

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

**Příprava vybraných lidských cyklofilinů
v *Escherichia coli***

Bakalářská práce

Autor: Petra Bůbelová
Studijní program: B1407 / Chemie
Studijní obor: 1407R005 / Chemie
Vedoucí práce: doc. RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Hradec Králové

Červenec 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.

V Hradci Králové dne

Petra Bůbelová

Poděkování:

Chtěla bych velmi poděkovat paní doc. RNDr. Lucii Zemanové, Ph.D., vedoucí mé bakalářské práce, která se mnou neztratila nervy a vyšla mi ve všem vstříc. Chtěla bych také poděkovat za všechny rady a nápady, které mi poskytla, a čas, který mi věnovala, abych byla schopna úspěšně tuto práci dokončit. Mé vřelé díky patří také skvělému kolektivu v laboratořích buněčné a molekulární biologie, zvláště pak paní Mgr. Monice Schmidt, Ph.D., Mgr. Michaele Vaškové a RNDr. Mgr. Lucii Vinklářové.

Anotace (CZ)

BŮBELOVÁ, P. *Příprava vybraných lidských cyklofilinů v Escherichia coli*. Hradec Králové, 2020. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Lucie Zemanová Ph.D. 68 s.

Teoretická část se zabývá cyklofiliny, což jsou enzymy mající peptidyl-prolyl cis-trans izomerázovou aktivitu, kterou přispívají ke správnému sbalení proteinů po translaci. Lidský genom kóduje 17 různých cyklofilinů, z čehož má každý své další specifické funkce. Hrají roli například při rozvoji různých onemocnění, při sestřihu pre-mRNA, při sestřihu v apoptóze buněk atd. Dále je popsána metodika přípravy rekombinantních proteinů, zvláště v prokaryotních organismech. Cílem praktické části byla příprava rekombinantních proteinů lidského cyklofilinu A a lidského cyklofilinu E, pomocí expresního systému *Escherichia coli*. Výchozí kultury *E.coli* XL-1 obsahovaly cDNA cyklofilinu A a cDNA cyklofilinu E, klonovanou do vektoru pCR4-TOPO. Klonování cDNA cyklofilinu A a cDNA cyklofilinu E z tohoto plazmidu do expresního plazmidu pET-28b(+) se podařilo pouze pro cyklofilin A, který byl následně exprimován pomocí *E.coli* BL-21 (DE3) a purifikován. U čistého cyklofilinu A byla stanovena koncentrace a ověřena čistota, identita, aktivita a interakce s cyklosporinem A. Byla stanovena také disociační konstanta vazby cyklofilin A-cyklosporin A.

Klíčová slova

Cyklofilin A, cyklofilin E, *Escherichia coli*, rekombinantní protein

Anotace (EN)

The theoretical part describes cyclophilins, which are enzymes with a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. They are involved by this activity in the protein folding after translation. The human genome encodes 17 different cyclophilins, each with additional functions. They play roles for example in the development of various diseases, in the splicing of pre-mRNA, in the splicing of cell apoptosis etc. Next, the process of preparation of recombinant proteins is described, especially in prokaryotic organisms. The aim of the experimental part was to prepare a recombinant human cyclophilin A and human cyclophilin E proteins using the *Escherichia coli* expression system. The original cultures *E.coli* XL-1 contained cDNA of cyclophilin A and cDNA of cyclophilin E cloned into the pCR4-TOPO vector. The cloning of cDNA of cyclophilin A and cDNA of cyclophilin E from this plasmid into the expression plasmid pET-28b(+) were successful only for cyclophilin A, which was then expressed by *E.coli* BL-21 (DE3) and purified. The concentration of protein, purity, identity, activity and the interaction with cyclosporin A were determined for purified cyclophilin A. The dissociation constant of cyclophilin A-cyclosporin A binding was also determined.

Keywords

Cyclophilin A, cyclophilin E, *Escherichia coli*, recombinant protein

Seznam zkratek

AA – akrylamid
Ala – alanin
APS – persíran amonný
Arg – arginin
Asn – asparagin
BCA – kyselina bicinchoninová
BFB – bromfenolová modř
BSA – hovězí sérový albumin
BSG, CD147 – basign
CD4⁺ T buňky – pomocné T lymfocyty
cDNA – komplementární DNA
CsA – cyklosporin A
CypA, PPIA – cyklofilin A
CypB, PPIB – cyklofilin B
CypC, PPIC – cyklofilin C
CypD, PPID – cyklofilin D
CypE, PPIE – cyklofilin E
CypD, PPIF – cyklofilin D
CypG, PIG – cyklosporin G
CypH, PPIH – cyklofilin H
Cyp11, PPIL1 – peptidylprolyl izomeráza-like 1
Cyp12, PPIL2 – peptidylprolyl izomeráza-like 2
Cyp13, PPIL3 – peptidylprolyl izomeráza-like 3
Cyp14, PPIL4 – peptidylprolyl izomeráza-like 4
Cyp16, PPIL6 – peptidylprolyl izomeráza-like 6
DEAE-dextran – dietylaminoetyl-dextran
DMSO – dimetylsulfoxid
E.coli – *Escherichia coli*
EDTA – etylendiamintetraoctová kyselina
FKBP – FK506 vázající protein
FW primer – (z angl. forward primer) kódující/přední primer
Gln – glutamin
Glu – glutamová kyselina
Gly – glycin
HBV – virus hepatitidy B
HCV – virus hepatitidy C
His – histidin
HIV – virus imunosupresivní imunodeficiency
IgE – imunoglobulin E
IgG – imunoglobulin G
Ile – izoleucin
IPTG – isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

K_D – disocisční konstanta
Leu – leucin
MALDI – (z angl. matrix assisted laser desorption/ionization) ionizace laserem za přítomnosti matrice
TOF – (z angl. time of flight) detektor doby letu
Met – methionin
mRNA – mediátorová/informační RNA
NKTR – NK-tumor vázající protein
OD₆₀₀ – optická denzita měřená při 600 nm
PCR – polymerázová řetězová reakce
PDB – protein data bank
PEI – polyetylenimin
Phe – fenylalanin
PLL – poly-L-lysin
PPWD1 – peptidylprolilizomerázová doména obsahující opakující se protein WD 1
PVDF – polyvinyliden fluorid
RANBP2 – RAN vázající protein 2
RRM – RNA vázající motiv
RV primer – (z angl. reverse primer) antikódující/zadní primer
SDS – dodecylsírán sodný
SDS-PAGE elektroforéza – elektroforéza proteinů v polyakrylamidovém gelu, v přítomnosti dodecylsíranu sodného
snRNA – jednořetězcová ribonukleová kyselina
TEMED – tetrametyletylendiamin
Tris – tris(hydroxymetyl)aminometan
tRNA – transferová RNA
Trp – tryptofan
Tyr – tyrosin
Val – valin

Obsah

1	Teoretická část	11
1.1	Cyklofiliny	11
1.1.1	Expresce cyklofilinů	12
1.1.2	Základní struktura cyklofilinů	13
1.1.3	Struktura aktivního místa cyklofilinů	14
1.1.4	Role cyklofilinů ve sbalování proteinů	15
1.1.5	Vazba cyklosporinu A na různé druhy cyklofilinů	16
1.2	Cyklofilin A	17
1.2.1	Struktura cyklofilinu A	17
1.2.2	Funkce cyklofilinu A	18
1.2.3	Souvislost mezi cyklofilinem A a virovými infekcemi	18
1.3	Cyklofilin E.....	19
1.3.1	Struktura cyklofilinu E.....	19
1.3.2	Funkce cyklofilinu E.....	21
1.4	Příprava rekombinantních proteinů v <i>Escherichia coli</i>	21
1.4.1	Charakteristika <i>E.coli</i>	23
1.4.2	Získání genu kódujícího cílový protein	24
1.4.3	Vložení genové sekvence do vhodného vektoru.....	24
1.4.4	Transformace rekombinantní DNA do hostitelských buněk	25
1.4.5	Selekce buněk, které přijaly požadovaný vektor a namnožení buněk	27
1.4.6	Expresce proteinu	28
1.4.7	Izolace a purifikace proteinu.....	28
1.4.8	Ověření identity proteinu, stanovení koncentrace a čistoty	28
2	Experimentální část.....	29
2.1	Chemikálie a materiály	29
2.2	Buňky	30
2.3	Enzymy	30
2.4	Plazmidy.....	30
2.5	Protilátky	30
2.6	Komerčně vyráběné Kity	31
2.7	Přístrojové vybavení.....	31
2.8	Složení použitých roztoků a pufrů	32

2.9	Metodika	36
2.9.1	Klonování cDNA CypA a CypE do expresního plazmidu pET-28b(+) ...	36
2.9.2	Transformace pET-28b(+)_CypA do expresních <i>E.coli</i> BL-21 (DE3)	41
2.9.3	Indukce.....	42
2.9.4	Purifikace rekombinantního CypA	44
2.9.5	Stanovení čistoty rekombinantního CypA	46
2.9.6	Ověření identity proteinu	47
2.9.7	Měření aktivity cyklofilinu A pomocí metody refoldingu RNázyT1	47
2.9.8	Měření inhibice CypA pomocí cyklosporinu A (CsA).....	48
2.9.9	Měření vazby CsA a CypA pomocí izotermální kalorimetrie	48
3	Výsledky a diskuse	49
3.1.1	Klonování cDNA CypA a CypE do expresního plazmidu pET-28b(+) ...	49
3.1.2	Transformace pET-28b(+)_CypA do expresních <i>E.coli</i> BL-21 (DE3)	53
3.1.3	Indukce exprese CypA.....	54
3.1.4	Purifikace CypA	55
3.1.5	Stanovení koncentrace CypA.....	56
3.1.6	Ověření identity CypA.....	57
3.1.7	Měření aktivity CypA	58
4	Závěr	62

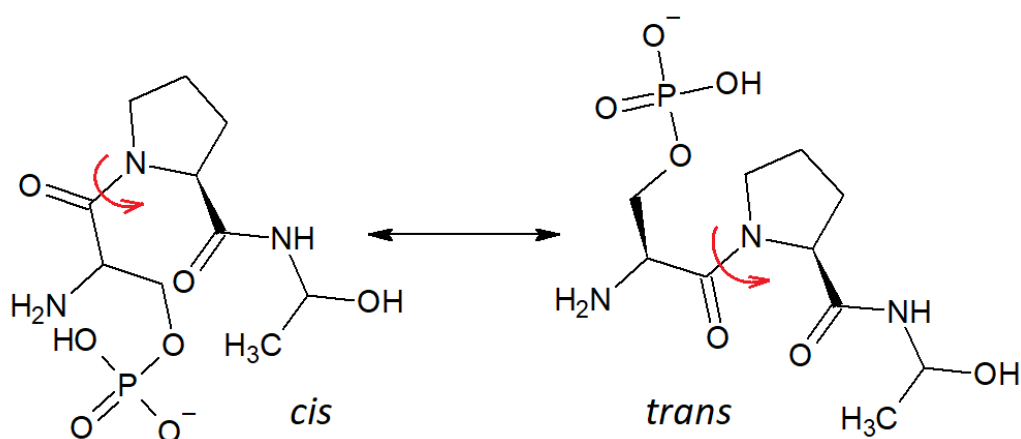
Úvod

Lidské cyklofiliny jsou důležité enzymy, zprostředkovávající peptidyl-prolyl cis-trans izomerázovou aktivitu, kterou se podílejí na správném sbalení proteinů po translaci. V lidském organismu se nachází celkem 17 izoforem cyklofilinů, které mají své specifické úlohy. Různé cyklofiliny se zapojují například do rozmanitých signálních drah, apoptózy buněk iniciovanou mitochondriemi, RNA sestřihu, nebo adaptivní imunity. Například cyklofilin A hraje důležitou roli při úspěšné replikaci virů imunopresivní imunodeficience (HIV), hepatitidy C (HCV), nebo hepatitidy B (HBV). Cyklofilin E se pro změnu zapojuje jako spliceofilin do spliceozomálních komplexů, kde přispívá k sestřihu pre-mRNA, regulaci sestřihového cyklu, sestřihu v apoptóze buněk a sestřihu při zánětu. Vyhledání finančně dostupného a časově nenáročného postupu přípravy plně funkčních lidských cyklofilinů by tak zajišťovalo možnost zkoumat tyto enzymy *in vitro*, což by mohlo dále přispět k výzkumu struktury a aktivity jednotlivých izoforem, nebo nalezení nových, silných a selektivních inhibitorů, fungujících jako léčiva výše zmiňovaných onemocnění. Z tohoto důvodu byl pro expresi cyklofilinů A a E vybrán expresní systém bakterie *Escherichia coli*, která je snadno kultivovatelná, cenově dostupná a její kultivace je časově nenáročná. Pro expresi byl vybrán expresní vektor pET-28b(+), transformovaný do expresního kmene *Escherichia coli* BL-21 (DE3).

1 Teoretická část

1.1 Cyklofiliny

Cyklofiliny jsou globulární proteiny s enzymatickou funkcí, přirozeně se vyskytující v široké škále organismů. Patří mezi izomerázy (EC 5) a katalyzují přeměnu mezi cis a trans konformací peptidové vazby, nacházející se mezi amino-koncovou částí prolinu a následující aminokyselinou (obrázek 1) [1]. V lidském organismu můžeme stejnou izomerázovou aktivitu pozorovat také u FK506 vázajících proteinů (FKBP) a parvulinů [2, 3]. Z širšího hlediska pak můžeme cyklofiliny zařadit mezi foldázy [1, 2], jelikož svojí cis/trans izomerázovou aktivitou pomáhají při správném sbalení proteinů po translaci [4]. Mimo izomerázové aktivity cyklofiliny zprostředkovávají v organismu také další důležité funkce. Zapojují se například do rozmanitých signalizačních drah, apoptózy buněk iniciovanou mitochondriemi, RNA sestřihu nebo adaptivní imunity. V literatuře můžeme cyklofiliny najít také pod názvy peptidyl-prolyl cis-trans izomerázy nebo PPIasy [1].



Obrázek 1: Znázornění cis a trans konformace peptidové vazby, která se nachází mezi amino-koncovou částí prolinu a následující aminokyselinou v polypeptidovém řetězci [3].

1.1.1 Exprese cyklofilinů

Cyklofiliny se vyskytují v celé řadě organismů, od nejjednodušších prokaryotních až po eukaryotní, včetně člověka [5, 3]. V rámci eukaryotních buněk či organismů jsou exprimovány ve všech buněčných organelách a v buněčné cytoplazmě [5]. Ve složitějších organismech se některé nachází také v mezibuněčném prostoru [3]. Mnoho cyklofilinů obsahuje kromě cyklofilinové domény také další motivy a domény. Příkladem může být cyklofilin E, který se skládá z izomerázové domény a RNA vázajícího motivu (RRM). S ohledem na druh organismu může být v genomu různých druhů živočichů kódováno více cyklofilinů, například v lidském genomu je cyklofilinů zakódováno sedmnáct. Přehled těchto sedmnácti lidských cyklofilinů, a jejich přirozený výskyt v rámci organismu, je uveden v tabulce 1 [5].

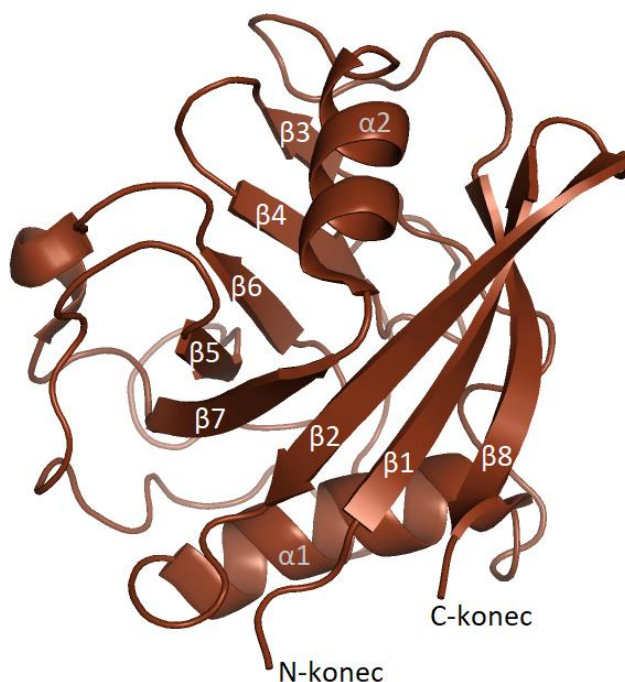
Tabulka 1: Přehled sedmnácti lidských cyklofilinů a jejich exprese v rámci eukaryotní buňky [5].

17 lidských cyklofilinů	Lokalizace
Peptidylprolyl izomeráza A (PPIA, CypA)	Cytoplazma / extracelulárně
Peptidylprolyl izomeráza B (PPIB, CypB)	Cytoplazma / extracelulárně
Peptidylprolyl izomeráza C (PPIC, CypC)	Cytoplazma / extracelulárně
Peptidylprolyl izomeráza D (PPID, CypD)	Cytoplazma
Peptidylprolyl izomeráza E (PPIE, CypE)	Jádro
Peptidylprolyl izomeráza F (PPIF, CypD)	Mitochondrie
Peptidylprolyl izomeráza G (PPIG, CypG)	Jádro
Peptidylprolyl izomeráza H (PPIH, CypH)	Jádro
Peptidylprolyl izomeráza-like 1 (PPIL1, Cyp11)	Jádro
Peptidylprolyl izomeráza-like 2 (PPIL2, Cyp12)	Jádro
Peptidylprolyl izomeráza-like 3 (PPIL3, Cyp13)	Jádro
Peptidylprolyl izomeráza-like 4 (PPIL4, Cyp14)	Cytoplazma
Peptidylprolyl izomeráza-like 6 (PPIL6, Cyp16)	Jádro
Peptidylprolylizomerázová doména obsahující opakující se protein WD 1 (PPWD1)	Jádro
RAN vázající protein 2 (RANBP2)	Cytoplazma
SDCCAG-10	Jádro
NK-tumor vázající protein (NKTR)	Jádro

1.1.2 Základní struktura cyklofilinů

Všechny cyklofiliny mají společnou izomerázovou doménu o velikosti 109 aminokyselin, která zprostředkovává katalýzu izomerace cis/trans konformace peptidové vazby mezi prolinem a následující aminokyselinou. U řady cyklofilinů je izomerázová doména obklopena dalšími doménami, které různým cyklofilinům přidělují další funkce [6].

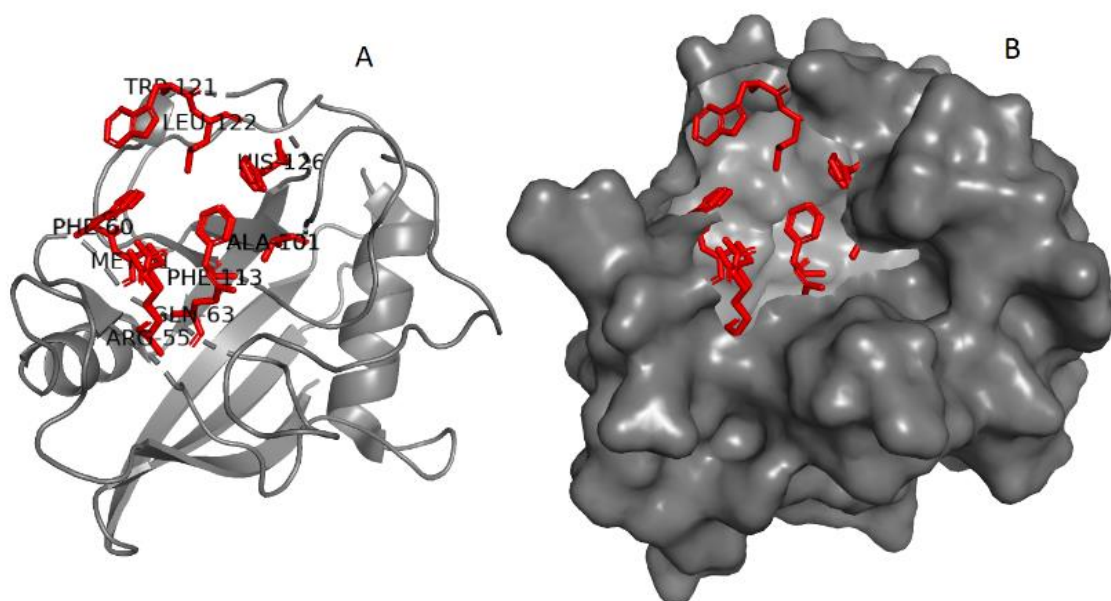
Samotná izomerázová doména je tvořena osmi antiparalelně uspořádanými lamelami β -listů, které jsou uspořádány do barelu ($\beta 1 - \beta 8$), dále z velkého počtu smyček a dvěma α -helixy ($\alpha 1, \alpha 2$), sbalenými proti β -listům. Kromě toho se v architektuře izomerázové domény nachází krátký α -helikální závit, označovaný jako 3/10 helix. Tento 3/10 helix se nachází v oblasti smyčky $\beta 6-\beta 7$ a obsahuje zbytek aminokyseliny 121, která je důležitou součástí aktivního místa (viz obrázek 2). Sekvenční analýza prokázala shodu mezi jednotlivými cyklofiliny od 61 % do 86 %, přičemž největší rozdíl ve struktuře mezi všemi cyklofiliny byl shledán u zástupců PPIL1 a PPWD1 [1]. Navzdory velké shodě v sekvenci aminokyselin i struktuře izomerázové domény napříč celou cyklofilinovou rodinou, mají různé cyklofiliny své unikátní a specifické funkce v buňce i v organismu.



Obrázek 2: Cyklofilin A, pomocí něhož je představena základní struktura izomerázové domény. Stejná struktura izomerázové domény, označena na obrázku pomocí popsaných sekundárních struktur (α, β), se nachází ve všech peptidyl-prolyl cis-trans izomerázách cyklofilinového typu [7].

1.1.3 Struktura aktivního místa cyklofilinů

Aktivní místo cyklofilinů je složeno ze dvou vzájemně přilehlých kapes, kterými jsou S1 kapsa a S2 kapsa [5]. V S2 kapse cyklofilinů, přesněji v „gatekeeper“ reziduích, se nachází největší pozorovaná diverzita napříč cyklofilinovou rodinou [1]. Tyto obě kapsy jsou tvořeny vysoce konzervovanou skupinou hydrofobních, aromatických a polárních reziduí, vytvářejících na povrchu enzymu hydrofobní prohloubeninu, do které se váže substrát. Navázaný substrát následně podléhá katalyzované reakci [5]. Katalytická funkce cyklofilinů je zprostředkována především Arg55, ale výjimku zde představuje PPIL4, který má v pozici 55 vázaný asparagin. Přehled reziduí tvořících aktivní místa všech lidských cyklofilinů znázorňuje tabulka 2. Strukturu aktivního místa cyklofilinů znázorňuje obrázek 3 na modelu cyklofilinu A [1].



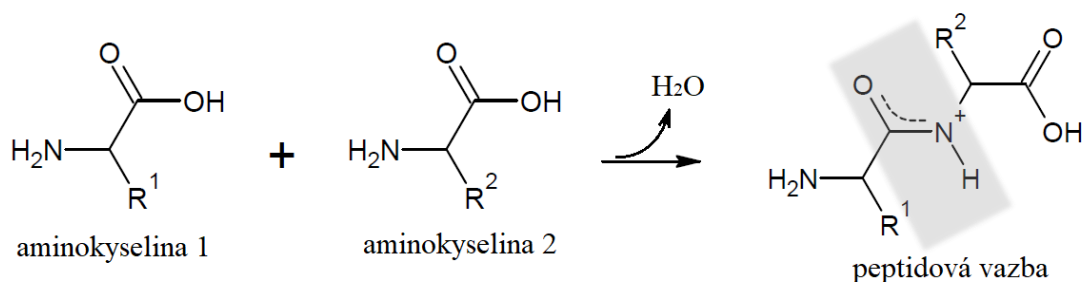
Obrázek 3: Znázornění aktivního místa cyklofilinů, spolu s aminokyselinovými zbytky vytvářejícími toto aktivní místo, na struktuře cyklofilinu A. (A) Zobrazení terciární struktury cyklofilinu A s červeně vyznačenými aminokyselinovými zbytky vytvářejícími aktivní místo. (B) Zobrazení povrchu cyklofilinu A, s červeně vyznačenými aminokyselinovými zbytky tvořícími aktivního místo [7].

Tabulka 2: Souhrn aminokyselinových zbytků nacházejících se v aktivních místech všech známých lidských cyklofilinů [1].

	55	60	61	63	101	113	121	122	126
PPIA (CypA)	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	Trp	Leu	His
PPIB (CypB)	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	Trp	Leu	His
PPIC (CypC)	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	Trp	Leu	His
PPID (CypD)	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	His	Leu	His
PPIE (CypE)	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	Trp	Leu	His
PPIF (CypD)	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	Trp	Leu	His
PPIG (CypG)	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	His	Leu	His
PPIH (CypH)	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	Trp	Leu	His
PPIL1 (CypI1)	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	Trp	Leu	His
PPIL2 (CypI2)	Arg	Phe	Val	Gln	Ala	Phe	Tyr	Leu	His
PPIL3 (CypI3)	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	His	Leu	Tyr
PPIL4 (CypI4)	Asn	Phe	Ile	Gln	Val	Leu	Tyr	Leu	His
PPIL6 (CypI6)	Arg	Gly	Met	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Phe
PPWD1	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	Trp	Leu	His
RANBP2	Arg	Phe	Val	Gln	Ala	Val	His	Leu	His
SDCCAG-10	Arg	Phe	Ile	Gln	Ala	Phe	Glu	Leu	His
NKTR	Arg	Phe	Met	Gln	Ala	Phe	His	Leu	His

1.1.4 Role cyklofilinů ve sbalování proteinů

Proteiny a polypeptidy jsou složeny z aminokyselin, navzájem poutaných peptidovými vazbami. Peptidové vazby vznikají vazbou C-koncové části jedné aminokyseliny s N-koncovou částí aminokyseliny druhé, viz obrázek 4. Kvůli vysoké mobilitě elektronů z atomů dusíku a kyslíku jsou peptidové vazby planární struktury s velkou bariérou rotace [8]. Svými vlastnostmi se podobají dvojně vazbě a při izomeraci musí být částečně rozrušeny [9]. Planarita navíc umožňuje peptidovým vazbám vytvářet cis a trans konformery, které se navzájem stáčí o úhel přesně 180° [1, 2]. V převážné většině peptidových vazeb tvořených 19 základními aminokyselinami (vyjma prolinu) převládá trans konformace, a to z důvodu konformačních energií. Pro vazbu prolinu s různými aminokyselinami se však přirozeně vyskytují případy jak cis, tak trans konformace peptidové vazby. Tato skutečnost je vysvětlena tím, že na dusík peptidové vazby jsou vázány z obou stran stejné substituenty uhlíku, tudíž energetické rozdíly obou konformerů jsou téměř energeticky vyrovnané (izoenergetické), přičemž trans forma je nepatrně energeticky výhodnější. Malé peptidy tak přirozeně vykazují směs cis a trans forem této vazby. Jelikož je konformace této vazby závislá také na polaritě prostředí, v nativních proteinech můžeme pozorovat buď zcela cis nebo zcela trans izomerii [10]. Přeměnu těchto vazeb do správných konformací pak katalyzují peptidyl-prolyl cis-trans izomerázy.



Obrázek 4: Vznik peptidové vazby mezi dvěma aminokyselinami. Vzniklá peptidová vazba je znázorněna v *trans* uspořádání, s vyznačenými delokalizovanými elektrony atomů dusíku a kyslíku peptidové vazby, které vytváří planární strukturu.

Izomerázová aktivita cyklofilinů tedy spočívá v katalýze jinak velmi pomalu probíhajícího rotačního pohybu kolem peptidové vazby, která se nachází v polypeptidovém řetězci mezi N-koncovou částí prolinu a následující aminokyselinou [8]. Jako všechny foldázy zajišťují i cyklofiliny, spolu s bílkovinnými chaperony, správnou strukturu proteinů po translaci, která je nezbytná pro jejich správné fungování. Při translaci mRNA na ribozomech totiž vznikají v nativních polypeptidových řetězcích *cis* nebo *trans* konformace peptidové vazby na N-koncové části prolinu náhodně [1, 2, 4]. Izomerázová přeměna peptidových vazeb v proteinech má navíc také vliv na rychlost skládání proteinu [10].

1.1.5 Vazba cyklosporinu A na různé druhy cyklofilinů

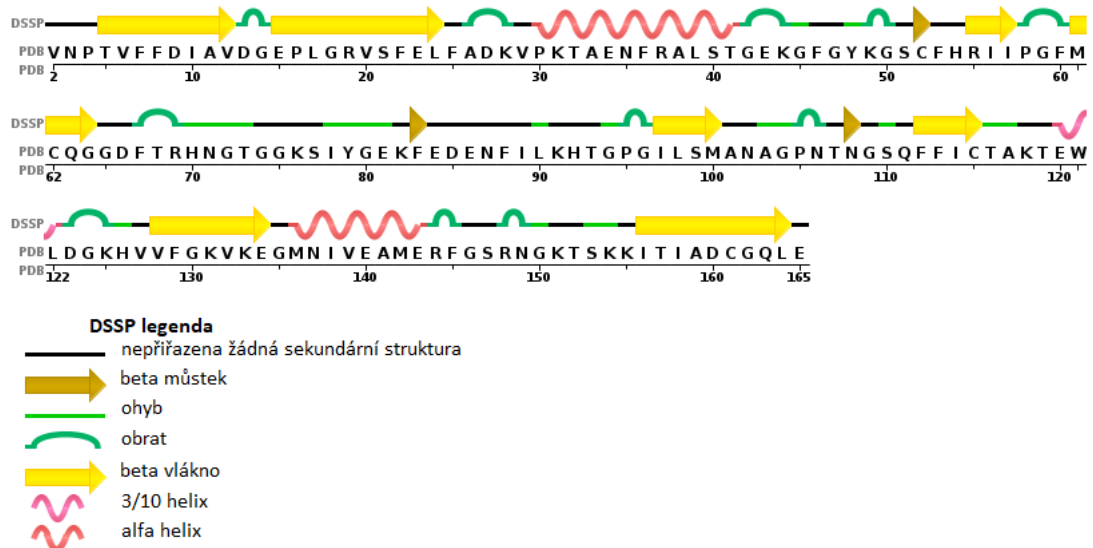
Imunosupresivní léčiva, jako je například cyklosporin A, se váží na cyklofiliny, a tím inhibují jejich funkci. S inhibiční funkcí cyklofilinů souvisí i snížení imunitní odpovědi, a proto se tato léčiva používají například při transplantacích, kdy je potřeba zajistit, aby daný organismus lépe přijal nový transplantovaný orgán [3, 1]. Vzhledem k sekvenční rozmanitosti napříč cyklofilinovou rodinou, zvláště v oblasti kapsy S2, rozlišujeme cyklofiliny schopné vázat cyklosporin A, tyto jsou typičtější a je jich většina, a cyklofiliny, které cyklosporin A nevážou. Vliv na vazbu cyklofilinu a cyklosporinu A se pak nejvíce projevuje v oblasti aminokyselinového zbytku 121. Cyklofiliny obsahující v pozici 121 tryptofan, nebo histidin, mají schopnost cyklosporin A vázat. Jsou to CypA, CypB, CypC, CypD (mitochondriální PPIF i cytoplazmatický PPID), CypE, CypG, CypH, Cypl1, NKTR a PPWD1. Výjimku zde představuje RANBP2, který obsahuje v pozici 121 histin, ale přesto schopnost vázat cyklosporin A nemá. Další cyklofiliny, které nemají schopnost vázat cyklosporin A jsou ty, které mají v pozici 121 tyrosin nebo glutamovou kyselinu. Patří mezi ně Cypl2, Cypl6 a SDCCAG-10 [1].

1.2 Cyklofilin A

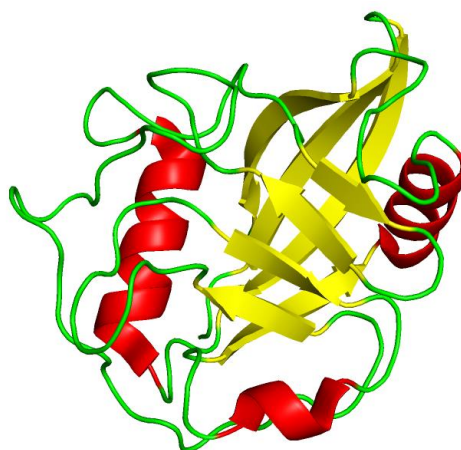
Lidský cyklofilin A, v literatuře také pod názvem peptidyl-prolyl cis-trans izomeráza A, cyklosporin A vázající protein, rotamáza A, EC 5.2.1.8, PPIáza A, či CypA, je enzym ze skupiny cyklofilinů, který je kódován genem *ppiA*. Jedná se o monodomenový protein, který se nachází v buněčné cytoplazmě, a je exprimován téměř ve všech lidských tkáních. Můžeme ho nalézt také extracelulárně a jedná se o nejhojněji zastoupený lidský cyklofilin [11]. Jeho funkce jsou kromě peptidyl-prolyl cis-trans izomerace také funkce, zahrnující imunitní odpovědi organismu na různé druhy infekčních nemocí [12, 13]. Původně byl cyklofilin A identifikován jako cíl imunosupresivního léčiva cyklosporinu A [11].

1.2.1 Struktura cyklofilinu A

Lidský cyklofilin A je globulární polypeptid, vyskytující se ve formě monomeru. Obsahuje celkem 164 reziduí. Obsahuje pouze izomerázovou doménu, která je složena ze dvou antiparalelně uspořádaných β -listů, dvou α -helixů, velkého počtu smyček a jednoho 3/10 helixu. Samotné β -listy se skládají z osmi vláken a cyklofilin A má z 32 % strukturu β -listu a ze 14 % helikální strukturu. Primární a sekundární strukturu CypA zobrazuje obrázek 5. Terciární strukturu CypA s barevně vyznačenými prvky sekundární struktury zobrazuje obrázek 6 [7]. Struktura CypA lze najít pod PDB: 5KUL, 3K0M, 3K0N, 4YUN, 4YUG, 4YUP, 6U5C, 6U5D, 5F66, 5KUN, 5KV6, 6KUU, 5KV7, 5KUV, 5KV4, 5KUS, 5KV5, 5KV2, 5KUQ, 5KV3, 5KUR, 5KVO, 5KUO, 5KV1, 5KUZ, 5KUW, 4YUO, 4YUK, 4YUL, 4YUM, 6U5E a 6U5G.



Obrázek 5: Sekvence aminokyselin v cyklofilinu A s vyznačenými prvky sekundární struktury [7].



Obrázek 6: Struktura lidského rekombinantního cyklofilinu A, získaná pomocí rentgenové difrakce. Barevně jsou vyznačeny sekundární strukturní prvky, žlutě β -listy a červeně α -helixy [7].

1.2.2 Funkce cyklofilinu A

Cyklofilin A má, stejně jako celá rodina cyklofilinů, intracelulární peptidyl-prolyl cis-trans izomerázovou aktivitu, která urychluje skládání funkčních struktur proteinů. Také hraje roli při regulaci transkripce a regulaci buněčného cyklu. Extracelulárně hraje cyklofilin A důležitou roli například při stresové odpovědi, přenosu signálu [14], nebo v imunitní odpovědi. Při imunitní odpovědi ovlivňuje hladinu pomocných T lymfocytů ($CD4^+$ T buněk) a protilátek imunoglobulinu G (IgG) a imunoglobulinu E (IgE) [12]. Mimo to indukuje chemotaxi leukocytů tím, že se váže na signální receptor basigin (BSG, CD147) na buněčném povrchu. Je dobré poznamenat, že pro různé funkce zprostředkované CypA, nemusí být nezbytně nutná jeho izomerázová aktivita. Například vazba CypA na basigin je nezávislá na jeho izomerázové aktivitě, ale je zprostředkovaná interakcí protein-protein, a je funkční i po inhibici izomerázové aktivity [15].

1.2.3 Souvislost mezi cyklofilinem A a virovými infekcemi

Expresce cyklofilinu A, přirozeně se nacházejícího v lidském organismu, může být ovlivněna virovými infekcemi, a zároveň, propuknutí virových infekcí je závislé na koncentraci CypA v organismu. Zvýšením či snížením exprese CypA se tak výrazně ovlivní konečný výsledek virové infekce. Ukázalo se, že CypA hraje významnou roli v úspěšné replikaci virů, mezi které patří například virus imunodeficientie (HIV), virus hepatitidy C (HCV), nebo virus hepatitidy B (HBV) [12]. Na druhou stranu CypA vykazuje represivní účinek na replikaci virů, jako je virus chřipky A a rotavirus [12]. Mimo to může být zapojen do rozvoje kardiovaskulárních chorob [16] a rakoviny [17]. Ovlivnění těchto a dalších onemocnění však nemusí být způsobeno izomerázovou aktivitou cyklofilinu A. Například schopnost potlačovat rané stádium replikace viru chřipky A je spojena s přímou interakcí CypA s virovým

matrixovým proteinem (M1), která je nezávislá na izomerázové aktivitě CypA, ale závislá na interakci protein-protein [15].

1.3 Cyklofilin E

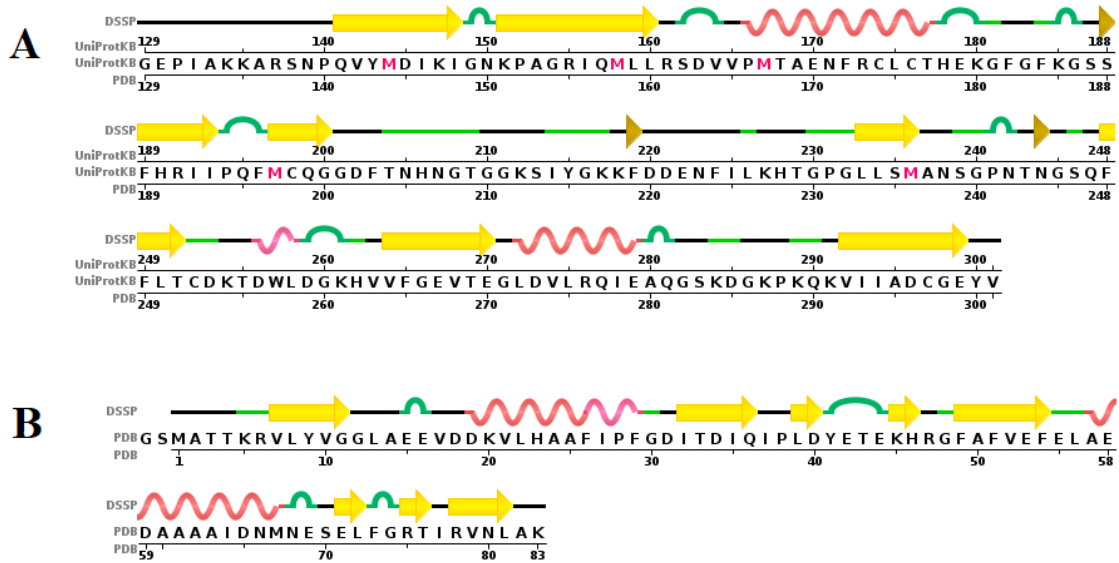
Lidský cyklofilin E, v literatuře také pod názvem peptidyl-prolyl cis-trans izomeráza E, rotamáza E, cyklofilin 33, EC 5.2.1.8, Cyp33, či CypE, je enzym ze skupiny cyklofilinů, který se nachází v buněčném jádře, a je kódován genem *ppiE*. Jedná se o multidoménový protein obsahující N-koncový RNA rozpoznávací motiv (RRM) a C-koncovou izomerázovou doménu. Jaderné cyklofiliny obecně jsou označovány jako spliceofiliny, a jsou zapojeny do spliceozomálních komplexů, které regulují modifikaci chromatinu, transkripci a sestřih pre-mRNA. Spliceozomální komplexy mohou obsahovat jeden, nebo i více jaderných spliceofilinů, které jsou považovány za doplněk k těmto spliceozomům a hrají svou roli v regulaci sestřihu pre-mRNA a v průběhu sestřihového cyklu [5].

1.3.1 Struktura cyklofilinu E

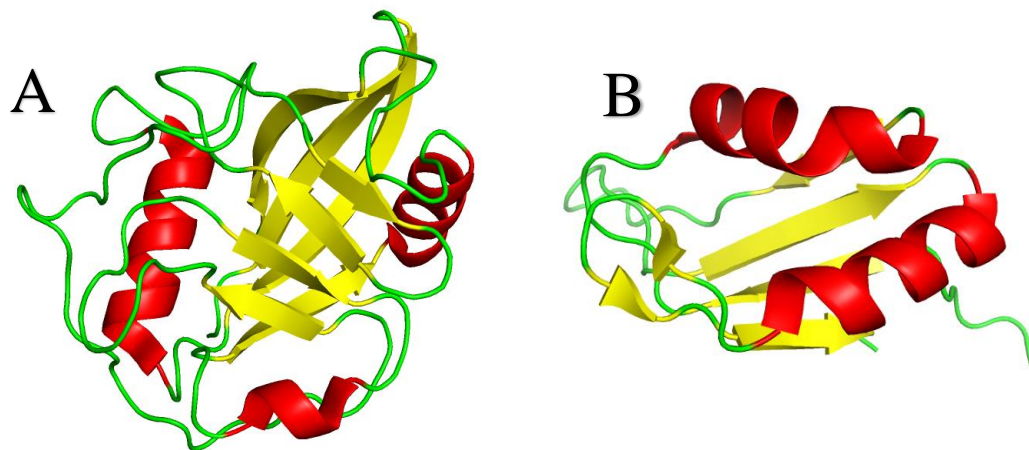
Cyklofilin E obsahuje N-terminální RNA rozpoznávací motiv (RRM) a C-terminální izomerázovou doménu [5].

Izomerázová doména cyklofilinu E je monomer, který obsahuje 174 reziduí. Její sekundární strukturou jsou dva β -listy, dva α -helixy a jeden 3/10 helix. Struktura izomerázové domény CypE má ze 13 % charakter helixu a z 30 % charakter β -listu. Primární struktura izomerázové domény CypE je znázorněna na obrázku 7 (A). Terciární struktura izomerázové domény s barevně vyznačenými prvky sekundární struktury je zobrazena na obrázku 8 (A). Struktury izomerázové domény lze najít pod PDB: 1ZMF, 2R99, 3UCH [18].

RRM doména CypE obsahuje dva α -helixy, jeden 3/10 helix a jeden β -list. Její struktura má z 25 % charakter helixu a z 32 % charakter β -listu. Primární strukturu s vyznačenými sekundárními prvky znázorňuje obrázek 7 (B). Terciární strukturu s barevně vyznačenými sekundárními prvky zobrazuje obrázek 8 (B). Struktury RRM motivu lze najít pod PDB: 2CQB, 3MDF, 3LPY, 2KYX [19].



Obrázek 7: A) Primární struktura izomerázové domény PPIE se znázorněnými sekundárními prvky [18], B) Primární struktura RMM domény PPIE s vyznačenými sekundárními prvky [19].



Obrázek 8: Terciární struktura cyklofilinu E. A) izomerázová doména cyklofilinu E, B) RRM doména cyklofilinu E.

U cyklofilinu E byly popsány dvě formy, o velikostech 30 kDa a 33 kDa, vznikající pravděpodobně posttranslační modifikací. Pouze forma o velikosti 33 kDa, produkovaná v lyzátech retikulocytů, byla schopna se vázat na RNA. Je tedy možné, že fosforylace a defosforylace hraje důležitou roli v regulaci jejich aktivity [20].

1.3.2 Funkce cyklofilinu E

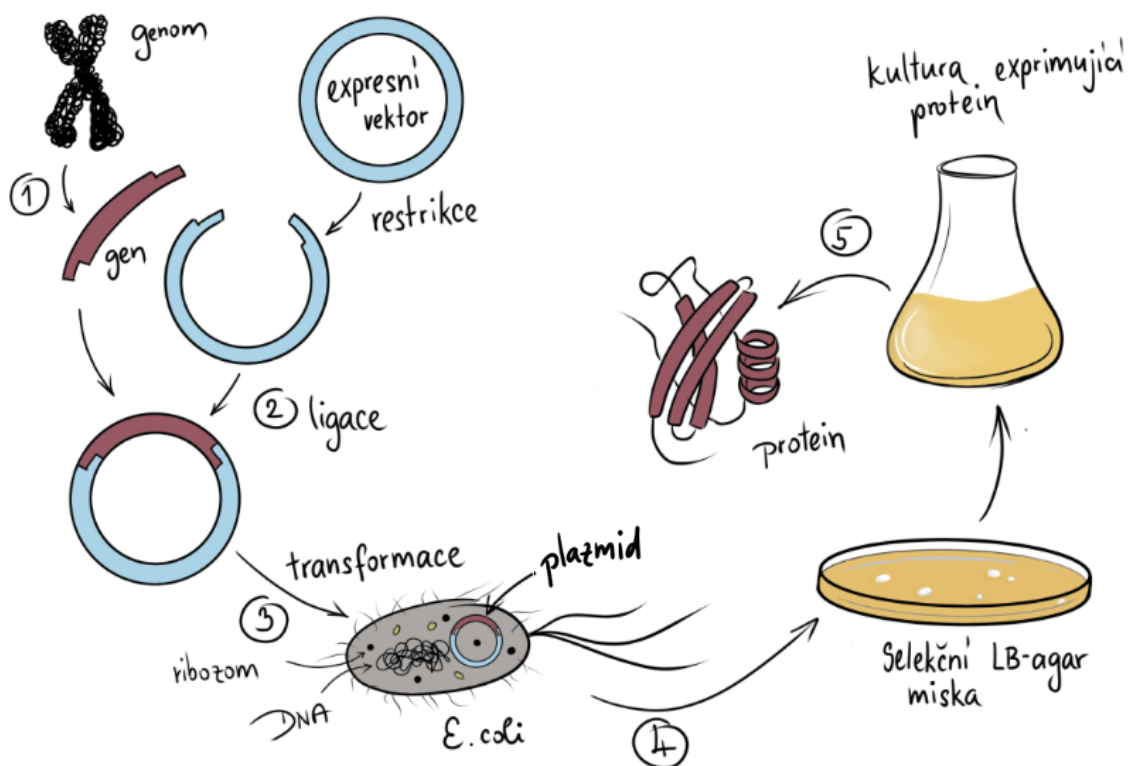
Cyklofilin E, jeho RRM i izomerázová doména, se účastní jako spliceofilin sestřihu pre-mRNA, při kterém se z jednovláknové mRNA odstraňují introny a exony se navzájem spojují. Toto zpracování mRNA probíhá pomocí makromolekulárního spliceozomálního komplexu, který se skládá z pěti malých jaderných RNA (snRNA), interagujících s proteiny za vzniku snRNP subkomplexů, a tyto snRNP subkomplexy se spojují za vzniku spliceozomu. Spliceozomy eukaryot mohou obsahovat stovky dalších proteinových faktorů, které se nazývají „příslušenství“ ke spliceozomu, a mezi které se řadí také spliceofiliny, například cyklofilin E. Spliceofiliny mají svou roli v regulaci sestřihu a v průběhu sestřihového cyklu. Schopnost formovat sestřih mají v cyklofilinu E interakce v místech mimo aktivní místo a mimo izomerázovou doménu, kde se vyskytuje velký stupeň diverzity. Spliceofiliny se aktivně účastní také regulace sestřihu v apoptóze a zánětu. Odstranění jednotlivých spliceofilinů z buněk má tak za následek velké změny v tisících sestřihových událostí [5].

1.4 Příprava rekombinantních proteinů v *Escherichia coli*

Příprava rekombinantních proteinů je alternativou k izolaci proteinů z přirozených zdrojů, která probíhá obvykle složitými mnohakrovými purifikačními postupy. Jako přirozený zdroj se označují živočišné tkáně, rostlinná pletiva nebo mikroorganismy, ve kterých je daný protein přirozeně exprimován. Místo přirozených zdrojů se používají pro expresi proteinů hostitelské organismy, které jsou snadněji kultivovatelné a výsledný protein je z nich snadno izolovatelný ve vysoké čistotě. Příkladem takového organismu je bakterie *Escherichia coli* (*E.coli*).

Jako rekombinantní proteiny obecně označujeme takové proteiny, které se připravují pomocí genetické modifikace. Přesněji se připraví rekombinantní DNA, pomocí umělého spojení několika genů, a to tak, aby se vzniklá genetická informace byla schopná v hostitelském organismu replikovat. Zpravidla se spojuje genom hostitelského organismu a gen kódující požadovaný protein. Vytvořená rekombinantní DNA se vkládá do hostitelských organismů, které zajišťují její transkripci a translaci. Výsledkem je exprese požadovaného proteinu pomocí hostitelského organismu. Příprava rekombinantních proteinů do značné míry usnadňuje dostupnost proteinů pro vědecké a lékařské účely. Přináší s sebou celou řadu výhod, jako je větší výtěžnost proteinů, jednodušší postupy při izolaci proteinů, menší časovou a finanční náročnost, větší čistotu proteinů, nižší množství vstupní suroviny a vylučuje infekční rizika [21].

Pro přípravu rekombinantních proteinů pomocí hostitelského proteosyntetického aparátu existuje několik základních a neměnných postupů. 1) Získání genu kódujícího požadovaný protein. 2) Vložení genu do DNA, která zároveň obsahuje další nezbytné sekvence, nutné pro přijetí této rekombinantní DNA hostitelskou buňkou a expresi proteinu. Taková DNA, do které se vkládá sekvence cílového proteinu, se nazývá expresní vektor. 3) Vložení upraveného vektoru do buněk. Pokud budeme hovořit o vkládání vektoru do prokaryotních buněk, jedná se o transformaci, pokud hovoříme o vkládání genu do eukaryotních buněk, hovoříme o transfekci. 4) Určení a oddělení buněk, které vektor přijaly. Tyto buňky/organismy se namnoží a pěstují za vhodných podmínek, aby byly schopné daný protein exprimovat. 5) Izolace a purifikaci exprimovaného proteinu od nežádoucích látek [21, 22]. Celý proces přípravy rekombinantního proteinu znázorňuje obrázek 9.



Obrázek 9: Schéma přípravy rekombinantního proteinu. 1: získání genu kódujícího požadovaný protein, 2: ligace genu do expresního vektoru, 3: transformace expresního vektoru, obsahujícího gen požadovaného proteinu, do vhodného hostitelského expresního systému, 4: selekce buněk, které plazmid přijaly, a tvorba kultury, která daný protein exprimuje, 5: izolace a purifikace požadovaného proteinu.

Produkcí rekombinantního proteinu lze optimalizovat na několika úrovních, kterými jsou výběr expresního systému, způsob kultivace, použité purifikační značky a výběr purifikačních metod [21].

1.4.1 Charakteristika *E.coli*

Escherichia coli je bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* a rodu *Escherichia*. Jedná se o gramnegativní, aerobní tyčinku, pohybující se pomocí bičků. Přirozeně se vyskytuje jako nepatogenní fakultativní bakterie ve střevní mikroflóře savců. Některé kmeny *E.coli* však způsobují onemocnění týkající se gastrointestinálního, močového nebo centrálního nervového systému. Nejčastěji tyto patogenní kmeny způsobují průjemová onemocnění, která se projevují jako cestovatelský průjem, hemoragická kolitida, hemolyticko-uremický syndrom, přetrvávající průjem nebo vodnatý průjem [23, 24].

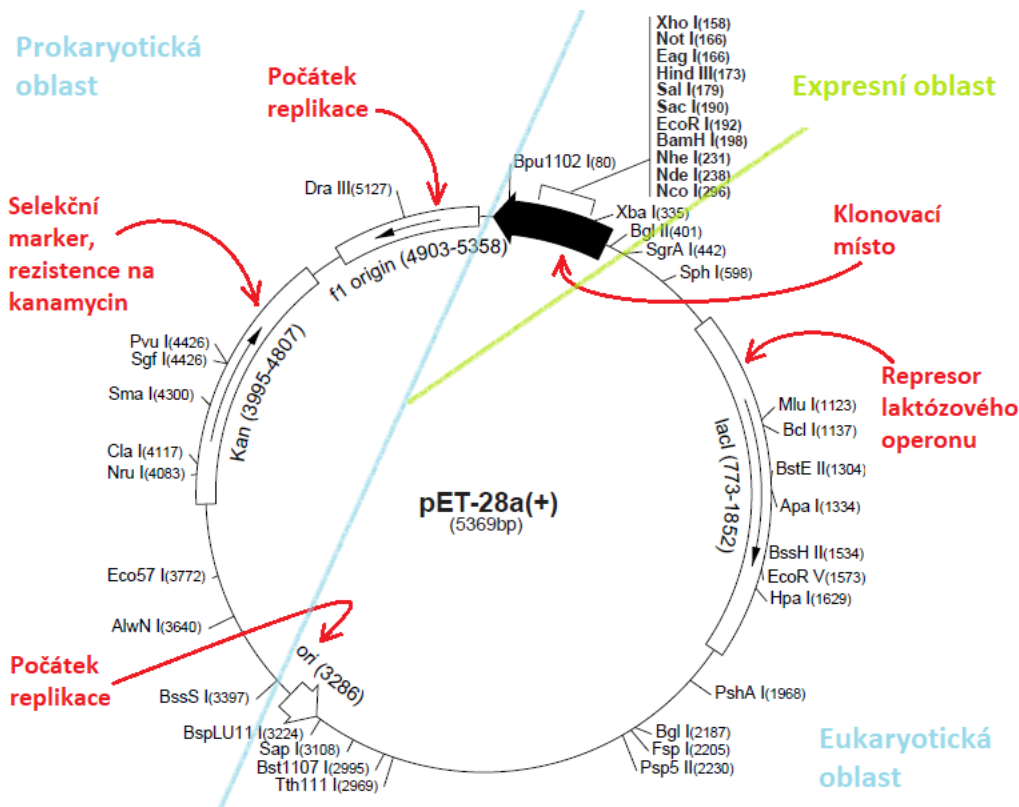
Escherichia coli však dosáhla velkého uplatnění v molekulární biologii, kde slouží jako expresní systém pro získávání rekombinantních proteinů. Dokonce patří mezi nejvíce používanou bakterii pro tento účel. Důvodem je rychlý růst bakterie a rychlá doba zdvojení, která se pohybuje kolem 30 minut. Dále zde hraje roli nízká cena růstového média a vysoká hladina exprese proteinů. K dalším pozitivům patří snadná kultivace a snadná kontrola genové exprese, která může být řízena několika promotory. *E.coli* je nejlépe charakterizovaný hostitel a byl pro ni navrhnut velký rozsah klonovacích expresních vektorů [25, 26]. *E.coli* má však v produkci rekombinantních proteinů také své nevýhody. Některé lze obejít, u jiných je taková možnost složitá. Mezi menší nevýhody zapadá přirozená sekrece proteinů do periplazmy, což neumožňuje získávat proteiny bez porušení vnější membrány. Tuto nevýhodu lze obejít pomocí modifikace *E.coli*, kdy sekrece proteinů může probíhat do média [26]. Další menší nevýhodou je, že bakteriální expresní systém obsahuje nedostatek tRNA pro některé kodony převažující u eukaryotické mRNA. Tento nedostatek lze obejít vytvořením expresních kmenů bakterií, které nesou plazmidy, kódující tyto vzácné tRNA. Mezi komplikující nedostatek spadá neschopnost správného posttranslačního skládání větších složitějších eukaryotních proteinů, kvůli nepřítomnosti aparátu molekulárních chaperonů. Chaperony napomáhají eukaryotickým proteinům při správném složení a tím zajišťují jejich správnou biologickou aktivitu. Z *E.coli* se však proteiny získávají v nativní formě, a velké multi-doménové eukaryotické proteiny jsou pak náchylné k denaturaci, čímž vytváří nerozpustná inkluzní tělíska [25]. Většinou se tento problém objevuje při nadměrné expresi proteinů, a proteiny většinou lze zachránit pomocí solubilizace, úplné denaturace a následné renaturace. Tyto procesy jsou však složité, nákladné a mají malé výtěžky. Nejlepším řešením je tak použití eukaryotických expresních systémů [25, 26]. Další nevýhodou exprese eukaryotních rekombinantních proteinů v *E.coli* je neschopnost posttranslační modifikace, kvůli absenci mechanismů, kterými se posttranslačně modifikují běžné eukaryotické proteiny. Tyto modifikace zahrnují N-glykosylaci, O-glykosylaci, fosforylaci, acetylaci, acylaci a gama-karboxylaci. Dalšími nevýhodami je obsah endotoxinů v buněčné stěně *E.coli* [25] a to, že je velmi obtížné bez testování vybrat správný hostitelský vektorový systém, signální sekvenci pro sekreci a další podmínky pro přípravu požadovaného proteinu [26].

1.4.2 Získání genu kódujícího cílový protein

První nezbytnou součástí přípravy rekombinantních proteinů, je získání genu, kódujícího požadovaný protein. U proteinů pocházejících z prokaryotních organismů se může vycházet z celého úseku DNA, a následně několikanásobně zvýšit jeho počet pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). U proteinů pocházejících z eukaryotních organismů nelze použít tuto metodu, jelikož eukaryotní geny obsahují navíc nekódující sekvence (introny) a nepřepisované 3' a 5' sekvence. U těchto proteinů se tedy vyplatí dvě možnosti. První možností je izolovat mRNA, která již neobsahuje introny, ale jen funkční sekvence. Tato mRNA se zpětně přepíše do komplementární DNA (cDNA), pomocí reverzní transkriptázy. Reverzní transkripce se dá s výhodou provést pomocí komerčních kitů. Druhou možností je získání genu syntetickou cestou [21].

1.4.3 Vložení genové sekvence do vhodného vektoru

Gen kódující požadovaný protein se vkládá do vhodného expresního vektoru, zvoleného podle expresního systému, který bude následně použit [21]. Vektory mohou být v podobě plazmidů (neživé vektory), nebo virů (živé vektory) [27]. Nejčastěji se používají plazmidy, což jsou extrachromozomální kruhové DNA molekuly, schopné vlastní replikace v hostitelské buňce. Vyskytují se přirozeně u většiny bakterií a kódují geny, pomáhající bakteriím přežít v nepříznivém prostředí. Tím ovlivňují také jejich metabolickou aktivitu. Pro vytvoření expresních vektorů jsou z plazmidů odstraněny nepotřebné sekvence a zachovány jen ty nezbytně nutné. Mezi důležité sekvence patří prokaryotická oblast, kde se nachází počátek replikace (ori) a selekční marker, a eukaryotická oblast, kde se nachází vlastní počátek replikace (ori) s expresní oblastí, obsahující klonovací místo (MCS) a sekvenci regulující transkripci [28, 27]. V expresním místě je často obsažena také sekvence kódující afinitní značky, s nimiž může být rekombinantní protein následně exprimován [29]. *E.coli*, jako příklad bakteriálního expresního systému, může využívat několik komerčně dostupných expresních vektorů, nejčastěji ve formě dvouřetězcových kruhových DNA plazmidů. Plazmidy se v *E.coli* replikují dle potřeby a jsou v bakteriích přítomny ve větším počtu. Druhou možností je začlenění genu pro požadovaný protein přímo do chromozomu *E.coli* pomocí prostředníků, například pomocí bakteriofágů [30]. Příkladem expresního vektoru je plazmid pET-28a(+), znázorněný na obrázku 10. Tento expresní vektor se od námi použitého vektoru pET-28b(+) liší pouze velikostí o přebývající 1 bp, následující za BamHI. Velikost pET-28b(+) je tedy 5 368 bp.



Obrázek 10: Příklad expresního vektoru pET-28a(+), s vyznačenými důležitými oblastmi.

1.4.4 Transformace rekombinantní DNA do hostitelských buněk

Expresní vektor, obsahující požadovaný gen, se vkládá do hostitelských buněk, sloužících k expresi daného rekombinantního proteinu. Expres proteinů může být přechodná, nebo konstantní. Přechodná exprese proteinu je řízena přechodnou genetickou modifikací organismu, zatím co kontinuální exprese proteinu využívá tvorbu stabilních linií, které nesou gen pro daný protein na plazmidu nebo integrovaný do genomu. Vnášení expresního vektoru do prokaryotické buňky se nazývá transformace, a je podmíněna dostatečnou permeabilitou buněčné cytoplazmatické membrány, přes kterou se vektor musí dostat [21]. Transformační metody jsou obecně založeny na biologických, chemických a fyzikálních metodách. Přehled těchto metod znázorňuje tabulka 3, tabulka 4 a tabulka 5 [27].

První metodou je virový přenos, založený na přirozeném přenosu virové DNA do hostitelských buněk během infekce. Z genetického materiálu virů se odstraní patogenní geny a vloží se do nich gen cílového proteinu. Virový přenos má vysokou účinnost a vysokou klonovací kapacitu (množství nukleotidů, které může daný vektor přenést) [27]. Přehled virů zprostředkovávajících přenos DNA zobrazuje tabulka 3.

Tabulka 3: Biologická transformační metoda použitelná pro prokaryotické buňky, shrnutí jejich výhod a nevýhod [27].

Biologické transfekční metody	Popis transfekční metody, výhod a nevýhod
Bakteriofág λ	Obsahuje dvouřetězcovou DNA. Jeho klonovací kapacita je dvojnásobná oproti plazmidovým vektorům.

Druhou metodou je chemický přenos, založený na neutralizaci náboje membrány, nebo změně náboje na kladný. Membrány jsou záporně nabitě a DNA není schopna samovolně přecházet přes lipofilní membránu, která zároveň nese záporný náboj. Po změně náboje je schopen komplex DNA-transfekční roztok přejít do buňky. Tyto metody jsou méně efektivní než virové přenosy, ale nedochází při nich k imunologické odpovědi [27]. Chemokompetentním buňkám se k přijetí DNA může napomocť teplotním šokem [21]. Přehled chemických metod je znázorněn v tabulce 4.

Tabulka 4: Přehled chemických transformačních metod použitelných pro prokaryotní buňky, shrnutí jejich výhod a nevýhod [27].

Chemické transfekční metody	Popis transfekční metody, výhod a nevýhod
Anorganické sloučeniny	Nejvýznamnějším transfekčním činidlem je fosforečnan vápenatý. DNA do buňky přechází pomocí fagocytózy, do jádra pomocí lysozomů. Jedná se o levnou metodu. Využitelná pro stabilní i přechodnou expresi. Metoda je časově náročná.
Kationické polymery	Syntetické látky jako poly-L-lysin (PLL), dietylaminoetyl-dextran (DEAE-dextran) nebo polyetylenimin (PEI) tvoří s DNA komplexy nesoucí náboj, nazývaný polypex. Polypexy mají schopnost adherovat k buněčnému povrchu a přecházet pomocí endocytózy do buněčné cytoplazmy. Do buněčného jádra přechází čistá DNA cytoplazmatickým transportem.
Kationické lipidy	Syntetické sloučeniny mající amfifilní charakter, díky kterému tvoří liposomy. Liposomy s DNA vytváří kladně nabitý komplex, takzvaný lipoplex, který přechází do buňky endocytózou. Používají se pro stabilní expresi. Metoda je velmi efektivní, ale také má vyšší cenu.

Třetí metodou je fyzikální přenos, kdy se do buňky přenáší nejčastěji samotná DNA. Fyzikální procesy bývají jednoduché, s poměrně vysokou úspěšností. Pro provedení je však nezbytná správná optimalizace, aby nedocházelo k poškození nebo k usmrcení buněk [27]. Fyzikální metody přenosu jsou vypsány v tabulce 5.

Tabulka 5: Přehled fyzikálních transformačních metod použitelných pro prokaryotní buňky, shrnutí jejich výhod a nevýhod [27].

Fyzikální transfekční metody	Popis transfekční metody, výhod a nevýhod
Elektroporace	Využívá elektrického impulzu s vysokým napětím, kterým se reorganizuje lipidová dvojvrstva a vytvoří se reverzibilní póry. Těmito póry mohou procházet malé molekuly do buňky. Metoda je využitelná pro všechny typy buněk. Zajišťuje přechodnou i stabilní transfekci.
Mikroinjekce	Pomocí kapiláry se DNA vloží přímo do cytoplazmy cílové buňky. Metoda zahrnuje menší pravděpodobnost mutací. Není vhodná pro transfekci ve větším měřítku. Používá se například pro vnesení DNA do embryonálních buněk.
Gene gun	Metoda využívá mikroskopických částic wolframu nebo zlata, obalených DNA. Částice jsou do buňky „nastřelovány“ pomocí velkého zrychlení. Účinnost transfekce je shodná s účinností elektroporace. Vyskytuje se zde možnost poškození hostitelského organismu. Je to poměrně drahá metoda.
Magnetická částice (MATra)	Metoda využívá magnetické nanočástice, na kterých je zachycena DNA. Ty jsou pomocí silně magnetického pole přenášeny do buněk.
Ultrazvuk	Mechanismus není znám

1.4.5 Selektce buněk, které přijaly požadovaný vektor a namnožení buněk

Selekcí získáme buňky, které přijaly gen požadovaného proteinu a jsou schopny jej exprimovat. Selektce se provádí pouze u stabilních linií a je založena na selekčních markerech, přítomných v expresním vektoru, který rovněž obsahuje gen pro požadovaný protein. Selekcční markery kódují nejčastěji rezistenci na určitý typ antibiotik v podobě enzymů, které danému organismu přirozeně chybí a expresí těchto enzymů si organismus zajistí přežití v kultivačních podmínkách [21]. Příkladem takového enzymu je β -laktamáza, způsobující rezistenci na β -laktamová antibiotika (penicilin, ampicilin, tetracyklin, blastidicin a další) [31].

1.4.6 Exprese proteinu

Buňky se nasadí do živného média, kde probíhá jejich množení a exprese cílového proteinu. Jelikož není exprese samotného cílového proteinu pro buňky výhodná a buňky nemají potřebu jej exprimovat, je do expresní oblasti plazmidu přidán gen kódující enzym, který zajišťuje přežití buněk v určitém prostředí. Aby buňky přežily, musí daný enzym exprimovat a s ním je zároveň exprimován i požadovaný protein. Tímto způsobem lze zařídit kontinuální nebo jen indukovanou expresi, kdy se využívá změny složení média. Příkladem může být laktózový operon, který je aktivní pouze za přítomnosti laktózy a nepřítomnosti glukózy [21].

1.4.7 Izolace a purifikace proteinu

Po expresi se požadovaný protein izoluje a purifikuje. Výhodou je sekreční varianta exprese, kdy je cílový protein přítomný v médiu. V druhém případě protein zůstává v cytoplasmě buněk, ze kterých se izoluje pomocí lyze buněk. Lyze znamená rozrušení buněčné stěny a buněčné membrány, při kterém se obsah buňky uvolní do média. Lyze buněk lze provést enzymaticky, například lysozymem, nebo fyzikálně, například sonikací, opakovaným mražením, nebo mletím. Většinou se používá kombinace výše uvedených metod [21].

K získání čistého proteinu, zbaveného ostatních složek, se používá purifikace [21]. K purifikaci rekombinantních proteinů je možné využít afinitních značek, které se mohou umístit jak na C-konec, tak na N-konec proteinu. Afinitní značky zároveň pomáhají proteinům dosáhnout maximální rozpustnosti. Příkladem takových značek je protein A, lac Z, polyhistidin (his-tag), glutathion s-transferáza nebo maltózu vázající protein [31], a dá se díky nim využít metoda afinitní chromatografie. K purifikaci proteinů však není zapotřebí použití afinitní značky. Takové proteiny se purifikují pomocí jiných chromatografických metod, jako je gelová permeační chromatografie, iontoměničová chromatografie nebo hydrofobní chromatografie. V neposlední řadě se dá použít také metoda selektivní precipitace síranem amonným [21].

1.4.8 Ověření identity proteinu, stanovení koncentrace a čistoty

Pro ověření míry úspěšnosti zvoleného postupu je třeba stanovit identitu proteinu, jeho koncentraci a čistotu. Identita proteinu se může ověřit pomocí metod imunologických (western-blot), nebo pomocí hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF). Koncentrace proteinu se nejčastěji stanovuje pomocí spektrálních technik, jako je metoda dle Bradfordové, nebo metoda využívající sodné soli kyseliny bicinchoninové (BCA). Čistota proteinu se stanovuje pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu, v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS-PAGE elektroforézy) s následným denzitometrickým vyhodnocením. Pro ověření správného zabalení proteinu po translaci se stanovuje jeho funkčnost. U enzymově aktivních proteinů se stanovuje aktivita vzhledem k substrátům a u antigenních proteinů se stanovuje imunogenita a schopnost navození specifických imunitních mechanismů [21].

2 Experimentální část

2.1 Chemikálie a materiály

CHEMIKÁLIE	DODAVATEL
Agar-Agar, BioScience, granulated	Carl Roth Gmbh & Co. Kg
Agarosa SERVA for DNA Electrophoresis	SERVA Electrophoresis GmbH
Akrylamid (AA)	Sigma-Aldrich s.r.o.
Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories
BlueJuice Gel Loading Buffer (10x)	Invitrogen
Bromfenolová modř (BFB)	Sigma-Aldrich s.r.o.
BugBuster Protein Extraction Reagent	MilliporeSigma
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma-Aldrich s.r.o.
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma-Aldrich s.r.o.
CutSmart pufr	New England Biolabs
Cyklosporin A	Sigma-Aldrich s.r.o.
Dodecylsírán sodný (SDS)	Sigma-Aldrich s.r.o.
Glycerol	Sigma-Aldrich s.r.o.
Hovězí sérový albumin (BSA)	Sigma-Aldrich s.r.o.
Imidazol	Sigma-Aldrich s.r.o.
Inhibitory proteáz (bez EDTA)	Hoffmann-La Roche
Isopropanol	SERVA Electrophoresis GmbH
Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (ITPG)	SERVA Electrophoresis GmbH
Kanamycin	SERVA Electrophoresis GmbH
Karbenicilin	SERVA Electrophoresis GmbH
Kyselina fosforečná (85 %)	Penta PENTA s.r.o.
LB Broth (Luria/Miller)	Carl Roth Gmbh & Co. Kg
Marker molekulových hmotností DNA O'GeneRuler 1 kb DNA	Thermo Fisher Scientific
Marker molekulových hmotností Precision Plus Protein Kaleidoscope	Bio-Rad Laboratories
Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich s.r.o.
Metanol	Sigma-Aldrich s.r.o.
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	PENTA s.r.o.
NaCl	Penta PENTA s.r.o.
Ni-NTA agarose	Qiagen
Persírán amonný (APS)	Sigma-Aldrich s.r.o.
Polyvinyliden fluoridová (PVDF) membrána (0,2 μm)	MilliporeSigma
PPP Master Mix	Top-Bio
Seakem GTG Agarosa	Lonza
Sírán amonný	Sigma-Aldrich s.r.o.
SOC médium	New England Biolabs

SYBR save DNA Gel Stain (10 000x konc.)	Invitrogen
TAE pufr (50x konc.)	SERVA Electrophoresis GmbH
Tetracyklin	SERVA Electrophoresis GmbH
Tetrametyletylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich s.r.o.
Tris	Penta PENTA s.r.o.
Tris(hydroxymetyl)aminometan (Tris)	Lach:ner, s.r.o.
TWEEN 20	Sigma-Aldrich s.r.o.

2.2 Buňky

BUNĚKY	DODAVATEL
<i>E.coli</i> BL-21 (DE3)	New England Biolabs
<i>E.coli</i> XL-1	Agilent Technologies
NEB Turbo Competent <i>E.coli</i>	New England Biolabs

2.3 Enzymy

ENZYMY	DODAVATEL
Anza T4 DNA Ligase Master Mix	Invitrogen
Benzonáza	Sigma-Aldrich s.r.o.
Lysozym	Sigma-Aldrich s.r.o.
Restrikční endonukleáza NdeI	New England Biolabs
Restrikční endonukleáza XhoI	New England Biolabs
RNáza T1	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA ligáza	New England Biolabs

2.4 Plazmidy

PLAZMIDY	DODAVATEL
pCR4-TOPO	Invitrogen
pET-28b(+)	Merck kGaA
pUC19	Invitrogen

2.5 Protilátky

RPOTILÁTKY		DODAVATEL
CyPA Antibody (6-YD13)	sc-134310	Santa Cruz Biotechnology
His-probe Antibody (H-3) HRP	sc-8036 HRP	Santa Cruz Biotechnology
m-IgGκ BP-HRP	sc-516102	Santa Cruz Biotechnology

2.6 Komerčně vyráběné Kity

Monarch Plasmid DNA Miniprep Kit (NEB#T1010) (New England Biolabs)
QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)
Kit pro stanovení bílkoviny pomocí metody BCA (Sigma-Aldrich s.r.o.)
Quick CIP (New England Biolabs)

2.7 Přístrojové vybavení

Laminární box SCS-13 (Faster)
Inkubovaná třepačka Innova 42 (New Brunswick Scientific)
Centrifuga Eppendorf 5804R (Eppendorf)
Stolní centrifuga Minispin plus (Eppendorf)
Termoblok Thermoshaker (Grant-Bio)
Spektrofotometr Tecan Spark (Tecan)
UV transluminátor s kamerou (Uvitec Cambridge)
Elektroforetické zařízení pro agarózovou elektroforézu (Fisher Scientific)
Elektroforetické zařízení pro PAGE elektroforézu (Bio-Rad Laboratories)
PCR cyklér Master cycler X50s (Eppendorf)
Laboratorní sonikátor UP100H (Hielscher Ultrasonics)
Kývačka BenchRocker (Benchmark s.r.o.)
Rotátor Rotobot (Benchmark s.r.o.)
Zařízení pro western blotting Trans-Blot turbo (Bio-Rad Laboratories)
Inkubátor UniIncu 20 (LLG Labware)
Detekční systém Biosystems c400 (Azure Biosystems)
Spektrofluorimetr LS-55 (PerkinElmer (UK))
PTP – 1 Fluorescence Peltier Systém (PerkinElmer (UK))
Izotermální titrační kalorimetr MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Instruments)

2.8 Složení použitých roztoků a pufrů

Lyzační pufr

- 50 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O
- 150 mM NaCl
- 10 mM imidazol
- pH 8 (úprava NaOH)

Promývací pufr 1

- 50 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O
- 150 mM NaCl
- 20 mM imidazol
- pH 8 (úprava NaOH)

Promývací pufr 2

- 50 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O
- 150 mM NaCl
- 40 mM imidazol
- pH 8 (úprava NaOH)

Eluční pufr

- 50 mM NaH₂PO₄ · 12 H₂O
- 150 mM NaCl
- 250 mM imidazol
- pH 8 (úprava NaOH)

Výměnný pufr

- 71 mM Tris
- 214 mM NaCl
- pH 7,4 (úprava NaOH)

TAE pufr

- 20 ml TAE pufru (50x konc.)
- 980 ml ultračisté vody

Isobutanol nasycený vodou

- Čistý isobutanol
- Ultračistá voda

Fixační roztok pro BlueSilver barvení

- 10 ml koncentrované kyseliny octové
- 40 ml metanolu
- 50 ml ultračisté vody

Barvicí roztok BlueSilver

- 10 ml ultračisté vody
- 8 ml 85 % kyseliny fosforečné
- 10 g síranu amonného
- 0,12 g Coomassie Brilliant Blue G
- Doplnit do 80 ml ultračistou vodou
- 20 ml metanolu

Bradfordovo činidlo

- 100 mg Coomassie brilliant blue G250
- 50 ml 95 % etanol
- 100 ml 85% kyseliny fosforečné
- Doplnit do 1000 ml vodou

10x zásobní TBS pufr

- 24 g Tris
- 8,8 g NaCl
- 900 ml ultračisté vody
- pH 7,6 (úprava HCl)
- Doplnit do 1 000 ml ultračistou vodou

TBS-T pufr

- 10 ml 10x zásobního TBS pufru
- Doplnit do 1 000 ml ultračistou vodou
- 1 ml TWEEN 20

Blotovací pufr

- 25 mM Tris
- 192 Mm glycin
- 20 % metanol
- Doplnit ultračistou vodou do 500 ml

4M HCl

- 88 ml koncentrované HCl
- 150 ml ultračisté vody
- Doplnit ultračistou vodou do 250 ml

1,5 M Tris-HCl

- 18,5 g Tris
- 75 ml ultračisté vody
- pH 8,8 (úprava HCl)
- Doplnit ultračistou vodou do 100 ml

0,5 M Tris-HCl

- 6 g tris
- 75 ml ultračisté vody
- pH 6,8 (úprava 4M HCl)
- Doplnit ultračistou vodou do 100 ml

10 % SDS

- 10 g SDS
- 80 ml ultračisté vody
- Doplnit ultračistou vodou do 100 ml

10 % APS

- 0,01 g APS (ammonium persulfate)
- 100 µl ultračisté vody

30 % akrylamid (AA) + 0,8 % bis-akrylamid (bis-AA)

- 30 g AA
- 0,8 g bis-AA
- 100 ml ultračisté vody

5x zásobní elektrodový pufr (5x SDS pufr)

- 15,1 g Tris
- 72 g glycin
- 5 g SDS
- 900 ml ultračisté vody
- pH 8,3 (pomocí 4M HCl)
- Doplnit ultračistou vodou do 1 000 ml

1x SDS pufr

- 160 ml 5x koncentrovaného elektrodového pufru
- 640 ml ultračisté vody

0,5 % bromfenolová modř (BFB)

- 5,0 mg BFB
- 10 ml ultračisté vody

5× zásobní vzorkový pufr

- 1,2 ml ultračisté vody
- 5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8
- 3,4 ml glycerol
- 1 g SDS
- 0,4 ml 0,5 % BFB
- (10 µl ME na 200 µl zásobního vzorkového pufru)

Denaturační pufr

- 8 M močovina
- 50 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 30 % glycerol
- pH 7,4 (úprava HCl)

2.9 Metodika

2.9.1 Klonování cDNA CypA a CypE do expresního plazmidu pET-28b(+)

2.9.1.1 Příprava noční kultury

Ze zásobních kultur *E.coli* XL-1 obsahujících plazmid pCR4-TOPO_CypA, pCR4-TOPO_CypE a expresní vektor pET-28b(+), skladovaných při -80 °C, byly připraveny noční kultury o objemu 10 ml. Jejich složení znázorňuje tabulka 6. Kultury byly inkubovány při 37 °C a 150 rpm přes noc. Následně byly kultury použity pro izolaci plazmidu a pro přípravu dalších zásob těchto buněk.

Tabulka 6: Složení nočních kultur *E.coli* XL-1 s vloženým pCR4-TOPO_CypA, pCR4-TOPO_CypE a pET-28b(+) plazmidem.

Komponenta	Kultura 1 [μl]	Kultura 2 [μl]	Kultura 3 [ul]
Sterilní LB médium	10 000	10 000	10 000
Karbenicillin 50 μg/ml	10	10	
Kanamycin 50 mg/ml	-	-	10
<i>E.coli</i> s pCR4-TOPO_CypA	50	-	-
<i>E.coli</i> s pCR4-TOPO_CypE	-	50	-
<i>E.coli</i> s pET-28b(+)	-	-	50

2.9.1.2 Izolace plazmidu

Noční kultury byly po 5 ml centrifugovány v kónických zkumavkách při 4 500 rpm a 4 °C, 20 minut. Supernatant byl odstraněn a pelety byly použity pro izolaci plazmidu pomocí kitu Monarch Plasmid DNA Miniprep Kit podle pokynů výrobce. Každá peleta byla resuspendována ve 200 μl resuspendačního pufru (B1) pomocí pipety. Následně bylo do směsi přidáno 200 μl lyzačního pufru (B2). Mikrozkumavka byla manuálně několikrát převrácena (nesmí se třepat), dokud roztok nezměnil barvu z růžové na tmavě růžovou. Lyzát byl dále zneutralizován přidáním 400 μl neutralizačního pufru (B3). Mikrozkumavka byla manuálně několikrát převrácena (nesmí se třepat) do doby, dokud se barva celého obsahu nezměnila na žlutou a poté byla inkubována 2 minuty při laboratorní teplotě. Vzniklý precipitát byl centrifugován při 14 000 rpm, 5 minut. Supernatant s požadovaným plazmidem byl nanesen na kolonu z kitu, vloženou ve sběrné zkumavce, a centrifugován při 14 000 rpm, 1 min. Kolona byla promyta 200 μl promývacího pufru 1 a opět centrifugována při 14 000 rpm, 1 min. Následně byla kolona promyta 400 μl promývacího pufru 2 a centrifugována při 14 000 rpm, 1 min. Kolona byla přenesena do čisté mikrozkumavky a zachycený plazmid byl eluován 30 μl destilované sterilní vody, nanesené do středu kolony. Kolona byla inkubována jednu minutu při laboratorní teplotě a následně centrifugována při 14 000 rpm, 1 min. Zachycený eluát obsahoval příslušný plazmid.

2.9.1.3 Měření koncentrace a čistoty plazmidů

Měření bylo provedeno pouze u třetího pokusu, z důvodu přidání přesného množství plazmidů do restrikční směsi, podle pokynů výrobce. Koncentrace a čistota byla měřena na mikrodestičkovém multireaderu, pomocí speciální destičky NanoQuant, při 280 nm.

2.9.1.4 Restrikce plazmidů

Purifikované plazmidy z 2.9.1.2. byly rozštěpeny pomocí restrikčních endonukleáz. Použité restrikční endonukleázy byly XhoI a NdeI, a pro restrikci byly voleny různé podmínky. Složení restrikčních směsí v pokusu č. 1, 2 a 3 znázorňuje tabulka 7, tabulka 8 a tabulka 9. Restrikce v pokusu č. 1 probíhala při 37 °C, 1 hodinu a bez následné inaktivace restrikčních endonukleáz. Restrikce v pokusu č. 2 probíhala při 37 °C přes noc a také bez následné inaktivace restrikčních endonukleáz. Pro restrikci v pokusu č. 3 byl použit přesně 1 µg plazmidu, vypočítaný z naměřené koncentrace. Restrikce probíhala při 37 °C, 1 hodinu. Následovala inaktivace restrikčních endonukleáz při 65 °C, 20 minut. Po restrikci plazmidu pET-28b(+) byla provedena defosforylace, přidáním 2 µl Quick CIP, při 37 °C, 10 minut. Inaktivace fosfatázy proběhla při 80 °C, 2 minuty.

Tabulka 7: Složení restrikční směsi, pokus č. 1.

Restrikce plazmidů pokus č. 1			
Komponenta	Restrikční směs 1 [µl]	Restrikční směs 2 [µl]	Restrikční směs 3 [µl]
CutSmart pufr	3	3	3
XhoI	1	1	1
NdeI	1	1	1
pCR4-TOPO_CypA	20	-	-
pCR4-TOPO_CypE	-	20	-
pET-28b(+)	-	-	20
Ultračistá voda	5	5	5

Tabulka 8: Složení restrikční směsi, pokus č. 2.

Restrikce plazmidů pokus č. 2			
Komponenta	Restrikční směs 1 [µl]	Restrikční směs 2 [µl]	Restrikční směs 3 [µl]
CutSmart pufr	2	2	2
XhoI	1	1	1
NdeI	1	1	1
pCR4-TOPO_CypA	10	-	-
pCR4-TOPO_CypE	-	10	-
pET-28b(+)	-	-	10
Ultračistá voda	7	7	7

Tabulka 9: Složení restrikční směsi, pokus č. 3.

Restrikce plazmidů pokus č. 3			
Komponenta	Restrikční směs 1 [μl]	Restrikční směs 2 [μl]	Restrikční směs 3 [μl]
CutSmart pufr	5	5	5
Xho1	1	1	1
Nde1	1	1	1
pCR4-TOPO_CypA	3,64	-	-
pCR4-TOPO_CypE	-	4,25	-
pET-28b(+)	-	-	12,7
Ultračistá voda	0,36	8,75	0,3

2.9.1.5 Analýza restrikce a izolace komponent pro ligaci

Analýza restrikce proběhla na agarózové elektroforéze, pro kterou byl připraven 1 % gel ze 40 ml TAE pufru a 0,4 g Seakem GTG agarosu, která je vhodná pro následnou izolaci DNA. Agarosa v pufru byla rozvařena pomocí mikrovlnné trouby. Po částečném ochlazení roztoku byla do roztoku přidána barva SYBR Safe DNA Gel Stain (10 000x konc.) o objemu 4 μl a rozmíchána. Roztok byl nalit do formy pro agarózovou elektroforézu a do roztoku byl vložen vhodný hřebínek. Tuhnutí gelu probíhalo 15 – 20 minut. Z gelu byl následně vysunut hřebínek a gel byl vložen do elektroforetické vany a zalit TAE puftrem. Vzorky na elektroforézu byly připraveny smísením celé restrikční směsi a 3 μl BlueJuice Gel Loading pufr (10x konc.). Vzorky byly nanášeny na gel společně s 4 μl markeru molekulových hmotností O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder a separace DNA proběhla při 100 V a 250 mA, 30 min. Výsledek elektroforézy byl zviditelněn pomocí UV lampy a úseky odpovídající cDNA CypA, cDNA CypE a lineárnímu pET-28b(+) byly skalpelem vyříznuty z gelu. Izolované úseky byly vloženy do 2 ml mikrozkuvek a zváženy.

2.9.1.6 Purifikace cDNA CypA, cDNA CypE a pET-28b(+)

Z gelu izolované úseky cDNA CypA, cDNA CypE a lineární pET-28b(+) byly purifikovány pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit. K izolátům byl přidán 3x objem QC pufru a směs byla inkubována při 50 °C s občasným promícháváním na vortexu, 10 minut, nebo do úplného rozpuštění gelu. Do směsi byl přidán 1x objem isopropanolu a vzorky byly promíchány na vortexu. Pro zachycení úseků DNA na koloně, byly roztoky o maximálním objemu 800 μl nanášeny na kolonu z kitu, vloženou ve sběrné mikrozkuvce a kolony byly centrifugovány při 14 000 rpm, 1 minutu. Pro větší objem vzorku byl postup opakován. Na kolony bylo napipetováno 500 μl QC pufru a kolony byly centrifugovány při 14 000 rpm, 1 minutu. K pročištění DNA bylo na kolony nanášeno 750 μl PE pufru a kolony byly centrifugovány při 14 000 rpm, 1 minutu. Pro eluci DNA byla kolona umístěna do čisté mikrozkuvky a do středu kolony bylo nanášeno 30 μl destilované vody. Kolona byla inkubována jednu minutu při laboratorní teplotě a následně centrifugována při 14 000 rpm, 1 minutu.

2.9.1.7 Měření koncentrace získané DNA

Koncentrace vypurifikované cDNA CypA, cDNA CypE a lineárního pET-28b(+) byla měřena na mikrodestičkovém multireaderu, pomocí speciální destičky NanoQuant, při 280 nm.

2.9.1.8 Ligace cDNA CypA a CypE do pET-28b(+)

Ligace cDNA CypA a CypE do linearizovaného vektoru pET-28b(+) byla uskutečněna pomocí T4 DNA ligázy. Objemy ostatních komponent byly vypočítány pomocí kalkulátoru výrobce (<http://nebiocalculator.neb.com>), kde v pokusu č. 1 a 2 byl zvolen poměr inzerť:vektor 3:1 a v pokusu č. 3 byl zvolen poměr inzerť:vektor 6:1. Ligační směs byla doplněna sterilní destilovanou vodou do objemu 20 µl. Složení výsledných ligačních směsí znázorňuje tabulka 10, tabulka 11 a tabulka 12. Při prvním pokusu probíhala ligace při laboratorní teplotě, 1 hodinu. Při druhém pokusu probíhala ligace při 16 °C, přes noc. Při třetím pokusu byla ligační směs inkubována přes noc v samovolně se zahřívající lázni tvořené z vody a ledu.

Tabulka 10: Složení ligační směsi, pokus č. 1.

Pokus č. 1		
Komponenta	Ligační směs 1 [µl]	Ligační směs 2 [µl]
cDNA CypA	0,75	-
cDNA CypE	-	1,75
pET-28b(+)	1,3	1,3
Ultračistá voda	14,95	13,95
Ligázový pufr (10x konc.)	2	2
T4 DNA ligáza (NEB)	1	1

Tabulka 11: Složení ligační směsi, pokus č. 2.

Pokus č. 2		
Komponenta	Ligační směs 1 [µl]	Ligační směs 2 [µl]
cDNA CypA	0,71	-
cDNA CypE	-	0,72
pET-28b(+)	1,71	0,71
Ultračistá voda	12,58	13,57
Anza Ligase Master mix	5	5

Tabulka 12: Složení ligační směsi, pokus č. 3.

Pokus č. 3		
Komponenta	Ligační směs 1 [µl]	Ligační směs 2 [µl]
cDNA CypA	1,28	-
cDNA CypE	-	2,06
pET-28b(+)	0,7	0,7
Ultračistá voda	13,02	12,24
Anza Ligase Master mix	5	5

2.9.1.9 Vložení plazmidu pET-28b(+)_CypA a pET-28b(+)_CypE do *E.coli*

Při prvním a druhém pokusu byla transformace ligační směsi z 2.9.1.8 uskutečněna do kompetentních buněk NEB 10-Beta competent *E.coli*, podle protokolu výrobce. Buňky byly z -80 °C vyndány a inkubovány 10 minut na ledu. K buňkám byly přidány 2 µl ligační směsi a mikrozkušavka byla jemně 5x proklepnuta pomocí prstu. Transformace byla provedena pomocí teplotního šoku, kdy byla směs 30 minut držena na ledu, 30 sekund ve 42 °C a 5 minut na ledu. K buňkám bylo přidáno 950 µl SOC média pokojové teploty a buňky byly umístěny do inkubované třepačky na 37 °C a 250 rpm, 1 hodinu. Při třetím pokusu byla transformace provedena do kompetentních *E.coli* XL-1 pomocí pozměněného teplotního šoku. Buňky byly vyndány z -80 °C a inkubovány 30 minut na ledu. K buňkám bylo přidáno 2,5 µl ligační směsi a mikrozkušavka byla jemně 5x proklepnuta pomocí prstu. Buňky byly drženy půl hodiny na ledu, 45 sekund na 42 °C a 3 minuty na ledu. K buňkám bylo přidáno 250 µl SOC média, a buňky byly inkubovány v inkubované třepačce při 37 °C a 250 rpm, 1 hodinu.

2.9.1.10 Nanášení na misky s LB-agarem

Při prvním a druhém pokusu byly buňky *E.coli* z obou transformačních směsí (2.9.1.9) nanášeny na misky s LB-agarem obsahujícím kanamycin (50 µg/ml). Při třetím pokusu byly buňky *E.coli* z obou transformačních směsí (2.9.1.9) nanášeny na misky s LB-agarem obsahujícím kanamycin (50 µg/ml) a tetracyklin (10 µg/ml). Na jednu misku bylo nanášeno vždy 50 µl transformační směsi a na druhou byl nanášen zbytek transformační směsi. Misky byly inkubovány na 37 °C přes noc.

2.9.1.11 PCR z kolonií

Kolonie z misek s LB-agarem (2.9.1.10) byly pomocí pipety odebrány a přeneseny do 50 µl destilované vody a pomocí pipety zhomogenizovány. Pro PCR reakci bylo použito 20 µl homogenní směsi a zbylých 30 µl bylo uschováno při 4 °C. PCR reakce byla provedena pomocí PPP Master Mixu, ze kterého byl namíchán roztok PPP master mix podle tabulky 13. Templát pro PCR reakci byl získán denurací homogenní směsi buněčných kultur ve vodě při 95 °C. PCR směs byla připravena z templátu a roztoku PPP master mix do tenkovrstvých PCR mikrozkušavek podle tabulky 14. Směs pro PCR reakci byla promíchána na vortexu a krátce centrifugována. Průběh PCR reakce znázorňuje tabulka 15.

Tabulka 13: Složení roztoku PPP master mixu použitého pro PCR reakci.

Komponenta	Na 1 vzorek [µl]	2,5x množství [µl]
H ₂ O	3,75	9,4
PPP master mix	6,25	15,6
FW primer CypA/CypE	0,5	1,25
RV primer CypA/CypE	0,5	1,25
Roztok kultury <i>E.coli</i> obsahující CypA/CypE	1,5	-

Tabulka 14: Složení konečné směsi, ve které probíhala PCR reakce.

Komponenta	PCR směs CypA [μ l]	PCR směs CypE [μ l]
PPP master mix	11	11
Templát CypA	1,5	-
Templát CypE	-	1,5

Tabulka 15: průběh PCR reakce provedené z odebraných kolonií *E.coli* XL-1, po transformaci liguční směsi, obsahující cDNA CypA nebo CypE s pET-28b(+).

	Teplota	Doba	Počet cyklů
Úvodní denaturace	94 °C	1 min	1
Denaturace	94 °C	15 sek	25-35
Nasednutí primerů	50 °C	15 sek	
Extenze	72 °C	1 minuta na 1 kb	
Finální extenze	72 °C	7 min	1
Chlazení	22 °C		

2.9.1.12 Agarózová elektroforéza

Gel na plošnou agarózovou elektroforézu byl připraven jako 1 % z agarosy pro analýzu DNA podle postupu dříve (2.9.1.5). Na agarózový gel byly nanесeny vzorky z PCR reakce a separace DNA probíhala při 100 V a 250 mA, 30 minut.

2.9.1.13 Noční kultura a příprava zásob

Noční kultura byla připravena z homogenizovaného vodného roztoku kolonie *E.coli* XL-1, obsahujících plazmid pET-28b(+)_CypA (2.9.1.11), a z 10 ml LB média, obsahujícího kanamycin (50 μ g/ml) a tetracyklin (10 μ g/ml). Kultura byla inkubována v inkubované třepačce při 37 °C a 200 rpm, přes noc. Dále byly kultury centrifugovány při 7 500x g a 4 °C, 10 minut. Pelety byly uchovány při -20 °C pro další použití.

2.9.2 Transformace pET-28b(+)_CypA do expresních *E.coli* BL-21 (DE3)

2.9.2.1 Izolace a purifikace plazmidu

Izolace a purifikace plazmidu pET-28b(+)_CypA z buněk *E.coli* XL-1 byla provedena pomocí komerčního kitu Monarch Plasmid DNA Miniprep Kit, postupem (2.9.1.2). Purifikovaný plazmid byl z kolony eluován pomocí 30 μ l DNA elučního pufru namísto destilované vody.

2.9.2.2 Měření koncentrace a čistoty

Koncentrace a čistota získaného pET-28b(+)_CypA plazmidu byla měřena pomocí spektrofotometrického mikrodestičkového multireaderu, pomocí speciální destičky NanoQuant, při 280 nm.

2.9.2.3 Transformace pET-28b(+)_CypA do expresních *E.coli* BL-21 (DE3)

Zásobní kompetentní buňky *E.coli* BL-21 (DE3) byly vyndány z -80 °C a inkubovány 30 minut na ledu. Ke kompetentním buňkám bylo přidáno 0,25 µl (40 ng) a 0,5 µl (80 ng) plazmidu pET-28b(+)_CypA nebo 2 µl kontrolního pUC19. Transformace byla provedena teplotním šokem. Kompetentní buňky byly inkubovány 30 minut na ledu, 45 sekund při 42 °C a 3 minuty na ledu. K buňkám bylo přidáno 250 µl SOC média a kultury byly inkubovány v inkubované třepačce při 37 °C a 250 rpm, 2 hodiny a 15 minut.

2.9.2.4 Nanesení buněk na misky s LB-agarem

Buňky *E.coli* BL-21 (DE3) s vloženým pET-28b(+)_CypA plazmidem byly nanесeny na misky s LB-agarem obsahujícím kanamycin (50 µg/ml) a buňky *E.coli* BL-21 (DE3) s kontrolním PUC19 plazmidem byly nanесeny na misky s LB-agarem obsahujícím ampicilin (100 µg/ml). Z každé kultury bylo nanесeno na jednu misku 50 µl kultury, a na druhou zbytek kultury. Misky byly inkubovány při 37 °C přes noc.

2.9.2.5 Příprava noční kultury *E.Coli* BL-21 (DE3) s pET-28b(+)_CypA

Z LB-agar misek byly vybrány 2 kolonie BL-21 (DE3) *E.coli* s vloženým pET-28b(+)_CypA plazmidem (2.9.2.4). Každá kolonie byla převedena do 2,5 ml LB média obsahujícího kanamycin (50 µg/ml). Kultura byla inkubována na inkubované třepačce při 37 °C a 200 rpm, 2 hodiny. Z této kultury byla připravena noční kultura obsahující 50 ml LB média a 0,5 ml kultury.

2.9.2.6 Příprava zásobních kultur *E.coli* BL-21 (DE3) s pET-28b(+)_CypA

Z 200 µl nočních kultur (2.9.2.5) byly připraveny zásobní kultury buněk přidáním 300 µl 50 % glycerolu. Směs byla promíchána, rozdělena po 100 µl a uchována při -80 °C.

2.9.3 Indukce

Pro indukci byly připraveny dvě kultury z 50 ml LB média obsahujícího kanamycin (50 µg/ml) a 1 ml noční kultury *E.coli* BL-21 (DE3) pET-28b(+)_CypA (2.9.2.5). Kultury byly inkubovány na inkubované třepačce při 37 °C a 200 rpm, dokud jejich optická denzita (OD₆₀₀) nedosáhla hodnoty 0,6. Z každé kultury bylo odebráno 200 µl vzorku „před indukcí“. Do zbytku kultur bylo přidáno 250 µl 100 mM ITPG a kultury byly inkubovány v inkubované třepačce při 37 °C a 200 rpm, 4 hodiny. Z každé kultury bylo odebráno 200 µl vzorku „po indukcí“ a všechny odebrané vzorky (před indukcí i po indukcí) byly centrifugovány při 14 000 rpm, 10 minut. Kultury po indukcí, inkubované 4 hodiny, byly přeneseny do kónických zkumavek a stočeny při 4 °C a 7 500x g, 10 minut. Pelety kultur a odebraných vzorků byly uchovány při -20 °C.

2.9.3.1 Analýza indukce CypA

Vzorky po indukci byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy, pro kterou byl připraven 1 milimetrový 12,5 % separační gel a 4 % zaostřovací gel. Roztok pro přípravu separačního gelu byl připraven podle tabulky 16 a nalit mezi skla, přibližně 1,5 cm od vrchního okraje skel. Roztok byl pokryt tenkou vrstvou izobutanolu nasyceného ve vodě a polymerace gelu trvala 45 minut. Izobutanol byl odstraněn z gelu a gel byl omyt destilovanou vodou. Zaostřovací gel byl připraven podle tabulky 17 a nanesen na separační gel, až po horní okraj skel. Do zaostřovacího gelu byl ihned vložen 15 jamkový hřebínek a gel polymeroval 90 minut. Hřebínek byl z gelu vyjmut, gel byl promyt destilovanou vodou, následně vložen do elektroforetické vany a zalit elektrodoým pufrem.

Tabulka 16: Složení roztoku pro 1 mm, 12,5 % SDS-polyakrylamidový separační gel.

Komponenta	Objem [μl]
H ₂ O	2 400
1,5 M tris-HCl, pH 8,8	1 870
10 % SDS	75
30 % AA	3 150
10 % APS	50
TEMED	2,5

Tabulka 17: Složení roztoku pro 1 mm, 4 % SDS-polyakrylamidový zaostřovací gel.

Komponenta	Objem [μl]
H ₂ O	1 170
0,5 M tris-HCl, pH 6,8	468
10 % SDS	18,7
30 % AA	187,5
10 % APS	25
TEMED	1,25

Vzorky pro elektroforézu byly připraveny z pelet vzorků „před indukci“ a „po indukci“. K lyzi buněk byl použit zásobní roztok Bug Busteru složený z 0,5 ml Bug Busteru a 0,1 μ l benzonázy. Každá peleta byla resuspendována ve 20 μ l zásobního roztoku a vzorky byly umístěny na 20 minut na kývačku. Ke vzorkům byly přidány 4 μ l vzorkového pufru obsahujícího merkaptoetanol a vzorky byly promíchány. Vzorky byly zahřáty na 95 °C, 3 minuty, a následně byly volně ochlazeny na laboratorní teplotu. Na gel byly nanášeny vzorky o objemu 15 μ l a marker molekulových hmotností Precision Plus Protein Kaleidoscope o objemu 4 μ l. Elektroforetická vana byla doplněna elektrodoým pufrem a separace proteinů probíhala nejprve při 100 V, 10 minut a následně při 150 V, 1 hodinu.

2.9.3.2 Detekce výsledků z SDS-PAGE elektroforézy

Gel z SDS elektroforézy byl vyjmut ze skel a zbaven zaostřovacího gelu. Separační gel byl ponořen do fixačního roztoku a umístěn na kývačku, 30 minut. Promytí gelu od fixačního roztoku bylo provedeno 2x destilovanou vodou, gel byl ponořen do promíchaného BlueSilver roztoku a umístěn na kývačku přes noc. Gel byl od BlueSilver roztoku promýván několikrát destilovanou vodou.

2.9.4 Purifikace rekombinantního CypA

2.9.4.1 Lyze buněk

Pro purifikaci exprimovaného rekombinantního proteinu CypA byla použita uchovaná peleta buněk *E.coli* BL-21 (DE3) pET-28b(+)_CypA po indukci (2.9.3). Lyze buněk byla provedena sonikací v lyzačním pufru 2 (tabulka 18). Peleta byla resuspendována v 5 ml lyzačního pufru 2. Ze směsi byl odebrán vzorek před lyzí o objemu 100 μ l a směs byla 20 minut inkubována na ledu. Následně byla provedena sonikace na ledu pomocí sonikátoru UP100H s velikostí jehly MS2 a nastavenou amplitudou na 80 %. Sonikace byla uskutečněna v 17 cyklech, ve kterých probíhalo 10 vteřin sonikování a 30 vteřin pauza. Lyzát byl centrifugován při 10 000 rpm a 4 °C, 10 minut. Ze supernatantu byl odebrán 50 μ l vzorek supernatantu „po sonikaci“.

Tabulka 18: Složení lyzačního pufru 2, použitého pro lyzi buněk E.coli BL-21 (DE3) pET-28b(+)_CypA po indukci, společně se sonikací.

Lyzační pufr 2	
Lyzační pufr	10 ml
Lysozym	10 mg
Inhibitory proteáz (bez EDTA)	1 tableta
Benzonáza	6 μ l

2.9.4.2 Purifikace rekombinantního CypA

Pro purifikaci byla použita afinitní chromatografie. Do kolony pro afinitní chromatografii byl nanesen 1 ml promíchané pryskyřice Ni-NTA agarose a kolona byla svisle postavena do stojanu. Pro promytí pryskyřice od skladovacího pufru bylo do kolony dvakrát naneseo 5 ml lyzačního pufru, který se nechal vykat. Kolona byla ze spodu uzavřena a do kolony byl nanesen supernatant po lyzi (2.9.4.1). Kolona byla uzavřena i z vrchu a umístěna do rotátoru na 1 hodinu při 4 °C. Kolona byla svisle umístěna do stojanu a roztok se nechal vykat do zkumavky jako vzorek „flow-through“. Do kolony uzavřené zespodu bylo naneseo 10 ml ledového promývacího pufru 1. Kolona byla uzavřena z vrchu a promyta na rotátoru 2 minuty. Kolona byla nechána svisle vykat a byl odebrán vzorek „washing1“. Postup promývání byl opakován 3x, s odebranými vzorky „washing 1“, „washing 2“ a „washing 3“. Stejný postup následoval s promývacím pufrům 2, kdy byly odebrány vzorky „washing 4“, „washing 5“ a „washing 6“ o objemu přibližně 1 ml. Eluce proteinů obsahujících his-tag byla provedena nanesením 1 ml ledového elučního pufru na kolonu, všechny eluát byl zachycen a postup byl opakován až do uvolnění veškerého požadovaného proteinu.

Předběžné zjištění obsahu proteinů v elučních roztocích bylo provedeno pomocí vizuální identifikace proteinů Bradfordovým činidlem. Stanovení proběhlo v mikrotitrační destičce z 10 μ l vzorku a 100 μ l Bradfordova činidla. Jako pozadí byl použit eluční pufr. Roztoky obsahující protein byly zabarveny jasnější modrou barvou vzhledem ke vzorkům obsahujícím pouze pufr.

2.9.4.3 Výměna pufru pro uchovávání proteinů

Přenesení proteinu z elučního pufru do výměnného pufru bylo provedeno pomocí centrifugační filtrační zkumavky Amicon ultra-4. Filtrační zkumavka byla promyta destilovanou vodou a výměnným pufrem pomocí centrifugace při 4 000x g a 4 °C, 15 minut. Na membránu centrifugační zkumavky bylo nanášeno malé množství elučního pufru a zkumavka byla několik minut inkubována při laboratorní teplotě. Centrifugační zkumavka byla vyprázdněna a na membránu byly nanášeny všechny eluční roztoky obsahující protein. Zkumavka byla centrifugována při 4 000x g a 4 °C, 15 minut. Roztok nad membránou byl pomocí pipety rozvířen a doplněn výměnným pufrem o objemu nejméně 3 ml. Zkumavka byla centrifugována při 4 000x g a 4 °C, 15 - 20 minut. Postup byl 2x opakován a po posledním stočení by měl roztok nad membránou zaujímat objem přibližně 0,5 ml.

2.9.4.4 Příprava zásobních roztoků CypA

Zbýlý roztok v centrifugační zkumavce (2.9.4.3) byl odměřen a inkubován na ledu. Do roztoku byl přidán glycerol do koncentrace 30 %, čímž byl získán zásobní roztok CypA v 50 mM tris, 150 mM NaCl a 30 % glycerolu, pH 7,4. Roztok byl rozdělen do mikrozkuvek po 20 a 10 μ l a následně byl uchován při -20 °C a při -80 °C.

2.9.4.5 Stanovení koncentrace proteinu

Koncentrace proteinu CypA byla stanovena metodou BCA v mikrotitrační destičce, pomocí kalibrační křivky. Standardem pro kalibrační křivku byl hovězí sérový albumin (BSA). Zásobní roztok BSA byl připraven o koncentraci 1 mg/ml v 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 30% glycerol, pH 7,4. Na kalibrační řadu byly připraveny 250 μ l roztoky BSA o koncentracích 100 μ g/ml, 200 μ g/ml, 400 μ g/ml, 600 μ g/ml, 800 μ g/ml a 1000 μ g/ml. Koncentrace CypA byla měřena ze zásobního roztoku proteinu, ředěného 1:1 a 1:5, stejným pufrem jako byl použit na přípravu kalibračních roztoků. Kalibrační řada a naředěné zásobní roztoky proteinu byly v tripletech umístěny do mikrotitrační destičky po 10 μ l. Vzorky byly převrstveny 200 μ l BCA činidla, které vzniklo smícháním BCA roztoku s CuSO₄, v poměru 1:50. Vzorky byly inkubovány při 37 °C, 30 minut. Následně bylo provedeno měření na mikrodestičkovém multireaderu při 562 nm.

2.9.5 Stanovení čistoty rekombinantního CypA

Celý purifikační proces byl analyzován pomocí SDS-PAGE elektroforézy a gely pro elektroforézu byly připraveny 1 milimetrové a 12,5 %, podle postupu v kapitole 2.9.3.1. Na elektroforézu byly použity vzorky z purifikace (2.9.4.2) o objemu 20 μ l: flow-through (FT), washing 1-6 (W1-6), vzorek před sonikací (P1), vzorek po sonikaci (P2) a supernatant po sonikaci (S). Vzorek před sonikací byl centrifugován při 14 000 rpm, 5 minut. Pelety vzorků před a po sonikaci byly resuspendovány ve 100 μ l Bug Buster roztoku, připraveného z Bug Busteru a benzonazy, v poměru 500:1. Homogenní roztoky byly umístěny na kývačku, 20 minut. Z purifikovaného CypA (2.9.4.4) byly připraveny dva roztoky obsahující 1 μ g a 2 μ g CypA. Ke všem vzorkům byl přidán vzorkový pufr s merkptoetanolem a vzorky byly inkubovány při 95 °C, 3 minut. Vzorky byly naneseny na SDS-PAGE gel (tabulka 19, tabulka 20) a elektrolytická vana byla naplněna elektrodovým pufrem. Separace proteinů probíhala při 100 V, 10 minut a následně při 150 V, 65 minut. Gel byl vyjmut ze skel, očištěn od zaostřovacího gelu a obarven BlueSilver roztokem stejným postupem jako v kapitole 2.9.3.2.

Tabulka 19: Pořadí a složení nanášených vzorků na gel pro SDS-PAGE elektroforézu, určeného k analýze purifikačního procesu. Vzorky jsou: marker molekulových hmotností (M), vzorek před sonikací (P1), vzorek po sonikaci (P2), supernatant po sonikaci (S), washing 1-6 (W1-6), 1 μ g CypA (P 1 μ g) a 2 μ g CypA (P 2 μ g).

	M	P1	P2	S	FT	W1	W2	W3	W4	W5	W6	P 1 μ g	P 2 μ g
Vzorek [μ l]	4	10	10	10	10	20	20	20	20	20	20	10	10
Vzorkový pufr [μ l]	-	2	2	2	2	4	4	4	4	4	4	2	2

Tabulka 20: Pořadí a složení nanášených vzorků na gel pro SDS-PAGE elektroforézu, určeného pro následný western-blot. Primární protilátky jsou pouze predikcí pro použití při western-blotu, nikoli složení vzorku. Vzorky jsou: marker molekulových hmotností (M), vzorek před sonikací (P1) a zásobní roztok purifikovaného CypA (E1).

	M	P1	E1		M	P1	E1
Vzorek [μ l]	4	10	10	-	4	10	10
Vzorkový pufr [μ l]	-	2	2	-	-	2	2
Primární protilátky	Anti-CypA				Anti-histag		

2.9.6 Ověření identity proteinu

Identita proteinu byla ověřena pomocí western-blot metody. Proteiny byly nejprve rozděleny pomocí SDS-PAGE elektroforézy, postupem stejným, jako v 2.9.5. Složení a pořadí vzorků je uvedeno v tabulce 20. SDS-PAGE gel byl vyndán ze skel a namočen na 20 minut do blotovacího pufru. Stejně tak byly namočeny dva blotovací papíry o velikosti gelu. PVDF membrána (0,2 μm) o velikosti gelu byla promývána v metanolu, 1 minutu, následně v destilované vodě, 2 minuty a poté byla ponořena do blotovacího pufru na 5 minut. Na kladnou deskovou elektrodu blotovacího přístroje byl umístěn blotovací papír, na něj membrána (aktivní stranou nahoru), dále gel a blotovací papír. Kazeta byla uzavřena a vložena do blotovacího přístroje TransBlot Turbo. Přenos proteinů probíhal při 25 V a 1 A, 30 minut. Membrána byla vložena do konických zkumavek a byla blokována 5 ml 3 % mléka, v TBS-T pufru po dobu 90 min. Následně byla membrána 3x krátce promyta TBS-T pufrem a 3x promývána TBS-T pufrem na rotační kývačce, 5 minut. K jedné membráně (M, P1, E1) byl přidán roztok anti-CypA protilátky, ředěný 1:1000, v 3 % mléce v TBS-T pufru. K druhé membráně (M, P1, E1) byl přidán roztok protilátky anti-HisProbe, ředěný 1:1000, v 3 % mléce v TBS-T pufru. Membrány byly v primární protilátce promývány na rotační kývačce při 4 °C přes noc. Následně byly membrány promyty TBS-T pufrem 3x krátce a 3x na rotační kývačce, 5 minut. Následně byl aplikován sekundární vazebný pufr m-IgGk BP-HRP, ředěný 1:1000, v 3 % mléce v TBS-T a membrány byly omývány sekundární protilátkou, na rotační kývačce při laboratorní teplotě, 90 minut. Membrány byly promyty TBS-T pufrem 3x krátce a 3x na rotační kývačce, 5 minut.

Navázané protilátky byly detekovány pomocí kitu Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, dle pokynů výrobce, na přístroji Azure biosystems c400. Membrána byla převrstvena připraveným roztokem z kitu a inkubována při laboratorní teplotě, 3 minuty. Membrána byla vložena do detekčního přístroje a na membráně byla detekována chemiluminiscence.

2.9.7 Měření aktivity cyklofilinu A pomocí metody refoldingu RNázy T1

RNáza T1 byla denaturována jako 50 μM v denaturačním pufru, 2 hodiny při laboratorní teplotě. Roztok CypA byl ředěn na 1 μM , ze zásobních roztoků skladovaných při -20 °C a -80 °C, pomocí 20 mM Tris pufru s 30 % glycerolem (pH 7,4). Následně bylo provedeno měření refoldingu RNázy T1 v křemenných kyvetách, pomocí spektrofluorimetru chlazeného na 10 °C, kdy byla snímána fluorescence tryptofanu z RNázy T1 při excitační vlnové délce 268 nm (štěrbina 10 nm) a emisní vlnové délce 325 nm (štěrbina 5 nm). Měření probíhalo ihned po smíchání roztoků v prostředí 20 mM Tris bez glycerolu (pH 7,4) a hodnoty fluorescence byly snímány každou půl sekundu. Byl měřen spontánní refolding 1,25 μM RNázy T1 a refolding 1,25 μM RNázy T1 s přídatkem CypA (0,61 nM, 24,4 nM a 121,9 nM). Každé měření proběhlo pouze jednou a aktivita byla vyjádřena v hodnotách $\Delta F/\text{min}/\text{ng}$ CypA. Roztoky byly po celou dobu drženy na ledu.

2.9.8 Měření inhibice CypA pomocí cyklosporinu A (CsA)

Refolding denaturované RNázy T1 (2.9.7) byl měřen v kyvetách, při excitační vlnové délce 268 nm (štěrbina 10 nm) a emisní vlnové délce 325 nm (štěrbina 5 nm), pomocí spektrofluorimetru chlazeného na 10 °C. Měření bylo provedeno pro refolding samotné 1,25 μM RNázy T1, refolding 1,25 μM RNázy T1 s 14,4 nM CypA, refolding 1,25 μM RNázy T1 s 14,4 nM CypA a 1,9 μM CsA rozpuštěného v DMSO a refolding 1,25 μM RNázy T1 s 14,4 nM CypA a 0,1 M DMSO. Zásobní roztok CypA z -20 °C byl ředěn 20 mM Tris pufrům s 30 % glycerolem (pH 7,4) na 1 μM, a následné měření probíhalo v prostředí 20 mM Tris bez glycerolu (pH 7,4). Směs CypA, CypA s CsA nebo CypA s DMSO byla 5 minut inkubována na ledu, následně smíchána v kyvetě s RNázou T1 a ihned měřena. Měření probíhalo každou půl sekundu, 2 minuty. Každá reakce byla změřena dvakrát a aktivita byla vyjádřena jako $\Delta F/\text{min}/\text{ng}$ CypA. V přítomnosti CsA byl sledován inhibiční efekt CsA na CypA, pro který byl spontánní refolding samotné RNázy roven 100 %. Vzorky byly po celou dobu drženy na ledu.

2.9.9 Měření vazby CsA a CypA pomocí izotermální kalorimetrie

Měření tepelného zabarvení vazby cyklosporinu A na cyklofilin A bylo provedeno pomocí izotermálního titračního kalorimetru. Injekce byla naplněna roztokem 20 μM cyklofilinu A s 0,1 % DMSO, v rozpouštědle 50 mM Tris, 150 mM NaCl a 30 % glycerolu (pH 7,4). Měrná celda byla naplněna roztokem 2 μM cyklosporinu A v rozpouštědle 0,1 % DMSO, 50 mM Tris, 150 mM NaCl a 30 % glycerolu (pH 7,4). Postupně docházelo k automatickým 2 μl přídávům roztoku cyklofilinu A do reakční cely, kde byla měřena změna teploty při vzniku vazby CsA-CypA. Měření probíhalo při konstantní teplotě 20 °C. Z měření byla vypočítána disociační konstanta K_D , pomocí programu, který je součástí přístroje. Výsledky měření zobrazuje obrázek 18. Měření bylo provedeno pouze jednou.

3 Výsledky a diskuse

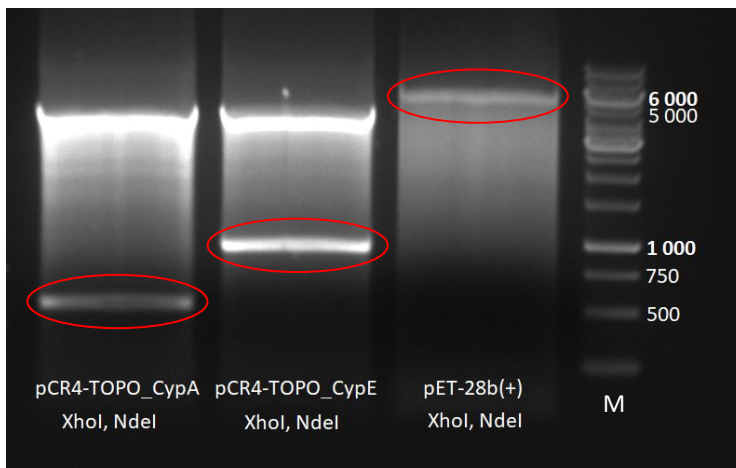
Cyklofiliny jsou důležité enzymy, které v lidském organismu mají peptidyl-prolyl cis-trans izomerázovou aktivitu, kterou napomáhají správnému sbalení proteinů po translaci [1, 2, 4]. Mimo to mají další důležité funkce, mezi které patří přispívání do rozmanitých signalizačních drah, apoptózy buněk iniciovanou mitochondriemi, zapojení do RNA sestřihu a adaptivní imunity a přispívají k rozvoji některých onemocnění [1]. Kvůli své schopnosti podporovat vznik a rozvoj různých onemocnění mohou být významnými cíli pro léčiva těchto nemocí, mezi které patří například virus imunopresivní imunodeficiency (HIV), virus hepatitidy C (HCV), nebo virus hepatitidy B (HBV) [12, 16, 17]. Problém však nastává u nalezení léčiv, které by selektivně působily pouze na jeden konkrétní cyklofilin, protože mezi všemi členy cyklofilinové rodiny existuje vysoká sekvenční a strukturní podobnost [1]. Z tohoto důvodu je třeba jednotlivé cyklofiliny nadále studovat po stránce vazebné i strukturní. Pro jejich studium, a pro hledání silných a selektivních inhibitorů jsou významné pokusy *in vitro*, představující základní úroveň výzkumu. Pro *in vitro* testy jsou potřeba čisté proteiny, a proto byla potřeba najít a zavést jednoduchou, levnou a spolehlivou cestu jejich přípravy. Nejsnazší volbou hostitelského expresního systému se zdála být bakterie *E.coli*, která je snadno kultivovatelná v poměrně levných a nenáročných podmínkách [25, 26]. Navíc exprese cyklofilinu A i cyklofilinu E byla již v *E.coli* úspěšně provedena [32, 33, 34, 35, 36]. Cílem tedy bylo nalézt optimální cestu přípravy rekombinantních cyklofilinů A a E s expresním vektorem a *E.Coli*, dostupnými na pracovišti.

3.1.1 Klonování cDNA CypA a CypE do expresního plazmidu pET-28b(+)

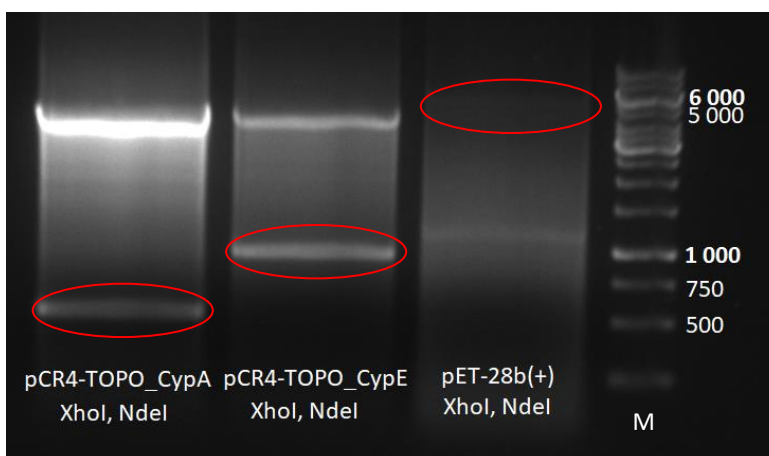
Na začátku byly k dispozici zásobní kultury *E.coli* XL-1 s cDNA CypA a CypE vloženou v klonovacím vektoru pCR4-TOPO (pCR4-TOPO_CypA a pCR4-TOPO_CypE). Geny cDNA CypA a CypE bylo potřeba vložit do zvoleného expresního vektoru pET-28b(+), který byl dostupný na pracovišti. Tento expresní vektor nebyl dosud pro přípravu CypA a Cyp E použit, ale byly použity podobné vektory ze skupiny pET, konkrétně pET-15b [35] a pET-14b [32] či další odlišné vektory [33, 34, 35, 36]. Expresní vektor pET-28b(+) byl použit například pro expresi lidského mitochondriálního CypD [37].

Prvním krokem tohoto postupu je restrikce cDNA z klonovacího vektoru. K tomu bylo potřeba získat dostatečné množství příslušných plazmidů, a proto byla nejprve připravena noční kultura (2.9.1.1) ze které byly plazmidy pCR4-TOPO_CypA, pCR4-TOPO_CypE a samotný expresní vektor pET-28b(+) purifikovány pomocí komerčního kitu (2.9.1.2). Následovala samotná restrikce pomocí XhoI a NdeI, která byla provedena v rámci bakalářské práce celkem 3x. Před třetím pokusem restrikce byla měřena koncentrace plazmidů (pCR4-TOPO_CypA: 274,6 µg/µl, pCR4-TOPO_CypE: 235,5 µg/µl a pET-28b(+): 78,42 µg/µl), aby bylo dodrženo doporučení výrobce, týkající se množství vložené DNA do restrikční směsi. Výsledky restrikce zobrazuje obrázek 11, obrázek 12 a obrázek 13.

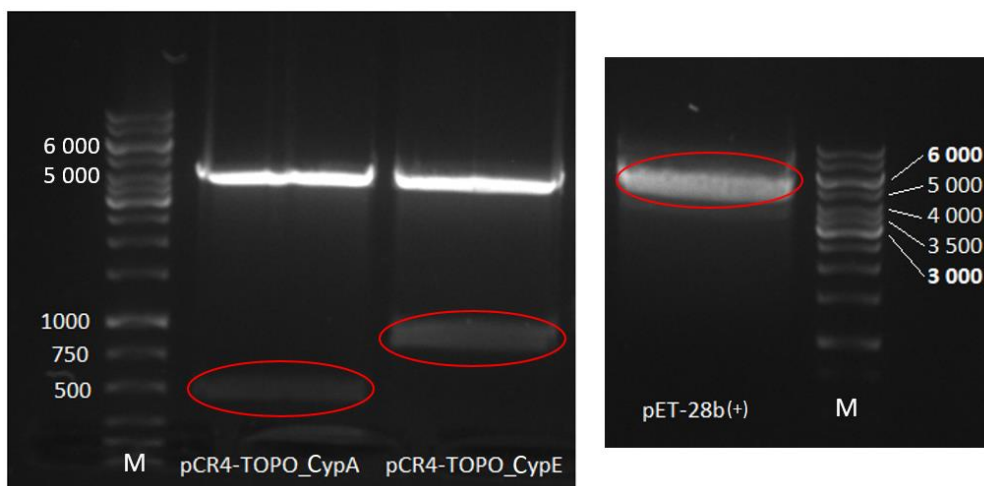
Po restrikci pCR4-TOPO_CypA bychom měli získat DNA odpovídající cDNA CypA, což je 495 bp, a samotnému plazmidu pCR4-TOPO, který má velikost 4 000 bp. Po restrikci pCR4-TOPO_CypE bychom měli získat DNA odpovídající cDNA CypE (903 bp), a pCR4-TOPO (4 000 bp). Po restrikci pET-28b(+) bychom měli získat DNA odpovídající lineárnímu plazmidu pET-28b(+), což je 5 289 bp. Ve všech třech případech (obrázek 11, obrázek 12 a obrázek 13) je velikost DNA odpovídající, a lze říct, že restrikce proběhla úspěšně.



Obrázek 11: Výsledek restrikce pCR4-TOPO_CypA, pCR4-TOPO_CypE a pET-28b(+) pomocí restrikčních endonukleáz XhoI a NdeI, pokus první. pCR4-TOPO_CypA: restrikční směs obsahující pCR4-TOPO_CypA vektor, pCR4-TOPO_CypE: restrikční směs obsahující pCR4-TOPO_CypE vektor, pET-28b(+): restrikční směs obsahující pET-28b(+) vektor, M: marker molekulových hmotností O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder.



Obrázek 12: Výsledek restrikce pCR4-TOPO_CypA, pCR4-TOPO_CypE a pET-28b(+) pomocí restrikčních endonukleáz XhoI a NdeI, pokus druhý. pCR4-TOPO_CypA: restrikční směs obsahující pCR4-TOPO_CypA vektor, pCR4-TOPO_CypE: restrikční směs obsahující pCR4-TOPO_CypE vektor, pET-28b(+): restrikční směs obsahující pET-28b(+) vektor, M: marker molekulových hmotností O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder.



Obrázek 13: Výsledek restrikce pCR4-TOPO_CypA, pCR4-TOPO_CypE a pET-28b(+) pomocí restrikčních endonukleáz XhoI a NdeI, pokus třetí. pCR4-TOPO_CypA: restrikční směs obsahující pCR4-TOPO_CypA vektor, pCR4-TOPO_CypE: restrikční směs obsahující pCR4-TOPO_CypE vektor, pET-28b(+): restrikční směs obsahující pET-28b(+) vektor, M: marker molekulových hmotností O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

Dalším krokem přípravy expresního vektoru je ligace cDNA CypA a CypE do linearizovaného pET-28b(+) vektoru. Nejprve byly izolovány příslušné úseky DNA z gelu a purifikovány pomocí komerčního kitu (2.9.1.6). Pro ligaci je nutné volit přesné množství komponent, proto byla měřena koncentrace izolovaných úseků DNA (2.9.1.7). Postup byl v rámci bakalářské práce opakován 3x a výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 21.

Tabulka 21: Výsledky měření koncentrace cDNA CypA, cDNA CypE a pET-28b(+), izolovaných z gelu po restrikci, pokus první, druhý a třetí.

1. pokus			
Komponenta	CypA	CypE	pET-28b(+)
Koncentrace [ng/μl]	18,715	14,625	38,26
2. pokus			
Komponenta	CypA	CypE	pET-28b(+)
Koncentrace [ng/μl]	21,015	35,525	29,195
3. pokus			
Komponenta	CypA	CypE	pET-28b(+)
Koncentrace [ng/μl]	14,87	16,93	48,59

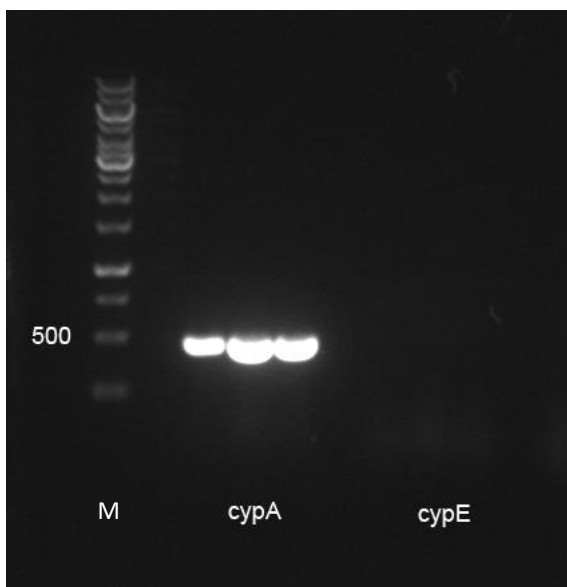
Ligace provedená pomocí T4 DNA ligázy (2.9.1.8) byla následována transfekcí ligační směsi do kompetentních *E.coli* (2.9.1.9) s následnou selekcí buněk, na miskách s LB-agarem obsahujících kanamycin, jehož rezistenci kóduje plazmid pET-28b(+) (2.9.1.10).

V prvním pokusu, kde byla použita T4 DNA ligáza od firmy New England Biolabs a poměr plazmidu a inzertu 1:3 s následnou transformací do kompetentních buněk NEB 10-Beta competent *E.coli*, nebyly na selekčních miskách přítomny žádné kolonie. Vzhledem k tomu, že kritickým krokem postupu je samotná ligace byla ve druhém pokusu změněna ligáza na T4 DNA ligázu Anza od firmy Thermo, která se dodává jako mastermix (je přímo ve vhodném pufru pro ligaci). Také byla prodloužena doba ligace a snížena teplota z laboratorní teploty na 16 °C. Při druhém pokusu rovněž nebyly na selekčních LB-agar miskách přítomny žádné kolonie. Při třetím pokusu byla zachována Anza ligáza, ale na doporučení výrobce, při negativních výsledcích změnit poměr vektor:inzert, byl poměr vektor:inzert změněn z 1:3 na 1:6. Byla také změněna teplota ligace, která se postupně měnila z cca 0 °C (směs vody a ledu) na laboratorní teplotu, jak led přes noc odtával, a pro transformaci byly vybrány kompetentní buňky *E.coli* XL-1. Ve třetím pokusu bylo na selekčních LB-agar miskách s buňkami transfekovanými ligační směsí pET-28b(+) a cDNA CypA přítomno asi 30 kolonií a na selekčních LB-agar miskách s buňkami transfekovanými ligační směsí pET-28b(+) a cDNA CypE přítomno 6 kolonií.

Ověření, zda vyrostlé kolonie obsahují ve vektoru pET-28b(+) cDNA CypA a CypE, proběhlo pomocí PCR reakce (2.9.1.11) s následným elektroforetickým vyhodnocením (2.9.1.12). Primery použité pro PCR reakci shrnuje tabulka 22. Výsledek znázorňuje obrázek 14, a je z něj patrné, že do příslušného vektoru byla úspěšně implementována pouze cDNA CypA, o velikosti 495 bp.

Tabulka 22: Znázornění sekvence primerů, použitých pro PCR reakci z kolonií E.coli XL 1, s vloženým pET-28b(+)_CypA/CypE. Podtržené části jsou sekvence pro restriční endonukleázy.

Primer	Sekvence primeru
FW primer CypA	5'- <u>CATATGGTGA</u> ACCCTACGGTTTTT-3'
RV primer CypA	5'- <u>CTCGAGTCA</u> TTCAGTTGACCACAATCCG-3'
FW primer CypE	5'- <u>CATATGGCTAC</u> GACGAAACGTGTG-3'
RV primer CypE	5'- <u>CTCGAGTCA</u> AACGTA ^T CTCACCACAATCCGG-3'



Obrázek 14: Výsledek agarózové elektroforézy po PCR z kolonií, získaných transformací kompetentních *E.coli* XL-1 ligační směsí, skládající se z pET-28b(+) a kódující sekvence pro CypA, resp. CypE. M: marker molekulových hmotností O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, CypA: vzorek po PCR reakci z kolonie obsahující ligační směs pET-28b(+) a cDNA CypA, CypE: vzorek po PCR reakci z kolonie obsahující ligační směs pET-28b(+) a cDNA CypE.

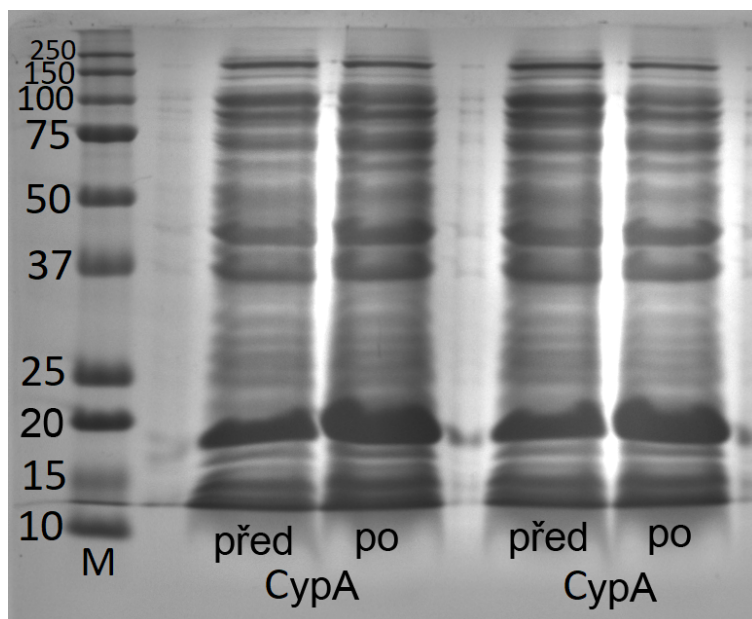
Z důvodu časových možností se s CypE v rámci této bakalářské práci dále nepokračovalo, ale bylo by možné pro úspěšnou ligaci dále upravit poměry vektor:inzert v rozmezí od 1:1 do 1:10, jak udává výrobce, nebo změnit teplotu a dobu ligace, nebo vyzkoušet jiné kompetentní buňky *E.coli*, či použít jiný expresní vektor. Expresní vektory, které by byly vhodné pro použití jsou takové, ve kterých byl již CypE úspěšně exprimován. Patří mezi ně pET-28a [38] nebo PQE30 [39]. Tao Wang a kolektiv také popisují, že při klonování genu cyklofilinu E do vektoru pET-22b(+), mezi restrikční místa XhoI a NdeI, byl získán pouze nerozpustný precipitát, zatímco po vložení genu s přidaným his-tagem do vektoru PQE30, mezi restrikční místa BamHI a HindIII, byl získán rozpustný funkční protein [39].

3.1.2 Transformace pET-28b(+)_CypA do expresních *E.coli* BL-21 (DE3)

Expresní vektor pET-28b(+)_CypA dále musel být vložen do expresních *E.coli* BL-21 (DE3), pro zajištění optimální exprese CypA. Tento kmen *E.coli* byl již použit v několika pracích a prokázal v nich úspěšnou expresi CypA [32, 34, 35]. K transfekci byla potřeba získat dostatečné množství plazmidu pET-28b(+)_CypA, proto byla připravena noční kultura (2.9.1.13), ze které byl plazmid purifikován pomocí komerčního kitu (2.9.2.1). Ověření transformace (2.9.2.3) proběhlo rovněž na selekčních LB-agar miskách s kanamycinem (2.9.2.4), na kterých kolonie vyrostly v hojném počtu. Z toho můžeme usuzovat, že buňky *E.coli* BL-21 (DE3) získaly plazmid pET-28b(+)_CypA, kódující rezistenci na kanamycin (*E.coli* BL-21 (DE3)_pET-28b(+)_CypA).

3.1.3 Indukce exprese CypA

Pro získání cílového rekombinantního proteinu CypA v dostatečném množství, byla z nočních kultur *E.coli* BL-21_pET-28b(+)_CypA (2.9.2.5) připravena 50 ml kultura, u které byla indukována exprese pomocí 0,5 mM IPTG, což je induktor genové exprese z laktózoového promotoru. Indukce byla zahájena po dosažení OD₆₀₀ v kultuře 0,6. Ověření úspěšnosti indukce proběhlo na SDS-PAGE elektroforéze (2.9.3.1), jejíž výsledky znázorňuje obrázek 15. Z obrázku je patrné, že po indukci bylo v buňkách z obou kultur přítomno větší množství proteinu o molekulové hmotnosti cca 18 kDa, což pravděpodobně odpovídá cyklofilinu A (na elektroforéze je jasnější a větší band). Vzhledem k tomu že základní indukce pomocí 0,5 mM IPTG byla úspěšná, bylo možné ze získané pelety *E.coli* BL-21_pET-28b(+)_CypA po indukci purifikovat CypA. I když pro dostatečnou expresi CypA postačovalo použít 0,5 mM IPTG, většina článků zaznamenávala použití 1 mM IPTG [32, 34, 35]. Důvodem použití menšího množství IPTG je fakt, že menší množství exprimovaných eukaryotních proteinů v prokaryotní buňce eliminuje tvorbu inkluzních tělísek, které se pravděpodobně tvoří z důvodu nadměrné exprese eukaryotního, nesprávně sbaleného proteinu [21].

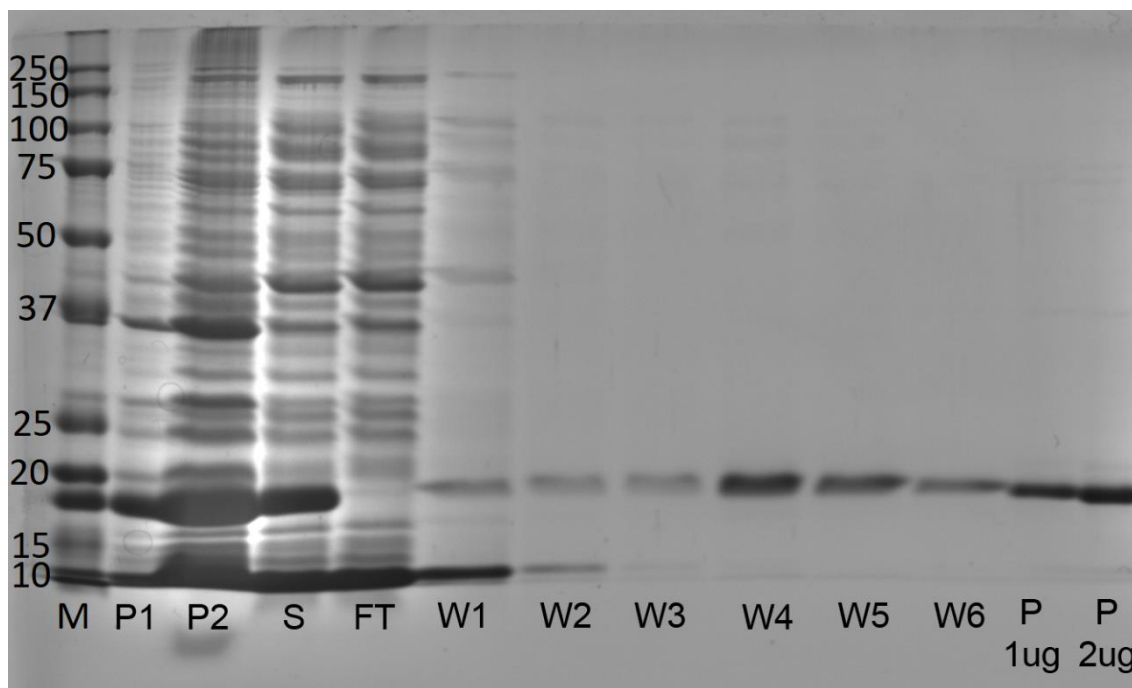


Obrázek 15: Výsledek SDS-PAGE elektroforézy z nočních kultur (CypA1, CypA2) buněk *E.coli* BL-21 obsahujících pET-28b(+)_CypA před a po indukci exprese CypA pomocí IPTG. Před: lyzované buňky *E.coli* BL-21_pET-28b(+)_CypA před indukcí exprese CypA, po: lyzované buňky *E.coli* BL-21_pET-28b(+)_CypA po indukci exprese CypA. M: marker molekulových hmotností Precision Plus Protein Kaleidoscope. Velikost CypA je 18 kDa.

3.1.4 Purifikace CypA

Pro purifikaci proteinu byla využita afinitní chromatografie s pryskyřicí Ni-NTA agarose, která váže proteiny obsahující his-tag, který obsahuje exprimovaný rekombinantní CypA na N-konci řetězce. Jedná se o afinitní chromatografii na bázi nikelnatých iontů, schopných vázat his-tag. Tato metoda chromatografie byla využita pro purifikace již dříve, pomocí pryskyřice His-Trap HP, GE Healthcare Life Science [32]. Vzhledem k tomu, že CypA byl exprimován uvnitř *E.coli* tak bylo třeba buňky nejprve lyzovat (2.9.4.1). Byl zvolen standardní přístup kombinace lysozymu a sonikace. Vzniklý lyzát byl aplikován na afinitní matici pryskyřice Ni-NTA agarose a purifikace byla provedena manuálně s pufru, které doporučuje výrobce této matrice (2.9.4.2).

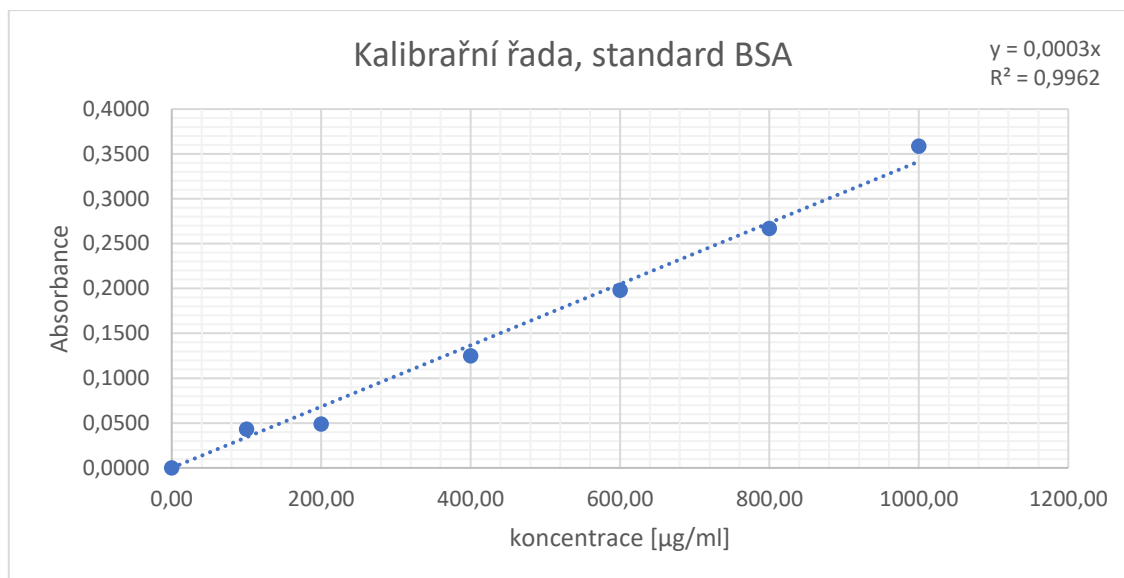
Hlavní úlohu při purifikaci zastával imidazol, schopný z pryskyřice vyvézt proteiny obsahující histidiny, které mají afinitu k této pryskyřici. Obrázek 16 znázorňuje průběh purifikačního procesu, a je z něj zřejmé, že při průtoku supernatantu po lyzi buněk kolonou (FT) byly zachyceny proteiny obsahující histidiny, zvláště pak CypA, který v tomto sloupci zcela chybí (18 kDa). Při promývání kolony 20 mM imidazolem byly z pryskyřice odmyty kontaminující proteiny obsahující histidiny (W1, W2, W3), ale částečně bohužel také CypA. I když se poslední promytí zdá být očištěno od nežádoucích proteinů (W3), je třeba provést promytí ještě s větším množstvím imidazolu, abychom se opravdu zbavili i proteinů, které se váží k pryskyřici Ni-NTA silněji než kontaminanty vymyté 20 mM imidazolem. Je to důležitý krok protože například protein SlyD, přirozeně se vyskytující v *E.coli* má extrémně vysokou petidyl-prolyl izomerázovou aktivitu a má také afinitu k pryskyřici Ni-NTA, protože obsahuje přirozeně více histidinů [70]. Pročištění 40 mM imidazolem sice způsobilo vyvázání dalšího CypA z kolony, ale zároveň lze pozorovat uvolnění dalších nežádoucích proteinů (W4, W5, W6). Nakonec byl CypA eluován 250 mM imidazolem, a ze sloupců P 1 μ g a P 2 μ g je patrné, že byl získán čistý a neobsahující žádné jiné kontaminující proteiny. Čistý CypA byl převeden do vhodného pufru, zakoncentrován (2.9.4.3) a skladován při -20 °C a -80 °C (2.9.4.4).



Obrázek 16: Výsledek SDS-PAGE elektroforézy analyzující purifikační proces rekombinantního CypA. M: marker molekulových hmotností Precision Plus Protein Kaleidoscope, P1: peleta *E.coli* BL-21 (DE3) obsahující pET-28b(+)_CypA po indukci exprese CypA a před lyzí, P2: peleta *E.coli* BL-21 (DE3) obsahující pET-28b(+)_CypA po indukci exprese CypA a po lyzi, S: supernatant po centrifugaci *E.coli* BL-21 (DE3) obsahující pET-28b(+)_CypA po indukci exprese CypA a po lyzi, FT: proteiny nezachycené na pryskyřici po vložení supernatantu „flow-through“, W1-6: proteiny uvolněné při promývání pryskyřice „washing 1-6“, P 1 μ g: zásobní roztok CypA, obsahující 1 μ g CypA a P 2 μ g: zásobní roztok CypA, obsahující 2 μ g CypA.

3.1.5 Stanovení koncentrace CypA

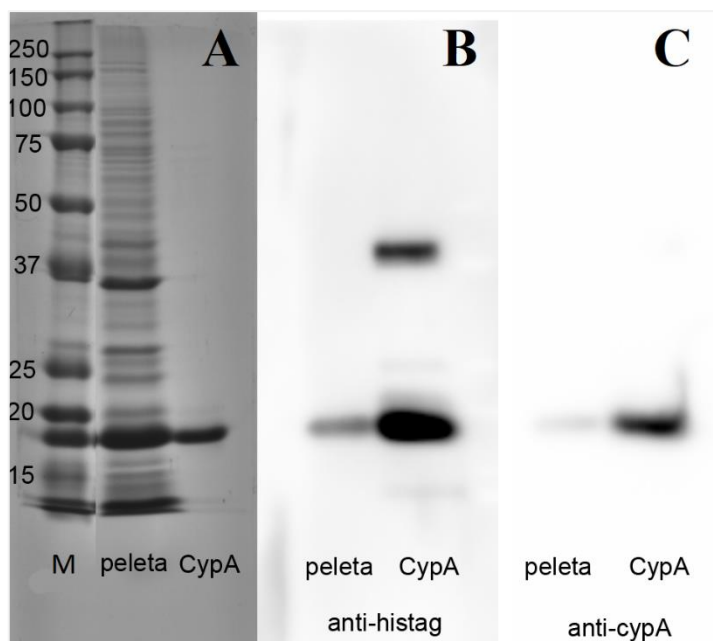
U získaného zásobního roztoku CypA byla změřena koncentrace pomocí kalibrační přímky, metodou BCA (2.9.4.5), jejíž výsledky znázorňuje graf 1. Výsledná koncentrace zásobního roztoku rekombinantního CypA je 1794,9 μ g/ml.



Graf 1: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace čistého CypA pomocí metody BCA, měřená pomocí mikrodestičkového multireaderu.

3.1.6 Ověření identity CypA

Vzhledem k tomu, že elektroforéza ukazuje pouze molekulovou hmotnost čistého proteinu, ze které lze pouze předběžně usuzovat, zda je cílový protein přítomen, je vždy třeba ověřit jeho identitu, což bylo provedeno pomocí metody western-blot (2.9.6). K tomu byly použity dvě různé protilátky, jedna zaměřená na his-tag (anti-HisProbe) a druhá specifická pro CypA (anti-CypA). Výsledky znázorňuje obrázek 17, a je z nich patrné, že protein o molekulové hmotnosti 18 kDa je skutečně CypA, jelikož reagoval specificky s oběma primárními protilátkami. Z výsledků je také vidět, že se CypA vyskytuje jak v peletě před lyzí, tak v čisté frakci. Protilátka specifická pro his-tag také zobrazila protein o velikosti cca 40 kDa v zásobním roztoku CypA. Jedná se nejspíš o nespecifickou interakci, ale jelikož byl zásobní roztok CypA testován na čistotu, je otázkou, zda by tento protein nemohl být dimer cyklofilinu A. Hmotnostně by tento band odpovídal dimeru, a navíc bylo již o existenci dimeru cyklofilinu A diskutováno [40].



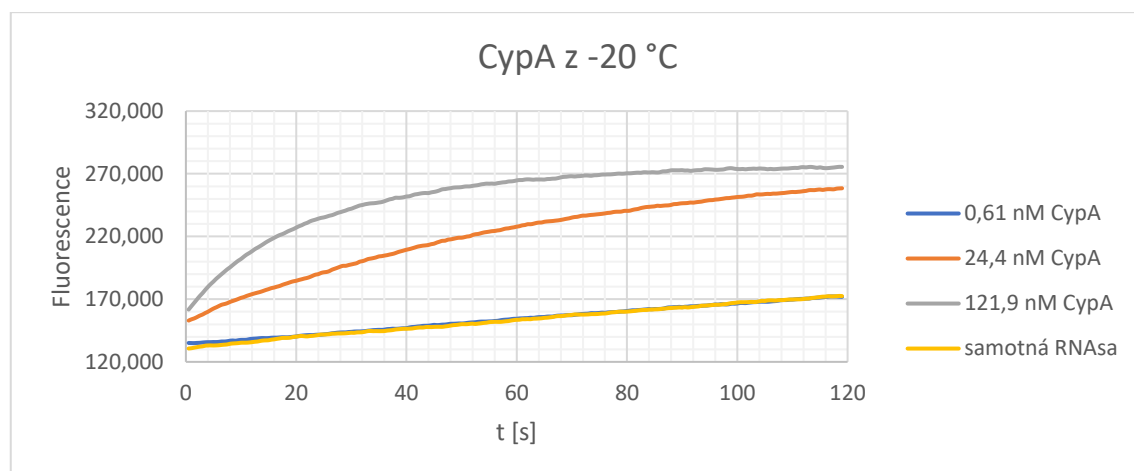
Obrázek 17: Výsledek SDS-PAGE elektroforézy a western-blottu pro zjištění přítomnosti CypA. A: SDS-PAGE elektroforéza, M: marker molekulových hmotností Precision Plus Protein Kaleidoscope, peleta: *E.coli* BL-21 po indukci ITPG, CypA: CypA získaný afinitní purifikací. B: Western-Blotting s použitím protilátky proti his-tagu, peleta: *E.coli* BL-21 po indukci ITPG, CypA: CypA získaný afinitní purifikací. C: Western-Blotting s použitím protilátky proti CypA, peleta: *E.coli* BL-21 po indukci ITPG, CypA: CypA získaný afinitní purifikací.

3.1.7 Měření aktivity CypA

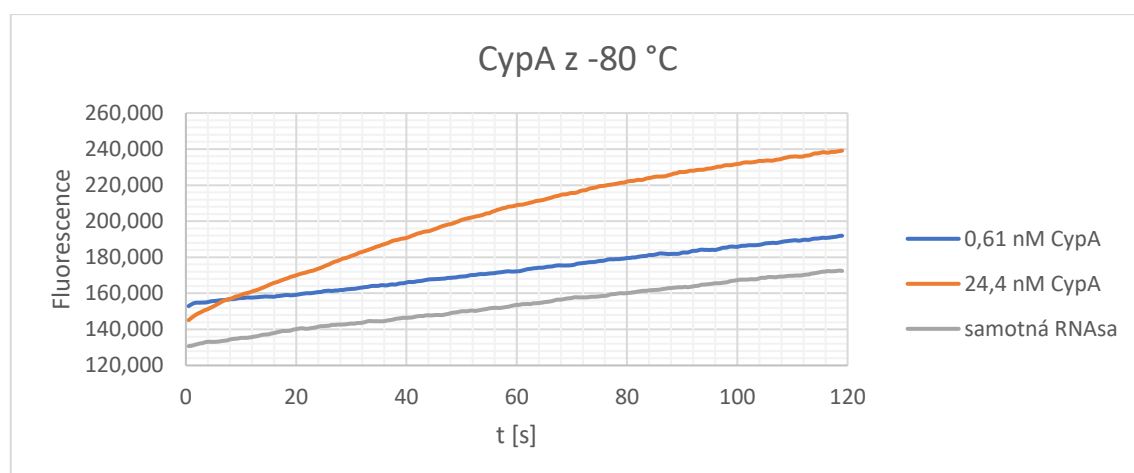
Vzhledem k tomu, že se nám podařilo získat CypA v čisté formě, bylo vhodné zjistit, jestli byl získán také ve formě aktivní. Pro měření aktivity cyklofilinů je možné použít dvě metody. První možnost je metoda, při které se měří vnitřní fluorescence tryptofanu v některých proteinech při refoldingu, který je rychlejší v přítomnosti peptidylprolyl izomeráz, jako jsou cyklofiliny [34, 41, 37, 42]. Druhá možnost je spektrofotometrická metoda, která stanovuje změny způsobené přeměnou cis-trans konformace tetrapeptidu, obsahujícího prolin v přítomnosti chymotrypsinu [33, 34, 36, 41, 42]. V této práci byla zvolena metoda pomocí refoldingu RNázy T1 (2.9.7), která již byla na pracovišti popsána pro mitochondriální cyklofilin D [38]. Podobné metodiky pro určení aktivity CypA byly také popsány pro refolding hovězí pankreatické ribonukleázy A [34] a arginin kinázy [36] tudíž se dá předpokládat jeho aktivita i v refoldingu RNázy T1.

Při stanovení aktivity CypA v refoldingu RNázy T1 byla nejprve měřena aktivita různých koncentrací CypA, skladovaných při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Z měření bylo zjištěno, že optimální koncentrace pro stanovení aktivity CypD (0,61 nM) se u CypA prokázala jako nedostačující [37]. Pro zvýšené množství 24,4 nM a 121,9 nM CypA jsme však již aktivitu byli schopni pozorovat. Výsledky měření znázorňuje graf 2 a graf 3, ze kterých usuzujeme, že pro koncentrace CypA větší než 24,4 nM je reakce příliš rychlá (lineární část grafu je krátká, a pro získání relevantních dat nepřesná) a při koncentraci CypA menší než 24,4 nM se aktivita CypA vytrácí. Z měření byly získány hodnoty specifické aktivity

pro CypA uchovávaný při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, počítané z lineární části grafu, a ty jsou shrnuty v tabulce 23. Z výsledků je patrné, že teplota uskladnění cyklofilinu A nemá výrazný vliv na jeho aktivitu.



Graf 2: Graf znázorňující průběh refoldingu $1,25\text{ }\mu\text{M}$ RNázy T1 bez přítomnosti (samotná RNáza) a v přítomnosti různých množství CypA ($0,61\text{ nM}$, $24,4\text{ nM}$, $121,9\text{ nM}$), uchovaného při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Měřeno pomocí fluorescenčního spektrofotometru při $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, excitační vlnová délka 268 nm a emisní vlnová délka 325 nm .

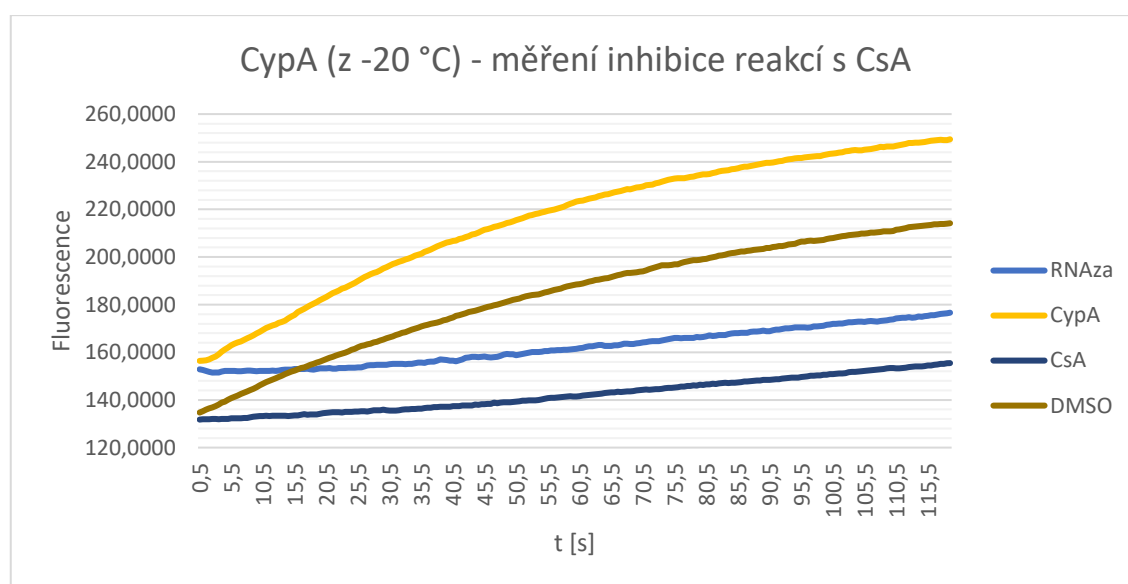


Graf 3: Graf znázorňující průběh refoldingu $1,25\text{ }\mu\text{M}$ RNázy T1 bez přítomnosti (samotná RNáza) a v přítomnosti různého množství CypA ($0,61\text{ nM}$, $24,4\text{ nM}$), uchovaného při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Měřeno pomocí fluorescenčního spektrofotometru při $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, excitační vlnová délka 268 nm a emisní vlnová délka 325 nm .

Tabulka 23: Výsledky měření aktivity CypA, skladovaného při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, pomocí refoldingové aktivity RNázy T1, při které byla měřena hodnota vnitřní fluorescence tryptofanu RNázy T1.

	Koncentrace [nM]	Použitá lineární oblast grafu [s]	Specifická aktivita [$\Delta\text{F}/\text{min}/\text{ng}$]
CypA ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)	24,4	6,5 – 28,5	0,36
CypA ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)	24,4	6 – 42	0,24

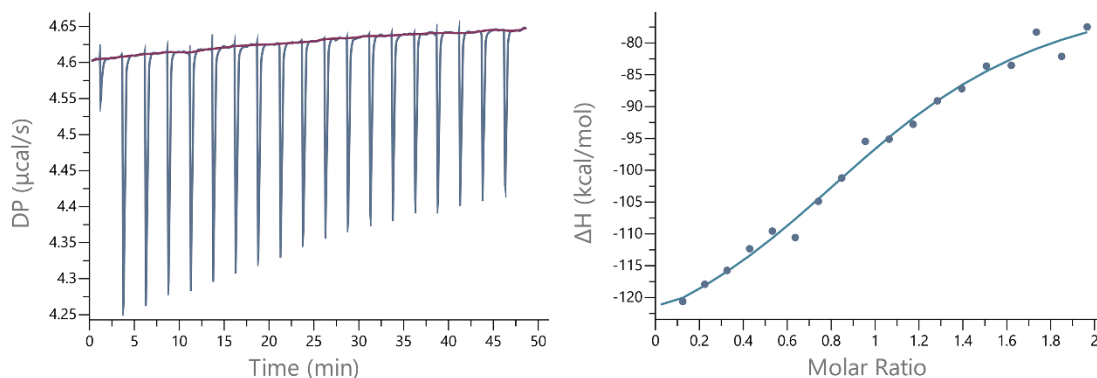
Následně byla měřena schopnost inhibice cyklofilinu A pomocí cyklosporinu A (2.9.8). Výsledky měření znázorňuje graf 4, ve kterém lze vidět, že přítomnost 2 μM CsA v reakci vedla k zablokování izomerázové aktivity enzymu, což byl očekávaný výsledek, protože CsA je popsán jako inhibitor CypA [33]. Inhibice izomerázové aktivity cyklofilinu A byla za těchto podmínek stoprocentní. Tím byla také vyloučena přítomnost, a tudíž i příspěvek k refoldingové aktivitě, peptidylprolyl izomerázy SlyD, která se přirozeně nachází v *E.coli*, a která by mohla být přítomna v zásobním roztoku CypA. Tento enzym totiž patří do skupiny FKBP, tudíž by nebylo možné ho inhibovat pomocí cyklosporinu A [42]. Měřením kontrolního vzorku v přítomnosti DMSO byla rovněž vyloučena inhibice aktivity CypA, která by mohla být způsobena rozpouštědlem, ve kterém se CsA nacházel. Obecně lze tedy potvrdit, že se podařilo připravit čistý CypA v aktivní formě.



Graf 4: Graf znázorňující průběh refoldingu 1,25 μM RNázy T1 bez přítomnosti (RNáza), a v přítomnosti 24,38 nM CypA (CypA), 24,38 nM CypA a 1,9 μM CsA (CsA) a v přítomnosti 0,1 M DMSO (DMSO). Měřeno pomocí fluorescenčního spektrofotometru při 10 $^{\circ}\text{C}$, excitační vlnová délka 268 nm a emisní vlnová délka 325 nm.

Vzhledem k omezenému množství RNázy na pracovišti nebylo možné změřit stejnou metodou poloviční inhibici CypA (IC_{50}) a disociační konstantu (K_D) vazby CypA-CsA. Proto byla použita jiná metoda pro stanovení síly interakce mezi CypA a CsA, kterou byla izotermální titrační kalometrie (ITC). Měření K_D CypA-CsA pomocí ITC již bylo dříve uskutečněno [33, 43]. Výsledky našeho měření znázorňuje obrázek 18. Postup stanovení byl velmi podobný s měřením, provedeným skupinou Sebastianem Daumem a kolektivem, jejichž měření probíhalo v pufru 35 mM HEPES (pH 7.8), obsahujícího 0,1 % DMSO. V jejich práci bylo do 2 μM roztoku CsA přidáváno 300 μl 20 μM roztoku CypA, přidávaného po 15 μl , a měření probíhalo při 293 K (20 $^{\circ}\text{C}$) [33]. Pro naše měření byl použit pufr 50 mM Tris, 150 mM NaCl a 30 % glycerolu (pH 7,4), obsahující 0,1 %

DMSO. Do roztoku 2 μM CsA byl přidáván roztok 20 μM CypA po 2 μl přidavcích, a měření probíhalo při 20 $^{\circ}\text{C}$. V postupu byl tedy zaměněn pouze pufr a objem přidavků roztoku CypA, vzhledem k rozměrům měrné cely. Z našeho měření a z předchozího měření Sebastianem Daumem a kolektivem byly získány podobné hodnoty K_D , které v našem experimentu vyšly $K_D = 4,63 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ a v publikaci Sebastiana Dauma a kolektivu $K_D = 4 \pm 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ [33].



Obrázek 18: Výsledky měření tepelného zabarvení interakce cyklofilinu A s cyklosporinem A pomocí izotermální titrační kalorimetrie. (A) Surová data (B) vyhodnocení poměru reakční entalpie na koncentraci CypA.

4 Závěr

Z původního vektoru pCR4-TOPO_CypA a pCR4-TOPO_CypE obsaženého v *E.coli*, byla úspěšně přenesena do expresního vektoru pET-28b(+) pouze cDNA cyklofilinu A. Problém při vytvoření pET-28b(+)_CypE mohl nastat při ligaci, nebo transformaci ligační směsi do buněk *E.coli*. Úspěšně připravený vektor pET-28b(+)_CypA byl následně transformován do expresních bakterií *E.coli* XL-1, zajišťujících expresi cyklofilinu A. Čistý protein byl získán pomocí afinitní chromatografie ve vysoké čistotě, zbavený všech nežádoucích proteinů s výslednou koncentrací zásobního roztoku CypA 1794,9 µg/ml. Pomocí metodiky refoldingu RNázy T1 bylo ověřeno, že získaný CypA je aktivní a inhibovatelný pomocí CsA. Aktivita cyklofilinu A byla měřena pro dvě teploty uskladnění, a to pro -20 °C a -80 °C. CypA z -20 °C vykazoval aktivitu 0,36 ΔF/min/ng a CypA z -80 °C vykazoval aktivitu 0,24 ΔF/min/ng. Inhibice CypA pomocí 2 µM CsA proběhla ze 100 %, proto byla dále měřena disociační konstanta vazby CypA-CsA, která byla rovna $K_D = 4,63 \cdot 10^{-7}$ M, což odpovídá dříve publikované literatuře. Připravený cyklofilin A je dobrým začátkem pro testy *in vitro*, které by mohly poskytnout nové poznatky o struktuře, vazebných podmínkách nebo nových, silných, selektivních inhibitorech.

Seznam literatury

- [1] DAVIS, Tara L., John R. WALKER, Valérie CAMPAGNA-SLATER, Patrick J. FINERTY, Ragika PARAMANATHAN, Galina BERNSTEIN, Farrell MACKENZIE, Wolfram TEMPEL, Hui OUYANG, Wen Hwa LEE, Elan Z. EISENMESSER, Sirano DHE-PAGANON. Structural and Biochemical Characterization of the Human Cyclophilin Family of Peptidyl-Prolyl Isomerases. *PLoS Biology* [online]. 2010, **8**(7) [cit. 2019-10-09]. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000439. ISSN 1545-7885.
- [2] LIN, Weilin, Malte BONIN, Annett BODEN, Robert WIEDUWILD, Priyanka MURAWALA, Martin WERMKE, Helena ANDRADE, Martin BORNHÄUSER, Yixin ZHANG. Peptidyl prolyl cis/trans isomerase activity on the cell surface correlates with extracellular matrix development. *Communications Biology* [online]. 2019, **2**(1) [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.1038/s42003-019-0315-8. ISSN 2399-3642.
- [3] SHAW, Peter E. Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO reports* [online]. 2002, **3**(6), 521-526 [cit. 2020-03-15]. DOI: 10.1093/embo-reports/kvf118. ISSN 1469-221X.
- [4] KOUR, Divjot, Kusam Lata RANA, Sapna THAKUR, Sushma SHARMA, Neelam YADAV, Ali A. RASTEGARI, Ajar Nath YADAV a Anil Kumar SAXENA. Disruption of Protease Genes in Microbes for Production of Heterologous Proteins. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 35-75 [cit. 2020-03-14]. DOI: 10.1016/B978-0-444-63503-7.00003-6. ISBN 9780444635037.
- [5] RAJIV, Caroline a Tara L. DAVIS. Structural and Functional Insights into Human Nuclear Cyclophilins. *Biomolecules* [online]. 2018, **8**(4) [cit. 2019-10-09]. DOI: 10.3390/biom8040161. ISSN 2218-273X.
- [6] CHATTERJI, Udayan, Michael BOBARDT, Suganya SELVARAJAH, Feng YANG, Hengli TANG, Noayo SAKAMOTO, Gregoire VUAGNIAUX, Tanya PARKINSON, Philippe GALLAY. The Isomerase Active Site of Cyclophilin A Is Critical for Hepatitis C Virus Replication. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2009, **284**(25), 16998-17005 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.1074/jbc.M109.007625. ISSN 0021-9258.
- [7] RUSSI, Silvia, Ana GONZÁLEZ, Lillian R. KENNER, Daniel A. KEEDY, James S. FRASER a Henry VAN DEN BEDEM. Conformational variation of proteins at room temperature is not dominated by radiation damage. *Journal of Synchrotron Radiation* [online]. 2017, **24**(1), 73-82 [cit. 2020-03-12]. DOI: 10.1107/S1600577516017343. ISSN 1600-5775.

- [8] SCHIENE-FISCHER, Cordelia, Tobias AUMÜLLER a Gunter FISCHER. Peptide Bond cis/trans Isomerases: A Biocatalysis Perspective of Conformational Dynamics in Proteins. JACKSON, Sophie, ed. *Molecular Chaperones* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, 2011-5-20, s. 35-67 [cit. 2020-03-04]. Topics in Current Chemistry. DOI: 10.1007/128_2011_151. ISBN 978-3-642-34551-7.
- [9] SCHMID, Franz X., Lorenz M. MAYR, Matthias MUCKE a E.Ralf SCHONBRUNNER. Prolyl Isomerases: Role in Protein Folding. *Accessory Folding Proteins* [online]. Elsevier, 1993, 1993, s. 25-66 [cit. 2020-04-21]. Advances in Protein Chemistry. DOI: 10.1016/S0065-3233(08)60563-X. ISBN 9780120342440.
- [10] WEDEMEYER, William J., Ervin WELKER a Harold A. SCHERAGA. Proline Cis-Trans Isomerization and Protein Folding †. *Biochemistry* [online]. 2002, **41**(50), 14637-14644 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1021/bi020574b. ISSN 0006-2960.
- [11] GUBA, Markus, Christian GRAEB, Karl-Walter JAUCH a Edward K. GEISSLER. PRO- AND ANTI-CANCER EFFECTS OF IMMUNOSUPPRESSIVE AGENTS USED IN ORGAN TRANSPLANTATION. *Transplantation* [online]. 2004, **77**(12), 1777-1782 [cit. 2020-04-21]. DOI: 10.1097/01.TP.0000120181.89206.54. ISSN 0041-1337.
- [12] ZHOU, Daijun, Qiang MEI, Jintao LI a Haiyang HE. Cyclophilin A and viral infections. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2012, **424**(4), 647-650 [cit. 2019-10-09]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.024. ISSN 0006291X.
- [13] AN, Ping, Li Hua WANG, Holli HUTCHESON-DILKS, George NELSON, Sharyne DONFIELD, James J GOEDERT, Charles R RINALDO, Susan BUCHBINDER, Gregory D KIRK, Stephen J O'BRIEN, Cheryl A WINKLER. Regulatory Polymorphisms in the Cyclophilin A Gene, PPIA, Accelerate Progression to AIDS. *PLoS Pathogens* [online]. 2007, **3**(6) [cit. 2020-02-26]. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030088. ISSN 1553-7374.
- [14] LAMMERS, Michael, Heinz NEUMANN, Jason W CHIN a Leo C JAMES. Acetylation regulates Cyclophilin A catalysis, immunosuppression and HIV isomerization. *Nature Chemical Biology* [online]. 2010, **6**(5), 331-337 [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.1038/nchembio.342. ISSN 1552-4450.
- [15] REIN, Theo. Peptidylprolyl isomerases, Protein Folders, or Scaffolders? The Example of FKBP51 and FKBP52. *BioEssays* [online]. 2020, **42**(7) [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1002/bies.201900250. ISSN 0265-9247.
- [16] SATOH, Kimio, Hiroaki SHIMOKAWA a Bradford C. BERK. Cyclophilin A. *Circulation Journal* [online]. 2010, **74**(11), 2249-2256 [cit. 2020-04-26]. DOI: 10.1253/circj.CJ-10-0904. ISSN 1346-9843.

- [17] OBCHOEI, Sumalee, Sopit WONGKHAN, Chaisiri WONGKHAM, Min LI, Qizhi YAO, Changyi CHEN. Cyclophilin A: potential functions and therapeutic target for human cancer. *Med Sci Monit* [online]. 2009, **15**(11), RA221–RA232 [cit. 2020-06-16]. PMID: 19865066
- [18] Joint Center for Structural Genomics (JCSG) a Partnership for T-Cell Biology (TCELL). *Crystal structure of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E (PPIE) from Homo sapiens at 2.50 Å resolution* [online]. 2011-11-16 [cit. 2020-06-20]. DOI: 10.2210/pdb3UCH/pdb. Dostupné z: <http://www.rcsb.org/structure/3UCH>
- [19] HOM, Robert A., Pei-Yun CHANG, Siddhartha ROY, Catherine A. MUSSELMAN, Karen C. GLASS, Anna I. SELEZNEVA, Or GOZANI, Rustem F. ISMAGILOV, Michael L. CLEARY a Tatiana G. KUTATELADZE. Molecular Mechanism of MLL PHD3 and RNA Recognition by the Cyp33 RRM Domain. *Journal of Molecular Biology* [online]. 2010, **400**(2), 145-154 [cit. 2020-06-21]. DOI: 10.1016/j.jmb.2010.04.067. ISSN 00222836.
- [20] MI, Huaifeng, Oliver KOPS, Esther ZIMMERMANN, Anja JÄSCHKE a Maximilian TROPSCHUG. A nuclear RNA-binding cyclophilin in human T cells. *FEBS Letters* [online]. 1996, **398**(2-3), 201-205 [cit. 2020-06-19]. DOI: 10.1016/S0014-5793(96)01248-3. ISSN 00145793.
- [21] KŘUPKA, P. *Příprava a purifikace rekombinantních proteinů*. Olomouc, 2011. Dizertační práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Fakulta lékařská. Vedoucí dizertační práce Prof. MUDr. Evžen Weigl, CSc. [Theses]
- [22] KODÍČEK, M. *Bílkoviny rekombinantní. Z Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2020-04-22]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=bilkoviny_rekombinantni
- [23] NATARO, James P. a James B. KAPER. Diarrheagenic Escherichia coli. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1998, **11**(1), 142-201 [cit. 2020-05-04]. DOI: 10.1128/CMR.11.1.142. ISSN 1098-6618.
- [24] KAPER, James B., James P. NATARO a Harry L. T. MOBLEY. Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2004, **2**(2), 123-140 [cit. 2020-06-23]. DOI: 10.1038/nrmicro818. ISSN 1740-1526.
- [25] RŮČKOVÁ, Eva, Petr MÜLLER a Bořivoj VOJTĚŠEK. Protein Expression and Purification. *Klinická onkologie* [online]. 2014, **27**(Suppl 1), S92-S98 [cit. 2020-06-23]. DOI: 10.14735/amko20141S92. ISSN 0862495X.

- [26] CHOI, J. H. a S. Y. LEE. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2004, **64**(5), 625-635 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1007/s00253-004-1559-9. ISSN 0175-7598.
- [27] DVOŘÁK, T. *Monitorování úspěšnosti transfekce buněčné linie 293 HEK*. Brno, 2011. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí diplomové práce Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D. [VUT]
- [28] ŠMÍD, J. *Vývoj protokolu pro transientní transfekci buněčné linie HEK293 EBNA1*. Brno, 2009. Diplomová práce. Vysoké učení technické, Fakulta chemická. Vedoucí diplomové práce Mgr. Mojmír Ševčík, Ph.D. [VUT]
- [29] ZEMEK, O. *Purifikace rekombinantních proteinů pomocí afinitní chromatografie*. Praha, 2010. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Fakulta přírodovědecká. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Jaroslav Mácha. [IS.cuni]
- [30] BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 1999, **10**(5), 411-421 [cit. 2020-07-16]. DOI: 10.1016/S0958-1669(99)00003-8. ISSN 09581669.
- [31] HÁJEK, D. *Využití chaperonů v přípravě medicíně významných rekombinantních proteinů*. Pardubice, 2017. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fkulta chemicko-technologická. Vedoucí bakalářské práce RNDr, Olga Heidingsfeld, CSc. [UPCE]
- [32] CAPORALE, Andrea, Fabiola MASCANZONI, Biancamaria FARINA, Mattia STURLESE, Gianluigi DI SORBO, Roberto FATTORUSSO, Menotti RUVO a Nunzianna DOTI. FRET-Protease-Coupled Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase Assay. *Journal of Biomolecular Screening* [online]. 2016, **21**(7), 701-712 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1177/1087057116650402. ISSN 1087-0571.
- [33] DAUM, Sebastian, Michael SCHUMANN, Sebastian MATHEA, Tobias AUMÜLLER, Molly A. BALSLEY, Stephanie L. CONSTANT, Boris FÉAUX DE LACROIX, Fabian KRUSKA, Manfred BRAUN, Cordelia SCHIENE-FISCHER. Isoform-Specific Inhibition of Cyclophilins. *Biochemistry* [online]. 2009, **48**(26), 6268-6277 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1021/bi9007287. ISSN 0006-2960.
- [34] XU, L.-R., X. YAN, M. LUO, Y.-X. GUAN a S.-J. YAO. Preparation, Characterization and Refolding in Vitro of a Recombinant Human Cyclophilin A Mutant: Effect of a Single Pro/Ser Substitution on Cyclophilin A Structure and Properties. *Biotechnology Progress* [online]. 2008, **24**(2), 302-310 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1021/bp070259m. ISSN 8756-7938.

- [35] WEAR, Martin A., Alan PATTERSON, Kirk MALONE, Colin DUNSMORE, Nicholas J. TURNER a Malcolm D. WALKINSHAW. A surface plasmon resonance-based assay for small molecule inhibitors of human cyclophilin A. *Analytical Biochemistry* [online]. 2005, **345**(2), 214-226 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1016/j.ab.2005.06.037. ISSN 00032697.
- [36] ZHANG, Xin-Chao, Wei-Dong WANG, Jin-Song WANG a Ji-Cheng PAN. PPIase independent chaperone-like function of recombinant human Cyclophilin A during arginine kinase refolding. *FEBS Letters* [online]. 2013, **587**(6), 666-672 [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.01.028. ISSN 00145793.
- [37] ZEMANOVA, Lucie, Michaela VASKOVA, Monika SCHMIDT, Jana ROUBALOVA, Annamaria HALECKOVA, Ondrej BENEK a Kamil MUSILEK. RNase T1 Refolding Assay for Determining Mitochondrial Cyclophilin D Activity: A Novel In Vitro Method Applicable in Drug Research and Discovery. *Biochemistry* [online]. 2020, **59**(17), 1680-1687 [cit. 2020-06-22]. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b01025. ISSN 0006-2960.
- [38] DAVIS, Tara L., John R. WALKER, Valérie CAMPAGNA-SLATER, Patrick J. FINERTY JR, Ragika PARAMANATHAN, Galina BERNSTEIN, Farrell MACKENZIE, Wolfram TEMPEL, Hui OUYANG, Wen Hwa LEE, Elan Z. EISENMESSER, Sirano DHE-PAGANON. Structural and Biochemical Characterization of the Human Cyclophilin Family of Peptidyl-Prolyl Isomerases. *PLoS Biology* [online]. 2010, **8**(7) [cit. 2020-06-22]. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000439. ISSN 1545-7885.
- [39] WANG, Tao, Cai-Hong YUN, Shen-Yan GU, Wen-Rui CHANG a Dong-Cai LIANG. 1.88Å crystal structure of the C domain of hCyP33: A novel domain of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2005, **333**(3), 845-849 [cit. 2020-07-15]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.06.006. ISSN 0006291X.
- [40] ZHANG, Xin-Chao, Wei-Dong WANG, Jin-Song WANG, Ji-Cheng PAN a Guo-Lin ZOU. Evidences of Monomer, Dimer and Trimer of Recombinant Human Cyclophilin A. *Protein & Peptide Letters* [online]. 2011, **18**(12), 1188-1193 [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.2174/092986611797642670. ISSN 09298665.
- [41] SCHOLZ, Christian, Thomas SCHINDLER, Kara DOLINSKI, Joseph HEITMAN a Franz X. SCHMID. Cyclophilin active site mutants have native prolyl isomerase activity with a protein substrate. *FEBS Letters* [online]. 1997, **414**(1), 69-73 [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00979-4. ISSN 00145793.
- [42] SCHOLZ, Christian, Peter MAIER, Kara DOLINSKI, Joseph HEITMAN a Franz X SCHMID. R73A and H144Q mutants of the yeast mitochondrial cyclophilin Cpr3 exhibit a low prolyl isomerase activity in both peptide and protein-folding assays. *FEBS Letters* [online]. 1999, **443**(3), 367-369 [cit. 2020-07-09]. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)01735-9. ISSN 00145793.

[43] FARINA, Biancamaria, Gianluigi DI SORBO, Angela CHAMBERY, Andrea CAPORALE, Guido LEONI, Rosita RUSSO, Fabiola MASCANZONI, Domenico RAIMONDO, Roberto FATTORUSSO, Menotti RUVO a Nunzianna DOTI. Structural and biochemical insights of CypA and AIF interaction. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1) [cit. 2020-06-26]. DOI: 10.1038/s41598-017-01337-8. ISSN 2045-2322.