

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Produkce rekombinantního CSL proteinu ze signální
dráhy Notch u druhu *Sphaerospora molnari* (Cnidaria:
Myxozoa)**

Bakalářská práce

Kateřina Hniličková

Školitel: RNDr. Alena Lövy, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Zdeněk Franta, Ph.D.

České Budějovice 2023

Hniličková, K., 2023: Produkce rekombinantního CSL proteinu ze signální dráhy Notch u druhu *Sphaerospora molnari* (Cnidaria: Myxozoa) [Production of recombinant CSL protein from the Notch signaling pathway in *Sphaerospora molnari* (Cnidaria: Myxozoa). Bc. Thesis, in Czech]- 51 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The Notch signaling pathway plays an important role in cell differentiation in multicellular organisms and the CSL protein is a key component of this pathway. This thesis focused on the CSL protein from a myxozoan parasite of the phylum Cnidaria *Sphaerospora molnari*. The objectives were to optimize the production of the recombinant CSL protein in the *Escherichia coli* expression system, to purify this protein, and to produce specific antibodies against the protein. All these goals were achieved and the work ended with the successful demonstration of the antibodies against the purified CSL protein. The rCSL and the antibodies obtained will be used for future studies on the structure of the CSL protein, immunolabelling and its interactions with DNA, which may help to understand how the Notch pathway works not only in Myxozoa but also in other early-branching metazoans.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2023

.....
Kateřina Hniličková

Poděkování

Můj dík patří primárně mé školitelce RNDr. Aleně Lövy, Ph.D. a konzultantovi RNDr. Zdeňku Frantovi, Ph.D. za vedení této práce, cenné rady, ochotu a trpělivost. Poté bych ráda poděkovala dalším zaměstnancům laboratoře Makrokomplexu PřF JU a Laboratoře rybí protistologie Parazitologického ústavu, BC AV ČR, kteří mi v případě potřeby pokaždé ochotně pomohli a poradili a po celou dobu ke mně přistupovali přátelsky. Dále děkuji Mgr. Filipu Dyčkovi, Ph.D. z PřF JU a týmu z Laboratorních chovů Parazitologického ústavu, BC AV ČR, pod vedením Mgr. Zuzany Vavruškové, za jejich výrazné přispění do této práce.

Na závěr nemohu opomenout poděkovat své rodině za podporu při studiu.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	<i>Sphaerospora molnari</i> – studovaný organismus	1
1.1.1	Charakteristika druhu <i>Sphaerospora molnari</i>	1
1.1.2	Vývojový cyklus a patogenita	2
1.2	Signální dráha Notch	3
1.2.1	Charakteristika a evoluce Notch signální dráhy	4
1.2.2	Signální dráha Notch u žahavců	6
1.3	CSL protein	8
1.3.1	Struktura a funkce CSL proteinu	8
1.3.2	Vazba na DNA	10
1.3.3	DNA-CSL-NICD komplex	11
1.3.4	Publikovaná produkce rekombinantního CSL	12
1.4	Notch dráha u <i>Sphaerospora molnari</i>	13
2	Cíle	15
3	Materiály a metody	16
3.1	Kompetentní buňky a vektory	16
3.2	Chemikálie a pufrý	16
3.3	Optimalizace produkce rekombinantního proteinu CSL v expresním systému <i>E. coli</i>	19
3.3.1	Transformace kompetentních buněk	19
3.3.2	Pilotní produkce rekombinantního proteinu	20
3.3.3	Izolace rozpustné a nerozpustné frakce	20
3.3.4	SDS-PAGE elektroforéza	21
3.3.5	Western Blot	21
3.4	Příprava rekombinantního CSL proteinu a purifikace	23
3.4.1	Large scale produkce	23
3.4.2	Solubilizace inkluzních tělísek proteinu	23
3.4.3	Denaturační afinitní chromatografie (Afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech, IMAC)	23
3.4.4	Step-down Refolding	24
3.5	Příprava polyklonálních protilátek proti rCSL a ověření jejich specifity	25
3.5.1	Příprava vzorků pro imunizaci	25
3.5.2	Ověření specifity protilátek proti rCSL	25
4	Výsledky	26

4.1	Optimalizace produkce rekombinantního proteinu CSL v bakteriálním expresním systému	26
4.1.1	Pilotní produkce rekombinantního proteinu	26
4.1.2	Ověření identity CSL proteinu	29
4.2	Příprava rekombinantního CSL a purifikace	30
4.2.1	Large scale produkce	30
4.2.2	Denaturační afinitní chromatografie (Afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech, IMAC).....	30
4.2.3	Step-down Refolding	32
4.3	Příprava polyklonálních protilátek proti rCSL a ověření jejich specifity	33
4.3.1	Ověření specifity protilátek proti rCSL	33
4.3.2	MALDI	34
5	Diskuze	36
6	Závěr.....	41
7	Seznam použitých zkratk.....	42
8	Seznam literatury	45

1 Úvod

Myxozoa neboli rybomorky jsou parazité převážně sladkovodních a mořských ryb a bezobratlých (kroužkovců a mechovek). Pro tuto skupinu patřící do kmene žahavců (Cnidaria) je typický dvou hostitelský vývojový cyklus a výrazná morfologická redukce stavby těla související s jejich přechodem od volně žijících k parazitickým žahavcům. Kromě mikroskopického zmenšení jejich těl je přechod k parazitismu spojen také se ztrátou některých orgánů (např. nervové soustavy, trávicí soustavy, epiteliální soustavy) a výraznými genetickými modifikacemi (Lom a Dyková 2006; Alama-Bermejo a Holzer 2022). Byla prokázána značná redukce genomu (23 – 206 Mb), která je doprovázena ztrátou některých signálních drah a také jednoho ze základních epigenetických procesů – metylace DNA (Chang et al. 2015; Guo et al. 2022). U jednoho druhu byla dokonce zjištěna ztráta mitochondriálního genomu (Yahalomi et al. 2020). I přes značnou redukci si rybomorky zachovaly žahavé buňky (nematocyty) neboli pólové váčky, jež používají nejen k adhezi k hostiteli, ale také mohou uvolňovat cytotoxické sloučeniny vedoucí pravděpodobně k imunomodulaci hostitele (Ben-David et al. 2016, Americus et al. 2021). U volně žijících žahavců toxiny uvolněné ze žahavých buněk slouží k omráčení kořisti a odrazení predátorů (Orst et al. 2013).

Žahavci (kam patří i Myxozoa) jsou řazeni k bazálním metazoím společně s vložkovci (Placozoa), houbovci (Porifera) a žebernatkami (Ctenophora). Žebernatky jsou podle posledních poznatků jako první se odvětvující metazoa a žahavci jsou sestersky příbuzní bilaterálně souměrným živočichům (Bilateria) (Moroz et al. 2014). Se vznikem metazoí se pojí i vznik signálních drah, a to relativně malý soubor vysoce evolučně konzervovaných signálních drah, které hrají zvláště zásadní roli pro buněčnou komunikaci (Babonis et al. 2016).

1.1 *Sphaerospora molnari* – studovaný organismus

1.1.1 Charakteristika druhu *Sphaerospora molnari*

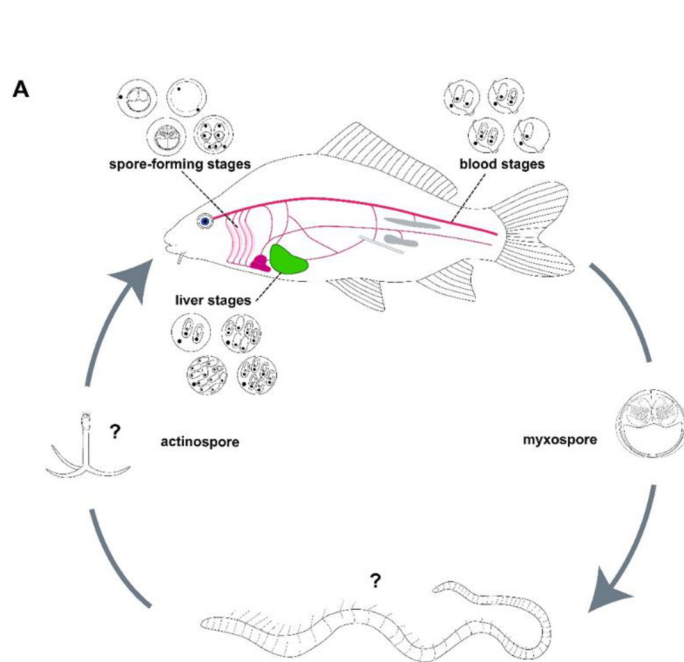
Rybomorka *Sphaerospora molnari* je vcelku běžný endoparazit kapra obecného (*Cyprinus carpio*). V rámci myxozoí se zástupci rodu *Sphaerospora* řadí do skupiny Myxosporea, která je tvořena třemi fylogenetickými liniemi. Jako první se větví linie sférospor (*Sphaerospora sensu stricto* linie) a poté se odděluje mořská linie infikující mnohoštětinatce (Polychaeta) a sladkovodní linie infikující máloštětinatce (Oligochaeta) (Holzer et al. 2018).

Sférospory se obecně vyznačují tvorbou presporogonických krevních stádií, která jsou u některých sférospor pohyblivá (Lom et al. 1985). Dále jsou pro ně specifické dlouhé a unikátní inserce ve variabilních oblastech 18S a 28S rDNA genů, kdy *Sphaerospora molnari* by mohla mít jednu z nejdelších eukaryotických 18S rDNA sekvencí (Patra et al. 2018). V Laboratoři rybí protistologie, BC AV ČR je *S. molnari* udržovaná v kaprech obecných, u kterých jsou krevní stádia přenášena z ryby na rybu pomocí intraperitoneálních injekcí (Holzer a Pimentel-Santos 2021).

1.1.2 Vývojový cyklus a patogenita

Jak je zmíněno výše, vývojový cyklus myxozoi zahrnuje dva hostitele, přičemž definitivním hostitelem je bezobratlý (kroužkovec nebo mechovka) a mezihostitelem obratlovec (nejčastěji ryba). Během vývojového cyklu *S. molnari* nejprve atakují aktinospory žaberní nebo kožní epitel kapra obecného, ve kterém vytváří nejprve presporogonická krevní stádia (pohyblivá) a jaterní stádia a poté sporogonická stádia vyvíjející se v kožním a žaberním epitelu (Lom et al. 1983; Korytář et al. 2019). Mezihostitele opouštějí myxospory infikující definitivního hostitele, který je u tohoto druhu (i u ostatních druhů sférospor) zatím neznámý. V definitivním hostiteli se poté vytvářejí aktinospory, jejichž vývoj také není dosud známý, které infikují dalšího mezihostitele (kapra obecného). Krevní stádia se vyznačují specifickým pohybem na bázi aktinu, což by zřejmě mohlo hrát roli v obraně parazita před imunitním systémem hostitele. Pohyb krevních stádií *S. molnari* byl charakterizován jako „tančící“, kdy se rychle pohybující krevní stádia vrtí kolem záhybů membrány (Hartigan et al. 2016). Dále bylo zdokumentováno přichycení krevních stádií na erytrocyty, které pravděpodobně i požírají (Hartigan et al. 2016, Korytář et al. 2019).

Sphaerospora molnari je parazit kapra obecného (*Cyprinus carpio*) zodpovědný za masivní úhyny násady kaprů ve střední Evropě včetně ČR (Lom et al. 1983; Dyková a Lom 1988). Je schopna u ryb vyvolat žaberní a kožní sférosporózu a v případě krevních stádií hemolytickou anemii nebo může přispět k zánětu plynového měchýře (Sudhagar et al. 2020). Žábrami mohou stádia *S. molnari* prostupovat buď rozptýleně, nebo ve velkých shlucích. Při masivní infekci mohou nahradit interlaminární buněčné vrstvy a může dojít až k nekróze tkáně. Nekrotickou tkání následně parazit kapra opouští a napadá další jedince (Lom et al. 1983).



Obr. 1: Schématický životní cyklus *Sphaerospora molnari* se známým mezihostitelem kaprem obecným (*Cyprinus carpio*) a definitivním bezobratlým hostitelem, v současnosti neznámým (zde zobrazen jako máloštetinatec (*Oligochaeta*)), kde se vyvíjí a uvolňují aktinospory (neznámé, zobrazeny jako triaktinomyxonový typ). Převzato od Wiśniewska et al. in prep.

1.2 Signální dráha Notch

Signální dráhy zprostředkovávají mezibuněčnou komunikaci, a to buď přímým kontaktem (např. přes gap junctions) nebo vazbou signální molekuly (ligandu). Signál je následně zaznamenán buněčným receptorem na plazmatické membráně nebo v jádře, načež je předán prostřednictvím tohoto receptoru či druhého posla do jádra buňky. V jádru dochází k ovlivnění cílových genů, které se začnou v odpovědi na přijatý signál buďto translatovat nebo bude jejich exprese naopak reprimována. Jelikož jsou tyto dráhy nástrojem mezibuněčné komunikace, jsou spojeny se vznikem mnohobuněčnosti během evoluce. U metazoi se uplatňuje kolem 20 signálních drah, přičemž sedm z nich hraje zásadní roli během jejich vývoje (Babonis et al. 2016). Těmi jsou tyto dráhy: Notch účastníci se např. diferenciace buněk, kanonická Wnt uplatňující se při organizaci struktur, TGF- β regulující dělení buněk, Hedgehog důležitá např. pro neurogenezi a specifikaci konečků prstů, receptor tyrosin kinázy (RTK) podílející se na regulaci buněčné proliferace a imunitního systému, jaderné receptory zapojené do metabolických procesů nebo reprodukce a JAK/STAT potřebná např. pro hematopoézu (Gazave et al. 2009; Sever a Glass 2016).

1.2.1 Charakteristika a evoluce Notch signální dráhy

Notch dráha je vysoce konzervovaná signální dráha u všech metazoií a podílí se na buněčné diferenciaci, určování buněčného osudu a udržování stavu kmenových buněk. Hraje roli při regulaci vývoje nervové soustavy a tvorbě pravidelných struktur tj. vzorování (např. vlasů, peří). Tato dráha působí mechanismem laterální inhibice, kdy se progenitorové buňky během embryogeneze nacházejí v několika skupinách podle typu buňky, který z nich má vzniknout. Následně z každé této skupiny začne jedna buňka vysílat do svého okolí vysoké množství ligandů pro Notch receptor, dochází k aktivaci Notch dráhy jak u této buňky, tak u sousedních buněk, což zabrání jejich diferenciaci.

Lze rozlišovat dva způsoby průběhu Notch dráhy, a to kanonický a nekanonický (též alternativní). Obvykle tato dráha probíhá kanonicky, tedy postupně, po určitých krocích, kdežto během nekanonické signalizace jsou některé z těchto kroků obcházeny (Layden a Martindale 2014). Alternativní způsoby průběhu této dráhy mohou společně s poruchami v regulaci určitých komponent Notch dráhy u lidí vést ke vzniku řady onemocnění včetně rakoviny a Alzheimerovy choroby (Sjölund et al. 2005, Kapoor a Nation 2021).

Kanonická Notch signalizace začíná kontaktem buňky vysílající signál s buňkou akceptující signál. Molekula přijímající signál během signalizace je transmembránový Notch receptor, který se skládá ze dvou domén, intracelulární (NICD) a extracelulární (NECD). Samotná Notch signalizace je zahájena vazbou DSL ligandu na EGF-like repetice NECD receptoru Notch, kdy dochází k odštěpení NECD prostřednictvím metaloproteáz z rodiny ADAM. EGF-like repetice jsou součástí EGF domény NECD a interakcí s Delta ligandem zesilují signál. Intracelulární doména, stále připojená k plazmatické membráně, je posléze uvolněna komplexem gama sekretázy, a pomocí alfa/beta 1 importinové dráhy vstupuje NICD do jádra. V jádře tvoří NICD komplex s transkripčním faktorem CSL navázaným na DNA, načež se na tento komplex začne vázat řada koaktivátorů. Vzniklý koaktivátorový komplex následně spouští expresi cílových genů z Hey/Hes rodiny, které působí jako inhibitory proneurálních bHLH genů, čímž indukuje zvýšenou produkci ligandů. Signalizace Notch je ukončena fosforylací PEST domény NICD, která následně podléhá ubikvitinem zprostředkované proteasomální degradaci. Když Notch signalizace není zapotřebí, NICD do jádra nevstupuje a je degradována lysozomem (Andersson et al. 2011). Transkripční faktor CSL může zároveň působit jako represor Notch dráhy, kdy se na tento protein namísto

koaktivátorů vážou korepresory. Takováto represe nastává v případě, kdy nedochází k pozitivnímu signálu pro zahájení Notch signalizace (Yuan et al. 2016).

Nekanonická Notch dráha může začínat stejně jako kanonická vazbou Delta ligandu na Notch receptor a štěpením receptoru komplexem gama sekretázy. V jádře ale NICD neinteraguje s CSL transkripčním faktorem a nespouští transkripci primárních cílů Hes/Hey genů, takže zde k regulaci proneurálních genů dochází alternativními způsoby (Layden a Martindale 2014).

Skutečnost, že složky Notch dráhy byly nalezeny u myxozoi a společně i u dalších bazálních metazoi jako u vložkovců (Placozoa) a houbovců (Porifera), nasvědčuje tomu, že tato funkční dráha mohla být přítomna již u společného předka metazoi (Chang et al. 2015). Ve studii zaměřené na signální dráhu Notch u zástupců eukaryot byla zjištěna přítomnost všech 22 sledovaných genů z dráhy Notch (tj. základních složek, ale i např. *Numb* a *Notchless*) u téměř všech analyzovaných bilaterií. Výjimku tvořil *Fringe*, který chybí v genomu dvou druhů prvoústých, a *Mastermind*, který se nenachází u pěti studovaných bilaterálních druhů, jak u prvoústých, tak u druhoústých. Zajímavé je, že mezi 22 cílovými geny je pouze devět specifických pro metazoa (*Notch*, *Delta*, *Furin*, *Mastermind*, *Numb*, *Neuralized*, *Mindbomb*, *HES* a *SMRT*). Překvapivě je mezi nimi devět genů kódujících ligand a receptor, což naznačuje, že kanonická dráha Notch existuje pouze u metazoi (Gazave et al. 2009). Experimentálními důkazy kanonického průběhu Notch dráhy je např. získání krystalické struktury samotného NICD, CSL a NICD-CSL-MAML komplexu nebo identifikace vazebních míst pro CSL u *C. elegans* a *D. melanogaster* (Kovall a Hendrickson 2004; Yuan et al. 2016; Tabaja et al. 2017; Friedman a Kovall 2009).

Právě *Mastermind* se u metazoi ukázal být velmi významným koaktivátorem během tvorby koaktivátorového komplexu s CSL proteinem a NICD v jádře, proto je kupodivu, že u některých druhů nebyl nalezen (McElhinny et al. 2008). Vzhledem k identifikaci tohoto koaktivátoru také u živočichů bez oboustranné symetrie (např. žahavci, mořská sasanka *Nematostella vectensis*), je u bilaterií s chybějícím genem pro *Mastermind* pravděpodobná jeho druhotná ztráta (Gazave et al. 2009).

Co se týče ligandů pro Notch receptor, existují jejich dvě rodiny, Delta/Delta-like a Serrate/Jagged rodina. Tyto rodiny jsou rozděleny podle počtu EGF repetice. U *D. melanogaster* nacházíme Delta ligand, člen z první zmíněné rodiny, a ligand Serrate, člen

z druhé rodiny, zatímco savčí genom kóduje z každé rodiny ligandů více členů (Parks et al. 2006; D'Souza et al. 2008). Bylo objeveno, že se Jagged, typ ligandu z Serrate/Jagged rodiny, nevyskytuje u houbovců a vložkovců, zatímco Delta byl identifikován u všech metazoi. Jelikož se řada domén (např. EGF repetice u Notch, Delta a Mindbomb, ANK repetice u Notch atd.) vyskytují u více eukaryotních linií, lze se domnívat, že se mohly nacházet již u posledního společného předka eukaryot (LECA) (Gazave et al. 2009).

Další důležitou komponentou dráhy Notch je gama-sekretáza, enzymatický komplex čtyř proteinů štěpící mimo jiné i NICD od plazmatické membrány. Gama-sekretáza se ukázala být konzervovaná a zřejmě přítomná již v LECA, ovšem neexistuje zatím příliš důkazů pro výskyt úplného komplexu gama-sekretázy obsahujícího všechny složky v tomto společném předku eukaryot (Gazave et al. 2009).

U myxozoi byly nalezeny jen některé složky této dráhy, přičemž některé absentující složky se ukázaly být klíčovými pro Notch signalizaci, např. transkripční koaktivátor Mastermind, u savců pod názvem MAML, u *Drosophila melanogaster* pod názvem Mam (Yang et al. 2014; Chang et al. 2015). Je tedy otázkou, jak přesně dráha u myxozoi bez řady důležitých komponent funguje, či zda je u nich vůbec uplatňována. Jelikož mohou kromě kanonické Notch dráhy existovat i různé alternativní cesty této signalizace, je možné, že dráha může u myxozoi probíhat některým z těchto nekanonických mechanismů. Jasnější odpovědi ale mohou poskytnout pouze experimentální studie.

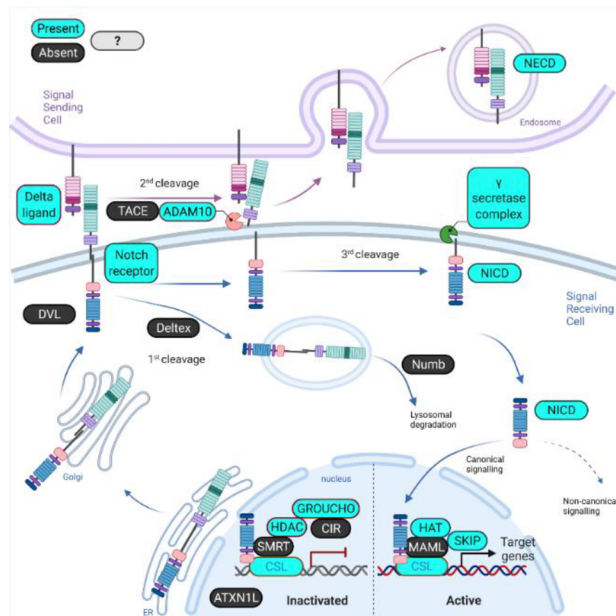
1.2.2 Signální dráha Notch u žahavců

U myxozoi je dráha Notch oproti volně žijícím žahavcům značně redukována (Obr. 2). Jak již bylo zmíněno výše, byly u myxozoi detekovány jen některé její složky. Identifikaci genů u myxozoi komplikuje rychlá evoluce a značná komprese jejich genomů, o kterých je udáváno, že mohou být až 15 x menší než u volně žijících žahavců, což může být spojeno s jejich parazitismem (např. postrádají geny pro metabolické procesy potřebné pro neparazitické druhy) (Alama-Bermejo a Holzer 2021).

Pro většinu studií žahavců včetně dráhy Notch jsou modelovými organismy volně žijící žahavci - mořská sasanka *N. vectensis* (Anthozoa) a nezmar obecný *Hydra vulgaris* (Hydrozoa), popřípadě *Hydractinia echinata* (Hydrozoa). U *N. vectensis* bylo zjištěno, že inhibice Notch dráhy pomocí DAPT (inhibitor gama-sekretázy) má vliv na počet nervových

progenitorových buněk a dozrávání nematocytů (Richards a Rentsch 2015). Spojení Notch dráhy s dozráváním žahavých buněk bylo zjištěno i u *H. vulgaris*. Naopak u *H. vulgaris* není vývoj nervových buněk z neepiteliálních buněk vázán na Notch dráhu (Käsbauer et al. 2007). To je v souladu se zjištěním u *H. echinata*, u které se ukázalo, že Notch dráha je postradatelná pro normální neurogenезi ve všech jejích životních fázích, ale je nezbytný pro dozrávání nematocytů a pro morfogenezi chapadel (Gahan et al. 2017).

Dále je Notch dráha u *H. vulgaris* a *H. echinata* spojena s regenerací hlavy a morfogenezi chapadel. Při zablokování dráhy např. došlo ke zkrácení chapadel, hlava vykazovala abnormální vzhled (např. obsahovala rozšířená nebo dislokovaná chapadla), ale pokud byl inhibitor z média odstraněn, došlo k úplné regeneraci hlavy (Münder et al. 2013; Gahan et al. 2017).

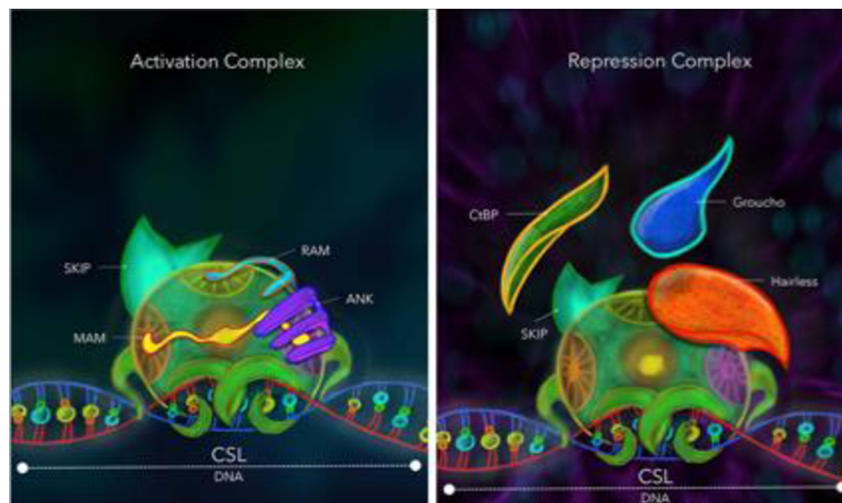


Obr. 2: Schéma navrhovaného průběhu dráhy Notch u myxozoi. Znázornění složek u myxozoi detekovaných (tyrkysová) a u myxozoi nedetekovaných (černá). Pozn.: všechny složky vyznačené na schématu byly nalezeny u volně žijících cnidarií. Převzato od Lövy et al. in prep.

1.3 CSL protein

1.3.1 Struktura a funkce CSL proteinu

CSL protein patří mezi základní složky Notch dráhy. Jedná se o transkripční faktor vázající DNA a řadu koaktivátorů a stejně tak korepresorů, což z něj za daných situací činí buď aktivátor nebo represor Notch dráhy (Obr. 3) (Contreras-Cornejo et al. 2016). Nejznámějším koaktivátorem tvořícím komplex s CSL je Mastermind, dále jsou to např. SKIP nebo HAT. Mezi korepresory jsou řazeny Hairless, CtBP, Groucho a Insensitive u *D. melanogaster* nebo SMRT/NCOR, CIR, KyoT proteiny, SHARP/Mint a různé histonové deacetylázy (HDAC) u savců (Maler et al. 2006; Nagel et al. 2005 a 2007; Duan et al. 2011; Oswald et al. 2002 a 2005; Bray 2006; Borggrefe a Oswald 2009). CSL zřejmě váže korepresory přímo. Přesný molekulární princip represe pomocí CSL sice dosud nebyl popsán, ovšem lze se domnívat, že by mohly korepresory rekrutovat histonové deacetylázy, které způsobí kompaktaci daných oblastí chromatinu vedoucích k potlačení exprese cílových genů. Naopak k aktivaci genové exprese dochází vytěsněním korepresorů z vazby na CSL, a je předpokládána účast acetyltransferáz rozvolňujících dané oblasti chromatinu (Mumm a Kopan 2000).

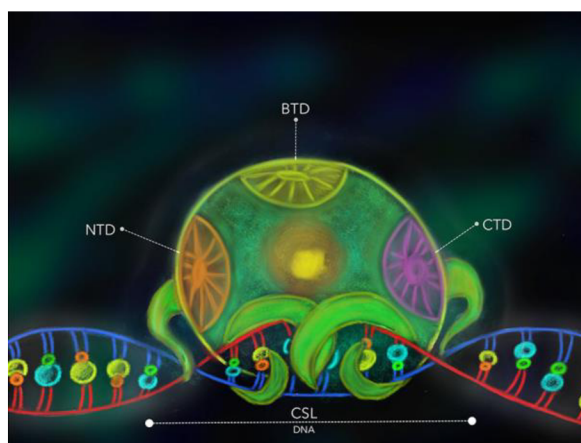


Obr. 3: Srovnání koaktivátorového (vlevo) a korepresorového (vpravo) komplexu CSL. Převzato z Contreras-Cornejo et al. 2016.

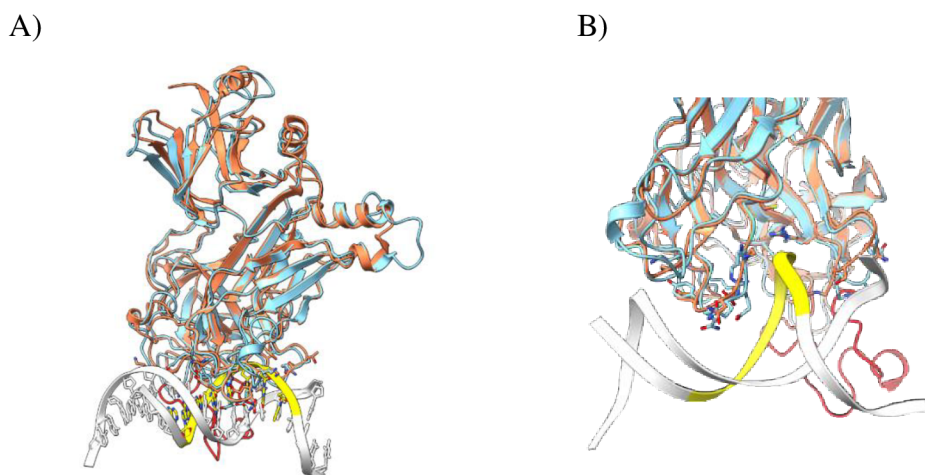
CSL proteiny jsou monomery složené ze tří domén, a to N-terminální domény (NTD), domény beta-trojlistku (BTD) a C-terminální domény (CTD) (Obr. 4). U BTD domény je patrný dlouhý beta-řetězec, který v této doméně začíná a vrací se sem skrz NTD i CTD domény, a je tak součástí struktury beta-skládaných listů ve všech třech doménách, čímž přispívá k organizaci struktury CSL. Na základě tohoto složitého propojení domén se z hlediska jeho terciální struktury centrální doménou CSL stává NTD, nikoli BTD. BTD dále obsahuje hydrofobní místo zvané hydrofobní kapsa. N-terminální helix $\alpha 1$ u CSL je zároveň integrován do CTD, což poukazuje na to, že výsledné sbalení tohoto proteinu je dáno různými specifickými interakcemi mezi doménami (Kovall a Hendrickson 2004; Nam et al. 2007).

U *S. molnari* byl v BTD doméně detekován specifický inzert (Obr. 5 B), který není homologní u žádného jiného organismu včetně ostatních žahavců. Je otázkou, zda se vyskytuje i u dalších druhů sférospor, jelikož jejich genomové či transkriptomové sekvence nejsou dostupné. Jaký má vliv tento inzert na strukturu CSL není známo, ale lze se domnívat, že by mohl přispívat k vazbě na DNA (Gahura pers. comm.).

Během evoluce byly CSL proteiny zřejmě vysoce konzervovány, udává se, že CSL protein *D. melanogaster* je na 84% shodný s CSL u lidí, zároveň je dle zjištěných informací pravděpodobné, že mnoho živočichů sdílí jádro proteinu, a naopak jeho N a C-konec se zdá být mezi druhy již variabilnější (Andreu-Aqullo et al. 2013).



Obr. 4: CSL protein. Vyznačena NTD (oranžová), BTD (žlutá) a CTD (fialová). Převzato z Contreras-Cornejo et al. 2016.



Obr. 5: Vytvořeno pomocí ChimeraX (ve spolupráci s RNDr. Ondřejem Gahurou, Ph.D. z Laboratoře funkční biologie protist Parazitologického ústavu, BC AV ČR). **A)** Terciální struktura CSL proteinu druhů *D. melanogaster* (oranžová) a *S. molnari* (modrá). **B)** Detailní pohled na dolní část terciální struktury CSL proteinu druhů *D. melanogaster* (oranžová) a *S. molnari* (modrá). Červená struktura je inzert specifický pro CSL u *S. molnari*.

1.3.2 Vazba na DNA

CSL protein vázající DNA je středobodem transkripční regulace v dráze Notch, kdy jeho role je interakce buď s korepresory, nebo koaktivátory za účelem potlačení nebo aktivace transkripce cílových genů. Jak bylo poprvé ukázáno u *C. elegans* na rentgenové struktuře CSL (Lag-1) vázaného na DNA (Kovall a Hendrickson 2004), všechny CSL proteiny obsahují konzervované strukturální jádro, které je z velké části složeno z beta-skládaných listů a skládá se ze tří domén (viz kapitola 1.3.1)

Roli ve tvorbě přímé vazby s DNA hrají u CSL proteinu jeho NTD a BTM domény, nikoli ale CTD. Přestože se CTD doména CSL proteinu neváže přímo na DNA, může její úloha spočívat ve stabilizaci struktury proteinu, jelikož je spojena se zbytkem proteinu jedním helixem a beta řetězcem. Specifických i nespécifických interakcí CSL s DNA je dosaženo vazbami proteinu s malým a velkým žlábkem na DNA, přičemž do velkého žlábků se váže NTD prostřednictvím argininových, lysinových a glutaminových zbytků a do malého žlábků se váže BTM (Kovall and Hendrickson 2004; Tun et al. 1994).

V promotorech cílových genů, které reagují na vazbu tohoto komplexu při Notch signalizaci, se nacházejí specifická vazebná místa. Tato vazebná místa sestávají ze dvou CSL vazebných míst v takzvané „head-to-head“ organizaci orientovaných proti sobě, která jsou oddělena 16-17 nukleotidy (u *D. melanogaster* a savců). Právě orientace a vzdálenost vazebných míst od cílových genů ovlivňuje jejich transkripci během signalizace (Nam et al.

2007). Konsenzuální i nekonsenzuální specifická vazebná místa pro CSL jsou dlouhá 8 nukleotidů. Konsenzuální vazebné místo (-TGTGGGAA-), jehož první a pátá pozice je variabilní (konkrétně C/T; G/T), je silně konzervované napříč studovanými organismy, zatímco druhé vazebné místo je nekonsenzuální a má více variabilních pozic (Friedman a Kovall 2009).

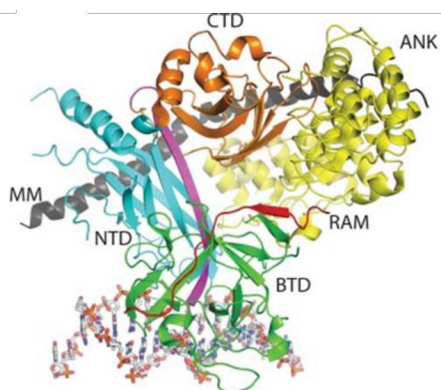
Primárními cíli u kanonické Notch dráhy jsou Hey/Hes geny. Jedná se o geny kódující transkripční represory Hes a Hey z bHLH rodiny, které potlačují expresi genů pro různé tkáňově specifické transkripční aktivátory. Právě díky těmto efektorům zůstává buňka s aktivní Notch dráhou v nediferencovaném stavu (Iso et al. 2001).

1.3.3 DNA-CSL-NICD komplex

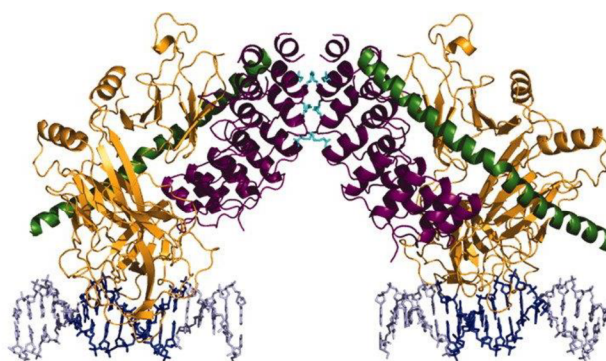
Pro charakteristiku tohoto tříložkového koaktivátorového komplexu je nutno nejprve popsat strukturu NICD, intracelulární domény Notch receptoru. V případě modelového organismu *D. melanogaster* byla u NICD zjištěna membránově proximální RAM doména, ANK doména obsahující 7 ankyrinových repetic, jaderné lokalizační sekvence a C-terminální degradační motiv PEST (Kopan et al. 2009).

Studie formování komplexu u *C. elegans* popisuje, že se NTD a CTD domény CSL proteinu vážou na ankyrinové repetice NICD, a současně dochází k vazbě RAM domény NICD na BTB CSL proteinu, a to zřejmě do její hydrofóbní kapsy (Obr. 6). Tak, jak BTB představuje vazebné místo pro NICD, se v ní také nachází vazebná místa pro korepresory. Současná vazba NICD a korepresorů se však vylučuje, tudíž Notch receptor aktivuje expresi genů vytěsněním korepresorů z vazby na BTB. Včetně korepresorů komplex interaguje s různými koaktivátory, např. Mastermind, který by se mohl vázat svým N-terminálním koncem do drážky vytvořené spojením ANK domény NICD a RHR CSL proteinu (Kovall a Hendrickson 2004; Nam et al. 2007). Vzniklý komplex NICD-CSL-MAML poté rekrutuje další faktory pomocí C-terminálního konce MAML. NICD koaktivátorového komplexu nakonec tvoří dimer stabilizovaný protein-protein interakcemi s povrchem ANK domény přes solné můstky, a tento komplex následně navazuje kontakt se dvěma oblastmi DNA, kdy s ní interaguje jak CSL (viz předchozí podkapitola), tak NICD, a to konkrétně její ANK doména (Kovall a Hendrickson 2004). CSL a MAML se v rámci komplexu nacházejí také dvakrát,

nicméně na rozdíl od NICD jejich molekuly mezi sebou neinteragují, a jsou tedy přítomny ve formě monomerů (Obr. 7).



Obr. 6: DNA-CSL-NICD komplex druhu *Caenorhabditis elegans* s vyznačenými doménami CSL a NICD: NTD (modrá), CTD (oranžová), BTM (zelená), RAM (červená), ANK (žlutá), MAML (šedá). Převzato z Friedman et al. 2007, PDB: 2FO1.



Obr. 7: Finální struktura lidského CSL-NICD-MAML komplexu vázajícího DNA. 2 ANK (fialová) mezi sebou interagují prostřednictvím svých reziduí (tyrkysová) za vzniku dimeru; molekuly CSL (zlatá) a MAML (zelená) mezi sebou neinteragují; komplex váže 2 oblasti DNA (tmavě modrá). Převzato z Nam et al. 2007.

1.3.4 Publikovaná produkce rekombinantního CSL

Dnes již je znám rekombinantní CSL protein z *C. elegans* a člověka. V případě *C. elegans* byly k produkci tohoto proteinu užity kompetentní buňky *Escherichia coli* Rosetta (DE3)pLysS, které byly transformovány vektorem pGEX-6P-1 nesoucím část genu pro CSL (u háďátka pod názvem Lag-1) fúzovaným s GST skupinou. Po kultivaci buněk s indukovanou genovou expresí, byl získaný buněčný lyzát nanesen na předem ekvilibrovanou glutation sefárovou 2B kolonu. Protein byl z kolony vymyt pufrém obsahujícím 20mM glutation a

GST byl nakonec odstraněn další purifikací na glutationové koloně. Lag-1 byl dále purifikován pomocí kationtově výměnné chromatografie (Kovall a Hendrickson 2004).

U člověka byly k produkci CSL užity BL21(DE3)pLysS buňky *E. coli* transformované vektorem pET28a nesoucím gen pro CSL fúzovaný s 6xHis-tag. Po kultivaci buněk s indukovanou genovou expresí byl buněčný lyzát nanesen na Ni-NTA (Qiagen) kolonu. Následně byl protein eluován pufrém s 200 mM imidazolem a poté purifikován aniontově výměnnou chromatografií na MonoQ HR 10/10 koloně a eluován pomocí gradientu NaCl (Nam et al. 2006).

1.4 Notch dráha u *Sphaerospora molnari*

Jak z úvodu vyplývá, u myxozoi nebyla oproti volně žijícím žahavcům detekována řada komponent Notch signální dráhy, mezi kterými jsou i molekuly během signalizace významné, což vyvolává otázky, zda je u nich tato dráha vůbec funkční, a případně jak by u nich bez přítomnosti těchto složek mohla probíhat. Jednou z teorií například je, že by u myxozoi mohl existovat alternativní způsob Notch signalizace, který by se mohl obejít bez některých složek podstatných během kanonické Notch dráhy.

Tato práce se zabývá jednou z klíčových složek Notch signalizace nalezenou u *S. molnari*, a to CSL proteinem o velikosti 61 kDa. Jeho funkce u *S. molnari* je však neznámá, a dosud u tohoto organismu nebyla blíže zkoumána. Posttranslačními modifikacemi CSL proteinu jsou zejména fosforylace, disulfidické vazby a glykosylace (Obr. 9). Byly predikovány i metylace, ale tento typ posttranslačních modifikací myxozoa pravděpodobně nemají (Kyger et al. 2020).

Prvním cílem této práce je optimalizace produkce rekombinantního CSL proteinu v bakteriálním expresním systému, kdy bude tento protein produkován v expresním systému bakterie *E. coli* transformované vektorem nesoucím gen pro CSL protein *S. molnari*. Dalším cílem je příprava rekombinantního CSL a purifikace pro získ koncentrovaného a purifikovaného proteinu, se kterým se posléze mohou provádět různé strukturní studie, a posledním cílem je příprava polyklonálních protilátek proti rekombinantnímu CSL a ověření jejich specifity. Získané protilátky mohou být dále využity k řadě studií tohoto proteinu v *S. molnari*, jako např. ke značení proteinu protilátkou v krevních stádiích tohoto druhu nebo ke zkoumání interakcí CSL s DNA.

Bakalářská práce tedy významně přispěje k výzkumu CSL proteinu, a tudíž i Notch dráhy u *S. molnari*. Využití rekombinantního CSL k dalším experimentům může pomoci objasnit průběh dráhy u rybomerek (kanonická vs. nekanonická).

2 Cíle

- 1) Optimalizace produkce rekombinantního proteinu CSL v bakteriálním expresním systému
- 2) Příprava rekombinantního CSL a purifikace
- 3) Příprava polyklonálních protilátek proti rCSL a ověření jejich specifity

3 Materiály a metody

3.1 Kompetentní buňky a vektory

Tab. 1: Užití buňky, vektory a jejich charakteristika.

Kompetentní buňky <i>E. coli</i>	
<i>Název</i>	<i>Charakteristika</i>
T7 Express Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency) (New England Biolabs)	deaktivované proteázy, teplotní šok: 10 s
BL21 (DE3) Competent <i>E. coli</i> (New England Biolabs)	deaktivované proteázy, teplotní šok: 10 s
SHuffle®T7 Express lysY Competent <i>E. coli</i> (New England Biolabs)	produkce disulfidických můstků, teplotní šok: 30 s
ArcticExpress (DE3) Competent cells (Agilent)	produkce chaperoninů, teplotní šok: 20 s
Vektory	
<i>Název</i>	<i>Charakteristika</i>
pASK-IBA37plus (IBA)	tetracyklinový promotor, 6xHis-tag, ampicilinová rezistence
Champion™ pET SUMO (Invitrogen™)	T7 promotor, 6xHis-tag, fúzní protein SUMO, kanamycinová rezistence

3.2 Chemikálie a pufrý

Tab. 2: Užití chemikálie a pufrý.

Transformace kompetentních buněk	
Agarové LB plotny	15 g/l agaru; 20 g/l LB média; ATB: 50 µg/ml kanamycinu, 50 µg/ml ampicilinu
S. O. C. medium	0,5% kvasničný extrakt; 2 % trypton; 10mM NaCl; 2,5mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10mM MgSO ₄ ; 20mM glukóza

Indukce produkce CSL proteinu	
LB médium	LB: 10 g/l tryptonu; 5 g/l kvasničného extraktu; 5 g/l NaCl připraveno rozpuštěním 16 g LB v 800 ml ddH ₂ O
Kanamycin	pracovní c= 50 µg/ml
Ampicilin	pracovní c= 50 µg/ml
Anhydrotetracyklin	pracovní c= 200 µg/ml
IPTG	pracovní c= 1 mM
SDS-PAGE elektroforéza	
Lyzační pufr	50mM KH ₂ PO ₄ ; 400mM NaCl; 100mM KCl; 10% glycerol; 0,5 % TritonX-100; 10mM imidazol; pH= 7,8
1x PBS	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8mM KH ₂ PO ₄ v 800 ml ddH ₂ O
4 x Laemli vzorkový pufr	20 ml 0,5M Tris- pH= 6,8; 4 g SDS; 20 ml glycerolu; 0,1 g bromfenolové modři, doplněno H ₂ O do 45 ml; poté přidán beta-merkaptóetanol v ředění 1:10
1 x TGS	připraven z 10 x TGS: 58,15 g Tris; 29,3 g glycinu; 3,75 g SDS
Coomassie Brilantní modř R-250	125 mg Coomassie Brilantní modři R-250 ve 125 ml metanolu; 125 ml 20% kyseliny octové
12 % Separační gel	TGX FastCast Acrylamide Solutions (Bio-Rad) -3ml Resolver A; 3 ml Resolver B; dále přidáno 30 µl 10 % APS a 3 µl TEMED

4 % Zaostřovací gel	TGX FastCast Acrylamide Solutions (Bio-Rad) -3 ml Stacker A; 3 ml Stacker B; dále přidáno 30 µl 10 % APS a 3 µl TEMED
Western blot	
10 x SDS přenosový pufr	25mM Tris; 192mM glycin; 10% metanol; pH 8,5
10 x TBS pufr	60,5 g Tris; 87,66 g NaCl; pH 7,6
TBS-T	připraven ředěním 10 x TBS na 1x a přidáním 1 ml Tween [®] 80 (SERVA)
Blokovací roztok	2,5 % roztok odtučněného sušeného mléka (ITW Reagents) v TBS-T
Myší monoklonální anti-polyhistidinová protilátka: Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse (Sigma Aldrich)	užité ředění= 1:3000
Kozí anti-myší IgG konjugovaný s peroxidázou: Anti-Mouse IgG– Peroxidase antibody produced in goat (Sigma Aldrich)	užité ředění: 1:5000
Kozí anti-králíčí IgG (H+L), konjugovaný s peroxidázou: Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (H+L), Peroxidase (Vector Laboratories)	užité ředění= 1:5000
Substrát pro křenuvou peroxidázu	Clarity Western [™] ECL Substrate (Bio-Rad)-Luminol/enhancer solution a Peroxide solution v poměru 1:1
Solubilizace inkluzních těles	
Solubilizační pufr	6M guanidium HCl, 20mM Tris, 5mM imidazol, 0,5M NaCl a 1mM beta-merkaptóetanol
Denaturační afinitní chromatografie (IMAC)	
Ekvilibrační pufr	20mM Tris; 300mM NaCl; 6M močovina; pH= 7,5

Eluční pufr	20mM Tris; 300mM NaCl; 6M močovina, 0,5M imidazol; pH= 7,5
Step-down refolding	
Pufr A	20mM Tris, 50mM NaCl, 4M močovina, 4mM beta-merkaptetoanol
Pufr B	20mM Tris, 50mM NaCl

3.3 Optimalizace produkce rekombinantního proteinu CSL v expresním systému *E. coli*

3.3.1 Transformace kompetentních buněk

Jednalo se o transformaci specifických kmenů kompetentních buněk *E. coli* patřičnými vektory (Tab. 1). Kompetentní buňky *E. coli* byly uchovávány v mrazáku při -80 °C. Před použitím byly 30 min rozmrazovány na ledu.

K buňkám byl přidán vektor, kdy byl smíchán 1 µl Champion™ pET SUMO o molární koncentraci 57,3 ng/µl nebo 0,5 µl pASK-IBA37plus o molární koncentraci 144 ng/1 µl s 25 µl buněk. Následně byla směs buněk a plazmidů promíchána jemným poklepáním na zkumavku a ponechána 30 min na ledu. Poté byl proveden teplotní šok, kdy se buňky vložily na danou dobu (Tab. 1) do vodní lázně o teplotě 42 °C, a poté byly vráceny na 2 min na led. Následně k buňkám bylo přidáno 250 µl S. O. C. media předehřátého na 37 °C a po hodinovém třepání při 37 °C a 220 rpm na třepačce Innova® S44i (Eppendorf) byly buňky rozetřeny plastovou hokejkou na temperované Petriho misky (37 °C) obsahující LB agar a vhodné ATB o dané pracovní koncentraci (Tab. 1, 2). 50 µl buněk bylo rozetřeno na první misku a zbylý objem buněk na druhou misku, což představovalo kontrolu účinnosti ATB, kdy následující den musí vyrůst množství kolonií závislé na objemu rozetřených buněk. Buňky byly kultivovány přes noc při 37 °C.

3.3.2 Pilotní produkce rekombinantního proteinu

Následující den po transformaci byla odebrána jedna narostlá izolovaná kolonie a přenesena do 50 ml zkumavky obsahující 15 ml tekutého LB media a vhodné ATB o své pracovní koncentraci (Tab. 2). Buňky byly kultivovány na třepačce Innova[®] S44i (Eppendorf) za teploty 37 °C při 220 rpm přes noc. Druhý den ráno byl inokulován 1 ml kultury do 15 ml čistého tekutého LB média bez ATB. Kultura byla vložena do třepačky a inkubována při 220 rpm na 30 °C, dokud nedosáhla hodnoty OD₆₀₀ 0,6-0,8. Po dosažení požadovaného OD₆₀₀ byla provedena indukce. Produkce proteinu byla indukována 1 mM IPTG (pro Champion[™] pET SUMO) nebo anhydrotetracyklinem ve výsledné koncentraci 200 µg/ml (pro pASK-IBA37plus). Zároveň byla pro každou sledovanou teplotu ponechána jedna zkumavka s kulturou bez indukce jako kontrola.

Produkce proteinu byla monitorována za různých teplot a v definovaných časových intervalech (Tab. 3) odebráním 1 ml kultury, ze kterého byl centrifugací na centrifuze 5415 R (Eppendorf) při MAX otáčkách (13 200 rpm) po dobu 1 min oddělen pelet buněk, a ten byl posléze skladován při -20 °C.

Tab. 3: Časové intervaly odběru peletu za daných teplot.

Teplota	Časové intervaly (h)
30 °C	2,4,6
18 °C	3,6, přes noc
16 °C	3,6, přes noc
10 °C	přes noc

3.3.3 Izolace rozpustné a nerozpustné frakce

Buněčný pelet byl smíchán s 500 µl lyzačního pufru a vzorky byly vortexovány až do rozpuštění. Následně byly buňky lyzovány mrazením v tekutém dusíku a zahříváním při 42 °C v ThermoBlocku. Rozpustná a nerozpustná frakce buněk byla oddělena centrifugací při 4 °C a otáčkách 13 200 rpm po dobu 10 min. K nerozpustné frakci bylo přidáno 500 µl 1x PBS.

Následně bylo ke všem vzorkům přidáno 125 μ l 4x Laemliho vzorkového pufru (900 μ l Laemli pufru se 100 μ l beta-merkaptetanolu) a vzorky byly denaturovány zahřátím na 94 °C v ThermoBlocku po dobu 5 min. Takto připravené vzorky byly vortexovány a skladovány při pokojové teplotě.

3.3.4 SDS-PAGE elektroforéza

Tato metoda umožnila separaci proteinů ze směsi jejich průchodem polyakrylamidovým gelem.

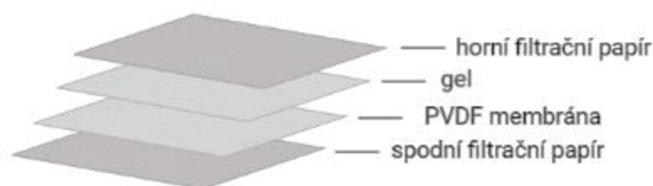
Nejprve byl připraven 12 % separační polyakrylamidový gel nalitím mezi dvě sklíčka zhruba do 2/3 výšky a zakápnut 75% etanolem. Po zhruba 30 min byl filtračním papírem odsán etanol a zbylý prostor mezi sklíčky byl dolit 4 % zaostřovacím gelem, do kterého byl ihned po nalití vsunut hřebínek a gel se nechal minimálně 30 min polymerizovat.

Při SDS-PAGE elektroforéze byly do jamek pipetovány 3 μ l PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) a 10 μ l jednotlivých vzorků. Následně byl gel zalit 1 x TGS pufrem a elektroforéza probíhala nejprve 15 min při 100 V a další zhruba hodinu a patnáct minut při 150 V. Gel byl následně třikrát po dobu 10 min promyt dH₂O, aby byl zbaven SDS, následně 30 min barvený barvivem Coomasie Brilliantní modří R-250 a nakonec byl dvakrát 30 min promyt dH₂O. Výsledné gely byly vyfoceny pomocí ChemiDoc (Bio-Rad).

3.3.5 Western Blot

Nejprve bylo 10 μ l vzorku proteinů separováno polyakrylamidovým gelem připraveným stejným způsobem jako v podkapitole 3.3.4 (SDS-PAGE elektroforéza). K Western blotu byla užita PVDF membrána (Immun-Blot®, Bio-Rad), která musela být 15 min aktivována namočením ve 100 % metanolu. Následně byly PVDF membrána i gel s proteiny na 15 min inkubovány v 1 x SDS přenosovém pufru. Poté následovalo blotování, přenesení separovaných proteinů z gelu na PVDF membránu, kdy byl do Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad) vložen sendvič složený z Mini-Trans Blot filtračních papírů, které tvořily jeho vnější vrstvy, na spodním filtračním papíru byla membrána a na ní gel. Vrstvy

sendviče byly pečlivě smáčknuty k sobě, aby se zamezilo vzniku bublin a přenos proběhl úspěšně. Přenos probíhal při programu STANDARD-SD při 25 V 30 min.



Obr. 8: Složení sendviče při Western blotu. Vytvořeno pomocí BioRender.

Po ukončení přenosu byla membrána promyta v TBS-T (3x 10 min) a poté blokována (2 hodiny) v 2,5% roztoku sušeného mléka ITW Reagents v TBS-T na třepačce (Edmund Bühler GmbH) při 50 rpm. Poté byla membrána znovu promyta v TBS-T (3x 10 min) a byla k ní přidána myši monoklonální anti-polyhistidinová primární protilátka (Sigma-Aldrich) ředěná v 2,5% roztoku sušeného mléka v TBS-T v poměru 1:3000 (4 μ l protilátky ve 12 ml blokovacího roztoku). Membrána byla s protilátkou inkubována přes noc za třepání na třepačce (Edmund Bühler GmbH) při 50 rpm při teplotě 4 °C. Další den byla membrána promyta TBS-T (3x 10 min) a přidal se k ní kozí sekundární anti-myši peroxidázový IgG (Sigma-Aldrich) v 2,5% roztoku sušeného mléka v TBS-T v poměru 1:5000 (2 μ l protilátky v 10 ml blokovacího roztoku). Sekundární protilátka se nechala působit za třepání na třepačce (Edmund Bühler GmbH) při 50 rpm jednu hodinu a poté byla membrána promyta v TBS-T (2x 10 min) a dalších 10 min v TBS.

Na závěr proběhla reakce se substrátem, kdy byl na membránu nakapán substrát připravený smícháním Clarity Western™ ECL Substrate: Luminol/enhancer solution a Peroxide solution v poměru 1:1, a nechal se 5 min působit za vzniku barevné změny. Substrát byl kapán v objemu závislém na ploše membrány, kdy 0,1 ml substrátu mělo pokrýt 1 cm² membrány. Výsledný signál byl zobrazen chemiluminiscencí pomocí G:BOX Chemi (Syngene).

3.4 Příprava rekombinantního CSL proteinu a purifikace

3.4.1 Large scale produkce

K této produkci byly využity BL21 (DE3) Competent *E. coli* buňky transformované pASK-IBA37plus (viz podkapitola 3.3.1). Po transformaci byly kultivovány přes noc při 37 °C na tuhém agarovém mediu obsahujícím vhodné ATB (Tab. 1, 2).

Následující den byla odebrána špičkou mikropipety jedna izolovaná kolonie, která byla vložena do 50 ml tekutého LB media s příslušným ATB a kultivována na třepačce Innova[®] S44i (Eppendorf) při 220 rpm a 37 °C přes noc. Následně bylo 25 ml kultury přidáno k 800 ml tekutého LB media a kultivováno při 37 °C, kdy po dosažení OD₆₀₀ hodnot 0,6-0,8 byla u buněk indukována genová exprese pomocí anhydrotetracyklinu užitého v koncentraci 200 µg/ml. Indukované buňky byly kultivovány při 30°C 6 h a poté byl 20 min centrifugací při 15 000 rpm na Heraeus-Multifuge X3R (Thermo Scientific) centrifuze stočen pelet buněk. Buněčný pelet byl zamražen při -20 °C.

3.4.2 Solubilizace inkluzních tělísek proteinu

Buněčný pelet byl nejprve rozpuštěn v 15 ml lyzačního pufru a buňky byly následně lyzovány při 20000 psi pomocí přístroje Microfluidizer LM20 (Microfluidics). Následně byla centrifugací na Heraeus-Multifuge X3R (Thermo Scientific) centrifuze při 15 000 rpm oddělena nerozpustná frakce, ke které bylo přidáno 50 ml solubilizačního pufru a solubilizace probíhala přes noc při pokojové teplotě za míchání na magnetické míchačce (DLAB) při 250 rpm. Poté byla provedena centrifugace při 15 000 rpm na Heraeus-Multifuge X3R (Thermo Scientific) 30 min a odebrána rozpustná frakce.

3.4.3 Denaturační afinitní chromatografie (Afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech, IMAC)

Purifikace byla prováděna v purifikačním systému ÄKTA pure 25 M (GE HealthCare) pomocí 5 ml HisTrap[™] HP (Cytiva) kolony. Tato kolona byla promývána 25 ml ddH₂O při objemovém průtoku 5 ml/min, načež byla kolona ekvilibrována ekvilibračním pufrem, poté promyta elučním pufrem a nakonec opět ekvilibračním pufrem.

Následovalo nanesení vzorku proteinů na kolonu pomocí vzorkové pumpy o objemovém průtoku 1 ml/min a zároveň byla jímána flow-through (FT) frakce s nenavázanými proteiny, a následně byla kolona promývána ekvilibračním pufrům. Poté byl užit eluční pufr s 0,5M imidazolem pro vymytí nespecificky navázaných proteinů. Eluce rekombinatního CSL probíhala pomocí zvýšení množství elučního pufru na 100 % o průtoku 1 ml/min po dobu 20 min. Eluce proteinů byla monitorována pomocí UV₂₈₀ a jímána v 1 ml frakcích. Nakonec byl purifikační systém promyt elučním a ekvilibračním pufrům, ddH₂O a napuštěn 20 % etanolem.

Obsah CSL proteinu v jednotlivých frakcích byl vyhodnocen pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

3.4.4 Step-down Refolding

Frakce vykazující nejvyšší obsah CSL proteinu byly slity a v poměru 1:2 smíchány s pufrům A obsahujícím 4M močovinu. Dialyzační střívko SnakeSkin™ Dialysis Tubing (Thermo Scientific™) s propustností molekul o velikosti do 10 kDa bylo naplněno 30 ml směsí proteinů v pufrům A, uzavřeno a vloženo do kádinky s 500 ml stejného pufru. Takto připravené střívko bylo ponecháno při 4 °C a za neustálého míchání magnetickou míchačkou (DLAB) při 250 rpm byla v různých časových intervalech (Tab. 4) vyměňována 1/3 objemu pufru v kádince a doplňována do původního objemu pufrům B bez močoviny, a tímto byly postupně snižovány denaturační podmínky. Po třech dnech byl proteinový vzorek vyjmut z dialyzačního střívka a stočen po dobu 30 min na centrifuze Heraeus-Multifuge X3R (Thermo Scientific) při 15 000 rpm. Precipitát i supernatant získaný po refoldingu, byly analyzovány na přítomnost CSL proteinu pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

Tab. 4: Koncentrace močoviny v čase.

Intervaly ředění pufru A (h)	Molární koncentrace močoviny (mol/l)
24	2,664
32	1,774
48	1,18
56	0,786
72	0,52
80	0

3.5 Příprava polyklonálních protilátek proti rCSL a ověření jejich specifity

3.5.1 Příprava vzorků pro imunizaci

Precipitát získaný refoldingem byl rozsuspendován v 0,5 ml destilované vody. Celkem bylo tímto způsobem připraveno pro imunizaci 8 vzorků, tedy 8 dávek. Imunizace byla prováděna servisem Laboratorních chovů Parazitologického ústavu, BC AV ČR, kdy byly vzorky za přídavku 0,5 ml adjuvancia podávány dvěma králíkům s čísly 086 a 087, a každému byly injikovány čtyři dávky během zhruba jednoho měsíce.

3.5.2 Ověření specifity protilátek proti rCSL

Z krve obou králíků byla po 24 hodinové sedimentaci ve 4 °C na centrifuze Heraeus-Multifuge X3R (Thermo Scientific) při otáčkách 2 500 rpm po dobu 15 min oddělena krevní plazma, která byla užita na ověření specifity protilátek Western blotem. Western blot byl proveden stejným způsobem jako v podkapitole 3.3.5 s výjimkou užití 3 µl vzorku purifikovaného CSL proteinu a užití plazmy obou králíků jako primární protilátky o ředěních 1:50 (120 µl plazmy v 6 ml blokovacího roztoku), 1:100 (60 µl plazmy v 6 ml blokovacího roztoku) a 1:500 (12 µl plazmy v 6 ml blokovacího roztoku). Jako sekundární protilátka byl v tomto případě užit kozí-anti-králičí IgG (H+L) konjugovaný s křenovou peroxidázou (Vector Laboratories) v ředění 1:5000 (1,2 µl protilátky v 6 ml blokovacího roztoku). Současně byla provedena SDS-PAGE (viz podkapitola 3.3.4) se 3 µl vzorku purifikovaného CSL a 3 µl PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific™). Krevní plazma poté byla uložena do -20 °C.

Identifikace proteinu pomocí MALDI byla provedena servisem Mgr. Filipa Dyčky, Ph.D. z PřF JU.

4 Výsledky

4.1 Optimalizace produkce rekombinantního proteinu CSL v bakteriálním expresním systému

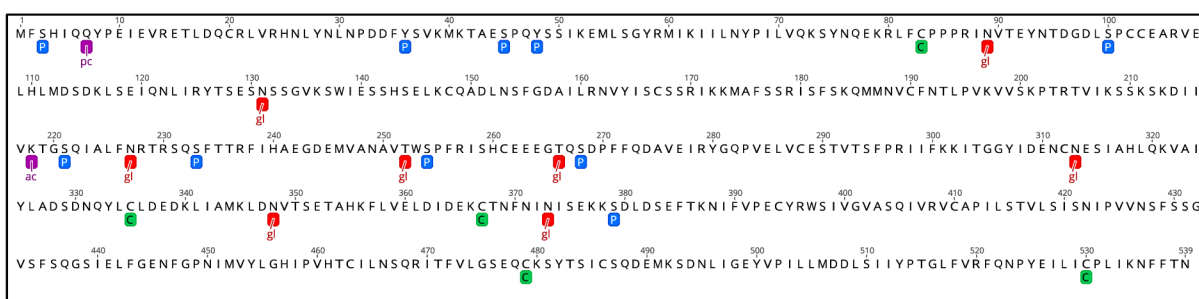
4.1.1 Pilotní produkce rekombinantního proteinu

Touto produkcí jsme zjišťovali, jaké podmínky jsou nejlepší pro produkci rekombinantního CSL proteinu v konkrétních buňkách *E. coli*. Užitými kompetentními buňkami byly BL21 (DE3), T7 Express (High Efficiency), SHuffle®T7 Express lysY a ArcticExpress (DE3). BL21 (DE3) a T7 Express (High Efficiency) jsou standartními typy buněk užívanými pro produkce rekombinantních proteinů. Mají inaktivované proteázy Lon a OmpT, aby bylo zabráněno štěpení proteinů. Další užití buňky jsou vylepšeny o vlastnosti, které běžné buňky *E. coli* nemají, jako je možnost posttranslačních modifikací, čímž jsou optimalizovány podmínky pro produkci eukaryotních proteinů. SHuffle®T7 Express lysY *E. coli* obsahují plazmidy nesoucí gen pro disulfid-izomerázu pro tvorbu disulfidických můstků, které se (společně s fosforylacemi a glykosylacemi) nacházejí v CSL proteinu *S. molnari* (Obr. 9), a jelikož proteiny *E. coli* tento typ vazby postrádají, je tak zvýšena pravděpodobnost produkce CSL v bakterii ve správné konformaci. Buňky ArcticExpress (DE3) jsou obohaceny o plazmidy s geny pro chaperoniny Cpn60 a Cpn10 usnadňujícími skládání proteinu.

BL21 (DE3) a T7 Express (High Efficiency) byly transformovány vektory pASK-IBA37+ a Champion™ pET SUMO a SHuffle®T7 Express lysY a ArcticExpress (DE3) byly transformovány pASK-IBA37plus. V případě CSL produkovaného vektorem pASK-IBA37plus byla očekávaná velikost proteinu 62 kDa, jelikož tento plazmid obsahoval mimo gen pro protein také N-terminální 6× His-tag. Champion™ pET SUMO produkoval protein o délce zhruba 74 kDa kvůli přítomnosti N-terminálního 6xHis-tag a fúzního proteinu SUMO, který napomáhá skládání proteinu. Dále pASK-IBA37plus obsahuje štěpné místo o velikosti 11 bp pro proteázu faktor Xa pro odštěpení 6× His-tag od CSL. V případě Champion™ pET SUMO je pro odštěpení N-terminálního 6× His-tag a proteinu SUMO přítomna C-terminální proteáza SUMO ULP-1.

Po indukci genové exprese u buněčné kultury (prostřednictvím 1mM IPTG pro Champion™ pET SUMO a anhydrotetracyklinu o koncentraci 200 µg/ml pro pASK-IBA37plus) byl po dobu 2 h, 3 h, 4 h, 6 h a přes noc a za teplot 10 °C, 16 °C, 18 °C a 30 °C odebrán 1 ml vzorek a z něj oddělen buněčný pelet. Poté byly buňky lyzovány střídáním jejich

zmrazování v tekutém dusíku s jejich zahříváním. Nakonec bylo 10 µl izolované rozpustné a nerozpustné frakce analyzováno pomocí SDS-PAGE na přítomnost proteinu CSL. V rozpustné frakci se nachází složené proteiny cytosolu, kdežto v nerozpustné frakci jsou přítomny proteiny nejčastěji v agregované formě inkluzních těles či membránové proteiny. Následně byla pomocí SDS-PAGE analyzována produkce rekombinantního CSL proteinu u všech kombinací buněk a vektorů za daných podmínek kultivace, kdy u všech testovaných buněk bylo prokázáno více proteinu v nerozpustné frakci oproti rozpustné. (Tab. 5). Ze získaných výsledků SDS-PAGE je v této práci prezentován výsledek produkce indukovaných buněk BL21(DE3) Competent *E. coli* s pASK-IBA37plus vektorem kultivovaných při teplotě 30 °C po dobu 6 h, u kterých byla zaznamenána nejvyšší produkce nerozpustného CSL proteinu (Obr. 10).

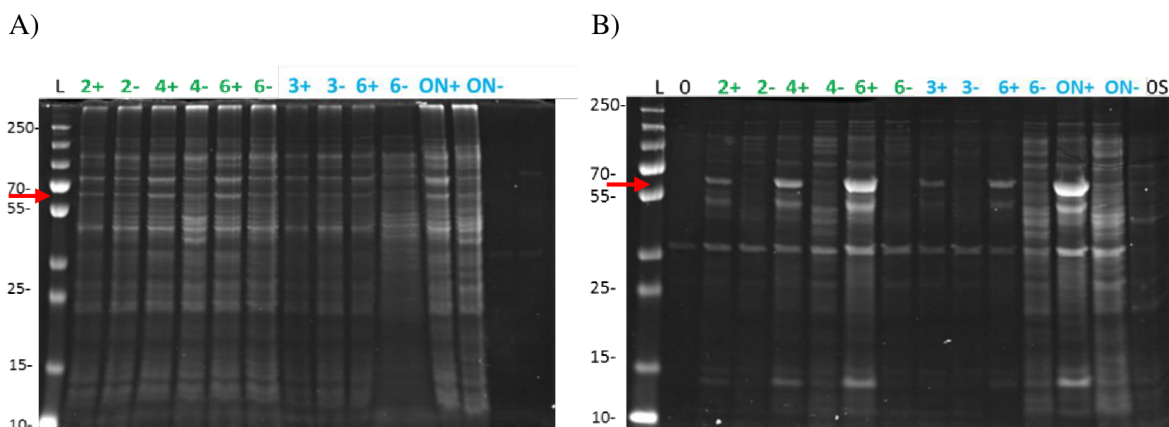


Obr. 9: Predikované (disulfidické můstky DCON, <http://gpcr.biocomp.unibo.it/>, ostatní <https://www.musite.net/>) posttranslační modifikace CSL proteinu *S. molnari*. Vyznačeny jsou: fosforylace (P), acetylace (ac), kyselina pyrrolidonkarboxylová (pc), cystein s disulfidickou vazbou (C) a glykosylace (gl).

Tab. 5: Produkce CSL proteinu u jednotlivých kombinací buněk a vektorů za daných kultivačních podmínek, kdy jsou znaménkem + označeny vyhovující produkce a znaménkem – nevyhovující příliš nízké produkce. Červeně označena kombinace a podmínky s nejvyšší produkcí.

Buňky	Vektor	Teplota (°C)	Čas	Produkce proteinu	
BL21 (DE3) Competent <i>E. coli</i>	pASK-IBA37plus	30 °C	2, 4, 6	rozpustný	-
				nerozpustný	+
BL21 (DE3) Competent <i>E. coli</i>	pASK-IBA37plus	18 °C	3, 6, přes noc	rozpustný	-
				nerozpustný	+
BL21 (DE3) Competent <i>E. coli</i>	Champion™ pET SUMO	30 °C	2, 4, 6	rozpustný	-
				nerozpustný	+
		18 °C	3, 6, přes noc	rozpustný	-

BL21 (DE3) Competent <i>E. coli</i>	Champion™ pET SUMO			nerozpustný	-
T7 Express Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	pASK- IBA37plus	30 °C	2, 4, 6	rozpustný	-
				nerozpustný	+
T7 Express Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	pASK- IBA37plus	18 °C	3, 6, přes noc	rozpustný	-
				nerozpustný	+
T7 Express Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	Champion™ pET SUMO	30 °C	2, 4, 6	rozpustný	-
				nerozpustný	-
T7 Express Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	Champion™ pET SUMO	18 °C	3, 6, přes noc	rozpustný	-
				nerozpustný	-
SHuffle®T7 Express lysY Competent <i>E. coli</i>	pASK- IBA37plus	30 °C	2, 4, 6	rozpustný	-
				nerozpustný	-
SHuffle®T7 Express lysY Competent <i>E. coli</i>	pASK- IBA37plus	16 °C	3, 6, přes noc	rozpustný	-
				nerozpustný	-
ArcticExpress (DE3) Competent cells	pASK- IBA37plus	10 °C	přes noc	rozpustný	-
				nerozpustný	-
ArcticExpress (DE3) Competent cells	Champion™ pET SUMO	10 °C	přes noc	rozpustný	-
				nerozpustný	+



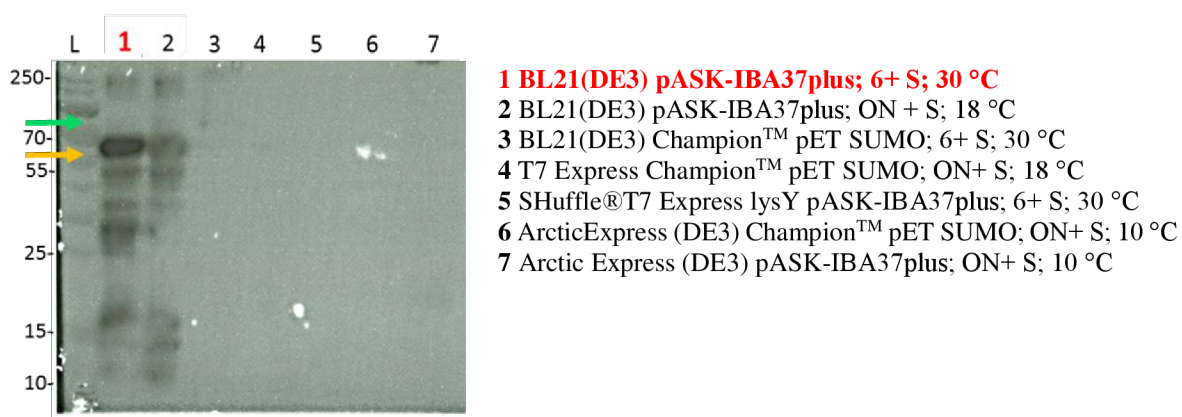
Obr. 10: Porovnání produkci CSL u rozpustné a nerozpustné frakce buněk BL21(DE3) Competent *E. coli* s pASK-IBA37plus. A) Rozpustná frakce. Znáznorněny časové intervaly v h pro t: 30 °C zeleně,

pro 18 °C modře; ON= přes noc, s indukcí (+) a bez indukce (-). **B)** Nerozpustná frakce. Znázorněny časové intervaly v h pro t: 30 °C zeleně, pro 18 °C modře; ON= přes noc, s indukcí (+) a bez indukce (-); OS= produkce v čase 0 pro supernatant. Šipky označují CSL protein.

4.1.2 Ověření identity CSL proteinu

Po pilotní produkci tedy bylo detekováno mnohem více proteinu v nerozpustné frakci než v rozpustné. Preferovanou variantou pro použití k následujícím krokům této práce byl rozpustný protein, který je již sbalen do své nativní konformace, a tudíž by s ním nebyl prováděn refolding, což je poměrně problematická metoda umělého sbalování proteinu s nejistou úspěšností. Z tohoto důvodu byl pro ověření, zda se pozitivní signály na SDS-PAGE vztahují skutečně k CSL proteinu, proveden Western blot, kdy bylo 10 µl vzorků rozpustných proteinů (přítomných v buněčném supernatantu) separováno polyakrylamidovým gelem a přebíleno na PVDF membránu. Následně bylo užito afinity primární myší monoklonální anti-polyhistidinové protilátky o ředění 1:3000 k 6×His-tag CSL proteinu obsaženého v supernatantu. Jako sekundární protilátka byl užit kozí anti-myší IgG konjugovaný s peroxidázou užítý v ředění 1:5000.

Touto metodou bylo hodnoceno 7 kombinací buněk a vektorů kultivovaných za určitých podmínek, kde jsme pozorovali největší produkci proteinu pomocí SDS-PAGE. Pomocí Western blotu byla nakonec potvrzena přítomnost CSL i u rozpustné frakce buněk BL21(DE3) Competent *E. coli* s vektorem pASK-IBA37plus kultivovaných při 30 °C 6 h, a tyto buňky užity pro large scale produkci a následnou purifikaci (Obr. 11).



Obr. 11: Výsledky Western blotu; ověření identity CSL proteinu u 7 kombinací buněk a vektorů (žlutá šipka pro pASK-IBA37plus, zelená šipka pro Champion™ pET-SUMO) vykazujícími nejvyšší produkci proteinu. ON= přes noc, S= rozpustný protein přítomný v supernatantu. Červeně vyznačeny buňky s pozitivním signálem.

4.2 Příprava rekombinantního CSL a purifikace

4.2.1 Large scale produkce

Na základě výsledků pilotní exprese jsme zvolili pro tuto produkci rekombinantního CSL proteinu buňky BL21(DE3) Competent *E. coli* s vektorem pASK-IBA37plus. Tyto buňky s indukovanou genovou expresí pomocí 1 mM IPTG byly kultivovány při 30 °C po dobu 6 h a následně stočeny. Buněčný pelet byl lyzován při 20000 psi a následně byla ověřena přítomnost CSL proteinu v buňkách pomocí SDS-PAGE (Obr. 12). Byť byla produkce CSL po large scale produkci oproti pilotní produkci nižší, bylo i v tomto případě pomocí SDS-PAGE vyhodnoceno mnohem vyšší množství proteinu v nerozpustné frakci oproti rozpustné, a tudíž byl protein z této frakce užít k purifikaci.



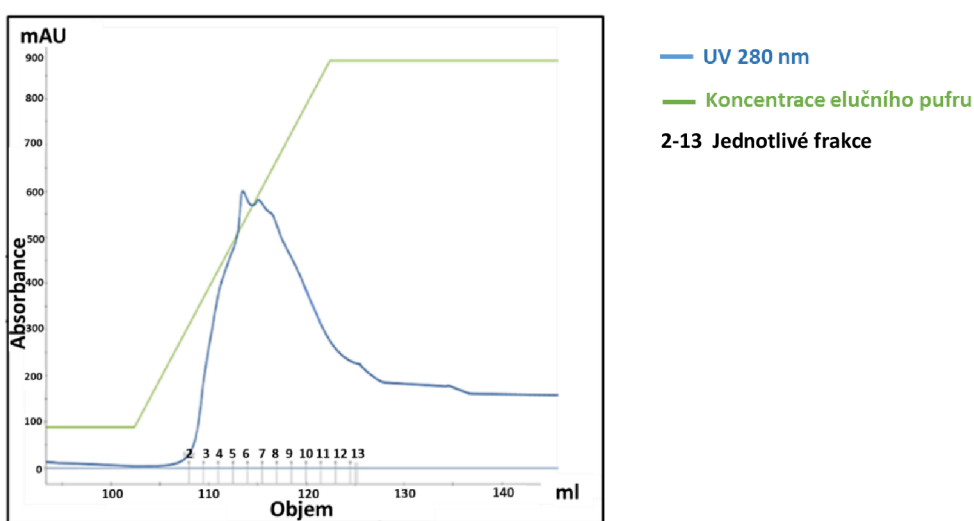
Obr. 12: Large scale produkce CSL proteinu vyhodnocená SDS-PAGE. Nejvyšší produkce proteinu v nerozpustné frakci buňky je vyznačena zeleně; S= protein přítomný v buněčném supernatantu. Šipkou vyznačen CSL protein.

4.2.2 Denaturační afinitní chromatografie (Afinitní chromatografie na vázaných kovových iontech, IMAC)

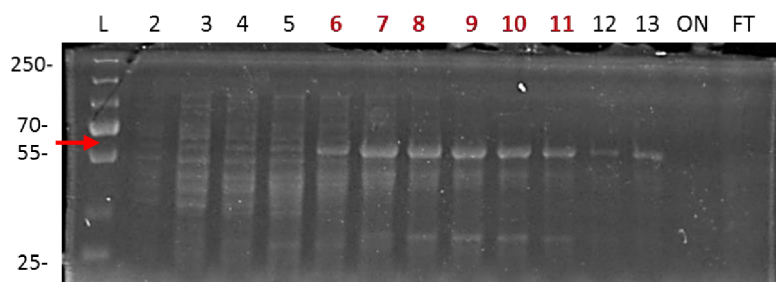
Po solubilizaci inkluzních těles, kdy došlo ke zpřístupnění CSL proteinu navozením denaturačních podmínek pomocí 6M guanidium HCl v solubilizačním pufru, byla s takto připraveným proteinem provedena purifikace. Pro purifikaci byla užita denaturační afinitní chromatografie. 5 ml HisTrapTM HP kolona byla nejprve promyta 25 ml ddH₂O a poté ekvilibrována ekvilibračním pufrům o složení 20mM Tris, 300mM NaCl a 6M močoviny. Následně byl na ionty niklu přítomných na této koloně navázán 6×His-tag CSL proteinu. Tento protein byl posléze po eluci nespecificky navázaných proteinů elučním pufrům, který obsahuje 0,5M imidazol, vymyt gradientem tohoto pufru, kdy bylo jeho množství v koloně zvýšeno na 100 %. Eluční pufr díky obsahu imidazolu s vyšší afinitou k iontům niklu než

v případě 6×His-tag vytěsňuje proteiny opatřené touto značkou, případně jiné proteiny s histidinou na povrchu, z vazby na kolonu a tyto proteiny jsou sbírány do frakcí.

Během purifikace byla odebrána ON frakce, tj. původní vzorek s nepurifikovaným proteinem, a flow through frakce s proteiny nenavázanými na kolonu. Dále bylo odebráno celkem čtrnáct 1 ml frakcí s eluovaným proteinem, kdy byl obsah proteinu v jednotlivých frakcích monitorován pomocí UV₂₈₀. Na výsledném chromatogramu průběhu purifikace je patrné, že nejvíce CSL proteinu vykazovaly frakce s čísly 6, 7, 8, 9, 10 a 11 (Obr. 13). Obsah CSL proteinu byl následně analyzován ve 3 μl jednotlivých odebraných frakcí pomocí SDS-PAGE, kdy byl rovněž potvrzen nejvyšší obsah tohoto proteinu ve zmíněných šesti frakcích (Obr. 14).



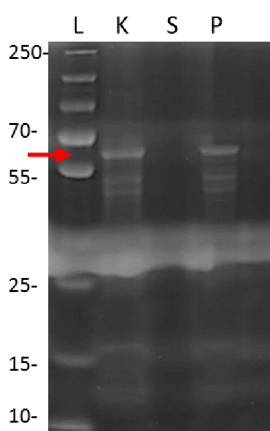
Obr. 13: Chromatogram průběhu IMAC; modrá křivka znázorňuje absorbanci při 280 nm přímo úměrnou množství proteinu přítomnému ve frakcích závisle na množství elučního pufru; zelená křivka znázorňuje gradient elučního pufru.



Obr. 14: Výsledky purifikace CSL proteinu z BL21(DE3) Competent *E. coli* buněk a pASK-IBA37plus vektoru. FT= flow through; červeně vyznačeny frakce s nejvyšším obsahem CSL proteinu. Šipkou vyznačena velikost CSL.

4.2.3 Step-down Refolding

Frakce vykazující nejvyšší množství purifikovaného denaturovaného CSL proteinu byly slity a následně smíchány v poměru 1:2 s pufrem A obsahujícím 4M močovinu, načež byla tato směs nalita do dialyzačního střívka. V dialyzačním střívku byl poté protein za neustálého míchání při 4 °C sbalován postupným snižováním denaturačních podmínek (po 8-16 h) ředěním pufru A s močovinou pufru B bez močoviny až na její nulovou koncentraci. Po refoldingu byl centrifugací oddělen supernatant a precipitát, který se v průběhu tohoto procesu vytvořil, a jelikož byla pomocí SDS-PAGE prokázána přítomnost CSL pouze v precipitátu, byl protein z něj použitý k poslednímu cíli bakalářské práce (Obr. 15).



Obr. 15: Produkce proteinu CSL po refoldingu. K= kontrolní vzorek proteinu před refoldingem; S= proteiny po refoldingu přítomné v supernatantu; P= proteiny po refoldingu přítomné jako precipitát. Šipka označuje velikost CSL.

4.3 Příprava polyklonálních protilátek proti rCSL a ověření jejich specifity

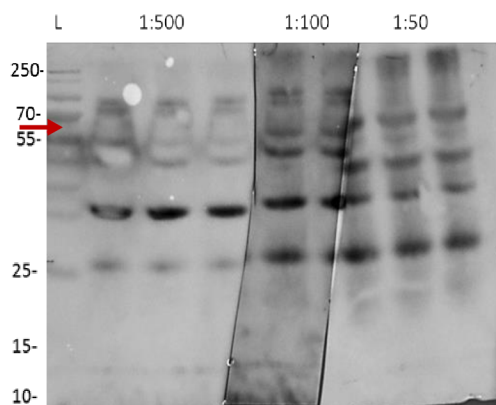
4.3.1 Ověření specifity protilátek proti rCSL

Precipitovaný CSL protein byl rozsuspendován v 0,5 ml destilované vody, a takto připravené vzorky byly injikovány servisem Laboratorních chovů Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR dvěma králíkům s čísly 086 a 087, kdy každému králíkovi byly podány čtyři dávky s přídavkem adjuvancia po dobu zhruba jednoho měsíce. Po imunizaci byla krev nejprve uchována 24 h při 4 °C. Ze sedimentované krve byla následně centrifugací oddělena plazma.

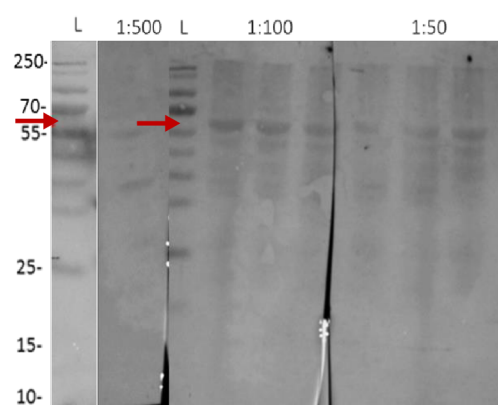
Pro ověření specifity protilátek proti rCSL byl proveden Western blot, kdy bylo jako primární protilátka použito získané sérum. Proteiny z 3 µl vzorku rekombinantního CSL byly nejprve separovány polyakrylamidovým gelem, a následně přebíjeny na PVDF membránu. Plazma byla při ověřování specifity protilátek užita v koncentracích 1:500, 1:100 a 1:50 naředěním v 2,5 % blokovacím roztoku sušeného mléka v TBS-T. Jako sekundární protilátka byl použit kozí anti-králičí IgG (H+L) konjugovaný s křenovou peroxidázou.

Síla výsledných signálů pozitivně korelovala s použitými koncentracemi plazmy u obou králíků. V případě prvního králíka (086) byly signály silnější než u druhého králíka, ovšem některé z nich byly viditelné i v jiných než očekávaných místech, tedy jinde, než kde by se měl nacházet CSL protein o své velikosti (62 kDa). Při ředění protilátky 1:100 a 1:500 byly dokonce některé tyto nespecifické signály mnohem výraznější než specifický signál (Obr. 16 A). Pro detekci, zda tyto signály náleží CSL proteinu o menší velikosti, byla provedena metoda MALDI. U druhého králíka (087) byly signály slabší než u prvního, a byť byly patrné i některé nespecifické signály, byly velmi slabé a nedosahovaly takové intenzity jako signály na očekávaném místě. Protilátky králíka č. 087 lze tedy bez dalšího ověřování považovat za afinní k rCSL (Obr. 16 B).

A)



B)

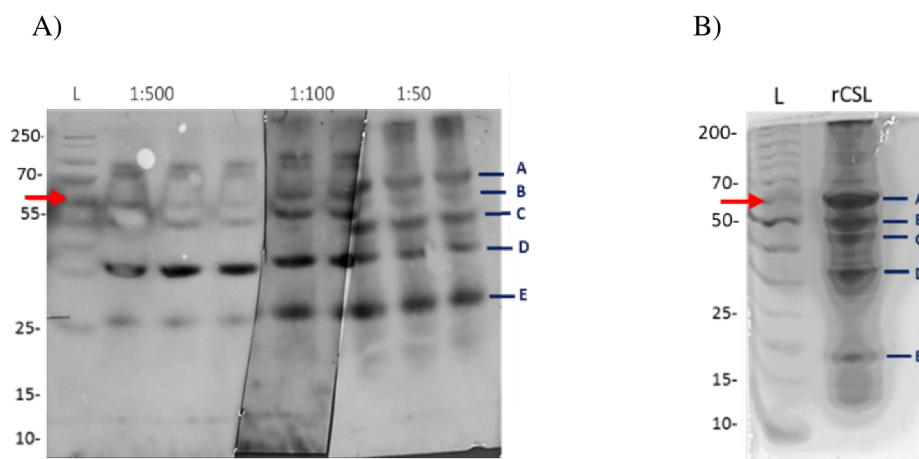


Obr. 16: Výsledky Western blotu pro protilátky králíků o ředěních 1:500, 1:100 a 1:50. **A)** Králík č. 086. Červená šipka označuje prominentní signál (tj. signál v místě CSL proteinu o očekávané velikosti). **B)** Králík č. 087. Červená šipka označuje prominentní signál.

4.3.2 MALDI

Jelikož pozice signálů detekovaných Western blotem u králíka č. 086 korespondovala s pozicí proužků patrných na proteinovém profilu rCSL (Obr. 17 A, B), byly tyto proužky z gelu vyříznuty, načež byly analyzovány na přítomnost CSL metodou MALDI. Tato metoda byla provedena servisem Mgr. Filipa Dyčky, Ph.D. z PřF JU.

Pomocí MALDI byl s vysokou pravděpodobností identifikován CSL *S. molnari* ve všech pěti analyzovaných proužcích (Tab. 6), čímž byla prokázána specifita protilátek i u králíka 086. Dále byly identifikovány některé proteiny *E. coli*, které nebyly purifikací odstraněny. S výjimkou vzorku C však jejich protein skóre dosahovalo výrazně nižších hodnot než v případě CSL *S. molnari*, a jejich zastoupení ve vzorcích tak lze považovat za minoritní.



Obr. 17: **A)** Signály detekované Western blotem u králíka č. 086 modře vyznačeny jako A, B, C, D a E. **B)** Signály na proteinovém profilu rCSL modře vyznačeny jako A, B, C, D a E. Červenými šipkami je označen prominentní signál (tj. signál v místě CSL proteinu o očekávané velikosti).

Tab. 6: Proteiny detekované v jednotlivých vzorcích. Protein skóre= míra nepravděpodobnosti falešně pozitivních výsledků (s nejnižší hranicí 53).

Vzorek	Protein	Protein skóre
A	CSL <i>S. molnari</i>	298
B	CSL <i>S. molnari</i>	184
	D-tagatóza-1,6-bisfosfát aldoláza <i>E. coli</i>	81
C	Elongační faktor Tu 1 <i>E. coli</i>	119
	CSL <i>S. molnari</i>	114
	Citrát syntáza <i>E. coli</i>	68
D	CSL <i>S. molnari</i>	408
	50S ribozomální protein <i>E. coli</i>	57
E	CSL <i>S. molnari</i>	340
	50S ribozomální protein <i>E. coli</i>	122

5 Diskuze

Prvním cílem práce byla optimalizace produkce rekombinantního CSL v bakteriálním expresním systému *E. coli*. Čtyři typy kompetentních buněk, jmenovitě T7 Express Competent *E. coli* (High Efficiency), BL21 (DE3) Competent *E. coli*, SHuffle® T7 Express lysY Competent *E. coli* a ArcticExpress (DE3) Competent cells, byly transformovány vektory pASK-IBA37plus nebo Champion™ pET SUMO obsahujícími gen pro CSL *S. molnari*. Přestože *E. coli* postrádá možnost některých posttranslačních modifikací, byla pro experiment zvolena, jelikož byla již dříve s úspěchem užitá při produkci rCSL proteinu u *D. melanogaster* a člověka (Kovall a Hendrickson 2004; Nam et al. 2006). Dalšími důvody použití této bakterie je její vysoká růstová rychlost (průměrná doba jejího buněčného dělení je 30 min) a nízké kultivační nároky oproti jiným expresním systémům, a proto je obecně při těchto typech produkce volena velmi často (Francis a Page 2010; Yin et al. 2007). Zmíněné vektory byly pro produkci proteinu upřednostněny, jelikož s jejich použitím má proteinová laboratoř Makrokomplex PřF JU, kde byla tato práce prováděna, mnohaleté zkušenosti. Oproti vektorům užitých Kovallem a Hendricksonem (2004), které obsahovaly fúzního partnera GST, byl v tomto experimentu protein fúzován se SUMO chaperonem (Champion™ pET SUMO). Sumoylace proteinů snižuje rychlost jejich sbalování, čímž zvyšuje šanci úspěšného dokončení tohoto procesu. Současně má SUMO protein hydrofilní povrch, zatímco uvnitř je hydrofobní, a mohl by tak fungovat jako detergent i pro za normálních okolností nerozpustné proteiny. To by mohlo být jedním z vysvětlení, proč je při užití Champion™ pET SUMO vektoru obvykle vysoká úspěšnost produkce rozpustných proteinů (Butt 2005; Malakhov 2004). Oba vektory dále nesou N-terminální 6×His-tag stejně jako v případě produkce lidského rekombinantního CSL (Nam et al. 2006).

Stejně jako vektory i použité buňky disponovaly vlastnostmi ulehčujícími formování proteinu, jako je produkce disulfidických můstků díky přítomnosti izomeráz disulfidických vazeb u SHuffle® T7 Express lysY nebo produkce chaperoninů Cpn60 a Cpn10 u ArcticExpress (DE3). Disulfidické můstky chybí u proteinů *E. coli*, zatímco v CSL proteinu přítomny jsou. SHuffle® T7 Express lysY buňky tak představují alternativu umožňující formaci těchto vazeb v *E. coli*. Zmíněné chaperoniny u ArcticExpress (DE3) umožňují sbalování proteinu, a je tak opět zvýšena šance zisku CSL v rozpustné formě. Co se týče buněk T7 Express (High Efficiency) a BL21 (DE3) nemají žádné vlastnosti přímo podporující vznik

nativního proteinu. Tyto buňky mají inaktivované proteázy Lon a OmpT, což by mělo usnadnit produkci proteinu o známé délce a také zabránit jeho degradaci.

V naší práci se rekombinantní CSL protein nacházel v buňkách převážně v nerozpustné frakci. Nerozpustný CSL protein je agregovaný a uložen v buňce ve formě inkluzních těles, která buňky vytvářejí u látek, jež jsou pro ně zbytečné (buď odpadní, nebo v nadbytku). Naopak nativní rozpustný cytosolový protein je sbalený, a nejenže s ním lze provádět různé strukturální/funkční testy, ale je také vhodnější variantou pro následnou tvorbu protilátek, které by mohly být užity ke studiím CSL plánovaným do budoucna, jako např. značení CSL přímo ve *Sphaerospora molnari*.

I přes použití mnoha typů buněk s různými vlastnostmi včetně např. možnosti posttranslačních modifikací, bylo po pilotní (maloobjemové) produkci nakonec pomocí SDS-PAGE u všech těchto buněk prokázáno mnohem vyšší množství CSL proteinu u jejich nerozpustné frakce oproti rozpustné frakci. Pro zvýšení úspěšnosti produkce rekombinantního CSL v nativní konformaci je nutno se této problematice dále věnovat a užít pro produkci další vektory a buňky eukaryotního organismu s vyvinutějším expresním systémem bohatším na posttranslační modifikace (např. kvasinky *Pichia pastoris*, hmyzí buňky, savčí buňky, alternativně buňky prvoka *Leishmania tarentolae*), případně nastolit jiné podmínky kultivace apod.

U ArcticExpress (DE3), SHuffle[®] T7 Express lysY a T7 Express lysY (High Efficiency) buněk byla detekována nízká produkce CSL proteinu, a to jak v případě pASK-IBA37plus, tak Champion[™]pET SUMO vektoru. Naopak vysokou produkci nerozpustného proteinu vykazoval běžně užívaný kmen buněk BL21(DE3) Competent *E. coli* transformovaných pASK-IBA37plus kultivovaných za teploty 30 °C po dobu 6 h (Obr. 10), což je vzhledem k výše popsaným vlastnostem ostatních buněk a vektoru Champion[™] pET SUMO v rozporu s očekávanými výsledky. Po následném úspěšném ověření identity CSL pomocí Western blotu prostřednictvím Anti-His Tag protilátky byl protein z těchto buněk a vektoru kultivovaných za uvedených podmínek použitý k dalšímu kroku, a tedy přípravě rekombinantního CSL a jeho purifikaci.

Jak lze předpokládat na základě výsledků pilotní produkce, bylo i po large scale (velkoobjemové) produkci, přítomno nejvíce CSL proteinu u BL21 (DE3) Competent *E. coli* buněk v inkluzních těliscích. Tato tělíska byla následně solubilizována, kdy došlo ke

zpřístupnění agregovaného proteinu navozením denaturačních podmínek pomocí 6M guanidium HCl, a takto připravený protein byl purifikován.

Jelikož CSL protein obsahoval 6×His-tag, byla provedena denaturační afinitní chromatografie (IMAC) založená na afinitě právě 6×His-tag CSL proteinu k iontům niklu navázaným na koloně. Výše zmíněná GST byla použita při produkci nativního rekombinantního CSL u *D. melanogaster* (Kovall a Hendrickson 2004) a společně s 6×His-tag je hojně užívaná pro afinitní purifikace proteinů. S použitím GST jsou však spojeny mnohé nevýhody jako např. nutnost jejího složení do správné konformace, aby byla při purifikaci afinní k imobilizovanému glutationu na koloně, nebo její délka (211 aminokyselin), která může negativně ovlivnit sbalování produkovaného proteinu. 6×His-tag obsahuje pouze 6 aminokyselin (6 histidinů), a jelikož nemusí být pro vazbu ke koloně složen, může být uplatněn i při purifikacích denaturovaných proteinů, a tedy i rekombinantního CSL *S. molnari*. Během purifikace bylo odebráno 14 frakcí o objemu 1 ml, kdy 6 z nich s nejvyšším obsahem CSL proteinu bylo použito pro step-down refolding (Obr. 13, 14).

Přestože je u pASK-IBA37plus možnost odstranit 6×His-tag, v tomto případě tato značka odštěpena nebyla, protože díky své malé velikosti nepředstavuje problémy při refoldingu, a dále je jeho sekvence jen slabě imunogenní, tudíž je malá šance, že by ovlivnil výsledky testů následně prováděných s protilátkami (Krupka et al. 2016; Jin et al. 2017).

Dále byl proveden step-down refolding, nejvíce stěžejní krok pro produkci CSL proteinu rozhodující o tom, v jaké formě bude CSL nakonec získán. Jednalo se o umělé sbalování denaturovaného purifikovaného proteinu postupným snižováním denaturačních podmínek za postupně klesajícího množství denaturačního činidla. V tomto případě byl užit 4mM beta-merkaptóetanol a 4M močovina, jejíž koncentrace za 4 dny klesla ředěním pufru A s močovinou pufrům B bez močoviny na nulovou hodnotu (Tab. 4). Z metod refoldingu proteinů založených na dialýze existuje spolu se step-down refoldingem, také one-step refolding. Během tohoto typu refoldingu dochází k rychlému poklesu koncentrace denaturačního činidla, kdy mezi jednotlivými ředěními pufru nejsou delší prodlevy. Právě prudkou změnou denaturačních podmínek se může zformovat špatně sbalený protein či může dojít ke tvorbě agregátů. Oproti tomu šetrnější step-down refolding zahrnuje ředění denaturačního činidla postupně v intervalech dostatečně dlouhých pro stabilizaci proteinu v měnícím se prostředí (Yamaguchi a Miyazaki 2014).

Po refoldingu výsledky SDS-PAGE nakonec prokázaly přítomnost CSL ve vytvořeném precipitátu, nikoli však v supernatantu (Obr. 15). Step-down refoldingem byl tudíž získán precipitovaný protein, u kterého nedošlo k jeho úspěšnému sbalení. Pro úspěšný refolding proteinu je potřeba optimalizovat jeho podmínky, např. snižovat koncentraci močoviny ještě pomalejším tempem a nechat protein sbalovat delší dobu, aby nedošlo k jeho precipitaci z roztoku, eventuálně ani k jeho nesprávnému sbalení. Další možností je např. přidavek chaperonů ulehčujících sbalování.

S precipitovaným proteinem byla následně provedena imunizace. Vzorek proteinu byl rozsuspendován v destilované vodě, poté k němu bylo přidáno adjuvancium pro zvýšení imunogenity a následně byl injikován dvěma králíkům (086 a 087) ve čtyřech dávkách po dobu zhruba jednoho měsíce.

Po imunizaci byla pomocí Western blotu ověřována specifita získaných protilátek proti rCSL (tedy stejnému proteinu, který byl injikován králíkům). U protilátek z obou králíků síla signálů rostla s jejich koncentrací, ovšem u každého zvířete byla imunitní odpověď na podání proteinu odlišná.

U králíka č. 087 bylo ihned zřejmé, že z něj získané protilátky jsou specifické pro rekombinantní CSL protein, jelikož byly zřetelně vidět signály v místě proteinu o očekávané velikosti, tedy 62 kDa. Současně byly viditelné i nespecifické signály v jiných oblastech membrány, ale protože byly příliš slabé, nebylo nutno jim připisovat větší význam (Obr. 16 B).

Výsledkem testování protilátky králíka č. 086 byly signály celkově silnější než u králíka č. 087 detekované nejen v pozici proteinu o očekávané velikosti, ale i v dalších čtyřech místech. Nespecifické signály byly na membráně patrné pod specifickým signálem (tj. signálem v místě proteinu o 62 kDa), z čehož lze usoudit, že se jedná o kratší proteiny, než je rekombinantní CSL. Navíc byly velmi silné a při ředěních protilátky 1:500 a 1:100 dokonce dosahovaly i vyšší intenzity než specifický signál (Obr. 16 A). Skutečnost, že se nacházely mimo předpokládané místo, ještě nemusela napovídat tomu, že se o CSL protein nejedná. Nespecifické signály mohly vykazovat např. fragmenty CSL proteinu. Ty mohly vzniknout předčasným ukončením translace anebo štěpením proteázami *E. coli* buď ještě v této bakterii, kdy se takto organismus zbavoval odpadní látky, nebo během skladování purifikovaného CSL, kdy je v -20°C teplotě (kde byl purifikovaný CSL uchováván) jejich aktivita sice značně zpomalena, ale není zastavena. Pro případ, že by se mohlo jednat o fragmenty proteinu, byla

provedena MALDI, kterou byla ověřována přítomnost CSL porovnáním jeho známé aminokyselinové sekvence s aminokyselinovým složením detekovaným ve vzorcích.

MALDI identifikovala CSL protein *S. molnari* u všech pěti analyzovaných vzorků (A, B, C, D, E), kdy společně s ním byly ještě detekovány některé proteiny náležící *E. coli*, které mohou obsahovat sekvenci aminokyselin podobnou 6×His-tag, a tak se během purifikace navázaly na kolonu spolu s CSL. Byly to D-tagatóza-1,6-bisfosfát aldoláza, elongační faktor Tu 1, citrát syntáza a 50S ribozomální protein. Avšak kromě elongačního faktoru Tu 1 přítomného ve vzorku C dosahovalo protein skóre těchto bakteriálních proteinů mnohem nižších hodnot než v případě CSL *S. molnari*, a tak lze jejich množství vyhodnotit jako velmi nízké (Tab. 6). Tímto byla potvrzena specifita protilátky také u králíka č. 086.

Pro zjištění, zda jsou protilátky afinní i k CSL proteinu produkovaného *S. molnari*, je nutno pomocí Western blotu ověřit jejich specifitu proti CSL proteinu z vývojových krevních stádií tohoto parazita a v případě pozitivních výsledků tyto protilátky purifikovat z plazmy.

Jelikož však byly získány protilátky proti denaturovanému proteinu, je stále otázkou, proti jakým epitopům proteinu se během imunizace vytvořily (zda se jedná o takové epitopy přístupné protilátkám i u sbaleného CSL), a tedy zda budou afinní také k nativnímu CSL v krevních stádiích parazita.

Pokud by byly protilátky specifické pro CSL *S. molnari*, může být s nimi posléze prováděna řada funkčních i strukturních studií CSL, jako např. imunobarvení CSL proteinu u krevních stádií barevně značenými protilátkami pro lokalizaci CSL v rámci buněk těchto stádií nebo metoda EMSA pro zkoumání vazebných míst na DNA pro CSL. Tyto studie mohou objasnit průběh Notch signalizace u myxozoí a bazálních metazoí zacílením na klíčovou komponentu této dráhy – a tedy CSL protein.

6 Závěr

Byla provedena produkce rekombinantního CSL proteinu ze signální dráhy Notch u *S. molnari*, jeho následná purifikace, příprava protilátek proti purifikovanému rekombinantnímu CSL a ověření jejich specifity.

Na základě úspěšného užití buněk *E. coli* při předešlých produkcích CSL u *D. melanogaster* a člověka byla bakterie zvolena i v tomto případě. V rámci optimalizace produkce rekombinantního CSL bylo zvoleno několik typů kompetentních buněk *E. coli* (T7 Express (High Efficiency), BL21 (DE3), SHuffle[®] T7 Express lysY a ArcticExpress (DE3) transformovaných vektory pASK-IBA37plus a Champion[™]-pET SUMO nesoucích gen pro CSL *S. molnari*, které byly kultivovány za různých teplot po různou dobu. Z použitých buněk byly jako nejvíce produktivní vyhodnoceny BL21(DE3) buňky transformované pASK-IBA37plus kultivované při 30° C po dobu 6 h, u kterých převažoval CSL protein v nerozpustné fázi, tedy agregovaný CSL protein v inkluzních těliscích.

Tyto buňky byly použity k velkoobjemové large scale produkci probíhající za výše uvedených podmínek a nerozpustný rekombinantní CSL protein z nich byl purifikován denaturační afinitní chromatografií IMAC.

Rekombinantní CSL protein byl renaturován pomocí step down refoldingu a následně byl použit k imunizaci králíků a vytvoření specifických protilátek. Imunizace probíhala zhruba měsíc a nakonec byly plazmy z obou králíků použity k ověření specifity protilátek proti rekombinantnímu CSL. Výsledky Western blot i MALDI nakonec potvrdily specifitu získaných protilátek z obou králíků.

7 Seznam použitých zkratk

18S rDNA	DNA malé ribozomální podjednotky
28S rDNA	DNA velké ribozomální podjednotky
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
ANK	ankyrin
APS	amonium persulfát
ATB	antibiotikum
BC AV ČR	Biologické centrum Akademie věd České republiky
bHLH	basic helix-loop-helix
CIR	CBF1-interacting co-repressor
Cpn	chaperonin
CSL	CBF-1/RBPJ- κ u člověka a myši domácí (<i>Mus musculus</i>), Suppressor of Hairless u octomilky (<i>D. melanogaster</i>), Lag-1 u háďátka obecného (<i>C. elegans</i>)
CtBP	C-terminální vazebný protein
DAPT	N-[N-(3,5-difluorofenacetyl)-L-alanyl]-S-fenylglycin t-butyl ester
DE3	označení pro buněčné kmeny s T7 genovou expresí
ddH₂O	dvakrát destilovaná H ₂ O
DSL	Delta, Serrate, LAG-2
EGF	epidermal growth factor- epidermální růstový faktor
GST	glutation-S-transferáza
HAT	histon acetyltransferáza

Hey/Hes	Hey: Hairy Ears, Y-Linked; Hes: savčí homolog genů <i>Hairy</i> and genového komplexu Enhancer of split u <i>D. melanogaster</i>
His	histidin
IgG	imunoglobulin G
IMAC	immobilized metal affinity chromatography- afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem
IPTG	izopropyl β -D-1tiogalaktopyranozid
JAK/STAT	Janus kinase/signal transducers and activators of transcription- Janus kináza/převodníky signálu a aktivátory transkripce
JU	Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
LB	Lysogeny broth
LECA	last eukaryotic common ancestor– poslední eukaryotický společný předek
MALDI	matrix assisted laser desorption/ionization- maticí asistovaná laserová desorpce/ionizace
Mb	megabáze
NCoR	nuclear receptor corepressor- korepresor jaderného receptoru
OD₆₀₀	optická denzita (optical density) měřená při 600 nm
PBS	phosphate-buffered saline- fosfátový roztok
PEST	polypeptidová sekvence bohatá na prolin (P), kyselinu glutamovou (E), serin (S) a threonin (T)
pET	typ vektoru s T7 genovou expresí
pLysS, lysY	označení pro buněčné kmeny, které obsahují lysozym T7 pro kontrolu genové transkripce
PřF	Přírodovědecká fakulta

PVDF	polyvinylidenfluorid
RAM	RBP-Jk-asociovaná-molekula
rCSL	rekombinantní CSL
RHR	Rel-homologní oblast
rpm	revolutions per minute- otáčky za minutu
SDS	sodium dodecyl sulphate- dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis- elektroforéza na polyakrylamidovém gelu s dodecylsíránem sodným
SHARP/Mint	SHARP: SMRT/HDAC1 asociovaný represorový protein-/ Mint: Msx2-interagující nukleární targetový protein
SKIP	SKI-interagující protein
SMRT	silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors- umlčující mediátor pro retinoidní receptory nebo receptory hormonů štítné žlázy
S. O. C.	Super Optimal Broth
SUMO	small ubiquitin-like modifier- malý modifikátor podobný ubikvitinu
TBS	tris-buffered saline- tris-pufrovaný fyziologický roztok
TEEMED	tetrametyl etylendiamin
TGF β	transforming growth factor beta- transformující růstový faktor beta
TGS	tris-glycin-SDS
UV	ultraviolet- ultrafialový
Wnt	spojení dvou termínů- a to wg (<i>wingless</i> , gen u <i>D. melanogaster</i>) a int (savčí homolog wg)

8 Seznam literatury

Alama-Bernejo, G., Bartošová-Sojková, P., Atkinson, S. D., Holzer, A. S., Bartholomew, J. L. (2022). Proteases as Therapeutic Targets Against the Parasitic Cnidarian *Ceratonova shasta*: Characterization of Molecules Key to Parasite Virulence In Salmonid Hosts. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 804864.

Alama-Bernejo, G., Holzer, A. S. (2021). Advances and Discoveries in Myxozoan Genomics. *Trends in Parasitology*, 37 (6), 552-568.

Americus B., Hams N., Klompen A. M. L., Alama-Bermejo G., Lotan T., Bartholomew J. L., Atkinson S. D. 2021. The cnidarian parasite *Ceratonova shasta* utilizes inherited and recruited venom-like compounds during infection. *PeerJ*, 9, 12606.

Andersson, R., Sandberg, R., Lendahl, U. (2011). Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development*, 138 (17), 3593-3612.

Babonis, L. S., Martindale, M. Q., Ryan, J. F. (2016). Do novel genes drive morphological novelty? An investigation of the nematosomes in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *BMC Evolutionary Biology*, 16 (114).

Ben-David, J., Atkinson, S. D., Pollak, Y., Yossifon, G., Shavit, U., Bartholomew, J. L., Lotan, T. (2016). Myxozoan polar tubules display structural and functional variation. *Parasites & Vectors*, 9 (1), 549.

Borggreffe, T., Oswald, F. (2009). The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (10), 1631-1646.

Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 678–689.

Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., Mattern, M. R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expression and Purification*, 43 (1), 1-9.

Contreras-Cornejo, H., Saucedo-Correa, G. Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcon, J. J., Baizabal-Aguirre, V. M., Cajero-Juarez, M., Bravo-Patiño, A. (2016). The CSL proteins, versatile transcription factors and context dependent corepressors of the notch signaling pathway. *Cell Division*, 11 (12).

- D'Souza, B., Miyamoto, A., Weinmaster, G. (2008). The many facets of Notch ligands. *Oncogene*, 27 (38), 5148-5167.
- Duan, H., Dai, Q., Kavalier, J., Bejarano, F., Medranda, F., Nègre, N., Lai, E. C. (2011). Insensitive is a corepressor for Suppressor of Hairless and regulates Notch signalling during neural development. *The EMBO Journal*, 30, 3120-3133.
- Dyková, I., Lom, J. (1988). *Chloromyxum reticulatum* (Myxozoa, Myxosporea) in the liver of burbot (*Lota lota* L) and its migration to the final site of infection. *European Journal of Protistology*, 23, 258-261.
- Francis, D. M., Page, R. (2010). Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*, 61 (1), 5241–52429.
- Friedman, D., Kovall, R. A. (2009). Thermodynamic and structural insights into CSL-DNA complexes. *Protein Science*, 19, 34-46.
- Gahan, J. M., Schnitzler, Ch. E., DuBuc, T. Q., Doonan, L. B., Kanska, J., Gornik, S. G., Barreira, S., Thompson, K., Schiffer, P., Bauxevanis, A. D., Frank, U. (2017). Functional studies on the role of Notch signaling in *Hydractinia* Development. *Developmental Biology*, 428 (1), 224-231.
- Gazave, E., Lapébie, P., Richards, G. S., Brunet, F., Ereskovsky, A. V., Degnan, B. M., Borchiellini, C., Vervoort, M., Renard, E. (2009). Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evolutionary Biology*, 9 (249).
- Guo, Q., Atkinson, S. D., Xiano, B., Zhai, Y., Bartholomew, J. L., Gu, Z. (2022). A myxozoan genome reveals mosaic evolution in a parasitic cnidarian. *BMC Biology*, 20 (51), 2-19.
- Hartigan, A., Estensoro, I., Vancová, M. Bílý, T., Patra, S., Eszterbauer, E., Holzer, A. S. (2016) New cell motility model observed in parasitic cnidarian *Sphaerospora molnari* (Myxozoa: Myxosporea) blood stages in fish. *Science Reports*, 6, 39093.
- Holzer, A. S., Bartošová-Sojková, P., Born-Torrijos, A., Lövy, A., Hartigan, A., Fiala, I. (2018). The joint evolution of the Myxozoa and their alternate hosts: A cnidarian recipe for success and vast biodiversity. *Molecular Ecology* 27, 1651-1666.

Holzer, A. S., Pimentel-Santos, J. (2021). *Sphaerospora molnari*. In: Sitja-Bobadilla, A., Bron, J. E., Wiegertjes, G., Piazzon, M. C. (Eds.), *Fish Parasites: A Handbook of Protocols for Their Isolation, Culture and Transmission*. European Association of Fish Pathologists, 5M Publishing, Sheffield 174-188.

Chang, E. S., Neuhofer, M., Rubinstein, N. D., Diamant, A., Philippe, H., Huchon, D., Cartwright, P. (2015). Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (48), 14912-14917.

Iso, T., Sartorelli, V., Poizat, C., Iezzi, S., Wu, H-Y., Chung, G., Kedes, L., Hamamori, Y. (2001). HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 21 (17), 6080 – 6089.

Jin, J., Hjerrild, K. A., Silk, S. E., Brown, R. E., Labbé, G. M., Marshall, J. M., Wright, K. E., Bezemer, S., Clemmensen, S. B., Biswas S., Li, Y., El-Turabi, A., Douglas, A. D., Hermans, P., Detmers, F. J., de Jongh, W. A., Higgins, M. K., Ashfield, R., Draper, S. J. (2017). Accelerating the clinical development of protein-based vaccines for malaria by efficient purification using a four amino acid C-terminal ‘C-tag’. *International Journal for Parasitology*, 47 (7), 435-446.

Kapoor, A., Nation, D. A. (2021). Role of Notch signaling in neurovascular aging and Alzheimer’s disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 116, 90-97.

Käsbauer, T., Towb, P., Alexandrova, O., David, Ch. N., Dall’Armi, E., Staudigl, A., Stiening, B., Böttger, A. (2007). The Notch signaling pathway in the cnidarian *Hydra*. *Developmental Biology*, 303 (1), 376-390.

Kopan, R., Ilagan, M. X. (2009) The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2), 216-233.

Korytář, T., Chan, J. T. H., Vancová, M., Holzer, A. S. (2019). Blood feast: Exploring the erythrocyte-feeding behaviour of the myxozoan *Sphaerospora molnari*. *Parasite Immunology*, 42 (8).

Krupka, M., Mašek, J., Barkoczi, L., Turánek Knötigová, P., Kulich, P., Plocková, J., Lukáč R., Bartheldyova, E., Koudelka, E., Chaloupková, R., Šebela, M., Zyka, M., Drož L., Effenberg, R., Ledvina M., Miller, A. D., Turánek, J., Raška, M. (2016). The Position of His-

Tag in Recombinant OspC and Application of Various Adjuvants Affects the Intensity and Quality of Specific Antibody Response after Immunization of Experimental Mice. *PLOS Biology*, 11 (2), 0148497.

Kyger, R., Luzuriaga-Neira, A., Layman, T., Milkewitz Sandberg, T. O., Singh, D., Huchon D., Peri, S., Atkinson, S. D., Bartholomew, J. L., Yi, S. V., Alvarez-Ponce, D. (2020). Myxosporea (Myxozoa, Cnidaria) Lack DNA Cytosine Methylation. *Molecular Biology and Evolution*, 38 (2), 393–404.

Layden, M. J., Martindale, M. Q. (2014). Non-canonical Notch signaling represents an ancestral mechanism to regulate neural differentiation. *EvoDevo*, 5 (30).

Lom, J., Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, 53 (1), 1-36.

Lom, J., Dyková, I., Pavlásková, M., Grupcheva, G. (1983). *Sphaerospora molnari* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporea), an agent of gill, skin and blood sphaerosporosis of common carp in Europe. *Parasitology*, 86 (3), 529-535.

Lom, J., Pavlásková, M. & Dyková, I. (1985). Notes on kidney infecting species of the genus *Sphaerospora Thelohan* (Myxosporea), including a new species *Sphaerospora gobionis* sp. nov., and on myxosporean life cycle stages in stages in the blood of some freshwater fish. *Journal of Fish Diseases*. 8, 221–232.

Lövy, A., Kyslík, J., Picard-Sánchez, A., Pimentel Santos, J., Holzer, A. S., Bruce Krejčí, A. Beyond complexity to reduction: Notch signalling pathway in parasitic cnidarians - Myxozoa. In prep.

Maier, D., Kurth, P., Schulz, A., Russell, A., Yuan, Z., Gruber, K., Kovall, R. A., Preiss, A. (2011). Structural and functional analysis of the repressor complex in the Notch signaling pathway of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology of the Cell*, 22 (17), 3242–3252.

Malakhov, M. P., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S., Butt, T. R. (2004). SUMO fusion and SUMO-specific proteases for efficient expression and purification of proteins. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 5 (1-2), 75-86.

McElhinny, A. S., Li, J. L., Wu, L. (2008). Mastermind-like transcriptional co-activators: emerging roles in regulating cross talk among multiple signaling pathways. *Oncogene*, 27, 5138–5147.

Moroz, L. L., Kocot, K. M., Citarella, M. R., Dosung, S., Norekian, T. P., Povolotskaya, I. S., Grigorenko, A. P., Dailey, Ch., Berezikov, E., Buckley, K. M., Ptitsyn, A., Reshetov, D., Mukherjee, K., Moroz, T. P., Bobkova, Y., Yu, F., Kapitonov, V. V., Jurka, J., Bobkov, Y. V., Swore, J. J., Girardo, D. O., Fodor, A., Gusev, F., Sanford, R., Bruders, R., Kittler, E., Mills, C. E., Rast, J. P., Derelle, R., Solovyev, V. V., Kondrashov, F. A., Swalla, B. J., Swedler, J. V., Rogaev, E. I., Halanych, K. M., Kohn, A. B. (2014). The ctenophore genome and the evolutionary origins of neural systems. *Nature*, 510, 109-114.

Mumm, J. S., Kopan, R. (2000). Notch Signaling: From the Outside In. *Developmental Biology*, 228 (2), 151-165.

Münder, S., Tischer, S., Grundhuber, M, Büchels, N., Bruckmeier, N., Eckert, S., Seefeldt, C. A., Prexl, A., Käsbaier, T., Böttger, A. (2013). Notch-signalling is required for head regeneration and tentacle patterning in Hydra. *Developmental Biology*, 383 (1), 146-157.

Nagel, A. C., Krejčí, A., Tenin, G., Bravo-Patiño, A., Bray, S., Maier, D., Preiss, A. (2005). Hairless-Mediated Repression of Notch Target Genes Requires the Combined Activity of Groucho and CtBP Corepressors. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (23), 10433–10441.

Nagel, A. C., Wech, I., Schwinkendorf, D., Preiss, A. (2007). Involvement of co-repressors Groucho and CtBP in the regulation of *single-minded* in *Drosophila*, *Hereditas*, 144 (5), 195-205.

Nam, Y., Sliz, P., Pear, W. S., Aster, J. C., Blacklow, S. C. (2007). Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (7), 2103-2108.

Nam, Y., Sliz, P., Song, L., Aster, J. C., Blacklow, S. C. (2006). Structural Basis for Cooperativity in Recruitment of MAML Coactivators to Notch Transcription Complexes. *Cell*, 124 (5), 973–983.

Orts D. J. B., Moran Y., Cologna C. T., Peigneur S., Madio B., Praher D., Quinton L., De Pauw E., Bicudo J. E. P. W., Tytgat J., de Freitas J. C. 2013. BcsTx3 is a founder of a novel

sea anemone toxin family of potassium channel blocker. *The FEBS Journal* 280 (19), 4839–4852.

Oswald, F., Kostezka, U., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Dillinger, K., Zechner, U., Ludwig, L., Wilda, M., Hameister, H., Knöchel, W., Liptay, S., Schmid, R. M. (2002). SHARP is a novel component of the Notch/RBP-J κ signalling pathway. *The EMBO Journal*, 21 (20), 5417-5426.

Oswald, F., Winkler, M., Cao, Y., Astrahantseff, K., Bourteele, S., Knöchel, W., Borggreffe, T. (2005). RBP-J κ /SHARP Recruits CtIP/CtBP Corepressors To Silence Notch Target Genes. *Molecular and Cellular Biology*, 25 (23), 10379–10390.

Parks, A. L., Stout, J. R., Shepard, S. B., Klueg, K. M., Santos, A. D., Parody, T. R., Vaskova, M., Muskavitch, M. A. T. (2006). Structure–Function Analysis of Delta Trafficking, Receptor Binding and Signaling in *Drosophila*. *Genetics*, 174 (4), 1947–1961.

Patra, S., Bartošová-Sojková, P., Pecková, H., Fiala, I., Eszterbauer, E., Holzer, A. S. (2018). Biodiversity and host-parasite cophylogeny of *Sphaerospora (sensu stricto)* (Cnidaria: Myxozoa). *Parasites & Vectors*, 11 (347).

Richards, G. S., Rentzsch, F. (2015). Regulation of *Nematostella* neural progenitors by SoxB, Notch and bHLH genes. *Development*, 142 (19), 3332-3342.

Sever, R., Glass, Ch. K. (2013). Signaling by Nuclear Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5, a016709.

Sjölund, J., Manetopoulos, C., Stockhausen, M. T., Axelson, H. (2005). The Notch pathway in cancer: differentiation gone awry. *European journal of cancer*, 41 (17), 2620-2629.

Sudgahar, A., Kumar, G., El-Matbouli, M. (2020). The malacosporean myxozoan parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae*: A threat to wild salmonids. *Pathogens*, 9 (1), 16.

Tabaja, N., Yuan, Z., Oswald, F., Kovall, R. A. (2017). Structure-function analysis of RBP-J-interacting and tubulin-associated (RITA) reveals regions critical for repression of Notch target genes. *Journal of Biological Chemistry*, 292 (25), 10549 –10563.

- Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T., Kawaichi, M. (1994). Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Research*, 22 (6), 965–971.
- Wiśniewska, M. M., Kyslík, J., Alama-Bermejo, G., Lövy, A., Kolísko, M., Holzer, A. S., Kosakyan, A. Game of genes: Exploring the major parasitic strategies of myxozoans using *Sphaerospora molnari* as a model. In prep.
- Yahalomi, D., Atkinson, S. D., Neuhof, M., Chang, E. S., Philippe, H., Cartwright, P., Bartholomew, J. L., Huchon, D. (2020). A cnidarian parasite of salmon (Myxozoa: *Henneguya*) lacks a mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (10), 5358-5363.
- Yamaguchi, H., Miyazaki, M. (2014). Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*, 4 (1), 235–251.
- Yang, Y., Xiong, J., Zhou, Z., Huo, F., Miao, W., Ran, C., Liu, Y., Zhang, J., Feng, J., Wang, M. Wang, M. (2014). The genome of the myxosporean *Thelohanellus kitauei* shows adaptations to nutrient acquisition within its fish host. *Genome Biology and Evolution*, 6 (12), 3182-3198.
- Yin, J. C., Li, G. X., Ren, X. F., Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127, 335-347.
- Yuan, Z., Praxenthaler, H., Tabaja, N., Torella, Preiss, A., Maier, D., Kovall, R. A. (2016). Structure and Function of the Su(H)-Hairless Repressor Complex, the Major Antagonist of Notch Signaling in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Biology*, 14 (7), 1002509.