

# Uttryck av AMBP i *E.coli*

**Författare: André Frank**

**Handledare: Maria Allhorn**

***Kandidatuppsats i molekylärbiologi, MOBK01 - 15 hp, maj 2018 - version 2***

Institutionen för infektionsmedicin – BMC, B14

Lunds universitet

## **Abstrakt**

Oxidativ stress i celler är en bakomliggande faktor till många dödliga sjukdomar. Detta kan kroppen reglera till en viss del med olika proteiner. Ett av proteinerna är Alfa-1-mikroglobulin (A1M) som kan sänka oxidativ stress i kroppen genom att t.ex binda till fria radikaler och bidra till vävnadsreparation. A1M transkriberas tillsammans med ett annat protein, bikunin, som har anti-inflammatoriska egenskaper och man vet inte riktigt varför detta sker, eftersom prokursorn klyvs isär till fritt A1M och bikunin innan sekretion från cellen. Det är av intresse att studera denna prekursor innan proteinerna klyvs, då man tror att den kan vara av medicinsk relevans. Jag har i detta projekt uttryckt AMBP försett med en His-tag från en plasmid i *E. coli*. Expressionen visade ett huvudsakligt proteinband på ca 40 kDa som innehöll både A1M och bikunin, vilket överensstämmer med förväntan.



**LUNDS**  
UNIVERSITET

# Innehållsförteckning S.1

<b>Introduktion</b> .....	2
<b>Oxidativ stress och fria radikaler</b> .....	2
<b>A1M – Struktur, funktion och genen</b> .....	3
<b>Bikunin</b> .....	4
<b>Bakteriell transformation</b> .....	5
<b>BL21(DE3) pLysE kompetenta celler</b> .....	7
<b>Klinisk signifikans</b> .....	8
<b>Frågeställning, syfte &amp; hypoteser</b> .....	9
<b>Tillvägagångssätt</b> .....	9
<b>Metod</b> .....	10
<b>Förberedning av prover</b> .....	10
<b>Gelelektrofores</b> .....	10
<b>Immunoblotting</b> .....	11
<b>Resultat</b> .....	12
<b>Diskussion</b> .....	14
<b>Referenser</b> .....	16

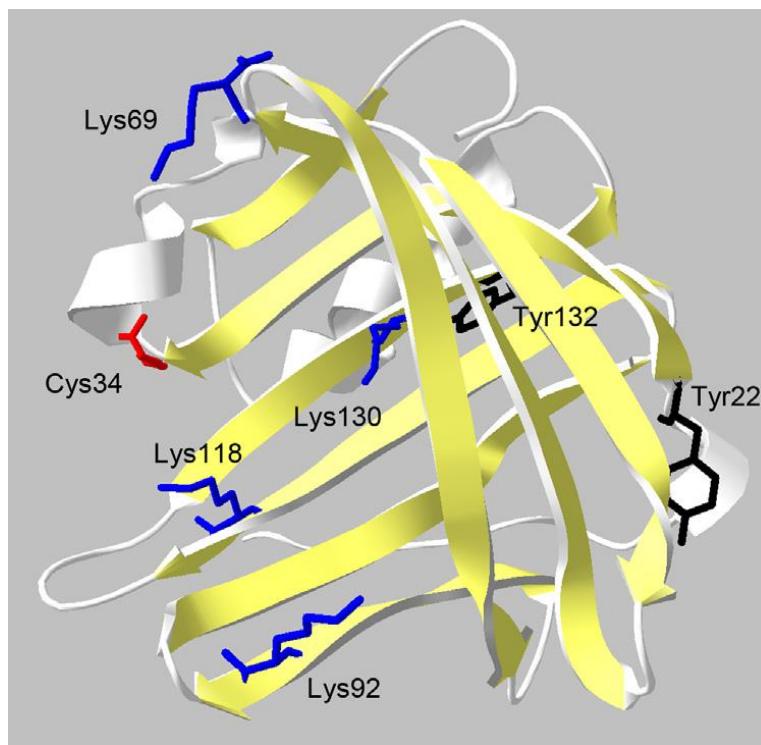
# Introduktion

## Oxidativ stress och fria radikaler

Oxidativ stress är starkt kopplat till olika former av cancer (Valko et al., 2007), Parkinsons (Hwang, 2013), ADHD (Joseph et al., 2015), Alzheimers sjukdom (Valko et al., 2007), hjärtinfarkt (Ramond et al., 2013) och många andra sjukdomar (Amer et al., 2006, Bonomini et al., 2008). Fria radikaler som orsakar oxidativ stress kan göra skada på alla typer av makromolekyler och även på strukturer och organ (Valko et al., 2007). Detta gör det nödvändigt att degradera dessa fria radikaler på ett säkert sätt, för att undvika cellulär skada. Denna oxidativa stress uppstår när vår redox balans rubbas av olika anledningar och detta ger då upphov till reaktiva syreföreningar. Bland dessa reaktiva syreföreningar ingår bland annat:  $\cdot\text{O}_2^-$  - superoxidanjonen,  $\text{H}_2\text{O}_2$  - väteperoxid,  $\cdot\text{OH}$  - hydroxylradikalen och  $\cdot\text{OR}$  – alkoxiradikalen (Lobo et al., 2010). Radikaler är definierade som molekyler, atomer eller joner med oparade valenselektroner, vilket gör dem kemiskt reaktiva mot andra substanser (Hayyan et al., 2016). Reaktiva syreföreningar är dock inte bara till vår nackdel, utan har också en fysiologisk funktion inom cellsignalering och vårt immunsystem för att oskadliggöra infektiösa patogener (Kim et al., 2013).

## A1M – Struktur, funktion och genen

A1M (Alfa-1-mikroglobulin) är ett relativt litet protein med en molekylärvikt på 26 kDa och är 183 aminosyror långt. Vi har haft vetskap om detta protein i ca. 40 år, men har inte förrän på senare tid kunnat förslå en exakt funktion för proteinet. Idag tror man att det har antioxidativa egenskaper och har en "house-keeping" funktion i kroppen samt kan reducera kroppsprotein som har blivit oxiderade, binda heme-grupper och binda skadliga fria radikaler (Åkerstrom and Gram, 2014). De fria radikalerna tros reagera med ett fritt cystein (Cys34) med negativ reduktionspotential (Gunnarsson et al., 2017). Man har även visat att A1M skyddar mitokondrier från den oxidativa miljön den skapar, genom att binda till en subenhet i komplex I (NADH-dehydrogenas) (Olsson et al., 2013). A1M tillhör lipokalin-familjen, en proteinfamilj som generellt transporterar små hydrofoba molekyler och har en karaktäristisk 3D-struktur, men har oftast en relativ sekvensidentitet på mindre än 20%. Vad som kännetecknar lipokalin-strukturen är den 8- eller 9-strängade, antiparallella,  $\beta$ -flak-veckningen på proteinet, vilket man kan beskriva som  $\beta$ -flak som går samman i en cylindrisk struktur, med ett internt ligand-sätet inuti strukturen (Flower, 1996). Denna struktur kan ses i figur 1.



Figur 1 - En kristallstruktur av A1M från 2014 som visar den karaktäristiska strukturen hos lipokalinfamiljer, med öppningen av cylindern till vänster i bild. Cys34 är ett kritiskt säte för den reducerande funktionen av A1M och föreslås vara heme-bindande samt medverkar i radikaleliminering (Åkerstrom and Gram, 2014, Rutardottir et al., 2013).

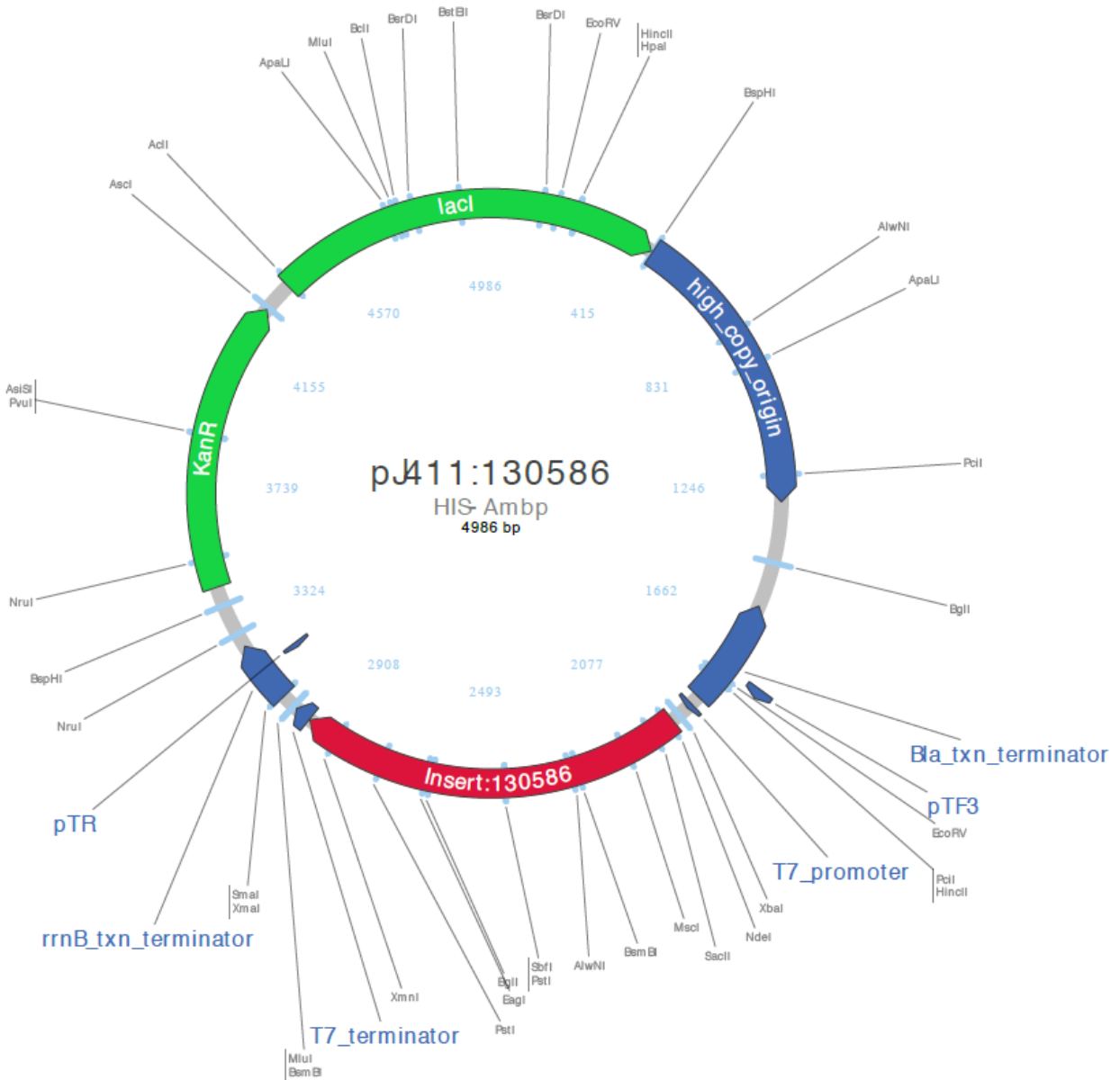
Något som förbryllar oss än idag är att detta protein transkriberas tillsammans med ett annat protein som inte verkar ha någon gemensam fysisk eller funktionell synergistiskt sammanhang, detta protein är bikunin och syntetiseras främst i levern (Åkerstrom and Gram, 2014). Genen som står för dessa produkter är känd som Alpha-1-Microglobulin-Bikunin Precursor (AMBP), denna protein-prekursor tas i animaliska celler till Golgiapparaten, där den klyvs vid given linker-sekvens (Bratt et al., 1993, Sanchez et al., 2002). Genen upp-regleras av oxidativ stress och resulterar alltså i att båda genprodukterna translateras tillsammans (Olsson et al., 2011, Åkerstrom and Gram, 2014). AMBP-genen har kartlagts till position 9q32-33 i människa (Diarrar-Mehrpour et al., 1989).

## **Bikunin**

Detta protein som translateras tillsammans med A1M är en plasma-proteinas inhibitor med två Kunitz-liknande domäner, dvs. den inhiberar enzym som klyver andra protein t.ex. många serin-proteaser som bidrar till inflammation såsom trypsin, trombin och plasmin, men även andra protein som elastas (Fries and Blom, 2000, Delaria et al., 1997, Pugia et al., 2007). Bikunin kan även ned-reglera pro-inflammatoriska cytokiner (IL-1 $\beta$  och TNF- $\alpha$ ) i immunceller där effekt är relativt till dos, genom att blockera LPS-inducerad sekretion av just dessa cytokiner via TLR-4 vid infektion (Kanayama et al., 2007). Bikunin är ett disulfidrikt protein trots sin lilla storlek, 12 stycken cysteiner bildar 6 stycken disulfidbryggor i ett komplicerat nätverk (Kaczmarczyk et al., 2005, Kanayama et al., 2007).

## **Bakteriell transformation**

Bakterier kan ta upp genetiskt material genom tre olika mekanismer: konjugation, transduktion och transformation. Genom transformation kan bakterier ta upp naket DNA i sin omgivning, vilket det finns gott om från döda organismer. Det finns flera bakteriella organismer som kan medverka i att utöka variansen på DNA som finns i omgivningen (Chen and Dubnau, 2004) *Streptococcus pneumoniae* och *Neisseria gonorrhoeae* är exempel på bakterier som aktivt kan utsöndra sitt DNA i ett medium för andra bakterier att ta upp (Steinmoen et al., 2003, Dillard and Seifert, 2001). DNA som tas upp av närliggande celler kan vara till bakteriens fördel, vilket kan sätta ett selektionstryck. Om t.ex. en gen för en given antibiotikaresistens tas upp, kan det ge bakterien en fördel i närvaro av den givna antibiotikan, men även andra funktioner som kan vara gynnsamma. Detta DNA tilläggs oftast i den bakteriella cellen som en plasmid, ett extra kromosomellt element (Lorenz and Wackernagel, 1994). I vårt projekt använder vi en plasmid med resistens mot ampicillin och kloramfenikol och vår AMBP gen är reglerad av en T7 promoter.



Figur 2 – AMBP-plasmiden som har tagits upp av vår BL21(DE3) pLysE variant av *E. coli*. Men är KanR (kanamycin resistens) är istället AmpR (ampicillin resistens).

## Human AIM-bikunin(FXa,Thr)Sequence - aminosyrasekvens

HHHHHHHHGG GGGIEGRGPV PTPPDNIQVQ ENFNISRIYG KWYNLAIGST  
CPWLKKIMDR MTVSTLVLGE GATEAEISMT STRWRKGVCE ETSGAYEKTD  
TDGKFLYHKS KWNITMESYV VHTNYDEYAI FLTKKFSRHH GPTITAKLYG  
RAPQLRETL QDFRVVAQGV GIPEDSIFTM ADRGECVPGE QEPEPILIPR  
GAVLPQEEEG SGGGQLVTEV TKKEDSCQLG YSAGPCMGMT SRYFYNGTSM  
ACETFQYGGC MGNGNMFVTE KECLQTCRTV AACNLPIVRG PCRAFIQLWA  
FDAVKGKCVL FPYGGCQNG NKFYSEKECR EYCGVPGDGD EELLRFSN

**N-terminal His-tag** - FXa-klyvningssäte - **AIM** - Trombin-klyvningssäte - **Bikunin**

*Figur 3 – AMBP sekvensen med His-tag i N-terminalen, denna His-tag kan klyvas bort med Faktor Xa (Fxa). Mellan AIM och bikunin sitter ett modifierat klyvningssäte för trombin, för reglerad klyvning. Klyvningssätena i figuren är understrukna.*

## BL21(DE3) pLysE kompetenta celler

Dessa typer av bakteriella celler är anpassade för att lättare transformera genetiskt material. Detta hjälper när man vill uttrycka proteiner som inte finns redan i bakterier, som man använder som modellorganism, samt att det är lättare att reglera genuttryck via ett inducerbart operon.

BL21(DE3) pLysE är en speciell variant ("strain" på engelska) av *E. coli*. Denna variant saknar OmpT yttermembran proteaser och detta resulterar i högre frekvens av ackumulation av rekombinerade proteiner, samt mindre degradering av dessa proteiner vid rening. Denna variant använder en T7 RNA promotor som kan ge ett högt utbyte proteiner kopplade när det induceras. (Donahue and Bebee, 1999, Studier et al., 1990).



## Klinisk signifikans

Många sjukdomar är som nämnt ovan, associerade med oxidativ stress som leder till skada på celler och vävnader. A1M är just nu i klinisk fas som potentiell medicin mot oxidativ skada vid sjukdomar som uppregerar reaktiva syreföreningar som t.ex. havandeskapsförgiftning (preeklampsi) och akut njurskada (Olsson et al., 2011, Wester-Rosenlof et al., 2014, Gunnarsson et al., 2017). Det är många argument som talar för att A1M kommer vara framgångsrikt i behandling av oxidativ skada, bl.a. att det är ett naturligt förekommande protein i kroppen, A1M är ca. 10 gånger mer effektivt att behandla fria radikaler än vitamin C & E, som är kända antioxidanter (Åkerstrom et al., 2017). Även efter reducering av oxidativa produkter och inbindning av fria radikaler, visar de inte tecken på att själv ge upphov till oxidativ skada (Åkerstrom and Gram, 2014, Ahlstedt et al., 2015). Bikunin verkar också ha potentiella egenskaper som medicinska preparat, eftersom proteinet verkar reglera antiinflammatoriska processer (Jian-qiu et al., 2008). Det skulle därför vara intressant att studera AMBP-prekursorn och försöka förstå varför dessa två proteiner uttryck hopkopplade med varandra. Detta kan leda till en bredare förståelse för exakta molekylära funktioner i kroppen och utveckling av optimala medicinska preparat.

En annan funktion som A1M potentiellt kan uppfylla, är en antimikrobiell funktion. De flesta patogener som infekterar oss, behöver järn i någon form. Detta kan vara fritt järn i plasma eller i ett komplex. Ett exempel är *Staphylococcus aureus* som lyserar erythrocyter och skördar järn från heme-gruppen av hemoglobinet. Fritt hemoglobin i blodet, är väldigt oxidativt och skadligt för närbelägna protein. A1M binder därför heme-gruppen med hög affinitet, vilket kan strypa bakterier på deras järnkälla (Francis et al., 1985, Åkerstrom and Gram, 2014).

## Frågeställning, syfte & hypoteser

*Frågeställning:* Går det att uttrycka en AMBP-prekursor i BL21(DE3) pLysE kompetenta celler?

*Hypotes:* Vi tror att det går för att en plasmid som innehåller denna AMBP-konstruktion har erhållits och transformation med BL21(DE3) pLysE kompetenta celler är en vanlig metod för att testa uttryck av främmande DNA för just denna variant av *E. coli*, då den är specialiserad på att ta upp och uttrycka naket DNA med IPTG-inducering.

*Syfte:* Vi vill uttrycka AMBP i BL21(DE3) pLysE kompetenta celler för att testa om denna variant av *E.coli* kan uttrycka AMBP. Om detta fungerar kan man ta steget vidare och försöka rena fram detta protein för att undersöka dess funktioner.

## Tillvägagångssätt

1. Konstruktion av plasmid med DNA kodande för AMBP försedd med N-terminal His-8-tag, klyvningssäte för Faktor Xa mellan His-tag och A1M, och klyvningssäte för trombin som linker mellan A1M och bikunin.
2. Transformerings av *E.coli* bakterier med plasmiden.
3. Småskalig odling av transformerade bakterier, induktion av plasmiden med IPTG, och SDS-PAGE och immunoblotting för att bekräfta rätt uttryck av AMBP.

# Metod

## Förberedning av prover

34 µg/ml ampicillin och 100 µg/ml kloramfenikol tillsattes till 1.5 ml Luria-Bertani medium (5 g jäst-extrakt, 10 g trypton och 5 g NaCl i 1 L millipore H<sub>2</sub>O som autoklaverades) i ett 50 ml polypropylenrör och inokulerades med pJ411:130586 transformerade BL(DE3)pLysE via en platinös. Detta inkuberades under omskakning (200 rpm) i 37° C i 1 h.

1.5 µl IPTG tillsattes, så att slutliga koncentrationen blev 1 mM, för att inducera uttryck av vår prekursor i cellerna. Detta inkuberades under omskakning (260 rpm), 37° C över natten (18h).

Cellerna skördades (pelleten) efter centrifugering (10 min, 10000x g), därefter återupplöses pelleten i 25 µl avjonat vatten och 35 µl Laemmi sample buffer. Cellerna lyserades genom kokning, 3 minuter i 100° C.

## Gelelektrofores

Proverna laddades på BIO-RAD TGX 12 % stain-free pre-cast gel™ 12 wells, 20 µl. I varje gel laddades 0.7 µl BIO-RAD All Blue standard i brunn 1 och 5 µl BIO-RAD Unstained standard i brunn 2. Med volymen av varje prov som laddades, laddades även motsvarande mängd Laemmi buffer, detta blandades i Eppendorfrör innan pipettering ner i brunnen. Gelen i figur 4 kördes i 1 timme på 180 V. Därefter fördes gelerna över till ett bad med avjonat vatten och analyserades med ett BIO-RAD Chemidoc™ imaging system i rumstemperatur.

## **Immunoblotting**

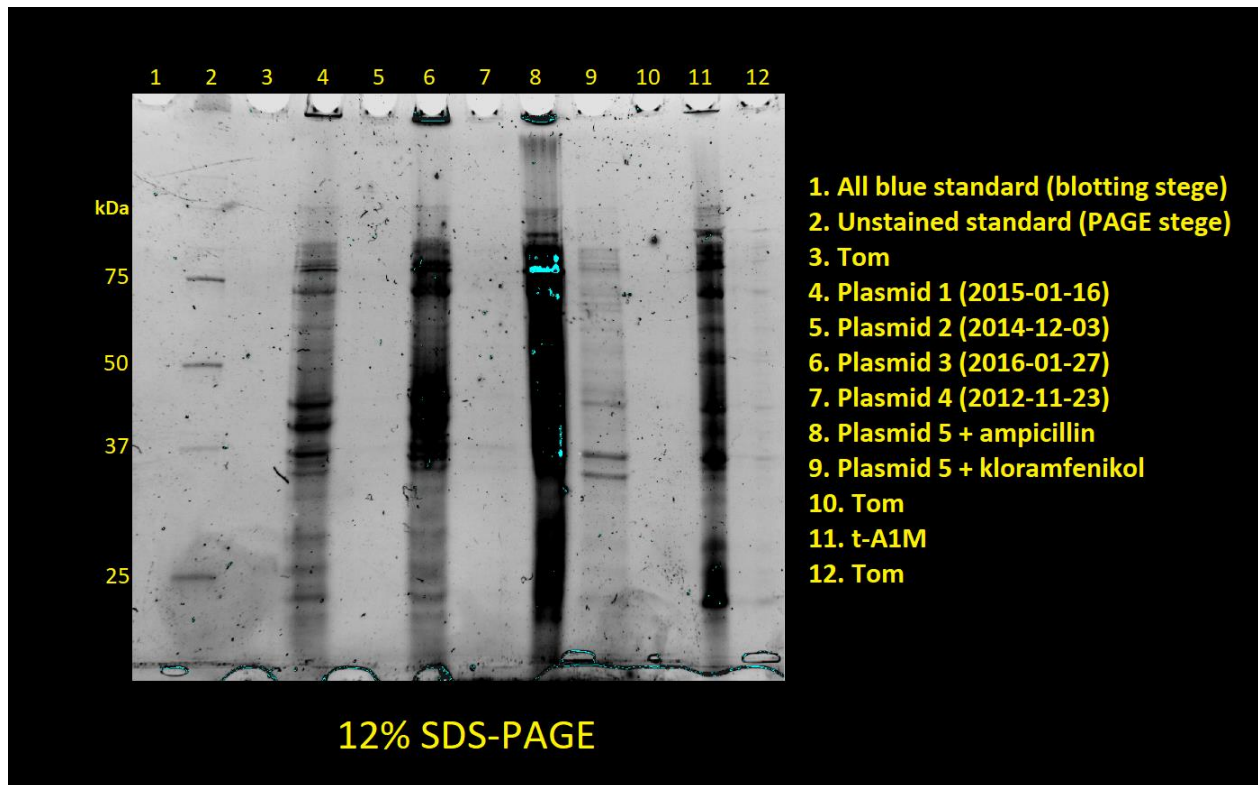
Två set av filterpapper blötlades i trans-blotbuffert (0.025 M Tris, 0.192 M glycin och 20 % metanol). Membranet (PVDF) aktiverades i 95 % metanol, i dragskåp. Kassetten laddades med set av filterpapper, membran, gel och ännu ett set av filterpapper. BIO-RAD Trans Blot Turbo maskin kördes på 25 V under 3 minuter.

Membranen fördes senare till ett 50 ml polypropylenrör med 10 ml blockeringsbuffert (1 tablett MilliporeSigma PBST pH 7.2 i 1 L millipore H<sub>2</sub>O och 5% skummat mjölkpulver). Det lades på omrörning i 1 h. Efter detta tömdes rören på vätskeinhåll och fylldes med 5 ml antikroppbuffert (1 tablett MilliporeSigma PBST pH 7.2 i 1 L millipore H<sub>2</sub>O och 1% skummat mjölkpulver) samt 5 µl av given primär antikropp. I detta experiment används kanin anti-A1M (K107, Agrisera, Umeå, Sverige) och kanin anti-bikunin (Bjärta, Agrisera, Umeå, Sverige). Detta inkuberas över natten, för att binda (15h, 30 min), med omrörning i 4°C.

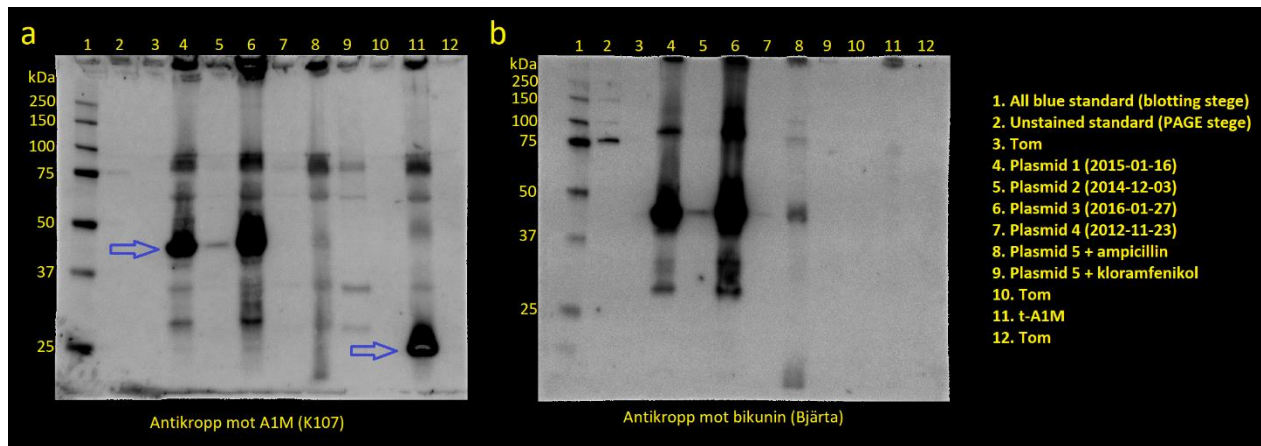
Rören tvättades sedan med 30 ml PBST 3 gånger, 5 minuter per gång. Sedan tillsattes antikroppbuffert samt 2 µl av sekundär antikropp. I detta experiment användes get anti-kanin (Alexa 647) inklusive markör. Detta inkuberas i 1 h, under omrörning i mörker. Rören tvättades igen med 30 ml PBST 3 gånger, 5 minuter per gång. BIO-RAD Chemidoc™ imaging system användes igen för att analysera membranerna, med inställning på att detektera  $\lambda = 647$  nm. Resultat för immunoblotting kan ses i figur 5.

## Resultat

En plasmid med den beskrivna DNA-konstruktionen fanns tillgänglig på labbet. Nedfrysta transformerade bakterier med AMBP-plasmid testades för uttryck av vår prekursor. Figur 4 och 5 visar gelelektrofores och immunoblotting med anti-A1M och anti-bikunin av proverna.



Figur 4 - Gelelektrofores på en 12 % stain-free pre-cast gel med 5 olika laddade prover. Prov 4-9 innehåller 5 olika *E.coli* bakteriepelletar transformerade med AMBP-plasmid. Prov 11 innehåller bakteriepellet transformerad med plasmid kodande för t-A1M som positiv kontroll. Gelen har framkallats med avseende på totalprotein-innehåll ("stain-free"-position). 8 µl laddades av varje plasmid.



Figur 5 - Immunoblotting av samma prover som i figur 4. Blåa pilar illustrerar position av A1M-innehållande band. Antikropp mot A1M visar inbindning till ett 40 kDa-band i två AMBP plasmider och t-A1M (kontroll). Antikropp mot bikunin visar inbindning till samma 40 kDa-band som anti-A1M i två av AMBP-plasmiderna.

Tre prover av de transformerade bakterierna visade tillväxt (figur 4). Två av dessa tre prover uttryckte ett 40 kDa-band som detekterades med både anti-A1M och anti-bikunin (plasmid 1 och 3 i figur 5). Detta 40 kDa-band uppfyller alltså kriterierna för AMBP-prekursorn. Transformation med känd plasmid kodande för en A1M-variant kallad t-A1M inkluderades som positiv kontroll för A1M blottingen.

## Diskussion

I figur 4 kan man se två plasmider som inte visade tillväxt av kultur (plasmid 2 och 4), metoden som användes var relativt tuff mot bakterierna och anledningen till att ingen tillväxt skedde tros vara pga. en för tuff övergångsfas; att gå från -80 °C i glycerol till ett rumstempererat medium kan orsaka för höga nivåer av stress. Alternativet här hade kunnat vara att stryka ut plasmiden på en agar-platta först och sedan selektera för de kolonier som överlever. Detta ger även en mer homogeniserad kultur.

I figur 5 kan det konstateras att ett proteinband runt 40 kDa binder till både antikropp mot A1M och bikunin i plasmid 2 och 4. Detta antas vara AMBP-prekursorn. Brunn 11 i figur 5a, visar en positiv kontroll för test av antikropp mot A1M, för att säkerställa att antikroppen fungerar.

Vi har visat i detta projekt att AMBP-prekursorn kan uttryckas i *E. coli* i rekombinant form. Syftet med detta är att rena upp prekursor och undersöka AMBP-prekursorn kan uppfylla både A1Ms och bikunins funktion, samt lika effektivt dvs. sitter några av de aktiva enzymatiska sätena blockerade i AMBP? Detta tros ge en bättre förståelse för både A1Ms och bikunins funktion som medicinska preparat. Vidare studier kan också hjälpa oss att svara på frågan: varför transkriberas dessa två produkter tillsammans?

En bakteriepellet med AMBP fanns tillgänglig på labbet och det försöktes även att rena fram AMBP från denna bakteriepellet. Slutresultaten visade att AMBP var rent, men hade format en del aggregat och därmed antas att prekursor inte är stabil. Detta antogs då proteinband korresponderade till multiplar av två och tre gånger molekyllärvikten av AMBP, detekterades i en immunoblotting med antikroppar mot A1M och bikunin. Aggregaten kan renas bort med storleksseparerande gelfiltrering, men har inte gjorts än. AMBP-prekursorn tros vara instabil för att den klyvs tidigt efter translation till A1M och bikunin och behöver därmed inte vara stabil. Det tros även att de fysikaliska förhållandena inte var optimala, dvs. att det är inte exakt samma koncentration på molekyler runt ribosomerna och Golgiapparaten som det var i vår buffert och detta kan bidra till instabilitet. Detta har inte dokumenterats i denna uppsats.

## **Uppskattningar**

Jag vill tacka speciellt min handledare Maria Allhorn och Bo Åkerström för hjälpen de gav mig under detta projekt och möjligheten att göra detta projekt på deras avdelning.



## Referenser

- AHLSTEDT, J., TRAN, T. A., STRAND, S. E., GRAM, M. & AKERSTROM, B. 2015. Human Anti-Oxidation Protein A1M--A Potential Kidney Protection Agent in Peptide Receptor Radionuclide Therapy. *Int J Mol Sci*, 16, 30309-20.
- AKERSTROM, B., CEDERLUND, M., BERGWIK, J., MANOUCHEHRIAN, O., ARNER, K., TAYLOR, I. H., GHOSH, F. & TAYLOR, L. 2017. The Role of Mitochondria, Oxidative Stress, and the Radical-binding Protein A1M in Cultured Porcine Retina. *Curr Eye Res*, 42, 948-961.
- AMER, J., GHOTI, H., RACHMILEWITZ, E., KOREN, A., LEVIN, C. & FIBACH, E. 2006. Red blood cells, platelets and polymorphonuclear neutrophils of patients with sickle cell disease exhibit oxidative stress that can be ameliorated by antioxidants. *Br J Haematol*, 132, 108-13.
- BONOMINI, F., TENGATTINI, S., FABIANO, A., BIANCHI, R. & REZZANI, R. 2008. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*, 23, 381-90.
- BRATT, T., OLSSON, H., SJOBERG, E. M., JERGIL, B. & AKERSTROM, B. 1993. Cleavage of the alpha 1-microglobulin-bikunin precursor is localized to the Golgi apparatus of rat liver cells. *Biochim Biophys Acta*, 1157, 147-54.
- CHEN, I. & DUBNAU, D. 2004. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol*, 2, 241-9.
- DELARIA, K. A., MULLER, D. K., MARLOR, C. W., BROWN, J. E., DAS, R. C., ROCZNIAK, S. O. & TAMBURINI, P. P. 1997. Characterization of placental bikunin, a novel human serine protease inhibitor. *J Biol Chem*, 272, 12209-14.
- DIARRA-MEHRPOUR, M., BOURGUIGNON, J., SESBOUE, R., MATTEI, M. G., PASSAGE, E., SALIER, J. P. & MARTIN, J. P. 1989. Human plasma inter-alpha-trypsin inhibitor is encoded by four genes on three chromosomes. *Eur J Biochem*, 179, 147-54.
- DILLARD, J. P. & SEIFERT, H. S. 2001. A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol Microbiol*, 41, 263-77.
- DONAHUE, R. & BEBEE, R. 1999. BL21-SI™ Competent Cells for Protein Expression in E.coli. *Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics*, 21, 49-51.
- FLOWER, D. R. 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J*, 318 ( Pt 1), 1-14.
- FRANCIS, R. T., JR., BOOTH, J. W. & BECKER, R. R. 1985. Uptake of iron from hemoglobin and the haptoglobin-hemoglobin complex by hemolytic bacteria. *Int J Biochem*, 17, 767-73.
- FRIES, E. & BLOM, A. M. 2000. Bikunin--not just a plasma proteinase inhibitor. *Int J Biochem Cell Biol*, 32, 125-37.
- GUNNARSSON, R., AKERSTROM, B., HANSSON, S. R. & GRAM, M. 2017. Recombinant alpha-1-microglobulin: a potential treatment for preeclampsia. *Drug Discov Today*, 22, 736-743.
- HAYYAN, M., HASHIM, M. A. & ALNASHEF, I. M. 2016. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev*, 116, 3029-85.
- HWANG, O. 2013. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Exp Neurobiol*, 22, 11-7.
- JIAN-QIU, W., FENG-QIN, Y., DOU-DOU, W., LEI, B., NAN, S., CONG-YAN, L., TING, Z. & WEI-QUN, Y. 2008. Expression and purification of active recombinant human bikunin in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 60, 127-31.
- JOSEPH, N., ZHANG-JAMES, Y., PERL, A. & FARAONE, S. V. 2015. Oxidative Stress and ADHD: A Meta-Analysis. *J Atten Disord*, 19, 915-24.
- KACZMARCZYK, A., BLOM, A. M., ALSTON-SMITH, J., SJOQUIST, M. & FRIES, E. 2005. Plasma bikunin: half-life and tissue uptake. *Mol Cell Biochem*, 271, 61-7.
- KANAYAMA, S., YAMADA, Y., ONOGI, A., SHIGETOMI, H., UEDA, S., TSUJI, Y., HARUTA, S., KAWAGUCHI, R., YOSHIDA, S., SAKATA, M., SADO, T., KITANAKA, T., OI, H., YAGYU, T. & KOBAYASHI, H. 2007. Bikunin suppresses expression of pro-inflammatory cytokines induced by lipopolysaccharide in neutrophils. *J Endotoxin Res*, 13, 369-76.
- KIM, H. J., KIM, C. H., RYU, J. H., KIM, M. J., PARK, C. Y., LEE, J. M., HOLTZMAN, M. J. & YOON, J. H. 2013. Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN-lambda regulation in human nasal epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49, 855-65.
- LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A. & CHANDRA, N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4, 118-26.
- LORENZ, M. G. & WACKERNAGEL, W. 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev*, 58, 563-602.

- OLSSON, M. G., ALLHORN, M., LARSSON, J., CEDERLUND, M., LUNDQVIST, K., SCHMIDTCHEN, A., SORENSEN, O. E., MORGELIN, M. & AKERSTROM, B. 2011. Up-regulation of A1M/alpha1-microglobulin in skin by heme and reactive oxygen species gives protection from oxidative damage. *PLoS One*, 6, e27505.
- OLSSON, M. G., ROSENLOF, L. W., KOTARSKY, H., OLOFSSON, T., LEANDERSON, T., MORGELIN, M., FELLMAN, V. & AKERSTROM, B. 2013. The radical-binding lipocalin A1M binds to a Complex I subunit and protects mitochondrial structure and function. *Antioxid Redox Signal*, 18, 2017-28.
- PUGIA, M. J., VALDES, R., JR. & JORTANI, S. A. 2007. Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement. *Adv Clin Chem*, 44, 223-45.
- RAMOND, A., GODIN-RIBUOT, D., RIBUOT, C., TOTOSON, P., KORITCHNEVA, I., CACHOT, S., LEVY, P. & JOYEUX-FAURE, M. 2013. Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol*, 27, 252-61.
- RUTARDOTTIR, S., NILSSON, E. J., PALLON, J., GRAM, M. & AKERSTROM, B. 2013. The cysteine 34 residue of A1M/alpha1-microglobulin is essential for protection of irradiated cell cultures and reduction of carbonyl groups. *Free Radic Res*, 47, 541-50.
- SANCHEZ, D., MARTINEZ, S., LINDQVIST, A., AKERSTROM, B. & FALKENBERG, C. 2002. Expression of the AMBP gene transcript and its two protein products, alpha(1)-microglobulin and bikunin, in mouse embryogenesis. *Mech Dev*, 117, 293-8.
- STEINMOEN, H., TEIGEN, A. & HAVARSTEIN, L. S. 2003. Competence-induced cells of *Streptococcus pneumoniae* lyse competence-deficient cells of the same strain during cocultivation. *J Bacteriol*, 185, 7176-83.
- STUDIER, F. W., ROSENBERG, A. H., DUNN, J. J. & DUBENDORFF, J. W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 185, 60-89.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M. T., MAZUR, M. & TELSER, J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 44-84.
- WESTER-ROSENLOF, L., CASSLEN, V., AXELSSON, J., EDSTROM-HAGERWALL, A., GRAM, M., HOLMQVIST, M., JOHANSSON, M. E., LARSSON, I., LEY, D., MARSAL, K., MORGELIN, M., RIPPE, B., RUTARDOTTIR, S., SHOHANI, B., AKERSTROM, B. & HANSSON, S. R. 2014. A1M/alpha1-microglobulin protects from heme-induced placental and renal damage in a pregnant sheep model of preeclampsia. *PLoS One*, 9, e86353.
- ÅKERSTROM, B. & GRAM, M. 2014. A1M, an extravascular tissue cleaning and housekeeping protein. *Free Radic Biol Med*, 74, 274-82.