

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Kateřina Čápová

**Produkce a charakterizace lidského inhibitoru C1 a rekombinantních proteinů z
Plasmodium falciparum PfMSP3.1 pro strukturní studia**

Production and characterisation of human C1 inhibitor and Plasmodium falciparum
PfMSP3.1 recombinant proteins for structural studies

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: prof. RNDr. Jan Konvalinka, CSc.

Konzultant: Mgr. Sebastian Zoll Ph.D.

Praha, 2023

Prohlášení

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

V Praze dne:

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli, prof. RNDr. Janu Konvalinkovi, CSc., za umožnění vypracování tohoto tématu bakalářské práce a za pomoc s jejím zpracováním. Dále bych chtěla poděkovat mému konzultantovi Mgr. Sebastianu Zollovi Ph.D. a mým kolegům Dr. Arunu Dhillonovi a Hagenovi Sülzen, MSc. za rady a pomoc v laboratoři.

Abstrakt

PfMSP3.1 je jedním z povrchových proteinů intracelulárního parazita *Plasmodium falciparum*, který způsobuje malárii. Protein v rámci strategie úniku parazita před imunitním systémem lidského hostitele váže jeden z regulátorů systému komplementu – C1 inhibitor. Zjištění přesného místa vazby a jeho strukturální stanovení by napomohlo k pochopení interakce mezi parazitem a hostitelem, která je důležitá pro rozvoj nemoci, a tím i pro návrh možné terapie.

V teoretické části práce je přiblížen životní cyklus *Plasmodia falciparum*, role vývojového stádia parazita zvaného merozoit, jeho povrchových proteinů a s tím i přímo merozoitového povrchového proteinu 3 při napadání červených krvinek parazitem. Dále je v ní stručně popsán systém komplementu, jeho aktivace a regulace. Experimentální část zahrnuje klonování plasmidů pro tvorbu C1 inhibitoru a různých forem povrchového proteinu merozoitu PfMSP3.1, transfekci S2 hmyzích buněk těmito plasmidy, následnou expresi proteinů v S2 buňkách a jejich purifikaci. V druhé polovině experimentální části byly provedeny pokusy o vytvoření komplexů C1 inhibitoru s jednotlivými formami povrchového proteinu merozoitu PfMSP3.1 a krystalizaci tohoto proteinu.

Klíčová slova

Proteinová exprese, inhibice enzymů, krystalizace proteinů, malárie, komplement, C1 inhibitor

Abstract

PfMSP3.1 is one of the surface proteins of the intracellular parasite *Plasmodium falciparum*, which causes malaria. As one of the evasion strategies of the immunity system of the human host this protein interacts with one regulator of the complement system – C1 inhibitor. Determining the exact binding site and its structural assessment would help to better understand the interaction between the parasite and the host, which is necessary for the disease progression and thus for the development of a potential therapy.

In the theoretical part of the thesis, the life cycle of *Plasmodium falciparum*, the role of the parasite stage called merozoite, the role of its surface proteins, including merozoite surface protein 3, in the attack of red blood cells by the parasite, are described in more detail. It also briefly describes the complement system, its activation pathways and the regulation of these pathways. The experimental part includes the cloning of plasmids to produce C1 inhibitor and various forms of merozoite surface protein PfMSP3.1, transfection of S2 insect cells with these plasmids, subsequent protein expression in S2 cells and their purification. In the second half of the experimental part, we tried to create complexes of C1 inhibitor with individual PfMSP3.1 forms and an attempt to crystallize PfMSP3.1.

[In Czech]

Key words

Protein expression, enzyme inhibition, protein crystallization, malaria, complement, C1 inhibitor

Obsah

1. Úvod	11
2. Literární přehled	12
2.1 Plasmodium falciparum.....	12
2.1.1 Malárie.....	12
2.1.2 Životní cyklus.....	12
2.1.3 Merozoitové povrchové proteiny	14
2.1.3.1 Merozoitový povrchový protein 3 (MSP3)	14
2.1.4 Reakce lidského imunitního systému na přítomnost <i>Plasmodia falciparum</i>	15
2.2 Systém komplementu	16
2.2.1 Aktivace alternativní cestou	17
2.2.2 Aktivace klasickou cestou	17
2.2.3 Aktivace lektinovou cestou	18
2.2.4 Tvorba MAC a proteolytická degradace membrány patogenu.....	18
2.2.5 Regulace systému komplementu	18
2.2.5.1 C1 inhibitor	19
2.3 Interakce C1 inhibitoru s PfMSP3.1.....	20
3. Cíle práce.....	21
4. Materiál a metody	22
4.1 Použité přístroje	22
4.2 Chemikálie a materiály	23
4.3 Metody	26
4.3.1 Klonování	26
4.3.2 Transfekce S2 hmyzích buněk.....	29
4.3.3 Exprese	30
4.3.4 Počítání buněk	31
4.3.5 C-tag purifikace.....	31
4.3.6 Zkoncentrování proteinu	32

4.3.7	Měření koncentrace	32
4.3.8	Gelová chromatografie	32
4.3.9	Ionexová chromatografie	33
4.3.10	Dialýza	33
4.3.11	SDS elektroforéza	34
4.3.12	Barvení SDS gelů	34
4.3.13	Krystalizace	34
4.3.14	Optimalizace krystalizace	35
4.3.15	Rentgenová krystalografie	35
5.	Výsledky	36
5.1.	Expres a purifikace proteinů	36
5.1.1	C1 inhibitor	36
5.1.2	Varianty PfMSP3.1	38
5.1.2.1	PfMSP3.1 s plnou délkou	39
5.1.2.2	Zkrácený PfMSP3.1 na C-konci	40
5.1.2.3	Zkrácený PfMSP3.1 na N-konci	41
5.1.2.4	Zkrácený PfMSP3.1 na C i N-konci	42
5.2.	Tvorba komplexů C1 inhibitoru s jednotlivými variantami PfMSP3.1	43
5.2.1	Komplex C1 inhibitoru a PfMSP3.1 s plnou délkou	47
5.2.2	Komplex C1 inhibitoru a PfMSP3.1 zkráceného na C-konci	48
5.2.3	Komplex C1 inhibitoru a PfMSP3.1 zkráceného na N-konci	48
5.2.4	Komplex C1 inhibitoru a PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci	49
5.3	Krystalizace	50
5.3.1	Krystalizace PfMSP3.1 s plnou délkou	50
5.3.2	Krystalizace PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci	51
5.4	Optimalizace krystalizace	51
5.5	Stanovení struktury proteinu PfMSP3.1 s plnou délkou rentgenovou krystalografií .	52
6	Diskuse	53
7	Závěr	57

Seznam literatury.....	58
Seznam příloh	63

Seznam použitých zkratek

C4BP	C4b-vázající protein (C4b-binding protein)
CD4+	povrchové proteiny diferenační skupiny 4 (CD z angl. Cluster of differentiation)
CD8+	povrchové proteiny diferenační skupiny 8 (CD z angl. Cluster of differentiation)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	Dithiotreitol
FBS	Fetální hovězí sérum (z angl. Fetal bovine serum)
LB	Médium Luria-Bertani
MAC	Membránolytický komplex (z angl. Membrane attack complex)
MALS	Měření pomocí víceúhlového rozptylu světla (z angl. Multiangle light scattering)
MAP	S MBL asociovaný protein (z angl. MBL-associated protein)
MASP	S MBL asociovaná serinová proteasa (z angl. MBL-associated serine proteases),
MBL	Manosu vázající lektin (z angl. Mannose-binding lectin)
MSP	Merozoitový povrchový protein (z angl. Merozoit surface protein)
MSPDBL	Merozoitový povrchový protein vázající se na Duffyho antigen (z angl. merozoit surface protein Duffy binding-like)
NK-buňky	Lymfocyty tzv. „přirození zabijáci“ (z angl. Natural killer)
NKT-buňky	T -lymfocyty s některými vlastnostmi NK -buněk
PBS	Fosfátový pufr NaCl 137 mmol/l, KCl 2,7 mmol/l, Na ₂ HPO ₄ 8mmol/l, KH ₂ PO ₄ 2 mmol/l (z angl. Phosphate buffered saline)

PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. P olymerase c hain r eaction)
PEG	P olyethylenglykol
RPM	Otáček za minutu (z angl. R evolutions p er m inute)
SDS	Dodecylsírán sodný (z angl. S odium d odecyl sulfate)
SEC	Gelová chromatografie (z angl. s ize e xclusion c hromatography)
Serpin	Inhibitor serinové proteasy (z angl. S erine p rotease i nhibitors)
sMAP	Malý protein asociovaný s MBL (z angl. s mall M BL- a ssoiated p rotein)
SOC	Optimalizované nutričně bohaté LB-médium (z angl. S uper o ptimal b roth with c atabolite repression)
Tris	T ris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Úvod

Onemocnění malárie způsobované parazity rodu *Plasmodium* zůstává i dnes stále velkým zdravotnickým problémem. *Plasmodium falciparum* má ze všech jeho druhů za následek vůbec největší procento úmrtí [1].

Nepohlavní forma parazita *Plasmodium falciparum* se tvoří poprvé v játrech ve formě schizontů – shluk několika merozoitů. Rozpadem schizontů vznikají jednotlivé merozoity, které jsou uvolňované do krve. V krevním stádiu parazité zahajují napadání červených krvinek, které je zprostředkované jejich povrchovými proteiny (merozoitové povrchové proteiny; MSP, z angl. merozoit surface protein). Ty tvoří na jeho povrchu složité komplexy mnoha funkcí, z nichž většina zůstává stále neobjasněna [2].

Merozoitový povrchový protein 3 (MSP3), který není na povrch merozoitu ukotven pomocí glykosylfosfatidylinositolu, ale váže se na merozoitový povrchový protein 1 (MSP1), je jedním z proteinů hrajících zásadní roli při prvotní interakci merozoitu s červenou krvinkou [3]. Další roli zastává v jednom z mechanismů úniků parazita před imunitním systémem hostitele [4].

Protože je parazit ve stádiu merozoitu přímo vystaven složkám imunitního systému hostitele, vyvinul si několik obranných mechanismů, díky kterým uniká jeho pozornosti. Jedním z nich je nábor regulátorů systému komplementu na jeho povrch. *Plasmodium falciparum* na svůj povrch váže C1 inhibitor prostřednictvím merozoitového povrchového proteinu (PfMSP) 3 [5], konkrétně jeho varianty PfMSP3.1 [6].

2. Literární přehled

2.1 Plasmodium falciparum

Plasmodium falciparum je jedním z pěti rodů intracelulárních parazitů *plasmodium*, způsobujících onemocnění malárie u lidí. Rod *Plasmodium falciparum* má vůbec nejvyšší úmrtnost ze všech. Dalšími rody způsobujícími toto onemocnění jsou *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* a *Plasmodium knowlesi* [7], [1], [8].

2.1.1 Malárie

I v dnešní době se malárie stále řadí mezi nejsmrtelnější choroby světa. Ročně se nemocí nakazí 300-500 milionů lidí a na její následky zemře kolem 600 tisíc lidí žijících hlavně v subsaharské Africe [1], [9], [10].

Mezi hlavní příznaky se řadí symptomy podobné chřipce – horečka, malátnost, bolesti hlavy a bolesti svalů. Dále se může objevit žloutenka nebo střevní obtíže. Tato podobnost vede často k nesprávné prvotní diagnóze, jejíž včasné provedení je klíčové k předejití fatálních následků nemoci [11], [12].

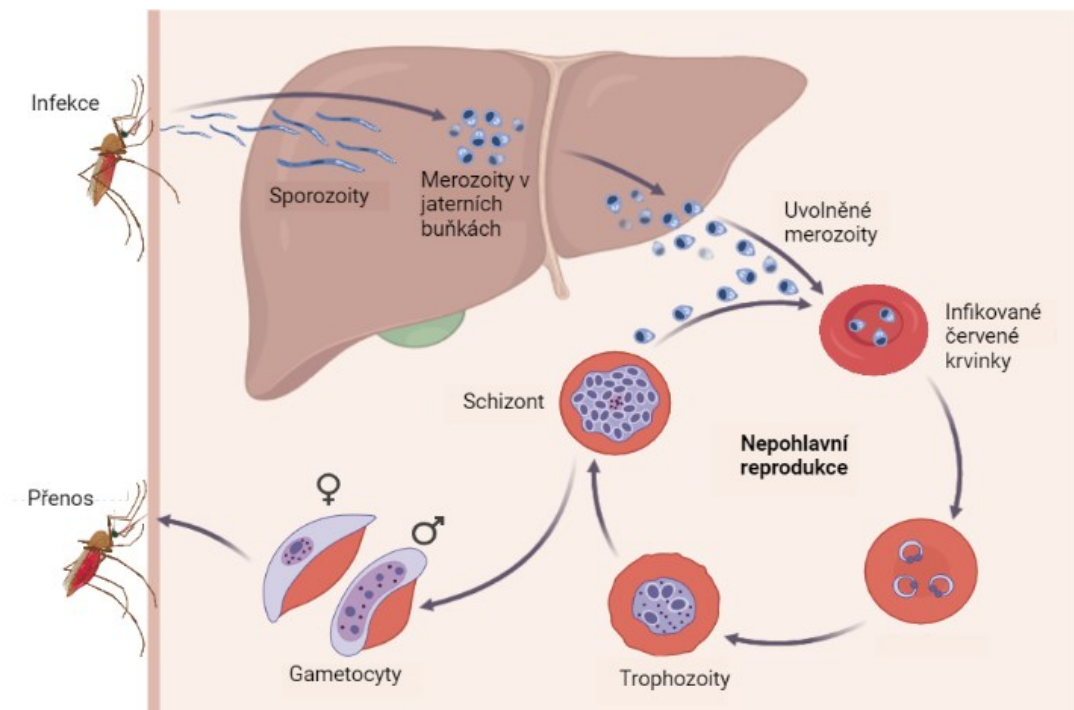
Zatím nejúčinnějšími látkami pro léčbu malárie jsou léky na bázi artemisininu (artemether-lumefantrin). Při infekci rodem *Plasmodium vivax* je doporučován chlorochin, avšak pouze v ohniskách nákazy, kde se nenachází rezistence vůči tomuto léku. Jako podpůrné léčivo se používá primaquin, aby nedocházelo ke znovu vzplanutí při infekci rody *Plasmodium vivax* a *Plasmodium ovale* [1].

Z důvodu neustále se zvyšující rezistence vůči lékům proti malárii a neúspěšnému hledání účinné vakcíny se výzkumy zaměřují na vývoj nových antimalarik. Tyto výzkumy se zabývají důležitostí apicoplastu pro přežití *Plasmodia*. Apicoplast je membránově vázaný plastid s vlastním kruhovým genomem, jehož přítomnost je nezbytná pro život parazita. V případě ztráty této organely nastává tzv. opožděná smrt parazita [7], [13].

2.1.2 Životní cyklus

Přenašečem *Plasmodia falciparum* jsou samičky komára rodu *Anopheles*. Lidský organismus je infikován *Plasmodiem* ve formě sporozoitů (konečné vývojové stádium parazita v přenašeči, které je zároveň infekční pro lidského hostitele), které přechází do těla během bodnutí. Místo bodnutí opouští zhruba jen 50 % všech sporozoitů. Ty jsou

dále krví přeneseny do jater, kde parazit putuje kolem jaterních sinusoid, prochází přes Kupfferovy buňky, a nakonec infikuje hepatocyty [9]. V hepatocytech se dělí na tisíce merozoitů. Merozoity jsou jako shluk ve formě schizontů uvolňovány zpět do krve, kde se rozpadají na jednotlivé merozoity a ty napadají červené krvinky, ve kterých dochází k jejich replikaci a iniciaci erytrocytárního stádia [9], [11], [14]. Při počáteční interakci merozoitů s červenými krvinkami hostitele jsou důležité merozoitové povrchové proteiny. Proteiny interagují s receptory na povrchu hostitelských buněk za účelem zahájení invaze [15]. (Obr. 1)



Obrázek 1 Životní cyklus *Plasmodia falciparum*. Vytvořeno pomocí biorender.com.

Po prostupu merozoitu do hostitelské buňky si kolem sebe parazit vytvoří vakuolu sloužící k jeho oddělení od cytoplazmy červené krvinky a vytvoří si tak ideální podmínky pro vlastní vývoj [10]. Během následujících 48 hodin dochází k dělení merozoitů na konečný počet 16-32 v jednom schizontu [16]. Schizonty jsou uvolněny ven z hostitelské buňky, rozpadají se na jednotlivé merozoity. Ty napadají další červené krvinky a celý proces se opakuje [15], [16].

Pro další přenos a rozmnožování se z některých schizontů stávají gametocyty za účelem sexuálního vývoje. Gametocyty zrají po dobu asi jedenácti dní v kostní dřeni. Zralé přecházejí do krevního oběhu odkud se dostávají do dalšího komára živícího se krví nakaženého [16].

2.1.3 Merozoitové povrchové proteiny

Merozoitové povrchové proteiny hrají zásadní roli v prvotní fázi propojení parazita a červené krvinky. Nejvíce zastoupený je glykosylfosfatidylinositolem vázaný merozoitový povrchový protein 1 (MSP1). Ten slouží jednak jako základ pro komplexy s dalšími vnějšími proteiny, které se následně vážou na povrch červených krvinek, jednak se jeho fragmenty samy podílejí na vazbě k povrchu červených krvinek [15], [16], [2]. Mezi další povrchové proteiny interagující s MSP1 se řadí MSP3, MSP6, MSP7, MSPDBL1 (z angl merozoit surface protein duffy binding-like), MSPDBL2 [2].

Vzhledem k dobré přístupnosti těchto proteinů – na povrchu parazitů – a k interakci těchto proteinů s imunitním systémem hostitele se v posledních letech stávají čím dál častějšími cíli pro výzkum vakcín proti malárii [15], [2], [17]. Protilátky proti MSP v testech *in vivo* působí přímým blokováním vniknutí parazita do červené krvinky, zvýšením účinnosti fagocytózy vůči merozoitům, nebo indukci buněčné inhibice [2].

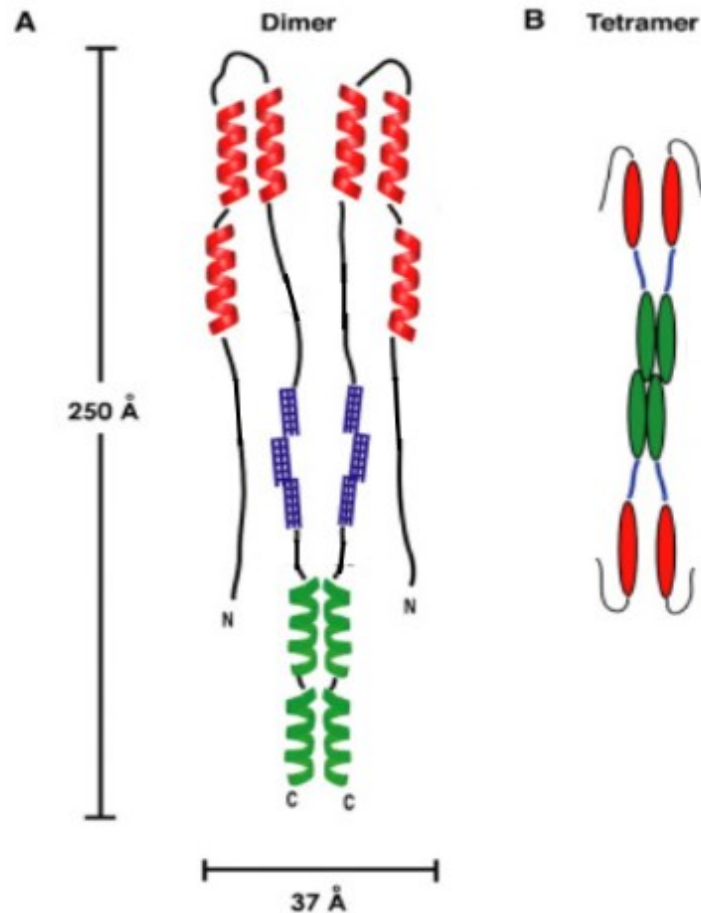
2.1.3.1 Merozoitový povrchový protein 3 (MSP3)

MSP3 je povrchový merozoitový protein parazita *Plasmodium falciparum*. Prvně je syntetizován ve stádiu schizontu (shluk více merozoitů) jakožto prekurzor s větší molekulovou hmotností. Po vniknutí merozoitu do hostitelské buňky a vytvoření vakuoly kolem parazita je zkrácen o N-koncovou část [18], [3], [19]. Přestože mechanismus stále není plně objasněn, MSP3 je zásadní jak při prvotní vazbě parazita na červenou krvinku, tak při jeho ochraně před toxicitou hemu. Zároveň je označován za cíl imunitní odpovědi hostitelského organismu [3].

Sekvence MSP3 se dá rozdělit na tři domény – první obsahující tři bloky sedmičlenných opakování se vzorcem Ala-X-X-Ala-X-X-X; druhou, která je bohatá na kyselinu glutamovou; a třetí, která je obdobou leucinového zipu [18], [3][11], [20]. N-koncová část proteinu je tedy polymorfní, a to hlavně díky nahrazením v sedmičlenných opakováních. Naopak C-koncová část je poměrně dobře konzervovaná [3]. Vzhledem k těmto polymorfismům se často mluví spíše o rodině proteinů MSP3, která se skládá z osmi členů označovaných jako PfMMSP3.1 až PfMSP3.8. Ty mají společnou právě výše zmíněnou konzervovanou sekvenci, ale liší se několika aminokyselinami v řetězci [6].

Prostorová struktura MSP3 dosud nebyla experimentálně vyřešena. Předpokládaná struktura proteinů je bohatá na α -šroubovice [18], [20]. Pomocí spekter cirkulárního

dichroismu byla změřena procentuální zastoupení sekundárních struktur. Výsledkem měření MSP3 s plnou délkou bylo 47 % zastoupení α -šroubovice, 6 % zastoupení β -listu a 31 % zastoupení náhodného klubka. Zároveň bylo zjištěno, že MSP3 tvoří dimery a dimery dimerů – tedy tetramery (Obr. 2) [20].



Obrázek 2 Předpovídaná struktura proteinu MSP3 s plnou délkou na základě výsledků z měření spekter cirkulárního dichroismu. Červeně – tři bloky sedmičlenného opakování struktury Ala-X-X-Ala-X-X-X, Modře – doména bohatá na kyselinu glutamovou, Zeleně – doména podobající se leucinovému zipu. Modrá oblast znázorňující druhou doménu neodpovídá měřítku a její sekundární struktury zatím nebyly objasněny. Převzato z [20], upraveno pomocí biorender.com.

MSP3 jsou v současné době zkoumány jako kandidáti na vakcínu proti malárii. Pokusy o imunizaci opic potvrdily, že při jejich vakcinaci rekombinantními formami MSP3 jsou zvířata chráněna před infekcí malárie [21]. Zároveň bylo zjištěno, že protilátky anti-MSP3 zpřechovávají buněčnou inhibici *Plasmodia* [22], [23].

2.1.4 Reakce lidského imunitního systému na přítomnost *Plasmodia falciparum*

Úspěšnost množení *Plasmodia falciparum* v lidském hostiteli spočívá hlavně v jeho schopnosti vyhýbat se imunitnímu systému hostitele. Nejkritičtější fází pro parazita je jeho krevní stádium, kdy je mu přímo vystaven. Pro tuto, ale i pro jaterní fázi si vyvinul

několik mechanismů, díky kterým uniká pozornosti buněk zajišťujících lidskou imunitu [4], [24]. V krevním stádiu pro svou ochranu přenáší vlastní povrchové proteiny na povrch červených krvinek [24], [25], a zároveň využívá variací antigenů a polymorfismů povrchových proteinů. V jaterním stádiu je pak schopný indukovat apoptózu Kupfferových buněk [4].

Přestože přirozená imunita v jaterní fázi není příliš účinná, existuje imunitní odpověď i na toto stádium parazita. Ta je zaměřena především na volné sporozoity a napadené hepatocyty [4]. Infikované hepatocyty jsou ničeny NK- či NKT-buňkami. Dále mohou být zabíjeny působením CD4+ a CD8+ T-buňkami [24], [4], [26].

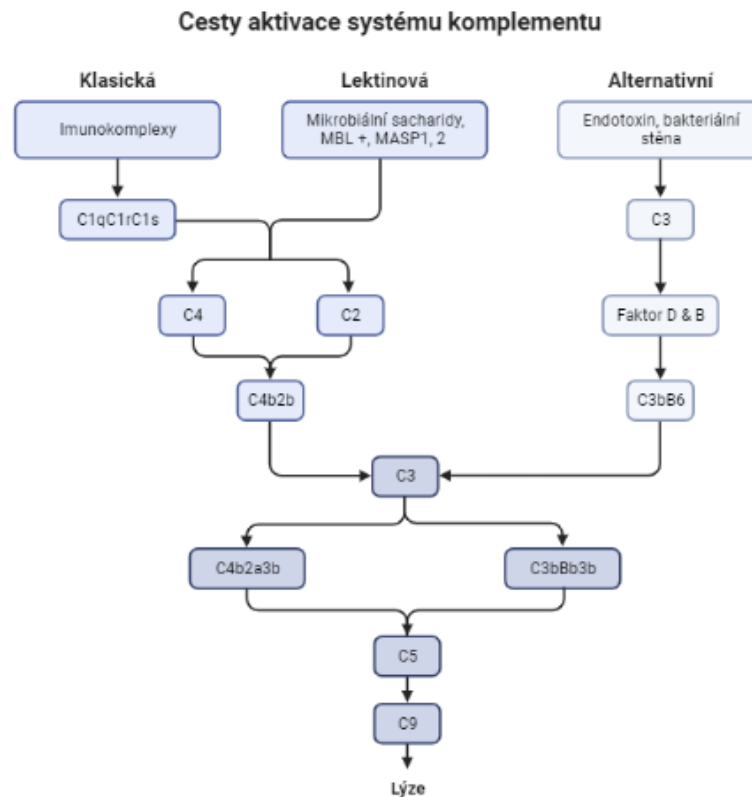
Cílem buněk imunitního systému jsou především volné merozoity a infikované červené krvinky. Jako první na infekci reagují dendritické buňky, které vychtají a zpracují antigeny. Ty pak prezentují na svém povrchu a aktivují buňky imunitního systému [25]. Dále zasahují protilátky, které napomáhají likvidaci červených krvinek skrze zesílení fagocytózy [24], blokují napojení napadených červených krvinek k endotelu, neutralizují toxiny produkované parazitem a také označují merozoity pro následnou lýzi systémem komplementu [4].

Komplement je hlavním obranným systémem vůči různým patogenům v krevním séru. Aby se parazit vyhnul aktivaci komplementu, váže na svůj povrch regulační proteiny. Mezi ty se řadí například faktor H a protein podobný faktoru H1, které regulují alternativní cestu aktivace komplementu a kladnou zpětnou vazbu. Po navázání je parazit schopen snižovat aktivitu alternativní dráhy komplementu a s ní následnou lýzi merozoitů [5]. Dalším je C1 inhibitor, negativní regulátor klasické a lektinové cesty aktivace komplementu. C1 inhibitor interaguje s merozoitem prostřednictvím jednoho z jeho povrchových proteinů rodiny 3 – PfMSP3.1 [5], [6].

2.2 Systém komplementu

Systém komplementu je souborem více než čtyřiceti bílkovin, receptorů a regulátorů tvořených hlavně v játrech a působících v plazmě, tkáních i buňkách. Jejich kaskádová aktivace vede k aktivaci imunitní odpovědi organismu [5], [27], [28] a jeho hlavní funkcí je rozpoznání patogenů, odumírajících buněk či chybně poskládaných molekul [29]. Systém komplementu je aktivován alternativní, klasickou nebo lektinovou cestou (Obr. 3), jejichž průběh je odlišný ale dojde vždy ke stejnému poslednímu kroku [27]. Plná aktivace nastává ihned po styku s patogenem a zahajuje boj organismu

s „nepřítelem“ skrze fagocytózu, zánět, opsonizaci a následnou aktivaci adaptivní imunity [27], [28], [30].



Obrázek 3 Schéma klasické, lektinové a alternativní cesty aktivace systému komplementu. Vytvořeno pomocí biorender.com.

2.2.1 Aktivace alternativní cestou

Alternativní cesta je v malé míře aktivní neustále. Malá část proteinu C3 je v plazmě samovolně hydrolyzována. Tato hydrolyza vede k velké konformační změně a odhalení vazebného místa pro faktor B. Hydrolyzovaný C3 s navázaným faktorem B je štěpen faktorem D za vzniku komplexu konvertasy C3(H₂O)Bb. Ta aktivuje systém komplementu rozštěpením C3 na bioaktivní fragmenty C3a a C3b. C3a je prozánětlivou molekulou, která aktivuje okolní buňky, zatímco C3b díky své nehydrolyzované thioesterové vazbě může vytvořit kovalentní vazbu s jakoukoliv hydroxylovou skupinou ve svém okolí – například na povrchu patogenu [27], [28], [30].

2.2.2 Aktivace klasickou cestou

Pro klasickou cestu je zásadní komplex C1. Ten se skládá z C1q, C1r a C1s [31]. Po rozpoznání cílové molekuly (imunokomplexy) proteinem C1q dochází k jeho konformační změně, která vede k aktivaci C1r a C1s. Tím dojde k vytvoření aktivovaného komplexu C1qr2s2, následnému štěpení C4 a C2 a vytvoření C3 konvertasy

pro klasickou cestu. C3 konvertasa je pak schopna rozštěpit hlavní složku komplementu C3 na její bioaktivní fragmenty C3a a C3b [27], [28], [30], [32].

2.2.3 Aktivace lektinovou cestou

Lektinová cesta je aktivována pomocí molekul rozpoznávajících hlavně sacharidové vzorce, které patří převážně do rodiny kolektorinů [33]. Nám nejznámějším je MBL (z angl. Mannose-binding lectin) s obdobnou strukturou jako má C1q [27]. MBL se spojuje s MASP (z angl. MBL-associated serine proteases), které jsou strukturně podobné C1r a C1s. MASP-2 je schopna štěpit C4 i C2 a vytvořit stejnou C3 konvertasu jako u klasické cesty. MASP-1 je schopna štěpit pouze C2, čímž ovšem napomáhá tvorbě konvertasy [30].

2.2.4 Tvorba MAC a proteolytická degradace membrány patogenu

Po štěpení C3 na fragmenty C3a a C3b výše zmíněnými cestami dochází k hromadění C3b. C3b se tak začne vázat na C3 konvertasu, čímž změni její substrátovou specifitu směrem k C5. Nově vzniklá konvertasa C5 ho štěpí na anafylotoxin C5a a fragment C5b. C5b se spojuje do komplexu s C6 a C7 a vkládá se do buněčných membrán. Nakonec naváže C8, čímž iniciuje navázání několika jednotek C9 [28], [30], [32]. Tento komplex C5b-9 je známý jako MAC (z angl. membrane attack complex), který vytvoří póry v cílové membráně patogenu [28].

2.2.5 Regulace systému komplementu

Pro ochranu těla vlastních zdravých buněk je aktivace systému komplementu řízena pomocí několika regulačních proteinů. U alternativní cesty aktivace jsou nejvýznamnějšími regulátory faktor H a protein podobný faktoru H1. Tyto dva faktory společně inaktivují C3b a inhibují C3 konvertasu alternativní cesty [27], [30], [34], [35], [36]. Podobné účinky na C3 konvertasy klasické a lektinové cesty aktivace má C4BP (z angl. C4b-binding protein) [30].

Klasická a lektinová cesta aktivace je řízena serpinem (z angl. serine protease inhibitor), inhibitorem C1. Ten u klasické cesty váže a inaktivuje fragmenty C1r a C1s, u lektinové cesty inhibuje MASP-1 a MASP-2 [27], [30], [35], [36].

Mimo C1 inhibitor je lektinová cesta aktivace ovlivněna též proteiny sMAP (z angl. small MBL-associated protein) a MAP-1 (z angl. MBL-associated protein), které soutěží s proteiny MASP-1 a MASP-2 o vytvoření vazby s MBL a fikoliny [30]. Tyto proteiny

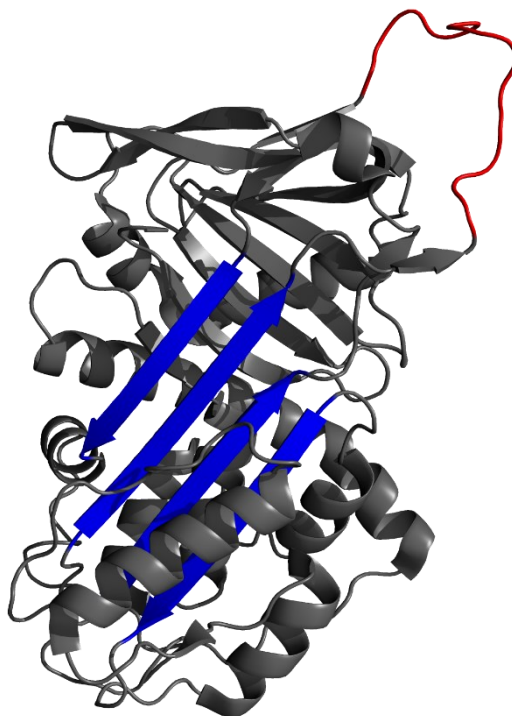
však neumí štěpit C2 a C4, čímž znemožní nadcházející aktivaci kaskády lektinové cesty [27].

Ve společné konečné fázi všech cest je systém komplementu regulován především dvěma inhibitory – glykoproteiny vitronektinem a klusterinem [30], [35], [36]. Vitronektin interaguje s C5b-7 a C9 za vzniku SC5b-9, čímž inhibuje polymeraci C9. Klusterin zabraňuje vložení C5b-7 do buněčných membrán a váže se na C8 a C9 čímž také inhibuje polymeraci C9 při tvorbě MAC [35].

Systém komplementu má jediný pozitivní regulátor – plasmový glykoprotein properdin. Properdin slouží ke stabilizaci C3 konvertasy alternativní cesty aktivity a je tak částečným antagonistou faktoru H [27], [36].

2.2.5.1 C1 inhibitor

C1 inhibitor je protein z rodiny inhibitorů serinových proteas (serpinů) [37], [38], [39], [40], [41], [42] označovaný též jako SERPING1 [37]. Obsahuje dvě domény – N-koncovou doménu o 113 aminokyselinách podobající se mucinu [38] a C-koncovou serpinovou doménu (Obr. 4) obsahující 365 aminokyselin [38], [39], [42] – a ve svém řetězci má celkem 13 glykosylačních míst [38].



Obrázek 4 Terciární struktura aktivní formy serpinové domény C1 inhibitoru. Červeně – centrální reaktivní smyčka; modře – centrální β -list. Vytvořeno pomocí programu PYMOL, struktura vyhledána v PDB databázi (<https://www.rcsb.org>; PDB ID: 5DU3)

Serpiny vážou proteasy prostřednictvím své centrální reaktivní smyčky, která vyčnívá ze struktury serpinové domény. Po navázání proteasy dochází k počátečnímu štěpení centrální reaktivní smyčky a vzniku kovalentní vazby mezi aktivním místem proteasy a serpinem. Následným vložением centrální reaktivní smyčky do centrálního β -listu serpinové domény dojde k mimořádně dramatické konformační změně – přesunu proteasy na opačný pól serpinu a tím narušení aktivního místa proteasy [37], [41]. V případě poruch serpinového mechanismu dochází k úplnému rozštěpení centrální reaktivní smyčky proteasou následovaného uvolněním aktivní proteasy a nevratně rozštěpeného, deaktivovaného serpinu [37].

Funkcí C1 inhibitoru je inhibice serinových proteas systému komplementu, koagulačního, fibrinolytického a kontaktního systému. V kaskádách systému komplementu inhibuje proteasy C1r a C1s klasické cesty aktivace a proteasy MASP-1 a MASP-2 lektinové cesty aktivace. V rámci koagulačního systému inaktivuje faktor XIa a trombin, u fibrinolytického systému plasmin a aktivátor tkáňového plasminogenu, a faktor XIIa a kalikrein v rámci kontaktního systému [38], [39], [40], [41], [42].

2.3 Interakce C1 inhibitoru s PfMSP3.1

Vazba regulátorů systému komplementu na povrch patogenu je jednou ze strategií blokování jeho aktivace. Mezi regulátory, které patogeny často rekrutují, se řadí faktor H, protein podobný faktoru H1, C4b nebo C1 inhibitor [6], [43].

Merozoity vážou C1 inhibitor výhradně přes merozoitový povrchový protein z rodiny 3 (proteiny PfMSP3.1-PfMSP3.8) – PfMSP3.1. V případě merozoitů, které nebyly schopny exprese proteinu PfMSP3.1, k vazbě C1 inhibitoru na jejich povrch nedocházelo. C1 inhibitor interaguje skrze svou serpinovou doménu. Tato interakce není nijak ovlivněna jeho glykosylacemi a zároveň při ní C1 inhibitor neztrácí svou schopnost vázat proteasy [6].

3. Cíle práce

- 1) Produkce rekombinantních proteinů
 - a) Klonování plasmidů s genem pro C1 inhibitor komplementu a jednotlivé varianty povrchového proteinu PfMSP3.1 z *Plasmodia falciparum*.
 - b) Transfekce hmyzích S2 buněk připravenými plasmidy.
 - c) Exprese a purifikace rekombinantního C1 inhibitoru a jednotlivých variant povrchového proteinu PfMSP3.1 (s plnou délkou, zkráceného na C, N nebo C i N-konci).
- 2) Analýza vazby variant povrchového proteinu PfMSP3.1 s C1 inhibitorem
 - a) Analýza tvorby komplexů C1 inhibitoru s jednotlivými variantami PfMSP3.1.
 - b) Krystalizace proteinů PfMSP3.1 a jejich komplexů s C1 inhibitorem.

4. Materiál a metody

4.1 Použité přístroje

ÄKTA pure systémy

ÄKTA start, General Electric Healthcare Systems, USA

ÄKTA pure, General Electric Healthcare Systems, USA

Aparatura na elektroforézu

PowerPac Basic, BIO-RAD, USA

Mini-PROTEAN, BIO-RAD, USA

Autovyhřívání vodní lázeň

JBA5, Grant Instruments, UK

Centrifugy

Sorvall evolution RC, rotor F8S-6x1000y, Thermo Fisher Scientific, USA

5424R, Eppendorf, Německo

5810R, Eppendorf, Německo

Mikrocentrifuga Boeco M-6, Boeckel GmbH, Německo

Inkubátory

Innova44 incubator shaker, Eppendorf, Německo

Multitron Standart, INFORS HT, UK

Magnetická míchačka

Hotplate Stirrers, VWR, ČR

Mikroskopy

Eclipse TS100, Nikon, Japonsko

SZX10, objektiv DF PLAPO 1X, Olympus, Japonsko

Mrazáky

20_GNP, Liebherr, Německo

MDF-594 ULT Chest freezer, PHCbi, Japonsko

Nanodrop

NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, USA

pH metr

pHenomenal, VWR, ČR

Příprava krystalizačních destiček

Mosquito Crystal, TTP Labtech, UK

Dragonfly Discovery, SPT Labtech, UK

Rentgenová krystalografie

MicroMaxTM-007 HF Microfocus, Rigaku, Japonsko

Termocyklér

VeritiTM 96-Well Fast Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific, USA

Třepačka

Třepačka GFL, VERKON, ČR

Vortex

Analog Vortex Mixer, VWR, ČR

4.2 Chemikálie a materiály

Biological industries, USA

Pen strep (10,000 U/ml penicillin, 10 mg/ml streptomycin)

Carl Roth, Německo

dodecylsírán sodný (SDS), dithiothreitol (DTT), bromphenolová modř, Coomassie R-250 Brilliant blue, polyethylenglykol (PEG 4000)

Cytiva, USA

kolony – Superdex 200 10/300 GL, Superdex 75 increase 10/300 GL, MonoQ 5/50 GL

Eppendorf, Německo

automatické pipety

Expres2ion Biotechnologies, Dánsko

vektor pExpress2.1, transfekční činidlo Expres² TR

Generi Biotech, Hradec Králové, ČR

Primery pro zkrácené varianty PfMSP3.1

GENEWIZ, Německo

Geny kódující C1 inhibitor a PfMSP3.1 s plnou délkou

Greiner bio.one, Německo

50ml zkumavky

Lach-Ner, Neratovice, ČR

36% kyselina chlorovodíková, glycerol, 99,8% kyselina octová, glycin, dimethylsulfoxid (DMSO)

Life technologies, USA

Zeocin

Molecular dimensions, UK

krystalizační kity – JCSG-plusTM, PACT premierTM, The BCS Screen, Stura Footprints Screens, ProPlexTM, MIDASplusTM, Morpheus
96 jamkové krystalizační destičky SWISSCI

New England Biolabs, USA

Gibson Assembly Master Mix (2x), Phusion Master Mix (2x)

PENTA, Chrudim, ČR:

tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Tris), chlorid sodný, ethanol, chlorid hořečnatý, citronan sodný

P-LAB, Praha, ČR

mikrozkumavky – 0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml; klipsy pro dialyzační membrány

Qiagen, Německo

QIAprep Spin Miniprep Kit

Sartorius, UK

centrifugační koncentrátor (MWCO 10 kDa)

Shodex, Japonsko

kolona shodex KW404-4F

Sigma-Aldrich, USA

EX-CELL® 420 Serum-Free Medium for Insect Cells, Trypan blue

Hemocytometer cell counting

Thermo Fisher Scientific, USA

fetální hovězí sérum (FBS), PageRuler™ Unstained Protein Ladder, S.O.C. Medium,

PureLink® Quick Gel Extraction Kit, CaptureSelect™ C-tagXL Affinity Matrix

SnakeSkin™ (MWCO 10 kDa)

ÚOCHB, Praha, ČR

sterilní voda, MiliQ voda

12,5% polyakrylamidový gel, LB-agarové plotny, tekutý dusík, Erlenmeyerovy baňky

(25-2000 ml), plastové odměrky (250-5000 ml), C-tag kolona

Pufry a roztoky

Vazebný pufr C-tag

Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l, pH 7,5

Eluční pufr C-tag

Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l, MgCl₂ 2 mol/l, pH 7,5

Gelová chromatografie

Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l, pH 7,5

Ionexová chromatografie A, B

A: NaCl 30 mmol/l, Tris 20 mmol/l, pH 7,5

B: NaCl 1 mol/l, 20mM Tris 20 mmol/l, 7,5

SDS elektroforéza – vzorkový pufr

Tris 0,375 mol/l, SDS 12 %, glycerol 60 %, DTT 0,6 mol/l, bromphenolová modř

0,06 ;%

SDS elektroforéza – barvicí roztok

Coomasie R-250 Brilliant blue 0,1 %, ethanol 40 %, kyselina octová 10 %

SDS elektroforéza – odbarvovací roztok

ethanol 10 %, kyselina octová 7,5 %

Primery

Tabulka 1 Primery použité při polymerázové řetězové reakci pro amplifikaci nukleotidových fragmentů zkrácených variant PfMSP3.1.

Varianta	Kódující primer	Antikódující primer
PfMSP3.1 ΔC	AGAAGGAGGAGAATATGCT GCTGGAGGTGCTGTTCCAG	TTCTTCACGATCTCCTTGCT GAATTCGCCCAGACTCAGT
PfMSP3.1 ΔN	GCAAGTACTTCAAGAACCAC CTGGAGGTGCTGTTCCAGG	AACTCGCCGCCGCTGAAATC GAATTCGCCCAGACTCAGTC
PfMSP3.1 ΔNC	AGAAGGAGGAGAATATGCT GCTGGAGGTGCTGTTCCAG	AACTCGCCGCCGCTGAAATC GAATTCGCCCAGACTCAGTC

4.3 Metody

4.3.1 Klonování

Klonování plasmidů pro C1 inhibitor a PfMSP3.1 s plnou délkou po transformaci NEB 5-alpha kompetentních *E. coli* buněk včetně bylo provedeno s pomocí a dohledem Dr. Aruna Dhillona. Následné extrakce plasmidů a PCR reakce byly provedeny samotným Dr. Arunem Dhillonem.

Syntetické geny kódující C1 inhibitor a PfMSP3.1 s plnou délkou (Příloha 1) byly dodány firmou GENEWIZ. Geny obsahovaly třicet lemujících bází na obou koncích (5' i 3') komplementárních k 5' a 3' koncům použitého vektoru pExpress2.1 (Expres2ion Biotechnologies, Dánsko), který kóduje C-tag a jeho součástí je gen pro rezistenci vůči ampicilinu. Syntetické geny a vektor byly smíchány spolu s Gibson Assembly Master Mix (2x) (New England Biolabs, USA) v poměrech uvedených v Tabulce 2 a Tabulce 3.

Tabulka 2 Objemy jednotlivých komponent pro klonování plasmidu obsahujícího gen pro C1 inhibitor.

Komponenta	Objem	Finální množství v reakci
Gibson Assembly Master Mix (2x)	5 μ l	1x
MiliQ voda	1,22 μ l	-
Syntetický gen (0,01 mg/ml)	3 μ l	30 ng
pExpress2.1 vektor (0,06 mg/ml)	0,78 μ l	50 ng

Tabulka 3 Objemy jednotlivých komponent pro klonování plasmidu obsahujícího gen pro PfMSP3.1 s plnou délkou.

Komponenta	Objem	Finální množství v reakci
Gibson Assembly Master Mix (2x)	5 μ l	1x
MiliQ voda	1,52 μ l	-
Syntetický gen (0,01 mg/ml)	2,7 μ l	27 ng
pExpress2.1 vektor (0,06 mg/ml)	0,78 μ l	50 ng

Připravené vzorky byly inkubovány při 50 °C v termocykleru Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA) po dobu 15 minut pro vznik 2-3 fragmentů, nebo po dobu 60 minut pro vznik 4-6 fragmentů. 50 μ l NEB 5-alpha kompetentních *E. coli* buněk bylo transformováno 2 μ l výše uvedené reakce. Směs byla opatrně promíchána opakovaným nasáváním do pipety a nechána 30 minut na ledu. Po 30 minutách byl proveden teplotní šok ve 42 °C po dobu 30 sekund a směs byla vrácena zpět na led na další 2 minuty. Bylo přidáno 950 μ l SOC média (thermo Fisher Scientific, USA), směs byla inkubována v 37 °C po dobu jedné hodiny za stálého míchání rychlostí 180 RPM. Směs byla zcentrifugována při 10000x g po dobu jedné minuty a byla odstraněna většina supernatantu – necháno přibližně 100 μ l. Peleta buněk byla resuspendována ve zbylých 100 μ l supernatantu a tento konečný roztok byl nanesen na LB-agarové plotny s přidáním Zeocinem (1500 μ g/ml) a rozprostřen pomocí skleněných kuliček.

Následující den byly pozorovány kolonie na LB-agarové plotně s přidáním Zeocinem (1500 μ g/ml). Pro každý protein (C1 inhibitor a PfMSP3.1 s plnou délkou) byly vzaty dvě kolonie a naočkovány v 10 ml LB média s přidáním Zeocinem

(1500 µg/ml) pro extrakci plasmidu. Extrakce plasmidů byla provedena za použití kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo) a následného vysrážení ethanolem [44].

Extrahované plasmidy byly poslány na Sangerovo sekvenování do firmy SEQme pro identifikaci pozitivních klonů. Po identifikaci pozitivních klonů byly naočkovány nové kultury v 15 ml LB-média. Extrakce plasmidů byla opět provedena za použití kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo) a následného vysrážení ethanolem [44]

Nukleotidové fragmenty zkrácených variant PfmSP3.1 byly amplifikovány pomocí plasmidu obsahujícího kódující sekvenci PfmSP3.1 s plnou délkou, který byl připraven podle výše zmíněného postupu, jako templátu metodou PCR. Množství jednotlivých komponent ve směsi pro amplifikaci variant PfmSP3.1 zkráceného na C-konci, PfmSP3.1 zkráceného na N-konci a PfmSP3.1 zkráceného na C i N-konci je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4 Objemy jednotlivých komponent pro PCR reakce.

Komponenta	Objem
Phusion Master Mix (2x)	25 µl
Kódující primer (10 µM)	2,5 µl
Antikódující primer (10 µM)	2,5 µl
MiliQ voda	19,25 µl
Templát (0,1 mg/ml)	0,5 µl

Byly provedeny PCR reakce v termocykleru Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, USA). Nejprve byl vzorek po dobu 10 sekund v 98 °C. Následovalo třicet cyklů – 5 sekund 98 °C; 10-30 sekund 68 °C; 60 sekund 72 °C. Celý průběh byl ukončen 1 minutou při 72 °C. Byla provedena agarosová elektroforéza v 0,8% (w/v) agarosovém gelu a produkty byly extrahovány za použití komerčního PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, USA).

Tyto extrahované geny pro zkrácené varianty PfmSP3.1 a vektor byly smíchány spolu s Gibson Assembly Master Mix (2x) (New England Biolabs, USA) v poměru uvedeném v Tabulce 5.

Tabulka 5 Objemy jednotlivých komponent pro klonování plasmidů obsahujících geny pro zkrácené varianty PfMSP3.1.

Komponenta	Objem	Finální množství v reakci
Gibson Assembly Master Mix (2x)	5 μ l	1x
MiliQ voda	1,52 μ l	-
Extrahovaný gen (0,01 mg/ml)	1 μ l	10 ng
pExpress2.1 vektor (0,01 mg/ml)	2,5 μ l	25 ng

Dále se pokračovalo dle stejného postupu jako u klonování plasmidů pro C1 inhibitor a PfMSP3.1 s plnou délkou (stejná kapitola odstavce 3-5). Po vysrážení plasmidů ethanolem byla provedena transfekce S2 hmyzích buněk vytvořenými plasmidy.

4.3.2 Transfekce S2 hmyzích buněk

Při transfekci dochází k zavádění cizorodé DNA do eukaryotické buňky. Základem pro postup byl protokol ExpreS2ion od Biotechnology. Všechny transfekce byly provedeny Dr. Arunem Dhillonem.

Rozmražené S2 buňky byly převedeny do 5 ml EX-CELL® 420 média (Sigma-Aldrich, USA) s penicilinem, streptomycinem a 10% FBS o pokojové teplotě. V tomto médiu, které bylo vyměňováno každých 3-5 dní, byly na shakeru s konstantní teplotou 26 °C po dobu tří týdnů kvůli zotavení. Den před transfekcí bylo médium vyměněno za čerstvé.

V den transfekce byly buňky spočítány a zcentrifugovány při 1500 RPM po dobu 3 minut v 25 °C. Supernatant byl slit a buňky byly opatrně resuspendovány v čerstvém médiu na 2 miliony buněk v 1 ml. Roztok byl rozdělen do 15ml zkumavek po 5 ml. K 5 ml bylo přidáno 50 μ l transfekčního činidla ExpreS² TR (5x) (ExpreS2ion Biotechnologies, Dánsko) a směs byla opatrně promíchána. Do zkumavky bylo přidáno 12,5 μ g plasmidu a směs byla opět promíchána. Roztok byl přenesen do T25 baňky a umístěn do inkubátoru na 2 hodiny při 26 °C (bez třepání). Následně bylo přidáno 0,75 ml 100% FBS a baňka byla vrácena do inkubátoru, kde za stejných podmínek zůstala přes noc.

Druhý den (24 hodin po transfekci) byl přidán Zeocin, jehož výsledná koncentrace v roztoku byla 1500 µg/ml. V tomto médiu obsahujícím 10% FBS a 1500 µg/ml Zeocinu byly buňky ponechány následující 3 týdny, přičemž každých 3-5 dní byly vyměněny 2 ml média za nové. Kondice buněk byla průběžně kontrolována pomocí mikroskopu.

Po třech týdnech byla kultura rozdělena na dvě poloviny. Obě byly stočeny na centrifuze a supernatant byl vyměněn za čerstvé médium. První peleta byla resuspendována v EX-CELL® 420 médiu (Sigma-Aldrich, USA) s penicilinem, streptomycinem bez FBS do výsledného počtu buněk 8 milionů v 1ml. Dále bylo pokračováno dle protokolu exprese (4.3.3) od čtvrtého odstavce.

Druhá peleta byla resuspendována v EX-CELL® 420 médiu (Sigma-Aldrich, USA) s penicilinem, streptomycinem a 10% FBS do výsledného počtu buněk 5 milionů v 1 ml. Tato směs byla vložena na shaker s konstantní teplotou 26 °C a ponechána zde několik dní pro další růst buněk. Poté byly buňky spočítány, zcentrifugovány a supernatant byl slit. Peleta byla resuspendována v médiu pro zmrazení [40% EX-CELL® 420 médium (Sigma-Aldrich, USA) s penicilinem a streptomycinem, 50% FBS, 10% DMSO] do výsledného počtu buněk 250 milionů v 1 ml. Roztok byl rozdělen do 1ml zkumavek, zmrazen a uchován při teplotě -80 °C.

4.3.3 Expresse

Při přípravě roztoku pro expresi je velmi důležitá sterilita pracovní plochy. Proto byly všechny úkony s otevřenými nádobami prováděny v digestoři a všechny používané pomůcky byly před umístěním do digestoře důkladně dezinfikovány 70% ethanolem. Základem pro postup při expresi byl protokol ExpreS2ion od Biotechnology. Všechny exprese, kromě čtvrté exprese varianty PfMSP3.1 s plnou délkou (5.1.2.1), byly provedeny Dr. Arunem Dhillonem.

Do sterilní Erlenmeyerovy baňky bylo pipetováno 15 ml EX-CELL® 420 média (Sigma-Aldrich, USA) s penicilinem, streptomycinem a 10% FBS o pokojové teplotě a přidán 1 ml roztoku buněk. Baňka byla uzavřena zátkou a vložena na shaker s konstantní teplotou 26 °C a rychlostí otáček 110 rpm, kde byla ponechána dalších 5 dní.

Po 5 dnech byly spočítány buňky v roztoku (4.3.4). Roztok byl zcentrifugován po dobu 3 minut rychlostí 1000 rpm, supernatant byl slit a buňky byly resuspendovány v čerstvém médiu (penicilin, streptomycin, 10% FBS) o takovém objemu, aby byl

výsledný počet buněk 8 milionů v 1 ml. Roztok byl převeden do sterilní Erlenmeyerovy baňky a zazátkovaný vložen zpět na shaker (26 °C, 110 rpm) na další 4 dny.

Po každých dalších 4 dnech byl postup počítání, centrifugace, resuspendace, tentokrát v médiu bez FBS, a zpětného vložení na shaker opakován, dokud nebylo dosaženo požadovaného celkového objemu supernatantu.

Po poslední resuspendaci v závěrečném objemu média byl roztok naposledy umístěn na shaker na dobu 4 dnů. Poté byl roztok převeden do plastové kyvety a zcentrifugován po dobu 10 minut při 5000 rpm a 4 °C. Supernatant byl slit, dialyzován (4.3.10) a následně byl purifikován daný protein (4.3.5).

4.3.4 Počítání buněk

Buňky byly počítány pomocí destičky Hemacytometer cell counting (Sigma-Aldrich, USA). V mikrozkušavce bylo smícháno 25 µl barvícího roztoku, 20 µl destilované vody a 5 µl roztoku buněk s médiem. Destička byla překryta tenkým sklíčkem a umístěna pod mikroskop. Pomocí počítadla byl spočítán počet buněk ve všech políčkách (4x16 políček). Celkový počet byl vydělen čtyřmi a následně byl spočítán výsledný počet buněk v jednom mililitru.

4.3.5 C-tag purifikace

Pro purifikaci všech pěti proteinů ze supernatantu byla použita metoda C-tag purifikace [45]. Při této metodě se na C-konci proteinu nachází specifická značka o čtyřech aminokyselinách: Glu – Pro – Glu – Ala, díky které získává vysokou afinitu a selektivitu při průchodu C-tag kolonou [afinitní kolona obsahující rekombinantní nanoprotlátku proti tomuto peptidu, 6ml kolona naplněna na ÚOCHB CaptureSelect™ C-tagXL Affinity Matrix (Thermo Fisher Scientific, USA)].

K přístroji ÄKTA start (General Electric Healthcare Systems, USA) s připojeným sběračem frakcí Frac30 byla připojena C-tag kolona o objemu 6 ml (maximální průtok 3 ml/min). Přístroj s kolonou byly nejprve promyty asi 30 ml MiliQ vody. Poté byly hadičky pro přívod pufřů promyty elučním pufrem (složení 4.2 pufry a roztoky) – hadička B, mimo kolonu, 20 ml; a vazebným pufrem (složení 4.2 pufry a roztoky) – hadička A, nejprve 20 ml mimo kolonu, poté skrz kolonu do ustálení hodnoty absorbance. Nakonec byla hadička pro přívod vzorku promyta 15 ml MiliQ vody a následně 15 ml vazebného pufřu, obojí mimo kolonu.

Supernatant byl nanesen na kolonu, přičemž jeho celkový objem se při jednotlivých purifikacích lišil. Proteklý supernatant byl jímán pro kontrolu míry dokonalosti purifikace. Kolona byla promývána vazebným pufrům do poklesu hodnoty absorbance na hodnotu zhruba 5 mAU. Následně byl protein vymyt elučním pufrům (asi 20 ml) a jímán do jednotlivých frakcí, které se dále zpracovaly.

Přístroj s kolonou byly promyty asi 40 ml MiliQ vody a následně asi 40 ml 20% ethanolu. Kolona byla odpojena a uchována ve 4 °C.

Frakce s proteinem byly dialyzovány (4.3.10), zkoncentrovány (4.3.6) na hodnotu 1-5 mg/ml v závislosti na vyprodukovaném množství a v případě pozdějšího použití zmrazeny pomocí tekutého dusíku a uchovány v mrazáku při -80 °C.

4.3.6 Zkoncentrování proteinu

Do centrifugačního koncentrátoru (MWCO 10 kDa; Sartorius, UK) byl napipetován roztok proteinu. Následně byl zcentrifugován v předem vychlazené centrifuze o teplotě 4 °C do požadované konečné koncentrace proteinu, která byla průběžně měřena (4.3.7).

4.3.7 Měření koncentrace

Koncentrace proteinů byla měřena pomocí přístroje Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA) přes absorbanci při 280 nm. Jako blank byl použit vazebný pufr pro C-tag purifikaci (složení 4.2 pufrů a roztoky).

Bylo naneseo asi 1,8 µl vazebného pufru a změřen blank. Následně byl nanesen vzorek a změřena jeho absorbance při 280 nm. Koncentrace byla vypočítána jako absorbance vydělena hodnotou Abs 0,1% (= 1 g/l) získanou z ProtParam expasy tool (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Švýcarsko; <https://web.expasy.org/protparam/>). Tato hodnota je individuální pro každý protein.

4.3.8 Gelová chromatografie

Gelová chromatografie (dále jen SEC, z angl. Size exclusion chromatography) je jednou ze separačních metod sloužících pro oddělení jednotlivých proteinů v roztoku. Pomocí SEC je možné oddělit od sebe proteiny na základě jejich velikosti, přičemž větší proteiny putují okolo gelu v chromatografické koloně rychleji a vycházejí tak jako první, naopak menší proteiny se zdržují v pórech gelu a vycházejí později.

Pro SEC byl použit přístroj ÄKTA pure (General Electric Healthcare Systems, USA) se sběračem frakcí F9-C fraction collector a kolonami Superdex 200 10/300 GL a Superdex 75 increase 10/300 GL. Jako mobilní fáze byl použit vazebný pufr C-tag (složení 4.2 pufry a roztoky).

Přístroj byl propláchnut MiliQ vodou, pufrem a ekvilibrován, včetně kolony, pomocí předem vytvořeného programu. Smyčka byla promyta MiliQ vodou, pufrem a následně byl proveden nástřik roztoku proteinu. Byla provedena SEC zapnutím předem vytvořeného programu specifického pro vybranou kolonu. Jednotlivé frakce byly sbírány pomocí připojeného sběrače frakcí a dále zpracovávány, případně zamrazeny pomocí tekutého dusíku a uskladněny v mrazícím boxu při -80 °C.

4.3.9 Ionexová chromatografie

V ionexové chromatografii dochází k rozdělení proteinů na základě jejich různého náboje. Proteiny jsou následně vytěšňovány zvyšováním koncentrace soli v pufru.

Přístroj ÄKTA pure (General Electric Healthcare Systems, USA) se sběračem frakcí F9-C fraction collector a s připojenou kolonou MonoQ 5/50 GL (Cytiva, USA) byly ekvilibrovány za použití pufru A pro ionexovou chromatografii (složení 4.2 pufry a roztoky). Smyčka byla promyta MiliQ vodou, pufrem A, a poté byl proveden nástřik roztoku proteinu. Byl spuštěn předem vytvořený program, během kterého se lineárně měnil poměr zastoupení pufru A a pufru B pro ionexovou chromatografii (složení 4.2 pufry a roztoky) z procentuálního zastoupení 100:0 na 0:100 v průběhu 20 ml (změna 5 % na 1 ml). Jednotlivé frakce byly sbírány pomocí připojeného sběrače frakcí F9-C fraction collector. Po dokončení byly frakce obsahující protein pro kontrolu nanoseny na SDS gel (4.3.11), a následně dále zpracovány nebo zamrazeny pomocí tekutého dusíku a uchovány v mrazícím boxu při -80 °C.

4.3.10 Dialýza

Dialýza byla vždy prováděna v dialyzační membráně SnakeSkin™ (Thermo Fisher Scientific, USA) s velikostí pórů 10000 MWCO. Jako dialyzační pufr byl použit vazebný pufr pro C-tag (složení 4.2 pufry a roztoky), pokud není uvedeno jinak.

Dialyzační membrána byla nejprve namočena v dialyzačním pufru a uzavřena z jedné strany klipsem pro dialyzační membrány. Byla naplněna roztokem proteinu, uzavřena klipsem z druhé strany a vložena do plastové odměrky s potřebným množstvím

dialyzačního pufru. Do odměrky bylo vloženo magnetické míchadlo a byla odnesena na magnetickou míchačku do chladicí místnosti o 4 °C, kde byla nechána přes noc. Magnetická míchačka byla po celou dobu dialýzy zapnuta na 50 rpm.

4.3.11 SDS elektroforéza

SDS elektroforéza je metoda rozdělující proteiny v polyakrylamidovém gelu dle jejich molekulové hmotnosti. Záporně nabitě denaturované proteiny se díky elektrickému proudu pohybují směrem k anodě. Rychlost pohybu je závislá právě na molekulové hmotnosti a velikosti proteinu.

Do mikroskopavek bylo odebráno vždy 20 µl vzorku z jednotlivých frakcí po přečišťujících metodách. Ke každému vzorku byly přidány 4 µl vzorkového redukujícího pufru (6x koncentrovaný; složení 4.2 pufru a roztoky). Vzorky byly vařeny při 100 °C po dobu pěti minut a následně zcentrifugovány na stolní centrifuze.

Do jamek předpřipraveného 12,5% polyakrylamidového gelu bylo postupně nanášeno 5 µl markeru a po 12 µl z předpřipravených vzorků. Aparatura Mini-PROTEAN (BIO-RAD, USA) byla připojena ke zdroji napětí PowerPac Basic (BIO-RAD, USA). Elektroforéza probíhala po dobu 45 minut za konstantního napětí 230 V.

4.3.12 Barvení SDS gelů

12,5% polyakrylamidový gel byl po skončení elektroforézy vložen do skleněné misky a obarven v barvicím roztoku (složení 4.2 pufru a roztoky). Po dostatečném obarvení byl odbarven v odbarvovacím roztoku (složení 4.2 pufru a roztoky). Během obou procesů byla miska s gelem nechána na třepačce. Pro uchování výsledků byly gely vyfoceny.

4.3.13 Krystalizace

Krystalizace je snaha o vytvoření monokrystalů dané makromolekuly, v tomto případě proteinu, pomocí různých podmínek krystalizace (různé koncentrace komponent, různé pH). Aby mohl krystal vzniknout, je potřeba dostat systém do stavu přesycení a snížené rozpustnosti. Celý proces se pak skládá ze tří fází – nukleace, růstu krystalů a ukončení růstu krystalů.

Pro krystalizaci byly použity 96 jamkové krystalizační destičky. Každá jamka se skládá z rezervoáru a tří/dvou dalších menších jamek. V každé z 96 jamek je tak možno navodit podmínky ve třech/dvou různých poměrech. Poloha proteinu u tohoto typu krystalizační destičky je poloha sedící kapky.

Nejprve byly do rezervoárů krystalizační destičky napipetovány jednotlivé komerční krystalizační kity (JCSG-plusTM, PACT premierTM, The BCS Screen, Stura Footprints Screens, ProPlexTM, MIDASplusTM, Morpheus; Molecular dimensions, UK) po 150 μ l. Pro následné napipetování správných, velmi malých, objemů proteinu a podmínek krystalizace byl použit automatický krystalizační robot Mosquito Crystal (TTP Labtech, UK). Do osmi jamkové mikrodestičky na kraji přístroje bylo napipetováno 5 μ l proteinu do každé jamky a poté robot napipetoval do každé z 96 jamek protein a precipitant ve třech/dvou různých poměrech. Destička byla přelepena průhlednou páskou pro zamezení odpařování, popsána, uchována v temperované krystalizační místnosti při pokojové teplotě a kontrolována pod mikroskopem každý druhý den.

4.3.14 Optimalizace krystalizace

Po vytvoření krystalu v konkrétní jamce byly podmínky krystalizace dále optimalizovány. Byly připraveny potřebné roztoky a následně pomocí automatického robota Dragonfly Discovery (SPT Labtech, UK) nachystána 96 jamková krystalizační destička, na které se měnilo pH a koncentrace některého z reaktantů.

4.3.15 Rentgenová krystalografie

Pomocí interakce krystalů s rentgenovým zářením lze vyřešit celkovou strukturu molekuly. Na základě získané struktury je pak možné objasnit některé vlastnosti či chování dané molekuly.

Rentgenová krystalografie byla prováděna na ÚOCHB pomocí přístroje MicroMaxTM-007 HF Microfocus (Rigaku, Japonsko) proškoleným pracovníkem.

5. Výsledky

5.1. Expres a purifikace proteinů

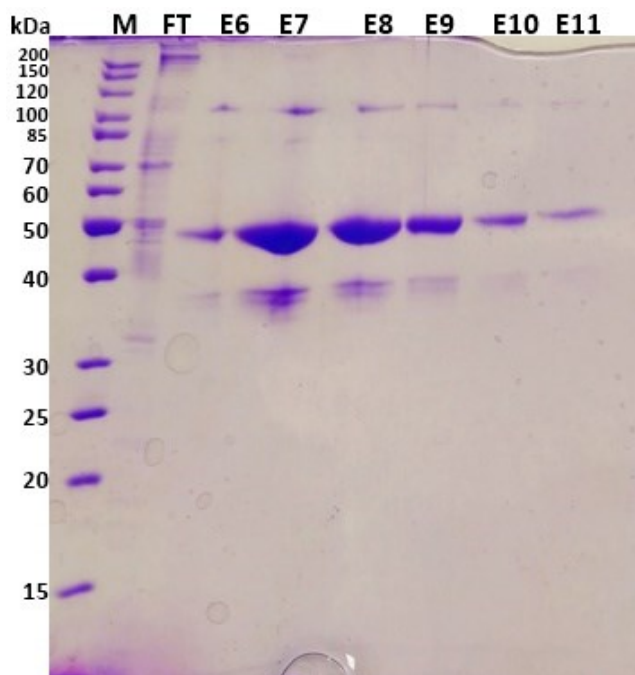
Proteiny C1 inhibitor, PfMSP3.1 s plnou délkou, PfMSP3.1 zkrácený na C-konci, PfMSP3.1 zkrácený na N-konci a PfMSP3.1 zkrácený na C i N-konci byly exprimovány v S2 hmyzích buňkách, kromě jedné exprese C1 inhibitoru v Expi cells (více viz 5.1.1). Po expresi byl supernatant dialyzován v minimálně desetinásobku objemu a následně získán protein metodou C-tag purifikace. Pro kontrolu čistoty, a po první purifikaci též pro zjištění přibližné molekulové hmotnosti, byla pro každý protein provedena SDS elektroforéza elučních frakcí obsahujících protein. Frakce s dostatečnou čistotou a koncentrací byly spojeny, dialyzovány kvůli odstranění chloridu hořečnatého, zkoncentrovány a zamrazeny.

5.1.1 C1 inhibitor

Plasmid byl připraven vložením syntetického genu pro C1 inhibitor do vektoru pExpress2 dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.1. Byla provedena transfekce S2 hmyzích buněk tímto plazmidem (4.3.2) a následně byl lidský C1 inhibitor v těchto buňkách exprimován (4.3.3). Protein byl purifikován metodou C-tag purifikace (4.3.5). C1 inhibitor byl produkován celkem dvakrát. Poprvé ve hmyzích S2 buňkách do výsledného objemu supernatantu 20 ml. Po C-tag purifikaci byla provedena SDS elektroforéza elučních frakcí 6-11 a supernatantu prošlého kolonou (dále jen FT, z angl. flow through) viz Obr. 5.

Ve všech drahách s nanesenými elučními frakcemi lze pozorovat přítomný C1 inhibitor zhruba na úrovni 50 kDa markeru. Naopak v dráze s nanesenou frakcí proteklou kolonou můžeme pozorovat pouze minimum zbytkového proteinu. Expres a purifikace tedy proběhly úspěšně. Frakce 6-11 byly smíchány, dialyzovány v jednom

litru vazebného pufru přes noc, zkoncentrovány na přibližně jeden ml o koncentraci 1,3 mg/ml a následně zmrazeny a uchovány v mrazícím boxu při -80 °C.

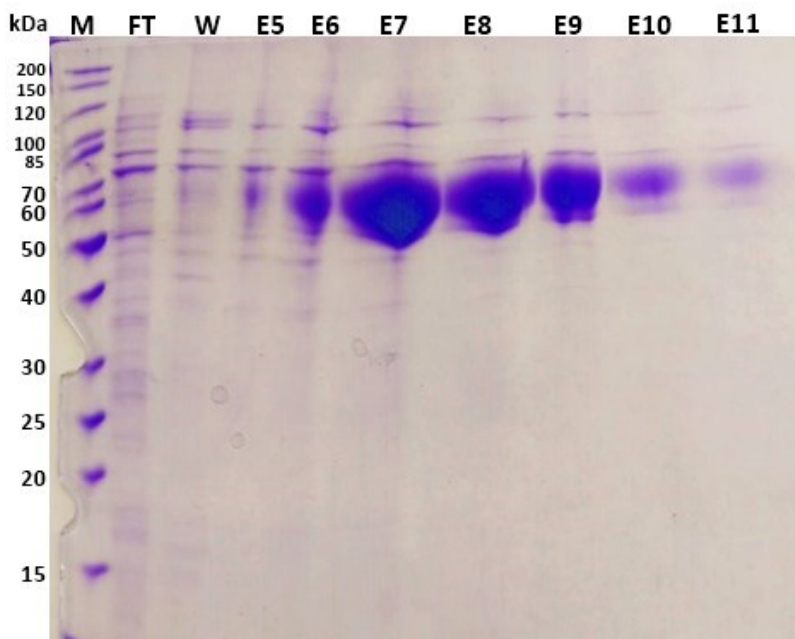


Obrázek 5 12,5% gel SDS elektroforézy C1 inhibitoru po první C-tag purifikaci. M – 5 μ l marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder, FT – 12 μ l průtoková frakce, E6-E11 – 12 μ l eluční frakce purifikace. Postup viz kapitoly 4.3.11 a 4.3.12.

Podruhé byl C1 inhibitor exprimován v lidských Expi Cells doktorem Arunem Dhillonem na ÚOCHB [46] do konečného objemu supernatantu 50 ml. Dále již bylo pokračováno běžným postupem. Po C-tag purifikaci byla provedena SDS elektroforéza elučních frakcí 5-11, FT a vzorku s neznámým složením, který se při promývání kolony vazebným puftrem na chromatografu zobrazil jako vrchol (Obr. 6).

V drahách s elučními frakcemi lze pozorovat C1 inhibitor s mírně horší čistotou, než tomu bylo u první purifikace (Obr. 5). Zároveň se nachází na úrovni standardu mezi 60 a 70 kDa, což je u zhruba o 15 kDa více než v předchozím případě. Ve FT ani ve vzorku s neznámým složením, který se při promývání kolony vazebným puftrem na chromatografu zobrazil jako vrchol, se C1 inhibitor nenacházel. Expres v Expi cells a následná purifikace proběhly úspěšně. Frakce 6-11 byly smíchány a dvakrát

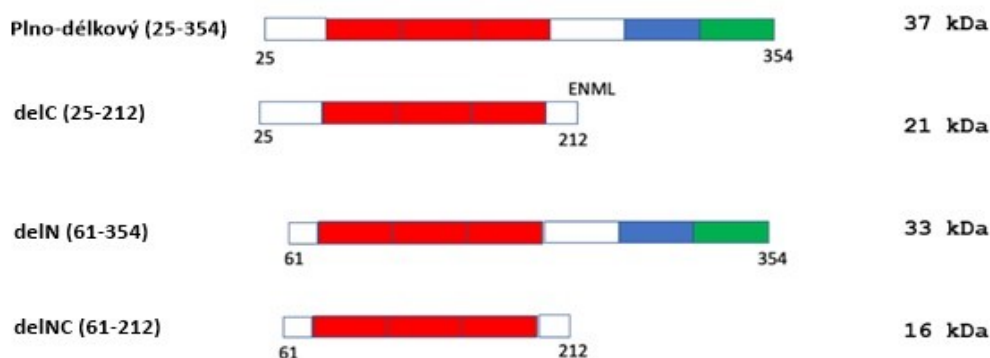
dialyzovány v jednom litru vazebného pufru. Byla změřena koncentrace (4.3.7), jejíž hodnota byla 0,6 mg/ml, protein byl zmrazen a uchován v mrazícím boxu při -80 °C.



Obrázek 6 12,5% gel SDS elektroforézy C1 inhibitoru exprimovaného v Expi cells po C-tag purifikaci. M – 5 μ l marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder, FT – 12 μ l průtoková frakce, W – 12 μ l vzorek neznámého složení, E5-E11 – 12 μ l eluční frakce purifikace. Postup viz kapitoly 4.3.11 a 4.3.12.

5.1.2 Varianty PfMSP3.1

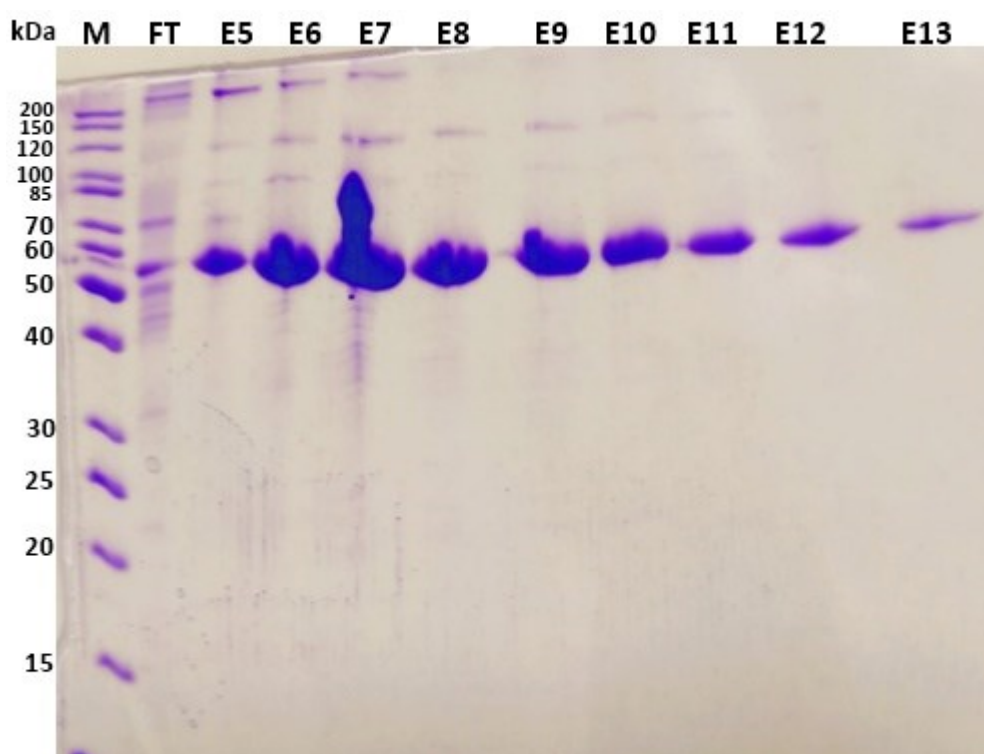
Byly exprimovány a purifikovány celkem čtyři varianty PfMSP3.1 – s plnou délkou, zkrácený na C-konci, zkrácený na N-konci a zkrácený na C i N-konci. Délka jednotlivých variant a jejich předpokládaná velikost je zobrazena na Obr. 7.



Obrázek 7 Délka a předpokládaná velikost jednotlivých variant PfMSP3.1 s barevně vyznačenými doménami. Červeně – tři bloky sedmičlenného opakování struktury Ala-X-X-Ala-X-X-X, Modře – doména bohatá na kyselinu glutamovou, Zeleně – doména podobající se leucinovému zipu. Vytvořeno doktorem Arunem Dhillonem, upraveno.

5.1.2.1 PfMSP3.1 s plnou délkou

Plasmid byl připraven vložím syntetického genu pro PfMSP3.1 s plnou délkou do vektoru pExpress2 dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.1. Byla provedena transfekce S2 hmyzích buněk tímto plazmidem (4.3.2) a následně byl PfMSP3.1 s plnou délkou v těchto buňkách exprimován (4.3.3). Protein byl purifikován metodou C-tag purifikace (4.3.5). PfMSP3.1 s plnou délkou byl produkován celkem čtyřikrát. První zkušební exprese byla provedena do konečného objemu supernatantu 20 ml. Po C-tag purifikaci byla provedena SDS elektroforéza FT a elučních frakcí 5-13 (Obr. 8).



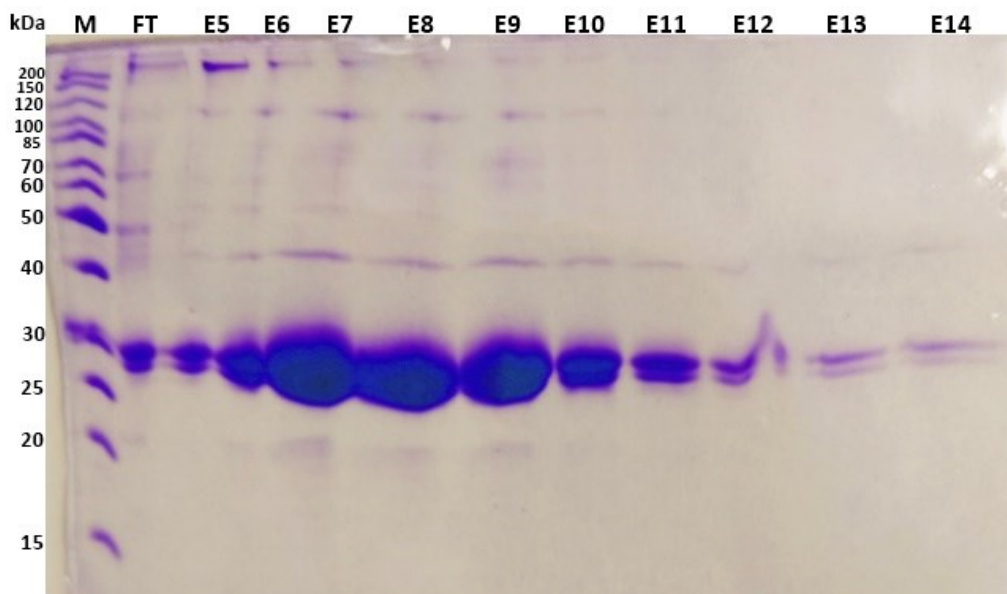
Obrázek 8 12,5% gel SDS elektroforézy PfMSP3.1 s plnou délkou po C-tag purifikaci. M – 5 μ l marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder, FT – 12 μ l průtoková frakce, E5-E13 – 12 μ l eluční frakce purifikace. Postup viz kapitoly 4.3.11 a 4.3.12.

Ve všech drahách s nanesenými vzorky elučních frakcí můžeme pozorovat přítomnost proteinu PfMSP3.1 s plnou délkou o velikosti zhruba 55 kDa (mezi úrovněmi markeru 50 a 60 kDa) s poměrně dobrou čistotou. Ve FT lze pozorovat minimální množství přítomného PfMSP3.1. Expres i purifikace PfMSP3.1 o plné délce byla tedy úspěšná. Frakce E5-E13 byly smíchány, dialyzovány přes noc v jednom litru vazebného pufru, zkoncentrovány přibližně na 1 ml o koncentraci 2,7 mg/ml a zmrazeny. Druhá exprese byla provedena do konečného objemu 300 ml. Eluční frakce E5-E9 ze C-tag purifikace byly smíchány, dialyzovány, zkoncentrovány na asi 4 ml o koncentraci 1 mg/ml a zamrazeny.

Po třetí expresi do konečného objemu supernatantu 500 ml a následné purifikaci bylo pomocí SDS elektroforézy zjištěno, že získaný protein má přibližně poloviční velikost (25 kDa) oproti původně purifikovanému PfMSP3.1 o plné délce (55 kDa). Čtvrtá exprese byla provedena do konečného objemu supernatantu 400 ml. Při SDS elektroforéze po C-tag purifikaci bylo zjištěno, že roztok proteinu je dost znečištěný. Znečištění se nepodařilo dostatečně eliminovat ani několika dalšími gelovými chromatografiemi, ani ionexovou chromatografií. Protein PfMSP3.1 s plnou délkou ze třetí a čtvrté exprese byl vyřazen z následných pokusů.

5.1.2.2 Zkrácený PfMSP3.1 na C-konci

Plasmid byl připraven vložením genu pro PfMSP3.1 zkráceného na C-konci, který byl připraven metodou PCR (4.3.1), do vektoru pExpress2 dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.1. Byla provedena transfekce S2 hmyzích buněk tímto plazmidem (4.3.2) a následně byl PfMSP3.1 zkrácený na C-konci v těchto buňkách exprimován (4.3.3). Protein byl purifikován metodou C-tag purifikace (4.3.5). PfMSP3.1 zkrácený na C-konci byl produkován celkem třikrát. Při první zkušební expresi byly buňky exprimovány do konečného objemu supernatantu 20 ml. Po C-tag purifikaci byly frakce 5-14 a FT naneseny na 12,5% polyakrylamidový gel (Obr. 9).



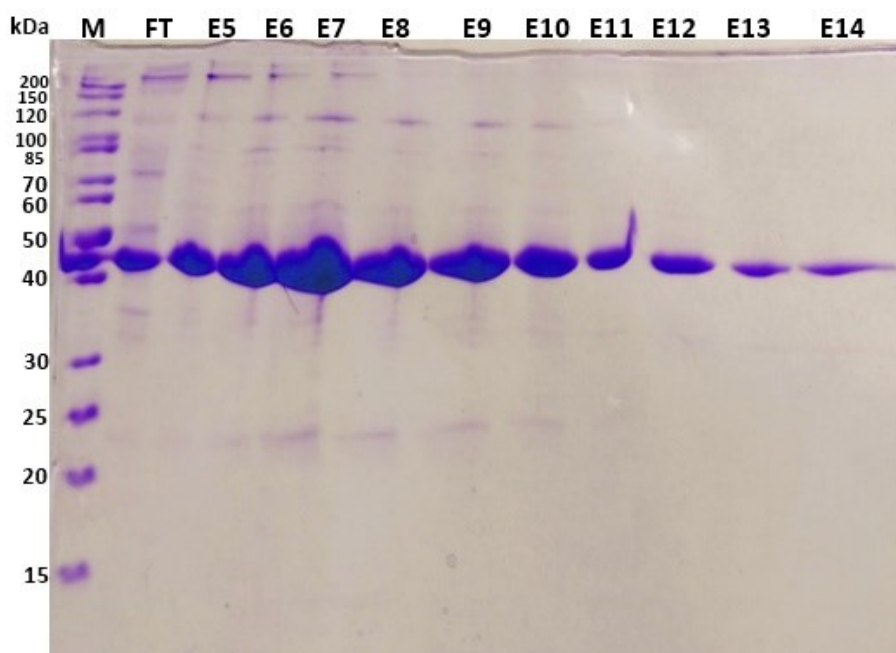
Obrázek 9 12,5% gel SDS elektroforézy PfMSP3.1 zkráceného na C-konci po C-tag purifikaci. M – 5 μ l marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder, FT – 12 μ l průtoková frakce, E5-E14 – 12 μ l eluční frakce purifikace. Postup viz kapitoly 4.3.11 a 4.3.12.

Ve všech drahách s nanesenými elučními frakcemi lze pozorovat přítomný PfMSP3.1 zkrácený na C-konci s molekulovou hmotností odpovídající přibližně 30 kDa

markeru. Pásy této zkrácené varianty jsou však zdvojené, což je pravděpodobně způsobeno štěpením proteasou na odhaleném místě štěpení u této konkrétní varianty. Zároveň je možné pozorovat přítomnost proteinu i v dráze s FT. Ta však mohla být způsobena i neopatrným nanesením vzorku E5 na gel a koncentrace proteinu v FT je v poměru s ostatními frakcemi nízká. Expres i purifikace proteinu proběhla úspěšně. Byly smíchány frakce E5-E12, dialyzovány, zkoncentrovány na asi 1 ml o koncentraci 3,4 mg/ml a zamrazeny. Další dvě produkce proteinu PfMSP3.1 zkráceného na C-konci proběhly do konečných objemů 300 a 200 ml. Jejich exprese a následná purifikace byla stejně úspěšná, avšak v obou případech se pás při SDS elektroforéze zobrazoval jako zdvojený. U druhé exprese byly vzaty a smíchány frakce E6-E13, dialyzovány, zkoncentrovány na asi 3 ml o koncentraci 1,3 mg/ml a zamrazeny. U třetí exprese byly vzaty eluční frakce E5-E13, dialyzovány, zkoncentrovány na 0,5 ml o koncentraci 1,3 mg/ml a zamrazeny. Nízký výtěžek při třetí expresi byl způsoben porouchanou C-tag kolonou.

5.1.2.3 Zkrácený PfMSP3.1 na N-konci

Plasmid byl připraven vložením genu pro PfMSP3.1 zkráceného na N-konci, který byl připraven metodou PCR (4.3.1), do vektoru pExpress2 dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.1. Byla provedena transfekce S2 hmyzích buněk tímto plazmidem (4.3.2) a následně byl PfMSP3.1 zkrácený na N-konci v těchto buňkách exprimován (4.3.3). Protein byl purifikován metodou C-tag purifikace (4.3.5). PfMSP3.1 zkrácený na N-konci byl produkován jednou. Expres proběhla do konečného objemu supernatantu 20 ml. Po C-tag purifikace byla provedena SDS elektroforéza elučních frakcí 5-14 a FT (Obr. 10).



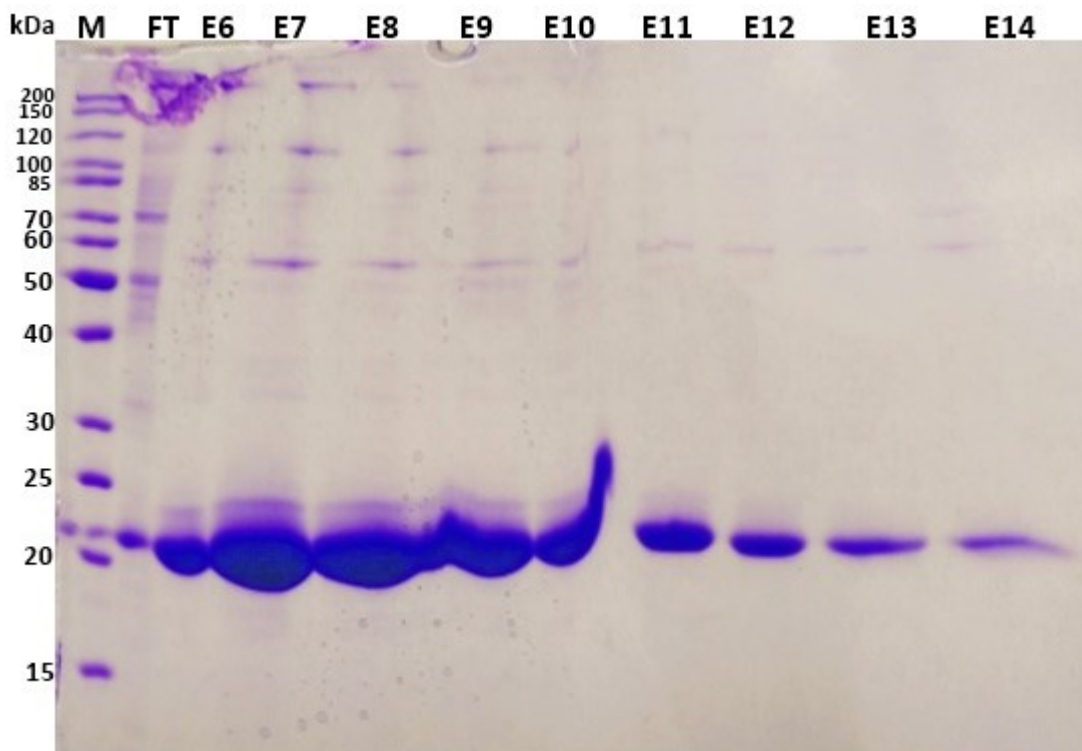
Obrázek 10 12,5% gel SDS elektroforézy PfMSP3.1 zkráceného na N-konci po C-tag purifikaci. M – 5 μ l marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder, FT – 12 μ l průtoková frakce, E5-E14 – 12 μ l eluční frakce purifikace. Postup viz kapitoly 4.3.11 a 4.3.12.

Ve všech nanesených elučních frakcích je možné pozorovat přítomnost proteinu PfMSP3.1 zkráceného na N-konci mezi pásy markeru 40 a 50 kDa. Přítomnost proteinu je možné pozorovat i v dráze s FT, avšak množství je zanedbatelné oproti ostatním frakcím. Exprese a purifikace PfMSP3.1 zkráceného na N-konci proběhla úspěšně. Spojené eluční frakce 5-14 byly dialyzovány, zkoncentrovány na přibližně 1 ml o koncentraci 3,2 mg/ml a zamrazeny.

5.1.2.4 Zkrácený PfMSP3.1 na C i N-konci

Plasmid byl připraven vložení genu pro PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci, který byl připraven metodou PCR (4.3.1), do vektoru pExpress2 dle postupu uvedeného v kapitole 4.3.1. Byla provedena transfekce S2 hmyzích buněk tímto plazmidem (4.3.2) a následně byl PfMSP3.1 zkrácený na C i N-konci v těchto buňkách exprimován (4.3.3). Protein byl purifikován metodou C-tag purifikace (4.3.5). PfMSP3.1 zkrácený na C i N-konci byl produkován jednou. Exprese byla provedena do konečného objemu

supernatantu 20 ml. Po C-tag purifikaci byla provedena SDS elektroforéza v 12,5% polyakrylamidovém gelu elučních frakcí 6-14 a FT (Obr. 11).



Obrázek 11 12,5% gel SDS elektroforézy PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci po C-tag purifikaci. M – 5 μ l marker PageRuler™ Unstained Protein Ladder, FT – 12 μ l průtoková frakce E6-E14 – 12 μ l eluční frakce purifikace. Postup viz kapitoly 4.3.11 a 4.3.12.

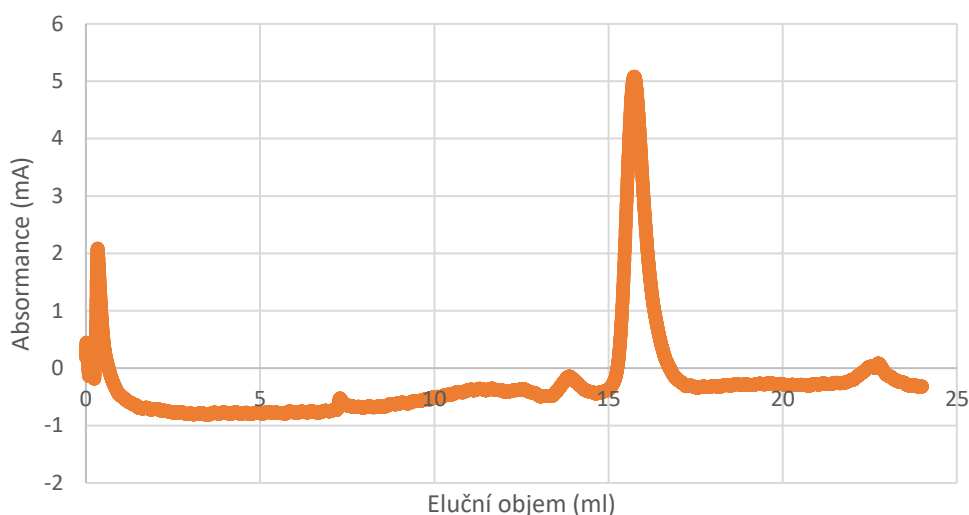
Ve všech drahách s elučními frakcemi je přítomen PfMSP3.1 zkrácený na C i N-konci těsně nad úrovní pásu markeru o 20 kDa. V FT je pozorovatelné nepatrné množství nezachyceného proteinu, které je zanedbatelné oproti množství v elučních frakcích. Exprese a purifikace proteinu proběhla úspěšně. Frakce 6-13 byly spojeny, dialyzovány, zkoncentrovány na asi jeden ml o koncentraci 3,7 mg/ml a zamrazeny.

5.2. Tvorba komplexů C1 inhibitoru s jednotlivými variantami PfMSP3.1

Jak bylo zmíněno v literárním přehledu (2.3), merozoity na svůj povrch váží lidský C1 inhibitor skrze merozoitový povrchový protein PfMSP3.1. Přesné místo vazby však není známo. Pro další strukturální studia této vazby jsme se pokusili o vytvoření komplexů čistých forem proteinů C1 inhibitoru s jednotlivými variantami PfMSP3.1 (s plnou délkou, zkrácený na C-konci, zkrácený na N-konci, zkrácený na C i N-konci).

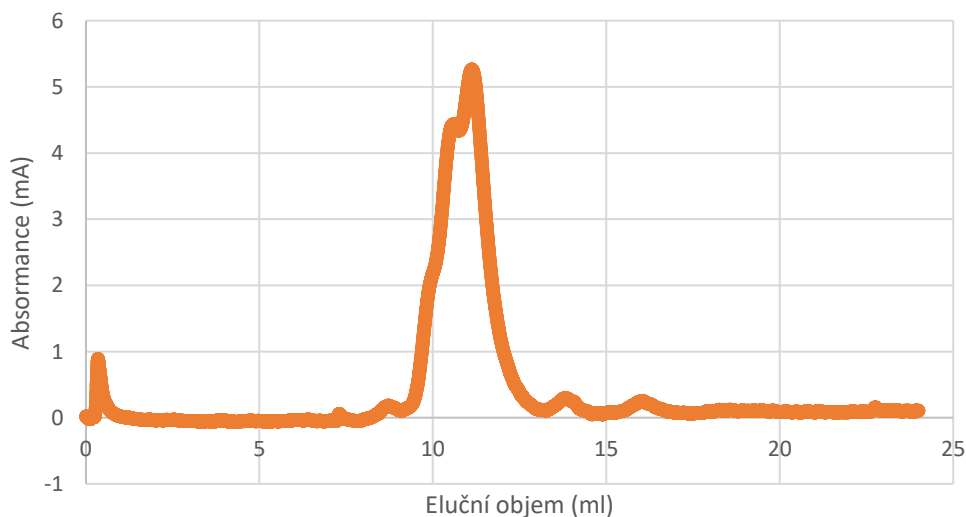
Nejprve bylo potřeba provést gelovou chromatografií (4.3.8) jednotlivých proteinů a jejich variant pro pozdější vyhodnocení úspěšnosti tvorby jednotlivých komplexů. Eluční objemy jednotlivých proteinů (Obr. 12-Obr.16) byly později porovnány s elučními křivkami potenciálních komplexů.

Graf závislosti absorpance při 280 nm na elučním objemu (C1 inhibitor)



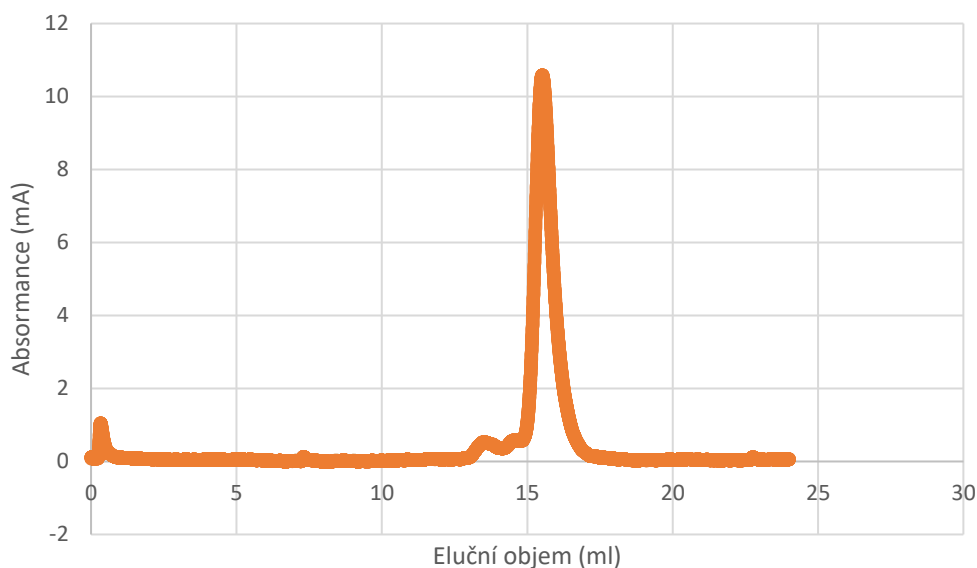
Obrázek 12 graf závislosti absorpance na elučním objemu při gelové chromatografii C1 inhibitoru. Použitá kolona – Superdex 200 10/300 GL, průtok – 0,5 ml/min, teplota – pokojová teplota (22-24°C), složení mobilní fáze – Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l. Eluční objem C1 inhibitoru 15-17 ml.

Graf závislosti absorpance při 280 nm na elučním objemu (PfMSP3.1 s plnou délkou)



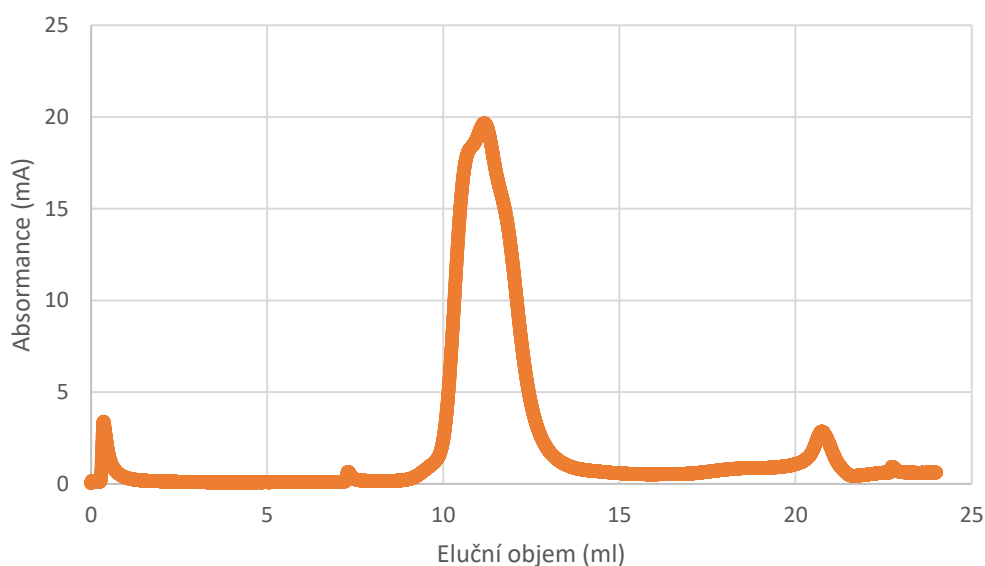
Obrázek 13 graf závislosti absorpance na elučním objemu při gelové chromatografii PfMSP3.1 s plnou délkou. Použitá kolona – Superdex 200 10/300 GL, průtok - 0,5 ml/min, teplota – pokojová teplota (22-24°C), složení mobilní fáze – Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l. Eluční objem PfMSP3.1 s plnou délkou 10-13,5 ml.

Graf závislosti absorbance při 280 nm na elučním objemu (PfMSP3.1 zkrácený na C-konci)



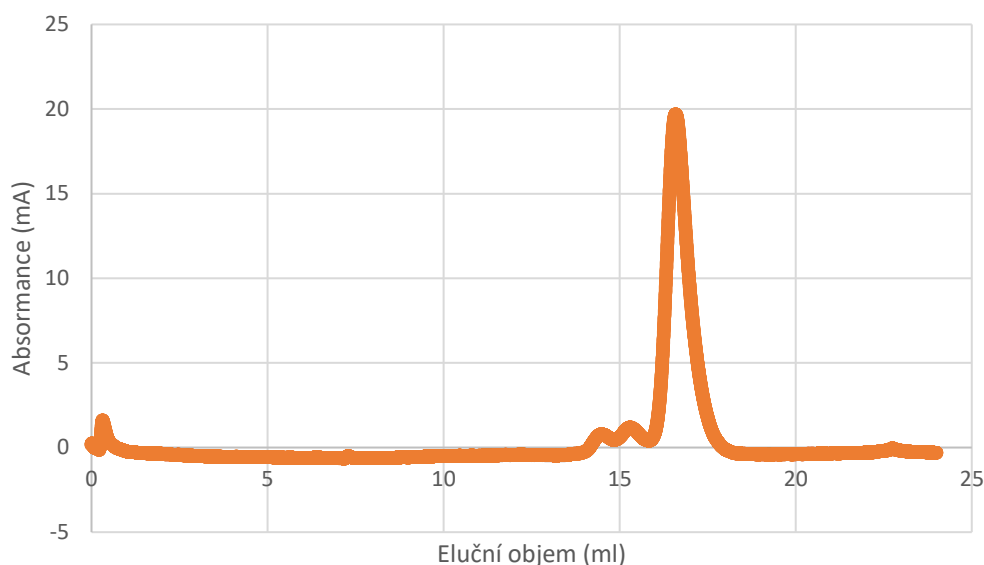
Obrázek 14 graf závislosti absorbance na elučním objemu při gelové chromatografii PfMSP3.1 zkráceného na C-konci. Použitá kolona – Superdex 200 10/300 GL, průtok - 0,5 ml/min, teplota – pokojová teplota (22-24°C), složení mobilní fáze – Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l. Eluční objem PfMSP3.1 zkráceného na C-konci 15-17 ml.

Graf závislosti absorbance při 280 nm na elučním objemu (PfMSP3.1 zkrácený na N-konci)



Obrázek 15 graf závislosti absorbance na elučním objemu při gelové chromatografii PfMSP3.1 zkráceného na N-konci. Použitá kolona – Superdex 200 10/300 GL, průtok - 0,5 ml/min, teplota – pokojová teplota (22-24°C), složení mobilní fáze – Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l. Eluční objem PfMSP3.1 zkráceného na N-konci 10-14 ml.

Graf závislosti absorpance při 280 nm na elučním objemu (PfMSP3.1 zkrácený na C i N-konci)



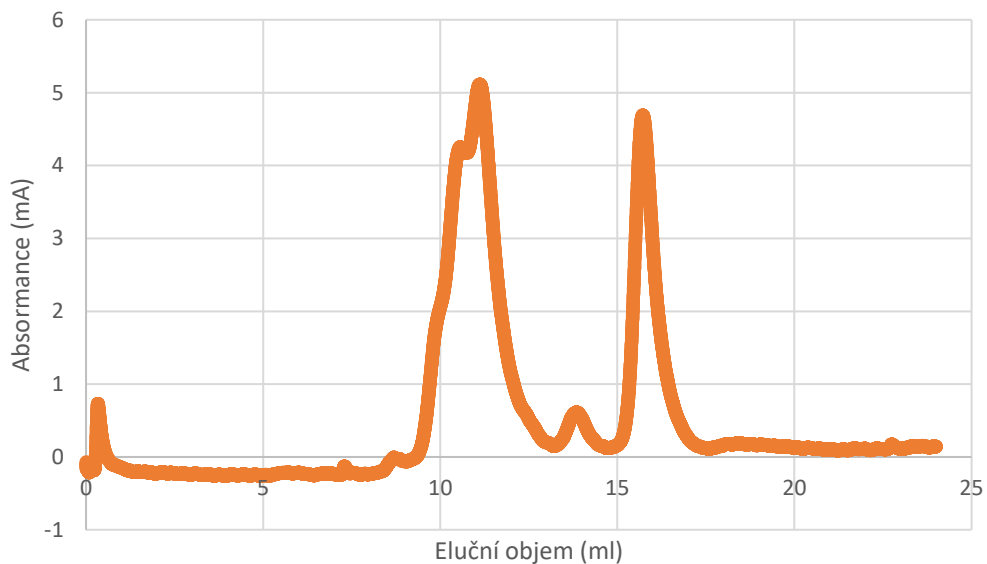
Obrázek 16 graf závislosti absorpance na elučním objemu při gelové chromatografii PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci. Použitá kolona – Superdex 200 10/300 GL, průtok – 0,5 ml/min, teplota – pokojová teplota (22-24°C), složení mobilní fáze – Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l. Eluční objem PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci 16-18 ml.

Tvorba potenciálních komplexů C1 inhibitoru s jednotlivými variantami PfMSP3.1 byla kvůli stabilitě proteinů vždy prováděna na ledě. V mikrozkuhavce byl smíchán roztok C1 inhibitoru s roztokem PfMSP3.1 v molárním poměru přibližně 1:2. Směs byla opatrně promíchána opakovaným nasáváním do pipety a následně byla provedena gelová chromatografie (4.3.8) směsi pomocí přístroje ÄKTA pure, (General Electric Healthcare Systems, USA) s připojeným sběračem frakcí F9-C fraction collector a kolonou Superdex 200 10/300 GL (Cytiva, USA). Byly pozorovány vrcholy po chromatografii směsi, porovnány s vrcholy gelové chromatografie jednotlivých proteinů a vyhodnocena úspěšnost tvorby komplexu.

5.2.1 Komplex C1 inhibitoru a PfMSP3.1 s plnou délkou

Tvorba potenciálního komplexu C1 inhibitoru a PfMSP3.1 s plnou délkou byla provedena dvakrát. Poprvé bylo smícháno 36 μ l C1 inhibitoru produkovaného v S2 hmyzích buňkách o koncentraci 1,5 mg/ml a 29 μ l PfMSP3.1 s plnou délkou z první exprese o koncentraci 2,6 mg/ml a byla provedena gelová chromatografie (Obr. 17). Na chromatogramu je možné vidět dva oddělené vrcholy s elučními objemy 10-13 ml a 15-17 ml, které odpovídají elučním objemům samotných proteinů. Lze tedy říct, že tvorba komplexu se nezdařila. Výsledek druhého pokusu byl totožný.

Stanovení elučního objemu potenciálního komplexu C1 inhibitoru s PfMSP3.1 s plnou délkou pomocí SEC

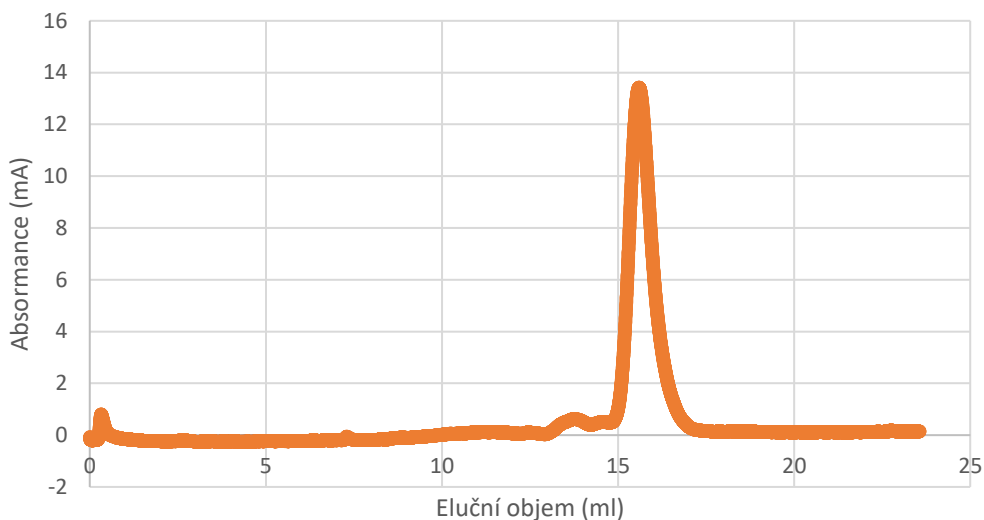


Obrázek 17 Stanovení elučního objemu potenciálního komplexu C1 inhibitoru s PfMSP3.1 s plnou délkou z první exprese. Použitá kolona – Superdex 200 10/300 GL, průtok – 0,5 ml/min, teplota – pokojová teplota (22-24°C), složení mobilní fáze – Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l.

5.2.2 Komplex C1 inhibitoru a PfMSP3.1 zkráceného na C-konci

Pokus o vytvoření potenciálního komplexu C1 inhibitoru s PfMSP3.1 zkráceným na C-konci byl proveden dvakrát. Poprvé bylo smícháno 36 μ l C1 inhibitoru produkovaného v S2 hmyzích buňkách o koncentraci 1,5 mg/ml a 14 μ l PfMSP3.1 zkráceného na C-konci z první exprese o koncentraci 3 mg/ml a byla provedena gelová chromatografie (Obr. 18). Na chromatogramu lze pozorovat jediný vrchol s elučním objemem 15-17 ml. Vzhledem k velmi podobnému elučnímu objemu u jednotlivých proteinů, který je zároveň totožný s elučním objemem směsi, a neúspěchu s vytvářením komplexu v ostatních případech bylo předpokládáno, že se vytvoření komplexu nezdařilo. Druhý pokus byl proveden s C1 inhibitorem exprimovaným v lidských Expi cells, avšak výsledek byl totožný – vytvoření komplexu se nezdařilo.

Stanovení elučního objemu potenciálního komplexu C1 inhibitoru s PfMSP3.1 zkráceného na C-konci pomocí SEC



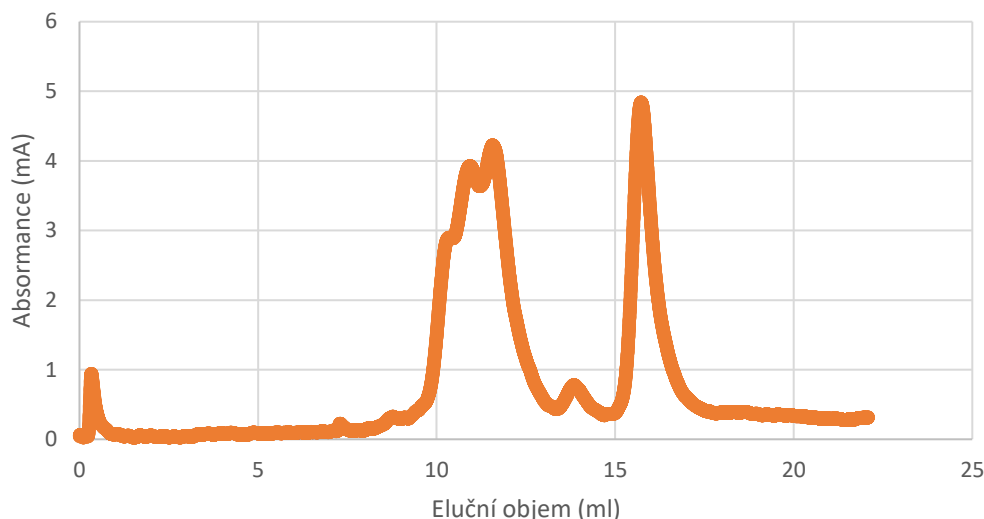
Obrázek 18 Stanovení elučního objemu potenciálního komplexu C1 inhibitoru s PfMSP3.1 zkráceného na C-konci. Použitá kolona – Superdex 200 10/300 GL, průtok – 0,5 ml/min, teplota – pokojová teplota (22-24°C), složení mobilní fáze – Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l.

5.2.3 Komplex C1 inhibitoru a PfMSP3.1 zkráceného na N-konci

O potenciální komplex C1 inhibitoru a PfMSP3.1 zkráceného na N konci jsme se pokusili jednou. Bylo smícháno 36 μ l C1 inhibitoru produkovaného v S2 hmyzích buňkách o koncentraci 1,5 mg/ml a 21 μ l PfMSP3.1 zkráceného na N-konci o koncentraci 3 mg/ml a byla provedena gelová chromatografie (Obr. 19). Na chromatogramu můžeme

pozorovat dva oddělené vrcholy s elučními objemy odpovídajícími elučním objemům jednotlivých proteinů. Lze tedy říct, že tvorba komplexu nebyla úspěšná.

Stanovení elučního objemu potenciálního komplexu C1 inhibitoru s PfMSP3.1 zkráceného na N-konci pomocí SEC



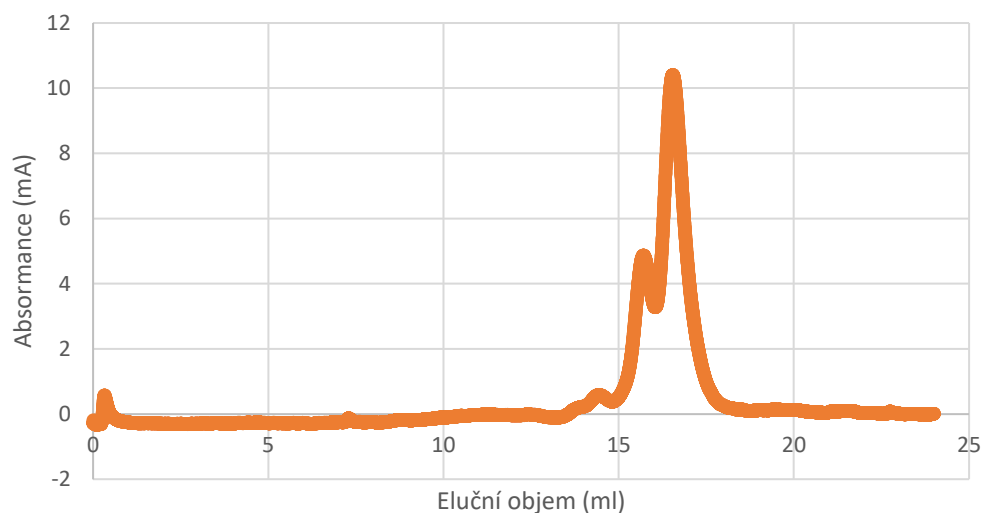
Obrázek 19 Stanovení elučního objemu potenciálního komplexu C1 inhibitoru s PfMSP3.1 zkráceného na N-konci. Použitá kolona – Superdex 200 10/300 GL, průtok – 0,5 ml/min, teplota – pokojová teplota (22-24°C), složení mobilní fáze – Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l.

5.2.4 Komplex C1 inhibitoru a PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci

Potenciální komplex C1 inhibitoru s PfMSP3.1 zkráceném na C i N-konci jsme se pokusili vytvořit celkem třikrát. Poprvé bylo smícháno 36 μ l C1 inhibitoru produkovaného v S2 hmyzích buňkách o koncentraci 1,5 mg/ml a 10 μ l PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci o koncentraci 3,3 mg/ml. Byla provedena gelová chromatografie (Obr. 20). Na chromatogramu můžeme pozorovat dva neúplně separované vrcholy, z nichž každý odpovídá elučnímu objemu samostatného proteinu. Bylo předpokládáno, že tvorba komplexu se nezdařila. Druhý pokus byl proveden s C1 inhibitorem exprimovaným v lidských Expi cells, třetí opět s C1 inhibitorem

exprimovaným v hmyzích S2 buňkách, avšak výsledek obou byl totožný s prvním výsledkem – vytvoření komplexu se nezdařilo.

Stanovení elučního objemu potenciálního komplexu C1 inhibitoru s PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci pomocí SEC



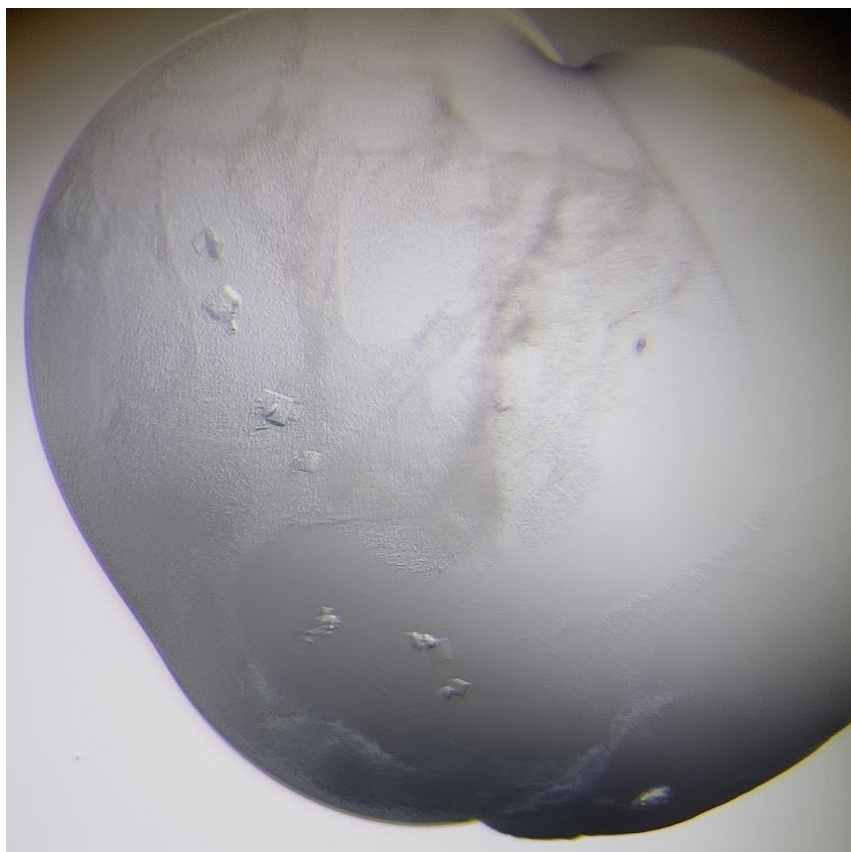
Obrázek 20 Stanovení elučního objemu potenciálního komplexu C1 inhibitoru s PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci. Použitá kolona – Superdex 200 10/300 GL, průtok – 0,5 ml/min, teplota – pokojová teplota (22-24°C), složení mobilní fáze – Tris 20 mmol/l, NaCl 100 mmol/l.

5.3 Krystalizace

Pro krystalizaci byly používány 2 varianty PfMSP3.1 – s plnou délkou a zkrácená na C i N-konci. Pro oba proteiny byly použity různé komerční kity s různými podmínkami.

5.3.1 Krystalizace PfMSP3.1 s plnou délkou

Při hledání krystalizačních podmínek pro PfMSP3.1 s plnou délkou byly využity komerční kity JCSG-plusTM, PACT premierTM, The BCS Screen, Stura Footprint Screens, ProPlexTM, MIDASplusTM, Morpheus. Pozitivní nález krystalů proteinu byl pouze u kitu Proplex v podmínce B8 (Obr. 21), která obsahuje chlorid hořečnatý 0,1 mol/l, citronan sodný 0,1 mol/l, 15% PEG4000 a jejíž pH je 5. Koncentrace proteinu použitého pro tento kit byla 13,8 mg/ml. Pro tuto podmínku byly dále provedeny dvě optimalizace (5.4).



Obrázek 21 Krystalizační kapka s mikrokrystaly PfMSP3.1 s plnou délkou; Proplex B8 (chlorid hořečnatý 0,1 mol/l, citronan sodný 0,1 mol/l, 15% PEG4000, pH = 5)

5.3.2 Krystalizace PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci

Při hledání vhodných krystalizačních podmínek pro PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci byly použity komerční kity JCSG-plusTM a Stura Footprint Screens. Ani v jednom kitu nebyl pozitivní nález krystalů proteinu.

5.4 Optimalizace krystalizace

Optimalizace byla prováděna dvakrát, a to pouze pro podmínku B8 z kitu Proplex s proteinem PfMSP3.1 s plnou délkou. Při první optimalizaci byl použit protein o koncentraci 12,3 mg/ml. Podmínkami vytvořenými pomocí přístroje Dragonfly Discovery (SPT Labtech, UK) v 96jamkové krystalizační destičce byly konstantní koncentrace chloridu hořečnatého 0,1 mol/l; konstantní koncentrace citronanu sodného 0,1 mol/l; rostoucí koncentrace PEG4000 15%-25% a rostoucí pH 3-6,2. Při této první optimalizaci byl v téměř všech podmínkách přítomen precipitát. Ten může být následkem příliš vysoké koncentrace proteinu, což bylo vyloučeno vzhledem k původnímu hledání krystalizačních podmínek, kdy byla koncentrace proteinu vyšší než při optimalizaci,

a přesto protein vykryštoval, nebo příliš vysokou koncentrací PEG4000, což bylo vyhodnoceno jako pravděpodobnější důvod.

Při druhé optimalizaci byl použit protein o koncentraci 12,8 mg/ml. Vytvořenými podmínkami v krystalizační destičce byly konstantní koncentrace chloridu hořečnatého 0,1 mol/l; konstantní koncentrace citronanu sodného 0,1 mol/l; rostoucí koncentrace PEG4000 10%-20% a rostoucí pH 3-6,2. Při druhé optimalizaci byly nalezeny možné mikrokryštaly, které však byly příliš malé pro další analýzu pomocí rentgenové krystalografie.

5.5 Stanovení struktury proteinu PfMSP3.1 s plnou délkou rentgenovou krystalografií

Příprava a následné chycení krystalu proteinu PfMSP3.1 s plnou délkou z podmínky B8 komerčního kitu Proplex pomocí smyčky byla provedena kolegou Hagenem Sülzenem, MSc. Pro ozařování krystalu byl použit pouze přístroj MicroMaxTM-007 HF Microfocus (Rigaku, Japonsko) na ÚOCHB. Z rentgenové krystalografie nebyly získány žádné snímky, protože krystal byl velmi malý, avšak bylo potvrzeno, že se jedná o krystal proteinu.

6 Diskuse

V předkládané bakalářské práci byl připraven proteiny C1 inhibitor lidského komplementu a řada jednotlivých forem PfMSP3.1 z *Plasmodia falciparum*. Ve studii z roku 2017 [6] bylo dokázáno, že C1 inhibitor je na povrch merozoitů (krevní stádium parazita *Plasmodium falciparum*) vázán skrze merozoitový povrchový protein z rodiny 3 – PfMSP3.1. Tato interakce je jedním z mechanismů úniku parazita před odpovědí lidského imunitního systému. Přestože se podařilo určit protein, kterým merozoity vážou C1 inhibitor, a bylo zjištěno, že tato interakce probíhá přes serpinovou doménu C1 inhibitoru, přesné místo vazby zůstává neznámé. A právě zjištění přesného místa vazby těchto dvou proteinů bylo hlavním cílem tohoto projektu.

Rekombinantní plasmidy byly připraveny vložením genů pro C1 inhibitor a PfMSP3.1 do vektoru pExpress2.1, který má zároveň gen pro rezistenci vůči ampicilinu a kóduje specifickou značku C-tag. Plasmidy pro zkrácené varianty PfMSP3.1 byly připraveny pomocí metody PCR a plasmidu kódujícího PfMSP3.1 s plnou délkou jakožto templátem. Pro ověření pozitivních klonů byly sekvence plasmidů ověřeny Sangerovou sekvenací. Pozitivními extrahovanými plasmidy byly transformovány S2 hmyzí buňky, ve kterých byla provedena exprese proteinů.

Purifikace proteinů ze supernatantu byla usnadněna afinitní purifikací za použití tzv. C-tagu (aminokyselinová sekvence Glu-Pro-Glu-Ala na C-koci rekombinantního proteinu) a kolony obsahující monoklonální protilátku rozeznávající tuto sekvenci. Proteiny byly z kolony eluovány v neutrálním pH pomocí chloridu hořečnatého přítomného v elučním pufru pro C-tag purifikaci, který pravděpodobně narušuje vazbu mezi C-tagem a monoklonální protilátkou. Přesný mechanismus tohoto narušení není znám. Dalšími podmínkami, ve kterých jsou proteiny s C-tagem eluovány ze C-tag kolony, jsou 20 mM Tris, 1,0 M NaCl, 50% (v/v) propylenglycol nebo 20 mM Tris, 2 mM S-E-P-E-A v neutrálním prostředí (pH 7) a 20 mM kyselina citronová nebo kyselina octová, pH 3–4 nebo 0.1 M glycine pH 3.0 v kyselém prostředí [47]. Vzorky elučních frakcí byly pro kontrolu a vizualizaci podrobovány SDS elektroforéze.

Na Obr. 5 a Obr. 6 můžeme pozorovat přítomnost C1 inhibitoru na gelech po SDS elektroforéze. V prvním případě se pás nachází přibližně na úrovni markeru 50 kDa. Na druhém obrázku lze vidět pás přítomný mezi úrovněmi markeru 60 a 70 kDa. C1 inhibitor podléhá posttranslačním glykosylacím a jeho průměrný obsah sacharidů se pohybuje

okolo 26 % [48]. Protože podruhé byl C1 inhibitor exprimován v odlišných buňkách (Expi cells), než poprvé (S2 hmyzí buňky), je možné, že tento markantní rozdíl v molekulových hmotnostech je způsoben právě větší mírou glykosylace v druhé expresi oproti první. Glykosylace C1 inhibitoru však nemá žádný vliv na jeho vazbu s proteinem PfMSP3.1 [6]. V obou případech lze konstatovat, že C1 inhibitor je ve vzorku přítomný. Výtěžky C1 inhibitoru byly 1,3 a 3,6 mg.

Obr. 8 znázorňuje gel z SDS elektroforézy po purifikaci PfMSP3.1 s plnou délkou (aminokyseliny 25-364). Ve všech nanesených elučních frakcích je možné pozorovat výrazný pás mezi úrovněmi markeru 50 a 60 kDa, který odpovídá přítomnosti plno-délkového PfMSP3.1 (aminokyseliny 25-354). Stejného pozitivního výsledku se nám dostalo i v druhé purifikaci. Výtěžky PfMSP3.1 s plnou délkou byly 2,7 a 4 mg.

Přestože nejsou přítomna potvrzující data, po třetí expresi a purifikaci PfMSP3.1 s plnou délkou byla zjištěna jeho příliš nízká molekulová hmotnost okolo 25 kDa. Tento velký rozdíl v molekulové hmotnosti mohl být způsoben záměnou či chybným označením původních transformovaných S2 buněk. Je tedy možné, že „PfMSP3.1 s plnou délkou“ ze třetí exprese byl odlišný protein. Vzhledem k tomu, že během gelových a ionexových chromatografií proteinu ze čtvrté exprese vycházely všechny proteiny společně v jeden eluční čas, avšak na gelech z SDS elektroforézy byla stále stejná míra znečištění, byla uvažována možnost, že plno-délkový PfMSP3.1 mohl vytvořit s ostatními neznámými proteiny zobrazovanými na gelech z SDS elektroforézy komplex. Tento pravděpodobný komplex nebylo možné rozdělit námi používanými separačními metodami, ale byl následně rozdělen v průběhu SDS elektroforézy. Další hypotézou byla degradace proteinu PfMSP3.1 s plnou délkou. Pro zjištění pravého důvodu by musela být provedena hmotnostní spektrometrie jednotlivých pásů z gelu. Díky té by se dalo vyhodnotit, zdali se jedná o fragmenty degradujícího PfMSP3.1, nebo o úplně odlišné proteiny. Proteiny ze třetí a čtvrté exprese byly vyřazeny z návazných pokusů.

Na Obr. 9 vidíme pás těsně pod úrovní markeru s hodnotou 30 kDa na gelu z SDS elektroforézy. Ten potvrzuje přítomnost varianty PfMSP3.1 zkráceného na C-konci (aminokyseliny 25-212). Stejných pozitivních výsledků se nám dostalo i v následujících dvou purifikacích této varianty. Výtěžky PfMSP3.1 zkráceného na C-konci byly 3,4; 3,9 a 0,6 mg. Nízký výtěžek z poslední purifikace byl způsoben porouchanou C-tag kolonou.

Obr. 10 znázorňuje gel z SDS elektroforézy po purifikaci PfMSP3.1 zkráceného na N-konci (aminokyseliny 61-354). Přítomnost proteinu v elučních frakcích potvrzuje pás mezi úrovněmi markeru 40 a 50 kDa. Výtěžek PfMSP3.1 zkráceného na N-konci byl 3,2 mg.

Z Obr. 11 je možné potvrdit úspěšnou expresi a purifikaci varianty PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci (aminokyseliny 61-212). Protein se na gelu z SDS elektroforézy jeví jako pás těsně nad úrovní markeru 20 kDa. Výtěžek PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci byl 3,7 mg.

Pro následné vyhodnocování úspěšnosti tvorby komplexů byly nejprve provedeny gelové chromatografie jednotlivých proteinů, které jsou na Obr. 12-Obr. 16. Z chromatogramů byly vyhodnoceny eluční objemy proteinů. Na Obr. 17-Obr. 20 jsou chromatogramy směsí C1 inhibitoru s variantami PfMSP3.1. Na všech je možné pozorovat vrcholy pouze při elučních objemech, které vždy odpovídají elučním objemům jednotlivých použitých proteinů. Na Obr. 18 se sice nachází pouze jeden vrchol, ale taktéž totožný s elučním objemem jednotlivých proteinů (eluční objemy použitých proteinů jsou totožné). V případě komplexu by byl jeho eluční objem nižší, než eluční objem jednotlivých proteinů (vrchol by byl posunut na chromatogramu směrem doleva). Zároveň u Obr. 12, Obr. 15, Obr. 17 a Obr. 19 lze pozorovat eluční objem variant PfMSP3.1 s plnou délkou a PfMSP3.1 zkráceného na N-konci, který obsahuje tři překrývající se vrcholy. To je pravděpodobně způsobeno oligomerizací proteinu díky C-koncové doméně, která je právě jejím zprostředkovatelem. U chromatogramů s variantami PfMSP3.1 zkráceného na C-konci a PfMSP3.1 zkráceného na C i N-konci (Obr. 14, Obr. 16, Obr. 18 a Obr. 20) tyto překrývající se vrcholy kvůli chybějící C-koncové doméně nepozorujeme. Přestože PfMSP3.1 byl označen jako výhradní vazebný partner pro C1 inhibitor na povrch merozoitu [6], pokusy o jeho vytvoření v čisté proteinové formě byly neúspěšné. Jedním, avšak méně pravděpodobným, faktorem by mohla být teplota při smíchání proteinů. V rámci výše uvedené publikace byly prováděny pokusy, kde C1 inhibitor inkubovali po určitý čas s merozoity exprimujícími na svém povrchu PfMSP3.1 při 37 °C. Při námi provedených pokusech byl C1 inhibitor s variantami PfMSP3.1 smíchán na ledu. Druhým, pravděpodobnějším, faktorem by mohl být hypotetický pomocný vazebný partner pro PfMSP3.1 na povrchu merozoitu, který se však vazby neúčastní přímo. Povrchové merozoitové proteiny tvoří na povrchu parazita velmi složitý a málo probádaný komplex s mnoha funkcemi, z nichž spousta nebyla

dodnes objasněna [2]. Je tedy možné, že PfMSP3.1 není jediný protein nebo faktor, který je pro vytvoření jeho komplexu s C1 inhibítozem potřeba.

Vzhledem k neúspěchu s vytvořením komplexů, bylo hledání krystalizačních podmínek prováděno pouze pro samostatné varianty PfMSP3.1. Na Obr. 21 je možné pozorovat jediný případ úspěšné krystalizace proteinu PfMSP3.1 s plnou délkou v krystalizační podmínce B8 komerčního kitu Proplex. Díky rentgenové krystalografii bylo potvrzeno, že se skutečně jedná o krystaly proteinu, ale zatím nebyly získány žádné použitelné difrakční snímky. Dvakrát byla provedena optimalizace této krystalizace, avšak ani v jednom případě nedošlo k nárůstu krystalů. Důvodem pro neúspěšnou optimalizaci mohly být nepřesně připravené roztoky použité při přípravě krystalizační destičky, nepřesné pipetování jednotlivých komponent přístrojem při vytváření krystalizačních podmínek, či příliš velké skoky v rozdílech pH/PEG4000 mezi sousedními podmínkami. Pro PfMSP3.1 bylo celkově náročné najít podmínku, ve které by krystalizoval. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.1.3.1, tento protein má z cca 30 % strukturu náhodného klubka [20]. Právě vysoké zastoupení nestrukturované formy by mohlo být důvodem, proč je PfMSP3.1 těžké vykrystalizovat.

7 Závěr

- 1) Produkce rekombinantních proteinů
 - a) Příprava plasmidů s genem pro C1 inhibitor a varianty PfMSP3.1 byla úspěšná
 - b) Transfekce S2 hmyzích buněk připravenými plasmidy proběhla úspěšně.
 - c) Všechny proteiny (C1 inhibitor, PfMSP3.1 s plnou délkou, PfMSP3.1 zkrácený na C-konci, PfMSP3.1 zkrácený na N-konci, PfMSP3.1 zkrácený na C i N-konci) se povedlo exprimovat a purifikovat pomocí C-tag purifikace. Celkové výtěžky byly 4,9 mg pro C1 inhibitor, 6,7 mg pro PfMSP3.1 s plnou délkou, 7,9 mg pro PfMSP3.1 zkrácený na C-konci, 3,2 mg pro PfMSP3.1 zkrácený na N-konci a 3,7 mg pro PfMSP3.1 zkrácený na C i N-konci.
- 2) Analýza vazby variant povrchového proteinu PfMSP3.1 s C1 inhibitorem
 - a) Vytvoření komplexů C1 inhibitoru s jednotlivými variantami PfMSP3.1 se ani v jednom případě nezdařilo.
 - b) PfMSP3.1 se podařilo vykrystalizovat, avšak velikost a kvalita krystalu neumožnila získat difrakční snímky.

Seznam literatury

- [1] World Health Organization: *Fact sheet about malaria*. Dostupné z URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> [cit. 3. 3. 2023].
- [2] C. S. Lin, A. D. Uboldi, Ch. Epp, H. Bujard, T. Tsuboi, P. E. Czabotar, a A. F. Cowman: Multiple Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 1 Complexes Mediate Merozoite Binding to Human Erythrocytes. *J Biol Chem* **291**:14, 7703–7715, (Dub. 2016), doi: 10.1074/jbc.M115.698282.
- [3] H. G. Lê, T. L. Tháí, J.-M. Kang, J. Lee, M. Moe, T. C. Vö, H. Naw, M. K. Myint, Z. T. Htun, T.-S. Kim, H.-J. Shin, a B.-K. Na: Genetic polymorphism of merozoite surface protein-3 in Myanmar Plasmodium falciparum field isolates. *Malar J* **19**, 184, (Kvě. 2020), doi: 10.1186/s12936-020-03256-y.
- [4] E. B. Belachew: Immune Response and Evasion Mechanisms of Plasmodium falciparum Parasites, *J Immunol Res* **2018**:6529681, (Bře. 2018), doi: 10.1155/2018/6529681.
- [5] L. Kurtovic, M. J. Boyle, D. H. Opi, A. T. Kennedy, W.-H. Tham, L. Reiling, J.-A. Chan, a J. G. Beeson: Complement in malaria immunity and vaccines. *Immunol Rev* **293**:1, 38–56, (Led. 2020), doi: 10.1111/imr.12802.
- [6] A. T. Kennedy, L. C. Wijeyewickrema, A. Huglo, C. Lin, R. Pike, A. F. Cowman a W.-H. Tham: Recruitment of Human C1 Esterase Inhibitor Controls Complement Activation on Blood Stage Plasmodium falciparum Merozoites. *The Journal of Immunology* **198**:12, 4728–4737, (Čvn. 2017), doi: 10.4049/jimmunol.1700067.
- [7] A. Chakraborty: Understanding the biology of the Plasmodium falciparum apicoplast; an excellent target for antimalarial drug development. *Life Sciences* **158**, 104–110, (Srp. 2016), doi: 10.1016/j.lfs.2016.06.030.
- [8] D. A. Milner: Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **8**:1, a025569, (Led. 2018), doi: 10.1101/cshperspect.a025569.
- [9] A. Sturm a V. Heussler: Live and let die: manipulation of host hepatocytes by exoerythrocytic Plasmodium parasites. *Med Microbiol Immunol* **196**:3, 127–133, (Zář. 2007), doi: 10.1007/s00430-007-0044-3.
- [10] A. F. Cowman a B. S. Crabb: Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* **124**:4, 755–766, (Úno. 2006), doi: 10.1016/j.cell.2006.02.006.

- [11] A. Bartoloni a L. Zammarchi: Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **4**:1, (Kvě. 2012), doi: 10.4084/MJHID.2012.026.
- [12] Y. P. Bria, C.-H. Yeh, a S. Bedingfield: Significant symptoms and nonsymptom-related factors for malaria diagnosis in endemic regions of Indonesia. *International Journal of Infectious Diseases* **103**, 194–200, (Úno. 2021), doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.177.
- [13] C. D. Goodman, V. Su, a G. I. McFadden: The effects of anti-bacterials on the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **152**:2, 181–191, (Dub. 2007), doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.01.005.
- [14] V. Soulard, H. Bosson-Vanga, A. Lorthiois, C. Roucher, J.- F. Franetich, G. Zanghi, M. Bordessoulles, M. Tefit, M. Thellier, S. Morosan, G. Le Naour, F. Capron, H. Suemizu, G. Snounou, A. Moreno-Sabater, a D. Mazier: *Plasmodium falciparum* full life cycle and *Plasmodium ovale* liver stages in humanized mice. *Nat Commun* **6**, 7690, (Čvc. 2015), doi: 10.1038/ncomms8690.
- [15] M. Kadekoppala, R. A. O'Donnell, M. Grainger, B. S. Crabb, a A. A. Holder: Deletion of the *Plasmodium falciparum* Merozoite Surface Protein 7 Gene Impairs Parasite Invasion of Erythrocytes. *Eukaryot Cell* **7**:12, 2123–2132, (Pro. 2008), doi: 10.1128/EC.00274-08.
- [16] A. F. Cowman, J. Healer, D. Marapana, a K. Marsh: Malaria: Biology and Disease. *Cell* **167**:3, 610–624, (Řij. 2016), doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055.
- [17] M. J. Blackman, H.-G. Heidrich, S. Donachie, J. S. McBride a A. A. Holder: A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion- inhibiting antibodies. *J Exp Med* **172**:1, 379–382, (Čvc. 1990).
- [18] D. J. McColl a R. F. Anders: Conservation of structural motifs and antigenic diversity in the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-3 (MSP-3). *Molecular and Biochemical Parasitology* **90**:1, 21–31, (Pro. 1997), doi: 10.1016/S0166-6851(97)00130-8.
- [19] J. A. Pearce, A. N. Hodder, a R. F. Anders: The alanine-rich heptad repeats are intact in the processed form of *Plasmodium falciparum* MSP3. *Experimental Parasitology* **108**:3, 186–189, (Lis. 2004), doi: 10.1016/j.exppara.2004.07.017.
- [20] B. R. Burgess, P. Schuck, a D. N. Garboczi: Dissection of Merozoite Surface Protein 3, a Representative of a Family of *Plasmodium falciparum* Surface Proteins,

- Reveals an Oligomeric and Highly Elongated Molecule. *Journal of Biological Chemistry* **280**:44, 37236–37245, (Lis. 2005), doi: 10.1074/jbc.M506753200.
- [21] H.Hisaeda, A.Saul, J. J. Reece, M. C. Kennedy, C. A. Long, L. H. Miller, a A. W. Stowers: Merozoite Surface Protein 3 and Protection against Malaria in Aotus nancymai Monkeys. *The Journal of Infectious Diseases* **185**:5, 657–664, (Bře. 2002), doi: 10.1086/339187.
- [22] M. Imam, S. Singh, N. K. Kaushik, a V. S. Chauhan: Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 3: OLIGOMERIZATION, SELF-ASSEMBLY, AND HEME COMPLEX FORMATION. *Journal of Biological Chemistry* **289**:7, 3856–3868, (Úno. 2014), doi: 10.1074/jbc.M113.520239.
- [23] C. Oeuvray, H. Bouharoun-Tayoun, H. Gras-Masse, E. Bottius, T. Kaidoh, M. Aikawa, M.-C. Filgueira, A. Tartar a P. Druilhe: Merozoite Surface Protein-3: A Malaria Protein Inducing Antibodies That Promote Plasmodium falciparum Killing by Cooperation With Blood Monocytes. *Blood* **84**:5, 1594–1602, (Zář. 1994), doi: 10.1182/blood.V84.5.1594.1594.
- [24] B. Dinko a G. Pradel: Immune evasion by Plasmodium falciparum parasites: converting a host protection mechanism for the parasite's benefit. *Advances in Infectious Diseases* **6**:2, 82–95, (Kvě. 2016), doi: 10.4236/aid.2016.62011.
- [25] C. Ocaña-Morgner, M. M. Mota, a A. Rodriguez: Malaria Blood Stage Suppression of Liver Stage Immunity by Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine* **197**:2, 143–151, (Led. 2003), doi: 10.1084/jem.20021072.
- [26] D. C. Gowda a X. Wu: Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Front Immunol* **9**, 3006, (Pro. 2018), doi: 10.3389/fimmu.2018.03006.
- [27] N. S. Merle, S. E. Church, V. Fremeaux-Bacchi, a L. T. Roumenina: Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol* **6**, 262, (Čvn. 2015), doi: 10.3389/fimmu.2015.00262.
- [28] N. S. Merle, R. Noe, L. Halbwachs-Mecarelli, V. Fremeaux-Bacchi, a L. T. Roumenina: Complement System Part II: Role in Immunity. *Front Immunol* **6**, 257, (Kvě. 2015), doi: 10.3389/fimmu.2015.00257.
- [29] A. M. Blom: The role of complement inhibitors beyond controlling inflammation. *Journal of Internal Medicine* **282**:2, 116–128, (Srp. 2017), doi: 10.1111/joim.12606.

- [30] D. Ricklin, G. Hajishengallis, K. Yang, a J. D. Lambris: Complement - a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* **11**:9, 785–797, (Zář. 2010), doi: 10.1038/ni.1923.
- [31] R. Zheng, Y. Zhang, K. Zhang, Y. Yuan, S. Jia, a J. Liu: The Complement System, Aging, and Aging-Related Diseases. *Int J Mol Sci* **23**:15, 8689, (Srp. 2022), doi: 10.3390/ijms23158689.
- [32] M. Ling a M. Murali: Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. *Clinics in Laboratory Medicine* **39**:4, 579–590, (Pro. 2019), doi: 10.1016/j.cll.2019.07.006.
- [33] B. Belmonte, A. Mangogna, A. Gulino, V. Cancila, G. Morello, Ch. Agostinis, R. Bulla, G. Ricci, F. Fraggetta, M. Botto, P. Garred, a F. Tedesco: Distinct Roles of Classical and Lectin Pathways of Complement in Preeclamptic Placentae. *Front Immunol* **13**, 882298, (Kvě. 2022), doi: 10.3389/fimmu.2022.882298.
- [34] M. Korbelik a I. Cecic: Complement activation cascade and its regulation: Relevance for the response of solid tumors to photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **93**:1, 53–59, (Řij. 2008), doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.04.005.
- [35] M. Noris a G. Remuzzi: Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol* **33**:6, 479–492, (Lis. 2013), doi: 10.1016/j.semnephrol.2013.08.001.
- [36] L. Teirilä, J. Heikkinen-Eloranta, J. Kotimaa, S. Meri, a A. I. Lokki: Regulation of the complement system and immunological tolerance in pregnancy. *Seminars in Immunology* **45**, 101337, (Řij. 2019), doi: 10.1016/j.smim.2019.101337.
- [37] L. Hor, J. Pan, J. C. Whisstock, R. N. Pike, a L. C. Wijeyewickrema: Mapping the binding site of C1-inhibitor for polyanion cofactors. *Molecular Immunology* **126**, 8–13, (Řij. 2020), doi: 10.1016/j.molimm.2020.06.018.
- [38] M. Berger, C. Lefaucheur, a S. C. Jordan: Update on C1 Esterase Inhibitor in Human Solid Organ Transplantation. *Transplantation* **103**:9, 1763, (Zář. 2019), doi: 10.1097/TP.0000000000002717.
- [39] I. G. A. Wagenaar-Bos a C. E. Hack: Structure and Function of C1-Inhibitor. *Immunology and Allergy Clinics of North America* **26**:4, 615–632, (Lis. 2006), doi: 10.1016/j.iac.2006.08.004.
- [40] E. Kajdácsi, Z. Jandrasics, N. Veszeli, V. Makó, A. Koncz, D. Gulyás, K. V. Köhalmi, G. Temesszentandrás, L. Cervenak, P. Gál, J. Dobó, S. de Maat, C. Maas, H. Farkas, a L. Varga: Patterns of C1-Inhibitor/Plasma Serine Protease Complexes in

- Healthy Humans and in Hereditary Angioedema Patients. *Front Immunol* **11**, 794, (Kvě. 2020), doi: 10.3389/fimmu.2020.00794.
- [41] Madelon Dijk, Jolande Holkers, Patrick Voskamp, Bruno M. Giannetti, Willem-Jan Waterreus, Harrie A. van Veen, a Navraj S. Pannu: How Dextran Sulfate Affects C1-inhibitor Activity: A Model for Polysaccharide Potentiation. *Structure* **24**:12, 2182–2189, (Pro. 2016), doi: 10.1016/j.str.2016.09.013.
- [42] A. E. Davis, P. Mejia, a F. Lu: BIOLOGICAL ACTIVITIES OF C1 INHIBITOR. *Mol Immunol* **45**:16, 4057–4063, (Říj. 2008), doi: 10.1016/j.molimm.2008.06.028.
- [43] A. M. Blom, T. Hallström, a K. Riesbeck: Complement evasion strategies of pathogens—Acquisition of inhibitors and beyond. *Molecular Immunology* **46**:14, 2808–2817, (Zář. 2009), doi: 10.1016/j.molimm.2009.04.025.
- [44] Addgene: *Handling Plasmids from Addgene - Purifying Plasmid DNA*. Dostupné z URL: <https://www.addgene.org/protocols/purify-plasmid-dna/> [cit. 16. 5. 2023].
- [45] P. Hermans, R. Clasen, a F. Detmers: Reinventing Affinity Tags. *Genetic Engineering & Biotechnology News* **32**:17, 48–49, (Říj. 2012), doi: 10.1089/gen.32.17.20.
- [46] Thermo Fisher Scientific: *Expi293TM Expression System*. Dostupné z URL: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0007814_Expi293_ExpressionSystem_UG.pdf [cit. 17. 5. 2023].
- [47] Thermo Fisher Scientific: *CaptureSelectTM C-tagXL Affinity Matrix*. Dostupné z URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/2943072010> [cit. 15. 5. 2023].
- [48] K. Koles, P. H. C. van Berkel, F. R. Pieper, J. H. Nuijens, M. L.M. Mannesse, J. F.G. Vliegthart, a J. P. Kamerling: N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits. *Glycobiology* **14**:1, 51–64, (Led. 2004), doi: 10.1093/glycob/cwh010.

Seznam příloh

Příloha 1 – Sekvence syntetických genů dodaných firmou GENEWIZ

Final Sequence (5' to 3'):

```
GCCTTCGTGGGACTGAGTCTGGGCGAATTCAGCAAGGAGATCGTGAAGAAGTACAACCTGAACCTGCG  
CAACGCCATCCTGAACAACAACCTCGCAGATCGAGAACGAGGAGAACGTGAACACCACCATCACCGGCA  
ACGATTTACAGCGCGCGGAGTTCTGTGGCCCGGCTACACCGAGGAGTTGAAGGCTAAAAAGCTAG  
CGAAGATGCCGAGAAGGCGGCAATGATGCCGAGAACGCTAGCAAGGAAGCGGAGGAGGCGCTAA  
GGAAGCCGTAAATCTGAAGGAGAGCGATAAGAGCTACACCAAGGCCAAAGAAGCCTGCACCGCCGCT  
AGCAAGGCAAAGAAAGCTGTGGAGACCGCCCTGAAGGCCAAAGATGATGCGGAGAAGAGTAGCAAGG  
CCGATAGCATCAGCACCAAGACCAAGGAGTACGCAGAAAAAGCCAAGAACCGCTACGAGAAGGCTAA  
GAATGCGTACAAAAGGCCAACCAAGCCGTGTTGAAAGCCAAGGAGGCTAGCAGCTACGATTACATCC  
TGGGCTGGGAGTTTCGGCGGCGGCGTGCCTCGAGCACAAAGAGGAGGAGAATATGCTGAGCCACCTGTA  
CGTGAGCAGCAAGGATAAGGAGAACATCAGCAAGGAGAACGATGATGTGCTGGATGAGAAAGAAGAA  
GAAGCCGAAGAGACCGAAGAGGAGGAGCTGGAGGAGAAGAACGAGGAAGAGACCGAGTCAGAGATC  
AGCGAGGATGAGGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAAGAAAAGGAGGAAGAAAATGATAAGAAGAAGGAGC  
AAGAGAAGGAGCAGAGCAACGAGAACAACGATCAGAAGAAGGATATGGAGGCTCAGAACCTGATCAG  
CAAGAATCAGAACAACAACGAGAAGAACGTGAAGGAGGCCGCCGAGAGCATCATGAAGACCCTGGCC  
GGCCTGATCAAGGGCAACAATCAGATCGATAGCACCCCTGAAGGATCTGGTGGAGGAGCTGAGCAAGTA  
CTTCAAGAACCACCTGGAGGTGCTGTTCCAGGGCCCCAGCGCCGAGCCGGAGGCCTAAGCGGCCGC  
GGATCGATCGATATCTGACTAAATCTTAGT
```

Obrázek 22 Sekvence syntetického genu PfMSP3.1.

Final Sequence (5' to 3'):

```
GCCTTCGTGGGACTGAGTCTGGGCGAATTCACCGTTCTTTTTGTCCAGGTCCAGTTACTTTGTGTTCC  
GATTTGGAATCTCATTCTACCGAAGCTGTTTTGGGTGATGCTTTGGTTGATTTCTCATTGAAGTTGTACC  
ATGCTTTCTCCGCATGAAGAAAGTTGAAACTAATATGGCTTTCAGCCCTTCTCCATTGCTTCTTTGTT  
GACCCAAGTTTTGTTAGGTGCTGGTGAACACTAAGACCAACTTGAATCCATTTTGTCTTACCCAAAG  
GATTTACCTGTGTTTATCAAGCTTTGAAGGGTTTTACTACTAAGGGTGTACCTCCGTTTCTCAAATTTT  
CCATTCTCCAGATTTGGCCATCAGAGATACTTTTGTAAATGCCTCTAGAACCCTGTACTCTTCATCTCCA  
AGAGTTTTGTCTAACAACCTCCGATGCCAATCTGGAATTGATTAACACTTGGGTTGCTAAGAACACCAACA  
ACAAGATTTCTAGGTTGTTGGACTCTTTGCCATCTGATACAAGATTGGTTTTGTTGAACGCCATCTACTT  
GTCTGCTAAGTGGAAAACCTTTTCGATCCAAGAAAGACCAGAATGGAACCATTCCATTTCAAGAACTC  
CGTTATCAAGGTTCCCATGATGAACTCTAAAAGTACCCAGTTGCTCACTTCATCGATCAAACTTTGAAA  
GCTAAGGTCGGTCAATTGCAGTTGTCTCATAATCTGTCCTTGGTTATTTTGGTCCCACAGAATTTGAAGC  
ACAGGTTGGAAGATATGGAACAAGCTTTGTCTCCATCTGTTTTCAAGGCCATTATGGAAGTTGGAGA  
TGTCTAAGTTCCAGCCAACCTTGTGACTTTGCCAAGAATCAAAGTTACCACCTCTCAAGACATGCTGTC  
TATCATGGAAAAGCTAGAATCTTCGACTTCTCCTACGATTTGAACTTGTGTGGTTTACTGAAGATCCA  
GACTTACAAGTTTCTGCCATGCAACATCAAACCGTTTTGGAATTGACTGAACTGGTGTGAAAGCTGCT  
GCTGCTTCTGCTATTTCTGTTGCTAGAACTTTGTTGGTTTTTGAAGTGAACAACCCCTTCTGTTTATGTT  
GTGGGATCAACAACAAGTTTTCCAGTTTTTATGGGTAGAGTTTATGATCCAAGAGCCCTGGAGGTGCT  
GTTCCAGGGCCCCAGCGCCGAGCCGGAGGCCTAAGCGGCCGCGGATCGATCGATATCTGACTAAATC  
TTAGT
```

Obrázek 23 Sekvence syntetického genu C1 inhibitoru.