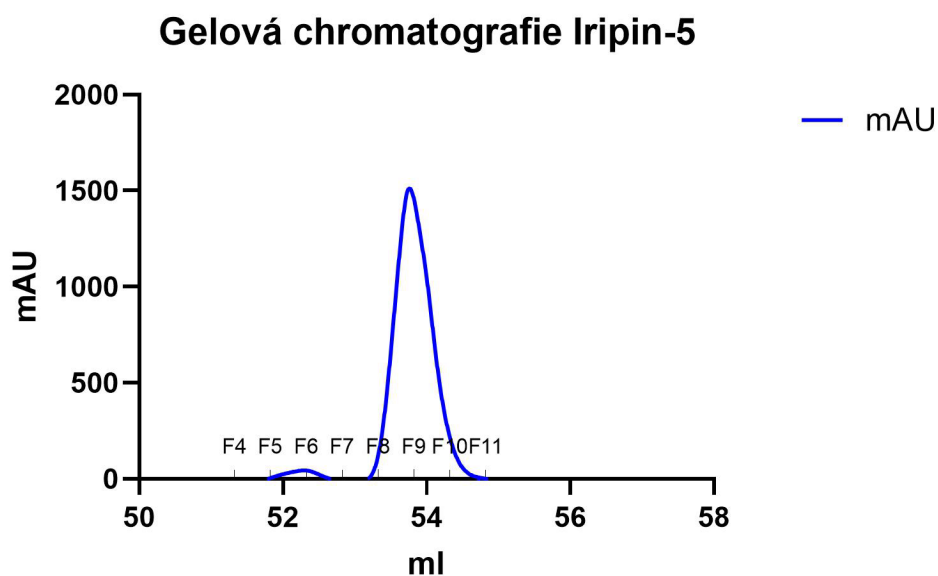


Obr. 18: Iontově výměnná chromatografie Iripinu-5 (M – marker, ON – on column, FT – flow through, 1-6 – sbírané frakce s proteinem).

Vzorek nanášený na kolonu byl znovu moc koncentrovaný. Ve flow through byl zachycen slabý proužek v oblasti velikosti studovaného proteinu, tudíž minimální množství Iripinu-5 protéklo kolonou. Vzorky frakcí na SDS-PAGE byly zředěny 10x v PBS. Frakce 2-6 byly poměrně čisté, ovšem znovu zde byl zachycen menší proužek pod hlavním proužkem. Podle SDS-PAGE byla vybrána jako nejkoncentrovanější frakce 4, a ta byla dále přečištěna pomocí gelové chromatografie.

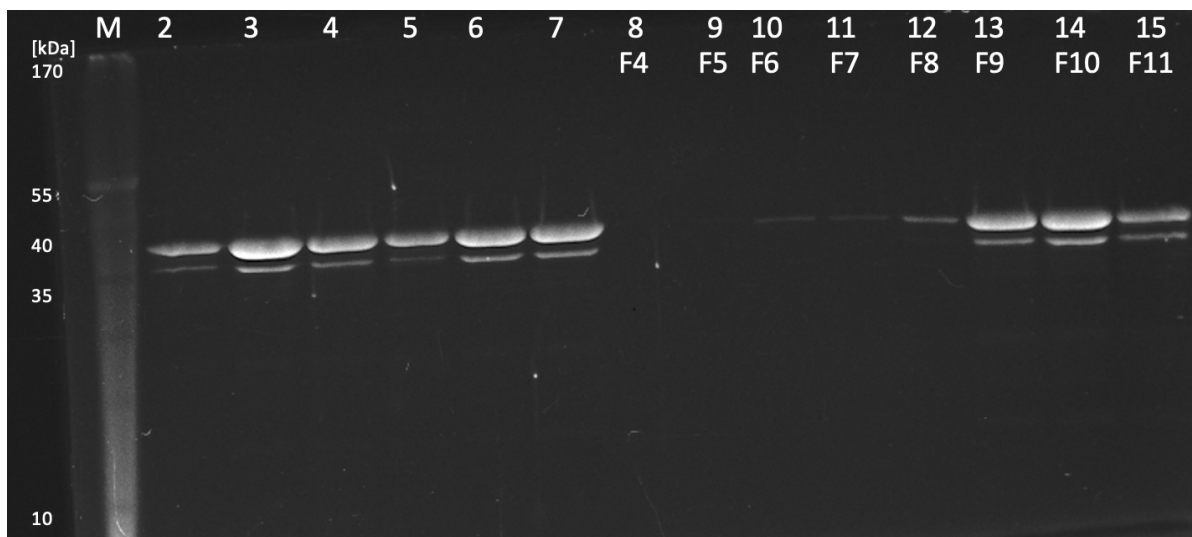
4.7 Gelová chromatografie

Chromatogram o průběhu gelové chromatografie je zaznamenán na Obr. 19.



Obr. 19: Gelová chromatografie Iripinu-5. Sbírané frakce s proteinem jsou označeny F4-F11. Modrá linie představuje absorbanci při 280 nm.

Pro frakci 4 byly provedeny čtyři shodné purifikace (z důvodu nutnosti nanášet malé objemy), na Obr. 19 je záznam průběhu první z nich. Sesbírané frakce z první purifikace byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 20).



Obr. 20: Gelová chromatografie Iripinu-5 (M – marker, 2-7 značí frakce z předchozí purifikace, F4-F11 – sbírané frakce s proteinem z 1. běhu gelové chromatografie).

Na gelu z SDS-PAGE byly zanalyzovány i frakce z iontově výměnné chromatografie pro porovnání. Pomocí chromatografií se podařilo získat čistý protein, menšího proužku pod hlavním se nepodařilo zbavit. U frakce F10 byla provedena hmotnostní spektrometrie jak pro horní, tak i pro spodní proužek. Ta potvrdila v obou případech přítomnost Iripinu-5, viz Obr. 21.

GADI01002653.1, 231006_irs_a1_5x

MKTLIVLMCSLVVWARYENEMRLANNRFAVDLLRGLPSSPEKNIFFSPYSISTAMGMVF
 AGAKGETLKNLYDGFYLRSGLKEDWVLQAYADHAKQLQVGQSSTFDVANAAAIHERLA
 LLSAYENTLDSTFHAQLLKVDFVNGGPAIDEINRWVKQKTHDKIDKLFDGPLDPLTRLV
 LLNAIFFKGVWSTKFDENATTKKQFLNGGTTPTQVDTMTKSIRIGYKLLPTMRLEIAELP
 YDGGNYSMVILLPRGSEIEAFKHSLTDHRLQDYIGHVELREVAVSLPKFKLETEYSLKD
 SLKSLGITEIFGTQADLSGISSDGELVVSVDVVKAVVEVNEEGTEAAAVSGVAVVTRLIE
 VPTLELNVNQPFLFFIRNTHTKDLLFAGQVNHL*

GADI01002653.1, 231006_irs_a2_5x

MKTLIVLMCSLVVWARYENEMRLANNRFAVDLLRGLPSSPEKNIFFSPYSISTAMGMVF
 AGAKGETLKNLYDGFYLRSGLKEDWVLQAYADHAKQLQVGQSSTFDVANAAAIHERLA
 LLSAYENTLDSTFHAQLLKVDFVNGGPAIDEINRWVKQKTHDKIDKLFDGPLDPLTRLV
 LLNAIFFKGVWSTKFDENATTKKQFLNGGTTPTQVDTMTKSIRIGYKLLPTMRLEIAELP
 YDGGNYSMVILLPRGSEIEAFKHSLTDHRLQDYIGHVELREVAVSLPKFKLETEYSLKD
 SLKSLGITEIFGTQADLSGISSDGELVVSVDVVKAVVEVNEEGTEAAAVSGVAVVTRLIE
 VPTLELNVNQPFLFFIRNTHTKDLLFAGQVNHL*

Obr. 21: Pokrytí sekvence proteinu Iripin-5 po purifikaci pomocí přístroje timsTOF Pro, vlevo pro horní pruh z SDS-PAGE, vpravo pro dolní pruh z SDS-PAGE. Identifikované peptidy byly zvýrazněny červeně.

U horní proužku byl identifikováno 70,5 % peptidů přiřazených k proteinu Iripin-5, u dolního proužku bylo identifikováno 48,3 % peptidů přiřazených k proteinu Iripin-5.

Nejkoncentrovanější frakce byly spojeny do jedné a u ní byla změřena koncentrace, která činila 3 mg/ml.

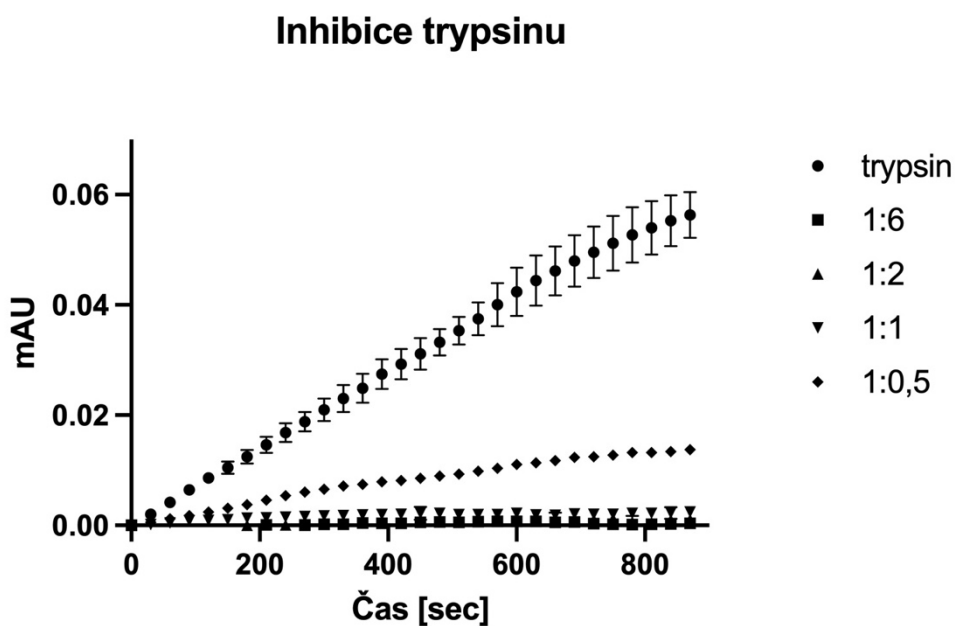
Vypurifikovaný Iripin-5 byl neúspěšně přečištěn od LPS pomocí kitu ToxinEraser Endotoxin Removal Kit. Z časových důvodů byly experimenty provedeny s Iripinem-5 obsahující LPS.

4.8 Ověření biochemické aktivity Iripinu-5

Biochemická aktivita Iripinu-5 byla ověřena inhibicí serinové proteázy. Na základě přítomnosti argininu v místě P1 byl vybranou serinovou proteázou trypsin.

Nejprve byla ověřena samotná enzymatická aktivita trypsinu při inkubaci se substrátem. Inhibice trypsinu (finální koncentraci 50 nM) byla vyzkoušena s Iripinem-5 v různých koncentracích (300 nM, 100 nM, 50 nM a 25 nM).

Na Obr. 22 je zaznamenáno snížení proteolytické aktivity trypsinu po inkubaci s Iripinem-5, čímž byla potvrzena biochemická aktivita Iripinu-5. K inhibici nebylo třeba velkého přebytku Iripinu-5 vůči cílovému enzymu, naopak ještě v ekvimolární směsi byla inhibice 100%, což naznačuje, že mechanismus serpinové inhibice v reakci fungoval.



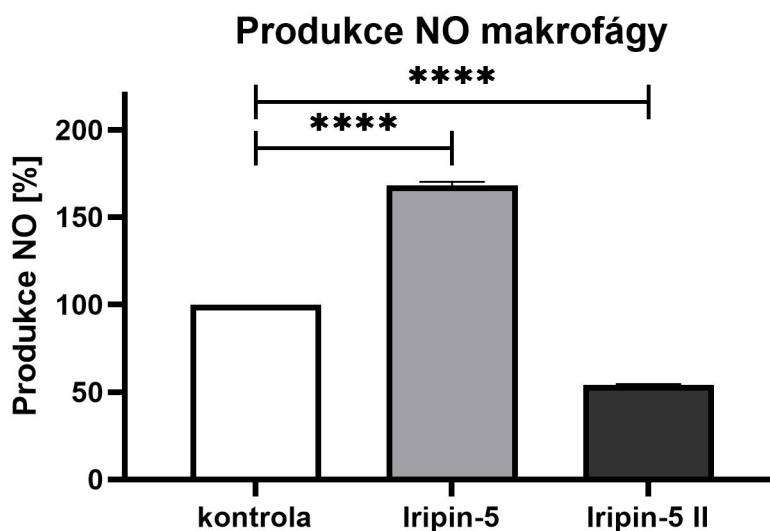
Obr. 22: Inhibice trypsinu Iripinem-5 je vyjádřena jako závislost absorbance na čase. (1:6 – trypsin (50 nM) : Iripin-5 (300 nM); 1:2 – trypsin (50 nM) : Iripin-5 (100 nM); 1:1 – trypsin (50 nM) : Iripin-5 (50 nM); 1:0,5 – trypsin (50 nM) : Iripin 5 (25 nM).

4.9 Stanovení produkce oxidu dusnatého makrofágy

Makrofágy hrají klíčovou roli v zánětlivých reakcích prostřednictvím vysoké produkce cytokinů a NO.

In vitro aktivované makrofágy IC-21 byly inkubovány s Iripiny-5. Inkubace makrofágů s Iripinem-5 (finální koncentrace 6 μ M) vedla ke zvýšení produkci NO v porovnání s pozitivní kontrolou i Iripinem-5 II. Inkubace makrofágů s Iripinem-5 II (finální koncentrace 6 μ M) vedla ke snížení produkci NO (viz Obr. 23).

V pokusech byla použita pozitivní kontrola skupina makrofágů, které byly aktivované přidanými aktivátory: LPS (finální koncentrace 500 ng/ml) a IFN- γ (finální koncentrace 50 ng/ml). Negativní kontrola byla skupina makrofágů, které nebyly stimulovány.



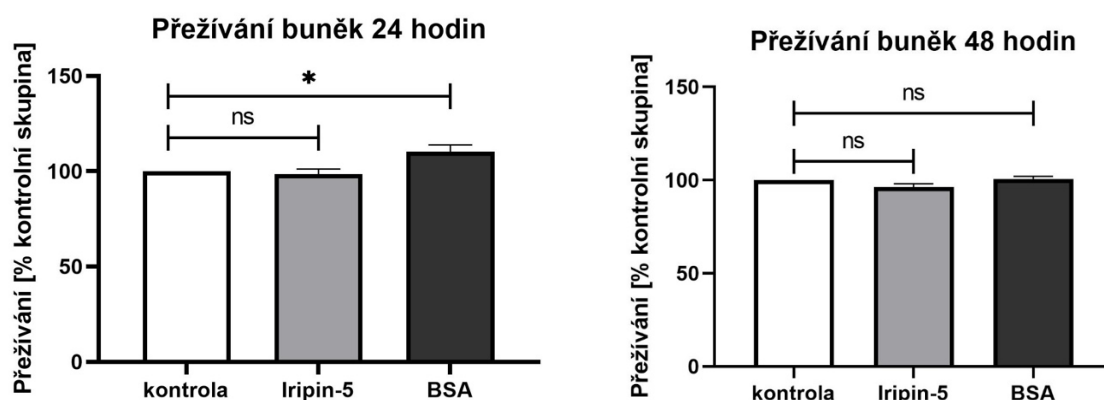
Obr. 23: Produkce NO aktivovaných makrofágů IC-21 po inkubaci s Iripiny-5. Iripin-5 inkubovaný s aktivovanými makrofágy IC-21 zvyšoval produkci NO. Iripin-5 II inkubovaný s aktivovanými makrofágy snižoval produkci NO. Je zde uveden průměr z jednoho nezávislého pokus (\pm SEM). **** $P \leq 0,0001$.

4.10 Detekce přežívání buněk pomocí alamarBlue™

Pro analýzu přežívání buněk byla vybrána buněčná linie HeLa CCL-2. Buňky byly inkubovány s Iripinem-5 (finální koncentrace 6 μ M) nebo s proteinovým standardem BSA (finální koncentrace 6 μ M) ve dvou časových intervalech 24 a 48 hodin. Životaschopnost buněk byla detekována barvicím roztokem alamarBlue™, který využívá metabolické aktivity živých buněk.

V časovém intervalu 24 hodin neměl Iripin-5 žádný signifikantní vliv na přežití buněk. U skupiny BSA došlo k mírnému nárůstu v přežívání buněk (viz Obr. 24 vlevo).

Detekce životaschopnosti buněk HeLa CCL-2 po 48 hodinové inkubaci s Iripinem-5 nebo s BSA neukázala žádnou pozorovatelnou změnu (viz Obr. 24 vpravo).



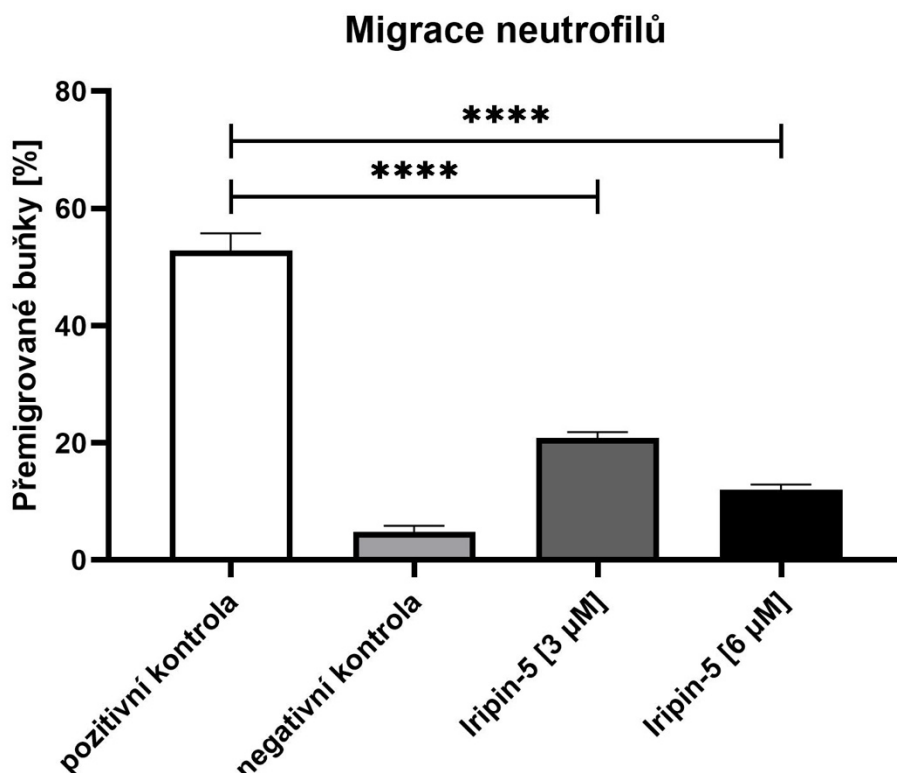
Obr. 24: Vlevo: Přežívání buněk v závislosti na inkubaci s Iripinem-5 nebo s BSA po 24 hodinách; jako 100 % byla zvolena průměrná hodnota kontrolní skupiny. Je zde uveden průměr tří nezávislých experimentů (\pm SEM). $*P \leq 0,0332$; *ns* – nesignifikantní. Vpravo: Přežívání buněk v závislosti na inkubaci s Iripinem-5 nebo s BSA po 48 hodinách; jako 100 % byla zvolena průměrná hodnota kontrolní skupiny. Je zde uveden průměr tří nezávislých experimentů (\pm SEM). *ns* – nesignifikantní.

4.11 Migrace neutrofilů

Iripin-5 primárně inhibuje lidskou neutrofilní elastázu (Kaščáková *et al.*, 2021), v souladu s tímto zjištěním byl studován jeho vliv na funkci neutrofilů.

Migrace neutrofilů byla testována *in vitro*. Neutrofilů, které byly vyizolovány z kostní dřeně myši, byly předem inkubovány s Iripinem-5 ve dvou různých koncentracích (3 μ M a 6 μ M), a následně byly testovány na migraci směrem k chemoatraktantu fMLP (finální koncentrace 1 μ M) v migrační destičce. Pozitivní kontrolní skupina byly neutrofilů aktivované fMLP. Negativní kontrola byly pouze neutrofilů bez chemoatraktantu fMLP. Počet přemigrovaných buněk byl spočítán pomocí Bürkerovy komůrky.

Inkubace neutrofilů v přítomnosti Iripinu-5 vedla k poklesu migrace neutrofilů v závislosti na dávce (viz Obr. 25). Oproti 52,8 % přemigrovaných buněk v pozitivní kontrole, Iripin-5 v koncentraci 3 μ M signifikantně snížil migraci neutrofilů na 20,8 %. Při vyšší koncentraci Iripinu-5 (6 μ M) byla migrace inhibována ještě výrazněji, počet přemigrovaných buněk byl pouze 12 % v porovnání s pozitivní kontrolou. Počet přemigrovaných buněk u negativní kontroly byl 4,8 %.



Obr. 25: Migrace neutrofilů. Neutrofilů z kostní dřeně myši byly předem inkubovány s Iripinem-5 (3 μ M a 6 μ M) a následně byl změřen počet přemigrovaných neutrofilů aktivovaných fMLP v migrační destičce. Je zde uveden průměr tří nezávislých experimentů (\pm SEM). **** $P \leq 0,0001$.

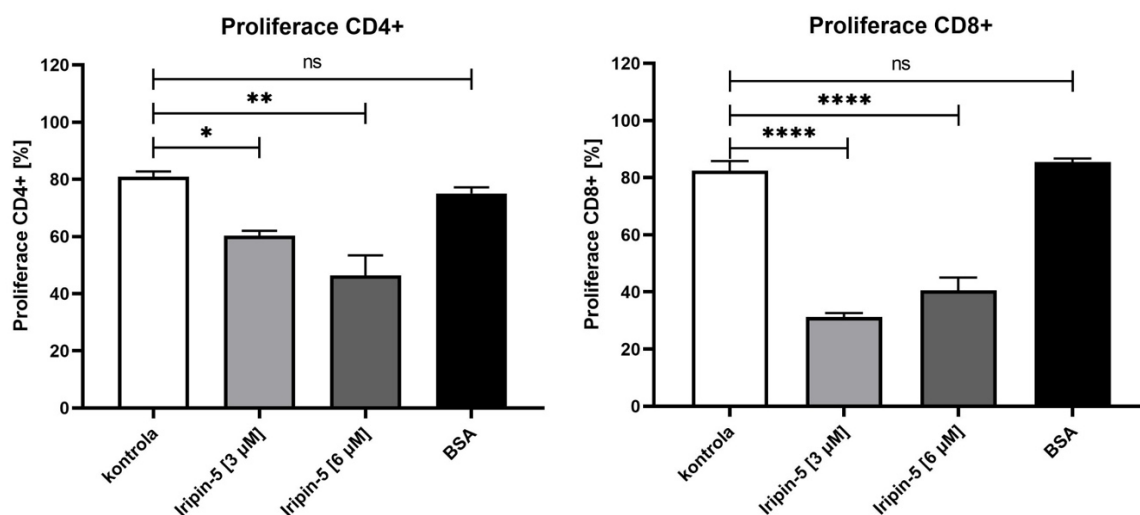
4.12 Proliferace T-lymfocytů

Vzhledem k tomu, že bylo zjištěno, že některé molekuly ze slin z různých druhů klíšťat mohou inhibovat proliferaci T-lymfocytů (Kotál *et al.*, 2019), byla tato možnost otestována i u Iripinu-5.

Proliferace T-lymfocytů byla provedena *in vitro*. Vyizolované splenocyty z myši byly předem inkubovány 1 hodinu s Iripinem-5 ve dvou koncentracích (3 μ M a 6 μ M), nebo s BSA (6 μ M). Pozitivní kontrolu tvořily splenocyty bez Iripinu-5 či BSA. Následně byly přidány protilátky anti-CD3 a anti-CD28. Procenta proliferujících T-lymfocytů byla vyhodnocena po 72 hodinách.

Inkubace splenocytů s Iripinem-5 vedla ke snížení proliferace CD4⁺ buněk v závislosti na dávce (viz Obr. 26 vlevo). V přítomnosti 3 μ M Iripinu-5 bylo procento proliferujících CD4⁺ buněk sníženo z 80 % v kontrolní skupině na 60 %, po přidání 6 μ M Iripinu-5 bylo proliferace schopno pouze 46 % CD4⁺ buněk. U BSA nebyl zaznamenán žádný signifikantní vliv na proliferaci CD4⁺ buněk.

Inkubace splenocytů s Iripinem-5 vedla ke snížení proliferace CD8+ buněk (viz Obr. 26 vpravo). V přítomnosti 3 μ M Iripinu-5 bylo procento proliferujících CD8+ buněk sníženo oproti kontrolní skupině z 82 % na 31 %, po přidání 6 μ M Iripinu-5 bylo proliferace schopno pouze 40 % CD8+ buněk. BSA (6 μ M) signifikantně neinhiboval proliferaci CD8+ buněk.



Obr. 26: Vlevo: Proliferace CD4+ buněk po inkubaci s Iripinem-5 v koncentraci 3 μ M a 6 μ M, nebo s BSA (6 μ M). Údaje jsou prezentovány jako průměr \pm SEM z jednoho ze tří nezávislých experimentů. * $P \leq 0,0332$; ** $P \leq 0,0021$; *ns* – nesignifikantní. Vpravo: Proliferace CD8+ buněk po inkubaci s Iripinem-5 v koncentraci 3 μ M nebo 6 μ M, či BSA (6 μ M). Údaje jsou prezentovány jako průměr \pm SEM z jednoho ze tří nezávislých experimentů. **** $P \leq 0,0001$.

5. Diskuze

Klíštěcí sliny obsahují nebílkovinné i bílkovinné složky, které umožňují sání krve na hostiteli po několik dní, udržují tekutost krve a potlačují imunitní reakce hostitele, či hojení ran. Klíčovou roli hrají inhibitory proteáz. Z transkriptomu slinných žláz *I. ricinus* bylo zjištěno, že ve svých slinných žlázách obsahuje čtyři hlavní typy: cystatiny, Kunitz inhibitory, inhibitory s TIL doménou a serpiny. U serpinů bylo prokázáno, že jsou modulátory obranných reakcí hostitele (Chmelař *et al.*, 2017). Cílem této práce bylo připravit rekombinantní protein Iripin-5 a pomocí *in vitro* pokusů popsat jeho funkci.

Počáteční cíl práce byl splněn. Restrikce byla provedena bez problémů. Za pomoci restrikčních enzymů byl Iripin-5 vyštěpnut z vektoru pET-17b a cílový vektor pET-19b byl rozštěpnut stejnými restrikčními enzymy. Pro lepší spojení konců inzertu a vektoru byla použita alkalická fosfatáza, která odstraňuje 5'-fosfáty a tím zabraňuje opětovnému spojení konců vektoru. Nicméně po transformaci do kompetentních buněk vyrostlé kolonie na agarových plotnách obsahovaly prázdný inzerť, což bylo ukázáno výsledkem z colony PCR, kdy z 16 testovaných kolonií pouze 3 kolonie obsahovaly vektor pET-19b se zaklonovaným Iripinem-5. Na výsledném gelu colony PCR (viz Obr. 8) byl zaznamenán větší band pozitivní kolonie 20, pravděpodobně došlo k nespecifické amplifikaci DNA (PCR Troubleshooting Guide).

Rekombinantní Iripin-5 se podařilo naprodukovat v cytoplazmatické frakci i v peletu proteinu (viz Obr. 9 a 10). Rozhodnutí pro cytoplazmatickou frakci bylo z důvodu, že protein v solubilní frakci je správně složen a je biologicky aktivní, kdežto z inkluzních tělísek je agregován a musel by být refoldován. Navíc během refoldingu dochází ke ztrátám proteinu (Singh *et al.*, 2005). Pro budoucí experimenty by bylo vhodné vyzkoušet expresi při nižší teplotě, aby byl protein pomaleji produkován, mohl se správně skládat a díky tomu by se neukládal do inkluzních tělísek (Rosano *et al.*, 2014).

Během afinitní chromatografie došlo k přečištění Iripinu-5 od dalších proteinů. Vypadá to, že polyhistidinová značka byla správně přístupná a došlo ke správnému navázání na kolonu afinitní chromatografie. Nicméně na SDS-PAGE gelu (viz Obr. 16) byl zachycen Iripin-5 i v SW, což bylo způsobeno chybně nastaveným vyšším průtokem. Naštěstí nebylo ztraceno velké množství proteinu a sbírané frakce po afinitní chromatografii obsahovaly vysokou koncentraci Iripinu-5. Znepokojující byl zaznamenaný menší pruh pod hlavním pruhem studovaného proteinu (Obr. 16 a 18), proto bylo rozhodnuto pro přečištění pomocí iontové výměnné chromatografie.

Ani iontově výměnnou chromatografií se nepodařilo odstranit menší pruh pod hlavním pruhem, viz Obr. 18. Zajímavé je, že ve vzorku ON na Obr. 18 jsou viditelné další proteiny, které nebyly zaznamenány v žádné z analyzovaných frakcí na Obr. 16. Je tedy možné, že protein nebyl dokonale přečištěn pomocí afinitní chromatografie.

Nakonec byl protein přečištěn pomocí gelové chromatografie a ani pomocí ní se nepodařilo odstranit menší pruh (viz Obr. 20). Po gelové chromatografii byla provedena hmotnostní spektrometrie, která potvrdila přítomnost Iripinu-5 v obou pružích z SDS-PAGE gelů. Menší pruh je tedy rovněž Iripin-5, ovšem v jiné strukturní konformaci. Některé serpiny mohou vykazovat dva pruhy na SDS-PAGE gelech po purifikačních procesech (Kozaki *et al.*, 1998).

Přítomnost LPS ve vypurifikovaném rekombinantním proteinu Iripinu-5 mohla mít vliv na následující imunologické pokusy. LPS může mít vliv na imunitní buňky tím, že je aktivuje a dojde k zahájení imunitní odpovědi vedoucí k zánětu či jiným imunitním reakcím. LPS konkrétně působí na toll like receptory (TLR), což vede k produkci prozánětlivých cytokinů a interferonu (Mamat *et al.*, 2015).

Cílové proteázy, které bude serpin inhibovat, jsou dány především aminokyselinou v P1 místě RCL (Marijanovic *et al.*, 2019). U Iripinu-5 je aminokyselinou v místě P1 arginin (Arg342), což by naznačovalo, že bude především cílit na proteázy podobné trypsinu jako je tomu u Iripinu-3, který má v P1 místě arginin a inhibuje především kalikrein a matriptázu (Chlastáková *et al.*, 2021) či u Iripinu-1 s argininem na P1 místě a inhibicí plasminu, kalikreinu a trypsinu (Chlastáková *et al.*, 2023). Iripin-8 má též v P1 místě arginin a cílí na trypsin, a především na proteázy koagulační kaskády (kalikrein, trombin, plasmin) (Kotál *et al.*, 2021).

Nicméně Iripin-5 cílí na proteázy podobné elastáze, protože inhibuje především neutrofilní elastázu a proteinázu 3 (Kašćáková *et al.*, 2021). Ovšem toto chování bylo již dříve popsáno i u jiných serpinů, kdy došlo k inhibici jiných serinových proteáz, než naznačuje aminokyselina v P1 místě (Gettins *et al.*, 2002). V této práci byla testována biochemická aktivita Iripinu-5 na inhibici trypsinu. Tento experiment ukázal, že Iripin-5 měl 100 % inhibiční aktivitu v ekvimolární směsi. V porovnání s výsledky Kašćáková *et al.*, 2021, kde bylo dosaženo inhibičního účinku na trypsin při vyšší koncentraci Iripinu-5, se nově připravený Iripin-5 jeví jako silnější inhibitor. Nicméně v experimentu byl použit jiný typ trypsinu než dříve, proto by bylo třeba aktivitu obou serpinů porovnat v rámci jednoho pokusu.

Bylo zjištěno, že některé molekuly ze slin *I. ricinus* potlačují schopnost makrofágů produkovat NO. Makrofágy hrají roli v obraně hostitele před sáním klíštěte a přenosy patogenů, protože produkují cytokiny nebo právě NO, kterým aktivují další imunitní buňky

v místě zánětu. Na základě výsledků publikace Kaščáková *et al.*, 2021 dokáže Iripin-5 potlačit schopnosti makrofágů produkovat NO v závislosti na dávce. Iripin-5 byl inkubován ve dvou koncentracích (1 μM a 5 μM) a ve dvou časových intervalech (24 a 48 hodin). Při nižší koncentraci (1 μM) Iripin-5 statisticky nevýznamně inhiboval produkci NO po 24 hodinách a po 48 hodinách vůbec neinhiboval. Naproti tomu v koncentraci 5 μM Iripin-5 inhiboval produkci NO po 24 i 48 hodinách. Použitý protein v tomto článku byl přečištěn od LPS (Kaščáková *et al.*, 2021). V této práci byla produkce NO makrofágy měřena pro Iripin-5 (vytvořený v této práci, nepřečištěný od LPS) tak pro Iripin-5 II (zásoby Katedry medicínské biologie, přečištěný od LPS). Oba Iripiny-5 byly v koncentraci 6 μM a produkce NO makrofágy byla měřena po 24 hodinách. U Iripinu-5 II byla pozorována inhibice produkce NO, čímž se potvrdily výsledky z Kaščáková *et al.*, 2021. Naproti tomu u Iripinu-5 v porovnání s kontrolou ještě zvýšil produkci NO makrofágy. Pravděpodobně je to tím, že nebyl řádně přečištěn od LPS. Z klíčících proteinů produkci NO makrofágy neinhibují jen serpiny, ale i některé cystatiny, jako je Iristatin (Kotál *et al.*, 2019).

Přežívání buněk po inkubaci (24 a 48 hodin) s Iripinem-5 (6 μM) bylo vyzkoušeno na buněčné linii HeLa CCL-2. Na základě výsledků se serpin Iripin-5 nejeví jako cytotoxický, ovšem bylo by třeba podrobnějšího experimentu, vyzkoušet vyšší koncentraci či delší dobu inkubace serpinu s buňkami. Pro porovnání byl k buňkám HeLa CCL-2 přidán BSA (6 μM), který po 24 hodinové inkubaci sice statisticky významně zvyšoval přežívání buněk, kdežto po 48 hodinové inkubaci nejevil žádné účinky na přežívání buněk. BSA je proteinový standard, který byl použit pouze pro získání informace, zda přidání náhodného proteinu k buněčné linii HeLa CCL-2 bude mít nějaký viditelný/detekovatelný efekt. Zvýšení po 24 hodinách je však tak nevýrazné, že zřejmě nemá žádný fyziologický význam.

Neutrofilů jsou buňky vrozené imunity, které mohou být aktivovány cytokiny a chemokiny, a do místa poranění migrují jako první. Inhibice migrace neutrofilů naznačuje protizánětlivou aktivitu na počátku imunitní reakce. Iripin-5 primárně inhibuje neutrofilní elastázu, a proto byl studován jeho účinek na migraci neutrofilů (Kaščáková *et al.*, 2021). Studie Kaščáková *et al.*, 2021 potvrdila, že Iripin-5 inhibuje migraci neutrofilů. Provedený pokus v rámci této práce též potvrdil inhibici migraci neutrofilů a zároveň ukázal, že inhibice migrace neutrofilů je závislá na koncentraci Iripinu-5. Nově připravený Iripin-5 má tedy tuto aktivitu shodnou s původním Iripinem-5, což znamená, že LPS nemá vliv na tento typ aktivity neutrofilů. Iripin-5 tedy cílí na vrozenou imunitu, má významný anti-neutrofilní účinek. Dalším ze serpinů z *I. ricinus*, který inhibuje migraci neutrofilů je Iripin-1 (Chlastáková *et al.*,

2023). Kromě serpinů i cystatin Iristatin inhiboval migraci neutrofilů *in vivo* (Kotál *et al.*, 2019).

Sliny a extrakty ze slin *I. ricinus* inhibují proliferaci T-lymfocytů (Chlastáková *et al.*, 2021). Serpiny mohou ovlivňovat proliferaci T-lymfocytů nepřímo modulací aktivity proteáz či regulací různých imunitních procesů např. aktivace cytokinů či chemokinů či ovlivněním prezentace antigenu na antigen prezentujících buňkách. Dále mohou zasahovat do nitrobuněčných signálních drah např. signalizace prostřednictvím T buněčného receptoru (TCR), či regulovat jiné imunitní buňky, které ovlivňují proliferaci T-lymfocytů jako jsou regulační T buňky (Tregs) nebo myeloidní supresorové buňky (MDSC). Zároveň některé serpiny mají protizánětlivou funkci, a dochází k utlumení imunitní odpovědi, a tím může dojít ke snížení proliferaci T-lymfocytů (Abbas *et al.*, 2022; Chlastáková *et al.*, 2021; Kotál *et al.*, 2015). Iripin-5 inhibicí neutrofilní elastázy ovlivňuje přímo buňky imunitního systému a tím imunitní reakci (Kašćáková *et al.*, 2021). Trypsin ovlivňuje produkci cytokinů, a tím nepřímo může ovlivnit proliferaci T-lymfocytů (Chlastáková *et al.*, 2021). Zároveň může být i inhibice produkce NO makrofágy spojena se snížením proliferace T-lymfocytů (Kotál *et al.*, 2019). Iripin-5 inhiboval proliferaci CD4⁺ v závislosti na dávce. Proliferaci CD8⁺ Iripin-5 též inhiboval, ale ne v závislosti na dávce. BSA proliferaci T-lymfocytů nijak neovlivnil. Ovlivnění adaptivní imunity serpiny z *I. ricinus* bylo pozorováno u Iripinu-3, který snižuje proliferaci CD4⁺ T-lymfocytů, a dále potlačuje Th lymfocyty, indukci Tregs a tvorbu IL-6 (Chlastáková *et al.*, 2021). K dalším se řadí Iris, který také inhiboval proliferaci T-lymfocytů a produkci několika zánětlivých cytokinů (IFN- γ , IL-6, IL-8 a TFN- α) (Leboulle *et al.*, 2002). Serpin RHS2 z *Rhipicephalus haemaphysaloides* inhibuje proliferaci jak CD4⁺ tak CD8⁺ buněk (Xu *et al.*, 2019).

Koncentrace Iripinu-5 v *in vitro* pokusech byla pravděpodobně vyšší, než je množství Iripinu-5 ve slinách klíštěte při krmení krví, i když na základě Kašćáková *et al.*, 2021 je nejvíce zastoupeným serpinem ve slinách klíštěte při sání krve. Nicméně použitá vyšší koncentrace v pokusech nevyvrací pozorované vlastnosti Iripinu-5. Je to dáno faktem, že klíštěcí sliny jsou komplexní směsí proteinů, které mohou vykazovat stejné vlastnosti, a proto pokud působí klíštěcí proteiny ve shodě, tak mohou dosáhnout požadovaného účinku (Chlastáková *et al.*, 2021; Chmelař *et al.*, 2016).

Bohužel výsledky prezentované v této práci nejsou jednoznačné, protože Iripin-5 nebyl dekontaminován od LPS, což mohlo ovlivnit některá získaná data. Přesto, na základě příslušných kontrol lze tvrdit, že nově připravený Iripin-5 vykazuje podobné účinky jako dříve

vyrobený protein. Pro přesné srovnání by bylo třeba udělat podrobnější experimenty s Iripinem-5 přečištěným od LPS.

6. Závěr

Tématem této práce byla příprava a ověření aktivity inhibitoru serinových proteáz – serpinu Iripin-5 ze slin klíštěte *I. ricinus*. Serpin se podařilo úspěšně zaklonovat do vektoru pET-19b a namnožit v kompetentních buňkách. Pomocí chromatografických metod byl získán čistý rekombinantní protein Iripin-5. Biochemická aktivita studovaného proteinu byla ověřena enzymatickou inhibiční esejí s vybranou proteázou – trypsinem.

Pro ověření biologické aktivity byly provedeny pokusy *in vitro*. Bylo otestován vliv Iripinu-5 na přežívání buněk HeLa CCL-2, z kterého vyplynulo, že Iripin-5 pro ně není cytotoxický. Vliv Iripinu-5 na vrozenou imunitu hostitele byl zkoumán dvěma pokusy. Prvním bylo stanovení produkce NO makrofágy, který ukázal, že vyprodukovaný Iripin-5 v rámci této práce spíše podporuje produkci NO makrofágy. Naopak Iripin-5 inhiboval migraci neutrofilů a potvrdil se tím jeho významný anti-neutrofilní účinek. Nakonec byla zkoumána role Iripinu-5 na získanou imunitu. Iripin-5 inhiboval proliferaci CD4+ a CD8+ buněk, což naznačuje i jeho vliv na adaptivní imunitu hostitele.

Na základě těchto poznatků lze charakterizovat jako serpin Iripin-5, který má protizánětlivé a imunomodulační vlastnosti.

7. Seznam použitých zkratek

AMP	ampicilin
ATB	antibiotikum
bp	počet párů bází (base pair)
BOFES	fetální hovězí sérum
BSA	hovězí sérový albumin
CD	diferenční skupina, cluster of differentiation
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FITC	fluorescein isothiocyanate
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-fenylalanin
FWD	forward (kódující)
FT	flow through
IFN	interferon
IgG	imunoglobulin G
IL	interleukin
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalaktosid
LB médium	lysogenylové médium (lysogeny broth medium)
L-GL	L-glutamin
LPS	lipopolysacharid
ME	merkaptoetanol
MHC-II	MHC glykoproteiny II. třídy
NO	oxid dusnatý
OD	optická hustota
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PE	phycoerythrin
PE – Cy7	phycoerythrin – Cyanin 7
pH	vodíkový exponent (potential of hydrogen)
PVDF membrána	polyvinylidene difluorid membrána
ref	relativní odstředivá síla (relative centrifugal force)
RCL	reactive centre loop (centrální reaktivní smyčka)

REV	reverse (antikódující)
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
RPMI médium	Roswell Park Memorial Institute médium
SDS	dodecylsírán sodný
S.O.C médium	super optimální vývar s katabolickými restrikcemi (Super Optimal broth with Catabolite repression)
SW	soft wash
TAE	tris base-acetic acid EDTA
TEMED	tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumor necrosis factor, faktor nádorové nekrózy
Tris	trisaminometan

8. Seznam použité literatury

- Abbas, M. N. (2022). Serpins in Tick Physiology and Tick-Host Interaction. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 19 (12). doi: 10.3389/fcimb.2022.892770.
- Anderson, J.F. & Magnarelli, L.A. (2008). Biology of ticks. *Infectious Diseases Clinics of North America*. 22 (2). doi: 10.1016/j.idc.2007.12.006.
- Cagliani, R. (2016). The mammalian complement system as an epitome of host-pathogen genetic conflicts. *Molecular Ecology*. 25 (6). doi: 10.1111/mec.13558.
- Coutinho, M. L. (2020). *Rhipicephalus microplus* serpins interfere with host immune responses by specifically modulating mast cells and lymphocytes. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 11 (4). doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101425.
- Cupp, E. W. (1991). Biology of Ticks. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 21 (1). doi:10.1016/s0195-5616(91)50001-2.
- de Araujo, A. C. (2024). Genome sequences of four *Ixodes species* expands understanding of tick evolution. biorxiv.org. (2024_03_15). doi: 10.1101/2024.02.29.581698
- de Castro, M. H. (2016). De novo assembly and annotation of the salivary gland transcriptome of *Rhipicephalus appendiculatus* male and female ticks during blood feeding. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 7 (4). doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.01.014.
- de la Fuente, J. (2017). Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7 (7). doi: 10.3389/fcimb.2017.00114.
- Dunstone, M. A. & Whisstock, J. C. (2011) Crystallography of serpins and serpin complexes. *Methods in Enzymology*. 501. doi: 10.1016/B978-0-12-385950-1.00005-5.
- Francischetti, I. M. (2010). Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*. 56 (7). doi: 10.1016/j.toxicon.2009.12.003.
- Gettins, P. G. (2002). Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews*. 102 (12). doi: 10.1021/cr010170+.
- Huntington, J. A. (2011). Serpin structure, function and dysfunction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 9 (26). doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04360.x.
- Chlastáková, A. (2021). Iripin-3, a New Salivary Protein Isolated From *Ixodes ricinus* Ticks, Displays Immunomodulatory and Anti-Hemostatic Properties *In vitro*. *Frontiers in Immunology*. 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.626200.

- Chlastáková, A. (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. doi: 10.3389/fimmu.2023.1116324.
- Chmelař, J. (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*. 117 (2). doi: 10.1182/blood-2010-06-293241.
- Chmelař, J. (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*. 75 (16). doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.026.
- Chmelař, J. (2016). All For One and One For All on the Tick-Host Battlefield. *Trends in Parasitology*. 32 (5). doi: 10.1016/j.pt.2016.01.004.
- Chmelař, J. (2017). Protease Inhibitors in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystatins in Tick-host-Pathogen Interaction. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7 (216). doi: 10.3389/fcimb.2017.00216.
- Chudzinski-Tavassi, A. M. (2016). Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 77 (14). doi: 10.1016/j.biopha.2015.11.003.
- Irving, J. A. (2002). Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: Engineering α 1-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases. *Biochemistry*. 41 (15). doi: 10.1021/bi0159985.
- Jackson, S. P. (2007). The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. 109 (12). doi: 10.1182/blood-2006-12-027698.
- Kaščáková, B. (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.
- Kelly-Robinson, G. A. (2021). The Serpin Superfamily and Their Role in the Regulation and Dysfunction of Serine Protease Activity in COPD and Other Chronic Lung Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (12). doi: 10.3390/ijms22126351.
- Kotál, J. (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*. (128). doi: 10.1016/j.jprot.2015.07.005.
- Kotál, J. (2019). The structure and function of Iristatin, a novel immunosuppressive tick salivary cystatin. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 76. doi: 10.1007/s00018-019-03034-3.
- Kotál, J. (2021). *Ixodes ricinus* Salivary Serpin Iripin-8 Inhibits the Intrinsic Pathway of Coagulation and Complement. *International Journal of Molecular Sciences*. 22 (17). doi: 10.3390/ijms22179480.

- Kotsyfakis, M. (2015). Deep Sequencing Analysis of the *Ixodes ricinus* Haemocytome. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 9 (5). doi: 10.1371/journal.pntd.0003754.
- Kozaki, K. (1998). Isolation, purification, and characterization of a collagen-associated serpin, aspin, produced by murine colon adenocarcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*. 273 (24). doi: 10.1074/jbc.273.24.15125.
- LaPelusa, A. Physiology, Hemostasis. [Updated 2023 May 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545263/>
- Law, R. H. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*. 7 (5). doi:10.1186/gb-2006-7-5-216.
- Leboulle, G. (2002). Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (12). doi: 10.1074/jbc.M111391200.
- Li, B. (2012). A systems biology approach to understanding the mechanisms of action of chinese herbs for treatment of cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(10). doi: 10.3390/ijms131013501.
- Lucas, A. (2018). Overview of Serpins and Their Roles in Biological Systems. *Methods in Molecular Biology*. 1826. doi: 10.1007/978-1-4939-8645-3_1.
- Maas, C. a de Maat, S. (2021). Therapeutic SERPINS: Improving on Nature. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 8. doi: 10.3389/fcvm.2021.648349.
- Mangan, M. (2008). The role of serpins in vertebrate immunity. *Tissue antigens*. 72. doi: 10.1111/j.1399-0039.2008.01059.x.
- Marijanovic, E. M. (2019). Reactive centre loop dynamics and serpin specificity. *Scientific Report*. 9. doi: 10.1038/s41598-019-40432-w.
- Martins, L. A. (2020). Small protease inhibitors in tick saliva and salivary glands and their role in tick-host-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins Proteomics*. 1868 (2). doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140336.
- Moon, T. C. (2014). Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Frontiers in Immunology*. 5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00569.
- Moro-García, M. A. (2018). Influence of Inflammation in the Process of T Lymphocyte Differentiation: Proliferative, Metabolic, and Oxidative Changes. *Frontiers in Immunology*. 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.00339.

- Mulenga, A. (2009). *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC Genomics*. 10 (217). doi: 10.1186/1471-2164-10-217.
- Páleníková, J. (2015). *Ixodes ricinus* salivary serpin IRS-2 affects Th17 differentiation via inhibition of the interleukin-6/STAT-3 signaling pathway. *Infection and Immunity*. 83 (5). doi: 10.1128/IAI.03065-14.
- PCR Troubleshooting Guide. ThermoFisher. Staženo 7.4.2024 z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-troubleshooting.html?open=Nonspecific#Nonspecific>.
- Pejler, G. (2010). Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood*. 115 (24). doi: 10.1182/blood-2010-01-257287.
- Pekáriková, D. (2015). Vasoconstriction induced by salivary gland extracts from ixodid ticks. *International Journal for Parasitology*. 45 (14). doi: 10.1016/j.ijpara.2015.08.006.
- Porter, L. (2015). A Bioinformatic analyses of male and female *Amblyomma americanum* tick expressed serine protease inhibitors (serpins). *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 6 (1). doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.08.002.
- Prevot, P. P. (2006). Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (36). doi: 10.1074/jbc.M604197200.
- Rau, J. C. (2007). Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 5 (1). doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02516.x.
- Rodriguez-Valle, M. (2015). *Rhipicephalus microplus* serine protease inhibitor family: annotation, expression and functional characterisation assessment. *Parasites & Vectors*. 8 (7). doi:10.1186/s13071-014-0605-4.
- Rosano, G. L. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*. 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
- Sanrattana, W. (2019). SERPINs-From Trap to Treatment. *Frontiers in Medicine*. 6 (25). doi: 10.3389/fmed.2019.00025.
- Silverman, G. A. (2001). The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (36). doi: 10.1074/jbc.r100016200.
- Singh, S. M. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99 (4). doi: 10.1263/jbb.99.303.

- Sojka, D. (2013). New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends in Parasitology*. 29 (6). doi: 10.1016/j.pt.2013.04.002.
- Song, J. (2011). Predicting serpin/protease interactions. *Methods in Enzymology*. 501. doi: 10.1016/B978-0-12-385950-1.00012-2.
- Spence, M. A. (2021). A Comprehensive Phylogenetic Analysis of the Serpin Superfamily. *Molecular Biology and Evolution*. 38 (7). doi: 10.1093/molbev/msab081.
- Sprong, H. (2018). Control of Lyme borreliosis and other *Ixodes ricinus*-borne diseases. *Parasites & Vectors*. 11 (145). doi: 10.1186/s13071-018-2744-5.
- Syrovets, T. (2012). Plasmin as a proinflammatory cell activator. *Journal of Leukocyte Biology*. 92 (3). doi: 10.1189/jlb.0212056.
- Tirloni, L. (2014). A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Experimental Parasitology*. 137. doi: 10.1016/j.exppara.2013.12.001.
- Tirloni, L. (2015). Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. *Parasites & Vectors*. 8 (338). doi: 10.1186/s13071-015-0918-y.
- Tirloni, L. (2019). *Amblyomma americanum* serpin 27 (AAS27) is a tick salivary anti-inflammatory protein secreted into the host during feeding. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 13 (8). doi: 10.1371/journal.pntd.0007660.
- Wang, F. (2020). The immunosuppressive functions of two novel tick serpins, HlSerpin-a and HlSerpin-b, from *Haemaphysalis longicornis*. *Immunology*. 159 (1). doi: 10.1111/imm.13130.
- Whisstock, J. (1998). An atlas of serpin conformations. *Trends in Biochemistry Science*. 23 (2). doi: 10.1016/s0968-0004(97)011729.
- Xu, Z. (2019). Immunomodulatory effects of *Rhipicephalus haemaphysaloides* serpin RHS2 on host immune responses. *Parasites & Vectors*. 12(1). doi: 10.1186/s13071-019-3607-4.
- Xu, Z. (2020). A serpin from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*: Involvement in vitellogenesis. *Veterinary Parasitology*. 279. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109064.
- Yaron, J. R. (2021). Fibrinolytic Serine Proteases, Therapeutic Serpins and Inflammation: Fire Dancers and Firestorms. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 8. doi: 10.3389/fcvm.2021.648947.
- Ye, S. (2001). The structure of a Michaelis serpin-protease complex. *Nature Structural Biology*. 8 (11). doi: 10.1038/nsb1101-979.

- Yu, Y. (2013). Isolation and characterization of two novel serpins from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 4 (4). doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.02.001.
- Zarbock, A. (2007). Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation. *Blood Reviews*. 21 (2). doi: 10.1016/j.blre.2006.06.001.
- Zhang, X. (2020). Metabolic substrate utilization in stress-induced immune cells. *Intensive Care Medicine Experimental*. 8 (1). doi: 10.1186/s40635-020-00316-0.