

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Lenka Marková

Proteom encystačních váček *Giardia intestinalis*

Proteome of the encystation-specific vesicles in *Giardia intestinalis*

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Doležal, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

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

V Praze dne 26. 4. 2018

.....

Poděkování:

Mé největší poděkování patří mému školiteli Pavlu Doležalovi za jeho vedení, vstřícnost, poskytnuté rady a velkou dávku trpělivosti a nadšení. Děkuji Lubošovi, Vlad'ce a Bětce za veškerou poskytnutou pomoc nejen v začátcích a také celému týmu naší laboratoře za skvělou atmosféru a příjemné pracovní prostředí. Děkuji svému příteli, týmu MaTeL a všem svým blízkým za podporu a porozumění.

Abstrakt

Proces encystace je nedílnou a důležitou součástí životního cyklu mnoha organismů. Jedním z nich je i *Giardia intestinalis*, významný jednobuněčný parazit obratlovců včetně člověka. Během encystace se u něj objevují speciální orgány nazvané jako encystační váčky. Ty slouží k akumulaci a transportu materiálu pro budoucí stěnu cysty.

Hlavními proteiny, které se nacházejí v encystačních váčkách a tvoří hlavní stavební komponenty stěny cysty, jsou CWP1, CWP2 a CWP3. Právě jim se blíže věnuje tato práce. Struktura a vlastnosti těchto proteinů byly využity k řešení hlavního cíle, kterým byla identifikace dalších proteinů asociovaných s encystačními váčky.

V experimentální části se podařilo vytvořit systém, který umožňuje cíleně charakterizovat proteiny a buněčné kompartmenty, a to za využití biotin ligázy z *Escherichia coli*. Pro tento systém byly vytvořeny konstrukty, které byly úspěšně vneseny do plasmidů a do buněk *G. intestinalis*. Pro účel klonování byla dále optimalizována metoda místně specifické mutagenese. Expres zvolených proteinů byla úspěšně detekována během *in vitro* navozené encystace. Mimo jiné byla také prokázána přirozená tvorba komplexů CWP1 s neznámým proteinem. V neposlední řadě práce uvádí do souvislosti složení stěny cysty *G. intestinalis* s ostatními komponentami cystové stěny u několika dalších parazitických prvoků.

Abstract

The process of encystation is a vital and important part of life cycles of many organisms. One of them is *Giardia intestinalis*, a significant single cell parasite of vertebrates, including man. During the process of encystation there are unusual organelles, called encystation vesicles. These serve to accumulate material for the future cyst wall.

The main proteins found in encystation vesicles that compose the cyst wall, are CWP1, CWP2 and CWP3. This work is focused on these proteins. The structure and properties of these proteins were used to study the main aim of this work, that is the identification of other proteins associated with the encystation vesicles.

In the experimental part, a system was created, that allows targeted characterization of proteins and cell compartments, by utilization of biotin ligase of *Escherichia coli*. For this system, we created specific constructs, that were successfully inserted into plasmids and into *G. intestinalis* cells. For the intention of cloning, a method of direct site mutagenesis was optimized. The expression of chosen proteins was detected successfully during the *in vitro* encystation. Aside, it was proven that CWP1 forms complexes with an unknown protein. This work relates the composition of cyst wall of *G. intestinalis* with other components identified in other parasitic protists.

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární přehled.....	2
2.1 <i>Giardia intestinalis</i>	2
2.1.1 Životní cyklus.....	2
2.1.1.1 Encystace	2
2.1.1.2 Excystace.....	3
2.2 Encystační váčky.....	5
2.2.1 Objev encystačních váček.....	5
2.2.2 Materiál cystové stěny	5
2.2.3 Struktura a vlastnosti proteinů cystové stěny	7
2.2.3.1 CWP1 a CWP2	7
2.2.3.2 CWP3	8
2.3 Komponenty cystové stěny u dalších parazitických protozoí	9
2.3.1 <i>Cryptosporidium parvum</i>	9
2.3.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	9
2.3.3 <i>Toxoplasma gondii</i>	10
2.3.4 Rod <i>Spironucleus</i>	12
2.4 In vivo značení proteinů biotinem	12
2.4.1 BirA a BAP	13
2.4.2 Promiskuitní biotinylace BioID, BioID2 a APEX.....	14
3 Cíle práce.....	16
4 Materiál a metodika	17
4.1 Organismy a jejich kultivace.....	17
4.1.1 <i>Giardia intestinalis</i>	17

4.1.2 Escherichia coli	17
4.2 Použité plasmidy	18
4.2.1 pOCT-PP2Aas.....	18
4.2.2 pONDRA.....	19
4.2.3 pJET1.2/blunt.....	20
4.3 Tvorba konstruktů a amplifikace genů	21
4.3.1 Tvorba konstruktů	21
4.3.1.1 CWP proteiny	21
4.3.1.2 BirA.....	22
4.3.2 Amplifikace genů.....	23
4.4 Izolace a klonování DNA fragmentů	25
4.4.1 Místně cílená (site-directed) mutageneze	25
4.5 Transformace bakterií.....	27
4.6 Transfekce Giardia intestinalis.....	28
4.7 Ověření lokalizace a funkčnosti komponent systému.....	29
4.7.1 Encystace Giardia intestinalis.....	29
4.7.2 SDS-PAGE	29
4.7.3 Barvení Coomassie Brilliant Blue.....	29
4.7.4 Western blot.....	29
4.7.5 Fluorescenční mikroskopie	30
4.7.5.1 Příprava preparátů	30
4.7.5.2 Fluorescenční značení	31
4.8 Chemický cross-link	32
4.9 Purifikace biotinylovaných proteinů pomocí Dynabeads®.....	32
5 Výsledky.....	35
5.1 Bioinformatická analýza proteinů cystové stěny.....	35

5.2 CWP proteiny	39
5.2.1 Amplifikace genů.....	39
5.2.2 Encystace Giardia intestinalis in vitro.....	41
5.2.3 Ověření exprese.....	41
5.3 BirA	43
5.4 Lokalizace CWP proteinů a BirA nepřímou fluorescencí.....	45
5.5 Testování optimální koncentrace cross-linkeru.....	48
5.6 Ověření funkčnosti systému pro biotinylací in vivo	51
5.7 BirA a endoplasmatické retikulum	53
6 Diskuze.....	56
6.1 Encystační váčky a CWP proteiny u G. intestinalis.....	56
6.2 Příprava konstruktů.....	56
6.3 Systém pro biotinylací in vivo.....	57
6.3.1 Exprese CWP proteinů a BirA.....	57
6.3.2 Biotinylace markeru pro encystační váčky	57
6.3.3 Buněčná lokalizace CWP proteinů a BirA	59
6.3.4 Tvorba komplexů CWP1	59
6.3.5 Encystace u ostatních diplomonád.....	60
7 Závěr.....	62
8 Seznam použitých zkratk	63
9 Seznam použité literatury.....	64

1 Úvod

Encystace je nedílnou součástí životního cyklu některých nejen parazitických organismů. Při encystaci dochází ke vzniku cysty - klidového stádia, které umožňuje přežití v nehostinném prostředí. U některých parazitických organismů také slouží k přenosu mezi hostiteli, může figurovat i jako hlavní patogenní agens. Jedním z organismů vytvářejících cysty je také *Giardia intestinalis*, významný anaerobní parazit obratlovců včetně člověka rozšířený po celém světě. U lidí způsobuje intenzivní průjemová onemocnění spojená s malabsorpcí živin. Tělo hostitele opouští se stolicí ve formě již zmíněné cysty, která může nakazit další hostitele. V současné době *G. intestinalis* také figuruje jako vynikající model pro studium encystačních procesů.

Proces encystace trvá u *G. intestinalis* přibližně 24 hodin, během kterých dochází u trofozoitů k řadě vývojových změn, ze kterých lze jmenovat například změnu tvaru buňky, fragmentaci adhezivního disku nebo dvě kola replikace jaderné DNA. Během encystace se u *G. intestinalis* také objevují zvláštní sekreční organely zvané encystační váčky, které vznikají z cisteren endoplasmatického retikula (Lanfredi-Rangel et al., 2003). Jejich funkcí je akumulace materiálu pro budoucí stěnu cysty a jeho transportu na povrch buňky.

Součástí encystačních váček a později i cystové stěny jsou tři proteiny CWP1, CWP2 a CWP3, jež slouží jako její hlavní stavební komponenty. Díky tomu, že jsou všechny tři CWP proteiny bohaté na aminokyseliny leucin a cystein, předpokládá se, že se tyto aminokyseliny účastní proteinových interakcí mezi CWP proteiny a dalšími proteinovými partnery. Zmíněný leucin v těchto proteinech tvoří motiv leucinových repetit, který se dle experimentálních dat může takových interakcí účastnit (Hehl et al., 2000). Pomocí cysteinu všechny tři CWP vytvářejí disulfidické vazby mezi sebou i s ostatními proteiny (Luján et al., 1995). Právě těchto vlastností bylo využito k řešení hlavního cíle vytyčeného v této práci, jejímž náplní bylo vytvoření systému pro biotinylyaci markerových proteinů ESV pro jejich následnou proteomickou analýzu. Literární rešerše se zabývá charakterizací cystové stěny *G. intestinalis* a popisuje strukturu a vlastnosti proteinů CWP1, 2 a 3. V neposlední řadě tato práce stručně popisuje komponenty cystové stěny u dalších parazitických protozoí.

2 Literární přehled

2.1 *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis je jednobuněčný střevní parazit patřící do skupiny Excavata, podskupiny Metamonada a do čeledi Diplomonadida. Je významným původcem střevních parazitárních onemocnění po celém světě, způsobuje např. průjemy a potíže s absorbcí lipidů. *G. intestinalis* postrádá některé orgány typické pro vyšší eukaryota, jako jsou peroxisomy, Golgiho aparát nebo klasické mitochondrie, které se u tohoto prvoka vyskytují ve formě vysoce redukováných mitosomů. Kromě mitosomů je *G. intestinalis* charakteristická také přítomností dvou jader, přísavného disku a osmi bičků – konkrétně šesti předních a dvou zadních. Díky své snadné kultivaci a osekvenovanému genomu je *G. intestinalis* dobrým modelovým organismem. Díky své fylogenetické pozici jako zástupce časně se odštěpujících skupin eukaryot je využívána jako modelový systém pro studium základních buněčných procesů a jejich evoluce. *G. intestinalis* v současné době také funguje jako vynikající model pro studium encystačních procesů (Einarsson et al., 2016).

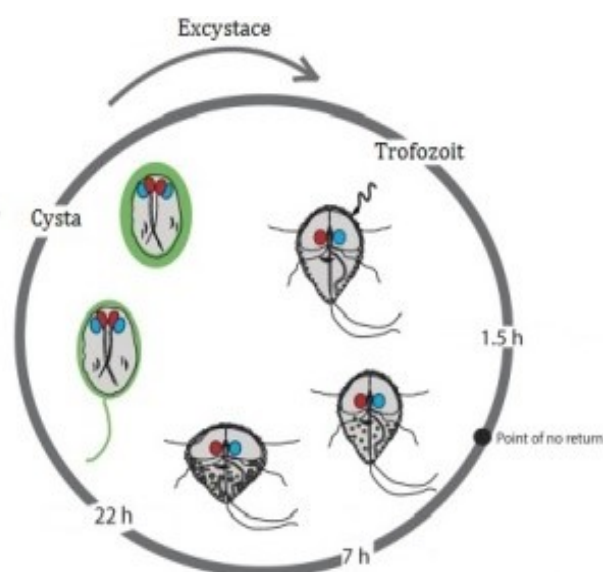
2.1.1 Životní cyklus

Během životního cyklu se *G. intestinalis* vyskytuje ve dvou stádiích – trofozoit a cysta. K nákaze dochází buď fekálně-orálním způsobem, nebo alimentární cestou, tedy požitím infekční cysty v kontaminované potravě nebo vodě. V trávicím traktu v oblasti duodena a jejunu pak dochází k excystaci. Z každé cysty vzniknou trofozoiti, kteří se posléze množí a zůstávají v lumen střeva přichycení k epitelu pomocí přísavného disku.

2.1.1.1 Encystace

Giardia intestinalis opouští tělo hostitele ve formě cyst. Encystace nastává po průchodu trofozoitů do dolních částí gastrointestinálního traktu a je vyvolána vyšší hodnotou pH a vyšší koncentrací žluči v těchto místech. Encystační proces trvá 20-24 hodin a lze ho rozdělit na ranou a pozdní fázi. Během rané fáze dochází k expresi proteinů cystové stěny a jejich transportu k buněčné membráně. Během pozdní fáze poté dochází ke změně tvaru buňky a dále pokračuje syntéza cystové stěny (Einarsson et al., 2016).

Encystující trofozoiti obecně prochází řadou vývojových změn, jejichž konečnou fází je tvorba stěny cysty. Během encystace probíhají dvě kola replikace DNA, ovšem bez cytokineze. Konečným produktem je cysta se čtyřmi tetraploidními jádry. Při encystaci dochází k již zmíněné modifikaci tvaru z kapkovitého trofozoita na oválnou cystu o rozměrech přibližně 11,6 μm \times 6,4 μm (Buchel et al., 1987). Dochází také k internalizaci bičků, fragmentaci adhezivního disku a ke vzniku encystačních váčků (ESV) (Palm et al., 2005). Schéma transformace trofozoita na dokončené cystové stádium viz obrázek 1.



Obrázek 1 - Schéma transformace *G. intestinalis* z trofozoita na dokončené cystové stádium. V době přibližně 1,5 h po začátku encystace začíná docházet k fragmentaci adhesivního disku a k indukci translace genů specifických pro encystaci. Po 7 hodinách dochází ke zvyšování translace a ke vzniku ESV, které dále zrají mezi 7-22 h po indukci encystace. V tomto časovém rozmezí rovněž dochází k rozpadu adhesivního disku a bičíků, k sekreci ESV a k formování stěny cysty. Na konci celého procesu dochází k replikaci DNA. Převzato a upraveno z (Einarsson et al., 2016).

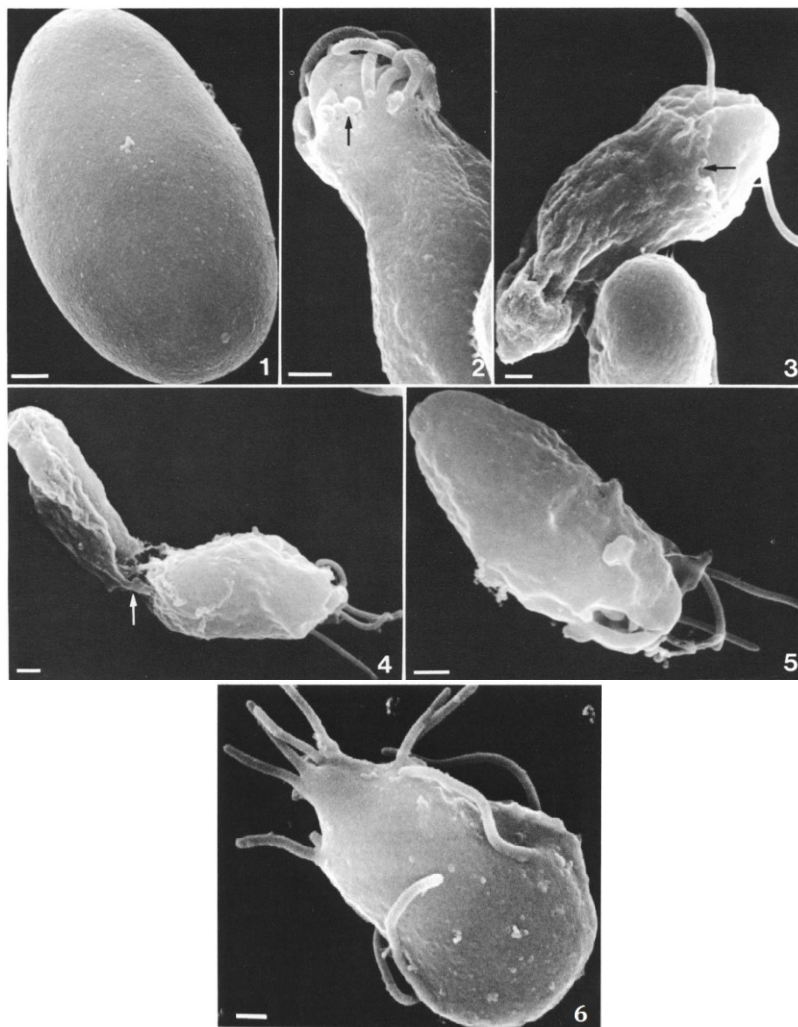
2.1.1.2 Excystace

Po požití hostitelem se infekční cysty *G. intestinalis* dostávají do jeho trávicího traktu. Při průchodu žaludkem dochází k jejich aktivaci žaludečními kyselinami při optimálním pH 1,3 - 2,7 (Bingham a Meyer, 1979). Při dosažení oblasti tenkého střeva dojde ke spuštění samotného excystačního procesu. Na pólu cysty dochází k otevření cystové stěny a vynoření prvního bičíku. Následně se otvor zvětšuje a obnažuje se celá buňka. Čerstvý excyzoit ještě nevykazuje typické morfologické znaky pro *G. intestinalis*, např. si zachovává oválný tvar, který je typický pro cystu. Ke změně tvaru dochází až po kompletním opuštění cysty. Nejprve dojde k zakulacení, poté k prodloužení a zploštění buňky, a nakonec ke zformování přísavného disku. V době 15-30 minut po excystaci prochází parazit dvěma koly buněčného dělení, jehož produktem jsou čtyři trofozoiti. Pro udržení infekce ve střevě se *G. intestinalis* dále dělí binárním dělením (Buchel et al., 1987; Smith et al., 2012). Proces excystace, stejně jako encystace, lze reprodukovat *in vitro*. Znázornění průběhu excystace viz obrázek 2.

Experimentální data naznačují, že k narušení cystové stěny *G. intestinalis* během excystace *in vitro* dochází pravděpodobně ve dvou krocích. Nejdříve dochází k degradaci cyst wall proteinů (cyst wall protein – CWP) (viz kapitola 2.2.2) prostřednictvím exogenních

serinových proteáz (např. trypsinu nebo chymotrypsinu). Následuje degradace fibril homopolymeru GalNAc (viz kapitola 2.2.2) pomocí endogenní glykohydrolázy, jelikož jsou díky proteolýze proteinů cystové stěny obnaženy (Chatterjee et al., 2010b).

G. intestinalis není jediným parazitem podstupujícím přeměnu z dormantního stádia na aktivní patogenní stádium. Proces excystace lze nalézt také např. u *Entamoeba histolytica*, kde se z čtyřjaderné cysty stávají čtyři jednojaderné améby. Oproti tomu u *Balantidium coli* se z každé cysty uvolní jen jeden trofozoit s ciliemi. Ačkoliv mezi parazity existují rozdíly v excystačním procesu, spojuje je předpoklad, že excystace probíhá většinou v tenkém střevě díky přítomnosti žaludečních kyselin a optimální hodnotě pH (Hetsko et al., 1998).



Obrázek 2 – Znárodnění průběhu excystace *G. intestinalis*. **1)** Cysta *G. intestinalis*. **2)** Otevření cystové stěny na pólu cysty. **3)** Vytlačování buňky z cysty. **4)** Nově vzniklý excyzoit. Cystová stěna je stále připevněná k parazitovi. **5)** Nově vzniklý excyzoit s patrným oválným tvarem a nezřetelnými bičíky. **6)** Finální podoba trofozoita po zakulacení, prodloužení a zploštění buňky, a po konečném zformování přísavného disku. Převzato a upraveno z (Buchel et al., 1987).

2.2 Encystační váčky

Tyto organely jsou stádiově specifické a k jejich tvorbě dochází *de novo* pouze během encystace. Pravděpodobně vznikají z modifikovaných cisteren endoplasmatického retikula (ER) (Lanfredi-Rangel et al., 2003). ESV měří zhruba 1,6 - 2,6 μm v průměru a slouží k akumulaci a posttranslačním úpravám stavebního materiálu pro stěnu cysty a k jeho exportu na povrch buňky (Reiner et al., 1989). Vlastnosti ESV, jako např. závislost jejich tvorby a zrání na Sar1 a Arf1 GTPázách nebo citlivost na Brefeldin A, který inhibuje transport proteinů mezi endoplasmatickým retikulem a Golgiho aparátem (Helms a Rothman, 1992), naznačují, že by tyto váčky mohly v buňce představovat analog Golgiho aparátu, jelikož *G. intestinalis* tuto organelu zcela postrádá (Stefanic et al., 2009).

2.2.1 Objev encystačních váček

ESV byly poprvé objeveny 80. letech 20. století. V roce 1989 byly pozorovány cytoplasmatické vesikuly, které byly viditelné ve světelném mikroskopu jako jedna z prvních morfologických změn u trofozoitů, kteří začínali proces encystace. Oproti tomu u kontrolních vzorků s neencystujícími trofozoity byly velice vzácné. Bylo zjištěno, že tyto nově objevené váčky se neshodují s již dříve objevenými periferními vakuolami, které podkládají buněčnou membránu a mají odlišnou strukturu pod transmisním elektronovým mikroskopem. Oproti tomu nově objevené ESV se zobrazovaly jako elektrondenzní struktury (Reiner et al., 1989).

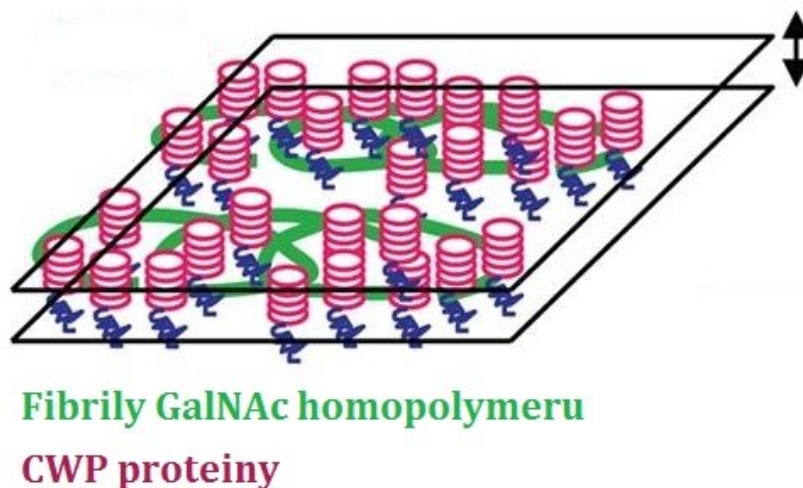
2.2.2 Materiál cystové stěny

Stěna cysty *G. intestinalis* je tvořena vnější vláknitou částí a dvěma vnitřními membránami (Chávez-Munguía et al., 2004). Je nepropustná pro malé molekuly a také poměrně tenká, její tloušťka se pohybuje mezi 0,3 - 0,6 μm (Chatterjee et al., 2010b). Stěna obsahuje tři hlavní stavební proteiny, a to CWP 1, 2 a 3, které jsou rovněž přítomny i v ESV. K syntéze těchto proteinů dochází na membráně endoplasmatického retikula. V rámci ESV jsou CWP proteiny modifikovány, a to na dvě odlišné frakce - periferní rozpustnou část a kondenzované jádro, které je touto rozpustnou částí obklopené (Konrad et al., 2010). Kromě tří CWP proteinů se encystace účastní ještě membránový „high cysteine non-variant cyst protein“ (HCNC), který se nachází na periférii cyst a také v endoplasmatickém retikulu. Sekvence proteinu HCNC se v mnoha ohledech podobá sekvenci pro VSP proteiny (variable surface protein), nicméně svým časovým profilem exprese a buněčným transportem má blíže k proteinům cystové stěny *G. intestinalis* (Davids et al., 2006). Tento protein by pravděpodobně mohl fungovat jako možná vazba mezi vlastní stěnou cysty a buněčným povrchem (Morf et al., 2010).

Proteinová složka zabírá asi 40 % z materiálu robustní cystové stěny. Zbývajících 60% tvoří fibrily polymeru $\beta(1-3)$ -N-acetylgalaktosaminu (GalNAc), se kterými CWP proteiny tvoří komplex (Sun et al., 2003). Struktura homopolymeru je založena na paralelních

řetězcích $\beta(1-3)$ -N-acetylgalaktosaminu, které jsou pravděpodobně navzájem propojené pomocí vodíkových můstků nebo kovalentních vazeb. Fibrily homopolymeru GalNAc mají tloušťku 5 nm, ve stěně cysty jsou vzájemně propojené a zvlněné. Díky navázaným komplexům CWP proteinů, které pokrývají povrch jednotlivých vláken, vytvářejí mřížku stlačenou do úzké roviny. Například protein CWP1, který ve své struktuře nese N-terminálně uložené leucinové repetice, obsahuje v této oblasti také lektinovou doménu, která je specifická pro fibrily homopolymeru GalNAc a dokáže je vázat (Chatterjee et al., 2010b). Schéma struktury cystové stěny je znázorněno na obrázku 3. Biosyntéza homopolymeru GalNAc je iniciována konverzí D-glukóza-6-fosfátu na D-glukosamin-6-fosfát za pomoci enzymu glukóza-6-fosfát izomeráza. Indukce tohoto enzymu probíhá pouze během encystace buňky (Van Keulen et al., 1998). Sekrece $\beta(1-3)$ -N-acetylgalaktosaminu probíhá za pomoci speciálních váčků odlišných od ESV (Midlej et al., 2013).

Experimentální výsledky ukazují, že všechny CWP proteiny u *G. intestinalis*, které jsou navázané na fibrily homopolymeru GalNAc, přispívají k výše zmíněným charakteristickým vlastnostem cystové stěny (nepropustnost a malá tloušťka). Při deproteinaci fibril GalNAc byla cystová stěna podstatně silnější a také propustná pro malé molekuly. Po deproteinaci byly cysty *G. intestinalis* také méně křehké a nemohly být rozbity pomocí sonikace, což je za normálních podmínek běžně možné. Deproteinované fibrily GalNAc homopolymeru byly navíc schopné udržovat dutý sférický tvar, který je pro cystovou stěnu typickým (Chatterjee et al., 2010b).



Obrázek 3 – Model struktury stěny cysty u *Giardia intestinalis*. Zvlněné fibrily homopolymeru GalNAc jsou stlačeny do úzké roviny pomocí navázaných CWP proteinů. Převzato z (Chatterjee et al., 2010b).

2.2.3 Struktura a vlastnosti proteinů cystové stěny

2.2.3.1 CWP1 a CWP2

Gen pro CWP1 je v genomu *G. intestinalis* přítomen pouze v jedné kopii. Transkripty tohoto genu lze v nízké hladině detekovat i u stádia trofozoitů, nicméně po indukci encystace začnou dramaticky narůstat, a to zhruba 100x, přičemž maximální hodnoty dosahují mezi 5. – 24. hodinou od začátku encystace (Mowatt et al., 1995a). Sekvence genu pro CWP1 poukazuje na to, že se jedná o protein, který je bohatý na leucin a stejně jako CWP2 obsahuje pět tandemových kopií leucinových repetitiv (LRRs). Každá z nich je složena z 24 aminokyselin. Funkcí tohoto motivu je podíl na protein-proteinových interakcích, přičemž experimentální data naznačují jeho možnou účast při tvorbě finální vláknité extracelulární matrix během zrání sekretovaného materiálu cystové stěny (Hehl et al., 2000). Na N-konci CWP1 se nachází hydrofobní signální peptid, který slouží jako signál, směřující CWP1 na sekreční dráhu zahrnující jeho lokalizaci v ESV a vyloučení do stěny cysty. Tento signální peptid lze stejně jako leucinové repetice nalézt také u proteinu CWP2. Oba proteiny mají dále společnou přítomnost 18-19 cysteinových zbytků v sekvenci genu, které se účastní tvorby disulfidických vazeb, a to již 5 minut po dokončení jejich syntézy (Luján et al., 1995).

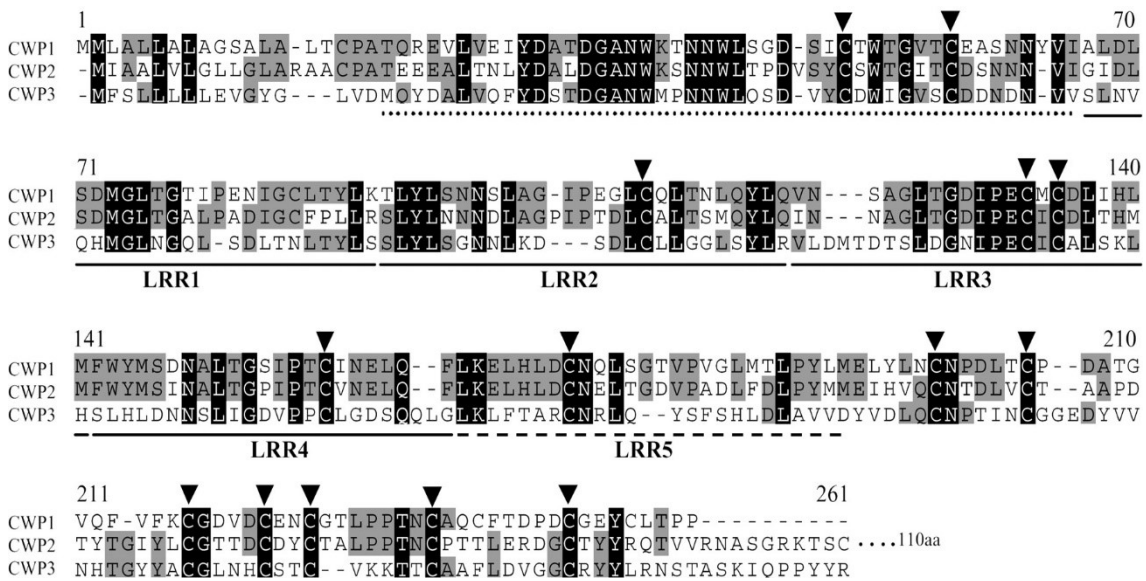
Ačkoliv mají CWP1 a CWP2 společný vysoký stupeň sekvenční identity, CWP2 obsahuje na rozdíl CWP1 C-koncovou extenzi bohatou na bazické aminokyseliny, ze které se při procesování odštěpuje peptid o velikosti 13 kDa (Luján et al., 1995). Podle experimentálních výsledků je právě tato extenze nezbytná pro biogenezi ESV, nicméně sama o sobě nestačí k jejímu spuštění. K tomu jsou pravděpodobně tedy potřebné i další domény ostatních CWP. CWP2 je zřejmě navíc klíčovým regulátorem tvorby ESV, protože působí jako agregační faktor pro CWP1 a CWP3 (Gottig et al., 2006a).

V roce 2016 byl proveden první úspěšný kompletní knock-out u *G. intestinalis*. Pomocí již dříve zavedeného Cre/loxP systému (Sternberg et al., 1981; Wampfler et al., 2014) byly odstraněny všechny čtyři kopie genu pro CWP1. Výsledky těchto experimentů dokazují, že proces diferenciaci trofozoita na cystu je nezávislý na CWP1. Ten je ale naopak nezbytný pro životaschopnost cyst a jejich odolnost vůči okolnímu prostředí. Z výsledků vyplývá, že po knock-outu jsou buňky sice dále schopny encystace, nicméně již nedokáží vytvořit cystovou stěnu, ani ESV potřebné pro její tvorbu. Buňky takto experimentálně vytvořeného fenotypu nazvaného jako „pseudocysta“ vykazují morfologické znaky charakteristické pro vyvíjející se cysty, včetně typického oválného tvaru. V buňkách jsou také přítomna čtyři jádra a dochází k remodelaci cytoskeletu, včetně resorpce bičíku a fragmentace adhezivního disku. Kromě neschopnosti vytvořit ESV nemohou upravené buňky také dopravit CWP2 dále než do endoplasmatického retikula. CWP2 je posléze pravděpodobně degradován, a to v době mezi 14-18 hodinami encystačního procesu. Tyto

výsledky poukazují na to, že export CWP proteinů z ER je kooperativní proces, který vyžaduje přítomnost všech komponent (Ebnetter et al., 2016).

2.2.3.2 CWP3

Existence třetího proteinu cystové stěny *G. intestinalis* byla potvrzena v roce 2003. CWP3 je stejně jako CWP1 a CWP2 kyselý protein a skládá se z 247 aminokyselin. I CWP3 vykazuje do určité míry podobnost s CWP1 a CWP2. Například 44-aminokyselinová N-koncová oblast CWP3 je z 52% podobná stejné oblasti proteinů CWP1 a CWP2. Zajímavé je, že všech 14 cysteinových zbytků, které jsou ve struktuře CWP3 přítomny, je ve stejných pozicích vůči cysteinům CWP1 a CWP2. CWP1 a CWP2 mají však o několik dalších cysteinů více. Na rozdíl od prvních dvou proteinů cystové stěny má CWP3 pouze čtyři kompletní LRR. Deleční analýzou bylo prokázáno, že všechny LRR jsou nezbytné pro cílení CWP3 do ESV a ke stěně cisty. Celkově nesou oblasti LRR CWP3 pouze 34-36% identitu s CWP1 a CWP2, přičemž vzájemná identita CWP1 a CWP2 je 61 % (Luján et al., 1995; Mccaffery et al., 2003). Sekvenční srovnání všech tří CWP proteinů je znázorněno na obrázku 4.



Obrázek 4: Sekvenční alignment CWP proteinů *G. intestinalis*. Aminokyseliny identické u všech tří CWP jsou znázorněny černě. Šedě jsou označeny aminokyseliny, které jsou stejné pouze u dvou CWP. Umístění čtyř úplných LRR je podtrženo souvislou čarou, pátá LRR, která je u CWP3 nekompletní, je podtržena přerušovaně. Trojúhelníky značí umístění 14 cysteinových zbytků CWP3, které jsou vůči cysteinům CWP1 a CWP2 v konzervované poloze. Tečkováním je označena 44-aminokyselinová oblast, která vykazuje vysokou míru sekvenční identity u všech tří CWP. Převzato z (Sun et al., 2003).

2.3 Komponenty cystové stěny u dalších parazitických protozoí

G. intestinalis není jediným parazitickým prvokem, v jehož životním cyklu se objevuje infekční a někdy také diagnostické stádium cysty nebo oocysty, která na rozdíl od cysty vzniká sexuálním rozmnožováním a obsahuje zygotu. Mezi další takové parazity patří například *Entamoeba histolytica*, *Toxoplasma gondii* nebo *Cryptosporidium parvum*. Hlavními komponenty cystové stěny jsou u těchto vybraných zástupců proteiny a polysacharidy. Chitin pro *E. histolytica* (Arroyo-Begovich et al., 1980) a $\beta(1-3)$ -glukan pro *T. gondii* (Bushkin et al., 2012). Ve stěně oocysty *C. parvum* nebyl dosud žádný polysacharid nalezen (Samuelson et al., 2013). U *T. gondii* a *C. parvum* lze nalézt také lipidy. Zatímco *G. intestinalis*, *E. histolytica* a *C. parvum* mají pouze jedno cystové stádium, *T. gondii* za svůj život projde stádiem oocysty, sporocysty a tkáňové cysty v mozku a svalech teplokrevných živočichů. Srovnání struktury stěn cyst nebo oocyst u těchto vybraných parazitů znázorněno na obrázku 5.

2.3.1 *Cryptosporidium parvum*

Cryptosporidium parvum je celosvětově významný střevní parazit člověka způsobující průjemy, který patří mezi jednohostitelské kokcidie z kmene Apicomplexa. Sférická oocysta *C. parvum*, kterou obklopuje jedna vícevrstvá stěna, ukrývá celkem čtyři sporozoity. Vnitřní vrstva cystové stěny obsahuje unikátní „cryptosporidium oocyst wall proteiny“ (COWP). Doposud byla u *C. parvum* prokázána přítomnost COWP1 a COWP8 (Chatterjee et al., 2010a). Tyto proteiny zaujímají ve stěně oocysty strukturní roli, jelikož jsou mezi sebou vzájemně propojeny pomocí disulfidických vazeb, a tím pravděpodobně přispívají k její tuhosti (Spano et al., 1997). V sekvenci COWP proteinů lze nalézt polymorfní repetice bohaté na aminokyseliny cystein a histidin (Templeton et al., 2004). Právě cystein je obsažen ve dvou strukturních motivech typických pro kmen Apicomplexa a označovaných jako domény typu I a II (Spano et al., 1996; Templeton et al., 2004). Strukturní doména typu I byla nalezena také u *T. gondii*, u níž lze nalézt homolog k COWP1 označovaný jako TgOWP1 (Templeton et al., 2004) (viz kapitola 2.3.3). Poměrně jednoduché uspořádání proteinů v cystové stěně *C. parvum* (složené převážně z COWP proteinů) je do určité míry podobné struktuře ve stěně cysty *G. intestinalis* (viz kapitola 2.2) (Chatterjee et al., 2010a).

2.3.2 *Entamoeba histolytica*

Dalším neméně významným parazitickým prvokem je *Entamoeba histolytica*, původce amébové dyzenterie. Stejně jako u *G. intestinalis* se v životním cyklu *E. histolytica* objevuje čtyřjaderná cysta, která ale na rozdíl od ní excystuje až v tlustém střevě. Jelikož encystaci *in vitro* v axenické kultuře *E. histolytica* se doposud nepodařilo optimalizovat, jako model pro studium její cystové stěny se používá příbuzný druh parazitující u plazů - *Entamoeba invadens*, která encystuje ochotněji (López-Romero a Villagómez-Castro, 1993). Cystová stěna entaméb má jednu vrstvu a stejně jako u *G. intestinalis* obsahuje pouze jediný

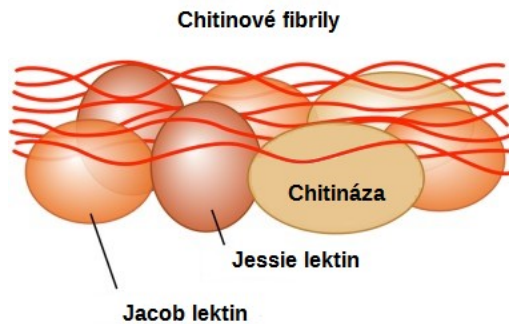
sacharidový polymer. Jedná se o chitin složený z vláken $\beta(1-4)$ -N-acetylglukosaminu (GlcNAc) (Arroyo-Begovich et al., 1980). Pomocí metody hmotnostní spektrometrie byly analyzovány purifikované stěny cyst *E. invadens*, ve kterých byly objeveny pouze tři proteiny, a to chitináza a dva typy lektinů - „Jacob“ a „Jessie“ (Frisardi et al., 2000; Van Dellen et al., 2006). „Jacob“ patří mezi nejvíce zastoupené proteiny v cystové stěně celého rodu *Entamoeba*, u *E. invadens* je přítomen v sedmi kopiích a u *E. histolytica* ve dvou. „Jacob“ lektiny váží chitin a skládají se z pěti domén, z nichž každá obsahuje šest cysteinových zbytků (Frisardi et al., 2000; Ghosh et al., 2010; Van Dellen et al., 2002; Van Dellen et al., 2006). Jejich funkcí je pravděpodobně zesíťování chitinových vláken. Oproti tomu „Jessie“ lektiny fungují jako jakási „malta“ a činí stěnu cysty nepropustnou pro malé molekuly. Role chitináz je v remodelaci cystové stěny (Chatterjee et al., 2009).

2.3.3 *Toxoplasma gondii*

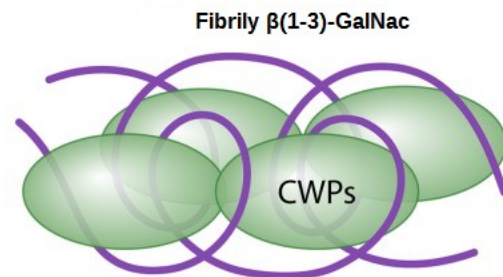
Toxoplasma gondii, stejně jako výše uvedené *C. parvum* (kapitola 2.3.1), patří do kmene Apicomplexa, a stejně tak se v jejím vývojovém cyklu objevuje stádium oocysty. Kromě oocysty, infekčního stádia přenášeného kočkami, se v životním cyklu *T. gondii* navíc objevují stádia sporocysty a tkáňové cysty. Jakmile se *T. gondii* dostane do vnějšího prostředí, vytvoří sporulované oocysty se dvěma sporocystami uvnitř. Každá oocysta obsahuje čtyři sporozoity, kteří mohou dále infikovat člověka a další teplotokrevné obratlovce, v nichž se mohou poté tvořit tkáňové cysty.

Stěna oocysty *T. gondii* se skládá ze dvou vrstev. Vnitřní vrstva má trámčitou strukturu, což naznačuje, že může fungovat jako „lešení“ podpírající vnější vrstvu oocystové stěny. Zmíněná kostra vnitřní vrstvy je tvořena vlákny $\beta(1,3)$ -glukanu (Bushkin et al., 2012). Nejhojnější složkou oocystové stěny *T. gondii* jsou ale proteiny, které zaujímají až 90% hmoty a mohou se vyskytovat v obou vrstvách stěny oocysty (Dumètre et al., 2013; Fritz et al., 2012; Possenti et al., 2010). Ve stěnách oocyst *T. gondii* byla nalezena skupina sedmi proteinů bohatých na aminokyselinu cystein, které byly nazvány jako „TgOWP“ 1-7. Skupina TgOWP proteinů se v mnohém podobá COWP proteinům u *C. parvum* (Possenti et al., 2010; Templeton et al., 2004) (viz kapitola 2.3.1). Společně s COWP proteiny sdílejí typickou strukturu založenou na tandemových duplikacích šesti motivů bohatých na cystein, které se velmi podobají strukturní doméně typu I (viz kapitola 2.3.1) popsané u COWP1 *C. parvum*. Na rozdíl od COWP proteinů ale žádný protein ze skupiny TgOWP ve své struktuře neobsahuje úseky bohaté na histidin (Possenti et al., 2010). Kromě TgOWP proteinů bylo ve stěně oocysty *T. gondii* nalezeno ještě několik dalších proteinů bohatých na tyrosin (Fritz et al., 2012). Zajímavé je, že kromě proteinů, obsahuje stěna oocysty *T. gondii* také vrstvu lipidů, což ji odlišuje od jiných parazitů přenášených fekálně-orální cestou, jako je např. *G. intestinalis* nebo *E. histolytica*. Mezi nejpočetnější lipidy nalezené ve stěně oocyst *T. gondii* patří triglyceridy, které se mezi sebou liší délkou řetězce mastných kyselin a různým stupněm nasycenosti nebo oxidace. Zastávají pravděpodobně strukturní roli (Bushkin et al., 2013).

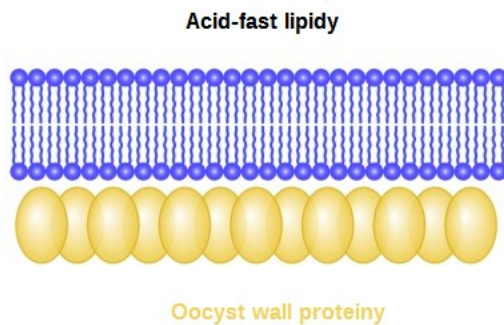
A. Entamoeba



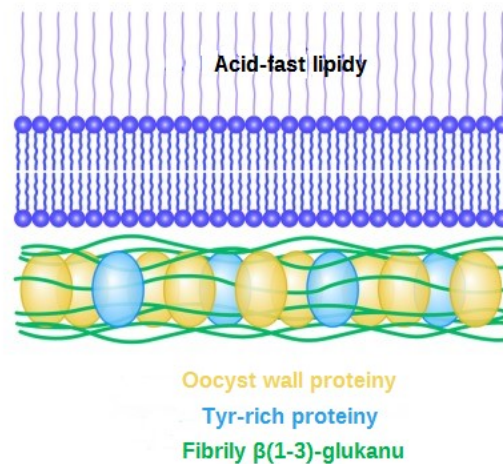
B. Giardia



C. Cryptosporidium



D. Toxoplasma



Obrázek 5: Srovnání struktury cyst u *Entamoeba* a *Giardia* a oocyst u *Cryptosporidium* a *Toxoplasma*. **A)** Cystová stěna *Entamoeba* se skládá z vláken chitinu a tří lektinů vázících chitin – chitináza, „Jacob“ a „Jessie“. **B)** Stěna cysty *Giardia* je složena ze tří CWP proteinů, které také fungují jako lektiny a váží se na zvlněné fibrily polymeru $\beta(1,3)$ -GalNac. **C)** Stěna oocysty u *Cryptosporidium* obsahuje vrstvu kyselých lipidů a vrstvu COWP proteinů. **D)** U *Toxoplasma* se cystová stěna skládá z vrstvy kyselých lipidů a vrstvy obsahující vlákna $\beta(1,3)$ -glukanu, TgOWP proteiny a proteiny bohaté na aminokyselinu tyrosin. Převzato a upraveno z (Samuelson et al., 2013).

2.3.4 Rod *Spironucleus*

Posledním zmiňovaným parazitickým prvokem, který tvoří stádium cysty, je *Spironucleus salmonicida* - blízký příbuzný *G. intestinalis* z čeledi Diplomonadida. *S. salmonicida* způsobuje systémové infekce u lososovitých ryb (Jørgensen a Sterud, 2006). Kromě fylogenetické příbuznosti ho s *G. intestinalis* spojuje podobnost mechanismů fungování genů zapojených do procesu encystace. U *S. salmonicida* bylo také nalezeno pět enzymů potřebných pro tvorbu polymeru GalNAc a také rodina osmi vysoce si podobných proteinů, které vykazují homologii s CWP1. Dále byly nalezeny další tři proteiny, které by mohly sloužit jako proteiny cystové stěny. Patří mezi ně i potenciální homolog k CWP2, jelikož stejně jako on vykazuje prodloužení na C-konci, ačkoliv u *S. salmonicida* je podstatně kratší. Ačkoliv u tohoto prvoka nebylo stádium cysty nikdy detekováno, srovnávací genomová analýza naznačuje jeho přítomnost v životním cyklu. Tuto hypotézu podporují i experimentální výsledky dokazující funkčnost pravděpodobných proteinů cystové stěny *S. salmonicida* při vložení do genomu *G. intestinalis* (Xu et al., 2014). U těchto dvou parazitů samozřejmě lze nalézt také rozdíly, a to nejen morfologické, ale i např. v metabolismu nebo v regulaci transkripce.

Na rozdíl od *S. salmonicida* je životní stádium cysty známé u suchozemských zástupců tohoto rodu – *S. muris* a *S. meleagridis*. Nalezené cysty u rodů *Spironucleus* a *Giardia* se v mnohém podobají. Například přítomností 2-4 jader, axonem bičíků nebo zřetelnou cystovou stěnou. Ve srovnání s cystami giardií jsou cysty *S. muris* podstatně menší a jsou tenčí, ačkoliv na ultrastrukturální úrovni jsou si velmi podobné. Mezi další odlišnosti cyst *S. muris* patří přítomnost flagelární pochvy nebo četných glykogenových rozet (Januschka et al., 1988; Wood a Smith, 2005).

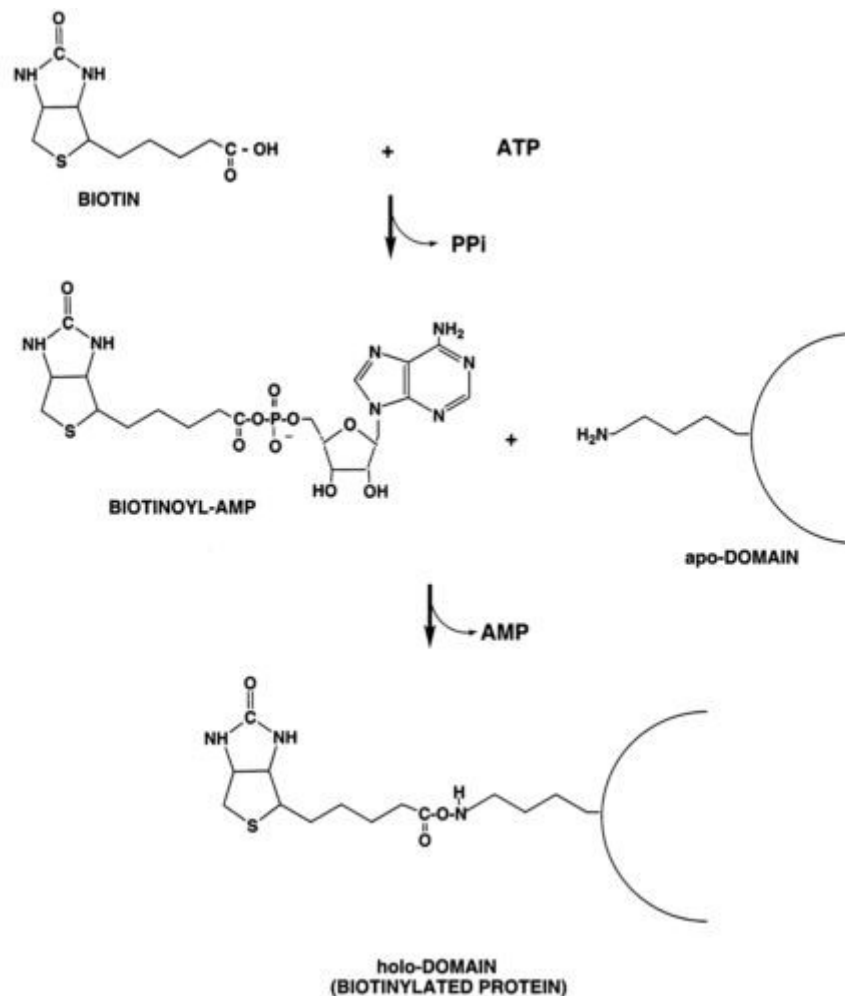
2.4 *In vivo* značení proteinů biotinem

Sledování protein-proteinových interakcí představuje významnou položku v porozumění komplexním biologickým procesům. V průběhu let byly vyvinuty různé biochemické i genetické techniky založené na koprecipitaci studovaného proteinu s jeho interakčními partnery. Nicméně většina z nich se potýká se zásadními omezeními, mezi které patří např. malá síla a nízká specifita jednotlivých interakcí (Roux et al., 2012). Vazba biotinu s avidinem nebo streptavidinem je nejsilnější známou nekovalentní interakcí mezi ligandem a proteinem. Pokud se vazba jednou vytvoří, je odolná nejen vůči teplotě nebo extrémním hodnotám pH, ale i proti působení organických rozpouštědel a jiných denaturačních činitelů. Právě díky těmto vlastnostem byly vyvinuty metody, které využívají interakci biotinu s jeho vazebnými proteiny pro purifikaci proteinů z jeho přirozeného prostředí. Za účelem získání poznatků o buněčných procesech jsou proto nyní často využívány metody biotinylace sledovaných proteinů *in vivo* a jejich následné izolace s interagujícími proteiny pomocí imobilizovaného streptavidinu. Stabilní vazba konjugátů

streptavidinu na biotinylované proteiny pak navíc umožňuje i jeho snadnou detekci v buněčných frakcích či pro mikroskopické analýzy (Howarth a Ting, 2008). Streptavidin má formu tetrameru obsahující vazebná místa pro biotin, přičemž každý jeho monomer může vázat jednu molekulu biotinu. Ve výsledku tedy streptavidin může vázat maximálně čtyři molekuly biotinu (Green, 1990). Většina metod na *in vivo* biotinylacii využívá „divokou“ nebo opravenou verzi biotin ligázy (BirA) získané z bakterie *Escherichia coli* (Howarth a Ting, 2008).

2.4.1 BirA a BAP

Proteinové biotin ligázy se vyskytují napříč všemi třemi oblastmi života (Ye et al., 2016). U bakterie *E. coli* lze nalézt pouze jedinou, a to BirA. Je to enzym katalyzující kovalentní připojení biotinu ke svým příbuzným akceptorovým proteinům, které hrají klíčovou roli v metabolických reakcích této bakterie (Chakravartty a Cronan, 2012). Specifická biotinylace pomocí BirA je velmi efektivní způsob pro detekci proteinů pomocí metody western blot, a také pro jejich účinnou purifikaci. Metoda funguje na principu fúze genu pro vybraný protein s rozpoznávací sekvencí o délce 15 aminokyselin, známou také jako „Biotin Acceptor Peptide“ (BAP) či Avitag. Biotin ligáza poté katalyzuje kovalentní připojení molekuly biotinu k postrannímu řetězci lyzinu v BAP akceptorovém peptidu, to vše za využití jedné molekuly ATP (Beckett et al. 1999; Howarth a Ting, 2008). Podrobné schéma reakce viz obrázek 6.



Obrázek 6: Mechanismus fungování biotin ligázy. BirA nejprve katalyzuje napadení P α na ATP atomem kyslíku patřícímu biotin-karboxylátu, za vzniku biotinoyl-AMP (také nazývaný biotinoyl-adenylát) a pyrofosfátu. Biotinoyl-AMP zůstává navázán v aktivním místě. Za přítomnosti apo-formy akceptorového peptidu je uhlíkový atom biotinoyl-AMP napaden nukleofilní aminoskupinou z právě modifikovaného lysinu. To má za následek zformování amidové vazby mezi biotinem a postranním řetězcem lysinu a také vznik AMP. Jakmile je amidová vazba jednou vytvořena, biotin zůstává k molekule připojen po celou dobu její životnosti. Převzato z (Chapman-Smith a Cronan, 1999).

2.4.2 Promiskuitní biotinylace BioID, BioID2 a APEX

Nicméně i metoda biotinylace proteinů má své nevýhody. V případě BirA je jí přílišná selektivita na substrát. BirA totiž dokáže specificky biotinylovat pouze akceptorový peptid BAP, s použitím této metody je tedy možné identifikovat a izolovat pouze interakční partnery proteinu zfúzaného s BAP-tagem. Proto byla vyvinuta metoda BioID (proximity-dependent biotin identification) pro screening potenciálních proteinových interakcí v přirozeném buněčném prostředí, založená na proximitní buněčné biotinylaci. BioID využívá promiskuitní mutantní biotin ligázu (vnesená mutace do BirA), která dokáže

nespecificky biotinylovat všechny proteiny ve svém blízkém okolí (Roux et al., 2012). Biotinylované proteiny mohou být posléze izolovány a identifikovány obvyklými způsoby, jakými je izolace pomocí kuliček s navázaným streptavidinem a identifikace pomocí hmotnostní spektrometrie. Podle předchozích výsledků naší laboratoře není BioID u *G. intestinalis* dostatečně aktivní pro provádění takových studií (nepublikovaná data).

Později byla vytvořena také metoda BioID2 využívající novou menší promiskuitní biotin ligázu, čímž by mělo být docíleno lepšího cílení fúzních proteinů. BioID2 také vyžaduje podstatně méně biotinu než BioID a navíc byla u BioID2 zjištěna vyšší účinnost biotinylace než u BioID, což umožňuje detekci proteinů, které byly doposud odolné vůči biotinylaci původní biotin ligázou (Kim et al., 2016).

Biotinylaci proteinů v buňkách ale neumožňují pouze biotin ligázy. Další možností je použití enzymu APEX – geneticky upravené askorbát peroxidázy, pomocí které je možné značení proteinů v konkrétních buněčných kompartmentech živých buněk. Stejně jako promiskuitní biotin ligázy dokáže APEX biotinylovat blízké proteiny ve svém okolí. Biotinylace zde probíhá za pomoci přidání biotin-fenolu jako donoru elektronů. Po jeho přidání do média dochází k navázání biotinu na proteiny v blízkém okolí APEXu (Rhee et al., 2013).

3 Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo izolovat a identifikovat proteiny asociované s encystačními váčky parazitického prvoka *Giardia intestinalis*.

Praktické cíle:

1. Vytvoření konstruktů pro *in vivo* biotinylation proteinů encystačních váček.
2. Optimalizace encystace *G. intestinalis in vitro*.
3. Biotinylation markeru pro encystační váčky.
4. Izolace a identifikace proteinů asociovaných s encystačními váčky.

4 Materiál a metodika

4.1 Organismy a jejich kultivace

4.1.1 *Giardia intestinalis*

Ve veškerých pokusech byli použiti trofozoiti nebo cysty *Giardia intestinalis* kmene WB1 (ATCC 30957). Buňky byly kultivovány při 37 °C v médiu TYI-S-33 (Keister, 1983), do kterého bylo přidáno 10% hovězí sérum (Gibco). Po transfekci buněk bylo médium obohaceno ještě o selekční antibiotika, puromycin (Gold biotechnology) o koncentraci 10mg/ml a/nebo geneticin (Gold biotechnology) o koncentraci 200mg/ml.

4.1.2 *Escherichia coli*

Pro namnožení vytvořených plasmidů byly použity buňky bakterie *Escherichia coli* kmene XL-1 blue. Transformace byla provedena pomocí tepelného šoku (42 °C, 45 s) a buňky byly dále kultivovány ve 37 °C v SOC médiu s přidáním selekčním antibiotikem – ampicilinem (Sigma) o koncentraci 100µg/ml.

Složení SOC média:

Trypton	2 g
Yeast Extract	0,5 g
NaCl	0,058 g
250 mM KCl	1 ml

Všechny složky byly naváženy a rozpuštěny. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 7 a množství doplněno do 100 ml. Roztok byl sterilizován pomocí autoklávu. Po vychlazení bylo navíc přidáno:

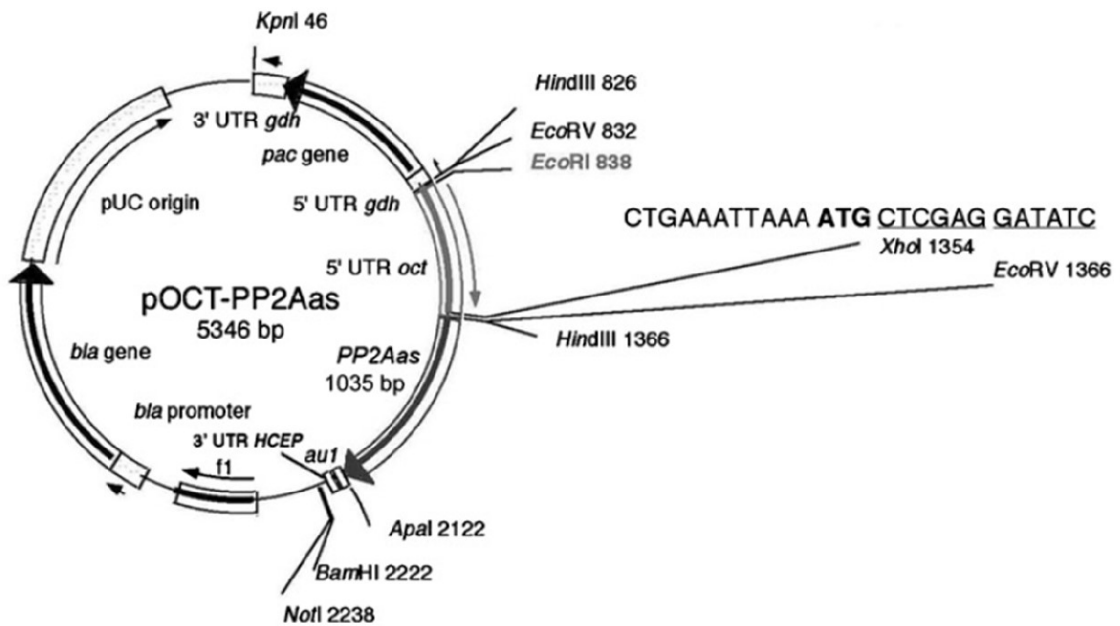
20% sterilní glukóza	1,8 ml
2 M sterilní MgCl ₂	0,5 ml

4.2 Použité plasmidy

Pro expresi proteinů CWP1 a CWP3 v *G. intestinalis* byly použity dva kompatibilní plasmidy - pOCT-PP2Aas (Lauwaet et al., 2007), který nese v naší laboratoři pracovní označení „pTG“ (viz obrázek 7), a pONDRA (viz obrázek 8), který byl získán modifikací plasmidu pRAN-neoGDHluc (Dolezal et al., 2005). Použití těchto dvou plasmidů umožnilo koexpresi dvou proteinů zároveň. Pro protein CWP2 byl použit plasmid pJET1.2/blunt (viz obrázek 9).

4.2.1 pOCT-PP2Aas

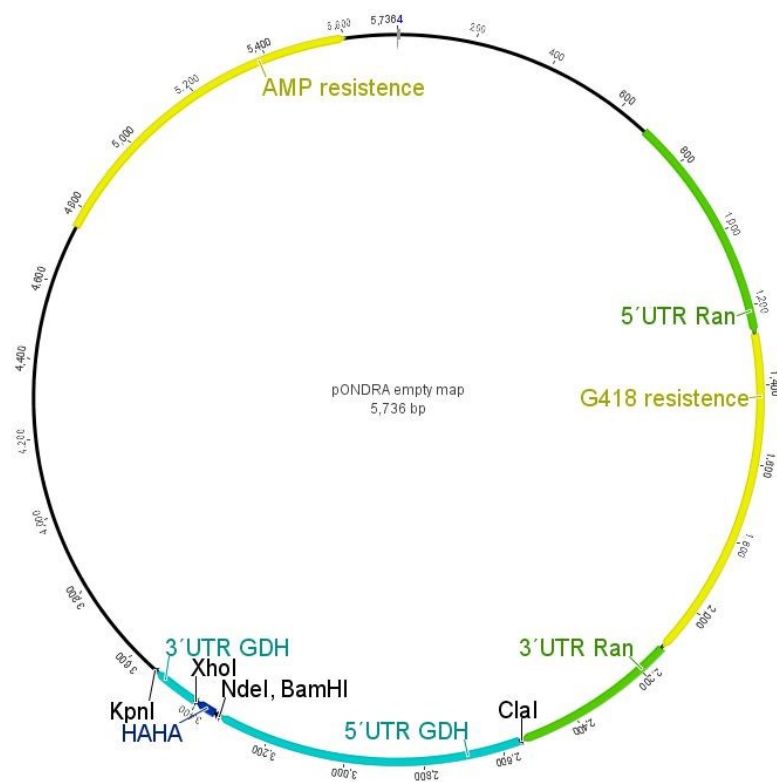
Plasmid disponuje rezistencí na selekční antibiotika ampicillin a puromycin. Pro vložení námi vytvořeného konstruktů byla použita restriční místa **EcoRV** a **ApaI**. Plasmid má velikost 5346 bp.



Obrázek 7: Plasmid pOCT-PP2Aas a jeho vyznačená restriční místa. Převzato z (Lauwaet et al., 2007).

4.2.2 pONDRA

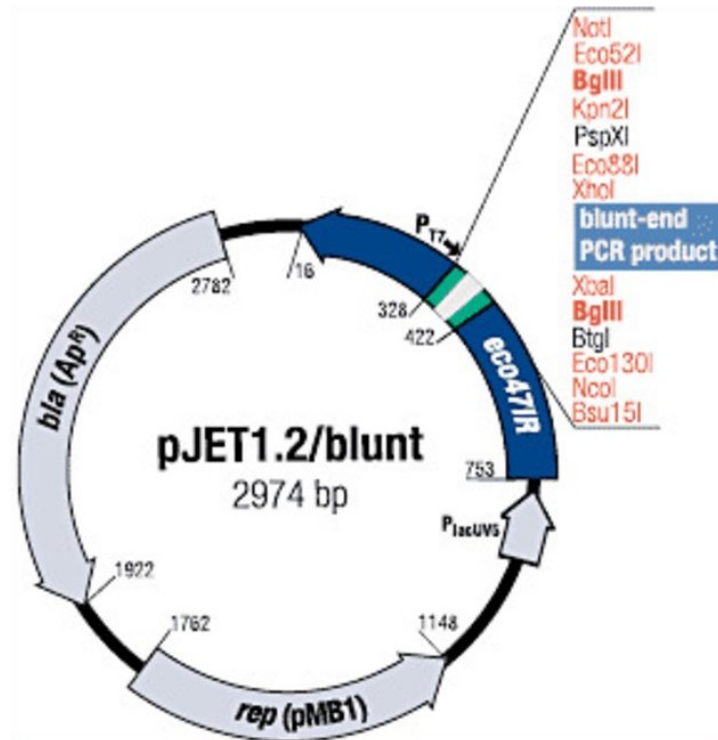
Tento plasmid obsahuje rezistenci na selekční antibiotika ampicillin a G418. Námi vytvořené konstrukty byly v případě proteinů CWP1 a CWP3 vkládány mezi restrikční místa **ClaI**, **XhoI**. V případě proteinu CWP2 byl konstrukt do plasmidu zaklonován s využitím restrikčních míst **ClaI** a **BamHI**. V konstruktu pro expresi proteinu BirA byla použita restrikční místa **NdeI**, **BamHI**. Velikost plasmidu je 5736 bp.



Obrázek 8: Plasmid pONDRA a jeho vyznačená restrikční místa.

4.2.3 pJET1.2/blunt

Plasmid nese rezistenci na selekční antibiotikum ampicilin a klonování do něj probíhá za použití insertu s tupými konci DNA sekvence. Plasmid má velikost 2974 bp.



Obrázek 9: Plasmid pJET1.2/blunt a jeho vyznačená restrikční místa. Převzato z oficiálních webových stránek společnosti Thermo Scientific.

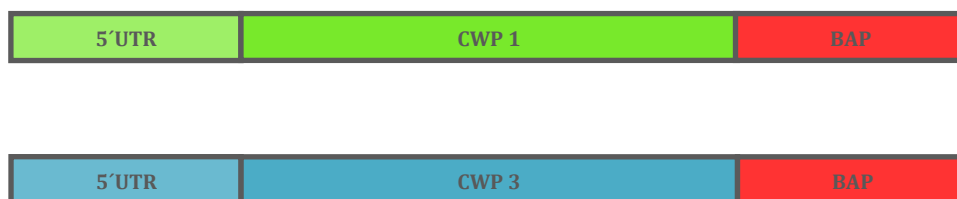
4.3 Tvorba konstruktů a amplifikace genů

4.3.1 Tvorba konstruktů

4.3.1.1 CWP proteiny

Pro vyvolání exprese byly pro protein CWP1 vytvořeny dva téměř identické konstrukty lišící se pouze v použitých vektorech, aby mohla být zvolena jejich nejvhodnější kombinace. Byly vybrány dva komplementární vektory umožňující expresi dvou proteinů najednou, a to pTG a pONDRA. Pro CWP2 a CWP3, které byly připravovány později, byl po předchozích zkušenostech připraven vždy jen jeden konstrukt, který byl následně vložen do vektoru pONDRA.

K sekvenci pro proteiny CWP1 a CWP3 byla přidána sekvence pro 5'UTR oblast dlouhá 150 párů bází a na 3' konec byla přidána sekvence pro BAP-tag, který byl nezbytný pro jejich biotinylacii (viz kapitola 2.4). Pro klonování do vektoru pONDRA byla použita restriční místa **ClaI** a **XhoI**, pro klonování do vektoru pTG pak **EcoRV** a **ApaI**. Schéma použitých konstruktů viz obrázek 10.



Obrázek 10: Schéma použitých konstruktů pro CWP1 a CWP3.

Při tvorbě konstruktů pro protein CWP2 bylo přihlédnuto k faktu, že u něj dochází k proteolytickému odštěpení části sekvence na C-konci, před tím, než se začlení do cystové stěny. Jeho sekvence dále obsahuje signální peptid na N-konci (Luján et al., 1995), tudíž ani jeden z konců sekvence genu pro CWP2 nemohl být použit pro umístění sekvence pro BAP-tag, jako tomu bylo u předešlých konstruktů. Sekvence pro tento tag byla nakonec umístěna ve vzdálenosti tří aminokyselin za předpokládaným koncem sekvence signálního peptidu. Pro klonování byla použita restriční místa **ClaI** a **BamHI**. Schéma konstruktů pro CWP2 viz obrázek 11.



Obrázek 11: Schéma použitého konstruktů pro CWP2.

4.3.1.2 BirA

Pro expresi biotin ligázy BirA byly obdobně jako u konstruktů pro CWP1 vytvořeny dva konstruktů lišící se pouze použitými vektory. Mnou byl vytvořen pouze konstrukt s vektorem pONDRA, konstrukt obsahující BirA ve vektoru pTG byl poskytnut Mgr. Vladimírou Najdovou již ve formě transfekovaných buněk.

Pro detekci na western blotu byl využit hemagglutininový tag (HA), který je ale přirozeně přítomen v plasmidu pONDRA, tudíž nebyl u tohoto konstruktů již znovu vkládán. Pro klonování do vektoru pONDRA byla použita restrikční místa **NdeI** a **BamHI**. Schéma konstruktů pro BirA viz obrázek 12.



Obrázek 12: Schéma použitého konstruktů pro biotin ligázu.

Konstrukt obsahující BirA se signální sekvencí do ER vložený v pTG vektoru byl převzat od Mgr. Evy Pyrihové, Ph.D. ve formě plasmidu a následně upraven. Z poskytnutého plasmidu byl vystřižen gen pro BirA s dvojitým HA-tagem, N-terminálním signálním peptidem (SP) a C-terminální sekvencí KDEL, která funguje jako signál pro retenci proteinu do ER. Tento celek byl následně vložen do jiného pTG vektoru, který již obsahoval sekvenci pro 5'UTR oblast CWP1 (viz kapitola 5.4.2). Schéma finálního konstruktů pro BirA viz obrázek 13.



Obrázek 13: Schéma finálního použitého konstruktů pro BirA.

4.3.2 Amplifikace genů

Amplifikace jednotlivých genů byla provedena pomocí metody PCR (polymerase chain reaction). Jako templátová DNA byla použita genomová DNA získaná z buněk *G. intestinalis* prostřednictvím kitu Genomic DNA Mini Kit (Geneaid). Veškeré primery byly navrženy podle sekvencí genomu *G. intestinalis*, navíc obsahovaly restriční místa nezbytná pro klonování. Přehled použitých primerů viz tabulka 1.

Tabulka 1: Přehled použitých primerů.

Primery pro vytvoření BAP-tagem značeného CWP1 pod CWP1 promotorem do vektoru pONDRA Restriční místa: ClaI, XhoI	
Forward	<i>GATCATCGATACAACGGCTTACTAAATC</i>
Reverse	<i>GATCCTCGAGTCACTCGTGCCACTCGATCTTCTGGGCCTCGAAGATGTCGTTTAGACCAGGC GGGGTGAGGCAGTA</i>

Primery pro vytvoření BAP-tagem značeného CWP1 pod CWP1 promotorem do vektoru pTG Restriční místa: EcoRV, ApaI	
Forward	<i>GATCGATATCACAACGGCTTACTAAATC</i>
Reverse	<i>GATCGGGCCCTCACTCGTGCCACTCGATCTTCTGGGCCTCGAAGATGTCGTTTAGACCAGGC GGGGTGAGGCAGTA</i>

Primery pro vytvoření BAP-tagem značeného CWP2 pod CWP2 promotorem do vektoru pONDRA Restriční místa: ClaI, BamHI	
Forward pro vytvoření první části insertu	<i>GATCATCGATACAACCCACTTTGATGAG</i>
Reverse pro vytvoření první části insertu	<i>CTCGTGCCACTCGATCTTCTGGGCCTCGAAGATGTCGTTTAGACC GGCGGAGCAAGACCAAGAAGTCC</i>
Forward pro vytvoření druhé části insertu	<i>GGTCTAAACGACATCTTCGAGGCCAGAAAGATCGAGTGGCAGGAG GCTTGCCCTGCCACCGAGGAGGAG</i>

Reverse pro vytvoření druhé části insertu	<i>GATCGGATCCTCACCTTCTGCGGACAATAGGCT</i>
--	--

Primery pro vytvoření BAP-tagem značeného CWP3 pod CWP3 promotorem do vektoru pONDRA Restrikční místa: ClaI, XhoI	
Forward	<i>GATCATCGATATGCATACCACTCCGGCGGC</i>
Reverse	<i>GATCCTCGAGTCACTCGTGCCACTCGATCTTCTGGGCCTCGAAGATGTCGTTTAGACCTCTG TAGTAGGG</i>

Primery pro vytvoření BirA s N-terminálně připojeným HA-tagem do vektoru pONDRA Restrikční místa: NdeI, BamHI	
Forward	<i>GATCCATATGAAGGATAACACCGTG</i>
Reverse	<i>GATCGGATCCTTTTTCTGCACTACGCAG</i>

25µl PCR reakce:

sterilní dH ₂ O	16 µl
5× Q5 reaction buffer	5 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
10µM primer forward	1 µl
10µM primer reverse	1 µl
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	1 µl
templátová DNA	0,5 µl

Pro amplifikaci DNA byl použit program dle doporučeného protokolu pro Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs). V případě neúspěšnosti byla provedena úprava teploty nasedání primerů nebo byl použit PrimeSTAR Max Premix (Takara) dle doporučeného protokolu.

Jednotlivé kroky základního PCR programu:

1. 98 °C	30 s
2. 98 °C	5-10 s
3. 55 °C	10-30 s
4. 72 °C	45s
5. 30 cyklů s kroky 2-4	
6. 72 °C	2 min
7. 4 °C	∞

4.4 Izolace a klonování DNA fragmentů

Amplifikované PCR vzorky byly analyovány za pomoci horizontální gelové elektroforézy s použitím 1% agarózového gelu. DNA byla detekována UV transluminátorem díky použití barviva SYBR Safe (Invitrogen), které bylo přidáno do gelu.

Z gelu byla DNA izolována pomocí High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Plasmidy i inserty (námi amplifikované DNA fragmenty) byly naštěpeny příslušnými restrikcními enzymy (New England BioLabs) dle doporučeného protokolu. Naštěpené fragmenty plasmidů byly analyzovány pomocí 1% agarózového gelu a následně opět přečištěny za použití High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Ostatní naštěpené produkty byly přečištěny pouze tímto komerčním kitem.

Následně byla namíchána ligační reakce, která zajistila vložení naštěpených insertů do příslušných plasmidů (pTG nebo pONDRA). Ligační reakce probíhala dle doporučeného protokolu přes noc při 16 °C a byla v ní použita T4 ligáza (Thermo Fisher Scientific).

4.4.1 Místně cílená (site-directed) mutageneze

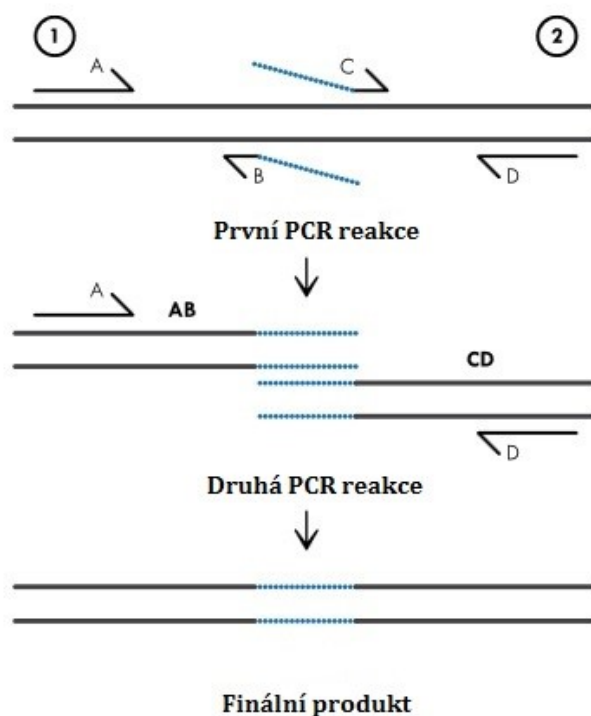
Pro vytvoření konstruktů navrženého pro expresi CWP2 s BAP-tagem uvnitř kódující sekvence (viz kapitola 4.3.1.1) byla využita metoda „site-directed“ mutageneze, tedy vnesení úmyslné změny do sekvence genu. Schéma průběhu metody je znázorněno na obrázku 14. Gen pro CWP2 byl amplifikován dle základního PCR programu na dvě části, přičemž obě obsahovaly sekvenci pro BAP-tag, aby mohlo dojít k následnému spárování obou úseků do jednoho. Po amplifikaci byly obě části analyzovány pomocí horizontální gelové elektroforézy za použití 1% agarózového gelu. DNA byla detekována UV transluminátorem díky použití barviva SYBR Safe (Invitrogen) přidaného do gelu. Naamplifikované DNA fragmenty byly z gelu izolovány použitím komerčního High Pure PCR Product Purification Kit (Roche).

Z každé části naamplifikované DNA bylo odebráno 5 μ l, které byly následně smíchány a vloženy do PCR cycleru k denaturaci a následné pozvolné renaturaci, během které dochází ke spojení obou úseků DNA v komplementární oblasti. PCR program byl nastaven na 95 °C po dobu 10 minut, poté docházelo každou minutu ke snižování teploty o 1 °C až do konečné teploty 25°C. Následně bylo k roztoku DNA přidáno 10 μ l PrimeSTAR Max Premix (Takara) a vše opět vloženo do PCR cycleru, tentokrát na dobu 10 minut při 72 °C. V tomto kroku dojde k doplnění dvouřetězce po hybridizaci dvou DNA molekul. V posledním kroku dojde díky použití koncových primerů (jeden primer z každé spojované DNA molekuly) k namnožení pouze celkové spojené molekuly. Byla připravena 50 μ l PCR reakce dle následujícího rozpisu:

2× PrimeSTAR Max Premix	25 μ l
sterilní dH ₂ O	19 μ l
10 μ M primer forward pro první část genu	2,5 μ l
10 μ M primer reverse pro druhou část genu	2,5 μ l
výsledný roztok DNA	1 μ l

Výsledná naamplifikovaná DNA byla opět analyována za pomoci horizontální gelové elektroforézy s použitím 1% agarózového gelu. DNA byla poté detekována UV transluminátorem s použitím barviva SYBR Safe. Z gelu byla DNA opět izolována pomocí High Pure PCR Product Purification Kit.

Dokončený naamplifikovaný konstrukt pro CWP2 byl ligován nejprve do pomocného klonovacího vektoru pJET1.2/blunt (Thermo Scientific) dle doporučeného protokolu po dobu 20 min a při 22 °C. Po transformaci bakterií, potvrzení přítomnosti plasmidu a ověření jeho sekvence pomocí sekvenace (viz kapitola 4.5) byl gen z pJET1.2/blunt plasmidu vyštěpen příslušnými restrikčními enzymy (New England BioLabs) dle doporučeného protokolu a poté zanalyzován za pomoci horizontální gelové elektroforézy (viz kapitola 4.4.). Nakonec byla dle doporučeného protokolu připravena ligační reakce s využitím T4 ligázy, aby došlo k vložení naštěpeného insertu do plasmidu pONDRA. Reakce probíhala při 4 °C přes noc.



Obrázek 14: Schéma místně cílené mutagenéze. Primery B a C obsahují komplementární sekvenci, která má být do genu vložena (znázorněno modře). V prvním kole PCR jsou provedeny dvě reakce s použitím primerových párů A + B (1. úsek DNA) a C + D (2. úsek DNA). Naamplifikované fragmenty DNA jsou následně smíchány, denaturovány a pozvolně renaturovány. Při renaturaci dochází ke spojení obou úseků v komplementární oblasti. Při druhém kole PCR je k výsledným ampliconům přidán primerový pár A + D, čímž dojde k namnožení pouze celkové spojené molekuly DNA. Převzato a upraveno z (Sabel a Brookman-Amissh, 2017).

4.5 Transformace bakterií

Hotová ligační reakce byla přidána k chemicky kompetentním buňkám bakterie *E. coli*. Následovala 20-ti minutová inkubace na ledu a tepelný šok při 42 °C po dobu 45 s, který zajistil vnesení DNA do buněk. Následovala další inkubace na ledu, tentokrát po dobu 10 min, a poté bylo přidáno 250 µl SOC média. Transformované bakterie byly dále inkubovány na třepačce při 37 °C a 220 RPM. Po uplynutí 1 hodiny byly bakterie naneseny na plotnu s LB médiem a příslušným selekčním antibiotikem a následně byla plotna ponechána ke kultivaci přes noc při 37 °C.

Z narostlých bakteriálních kolonií byl odebrán reprezentativní vzorek, který byl následně otestován na přítomnost plasmidu se zvoleným genem. Bakteriální kolonie byly resuspendovány v 50 µl vody, ze kterých bylo následně odebráno 10 µl. Přítomné bakterie byly rozrušeny pomocí střídání teplot a následně byly použity jako templátová DNA pro

kontrolní PCR. Přítomnost vybraného genu byla následně vyhodnocena pomocí horizontální gelové elektroforézy. Kolonie, které byly pozitivní, byly dále kultivovány v 5 ml tekutého LB média s příslušným selekčním antibiotikem. Kultivace probíhala přes noc na třepačce při 37 °C a 220 RPM. Po dokončení kultivace byl z bakteriální kultury izolován plasmid pomocí High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid). Koncentrace výsledné DNA byla změřena na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Poté byla provedena kontrolní restriční reakce s příslušnými restričními enzymy (Thermo Fisher Scientific) a výstup byl opět vyhodnocen horizontální gelovou elektroforézou. Při pozitivním výsledku byla DNA odeslána do sekvenační laboratoře a osekvenována.

Sekvenací ověřené bakteriální klony byly poté nasazeny do 75ml tekutého LB média s přidaným selekčním antibiotikem a ponechány ke kultivaci na třepačce přes noc při 37 °C, 220RPM. Po uplynutí 16 hodin byl z narostlé bakteriální kultury vyizolován plasmid prostřednictvím kitu Wizard® Plus Midipreps DNA Purification System (Promega). Koncentrace DNA ze vzorků byla opět změřena na přístroji NanoDrop 2000.

4.6 Transfekce *Giardia intestinalis*

Pro transfekci byli použiti trofoziti *G. intestinalis*, kteří byli napěstováni v 50ml kultivační lahvi do vytvoření monolayeru. Buňky byly ponechány v ledové lázni po dobu 20 minut, aby došlo k jejich odpoutání od stěn kultivační lahve a následně byly centrifugovány při otáčkách 1200 × g, při 4 °C a po dobu 10 minut. Získaný pelet buněk byl poté resuspendován v 900 µl TYI-S-33 média. Buňky v suspenzi byly spočítány pomocí přístroje Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer (Beckman) a následně naředěny na koncentraci $3,3 \cdot 10^7$ buněk/ml. Ze suspenze bylo odebráno 300 µl do 0,4cm elektroporační kyvety, do které bylo poté přidáno 50 µg plasmidové DNA (požadovaná koncentrace 1000-1500 ng/µl) a vše bylo opatrně promícháno. Následovala 10-ti minutová inkubace na ledu. Samotná elektroporace probíhala na přístroji Gene Pulser Xcell (Biorad), podle exponenciálního protokolu (350 V, 1000 µF a 750 Ω). Následně byla elektroporační kyveta s buněčnou suspenzí opět ponechána k inkubaci v ledové lázni, tentokrát po dobu 5 minut. Po dokončení inkubace byl obsah kyvety přenesen do 10ml kultivační zkumavky s připraveným TYI-S-33 médiem bez selekčních antibiotik.

Po uplynutí 24 hodin bylo v kultivační zkumavce vyměněno médium a byla přidána selekční antibiotika (puromycin a/nebo G418). Následně bylo médium měněno podle jeho stavu ve zkumavce a podle množství mrtvých buněk, nejpozději však každý třetí den. Po vytvoření monolayeru na stěnách zkumavky byla stabilně rostoucí buněčná kultura

připravena pro další práci. Do buněk *G. intestinalis* byly vkládány vždy dva konstrukty, jak konstrukt pro CWP, tak i konstrukt pro biotin ligázu.

4.7 Ověření lokalizace a funkčnosti komponent systému

4.7.1 Encystace *Giardia intestinalis*

Pro indukci exprese námi zvolených proteinů bylo u *G. intestinalis* nezbytné spustit encystační proces. K tomuto byl zvolen jednokrokový „Uppsala“ encystační protokol (Einarsson et al., 2016). Do média byl navíc přimíchán roztok biotinu o finální koncentraci 100 μ M. Po přelití encystačním médiem byly buňky ponechány k encystaci po dobu 18 hodin. Stav přeměny trofozoitů na cysty byl průběžně mikroskopicky kontrolován.

Expres proteinů byla ověřována metodami SDS-PAGE a western blot. Pro tyto metody byly nejprve připraveny vzorky z encystovaných buněk, které byly centrifugovány při 4 °C, při otáčkách 1200 \times g a po dobu 10 minut. Získaný pelet byl resuspendován v 1 \times koncentrovaném vzorkovém pufru a vzniklá suspenze poté povařena při 95 °C po dobu 5 minut.

4.7.2 SDS-PAGE

Po přípravě vzorků byla sestavena aparatura pro SDS-PAGE gelovou elektroforézu a zároveň byl připraven 12% polyakrylamidový gel, do kterého byly po jeho zatuhnutí vzorky nanášeny. Jako pufr byl využit standardní TGS (Tris-glycine-SDS) pufr (Biorad). Separace proteinů probíhala při 90 V a po přejetí vzorků do rozdělovacího gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V.

4.7.3 Barvení Coomassie Brilliant Blue

Pro potvrzení správnosti nanášení stejného množství proteinů do jamek byl gel barven pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue (Serva). Barvení probíhalo přes noc na rotátoru při 15 RPM. Po dokončení barvení bylo barvivo nenavázané na proteiny vymyto promývacím roztokem.

4.7.4 Western blot

Po proběhnutí SDS-PAGE elektroforézy byly proteiny z nebarveného gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu podle doporučeného protokolu. Kontrola přenosu proteinu byla provedena pomocí barviva Ponceau.

Po dokončení přenosu byla nespecifická vazebná místa na povrchu membrány zablokována 5% roztokem odtučněného mléka ve fosfátovém pufru (PBS) s přidáním detergentem Tween 20 (Sigma). Blokování probíhalo na rotátoru po dobu 1 hodiny.

Po zablokování byla membrána inkubována 1 hodinu s roztokem primární protilátky v mléčném roztoku (viz výše) v určeném poměru. Následně byla membrána 3× promyta v PBS po dobu 10 minut a dána k inkubaci s roztokem sekundární protilátky v mléčném roztoku v poměru 1:2000. Inkubace probíhala 1 hodinu a po jejím dokončení byla membrána opět 3× promyta v PBS po 10 minutách. Výsledky byly detekovány na přístroji Amersham imager 600 (GE Life Sciences).

Použité protilátky:

Konstrukty obsahující BAP-tag byly značeny primární králičí monoklonální anti-BAP protilátkou v ředění 1:1000 (GenScript). Jako sekundární protilátka byla použita anti-králičí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma).

Konstrukty obsahující HA-tag byly značeny primární krysí monoklonální anti-HA protilátkou v ředění 1:2000 (Roche). Jako sekundární protilátka byla použita anti-krysí protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma).

Vzorky z encystovaných buněk byly značeny primární myší anti-ESV protilátkou v ředění 1:500 (Waterborne). Jako sekundární protilátka byla použita anti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (Sigma).

Pro ověření předpokládané biotinylace byl použit konjugát streptavidinu s Alexa® fluor 488 v ředění 1:500 (Invitrogen).

4.7.5 Fluorescenční mikroskopie

4.7.5.1 Příprava preparátů

Všechny buňky použité na preparáty byly fixovány paraformaldehydem (EMS) přímo v kultuře. Do zkumavky s kulturou narostlou do souvislé vrstvy byl nejprve přidán paraformaldehyd do finální koncentrace 1% a následně byly buňky ponechány k inkubaci 30 min při 37 °C. Po dokončení fixace byla buněčná kultura centrifugována po dobu 5 min při 900 × g. Získaný pelet buněk byl následně promyt 5 ml 1× PEM pufru (Britton-Robinson buffer) a centrifugován opět po dobu 5 min při 900 × g. Výsledný pelet byl resuspendován v 1× PEM pufru v množství 150 µl na přípravu jednoho preparátu. Následně byla krycí sklíčka pokryta polylysinem (Sigma) v množství 10 µl polylysinu na jeden preparát. Polylysin byl pečlivě rozetřen a pokrytá sklíčka byla vložena do 6 jamkové destičky. Na krycí sklíčka byla po celém povrchu nanášena získaná buněčná suspenze a vše bylo následně ponecháno k inkubaci při pokojové teplotě po dobu 15 min, aby došlo k přisednutí buněk k podkladu. Po dokončení inkubace byl přebytek buněčné suspenze odsát a na preparát byl nakapán 1 ml 1× PEM pufru s přidáním tritonem TX100 (Sigma) o finální koncentraci 0,1%, čímž došlo k permeabilizaci buněk. Po 10 minutách inkubace byl triton odsát a preparáty byly 3× promyty ve 200 µl PEM pufru po dobu 30 s.

4.7.5.2 Fluorescenční značení

Na preparáty bylo nakapáno 500 μ l blokovacího roztoku PEMBALG a následovala 30-ti minutová inkubace při pokojové teplotě. Následně byl blokovací roztok odsát a preparát byl poté inkubován po dobu 1 hodiny v roztoku primární protilátky s PEMBALG (ředění 1:1000). Po dokončení inkubace došlo k promývání preparátu pomocí 1 \times PEM pufru po dobu 4 \times 10 minut. Následovala další inkubace, tentokrát v roztoku sekundární protilátky v PEMBALG (ředění 1:1000), opět po dobu 1 hodiny. Poté byl preparát opět 4 \times promyt po 10 minutách v 1 \times PEM pufru. Krycí sklíčko bylo osušeno a montováno médiem VectaShield s DAPI (Vector laboratories). Pro pozorování všech preparátů byl využit invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon eclipse Ti-S.

Složení 2 \times PEM pufru:

30,2 g PIPES (200 mM) (Sigma)
2 ml z 0,5M roztoku EGTA (2 mM) (Sigma)
100 μ l z 1 M roztoku MgSO₄ (0,2 mM) (Sigma)

Všechny složky byly smíchány a pH bylo upraveno na hodnotu 6,9. Následně byl pomocí H₂O upraven objem na 500 ml. Roztok byl sterilizován pomocí autoklávu.

Složení PEMBALG:

100 ml 1 \times PEM pufru
1 g BSA (1%) (Bovine Serum Albumin) (Sigma)
1,8 g lysin (100 mM) (Sigma)
0,5 g želatina (0,5 %) – cold water fish skin gelatin (Sigma)

Použití protilátky:

Proteiny obsahující BAP-tag byly značeny primární myší monoklonální anti-BAP protilátkou v ředění 1:1000 (GenScript). Jako sekundární protilátka použita anti-myší protilátka konjugovaná s Alexa® fluor 488 (Invitrogen) v ředění 1:1000.

Proteiny obsahující HA-tag byly značeny primární krysí monoklonální anti-HA protilátkou v ředění 1:1000 (Roche). Jako sekundární protilátka byla použita anti-krysí protilátka konjugovaná s Alexa® fluor 594 (Invitrogen) opět v ředění 1:1000.

DNA byla značena DAPI (4', 6-diamidino-2-fenylindol), které bylo obsaženo v montovacím médiu VectaShield (Vector).

4.8 Chemický cross-link

Veškerá práce probíhala s celými živými buňkami *G. intestinalis*. Buňky narostlé do souvislé vrstvy na povrchu encystační lahve byly encystovány a poté ponořeny na 20 minut do ledové lázně, aby došlo k jejich uvolnění. Buněčná kultura byla následně centrifugována po dobu 10 minut při $1200 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tekutina byla vylita a pelet byl resuspendován v 1 ml PBS s přidáním inhibitory proteáz cOMplete™ Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) dle koncentrace doporučené výrobcem. Ze vzniklého roztoku bylo na sklíčko odebráno 10 μl , které byly následně zlyzovány pomocí 1% SDS (dodecylsírán sodný). Zlyzování bylo pozorováno a ověřeno mikroskopickým pozorováním. Ve zlyzovaném vzorku byly následně stanoveny proteiny pomocí Biorad assay kit (Biorad). Použití proběhlo dle doporučeného protokolu. Z naměřených hodnot byla následně sestavena kalibrační křivka a zjištěna rovnice, pomocí které byl nelyzovaný vzorek buněk v PBS doředit do požadované koncentrace proteinu 1mg/ml.

Následovala inkubace buněčného roztoku s cross-linkerem, který byl přidáván v různých koncentracích, aby byla zjištěna jeho optimální koncentrace pro správný průběh reakce cross-linku. Inkubace probíhala 1 hodinu v ledové lázni a jako cross-linker byl použit roztok DSP [dithiobis(succinimidyl propionát)] (Thermo Fisher Scientific) v DMSO (Sigma). Po dokončení inkubace bylo chemické cross-linkování zastaveno přidáním Tris (Sigma) o hodnotě pH 7,4, aby bylo dosaženo finální koncentrace 50mM. Tato inkubace probíhala po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Vzniklé vzorky byly poté 10 minut centrifugovány, při 1200 RPM a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a následně uvařené ve vzorkovém pufru bez přidaného merkaptoetanolu. Vaření probíhalo při $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 minut.

Do pokusu byly zařazeny také dvě negativní kontroly. Obě obsahovaly vzorek nelyzovaných buněk v PBS, ovšem pouze s přidaným DMSO bez cross-linkeru. Jedna byla následně uvařena ve vzorkovém pufru bez merkaptoetanolu a jedna ve vzorkovém pufru, který merkaptoetanol obsahoval. Výsledky byly analyzovány za použití SDS-PAGE gelu a western blotu.

4.9 Purifikace biotinylovaných proteinů pomocí Dynabeads®

Pro pokus byly použity celé živé buňky *G. intestinalis*. Na jednu purifikaci bylo ve výsledné reakci použito 0,2 mg magnetických kuliček s navázaným streptavidinem - Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 (Invitrogen) na přibližně 3 ml lyzátu o proteinové koncentraci 1,5 mg/ml.

Buňky *G. intestinalis* byly napěstovány do objemu 750 ml. Kultivační lahve s narostlou souvislou buněčnou vrstvou byly zcystovány a buněčná kultura centrifugována po dobu

10 min, 1200 × g a při 4 °C. Tekutina byla vylita a pelet byl resuspendován v 1 ml PBS s přidanými inhibitory proteáz. Následně bylo 20 µl odebráno a uchováno jako kontrolní vzorek A0. Ze zbytku vzorku buněk v PBS bylo odebráno 10 µl pro určení proteinů a následně u něj bylo provedeno chemické cross-linkování (viz kapitola 4.8). Koncentrace cross-linkeru byla na základě předchozích pokusů zvolena na 100mM. Po zablokování cross-linku pomocí Tris, byl vzorek centrifugován při 4 °C, 30 000 × g a po dobu 10 minut. Získaný pelet byl resuspendován v Boiling pufru pro dosažení koncentrace proteinů 1,5 mg/ml a poté inkubován po dobu 10 minut v 80 °C.

Vzorek byl opět centrifugován po dobu 10 minut, 30 000 × g, ale tentokrát při pokojové teplotě. Pelet byl uchován jako kontrolní vzorek A1. 200 ml ze supernatantu bylo odebráno a uchováno jako kontrolní vzorek A2. Zbýlý supernatant byl 10× zředěn v Inkubačním pufru s přidanými inhibitory proteáz. 200ml z tohoto vzniklého roztoku bylo odebráno a uchováno jako kontrolní vzorek A3.

Následovala příprava Dynabeads kuliček, které byly promyty v Inkubačním pufru po dobu 3x5 minut na rotátoru. Promyté kuličky byly smíchány se zředěným supernatantem a vše bylo následně inkubováno přes noc na rotátoru při 4 °C.

Druhý den bylo ze vzorku odebráno 200 µl a uchováno jako kontrolní vzorek A4. Následovalo promývání kuliček s navázanými proteiny ve směsi 700 µl Inkubačního pufru a 0,1% SDS s přidanými inhibitory proteáz. Poté byly kuličky 5 minut promývány ve 100 µl Boiling pufru s přidanými inhibitory proteáz. Všech 100 µl tekutiny bylo z kuliček odsáto a uchováno jako kontrolní vzorek A5. Kuličky byly následně 5 minut promývány ve 100 µl SDS-PAGE vzorkového pufru bez přidaného merkaptoetanolu a bromfenolové modři. Všech 100 µl bylo opět odsáto a uchováno jako kontrolní vzorek A6. Další promývání kuliček probíhalo ve směsi 700 µl Inkubačního pufru s 0,1% SDS s přidanými inhibitory proteáz, a to po dobu 2x5 minut. Po druhém promytí bylo odebráno 100 µl tekutiny včetně kuliček a uchováno jako kontrolní vzorek A7. K tomuto vzorku A7 bylo poté přidáno 20 µl 1× koncentrovaného vzorkového pufru a 5 µl biotinu a vzorek byl následně uvařen při 95 °C po dobu 5 minut. Ze zbylého původního vzorku byl na magnetickém stojánku odsátý pufr a suché kuličky byly připraveny k odeslání do laboratoře hmotnostní spektrometrie.

Ke všem zbylým vzorkům kontroly (A0-A6) byl přidán 5× koncentrovaný vzorkový pufr v následujícím množství:

A0	5 µl	A3	50 µl	A6	25 µl
A1	5 µl	A4	50 µl		
A2	50 µl	A5	25 µl		

Všechny kontrolní vzorky byly uvařeny při 95 °C po dobu 5 minut. Výsledky byly detekovány pomocí SDS-PAGE gelu a metody western blot.

Složení roztoků:

Boiling pufr - 50mM Tris (Sigma)
- 1mM EDTA (Sigma)
- pH 7,4

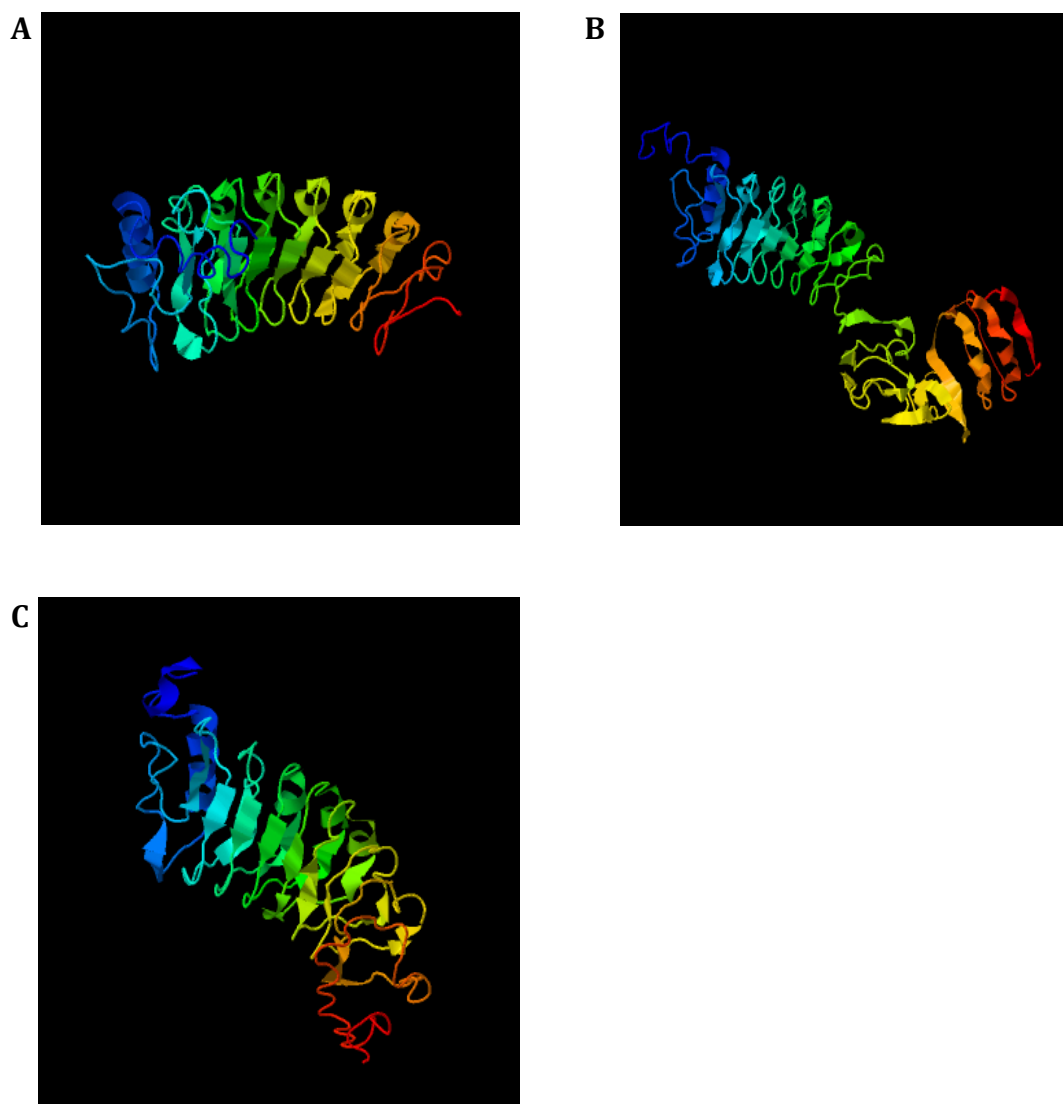
Inkubační pufr - 50mM Tris (Sigma)
- 150mM NaCl (Sigma)
- 5mM EDTA (Sigma)
- 1% Triton (Sigma)
- pH 7,4

5 Výsledky

5.1 Bioinformatická analýza proteinů cystové stěny

Jak bylo zmíněno v kapitole 2.2.3, proteiny CWP1, CWP2 a CWP3 sdílejí určitou míru sekvenční podobnosti (viz obrázek 4). Všechny tři proteiny jsou také bohaté na aminokyselinu leucin obsaženou v LRR. CWP1 a CWP2 mají pět kompletních repetic, zatímco CWP3 pouze čtyři. Pátá zůstává u CWP3 nekompletní (Hehl et al., 2000; Luján et al., 1995; Mccaffery et al., 2003). Naše porovnání aminokyselinových sekvencí proti databázi Pfam (Sonnhammer et al., 1997) skutečně potvrdilo přítomnost domény *LRRNT_2* (Leucine rich repeat N-terminal domain), na základě které byly proteiny zařazeny do stejnojmenné proteinové rodiny. Samotná identifikace proteinových domén ale proběhla pouze na základě podobnosti strukturních motivů, o funkcích jednotlivých CWP proteinů nic nevyovídá. V *LRRNT_2* proteinové rodině tedy lze nalézt další proteiny se stejnými doménami, které ale zastávají různé funkce, jako jsou např. kinázy, receptorové nebo jiné povrchové proteiny.

S využitím nástroje I-TASSER (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015; Zhang, 2008) byly navrženy pravděpodobné strukturní 3D modely proteinů CWP1, CWP2 a CWP3 (viz obrázek 15). Modely byly vygenerovány na základě sekvenční podobnosti s proteiny se známou strukturou, vlastnosti a funkce proteinů nebyly uvažovány. Pro CWP1 a CWP2 byl jako protein s největší strukturní podobností určen signální protein 5GIJ (identifikátor Protein Databank) pocházející z *Arabidopsis thaliana*, pro CWP3 pak transferáza 5GR9 pocházející z téhož organismu. I-TASSER vytvořil několik modelů, ze kterých byl pro každý protein vybrán vždy jeden s nejvyšší hodnotou C-skóre. Hodnota C-skóre u použitého modelu pro protein CWP1 byla -0,47; u modelu pro CWP2 -0,80 a u modelu pro CWP3 -0,66. Na obrázcích 15 A-C lze vidět, že všechny tři CWP proteiny zaujímají strukturu typickou pro LRR domény – β - α strukturní jednotky, které se skládají z krátkého β -vlákna a α -helixu v přibližné orientaci paralelně k sobě. Celý LRR motiv pak vytváří tvar podkovy s vnitřním β -listem a vnějším uspořádáním α -helixů (Kobe a Deisenhofer, 1994), jejíž ohyb je na obrázcích 15 A-C také zřetelný.



Obrázek 15: Predikované 3D strukturní modely pro proteiny CWP1 (A), CWP2 (B) a CWP3 (C). Na všech obrázcích lze vidět, že CWP proteiny zaujímají typickou strukturu LRR domén (β - α strukturní jednotky složené z krátkého β -vlákna a α -helixu v přibližné orientaci paralelně k sobě. Celý LRR motiv pak vytváří tvar podkovy s β -listem na vnitřní straně a uspořádáním α -helixů vně.

Další proteiny se strukturou podobnou třem homologním proteinům cystové stěny *G. intestinalis* (CWP1-3) byly nalezeny pomocí on-line programu HMMER (Eddy, 1995; Finn et al., 2011), a to u příbuzných protozoí z čeledi *Hexamitidae* – *Spironucleus salmonicida* a *Trepomonas sp.* Na alignmentu získaných sekvencí (viz obrázek 16) je dobře vidět, že jednotlivé proteiny společně sdílejí vysoký stupeň sekvenční podobnosti. Některé aminokyseliny jsou navíc konzervovány u všech sekvencí. Výsledek sekvenčního porovnání ukazuje na skutečnost, že jsou cysty a jejich tvorba podobné u různých diplomonád. Alignmenty byly vytvořeny pomocí programu ClustalW, který je součástí aplikace BioEdit.

Gi - 1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Gi P15 - 1											
Gi B - 1											
Gi - 2											
Gi B - 2											
Gi - 3											
Gi P15 - 3											
Gi B - 3											
Ss - class 1											
Ss - class 1											
Ss - class 1											
Ss - class 1											
Ss - class 1											
Ss - class 1											
Ss - class 2											
Ss - C class 2											
Ss - D class 2											
Tsp PC1											
Tsp PC1											
Tsp PC1											
Tsp PC1											
Gi - 1	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
Gi P15 - 1											
Gi B - 1											
Gi - 2											
Gi B - 2											
Gi - 3											
Gi P15 - 3											
Gi B - 3											
Ss - class 1											
Ss - class 1											
Ss - class 1											
Ss - class 1											
Ss - class 1											
Ss - class 1											
Ss - class 2											
Ss - C class 2											
Ss - D class 2											
Tsp PC1											
Tsp PC1											
Tsp PC1											
Tsp PC1											

Gi - 1	TVVG-LMTLPIYMEIYLINCPDPDTCVGFVFKCGDYDCENCGTLPFNCA	230	231	232	233	234
Gi P15 - 1	TVVG-LMTLPIYMEIYLINCPDPDTCVGFVFKCGDYDCENCGTLPFNCA	230	231	232	233	234
Gi B - 1	DVVG-LMTLPIYMEIYLINCPDPDTCVGFVFKCGDYDCENCGTLPFNCA	230	231	232	233	234
Gi - 2	DVPAD-LFDLPIYMEIYVQCNINVCYVTAAPDTYTGIVLGGTTDCDYCTVLPFNCP	230	231	232	233	234
Gi B - 2	DVPAD-LFDLPIYMEIYVQCNINVCYVTAAPDTYTGIVLGGTTDCDYCTVLPFNCP	230	231	232	233	234
Gi - 3	SFS---HLDLAVDYVDLQCNPTSCGGDYVVRNTHGIVYACGLNHCSCTVKKITCA	230	231	232	233	234
Gi P15 - 3	SFS---HLDLAVDYVDLQCNPTSCGGDYVVRNTHGIVYACGLNHCSCTVKKITCA	230	231	232	233	234
Gi B - 3	SLS---HLDLADVDLQCNPPNCGGDYVVRNTHGIVYACGLNHCSCTVKKITCA	230	231	232	233	234
Ss - class 1	TIPTG-FVALKFLVEMHVQCNADISCESGATRNFIKCGLENCCDGVIPDI	230	231	232	233	234
Ss - class 1	TIPTG-FVALKFLVEMHVQCNADISCESGATRNFIKCGLENCCDGVIPDI	230	231	232	233	234
Ss - class 1	PIPAG-LASIKYLIFHADNLAIDCSTSDIATRNFIHCGITDCDSDMKGPVPEIPEEA	230	231	232	233	234
Ss - class 1	PIPAG-LASIKYLIFHADNLAIDCSTSDIATRNFIHCGITDCDSDMKGPVPEIPEEA	230	231	232	233	234
Ss - class 1	TIPTG-FVALKFLVEMHVQCNADISCESGATRNFIKCGLENCCDGVIPDI	230	231	232	233	234
Ss - class 1	TIPTG-FVALKFLVEMHVQCNADISCESGATRNFIKCGLENCCDGVIPDI	230	231	232	233	234
Ss - class 2	KIPDE-LEQPLKIFANFNENGVICETGLAVRNVYELQQDMCYCESNVIP	230	231	232	233	234
Ss - C class 2	PIPOY---YKSIKRVFLGNKEIOECGNMKN---VYCGNSDCEGG	230	231	232	233	234
Ss - D class 2	EIENN---EIKELSGCNTDVIYDIAFKVLTG---SCTKLTNNC	230	231	232	233	234
Tsp. PC1	TVPVG-FNITQYITLRLQCNPEIDCSTSELSTRNFIKCGLENCCDGVIPDI	230	231	232	233	234
Tsp. PC1	TIPTG-FEONIVYELRVNENVCNDCDLSLSSKTNFIKCGLENCCDGVIPDI	230	231	232	233	234
Tsp. PC1	TIPTG-FGHTHLYLNRVNGENINVTCDLSOKTNFVATGGDYQCSNCLITPANCP	230	231	232	233	234
Tsp. PC1	GIPLS-MVTIIPPLIFLTCNLQVNCNCSPPFYIITENQLDQPFKQCGYLDGANL	230	231	232	233	234
Gi - 1	----	340	341	342	343	344
Gi P15 - 1	----	340	341	342	343	344
Gi B - 1	----	340	341	342	343	344
Gi - 2	SNMHSAHNAQKRCNMPNSRSQTPLRVTVVRSS-RTASTRSSTPKRAVQSRSSVTGNASRSATRPTARAITKSTQGRRTPVRAPARSTNKPVRRR	340	341	342	343	344
Gi - 3	SNMHSAHNAQKRCNMPNSRSQTPLRVTVVRSS-RTASTRSSTPKRAVQSRSSVTGNASRSATRPTARAITKSTQGRRTPVRAPARSTNKPVRRR	340	341	342	343	344
Gi P15 - 3	RNSTASKIQPPYR	340	341	342	343	344
Gi B - 3	RNSTASKIQPPYR	340	341	342	343	344
Ss - class 1	RQWFSHFQFLRRAECARVASSAGQ	340	341	342	343	344
Ss - class 1	RQ	340	341	342	343	344
Ss - class 1	RQ	340	341	342	343	344
Ss - class 1	RQ	340	341	342	343	344
Ss - class 2	LVRE	340	341	342	343	344
Ss - D class 2	HEGQFSDE	340	341	342	343	344
Tsp. PC1	PMVVTPLSKNKKSKSK	340	341	342	343	344
Tsp. PC1	REGFQ	340	341	342	343	344
Tsp. PC1	RE	340	341	342	343	344
Tsp. PC1	EEELILNNTNVAVMEVAAEELINMNAEEVEVIPAEEEEITABEEEEITAKKRSQEVVEAAK---ERPOEKVSEEKIVTRSRFHKKRNNHGHKRNKHKTRRFW	340	341	342	343	344

Popisek obrázku na následující straně.

Obrázek 16: Alignment CWP proteinů u *G. intestinalis*, *S. salmonicida* a pravděpodobných CWP proteinů *Trepomonas sp.*. Identické aminokyseliny jsou označeny růžově, podobné aminokyseliny modře (práh pro zvýraznění byl 50% zbytků v dané pozici). Z alignmentu je patrné, že CWP proteiny vybraných zástupců z řádu *Diplomonadida* sdílejí vysoký stupeň sekvenční podobnosti, a že, cysty a jejich tvorba si jsou u různých diplomonád podobné.

Gi – 1/2/3: CWP1/2/3 u *G. intestinalis*

Gi P15 – 1/2/3: CWP1/2/3 u *G. intestinalis* kmen P15

Gi B – 1/2/3: CWP1/2/3 u *G. intestinalis* assemblage B

Ss class 1: CWP z třídy 1 u *S. salmonicida*

Ss class 2: CWP z třídy 2 u *S. salmonicida*

Ss C class 2: CWP C z třídy 2 u *S. salmonicida*

Ss D class 2: CWP D z třídy 2 u *S. salmonicida*

Tsp. PC1: CWP u *Trepomonas sp. PC1*

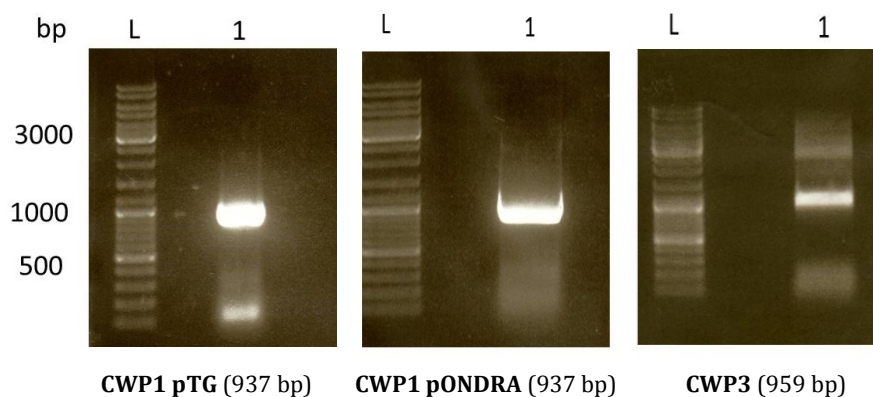
5.2 CWP proteiny

5.2.1 Amplifikace genů

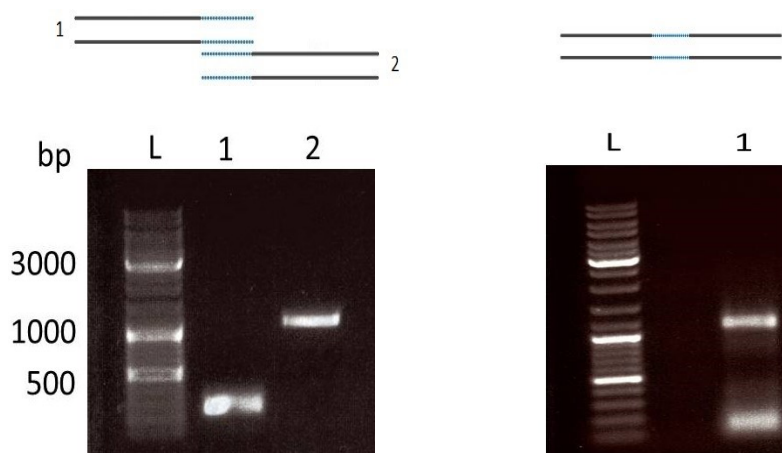
Prvním krokem bylo klonování všech navržených konstruktů do příslušných vektorů (viz kapitola 4.3.1). U obou konstruktů pro CWP1 proběhlo celé klonování základním způsobem bez problémů. U konstruktů obsahujícího gen pro CWP3 proběhla amplifikace také bez potíží, nicméně překážkou se stal pokus o vložení konstruktů do vektoru pONDRA. Vzorčky bakteriálních kolonií natransformovaných plasmidem s vneseným konstruktem se při testu na jeho přítomnost jevíly pozitivní, nicméně následná kontrolní restriční reakce měla vždy negativní výsledek. Bylo vyzkoušeno několik dalších dostupných plasmidů pONDRA s různorodými inserty, avšak vždy obsahující námi požadovaná restriční místa. Vložené původní inserty byly z plasmidů vystřiženy restričními enzymy a následně do nich byl vložen požadovaný konstrukt pro CWP3. V jediném z uskutečněných pokusů bylo vložení konstruktů do plasmidu pONDRA úspěšné.

Jelikož u CWP2 dochází k proteolytickému odštěpení části sekvence na C-konci před tím, než dojde k jeho začlenění do stěny cysty, bylo nezbytné, aby konstrukt pro tento protein obsahoval BAP-tag uvnitř své kódující sekvence (viz kapitola 4.3.1.1). Z tohoto důvodu bylo také nutné pro jeho amplifikaci použít metodu místně cílené mutagenese (viz kapitola 4.4.1), jež je založena na spojení dvou PCR produktů za pomoci krátkého přesahu. Vlastní spojování dvou hotových PCR produktů se však z počátku vůbec nedařilo a docházelo k opětovné amplifikaci jedné z částí konstruktů a nikoliv spojeného produktu. Výsledek byl příkládán faktu, že původní primery pro amplifikaci prvních dvou částí genu pro CWP2 zůstávají ve výsledné DNA i po přečištění přes kolonku při izolaci z horizontálního agarózového gelu. Bylo tedy připraveno několik dalších reakcí, tentokrát se zředěnými primery v různém poměru. Pozitivní výsledek amplifikace nastal při ředění primerů

na finální koncentraci 2,5 μ M. Další práce tedy probíhala s touto koncentrací. Úspěšné amplifikace všech vytvořených konstruktů pro CWP proteiny jsou patrné na obrázcích 17 a 18.



Obrázek 17: Jednotlivé amplifikované geny pro CWP 1 a CWP3 detekované horizontální gelovou elektroforézou. (L) Gene Ruler Mix (Thermo Fisher Scientific), (1) Naamplifikovaná DNA námi zvoleného genu. Ačkoliv je délka PCR produktů „CWP1 pTG“ a „CWP1 pONDRA“ identická, liší se v restričních místech příslušných uvedeným plasmidům.

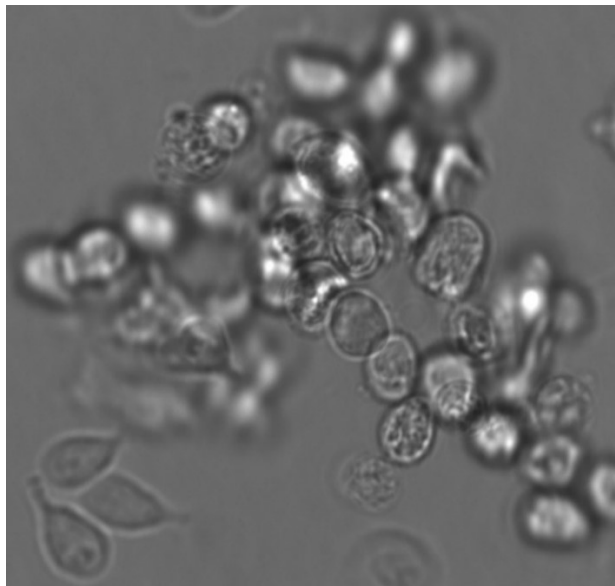


Obrázek 18: Amplifikace genu pro CWP2. Detekce horizontální gelovou elektroforézou. (L) Gene Ruler Mix (Thermo Fisher Scientific); Vlevo – (1) Naamplifikovaná první část CWP2 (249 bp), (2) Naamplifikovaná druhá část CWP2 (1099bp); Vpravo – (1) Naamplifikovaná celková molekula DNA CWP2 (1304 bp).

Získaný finální konstrukt pro CWP2 byl ověřen pomocí sekvenace, nicméně ani přes opakované pokusy se zatím nepodařilo jeho vložení do plasmidu pONDRA.

5.2.2 Encystace *Giardia intestinalis* in vitro

Klíčovým krokem celé práce byla správná encystace buněk *G. intestinalis*. Po předchozích zkušenostech v naší laboratoři byl pro encystaci zvolen jednokrokový „Uppsala“ protokol (viz kapitola 4.7.1), mezi jehož hlavní výhody patří snazší proveditelnost, časová úspora a také větší výtěžek. U trofozoitů *G. intestinalis* byla indukována encystace, jejíž stav byl průběžně vizuálně kontrolován pomocí mikroskopu. Jako optimální čas pro sklizení vzorků byla zvolena doba 18 hodin po indukci encystace, jelikož u většiny trofozoitů již byly patrné morfologické změny související s přeměnou na cystu. Stav buněk *G. intestinalis* po 18 hodinách encystace lze vidět na obrázku 19.

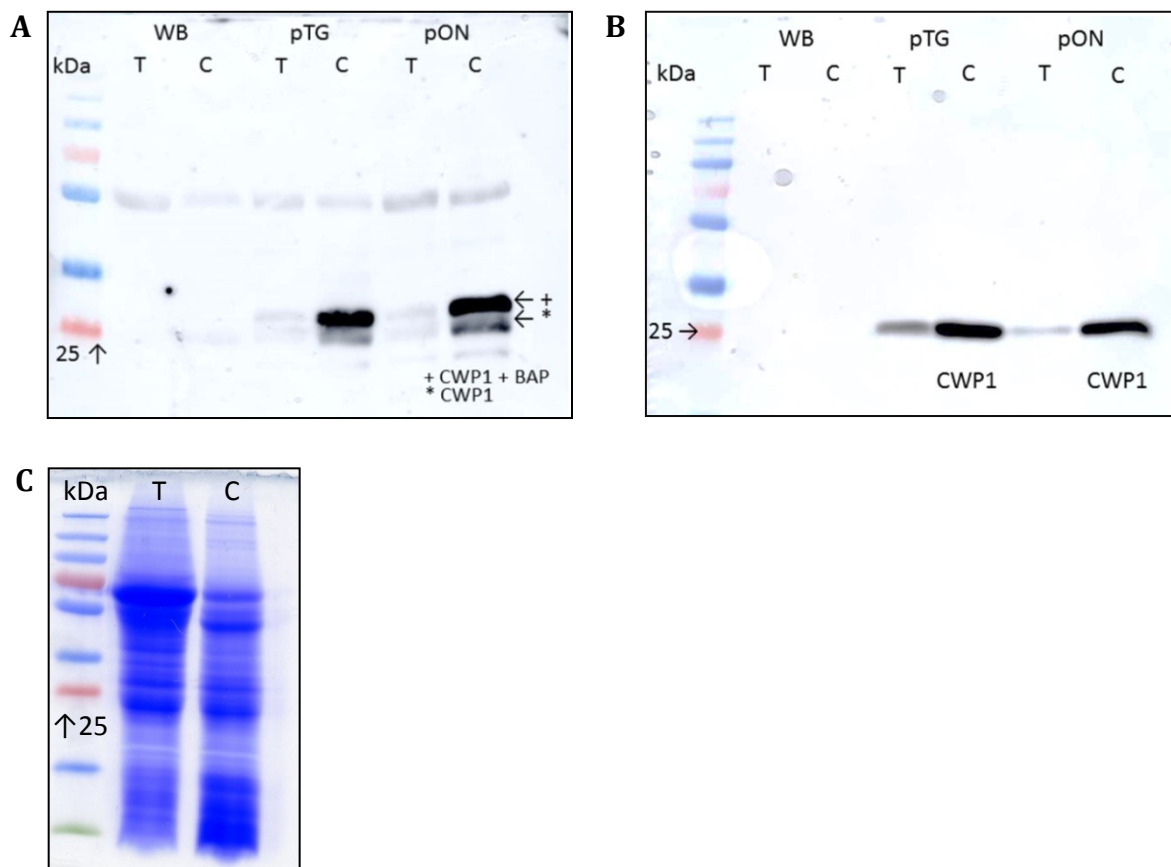


Obrázek 19: Stav buněk *G. intestinalis* v době 18 hodin po indukci encystace, znázornění buňky pod diferenciálním kontrastem. Na obrázku jsou patrné jak téměř dokončené cysty, tak teprve encystující trofozoiti, u kterých je již ale patrná změna tvaru, jakožto indikátoru úspěšného průběhu encystace.

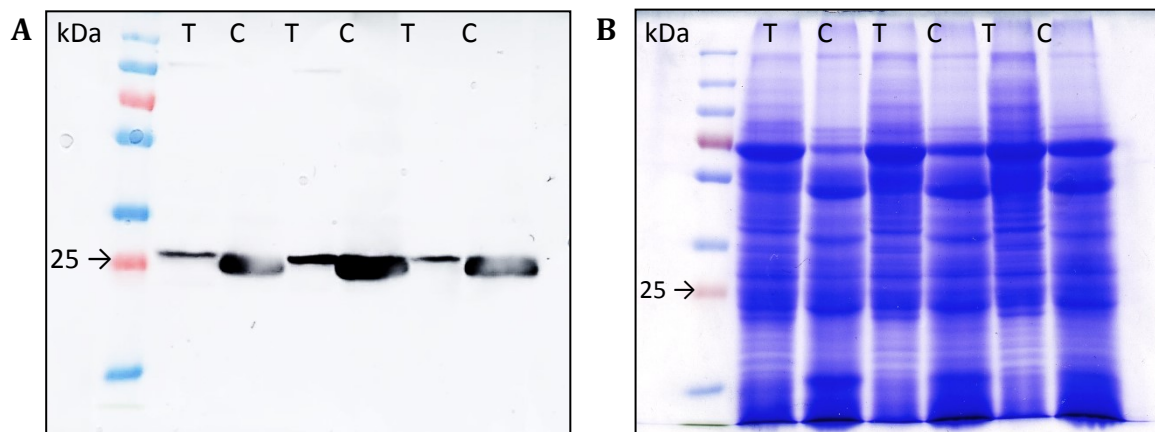
5.2.3 Ověření exprese

Úspěšnost transfekce *G. intestinalis* plasmidy nesoucími CWP1 a CWP3 byla testována za pomoci metody western blot. Pro CWP1 byla přítomnost exprese testována u obou variant vytvořených konstruktů, jak s plasmidem pTG, tak s plasmidem pONDRA. Pro CWP3 byl použit pouze jeden konstrukt, a to s plasmidem pONDRA. Z části stabilně rostoucí kultury buněk a z buněk encystovaných po dobu 18h byly připraveny vzorky na SDS-PAGE a western blot obsahující trofozoity (T) a cysty s ještě encystujícími trofozoity (C). Pro detekci CWP1 byly použity dva způsoby. Prvním bylo použití specifické protilátky přímo

proti tomuto proteinu (obrázek 20 A), druhým pak použitím protilátky proti BAP-tagu (obrázek 20 B). CWP3 byl detekován pouze pomocí protilátky proti BAP-tagu (obrázek 22 A). Jak lze vidět na obrázcích 20 a 21, u všech testovaných buněčných linií byla exprese proteinů pozitivní. Navíc je jejich indukce spolehlivá a snadno navoditelná. Dvojitý signál na obrázku 20 A je způsoben použitím protilátky proti CWP1, jelikož v cystách byly přítomny oba CWP1 proteiny, jak přirozený, tak i uměle modifikovaný s přidaným BAP-tagem.



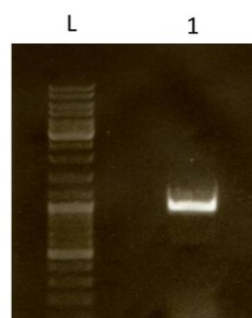
Obrázek 20: Ověření exprese proteinu CWP1 v trofozoitech a cystách *G. intestinalis* po transfekci vektory pTG nebo pONDRA. Jako negativní kontrola byly použity vzorky wild type kmene. **A)** Detekce CWP1 pomocí protilátky proti CWP1. **B)** Detekce CWP1 pomocí protilátky proti BAP-tagu. **C)** SDS-PAGE gel barvený Coomassie Brilliant Blue znázorňující poměrné hladiny proteinů v trofozoitech a cystách *G. intestinalis* po transfekci vektorem pTG nesoucím konstrukt obsahující CWP1.



Obrázek 21: Ověření exprese pro protein CWP3 v trofozoitech a cystách *G. Intestinalis* po transfekci vektorem pONDRA s konstruktem pro CWP3. **A)** Detekce CWP3 pomocí protilátky proti BAP-tagu. **B)** SDS-PAGE gel barvený Coomassie Brilliant Blue znázorňující poměrné hladiny proteinů v trofozoitech a cystách *G. intestinalis* po transfekci vektorem pONDRA nesoucím konstrukt obsahující CWP3.

5.3 BirA

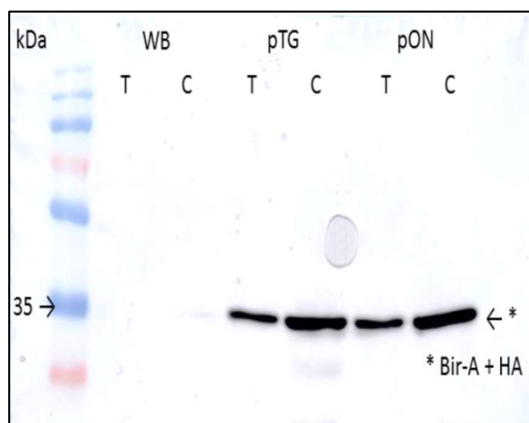
Hlavním cílem práce bylo identifikovat proteiny asociované s encystačními váčky, přičemž CWP proteiny označené pomocí BAP-tagu byly vytvořeny jako prostředek ("návnada") pro charakterizaci jejich celkového složení. Aby mohlo dojít ke specifické biotinylnaci CWP proteinů a k jejich následné izolaci spolu s dalšími proteiny, musela být v buňkách *G. intestinalis* přítomna také biotin ligáza BirA. Kromě konstruktů pro CWP proteiny byl tedy vytvořen také konstrukt pro BirA. V jeho případě proběhla amplifikace základním způsobem bez jakýchkoliv obtíží. Bez problémů bylo provedeno také vložení naamplifikované DNA do vektoru pONDRA. Úspěšnou amplifikaci genu pro BirA lze vidět na obrázku 22.



BirA (983 bp)

Obrázek 22: Amplifikace genu pro BirA detekovaná horizontální gelovou elektroforézou. (L) Gene Ruler Mix (Thermo Fisher Scientific); (1) Naamplifikovaná DNA zvoleného genu.

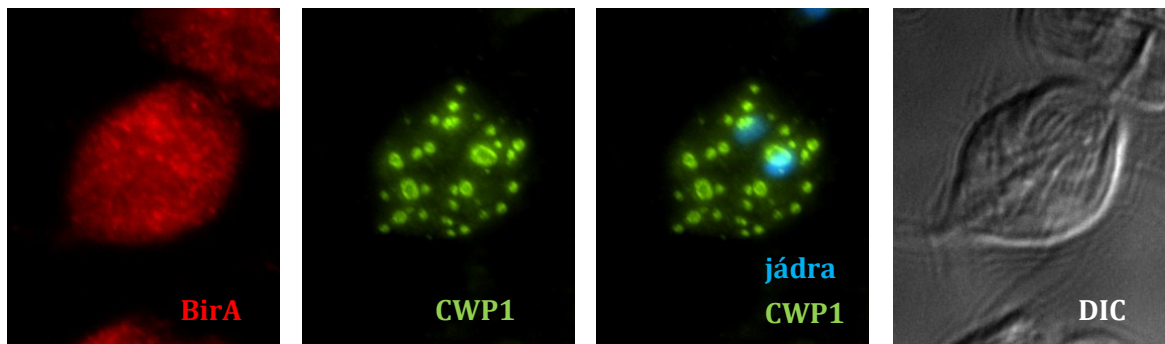
Pro zvolení nejefektivnější kombinace plasmidů byly pro BirA i CWP1 vytvořeny dva konstrukty s odlišnými komplementárními plasmidy pONDRA a pTG, které umožňují dvojitou selekci. Konstrukt obsahující BirA ve vektoru pTG byl poskytnut Mgr. Vladimírou Najdrovou již ve formě transfekovaných buněk. Konstrukt s vektorem pONDRA byl vytvořen a klonován pro účely této práce. Po úspěšném ukončení klonování byl plasmid pONDRA nesoucí konstrukt pro BirA transfekován do buněk *G. intestinalis* již obsahujících konstrukt CWP1 - pTG. Obdobně byl vytvořen také další kmen *G. intestinalis* nesoucí dvojici konstruktů BirA - pTG a CWP1 - pONDRA. Úspěšnost transfekce *G. intestinalis* byla testována za pomoci metody western blot, stejně jako v předchozím případě (viz kapitola 5.4) jak ve vzorcích s trofozoity, tak ve vzorcích obsahujících cysty a encystující trofozoity po dobu 18 h. Na western blotu byla BirA detekována za pomoci protilátky proti HA-tagu. Jak lze vidět na obrázku 23, u všech testovaných buněčných linií byla exprese pozitivní. Pro navazující pokusy byl vybrán kmen *G. intestinalis* nesoucí dvojici plasmidů CWP1 - pTG a BirA - pONDRA.



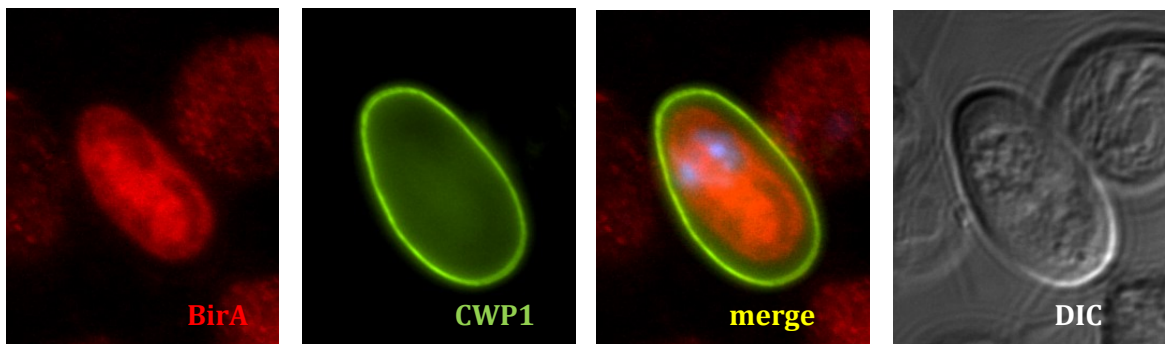
Obrázek 23: Ověření exprese pro BirA v trofozoitech a cystách *G. intestinalis* po transfekci vektory pONDRA nebo pTG nesoucí konstrukty pro BirA. Detekce pomocí protilátky proti HA-tagu. Jako negativní kontrola byly použity vzorky "wild type" kmene.

5.4 Lokalizace CWP proteinů a BirA nepřímou fluorescencí

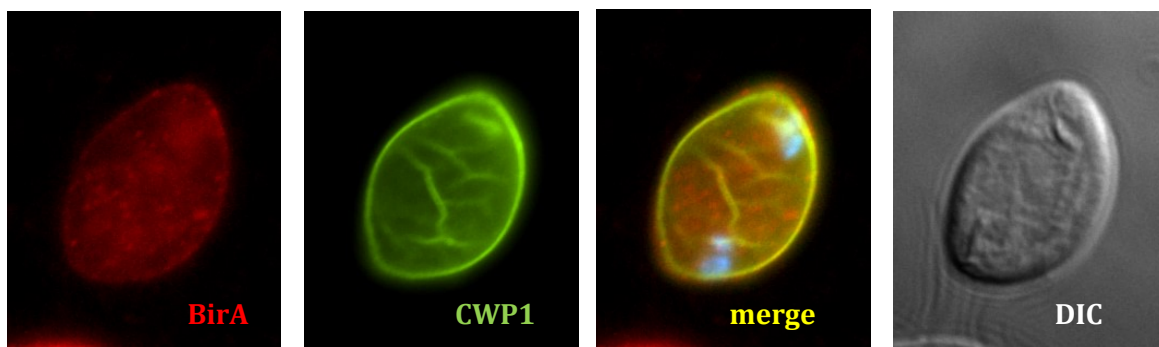
Lokalizace CWP proteinů i BirA byla ověřena metodou nepřímé fluorescence v kmeni *G. intestinalis* nesoucím plasmid s vloženým CWP3 a v kmeni nesoucím dvojici komplementárních plasmidů s vloženými CWP1 a BirA. CWP1 a CWP3 byly detekovány za pomoci protilátky proti BAP-tagu, zatímco BirA pomocí protilátky proti HA-tagu. Stabilně rostoucí kultura buněk transfekovaná plasmidy se zvolenými proteiny byla encystována po dobu 18 h a následně byly buňky fixovány 1% paraformaldehydem. Lokalizace všech tří proteinů byla pozorována v encystujících trofozoitech i v cystách (obrázky 24-28). Distribucí červeného signálu BirA (viz obrázek 24) byla potvrzena předpokládaná cytoplasmatická lokalizace tohoto proteinu, zatímco zelený signál značící CWP1 a CWP3 poukazoval (viz obrázky 24-28) na jejich přítomnost v ESV u encystujících trofozoitů a následnou distribuci do stěny u stádia cesty. S proteinem CWP3 nebyly z časových důvodů provedeny žádné další experimenty.



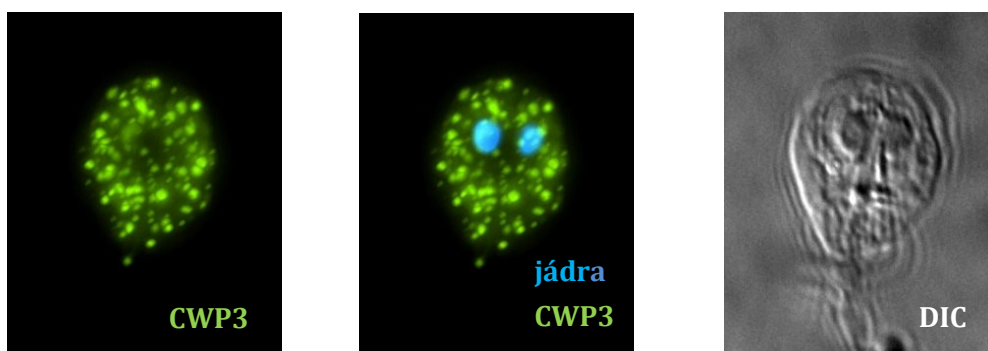
Obrázek 24: Lokalizace proteinů BirA a CWP1 v encystujících trofozoitech *G. intestinalis* pomocí nepřímé imunofluorescence. BirA je znázorněna červeně značenou protilátkou proti HA-tagu, přičemž signál ukazuje předpokládanou cytoplasmatickou lokalizaci. CWP1 je znázorněn zeleně značenou protilátkou proti BAP-tagu. Zelený signál poukazuje na lokalizaci tohoto proteinu v ESV. Na překryvu lze vidět stejně značenou lokalizaci CWP1 a jádra buňky ve kterých je značena DNA modrou barvou (DAPI). DIC znázorňuje buňku pod diferenciálním kontrastem.



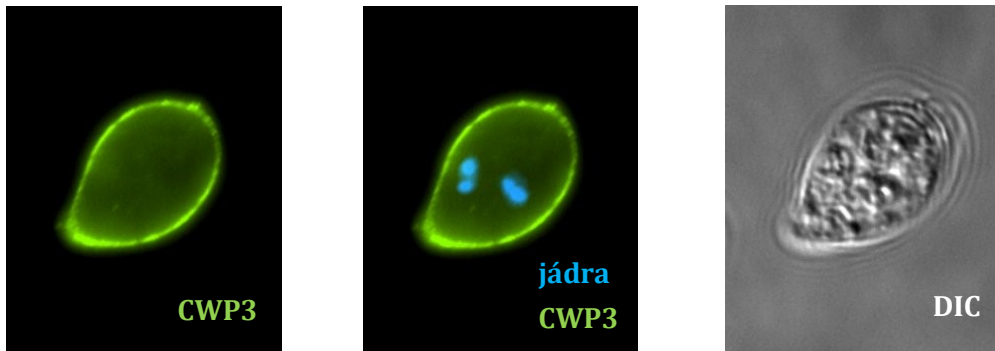
Obrázek 25: Lokalizace BirA a CWP1 v cystách *G. intestinalis* pomocí nepřímé imunofluorescence. Lokalizace BirA je znázorněna červeně značenou protilátkou proti HA-tagu, lokalizace CWP1 je znázorněna zeleně značenou protilátkou proti BAP-tagu. Zelený signál ukazuje rozmístění CWP1 po povrchu cysty. Překryv obrázků potvrzuje předpoklad, že BirA se u cysty nachází v cytoplasmě uvnitř buňky, zatímco CWP1 pouze na povrchu. Modře je znázorněna DNA v jádrech značená DAPI. DIC znázorňuje buňku pod diferenciálním kontrastem.



Obrázek 26: Lokalizace BirA a CWP1 v cystách *G. intestinalis* pomocí nepřímé imunofluorescence. Lokalizace BirA je znázorněna červeně značenou protilátkou proti HA-tagu, lokalizace CWP1 je znázorněna zeleně značenou protilátkou proti BAP-tagu. Na překryvu obrázků lze vidět změněnou polohu jader (DNA značena modře pomocí DAPI) během dělení, dále předpokládanou cytoplasmatickou lokalizaci BirA a lokalizaci CWP1 na povrchu cysty. DIC znázorňuje buňku pod diferenciálním kontrastem.



Obrázek 27: Lokalizace BAP-tagovaného CWP3 v encystujících trofozoitech *G. Intestinalis* pomocí nepřímé imunofluorescence. CWP3 je znázorněn zeleně značenou protilátkou proti BAP-tagu. Signál potvrzuje přítomnost tohoto proteinu v ESV. Na překryvu lze vidět stejně značenou lokalizaci CWP3 a jádra buňky ve kterých je značena DNA modrou barvou (DAPI). DIC znázorňuje buňku pod diferenciálním kontrastem.



Obrázek 28: Lokalizace BAP-tagovaného CWP3 v cystách *G. intestinalis* pomocí nepřímé imunofluorescence. Lokalizace CWP1 je znázorněna zeleně značenou protilátkou proti BAP-tagu. Zelený signál ukazuje rozmístění CWP1 po povrchu cysty. Obrázek potvrzuje předpoklad, že u cysty se CWP3 vyskytuje pouze na povrchu. Na překryvu lze vidět změněnou polohu jader (DNA značena pomocí DAPI modrou barvou) během dělení. DIC znázorňuje buňku pod diferenciálním kontrastem.

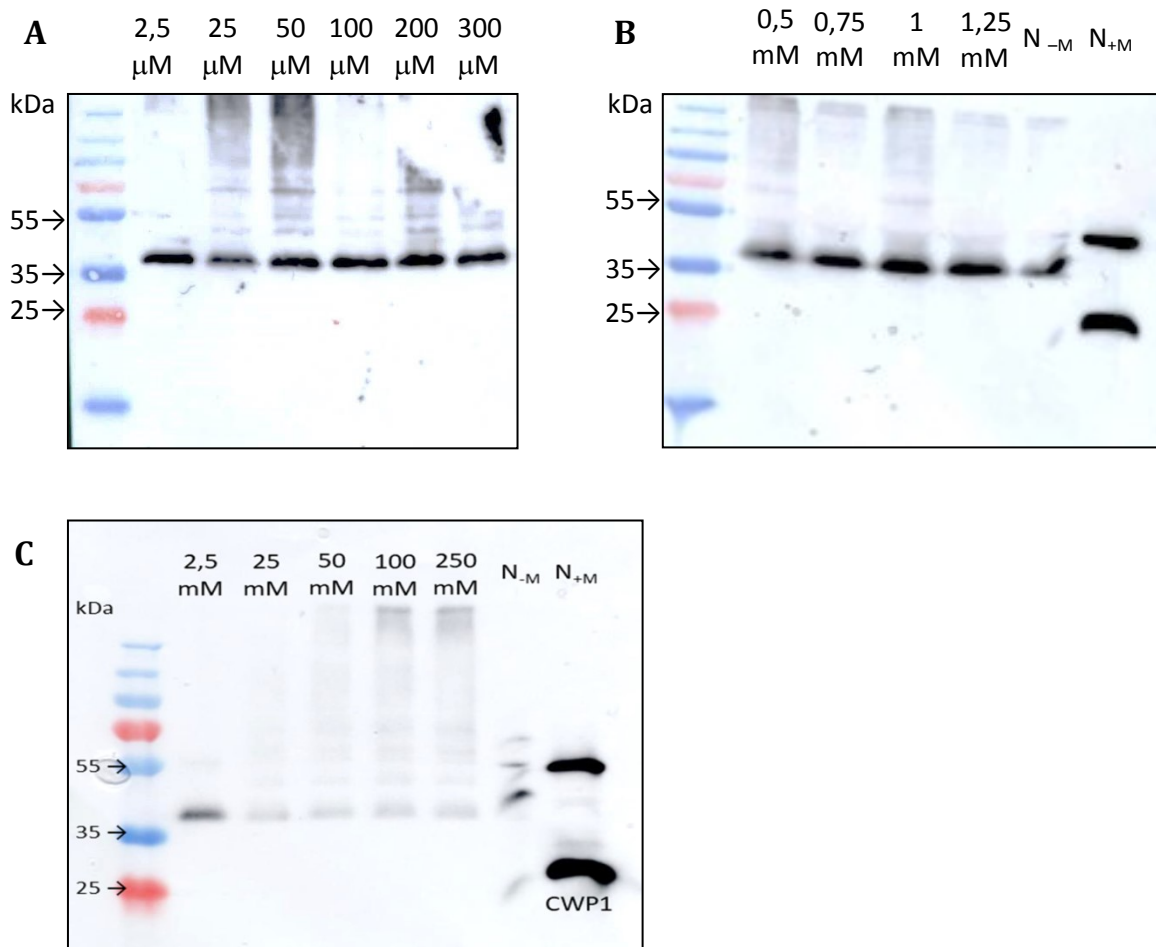
5.5 Testování optimální koncentrace cross-linkeru

Jelikož hlavním cílem práce bylo identifikovat proteiny asociované s encystačními váčky, byla využita metoda chemického cross-linku. Pomocí přidaného cross-linkeru byly CWP proteiny označené BAP-tagem propojeny s dalšími neznámými proteiny v dosahu jeho působení. Navíc díky navázaným molekulám biotinu mohly být CWP proteiny využity i pro následnou izolaci (viz kapitola 5.6). BAP-tagem označené CWP proteiny byly tedy použity jako jakási "návnada" pro charakterizaci celkového složení ESV.

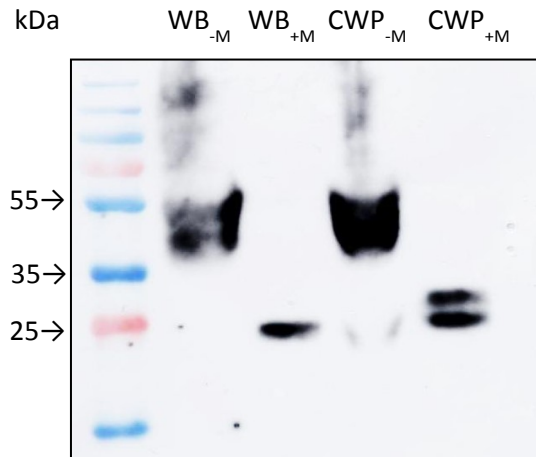
Pro chemický cross-link byly využity celé živé buňky *G. intestinalis* s vnesenou dvojicí komplementárních plasmidů s vloženými CWP1 a BirA, které byly encystovány po dobu 18 h. Všechny vzorky s výjimkou poslední negativní kontroly N_{+M} byly připravovány za neredukujících podmínek, aby nedošlo k redukci intramolekulárního disulfidu uvnitř cross-linkeru DSP. Výsledky působení cross-linkeru byly detekovány na western blotu za použití protilátky proti BAP-tagu (obrázek 30 A-C). Jelikož není známo, jaká optimální koncentrace cross-linkeru DSP se dostane přes membránu ESV až k proteinu CWP1, bylo nejprve zapotřebí ji určit. Testovány byly koncentrace: 2,5 μ M; 25 μ M; 50 μ M; 100 μ M; 200 μ M; 300 μ M; 0,5 mM; 0,75 mM; 1 mM; 1,25 mM; 2,5 mM; 25 mM; 50 mM; 100 mM a 250 mM. Na výsledných western blotech (obrázek 30 A-C) byl pozorován komplex o velikosti \sim 40 kDa, a to i u vzorků, ke kterým nebyl přidáván cross-linker. Z výsledků je navíc patrné, že je tento komplex citlivý na redukci, což značí, že se jedná o přirozenou disulfidickou vazbu a tento komplex je tedy vytvářen přirozeně. Tvorba dalších proteinových komplexů je viditelná v horních částech western blotů u jednotlivých vzorků (viz obrázek 30 A-C). Jako nejvhodnější koncentrace cross-linkeru pro další pokusy byla zvolena hodnota 100 mM, při které již byly detekovány větší proteinové komplexy v horní části western blotu a zároveň byl mezi ně navazován i objevený \sim 40kDa komplex (viz obrázek 30 C).

Negativní kontroly na obrázku 30 C byly připraveny ze vzorku nelyzovaných buněk v PBS s přidaným DMSO bez cross-linkeru. Jedna byla připravována za neredukujících podmínek (N_{-M}), zatímco druhá za redukujících (N_{+M}).

Z výsledků kontrol (viz obrázek 30 B+C) je patrné, že protein CWP1 by se mohl přirozeně nacházet v komplexu s jiným neznámým proteinem o celkové velikosti komplexu ~ 40 kDa. Tato hypotéza byla dále testována na western blotu pomocí specifické protilátky proti CWP1. Byly připraveny zcela nové vzorky reprezentující neredukující i redukující prostředí. Jako kontrola byly využity buňky "wild type" linie. Výsledky potvrzují předpoklad, že CWP1 za neredukujících podmínek vytváří komplex s neznámým proteinem. Z výsledků je zároveň zřejmé, že vytvořený systém s CWP1 značeným BAP-tagem se chová stejně jako přirozený CWP1 ve „wild type“ linii – tedy, že za neredukujících podmínek vytváří stejné komplexy (viz obrázek 31)



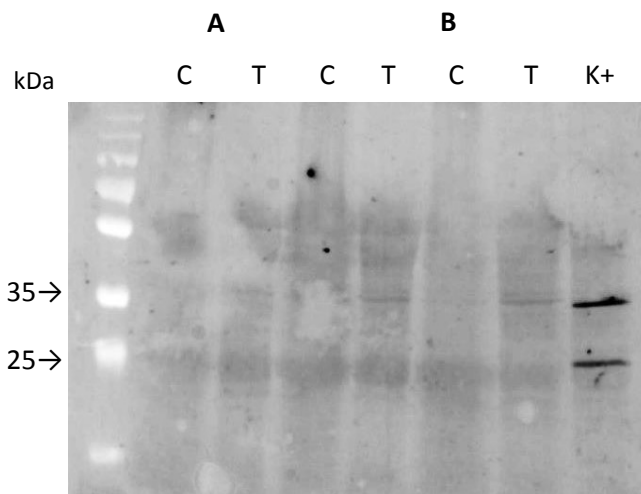
Obrázek 30: Testování optimální koncentrace cross-linkeru v buňkách *G. intestinalis* po transfekci vektorem nesoucím konstrukt pro CWP1 metodou western blot. Pro detekci byla použita protilátka proti BAP tagu. Na všech membránách (A-C) byl detekován band o velikosti ~ 40 kDa značící tvorbu komplexu CWP1 s neznámým proteinem. Stejný band byl detekován také u kontrol na obrázcích B a C připravených za neredukujících podmínek, což značí, že tvorba tohoto proteinového komplexu je pravděpodobně přirozená a nezávisí na přidání cross-linkeru. Jako vhodná koncentrace cross-linkeru pro další pokusy byla zvolena hodnota 100 mM, jelikož při ní byly detekovány větší proteinové komplexy, mezi které byl postupně navazován i detekovaný ~ 40kDa band. Ve vzorcích negativních kontrol připravených za redukcujících podmínek byl detekován band o velikosti ~ 55 kDa. Vzhledem k charakteru vzorků by se mohlo jednat o artefakt použité protilátky.



Obrázek 31: Testování hypotézy tvorby proteinových komplexů v cystách *G. intestinalis* po transfekci vektorem nesoucím konstrukt pro CWP1 a ve wild type linii metodou western blot. Vzorky byly připravovány za neredukujících a za redukujících podmínek. Detekce probíhala za pomoci protilátky proti CWP1. Z obrázku je patrné, že nově vytvořený systém s CWP1 značeným BAP-tagem se chová stejně jako přirozený CWP1 – tedy, že za neredukujících podmínek vytváří stejné komplexy o velikosti přibližně 40 kDa.

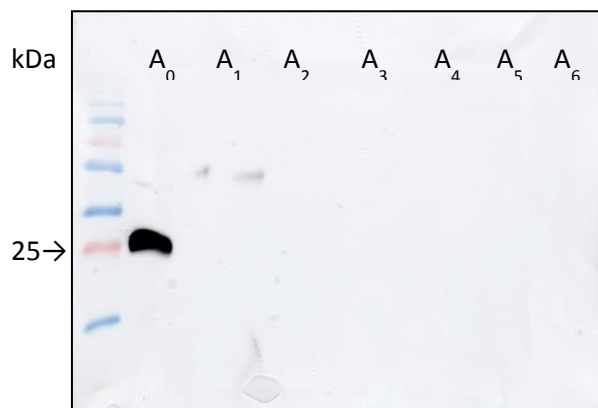
5.6 Ověření funkčnosti systému pro biotinylation *in vivo*

Aby mohla být provedena izolace CWP proteinů značených BAP tagem, společně s dalšími navázanými proteiny pomocí cross-linkeru (viz. kapitola 5.5), bylo nezbytně nutné, aby docházelo k jejich správné biotinylationi. Biotinylation byla zjišťována na membráně po western blotu buněčného lyzátu detekcí fluorescenčně značeného streptavidinu (Alexa® fluor 488). I přes opakované ověřování v buňkách nesoucích jak BirA, tak i CWP1 značený BAP-tagem, se nepodařilo biotinylationi akceptorového peptidu detekovat. Pozitivní biotinylationi lze na western blotu u jednotlivých vzorků vidět pouze u velikosti 35 kDa, což značí přítomnost BirA, která při nedostatku substrátu biotinyluje sama sebe. Pozitivní biotinylatione byla detekována také u vzorku pozitivní kontroly (viz obrázek 32). Jako možné vysvětlení negativního výsledku byla navržena hypotéza, že by BirA, jakožto cytoplasmatický protein, nemusela pronikat do ESV, tzn., že by se vůbec nedostávala do kontaktu s CWP1.



Obrázek 32: Ověření biotinylace markeru pro ESV pomocí metody western blot po transfekci buněk *G. intestinalis* vektorem nesoucím BirA a CWP1. **A)** Vzorky cyst a trofozoitů z "wild type" kmene *G. intestinalis* použité jako negativní kontrola. **B)** Testované vzorky cyst a trofozoitů *G. intestinalis* nesoucích plasmid obsahující BirA a CWP1. **K+)** Pozitivní kontrola – vzorek obsahující BirA (35 kDa) a hypotetický protein 17617 (25 kDa).

I přes pravděpodobný neúspěch z důvodu předpokladu nefunkční biotinylace CWP1 byl proveden pokus o izolaci CWP1 a dalších hypotetických proteinů asociovaných s ESV. Zvažovali jsme totiž, zda přece jen část CWP1 není v buňkách biotinylována a mohla by být proto specificky nabohacena z většího objemu buněk. Pro izolaci byly využity magnetické kuličky Dynabeads® s navázaným streptavidinem. Získané vzorky A0-A7, které odpovídají jednotlivým frakcím odebíraným postupně po celou dobu trvání experimentu (viz kapitola 4.9), byly analyzovány na western blotu za použití protilátky proti BAP tagu. Z výsledků je patrné, že signál byl detekován pouze u kontroly A0 (viz obrázek 33), kde lze vidět band o velikosti 26 kDa značící přítomnost CWP1. Z důvodu absence biotinylace pravděpodobně u žádného z dalších vzorků nedošlo k navázání na kuličky Dynabeads®.



Obrázek 33: Průběh izolace proteinových partnerů CWP1 za pomoci Dynabeads® s navázaným streptavidinem. Detekce prostřednictvím western blotu a protilátky proti BAP-tagu. Zleva: A0 – buňky *G. intestinalis* v PBS, A1 – pelet buněk po chemickém cross-linku a inkubaci v 80 °C, A2 – supernatant oddělený od vzorku A1, A3 – 10x zředěný vzorek A2, A4 – kuličky Dynabeads® se vzorkem A3 po inkubaci přes noc, A5 – vzorek získaný promytím vzorku A4 inkubačním pufru s SDS a boiling pufrům, A6 – vzorek získaný promytím vzorku A4 SDS-PAGE vzorkovým pufrům bez merkaptotetanolu, A7 – tekutina včetně kuliček po dalším promytí vzorku A4 v inkubačním pufru s SDS. (Detailní popis jednotlivých vzorků viz kapitola 4.9).

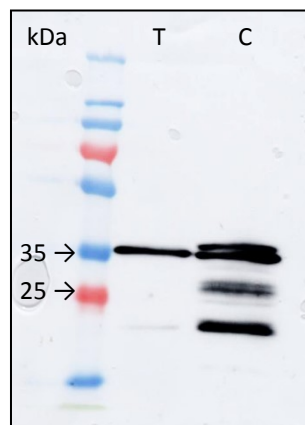
Signál byl detekován pouze u vzorku A0 – značí přítomnost CWP1. U ostatních vzorků signál nebyl detekován, tedy pravděpodobně nedošlo k navázání na Dynabeads®.

Pozn.: Vzhledem k přítomnosti bandu u vzorku A0, by měl tento band být detekován také u vzorků A1 nebo A2. K tomu nedošlo pravděpodobně z důvodu přílišného naředění vzorku kvůli dodržení určené koncentrace proteinů (viz kapitola 4.9).

5.7 BirA a endoplasmatické retikulum

Jako řešení problémů s nefunkční biotinylací (viz. kapitola 5.6) bylo přistoupeno k použití nového konstruktů obsahujícího opět gen pro BirA, navíc obohacený o přidanou signální sekvenci, která směřuje tento protein do ER, kde dochází také k syntéze CWP1. Tento konstrukt, který navíc obsahoval silný OCT promotor zajišťující konstitutivní expresi, byl vytvořen Mgr. Evou Pyrihovou Ph.D. Po opakované transfekci trofozoitů *G. intestinalis* zmíněným plasmidem bylo zjištěno, že transfekované buňky nejsou schopny dlouhodobého přežití. K vymření celé kultury došlo vždy po třech týdnech od počátku stabilního růstu po elektroporaci. Bylo uváženo, že z důvodu přítomnosti silného OCT promotoru mohlo docházet k takové expresi BirA, která byla pro buňky *G. intestinalis* toxická. Jako možné řešení toxicity byla navržena výměna promotoru v konstruktů pro BirA. Jako vhodný kandidát byl vybrán přirozený promotor proteinu CWP1, jehož výhodou je ustanovení společné indukce BirA a CWP1. Výměna promotoru měla spočívat ve

vystřížení přirozeného promotoru pro CWP1 z plasmidu poskytnutého Mgr. Natalií Wandyszewskou a v následovném vložení do výše zmíněného konstruktů obsahujícího BirA. Ani opakované pokusy o výměnu promotoru však nebyly úspěšné, proto bylo přistoupeno k alternativnímu řešení, a to k vystřížení sekvence BirA se signálním peptidem do ER z původního plasmidu a následnému vložení do poskytnutého plasmidu obsahujícího přirozený promotor pro CWP1, odkud byla předtím vystřížena nežádoucí část původního konstruktů. Po vytvoření konstruktů a jeho vnesení do buněk se potvrdilo, že buňky *G. intestinalis* jsou v tomto případě schopny dlouhodobého přežívání ve stabilní kultuře. U buněk transfekovaných plasmidem nesoucím nový konstrukt pro BirA bylo také dosaženo úspěšného ověření exprese proteinu pomocí metody western blot (viz obrázek 34). Pro detekci BirA byla použita protilátka proti HA-tagu. Bandy o menší než požadované velikosti jsou pravděpodobně degradační produkty proteinu. Horní band o větší velikosti, než bylo očekáváno, by mohl poukazovat na přítomnost proteinu s ještě neodstříženým signálním peptidem. K nižší, ale dobře detekovatelné expresi, docházelo i u trofozoitů (Obrázek 34).



Obrázek 34: Ověření exprese BirA v nově vytvořeném konstruktů, detekce pomocí protilátky proti HA-tagu. Band o velikosti 35 kDa naznačuje přítomnost maturovaného proteinu BirA, zatímco bandy o menší velikosti, než bylo očekáváno, jsou pravděpodobně degradační produkty proteinu. Horní band o větší než očekávané velikosti by mohl ukazovat přítomnost proteinu ještě se signálním prekurzorem.

Lokalizace BirA byla ověřena metodou nepřímé fluorescence v kmeni *G. intestinalis* nesoucím nově vytvořený plasmid pro tento protein. Detekce proběhla pomocí protilátky proti HA-tagu. Stabilně rostoucí kultura buněk transfekovaná zvoleným plasmidem byla encystována po dobu 18 h a následně byly buňky fixovány 1% paraformaldehydem. Lokalizace proteinu byla pozorována u encystujících trofozoitů, cysty nebyly detekovány (viz obrázek 35). Červený signál na obrázku 35 by měl zobrazovat předpokládanou lokalizaci proteinu BirA v ER.



Obrázek 35: Lokalizace HA-tagované BirA se signálním peptidem, KDEL sekvencí a přirozeným promotorem z CWP1 v encystujících trofozoitech *G. intestinalis* pomocí nepřímé imunofluorescence. Lokalizace BirA je znázorněna červeně značenou protilátkou proti HA-tagu. Červený signál by měl zobrazovat předpokládanou lokalizaci proteinu v ER. Na překryvu lze vidět stejně značenou lokalizaci BirA spolu s jádry buňky, ve kterých je DNA značena modrou barvou (DAPI). DIC znázorňuje buňku pod diferenciálním kontrastem.

6 Diskuze

6.1 Encystační váčky a CWP proteiny u *G. intestinalis*

ESV *G. intestinalis* jsou speciální organely objevující se pouze při procesu encystace a sloužící ke shromáždění a dozrávání materiálu pro budoucí cystovou stěnu a k jeho transportu na povrch buňky (Reiner et al., 1989). Je známo, že obsahují tři sekvenčně částečně podobné proteiny, které později tvoří hlavní stavební části cystové stěny. Kromě přítomnosti CWP1-3, jsou o celkovém složení ESV a jejich biogenezi k dispozici jen dílčí studie (Faso et al., 2013a; Wampfler et al., 2014). Hlavním cílem práce bylo vytvořit experimentální systém, který umožní identifikovat celkové složení ESV a případné posttranslační úpravy proteinů ESV v průběhu encystace parazita. K dosažení tohoto cíle bylo využito právě známých CWP proteinů. Experimentálním záměrem byla purifikace značených CWP za podmínek, které umožňují současnou kopurifikaci dalších komponent ESV.

Pro účely purifikace CWP byla využita metoda enzymatického značení *in vivo* založená na sekvenčně specifické biotinylní cílovému proteinu (Howarth a Ting, 2008). Metoda využívá aktivitu biotin ligázy BirA, která specificky připojuje molekuly biotinu k akceptorovému peptidu, který byl v případě této práce součástí vytvořených konstruktů pro všechny CWP proteiny.

6.2 Příprava konstruktů

Základem pro úspěšné naplnění vytyčených cílů byla příprava vlastních konstruktů pro expresi v *G. intestinalis*. Z výsledků (viz kapitola 5.2) je patrné, že u většiny konstruktů proběhla práce bez větších problémů a chimerické geny nesoucí sekvenci BAP se podařilo úspěšně amplifikovat a vnést do giardiových vektorů. U konstruktu pro CWP2 se však zprvu nedařila ani samotná amplifikace. Pro vnesení sekvence BAP dovnitř genu pro CWP2 bylo nutné vytvořit dva oddělené PCR produkty a ty posléze spojit do jednoho řetězce. Vlastní spojování dvou hotových PCR produktů nebylo nejprve úspěšné vůbec. Později při několikanásobném opakování docházelo k amplifikaci pouze jedné ze dvou původních částí konstruktů. Výsledek byl příkládán faktu, že původní primery pro amplifikaci prvních dvou částí genu pro CWP2 mají delší sekvenci než je obvyklé, a proto zůstávají ve výsledné DNA i po přečištění přes kolonku při izolaci z horizontálního agarózového gelu. K eliminaci tohoto problému bylo navrženo snížit původní koncentrace primerů do té míry, aby nedocházelo ke kontaminaci DNA získané v dalších krocích. Bylo tedy připraveno několik dalších reakcí se zředěnými primery v různém poměru. Problém se podařilo vyřešit zředěním primerů na finální koncentraci 2,5 μ M a sekvenací produktu

bylo ověřeno úspěšné vytvoření chimerického konstruktů pro protein CWP2 s interním BAP-tagem. Bohužel se však ani přes opakované pokusy o vložení konstruktů do vektoru pONDRA, nebyly úspěšné. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto s navrženým konstruktem pro CWP2 prozatím již dále nepracovat. Jako možné řešení do budoucna bylo uváženo použití In-Fusion PCR Cloning kitu (Clontech), který umožňuje efektivnější klonování delších a složitějších fragmentů DNA bez nutnosti použití restrikčních a ligačních enzymů.

6.3 Systém pro biotinylací *in vivo*

6.3.1 Exprese CWP proteinů a BirA

Imunodetekcí pomocí specifických protilátek bylo prokázáno, že proteiny CWP1 a CWP3 jsou exprimovány, a to jak ve vzorcích obsahujících pouze stádia trofozoitů, tak i u encystujících stádií, u kterých byla navíc dle předpokladu exprese detekována ve viditelně větší míře. Získané výsledky lze vysvětlit několika hypotézami. Za první možné vysvětlení lze pokládat skutečnost, že kontrola iniciace translace CWP1 a CWP3 by nemusela být natolik striktní a k expresi proteinů by mohlo v malé míře docházet již u stádií trofozoitů.

Již dříve bylo zjištěno, že transkripty genu pro CWP1 lze u trofozoitů v nízké hladině také detekovat, nicméně protein jako takový se detekovat nepodařilo. Předpokládá se tedy, že translace tohoto proteinu nastává až ve chvíli, kdy po začátku encystace začne hladina mRNA pro CWP1 dramaticky narůstat (Mowatt et al., 1995b). Dalším možným vysvětlením tedy je, že v buňkách transfekovaných plasmidy s konstrukty navrženými pro tuto práci, by hladina mRNA pro CWP1 a CWP3 u neencystujících trofozoitů mohla být v takové výši, aby docházelo k translaci a proteinové expresi. Nicméně dosud nebyl popsán žádný mechanismus, který by dokázal mRNA inhibovat, aby se v buňce nacházela v tak nízké hladině, při které ještě nedochází k expresi. Jako vysvětlení otázky exprese CWP1 a CWP3 u trofozoitů se tedy spíše nabízí první možnost.

Ačkoliv cytosolická BirA není pro *G. intestinalis* přirozeným proteinem, její exprese probíhala bez sebemenších problémů jak u stádií trofozoitů, tak v cystách, dle předpokladů na základě zkušeností s tímto proteinem v naší laboratoři.

6.3.2 Biotinylace markeru pro encystační váčky

Jádro celého projektu spočívalo v izolaci možných proteinů asociovaných s ESV. Proto bylo nezbytně nutné, aby docházelo ke správné biotinylací CWP proteinů a možné nově nalezené proteiny bylo možné spolu s nimi izolovat. Detekce pomocí značeného streptavidinu blotu však ukázala, že k biotinylací CWP proteinů nedochází, i když byla úspěšně protilátkou ověřena přítomnost BAP sekvence, která je biotinylována. Tento

výsledek byl velice překvapivý, protože díky předchozím zkušenostem s biotinylací mitosomálních proteinů v naší laboratoři (Martincová et al., 2015) byla předpokládána funkčnost celého systému. Výsledek byl přisuzován faktu, že nedošlo k dostatečnému kontaktu BirA a sekvence BAP, který by vyústil k biotinylaci proteinu CWP1. Doposud není známa přesná topologie a pohyb CWP1 v buňce ani prostupnost systému ESV. BirA jakožto cytoplasmatický protein tedy pravděpodobně vůbec neproniká do ESV. Neschopnost cytoplasmatické biotin ligázy biotinylovat BAP připojený k CWP1 poukazuje také na to, že tento protein je transportován kotranslačně.

Jako možné řešení bylo navrženo použití jiného konstruktů pro biotin ligázu, který byl převzat od Mgr. Evy Pyrihové, Ph.D a obsahoval gen pro BirA s HA-tagem, navíc nesoucí N-koncový signální peptid a C-koncovou sekvenci KDEL, která je rozeznávána jako retenční signál pro proteiny ER (Faso et al., 2013b). Tím měla být zajištěna dostupnost kontaktu mezi biotin ligázou a CWP1. Buňky *G. intestinalis* transfekované tímto novým plasmidem však nebyly schopny dlouhodobého přežití a buněčná kultura vymírala. Plasmid pTG, do kterého byl zvolený konstrukt pro BirA vložen, obsahuje silný promotor, který je součástí 5'-UTR oblasti genu pro ornitin karbamoyltransferázu (OCT) – nejvíce exprimovaného transkriptu u trofozoitů *G. intestinalis* (Lauwaet et al., 2007; Palm et al., 2003). Pravděpodobně tedy docházelo k příliš silné expresi BirA v ER, která byla pro buňky toxická. Jako možné řešení byla navržena výměna OCT promotoru za slabší. Jako vhodný kandidát byla zvolena 5'-UTR oblast proteinu CWP1, která měla jednak zajistit nízkou hladinu exprese proteinů u trofozoitů, a zároveň simultánní indukci s CWP1. Byl proto navržen konstrukt, při kterém došlo k vystřižení sekvence BirA se signální sekvencí do ER a dvojitým HA-tagem z původního plasmidu pTG a následnému vložení do jiného plasmidu pTG, který již obsahoval 5'UTR oblast CWP1. Tato výměna byla úspěšná. Díky slabšímu promotoru, a tedy i slabší expresi BirA, byly buňky schopny dlouhodobě přežívat ve stabilní struktuře.

Díky použití encystačního promotoru v upraveném konstruktů pro BirA bylo pro ověření exprese proteinu nutné u trofozoitů *G. intestinalis* indukovat encystaci. Z výsledků (viz kapitola 5.4.1) je patrné, že exprese BirA byla detekována také u vzorků obsahujících trofozoity, ale k výraznému nárůstu exprese došlo právě během encystace. Detekce exprese BirA ve vzorcích obsahujících encystující trofozoity byla sice úspěšná, ačkoliv byly na blotu detekovány také bandy o jiné velikosti než bylo očekáváno. Přítomnost bandů o větší velikosti než ~ 37 kDa (předpokládání velikost BirA se signální KDEL sekvencí) může značit přítomnost proteinu ještě se signálním peptidem před jeho odštěpením. O detekovaných bandech o menší než předpokládané velikosti lze usuzovat, že pravděpodobně značí přítomnost degradačních nebo nedokončených produktů proteinu BirA (Martincová et al., 2015). Jejich přítomnost lze vysvětlit několika způsoby. Je možné, že část chimerického proteinu není úspěšně kotranslačně transportována do ER, ale zůstává v cytoplasmě, kde je degradována. Další možností může být také chyba ve skládání

BirA uvnitř ER, kde se přirozeně nevyskytuje. Nesložené proteiny jsou pak směřovány k degradaci do cytoplasmy (Smith et al., 2011).

6.3.3 Buněčná lokalizace CWP proteinů a BirA

Pro celkový úspěch experimentů byla naprosto klíčová správná lokalizace BAP-tagovaných CWP proteinů. Po *in vitro* indukované encystaci buněk *G. intestinalis* encystace, byla u encystujících trofozoitů očekávána lokalizace proteinů CWP1 a CWP3 v ESV, v případě již maturovaných cyst pak ve stěně cysty (Gottig et al., 2006b; Konrad et al., 2010). Předpoklad byl jasně potvrzen distribucí signálů pomocí imunofluorescenční mikroskopie. V případě BirA byla pro tento protein očekávána lokalizace v cytoplasmě (Martincová et al., 2015), jež byla distribucí imunofluorescenčního signálu také potvrzena. U později vytvořeného konstruktů pro BirA s 5'-UTR oblastí CWP1 se signálním peptidem a retenčním signálem KDEL, byla očekávána lokalizace v ER. Detekovaný signál imunofluorescenčního značení ale spíše naznačuje dominantní cytoplasmatickou lokalizaci, a to z důvodu vysoké podobnosti se signálem detekovaným u cytoplasmatické BirA. V buňkách je však patrná i dílčí vezikulární lokalizace, které by mohla svědčit o lokalizaci proteinu v kompartmentu endomembránového systému. Tyto výsledky korespondují s výsledky detekce exprese tohoto proteinu na western blotu, které nejsou jednoznačné a svědčí o komplikovaném procesování této formy BirA. Klíčová proto bude následná lokalizace proteinu v buněčných frakcích – tj. zda protein sedimentuje jakou součást membránově definovaných organel nebo zůstává v supernatantu, který odpovídá cytoplasmě. Důležité bude i dvojitě imunofluorescenční značení s markerovými protein pro cytoplasmu a ER. Pro následující pokusy však není vyžadována výhradní lokalizace BirA v ER. Pro biotinylací proteinů v lumen ER by teoreticky stačila pouze úspěšně transportovaná frakce enzymu.

6.3.4 Tvorba komplexů CWP1

I přes pravděpodobný neúspěch z důvodu předpokladu nefunkční biotinylace CWP1 byl proveden pokus o izolaci možných proteinů asociovaných s ESV. Naší pracovní hypotézou bylo, že sice jen malá část proteinu je v buňce biotinylována a nemůže být proto detekována na western blotu buněčného lyzátu, ale i ta by mohla být specificky nabohacena purifikací z velkého množství buněk.

Bohužel tento experiment dopadl negativně a nedošlo k nabohacení proteinu pomocí magnetických kuliček s navázaným streptavidinem.

V průběhu práce s BAP-tagovaným CWP1 byl protein na vzorcích buněčných lyzátů připravených za neredukujících detekován jako band o přibližné velikosti 40 kDa. To by ukazovalo na fakt, že CWP1 by mohl pomocí disulfidického můstku tvořit komplex

s dalším neznámým proteinem. Tato domněnka byla potvrzena na přirozeném proteinu analýzou lyzátu encystujících „wild type“ buněk. Ze získaných výsledků je zároveň zřejmé, že uměle vytvořený systém s CWP1 značeným pomocí BAP-tagu a přirozený CWP1 ve „wild type“ linii se chovají identicky, tedy že za neredukujících podmínek vytváří stejné komplexy s dalším proteinem. Pro jeho identifikaci však bude nutné nejprve dokončit optimalizaci biotinylačního systému.

Při zjišťování optimální koncentrace cross-linkeru bylo zároveň zjištěno, že tato hodnota (100mM), je poměrně vysoká. Ze zkušeností v laboratoři s cross-linkováním mitosomálních proteinů, je zřejmé, že jsou běžně používány i nižší koncentrace cross-linkeru (25 μ M) (Martincová et al., 2015). To by mohlo poukazovat na skutečnost, že membrána systému ESV je pro cross-linker hůře prostupná. Složení membrán ESV dosud není známé a je možné, že ESV díky své specifické buněčné funkci mají i specifické složení lipidů.

Bez jasného vysvětlení však zůstává existence BAP-specifického bandu o velikosti ~ 55 kDa, který byl detekován u vzorků připravených za redukujících podmínek. Neredukovaný komplex obsahující CWP1 o velikosti cca 40 kDa se po redukcii rozpadá na očekávaný protein o velikosti 25 kDa (velikost izolovaného CWP1) a tento větší komplex. Vzhledem k tomu, že byl detekován je v případě BAP-tagovaného CWP1 a nikoliv u přirozeného proteinu, jedná se pravděpodobně o artefakt použité anti-BAP protilátky.

6.3.5 Encystace u ostatních diplomonád

Pomocí bioinformatických analýz lze proteiny strukturně podobné s CWP proteiny *G. intestinalis* identifikovat u několika příbuzných prvoků z řádu *Diplomonadida* (*Spironucleus salmonicida* a *Trepomonas* sp.). U *S. salmonicida* nebylo nalezení proteinů, které vykazují určitou homologii s CWP1 *G. intestinalis*, překvapivé, jelikož se o jejich existenci zmiňují i experimentální data v literatuře (Xu et al., 2014). Překvapivá je ovšem samotná existence těchto proteinů, jelikož u *S. salmonicida* nebylo stádium cysty doposud nikdy detekováno (Xu et al., 2014). To by mohlo znamenat, že existence tohoto stádia v životním cyklu by mohla být redukována až druhotně. Pravděpodobnější však je, že stádium cysty se v životním cyklu *S. salmonicida* skutečně objevuje, pouze nebylo z blíže nezjištěného důvodu nikdy detekováno. Ani *in vitro* encystace tohoto parazita se doposud nepodařila. Tuto hypotézu podporují i výsledky genomové analýzy dostupné v literatuře a skutečnost, že tyto pravděpodobné proteiny cystové stěny jsou při experimentální expresi v *G. intestinalis* vloženy do cystové stěny (Xu et al., 2014). Experimentální data zabývající se přítomností cystového stádia u *Trepomonas* sp. nebyla nalezena. Tento organismus je ale na rozdíl od *G. intestinalis* a *S. salmonicida* volně žijící, přítomnost nalezených proteinů by tedy mohla naznačovat, že tento styl života se mohl vyvinout až jako sekundární adaptace.

Na základě alignmentu všech tří CWP proteinů u *G. intestinalis*, včetně kmene P15 a assemblage B, s nalezenými CWP proteiny třídy 1 a 2, CWP C a CWP D u *S. salmonicida* a CWP proteinem u *Trepomonas sp.* je patrné, že všechny uvedené proteiny společně sdílejí vysoký stupeň sekvenční podobnosti, některé aminokyseliny jsou navíc konzervované ve všech sekvencích. Z porovnání všech sekvencí lze vyvodit závěr, že cysty a jejich tvorba jsou podobné u různých zástupců z řádu Diplomonadida.

7 Závěr

Tato práce se zabývá identifikací a izolací proteinů asociovaných s ESV parazitického prvoka *G. intestinalis*. Experimentální část je tedy zaměřena na vytvoření systému, který umožňuje cíleně charakterizovat proteiny a buněčné kompartmenty za využití biotin ligázy BirA získané z *Escherichia coli*. Pro tyto účely bylo vytvořeno několik konstruktů, které se podařilo úspěšně zaklonovat do vektorů a posléze transfekovat do buněk *G. intestinalis*. Pro potřeby klonování byla také optimalizována metoda místně specifické mutagenese. U všech vybraných proteinů byla úspěšně detekována exprese, která byla navíc stabilní a snadno navoditelná. Pomocí fluorescenční mikroskopie byla potvrzena buněčná lokalizace proteinů – pro proteiny CWP1 a CWP3 v ESV, pro BirA v cytoplasmě. Dále bylo zjištěno, že protein CWP1 tvoří za přirozených podmínek komplex s neznámým proteinem.

Nové proteiny asociované s ESV se identifikovat nepodařilo, neboť bylo zjištěno, že BirA pravděpodobně neproniká do ESV a tudíž se nedostává do kontaktu s CWP1 a nemůže ho biotinylovat. Proto byl vytvořen nový konstrukt pro BirA, obsahující navíc signální sekvenci do ER, aby byl zajištěn jeho kontakt s CWP1. Exprese takto upraveného proteinu byla úspěšně detekována, nicméně jeho buněčná lokalizace nebyla dosud spolehlivě určena. Pravděpodobné je, že se v buňce nachází na více místech. Z důvodu časové náročnosti projektu nebyly další experimenty provedeny. V neposlední řadě práce uvádí do souvislosti složení stěny cysty *G. intestinalis* a ostatní komponenty cystové stěny u několika dalších parazitických prvoků.

8 Seznam použitých zkratek

5'UTR	5' nepřekládaná oblast mRNA
Arf1	GTPáza Golgiho komplexu
BAP	„biotin acceptor peptide“
BirA	proteinová biotin ligáza
BSA	„bovine serum albumin“
COWP	„cryptosporidium oocyst wall protein“
Cre/loxP	rekombinační systém
CWP	„cyst wall protein“ <i>G. intestinalis</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTPs	deoxynukleotidy
DSP	dithiobis (succinimidyl propionát)
EDTA	polyaminokarboxylová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
ESV	encystační váčky
G418	geneticin
GalNAc	$\beta(1-3)$ -N-acetylgalaktosamin
GlcNAc	$\beta(1-4)$ -N-acetylglukosamin
HA-tag	hemagglutininový tag
HCNC	„high cysteine non-variant cyst“ protein
KDEL	signální sekvence směřující proteiny do endoplasmatického retikula
LB	„Lysogeny broth“ , růstové médium pro bakterie
LRR	strukturní motiv leucinové repetice
LRRNT_2	proteinová rodina „Leucine rich repeat N-terminal domain“
OCT	ornitin karbamoyltransferáza
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
Sar1	GTPáza COPII váčeků
SDS	dodecylsírnan sodný
SOC	„super optimal broth with catabolite repression“, růstové médium pro bakterie
TgOWP	„ <i>Toxoplasma gondii</i> oocyst wall protein“
TGS	„Tris-glycine-SDS“ pufr
VSP	„variable surface protein“, povrchový protein <i>G. intestinalis</i>

9 Seznam použité literatury

- Arroyo-Begovich, A., Cárabez-Trejo, A. a Ruíz-Herrera, J.** (1980). Identification of the Structural Component in the Cyst Wall of *Entamoeba invadens*. *Source J. Parasitol.* **66**, 735–741.
- Beckett, D., Kovaleva, E. a Schatz, P. J.** A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation.
- Bingham, A. K. a Meyer, E. A.** (1979). *Giardia* excystation can be induced in vitro in acidic solutions [15]. *Nature* **277**, 301–302.
- Buchel, L.-A., Gorenflot, A., Chochillon, C., Savel, J. a Gobert, J.-G.** (1987). In vitro Excystation of *Giardia* from Humans: A Scanning Electron Microscopy Study. *Source J. Parasitol.* **73**, 487–493.
- Bushkin, G. G., Motari, E., Magnelli, P., Gubbels, M.-J., Dubey, J. P., Miska, K. B., Bullitt, E., Costello, C. E., Robbins, P. W. a Samuelson, J.** (2012). β -1,3-glucan, which can be targeted by drugs, forms a trabecular scaffold in the oocyst walls of *Toxoplasma* and *Eimeria*. *MBio* **3**,
- Bushkin, G. G., Motari, E., Carpentieri, A., Dubey, J. P., Costello, C. E., Robbins, P. W. a Samuelson, J.** (2013). Evidence for a structural role for acid-fast lipids in oocyst walls of *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, and *Eimeria*. *MBio* **4**, e00387-13.
- Davids, B. J., Reiner, D. S., Birkeland, S. R., Preheim, S. P., Cipriano, M. J., McArthur, A. G. a Gillin, F. D.** (2006). A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. *PLoS One* **1**, e44.
- Dolezal, P., Smíd, O., Rada, P., Zubáková, Z., Bursać, D., Suták, R., Nebesárová, J., Lithgow, T. a Tachezy, J.** (2005). *Giardia* mitochondria and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 10924–9.
- Dumètre, A., Dubey, J. P., Ferguson, D. J. P., Bongrand, P., Azas, N. a Puech, P.-H.** (2013). Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 11535–40.
- Ebneter, J. A., Heusser, S. D., Schraner, E. M., Hehl, A. B. a Faso, C.** (2016). Cyst-Wall-Protein-1 is fundamental for Golgi-like organelle neogenesis and cyst-wall biosynthesis in *Giardia lamblia*. *Nat. Commun.* **7**, 13859.
- Eddy, S. R.** (1995). Multiple alignment using hidden Markov models.
- Einarsson, E., Troell, K., Hoepfner, M. P., Grabherr, M., Ribacke, U. a Svärd, S. G.** (2016). Coordinated Changes in Gene Expression Throughout Encystation of *Giardia intestinalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, 1–22.
- Faso, C., Bischof, S. a Hehl, A. B.** (2013a). The proteome landscape of *Giardia lamblia* encystation. *PLoS One* **8**, e83207.

- Faso, C., Konrad, C., Schraner, E. M. a Hehl, A. B.** (2013b). Export of cyst wall material and Golgi organelle neogenesis in *Giardia lamblia* depend on endoplasmic reticulum exit sites. *Cell. Microbiol.* **15**, 537–553.
- Finn, R. D., Clements, J. a Eddy, S. R.** (2011). HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.* **39**, W29–W37.
- Frisardi, M., Ghosh, S. K., Field, J., Van Dellen, K., Rogers, R., Robbins, P. a Samuelson, J.** (2000). The most abundant glycoprotein of amebic cyst walls (Jacob) is a lectin with five Cys-rich, chitin-binding domains. *Infect. Immun.* **68**, 4217–24.
- Fritz, H. M., Bowyer, P. W., Bogyo, M., Conrad, P. A. a Boothroyd, J. C.** (2012). Proteomic analysis of fractionated *Toxoplasma* oocysts reveals clues to their environmental resistance. *PLoS One* **7**, e29955.
- Ghosh, S. K., Van Dellen, K. L., Chatterjee, A., Dey, T., Haque, R., Robbins, P. W. a Samuelson, J.** (2010). The Jacob2 lectin of the *Entamoeba histolytica* cyst wall binds chitin and is polymorphic. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**, e750.
- Green, N. M.** (1990). Avidin and Streptavidin.
- Gottig, N., Elías, E. V., Quiroga, R., Nores, M. J., Solari, A. J., Touz, M. C. a Luján, H. D.** (2006a). Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **281**, 18156–66.
- Gottig, N., Elías, E. V., Quiroga, R., Nores, M. J., Solari, A. J., Touz, M. C. a Luján, H. D.** (2006b). Active and passive mechanisms drive secretory granule biogenesis during differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* **281**, 18156–66.
- Hehl, A. B., Marti, M. a Köhler, P.** (2000). Stage-specific expression and targeting of cyst wall protein-green fluorescent protein chimeras in *Giardia*. *Mol. Biol. Cell* **11**, 1789–800.
- Helms, J. B. a Rothman, J. E.** (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**, 352–354.
- Hetsko, M. L., McCaffery, J. M., Svärd, S. G., Meng, T.-C., Que, X. a Gillin, F. D.** (1998). Cellular and Transcriptional Changes during Excystation of *Giardia lamblia* in Vitro. *Exp. Parasitol.* **88**, 172–183.
- Howarth, M. a Ting, A. Y.** (2008). Imaging proteins in live mammalian cells with biotin ligase and monovalent streptavidin. *Nat. Protoc.* **3**, 534–45.
- Chakravartty, V. a Cronan, J. E.** (2012). Altered regulation of *Escherichia coli* biotin biosynthesis in BirA superrepressor mutant strains. *J. Bacteriol.* **194**, 1113–26.
- Chapman-Smith, A. a Cronan, J. E.** (1999). In vivo enzymatic protein biotinylation. *Biomol. Eng.* **16**, 119–125.
- Chatterjee, A., Ghosh, S. K., Jang, K., Bullitt, E., Moore, L., Robbins, P. W. a Samuelson, J.** (2009). Evidence for a “Wattle and Daub” Model of the Cyst Wall of *Entamoeba*. *PLoS Pathog.* **5**, e1000498.

- Chatterjee, A., Banerjee, S., Steffen, M., O'Connor, R. M., Ward, H. D., Robbins, P. W. a Samuelson, J.** (2010a). Evidence for mucin-like glycoproteins that tether sporozoites of *Cryptosporidium parvum* to the inner surface of the oocyst wall. *Eukaryot. Cell* **9**, 84–96.
- Chatterjee, A., Carpentieri, A., Ratner, D. M., Bullitt, E., Costello, C. E., Robbins, P. W. a Samuelson, J.** (2010b). Giardia cyst wall protein 1 is a lectin that binds to curled fibrils of the GalNAc homopolymer. *PLoS Pathog.* **6**, e1001059.
- Chávez-Munguía, B., Cedillo-Rivera, R. a Martínez-Palomo, A.** (2004). The ultrastructure of the cyst wall of *Giardia lamblia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**, 220–6.
- Januschka, M. M., Erlandsen, S. L., Bemrick, W. J., Schupp, D. G. a Feely, D. E.** (1988). A Comparison of *Giardia microti* and *Spironucleus muris* Cysts in the Vole: An Immunocytochemical, Light, and Electron Microscopic Study. *Source J. Parasitol.* **74**, 452–458.
- Jørgensen, Anders; Sterud, E.** (2006). The Marine Pathogenic Genotype of *Spironucleus barkhanus* from Farmed Salmonids Redefined as *Spironucleus salmonicida* n. sp. *J. Eukaryot. Microbiol.* **53**, 531–541.
- Keister, D. I.** (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 with bile medium supplemented.
- Kim, D. I., Jensen, S. C., Noble, K. A., Kc, B., Roux, K. H., Motamedchaboki, K. a Roux, K. J.** (2016). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* **27**, 1188–96.
- Kobe, B. a Deisenhofer, J.** (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 415–421.
- Konrad, C., Spycher, C., Hehl, A. B. a Beverley, S. M.** (2010). Selective Condensation Drives Partitioning and Sequential Secretion of Cyst Wall Proteins in Differentiating *Giardia lamblia*. *PLoS Pathog* **6**,.
- Lanfredi-Rangel, A., Attias, M., Reiner, D. S., Gillin, F. D. a De Souza, W.** (2003). Fine structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles.
- Lauwaet, T., Davids, B. J., Torres-Escobar, A., Birkeland, S. R., Cipriano, M. J., Preheim, S. P., Palm, D., Svärd, S. G., McArthur, A. G. a Gillin, F. D.** (2007). Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **152**, 80–89.
- López-Romero, E. a Villagómez-Castro, J. C.** (1993). Encystation in *Entamoeba invadens*. *Parasitol. Today* **9**, 225–227.
- Luján, H. D., Mowatt, M. R., Conrad, J. T., Bowers, B. a Nash, T. E.** (1995). Identification of a novel *Giardia lamblia* cyst wall protein with leucine-rich repeats. Implications for secretory granule formation and protein assembly into the cyst wall. *J. Biol. Chem.* **270**, 29307–13.
- Martincová, E., Voleman, L., Pyrih, J., Žárský, V., Vondráčková, P., Kolísko, M., Tachezy, J. a Doležal, P.** (2015). Probing the Biology of *Giardia intestinalis* Mitosomes Using In Vivo Enzymatic Tagging. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 2864–74.

- Mccaffery, J. M., Reiner, D. S. a Gillin, F. D.** (2003). Mining the *Giardia lamblia* Genome for New Cyst Wall Proteins* Chin-Hung Sun. *Publ. JBC Pap. Press*.
- Midlej, V., Meinig, I., de Souza, W. a Benchimol, M.** (2013). A New Set of Carbohydrate-positive Vesicles in Encysting *Giardia lamblia*. *Protist* **164**, 261–271.
- Morf, L., Spycher, C., Rehrauer, H., Fournier, C. A., Morrison, H. G. a Hehl, A. B.** (2010). The transcriptional response to encystation stimuli in *Giardia lamblia* is restricted to a small set of genes. *Eukaryot. Cell* **9**, 1566–76.
- Mowatt, M. R., Lujan, H. D., Cotten, D. B., Bowers, B., Theodore, J., Nash[^], E. a Stibbs[^], H. H.** (1995a). Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol. Microbiol.* **15**, 955–963.
- Mowatt, M. R., Lujan, H. D., Cotten, D. B., Bowers, B., Theodore, J., Nash[^], E. a Stibbs[^], H. H.** (1995b). Developmentally regulated expression of a *Giardia lamblia* cyst wall protein gene. *Mol. Microbiol.* **15**, 955–963.
- Palm, J. E. D., Weiland, M. E.-L., Griffiths, W. J., Ljungström, I. a Svärd, S. G.** (2003). Identification of Immunoreactive Proteins during Acute Human Giardiasis. *Immunoreactive Giardia Proteins @BULLETJID* **187**,.
- Palm, D., Weiland, M., McArthur, A. G., Winiacka-Krusnell, J., Cipriano, M. J., Birkeland, S. R., Pacocha, S. E., Davids, B., Gillin, F., Linder, E., et al.** (2005). Developmental changes in the adhesive disk during *Giardia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **141**, 199–207.
- Possenti, A., Cherchi, S., Bertuccini, L., Pozio, E., Dubey, J. P. a Spano, F.** (2010). Molecular characterisation of a novel family of cysteine-rich proteins of *Toxoplasma gondii* and ultrastructural evidence of oocyst wall localisation. *Int. J. Parasitol.* **40**, 1639–1649.
- Reiner, D. S., Douglas, H. a Gillin, F. D.** (1989). Identification and localization of cyst-specific antigens of *Giardia lamblia*. *Infect. Immun.* **57**, 963–8.
- Rhee, H.-W., Zou, P., Udeshi, N. D., Martell, J. D., Mootha, V. K., Carr, S. A. a Ting, A. Y.** (2013). Proteomic mapping of mitochondria in living cells via spatially restricted enzymatic tagging. *Science* **339**, 1328–1331.
- Roux, K. J., Kim, D. I., Raida, M. a Burke, B.** (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **196**, 801–10.
- Roy, A., Kucukural, A. a Zhang, Y.** (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* **5**, 725–38.
- Sabel, J. a Brookman-Amisshah, N.** (2017). Methods for site-directed mutagenesis. <http://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/methods-for-site-directed-mutagenesis>.
- Samuelson, J., Bushkin, G. G., Chatterjee, A. a Robbins, P. W.** (2013). Strategies to discover the structural components of cyst and oocyst walls. *Eukaryot. Cell* **12**, 1578–87.
- Smith, M. H., Ploegh, H. L. a Weissman, J. S.** (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* **334**, 1086–90.

- Smith, A. J., Lauwaet, T., Davids, B. J. a Gillin, F. D.** (2012). *Giardia lamblia* Nek1 and Nek2 kinases affect mitosis and excystation. *Int. J. Parasitol.* **42**, 411–9.
- Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R. a Durbin, R.** (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* **28**, 405–20.
- Spano, F., Puri#, C., Ranucci, L., Putignani, L. a Crisanti ", A.** (1996). Cloning of the entire COWP gene of *Cryptosporidium parvum* and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development.
- Spano, F., Puri, C., Ranucci, L., Putignani, L. a Crisanti, A.** (1997). Cloning of the entire COWP gene of *Cryptosporidium parvum* and ultrastructural localization of the protein during sexual parasite development. *Parasitology* **114 (Pt 5)**, 427–37.
- Stefanic, S., Morf, L., Kulangara, C., Regos, A., Sonda, S., Schraner, E., Spycher, C., Wild, P. a Hehl, A. B.** (2009). Neogenesis and maturation of transient Golgi-like cisternae in a simple eukaryote. *J. Cell Sci.* **122**, 2846–2856.
- Sternberg, N., Hamilton, D. a Hoess, R.** (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J. Mol. Biol.*
- Sun, C.-H., McCaffery, J. M., Reiner, D. S. a Gillin, F. D.** (2003). Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 21701–8.
- Templeton, T. J., Lancto, C. A., Vigdorovich, V., Liu, C., London, N. R., Hadsall, K. Z. a Abrahamsen, M. S.** (2004). The *Cryptosporidium* oocyst wall protein is a member of a multigene family and has a homolog in *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* **72**, 980–7.
- Van Dellen, K., Ghosh, S. K., Robbins, P. W., Loftus, B. a Samuelson, J.** (2002). *Entamoeba histolytica* lectins contain unique 6-Cys or 8-Cys chitin-binding domains. *Infect. Immun.* **70**, 3259–63.
- Van Dellen, K. L., Chatterjee, A., Ratner, D. M., Magnelli, P. E., Cipollo, J. F., Steffen, M., Robbins, P. W. a Samuelson, J.** (2006). Unique posttranslational modifications of chitin-binding lectins of *Entamoeba invadens* cyst walls. *Eukaryot. Cell* **5**, 836–48.
- Van Keulen, H., Steimle, P. A., Bulik, D. A., Borowiak, R. K. a Jarroll, E. L.** (1998). Cloning of Two Putative *Giardia* ZambZia Glucosamine 6-Phosphate Isomerase Genes Only One of Which is Transcriptionally Activated During Encystment. **45**, 637–2.
- Wampfler, P. B., Tosevski, V., Nanni, P., Spycher, C. a Hehl, A. B.** (2014). Proteomics of secretory and endocytic organelles in *Giardia lamblia*. *PLoS One* **9**, e94089.
- Wampfler Q1, P. B., Faso, C. a Hehl, A. B.** (2014). The Cre/loxP system in *Giardia lamblia*: genetic manipulations 4 in a binucleate tetraploid protozoan.
- Wood, A. M. a Smith, H. V.** (2005). Spironucleosis (Hexamitiasis, Hexamitosis) in the Ring-Necked Pheasant (*Phasianus colchicus*): Detection of Cysts and Description of *Spironucleus meleagridis* in Stained Smears. *Avian Dis.* **49**, 138–143.
- Xu, F., Jerlström-Hultqvist, J., Einarsson, E., Astvaldsson, A., Svärd, S. G. a Andersson, J. O.** (2014). The genome of *Spironucleus salmonicida* highlights a fish pathogen adapted to fluctuating environments. *PLoS Genet.* **10**, e1004053.

- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. a Zhang, Y.** (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**, 7–8.
- Ye, H., Cai, M., Zhang, H., Li, Z., Wen, R. a Feng, Y.** (2016). Functional definition of BirA suggests a biotin utilization pathway in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *Sci. Rep.* **6**, 26479.
- Zhang, Y.** (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* **9**, 40.