

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Příprava mutantního serpinu z klíštěte
Ixodes ricinus

Diplomová práce

Bc. Monika Ederová

Školitel: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2022

Ederová, M., 2022: Příprava mutantního serpinu z klíštěte *Ixodes ricinus*. [Mutagenesis of a serpin from the tick *Ixodes ricinus*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 62 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Point mutation altering arginin for tryptophan amino acid residue in P1 site of tick salivary serpin Iripin-1 was created using specific primers. Recombinant protein with this mutation in nucleotide sequence was then expressed in chemically competent *Escherichia coli* cells, extracted from them and purified by affinity and size-exclusion chromatography. To see the impact of the mutation on inhibitory function of Iripin-1, its ability to bind trypsin and form covalent complexes was evaluated.

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

V Českých Budějovicích dne 11.4.2022

.....

podpis studenta

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, trpělivost a ochotu pomoci s jakýmkoliv problémem. Zároveň bych chtěla poděkovat i Mgr. Ľubici Makušové za pomoc s jednotlivými laboratorními metodami a Mgr. Barboře Kašćákové za pomoc s provedením chromatografických metod.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Proteázy	1
1.2. Inhibitory proteáz.....	2
1.3. Serpiny (inhibitory serinových proteáz)	3
1.3.1 Obecný úvod do funkce serpinů	3
1.3.2. Struktura serpinů	4
1.3.3. Princip inhibice.....	6
1.3.4. Mutageneze	8
2. Cíle práce	10
3. Materiál a metody.....	11
3.1. Seznam chemikálií a kitů použitých v jednotlivých metodách, složení pufrů a gelů	11
3.2. Klonování	17
3.2.1. Návrh primerů	17
3.2.2. Gradientová PCR.....	17
3.2.3. High-fidelity PCR.....	19
3.2.4. Příprava vektoru pET-19b pro klonování	20
3.2.5. Restrikční štěpení a ligace.....	21
3.2.5.1. Restrikční štěpení.....	21
3.2.5.2. Ligace.....	22
3.2.6. Transformace do kompetentních buněk.....	23
3.2.7. Colony PCR.....	23
3.2.8. Transformace do BL21 buněk.....	25
3.3. Pilotní exprese.....	26
3.4. Western Blot	28
3.5. Large-scale exprese	29

3.6. Afinitní chromatografie.....	30
3.7. Rozměrově-vylučovací chromatografie	31
3.8. Tvorba komplexů Iripin-1 R357W s trypsinem.....	31
4. Výsledky.....	32
4.1. Porovnání Iripin-1 a Iripin-1 R357W.....	32
4.2. Příprava konstruktů pET-19b-Iripin-1 R357W	33
4.3. Pilotní exprese.....	35
4.4. Large-scale exprese.....	41
4.5. Afinitní chromatografie.....	42
4.6. Rozměrově-vylučovací chromatografie	48
4.7. Tvorba komplexů Iripin-1 R357W s trypsinem.....	51
5. Diskuse	52
6. Závěr	56
Seznam literatury	57

1. Úvod

Klíšťata patří k parazitickým členovcům, kteří se živí sáním krve savců, ptáků či plazů. Při tomto způsobu obživy čelí obranným mechanismům hostitelského organismu, mezi něž patří hemostáza, reakce imunitního systému a zánětlivá odpověď. Jelikož proces sání hostitelovy krve trvá po dobu několika dní, klíšťata musí být schopna potlačovat výše zmíněné překážky. To je zajištěno komplexním složením jejich slin, ve kterých se nachází směs protisrážlivých a vazodilatačních komponent, které zajišťují kontinuální tok krve v místě sání, a imunomodulačních látek (Anderson a Magnarelli, 2008; Martins a kol., 2020).

Důležitou složkou klíštěcích slin jsou proteázové inhibitory, z nichž jsou zde zastoupeny tři hlavní skupiny: převážně antikoagulační Kunitzovy inhibitory, serpiny a cystatiny (poslední dvě zmiňované skupiny kromě antihemostatického efektu ovlivňují i hostitelskou imunitní odpověď) (Chmelař a kol., 2017). Právě serpiny neboli inhibitory serinových proteáz jsou předmětem zájmu této práce.

1.1. Proteázy

Proteázy jsou enzymy katalyzující hydrolýzu peptidové vazby za vzniku peptidů, menších bílkovin či jednotlivých aminokyselin (da Silva, 2017). Jsou esenciální pro všechny živé organismy, v nichž hrají důležitou roli v rámci biologických regulací (Johnson a Pellecchia, 2006). V první řadě jsou zodpovědné za rozklad proteinů přijímaných v potravě na jednotlivé aminokyseliny, které jsou poté využívány jako stavební bloky pro proteosyntetické procesy v organismu. Zároveň jsou ale také využívány při přestavbě buněk a v procesech růstu za současného zachování rovnováhy mezi rozkladem starých a syntézou nových proteinů (Barrett, 2000).

Proteolýza katalyzovaná proteázami hraje důležitou úlohu i v procesech jako je aktivace proteinových molekul do jejich biologicky funkčního stavu (to lze sledovat u různých funkčních složek v rámci lidského těla jako např. kaskádovitě aktivace komplementového systému (Beinrohr a kol., 2011) nebo jednotlivých faktorů koagulační kaskády (Green, 2006)). Zároveň ale i samotné proteázy mohou být produkovány ve formě proenzymů za potřeby proteolytického štěpení pro jejich aktivaci. Veškeré takové proteolytické přeměny musí být navíc dokonale synchronizovány v rámci celého organismu (Sambrano a kol., 2000).

V r. 2004 Rawlings a kol. (Rawlings, Tolle a Barrett, 2004) klasifikovali proteázy a proteázové inhibitory na základě struktury do jednotlivých rodin a dalších subjednotek. Tuto hierarchickou klasifikaci proteáz a jejich inhibitorů lze nalézt v databázi MEROPS (MEROPS

the Peptidase Database, 2017), kde jsou proteázy či inhibitory proteáz s významnou podobností aminokyselinové sekvence proteázové či inhibiční jednotky, tedy té části molekuly, která je zodpovědná za proteolytickou či inhibiční aktivitu, seskupeny do jednotlivých rodin. Většina proteáz má jen jednu proteázovou jednotku, nicméně inhibitory proteáz mohou obsahovat několik inhibičních jednotek (Rawlings, 2010). Skupiny proteáz či jejich inhibitorů, které mají podobnou terciární strukturu, jsou poté seskupeny do tzv. klanů (Rawlings, Tolle a Barrett, 2004; Rawlings, 2010, 2020; Rawlings a kol., 2014).

Hlavní proteázové rodiny zahrnují (Johnson a Pellecchia, 2006; da Silva, 2017; Elsässer a Goettig, 2021):

- 1) aspartátové proteázy (značené písmenem A, zastoupeny např. pepsinem či reninem) – endoproteázy, jejichž katalytický aparát zahrnuje 2 kyseliny asparagové
- 2) cysteinové proteázy (značené písmenem C, zastoupeny např. katepsiny či papainem) – endoproteázy a exoproteázy, které mají v aktivním místě přítomen cystein
- 3) metaloproteázy (značené písmenem M, zástupcem je např. kolagenáza) – endoproteázy a exoproteázy, jejichž aktivita je závislá na kovových iontech, obvykle závisí na přítomnosti Zn, ale může se jednat i o Co, Mn, Ni, Cu či Fe
- 4) serinové proteázy (značené písmenem S, patří k nim např. trombin, trypsin či chymotrypsin) – endoproteázy a exoproteázy, v jejichž aktivním místě je přítomen jeden serin
- 5) threoninové proteázy (značené písmenem T) - endoproteázy, u nichž proteolytická aktivita závisí na přítomnosti N-terminálního threoninového zbytku v aktivním místě enzymu
- 6) glutamátové proteázy (značené písmenem G) – endoproteázy, které obsahují glutamát v aktivním místě
- 7) asparaginová peptidová lyáza (značená písmenem N) – endoproteáza, která jako jediná ze skupiny proteáz není hydrolázou a která v aktivním místě obsahuje asparagin

1.2. Inhibitory proteáz

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.1., proteázy jsou zásadní pro správný chod organismu. Vše ale musí být udržováno v rovnováze, proto existují různé mechanismy, kterými je proteolýza regulována. Jedním z těchto mechanismů je právě přítomnost inhibitorů proteáz (Johnson a Pellecchia, 2006).

Existují 2 základní mechanismy, jakými inhibitory proteáz inhibují cílové enzymy (Rawlings, Tolle a Barrett, 2004; Rawlings, 2010; Shamsi, Parveen a Fatima, 2016):

1) ireverzibilní reakce („sebevražedný“ typ) – tento způsob inhibice spočívá v rozštěpení peptidové vazby inhibitoru, vzniku kovalentního komplexu inhibitoru a proteázy a výsledné konformační změně vedoucí k rozrušení aktivního místa cílové proteázy. Inhibitor tady tedy využívá katalytickou aktivitu proteázy, aby ji uvěznil a inaktivoval (Farady a Craik, 2010). Touto cestou mohou být inhibovány jen endoproteázy. Mezi rodiny inhibitorů proteáz, které oplývají tímto mechanismem inhibice, patří mimo jiné i serpiny, kterými se tento text bude zabývat více do detailu v kapitole 1.3. (Yamasaki a kol., 2010).

2) reverzibilní kompetitivní reakce – klasický způsob inhibice, který využívá většina proteázových inhibitorů, kdy se inhibiční jednotka inhibitoru váže do aktivního místa inhibované proteázy jako klíč do zámku. Peptidová vazba inhibitoru je proteázou štěpena velmi pomalu, přičemž nedochází k uvolnění produktů a vazba může být obnovena. Na rozdíl od 1. typu inhibice nedochází k „sebevražednému“ obětování inhibitoru, dochází jednoduše k fyzickému zablokování přístupu k aktivnímu místu cílové proteázy. Mezi inhibitory s tímto mechanismem inhibice se řadí inhibitory cysteinových proteáz či inhibitory metaloproteáz (Farady a Craik, 2010).

Některé proteázy mohou vázat své substráty nejen v rámci aktivního místa, ale zároveň i pomocí sekundárních vazebných míst mimo aktivní místo (tzv. exosites), což prostřednictvím navýšení plochy interakce inhibitor-proteáza zvyšuje afinitu interakce (Whisstock a kol., 2010). Určité typy inhibitorů mohou pak fungovat skrze blokaci těchto přídatných míst spíše než interakcí s aktivním místem proteázy.

1.3. Serpiny (inhibitory serinových proteáz)

1.3.1 Obecný úvod do funkce serpinů

Serpiny jsou největší nadrodinou inhibitorů proteáz využívajících „sebevražedný“ způsob inhibice (Shamsi, Parveen a Fatima, 2016). Velikostně se tyto proteiny pohybují kolem 40 - 50 kDa, nicméně někteří zástupci jako antitrombin či heparinový kofaktor II a další dosahují větších velikostí díky prodlouženému N-terminálnímu konci. Kromě člověka (v lidské plazmě představují zhruba 2 - 10 % všech proteinů (van Gent a kol., 2003; Lucas a kol., 2018)) a zvířat se vyskytují i u rostlin, bakterií, virů nebo archeí (Gettins a Olson, 2016).

Z valné většiny se jedná o inhibitory serinových proteáz, nicméně část z nich inhibuje cysteinové proteázy (Farady a Craik, 2010), mohou cílit i na metaloproteázy či kaspázy (Ray a kol., 1992; Gettins a Olson, 2016) a část zcela postrádá inhibiční aktivitu (vzácně mohou

plnit funkce hormonálních transportérů, chaperonů či nádorových supresorů (Blisnick, Foulon a Bonnet, 2017)).

Serpiny se podílí na regulaci celé řady procesů probíhajících v organismu jako je koagulace, zánět či imunitní odpověď (Shamsi, Parveen a Fatima, 2016; Lucas a kol., 2018). Kromě samotného krevního srážení jsou zapojeny i v regulaci fibrinolýzy a aktivace komplementu (Gettins a Olson, 2016). Narušení jejich funkce, jejich nedostatek nebo naopak zvýšená produkce tak mohou vyústit v krvácivé či trombofilní stavy (Rau a kol., 2007).

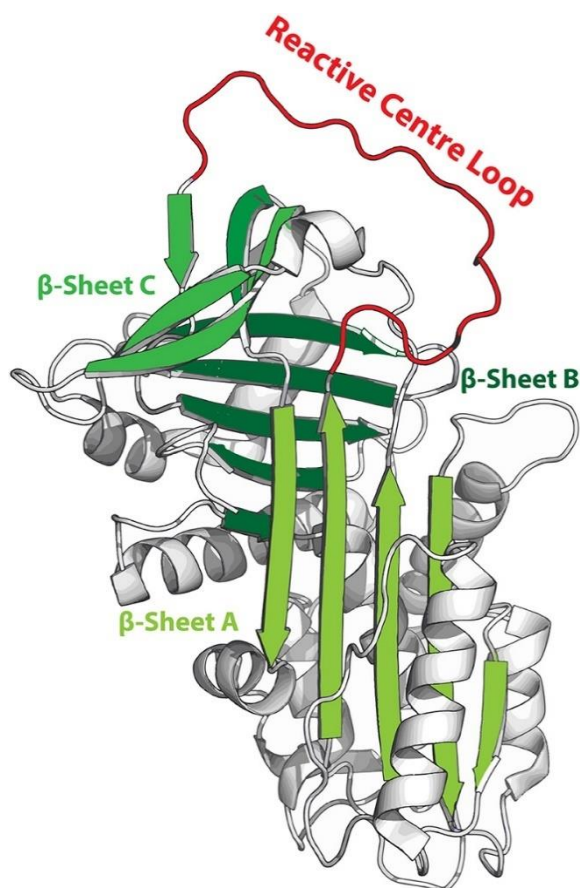
U hematofágních živočichů serpiny hrají roli při potlačení hemostatické odpovědi hostitele a udržování plynulého přísunu krve během sání. Klíšťata se tomuto způsobu výživy přizpůsobila vpravováním vazodilatačních, protizánětlivých a protisrážlivých složek (Ribeiro a Francischetti, 2003; Francischetti, Ivo, 2009) do hostitele. Na rozdíl od endogenních serpinů, které mají za úkol udržovat hemostázu v rovnováze, exogenní serpiny tuto rovnováhu posouvají směrem k inhibici koagulace vzhledem k potřebám hematofágních živočichů během sání krve. Serpiny svou roli sehrávají např. i v ochraně virů proti imunitní odezvě hostitele, která blokuje jejich množení (Lucas a kol., 2018).

1.3.2. Struktura serpinů

Primární struktura serpinů je tvořena 350 – 400 aminokyselinovými zbytky (Blisnick, Foulon a Bonnet, 2017). Jejich sekundární struktura, zachycená na Obr. 1, pak zahrnuje (Silverman a kol., 2001):

- a) tři β -skládané listy – největší je β -list A, menší potom β -list B a β -list C
- b) 8 – 9 α -helixů (značené A-I)

c) centrální reaktivní smyčku (RCL, Reactive Centre Loop) – ta je umístěna mezi β -listem A a C, vyčnívá do prostoru mimo hlavní strukturní jádro serpinu a slouží jako „návnada“ pro cílovou proteázu (Lucas a kol., 2018; Yaron a kol., 2021). Je to právě ta část serpinu, která interaguje s aktivním místem cílové proteázy. Její délka u inhibičních serpinů vykazuje jen nízkou variabilitu, obvykle se skládá ze 16 – 17 aminokyselinových zbytků (Gettins, 2002).



Obr. 1: Struktura serpinů (Maas a de Maat, 2021). RCL vyznačená červenou barvou vyčnívá do prostoru rozprostřená mezi β -listy A a C a je připravena interagovat s cílovou proteázou. Jednotlivé β -listy jsou znázorněny zeleně, α -helixy pak bíle.

Jako rozpoznávací oblast cílové proteázy slouží vazba mezi P1 a P1' místem v rámci RCL. Dle Schechtera a Bergera (Schechter a Berger, 1967) jsou aminokyseliny proteázového substrátu (v našem případě aminokyseliny tvořící RCL) značeny jako Pn – P2 na N-terminálním konci, P1 a P1' – Pn' na C-terminálním konci (viz Obr. 2). Tato místa poté interagují s korespondujícími oblastmi proteázy značenými Sn – S2, S1 a S1' – Sn' (Irving a kol., 2002; Antalis a Lawrence, 2004).

Serpiny jsou zvláštní tím, že v nativním stavu nezaujmají nejstabilnější konformaci, ale tzv. metastabilní konformaci (Tsutsui, Dela Cruz a Wintrode, 2012). V takovémto uspořádání jsou schopny za fyziologických podmínek vydržet stabilní po několik dní.

Obecně se tyto inhibitory mohou vyskytovat ve 3 různých konformacích (Whisstock a kol., 2000; Marszal a Shrake, 2006; Gettins a Olson, 2016):

- 1) nativní konformace – metastabilní konformace, u které RCL vyčnívá do prostoru a je připravena na interakci s cílovou proteázou
- 2) latentní konformace – stabilnější uspořádání, kdy dochází k vložení RCL do středu β -listu A za současné extrakce 1 vlákna z β -listu C
- 3) serpin po proběhlém proteolytickém štěpení – nejstabilnějšího uspořádání je dosaženo rozštěpením peptidové vazby P1-P1', jelikož vložení RCL do β -listu A může proběhnout bez potřeby extrakce vlákna z β -listu C

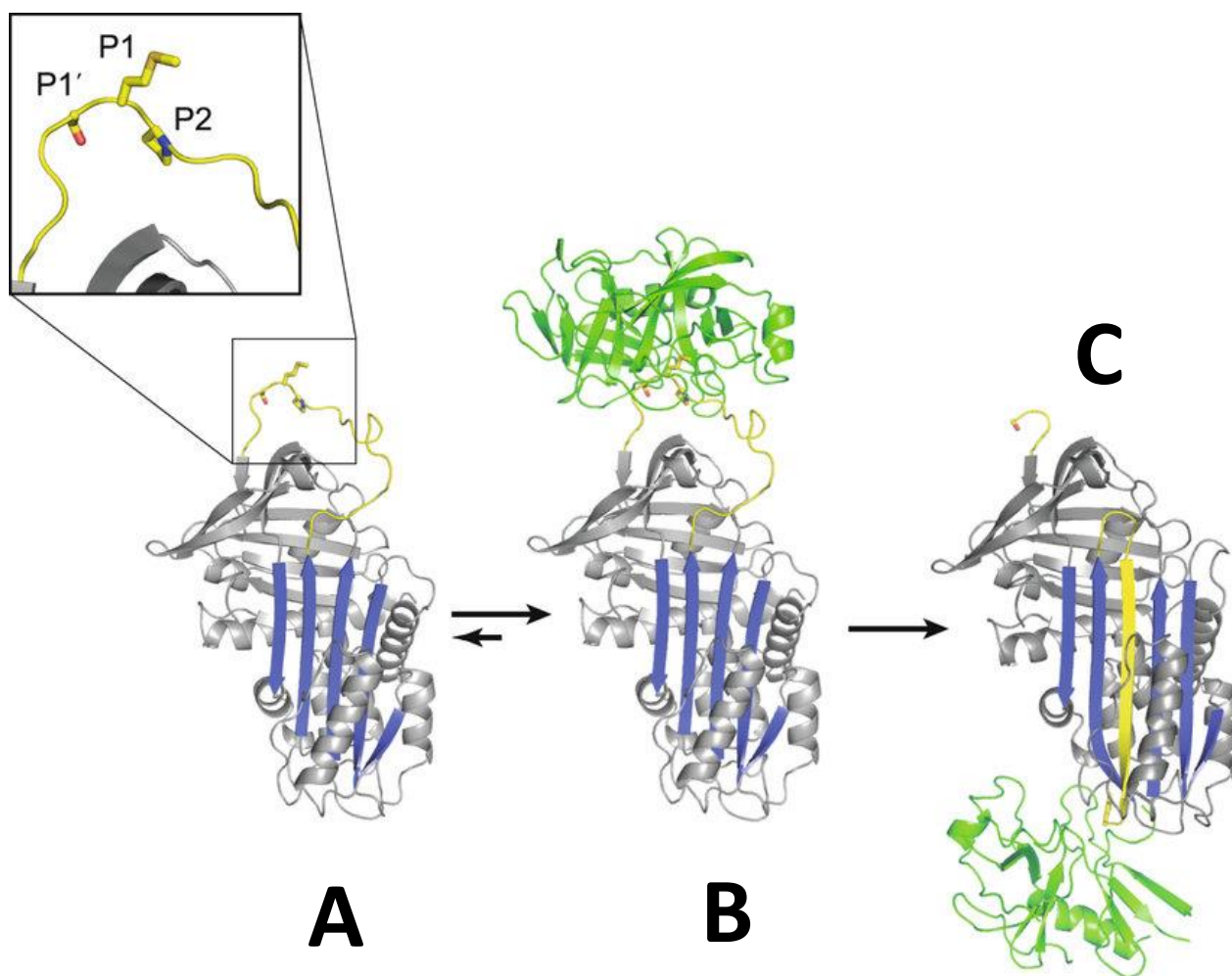
Specifita serpinů je primárně určena složením RCL, konkrétně aminokyselinami v místě P1 a v jeho blízkém okolí (Marijanovic a kol., 2019), nicméně je také navýšena interakcí proteázy se sekundárními vazebnými místy (tzv. exosites). Ty napomáhají k upevnění komplexu serpin-proteáza a podporují inhibiční funkci serpinu, protože disociace takového komplexu je zpomalena (Gettins a Olson, 2009).

1.3.3. Princip inhibice

Pro inhibiční funkci serpinů je stěžejní RCL, která je proteázou specificky rozpoznávána jako vhodný substrát. Proteáza zprvu tvoří nekovalentní komplex se serpinem na základě interakcí s místy kolem vazby, která má být zhydrolyzována (P1-P1') (Silverman a kol., 2001).

Vazba P1-P1' je nejprve enzymaticky štěpena proteázou, načež dojde ke kovalentnímu spojení proteázy a RCL smyčky (Lucas a kol., 2018). Podstatou sebevražedného inhibičního mechanismu serpinů je následné vložení N-terminálního konce RCL stále spojeného s proteázou do β -listu A. Pokud je vkládání RCL dostatečně rychlé, dojde k inhibici proteázy, pokud ne, serpin se stává substrátem a dojde k rozštěpení P1-P1' vazby bez inhibice (Marijanovic a kol., 2019). Vložení RCL do β -listu poté zapříčiní přesun proteázy kovalentně vázané se serpinem na opačnou stranu molekuly serpinu (Rawlings, Tolle a Barrett, 2004; Farady a Craik, 2010). Stericky je toto přeuspořádání usnadněno pomocí pohyblivého „pantu“ – tzv. „hinge region“ serpinu složeného z krátkého řetězce aminokyselin (Marijanovic a kol., 2019). Přesun navázané proteázy zapříčiní deformaci jejího aktivního místa, neschopnost efektivně dokončit hydrolyzu serpinu a uvolnit se z komplexu, čímž dojde k její ireverzibilní inhibici (Law a kol., 2006). Proces konformační změny je zaznamenán na Obr. 2.

Vzniklé komplexy serpin-proteáza jsou následně internalizovány do buněk k degradaci (Kounnas a kol., 1996).



Obr. 2: Konformační změna serpinu vedoucí k ireverzibilní inhibici navázané proteázy (Polderdijk a Huntington, 2018). V části **A** je vidět serpin v nativním stavu se žlutě naznačenou RCL vyčnívající do prostoru (včetně detailu na P1 a přiléhající oblasti) a modře naznačeným β -listem A. V části **B** je zobrazeno navázání cílové proteázy na RCL serpinu. Proteáza tuto smyčku rozpoznává jako substrát pro proteolytické štěpení. V části **C** již došlo ke konformační změně, kdy byla rozštěpená RCL zařazena do β -listu A (viz žlutá šipka vložená mezi modrými) se současnou translokací proteázy na opačný pól serpinu a deformací jejího katalytického místa.

Sebevražedný způsob inhibice je velmi efektivní, nicméně jelikož dochází k uvěznění jak cílové proteázy, tak i inhibičního serpinu, je potřeba, aby se v organismu vyskytovalo velké množství serpinových inhibitorů (aby mohly plnit své regulační funkce např. v rámci celého oběhového systému) (Lucas a kol., 2018). Velkou výhodou serpinové inhibice je regulace

jejich funkce pomocí specifických kofaktorů (např. serpin antitrombin inaktivuje trombin a fXa jen v malé míře, dokud není přítomen jeho kofaktor heparin (Rezaie, 1998)).

1.3.4. Mutageneze

Mutageneze serpinů je velmi užitečným nástrojem v rámci studia jejich struktury a funkce. Může být využita i pro určení významu určité oblasti v rámci struktury serpinu (Antalis a Lawrence, 2004). Vzhledem k významu RCL pro specifitu serpinů bylo publikováno několik pokusů zavádějících mutace v rámci RCL sekvence (nejčastěji bodové mutace) či zaměňujících sekvence RCL mezi různými serpiny (Marijanovic a kol., 2019). Mutageneze aminokyselin v oblasti P1 je přijatelná, jelikož tato místa jsou vystavena kontaktu s proteázou a neměla by nijak výrazně ovlivnit sbalení proteinu nebo vkládání RCL do β -listu A. Mutace mohou být zaváděny ale i do hinge regionu, kde mohou zablokovat inhibiční aktivitu serpinu, aniž by narušily jiné interakce, ústí tedy ve vystupování serpinu jakožto pouhého substrátu dané proteázy spíše než jejího inhibitoru (Antalis a Lawrence, 2004; Marijanovic a kol., 2019).

Obecně je v tomto odvětví výzkumu kladen velký důraz na serpiny mající významnou úlohu v regulaci hemokoagulačního systému a na dopad zaváděných mutací na jejich funkci a vznik případných onemocnění s tím spojenými. To lze vidět např. v práci Elderinga a kol. (1992) popisující záměnu methioninu za arginin v P1 místě vedoucí ke změně specifity alfa-1-antitrypsinu z neutrofilní elastázy na trombin a jiné arginin-specifické proteázy, což ve výsledku ústí v krvácivé stavy u jedinců s danou variantou (Eldering a kol., 1992). U antitrombinu se záměnou argininu za tyrosin zase výrazně klesá jeho inhibiční vliv na určité faktory koagulační kaskády (především trombin, ale i fXa). Z pozorovaných výsledků tedy vyplývá, že jednotlivé proteázy se liší schopností akceptovat záměnu aminokyseliny, která vstupuje do interakce v jejich aktivním místě (Yang a kol., 2010).

V minulosti bylo provedeno i několik experimentů s chimerickými serpiny připravenými záměnou sekvencí mezi serpiny, aby se ověřil dopad takové záměny na funkci proteinů. Většina studií se opět zaměřovala na serpiny, které hrají důležitou roli v koagulačním systému (Ehrlich a kol., 1990; Lawrence a kol., 1990; Hopkins a kol., 1995). Pomocí mutagenního přístupu byl tímto způsobem zkoumán i charakter inhibičních účinků určitých serpinů (Sherman a kol., 1995; Chuang a kol., 2001; Yang a kol., 2010) či význam exosites na jejich inhibiční funkci (Izaguirre a kol., 2013).

Mutageneze RCL a přilehlých míst má také velký terapeutický potenciál. Mohla by být využita pro léčbu chorob postihujících koagulační systém jako je např. hemofilie. Ve studii Polderdijk a kol. (2017) se zaměřili na inhibici aktivovaného proteinu C (APC), který je

normálně zodpovědný za proteolytickou inaktivaci fV a fVIII. Mezi jeho endogenní inhibitory patří α_1 -antitrypsin, ten ovšem vykazuje nízkou reaktivitu a selektivitu pro APC. Zavedení mutace v jeho RCL smyčce vedla k rychlé a specifické inhibici APC s dalšími výhodami, pomocí nichž by se mohlo jednat o vhodného kandidáta pro léčbu hemofilie (Polderdijk a kol., 2017). Jiná studie přišla s nápadem využít schopnost serpinů inhibovat cysteinové proteázy, mezi něž patří i proteáza M^{pro} důležitá pro replikaci viru SARS-CoV-2. Vložení rozpoznávacího místa této proteázy do RCL smyčky serpinu by mohla být využita v rámci terapie tohoto respiračního onemocnění (Jairajpuri a Ansari, 2020).

V mutagenezi hraje ovšem zásadní roli jedinečnost konformace serpinů. V rámci terapeutického využití je příprava serpinů s požadovanou specifitou zavedenou pomocí záměny určité části RCL znemožněna komplexností inhibičního mechanismu serpinů. Např. ve studii využívající syntetický termostabilní serpin, conserpin, nevedlo vložení sekvence aminokyselin typické pro α_1 -antitrypsin do RCL k výraznému inhibičnímu účinku na trypsin. Důvodem by mohly být elektrostatické interakce mezi RCL smyčkou serpinu a aktivním místem proteázy, které definují rychlost inhibičního procesu a rozhodují, zda bude proteáza zainhibována či bude serpin zpracován jako její substrát (Marijanovic a kol., 2019).

Na závěr je nutné zdůraznit, že velká část studií využívajících mutagenezi serpinů se soustředí na RCL, především potom na P1 místo, kvůli výraznému vlivu mutací v těchto oblastech na specifitu serpinů (Antalis and Lawrence, 2004). Právě kvůli zásadnímu vlivu mutací zavedených v P1 místě byla v případě Iripin-1 zavedena do této oblasti bodová záměna argininu za tryptofan (k tomuto rozhodnutí jsme dospěli na základě studie Chuanga a kol. (Chuang a kol., 2001)). Efekt takové mutace byl poté sledován na schopnosti daného serpinu tvořit komplexy s cílovou proteázou.

2. Cíle práce

- 1.** Připravit mutantní konstrukt serpinu Iripin-1 (Iripin-1 R357W) se záměnou kodonu pro arginin za kodon pro tryptofan v P1 místě RCL smyčky
- 2.** Připravit Iripin-1 R357W v bakteriálním expresním systému a následně ho přečistit
- 3.** Ověřit vliv zavedené mutace na schopnost Iripin-1 R357W tvořit komplex s trypsinem

3. Materiál a metody

Následující text bude k označení původního serpinu bez mutace využívat výraz Iripin-1 a serpinu se záměnou argininu za tryptofan v P1 místě poté Iripin-1 R357W.

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

Veškerý materiál používaný v jednotlivých metodách a konkrétní složení užívaných gelů jsou uvedeny v Tab. I, Tab. II a Tab. III.

Tab. I: Seznam chemikálií užitých v jednotlivých metodách.

Název chemikálie	Specifikace
Gradientová PCR	
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, R0581
FWD primer (forward primer)	Generi Biotech 10 μ M, více viz sekce 3.2.1
REV primer (reverse primer)	Generi Biotech 10 μ M, více viz sekce 3.2.1
Templát	Iripin-1 zaklonovaný do plazmidu pET-17b
PCR master mix	ThermoFisher, K0171
High-fidelity PCR	
Q5 reakční pufr	NE BioLabs, B9027S
dNTP	NE BioLabs, N0447S
FWD + REV primery	viz Gradientová PCR
Templát	Iripin-1 zaklonovaný do plazmidu pET-17b v koncentraci 100 ng/ μ l
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, R0581
Q5 high-fidelity DNA polymeráza	NE BioLabs, M0491S
Gelová elektroforéza	
Agarózový gel (1%)	složení viz Tab. III
1x TAE pufr	40mM TRIS, 20mM kyselina octová a

	1mM EDTA
Loading Dye (6x) (vzorkový pufr)	ThermoFisher, R0611
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	ThermoFisher, SM0323
Transformace plazmidu/plazmidu s inzertem do kompetentních buněk	
NEB 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency) pro namnožení plazmidu s inzertem nebo One Shot BL21 (DE3) pro expresi proteinu	NE BioLabs, C2987H Invitrogen, C600003
Zásobní plazmid/plazmid s inzertem	čistý pET-19b/pET-19b s Iripin-1 R357W
SOC médium	NE BioLabs, B9020S
LB médium	15,5 g Luria Broth Base, Miller (Duchefa Biochemie, L1717.1000) v 1 l dH ₂ O
Ampicilin	v koncentraci 50 mg/μl
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, R0581
Restrikční štěpení	
rCutSmart pufr	NE BioLabs, B6004S
DNA (vektor a inzert)	
NdeI	NE BioLabs, R0111S
XhoI	NE BioLabs, R0146S
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, R0581
Alkalická fosfatáza	NE BioLabs, M0371S
Ligace	
T4 DNA ligační pufr (10x)	NE BioLabs, B0202A
Naštěpený vektor a inzert	
T4 DNA ligáza	NE BioLabs, M0202S
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, R0581
Colony PCR	
PCR master mix	ThermoFisher, K0171
Voda bez nukleáz	ThermoFisher, R0581

T7 FWD primer	Generi Biotech
T7 REV primer	Generi Biotech
LB médium	15,5 g Luria Broth Base, Miller (Duchefa Biochemie, L1717.1000) v 1 l dH ₂ O
Ampicilin	v koncentraci 50 mg/μl
Pilotní exprese	
OmniPur IPTG	Calbiochem, 367-93-1
LB médium	viz Colony PCR
Ampicilin	v koncentraci 50 mg/μl
SDS PAGE	
Polyakrylamidový gel (12%)	složení viz Tab. III
5x ELFO pufr	15,1 g TRIS, 72 g glycinu, 5 g SDS, doplněno do 1 l dH ₂ O
1x ELFO pufr	5x ELFO pufr 5x zředěný v dH ₂ O
Laemmli pufr (4x) (vzorkový pufr)	Bio-Rad, 1610747
Merkaptoethanol	
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	ThermoFisher, 26619
Barvení polyakrylamidových gelů	
Coomassie Brilliant Blue R-250 barvicí roztok	Bio-Rad, 161-0436
Odbarvovací roztok	100 ml kyseliny octové, 200 ml methanolu, 700 ml dH ₂ O
dH ₂ O	
Western blot	
Materiál potřebný pro SDS PAGE	viz SDS PAGE
PVDF membrána	ThermoFisher, 88518
10x transferový pufr	30,2 g TRIS, 144 g glycinu, doplněno do 1 l dH ₂ O
1x transferový pufr	100 ml 10x transferového pufru, 200 ml methanolu, 700 ml dH ₂ O

Methanol	
10x TBS	24,2 g TRIS, 87,6 g 1,5M NaCl, pH 7,5, doplněno do 1 l dH ₂ O
1x TBS	10x TBS 10x zředěný v dH ₂ O
Promývací pufr (TBS-T)	1x TBS, 0,1% Tween
Blokovací pufr	5% sušené mléko v TBS-T
Monoklonální anti-polyhistidinová protilátka (primární Ig, myší)	Sigma-Aldrich, H1029-100UL ředěná v 1% sušeném mléce v TBS-T (ředění 1:2000)
Anti-mouse IgG značená peroxidázou (sekundární Ig, koňská)	Vector Labs, PI-2000 ředěná v 1% sušeném mléce v TBS-T (ředění 1:2000)
Pufr na ředění protilátek	1% sušené mléko v TBS-T
Vyvíjecí roztok	1 ml Detection Reagent 1 Peroxide Solution (ThermoFisher, 1859701), 1 ml Detection Reagent 2 Luminol Enhancer Solution (ThermoFisher, 1859698)
Large-scale exprese	
LB médium	viz Colony PCR
Ampicilin	v koncentraci 50 mg/μl
OmniPur IPTG	Calbiochem, 367-93-1
Základní solubilizační pufr	20mM TRIS-HCl, pH 8
Solubilizační pufr 1	20mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, pH 8,5
Solubilizační pufr 2	20mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, pH 8
Solubilizační pufr 3	20mM TRIS-HCl, 150mM NaCl, pH 8
Solubilizační pufr 4	20mM TRIS-HCl, 240mM NaCl, 10mM KCl, 2mM MgCl ₂ , pH 8
Solubilizační pufr 5	PBS (8 g NaCl, 2,9 g Na ₂ HPO ₄ ·12 H ₂ O, 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 0,2 g KCl, doplněné do 1 l dH ₂ O)

Afinitní chromatografie	
SIGMAFAST tablety se směsí inhibitorů proteáz	Sigma-Aldrich, S8830
DNáza I	NE BioLabs, M0303S
HisTrap HP (5 ml) (kolona pro afinitní chromatografii)	GE Healthcare, 71-5027-68 AF
Ekvilibrační pufr	20mM TRIS, 300 mM NaCl, pH 8,5 přefiltrovaný, degasovaný
Eluční pufr	20mM TRIS, 300 mM NaCl, pH 8,5, 1M imidazol přefiltrovaný, degasovaný
Milli-Q H ₂ O	
Rozměrově-vylučovací chromatografie	
Superdex 75 Increase 10/300 GL (kolona)	Cytiva, 29148721
Solubilizační pufr 1	20mM TRIS, 300 mM NaCl, pH 8,5 přefiltrovaný, degasovaný
Testování tvorby komplexů	
Ředící pufr	20mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,01% Tween, pH 7,4
Iripin-1	rekombinantně připravený na Katedře medicínské biologie naředěn do 2μM koncentrace v ředícím pufru
Iripin-1 R357W	v koncentraci 2μM
Trypsin	ThermoFisher, 90305 naředěn do 2μM koncentrace v ředícím pufru

Tab. II: Seznam kitů použitých v jednotlivých metodách.

Název kitu	Specifikace
NucleoBond Xtra Midi kit	Macherey-Nagel, 740410.50
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit	Macherey-Nagel, 740609.250

NucleoSpin Plasmid kit	Macherey-Nagel, 740588.250
BCA Protein Assay Kit	Millipore, 71285-3
Amicon Ultra – 15 Centrifugal Filters (Ultracel – 10K)	Millipore, UFC901024
Amicon Ultra – 2mL Centrifugal Filters (Ultracel – 10K)	Millipore, UFC201024

Tab. III: Složení agarózového a polyakrylamidového gelu.

Složení agarózového gelu (1%)		
1x TAE pufr (40mM TRIS, 20mM kyselina octová a 1mM EDTA)	70 ml	
Agaróza (Life Technologies, 15510-027)	0,7 g	
SYBR Safe DNA (ThermoFisher, S33102)	7 μ l	
Složení polyakrylamidového gelu (12%)		
Chemikálie	Objem	
	Running gel	Stacking gel
dH ₂ O	3,375 ml	1,6 ml
TRIS-HCl/SDS (pH 8,8) (1,5M TRIS, 0,4% SDS)	1,375 ml	-
TRIS-HCl/SDS (pH 6,8) (0,5M TRIS, 0,4% SDS)	-	0,625 ml
Acryl/Bis 29:1 (40%) (VWR, 0311-500ml)	2,25 ml	0,245 ml
Ammonium persulfate (10%) (Sigma-Aldrich, 7727-54-0)	30 μ l	15 μ l
TEMED (VWR, 110-18-9)	6 μ l	3 μ l
Izopropanol	zalití 500 μ l izopropanolu pro vyrovnání	-

3.2. Klonování

3.2.1. Návrh primerů

Forward (FWD) a reverse (REV) primer byly navrženy na základě sekvence Iripin-1 tak, aby ve FWD primeru bylo přítomno štěpné místo pro restriční enzym NdeI a v REV primeru štěpné místo pro XhoI (sekvence obou primerů jsou uvedeny na Obr. 3). Reverse primer byl navíc navržen tak, aby během PCR vnášel do templátu Iripin-1 záměnu Arg za Trp v místě P1.

FWD

5' AAA **CATATG** CAAGGCAACGATAAACTTACCTTCGCCAAC3'

REV

5' AAA **CTCGAG** TCAGAGACTGTTCCTTGTCCCGCAAACAGGATGTCATTGGTGACCGTG
TTGCGTATGAAGAAGAGGAAAGGATGGTCGACGTTGAACTCGAATGCCTGCCTGCCAA
TCCATGT3'

Obr. 3: Sekvence forward a reverse primeru. Žlutě jsou vyznačena štěpná místa pro NdeI a XhoI.

Primery byly naředěny vodou bez nukleáz dle návodu tak, aby byly získány 10 μ M pracovní roztoky.

3.2.2. Gradientová PCR

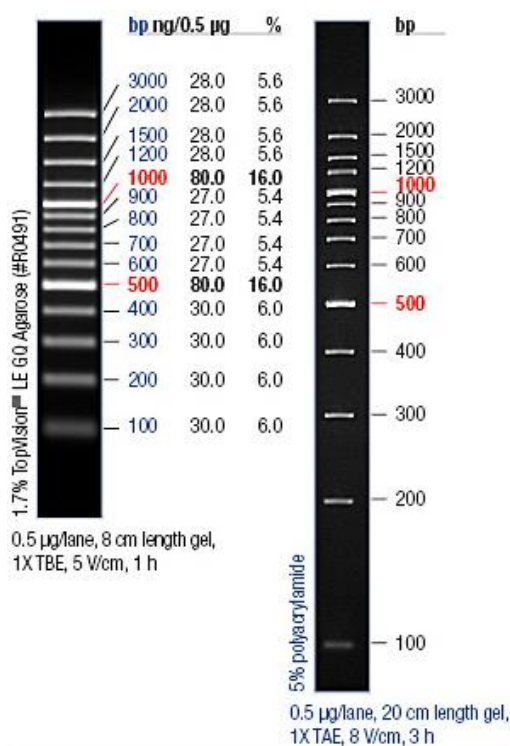
Pro určení ideální teploty nasedání primerů byly na ledu připraveny tři 20 μ l reakční směsi, jejichž složení je uvedeno níže. Jednotlivé reagenty byly napipetovány do tří 200 μ l zkumavek, které byly následně při PCR podrobeny rozdílným teplotám.

<u>Složení reakční směsi:</u>	2x PCR master mix	10 μ l
	FWD primer (10 μ M)	1 μ l
	REV primer (10 μ M)	1 μ l
	templát (v koncentraci 100 ng/ μ l)	1 μ l
	voda bez nukleáz	doplnit do 20 μ l

Během gradientové PCR byly testovány teploty 45 °C, 50 °C a 55 °C. Nastavení programu PCR cycleru bylo následující:

95 °C	1 - 3 min	} 30x
95 °C	30 s	
45 - 55 °C	30 s (gradient)	
72 °C	1 min/kb (Iripin-1 má 1200 bp → 75 s)	
72 °C	5 - 15 min	
4 °C	∞	

Vzorky byly následně smíchány s vizualizační barvičkou Loading Dye (6x) a podrobeny gelové elektroforéze na 1% agarózovém gelu (nastavení programu: 100 mA, 100 – 150 V, 30 – 45 min). Použitý velikostní standard je vyobrazen na Obr. 4.



Obr. 4: GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (BIOGEN PRAHA, 2022).

Gely byly po skončení gelové elektroforézy vyfoceny pod UV filtrem.

3.2.3. High-fidelity PCR

Po stanovení teploty nasedání navržených primerů s nejvyšším výtěžkem byla provedena high-fidelity PCR za využití vysoce specifické Q5 DNA polymerázy schopné opravy chybně zařazených nukleotidů.

Pro PCR reakci byla na ledu připravena 50 μ l reakční směs, jejíž složení je uvedeno níže.

<u>Reakční směs:</u>	5x Q5 reakční pufr	10 μ l
	dNTP (10mM).....	1 μ l
	FWD a REV primer (10 μ M)	2,5 μ l
	templát (v koncentraci 100 ng/ μ l)	1 μ l
	Q5 high-fidelity DNA polymeráza (2000 U/ml).....	0,5 μ l
	voda bez nukleáz	doplnit do 50 μ l

Nastavení programu PCR cycleru bylo následující:

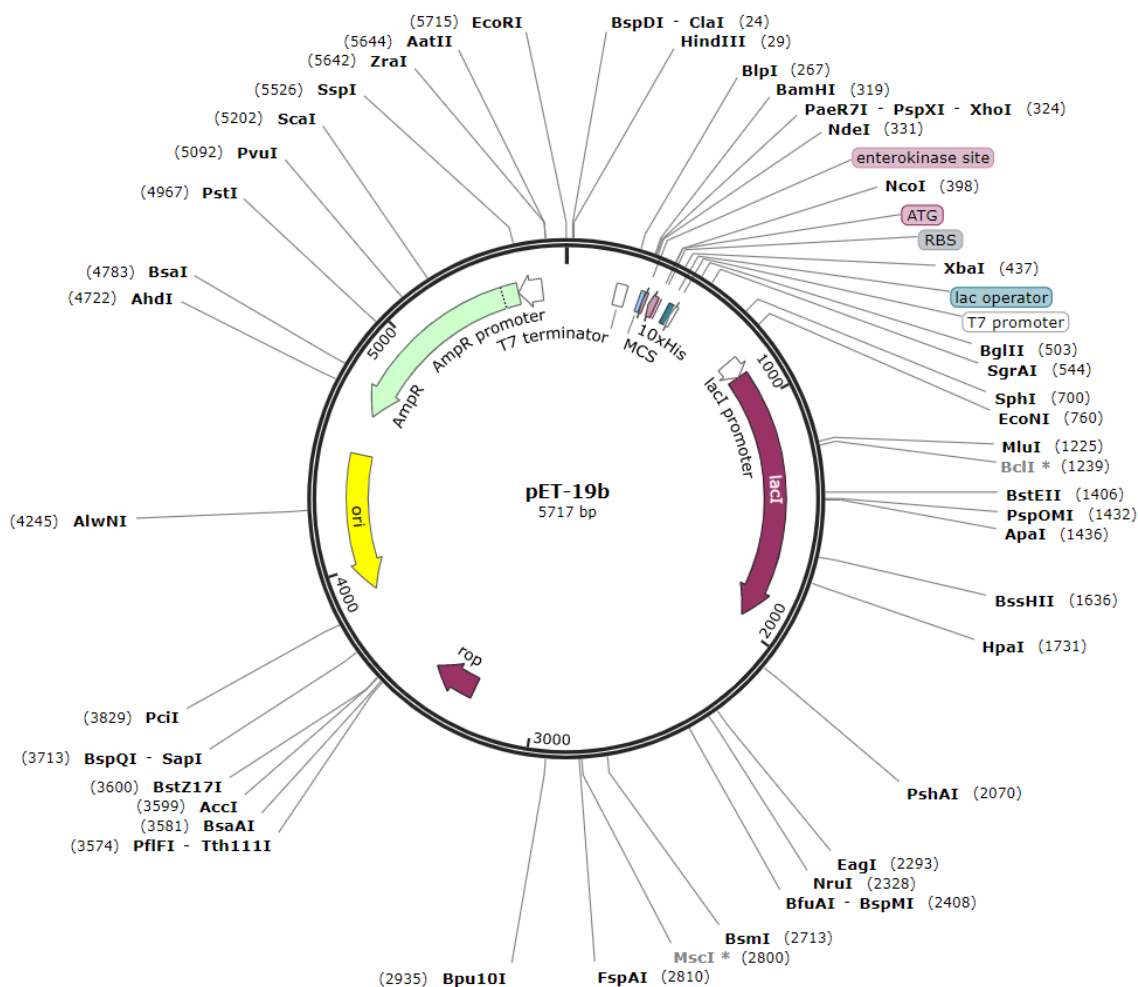
98 °C	30 s	} 35x
98 °C.....	10 s	
50 °C.....	10 - 30 s	
72 °C.....	20 – 30 s/kb (Iripin-1 má 1200 bp → 40 s)	
72 °C	2 min	
4 °C.....	∞	

Produkty high-fidelity PCR byly následně smíchány s vizualizační barvičkou Loading Dye (6x) a separovány na 1% agarózovém gelu (nastavení programu gelové elektroforézy je stejné jako v případě gradientové PCR v kapitole 3.2.2.). Jako hmotnostní standard byl použit GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (viz Obr. 4).

Gel byl po skončení gelové elektroforézy vyfocen a příslušné proužky byly vyříznuty skalpelem pod UV světlem. Naamplifikovaná DNA byla poté vyzolována z gelu pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu dle návodu. Koncentrace takto vyzolované DNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop.

3.2.4. Příprava vektoru pET-19b pro klonování

Pro zaklonování mutované sekvence byl používán jako vektor plazmid pET-19b nesoucí rezistenci na antibiotikum ampicilin a obsahující štěpná místa pro restriční enzymy NdeI a XhoI. pET-19b zároveň obsahuje polyhistidinovou sekvenci s 10 histidiny, která byla využita pro přečištění Iripin-1 R357W pomocí afinitní chromatografie (viz kapitola 3.6.). Schematické znázornění pET-19b je na Obr. 5.



Obr. 5: Schematické vyobrazení plazmidu pET-19b (SnapGene, 2021).

Zásobní pET-19b byl nejdříve namnožen v kompetentních buňkách *E. coli*, aby mohl být následně použit pro přípravu konstruktů s Iripin-1 R357W.

Nejprve se 25 μ l NEB 5-alpha buněk (uchovávaných při -80 °C) nechalo roztát 20 min na ledu. Poté se k nim přidal 1 μ l zásobního čistého pET-19b a suspenze se jemně promíchala špičkou. Následovala inkubace na ledu po dobu 30 min, poté heat shock ve vodní lázni při 42

°C na 30 s a další inkubace na ledu na 2 min. K buňkám bylo poté přidáno 250 µl SOC média o pokojové teplotě a zkumavka se následně nechala třepat 1 h na 220 rpm při 37 °C ve vodorovné poloze. Po dokončení inkubace byl roztok rozdělen na 2 ampicilinové Petriho misky s LB agarem a rozetřen plastovou hokejkou. Misky se nechaly inkubovat při 37 °C přes noc a druhý den byla z každé z nich pomocí špičky přenesena jedna bakteriální kolonie do 50ml zkumavky (falkonky) se 100 ml LB média a 100 µl ampicilinu. Falkonka se poté nechala třepat přes noc na 220 rpm při 37 °C. Další den byl plazmid přečištěn pomocí NucleoBond Xtra Midi kit a vyeluován do 100 µl vody bez nukleáz. Koncentrace získaného pET-19b byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop, plazmidová DNA se následně nechala osekvenovat ve firmě SEQme. Po ověření správnosti mohl být takto připravený plazmid použit pro další klonovací kroky.

3.2.5. Restrikční štěpení a ligace

3.2.5.1. Restrikční štěpení

Restrikční štěpení inzertu a vektoru a jejich následná ligace byly prováděny ve stejný den. Inzert (Iripin-1 R357W) a vektor (pET-19b plazmid) musely být nejprve naštěpeny pomocí restrikčních endonukleáz NdeI a XhoI, aby mohly být následně spojeny v procesu ligace. V případě pET-19b jsou štěpná místa pro tyto enzymy přítomna v jeho genomu (viz Obr. 5), do inzertu bylo restrikční místo pro NdeI vneseno pomocí FWD primeru a pro XhoI pomocí REV primeru (viz kapitola 3.2.1.).

Složení restrikční reakční směsi (pro vektor i inzert):

10x rCutSmart pufr	5 µl
DNA*	takový objem, aby do reakce vstupoval celkem 1 µg
NdeI (20 000 U/ml)	1 µl
XhoI (20 000 U/ml).....	1 µl
voda bez nukleáz	doplnit do 50 µl

*pro restrikční reakci byla použita DNA Iripin-1 R357W o koncentraci 230 ng/µl a pET-19b o koncentraci 232 ng/µl

Štěpná reakce byla namíchána ve 200µl zkumavkách zvlášť pro vektor a inzert. Zkumavky byly následně inkubovány 15 min při 37 °C v PCR cycleru, restrikční enzymy byly poté

deaktivovány inkubací 20 min při 65 °C. Po skončení deaktivace bylo k celému objemu restriční reakce vektoru přidáno 2,5 µl alkalické fosfatázy, aby bylo zabráněno opětovnému spojení konců plazmidu. Plazmid byl s fosfatázou inkubován při 37 °C po dobu 30 min, fosfatáza byla následně deaktivována inkubací při 65 °C na 5 min.

Vektor i inzert byly po restrikci přečištěny prostřednictvím PCR clean-up pomocí NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kitu dle návodu a vyeluovány do 100 µl vody bez nukleáz, koncentrace byla změřena na spektrofotometru NanoDrop.

3.2.5.2. Ligace

Naštěpený Iripin-1 R357W a pET-19b byly ihned po restričním štěpení zligovány. Dle protokolu výrobce mají do ligační reakce vstupovat inzert a vektor v poměru 3:1 (I:V = 3:1), tedy 60 fmol:20 fmol. Množství inzertu a vektoru potřebné pro ligaci vyjádřené ve fmol bylo na základě koncentrace a velikosti vypočteno za pomoci online kalkulátoru NEBioCalculator (New England Biolabs, 2021):

Inzert (Iripin-1W)		Vektor (pET-19b)	
Velikost: 1200 bp	35,74 fmol	Velikost: 5700 bp	6,246 fmol
Koncentrace: 26,5 ng/µl		Koncentrace: 22 ng/µl	

Aby byl tedy dodržen protokol výrobce (I:V = 60 fmol:20 fmol), do ligační reakce bylo přidáno 1,68 µl inzertu a 3,2 µl vektoru.

Reagencie potřebné pro ligační reakci o celkovém objemu 20 µl:

T4 DNA ligační pufr 2 µl
naštěpený inzert 1,68 µl
naštěpený vektor 3,2 µl
T4 DNA ligáza 1 µl
voda bez nukleáz doplnit do 20 µl

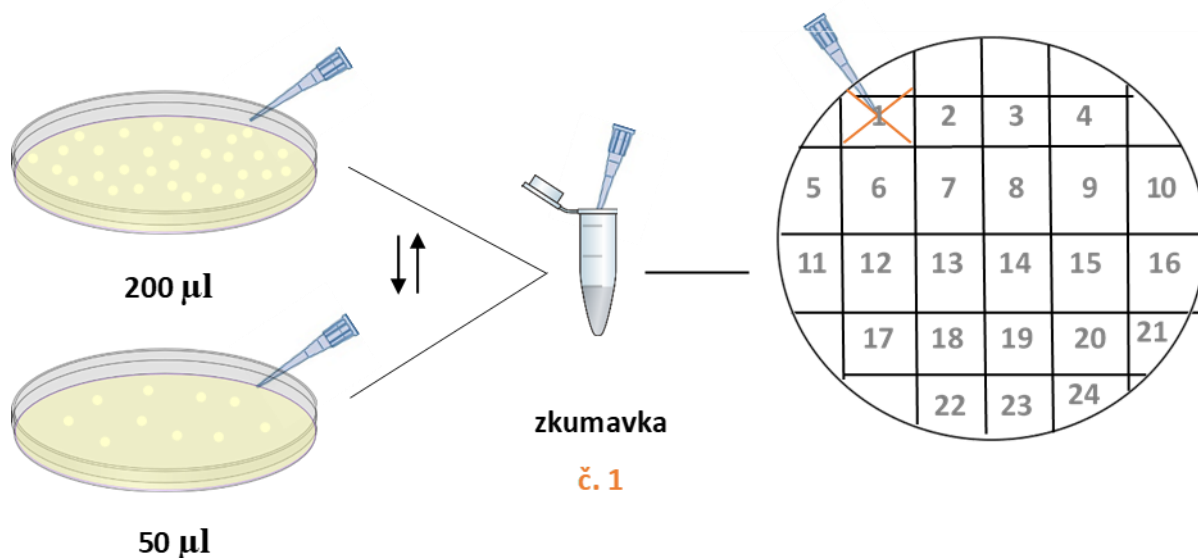
Zkumavky s ligační směsí byly inkubovány v PCR cycleru při 16 °C přes noc a druhý den byla ligáza inaktivována inkubací při 65 °C na 10 min. Po inaktivaci byly zkumavky přeneseny na led a následně byla provedena transformace do NEB 5-alpha buněk (viz kapitola 3.2.6.).

3.2.6. Transformace do kompetentních buněk

Nejdříve se nechalo 25 μl NEB 5-alpha buněk roztát 15 min na ledu. Poté se k nim přidaly 2 μl ligační reakce a vše bylo jemně promícháno špičkou. Následovala inkubace na ledu na 30 min, poté heat shock ve vodní lázni při 42 °C po dobu 30 s a další inkubace na ledu na 2 min. K buňkám bylo následně přidáno 250 μl SOC média o pokojové teplotě a poté se zkumavka nechala třepat 1 h na 220 rpm při 37 °C ve vodorovné poloze. Po dokončení inkubace byl roztok rozetřen plastovou hokejkou na 2 ampicilinové Petriho misky s LB agarem předeštěné na 37 °C, přičemž na jednu misku bylo nanášeno 50 μl buněčné suspenze a na druhou 200 μl . Bylo tak učiněno pro kontrolu antibiotika, na misce s menším množstvím přidávaných buněk by mělo vyrůst mnohem méně kolonií. Misky se poté nechaly inkubovat při 37 °C přes noc a druhý den byla provedena colony PCR.

3.2.7. Colony PCR

Nejprve bylo do 24 PCR zkumavek (o objemu 200 μl) napipetováno 20 μl vody bez nukleáz. Střídavě z obou misek (s 50 μl i 200 μl přidávané buněčné suspenze) s koloniemi narostlými z předchozího dne byla pomocí špičky vždy vypíchnuta jedna samostatná kolonie o vhodné velikosti a tvaru, ta byla následně důkladně vymáčána v očíslované zkumavce s 20 μl vody bez nukleáz a tou samou špičkou byl poté udělán křížek na nové misce v části s číslem odpovídajícím číslu zkumavky (schématické znázornění překřížkování kolonií je vyobrazeno na Obr. 6). Takto bylo střídavě z obou misek překřížkováno 23 kolonií, 24. vzorek sloužil jako negativní kontrola, kdy bylo špičkou píchnuto na místo bez kolonie na jedné ze dvou misek.



Obr. 6: Schéma přípravy směsi bakterií s vodou pro colony PCR a jejího překřížkování na novou ampicilinovou misku.

Následně byl namíchán master mix pro colony PCR.

Složení master mixu pro colony PCR (objem na 24 vzorků):

- 2x PCR master mix 120 µl
- voda bez nukleáz 81,6 µl
- T7 FWD primer (10µM) 7,2 µl
- T7 REV primer (10µM) 7,2 µl

Do každé zkumavky s takto namíchanou reakční směsí byl poté přidán 1 µl získané buněčné suspenze jako zdroj DNA pro amplifikaci při colony PCR. Zkumavky byly následně podrobeny colony PCR s následujícím programem:

- 94 °C6 min
 - 94 °C15 s**
 - 54 °C15 s** (teplota nasedání T7 FWD a T7 REV primerů)
 - 72 °C1 min** (čas se odvíjí od délky inzertu, 1 min/1 kb)
 - 72 °C7 min
 - 16 °C∞
- } **35x**

Po skončení PCR byly vzorky smíchány s Loading Dye (6x) a rozseparovány na 1% agarózovém gelu (složení gelu a nastavení programu gelové elektroforézy je stejné jako v případě gradientové a high-fidelity PCR v kapitolách 3.2.2. a 3.2.3.). Jako hmotnostní standard byl použit GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (viz Obr. 4). Gel byl po gelové elektroforéze vyfocen pod UV filtrem a na základě přítomnosti produktu o velikosti 1200 bp bylo určeno, které kolonie NEB 5-alpha buněk obsahují námi zatransformovaný pET-19b s Iripin-1 R357W inzertem.

Kolonie, u kterých byl prokázán produkt o požadované velikosti, byly pomocí špičky přeneseny do falkonky s 10 ml LB média a 10 μ l ampicilinu. Falkonka se nechala třepat na 220 rpm při 37 °C přes noc a druhý den byl plazmid pET-19b s Iripin-1 R357W inzertem vyizolován z buněk pomocí NucleoSpin Plasmid kitu. Koncentrace DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop a plazmid s inzertem byl poté poslán k sekvenaci do firmy SEQme, aby bylo ověřeno, že byla do P1 místa mutace zavedena úspěšně a došlo k náhradě argininu za tryptofan.

Po ověření zavedení mutace do P1 místa v Iripin-1 u daných kolonií byl pET-19b s mutovaným inzertem připraven ve větším množství kultivací bakterií ve 100 ml LB média se 100 μ l ampicilinu přes noc při 37 °C za třepání na 220 rpm. Druhý den byl plazmid s inzertem vyizolován pomocí NucleoBond Xtra Midi kitu, koncentrace byla následně změřena na spektrofotometru NanoDrop.

3.2.8. Transformace do BL21 buněk

Plazmid pET-19b s vloženou sekvencí Iripin-1 R357W byl zatransformován do BL21 kompetentních buněk pro vysoce účinnou expresi Iripin-1 R357W.

Zkumavka s 50 μ l BL21 buněk se nejprve nechala roztát na ledu cca 10 min. Následně k nim byl přidán 1 μ l pET-19b s Iripin-1 R357W (koncentrace DNA by se měla pohybovat kolem 150 ng/ μ l – jelikož koncentrace našeho vzorku byla více jak dvojnásobná, k buňkám bylo přidáno poloviční množství), suspenze byla jemně promíchána špičkou a zkumavka byla ponechána na ledu po dobu 30 min. Následně byl proveden heat shock ve vodní lázni při 42 °C na 30 s a poté byla zkumavka opět umístěna na led na 2 min. K buňkám bylo následně přidáno 500 μ l SOC média o pokojové teplotě a zkumavka se nechala třepat ve vodorovné poloze při 220 rpm, na 37 °C po dobu 1 h. Suspenze buněk byla poté přenesena do falkonky s 10 ml LB média a 10 μ l ampicilinu, která se nechala třepat přes noc (14-16 h) při 37 °C na

180 – 220 rpm. Druhý den byl z narostlé kultury připraven glycerol stock (250 μ l suspenze buněk a 750 μ l 87% glycerolu) a pokračovalo se pilotní expresí.

3.3. Pilotní exprese

Nejprve bylo smícháno 60 ml LB média se 60 μ l ampicilinu, k nimž byly následně přeneseny 4 ml kultury buněk narostlé z předchozího dne (viz kapitola 3.2.8.). Takto byla získána tzv. startovací kultura (SK), u které byla na spektrofotometru NanoDrop změřena OD_{600} (optická denzita při 600 nm) oproti samotnému LB médiu. U startovací kultury se OD_{600} obvykle pohybuje kolem hodnoty 0,2 a pro možnost dalšího postupu je potřebné, aby narostla na 0,6 – 0,8, proto se SK nechala třepat na 170 rpm při 37 °C tak dlouho, dokud nebylo dosaženo požadované hodnoty OD_{600} (cca 70 – 90 min).

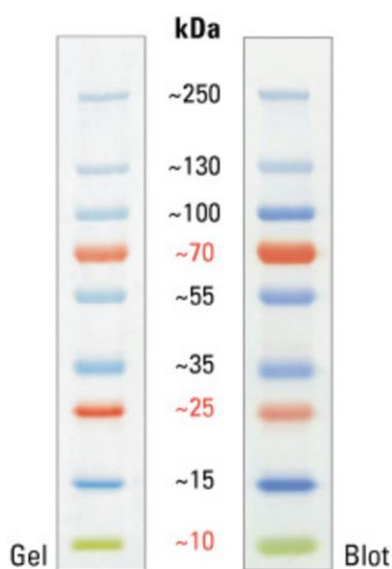
Jakmile bylo dosaženo ideální OD_{600} , ze SK byl odebrán 1 ml kultury jako vzorek T_0 (vzorek odebraný v čase 0), který byl stočen při 10 000 rpm po dobu 1 min. Supernatant byl odstraněn a pelet byl uskladněn na – 20 °C. Ze SK bylo následně odebráno 14 ml do Erlenmeyerovy baňky, která byla dále inkubována při teplotě 30 °C, a dalších 14 ml bylo přeneseno do Erlenmeyerovy baňky dále inkubované při 37 °C. Do obou baněk bylo následně přidáno 14 μ l 1M IPTG pro indukci exprese proteinů. Baňky se poté nechaly třepat při 150 rpm při příslušných teplotách (30 °C a 37 °C) a v daných časových intervalech po přidání IPTG (1, 2, 4, 6, 8 a 24 h) byl z obou baněk odebrán 1 ml kultury. Byly tak získány vzorky z jednotlivých časů (T_1 , T_2 , T_4 , T_6 , T_8 a T_{24}) od přidání IPTG pro teploty 30 °C i 37 °C. Vzorky byly po odběru vždy stočeny na 10 000 rpm na 1 min, přičemž získaný supernatant byl odstraněn a pelet byl zamražen na – 20 °C. Po získání všech časů odběru z pilotní exprese byly všechny pelety rozpuštěny v 500 μ l PBS a poté byly všechny zkumavky rychle zmrazeny v tekutém dusíku pro rozbití buněk. Zkumavky byly poté přesunuty do termobloku na 56 °C do rozmrznutí a následně krátce zvortexovány. Tento proces (dusík → termoblok → vortex) byl zopakován ještě třikrát (celkem tedy čtyřikrát). Zkumavky byly následně stočeny na 14 000 rpm na 10 min, aby došlo k oddělení supernatantu (S) a peletu (P). Následně se pracovalo zvlášť se S a P:

1) **Supernatant** (obsahující cytoplazmatické proteiny) byl odebrán do samostatných zkumavek, ze kterých bylo odebráno 20 μ l, zbytek byl zamražen na – 20 °C pro budoucí využití. K odebraným 20 μ l bylo přidáno 7 μ l směsi Laemmliho pufru a merkaptoethanolu v poměru 9:1 (tedy aby poměr vzorku:L/M byl 3:1), zkumavky byly následně povařeny

v termobloku při 90 °C na 10 min. Poté byly krátce stočeny a 25 µl takto připravených vzorků bylo rozseparováno při SDS PAGE na 12% gelu.

2) **Pelety** zbylé po odsátí supernatantu (obsahující převážně inkluzní tělíčka s proteiny) byly rozsuspendovány ve 250 µl PBS, povařeny při 90 °C na 10 min a krátce stočeny. Následně bylo ze zkumavek odebráno 20 µl (zbytek byl opět zamražen na – 20 °C), ke kterým bylo přidáno 7 µl směsi Laemmliho pufru a merkaptoethanolu v poměru 9:1. Vzorky byly poté opět povařeny při 90 °C na 10 min, krátce stočeny a 25 µl bylo rozseparováno na 12% gelu při SDS PAGE (nastavení programu: 250 V, 80 mA, 60 W, 40 min).

Jako velikostní standard byl při SDS PAGE použit PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, který je vyobrazen na Obr. 7.

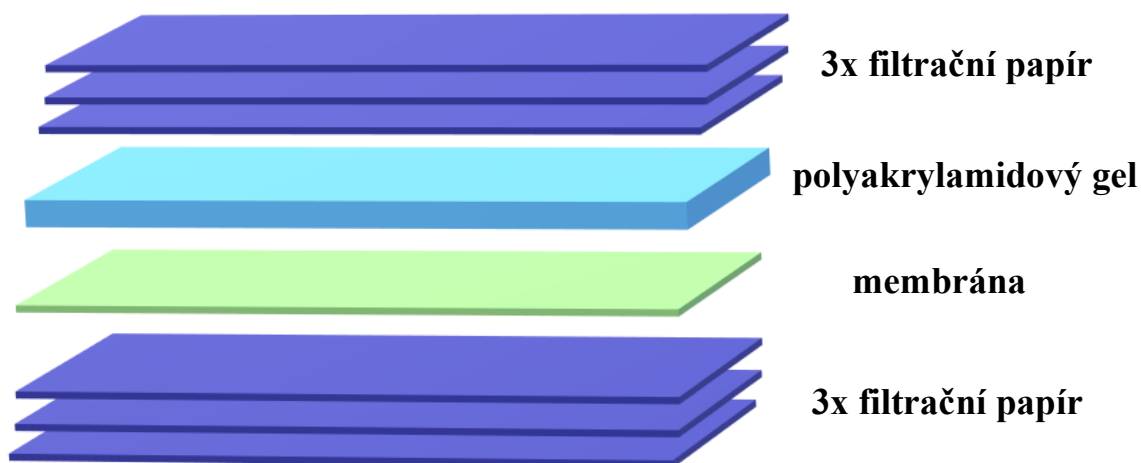


Obr. 7: Velikostní standard PageRuler Plus Prestained Protein Ladder.

Gely s rozseparovanými proteiny ze supernatantu a peletů pro 30 °C i 37 °C byly barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue barvicího roztoku po dobu 30 min. Následně byly odbarvovány za stálého míchání 15 min v odbarvovacím roztoku, 2x omyty destilovanou vodou a poté přes noc ponechány v destilované vodě.

3.4. Western Blot

Vzorky supernatantu (pro jednotlivé časy odběru pro teplotu 30 °C i 37 °C) získané pomocí pilotní exprese (viz kapitola 3.3.) byly nejprve rozseparovány na 12% polyakrylamidovém gelu stejně jako v kapitole 3.3. Po skončení SDS PAGE proběhlo přebílení z gelu na blotovací PVDF membránu dle schématu na Obr. 8.



Obr. 8: Sestavení jednotlivých částí pro přebílení.

Tři filtrační papíry byly nejprve namočený v 1x transferovém pufru a umístěny na blotovací desku. Membrána byla aktivována po dobu 1 min v methanolu, poté omyta v 1x transferovém pufru a umístěna na filtrační papíry. Na membránu byl položen polyakrylamidový gel s rozseparovanými vzorky a na něj byly opět umístěny 3 filtrační papíry namočené v 1x transferovém pufru. Proteiny z gelu se poté nechaly přenášet na membránu (nastavení programu (pro 2 gely): 126 mA, 300 V, 60 W, 60 min).

Po dokončení přenosu byla membrána 2x promyta v TBS-T pufru na 5 min. Po promytí došlo k zablokování nespecifických vazebných míst pomocí blokovacího pufru na 1 h. Membrána byla následně opět 2x promyta v TBS-T pufru po 5 min a přes noc inkubována v chladu s 5 ml naředěné primární protilátky. Druhý den byla membrána 3x promyta v TBS-T pufru po 5 min a následně inkubována při pokojové teplotě na 1 h s 5 ml naředěné sekundární protilátky. Po skončení inkubace byla membrána opět 3x promyta v TBS-T pufru po 5 min. Následně byl připraven vyvíjecí roztok, který byl nanesen na membránu.

3.5. Large-scale exprese

Z glycerol stocku připraveného v kapitole 3.2.8. byly BL21 buňky s pET-19b s vloženým Iripin-1 R357W přeneseny do 150 ml LB média se 150 μ l ampicilinu. Kultura se nechala růst 14-16 h na 180-220 rpm při 37 °C (dále O/N (overnight) kultura). Druhý den byly připraveny 2l Erlenmeyerovy baňky s 1 900 ml LB média a 1,9 ml ampicilinu, ke kterým bylo přidáno 100 ml O/N kultury. Byla změřeno OD₆₀₀ a baňky se následně nechaly třepat při 37 °C na 150 rpm (aby byly zachovány stejné podmínky jako při pilotní expresi), dokud OD₆₀₀ nenarostla na 0,6-0,8. Exprese proteinů byla indukována pomocí 1mM IPTG a baňky se nechaly třepat při 37 °C po dobu 6 h (jelikož tento časový úsek byl při pilotní expresi stanoven jako nejužitečnější). Po uplynutí daného časového úseku byl odebrán 1 ml kultury, který byl zpracován stejným způsobem jako u pilotní exprese (centrifugace na 10 000 rpm po dobu 1 min, odstranění supernatantu a zamražení peletu na – 20 °C).

Kultura byla následně stočena v 500ml centrifugačních lahvích při 4 °C na 4200 rpm po dobu 30 min, supernatant byl odstraněn a pelet byl rozsuspendován ve 20 ml 20mM TRIS o pH 8. Rozsuspendovaný pelet byl přenesen do 50ml falkonek a stočen při 4 °C na 4200 rpm na 20 min. Supernatant byl odstraněn a pelet zamražen na – 80 °C.

Před afinitní chromatografií bylo ještě potřeba stanovit, v jakém roztoku bude nejuvhodnější uskladněný pelet rozpustit. K tomu bylo použito 5 různých solubilizačních roztoků (uvedených v Tab. I), ve kterých byl otestován supernatant i pelet z času odběru T₆ (37 °C). Pelet T₆ byl nejprve rozsuspendován v 1 ml 20mM TRIS (pH 8). Roztok byl rozdělen po 200 μ l do 5 zkumavek, které byly stočeny. Získaný supernatant byl pipetou odebrán a ke zbylému peletu bylo do každé z 5 zkumavek přidáno 100 μ l jednoho z testovaných pufrů. Následně byly zkumavky zmrazeny v tekutém dusíku, ponechány v termobloku na 56 °C a krátce zvortexovány, celý tento proces byl poté zopakován ještě 3x stejně jako tomu bylo u pilotní exprese. Následovala centrifugace při pokojové teplotě na 14000 rpm na 10 min. Ze vzorků bylo odebráno 25 μ l supernatantu na změření koncentrace pomocí BCA Protein Assay kitu, zbytek supernatantu a pelet (rozsuspendovaný v 50 μ l daného roztoku a povařeny na 90 °C po dobu 10 min) byly rozseparovány pomocí SDS PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu. Gely byly poté obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250 barvicího roztoku (stejným způsobem jako v kapitole 3.3.). Solubilizační roztok, který byl stanoven jako nejuvhodnější pro rozsuspendování peletu získaného během large-scale exprese, byl následně využit v procesu afinitní chromatografie.

3.6. Afinitní chromatografie

Velké množství peletu, který byl získán pomocí large-scale exprese v kapitole 3.5., bylo rozsuspendováno v solubilizačním pufru 1, který byl určen jako nejvhodnější pro Iripin-1 R357W a který bude v této sekci označován jako eluční pufr (EP). Do elučního pufru se běžně přidávají inhibitory proteáz, nicméně součástí použité tablety s inhibitory proteáz je i aprotinin, který by mohl inhibovat účinky trypsinu. Jelikož bylo zamýšleno dále testovat vliv Iripin-1 R357W na trypsin, poloviční množství peletu bylo rozsuspendováno v 5 ml EP s inhibitory proteáz (dodány ve formě tablety, která byla rozpuštěna ve 100 ml EP) a druhá polovina v 5 ml EP bez inhibitorů proteáz.

Do obou typů vzorku byla následně přidána DNáza I v takovém objemu, aby bylo dosaženo ředění 1:1000 (DNáza:roztok), vzorky byly zvortexovány a inkubovány 20 min na ledu. Následovalo rozbití buněk pomocí tlakového zařízení French press a centrifugace na 40 000 g při 4 °C po dobu 1 h.

Poté již následovala příprava na samotnou afinitní chromatografii, kdy bude Iripin-1 R357W se zavedenou polyhistidinovou značkou vychytáván na afinitní koloně. Kolona byla nejprve převedena z ethanolu, ve kterém je skladována, do degasované Milli-Q vody. Následovalo promývání chromatografu pomocí ekvilibračního a elučního pufru. Přístroj byl tímto připraven pro nanášení vzorků na kolonu.

Ze zcentrifugovaných vzorků byl supernatant slit do 50ml falkony, ze které byl následně nanášen na kolonu chromatografu. Zbylý pelet (u obou vzorků – bez inhibitorů proteáz i s inhibitory proteáz) byl rozsuspendován v solubilizačním roztoku bez inhibitorů proteáz, stočen na 4000 g při 4 °C na 10 min a uskladněn na – 80 °C pro případné budoucí využití.

Po skončení nanášení vzorků (Iripin-1 R357W s přidávanými inhibitory proteáz i bez inhibitorů proteáz) byl nejprve přístroj promyt 5% EP (tzv. soft wash), aby se odmyly proteiny, které se na koloně mohly zachytit díky obsahu histidinu. Histag značka zavedená k proteinu pomocí pET-19b obsahuje 10 histidinů jdoucích po sobě, tudíž vazba značeného Iripin-1 R357W na kolonu je silnější než u proteinů, které mohou obsahovat sekvenci několika histidinů, a Iripin-1 R357W se na koloně udrží i po promytí 5% EP.

Následovala samotná frakcionace, kdy byly sbírány za průtoku elučního pufru chromatografem jednotlivé proteinové frakce (každá frakce měla cca 2 ml).

Frakce získané při afinitní chromatografii byly následně separovány na 12% akrylamidovém gelu při SDS PAGE, aby bylo zjištěno, v jakých frakcích se Iripin-1 R357W nachází. Přítomnost hledaného proteinu byla detekována jednak na základě porovnání

umístění proužků na gelu s výsledky pilotní exprese, navíc byl ale poté proveden pro ověření i Western blot s anti-polyhistidinovou protilátkou.

Dané frakce byly vzápětí spojeny dohromady, zakoncentrovány do 1 ml pomocí amikonů dle návodu a dále přečištěny pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie (viz kapitola 3.7.).

3.7. Rozměrově-vylučovací chromatografie

Frakce získané z afinitní chromatografie byly přečištěny od proteinů jiných velikostí pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie. Opět byly získány jednotlivé eluční frakce, které byly eluované do stejného pufru jako v případě afinitní chromatografie. Tyto frakce byly následně otestovány pomocí SDS PAGE na přítomnost Iripin-1 R357W. Ty, které vyšly pozitivní na hledaný protein, byly následně spojeny dohromady. Vzorky byly následně rozalíkvótovány, zamrazeny v tekutém dusíku a následně přesunuty do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.8. Tvorba komplexů Iripin-1 R357W s trypsinem

Pro otestování tvorby komplexů bylo na ledu připraveno celkem 5 vzorků o objemu 20 μl :

- 1) 1 μM Iripin-1: připraven smícháním 10 μl 2 μM Iripin-1 s 10 μl esej pufru
- 2) 1 μM Iripin-1 R357W: z důvodu malé koncentrace získaného Iripin-1 R357W (2 μM) nemohl být náš protein ředěn s dostatečným množstvím esej pufru jako tomu bylo u Iripin-1 či trypsinu, proto byl Iripin-1 R357W z původního roztoku (20mM TRIS, 300mM NaCl, pH 8,5) převeden pomocí amikonu do esej pufru a následně bylo 10 μl takto připraveného 2 μM Iripin-1 R357W smícháno s 10 μl esej pufru
- 3) 1 μM trypsin: připraven smícháním 10 μl 2 μM trypsinu s 10 μl esej pufru
- 4) 1 μM Iripin-1 + 1 μM trypsin: připraven smícháním 10 μl 2 μM Iripin-1 s 10 μl 2 μM trypsinu
- 5) 1 μM Iripin-1 R357W + 1 μM trypsin: připraven smícháním 10 μl 2 μM Iripin-1 R357W s 10 μl 2 μM trypsinu

Vzorky byly následně inkubovány za třepání při 150 rpm při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1 h. Po skončení inkubace k nim bylo přidáno 7 μl Laemmliho pufru s merkptoethanolem, byly povařeny na $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 10 min a následně byly separovány pomocí SDS PAGE na 12% polyakrylamidovém gelu. Gely byly po dokončení SDS PAGE obarveny stejným způsobem jako tomu bylo v kapitole 3.3.

4. Výsledky

4.1. Porovnání Iripin-1 a Iripin-1 R357W

Sekvence serpinu Iripin-1 je zobrazena na Obr. 9.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110     120
1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  ATGAAAGCCTCTAGTCCCTCTTCTATTTCTCTGGTCAGCTGTCGAGGCAAGGCAACGATAAACTTACCTTCGCCAACAAATCAGTTCGGCCTGCGATTACTGAATACTCTTCCAAGTCCCT
  M K P L V P L L F L L V S C R A Q G N D K L T F A N N Q F G L R L L N T L P S P
      130     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240
121 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  CCAGAAGAAAACGTATTCTTCTC GCCCTATAGTGTATCCACAGCCCTCGGAATGGCGTACGCCGGAGCTAGGGGAGACACACAAGAAGAGCTCTCGGAACAGCTAGGTTATACGCCCGCT
  P E E N V F F S P Y S V S T A L G M A Y A G A R G D T Q E E L S E Q L G Y T A A
      250     260     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360
241 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  GGGCTAAGCCAGGATGACGCTTCAACGCGTACTCTGACCAACGCACTGGCTAAAGGCTTCTAGGTCCAACCTCGACTCTAAGCGTGGCGAACGCCGCGCTCCACATGATAAAGTGGGG
  G L S Q D D V F N A Y S D H T Q W L K A S R S N S T L S V A N A A V L H D K V G
      370     380     390     400     410     420     430     440     450     460     470     480
361 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  CTCGTTACAGGTTCCAAAGAACATCGATCAGCGCTTTCGACGCCGACATTTCTGAAGGTCGACTTCGTC AACGAACTAAAGGAGCCGTTGGATCGCATCAACTACTGGGTGAAGGACAAG
  L R Y T F Q R T I D H A F D A D I L K V D F V N E R K G A V D R I N Y W V K D K
      490     500     510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
481 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  ACGAACGGAAAGATTTCGGTCGCTTTTAAACAGCCGCTAGAGTCTGAGACGAGACTTGTCTGCTCAACGCCATCTACTTCAAGGATCTGGAAATACCAGGTTCAACAAGAGTAGGACC
  T N G K I R S L F N K P L E S E T R L V L L N A I Y F K G S W N T R F N K S R T
      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700     710     720
601 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  GAAAAGAGGAGTTCCTCAATGGCGCGCTCACTCCGACCAAGGTTGACATGATGATGGGGAGCATGAACATCGGCCACCATTTCTCAGGGACCTGAAAATGTATGTGGGGATTTCCCG
  E K S E F L N G G V T P T K V D M M M G S M N I G H H F F R D L K I D V A D F P
      730     740     750     760     770     780     790     800     810     820     830     840
721 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  TACCAAGGGGGGGACTACAGCATGACAGTCACTCTGCCCTGGAGGAACGACGGCGTAGAAGCGATCAAGCAGAACCTCACTCTGGACTGTTTCAAGAGCTGGTTCAGAGCTGAGGGAA
  Y Q G R D Y S M T V I L P W R N D G V E A I K Q N L T L D L F Q K L V S E L R E
      850     860     870     880     890     900     910     920     930     940     950     960
841 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  AGAAGGGTCTTCGTTGTTATTTCCAAAGTTCAAATAGAGGCAGAGTACTCCCTGAAGGAACCCCTCCAGAACCTGGGCATCAAACAGATCTTCAAGTGGTGGCTCCGACCTGTCGGCGT
  R R V F V L F P K F K I E A E Y S L K E P L Q N L G I K Q I F S G G S D L S G V
      970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080
961 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  ACAAACGACAAAGATCTTGTGGTGTCCCGCGTCTCCACAAAGCGGTCTGGAGGTCAAAGAAAGAAAGCGAAGCAGCAGCCGCTGTCGAGTGTGGCGCTCACAGGATTGGCACG
  T N D N D L V V S A V V H K A V L E V N E E G S E A A A V S S V V A V T I I G T
      1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
1081 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
  CAGGCATTCGAGTCAACGTCGACCATCTTCTCTCTTTCATACGCAACAGGTCACCAATGACATCCTGTTTGGGGACAAGTGAACAGTCTCTGA 1179
  Q A F E F N V D H P F L F F I R N T V T N D I L F A G Q V N S L *

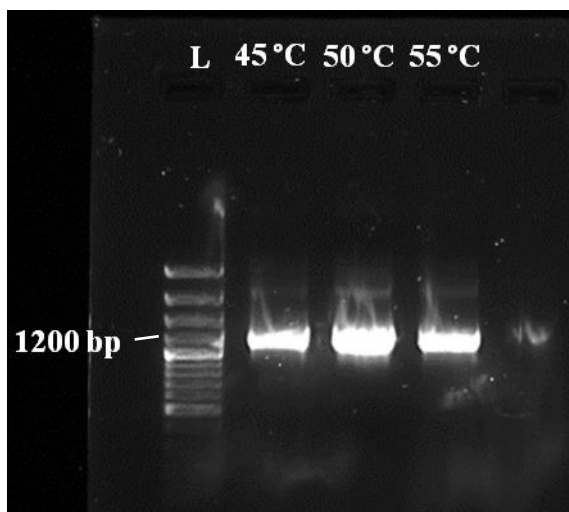
```

Obr. 9: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence Iripin-1. Žlutě je vyznačená signální sekvence proteinu, zeleně P1 místo centrální reaktivní smyčky, kde došlo k záměně kodonu AGG pro arginin za TGG pro tryptofan.

Původní Iripin-1 je protein o 376 aminokyselinách, velikosti 42,150 kDa a pI 5,88. Oproti tomu Iripin-1 R357W se záměnou v P1 místě RCL a s polyhistidinovou značkou zavedenou pomocí pET-19b je protein o 397 aminokyselinách, velikosti 44,729 kDa a pI 6,17.

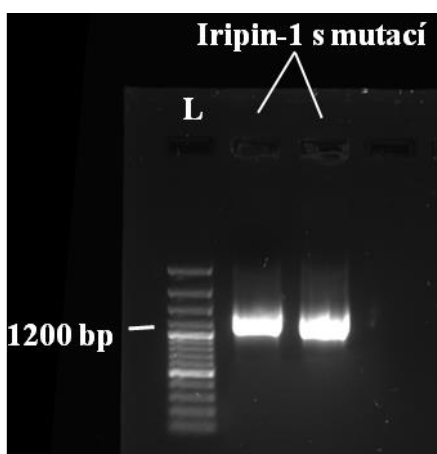
4.2. Příprava konstruktů pET-19b-Iripin-1 R357W

Výsledek gradientové PCR je uveden na Obr. 10.



Obr. 10: Gel s produkty gradientové PCR. Zleva doprava lze vidět velikostní standard (L) a 3 produkty o velikosti 1200 bp, které byly amplifikovány při teplotách 45 °C, 50 °C a 55 °C.

Viditelně nejsilnější band byl u amplifikace při 50 °C, proto byla tato teplota následně použita pro PCR se specifitější a přesnější high-fidelity Q5 polymerázou. Amplikony po high-fidelity PCR jsou vyobrazeny na Obr. 11.

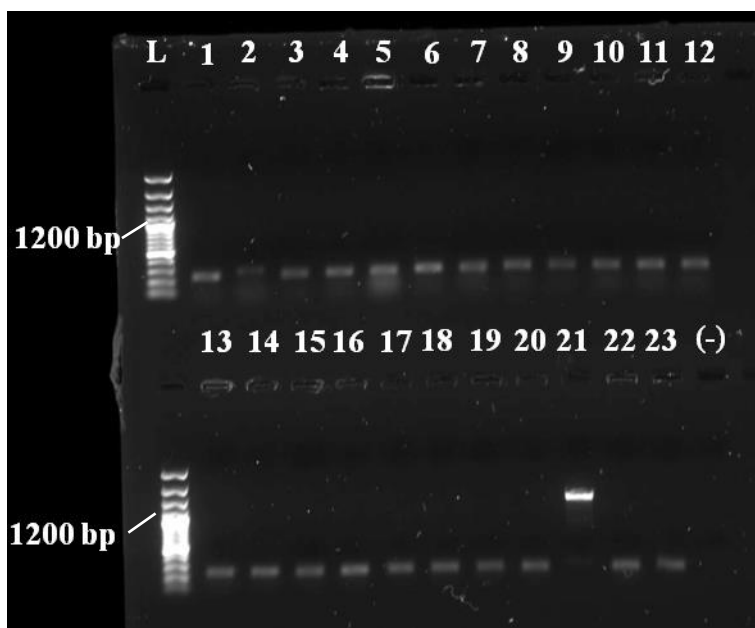


Obr. 11: Gel s produkty high-fidelity PCR. Zleva doprava lze vidět velikostní standard (L) a naamplifikovaný Iripin-1 R357W o velikosti 1200 bp rozdělenou do dvou jamek.

Koncentrace DNA Iripin-1 R357W vyizolované z agarózového gelu činila 230 ng/μl.

Koncentrace plazmidové DNA připravené pro klonování po přečištění pomocí midiprep kitu byla 232 ng/μl. Následným restriční štěpením inzertu a plazmidu byl získán pET-19b o koncentraci 22 ng/μl a Iripin-1 R357W o koncentraci 26,5 ng/μl.

Plazmid byl poté transformován do kompetentních buněk, které byly vysety na Petriho misku se selekčním antibiotikem (ampicilinem). Bylo vybráno 23 kolonií, které byly přeneseny na novou misku (viz Obr. 6) a otestovány na přítomnost inzertu. Výsledek colony PCR je zobrazen na Obr. 12.



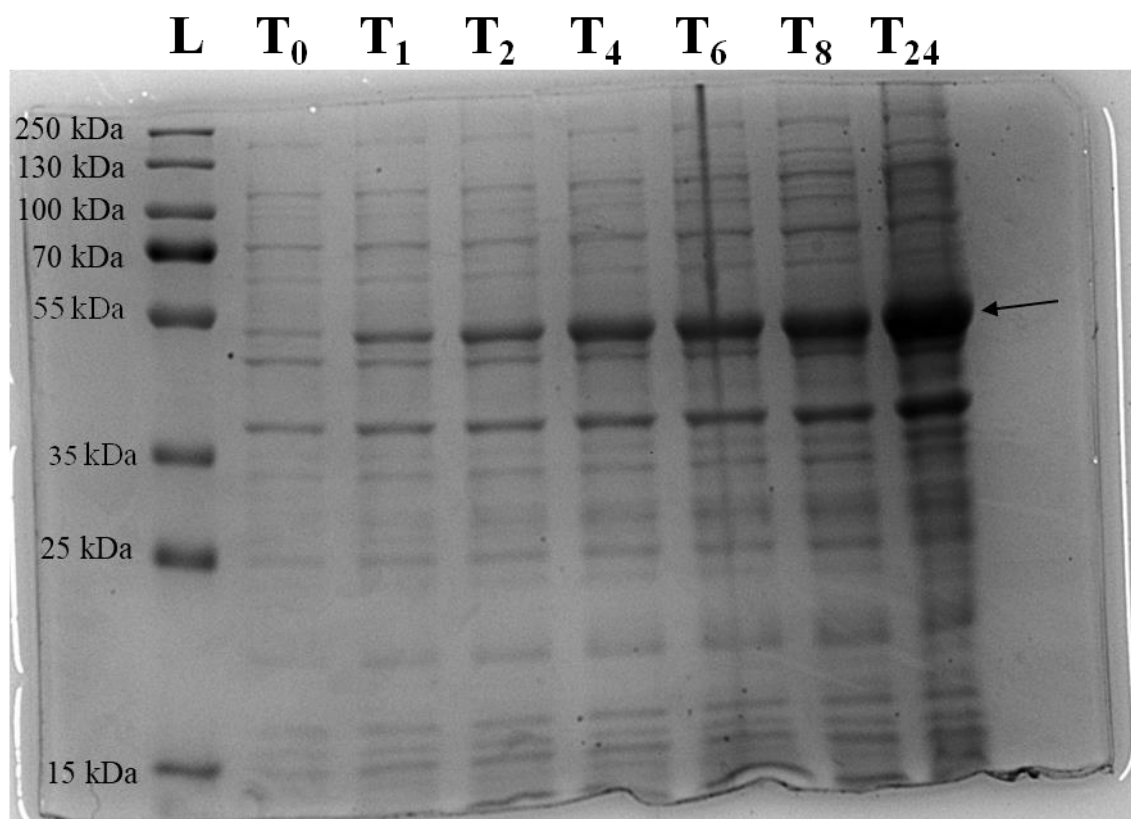
Obr. 12: Colony PCR. Na levé straně gelu lze vidět velikostní standard (L), jednotlivá čísla poté odpovídají číslům kolonií NEB 5-alpha buněk testovaných na přítomnost Iripin-1 R357W. Negativní kontrola je označena jako (-). Jelikož byl očekáván produkt o velikosti přibližně 1200 bp, jediná kolonie, která by mohla být na základě výsledku gelové elektroforézy pozitivní na Iripin-1 R357W, byla kolonie č. 21. Negativní kontrola vyloučila případnou kontaminaci.

Kolonie č. 21, která vyšla jako jediná pozitivní, byla následně namnožena v LB médiu a pET-19b s Iripin-1 R357W inzertem byl poté z buněk vyizolován pomocí midiprep kitu. Koncentrace takto získané DNA činila 328 ng/μl.

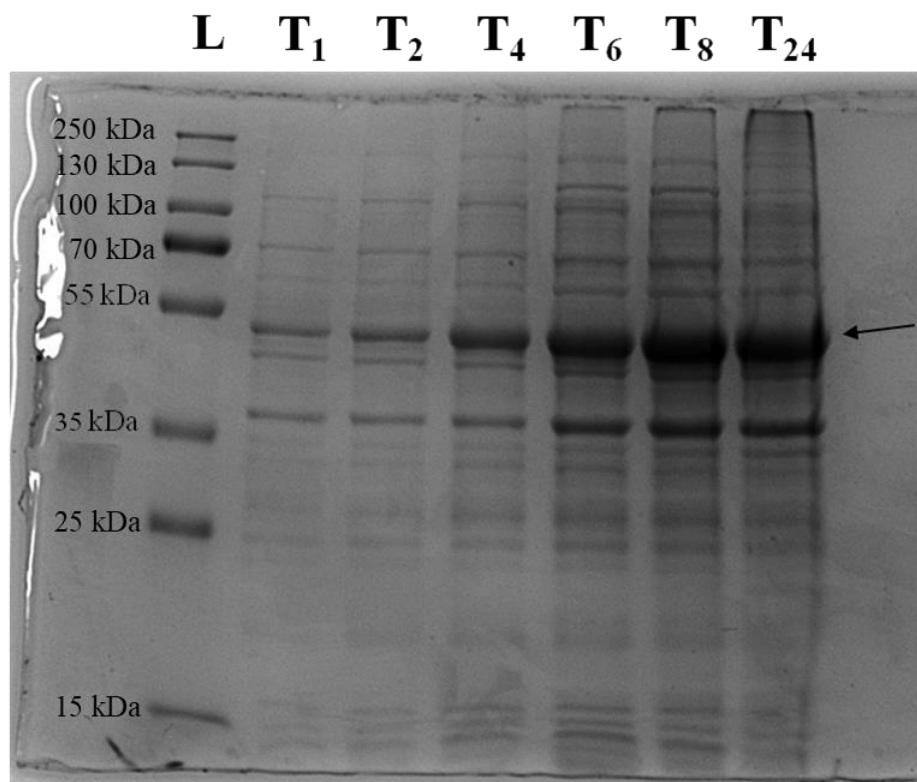
Kontrola, že inzert představuje Iripin-1 R357W se zavedenou mutací v P1 místě byla provedena sekvenací. Sekvence potvrdila přítomnost tryptofanu v P1 místě serpinu, proto bylo možno pokračovat k pilotní expresi.

4.3. Pilotní exprese

Gely se vzorky peletu inkubované při teplotě 30 °C a 37 °C během pilotní exprese jsou vyobrazeny na Obr. 13 a Obr. 14.



Obr. 13: Vzorky peletu po inkubaci na 30 °C. Zleva doprava lze vidět velikostní marker (L) a následně jednotlivé časy odběru (T₀ = před přidáním IPTG; T₁, T₂, T₄, T₆, T₈ a T₂₄ = 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h a 24 h po aktivaci exprese proteinů pomocí IPTG). V linii proužků označených šipkou je vidět postupný nárůst proteinové exprese s postupujícím časem kultivace BL21 buněk v LB médiu.

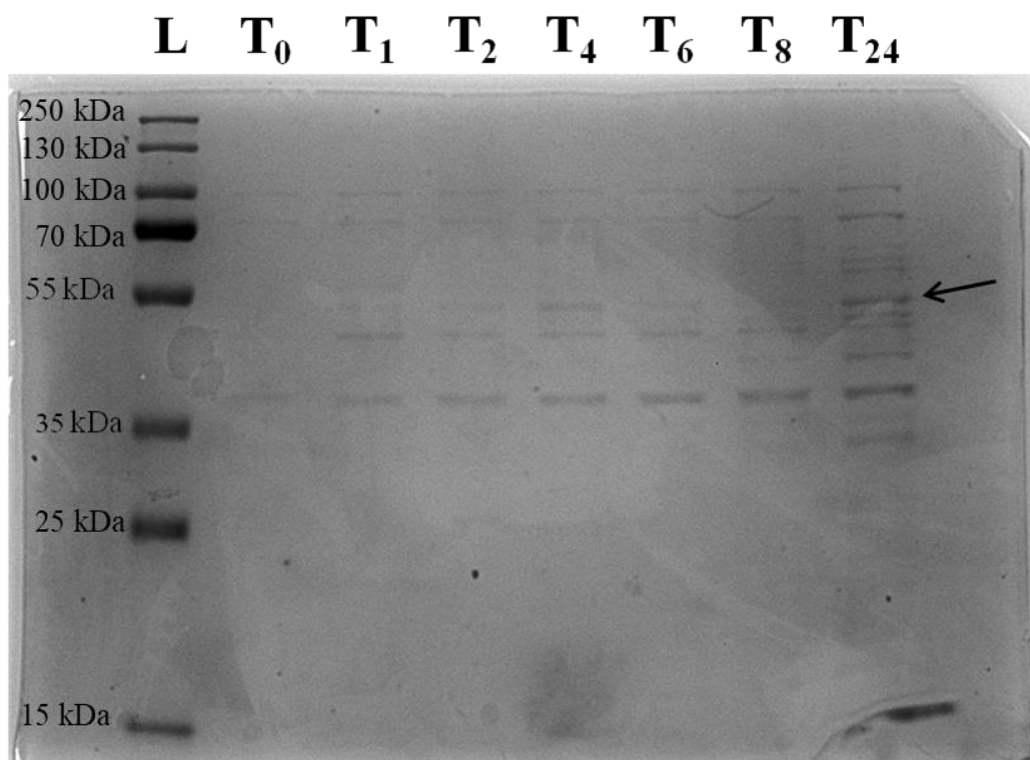


Obr. 14: Vzorky peletu po inkubaci na 37 °C. Zleva doprava lze vidět velikostní marker (L) a následně jednotlivé časy odběru (T1, T2, T4, T6, T8 a T24 = 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h a 24 h po aktivaci exprese proteinů pomocí IPTG). Opět se na gelu nachází linie proužků, u kterých je vidět kontinuální nárůst množství proteinu s rostoucí dobou kultivace BL21 buněk.

Výsledky inkubace vzorků peletu při 37 °C odpovídají výsledkům inkubace při 30 °C. Linie proužků, u kterých došlo k výraznému nárůstu exprimovaného proteinu, velikostně odpovídá té, která byla pozorována na gelu pro 30 °C.

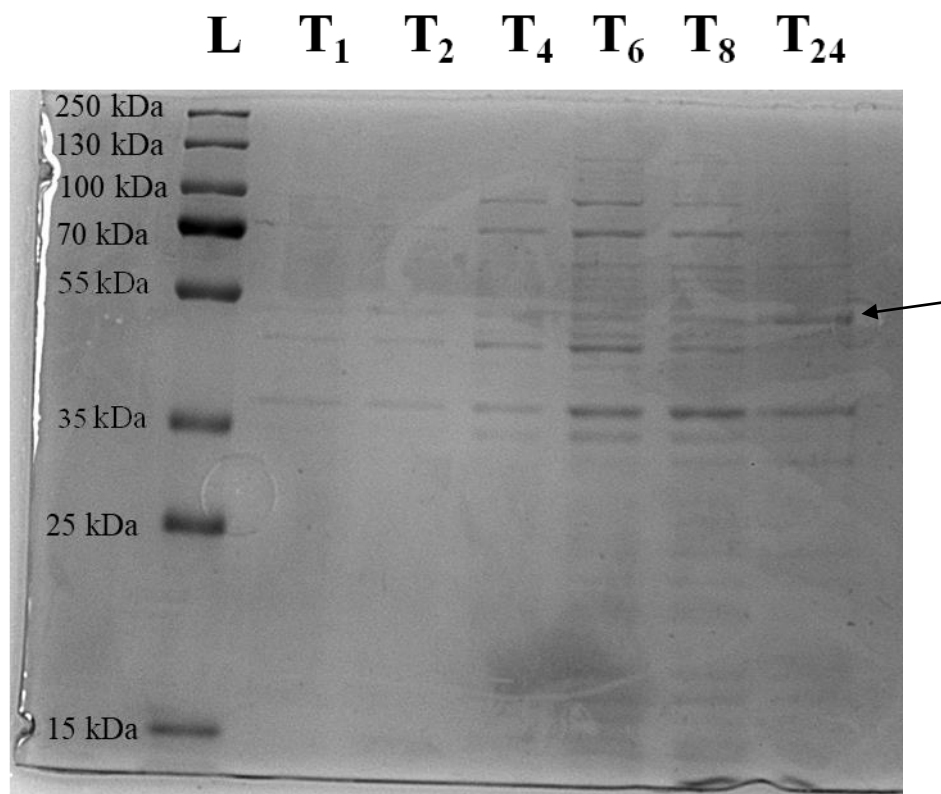
Velikost Iripin-1 by se měla pohybovat kolem 42 kDa, tudíž proteinový produkt pilotní exprese byl očekáván v rozmezí mezi 35 a 55 kDa velikostního markeru. Je pravdou, že produkt, u kterého došlo s rostoucím časem kultivace k výraznému nárůstu exprese, leží výše než byla očekávaná velikost, nicméně je nutné brát v potaz, že se Iripin-1 R357W se zavedenou mutací bude na gelu pohybovat ve trochu větších velikostech kvůli přítomnosti polyhistidinové značky vnesené pomocí pET-19b.

Gely se vzorky supernatantu inkubované při teplotě 30 °C a 37 °C během pilotní exprese jsou vyobrazeny na Obr. 15 a Obr. 16.



Obr. 15: Vzorky supernatantu po inkubaci na 30 °C. Zleva doprava lze vidět velikostní marker (L) a následně jednotlivé časy odběru (T₀ = před přidáním IPTG; T₁, T₂, T₄, T₆, T₈ a T₂₄ = 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h a 24 h po aktivaci exprese proteinů pomocí IPTG). Velikost předpokládaného proteinu je vyznačena šipkou.

Ve srovnání s Obr. 13 a Obr. 14 je patrné, že síla proužků, které velikostně odpovídají linii s kontinuálním nárůstem proteinové exprese v případě vzorků peletu, je mnohonásobně menší. Proteinový produkt stejné velikosti je sice přítomen, nicméně v mizivé koncentraci.



Obr. 16: Vzorky supernatantu po inkubaci na 37 °C. Zleva doprava lze vidět velikostní marker (L) a následně jednotlivé časy odběru (T₁, T₂, T₄, T₆, T₈ a T₂₄ = 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h a 24 h po aktivaci exprese proteinů pomocí IPTG). Velikost předpokládaného proteinu je vyznačena šipkou.

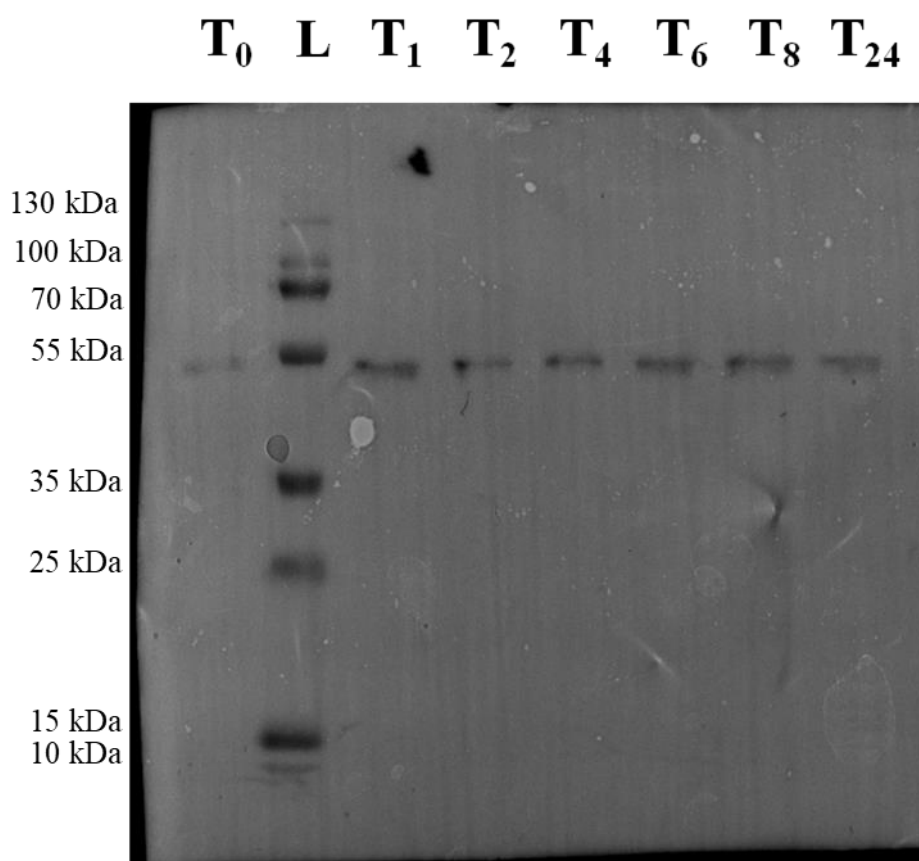
Stejně jako tomu bylo v případě pokusu na Obr. 15, exprese proteinu, který by velikostně odpovídal výsledkům pilotní exprese vzorků peletu, je i v tomto případě mizivá. Z výsledků vyplývá, že daný protein je ve velké míře shromažďován ve formě inkluzních tělísek uvnitř kompetentních buněk *E. coli*, přičemž tato exprese kontinuálně narůstá s rostoucí dobou kultivace buněk v LB médiu. Na druhou stranu, exprese cytoplazmatické frakce proteinu je mnohonásobně menší.

V rámci dalšího postupu bylo výhodnější pracovat s cytoplazmatickou frakcí proteinu, jelikož ta nevyžaduje refoldování (sbalování proteinu do jeho aktivní konformace) jako je tomu v případě proteinu vysoce agregovaného do podoby inkluzních tělísek.

Zároveň bylo potřeba ověřit, zda protein, jehož množství kontinuálně rostlo s narůstající dobou inkubace v případě vzorků peletu (viz Obr. 13 a Obr. 14) a jehož množství bylo minimální v případě supernatantu (viz Obr. 15 a Obr. 16), opravdu představuje Iripin-1 R357W s navázanou polyhistidinovou značkou. Proto byl následně proveden Western blot

s anti-polyhistidinovou protilátkou. Ten byl proveden jen u vzorků supernatantu (pro 30 °C i 37 °C), jelikož u vzorků peletu byl velmi dobře pozorovatelný trend zvyšování proteinové exprese. Naopak v případě supernatantu bylo velmi obtížné určit, jak teplota či doba inkubace ovlivňuje proteinovou expresi jen na základě výsledku SDS PAGE, jelikož síla proužků v očekávané velikosti byla mizivá.

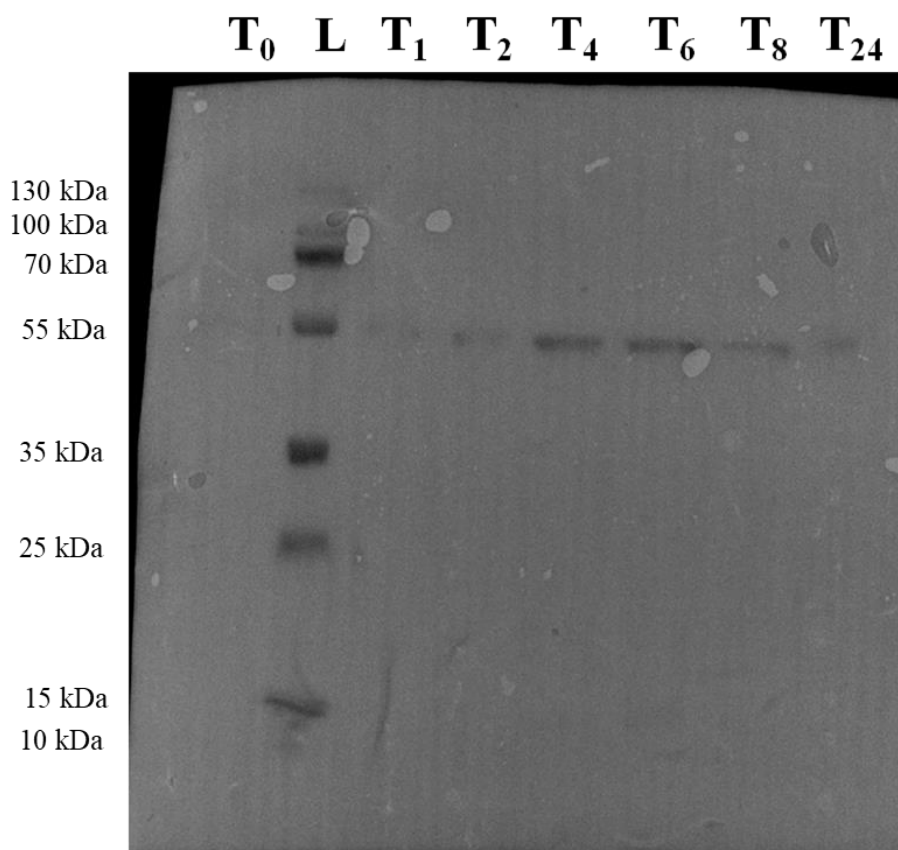
Ověření přítomnosti Iripin-1 R357W v supernatantu pro teplotu 30 °C a 37 °C pomocí Western blotu s anti-polyhistidinovou protilátkou je zobrazeno na Obr. 17 a Obr. 18.



Obr. 17: Western blot vzorků supernatantu po inkubaci na 30 °C. Zleva doprava lze vidět čas odběru T₀ (před přidáním IPTG), velikostní standard (L) a následně jednotlivé časy odběru po přidání IPTG (T₁, T₂, T₄, T₆, T₈ a T₂₄ = 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h a 24 h po aktivaci exprese proteinů pomocí IPTG).

Anti-polyhistidinová protilátka se navázala v místě očekávané molekulární velikosti. Tím bylo prokázáno, že protein, jehož množství narůstalo v případě vzorků peletu (viz Obr. 13 a Obr. 14) a který se v supernatantu nacházel jen v minimálním množství, je skutečně námi připravený Iripin-1 R357W.

Nicméně, jak je vyobrazeno na Obr. 17, míra vazby anti-polyhistidinové protilátky se mezi jednotlivými časy odběru nijak výrazně neliší. K velmi slabému navázání protilátky došlo i v případě T₀, tedy k minimální expresi proteinu došlo již před přidáním IPTG. U všech ostatních časů odběru se pak protilátka vážala v přibližně stejné míře, tudíž výsledky vzorků, které byly inkubovány při 30 °C, nepoukázaly na větší výtěžnost konkrétní doby inkubace.



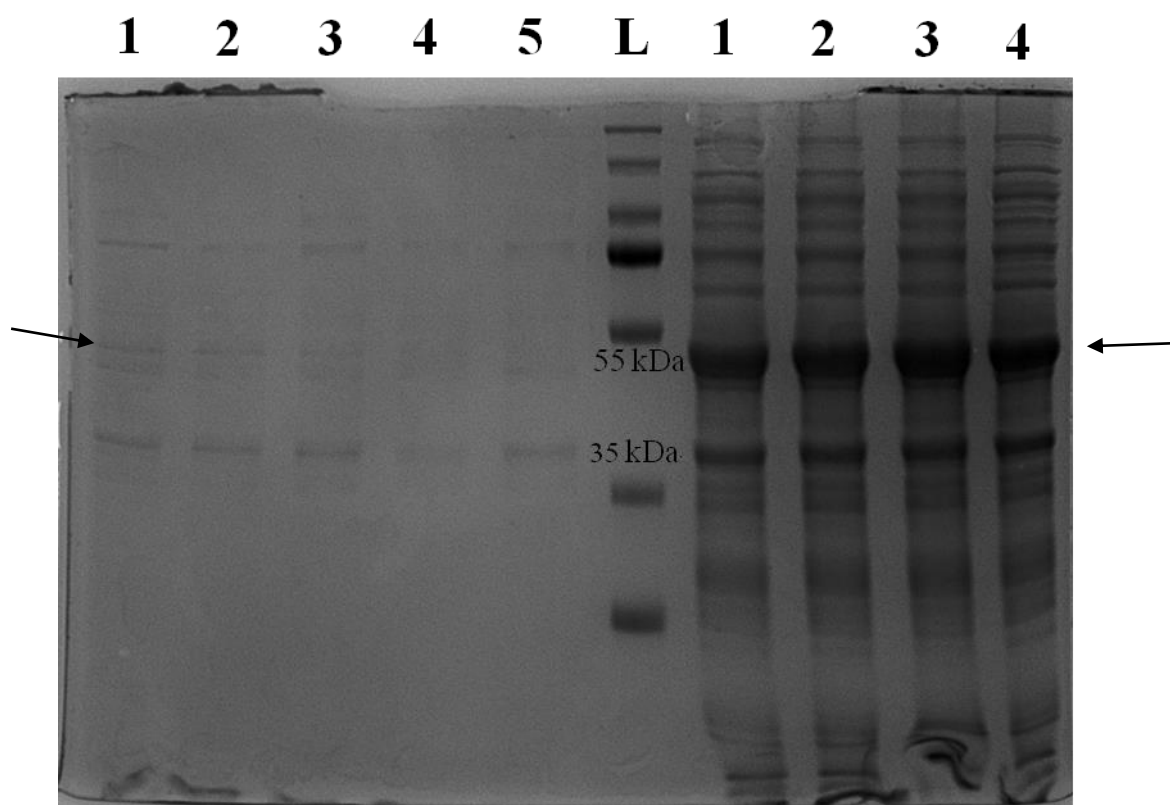
Obr. 18: Western blot vzorků supernatantu po inkubaci na 37 °C. Zleva doprava lze vidět čas odběru T₀ (před přidáním IPTG), velikostní standard (L) a následně jednotlivé časy odběru po přidání IPTG (T₁, T₂, T₄, T₆, T₈ a T₂₄ = 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h a 24 h po aktivaci exprese proteinů pomocí IPTG).

Obr. 18 ukazuje, že se protilátka opět vážala na místě očekávaném dle předchozích výsledků. Nicméně oproti vzorkům supernatantu inkubovaných při teplotě 30 °C (viz Obr. 17) se exprese výrazně liší. V případě času odběru T₀ byla exprese nulová. Poté v časech T₁ a T₂ docházelo k velmi omezené expresi proteinu. V případě T₄ a T₆ se míra produkce proteinu výrazně navýšila, ale následně u T₈ a T₂₄ byla opět nižší.

4.4. Large-scale exprese

Pomocí anti-polyhistidinové protilátky bylo tedy ověřeno, že se Iripin-1 R357W nachází i v supernatantu (viz Obr. 15, Obr. 16, Obr. 17 a Obr. 18), byť v mnohem menším množství než tomu je u inkluzních tělísek (viz Obr. 13 a Obr. 14). Aby bylo možné dále pracovat s málo koncentrovanou cytoplazmatickou frakcí Iripin-1 R357W, bylo potřeba BL21 buňky obsahující pET-19b s Iripin-1 R357W inzertem pomnožit ve velkém množství pomocí large-scale exprese, přičemž jako nejvhodnější čas odběru po spuštění proteinové exprese pomocí IPTG byl určen T6 při kultivaci buněk při 37 °C.

Pelet získaný pomocí large-scale exprese byl následně rozpuštěn v různých solubilizačních pufrech a podroben SDS PAGE elektroforéze pro určení nejvhodnějšího pufru pro další postup. Výsledek je zobrazen na Obr. 19.



Obr. 19: Výsledek SDS PAGE elektroforézy vzorků supernatantu (T6, 37 °C) rozpuštěných v 5 různých solubilizačních pufrech. Zleva doprava se v prvních pěti jamkách nachází vzorky supernatantu rozpuštěné v různých roztocích: solubilizační pufr 1 (20mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, pH 8,5), solubilizační pufr 2 (20mM TRIS-HCl, 300mM NaCl, pH 8), solubilizační pufr 3 (20mM TRIS-HCl, 150mM NaCl, pH 8), solubilizační pufr 4 (20mM TRIS-HCl, 240mM NaCl, 10mM KCl, 2mM MgCl₂, pH 8) a solubilizační pufr 5 (PBS). Vzápětí následuje velikostní standard (L) a vzorky pelety rozpuštěné ve stejných roztocích

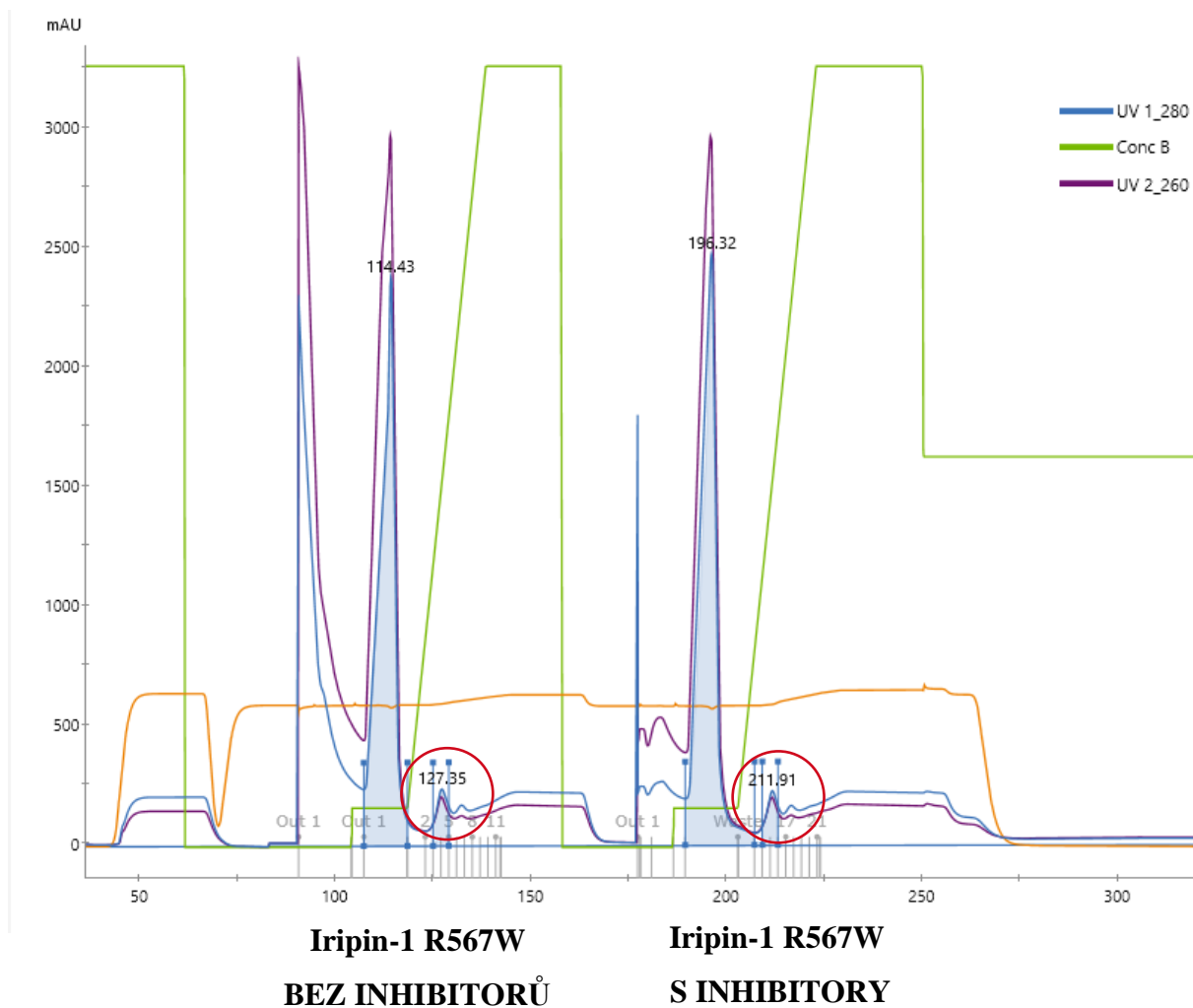
jako tomu bylo u supernatantu (vyjma PBS). Linie proužků s předpokládaným proteinem je naznačena šipkami.

Na Obr. 19 je opět viditelný rozdíl mezi množstvím cytoplazmatické frakce proteinu a proteinu přítomném v inkluzních tělískách. Na samotných vzorcích peletu není vidět prakticky žádný vliv 4 testovaných solubilizačních pufrů, množství Iripin-1 R357W je ve všech vzorcích stejné. Nicméně v případě supernatantu už jistý rozdíl vidět je. Solubilizační pufr 1 vypadá jako nejvhodnější kandidát, jelikož proužek je v tomto případě nejsilnější. Následují solubilizační pufr 2 a 3, u nichž jsou proužky jen o trochu slabší. V případě solubilizačních roztoků 4 a 5 je proužek velmi málo viditelný.

Na základě těchto výsledků bylo stanoveno, že se pro solubilizaci peletu získaného během large-scale exprese využije solubilizační roztok 1, tedy 20mM TRIS-HCl s 300mM NaCl o pH 8,5.

4.5. Afinitní chromatografie

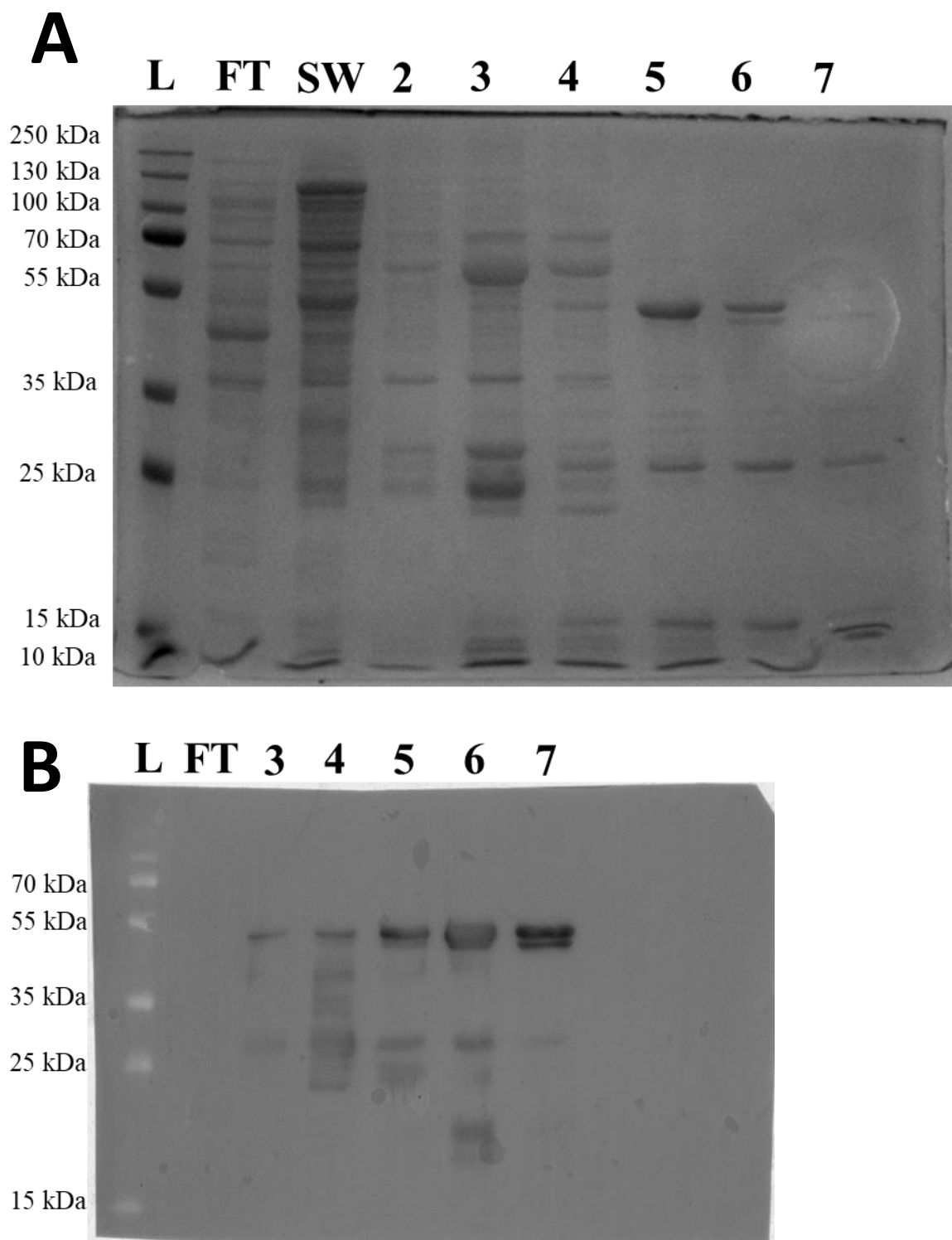
Grafický výstup eluce jednotlivých frakcí během afinitní chromatografie je zobrazen na Obr. 20.



Obr. 20: Záznam eluce frakcí Iripin-1 R357W během afinitní chromatografie. Nejprve byl afinitní chromatografií zpracován vzorek bez přidání inhibitorů proteáz (1. purifikace), následně po promytí byl zpracován vzorek s přidáními inhibitory proteáz (2. purifikace). V grafu jsou nejvýznamnější modré peaky označující nárůst UV, ke kterému dochází během eluce proteinu. Vysoké peaky představují promytí 5% EP před samotnou frakcionací, eluce Iripin-1 R357W vychytávaného na koloně pomocí polyhistidinové značky je zvýrazněna červenými kruhy.

Již na základě velikosti elučních peaků bylo viditelné, že se koncentrace eluovaného Iripin-1 R357W nepohybuje ve vysokých hodnotách. Z první purifikace byly na přítomnost Iripin-1 R357W pomocí SDS PAGE otestovány frakce 2-7, které odpovídají většímu peaku na začátku frakcionace a za ním následujícímu malému peaku. Z druhé purifikace byly poté na přítomnost Iripin-1 R357W testovány frakce 14-19, které odpovídají většímu a menšímu peaku vyznačenému na Obr. 20.

Výsledky SDS PAGE pro jednotlivé frakce získané při afinitní chromatografii a jejich následné otestování pomocí Western blotu jsou vyobrazeny na Obr. 21 a Obr. 22.



Obr. 21: A: Výsledek SDS PAGE pro frakce z první purifikace (vzorky bez přidání inhibitorů). Zleva doprava lze vidět velikostní standard (L), flow-through (FT), promytí 5% EP (SW) a následně jednotlivé frakce značené příslušnými čísly. **B: Výsledek Western blotu**

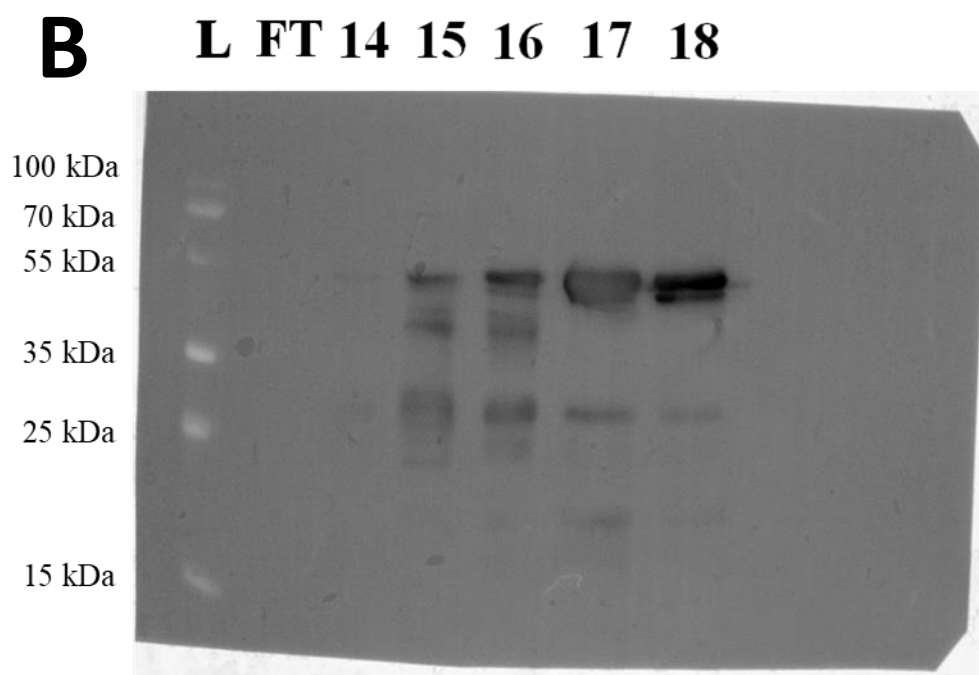
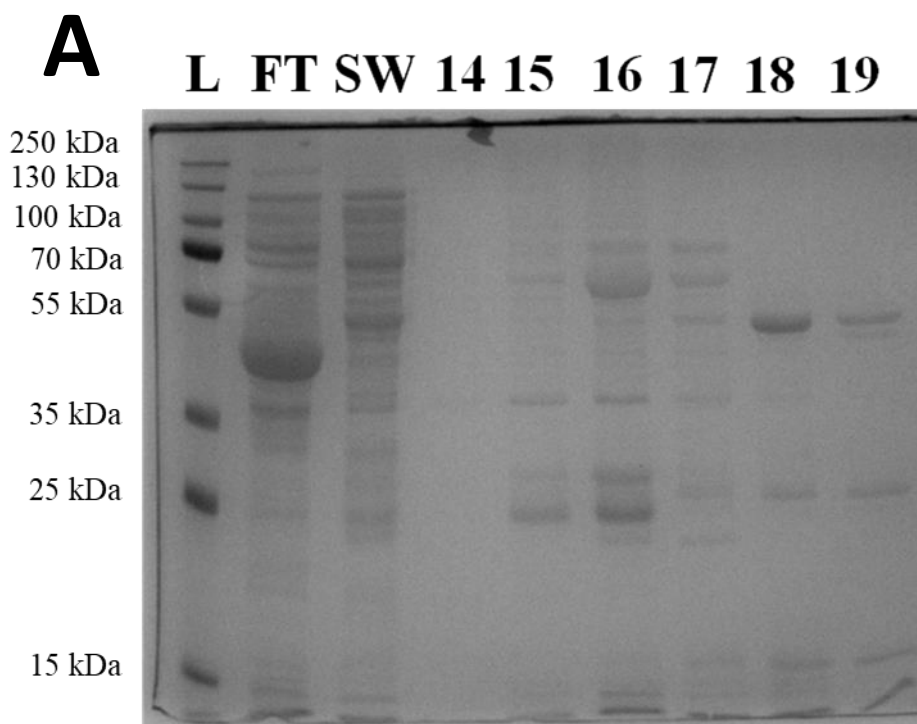
frakcí z 1. purifikace. Zleva lze vidět velikostní standard (L), flow-through (FT) a následně jednotlivé frakce označené příslušnými čísly.

V části A na Obr. 21 lze vidět, že v jamce se vzorkem z flow-through se vyskytuje proužek velikostně odpovídající Iripin-1 R357W, který je poměrně slabý, to znamená, že během flow-through neuniklo nijak velké množství našeho proteinu. V jamce SW již bylo množství proteklého Iripin-1 R357W výrazněji vyšší, zřejmě se část proteinu odmyla kvůli nedostatečně pevnému zachycení na afinitní koloně. Ve frakci 2 není v očekávané velikosti viditelný proužek, ten se slabě začíná objevovat ve frakcích 3 a 4. Následně se množství Iripin-1 R357W výrazně navyšuje ve frakci 5, přetrvává ve vcelku přijatelném množství ve frakci 6 a ve frakci 7 se již nevyskytuje.

Frakce 3 – 7, u nichž byla na gelu pozorována přítomnost Iripin-1 R357W (nehledě na množství daného proteinu), byly otestovány na přítomnost Iripin-1 R357W pomocí anti-polyhistidinové protilátky (viz část B, obr. 21).

V části B na Obr. 21 je znázorněno, že ve vzorku z flow-through nedošlo k žádnému navázání anti-polyhistidinové protilátky, přestože v části A se vyskytoval proužek, který by velikostně mohl odpovídat Iripin-1 R357W. Ve všech ostatních frakcích již došlo k navázání protilátky v očekávané velikosti, nicméně k vazbě došlo i na proteiny o menší velikosti. Ve frakcích 3 a 4 se Iripin-1 R357W vyskytoval v menším množství, což koreluje s výsledky SDS PAGE. Ve frakcích 5 – 7 se protilátka vážala ve velkém množství (výsledek u frakce 7 nekoreluje se silou proužku na SDS PAGE, tam nebyla pozorována přítomnost téměř žádného Iripin-1 R357W). Zároveň čistota těchto frakcí byla znatelně větší než v případě frakcí předchozích.

Na základě přítomnosti Iripin-1 R357W prokázané pomocí anti-polyhistidinové protilátky a čistoty frakcí 5 – 7, byly tyto frakce spojeny dohromady, zakoncentrovány do 1 ml a podrobeny přečištění pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie (její výstup viz Obr. 23).



Obr. 22: A: Výsledek SDS PAGE pro frakce z druhé purifikace (vzorky s přidanými inhibitory). Zleva doprava lze vidět velikostní standard (L), flow-through (FT), promytí 5% EP (SW) a následně jednotlivé frakce značené příslušnými čísly. **B: Výsledek Western blotu frakcí z 2. purifikace.** Zleva lze vidět velikostní standard (L), flow-through (FT) a následně jednotlivé frakce označené příslušnými čísly.

Část A na Obr. 22 ukazuje, že ve flow-through neuniklo velké množství Iripin-1 R357W serpinu. Stejně jako v případě první purifikace, nemalé množství proteinu proteklo přes kolonu během promytí 5% EP. Ve frakci 14 se nevyskytoval téměř žádný protein, Iripin-1 R357W se začal objevovat u frakcí 15 a 16, ovšem jen slabě. Výrazné navýšení jeho množství se objevilo u frakce 18, u frakcí 17 a 19 se pohybovalo v přijatelném množství. Frakce 14 – 18 byly následně otestovány na přítomnost Iripin-1 R357W pomocí Western blotu za využití anti-polyhistidinové protilátky (viz část B, Obr. 22).

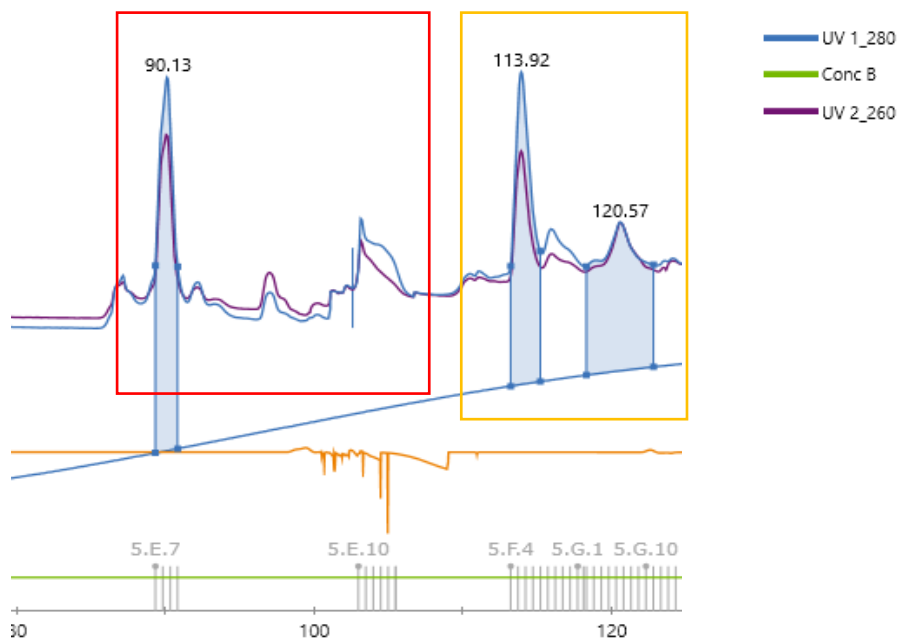
Jak ukazuje část B na Obr. 22, vzorek z flow-through, stejně jako tomu bylo u první purifikace, Iripin-1 R357W neobsahoval. Ve frakci 14 se anti-polyhistidinová protilátka téměř vůbec nevázala, což koreluje s výsledky SDS PAGE. Přítomnost Iripin-1 R357W byla potvrzena u frakcí 15 – 18, obzvláště u frakcí 17 a 18 se anti-polyhistidinová protilátka vážala velmi silně. Ve frakcích 15 a 16 se protilátka vážala i na jiné proteiny o menší velikosti, poslední dvě frakce byly ve srovnání s nimi čistější. Frakce 19 nebyla na přítomnost Iripin-1 R357W otestována, nicméně vzhledem k výsledku zobrazeného v části A, se dalo očekávat, že bude její čistota vypadat podobně jako v případě frakce 17 a 18.

Na základě výsledků SDS PAGE a Western blotu byly vybrány frakce 17 – 19, které byly spojeny, zakoncentrovány do 1 ml a přečištěny pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie. Frakce 17 byla vybrána i přesto, že obsahovala více proteinových kontaminací než zbylé dvě frakce, jelikož u ní bylo pomocí anti-polyhistidinové protilátky prokázáno poměrně velké množství Iripin-1 R357W a přítomné kontaminace mohly být následně odfiltrvány pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie.

Výstup z přečištění frakcí 5 – 7 z 1. purifikace a frakcí 17 – 19 ze 2. purifikace pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie je vyobrazeno na Obr. 23 (viz kapitola 4.6.).

4.6. Rozměrově-vylučovací chromatografie

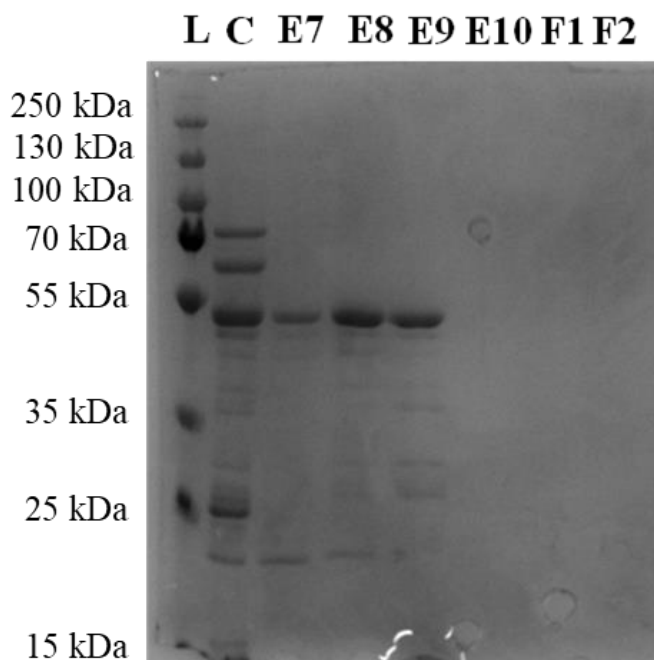
Grafický výstup rozměrově-vylučovací chromatografie je uveden na Obr. 23.



Obr. 23: Záznam eluce frakcí Iripin-1 R357W během rozměrově-vylučovací chromatografie. Jako první byl zpracován vzorek bez přidaných inhibitorů proteáz (1. purifikace, vyznačeno červeným obdélníkem), následně, po promytí, byl zpracován vzorek s přidanými inhibitory proteáz (2. purifikace, vyznačeno žlutým obdélníkem). V grafu jsou opět nejvýznamnější modré peaky označující nárůst UV, ke kterému dochází během eluce proteinu.

Z první purifikace byly na přítomnost Iripin-1 R357W pomocí SDS PAGE otestovány frakce E7-E9, které na základě grafického výstupu na Obr. 23 vypadaly jako eluční peaky Iripin-1 R357W, dále se ovšem otestovaly i E10 – F2 peaky, u kterých peak nevypadal úplně typicky a bylo nejasné, zda zde dochází k eluci proteinu či ne. Z druhé purifikace byly poté na přítomnost Iripin-1 R357W testovány frakce F4 – F10, u kterých bylo pozorovatelné výrazné navýšení UV, byly ale také otestovány i frakce G5, G6 a G7, u kterých také došlo k malému navýšení.

Výsledky SDS PAGE jednotlivých frakcí 1. i 2. purifikace získaných pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie jsou uvedeny na Obr. 24 a Obr. 25.

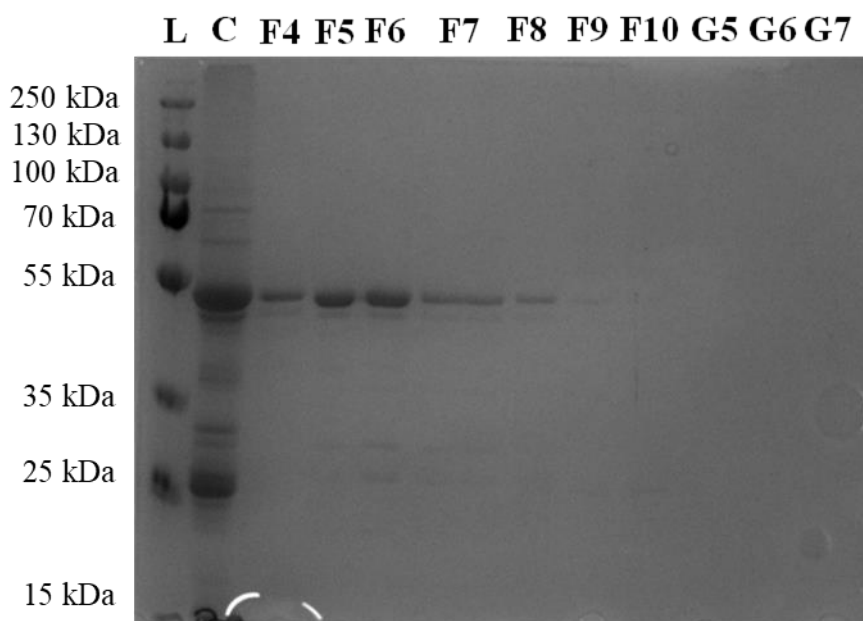


Obr. 24: Výsledek SDS PAGE pro frakce z 1. purifikace (bez přidaných inhibitorů) získané pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie. Zleva lze vidět velikostní standard (L), vzorek nanášený na kolonu (C) a dále jednotlivé frakce označené příslušným písmenem a číslem.

Jak lze vidět na Obr. 24, přítomnost Iripin-1 R357W byla prokázána u frakcí E7 – E9. Při porovnání vzorku dávaného na kolonu (C) a výše zmíněnými frakcemi lze podotknout, že se pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie podařilo vzorky očistit od proteinů, které se zde nacházely ve větším množství (především proteiny pohybující se velikostně mezi 55 kDa a 70 kDa a 70 kDa a 100 kDa, poté také protein u 25 kDa hranice velikostního standardu). U ostatních proteinů o menších velikostech vyskytujících se ve vzorku v menším množství nebylo přečištění tolik znatelné, je vidět, že se v různých kombinacích v přečištěných frakcích stále vyskytují.

Frakce E10 – F2, u nichž bylo nejasné, zda docházelo k eluci proteinu či ne, již žádné proteiny neobsahovaly.

Pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie se tedy podařilo u vybraných frakcí odfiltrovat určité proteinové kontaminace. Dané frakce (E7 – E9) byly následně spojeny a využity pro testování tvorby komplexů.



Obr. 25: Výsledek SDS PAGE pro frakce ze 2. purifikace (s přidanými inhibitory) získané pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie. Zleva lze vidět velikostní standard (L), vzorek nanášený na kolonu (C) a dále jednotlivé frakce označené příslušným písmenem a číslem.

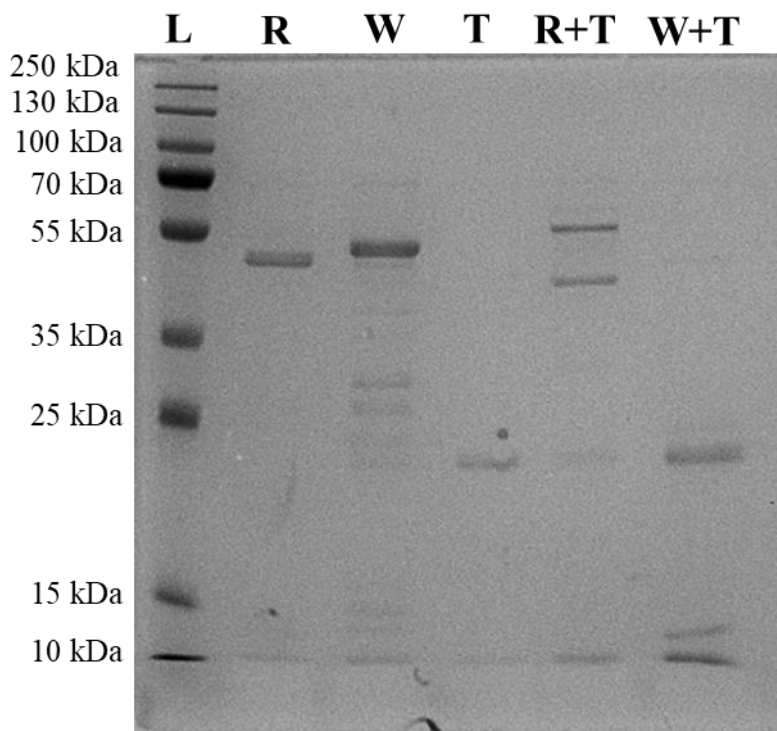
Druhá purifikace byla, co se týče množství získaného Iripin-1 R357W, výtěžnější než purifikace první. Vzorek nanášený na kolonu (C) obsahoval přibližně stejné proteiny jako tomu bylo v případě první purifikace (viz Obr. 24). Přítomnost Iripin-1 R357W byla potvrzena ve frakcích F4 – F9, nicméně v případě F9 frakce bylo množství proteinu velmi malé.

Při porovnání vzorku nanášeného na kolonu a výše zmíněnými frakcemi je vidět, že se pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie podařilo vzorky očistit od proteinů, které se zde nacházely ve větším množství (hlavně protein pohybující se velikostně mezi 55 kDa a 70 kDa a 100 kDa, poté také protein u 25 kDa hranice velikostního standardu). U ostatních proteinů o menších velikostech vyskytujících se ve vzorku v menším množství nebylo přečištění tolik patrné, v různých kombinacích se vyskytují i v přečištěných frakcích. Frakce F10 a G5 – G7 již žádné proteiny neobsahovaly.

Při porovnání Obr. 24 a Obr. 25 je vidět, že jednotlivé frakce z 2. purifikace jsou čistší než tomu bylo v případě purifikace první. Pro další využití byly z 2. purifikace vybrány frakce F4 – F9.

4.7. Tvorba komplexů Iripin-1 R357W s trypsinem

Polyakrylamidový gel se vzorky pro testování tvorby komplexů je uveden na Obr. 26.



Obr. 26: Výsledek SDS PAGE pro testování tvorby komplexů Iripin-1 a Iripin-1 R357W s trypsinem. Zleva lze vidět velikostní standard (L), dále 1 μ M Iripin-1 (R), 1 μ M Iripin-1 R357W (W), 1 μ M trypsin (T), 1 μ M Iripin-1 + 1 μ M trypsin (R+T) a 1 μ M Iripin-1 R357W + 1 μ M trypsin (W+T).

Obr. 26 ukazuje, že použitý Iripin-1 je naprosto čistý protein ve srovnání s Iripin-1 R357W, který se za využití afinitní chromatografie a rozměrově-vylučovací chromatografie nepodařilo dokonale přecistit. Je zde viditelný i velikostní rozdíl mezi těmito dvěma proteiny, který je způsoben přítomností polyhistidinové značky u Iripin-1 R357W, která se u Iripin-1 nevyskytuje, jelikož Iripin-1 byl připravován jiným způsobem. V případě trypsinu se také jedná o kompletně čistý protein o velikosti 23,3 kDa.

U vzorku Iripin-1 s trypsinem jednoznačně došlo ke vzniku komplexu těchto dvou proteinů, jelikož je zde pozorovatelný proužek velikostně odpovídající 55 kDa – 70 kDa, následně proužek o menší velikosti než původní Iripin-1 a nadbytečný trypsin.

U vzorku Iripin-1 R357W s trypsinem k tvorbě komplexu nedošlo, nachází se zde pouze proteiny menších velikostí než původní Iripin-1 R357W.

5. Diskuse

Serpiny plní mnoho významných funkcí v rámci lidského organismu, přičemž inhibiční vlastnosti těchto proteinů podléhají jejich specifické struktuře. To je důvodem, proč jsou v současné době významným předmětem zájmu vědeckého bádání, které se může zaměřovat na různé aspekty jejich fungování. Právě mutagenese je užitečným nástrojem pro pochopení funkce serpinů, proto jsem v rámci mé diplomové práce připravovala mutantní serpin Iripin-1 R357W pro další funkční testy.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 1.3.4., mutace bývají nejčastěji zaváděny do sekvence RCL (především pak do P1 místa), ale mohou být zavedeny i do hinge regionu serpinů (Antalis a Lawrence, 2004; Marijanovic a kol., 2019). V případě bodových mutací může mít záměna jedné aminokyseliny v P1 místě RCL velký dopad na specifitu studovaného serpinu, může kompletně změnit jeho specifitu (Owen a kol., 1983; Marijanovic a kol., 2019, Yang a Rezaie, 2017). Mutagenese serpinů přináší také velký terapeutický potenciál (viz dříve zmiňované studie (Polderdijk a kol., 2017; Jairajpuri a Ansari, 2020)), zacílení a možné využití tohoto přístupu je tedy široké.

My jsme se v této práci vydali cestou mutagenese P1 místa u serpinu Iripin-1. Zavedení bodové mutace argininu za tryptofan je výhodné z několika hledisek. Jednak dochází k mutaci oblasti, která je považována za hlavní determinantu specifity serpinů, zároveň by ale záměna jedné aminokyseliny neměla mít vliv na formování 3D struktury serpinu či vkládání RCL do β -listu A (Antalis a Lawrence, 2004). Tryptofan byl zvolen jako aminokyselina, za niž byl zaměněn původní arginin, na základě výsledků práce Chuanga a kol. (2001), kde byl srovnáván vliv různých bodových mutací P1 místa serpinů.

Na základě mých výsledků lze konstatovat, že cíle stanovené před zahájením projektu byly splněny, nicméně pravdou je, že výtěžnost použitých postupů má prostor k navýšení. První překážkou bylo zavedení optimálního protokolu klonování. Největším problémem, který se nepodařilo zcela vyřešit, bylo zpětné spojování konců plazmidu po restrikci, přestože byly použity dvě různé restriktázy a vzorky byly podrobeny působení alkalické fosfatázy, která by tomuto ději měla pomocí odstranění 5'-fosfátu zabránit. Přesto po transformaci do kompetentních buněk *E. coli* na agarových plotnách docházelo k růstu bakteriálních kolonií nesoucích prázdný plazmid bez inzertu. Lze to vidět i na výsledku colony PCR, kde vyšla ze 23 testovaných kolonií pouze jedna jako pozitivní pro Iripin-1 R357W. Přestože proces klonování nebyl tedy úplně ideálně zoptimalizován, k postupu do dalších fází pokusu byl dostačující.

Dalším aspektem, který rovněž přispěl k menší koncentraci získaného proteinu, byla práce se supernatantem, tedy s cytoplazmatickou frakcí proteinu, místo peletu s inkluzními tělísky, kde byla koncentrace na základě výsledků SDS PAGE mnohonásobně vyšší. Hlavním důvodem pro toto rozhodnutí bylo, že oproti proteinům, které jsou v rámci inkluzních tělísek vysoce agregovány, jsou cytoplazmatické proteiny už správně sbalené a není potřeba je refoldovat do biologicky aktivního stavu. Navíc proces refoldingu vede obvykle ke značným ztrátám proteinu (Singh a Panda, 2005). V takovém případě by totiž nebylo největší překážkou přečištění rekombinantně připraveného proteinu, ale jeho solubilizace a sbalení do aktivní konformace (Palmer a Wingfield, 2004). Pro získání většího množství proteinu by tedy bylo potřeba kultivovat bakterie ve větším objemu kultury.

Celkově problém nízké koncentrace Iripin-1 R357W vyizolovaného pomocí afinitní chromatografie nemusí být jen záležitostí malého množství vstupního materiálu, ale zároveň by mohlo jít i o špatnou přístupnost polyhistidinové značky tohoto proteinu a její neefektivní vázání na kolonu afinitního chromatografu (McCoy, 2020). Určení struktury Iripin-1 R357W nebylo součástí této práce, nicméně kdyby byla polyhistidinová značka schována v rámci 3D struktury získaného proteinu, problém by se mohl vyřešit přidáním krátké spojovací sekvence mezi polyhistidinovou značkou a protein, což by mohlo odkrýt tuto značku a vylepšit výtěžek afinitní chromatografie (Chen, Zaro a Shen, 2013).

Nepřístupnost polyhistidinové značky by mohla také vysvětlit odmytí nezanedbatelného množství proteinu během promytí s 5% EP. Spolu s Iripin-1 R357W byl pomocí afinitní chromatografie purifikován i serpin Iripin-4 značený toutéž polyhistidinovou značkou, u něhož byla koncentrace získaného proteinu znatelně větší. To napovídá strukturálnímu vlivu Iripin-1 R357W na efektivitu afinitní chromatografie.

Serpin získaný pomocí afinitní chromatografie byl ke všemu poměrně znečištěný dalšími proteiny, jelikož HisTrap afinitní kolona sice vycytává proteiny značené polyhistidinovou značkou s dlouhým řetězcem histidinů, ale s určitou silou se na ni mohou vázat i proteiny obsahující více histidinů blízko u sebe. Tyto proteiny by se měly z kolony odmyt během promývání, ale jak bylo vidět na SDS PAGE, takovýchto kontaminací bylo v jednotlivých frakcích přítomno několik. Zvýšení čistoty by mohlo být dosaženo dalšími purifikačními kroky, např. pomocí iontové výměny, což by ovšem vedlo k dalším ztrátám.

Koncentrace Iripin-1 R357W byla poměrně nízká již po afinitní chromatografii, nicméně po přečištění pomocí rozměrově-vylučovací chromatografie, kdy byly odfiltrovány velikostně odlišné proteiny, dále klesla. Zakoncentrování do menšího objemu pomocí Amicon Ultra – 2mL centrifugačních filtrů vedlo k získání proteinu s dostatečnou koncentrací (2 μ M) pro

otestování tvorby komplexů. Bohužel, pro další funkční testy by bylo potřeba koncentraci a množství proteinu ještě zvýšit. Je zajímavé, že i Iripin-1, který byl rekombinantně připraven na Katedře medicínské biologie JU v rámci předchozího výzkumu, patří mezi serpiny s poměrně nízkými výtěžky.

Jelikož bylo v rámci předchozího výzkumu potvrzeno, že Iripin-1 tvoří inhibiční komplexy s trypsinem, byl Iripin-1 R357W testován na schopnost tvořit komplexy právě s touto proteázou. U Iripin-1 bylo viditelné, že kromě vzniklého komplexu o vyšší velikosti, pohybující se mezi 55-70 kDa, se zde nachází i produkt o velikosti menší než původní Iripin-1 a zbytkový trypsin. To napovídá možnosti, že se veškerý Iripin-1 vložený do reakce spotřeboval na inhibici přítomného trypsinu, což se projevilo vytvořením komplexu. Zbylý neinhibovaný trypsin následně mohl takto vytvořené komplexy štěpit, to naznačuje přítomnost proužku v menší velikosti než v případě Iripin-1. V případě Iripin-1 R357W k tvorbě komplexu očekávané velikosti nedošlo, tedy bodová mutace zavedena v P1 místě serpinu patrně zamezila jeho schopnosti se vázat s trypsinem. Trypsin poté mohl přítomný serpin štěpit, ne ovšem klasicky v P1 místě, protože tato proteáza štěpí proteiny na karboxylovém konci argininu a lysinu, ne tryptofanu. V práci Chuanga a kol. (2001), kde byla také provedena záměna argininu za tryptofan v P1 místě antitrombinu, došlo k 5000-násobnému snížení reaktivity serpinu s cílovou proteázou, což naznačuje, že tato mutace může velmi účinně snižovat inhibiční schopnost serpinu. Jelikož v rámci předchozího výzkumu nebyl u Iripin-1 pozorován prokazatelný vliv na koagulační kaskádu (vliv nebyl prokázán ani u jednoho ze tří prováděných koagulačních testů – protrombinového času, aktivovaného parciálního tromboplastinového času či trombinového času), tímto směrem jsme se při testování ubírat nemohli.

Přítomnost aprotininu, který je součástí inhibitorů proteáz přidávaných do elučního pufru a který by mohl inhibovat účinky trypsinu, byla pomocí SDS PAGE na 15% polyakrylamidovém gelu vyloučena, proto bylo možné pro testování tvorby komplexů používat vzorky s přidanými inhibitory proteáz.

Velikostní rozdíl mezi Iripin-1 a Iripin-1 R357W může být výsledkem jejich rozdílné přípravy. Iripin-1 R357W zahrnuje navázanou polyhistidinovou značku s deseti histidiny o velikosti zhruba 1,6 kDa a sekvenci několika dalších aminokyselin, včetně místa pro štěpení enterokinázou. Dohromady tato přídatná sekvence navyšuje velikost Iripin-1 R357W oproti původnímu Iripin-1 o cca 2,6 kDa. Vzhledem k malé velikosti přídatné sekvence by přítomnost polyhistidinové značky neměla mít vliv na funkci a strukturu daného proteinu, proto byla ponechána součástí Iripin-1 R357W.

Nemůžeme sice určit a dedukovat, jakou konformaci získaný Iripin-1 R357W zaujímá, zda se sbaluje do metastabilní či latentní konformace, nicméně, jak bylo zmíněno výše, obecně by zavedení bodové mutace do P1 místa neměla mít vliv na sbalování serpinu (Antalis a Lawrence, 2004).

Získaný mutantní klon Iripin-1 R357W by mohl být využit jako neinhibiční kontrola v *in vitro* pokusech, které byly provedeny v rámci předchozího výzkumu a u nichž nebyl objasněn mechanismus inhibice. V tomto případě by srovnání s Iripin-1 mohlo zodpovědět otázku, zda pozorovaný efekt může být zprostředkován vazbou RCL smyčky serpinu nebo se jedná o jiný mechanismus. V současné době ovšem nebylo možné *in vitro* pokusy provést.

Zároveň bylo původně zamýšleno pracovat i s dalším serpinem, u něžž byly pozorovány v rámci koagulačních testů inhibiční účinky, nicméně z časových důvodů toto zůstává předmětem budoucího výzkumu.

6. Závěr

Zavedení bodové mutace za účelem záměny argininu za tryptofan do P1 místa serpinu Iripin-1 pomocí rekombinantních technik bylo úspěšné, podařilo se získat protein o předpokládané velikosti 44,729 kDa. Přestože koncentrace a čistota získaného proteinu nebyla optimální, byly dostačující pro plánované otestování vlivu mutace na funkci serpinu.

U připraveného proteinu došlo ke ztrátě schopnosti vytvářet kovalentní komplex s trypsinem, tedy proteázou, která je normálně cílem jeho inhibice. Z tohoto důvodu mohl trypsin Iripin-1 R357W štěpit na jiných místech než v P1 oblasti.

V dalším výzkumu by tento protein mohl být využit k objasnění mechanismu účinků pozorovaných v *in vitro* pokusech v rámci předchozího výzkumu. Zároveň by mohl být postup užitý pro vytvoření a získání Iripin-1 R357W použit pro tvorbu mutantů dalších serpinů studovaných v laboratoři Katedry medicínské biologie se zaměřením na jejich antikoagulační působení.

Seznam literatury

- Anderson, J. F. a Magnarelli, L. A. (2008) „Biology of Ticks“, *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), str. 195–215. doi: 10.1016/j.idc.2007.12.006.
- Antalis, T. a Lawrence, D. (2004) „Serpín mutagenesis“, *Methods*, 32(2), str. 130–140. doi: 10.1016/S1046-2023(03)00204-4.
- Barrett, A. J. (2000) „Proteases“, *Current Protocols in Protein Science*, 21(1). doi: 10.1002/0471140864.ps2101s21.
- Beinrohr, L. a kol. (2011) „Serpíns and the Complement System“, *Methods Enzymol.*, str. 55–75. doi: 10.1016/B978-0-12-386471-0.00004-3.
- BIOGEN PRAHA (2022) GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. Dostupné z: <https://eshop.biogen.cz/generuler-100-bp-plus-dna-ladder>.
- Blisnick, A. A., Foulon, T. a Bonnet, S. I. (2017) „Serine Protease Inhibitors in Ticks: An Overview of Their Role in Tick Biology and Tick-Borne Pathogen Transmission“, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fcimb.2017.00199.
- Chen, X., Zaro, J. L. a Shen, W.-C. (2013) „Fusion protein linkers: Property, design and functionality“, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(10), str. 1357–1369. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.039.
- Chmelař, J. a kol. (2017) „Protease Inhibitors in Tick Saliva: The Role of Serpins and Cystatins in Tick-host-Pathogen Interaction“, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fcimb.2017.00216.
- Chuang, Y.-J. a kol. (2001) „The Antithrombin P1 Residue Is Important for Target Proteinase Specificity but Not for Heparin Activation of the Serpin. Characterization of P1 Antithrombin Variants with Altered Proteinase Specificity but Normal Heparin Activation“, *Biochemistry*, 40(22), str. 6670–6679. doi: 10.1021/bi002933d.
- Ehrlich, H. J. a kol. (1990) „Alteration of serpin specificity by a protein cofactor. Vitronectin endows plasminogen activator inhibitor 1 with thrombin inhibitory properties.“, *The Journal of biological chemistry*, 265(22), str. 13029–35. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1695900>.

Eldering, E. a kol. (1992) „Characterization of recombinant C1 inhibitor P1 variants.“, *The Journal of biological chemistry*, 267(10), str. 7013–20. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1551909>.

Elsässer, B. a Goettig, P. (2021) „Mechanisms of Proteolytic Enzymes and Their Inhibition in QM/MM Studies“, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), str. 3232. doi: 10.3390/ijms22063232.

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

Francischetti, Ivo, M. (2009) „The role of saliva in tick feeding“, *Frontiers in Bioscience*. NIH Public Access, 14, str. 2051. doi: 10.2741/3363.

van Gent, D. a kol. (2003) „Serpins: structure, function and molecular evolution“, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35(11), str. 1536–1547. doi: 10.1016/S1357-2725(03)00134-1.

Gettins, P. G. W. (2002) „Serpins: structure, mechanism, and function.“, *Chemical reviews*, 102(12), str. 4751–804. doi: 10.1021/cr010170+.

Gettins, P. G. W. a Olson, S. T. (2009) „Exosite Determinants of Serpin Specificity“, *Journal of Biological Chemistry*, 284(31), str. 20441–20445. doi: 10.1074/jbc.R800064200.

Gettins, P. G. W. a Olson, S. T. (2016) „Inhibitory serpins. New insights into their folding, polymerization, regulation and clearance“, *Biochemical Journal*, 473(15), str. 2273–2293. doi: 10.1042/BCJ20160014.

Green, D. (2006) „Coagulation cascade“, *Hemodialysis International*, 10(S2), str. S2–S4. doi: 10.1111/j.1542-4758.2006.00119.x.

Hopkins, P. C. R. a kol. (1995) „Development of a Novel Recombinant Serpin with Potential Antithrombotic Properties“, *Journal of Biological Chemistry*, 270(20), str. 11866–11871. doi: 10.1074/jbc.270.20.11866.

Irving, J. A. a kol. (2002) „Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: Engineering α 1-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases“, *Biochemistry*, 41(15), str. 4998–5004. doi: 10.1021/bi0159985.

- Izaguirre, G. a kol. (2013) „Identification of Serpin Determinants of Specificity and Selectivity for Furin Inhibition through Studies of α 1PDX (α 1-Protease Inhibitor Portland)-Serpin B8 and Furin Active-site Loop Chimeras“, *Journal of Biological Chemistry*, 288(30), str. 21802–21814. doi: 10.1074/jbc.M113.462804.
- Jairajpuri, M. A. a Ansari, S. (2020) „Using serpins cysteine protease cross-specificity to possibly trap SARS-CoV-2 Mpro with reactive center loop chimera“, *Clinical Science*, 134(17), str. 2235–2241. doi: 10.1042/CS20200767.
- Johnson, S. a Pellecchia, M. (2006) „Structure- and Fragment-Based Approaches to Protease Inhibition“, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6(4), str. 317–329. doi: 10.2174/156802606776287072.
- Kounnas, M. Z. a kol. (1996) „Cellular Internalization and Degradation of Antithrombin III-Thrombin, Heparin Cofactor II-Thrombin, and α 1-Antitrypsin-Trypsin Complexes Is Mediated by the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein“, *Journal of Biological Chemistry*, 271(11), str. 6523–6529. doi: 10.1074/jbc.271.11.6523.
- Law, R. H. P. a kol. (2006) „An overview of the serpin superfamily“, *Genome Biology*, 7(5), str. 1–11. doi: 10.1186/gb-2006-7-5-216.
- Lawrence, D. A. a kol. (1990) „Structure-function studies of the SERPIN plasminogen activator inhibitor type 1. Analysis of chimeric strained loop mutants“, *Journal of Biological Chemistry*, 265(33), str. 20293–20301. doi: 10.1016/S0021-9258(17)30503-3.
- Lucas, A. a kol. (2018) „Overview of Serpins and Their Roles in Biological Systems“, str. 1–7. 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.
- Marijanovic, E. M. a kol. (2019) „Reactive centre loop dynamics and serpin specificity“, *Scientific Reports*, 9(1), str. 3870. doi: 10.1038/s41598-019-40432-w.
- Marszal, E. a Shrake, A. (2006) „Serpins crystal structure and serpin polymer structure“, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 453(1), str. 123–129. doi: 10.1016/j.abb.2006.03.006.

Martins, L. A. a kol. (2020) „Small protease inhibitors in tick saliva and salivary glands and their role in tick-host-pathogen interactions“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1868(2), str. 140336. doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140336.

McCoy, A. (2020) G-Biosciences, His-tagged protein expressing but not binding your Ni-NTA column? Dostupné z: <https://info.gbiosciences.com/blog/his-tagged-protein-expressing-but-not-binding-your-ni-nta-column>.

MEROPS the Peptidase Database (2017). Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/merops/>.

New England Biolabs (2021) NEBioCalculator. Dostupné z: <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>.

Owen, M. C. a kol. (1983) „Mutation of Antitrypsin to Antithrombin“, *New England Journal of Medicine*, 309(12), str. 694–698. doi: 10.1056/NEJM198309223091203.

Palmer, I. a Wingfield, P. T. (2004) „Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*.“, *Current protocols in protein science*, doi: 10.1002/0471140864.ps0603s38.

Polderdijk, S. G. I. a kol. (2017) „Design and characterization of an APC-specific serpin for the treatment of hemophilia“, *Blood*, 129(1), str. 105–113. doi: 10.1182/blood-2016-05-718635.

Polderdijk, S. G. I. a Huntington, J. A. (2018) „Identification of serpins specific for activated protein C using a lysate-based screening assay“, *Scientific Reports*, 8(1), str. 8793. doi: 10.1038/s41598-018-27067-z.

Rau, J. C. a kol. (2007) „Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis“, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(1), str. 102–115. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02516.x.

Rawlings, N. D. (2010) „Peptidase inhibitors in the MEROPS database“, *Biochimie*, 92(11), str. 1463–1483. doi: 10.1016/j.biochi.2010.04.013.

Rawlings, N. D. a kol. (2014) „MEROPS : the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors“, *Nucleic Acids Research*, 42(D1), str. D503–D509. doi: 10.1093/nar/gkt953.

Rawlings, N. D. (2020) „Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes“, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1868(2). doi: 10.1016/j.bbapap.2019.140345.

Rawlings, N. D., Tolle, D. P. and Barrett, A. J. (2004) „Evolutionary families of peptidase inhibitors“, *Biochemical Journal*, 378(3), str. 705–716. doi: 10.1042/bj20031825.

Ray, C. A. a kol. (1992) „Viral inhibition of inflammation: Cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme“, *Cell*, 69(4), str. 597–604. doi: 10.1016/0092-8674(92)90223-Y.

Rezaie, A. R. (1998) „Calcium Enhances Heparin Catalysis of the Antithrombin-Factor Xa Reaction by a Template Mechanism“, *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), str. 16824–16827. doi: 10.1074/jbc.273.27.16824.

Ribeiro, J. M. C. a Francischetti, I. M. B. (2003) „Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives“, *Annual Review of Entomology*, 48(1), str. 73–88. doi: 10.1146/annurev.ento.48.060402.102812.

Sambrano, G. R. a kol. (2000) „Cathepsin G Activates Protease-activated Receptor-4 in Human Platelets“, *The Journal of biological chemistry*, 275(10), str. 6819-6823. doi: 10.1074/JBC.275.10.6819.

Schechter, I. a Berger, A. (1967) „On the size of the active site in proteases. I. Papain“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27(2), str. 157–162. doi: 10.1016/S0006-291X(67)80055-X.

Shamsi, T. N., Parveen, R. a Fatima, S. (2016) „Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review“, *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, str. 1120–1133. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.069.

Sherman, P. M. a kol. (1995) „Identification of Tissue-type Plasminogen Activator-specific Plasminogen Activator Inhibitor-1 Mutants“, *Journal of Biological Chemistry*, 270(16), str. 9301–9306. doi: 10.1074/jbc.270.16.9301.

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

Silverman, G. A. a kol. (2001) „The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins“, *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), str. 33293–33296. doi: 10.1074/jbc.R100016200.

Singh, S. M. a Panda, A. K. (2005) „Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins“, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), str. 303–310. doi: 10.1263/jbb.99.303.

SnapGene (2021) pET-19b. Dostupné z: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_\(novagen\)&plasmid=pET-19b](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pet_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-19b).

Tsutsui, Y., Dela Cruz, R. a Wintrode, P. L. (2012) „Folding mechanism of the metastable serpin $\alpha 1$ -antitrypsin“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(12), str. 4467–4472. doi: 10.1073/pnas.1109125109.

Whisstock, J. C. a kol. (2000) „Conformational changes in serpins: I. the native and cleaved conformations of $\alpha 1$ -antitrypsin“, *Journal of Molecular Biology*, 296(2), str. 685–699. doi: 10.1006/jmbi.1999.3520.

Whisstock, J. C. a kol. (2010) „Serpins Flex Their Muscle“, *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), str. 24307–24312. doi: 10.1074/jbc.R110.141408.

Yamasaki, M. a kol. (2010) „Loop-Sheet Mechanism of Serpin Polymerization Tested by Reactive Center Loop Mutations“, *Journal of Biological Chemistry*, 285(40), str. 30752–30758. doi: 10.1074/jbc.M110.156042.

Yang, L. a kol. (2010) „Inhibitory Properties of the P1 Tyr Variant of Antithrombin“, *Biochemistry*, 49(12), str. 2680–2686. doi: 10.1021/bi100120a.

Yaron, J. R. a kol. (2021) „Fibrinolytic Serine Proteases, Therapeutic Serpins and Inflammation: Fire Dancers and Firestorms“, *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8. doi: 10.3389/fcvm.2021.648947.