UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie

Bc. Alexandra Satrapová

Charakterizace proteinů polární trubice mikrosporidií

Characterization of polar tube proteins of microsporidia

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Markéta Petrů, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 11. 7. 2021

……..

Poděkování

Největší poděkování patří mému školiteli Pavlu Doležalovi za vstřícnost, trpělivost, cenné rady a pozitivní přístup. Děkuji také své konzultantce Markétě za vědecké vedení a zasvěcení do světa mikrosporidií. Stejně tak patří velké díky celému týmu naší laboratoře za skvělou atmosféru a příjemné pracovní prostředí. Na závěr děkuji rodině a všem svým blízkým za podporu a porozumění, které jsem u nich vždy našla.

Abstrakt

Mikrosporidie jsou vnitrobuněční parazité patřící do skupiny Fungi. Přestože se jedná o diverzifikovanou skupinu organismů napadající široké spektrum hostitelů a tkání, sdílejí naprosto unikátní invazní aparát. Klíčovou organelou tohoto aparátu je polární trubice sloužící k transportu infekční sporoplasmy do hostitelské buňky. Skládá se z PTP proteinů, které jsou hlavním zájmem této diplomové práce. Hlavní úsilí bylo věnováno studiu interakcí dvou hlavních PTP proteinů. Na rozdíl od již publikovaných dat se nám nepodařilo ověřit interakci PTP proteinů za použití kvasinkového dvouhybridního systému. Pokusy *s in vitro* připravenými proteiny naopak ukázaly na možnou tvorbu homopolymerních komplexů proteinů PTP2 a PTP3 z *Nosema bombycis* (NbPTP2, NbPTP3). Připraveno bylo několik konstruktů pro expresi rekombinantních proteinů NbPTP2 a NbPTP3 v *Escherichia coli.* Exprese NbPTP2 byla úspěšná, avšak protein se nepodařilo převést za nativních podmínek do solubilní frakce umožňující jeho následnou purifikaci. Příprava rekombinantního NbPTP3 byla komplikována rychlou tvorbou pravděpodobně degradačních produktů. Proto byl na závěr vytvořen konstrukt umožňující purifikaci intaktního NbPTP3 pomocí dvou purifikačních tagů na N- a C-koncích proteinu. V průběhu diplomového projektu se nám podařilo úspěšně zavést laboratorní cyklus *N. bombycis* pomocí infekcí housenek *Bombyx mori*. Vyizolované spory pak byly použity pro analýzu vystřelených polárních trubic pomocí kryoelektronové mikroskopie. Fourierova transformace získaných dat ukázala na periodicitu ve stavbě polární trubice.

Abstract

Microsporidia is a group of intracellular parasites belonging to Fungi. Even though this group seems to be diverse with great variety of hosts and infected tissues they share completely unique invasion apparatus. A key organelle of this apparatus called the polar tube serves as a conduit for sporoplasm passage into the host cell. It consists of PTP proteins which are the main interest of this diploma thesis. Major effort was devoted to the study of the two main PTP proteins. In contrast to already published data, we were unable to verify the interaction of PTP proteins using a yeast two-hybrid system. On the contrary, experiments with *in vitro* prepared proteins have shown the possible formation of homopolymeric complexes of PTP2 and PTP3 proteins from *Nosema bombycis* (NbPTP2, NbPTP3). Several constructs were prepared for the expression of recombinant NbPTP2 and NbPTP3 proteins in *Escherichia coli.* Expression of NbPTP2 was successful but under native conditions the protein wasn't obtained in soluble fraction allowing its subsequent purification. The preparation of recombinant NbPTP3 was complicated by the rapid formation of presumably degradation products. Therefore, a final construct was made to allow purification of intact NbPTP3 using two purification tags at the N- and C-termini of the protein. During the diploma project we managed to successfully establish the laboratory cycle of *N. bombycis* using *Bombyx mori* caterpillar infections. The isolated spores were then used to analyze the extruded polar tubes using cryoelectron microscopy. The Fourier transform of the obtained data showed the periodicity in the structure of the polar tube.

Obsah

1. Úvod 1

2. Literární přehled 2

2.1 Mikrosporidie 2

2.2 Adaptace na parazitický styl života 2

2.3 Životní cyklus 3

2.4 Spora 4

2.4.1 Stavba spory 4

2.4.2 Biogeneze invazního aparátu 5

2.4.3 Extruze invazního aparátu 6

2.5 Polární trubice 7

2.5.1 Proteiny polární trubice 8

3. Cíle 13

4. Materiál a metodika 14

4.1 Organismy a jejich kultivace 14

4.1.1 *Escherichia coli* 14

4.1.2 *Saccharomyces cerevisiae* 15

4.1.3 *Bombyx mori* 17

4.1.4 *Nosema bombycis* CQ1 17

4.2 Plazmidy 17

4.2.1 *in vitro* translace 17

4.2.2 Kvasinkový dvouhybridní systém (Y2H) 17

4.2.3 Exprese proteinů v kvasinkách *S. cerevisiae* 19

4.2.4 Exprese proteinů v bakteriích *E. coli* 20

4.3 Design konstruktů a amplifikace genů 21

4.3.1 Tvorba konstruktů a primerů 21

4.3.2 Amplifikace genů 26

4.3.3 Hybridizace oligonukleotidů 26

4.4 Klonování DNA fragmentů a transformace bakterií 27

4.5 *Saccharomyces cerevisiae* 28

4.5.1 Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou 28

4.5.2 Y2H – Rozkapávání (Serial dilution test) 28

4.5.3 Vizualizace proteinů v kvasinkách 29

4.6 *in vitro* translace NbPTP proteinů 30

4.7 Exprese proteinů v bakteriích 30

4.7.1 IPTG-indukovaná exprese proteinů 30

4.7.2 Autoindukce 32

4.7.3 Nativní izolace exprimovaného proteinu 32

4.8 SDS-PAGE 33

4.9 BN-PAGE 33

4.10 Coomassie Brilliant Blue barvení 34
4.11 Western blot 35
4.12 Laboratorní cyklus *N. bombycis* 36
4.13 Kryoelektronová mikroskopie 36

5. Výsledky 37

5.1 Interakce NbPTP proteinů 37
5.1.1 *in vitro* translace 37
5.1.2 Kvasinkový dvouhybridní systém 39
5.2 Vizualizace NbPTP proteinů v kvasinkách 40
5.3 Exprese NbPTP2 v bakteriích 42
5.4 Exprese NbPTP3 v bakteriích 43
5.5 Laboratorní cyklus *N. bombycis* 48
5.6 Kryoelektronová mikroskopie 50

6. Diskuze 51

6.1 Interakce PTP proteinů 51
6.1.1 *in vitro* translace 51
6.1.2 *S. cerevisiae* 52
6.2 Exprese PTP proteinů v bakteriích 53
6.3 Laboratorní cyklus *N. bombycis* 55
6.4 Kryoelektronová mikroskopie 55

7. Závěr 57

8. Seznam zkratek 58

9. Literatura 60

1. Úvod

Mikrosporidie jsou jednobuněčné organismy vysoce specializované k parazitismu. Mimo hostitelskou buňku se tento vnitrobuněčný parazit, patřící do skupiny Fungi, vyskytuje pouze ve stádiu odolné spory, která slouží k přežití ve vnějším prostředí a k nákaze dalšího hostitele pomocí unikátního invazního aparátu. Nejpozoruhodnější strukturou zodpovědnou za invazi do hostitelské buňky je bezpochyby polární trubice, která je uvnitř spory stočená do pravotočivých kompaktních smyček. V případě stimulu indikujícího přítomnost spory v novém hostiteli dojde k extruzi polární trubice rychlostí přesahující 300 μm/s, během níž se trubice obrátí naruby „jako prst rukavice“ a vytvoří transportní kanál, jímž je obsah spory injikován do hostitelské buňky.

Navzdory dlouholetému výzkumu, který je motivován nejen unikátností invazního aparátu, ale také tím, že mikrosporidiální infekce způsobují ve světě značné ekonomické škody, není celý proces invaze příliš objasněný. Polární trubice se skládá z PTP proteinů (polar tube protein), kterých bylo popsáno 6 rodin. Tyto proteiny se nepodobají žádným jiným proteinům a jejich studium, jež je obecným cílem této diplomové práce, je klíčové pro pochopení stavby i fungování invazního aparátu. Jako modelový organismus pro studium PTP proteinů byla v naší laboratoři zvolena *Nosema bombycis* zejména proto, že zavedení laboratorního cyklu (které je také součástí této diplomové práce) je proveditelné v běžných laboratorních podmínkách a nepožaduje žádné speciální vybavení. Experimentální část práce je zaměřená na stavbu polární trubice *N. bombycis* především v souvislosti s proteinovými interakcemi NbPTP2 a NbPTP3. Pro získání obecnějších znalostí byla využita také kryoelektronová mikroskopie polární trubice.

Literární rešerše této práce shrnuje základní poznatky o životním cyklu a stavbě mikrosporidií s důrazem na strukturu polární trubice.

2. Literární přehled

2.1 Mikrosporidie

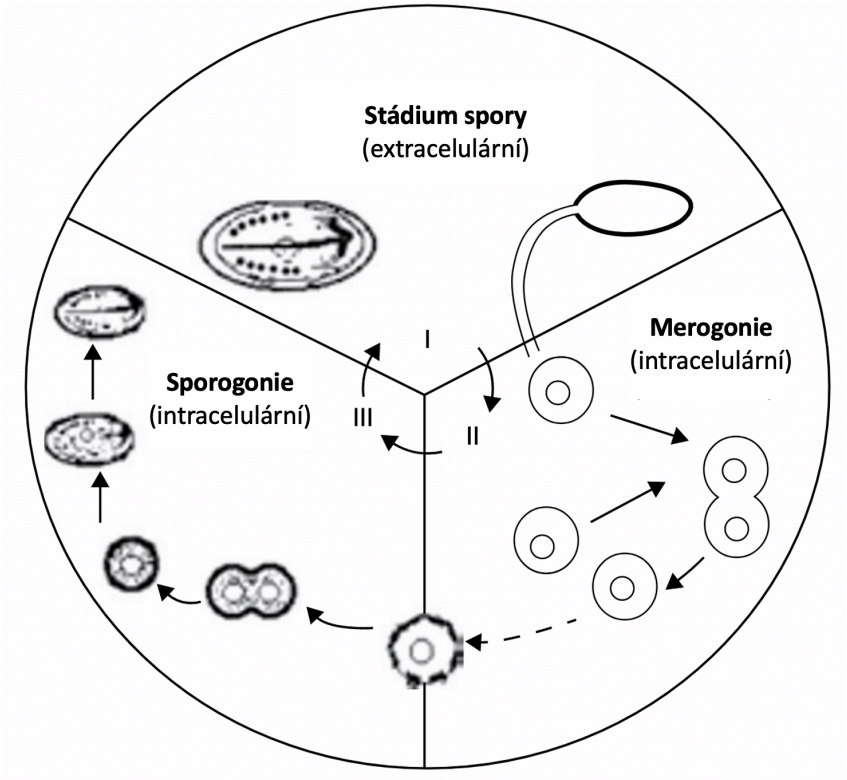
Mikrosporidie jsou obligátní vnitrobuněční parazité, kterých bylo popsáno přibližně 1 400 druhů ve skoro 200 rodech (Weiss & Becnel, 2014). Typickými hostiteli jsou hmyz a vodní bezobratlí, u kterých infekce způsobuje ekonomické škody např. při produkci hedvábí (Bhat et al., 2009), chovu včel (Chen et al., 2009) či krevet a humrů (Tourtip et al., 2009; Stentiford et al. 2009). Spektrum hostitelů je však velmi široké a zahrnuje zástupce všech skupin živočichů včetně některých protist a člověka (Weiss & Becnel, 2014). Lidské nákazy jsou nejčastěji způsobeny zástupci *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon cuniculi* a ohroženi jsou především imunodeficientní jedinci, u nichž se může rozvinout systematická infekce; např. pacienti s AIDS, či po prodělání transplantace (Didier, 2005).

2.2 Adaptace na parazitický styl života

Mikrosporidie vykazují celou řadu „primitivních“ znaků, kvůli kterým byly zpočátku vnímány jako bazální skupina eukaryot a byly řazeny do Archezoa (Vossbrinck et al., 1987). Jedná se například o absenci klasických mitochondrií, které nahrazují mitosomy (Vávra, 2005), Golgiho aparát bez typických cisteren (Beznoussenko et al., 2007), „prokaryotický“ typ ribosomů (Curgy et al., 1980) či absenci peroxisomů (Vávra & Lukeš, 2013). Na základě studií molekulární fylogenetiky se však ukázalo, že mikrosporidie jsou komplexní eukaryota, jejichž znaky byly sekundárně redukovány adaptováním na parazitický styl života, a jsou řazeny do skupiny Fungi (Corradi & Keeling, 2009). Adaptaci na tento životní styl potvrzuje také redukce genomu u některých zástupců, např. velikost genomu *Encephalitozoon cuniculi* je pouze 2,9 Mbp (Katinka et al., 2001), či absence důležitých metabolických drah včetně oxidativní fosforylace. ATP získávají z buněk hostitele pomocí ATP/ADP přenašečů, s výjimkou stádia spory, která má příliš tlustou stěnu a ATP si musí vytvářet pomocí glykolýzy (Timofeev et al., 2020).

2.3 Životní cyklus

Životní cyklus mikrosporidií je značně variabilní vzhledem k velkému počtu zástupců a širokému hostitelskému spektru. Unikátním a společným znakem všech mikrosporidií je stádium odolné spory, která slouží k přežití parazita ve vnějším prostředí a k nákaze dalšího hostitele pomocí specializovaného invazního aparátu. Následují intracelulární stádia, která prochází mnohonásobným dělením pomocí merogonie, která slouží k namnožení parazita, a pomocí sporogonie, která produkuje sporoblasty, tvořící stádium spory (Obr. 1) (Weiss & Becknel, 2014).



Obrázek 1: Obecné schéma životního cyklu mikrosporidií. Spora (I) injikuje svůj obsah (sporoplasmu) do hostitelské buňky, kde se mikrosporidie dělí pomocí merogonie (II) a sporogonie (III). Upraveno podle Weiss & Becknel, 2014.

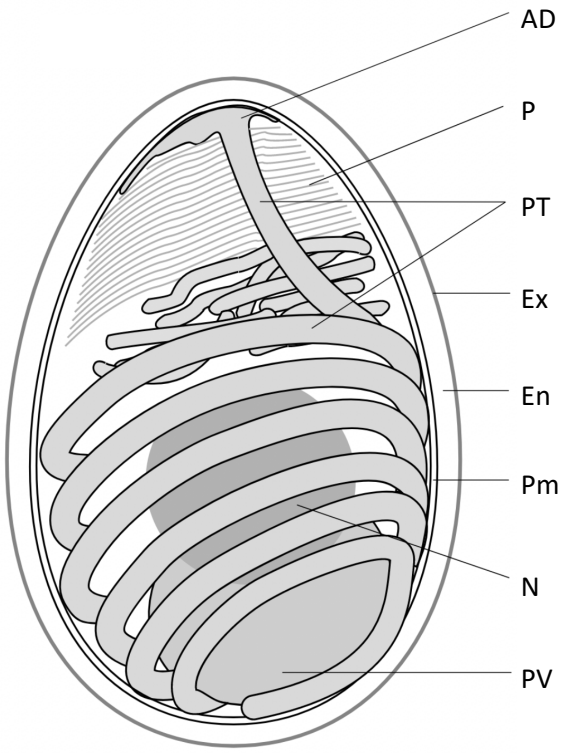
Průběh intracelulárních fází se napříč mikrosporidiemi liší. Někteří zástupci, např. *Nosema* spp., se nejvíce množí ve fázi merogonie, která může být několikanásobná, zatímco ve stádiu sporogonie tvoří každá mateřská buňka pouze dvě spory (Brooks et al., 1995). Oproti tomu u některých druhů nebyla merogonie vůbec pozorována a pravděpodobně v životním cyklu chybí (Larsson, 1993).

2.4 Spora

Spora je infekční stádium mikrosporidií a zároveň jediné pozorovatelné mimo hostitelskou buňku. Velikost spory se napříč zástupci liší; pohybuje se od 1 µm (*Enterocytozoon bieneusi*) až po 40 µm (*Bacillidium filiferum*). Stejně tak tvar spory je variabilní, nejčastěji však oválný (Vávra & Larsson, 1999).

2.4.1 Stavba spory

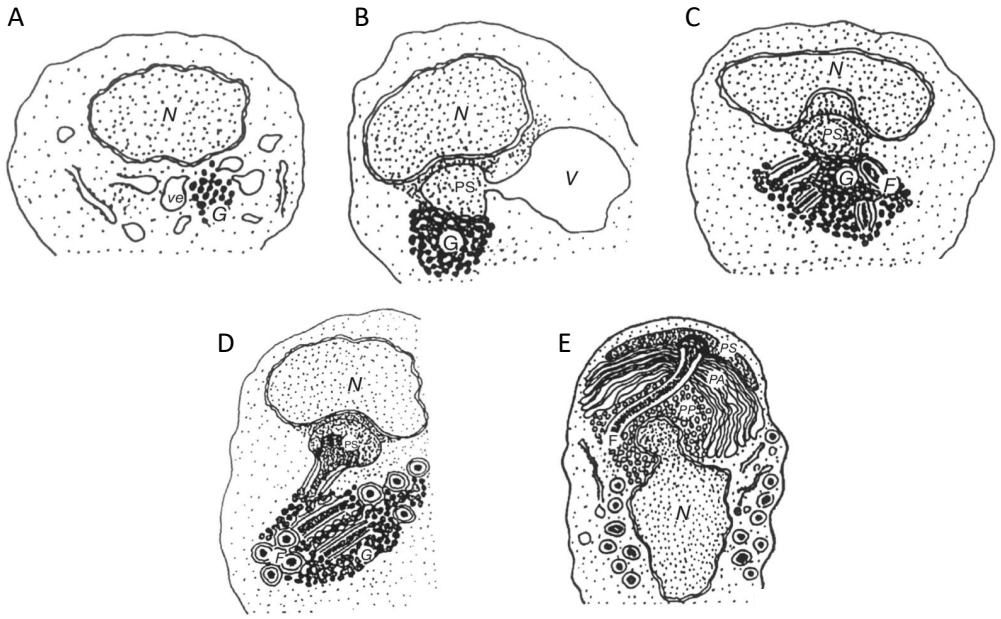
Pro přežití ve vnějším prostředí je obalena dvěma vrstvami buněčné stěny, tzv. endosporou a exosporou, která obsahuje chitin (Bigliardi et al., 1996). Pod sporovou stěnou se nachází plasmatická membrána oklopující buněčnou cytoplasmu – sporoplasmu. Sporoplasma obsahuje jádro (v některých případech dvě jádra, tzv. diplokaryon), cytoplasmu s ribosomy a organely infekčního aparátu. Na anteriorní straně buňky je ukotven přichycovací disk, na který navazuje rovná část polární trubice (manubrium), která se poté stáčí do smyček kolem jádra a vede až k posteriorní vakuole na opačném konci buňky. Součástí infekčního aparátu je také polaroplast; organizovaný systém lamel a váčků v přední části buňky (Vávra & Larsson, 1999) (Obr. 2).



Obrázek 2: Schématické zobrazení spory mikrosporidií. AD – přichycovací disk; P – polaroplast; PT – polární trubice; Ex – exospora; En – endospora; Pm – plazmatická membrána; Nu – jádro; PV – posteriorní vakuola. Převzato z Franzen, 2004.

2.4.2 Biogeneze invazního aparátu

Vznik invazního aparátu a celková přeměna sporoblastu ve sporu nejsou dodnes příliš objasněny. Invazní aparát vzniká během zrání sporoblastu a poznatky o tomto jevu pramení z analýzy snímků pořízených elektronovou mikroskopií. Obecně se autoři shodují, že místem vzniku je Golgiho aparát, popřípadě endoplazmatické retikulum (ER). V prvotní fázi se v blízkosti jádra akumulují elektrondenzní váčky Golgiho aparátu a malá vakuola, která je primordiem polárního vaku. Elektrondenzní materiál se dále akumuluje, dochází k postupné organizaci a vzniku polární trubice, polaroplastu a příchytného disku (Vávra & Larsson, 1999) (Obr.3).

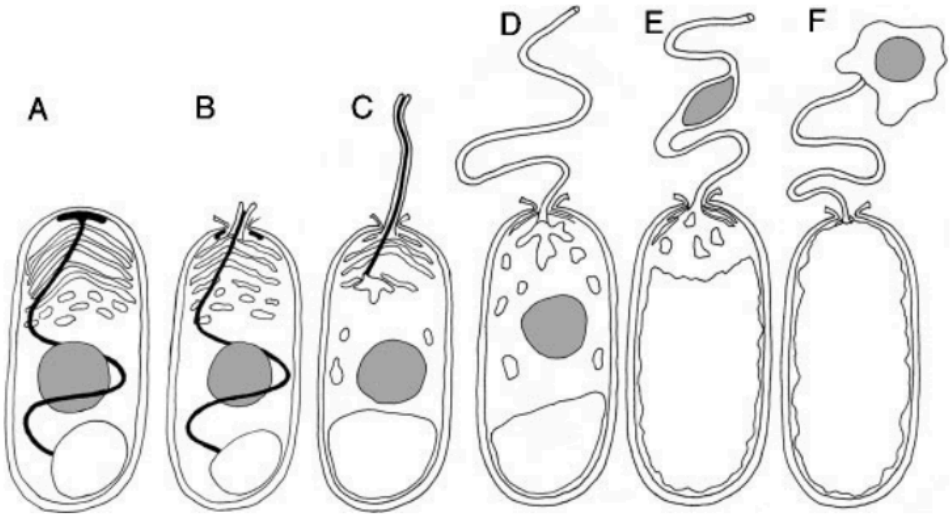


Obrázek 3: Schématické znázornění biogeneze invazního aparátu. A – Váčky Golgiho aparátu s elektrondenzním materiálem (G) společně s malou vakuolou (ve) jsou lokalizovány v blízkosti jádra (N); B – polární vak (PS) vzniká z vakuoly; C – první úseky polární trubice (F) vznikají shlukováním váčků; D – další úseky polární trubice vznikají s napojením na polární vak, prstýnkovité útvary zobrazují příčný řez polární trubicí; E – dochází k reorganizaci organel v buňce, smyčky polární trubice se posouvají k okrajům buňky a obklopují jádro, zatímco na anteriorní straně buňky se organizuje lamelární (PA) a váčkový (PP) polaroplast vzniklý z polárního vaku. Převzato z Vávra & Larsson, 1999.

Během sporogonie dochází k expresi proteinů polární trubice (PTP proteinů) a proteinů stěny spory, které obsahují N-terminální signální sekvence pro transport do ER (Beznoushenko et al., 2007; Delbac et al., 1998; Hayman et al., 2001). Proteiny dále pokračují do Golgiho aparátu, kde jsou glykosylovány a dopraveny do místa vzniku polární trubice, respektive stěny spory (Xu et al., 2004, Peuvel et al., 2002).

2.4.3 Extruze invazního aparátu

Spory přetrvávají v dormantním stavu ve vnějším prostředí až několik let (Vávra & Larsson, 1999). K aktivaci spory přispívá celá řada stimulů, např. pH, osmotický tlak, teplota, přítomnost specifických iontů či trávicích enzymů hostitele (Undeen, 1990). Tyto vnější vlivy vedou k prasknutí spory na anteriorní straně v místě přichycovacího disku, kde je stěna spory tenčí, a dochází k extruzi polární trubice. Celý proces je poháněn zvětšováním posteriorní vakuoly, která vytlačuje sporoplasmu skrz polární trubici (Obr. 4). Obecně bylo přijímáno, že mechanismus zvětšování vakuoly je zprostředkován aktivací trehalázy, která začne štěpit trehalózu za vzniku menších molekul, jejichž koncentrace zvyšuje osmotický tlak. Osmotickým pohybem pak buňka vstřebává vodu a dochází ke zvětšování vakuoly (Undeen, 1990). Podle studie Miao et al., 2018 však při germinaci spory *N. bombycis* nedochází ke změně koncentrace trehalózy a celý proces je tedy nejspíše zabezpečen jiným mechanismem.



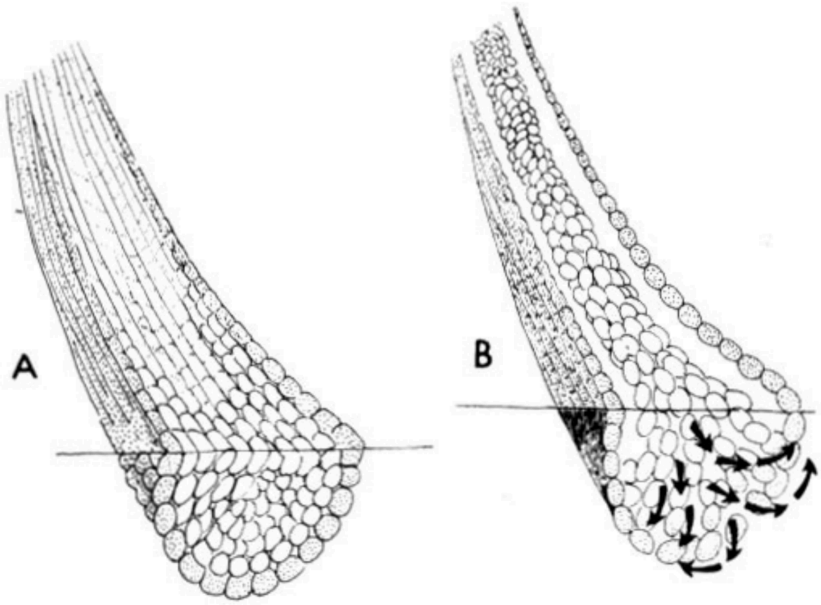
Obrázek 4: Schématické zobrazení germinace spory mikrosporidií. A – Dormantní spora; B – Prasknutí spory na apikálním konci buňky; C, D – Otok posteriorní vakuoly a extruze polární trubice, která se otáčí naruby; E, F – Vytlačení sporoplasmy skrz polární trubici. Keeling & Fast, 2002.

Průnik sporoplasmy do hostitelské buňky je způsobený i) penetrací polární trubice skrze membránu hostitelské buňky; ii) fagocytózou spory hostitelskou buňkou a následnou penetrací fagolysosomu do hostitelské cytoplasmy nebo iii) interakcí proteinů polární trubice s receptory hostitelské buňky a vytvořením parazitoforní vakuoly (Weiss & Becknel, 2014).

2.5 Polární trubice

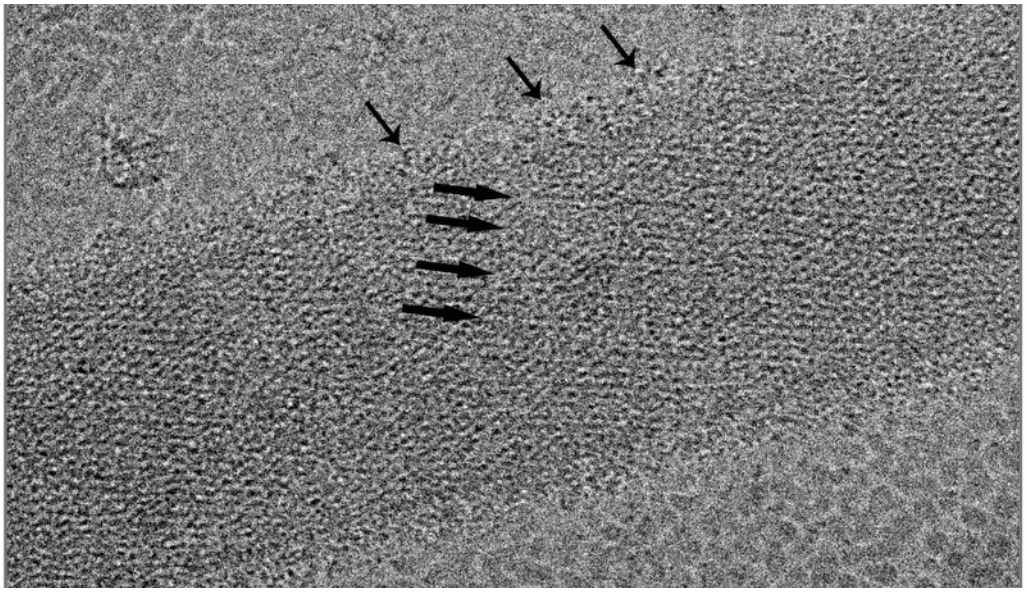
Polární trubici mikrosporidií, sloužící k transportu infekční sporoplasmy, lze rozdělit na dvě části; rovný úsek připojený k přichycovacímu disku na pólu buňky (tzv. manubrium) a navazující smyčky polární trubice, jejichž počet je napříč mikrosporidiemi variabilní (Vávra & Larsson, 2014). Výjimkou je například *Mrazekia tetraspora*, jejíž trubice je krátká a netvoří žádné smyčky (Bylén & Larsson, 1996). Šířka trubice se pohybuje v rozmezí 0,1 – 0,2 µm a délka trubice 50 – 150 µm (Weiss & Becknel, 2014).

Polární trubice se skládá z PTP proteinů a lumen nevystřelené trubice je vyplněno elektrondenzním materiálem (Weidner, 1796; Cali et al., 2002; Takvorian et al., 2020). Extruze polární trubice bývá popisována jako „posun trubice v trubici“ nebo „otočení naruby jako prst rukavice“ (Han et al., 2020). Délka vystřelené polární trubice je až 2 – 3 krát větší, než délka polární trubice uvnitř spory (Weidner, 1972), což může být zapříčiněno elasticitou PTP proteinů v případě, že trubice uvnitř spory je již kompletně sestavená. Jiná hypotéza předpokládá, že polární trubice při vystřelení dorůstá na svém konci a délka trubice je tedy prodloužena o úseky vznikající polymerizací PTP proteinů, mezi nimiž se vytváří disulfidické můstky (Obr. 5) (Weidner, 1972; Weidner, 1982).



Obrázek 5: Schématické zobrazení extruze polární trubice. Lumen polární trubice obsahuje nepolymerované PTP proteiny (A), které ve směru šipek prodlužují polární trubici (B). Převzato z Weidner, 1982.

Uvnitř vystřelených trubic byla pomocí kryoelektronové transmisní mikroskopie pozorována řada útvarů zahrnující membrány, válce či váčky, jež jsou součástí transportovaného materiálu (Weidner, 1972; Takvorian et al., 2020), zatímco na povrchu byly popsány jemné fibrilární útvary způsobené nejspíše glykosylací PTP proteinů. Pravidelné žíhání povrchu polární trubice naznačuje pravidelné uspořádání PTP proteinů (Obr. 6). Snímky vystřelených trubic *Anncaliia algerae* byly analyzovány pomocí Fourierovy transformace, která vykázala opakování pravidelného vzoru s průměrnou periodicitou 64 Å (Takvorian et al., 2020).



Obrázek 6: Snímek vystřelené trubice *A. algerae* pořízený pomocí kryoelektronové mikroskopie. Pravidelné žíhání vyznačené tučnými šipkami naznačuje pravidelné helikální uspořádání PTP proteinů. Tenké šipky zobrazují fibrilární povrch polární trubice. Převzato z (Takvorian et. al, 2020).

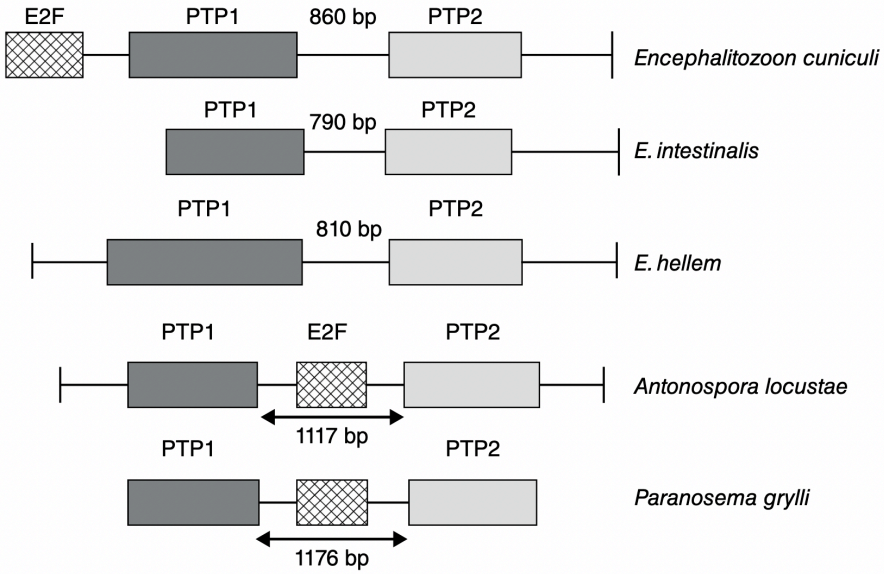
2.5.1 Proteiny polární trubice

První PTP byl popsán v roce 1976 (Weidner, 1976). Následně bylo popsáno pět rodin PTP proteinů (PTP1, PTP2, PTP3, PTP4, PTP5) a v roce 2020 byl identifikován PTP6 u *N. bombycis* (Han & Weiss, 2017, Qing et al., 2020).

Za majoritní protein polární trubice je považován PTP1, který zaujímá 70 % obsahu polární trubice (Xu et al., 2004). PTP proteiny napříč mikrosporidiemi jsou sekvenčně divergované, sdílejí však stejné vlastnosti (rozpustnost, hydrofobicitu, velikost, či zastoupení aminokyselin), které je pomáhají identifikovat (Keohane & Weiss,

1998). PTP1 o predikované velikosti 50 – 55 kDa je protein s vysokým obsahem prolinu, který nejspíše zajišťuje elasticitu polární trubice, což je důležité při vystřelení polární trubice a pro průchod sporoplasmy. Obsahuje také několik cysteinových zbytků umožňujících vytvoření disulfidických můstků pro stavbu a stabilizaci polární trubice (Weidner, 1976). Na základě analýzy proteinové sekvence byla predikována místa pro O-glykosylaci a N-glykosylaci; experimentálně byla potvrzena O-manosylace (Xu et al., 2003; Xu et al., 2004), jež zabezpečuje interakci s MNB (manosyl-vazebné místo) hostitelské buňky (Han & Weiss, 2017; Xu et al., 2004). Na N-konci obsahuje predikovanou signální sekvenci, která koresponduje s hypotézou, že PTP jsou proteiny procházející sekretorickou dráhou (Delbac et al., 1998).

V genomu *E. cuniculi* byl gen pro PTP1 objeven v těsné blízkosti genu pro PTP2, které tak společně tvoří genový klastr (Delbac et al., 2001) (Obr. 7). Jedná se o ~35 kDa velký protein bohatý na lysin, který je sekvenčně více konzervovaný napříč mikrosporidiemi než PTP1. Společně s existencí genového klastru tato skutečnost přispěla k identifikaci více divergovaných PTP1 u dalších druhů mikrosporidií (Weiss & Becknel, 2014). Pozice cysteinových zbytků sloužících pro tvorbu disulfidických můstků jsou v sekvencích PTP2 konzervovány (Delbac et al., 2001). PTP2 obsahuje predikovanou N-terminální signální sekvenci pro průchod sekretorickou dráhou a tři potenciální místa pro O-glykosylaci (Weiss & Becknel, 2014).

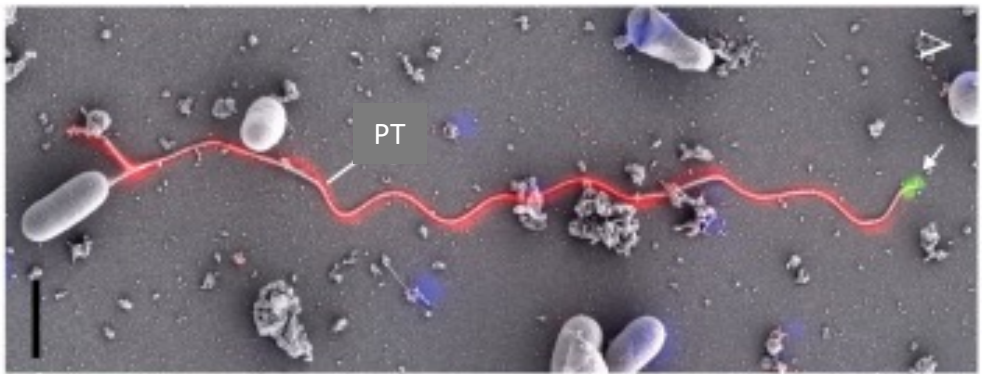


Obrázek 7: Schématické zobrazení klastrů PTP1 (tmavě šedé rámečky) a PTP2 (světle šedé rámečky) na chromozomech mikrosporidií. E2F – transkripční faktor (šrafované rámečky). Převzato z Weiss & Becknel, 2014.

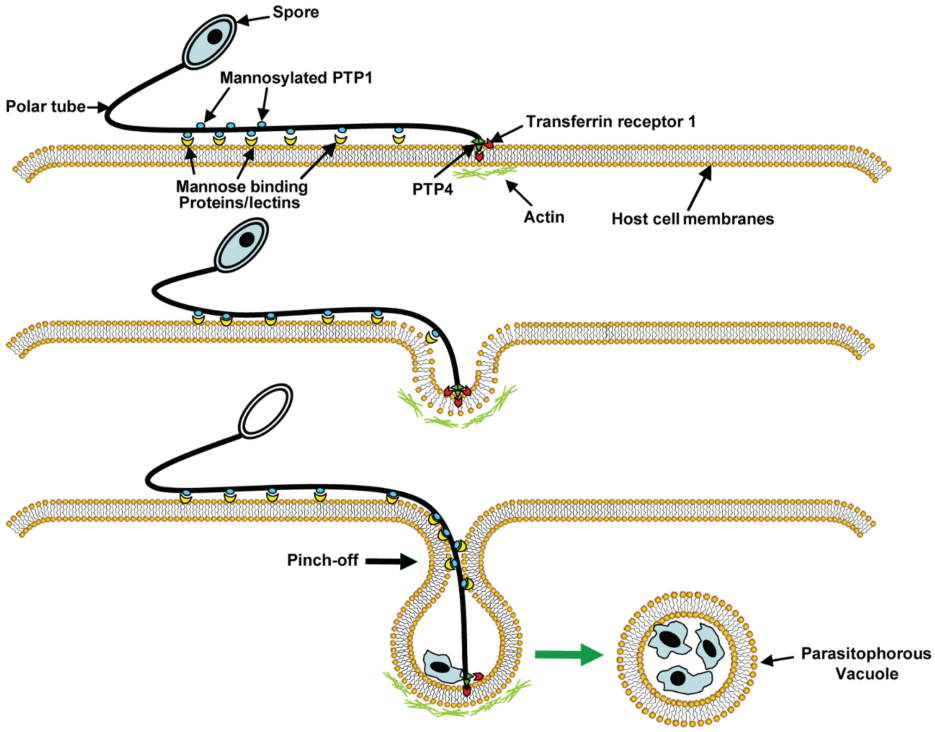
PTP3 je ~150 kDa velký protein, který obsahuje predikovaný N-terminální signální peptid a místa pro N-glykosylaci a O-glykosylaci stejně jako PTP1 a PTP2. Neobsahuje cysteinové zbytky, což vylučuje vazbu tohoto proteinu pomocí disulfidických můstků; obsahuje však nabité aminokyselinové zbytky, což naznačuje, že interakce jsou nejspíše zprostředkovány pomocí iontových vazeb (Peuvel et al., 2002). Jedním z možných stimulů pro germinaci spory je přítomnost monovalentních iontů (Undeen, 1990). Je tedy možné, že PTP3 interaguje s PTP1 a PTP2 pomocí iontových vazeb, které jsou ovlivněné influxem iontů, což vede k narušení zmíněných interakcí mezi PTP proteiny a umožňuje vystřelení polární trubice (Peuvel et al., 2002).

Hlavní tři PTP proteiny *E. cuniculi* (PTP1, PTP2, PTP3) byly otestovány pomocí kvasinkového dvouhybridního systému, který potvrdil, že tyto proteiny navzájem interagují. Všechny tři zmíněné proteiny vykázaly interakci samy se sebou (tvorba homopolymerů). Stejně tak byly potvrzeny interakce mezi PTP1-PTP2, PTP1-PTP3 i PTP2-PTP3 (Bouzahzah et al., 2010).

Později popsané proteiny PTP4 a PTP5 byly identifikovány u *E. intestialis*. Řada homologních proteinů byla identifikována u dalších mikrosporidií, přesto se o jejich struktuře a funkci neví mnoho (Brosson et al., 2006; Weiss & Becknel, 2014). PTP4 *E. hellem* podle Han et al., 2017 zajišťuje interakci s hostitelskou buňkou během invaze. Zatímco PTP1 (lokalizovaný po celé délce trubice - obr. 8) se pomocí manosylovaných zbytků váže na MBP (Obr. 9), PTP4 (lokalizovaný pouze na konci polární trubice – obr. 8) interaguje s transferinovým receptorem (TfR1) a iniciuje vytvoření parazitoforní vakuoly (Obr. 9) (Han et al., 2017).



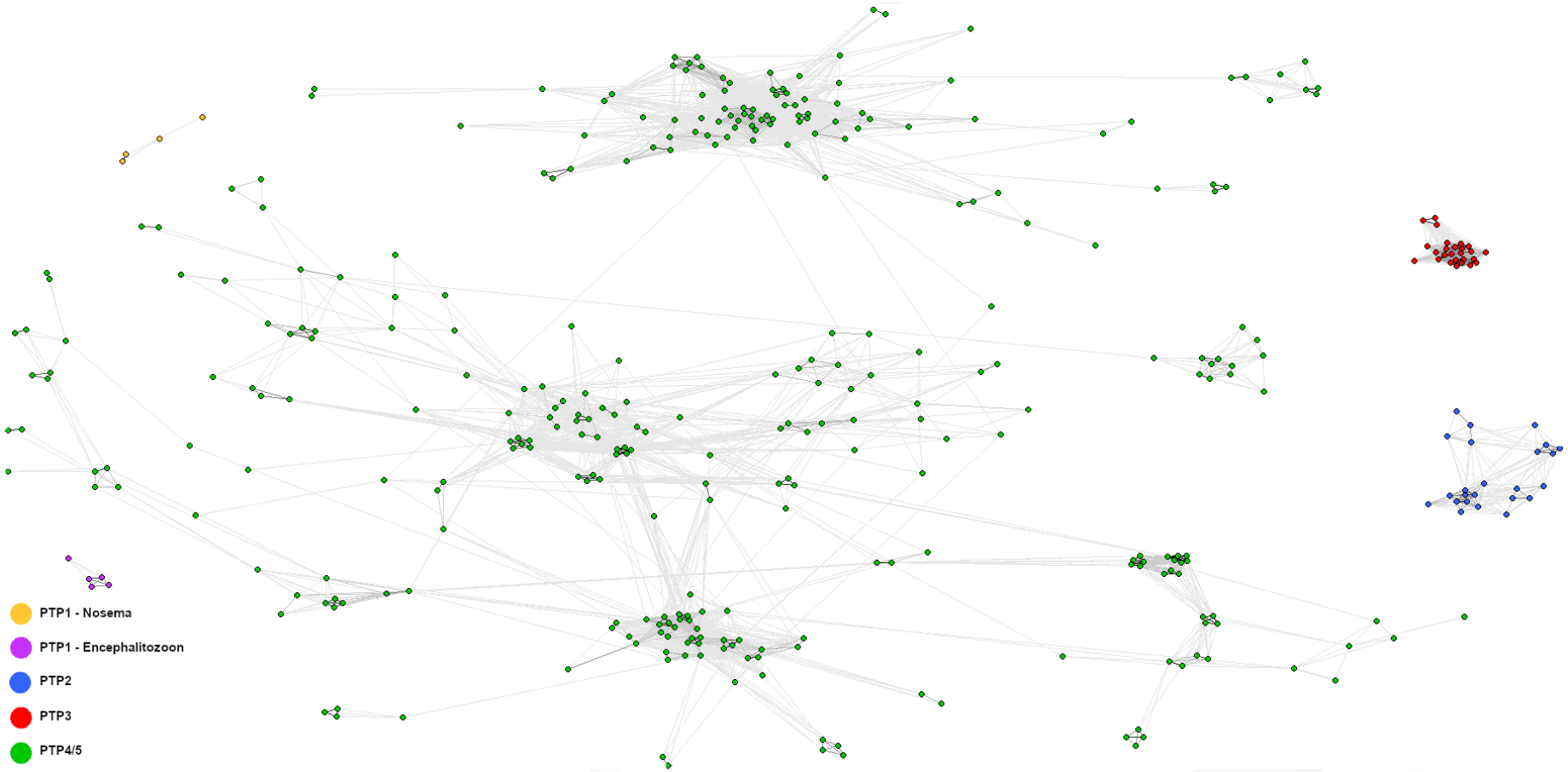
Obrázek 8: Imunofluorescenční lokalizace PTP1 (červená) a PTP4 (zelená) na vystřelené polární trubici (PT) *Encephalitozoon hellem*. Převzato z Han et al., 2017.



Obrázek 9: Schématické zobrazení invaze *E. hellem* do hostitelské buňky zprostředkované vazbou PTP1 na manosyn-vazebná místa a PTP4 na transferinový receptor za vzniku parazitoformní vakuoly. Převzato z Han et al., 2017.

Na základě hledání homologních proteinů již anotovaných PTP proteinů a jejich klastrovací analýzy se ukázalo, že PTP4, respektive PTP5 jsou v genomu některých mikrosporidií v mnoha kopiích a tvoří velké množství různorodých klastrů (Obr. 10) (Dohnálek, nepublikovaná data). Zmíněná analýza navíc ukázala, že PTP1 rodů *Nosema* a *Encephalitozoon* nejsou homologní, jelikož spadají do odlišných klastrů (Obr. 10).

Nejnověji popsanou rodinou proteinů je PTP6. Popsán byl zatím pouze u *N. bombycis*, ale analýza sekvencí ukázala homologii s nepopsanými proteiny dalších mikrosporidií (Qing et al., 2017). Protein o predikované velikosti 28,3 kDa je bohatý na histidin a obsahuje N-terminální signální peptid, 6 míst pro potenciální O-glykosylaci a 1 místo pro potenciální N-glykosylaci. Predikce také ukázala 18 míst pro fosforylaci serinu, 8 míst pro fosforylaci treoninu a 7 míst pro fosforylaci tyrosinu (Qing et al., 2017). Studie potvrdila vazbu NbPTP6 na hostitelské buňky buněčné linie BmE (Qing et al., 2020).



Obrázek 10: Klastrovací analýza PTP proteinů pomocí programu CLANS (Dohnálek, nepublikovaná data).

3. Cíle

Hlavním cílem práce bylo charakterizovat PTP proteiny *N. bombycis* za účelem zjištění stavby a struktury polární trubice mikrosporidií zejména z hlediska proteinových interakcí.

Praktické cíle:

- Otestovat proteinové interakce PTP2 a PTP3 *N. bombycis*
  - i) analýzou *in vitro* translace a kotranslace
  - ii) pomocí kvasinkového dvouhybridního systému
- Exprimovat a lokalizovat PTP2 a PTP3 *N. bombycis* v kvasinkách pro další interakční analýzy
- Vypurifikovat nativní formu rekombinantních proteinů PTP2 a PTP3 *N. bombycis*
- Zavést laboratorní cyklus *N. bombycis* za účelem mikroskopické analýzy polárních trubic *N. bombycis*

4. Materiál a metodika

4.1 Organismy a jejich kultivace

4.1.1 *Escherichia coli*

TOP10

Bakterie *E. coli* kmene TOP10 byly použity pro uchování a množení plazmidů. Bakterie s plazmidy byly dlouhodobě uchovávány v –80 °C v LB médiu s 20% glycerolem. Pro namnožení byly inokulovány do LB média se selekčními antibiotiky ampicilinem (100 μg/ml), respektive kanamycinem (50 μg/ml) a kultivovány přes noc při 37 °C a 220 rpm. V případě nově natransformovaných bakterií byly buňky nejprve kultivovány v SOC médiu a poté natřeny na agarové plotny s LB médiem a selekčními antibiotiky a kultivovány přes noc při 37°C.

BL21, Rosetta2, NICO

Bakterie *E. coli* kmene BL21 a Rosetta2 byly použity pro IPTG-indukovanou expresi proteinů. Kmen NICO byl použit pro expresi proteinu metodou autoindukce. Buňky byly po transformování expresními rekombinantními plazmidy inkubovány na agarových plotnách s LB médiem a selekčními antibiotiky přes noc při 37 °C.

Bakterie kmene Rosetta2 obsahovaly kromě expresního plazmidu navíc pRARE2 plazmid, který nese geny pro tRNA rozeznávající sedm méně obvyklých kodónů. Zároveň obsahuje gen pro rezistenci na chloramfenikol, takže tyto bakterie byly kultivovány za přítomnosti dvou selekčních antibiotik (pro expresní a pRARE2 plazmid).

Příprava médií

LB médium (1 l):

Složky média byly rozpuštěny v destilované vodě a objem byl doplněn do 1 l. Médium bylo sterilizováno pomocí autoklávu. V případě přidání agaru bylo médium přelito do sterilních Petriho misek v laminárním boxu.

LB broth	20 g
(Agar)	15 g
dH_2O	

SOC médium (100 ml):

Trypton, Yeast Extract, NaCl a KCl byly rozpuštěny v dH_2O. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 7 a množství doplněno do objemu 100 ml. Roztok byl sterilizován pomocí autoklávu a po vychlazení byly přidány sterilní roztoky glukózy a $MgCl_2$.

Trypton	2 g
Yeast Extract	0,5 g
NaCl	0,058 g
250 mM KCl	1 ml
20% glukóza	1,8 ml
2M $MgCl_2$	0,5 ml
dH_2O	

4.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinky *S. cerevisiae* kmene AH109 byly použity pro kvasinkový dvouhybridní systém (Y2H). Kultivovány byly na plotnách s 2 × YPAD médiem. Po transformování byla provedena auxotrofní selekce pomocí minimálního média s deficitem tryptofanu a leucinu (SD –trp/–leu). Na tomto médiu mutantní kmen kvasinek naroste pouze v případě, že je úspěšně transformován dvojící plazmidů pGADT7 a pGBKT7, jež zajistí syntézu leucinu a tryptofanu. Ověření interakcí bylo provedeno kultivací na plotnách s minimálním médiem, které kromě tryptofanu a leucinu neobsahovalo ani histidin, jehož syntéza je spuštěna v případě, že testované proteiny interagují a aktivují tím domény transkripčního faktoru GAL4 a transkripci reportérového genu HIS3. Pro prevenci proti bakteriální kontaminaci bylo přidáno antibiotikum kanamycin (50 μg/ml).

Kvasinky kmene YPH499 byly použity pro expresi a mikroskopii proteinů tagovaných GFP. Kultivovány byly na plotnách s 2 × YPAD médiem. Po transformování pak na plotnách či v tekutém médiu s deficitem uracilu (SC–ura), kde kvasinky narostly pouze v případě, že byly úspěšně transformovány plazmidem pUG35. Pro prevenci bakteriální kontaminace bylo přidáno antibiotikum ampicilin (100 μg/ml).

Příprava médií:

Všechny složky byly rozpuštěny v dH_2O a objem byl doplněn do 250 ml. Roztok byl sterilizován pomocí autoklávu. Pokud byl přidán agar, bylo médium přelito do sterilních Petriho misek v laminárním boxu.

2 × YPAD médium (250 ml):

Yeast Extract	5 g
Pepton	10 g
Glukóza	10 g
Adenin-hemisulfát	25 mg
Agar	3 g
dH_2O	

SD –trp/–leu:	YNB	1,675 g
	Drop out (–trp/–leu)	0,385 g
	Glukóza	5 g
	(Agar)	3 g
	dH_2O	

SD –trp/–leu/–his	YNB	1,675 g
	Drop out (–trp/–leu/–his)	0,365 g
	Glukóza	5 g
	Agar	3g
	dH_2O	

SC –ura:	YNB	3,35 g
	Drop out (–ura)	0,96 g
	Glukóza	10 g
	(Agar)	6 g
	dH_2O	

4.1.3 *Bombyx mori*

Bourec morušový (*B. mori*) je přirozeným hostitelem mikrosporidie *N. bombycis*. Larvy *B. mori* byly proto použity k experimentální infekci pomocí spor *N. bombycis*. Inkubace vajíček *B. mori* (https://www.silkwormstore.co.uk/) a chov vylíhnutých larev probíhaly v digitální automatické líhni (RCom MARU 190 DELUXE) při teplotě 29,4 °C a vzdušné vlhkosti 70 %.

4.1.4 *Nosema bombycis* CQ1

Spory *Nosema bombycis* CQ1 byly použity pro zavedení laboratorního cyklu mikrosporidie. Uchovávány byly při 4 °C v TE pufru (10mM Tris, 1mM EDTA).

4.2 Plazmidy

4.2.1 *in vitro* translace

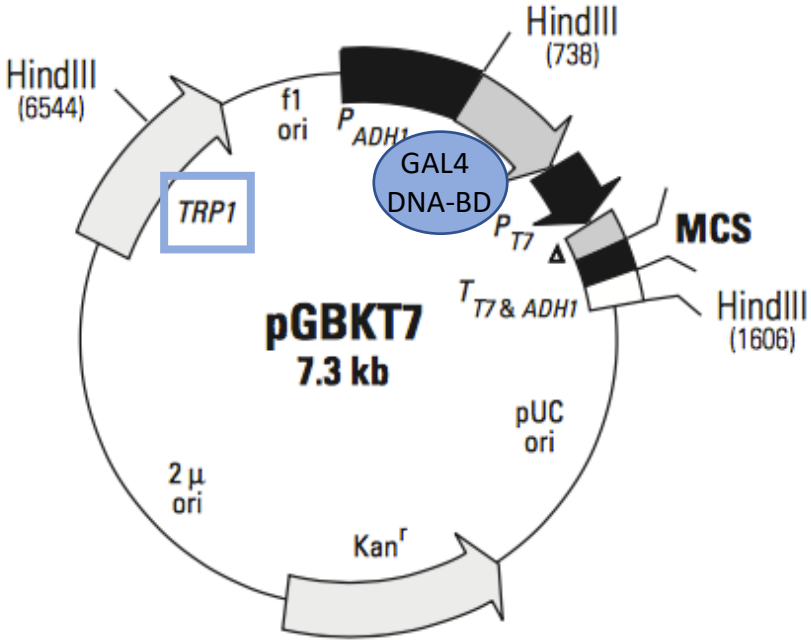
Pro *in vitro* translaci byl použit kontrolní plazmid s dihydrofolátreduktázou (DHFR). Gen pro DHFR byl vyštěpen pomocí restrikčních enzymů NdeI a XhoI a na jeho místo byly vneseny geny kódující NbPTP proteiny. Plazmid obsahuje rezistenci na selekční antibiotikum ampicilin (Obr. 11).

Obrázek 11: Schématické zobrazení části kontrolního plazmidu s DHFR. rbs – ribosome binding site (místo pro vazbu ribozomů), MCS – multiple cloning site (mnohočetné klonovací místo). Převzato z instrukčního manuálu PURExpress® *In Vitro* Protein Synthesis, NEB.

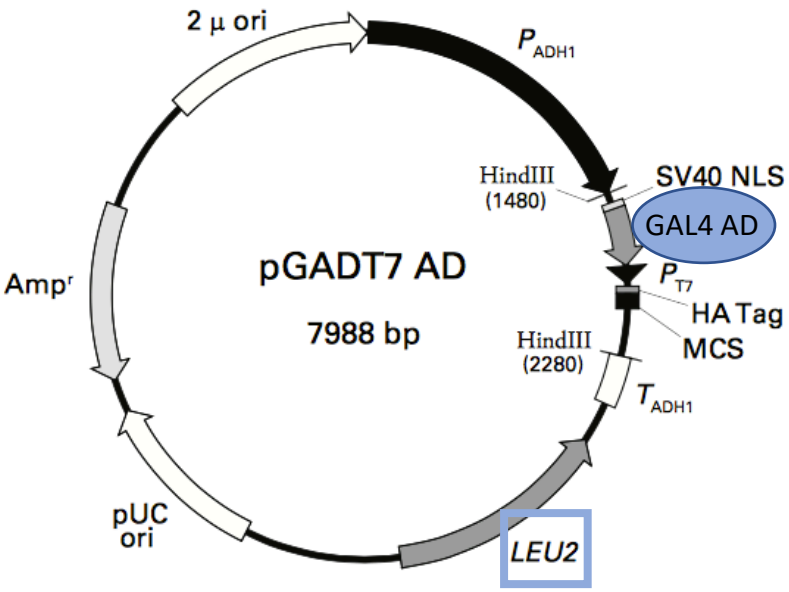
4.2.2 Kvasinkový dvouhybridní systém (Y2H)

Pro kvasinkový dvouhybridní systém (yeast two-hybrid, Y2H) byly použity plazmidy pGADT7 a pGBKT7. pGBKT7 (Obr. 12) nese gen TRP1, čímž umožňuje růst na médiu s deficitem tryptofanu a zároveň kóduje GAL4-DNA-vazebnou doménu a rezistenci na selekční antibiotikum kanamycin. Pro klonování byla použita restrikční místa NdeI a PstI. Plazmid pGADT7 (Obr.13) obsahuje gen LEU2, který kvasinkám umožní růst na médiu

s deficitem leucinu, a kóduje GAL4-aktivační doménu a rezistenci na selekční antibiotikum ampicilin. Pro klonování byla použita restrikční místa NdeI a XhoI.



Obrázek 12: Schématické zobrazení plazmidu pGBKT7 s vyznačeným genem TRP1 a GAL4 DNA-vazebnou doménou. Převzato a upraveno z oficiálních stránek Takarabio.

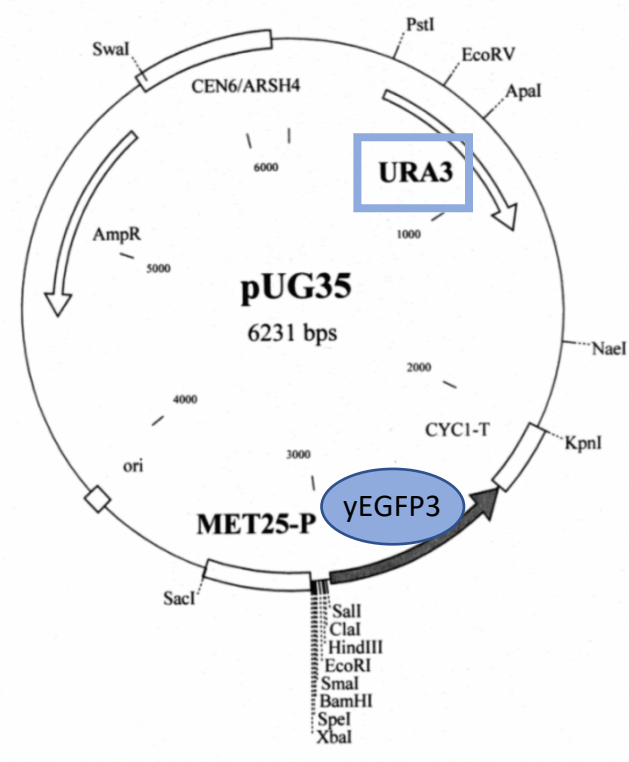


Obrázek 13: Schématické zobrazení plazmidu pGADT7 s vyznačeným genem LEU2 a GAL4 aktivační doménou. Převzato a upraveno z oficiálních stránek Takarabio.

Y2H umožňuje detekovat interakci proteinů, jelikož expresí proteinů z výše uvedených plazmidů vznikají fúzní proteiny s doménami transkripčního faktoru. V případě, že proteiny interagují, dojde k navázání aktivační domény na DNA-vazebnou doménu a spustí se transkripce reportérového genu HIS3, který umožní kvasinkám růst na médiu s deficitem histidinu.

4.2.3 Exprese proteinů v kvasinkách *S. cerevisiae*

Plazmid pUG35 (Obr. 14) byl vybrán pro expresi proteinů fúzovaných s GFP pro lokalizaci v kvasinkách *S. cerevisiae* kmene YPH499. Pro zaklonování byla použita restrikční místa XbaI, ClaI. Plazmid nese rezistenci na selekční antibiotikum ampicilin a kóduje gen URA3, který kvasinkám umožní růst v médiu s deficitem uracilu.

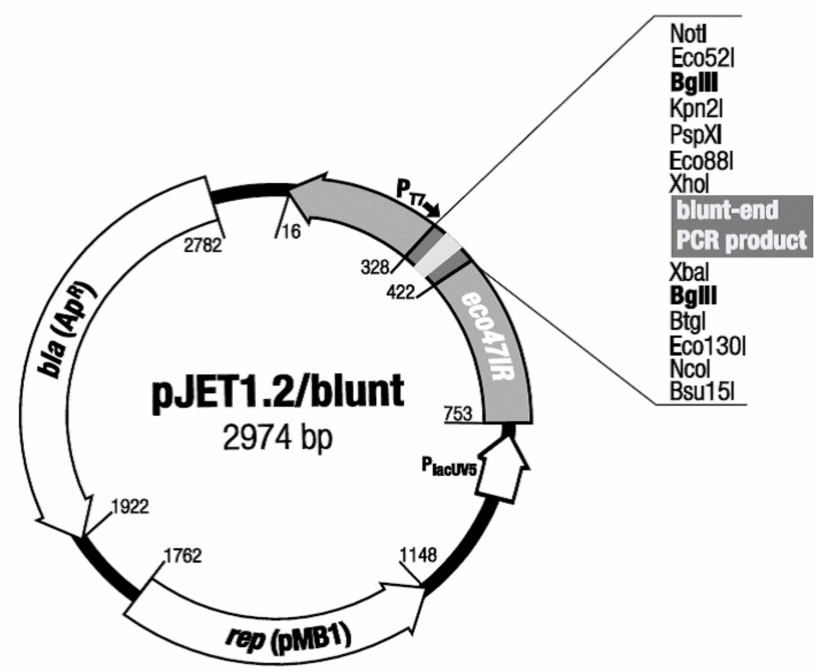


Obrázek 14: Schématické zobrazení plazmidu pUG35 s vyznačeným genem URA3 a GFP (Gueldener & Hegemann, 2000).

4.2.4 Exprese proteinů v bakteriích *E. coli*

Pro expresi proteinů v bakteriích *E. coli* byly použity expresní vektory systému pET. Plazmid pET22b byl, stejně jako pET42b, použit pro expresi proteinu s C-terminálním HIS tagem. Plazmid pET28a byl upraven přidáním C-terminálního SUMO tagu, popř. C-terminálního twinSTREP tagu. Plazmid pET22b nese rezistenci na selekční antibiotikum ampicilin a plazmidy pET42b a pET28a na selekční antibiotikum kanamycin.

Při úpravách expresního vektoru pET28a byl nejdříve využit plazmid pJET1.2/blunt z CloneJET PCR Cloning Kitu (ThermoFisher scientific) (Obr. 15), který slouží k zaklonování neštěpeného PCR produktu. Plazmid obsahuje rezistenci na selekční antibiotikum ampicilin.



Obrázek 15: Mapa plazmidu pJET1.2/blunt.Převzato z oficiálních stránek Thermo Scientific™.

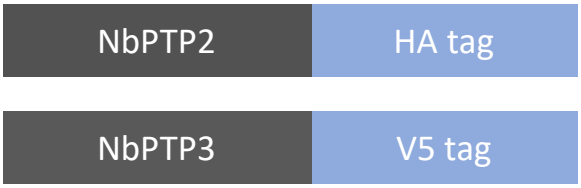
4.3 Design konstruktů a amplifikace genů

Všechny experimenty v této práci byly provedeny s použitím předem upravených genů pro NbPTP2 a NbPTP3 (proteiny polární trubice mikrosporidie *Nosema bombycis*). U obou genů byly kodony optimalizovány pro kvasinkový model pomocí programu GeneArt a primery byly vždy navržené tak, aby amplifikovaly geny bez N-terminální signální sekvence, která byla predikována pomocí programů SignalP a TargetP. Výjimkou byl experiment vizualizace proteinů v kvasinkách, kde geny obsahovaly i signální sekvenci.

4.3.1 Tvorba konstruktů a primerů

in vitro translace

Pro detekci proteinů metodou western blot byla ke genům NbPTP2 a NbPTP3 přidána sekvence pro HA-tag, respektive V5-tag (Obr. 16). Příslušné primery jsou uvedeny v tab. 1.



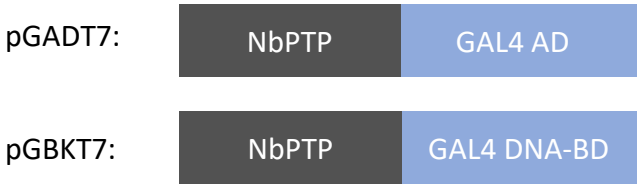
Obrázek 16: Schéma konstruktů pro *in vitro* translaci.

Tabulka 1: Primery pro amplifikaci HA-tagem značeného NbPTP2 a V5-tagem značeného NbPTP3. Šedivě jsou vyznačené příslušné tagy.

pDHFR		
NbPTP2-HA **NdeI, XhoI**	Forward	CTAG**CATATG**GTTGCTCCACCACAAGGTGGTATTATGGTTCCAAATAGAGCA
	Reverse	CTAG**CTCGAG**TCATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAAGTAGAGTTAGAGCCGTTCTC
NbPTP3-V5 **NdeI, XhoI**	Forward	CTAG**CATATG**GGTCCACCAACTGTTCCATTCGATGAACATCAAGCTAAACACGTTCATGTTAGAGTTCATGGTAGA
	Reverse	CTAG**CTCGAG**TCATTACGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGGCTTACCCTTCAATGGAGATGAAGGAAT

Y2H

Pro testování interakcí proteinů polární trubice byly geny NbPTP2 a NbPTP3 zaklonovány do vektorů pGADT7 a pGBKT7. Expresí proteinu ve vektoru pGADT7 vzniká fúzní protein s GAL4 aktivační doménou a ve vektoru pGBKT7 s GAL4 DNA-vazebnou doménou (Obr. 17). Primery pro amplifikaci jsou uvedené v tab. 2.



Obrázek 17: Schéma konstruktů pro kvasinkový dvouhybridní systém.

Tabulka 2: Primery pro amplifikaci konstruktů pro kvasinkový dvouhybridní systém.

pGADT7		
NbPTP2 **NdeI, XhoI**	Forward	CTAG**CATATG**GTTGCTCCACCACAAGGTGGT
	Reverse	CTAG**CTCGAG**TTAAGTAGAGTTAGAGCCGTTCTC
NbPTP3 **NdeI, XhoI**	Forward	CTAG**CATATG**GGTCCACCAACTGTTCCATTC
	Reverse	CTAG**CTCGAG**TTACTTCAATGGAGATGAAGGAAT

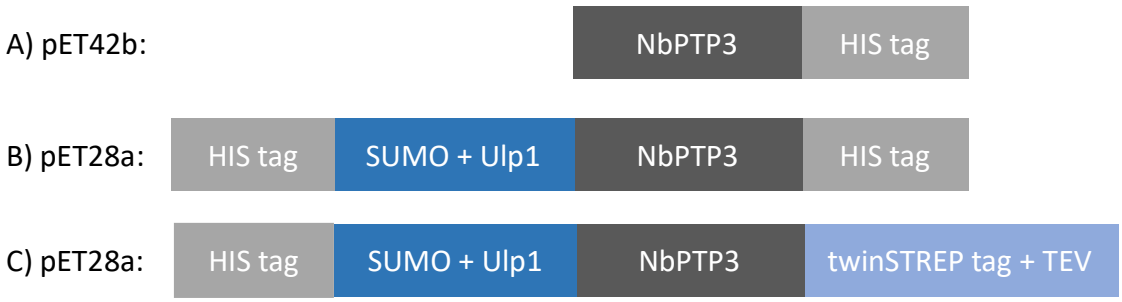
pGBKT7		
NbPTP2 **NdeI, PstI**	Forward	CTAG**CATATG**GTTGCTCCACCACAAGGTGGT
	Reverse	CTAG**CTGCAG**TTAAGTAGAGTTAGAGCCGTTCTC
NbPTP3 **NdeI, PstI**	Forward	CTAG**CATATG**GGTCCACCAACTGTTCCATTC
	Reverse	CTAG**CTGCAG**TTACTTCAATGGAGATGAAGGAAT

Exprese proteinů v bakteriích *E. coli*

Pro expresi proteinu NbPTP2 s C-terminálním HIS tagem (Obr. 18) byl použit konstrukt poskytnutý od Markéty Petrů, která příslušný gen zaklonovala do vektoru pET22b.

Obrázek 18: Schéma konstruktu pro expresi NbPTP2.

Pro expresi proteinu NbPTP3 byly vytvořeny tři různé konstrukty zaklonované do vektorů pET42b či pET28a. Pro detekci exprimovaného proteinu metodou western blot a izolaci proteinu byl k NbPTP3 přidán C-terminální HIS tag (Obr. 19A). Do dalšího konstruktu byl navíc přidán N-terminální SUMO tag pro stabilizaci proteinu a Ulp1 doména pro jeho odštěpení pomocí Ulp1 proteázy (Obr. 19B). Přidání C-koncového HIS tagu do tohoto konstruktu nebylo úmyslné, vzniklo nezahrnutím STOP kodonu při navrhování primerů. Následný konstrukt byl proto modifikován přidáním C-terminálního twinSTREP tagu a místa pro jeho odštěpení pomocí TEV proteázy (Obr. 19C).



Obrázek 19: Schéma konstruktů vytvořených pro expresi NbPTP3.

Primery pro amplifikaci konstruktu pro expresi HIS tagem značeného NbPTP3 (Obr. 19A) jsou uvedeny v tab. 3.

Tabulka 3: Primery pro amplifikaci konstruktu pro expresi konstruktu NbPTP3_HIS.

pET42b		
NbPTP3 **NdeI, XhoI**	Forward	CTAG**CATATG**GGTCCACCAACTGTTCCATTC
	Reverse	CTAG**CTCGAG**CTTCAATGGAGATGAAGGAAT

Konstrukt HIS_SUMO_Ulp1_NbPTP3_HIS (Obr. 19B) byl připraven ze dvou částí. Vytvořeny tedy byly dvě sady primerů (Tab. 4). Nejdříve byl gen pro NbPTP3 zaklonován do vektoru pJET1.2/blunt, kam byla poté mezi restrikční místa NdeI a SacI zaklonována sekvence pro SUMO tag a Ulp1 doménu. Celý konstrukt byl poté z vektoru pJET1.2/blunt vyštěpen a zaligován do vektoru pET28a pomocí restrikčních míst NdeI a XhoI.

Tabulka 4: Primery pro amplifikaci částí konstruktu HIS_SUMO_Ulp1_NbPTP3_HIS.

pET28a		
NbPTP3 **NdeI, SacI** **NotI, XhoI**	Forward	CTAG**CATATGGAGCTC**GGTCCACCAACTGTTCCATTC
	Reverse	CTAG**CTCGAGTGCGGCCGC**CTTCAATGGAGATGAAGGAATA
SUMO + Ulp1 **NdeI, SacI**	Forward	CTAG**CATATG**GCTAGCATGTCGGAC
	Reverse	CTAG**GAGCTC**ATAGGTCGCTCCACCAATCTG

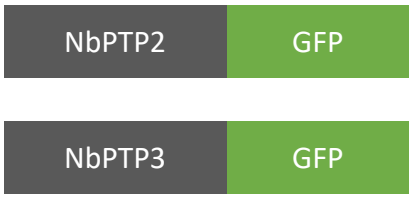
Konstrukt HIS_SUMO_Ulp1_NbPTP3_twinSTREP_TEV (Obr. 19C) byl vytvořen zaklonováním úseku DNA kódujícího twinSTREP tag a TEV sekvenci do konstruktu HIS_SUMO_Ulp1_NbPTP3_HIS. Oligonukleotidy kódující twinSTREP tag a TEV sekvenci (Tab. 5) byly tedy nasyntetizovány s přesahem do restrikčních míst NdeI a XhoI, mezi něž byly po zhybridizování oligonukleotidů zaligovány.

Tabulka 5: Sekvence oligonukleotidů kódující twinSTREP tag a TEV sekvenci.

pET28a		
twinSTREP tag + TEV **Přesah do NdeI, NotI**	Forward	**GGCCGC**AGAAAACCTGTATTTTCAGAGCTGGAGCCATCCGC AGTTTGAAAAAGGCGGCGGCAGCGGCGGCGGCAGCGGCG GCAGCAGCGCGTGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAATAG**C**
	Reverse	**TCGAG**CTATTTTTCAAACTGCGGATGGCTCCACGCGCTGCTG CCGCCGCTGCCGCCGCCGCTGCCGCCGCCTTTTTCAAACTGC GGATGGCTCCAGCTCTGAAAATACAGGTTTTCT**GC**

Vizualizace proteinů v kvasinkách

Pro vizualizaci proteinů NbPTP2 a NbPTP3 byly použity konstrukty poskytnuté od Juana Fernandeze Carilla, který příslušné geny zaklonoval do vektoru pUG35. Expresí v kvasinkách kmene YPH499 jsou tvořeny fúzní proteiny s GFP (Obr. 20).



Obrázek 20: Schéma konstruktů vytvořených pro vizualizaci proteinů v kvasinkách.

4.3.2 Amplifikace genů

Jednotlivé geny byly amplifikovány metodou PCR (polymerase chain reaction). Jako templát byly použity plazmidy pGEM T-easy, do kterých tyto geny zaklonovala M. Petrů.

PCR reakce	**50 μl**
Templátová DNA	0,5 μl
Q5 polymeráza	0,5 μl
5× Q5 pufr	10 μl
5× Q5 enhancer	10 μl
10mM dNTPs	1 μl
100μM forward primer	0,2 μl
100μM reverse primer	0,2 μl
dH_2O	27,6 μl

PCR program

1. 98 °C	30 s
2. 98 °C	10 s
3. 55 °C	30 s
4. 72 °C	30 s / 1000 bp
5. 30 cyklů kroků 2 – 4	
6. 72 °C	5 min
7. 4 °C	∞

PCR produkty byly analyzovány pomocí horizontální elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu s interkalačním barvivem SYBR Safe (Invitrogen). DNA byla detekována prostřednictvím UV transiluminátoru. K izolaci DNA z gelu byl použit High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

4.3.3 Hybridizace oligonukleotidů

Oligonukleotidy kódující twinSTREP tag a sekvenci TEV byly naředěny na 100μM koncentraci. Poté byly smíchány v poměru 1:1 (5 μl + 5 μl), denaturovány 10 min při 98 °C a pomalu chlazeny v PCR cycleru (1 °C/min). Dále bylo s hybridizovanými

oligonukleotidy pracováno stejně jako s naštěpenými PCR produkty, protože již obsahovaly přesahy do restrikčních míst.

4.4 Klonování DNA fragmentů a transformace bakterií

Izolované PCR produkty a příslušné plazmidy byly štěpeny restrikčními endonukleázami (NEB) podle protokolu od výrobce. Produkty restrikčních reakcí byly analyzovány na horizontální gelové elektroforéze a izolovány stejně jako produkty PCR reakce.

Inzerty (štěpené fragmenty DNA) a štěpené plazmidy byly poté přidány v poměru 3:1 do ligační reakce, ve které byla použita T4 DNA ligáza (Thermo Fisher Scientific) a příslušný pufr. Reakce byla inkubována přes noc v 16 °C a poté byla přidána k 150 μl kompetentních bakterií *E. coli* kmene TOP10 a inkubována 15 min na ledu. Poté byly bakterie vystaveny teplotnímu šoku (42 °C) po dobu 1 min a vráceny na led na další 2 min. Po přidání 250 μl SOC média byla kultura inkubována na třepačce (220 RPM) při teplotě 37 °C po dobu 30 min a následně vyseta na agarové plotny s LB médiem a příslušným selekčním antibiotikem.

Kolonie byly poté testovány na přítomnost klonovaných genů pomocí PCR a specifických primerů následujícím způsobem: Kolonie byla vypíchnuta z plotny a resuspendována v 50 μl dH_2O. Ke kontrolní PCR bylo použito 10 μl resuspendovaných bakterií, které byly lyzovány pomocí střídání teplot v PCR cycleru. Uvolněná DNA poté sloužila jako templát v kontrolní PCR reakci. PCR produkty byly analyzovány pomocí horizontální gelové elektroforézy a v případě pozitivního výsledku bylo zbylých 40 μl resuspendovaných bakterií inokulováno do 5 ml LB média a inkubováno přes noc na třepačce (220 RPM) při 37 °C za přítomnosti příslušného selekčního antibiotika.

Plazmid byl z bakteriální kultury izolován pomocí High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid). Koncentrace izolované DNA byla změřena na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Poté byla provedena kontrolní restrikční reakce a produkty byly analyzovány na horizontální gelové elektroforéze. V případě, že se DNA naštěpila na fragmenty o správné velikosti, byl plazmid poslán na sekvenaci k vyloučení potenciálních mutací.

4.5 *Saccharomyces cerevisiae*

4.5.1 Transformace kvasinek lithium-acetátovou metodou

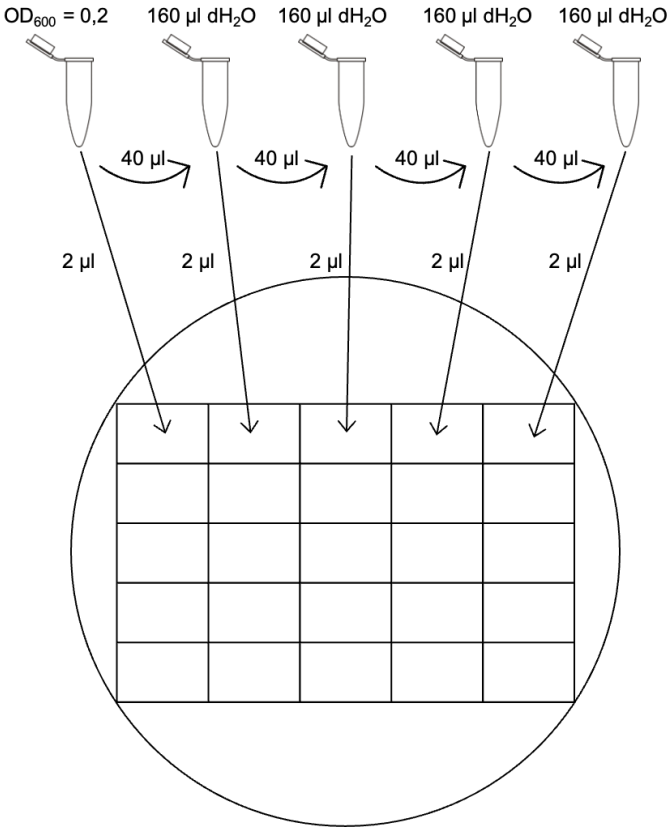
Kvasinky byly inkubovány přes noc na plotně s 2 × YPAD médiem ve 30 °C. Z plotny bylo odebráno 100 μl buněk a byly promyty dvakrát 1 ml dH_2O a jednou 1 ml 100mM LiAc. Při promývání byly buňky stáčeny na centrifuze 3 min při 3 000 × g. Poté byl pelet buněk resuspendován ve 400 μl 100mM LiAc, zvortexován a rozdělen po 50 μl do 10 mikrozkumavek pro jednotlivé transformace. Buňky byly opět stočeny 3 min při 3 000 × g, byl odstraněn supernatant a přidány roztoky v následujícím pořadí:

40% PEG	240 μl
1M LiAc	36 μl
Denaturovaná ssDNA	50 μl
Plazmidová DNA (5 μl) + dH_2O	34 μl

Transformované buňky byly 1 min vortexovány a poté inkubovány 60 min ve 42 °C. Buňky byly stočeny 1 min při 3 000 × g, supernatant byl odstraněn a buňky resuspendovány v 200 μl dH_2O a natřeny na plotny. V případě kvasinkového kmene AH109 byly použity plotny s médiem SD –leu/–trp a selekční antibiotikum kanamycin (50 μg/ml) a u kmene YPH499 plotny s médiem SC –ura a selekční antibiotikum ampicilin (100 μg/ml).

4.5.2 Y2H – Rozkapávání (Serial dilution test)

Kvasinky kmene AH109 byly po kotransformaci dvojicemi plazmidů (pGADT7, pGBKT7) inkubovány 3 dny při 30 °C. Narostlé kolonie byly inokulovány do 5 ml média SD –leu/–trp a inkubovány přes noc na třepačce (220 RPM) při 30 °C. Narostlá kultura byla naředěna na OD_{600} = 0,2 a poté rozředěna podle schématu na obr. 21. Na plotny s SD–leu/–trp a SD–leu/–trp/–his médiem byly naneseny 2 μl kultury. Plotny byly inkubovány 3 dny při 30 °C.



Obrázek 21: Design experimentu pro Serial dilution test.

4.5.3 Vizualizace proteinů v kvasinkách

Kvasinky kmene YPH499 byly po transformaci plazmidu pUG35 inkubovány 3 dny při teplotě 30 °C. Narostlá kolonie byla inokulována do 5 ml média a inkubována přes noc při 30 °C. Pro specifické značení mitochondrií bylo přidáno barvivo MitoTracker Red CMXRos (Invitrogen) v ředění 1 : 10 000 a kultura byla kultivována 20 min při 30 °C. Poté byly buňky stočeny po dobu 1 min při 3 × 000 g, dvakrát promyty pomocí 1 × PBS a resuspendovány v 1 ml 1 × PBS. Na podložní sklo bylo naneseno 15 µl buněk, které byly smíchány s 15 µl rozehřáté 2% low-melting agarózy. Po přikrytí krycím sklem byly preparáty pozorovány pomocí mikroskopu Nikon Eclipse Ti a pořízené snímky byly zpracovány pomocí programu ImageJ.

4.6 *in vitro* translace NbPTP proteinů

Pro *in vitro* translace byl použit PURExpress *In Vitro* Protein Synthesis Kit (NEB). Kromě roztoků obsažených v kitu byl do translačních reakcí přidán RNAsin (Promega) a plasmidová DNA s úspěšně zaklonovanými geny pro NbPTP2 a NbPTP3.

Translační reakce	**12 µl**
Solution A	5 µl
Solution B	3,75 µl
RNAsin (Promega)	0,5 µl
Plazmidová DNA	250 ng*
dH_2O	

* V případě kotranslace obou proteinů byla přidaná plazmidová DNA s oběma příslušnými geny. Celkové množství DNA tedy bylo 500 ng.

Translační reakce byly inkubovány ve 37 °C po dobu 2 hodin. Poté byly připraveny vzorky pro proteinovou elektroforézu. Pro SDS-PAGE bylo 6 µl reakce smícháno se vzorkovým pufrem a denaturováno po dobu 5 min při teplotě 95 °C. Pro BN-PAGE bylo 6 µl reakce smícháno s 5 µl NativePAGE 4 × koncentrovaného vzorkového pufru (Invitrogen), 0,5 µl NativePAGE G-250 vzorkového aditiva (Invitrogen) a 8,5 µl dH_2O. Takto namíchané vzorky byly poté analyzovány pomocí metod SDS-PAGE, BN-PAGE a western blot.

4.7 Exprese proteinů v bakteriích

4.7.1 IPTG-indukovaná exprese proteinů

Bakterie *E.* coli (BL21, Rosetta2) byly po transformování expresními plazmidy inkubovány na agarových plotnách s LB médiem a selekčními antibiotiky přes noc při 37 °C. Náhodně vybraná kolonie byla inokulována do LB média se selekčními antibiotiky a inkubována přes noc na třepačce (220 RPM) při 37 °C. Poté byla kultura naředěna do LB média v poměru 1:10 a inkubována ve stejných podmínkách do OD_{600} = 0,6 – 0,8. Poté byla odebrána neindukovaná kontrola (1 ml) a bylo přidáno IPTG (výsledná koncentrace nejčastěji 0,2mM, při optimalizování podmínek však byly testovány různé koncentrace). Kultura s IPTG byla inkubována opět na třepačce (220 RPM, 37 °C) a po definovaných časových úsecích (nejčastěji 2 hod/4 hod) byl odebrán vzorek (1 ml).

V případě finální exprese proteinu ve velkém objemu (např. 1 l) byla kultura stočena při 4 °C, 3 500 × g po dobu 20 min.

Pro expresi proteinů bylo použito LB médium připravené z jednotlivých složek, a nikoliv ze zakoupené kompletní směsi (LB broth viz výše). Empiricky bylo zjištěno, že (z neznámých důvodů) je exprese rekombinantních proteinů účinnější právě v takto připraveném médiu.

LB médium (1 l):

Všechny složky byly rozpuštěny v dH_2O a doplněny do objemu 1 l. Následně bylo médium sterilizované pomocí autoklávu.

Trypton	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	10 g
dH_2O	

4.6.1.1 Otestování exprese proteinu

Vzorky odebrané po indukci exprese (včetně neindukované kontroly) byly stočeny, promyty pomocí PBS, resuspendovány ve vzorkovém pufru pro SDS-PAGE a denaturovány 5 min při teplotě 95 °C. Následně byly vzorky analyzovány pomocí metod SDS-PAGE a western blot.

4.6.1.2 Otestování solubility proteinu

Rozbití bakterií pro uvolnění proteinu bylo provedeno pomocí **i) sonikace** – 1 ml indukované kultury byl stočen, resuspendován v 1 ml roztoku TRIS-NaCl (150mM NaCl, 20mM TRIS, pH=8) a sonikován 3 × 20 s při 60% amplitudě a pulsu 5/5, nebo **ii) french pressu** – pelet indukované kultury byl resuspendován v roztoku TRIS-NaCl (150mM NaCl, 20mM TRIS, pH=8), ve kterém byly nejdříve rozpuštěny inhibitory proteáz (Roche). Dále bylo pracováno na ledu a byl přidán lysosym (1 mg/ml), DNáza (1 mg/ml) a 50 μl 2,5M $MgCl_2$. Poté byly bakterie inkubovány 30 min na ledu a homogenizovány pomocí přístroje French Press G-M (GlenMills).

Po rozbití bakterií byl vzorek stočen při 4 °C, 20 000 × g. Supernatant byl odebrán a byly připraveny vzorky pro SDS-PAGE. Pelet byl smíchán s 5 × koncentrovaným

vzorkovým pufrem, supernatant s 1 × koncentrovaným vzorkovým pufrem a vzorky byly denaturovány 5 min při teplotě 95 °C. Následně byly analyzovány pomocí metod SDS-PAGE a western blot.

4.7.2 Autoindukce

Bakterie *E. coli* kmene NICO byly transformovány expresními plazmidy a inkubovány přes noc při 37 °C na plotnách s LB médiem a selekčními antibiotiky. Narostlá kolonie byla inokulována do 100 ml autoindukčního média a inkubována 20 hodin při 37 °C, 30 °C, nebo 25 °C. Poté byly připraveny vzorky pro SDS-PAGE; 0,5 ml kultury bylo stočeno, promyto pomocí 1 × PBS a resuspendováno v 1 × koncentrovaném vzorkovém pufru, denaturováno po dobu 5 min při 95 °C a analyzováno pomocí metod SDS-PAGE a western blot.

Autoindukční médium (1 l):

Na_2HPO_4, KH_2PO_4, trypton, yeast extract a NaCl byly rozpuštěny v dH_2O a objem doplněn do 1 l. Po sterilizaci v autoklávu byly přidány sterilní roztoky glycerolu, glukózy a laktózy.

Na_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	3 g
Trypton	20 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
50% glycerol	1 ml
50% glukóza	0,1 ml
20% laktóza	1 ml
dH_2O	

4.7.3 Nativní izolace exprimovaného proteinu

Pelet bakterií získaný stočením kultury inkubované s IPTG (viz kapitola 6.4.1) byl resuspendován v lyzačním pufru s rozpuštěnými inhibitory proteáz (Roche) a byl přidán lysosym (1 mg/ml) a DNáza (1 mg/ml). Po 30 min inkubace na ledu byly bakterie lyzovány pomocí french pressu (4.6.2.1). Z lyzátu byl odebrán vzorek (40 μl) a poté byl lyzát stočen při 4 °C, 30 000 × g po dobu 40 min. Mezitím bylo 1,5 ml Ni-NTA agarózy (QIAGEN)

promyto pomocí dH_2O a přesunuto na kolonu, kde byla agaróza promyta pomocí promývacího pufru (2 × 5 ml). Ze supernatantu byl odebrán vzorek (40 μl) a zbytek byl přesunut na kolonu a inkubován s Ni-NTA agarózou na rotátoru při 4 °C po dobu 4 hod. Kolona byla poté umístěna na stojan ve 4 °C a otevřena; FLOW-THROUGH frakce byla zachycena do falkony a byl odebrán vzorek (40 μl). Poté byla kolona promyta pomocí promývacího pufru (2 × 10 ml) a protein byl z kolony uvolněn pomocí elučního pufru (2 × 5 ml). Jednotlivá promytí byla zachycena do falkon a byly odebrány vzorky (40 μl). Všechny odebrané vzorky byly smíchány s 5 × koncentrovaným vzorkovým pufrem a analyzovány pomocí metod SDS-PAGE a western blot.

Lyzační/promývací pufr: 50mM Tris-HCl, pH = 7,6; 300mM NaCl; 20mM imidazol; 5mM βME

Eluční pufr: 50mM Tris-HCl, pH = 7,6; 300mM NaCl; 300mM imidazol, 5mM βME

4.8 SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE elektroforézu byly použity akrylamidové gely různých koncentrací podle velikosti analyzovaných proteinů. Pro NbPTP2 byl nejčastěji používán 13,5%, pro NbPTP3 10%. Jako pufr byl použit TGS (Tris-glycine-SDS, Biorad). Napětí elektroforézy bylo regulováno; v části zaostřovacího gelu bylo nastaveno na 90 V, poté bylo zvýšeno na 150 V. Jako standard pro určení velikosti proteinů byl použit PageRuler™ (Thermo Scientific). Po separaci proteinů byl gel obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue, nebo přeblotován na nitrocelulózovou membránu pro analýzu pomocí western blot metody.

4.9 BN-PAGE

Blue Native Page elektroforéza byla prováděna ve 4 °C. Byly použity prefabrikované gely NativePAGE™ 3 – 12%. Doprostřed gelové kazety byl nalit nejdříve tmavý katodový pufr a později (pro sledování průběhu elektroforézy) byl vyměněn za světlý katodový pufr. Do vnějšího prostoru elektroforézy byl nalit anodový pufr. Jako standard byl použit NativeMark™ a jednotlivé vzorky byly na gel nanášeny tak, že mezi nimi byla vždy jedna prázdná jamka, do které byl nanesen NativePAGE 4× koncentrovaný vzorkový pufr (Invitrogen). Napětí elektroforézy bylo nastaveno na 50 V a postupně zvyšováno až na 150 V.

Po separaci proteinů byla oddělena část gelu se standardem, která byla obarvena pomocí Coomassie Brilliant Blue a zbytek gelu byl přeblotován na PVDF membránu pro analýzu pomocí western blot metody.

Anodový pufr	
NativePAGE™ Running Buffer 20 × (Invitrogen)	30 ml
dH_2O	570 ml

Tmavý katodový pufr	
NativePAGE™ Running Buffer 20 × (Invitrogen)	10 ml
NativePAGE™ Cathode buffer additive 20 × (Invitrogen)	10 ml
dH_2O	180 ml

Světlý katodový pufr	
NativePAGE™ Running Buffer 20 × (Invitrogen)	10 ml
NativePAGE™ Cathode buffer additive 20 × (Invitrogen)	1 ml
dH_2O	189 ml

4.10 Coomassie Brilliant Blue barvení

Gely z vertikální elektroforézy byly přes noc barveny pomocí Coomassie Brilliant Blue obarvovacího roztoku na rotátoru (15 RPM). Následně byly promývány odbarvovacím roztokem k odstranění barviva nenavázaného na proteiny.

Obarvovací roztok	
CBB (Serva)	200 mg
Denaturovaný etanol	225 ml
Kyselina octová	50 ml
dH_2O	225 ml

Odbarvovací roztok	
Denaturovaný etanol	250 ml
Kyselina octová	650 ml
dH_2O	100 ml

4.11 Western blot

Pro specifické značení proteinů byly vzorky analyzovány pomocí metody western blot. Použita byla i) nitrocelulózová membrána nebo ii) PVDF membrána, která byla nejdříve aktivována pomocí metanolu (10 s) a promyta pomocí dH_2O (1 s).

Filtrační papíry, membrána i gel byly promyty v blotovacím pufru a vloženy do blotovacího přístroje v následujícím pořadí: filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír. Blotování probíhalo při 1 mA/cm^2 po dobu 70 min. PVDF membrána byla poté inkubována 5 min v 8% kyselině octové a 5 min v dH_2O. Nespecifická vazebná místa na membráně byla blokována přes noc pomocí blokovacího roztoku – 5% nízkotučné mléko v 1 × PBS s 0,1% Tween 20 (Sigma). Membrána byla dále inkubována 1 hod v blokovacím roztoku s primární protilátkou (Tab. 6), promyta blokovacím roztokem (3 × 15 min), inkubována 1 hod v blokovacím roztoku se sekundární protilátkou (Tab. 7) a promyta blokovacím roztokem (2 × 15 min) a pomocí 1 × PBS (15 min).

V závislosti na typu sekundární protilátky byl použit i) substrát pro alkalickou fosfatázu (Sigma), který byl po vyvolání blotu vymyt pomocí dH_2O nebo ii) substrát pro peroxidázu (Merck Luminata™ – Crescendo), který byl detekován pomocí přístroje Amersham Imager 600.

Blotovací pufr

Tris	3 g
Glycine	14,4 g
SDS	1 g
Metanol	200 ml
dH_2O	700 ml

Tabulka 6: Použité primární protilátky

Protilátka	**Zvíře**	**Ředění**	**Producent**
α-HA	krysa	1 μl/ml	Roche
α-V5	králík	1 μl/ml	Sigma
α-HIS	myš	1 μl/ml	Qiagen
α-STREP	myš	2 μl/ml	Abcan

Tabulka 7: Použité sekundární protilátky

Protilátka	**Ředění**	**Producent**
α-myš-HRP	0,5 μl/ml	Sigma
α-myš-AP	0,5 μl/ml	Sigma
α-krysa-HRP	0,5 μl/ml	Sigma
α-králík-HRP	0,5 μl/ml	Sigma

4.12 Laboratorní cyklus *N. bombycis*

Vajíčka *B. mori* (https://www.silkwormstore.co.uk/) byla inkubována do vylíhnutí larev (~ 7 dní) při teplotě 29,4 °C a vzdušné vlhkosti 70 %. Larvy byly chovány ve stejných podmínkách a byly každý den krmeny práškovou drtí listů moruše (https://www.silkwormstore.co.uk/), která byla smíchána s dH_2O a sterilizována pomocí autoklávu. Po 18 dnech od vylíhnutí (3.-4. vývojový instar) byly larvy jeden den ponechány bez krmení a k následující dávce bylo na každý gram drti moruše přidáno řádově 10^4 spor *N. bombycis*. Po 11 dnech od infikování byly larvy usmrceny, ponechány přes noc v 1 × PBS a pitvány. Vyjmuty byly snovací žlázy, které byly homogenizovány v 1 × PBS a suspenze byla přefiltrována přes 40μm filtr pro odstranění větších zbytků tkáně. Filtrát byl stočen při 1 500 × g, 4 °C po dobu 1 min a pelet resuspendován v 2 ml TE pufru. Následně byla suspenze přečištěna pomocí Percoll gradientu (Sigma), jehož pH bylo pomocí HCl upraveno na pH = 7, při 27 000 × g, 4 °C po dobu 90 min. Frakce se sporami byla promyta pomocí 1 × PBS a izolované spory skladovány při 4 °C v TE pufru.

4.13 Kryoelektronová mikroskopie

Vyizolované spory *N. bombycis* byly zaslány do spolupracující laboratoře (Edward Egelman, University of Virginia), kde byly stimulovány pomocí 3% peroxidu vodíku k extruzi polární trubice. Poté byly připraveny vzorky pro kryoelektronovou mikroskopii, které byly dále analyzovány. Na získaných datech byla provedena Fourierova transformace za účelem zjištění, zda se v polární trubici pravidelně opakuje určitý vzor.

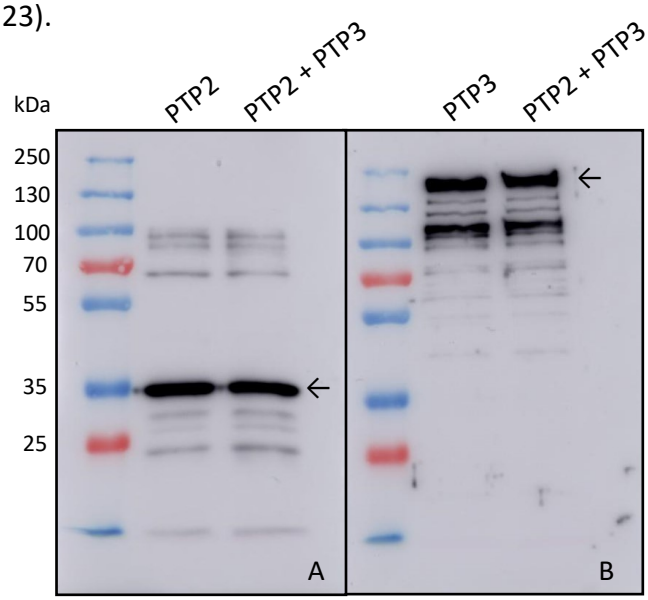
5. Výsledky

5.1 Interakce NbPTP proteinů

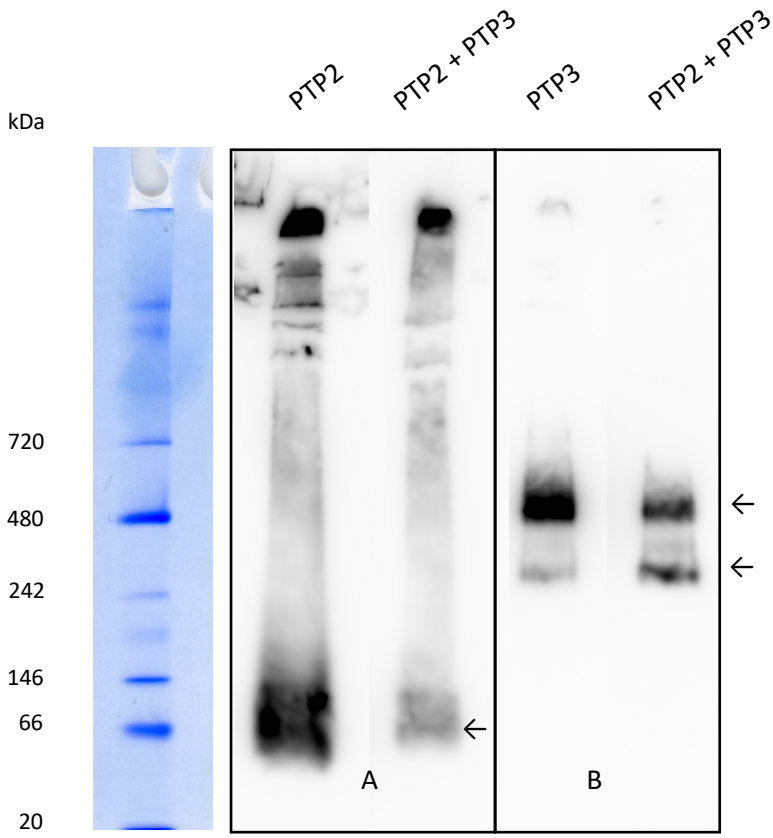
Na základě experimentů provedených u *E. cuniculi*, byly prokázány interakce všech majoritních PTPs – PTP1, PTP2, PTP3 (Bouzahzah et al., 2010). Vzhledem k předpokladu, že stavba polární trubice je konzervovaná napříč mikrosporidiemi a PTP proteiny by tedy měly interagovat stejným způsobem, byly vybrány následující metody pro otestování interakcí PTP2 a PTP3 *N. bombycis*. Zda proteiny tvoří komplexy bylo otestováno jak *in vitro* pomocí kotranslace proteinů v bezbuněčném systému, tak *in vivo* pomocí Y2H.

5.1.1 *in vitro* translace

Po úspěšném zaklonování genů pro NbPTP2 a NbPTP3 s příslušnými tagy do expresního plazmidu byly tyto konstrukty použity v *in vitro* translačních reakcích. Translace (kotranslace) proteinů byla nejdříve ověřena pomocí SDS-PAGE elektroforézy a western blotu (Obr.22). Exprimované proteiny byly úspěšně detekovány specifickými protilátkami proti připojeným tagům (V5, HA). Proto byly následně translační reakce analyzovány pomocí nativní proteinové elektroforézy BN-PAGE. Cílem bylo ověřit, zda jednotlivé proteiny nebo ve společné kombinaci vytvářejí detekovatelné proteinové komplexy (Obr. 23).



Obrázek 22: Kontrola výsledku translační reakce pomocí SDS-PAGE a western blotu. A – Protein NbPTP2 o predikované velikosti 30,9 kDa detekován pomocí primární protilátky proti HA tagu (krysa) a sekundární protilátky konjugované s HRP. B – Protein NbPTP3 o predikované velikosti 150 kDa byl detekován primární protilátkou proti V5 tagu (králík) a sekundární protilátkou konjugovanou s HRP.



Obrázek 23: Analýza translačních reakcí pomocí BN-PAGE a westernblot. Blot A byl vyvolán pomocí primární protilátky proti HA tagu (krysa) a sekundární protilátky konjugované s HRP pro detekci NbPTP2. Blot B byl vyvolán primární protilátkou proti V5 tagu (králík) a sekundární protilátkou konjugovanou s HRP pro detekci NbPTP3. Proteinový standard pro určení velikosti proteinů byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue.

Analýzou *in vitro* translačních reakcí pomocí BN-PAGE a western blotu byl detekován bend pro PTP2 o velikosti 66 kDa (Obr. 23A), což přibližně odpovídá tvorbě dimeru, zatímco v případě PTP3 byly detekovány bendy o velikosti ~480 a 300 kDa (Obr. 23B), což naznačuje tvorbu homotrimeru, respektive homodimeru PTP3. Profil translačních reakcí v porovnáním s kontranslačními se nezměnil a v kontranslačních reakcích jsou bandy detekující NbPTP2 a NbPTP3 v jiné úrovni; interakce těchto dvou proteinů mezi sebou tedy nebyla potvrzena.

5.1.2 Kvasinkový dvouhybridní systém

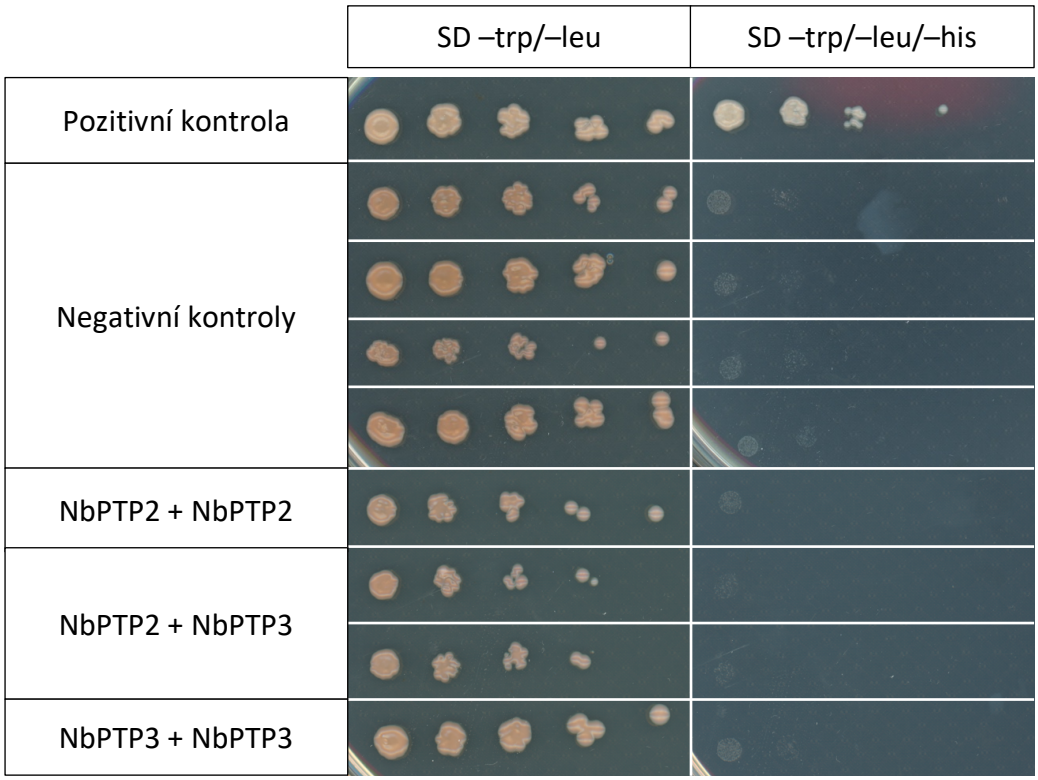
Geny pro NbPTP2 a NbPTP3 byly úspěšně zaklonovány do vektorů pGADT7 a pGBKT7. Dvojice rekombinantních plazmidů byly kotransformovány do kvasinek AH109. Jako pozitivní kontrola byly použity rekombinantní plazmidy s genem pro GspD *Malawimonas* sp. str. 249 od Alžběty Motyčkové. Jako negativní kontrola byl použit vždy jeden z dvojice transformovaných plazmidů prázdný (Tab.8).

Tabulka 8: Tabulka dvojic rekombinantních plazmidů kotransformovaných do kvasinek AH109.

pGADT7	**pGBKT7**
GspD	GspD
NbPTP2	prázdný
NbPTP3	prázdný
prázdný	NbPTP2
prázdný	NbPTP3
NbPTP2	NbPTP2
NbPTP2	NbPTP3
NbPTP2	NbPTP3
NbPTP3	NbPTP3

Pro ověření, že byly kvasinky natransformovány oběma plazmidy, byly buňky vysety na plotnu s SD –leu/–trp médiem. Narostlé kolonie byly poté otestovány pomocí ředícího testu (serial dilution test), kdy byly rozkapány na plotnu s SD –leu/–trp a s SD –leu/–trp/–his médiem pro otestování interakce proteinů.

Kvasinky *S. cerevisiae* kmene AH109 byly úspěšně kontransformovány vybranými dvojicemi plazmidů, což bylo potvrzeno růstem na médiu s deficitem leucinu a tryptofanu. Žádná interakce mezi proteiny prokázána nebyla, jelikož na médiu s deficitem leucinu, tryptofanu a histidinu narostla pouze pozitivní kontrola (Obr. 24).

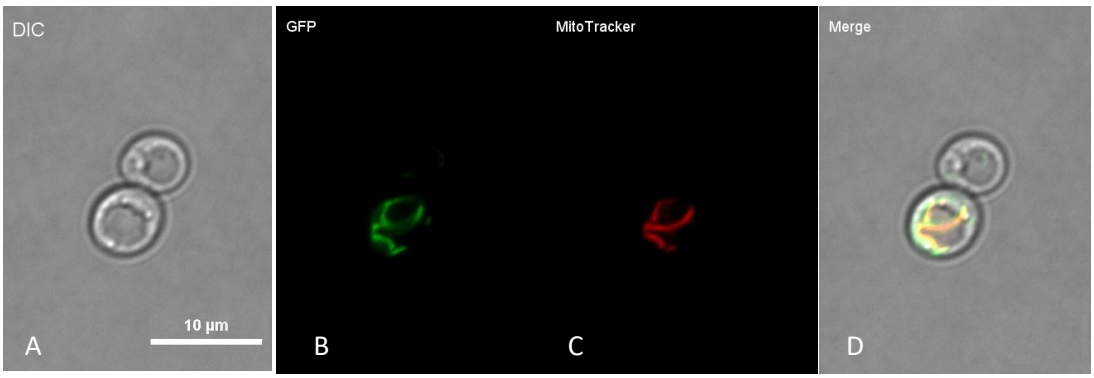


Obrázek 24: Serial dilution test transformovaných kvasinek kmene AH109.

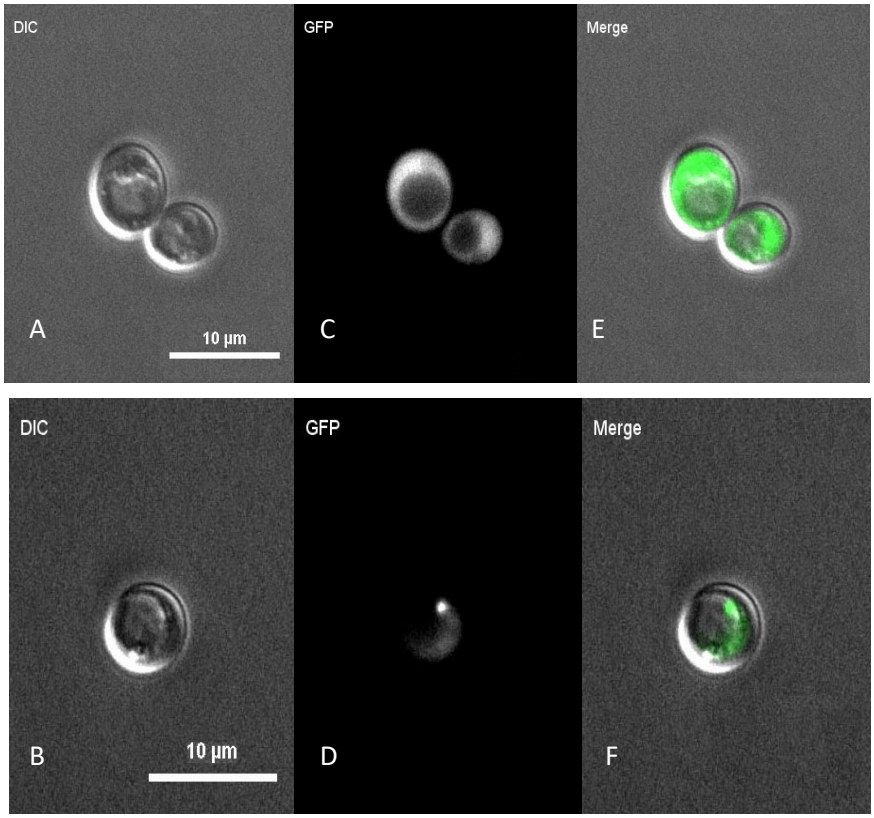
5.2 Vizualizace NbPTP proteinů v kvasinkách

Pro otestování, zda lze kvasinkový model použít pro ko-expresi PTP proteinů za účelem studování jejich interakcí, byly proteiny NbPTP2 a NbPTP3 vizualizovány v kvasinkách kmene YPH499 pomocí GFP.

Kvasinky byly transformovány pomocí plazmidů pUG35 se zaklonovanými geny pro NbPTP2 a NbPTP3 a pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem; pro ověření transformace byly kvasinky vysety na plotnu s médiem SC –ura. V případě NbPTP2 bylo pro potvrzení mitochondriální lokalizace použito barvivo MitoTracker Red CMXRos.



Obrázek 25: Vizualizace NbPTP2-GFP v kvasinkách *S. cerevisiae* kmene YPH499. A – buňka v DIC; B – NbPTP2 značený GFP; C – mitochondrie značené MitoTracker Red CMXRos; D – překryv.

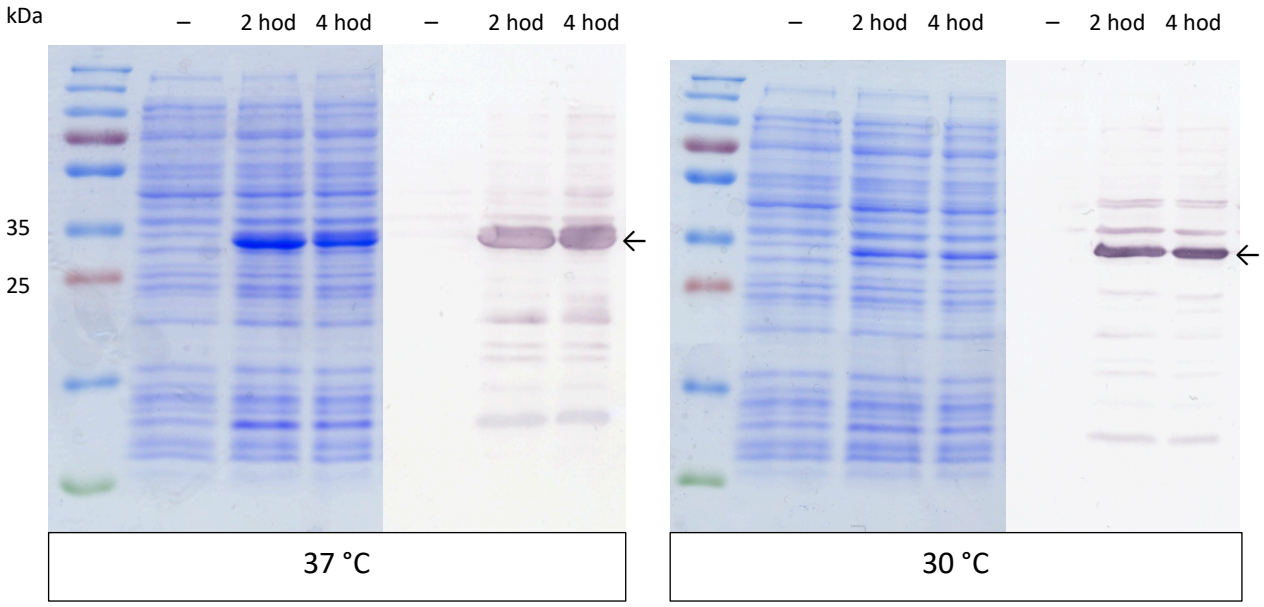


Obrázek 26: Vizualizace NbPTP3-GFP v kvasinkách YPH499. A,B – buňka v DIC; C,D – NbPTP3 značený GFP; E,F – mitochondrie značené MitoTracker Red CMXRos; D – překryv

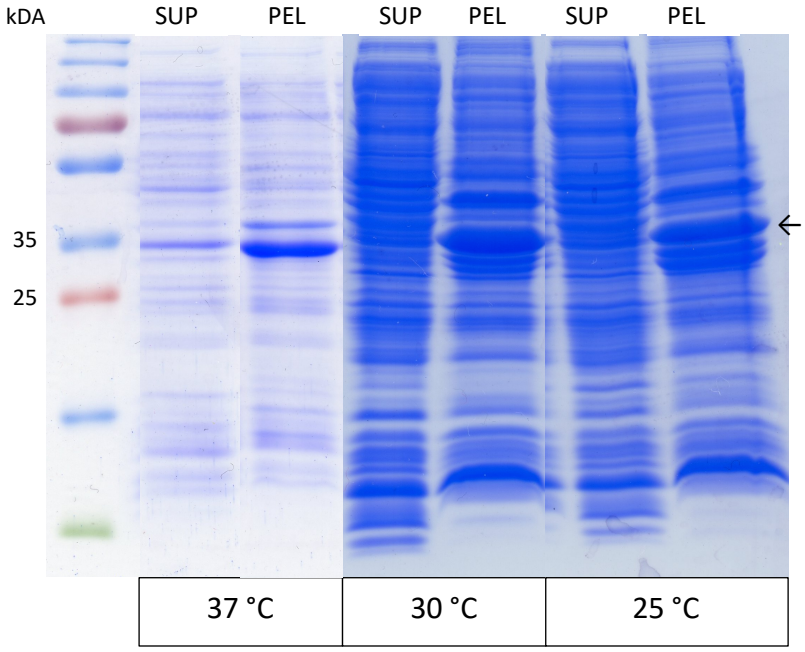
Proteiny NbPTP2 a NbPTP3 měly odlišnou lokalizaci v kvasinkách YPH499 (Obr. 25 a 26). GFP signál proteinu NbPTP2 kolokalizoval se signálem barviva MitoTracker Red CMXRos; vykazoval tedy mitochondriální lokalizaci. GFP signál proteinu NbPTP3 byl ve většině případů cytoplazmatický. V menším počtu případů pak značil jediný váček v buňce. Pozorovaná lokalizace obou proteinů neodpovídá přítomnosti predikovaných signálních peptidů, které by proteiny nasměrovaly do sekreční dráhy. Výsledky proto pravděpodobně odrážejí neschopnost kvasinek rozeznat tyto signální peptidy.

5.3 Exprese NbPTP2 v bakteriích

S cílem purifikace nativního proteinu NbPTP2 pro další interakční a strukturní analýzu byly bakterie *E. coli* kmene BL21 transformovány rekombinantním plazmidem pET22b se zaklonovaným NbPTP2 fúzovaným s HIS tagem. Exprese proteinu byla indukována pomocí 0,2mM IPTG a analyzována pomocí SDS-PAGE a western blot. Exprese byla otestována při dvou různých teplotách (37 °C, 30 °C) (Obr. 27). Otestování solubility exprimovaného proteinu bylo provedeno lyzováním buněk pomocí frenchpressu v lyzačním pufru 150mM NaCl, 20mM TRIS, pH=8 po expresi při třech různých teplotách (37 °C, 30 °C, 25 °C) (Obr.28).



Obrázek 27: Test exprese NbPTP2 v bakteriích. Gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue a western blot inkubován s primární protilátkou proti HIS tagu (myš) a sekundární protilátkou s alkalickou fosfatázou. Analyzovány byly vzorky neindukované kontroly (–) a vzorky po 2 a 4 hodinách indukce.

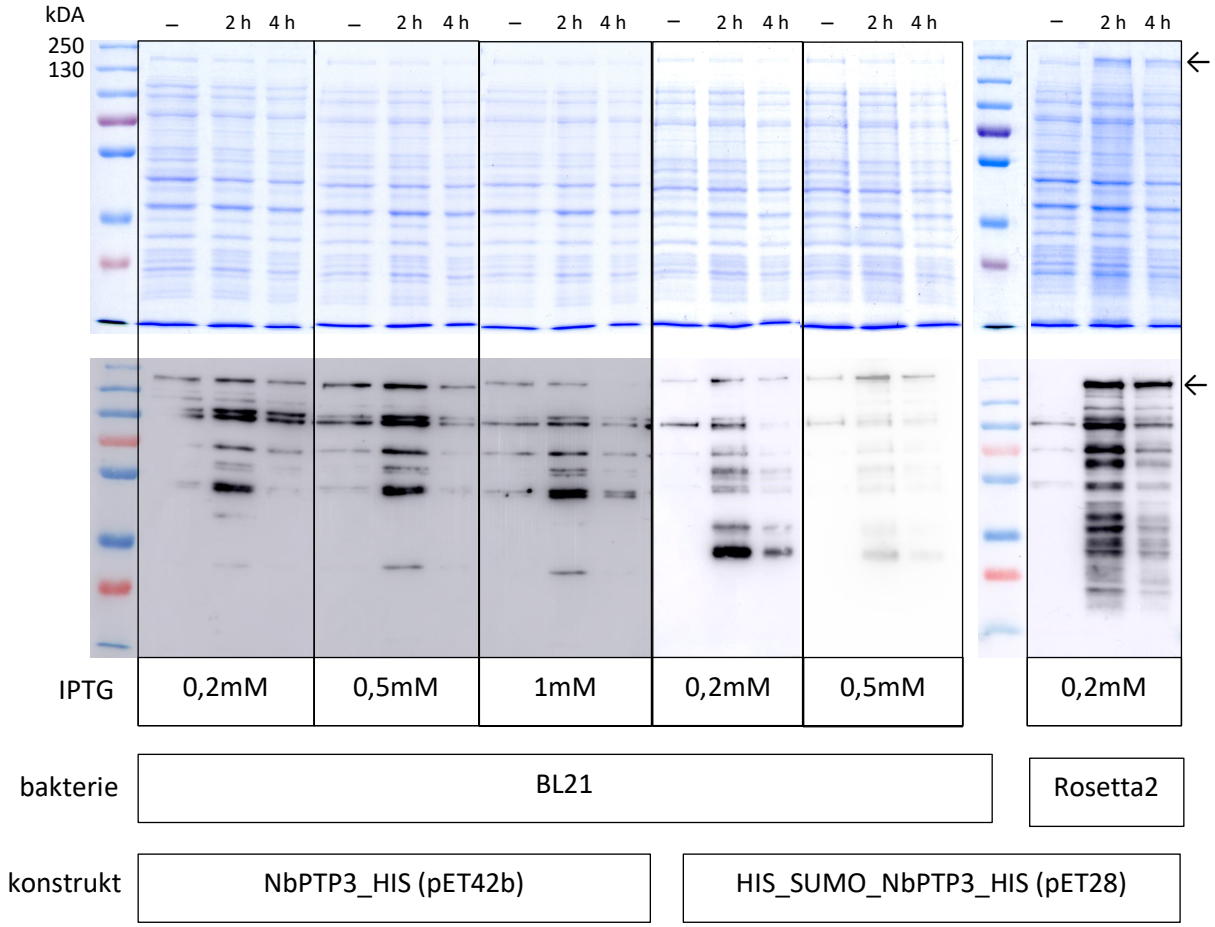


Obrázek 28: Otestování solubility proteinu NbPTP2. Gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue. SUP – supernatant; PEL – pelet.

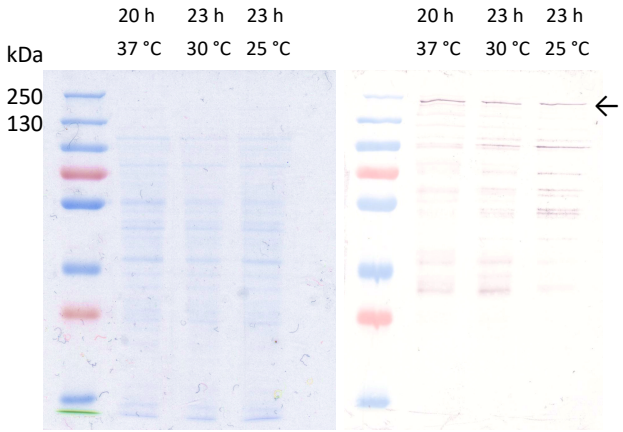
Exprese proteinu NbPTP2 o predikované velikosti 30,9 kDA byla úspěšně detekována ve všech zvolených podmínkách. K silnější expresi docházelo při 37 °C než při 30 °C. Protein však nebyl ve zvoleném pufru solubilní a nepomohla ani optimalizace snížením teploty kultivace. Pro získání solubilního NbPTP2 bude proto nutné optimalizovat složení lyzačního pufru nebo případně využít renaturaci proteinu získaného za denaturujících podmínek.

5.4 Exprese NbPTP3 v bakteriích

Za účelem purifikace nativního proteinu NbPTP3 pro následnou interakční či strukturní analýzu byly pro expresi proteinu v bakteriích *E. coli* vytvořeny tři konstrukty. Konstrukt NbPTP3_HIS byl úspěšně zaklonován do expresního vektoru pET42b a konstrukty HIS_SUMO_NbPTP3_HIS a HIS_SUMO_NbPTP3_twinSTREP do expresního vektoru pET28a. Exprese těchto konstruktů byla testována při různé koncentraci IPTG, v různých kmenech bakterií *E. coli* a v různých časech indukování (Obr. 29) a také metodou autoindukce (Obr. 30).

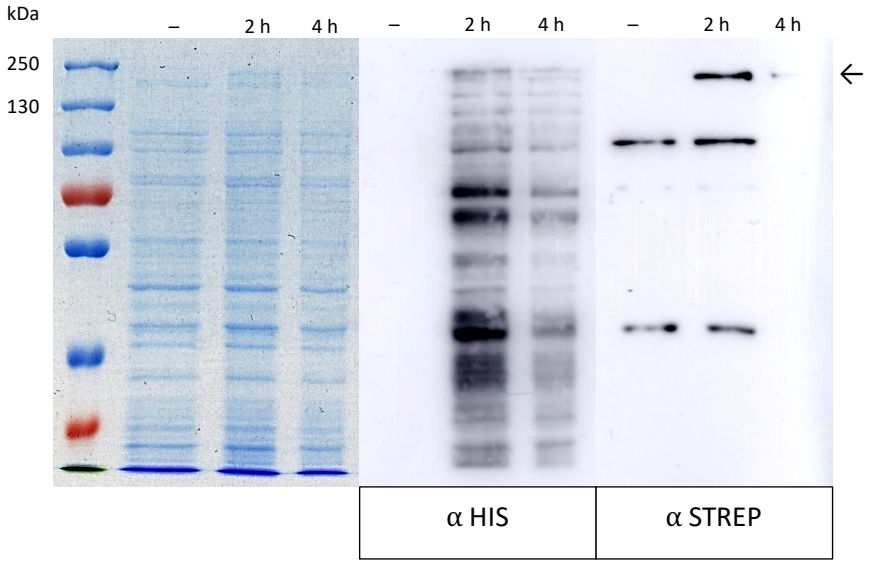


Obrázek 29: Testování exprese proteinu NbPTP3 v bakteriích *E. coli* při různých podmínkách pomocí SDS-PAGE a western blot. Gely byly obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue a bloty vyvolány primární protilátkou proti HIS tagu (myš) a sekundární protilátkou konjugovanou s HRP. Analyzovány byly vzorky neindukované kontroly a vzorky po 2 a 4 hodinách exprese.



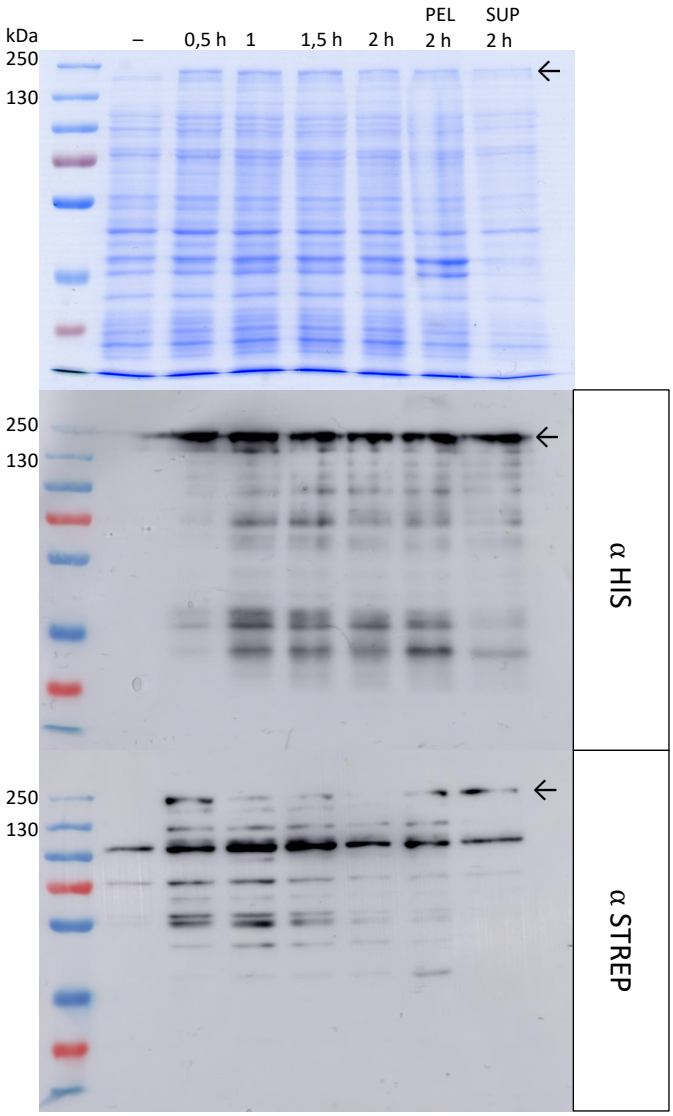
Obrázek 30: Testování exprese proteinu NbPTP3 v bakteriích BL21 metodou autoindukce. Gel byl obarveny pomocí Coomassie Brilliant Blue a blot vyvolán primární protilátkou proti HIS tagu (myš) a sekundární protilátkou s alkalickou fosfatázou.

Exprese proteinu byla detekována za všech zvolených podmínek. Shodně však byla za všech situací zjištěna přítomnost celé řady kratších proteinových produktů. To mohlo být způsobeno buď degradací proteinu nebo translací z alternativních START kodónů. Koncentrace IPTG neměla vliv na hladinu a kvalitu exprese NbPTP3 v bakteriích. Exprese v bakteriích *E. coli* kmene Rosetta2 však vykazovala nejlepší výsledky; celý NbPTP3 o predikované velikosti 150 kDa byl detekován ve větší míře než u buněk BL21. V dalších experimentech byl vzhledem k fragmentaci NbPTP3 používán již pouze konstrukt HIS_SUMO_NbPTP3_twinSTREP. Jeho výhodou bylo využití dvou různých purifikačních tagů na opačných koncích proteinu a teoreticky tak možnost purifikace pouze celého proteinu. Test exprese tohoto konstruktu je znázorněn na Obr. 31.



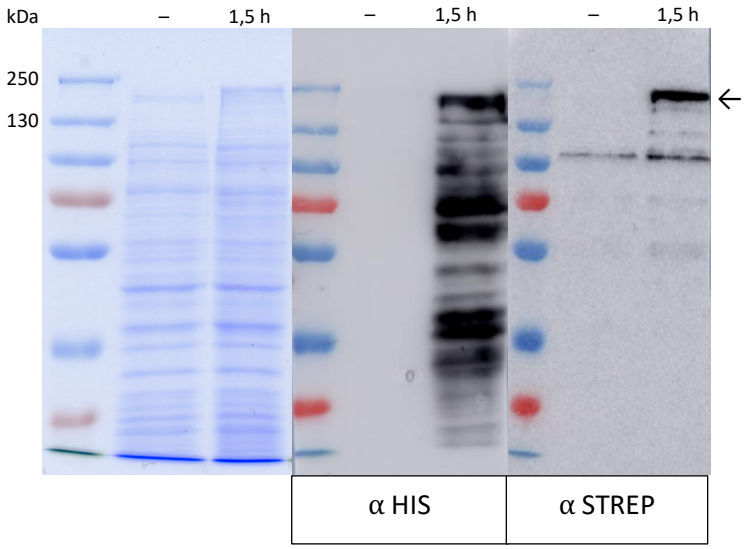
Obrázek 31: Test exprese konstruktu HIS_SUMO_NbPTP3_twinSTREP indukované pomocí 0,2mM IPTG v bakteriích *E. coli* kmene Rosetta2 po dobu 2 a 4 hodin. Gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue a bloty vyvolány pomocí primárních protilátek proti HIS tagu a STREP tagu a sekundární protilátky konjugované s HRP.

Test exprese konstruktu HIS_SUMO_NbPTP3_twinSTREP tag (Obr.31) vykázal slabší expresi po 4 hodinách než po 2 hodinách; zároveň po 4 hodinách byl jen velmi slabě detekovaný band na blotu vyvolaném α STREP protilátkou, což značí, že by protein mohl být degradován od C-konce. Dále byla tedy otestována exprese v kratších časových úsecích a také byla otestována solubilita proteinu po lyzi buněk pomocí sonikace v lyzačním pufru 150mM NaCl, 20mM TRIS, pH=8. Přestože rozdíly nebyly výrazné, největší množství proteinu bylo detekováno po 1,5 hodině exprese a protein byl detekován i v solubilní frakci (Obr. 32).

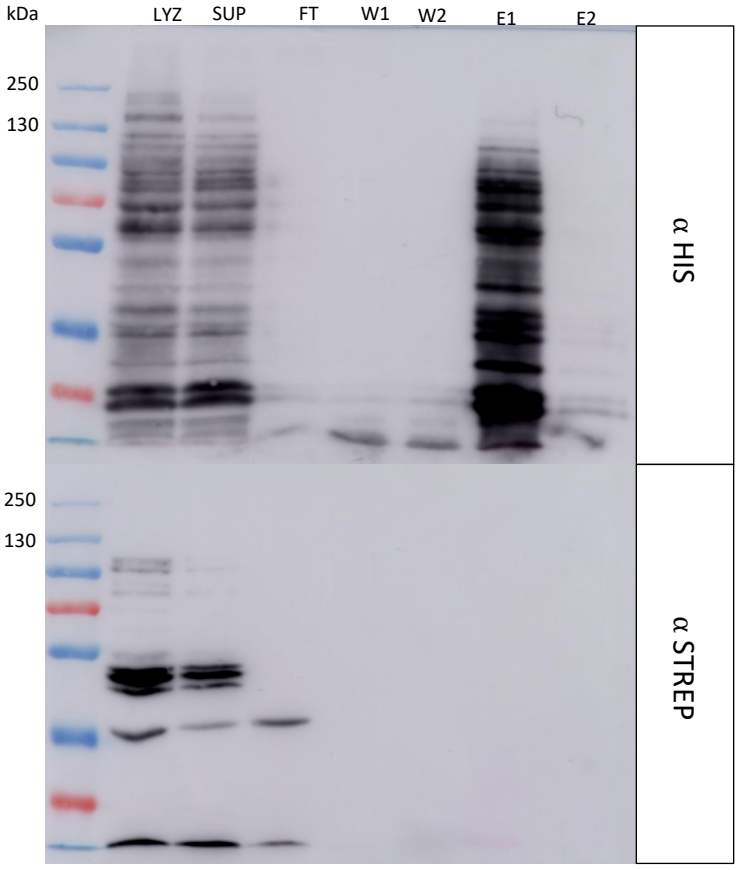


Obrázek 32: Testování času vhodného pro expresi HIS_SUMO_NbPTP3_twinSTREP pomocí 0,2mM IPTG v bakteriích *E. coli* kmene Rosetta2 a test solubility proteinu. Gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue a bloty vyvolány pomocí primárních protilátek proti HIS tagu a STREP tagu a sekundární protilátky konjugované s HRP.

Pro indukci exprese za účelem následného izolování proteinu byly vzhledem k předchozím testům zvoleny následující podmínky pro indukování ve velkém objemu (2 l): bakterie kmene Rosetta2 byly transformovány plazmidem pET28a s konstruktem HIS_SUMO_NbPTP3_twinSTREP a exprese byla indukována 0,2mM IPTG po dobu 1,5 hod. Z kultury byly odebrány vzorky pro potvrzení exprese proteinu a pelet bakterií byl dočasně zamražen do –80 °C. Po analýze vzorků, která potvrdila expresi proteinu (Obr. 33) byly bakterie lyzovány pomocí frenchpressu v lyzačním pufru 50mM Tris-HCl, pH = 7,6; 300mM NaCl; 20mM imidazol; 5mM βME a protein byl purifikován pomocí NiNTA agarózy (Obr. 34).



Obrázek 33: Ověření exprese HIS_SUMO_NbPTP3_twinSTREP exprimovaného ve 2l kultuře bakterií *E. coli* kmene Rosetta2. Gel byl obarven pomocí Coomassie Brilliant Blue a bloty vyvolán primárními protilátkami α HIS a α STREP a sekundární protilátkou konjugovanou s HRP.

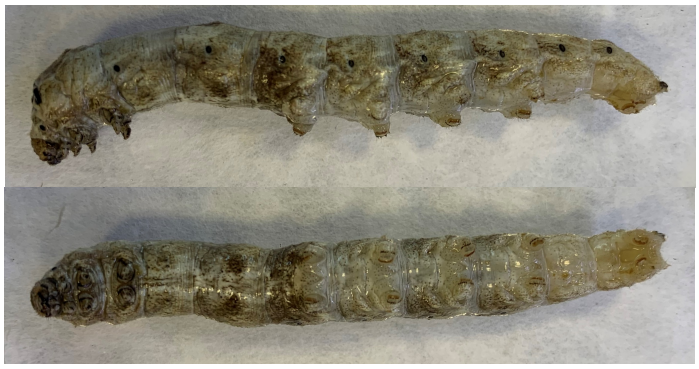


Obrázek 34: Analýza vzorků odebíraných při purifikaci HIS_SUMO_NbPTP3_twinSTREP. LYZ – lyzát; SUP – supernatant; FT – flow through; W1 – 1. promytí; W2 – 2. promytí; E1 – 1. eluce; E2 – 2. eluce. Bloty byly vyvolány primárními protilátkami α HIS a α STREP a sekundární protilátkou konjugovanou s HRP.

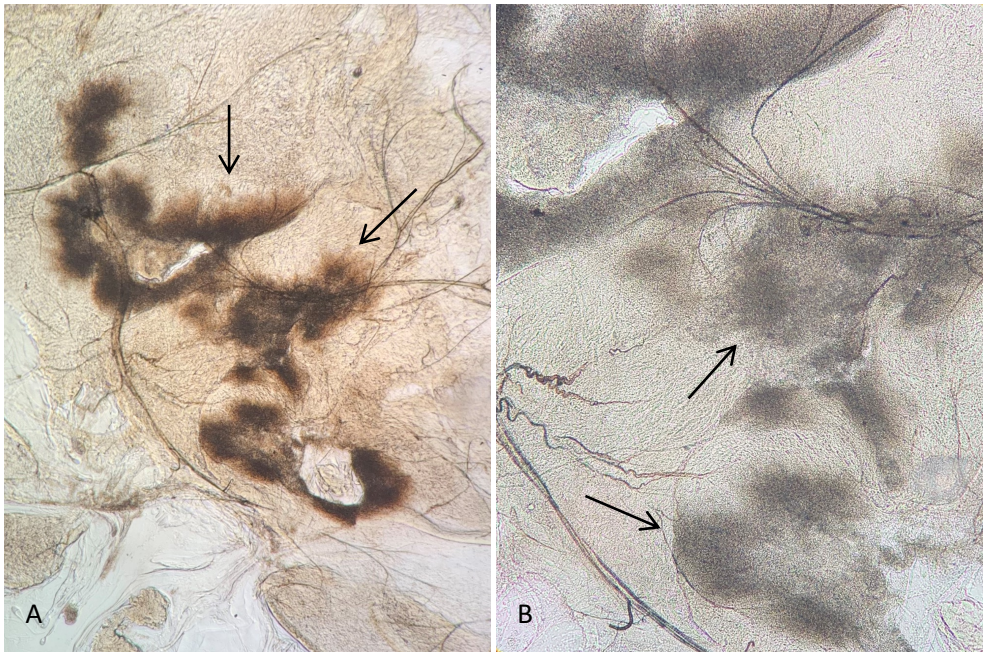
Celý protein NbPTP3 se v tomto pokusu bohužel nepodařilo vyizolovat (Obr. 34). Během manipulace byl protein pravděpodobně degradován, což naznačuje i jeho úbytek před a po zamražení vzorku do –80 °C a lyzi buněk pomocí frenchpressu. V dalších fázích izolace už nebyl detekován vůbec. Další purifikace proto bude nutné provádět rychleji. Aby se zkrátila doba manipulace mimo chladovou komoru, bylo by pravděpodobně lepší lyzovat buňky pomocí sonikace namísto frenchpressu.

5.5 Laboratorní cyklus *N. bombycis*

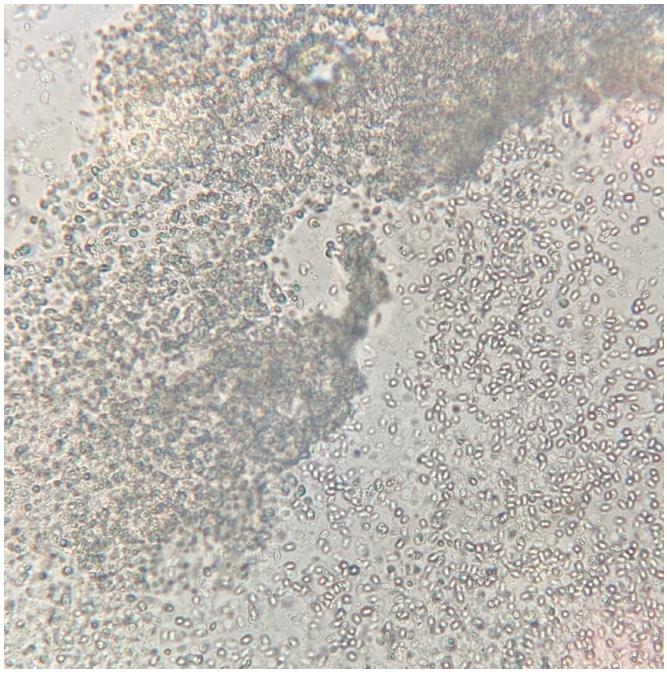
Larvy *B. mori* byly 11 dní po vylíhnutí perorálně infikovány sporami *N. bombycis* CQ1. 18 dní po infekci byla ve snovacích žlázách infikovaných larev (Obr. 35) detekovatelná masivní ložiska spor *N. bombycis* (Obr. 36 a 37), které byly úspěšně vyizolovány (Obr. 38) z vypitvaných homogenizovaných snovacích žláz a přečištěny.



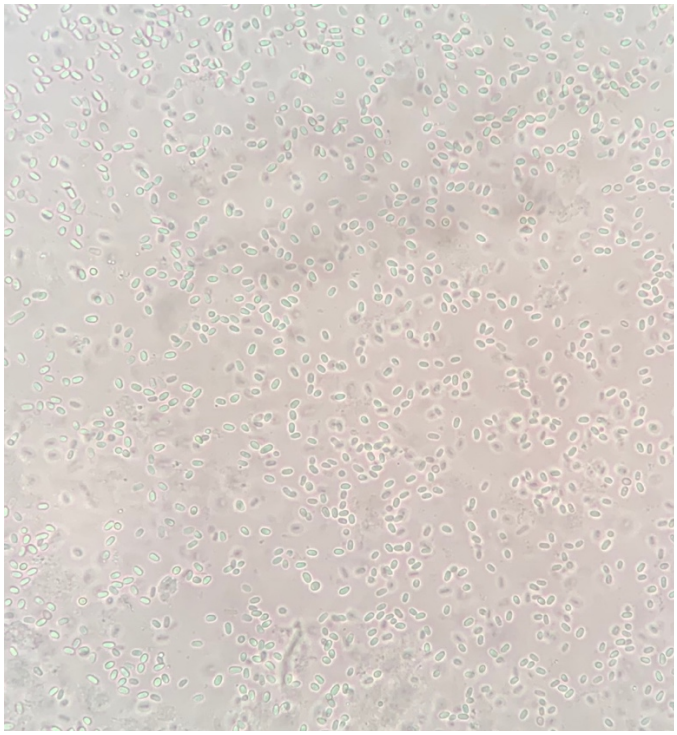
Obrázek 35: Larva *B. mori* 18 dní po infekci sporami *N. bombycis*.



Obrázek 36: Snovací žlázy *B. mori* s ložisky infekce *N. bombycis*. Zvětšení: A – 40 × ; B – 100 ×



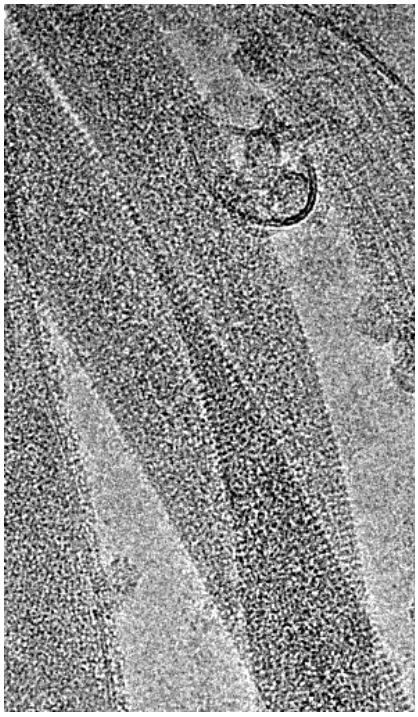
Obrázek 37: Fragment snovací žlázy *B. mori* s uvolněnými sporami *N. bombycis*; Zvětšení: 400 ×.



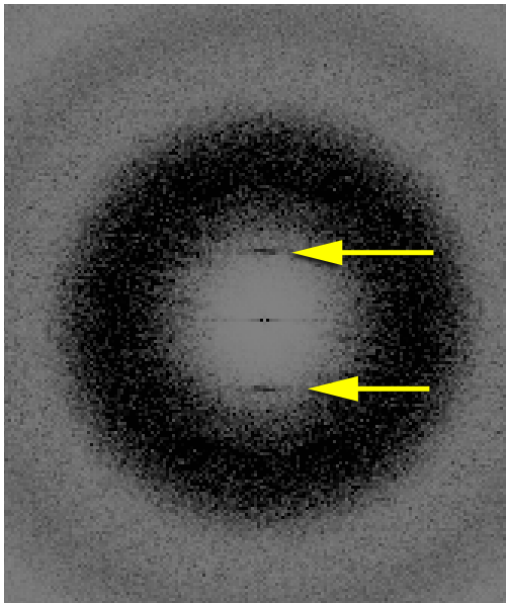
Obrázek 38: Vyizolované spory *N. bombycis* ze snovacích žláz *B. mori*; zvětšení: 400 ×.

5.6 Kryoelektronová mikroskopie

Spory *N. bombycis* byly pomocí peroxidu vodíku stimulovány k extruzi polární trubice a analyzovány pomocí kryoelektronové mikroskopie (Obr 38). Výsledné snímky polárních trubic byly dále analyzovány pomocí Fourierovy transformace (Obr. 39), která vykázala pravidelně opakující se vzor s periodicitou 63 Å.



Obrázek 39: Polární trubice *N. bombycis* analyzovaná pomocí cryoEM. Na obrázku je patrné „žíhání“, které naznačuje pravidelné opakování PTP proteinů v rámci struktury.



Obrázek 40: Analýza cryoEM snímků polární trubice *N. bombycis* pomocí Fourierovy transformace.

6. Diskuze

Polární trubice skládající se z PTP proteinů je unikátní biologická struktura, jejíž mechanismus ani přesná stavba nejsou dodnes známy. Uvnitř spory je polární trubice stočená do kompaktních smyček a vyplněna densním materiálem. Po vystřelení tvoří transportní kanál pro sporoplasmu pronikající do hostitelské buňky. Unikátní vlastnosti PTP proteinů umožní průchod až sedmkrát většího jádra, než je průměr polární trubice (Jaroenlak et al., 2020). Cílem této práce bylo přispět k rozklíčování této pozoruhodné struktury studiem PTP proteinů *N. bombycis.*

6.1 Interakce PTP proteinů

Sekvence PTP proteinů mikrosporidií jsou značně divergované napříč mikrosporidiemi. Zachovávají si však určité vlastnosti (např. velikost, zastoupení aminokyselin, konzervované pozice cysteinů v sekvenci), které indikují, že struktura by mohla být konzervována a jednotlivé proteiny by mohly u různých mikrosporidií plnit stejnou funkci, a tedy celkový mechanismus extruze a skládání polární trubice by měl být obdobný (Delbac et al., 2001; Weiss & Becknel, 2014). Relativně dobře studovaným organismem v souvislosti s PTP proteiny je *E. cuniculi*, u nějž byla pomocí Y2H prokázána interakce PTP1, PTP2 a PTP3 ve všech kombinacích dvojic proteinů, včetně tvorby homopolymerů (Bouzahzah et al., 2010). Na základě těchto znalostí bylo předpokládáno, že i proteiny PTP2 a PTP3 *N. bombycis* by měly interagovat a byly vybrány následující metody pro ověření této hypotézy.

6.1.1 *in vitro* translace

Extruze polární trubice je velice dynamický proces s rychlostí přesahující 300 µm/s; podle Jaroenlak et al., 2020 trvá (včetně pasáže sporoplasmy skrz trubici) pouhých 500 ms u *E. hellem* a *E. intestinalis* a 1,6 s u *A. algerae*. Původní hypotéza předpokládala polymeraci volných PTP proteinů během extruze na konci trubice (Weidner, 1982). To je však vzhledem k naměřeným rychlostem extruze velmi nepravděpodobné. Navíc by polymerace trubice probíhala v nekontrolovatelném extracelulárním prostředí.

Přesto je dost pravděpodobné, že polymerace periodické struktury, jakou je právě polární trubice, bude do značné míry autonomní proces, který by mohl probíhat

samovolně i v nebuněčném systému. Proto byly proteiny translatovány (popř. kotranslatovány) *in vitro* a možné interakce analyzovány pomocí nativní elektroforézy.

Funkčnost *in vitro* translace byla nejdříve otestována pomocí SDS-PAGE elektroforézy, která potvrdila, že v translačních i kotranslačních reakcích dochází ke vzniku proteinů NbPTP2 a NbPTP3. Analýza pomocí BN-PAGE naznačila vznik homodimerů NbPTP2, respektive homotrimerů a homodimerů NbPTP3. Interakce mezi NbPTP2 a NbPTP3 však prokázána nebyla. U PTP proteinů je predikováno značné množství míst pro posttranslační modifikace (Xu et al., 2004, Peuvel et al., 2002, Bouzahzah et al., 2010), které by mohly být důležité pro správnou konformaci či interakce proteinů. Neprokázání interakce mezi NbPTP2 a NbPTP3 by tedy mohlo být způsobeno absencí posttranslačních modifikací v bezbuněčném systému.

6.1.2 *S. cerevisiae*

Pro testování interakcí *in vivo* byl vybrán kvasinkový model zejména vzhledem k již prokázaným interakcím u *E. cuniculi* pomocí Y2H. Výběr tohoto modelového organismu podpořil také fakt, že *S. saccharomyces* patří do skupiny Fungi stejně jako mikrosporidie.

Exprese PTP proteinů v kvasinkách

PTP proteiny obsahují N-terminální signální peptidy, které podporují hypotézu, že proteiny procházejí sekretorickou dráhou a jsou transportovány pomocí derivátů Golgiho aparátu na místo vzniku polární trubice (Delbac et al., 1998). Předpokládaná kolokalizace proteinů v kvasinkách však nebyla potvrzena pravděpodobně z důvodu špatného rozpoznání signálních sekvencí PTP proteinů.

NbPTP2 vykazoval mitochondriální lokalizaci. U NbPTP3 byly pozorovány dva fenotypy, přestože všechny pozorované buňky pocházely z jedné kolonie. Jedním fenotypem byl signál z jediného váčku v buňce, což by mohlo znamenat lokalizaci v endosomu. Druhým fenotypem byl nespecifický cytoplasmatický signál.

Možným řešením v dalších experimentech by bylo upravení signálních peptidů genů pro NbPTP2 a NbPTP3 tak, aby byly pro *S. cerevisiae* rozpoznatelné a proteiny by tak vstoupily do ER a dále do sekreční dráhy; v případě koexprese proteinů by pak kvasinka mohla být vhodným buněčným systémem pro vznik komplexů PTP proteinů *in vivo*.

Y2H

Pomocí Y2H byly otestovány všechny možné kombinace NbPTP2 a NbPTP3 proteinů a vektorů. Interakce však potvrzena nebyla, přestože kvasinky byly úspěšně kotransformovány v případě všech dvojic plazmidů a u pozitivní kontroly byla interakce potvrzena. Toto zjištění bylo překvapivé vzhledem k tomu, že u PTP proteinů *E. cuniculi* byly tyto interakce pomocí Y2H potvrzeny (Bouzahzah et al., 2010). Důvodem může být divergovanost PTP proteinů. Pravděpodobnější se však zdá, že tyto proteiny nejsou v kvasinkách správně posttranslačně modifikovány, či správně skládány, a to způsobuje absenci interakce. Bohužel ani (kontrolní) pokusy prováděné v naší laboratoři s konstrukty obsahujícími PTP proteiny z *E. cuniculi* nezopakovaly výsledky již publikované studie (Bouzahzah et al., 2010).

Otázkou tedy je, do jaké míry je Y2H vhodným nástrojem pro studium interakcí mezi PTP proteiny a pro detailní analýzu proteinů, pokud je obtížné reprodukovat již publikovaná data.

6.2 Exprese PTP proteinů v bakteriích

Za účelem izolování nativních PTP proteinů pro další interakční či strukturní analýzu byly PTP proteiny exprimovány v bakteriích *E. coli*.

IPTG-indukovaná exprese NbPTP2 v bakteriích *E. coli* kmene BL21 byla úspěšná a protein byl detekován za všech testovaných podmínek; k nejsilnější expresi docházelo při 37 °C. Při testování solubility proteinu za využití sonikace a lyzačního pufru 150mM NaCl, 20mM TRIS, pH=8 však bylo zjištěno, že takto indukovaný protein není solubilní, což je problematické pro izolaci za nativních podmínek. Nepomohl ani pokus o optimalizaci exprese pomocí snížení teploty. Další experimenty nebyly z časových důvodů provedeny. Pro získání solubilního PTP2 bude nutné optimalizovat složení lyzačního pufru nebo případně využít renaturaci proteinu získaného za denaturačních podmínek. Další možnou variantou je exprese metodou autoindukce, při které mohou být navozeny přirozenější podmínky exprese a skládaní proteinů.

Pro expresi NbPTP3 byly vytvořeny tři konstrukty: PTP3_HIS, HIS_SUMO_PTP3_HIS a HIS_SUMO_PTP3_twinSTREP. Pilotní experimenty s konstruktem PTP3_HIS naznačily hlavní problém při expresi NbPTP3. Protein je sice exprimován, ale ve velmi malém množství. Navíc bylo detekováno velké množství

fragmentů daného proteinu. Pro stabilizaci a větší výtěžek proteinu byl vytvořen konstrukt se SUMO tagem. Exprese těchto konstruktů byla testována za různých koncentrací IPTG, v různých kmenech bakterií *E. coli* a po různé době exprese. Otestována byla i exprese provedená metodou autoindukce. Nejlepších výsledků bylo dosaženo IPTG-indukovanou expresí za použití kmene Rosetta2 bakterií *E. coli*; exprese proteinu byla nejsilnější a zároveň tyto buňky vykazovaly nejlepší mechanismus indukce genové exprese pomocí IPTG – protein, na rozdíl od kmene BL21, nebyl detekován v neindukované kontrole. Testování použité koncentrace IPTG neukázalo vliv množství induktoru na kvalitu exprese.

Pro purifikaci celých proteinů ze směsi fragmentů byl vytvořen konstrukt se dvěma odlišnými purifikačními tagy (HIS, twinSTREP), který byl na základě předešlých experimentů exprimován v bakteriích *E. coli* kmene Rosetta2. Exprese tohoto konstruktu byla nejsilnější po 1,5 hodině exprese pomocí 0,2mM IPTG. Přestože tyto podmínky nevykázaly ideální expresi proteinu pro purifikaci, byly vzhledem k časovým důvodům použity pro expresi ve velkém objemu (2 l) a následnou purifikaci pomocí NiNTA agarózy. NbPTP3 se vypurifikovat nepodařilo, po dočasném zamražení do –80 °C a následném lyzování bakterií pomocí french pressu došlo k jeho úbytku a v dalších fázích izolování už nebyl detekován vůbec. Z časových důvodů jsme tento slibný postup bohužel nezopakovali.

Fragmentace NbPTP3 může být způsobena proteolytickým štěpením. Bakterie mohou rozpoznat rekombinantní protein jako cizorodý, popř. špatně složený, což je u 150 kDa velkého proteinu pravděpodobné, a degradovat ho. Jinou variantou je translace z alternativních START kodónů, což je méně pravděpodobné vzhledem k tomu, že při expresi HIS_SUMO_PTP3_twinSTREP bylo detekováno velké množství bendů protilátkou α HIS a menší množství bendů detekovaných protilátkou α STREP, což naznačuje, že je protein degradován od C-konce. Podmínky exprese a purifikace je potřeba dále optimalizovat, z možných variant se nabízí např. lyzování buněk pomocí sonikace, která je rychlejší oproti french pressu a sníží se čas manipulace mimo chladovou místnost, popř. otestování větší koncentrace či jiného druhu inhibitorů proteáz. Problémem však může být samotná DNA *nbptp3*, jež byla v experimentech použita. Vzhledem k tomu, že jako vhodný modelový organismus pro studium proteinů *N. bombycis* v heterologním systému byla v naší laboratoři vytipována kvasinka, byly

kodony genů *nbptp2* a *nbptp3* před nasyntetizováním optimalizovány pro kvasinkový model. Kvasinka se jako modelový organismus neosvědčila, a proto byla exprese indukována v bakteriích, které mohou mít problém právě s odlišnou frekvencí použitých kodónů. Tuto hypotézu částečně podporuje fakt, že nejlepších výsledků exprese bylo dosaženo použitím bakterií *E. coli* kmene Rosetta2, které obsahují tRNA pro vzácné kodóny a zlepšují tak expresi.

6.3 Laboratorní cyklus *N. bombycis*

Přestože spory mikrosporidií jsou velmi odolné a dokáží ve vnějším prostředí přežít dlouhou dobu (Undeen, 1990), v naší laboratoři bylo pozorováno (M. Petrů), že po delším skladování v TE purfu při 4 °C ztrácí spory životnost a stimulace germinace pomocí 3% peroxidu vodíku ztrácí účinnost. Pro udržení životaschopných spor v laboratoři a pro jejich namnožení bylo třeba zavést laboratorní cyklus.

Larvy *B. mori* byly infikované perorálně přidáním spor *N. bombycis* do krmení. U některých larev se rozvinula masivní infekce a ložiska ve snovacích žlázách byla snadno pozorovatelná pod mikroskopem, zatímco některé larvy infekci nevykázaly. Důvodem může být, že v době infikování zrovna procházely procesem svlékání a nepřijímaly tedy potravu, nebo infikované byly, ale infekce se dostatečně nerozvinula. To může být zapříčiněno tím, že *N. bombycis* při některých infekcích produkuje jen malé množství spor, z nichž některé jsou transovariálně přeneseny do další generace, kde dochází k rozvinutí masivní infekce (Bhat et al., 2009). V případě masivních infekcí se však podařilo úspěšně vyizolovat spory *N. bombyci* pro další infekce a udržování laboratorního cyklu a pro analýzu spor pomocí různých druhů mikroskopie.

6.4 Kryoelektronová mikroskopie

Analýza polární trubice *Ancaliia algerae* prokázala helikální a pravidelné uspořádání PTP proteinů v rámci polární trubice (Jaroenlak et al., 2020; Takvorian et al., 2020). Pomocí Fourierovy transformace provedené na kryoelektronových snímcích vystřelené polární trubice *A. algerae* bylo potvrzeno pravidelné opakování vzoru PTP proteinů s průměrnou periodicitou 64 Å, které se na snímcích zobrazuje v podobě pravidelného žíhání (Takvorian et al., 2020).

Obdobným způsobem byly analyzovány vystřelené trubice námi vyizolovaných spor *N. bombycis* ve spolupracující laboratoři (Edward Egelman, University of Virginia). Na snímcích bylo viditelné stejné žíhání. Fourierova transformace vykázala opakování pravidelného vzoru PTP proteinů s průměrnou periodicitou 63 Å, což koresponduje s výsledkem u *A. algerae* a přispívá k potvrzení hypotézy, že mechanismus skládání polární trubice a uspořádání PTP proteinů při skládání polární trubice jsou obdobné a zakonzervované napříč mikrosporidiemi.

7. Závěr

Tato diplomová práce shrnuje poznatky o mikrosporidiích z hlediska jejich životního cyklu, stavby a mechanismu infekce se zaměřením na polární trubici. Cílem experimentální části bylo získat nové poznatky o struktuře polární trubice *N. bombycis*, respektive potvrdit výsledky získané studiem jiných zástupců mikrosporidií. Interakce PTP proteinů prokázané pomocí Y2H u *E. cuniculi* se však u *N. bombycis* potvrdit nepodařilo, přestože transformace dvojic plazmidů do kvasinek byla úspěšná. Jediným výsledkem podporujícím přítomnost těchto interakcí byla detekce komplexů při analýze *in vitro* translačních reakcí pomocí BN-PAGE, které naznačily vznik dimerů NbPTP2 a trimerů i dimerů NbPTP3. Další interakční, popř. strukturní studie nebyly provedeny, jelikož rekombinantní proteiny NbPTP2 ani NbPTP3 se nepodařilo vypurifikovat v nativní formě, přestože byla vyzkoušena celá řada podmínek exprese a pro NbPTP3 byly vytvořeny tři různé genové konstrukty s cílem optimalizace exprese. Přesto vytvořené konstrukty a otestované podmínky exprese a purifikace proteinů jsou velmi cenné pro budoucí experimenty prováděné již mimo tuto diplomovou práci

Vizualizace proteinů pomocí GFP bohužel nepotvrdila naši hypotézu, že by expresí proteinů v kvasinkách mohlo docházet ke kolokalizaci NbPTP2 a NbPTP3 za vzniku pozorovatelných komplexů. Hlavním důvodem bylo zřejmě špatné rozpoznání signálních peptidů v heterologním kvasinkovém systému.

Úspěšnou částí práce je zavedení laboratorního cyklu *N. bombycis*, díky kterému se v naší laboratoři podařilo po infekci larev *B. mori* vyizolovat velké množství spor, které tak mohly být použity pro analýzu pomocí různých druhů mikroskopie. Kryoelektronová mikroskopie vystřelených trubic a následná analýza dat pomocí Fourierovy transformace koresponduje s výsledky studie *A. algerae*, jelikož prokázala stejné pravidelné žíhání naznačující helikální uspořádání trubice a opakování pravidelného vzoru s průměrnou periodicitou 63 Å, přičemž u *A. algerae* je tato hodnota obdobná (64 Å).

8. Seznam zkratek

AP	alkalická fosfatáza
ATP	adenosintrifosfát
BN-PAGE	blue native polyacrylamide gel electrophoresis
βME	β-mercaptoethanol
cryoEM	kryoelektronová mikroskopie
DIC	diferenciální interferenční kontrast
DHFR	dihydrofolátreduktáza
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	deoxyribonukleotidy
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GFP	green fluorescent protein
HA-tag	hemaglutininový tag
HIS-tag	polyhistidinový-tag
HRP	horseradish peroxidase
IPTG	isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LB	lysogeny broth
NbPTP	polar tube protein *N. bombycis*
Ni-NTA	nickel nitrilotriacetic acid
OD	optická denzita
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PTP	polar tube protein
PVDF	polyvinylidenfluorid
RNA	ribonukleová kyselina
SC medium	synthetic complete medium
SD medium	synthetic defined medium
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SOC	super optimal broth with catabolite repression medium
ssDNA	salmon sperm DNA

SUMO-tag	small ubiquitin-related modifier
twinSTREP-tag	dvojitý tag s afinitou na StrepTactin
TE pufr	Tris-EDTA pufr
TEV	tobacco etch virus
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transferová RNA
Tween20	polysorbát 20
Ulp1	Ubiquitin-like-specific protease 1
YPAD	yeast extract–peptone–dextrose with adenine
YNB	yeast nitrogen base
Y2H	yeast-two-hybrid

9. Literatura

Beznoussenko GV, Dolgikh VV, Seliverstova, E, Semenov PB, Tokarev YS, Trucco A, Micaroni M, di Giandomenico D, Auinger P, Senderskiy IV, Skarlato SO, Snigirevskaya ES, Komissarchik YY, Pavelka M, de Matteis MA, Luini A, Sokolova YYa, & Mironov AA. (2007). Analogs of the Golgi complex in microsporidia: structure and avesicular mechanisms of function. *Journal of Cell Science*, *120*(7), 1288–1298. https://doi.org/10.1242/JCS.03402

Bhat SA, Bashir I, & Kamili AS. (2009). Microsporidiosis of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera-Bombycidae): A review. *African Journal of Agricultural Research*, *4*(13), 1519–1523. http://www.academicjournals.org/AJAR

Bigliardi E, Selmi MG, Lupetti P, Corona S, Gatti S, Scaglia M, & Sacchi L. (1996). Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *43*(3), 181–186. https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.1996.TB01388.X

Bouzahzah B, Nagajyothi F, Ghosh K, Takvorian PM, Cali A, Tanowitz HB, & Weiss LM. (2010). Interactions of *Encephalitozoon cuniculi* polar tube proteins. *Infection and Immunity*, *78*(6), 2745–2753. https://doi.org/10.1128/IAI.01205-09

Brooks WM, Hazard EI, & Becnel J. (1985). Two new species of *Nosema* (Microsporida: Nosematidae) from the mexican bean beetle *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae)1,2. *The Journal of Protozoology*, *32*(3), 525–535. https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.1985.TB04056.X

Brosson D, Kuhn L, Delbac F, Garin J, Vivarès CP, & Texier C. (2006). Proteomic analysis of the eukaryotic parasite *Encephalitozoon cuniculi* (microsporidia): a reference map for proteins expressed in late sporogonial stages. *Proteomics*, *6*(12), 3625–3635. https://doi.org/10.1002/PMIC.200500796

Bylén EKC, & Larsson JIR. (1996). Ultrastructural study and description of *Mrazekia tetraspora* Léger & Hesse, 1922 and transfer to a new genus *Scipionospora* n. g. (Microspora, Caudosporidae). *European Journal of Protistology*, *32*(1), 104–115. https://doi.org/10.1016/S0932-4739(96)80045-9

Cali A, Weissh LM, & Takvorian PM. (2002). *Brachiola algerae* spore membrane systems, their activity during extrusion, and a new structural entity, the multilayered interlaced network, associated with the polar tube and the sposoplasm. *J. Eukufyor. Miclohiol*, *49*(2), 164–174.

Chen Y, Evans JD, Zhou L, Boncristiani H, Kimura K, Xiao T, Litkowski AM, & Pettis, JS. (2009). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, *101*(3), 204–209. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.05.012

Corradi N & Keeling PJ. (2009). Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews*, *23*(1–2), 1–8. https://doi.org/10.1016/J.FBR.2009.05.001

Curgy JJ, Vávra J & Vivarès C. (1980). Presence of ribosomal RNAs with prokaryotic properties in Microsporidia, eukaryotic organisms. *Biol. Cell 38*(1), 49–51 (1980).

Delbac F, Peyret P, Méténier G, David D, Danchin A & Vivarès CP. (1998). On proteins of the microsporidian invasive apparatus: Complete sequence of a polar tube protein of *Encephalitozoon cuniculi*. *Molecular Microbiology*, *29*(3), 825–834. https://doi.org/10.1046/J.1365-2958.1998.00975.X

Delbac F, Peuvel I, Metenier G, Peyretaillade E & Vivares CP. (2001). Microsporidian invasion apparatus: identification of a novel polar tube protein and evidence for clustering of ptp1 and ptp2 genes in three *Encephalitozoon* species. *Infection and Immunity*, *69*(2), 1016. https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.1016-1024.2001

Didier ES. (2005). Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*, *94*(1), 61–76. https://doi.org/10.1016/J.ACTATROPICA.2005.01.010

Franzen C. (2004). Microsporidia: How can they invade other cells? *Trends in Parasitology*, *20*(6), 275–279. https://doi.org/10.1016/J.PT.2004.04.009

Han B & Weiss LM. (2017). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. *Microbiology Spectrum*, *5*(2). https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0018-2016

Han B, Polonais V, Sugi T, Yakubu R, Takvorian PM, Cali A, Maier K, Long M, Levy M, Tanowitz HB, Pan G, Delbac F, Zhou Z & Weiss LM. (2017). The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLOS Pathogens*, *13*(4), e1006341. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1006341

Han B, Takvorian PM, & Weiss LM. (2020). Invasion of host cells by Microsporidia. *Frontiers in microbiology*, *11*, 172. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00172

Hayman JR, Hayes SF, Amon J & Nash TE. (2001). Developmental expression of two spore wall proteins during maturation of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Infection and Immunity*, *69*(11), 7057–7066. https://doi.org/10.1128/IAI.69.11.7057-7066.2001

Jaroenlak P, Cammer M, Davydov A, Sall J, Usmani M, Liang FX, Ekiert DC & Bhabha G. (2020). 3-Dimensional organization and dynamics of the microsporidian polar tube invasion machinery. *PLOS Pathogens*, *16*(9), e1008738. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1008738

Katinka MD, Duprat S, Cornillott E, Méténler G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretaillade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, el Alaoul H, Peyret P, Saurin W, Gouy M & Weissenbach J. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*, *414*(6862), 450–453. https://doi.org/10.1038/35106579

Keeling PJ & Fast NM. (2002). Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology*, *56*, 93–116. https://doi.org/10.1146/ANNUREV.MICRO.56.012302.160854

Keohane EM & Weiss LM. (1998). Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review. *Folia parasitologica*, *45*(2), 117–127.

Keohane, E. M., & Weiss, L. M. (1999). The Structure, Function, and Composition of the Microsporidian Polar Tube. *The Microsporidia and Microsporidiosis*, 196–224. https://doi.org/10.1128/9781555818227.CH6

Larsson JIR. (1993). Description of *Chytridiopsis Trichopterae* n. sp. (Microspora, Chytridiopsidae), a microsporidian parasite of the caddis fly *Polycentropus Flavomaculatus* (Trichoptera, Polycentropodidae), with comments on relationships between the families Chytridiopsidae and Metchnikovellidae. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *40*: 37-48. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04880.x

Miao Z, Zhang Y, Zhang P, Wang X, Liu J & Wang G. (2018). Characterization of the germination kinetics of individual *Nosema bombycis* spores using phase contrast microscopy imaging and Raman spectroscopy. *Optics in Health Care and Biomedical Optics VIII*, 108202Z. https://doi.org/10.1117/12.2501212

Peuvel I, Peyret P, Méténier G, Vivarès CP & Delbac F. (2002). The microsporidian polar tube: evidence for a third polar tube protein (PTP3) in *Encephalitozoon cuniculi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *122*(1), 69–80. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00073-7

Qing LV, Wang L, Fan Y, Meng X, Liu K, Zhou B, Chen J, Pan G, Long M & Zhou Z. (2020). Identification and characterization a novel polar tube protein (NbPTP6) from the microsporidian Nosema bombycis. *Parasites & Vectors*, *13*(1). https://doi.org/10.1186/S13071-020-04348-Z

Stentiford GD, Bateman KS, Small HJ, Moss J, Shields JD, Reece KS & Tuck I. (2010). *Myospora metanephrops* (n. g., n. sp.) from marine lobsters and a proposal for erection of a new order and family (Crustaceacida; Myosporidae) in the Class Marinosporidia (Phylum Microsporidia). *International Journal for Parasitology*, *40*(12), 1433–1446. https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2010.04.017

Takvorian PM, Han B, Cali A, Rice WJ, Gunther L, Macaluso F & Weiss LM. (2020). An ultrastructural study of the extruded polar tube of *Anncaliia algerae* (Microsporidia). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *67*(1), 28. https://doi.org/10.1111/JEU.12751

Timofeev S, Tokarev Y & Dolgikh V. (2020). Energy metabolism and its evolution in Microsporidia and allied taxa. *Parasitology Research*, *119*(5), 1433–1441. https://doi.org/10.1007/S00436-020-06657-9

Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford GD, Bateman KS, Sriurairatana S, Chavadej J, Sritunyalucksana K & Withyachumnarnkul B. (2009). *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *Journal of Invertebrate Pathology*, *102*(1), 21–29. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2009.06.004

Undeen AH. (1990). A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. *Journal of Theoretical Biology*, *142*(2), 223–235. https://doi.org/10.1016/S0022-5193(05)80223-1

Vávra J. (2005). “Polar vesicles” of microsporidia are mitochondrial remnants (“mitosomes”)? *Folia Parasitologica* , *52*, 193–195.

Vávra J & Larsson JIR. (1999). The Microsporidia and Microsporidiosis. *The Microsporidia and Microsporidiosis*, 7–84. https://doi.org/10.1128/9781555818227

Vávra J & Lukeš J. (2013). Microsporidia and “the art of living together.” *Advances in Parasitology*, *82*, 253–319. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407706-5.00004-6

Vossbrinck CR, Maddox, JV, Friedman S, Debrunner-Vossbrinck BA & Woese CR. (1987). Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature*, *326*(6111), 411–414. https://doi.org/10.1038/326411A0

Weidner E. (1972). Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* (Berlin, Germany), *40*(3), 227–242. https://doi.org/10.1007/BF00329623

Weidner E. (1976). The microsporidian spore invasion tube the ultrastructure, isolation, and characterization of the protein comprising the tube. *The Journal Of Cell Biology*, *71*, 23–34

Weidner E. (1982). The microsporidian spore invasion tube. III. Tube extrusion and assembly. *The Journal of Cell Biology*, *93*(3), 976. https://doi.org/10.1083/JCB.93.3.976

Weiss LM & Becnel JJ. (2014). Microsporidia: Pathogens of opportunity: First Edition. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition*, 1–709. https://doi.org/10.1002/9781118395264

Xu Y, Takvorian P, Cali A & Weiss LM. (2003). Lectin binding of the major polar tube protein (PTPl) and its role in invasion. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(s1), 600–601. doi:10.1111/j.1550-7408.2003.tb00644.x

Xu Y, Takvorian PM, Cali A, Orr G & Weiss LM. (2004). Glycosylation of the major polar tube protein of *Encephalitozoon hellem*, a Microsporidian parasite that infects humans. *Infection and Immunity*, *72*(11), 6341. https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6341-6350.2004