

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Příprava rekombinantního inhibitoru serinových
proteáz z klíštěte *Ixodes ricinus***

Bakalářská práce

Ivana Pokorná

Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.
Školitel specialista: RNDr. Jiří Salát Ph.D.
Školitel specialista: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2012

Pokorná, I., 2012: Příprava rekombinantního inhibitoru serinových proteáz z klíštěte *Ixodes ricinus*. [Preparation of recombinant inhibitor of serine proteases from the tick *Ixodes ricinus*. Bc. Thesis, in Czech.] – 45 p., Faculty of Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tick serine protease inhibitors could be important anti-tick vaccines targets because of their properties and functions. The aim of this work was to prepare recombinant inhibitor of serine proteases from the tick *Ixodes ricinus* in baculovirus expression system. Two tick saliva proteins of the serpine superfamily were selected for this purpose and transformed into plasmids. One recombinant protein was expressed in baculovirus expression system, purified and its biochemical analyses were done.

Tato bakalářská práce byla financována granty:

MŠMT: Centrum molekulární ekologie vektorů a patogenů LC 06009

P207/10/2183 GAČR – Strukturní proteomika proteolytických systémů klíšťat

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Ivana Pokorná

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především mému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za zadání zajímavé bakalářské práce, ochotu vždy poradit a za cenné rady. Dále chci poděkovat mým školitelům – specialistům: RNDr. Jiřímu Salátovi Ph.D. a RNDr. Jindřichovi Chmelařovi, Ph.D. za jejich odborné vedení, ochotu a trpělivost v průběhu celé mé práce. Můj velký dík také patří RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc., Michalisovi Kotsyfakisovi Ph.D., Mgr. Jaroslavě Lieskovské, Ph.D., Mgr. Veronice Dorňákové, Evě Výletové a všem dalším, jenž mi s touto bakalářskou prací ochotně pomohli a vytvořili příjemné pracovní prostředí.

V neposlední řadě chci poděkovat mé rodině a Martínkovi za jejich podporu.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Klíště <i>Ixodes ricinus</i>	1
1.2 Obsah slin klíšťat.....	2
1.3 Charakteristika inhibitorů serinových proteáz.....	3
1.4 Inhibitory serinových proteáz ve slinách klíšťat	3
1.5 Inhibitory serinových proteáz ve slinách klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	4
2. Metody.....	7
2.1 PCR amplifikace.....	7
2.2 Purifikace amplifikovaných úseků DNA.....	8
2.3 Klonování amplifikované DNA pomocí klonovacího vektoru.....	9
2.4 Transformace	10
2.5 Purifikace plazmidové DNA	12
2.6 Sekvence	12
2.7 Transfekce hmyzích buněk Sf9	12
2.8 Amplifikace viru.....	13
2.9 Exprese a purifikace proteinu IRS-1 HT	13
2.10 Biochemická analýza.....	19
3. Výsledky.....	22
3.1 PCR amplifikace.....	22
3.2 Klonování amplifikované DNA a transformace.....	22
3.3 Transfekce hmyzích buněk Sf9 a amplifikace viru	25
3.4 Exprese a purifikace proteinu IRS-1 HT	25
3.5 Biochemická analýza proteinu IRS-1 HT.....	30
3.6 Skladování proteinu IRS-1 HT	31
4. Diskuze	33
5. Závěr.....	36
6. Literatura	37
7. Příloha.....	42
7.1 Sekvence serpinů převzatých z genové banky NCBI.....	42
7.2 Záznam průběhu filtrace na kobaltové koloně	44

1. Úvod

Je známo přibližně 850 druhů klíšťat vyskytujících se na všech kontinentech s výjimkou Antarktidy. Klíšťata jsou ektoparazité obratlovců. Živí se pouze krví a patří mezi nejvýznamnější vektory nemocí přenášených na lidi a zvířata na celém světě.

Rozděluje je do dvou hlavních skupin: Ixodidae a Argasidae. Všechna klíšťata mají tři vývojová stádia – larvu, nymfu a dospělce. Klíšťata žijí relativně dlouho a většina z nich dokáže přežít i více jak rok bez příjmu potravy.

Čeď Ixodidae čítá přes 200 druhů. Rozmnožování probíhá na hostiteli. Nejčastěji parazitují na malých savcích (Goodman a kol., 2005).

1.1 Klíště *Ixodes ricinus*

Klíště *Ixodes ricinus* je roztoč, patří do čeledi Ixodidae, podčeledi Ixodinae a řádu Ixodida. Je přenašečem patogenů, jako například viru klíšťové encefalitidy nebo bakterií *Borrelia burgdorferi* sensu lato způsobující Lymfskou boreliózu.

Parazituje na suchozemských obratlovcích. Larvy sají na ptácích, savcích a plazech, nymfy pak na větších obratlovcích a dospělci (samice) na větších savcích. Životní cyklus trvá přibližně 2 – 3 roky. Je rozšířené v mírném pásmu Evropy a v Asii. (Goodman a kol., 2005).

I ve vyšších nadmořských výškách (kolem 900 m. n. m.) je zdokumentován jeho výskyt a také výskyt nemocí, jež přenáší (Danielová a kol., 2006).

Klíště, patogen a hostitel spolu navzájem interagují. Patogen je přenášen z klíštěte na hostitele. Hostitel proti klíštěti uplatňuje vrozenou i adaptivní imunitu, působí proti němu i hemostázou a zánětem. Klíště proti hostiteli působí souborem imunomodulačních opatření (Wikel a Bergman, 1997, Nuttall a kol., 2000, Francischetti a kol., 2009).

Pro porozumění tomu, jak přesně klíšťata sají, jak dochází k přenosu patogenů i jak vyrobit vakcínu proti klíšťatům je třeba dokonale pochopit imunobiologii vztahu hostitel – klíště. Pokroky v imunobiologii klíšťat vedly k identifikaci proteinů slinných žláz, jež interagují s hostitelským imunitním systémem (Brossard a Wikell, 2004).

1.2 Obsah slin klíšťat

Sliny sekretované slinnými žlázami klíšťat mají potencionální antikoagulační, vazodilatační a protizánětlivé účinky, protože obsahují rozmanité proteiny, jež rozšiřují krevní cévy, ovlivňují účinek histaminu hostitele, potlačují zánět a působí proti imunoglobulinům hostitele. (Goodman a kol., 2005; Ribeiro a Francischetti, 2003).

Látky obsažené ve slinách klíšťat například inhibují produkci prozánětlivých cytokinů jako je TNF α a IL-1, blokuje aktivaci komplementu a ovlivňují buňky imunitního systému (Wikel a Bergman, 1997).

Sliny klíšťat a extrakt ze slinných žláz umožňují takzvaný „slinami aktivovaný přenos“. Zjistilo se, že usnadňují přenos patogenů z klíštěte na hostitele (Nuttall a kol., 2000). Patogeny zřejmě využívají imunomodulačních vlastností slin klíšťat. Tento jev byl poprvé zaznamenán u Thogoto viru a byl nazván SAT (Saliva Activated Transmission) (Jones a kol., 1989; Jones a kol., 1992). Sliny klíšťat jsou důležité při takzvaném nevíremickém přenosu, kdy i když v krvi hostitele nebyl zjištěn virus, tak i přesto se neinfikovaná klíšťata sající s infikovanými nakazí tímto virem (Jones a kol., 1992). Salp 15, inhibující proliferaci Th (CD4+) lymfocytů, byl první molekulou, u níž se prokázala spojitost se SAT (Anguita a kol., 2002).

Obsah slin tvoří také velké množství proteinů a bioaktivních lipidů. O většině proteinů není známo, jakou mají funkci (pouze u přibližně 5 % byla zjištěna jejich funkce) (Francischetti a kol., 2009).

Vůbec první protein z klíštěcích slin byl získán z klíštěte *Ornithodoros moubata*. Peptid nazvaný TAP (tick anti-coagulant peptide), složený ze 60 aminokyselinových zbytků, měl antikoagulační vlastnosti – s vysokou specifitou inhiboval faktor Xa – enzym koagulační kaskády (Waxman a kol., 1990). Následovaly objevy dalších proteinů klíštěcích slin.

Pokud se ve velkém množství proteinů a jejich rodin zaměříme pouze na rodiny obsahující domény inhibující proteázy, zjistíme, že do této domény patří 8 dalších domén, mimo jiné například rodina inhibitorů serinových proteáz (serpiny) nebo cysteinové proteinázové inhibitory (cystatiny) (Francischetti a kol., 2009).

1.3 Charakteristika inhibitorů serinových proteáz

Serpiny jsou největší nadrodina proteinových inhibitorů (Irving a kol., 2000). Lze je nalézt u širokého spektra organismů (bakterie, archea, eukaryota, viry) (Irving a kol., 2000; Silverman a kol., 2001). Samotné slovo serpin je odvozeno od počátečních písmen slov: **Ser**in **P**rotease **I**nhibitor (Gettins, 2002). Serpiny se účastní regulací procesů jako je srážení krve, diferenciací buněk, fibrinolýza, transport hormonů, zánětlivá odpověď, patogenita virů a parazitů a mnoha dalších (Potempa a kol., 1994).

Ne všechny serpiny fungují jako inhibitory serinových proteáz – mohou například vykonávat funkci transportních proteinů (Hammond a kol., 1987). Většina serpinů hraje roli v regulačních procesech. Mutace serpinů může způsobit například poruchy srážení krve, cirhózu nebo demenci (Irving a kol., 2000).

Serpiny s proteázami interagují v místě smyčky tvořené 30-40 aminokyselinami, nazývané také reaktivní smyčka (reactive center loop – RCL). Tato oblast se nachází na povrchu serpinu. (Loebermann a kol., 1984, Gettins, 2002).

Jádro serpinů je složeno z 3 β - skládaných listů a 8-9 α helixů. Obsahuje přibližně 350 aminokyselinových zbytků. Serpiny se velmi odlišují délkou úseku na N- a C- koncích. Většina serpinů má molekulovou hmotnost kolem 40 – 60 kDa a podobnost mezi serpiny, co se týče primární struktury, může být dokonce nižší než 25 %. K základní identifikaci této nadrodiny došlo díky podobnosti primární struktury lidského anti-thrombinu, lidského α_1 – inhibitoru proteáz a ovalbuminu, přestože jsou si sekvenčně podobné jen asi ze 30 % a mají zcela odlišné funkce.

Zajímavou vlastností většiny serpinů je také to, že při inhibici proteáz dochází ke změnám v jejich konformaci, k takzvané „sebevražedné substrátové inhibici“, při níž serpin ztratí funkčnost (Gettins, 2002).

1.4 Inhibitory serinových proteáz ve slinách klíšťat

Serpiny se účastní regulací procesů jako je srážení krve, fibrinolýza, transport hormonů, zánětlivá odpověď, patogenita virů a parazitů a mnoha dalších (Potempa a kol., 1994), jak už bylo řečeno výše. Pokud dojde k zablokování těchto funkcí serpinů imunizací hostitele, zhorší se tím i schopnost klíšťat sát (Mulenga a kol., 2000, Mulenga a kol., 2001).

Vakcína proti klíšťatům by tedy především mohla poskytnout ochranu proti nemocem přenášeným klíšťaty (Wikel a Bergman, 1997).

Pro produkci vakcíny je nejdříve třeba vyprodukovat a blíže charakterizovat proteiny esenciální pro regulaci imunitní odpovědi hostitele a přenos patogenů (Mulenga a kol., 2000; Mulenga a kol., 2001). U zvířat, na nichž opakovaně sála klíšťata, vznikla imunita proti klíšťatům, což naznačuje, že vakcínu proti klíšťatům *Ixodes ricinus* lze vyrobit (Prevot a kol., 2007).

Komerčně se využívá vakcína proti klíštěti *Boophilus microplus*, které přenáší babeziózu (Willadsen a kol., 1995). Díky ní došlo k výraznému snížení ekonomických ztrát spojených s přenosem tohoto onemocnění (de la Fuente a kol., 1999).

1.5 Inhibitory serinových proteáz ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*

Serpiny už byly izolovány z klíšťat *Ixodes scapularis* (Mulenga a kol., 2009), *Haemaphysalis longicornis* (Sugino a kol., 2003), *Amblyoma americanum* (Mulenga a kol., 2007), *Rhipicephalus appendiculatus* (Mulenga a kol., 2003) a *Ixodes ricinus* (Leboulle a kol., 2002; Chmelař a kol., 2011).

Jen u některých serpinů byly testovány jejich funkce a imunomodulační vlastnosti. Bylo zjištěno, že serpin, izolovaný z klíštěte *Ixodes ricinus*, nazvaný Iris (*Ixodes ricinus* imunosupresor) je produkován ve slinných žlázách v průběhu sání. Jak rovněž sám jeho název naznačuje, byly u něj zjištěny určité imunomodulační vlastnosti. Potlačuje proliferaci T-lymfocytů a indukuje Th2 typ imunitní odpovědi (dojde k inhibici produkce IFN- γ lidskými leukocyty) a snižuje produkci prozánětlivých cytokinů, produkce TNF- α , IL-6 a IL-8 byla také potlačena (Leboulle a kol., 2002).

Zjistilo se, že Iris snižuje koagulaci, inhibuje fibrinolýzu (zřejmě díky anti-proteolytické aktivitě RCL) a hemostázu. Šlo o první ektoparazitický serpin, u nějž bylo prokázáno, že pozměňuje jak hemostázu, tak imunitní odpověď hostitele. Stal se tedy vhodným kandidátem na vývoj vakcíny proti klíštěti. Navíc se ukázalo, že Iris přirozeně inhibuje elastázu lidských leukocytů (Prevot a kol., 2006).

Další výzkum ukázal, že Iris je produkován jak ve slinných žlázách dospělých samiček a samců, tak u nymf. U samiček, které sály na hostiteli, došlo k velmi brzké indukci Iris. Protein se objevil v průběhu sání ve slinách. Po imunizaci myší a králíků pomocí Iris se objevily specifické protilátky proti tomuto proteinu. Iris je schopen vyvolat výraznou specifickou imunitní odpověď.

Byla pozorována o 30 % vyšší úmrtnost nymf sajících na imunizovaných králících (oproti kontrolní skupině). Dospělcům sajícím na králících v kontrolní skupině trvalo 6 – 10

dní než dokončila sání. V případě klíšťat sajících na imunizovaných králících byla doba sání 11 – 23 dní. Opět byla pozorována vyšší mortalita (přibližně 33,6 % u klíšťat sajících na imunizovaných králících oproti 4,2 % u kontrolní skupiny).

Mezi klíšťaty nebyl zaznamenán rozdíl, co se týká kladení vajíček, ať už sála na vakcinovaných nebo kontrolních králících (Prevot, 2007).

Pomocí radioaktivně značených prób se také získaly kompletní sekvence 4 serpinů z *Ixodes ricinus*: IRS-1 (*Ixodes ricinus* serpin) (DQ915842), IRS-2 (DQ915843), IRS-4 (DQ915844) a IRS-8 (DQ915845).

Zjistilo se, že IRS-2 inhibuje chymázu žírných buněk, agregaci krevních destiček prostřednictvím inhibice katepsinu G, dále inhibuje agregaci krevních destiček indukovanou trombinem a také akutní zánět (Chmelař a kol., 2011).

Protein IRIS-2 s His-tagovou kotvou byl produkován v bakteriálním expresním systému. IRIS-2 vykazoval výrazný inhibiční účinek na produkci IFN- γ v kultuře myších splenocytů aktivovaných lipopolysacharidem. Stimuloval produkci IL-10 splenocyty, IL-6 a NO makrofágy, naopak inhiboval produkci TNF- α a fagocytózu makrofágů. Podle Chmelaře by IRIS-2 mohl být SAT faktorem (Chmelař, 2005).

Cíle práce:

- Zpracování literárního přehledu: Úlohy serinových proteáz ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus*.
- Příprava inhibitoru serinových proteáz z klíštěte *Ixodes ricinus* v bakulovirovém expresním systému.

2. Metody

2.1 PCR amplifikace

Pro amplifikaci serpinů z cDNA z klíštěte *Ixodes ricinus* byla použita metoda PCR.

Navržení primerů

Podle sekvencí serpinů IRS (*Ixodes ricinus* serpin) převzatých z genové banky NCBI (viz příloha) byly navrženy primery – viz tab. I.

Tab. I: Navržené primery.

Název primeru	Sekvence
IRS-1 Fwd (GENERI BIOTECH)	5'-GGA GGA TCC ATGA AGC CTC TAG TCC CTC TTC-3'
IRS-1 Rev HT (GENERI BIOTECH)	5'-AAT CTC GAG TCA ATG GTG ATG GTG ATG GTG TCC GAG ACT GTT CAC TTG TCC-3'
IRS-8 Fwd (GENERI BIOTECH)	5'-TTA GGA TCC ATG ACC CGC CTG CTG TGG -3'
IRS-8 Rev NoHT (GENERI BIOTECH)	5'-ATT CTC GAG TCA AAG GGC GTT GAT CTCC-3'

PCR

Jako templát pro PCR reakci sloužila cDNA ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*, cDNA byla připravena v laboratoři imunologie parazitóz RNDr. Jindřichem Chmelařem, Ph.D..

Každá 50µl reakce obsahovala:

- 1 µl cDNA ze slinných žláz *Ixodes ricinus*
- 2 µl příslušného Fwd primeru (viz tabulka I)
- 2 µl příslušného Rev primeru (viz tabulka I)
- 45 µl Platinum[®] PCR SuperMix (Invitrogen)

Dále následovala PCR za těchto podmínek:

- | | | |
|-------------------------|-------|-----------|
| 1. Počáteční denaturace | 95 °C | 10 minut |
| 2. Denaturace | 95 °C | 20 sekund |
| 3. Nasedání | 50 °C | 30 sekund |
| 4. Elongace | 72 °C | 2 minuty |
| 5. Extenze | 72 °C | 7 minut |

Pozn.: Cyklus 2.-4. se opakuje 30krát.

PCR probíhala na přístroji 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Gelová elektroforéza

Vzorky po PCR byly naneseny na 1% agarózový gel, jenž byl připraven smícháním 50 ml 1 x TAE pufru (40mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH = 8) s 0,5 g agarózy (Amresco). Tato směs se za občasného zamíchání povařila v mikrovlnné troubě a posléze se zchladila na 50 °C. Ke směsi bylo přidáno 0,5 µl ethidia bromidu a gel se nalil do aparatury na gelovou elektroforézu (SCIE-PLAS).

Vzorky nanášené na gel obsahovaly:

50 µl příslušného vzorku po PCR

10 µl 6x DNA Loading Dye (Fermentas)

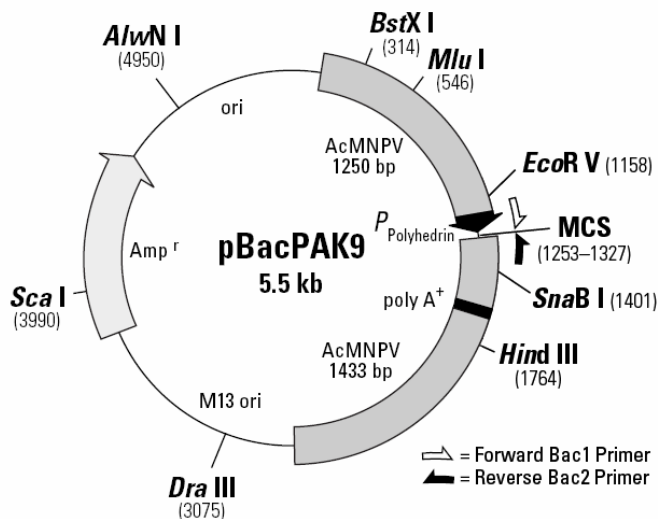
Dále byl použit marker GeneRuler™ 100bp DNA ladder Plus (Fermentas). Elektroforéza byla provedena v 1 x TAE pufru ve stejnosměrném elektrickém proudu při 100 V 40 minut. Pod UV světlem byla zkontrolována úspěšnost amplifikace. Požadované namnožené úseky DNA se poté pomocí skalpelu vyřízly z gelu.

2.2 Purifikace amplifikovaných úseků DNA

Amplifikované úseky DNA byly přečištěny pomocí kitu Wizard® PCR Clean-Up System (Promega). Postupovalo se podle originálního firemního návodu s jednou modifikací: Při eluci bylo použito 40 µl Nuclease-Free H₂O (Promega) místo doporučených 50 µl.

2.3 Klonování amplifikované DNA pomocí klonovacího vektoru

Jako klonovací vektor byl použit pBacPAK9 (Clontech) (viz obr. 1).



Obr. 1: pBacPAK9 (Clontech).

Restrikce

Nejdříve bylo třeba plazmid a amplifikované úseky DNA s geny kódující serpiny rozštěpit na vhodných místech pomocí restrikčních endonukleáz. Složení restrikční reakce viz tab. II.

Restrikční reakce

Tab. II: Reagencie použité při restrikční reakci.

Název	Restrikce IRS1-HT	Plazmid pro IRS-1 HT	Restrikce IRS8	Plazmid pro IRS-8
Použité reagenty	30 μ l PCR produktu IRS1-HT (viz výše)	5 μ l pBacPAK9 (100 ng/ μ l) (Clontech)	30 μ l PCR produktu IRS8 (viz výše)	5 μ l pBacPAK9 (100 ng/ μ l) (Clontech)
	1 μ l EcoR I (Fermentas)	1 μ l EcoR I (Fermentas)	1 μ l BamHI (Fermentas)	1 μ l BamHI (Fermentas)
	1 μ l XhoI (Fermentas)	1 μ l XhoI (Fermentas)	1 μ l XhoI (Fermentas)	1 μ l XhoI (Fermentas)
	8 μ l 10x Buffer Tango TM (Fermentas);	8 μ l 10x Buffer Tango TM (Fermentas);	8 μ l 10x Buffer Tango TM (Fermentas)	8 μ l 10x Buffer Tango TM (Fermentas)
		25 μ l H ₂ O - Nuclease - Free (Fermentas)		25 μ l H ₂ O - Nuclease - Free (Fermentas)

Prázdný plazmid byl rozmrazen a uchováván na ledu. Restrikce probíhala ve 40 °C.

Za 2 hodiny byly reakční směsi přečištěny pomocí kitu Wizard[®] PCR Clean-Up System (Promega). Postupovalo se podle originálního firemního návodu s jednou modifikací: Při eluci bylo použito 40 µl Nuclease-Free H₂O (Promega) místo doporučených 50 µl.

Ligace

Pomocí ligační reakce došlo k začlenění PCR produktů do klonovacího vektoru pBacPAK9. Ligační reakce probíhala při 4 °C přes noc.

Ligační reakce:

- 1 µl T4 DNA Ligase (Fermentas)
- 2 µl 10x T4 DNA Ligase Buffer (Fermentas)
- 3 µl plazmidu pBacPAK9 (Clontech) po restrikci (viz tab. II)
- 14 µl PCR produktu po restrikci (viz tab. II)

2.4 Transformace

Pro transformaci byly použity buňky *E. coli* One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen), (uchovávány v -80 °C). Byly rozmrazeny na ledu.

Následně byla provedena transformace probíhající opět na ledu: Ke 25 µl buněk bylo přidáno 10 µl vždy jedné příslušné ligační reakce z předešlého dne. Celá směs byla 30 minut ponechána na ledu a poté byla inkubována 1 minutu v inkubátoru vyhřátém na 42 °C. Následovalo opětovné přemístění na led na další 2 minuty. Proběhl teplotní šok, při němž došlo k začlenění plazmidu do buněk.

K transformovaným buňkám bylo sterilně přidáno 125 µl S.O.C. media (Invitrogen) a celá směs se umístila na třepačku na 1 hodinu při 200 ot/min a 37 °C.

Nanášení na bakteriologickou půdu

20 µl směsi s transformovanými buňkami byla rozetřena na agarové půdy s ampicilinem (25 µl LB media LB BROTH, MILLER (Amresco); 20 g agaru (Amresco); 1 ml ampicilinu na 15 µg/ml; 1000 ml H₂O). Půdy s buňkami se umístily do inkubátoru do 37 °C přes noc. Na půdách vyrostly kolonie buněk *E. coli* s plazmidem.

Ověření úspěšnosti transformace

Bylo třeba zjistit, zda vybrané kolonie obsahují plazmid i s insertem nebo pouze prázdný plazmid – k tomu posloužila PCR.

Byly odebrány kolonie vyrostlých transformovaných buněk z každé agarové půdy. Část z každé kolonie se přenesla do Master mix směsi, posléze byla provedena PCR.

Master Mix směs pro jednu reakci:

1 µl příslušného Fwd primeru (1 µM) (viz tabulka I)

1 µl příslušného Rev primeru (1 µM) (viz tabulka II)

5 µl PCR Master Mix (2x) (Fermentas)

3 µl H₂O - Nuclease - Free (Fermentas)

1 µl cDNA získané z kolonie

Dále následovala PCR za těchto podmínek:

1. Počáteční denaturace	93 °C	10 minut
2. Denaturace	93 °C	20 sekund
3. Nasedání	55 °C	30 sekund
4. Elongace	72 °C	1,5 minuty
5. Extenze	72 °C	7 minut

Pozn.: Cyklus 2.-4. se opakuje 30krát.

PCR probíhala na přístroji 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem). Produkty PCR byly rozděleny pomocí gelové elektroforézy na gelu (za podmínek, jenž byly uvedeny výše v části „Gelová elektroforéza“).

Druhá část buněk z kolonie byla dána do 5 ml LB media (Amresco) s 5 µl ampicilinu. Zkumavka byla přes noc umístěna na třepačku při 200 ot/min a 37 °C. Došlo k pomnožení buněk, což se mimo jiné projevilo zákalem tekutiny ve zkumavce. Dále bylo nutné přechistit plazmidovou DNA.

Z části kultivační směsi byl vytvořen roztok pro další uchovávání a to smícháním 200 µl 80% glycerolu a 800 µl bakteriální kultury. Následovalo důkladné promíchání a rychlé zmrazení tekutým dusíkem. Celá směs byla umístěna do -80 °C.

2.5 Purifikace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla přečištěna pomocí Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Postupovalo se podle originálního firemního návodu pouze s jednou modifikací: Při eluci bylo použito 50 µl Nuclease-Free H₂O (Fermentas) místo doporučených 100 µl. K produkci přečištěného plazmidu byly použity 4 ml bakteriální kultury a centrifugace probíhala při 16 g na centrifuze Spectrafuge 24D (Labnet) a laboratorní teplotě. Spektrofotometricky přístrojem NanoDrop 1000 (ThermoSCIENTIFIC) byla zjištěna koncentrace purifikované plazmidové DNA.

2.6 Sekvenace

1. sekvenační reakce

150 ng/µl plazmidové DNA

0,5 µl příslušného Fwd primeru (viz tabulka I)

doplnit do 7 µl H₂O - Nuclease - Free (Fermentas)

2. sekvenační reakce

150 ng/µl plazmidové DNA

0,5 µl příslušného Rev primeru (viz tabulka I)

doplnit do 7 µl H₂O - Nuclease - Free (Fermentas)

Sekvenace probíhala v laboratoři Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích. Jako sekvenátor se použil přístroj ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems).

Výsledky se zpracovaly pomocí programu BioEdit (Ibis Biosciences). Tímto programem se upravily alignmenty. Genové sekvence serpinů se následně porovnály v databázi NCBI Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.7 Transfekce hmyzích buněk Sf9

Pro transfekci byly použity hmyzí buňky Sf9 (OET) v log fázi růstu pěstované v mediu Sf-900 II SFM (Gibco) s 1% obsahem Penicillin-Streptomycin (Gibco) a s 1% Kanamycin Sulfate (Gibco). Byl použit systém FlashBAC (OET). Postupovalo se podle originálního firemního návodu.

Do jamky šesti jamkového panelu byly rovnoměrně nanесeny 2 ml Sf9 buněk o koncentraci 10^6 /ml. Třikrát se vyměnilo medium – použito bylo Sf-900 II SFM (Gibco) bez ATB. Z buněk bylo odsáto promývací medium a na střed jamky bylo aplikováno 1 ml směsi obsahující: 100ng FlashBac DNA, 500 ng plazmidu obsahujícího požadovaný gen a transfekční reagens Cellfectin (Invitrogen). Směs byla před přidáním k buňkám 15 minut inkubována při laboratorní teplotě.

Po inkubaci přes noc probíhající v termostatu při 28 °C bylo ke směsi přidáno 1 ml media Sf-900 II SFM (Gibco) bez ATB. Následovala inkubace v termostatu při 28 °C 5 dní. Bylo odebráno medium obsahující rekombinantní virus a bylo skladováno při 4 °C v temnu.

2.8 Amplifikace viru

Ke 200 ml Sf9 buněk v log fázi o koncentraci 2×10^6 /ml bylo přidáno 1 ml media obsahujícího rekombinantní virus. Nakažené buňky byly umístěny na třepačku do 28 °C při 125 ot/min (N Biotek). Po pěti dnech se zkontrolovalo, zda infekce probíhá. Infikované buňky byly zvětšeny, více granulovány a měly větší jádro v porovnání s neinfikovanými buňkami.

Infikované buňky se přes noc nechaly usadit a supernatant byl sterilně odebrán pipetmanem. Ke 100 ml byly přidány 4 ml bovinního fetálního séra (PAA). Medium se uložilo do temna do 4 °C.

2.9 Expres a purifikace proteinu IRS-1 HT

Ke 400 ml Sf9 buněk v log fázi o koncentraci 10^6 /ml (poslední ředění buněk z 200 ml na 400 ml proběhlo mediem Sf-900 II SFM (Gibco) bez ATB) bylo přidáno 20 ml media IRS-1 HT obsahující rekombinantní virus přednostně bez bovinního fetálního séra (PAA).

Po třech dnech bylo zkontrolováno, zda jsou buňky úspěšně nakaženy, v tom případě byly buňky opět zvětšeny, více granulovány, měly větší jádro a nižší koncentraci v porovnání s neinfikovanými buňkami.

Nakažené buňky byly zcentrifugovány na centrifuze Universal 32R (Hettich) při 2860 g po dobu 30 minut a 20 °C. Do supernatantu byla přidána sterilní 0,5 M kyselina citronová v takovém množství, aby roztok měl pH = 5,5. His-tag tím získal vhodný náboj pro navázání v heparinové koloně. Roztok byl umístěn do 4 °C přes noc. Došlo k vysrážení nežádoucích solí.

Dalším krokem bylo opětovné stočení při 2860 g po dobu 30 minut a 20 °C. Roztok byl poté přefiltrován přes filtr Stericup[®] Filter 0,22 µm (Millipore).

V průběhu purifikace se ke vzorkům určeným pro delší skladování přidával 1% azid sodný.

Heparinová kolona

Dalším krokem bylo zachycení požadovaného proteinu na heparinové koloně HiTrap[™] Heparin HP (GE Healthcare) a jeho následná eluce, čímž došlo k jeho částečnému přečištění. Aparatura, zapojená dle originálního firemního návodu, byla ještě před připojením heparinové kolony propláchnuta 20 ml 20% ethanolu a pak 20 ml sterilního PBS.

Byla připojena heparinová kolona a byla promyta 50 ml sterilního PBS s maximálním průtokem 5 ml/min.

Roztok obsahující požadovaný protein byl nanesen na kolonu (průtok maximálně 5 ml/min). Protein s navázaným his-tagem se zachytil na koloně. K eluci bylo použito 13 ml 2M NaCl přefiltrovaných přes filtr Millex-GV, 0.22 µm (Millipore).

Aparatura bez kolony byla propláchnuta PBS a kolona byla zakonzervována 20% ethanolem.

Kobaltová kolona

Vazebný roztok (pH = 8)

0,04M fosfátový pufr, pH = 8

0,3M NaCl

10% v/v glycerol

Vazebný roztok byl přefiltrován přes filtr Stericup[®] Filter 0,22 µm (Millipore). Do připravené kobaltové kolony (Bio-Rad) bylo napipetováno 1 ml matrix s kobaltovými částicemi TALON Superflow Metal Affinity Resin (Clontech).

13 ml proteinu eluovaného z heparinové kolony se smíchalo se 100 ml vazebného roztoku. Protein ve vazebném roztoku byl postupně po 10 ml nanášen na kolonu. Došlo k zachycení proteinu na koloně.

K eluci proteinu z kolony bylo použito 6 ml elučního pufru přefiltrovaného přes filtr Stericup[®] Filter 0,22 µm (Millipore).

Eluční pufr (pH = 8):

250mM imidazol

20mM TRIS

150mM NaCl

Do centrifugační zkumavky Vivaspin 6 s filtrem (0.2 μm) (Biotech) byla odebrána eluovaná frakce a stočena 25 minut při 4 °C a 2860 g na centrifuze Universal 32R (Hettich).

Gelová filtrace – FPLC (Fast protein liquid chromatography)

Gelová filtrace na aparatuře Akta FPLC (GE Healthcare) byla použita pro dělení proteinů podle molekulové hmotnosti po přečištění na kobaltové koloně. Použita byla kolona Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). Kolona byla 1,5 hodiny ekvilibrována pufrům (15mM HEPES, 200mM NaCl, pH 7,2). Průběh chromatografie byl monitorován při vlnové délce 280 nm. Injekovalo se vždy 0,5 ml vzorku. Průtok byl 0,5 ml/min.

Kobaltová kolona - FPLC

Kolona HiTrap[™] IMAC FF (5 ml) (GE Healthcare) byla propláchnuta 25 ml destilované vody a poté 25 ml 100mM CoCl₂. Následovalo další propláchnutí 25 ml destilované vody. Chromatografická aparatura (Akta FPLC (GE Healthcare)) byla promyta 20 ml 1% tritonu a dále 20% ethanolem. Kolona byla po připojení postupně vypláchnuta pufrům A₁ a B₁ a následně byla ekvilibrována pufrům A₁.

13 ml proteinu eluovaného z heparinové kolony se smíchalo s 13 ml 200mM TRIS HCl (přefiltrovaným přes membránový filtr Stericup[®] Filter 0,22 μm (Millipore)) a 26 ml H₂O. Tento roztok byl pomocí dávkovací smyčky nanesen na kolonu a po vymytí na základní linii eluován lineárním gradientem pufru B₁.

Pufr A₁ (pH = 7,5)

50mM TRIS HCl

0,5M NaCl

Pufř B₁

50mM TRIS HCl

0,5M NaCl

0,5M imidazol

Dialýza

Dialýza byla provedena s proteinem přečiřtřeným na kobaltové koloně HiTrap[™] IMAC FF (5 ml) (GE Healthcare). Pufř B₂ byl dialyzován proti 2 l pufř A₂ (viz níže). Dialýza proběhla přes noc v chladové místnosti. Použilo se dialyzační střevo Visking 20/32 (Serva).

Pufř A₂

50mM TRIS HCl, pH = 8

Pufř B₂

50mM TRIS HCl, pH = 8

0,5M NaCl

Iontová chromatografie na koloně Mono Q - FPLC

Iontová chromatografie na koloně Mono Q HR 5/5 (GE Healthcare) byla provedena s proteinem přečiřtřeným na kobaltové koloně HiTrap[™] IMAC FF (5 ml) (GE Healthcare). Protein měl díky vysokému pH záporný náboj a vychytil se tedy na kladný náboj. Kolona byla 15 minut proplachována pufřem A₃. Po ustálení základní linie byl protein eluován gradientem NaCl v pufřu B₃.

Pufř A₃

50mM TRIS HCl, pH = 8

Pufř B₃

50mM TRIS HCl, pH = 8

0,5M NaCl

SDS – PAGE elektroforéza

Pro ověření správnosti přečištění byla provedena SDS – PAGE elektroforéza (aparatura XCell SureLock (Invitrogen)). Použit byl NuPAGE® 4–12% Bis-Tris 1.0 mm Gel (Invitrogen) a transferový pufr (25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% SDS). Bylo nanášeno 20 µl od každého vzorku, připraveného na nanášení (viz níže). Jako marker byl použit SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen). (Při druhém způsobu provádění elektroforézy byly vzorky naředěny vzorkovým pufrem s dithiotreitem (4:1). Vzorky byly považeny a nanášeny na gradientový polyakrylamidový gel (5-17%). Marker byl použit LMW (GE Healthcare)).

Příprava vzorků pro nanášení na gel

13 µl vzorku

5 µl sample NuPAGE® Sample Reducing Agent (Invitrogen)

2 µl redukčního činidla

→ Inkubace 10 minut při 72 °C

Elektroforéza probíhala při 200 V a 250 mA 30 minut. Gel byl po vyjmutí z aparatury a opláchnutí v destilované vodě umístěn 1 hodinu na třepačku v barvivu Coomassie Brilliant Blue (Merck). To se následně nahradilo odbarvovacím roztokem (10% kyselina octová, 20% methanol). Gel byl ponechán v odbarvovacím roztoku na třepačce přes noc. Druhý den byl výsledek zdokumentován pomocí AlphaDigiDoc RT (Sigma).

Western Blot

Western Blot sloužil k zviditelnění proteinu pomocí protilátky. K separaci proteinů byla využita SDS – PAGE elektroforéza (viz výše). Gel byl po vyjmutí z aparatury vložen do blotovací aparatury, jenž byla umístěna v nádobě v roztoku s transferovým pufrem (10% transferovým pufrem s glycerinem a 20% methanolem). Ještě předtím byla nitrocelolózová membrána navlhčena 10% methanolem. Aparatura byla zapojena dle originálního firemního návodu 1,5 hodiny při 70 V a 250 mA.

Složení

houbička

3 kusy filtračního papíru

nitrocelulózová membrána namočená v 10% methanolu

gel

3 kusy filtračního papíru

houbička

Po přenosu proteinu byla nitrocelulózová membrána 2x 5 minut promyta v promývacím roztoku, zalila se blokovacím pufrem a byla ponechána 2 hodiny na třepačce při laboratorní teplotě. Došlo k znemožnění případného navázání nespecifických protilátek.

Promývací roztok

250 ml PBS

0,1% Tween

Blokovací pufir

50 ml PBS

5% sušeného odtučněného mléka

0,1% Tween

Membrána byla znovu promyta promývacím roztokem a zatavena do plastové folie i s roztokem s primární protilátkou. Přes noc byla ponechána na třepačce při 4 °C.

Roztok s primární protilátkou

1% BSA v 20 ml PBS

20 µl myší anti-histagové protilátky

Membrána byla po vyjmutí ze sáčku promyta 1x 15 minut v promývacím roztoku, ten byl vyměněn a promývání pokračovalo ještě 2x 5 minut vždy s novým promývacím roztokem.

K promyté membráně byl přidán roztok se sekundární protilátkou. Membrána byla umístěna na 1 hodinu na třepačku při laboratorní teplotě. Poté byla promyta 1x 15 minut

v promývacím roztoku, ten byl vyměněn a promývání pokračovalo ještě 2x 5 minut vždy s novým promývacím roztokem.

Roztok se sekundární protilátkou

1% BSA v 20 ml PBS

10 µl goat anti-mouse-HRP (Santa Cruz Biotechnology)

Jako substrát byl použit peroxidázový substrát Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) pro detekci HRP enzymatické aktivity chemiluminiscencí. Postupovalo se podle originálního firemního návodu. Byly smíchány 2 ml Detection Reagent 1 s 2 ml Detection Reagent 2 – tím vznikl peroxidázový substrát. Membrána byla osušena ubrouskem a na minutu ponořena do peroxidázového substrátu. Poté byla zabalena do folie. Na přístroji FUJIFILM Luminescent Image Analyzer LAS-3000 se zaznamenala vzniklá chemiluminiscence.

Stanovení koncentrace

Koncentrace proteinu byla zjištěna metodou Bradfordové na přístroji BioPhotometer (Eppendorf). Jako blank posloužilo 50 µl vyrážecího pufru s 0,5 ml Bradfordové činidla. 50 µl vzorku s 0,5 ml Bradford činidla bylo změřeno při absorbanci 590 nm. Podle předem vytvořené kalibrační křivky byla zjištěna koncentrace proteinu.

2.10 Biochemická analýza

Biochemické testy byly prováděny při 30 °C. Byly provedeny Michalisem Kotsyfakisem, Ph.D.

Byly provedeny třikrát. 1 µM proteinu se s každým enzymem nechal 10 minut inkubovat. Poté byl přidán vhodný substrát. Ke statistické analýze pozorované inhibice byl použit *t*-test. Za statisticky významné byly považovány hodnoty, kdy bylo $p < 0.05$ při porovnání enzymatické aktivity v přítomnosti, nebo naopak v nepřítomnosti inhibitoru.

V obou případech byla míra hydrolýzy fluorescenčního substrátu odhadnuta z lineárního sloučení získaných dat (arbitrální jednotky fluorescence za sekundu; $r^2 > 0.95$) (Započítány byly vždy tři výsledky, protože se testy prováděly vždy třikrát).

Lineární sloučení zvýšení fluorescence jako funkce času byla ověřena pomocí MagellanTM - Data Analysis Software (Tecan group Ltd).

Míra substrátové hydrolyzy v nepřítomnosti substrátu byla stanovena jako 100 %. Ta se následně porovnávala s enzymatickou aktivitou v přítomnosti proteinu. Všechny použité enzymy byly lidského původu, čištěné či rekombinantní.

Jako enzymy byly použity: 0,01 nM trombin (Sigma); 0,025 nM α -chymotrypsin (Sigma); 7,7 nM granzym B (Sigma); 0,4 nM plasmin (Sigma); 0,9 nM chymáza (Sigma); 0,01 nM β -tryptáza (Promega); 0,33 nM faktor Xa (EMD Biosciences); 0,1 nM faktor XIIa (Haematologic Technologies Inc.); 0,1 nM kallikrein (Fitzgerald Industries International); 0,18 nM elastáza (Elastin Products); 4,4 nM katepsin G (Molecular Innovations); 0,06 nM faktor XIa (Molecular Innovations); 0,125 nM uPA (Molecular Innovations); 0,012 tPA (Molecular Innovations); 0,1 nM matriptáza (R&D Systems); 8,2 nM proteináza 3 (Merck) a 0,1 nM sequencing-grade trypsin (Roche). Reakční pufrů viz tabulka III.

Tab. III: Složení reakčních pufrů.

Enzym	Složení reakčního pufru
Elastáza, proteináza 3, chymáza	50 mM hepes pufr, pH 7,4 100 mM NaCl 0,01% Triton X-100
Trypsin, α -chymotrypsin, faktor XIa, faktor XIIa, trombin	50 mM Tris-HCl, pH 8 150 mM NaCl 20 mM CaCl ₂ 0,01% Triton X-100
β -tryptáza	50 mM Tris-HCl, pH 8 50 mM NaCl 0,05% Triton X-100
Kallikrein, matriptáza a plasmin	20 mM Tris-HCl, pH 8,5 150 mM NaCl 0,02% Triton X-100
Faktor Xa	20 mM Tris-HCl, pH 8 200 mM NaCl 5 mM CaCl ₂ 0,1% BSA
uPA, granzym B a tPA	20 mM Tris-HCl, pH 8,5 0,05% Triton X-100
Katepsin G	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 0,01% Triton X-100

Sekvence použitých fluorescenčních substrátů viz tab. IV.

Tab. IV: Použité fluorescenční substráty a jejich sekvence. (AMC = aminomethyl coumarin).

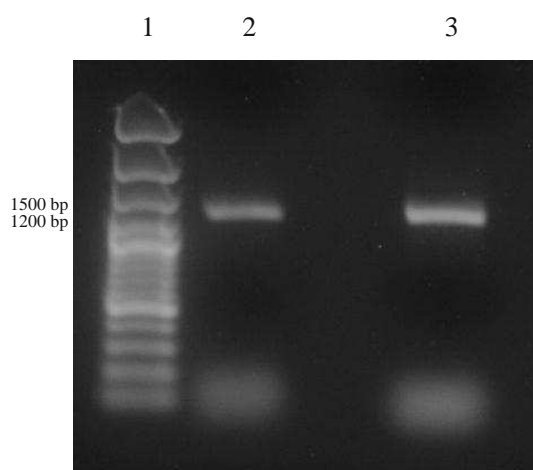
Použitý substrát	sekvence
Elastáza, proteináza 3 (Sigma)	Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC
trombin, plasmin (Sigma)	Boc-Asp-Pro-Arg-AMC
trypsin, faktor XIa, uPA (Sigma)	Boc-Gln-Ala-Arg-AMC
β -tryptáza (Bachem Bioscience, Inc.)	Boc-Phe-Ser-Arg-AMC
chymáza (Bachem Bioscience, Inc.)	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC
α -chymotrypsin (EMD Biosciences)	Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC
granzym B (Enzo Life Sciences)	Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-AMC
faktor Xa, faktor XIIa, t-PA, matriptáza, kallikrein (American Diagnostica Inc.)	methylsulfonyl-D-cyclohexylalanyl-Gly-Arg-AMC acetát

Všechny substráty byly použity v koncentraci 250 μ M. Míra substrátové hydrolýzy byla měřena na přístroji Tecan Infinite M200 96-well plate fluorescence reader (Tecan group Ltd, Switzerland) za použití 365 nm pro excitaci a 450 nm pro emisi.

3. Výsledky

3.1 PCR amplifikace

Amplifikace genů IRS-1 HT a IRS-8 z cDNA klíštěte *Ixodes ricinus* pomocí PCR a specificky navržených primerů (viz tabulka I) byla úspěšná. K ověření úspěšnosti posloužila elektroforéza – viz obr. 2.



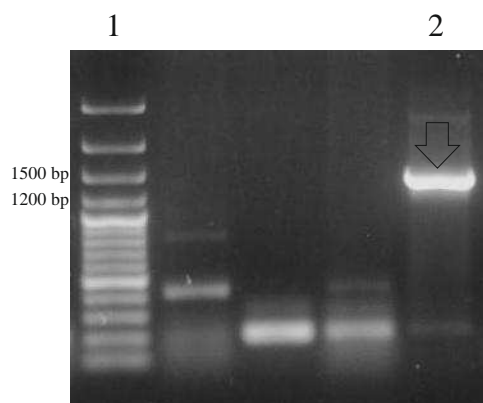
Obr. 2: Amplifikace úseků genů IRS1-HT a IRS8 z cDNA z klíštěte *Ixodes ricinus* pomocí PCR. 1 - marker GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder (Fermentas); 2 – IRS-1 HT; 3 – IRS-8.

Amplifikované úseky DNA se od nečistot přečistily pomocí kitu Wizard® PCR Clean-Up System (Promega).

3.2 Klonování amplifikované DNA a transformace

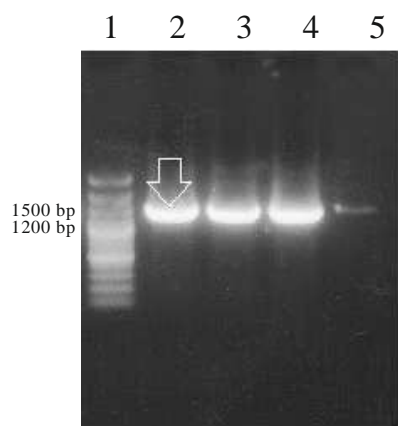
Jako klonovací vektor byl použit pBacPAK9 (Clontech). Pro transformaci byly použity buňky *E. coli* One Shot® TOP10 Chemically. Úspěšnost transformace se ověřila pomocí PCR (viz obr. 3 a obr. 4).

Ověření úspěšnosti transformace



Obr. 3: Ověření úspěšnosti zaklonování IRS-8 do plazmidu pBacPAK9 (Clontech). 1 - marker GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder (Fermentas); 2 – IRS-8, jenž byl úspěšně sekvenován (viz šipka).

Koncentrace IRS-8 byla: $c = 300,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$



Obr. 4: Ověření úspěšnosti zaklonování IRS-1 HT do plazmidu pBacPAK9 (Clontech). 1 - marker GeneRuler™ 100bp Plus DNA ladder (Fermentas); 2 – plazmid IRS-1 HT, jenž byl úspěšně sekvenován (viz šipka); 3 - plazmid IRS-1 HT; 4 - plazmid IRS-1 HT; 5 - plazmid IRS-1 HT.

Koncentrace IRS-1 HT (úspěšně sekvenovaného) byla: $c = 152 \text{ ng}/\mu\text{l}$

Plazmidová DNA byla přečištěna pomocí Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Následně byla sekvenována. Výsledky můžete vidět na obr. 5 a obr. 6.

Výsledky sekvenace

GGATCCATGACCCGCTGCTGTGGCTCTTCGCGCTATTACAGCGTCGTTAGCGCAAGACGAAATCAGCCAA
G S M T R L L W L F A A I T A S L A Q D E I S Q
GACAAGTGGGAGCTGGCACGAGCCAACAACCTACCTGGGGCTCAATCTTCTCAAGCAGCTTCCCAGCAACGAC
D K W K L A R A N N Y L G L N L L K Q L P S N D
AAGACCAACGTGTTCTTTTCGCGCTTCAGCGTGTCCACAGCCATGGGCATGGCCTACGCCGGCGCCCGCGGG
K T N V F F S P F S V S T A M G M A Y A G A R G
GACACCTGGAACAGTTGACGTTGAACCTTCGGTTATGCTGCGGATGAACTCAACGAAGGCAAGGTTCTCGCC
D T L E Q L T L N F G Y A A D E L N E G K V L A
TTGTTCAAGGAACAGCTCCAGTCGACCAACGACCTACCGCACGACTACACGCTCAACATCGCCAACGCAGCC
L F K E Q L Q S T N D L P H D Y T L N I A N A A
GTGGCCCAAGAAGGGTACGGTATCCTTCCCTGAGTACACCGACGCACTCACGAGTTCCTTCGGTGCAGAGTAC
V A Q E G Y G I L P E Y T D A L T S S F G A E Y
ATCGAAGCCGACTTCCAGAAACGCGGTCAAGAGGCCATACAGAAGATCAACACTTGGGTTAGCAACAGGACA
I E A D F Q K R G Q E A I Q K I N T W V S R T
CATGGGAAGGTACAGAGTCTGTTTCGACGAACCACCGGACTTCTCGACTCGATTGATCCTCCTCAACGCCATC
H G K V Q S L F D E P D F S T R L I L L N A I
TACTATAAGGGGACGTGGCTGTACGAGTTCGACAAGACGAAAACAAAGCCGAGGTCGTTCTACAACGGCGGT
Y Y K G T W L Y E F D K T K T K P R N S F Y N G G
GTCGAGAAGGTTTCAGGTACCCATGATGCGGCTCAAGTCAACTCTTAACCACACGTACAACGCCATCCTCAAC
V E K V Q V P M M R L K S T L H T Y N A I L N
GCTGACCTTGTAGACCTGCCTTACGTCGGCAATGACTTCAGCATGACCATCATTCTGCCAGAGAGAAAACC
A D L V D L P Y V G N D F S M T I I L P R E K T
GGATTGGCTTCGCTCAAGTCGGTCTGACGTCGCAGACGCTTAACCTCGCCCTCCAGAACATGTACCCCAAG
G L A S L K S V L T S Q T L N L A L Q N M Y P K
GACATGAAGCTGAAGCTTCCAAAGTTAAGCTGGACACCAAATACACTCTCAAGCCCACGCTCGAAGCCATG
D M K L K L P K F K L D T K Y T L K P T L E A M
GGCATCACAAAGATTTTTTCGGCCGACGCCGATCTTTTCGGGTATCAGCGGTTTCGCGAAACCTCTACGTGTC
G I T K I F S A D A D L S G I S G S R N L Y V S
GATGTCCACACAAGGCTGTGCTGGAGGTCAATGAAGAAGGCAGCGAAGCCGCTGCCGTTACGGGTTTTGTC
D V L H K A V L E V N E E G S E A A A V T G F V
ATCCAGCTAAGAACGGCCGCGTTTTGTGACGCCCCCCCCGTTGCCAAAGGTGTACGTAGATCATCCCTTCATT
I Q L T A A F V P P P L P K V Y V D H P F I
TTCTCATCAGGAACCTCTAAACCAACACCATCATGTTCCTGGGGGAGATCAACGCCCTTTGACTCGAG
F L I R N S K T N T I M F L G E I N A L * L E

Obr. 5: Kódující sekvence cDNA pro IRS-8 a přeložení do peptidové sekvence. Žlutě zvýrazněno restriční místo; hnědě zvýrazněna možná O - glykosilační místa; zeleně zvýrazněná – možná N – glykosilační místa; fialově zvýrazněno – domény ohraničující reaktivní smyčku serpínů; červeně zvýrazněno – předpokládané aktivní místo serpínu; * - stop kodon.

```

GAATCCATGAAGCCTCTAGTCCCTCTTCTATTCTTCTGTTGTCAGCTGTCGAGCACAAGGCAACGATAAACTTACCTTCGCCAACAAAT
E S M K P L V P L L F L L V S C R A Q G N D K L T F A N N
CAGTTTCGGCCTGCGATTACTGAATACTCTTCCAAGTCTCCAGAAGAAAACGTATTTCTCGCCCTATAGTGTATCCACAGCCCTC
Q F G L R L L N T L P P P E E N V F F S P Y S V S T A L
GGAATGGCGTAGCGGGAGCTAGGGGAGACACAAGAAGAGCTCTCGAACAGCTAGGTTATACCGCCGCTGGGCTAAGCCAGGAT
G M A Y A G A R G D T Q E E L S E Q L G Y T A A G L S Q D
GACGTCTTCAACGCGTACTCTGACCACACGCGAGTGGCTAAAGGCTTCTAGGTCCAACTCGACTCTAAGCGTGGCGAACGCCGCCGTC
D V F N A Y S D H T Q W L K A S R S S T L S V A N A A V
CTACATGATAAAGTGGGGCTCCGTTACACGTTCCAAGAACCATCGATCACGCTTTCGACGCCGACATTTCTGAAGGTCGACTTCGTC
L H D K V G L R Y T F Q R T I D H A F D A D I L K V D F V
AACGAACGTAAGGAGCCGTGGATCGCATCAACTACTGGGTGAAGGACAAGACGAACGGAAAGATTCGGTCGCTTTTTAACAAGCCG
N E R K G A V D R I N Y W V K D K T N G K I R S L F N K P
CTAGAATCTGAGACGAGACTTGTCTGCTCAACGCCATCTACTTCAAGGGATCCTGGAATACAGGTTCAACAAGAGTAGGACCAA
L E S E T R L V L L N A I Y F K G S W N T R F K S R T E
AGAGCGAGGTTCTCAATGGCGGCGTCACTCCGACCAAGGTTGACATGATGATGGGGAGCATGAACATCGGCCACCATTCTTTCAGG
K S E F L N G G V P T K V D M M M G S M N I G H H F F R
GACCTGAAAATTGATGTGGCGGATTTCCCGTACCAGGGGGCGGACTACAGCATGACAGTCATCCTGCCCTGGAGGAACGACGGCGTA
D L K I D V A D F P Y Q G R D Y S M T V I L P W R N D G V
GAAGCGATCAAGCAGAACCTCACTCTGGACCTGTTTTCAGAGCTGGTGTGCGAGCTGAGGGAAGAAGGTTCTTCGTGTTATTTCCA
E A I K Q L T L D L F Q K L V S E L R E R R V F V L F P
AAGTTCAAAATAGAGGCAGAGTACTCCCTGAAGGAACCCCTCCAGAACCTGGGCATCAAACAGATCTTCAGTGGTGGCTCCGACCTG
K F F K I E A E Y S L K E P L Q N L G I K Q I F S G G S D L
TCCGGCGTCACAAACGACAACGATCTTGTGGTGTCCGCCGTCGCCACAAAGCGGTCCTGGAGGTCAATGAAGAAGGAAGCGAAGCA
S G V T N D N D L V V S A V V H K A V L E V N E E G S E A
GCAGCCGTGTCGAGTGTGTGGCCGTCACAAGGATTGGCAGCAGGATTCGAGTTC AACGTCGACCATCCTTTCTCTTTCATA
A A V S V V A V T I G T Q A F E F N V D H P L F F I
CGCAACACGGTCAACATGACATCCTGTTTGCGGGACAAGTGAACAGTCTCGGACACCATCACCATCACCATTGACTCGAG
R N T V T N D I L F A G Q V N S L G H H H H H H * L E

```

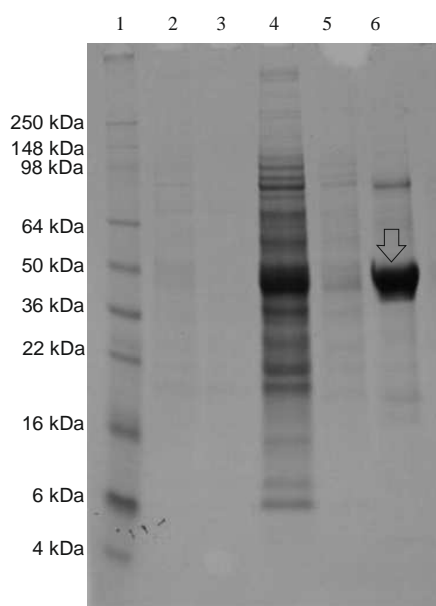
Obr. 6: Kódující sekvence cDNA pro IRS-1 HT a přeložení do peptidové sekvence. Žlutě zvýrazněno restriční místo; modře zvýrazněn histag; hnědě zvýrazněna možná O - glykosilační místa; zeleně zvýrazněná – možná N – glykosilační místa; fialově zvýrazněno – domény ohraničující reaktivní smyčku serpínů; červeně zvýrazněno – předpokládané aktivní místo serpínu; * - stop kodon.

3.3 Transfekce hmyzích buněk Sf9 a amplifikace viru

Pro transfekci byl primárně vybrán IRS-1 HT, zvláště pro to, že obsahoval his-tag, jenž umožňoval specifický způsob purifikace proteinu.

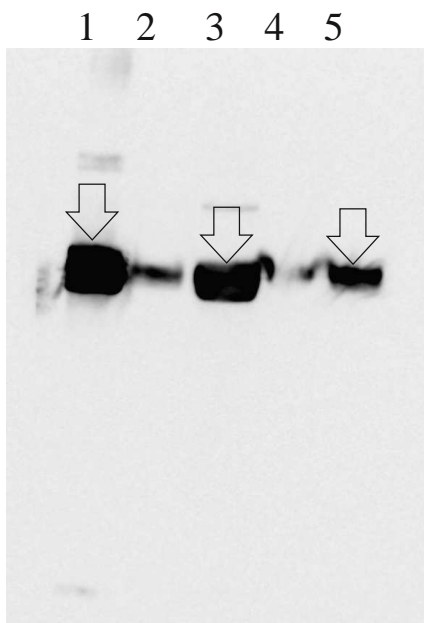
3.4 Exprese a purifikace proteinu IRS-1 HT

Exprese proteinu byla úspěšná. Po třech dnech po úspěšné nákaze následovalo přečištění proteinu na heparinové koloně (viz obr. 7). K dalšímu přečištění IRS-1 HT došlo na kobaltové koloně (Bio-Rad). Předpokládaná molekulová hmotnost připraveného proteinu IRS1-HT byla 46 kDa (viz obr. 7).



Obr. 7: SDS – PAGE elektroforéza proteinu IRS-1 HT přečištěného na heparinové koloně HiTrap™ Heparin HP a kobaltové koloně (Bio-Rad). 1 - marker SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen); 2 – původní materiál před purifikací; 3 – flowthrough z heparinové kolony (co se na kolonu nenavázalo); 4 – frakce 2 eluovaná z heparinové kolony; 5 - flowthrough z kobaltové kolony (co se na kolonu nenavázalo); 6 – frakce 2 eluovaná z kobaltové kolony (šipka značí protein IRS-1 HT).

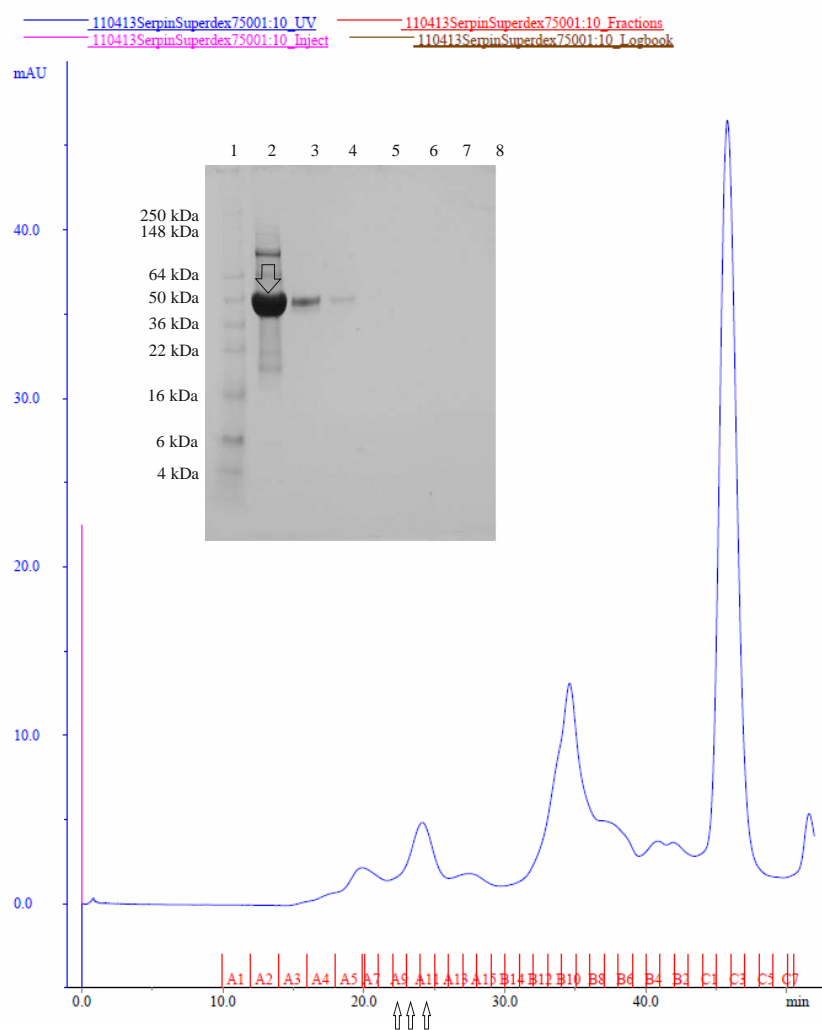
Pomocí Western Blotu se ověřilo, že jde o protein IRS-1 HT (viz obr. 8).



Obr. 8: Western Blot proteinu IRS-1 HT. 1 – protein eluovaný z kobaltové kolony (1. frakce); 2 – frakce 2 eluovaná z kobaltové kolony; 3 – frakce 2 eluovaná z heparinové kolony; 4 – flowthrough z heparinové kolony (co se na kolonu nenavázalo); 5 – původní materiál před purifikací; šipky značí protein IRS-1 HT.

Protein se povedlo přechistit, při následném zkoncentrování precipitoval. To se zjistilo při gelové filtraci, která se použila pro dělení proteinů podle molekulové hmotnosti (viz obr. 9).

Na gelové filtraci bylo zjištěno, že protein IRS-1 HT má nižší koncentraci, než bylo očekáváno vzhledem k výsledkům SDS-PAGE elektroforézy proteinu přečištěného na heparinové a kobaltové koloně (viz obr. 7). Důvodem bylo vysrážení proteinu z roztoku. To se potvrdilo SDS – PAGE elektroforézou proteinu po gelové filtraci a peletu po stočení proteinu po přečištění na kobaltové koloně (viz obr. 9).



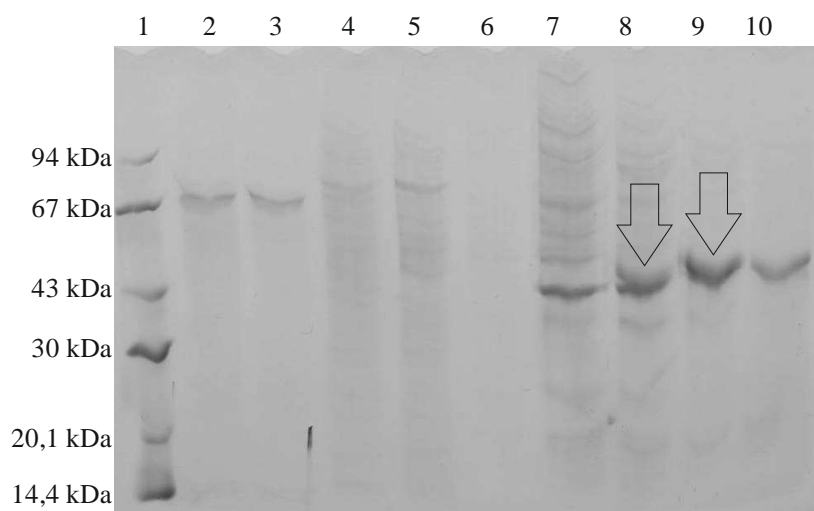
Obr. 9: Gelová filtrace na koloně Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) a SDS – PAGE elektroforéza proteinu IRS-1 HT po gelové filtraci. Gelová filtrace: Protein IRS-1 HT byl eluován ve frakci A9 - A11 (viz šipky). SDS – PAGE elektroforéza: 1 - marker SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen); 2 – pelet po stočení proteinu před aplikací na gelovou filtraci (šipka značí protein IRS-1 HT); 3 – frakce A9+A11 po gelové filtraci; 4 – frakce B9 po gelové filtraci; 5 - frakce B10 po gelové filtraci; 6 - frakce B11 po gelové filtraci; 7 – frakce B12 po gelové filtraci; 8 - frakce C2+C3 po gelové filtraci.

Byla také změřena koncentrace proteinu IRS-1 HT (viz tab. V).

Tab. V: Koncentrace proteinu IRS-1 HT po zkoncentrování po gelové filtraci na koloně Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare).

Název frakce	Koncentrace (µg/ml)
A9	300
A10	390
A11	275
A12	120

Další provedená exprese se nepodařila v takové míře, jako předchozí. Protein se přečistil na kobaltové koloně HiTrap™ IMAC FF (5 ml) (GE Healthcare) (viz obr. 10 a příloha – obr. 14 a obr. 15).



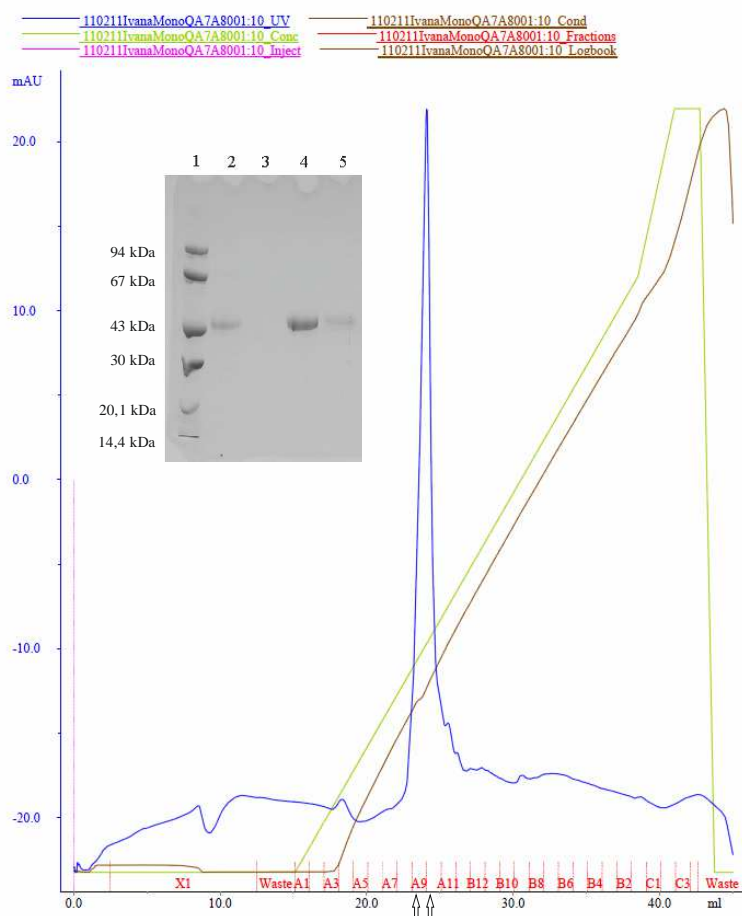
Obr. 10: SDS – PAGE elektroforéza proteinu IRS-1 HT přečištěného na heparinové koloně HiTrap™ Heparin HP (GE Healthcare) a poté na kobaltové koloně HiTrap™ IMAC FF (5 ml) (GE Healthcare). 1 – marker LMW (GE Healthcare); 2 –původní materiál před purifikací na heparinové koloně; 3 - flowthrough z heparinové kolony (co se na kolonu nenavázalo); 4 – frakce eluovaná z heparinové kolony; 5 - flowthrough z kobaltové kolony (co se na kolonu nenavázalo); 6 – frakce A4 po přečištění na kobaltové koloně; 7 – frakce A5 po přečištění na kobaltové koloně; 8 – frakce A6 po přečištění na kobaltové koloně; 9 – frakce A7 po přečištění na kobaltové koloně; 10 – frakce A8 po přečištění na kobaltové koloně; Šipka značí protein IRS-1 HT.

Koncentrace frakcí obsahujících protein IRS-1 HT byla změřena po přečištění na kobaltové koloně (viz tab. VI).

Tab. VI: Koncentrace frakcí obsahujících protein IRS-1 HT po přečištění na kobaltové koloně HiTrap™ IMAC FF (5 ml) (GE Healthcare).

Frakce	Koncentrace (µg/ml)
A5+A6	160
A7+A8	82

K dalšímu zakoncentrování frakcí A7+A8 eluovaných z kobaltové kolony došlo pomocí dialýzy a iontové výměny na koloně Mono Q HR 5/5 (GE Healthcare) (viz obr. 11). Změřila se koncentrace proteinu (viz tab. VII).



Obr. 11: Iontová výměna na koloně Mono Q HR 5/5 (GE Healthcare) a SDS – PAGE elektroforéza po jejím provedení. SDS – PAGE elektroforéza: 1 – marker LMW (GE Healthcare); 2 – protein IRS-1 HT přečištěný na kobaltové koloně; 3 – frakce A8; 4 – frakce A9+A10 (purifikovaný protein IRS-1 HT); 5 - frakce A11. Iontová výměna na koloně Mono Q: Protein IRS-1 HT byl eluován ve frakci A9 a A10 (viz šipky).

Tab. VII: Koncentrace frakce obsahující přečištěný protein IRS-1 HT po iontové výměně Mono Q HR 5/5 (GE Healthcare).

Frakce	Koncentrace (µg/ml)	Objem (ml)
A9+A10	75	2

Z frakce A9+A10 byly vytvořeny 4 x 0,5 ml alikvoty, 3 z nich se uchovávaly ve 4 °C, 1 se skladoval v -18 °C.

3.5 Biochemická analýza proteinu IRS-1 HT

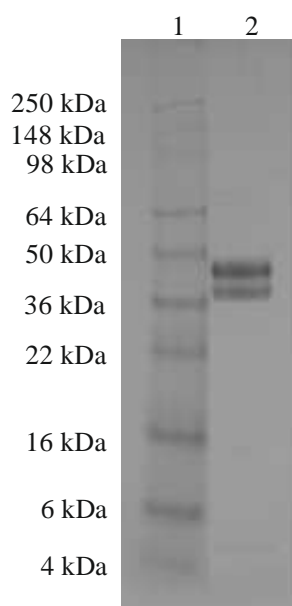
Biochemická analýza přečištěného proteinu IRS-1 HT byla provedena Michalisem Kotsyfačikem, Ph.D. Biochemické testy byly prováděny při 30 °C třikrát. Všechny použité enzymy byly lidského původu, čištěné či rekombinantní.

Bylo zjištěno, že protein IRS-1 HT výrazně inhibuje kallikrein, trypsin, a-chymotrypsin, elastázu, katepsin G, u-PA, plasmin, matriptázu, t-PA. Enzymatická aktivita byla výrazně snížena oproti kontrolní skupině hlavně u elastázy (na 10,8 % ± 5,4 % původní aktivity), plasminu (na 11,7 % ± 1,2 % původní aktivity), matriptázy (na 0,2 % ± 0,2 % původní aktivity) a t-PA (na 24,2 % ± 1,3 % původní aktivity). Výsledky biochemické analýzy jsou zaznamenány v tab. VIII.

Tab. VIII: Výsledky biochemické analýzy proteinu IRS-1 HT. Tučně jsou označeny enzymy, u nichž byla zaznamenána výrazná inhibice.

Enzym	Množství použitého enzymu (nM)	Zbývající enzymatická aktivita v přítomnosti 360 nM IRS-1 HT (%)
Trombin	0,01	97 ± 1
Faktor Xa	0,33	91,5 ± 2,5
Kallikrein	0,1	67,3 ± 2,7
Chymáza	0,9	101,1 ± 1
Trypsin	0,1	46,9 ± 0,5
a-chymotrypsin	0,025	60,7 ± 3,5
b-tryptáza	0,01	96,7 ± 2,1
Elastáza	0,18	10,8 ± 5,4
Katepsin G	4,4	66,3 ± 3,9
u-PA	0,125	54,2 ± 0,5
Plasmin	0,4	11,7 ± 1,2
Matriptáza	0,1	0,2 ± 0,2
Faktor XIa	0,06	96,4 ± 3,3
Faktor XIIa	0,1	95,9 ± 2
t-PA	0,012	24,2 ± 1,3
Granzym B	7,7	91,1 ± 4,8
Proteináza 3	8,2	94,1 ± 5,5

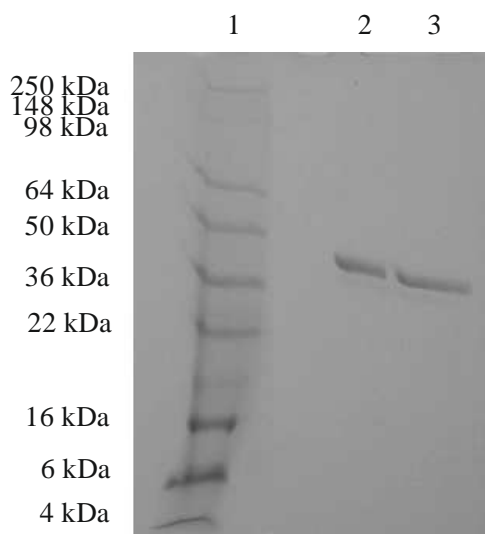
Po biochemické analýze byla provedena kontrolní SDS – PAGE elektroforéza proteinu IRS-1 HT ponechaného při pokojové teplotě 5 dní, aby se zjistilo, zda je vzorek stabilní (viz obr. 12). Vzorek byl zřejmě štěpen v přítomnosti proteáz.



Obr. 12: SDS – PAGE elektroforéza: Testování stability vzorku IRS-1 HT po biochemické analýze. 1 - marker SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen); 2 – frakce A9 + A10.

3.6 Skladování proteinu IRS-1 HT

Po odhalení precipitace proteinu IRS-1 HT po první purifikaci se pomocí SDS-PAGE elektroforézy otestovalo, zda k ní nedochází po úspěšné purifikaci při skladování vzorku při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ dva týdny. Bylo zjištěno, že při zamražení proteinu IRS-1 HT k precipitaci nedochází (viz obr. 13).



Obr. 13: SDS – PAGE elektroforéza: Testování precipitace IRS-1 HT u zamražených a nezamražených vzorků (po stočení 25 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 2860 g). 1 - marker SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen); 2 – frakce A9 + A10 po skladování v $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a stočení; 3 – frakce A9 + A10 po skladování ve $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a stočení.

Vhodnější bude protein IRS-1 HT před biochemickými analýzami skladovat v – 18 °C.

4. Diskuze

V současné době došlo díky „high-throughput“ přístupu k identifikaci mnoha nových genů a proteinů pocházejících ze slinných žláz klíštěte. U proteinů, jejichž příbuzné formy vykazují imunomodulační vlastnosti, je vhodné provést další výzkum například vytvořením rekombinantního proteinu, jenž lze dále testovat (Valenzuela, 2002).

Rekombinantní protein Iris připravený z intracelulárního serpinu (44 kDa) působí na Th2 imunitní odpověď hostitele (Leboulle a kol., 2002). Dále u něj byla objevena slabá antihemostatická aktivita. Iris je tedy serpin s antihemostatickými a imunomodulačními účinky. Vakcinace rekombinantním proteinem Iris měla částečné účinky (viz úvod) (Prevot a kol., 2006; Prevot a kol., 2007).

Použití serpinů k vakcinaci je zajímavé i z toho důvodu, že jsou klíčové pro regulaci metabolismu parazita a hemostázu hostitele (Prevot a kol., 2007).

Slibné výsledky vakcinace proteiny serpinů byly zaznamenány u klíšťat *A. variegatum* (Kazimirova a kol., 2002), *R. appendiculatus* (Mulenga a kol., 2003) a *H. longicornis* (Imamura a kol., 2005). Rekombinantní protein *Haemaphysalis longicornis* serpin-2 (HLS2) klíštěte *H. longicornis* inhiboval trombin. Při vakcinaci byla zaznamenána 44,6% úmrtnost nymf a 43% úmrtnost dospělců. HLS2 by tedy mohl být důležitým kandidátem na vakcínu proti klíšťatům (Imamura a kol., 2005).

Při vůbec prvním výzkumu přístupem „high-throughput“ provedeným na klíštěti *Ixodes ricinus* byla připravena cDNA knihovna ze slinných žláz tohoto klíštěte v různých fázích sání. Kolem 600 genů bylo sekvenováno a podrobena analýze (Chmelař a kol., 2008).

Z cDNA knihovny byly vybrány geny IRS-1, IRS-2, IRS-4 a IRS-8. Pro poměrně rychlé získání protilátek proti vybraným serpinům obsaženým ve slinách klíštěte *Ixodes ricinus* byla vyzkoušena metoda DNA vakcinace. Zjistilo se, že tuto metodu lze využít pro získání protilátek. Připravené protilátky však nejsou příliš specifické a je třeba počítat se zkříženou reaktivitou (Šubrtová, 2009).

Tato práce měla za cíl přípravu inhibitoru serinových proteáz z klíštěte *Ixodes ricinus* v bakulovirovém expresním systému. Pro tuto bakalářskou práci byly použity geny pro IRS-1 a IRS-8, které byly nalezeny pomocí screeningu cDNA knihovny sondou specifickou pro serpiny (Chmelař a kol., 2011).

Bakulovirový expresní systém má oproti bakteriálnímu několik výhod: Produkované proteiny jsou téměř vždy funkční a správně složené.

Geny IRS-1 a IRS-8 byly po amplifikaci zaklonovány do expresního plazmidu pBacPAK9 (Clontech). Pro následnou transfekci byly použity hmyzí buňky Sf9 (OET) – exprese v těchto buňkách umožňuje vznik posttranslačních modifikací (např. glykosilací) (Huntington, 2006).

Purifikaci proteinu IRS-1 HT komplikovala jeho precipitace při zakoncentrování. Změna vazebného roztoku po heparinové koloně na 200mM TRIS HCl (pH = 7,5) pomohla k tomu, aby se získal purifikovaný protein IRS-1 HT. Přesto je zde prostor k vyzkoušení dalších vazebných pufrů, aby se celý průběh purifikace zoptimalizoval.

Po eluci proteinu z kobaltové kolony pomocí imidazolu byla provedena dialýza a iontová chromatografie. Podařilo se vyprodukovat rekombinantní protein IRS-1 HT v bakulovirovém expresním systému. Předpokládaná molekulová hmotnost připraveného proteinu IRS1-HT byla 46 kDa.

Biochemická analýza byla provedena Michalisem Kotsyfakisem, Ph.D. Při biochemické analýze proteinu IRS-1 HT bylo zjištěno, že výrazně inhibuje kallikrein, trypsin, a-chymotrypsin, elastázu, katepsin G, u-PA, plasmin, matriptázu, t-PA. To naznačuje, že by se mohlo jednat o významný imunomodulační protein.

Dále bylo zjištěno, že bude vhodnější protein IRS-1 HT před biochemickými analýzami skladovat v -18 °C – nedocházelo totiž k precipitaci při zamražení.

Porovnáme – li tyto výsledky s výsledky, jakých dosáhl Prevot s Iris (Prevot a kol., 2006), IRS-1 HT oproti Iris výrazněji inhibuje elastázu, t-PA a plasmin, naopak IRS-1 HT oproti Iris méně inhibuje trombin a faktor Xa.

Gen IRS-1 exprimovaný v této práci v bakulovirovém expresním systému odpovídá genu IRIS-2 exprimovanému v bakteriálním expresním systému (fúzní protein s His-tagovou kotvou).

Bylo otázkou, zda absence posttranslačních úprav proteinu exprimovaného v bakteriálním expresním systému nebude mít vliv na jeho funkci (Chmelař a kol., 2005). Na druhou stranu ne vždy musí být posttranslační úpravy – zde glykosilace, klíčové pro funkci proteinu (Potempa a kol., 1994).

IRIS-2 prokázal účinek ve většině testů. IRIS-2 vykazoval výrazný inhibiční účinek na produkci IFN- γ v kultuře myších splenocytů aktivovaných lipopolysacharidem. Stimuloval produkci IL-10 splenocyty, IL-6 a NO makrofágy, naopak inhiboval produkci TNF- α a fagocytózu makrofágů (uvedeno již výše) (Chmelař a kol., 2005).

Porovnání výsledků biochemické analýzy IRS-1 HT exprimovaném v bakulovirovém expresním systému a IRS-1 HT exprimovaném v bakteriálním systému provedené RNDr. Jindřichem Chmelařem, Ph.D. (nepublikované výsledky) jsou zaznamenány v tab. IX.

Tab. IX: Výsledky biochemické analýzy proteinu IRS-1 HT exprimovaného v bakulovirovém expresním systému a IRS-1 HT exprimovaného v bakteriálním expresním systému (Chmelař, nepublikované výsledky). Tučně jsou označeny enzymy, u nichž byla zaznamenána výrazná inhibice.

Enzym	Množství použitého enzymu (nM)	Zbývající enzymatická aktivita v přítomnosti 360nM IRS-1 HT (%) (bakulovirový exp. systém)	Množství použitého enzymu (nM)	Zbývající enzymatická aktivita v přítomnosti 400nM IRS-1 HT (%) (bakteriální exp. systém)
Trombin	0,01	97 ± 1	0,01	94,9 ± 2,7
Faktor Xa	0,33	91,5 ± 2,5	0,8	103.1 ± 0.9
Kallikrein	0,1	67,3 ± 2,7	0,8	55.6 ± 1.2
Chymáza	0,9	101,1 ± 1	1,8	105.7 ± 2.9
Trypsin	0,1	46,9 ± 0,5	0,25	26 ± 2.1
a-chymotrypsin	0,025	60,7 ± 3,5	0,05	28.4 ± 2.4
b-tryptáza	0,01	96,7 ± 2,1	0,27	112.5 ± 7.7
Elastáza	0,18	10,8 ± 5,4	0,01	62.4 ± 2.3
Katepsin G	4,4	66,3 ± 3,9	10	88.5 ± 2.2
u-PA	0,125	54,2 ± 0,5	0,7	102.4 ± 1.2
Plasmin	0,4	11,7 ± 1,2	0,25	34.3 ± 2.5
Matriptáza	0,1	0,2 ± 0,2	1,2	36.4 ± 0.7
Faktor XIa	0,06	96,4 ± 3,3	0,06	100 ± 3.1
Faktor XIIa	0,1	95,9 ± 2	1,2	94.6 ± 0.8
Granzym B	7,7	91,1 ± 4,8	20	99.8 ± 4.9

Z výsledků vyplývá, že i když bylo použito různé množství enzymů, IRS-1 HT exprimovaný v bakulovirovém expresním systému výrazněji inhibuje elastázu, katepsin G, u-PA, plasmin, a matriptázu. Naopak IRS-1 HT exprimovaný v bakteriálním expresním systému výrazněji inhibuje kallikrein, trypsin a a-chymotrypsin. Rozdíly by mohly být způsobeny glykosilacemi v IRS-1 HT proteinu exprimovaného v bakulovirovém expresním systému.

Nabízí se otázka, zda by inhibičních vlastností IRS-1 HT produkovaného v bakulovirovém expresním systému nešlo využít například k výrobě vakcíny proti klíšťatům. Komerčně se už využívá vakcína proti klíšťeti *Boophilus microplus*, které přenáší babeziózu, jak už bylo uvedeno v úvodu (Willadsen a kol., 1995). Další výzkum v podobě vakcinace myši je vhodným pokračováním tohoto výzkumu.

5. Závěr

Za pomoci specifických primerů byl z cDNA klíštěte *Ixodes ricinus* namnožen gen pro serpin IRS-1 HT a IRS-8. IRS-1 HT byl zaklonován do plazmidu pBacPAK9 (Clontech). Transformace proběhla pomocí buněk *E. coli* One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Plazmidová DNA byla úspěšně osekvenována.

Byl připraven rekombinantní protein IRS-1 HT. Exprese proteinu IRS-1 HT proběhla v hmyzích buňkách Sf9 (OET). Byla provedena jeho biochemická analýza. Zjistilo se, že výrazně inhibuje kallikrein, trypsin, α -chymotrypsin, elastázu, katepsin G, u-PA, plasmin, matriptázu a t-PA.

Bylo zjištěno, že vzorek je vhodné skladovat při -18 °C.

6. Literatura

ANGUITA, J., RAMAMOORTHY, N., HOVIUS, J. W., DAS, S., THOMAS, V., PERSINSKI, R., CONZE, D., ASKENASE, P. W., RINCÓN, M., KANTOR, F. S., FIKRIG, E. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity*, 2002. 16: 849-859.

BROSSARD, M., WIKELL, S. K. Tick immunobiology. *Parasitology*, 2004. 129: S161-S176.

DANIELOVÁ, V., RUDENKO, N., DANIEL, M., HOLUBOVÁ, J., MATERNA, J., GOLOVCHENKO, M., SCHWARZOVÁ, L. Extension of *Ixodes ricinus* tick and agents of tick borne diseases to mountains areas in the Czech Republic. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006. 296: 48-53.

DE LA FUENTE, J., RODRÍGUEZ, M., MONTERO, C., REDONDO, M. A KOL. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genetic analysis*, 1999. 15: 143-148.

FRANCISCHETTI, I. M. B., SÁ-NUNES, A., MANS, B. J., SANTOS, I. M., RIBEIRO, J. M. C. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*, 2009. 14: 2051-2088.

GETTINS, P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical Reviews*, 2002. 102: 4751-4803.

GOODMAN, J. L., DENNIS, D. T., SONENSHINE, D. E. Tick-borne diseases of humans, 1.vydání. Washington: *ASM Press*, 2005. 401 p. ISBN 1-55581-238-4.

HAMMOND, G. L., SMITH, C. L., GOPING, I. S., UNDERHILL, A., A KOL. Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine proteinase inhibitors. *Biochemistry*, 1987. 84: 5153 – 5157.

HUNTINGTON, J. A. Shape-shifting serpins – advantages of a mobile mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*, 2006. 31: 427-435.

CHMELAŘ, J. Identifikace imunomodulačních molekul ze slin klíštěte *Ixodes ricinus*. 2005. Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 60 p..

CHMELAŘ, J., ANDERSON, J. M., MU, J., JOCHIM, R. C., VALENZUELA, J. G., KOPECKÝ, J. Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. *BMC Genomics*, 2008. 9: 233-254.

CHMELAŘ, J., OLIVEIRA, C. J., REZACOVA, P., FRANCISCHETTI, I. M. B., A KOL. A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*, 2011. 117: 736-744.

IMAMURA, S., DA SILVA VAZ JUNIOR, I., SUGINO, M., OHASHI, K., ONUMA, M. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*, 2005. 23: 1301-11.

IRVING, J. A., PIKE, R. N., LESK, A. M., WHISSTOCK, J. C. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Research*, 2000. 10: 1845-1864.

JONES, L. D., HODGSON, E., NUTTALL, P. A. Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *Journal of General Virology*, 1989. 70: 1895-1898.

JONES, L. D., HODGSON, E., WILLIAMS, T. HIGGS, S., NUTTALL, P. A. Saliva activated transmission (SAT) of Thogoto virus: relationship with vector potential of different haematophagous arthropods. *Medical and Veterinary Entomology*, 1992. 3: 261-265.

JONES, L. D., KAUFMAN, W. R., NUTTALL, P. Modification of the skin feeding site by tick saliva mediates virus transmission. *Experientia*, 1992. 48: 779-782.

KAZIMÍROVÁ, M., JANCINOVÁ, V., PETRÍKOVÁ, M., TAKÁC, P., LABUDA, M., NOSÁL', R. An inhibitor of thrombin-stimulated blood platelet aggregation from the salivary glands of the hard tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 2002. 28: 97-105.

LEBOULLE, G., CRIPPA, M., DECREM, Y., MEJRI, N., BROSSARD, M., BOLLEN, A., GODFROID, E. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277: 10083-10089.

LOEBERMANN, H., TOKUOKA, R., DEISENHOFER, J., HUBER, R. Human α_1 -proteinase inhibitor: Crystal structure analysis of two crystal modification, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *Journal of Molecular Biology*, 1984. 177: 531-557.

MULENGA, A., KHUMTHONG, R., BLANDON, M. A. Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *Journal of Experimental Biology*, 2007. 210: 3188-3198.

MULENGA, A., KHUMTHONG, R., CHALAIRE, K. C. *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC Genomics*, 2009. 10:-.

MULENGA, A., SUGIMOTO, C., ONUMA, M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine agents. *Microbes and Infection*, 2000. 2: 1353-1361.

MULENGA, A., SUGINO, M., NAKAJIMA, M., SUGIMOTO, CH., ONUMA, M. Tick-encoded serine proteinase inhibitors (serpins); potential target antigens for tick vaccine development. *Japanese Veterinary Medical Science*, 2001. 63: 1063-1069.

MULENGA, A., TSUDA, A., ONUMA, M., SUGIMOTO, C. Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhiphicephalus appendiculatus*; cDNA cloning

and preliminary characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003. 33: 267-276.

NUTTALL, P. A., PAESEN, G. C, LAWRIE C. H., WANG H. Vector-host interactions in disease transmission. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2000. 4: 381-386.

POTEMPA, J., KORZUS, E., TRAVIS, J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, functions, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. 269: 15957-15960.

PREVOT, P. P., ADAM, B.,BOUDJELTIA, K. Z., BROSSARD, M., LINS, L., CAUCHIE, P., BRASSEUR, R., VANHAEVERBEEK, M., VANHAMME, L., GODFROID E. Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281: 26361-26369.

PREVOT, P. P., COUVREUR, B., DENIS, V., BROSSARD, M., VANHAMME, L., GODFROID, E. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*, 2007. 25: 3284-3292.

RIBEIRO, J. M. C, FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology*, 2003. 48: 73-88.

SILVERMAN, G. A., BIRD, P. I., CARRELL, R. W., CHURCH, F. C., A KOL. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276: 33293-33296.

SUGINO, M., IMAMURA, S., MULENGA, A., NAKAJIMA, M., TSUDA, A., OHASHI, K., ONUMA, M. A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine*, 2003. 21: 2844-2851.

ŠUBRTOVÁ, K. Využití technologie cDNA vakcín pro imunizaci vybranými proteiny klíštěcích slin. 2009. Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 69 p..

VALENZUELA, J. G. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002. 32: 1199-1209.

WAXMAN, L., SMITH, D. E., ARCURI, K. E., VLASUK, G. P. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science*, 1990. 248: 593-596.

WIKEL, S. K., BERGMAN, D. Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*, 1997. 13: 383-389.

WILLADSEN, P., BIRD, P., COBON, G. S., HUNGERFORD, J. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*, 1995. 110: S43-50.

7. Příloha

7.1 Sekvence serpinů převzatých z genové banky NCBI

IRS-1

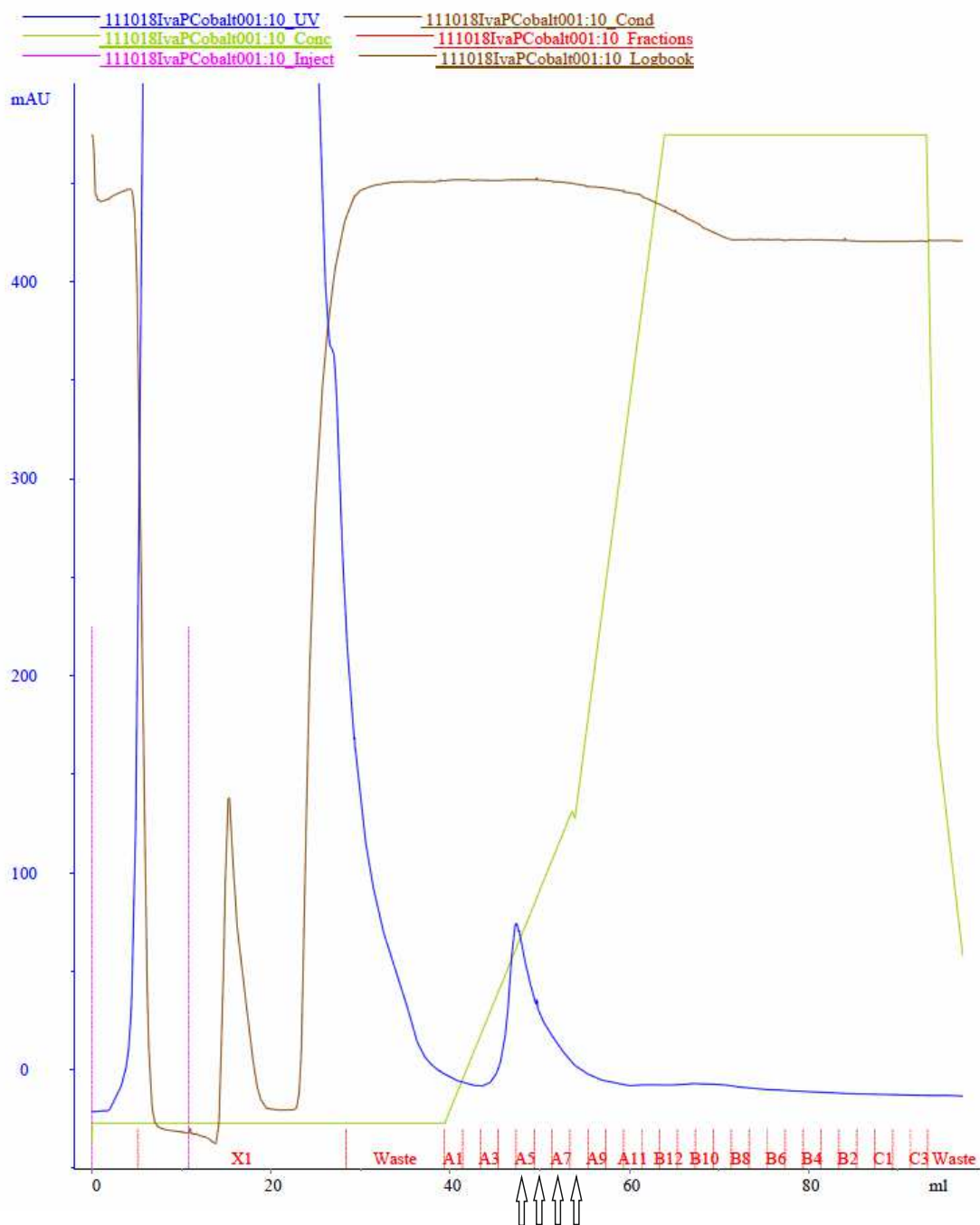
ATGAAGCCTCTAGTCCCTCTTCTATTTCTTCTGGTCAGCTGTTCGAGCACAAGGCA
ACGATAAACTTACCTTCGCCAACAATCAGTTCGGCCTGCGATTACTGAATACTCT
TCCAAGTCTCCAGAAGAAAACGTATTCTTCTCGCCCTATAGTGTATCCACAGCC
CTCGGAATGGCGTACGCCGGAGCTAGGGGAGACACACAAGAAGAGCTCTCGGA
ACAGCTAGGTTATACCGCCGCTGGGCTAAGCCAGGATGACGTCTTCAACGCGTA
CTCTGACCACACGCAGTGGCTAAAGGCTTCTAGGTCCAACCTCGACTCTAAGCGT
GGCGAACGCCGCCGTCCTACATGATAAAGTGGGGCTCCGTTACACGTTCCAAAG
AACCATCGATCACGCTTTCGACGCCGACATTCTGAAGGTCGACTTCGTCAACGA
ACGTAAAGGAGCCGTGGATCGCATCACTACTGGGTGAAGGACAAGACGAACG
GAAAGATTCGGTCGCTTTTTTAACAAGCCGCTAGAATCTGAGACGAGACTTGTT
TGCTCAACGCCATCTACTTCAAGGGATCCTGGAATACCAGGTTCAACAAGAGTA
GGACCGAAAAGAGCGAGTTCCTCAATGGCGGCGTCACTCCGACCAAGGTTGACA
TGATGATGGGGAGCATGAACATCGGCCACCATTTCTTCAGGGACCTGAAAATTG
ATGTGGCGGATTTCCCGTACCAGGGGCGGGACTACAGCATGACAGTCATCCTGC
CCTGGAGGAACGACGGCGTAGAAGCGATCAAGCAGAACCTCACTCTGGACCTGT
TTCAGAAGCTGGTGTTCGGAGCTGAGGGAAAGAAGGGTCTTCGTGTTATTTCAA
AGTTCAAAATAGAGGCAGAGTACTCCCTGAAGGAACCCCTCCAGAACCTGGGCA
TCAAACAGATCTTCAGTGGTGGCTCCGACCTGTCCGGCGTCACAAACGACAACG
ATCTTGTGGTGTCCGCCGTCGTCCACAAAGCGGTCCTGGAGGTCAATGAAGAAG
GAAGCGAAGCAGCAGCCGTGTCGAGTGTGTGGCCGTCACAAGGATTGGCACGC
AGGCATTCGAGTTCAACGTCGACCATCCTTTCTCTTTCATACGCAACACGGC
ACCAATGACATCCTGTTTTGCGGGACAAGTGAACAGTCTCTGA

IRS-8

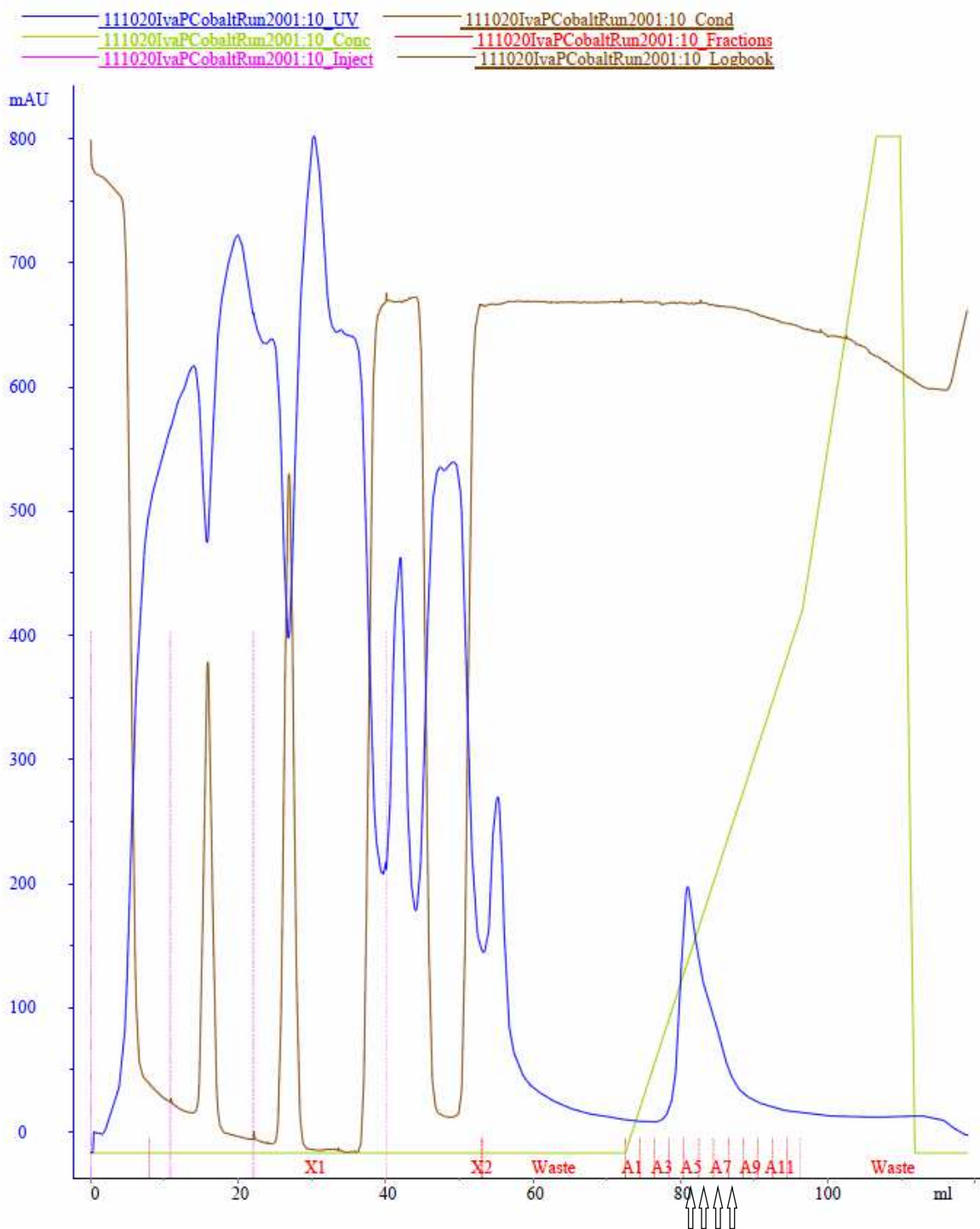
ATGACCCGCCTGCTGTGGCTCTTCGCCGCTATTACAGCGTCGTTAGCGCAAGACG
AAATCAGCCAAGACAAGTGAAGCTGGCACGAGCCAACAACCTACCTGGGGCTC
AATCTTCTCAAGCAGCTTCCCAGCAACGACAAGACCAACGTGTTCTTTTCGCCGT
TCAGCGTGTCCACAGCCATGGGCATGGCCTACGCCGGCGCCCGGGGACACCC
TGGAACAGTTGACGTTGAACTTCGGTTATGCTGCGGATGAACTCAACGAAGGCA

AGGTTCTCGCCTTGTTCAAGGAACAGCTCCAGTCGACCAACGACCTACCGCACG
ACTACACGCTCAACATCGCCAACGCAGCCGTGGCCCAAGAAGGGTACGGTATCC
TTCCTGAGTACACCGACGCACTCACGAGTTCCTTCGGTGCAGAGTACATCGAAG
CCGACTTCCAGAAACGCGGTCAAGAGGCCATACAGAAGATCAACGCTTGGGTTA
GCAACAGGACACATGGGAAGGTACAGAGTCTGTTCGACGAACCACCGGACTTCT
CGACTCGATTGATCCTCCTCAACGCCATCTACTATAAGGGGACGTGGCTGTACA
GTTTCGACAAGACGAAAACAAAGCCGAGGTCGTTCTACAACGGCGGTGTCGAGA
AGGTTTCAGGTACCCATGATGCGGCTCAAGTCAACTCTTAACCACACGTACAACG
CCATCCTCAACGCTGACCTTGTAGACCTGCCTTACGTCGGCAATGACTTCAGCAT
GACCATCATTCTGCCAGAGAGAAAACCGGATTGGCTTCGCTCAAGTCGGTTCT
GACGTCGCAGACGCTTAACCTCGCCCTCCAGAACATGTACCCCAAGGACATGAA
GCTGAAGCTTCCAAAGTTTAAGCTGGACACCAAATACACTCTCAAGCCCCCGCT
CGAAGCCATGGGCATCACAAAGATTTTTTCGGCCGACGCCGATCTTTCGGGTAT
CAGCGGTTTCGCGAAACCTCTACGTGTTTGATGTCCTACACAAGGCTGTGCTGGA
GGTCAATGAAGAAGGCAGCGAAGCCGCTGCCGTTACGGGTTTTGTTCATCCAGCT
AAGAACGGCCGCGTTTTGTGACGCCCCCCCCGTTGCCAAAGGTGTACGTAGATCA
TCCCTTCATTTTCCTCATCAGGAACTCTAAAACCAACACCATCATGTTTCCTGGGG
GAGATCAACGCCCTTTGA

7.2 Záznam průběhu filtrace na kobaltové koloně



Obr. 14: Záznam průběhu filtrace na kobaltové koloně (1.run). Protein IRS-1 HT byl eluován ve frakci A5, A6, A7 a A8 (viz šipky).



Obr. 15: Záznam průběhu filtrace na kobaltové koloně (2.run). Protein IRS-1 HT byl eluován ve frakci A5, A6, A7 a A8 (viz šipky).