

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Příprava rekombinantního proteinu kalcium-dependentní
proteinkinázy 5 prvoka *Babesia divergens***

Bakalářská práce

Zuzana Císařová

Školitelka: RNDr. Marie Jalovecká, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Daniel Sojka, Ph.D.

České Budějovice 2024

Císařová, Z., 2024: Příprava rekombinantního proteinu kalcium-dependentní proteinkinázy 5 prvoka *Babesia divergens*. [Production of recombinant protein Calcium-Dependent Protein Kinase 5 of the parasite *Babesia divergens*. Bc. Thesis, in Czech] - 59 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Babesia divergens, an Apicomplexan parasite, infects both bovines and humans, resulting in babesiosis. The life cycle of *B. divergens* is complex, with various developmental events coordinated by a calcium signaling pathways that are regulated by Ca²⁺-dependent protein kinases (CDPKs). While recent research has highlighted the crucial role of CDPKs in apicomplexan infectivity, including motility, host cell invasion, and transmission into the vector, *Babesia* CDPKs remain poorly characterized. This thesis focuses on BdCDPK5, a protein thus far uncharacterized with an unknown role in the *Babesia* life cycle. The recombinant BdCDPK5 protein was expressed and purified using the *Escherichia coli* expression system, representing a valuable tool for further studies such as biochemical characterization and 3D structural analysis. Additionally, polyclonal antibodies were generated and validated for their ability to recognize the BdCDPK5 molecule, enabling the detection of this enzyme using various immunomicroscopy applications.

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 10. 4. 2024

.....
Zuzana Císařová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Marii Jalovecké, Ph.D a školiteli specialistovi RNDr. Danielovi Sojkovi za jejich vedení, cenné rady a pomoc při práci v laboratoři, za zasvěcení do tajů vědy a předání jejich zkušeností. Dále bych ráda poděkovala techničce Mgr. Ľubici Makušové za její bezvýhradnou pomoc s prací v laboratoři i mimo ni. Můj dík patří také ostatním členům laboratoře Molekulární biologie klíšť'at, PaU BC AVČR za ochotu mi poradit a pomoci a týmu z Laboratorních chovů Parazitologického ústavu, BC AV ČR, pod vedením Mgr. Zuzany Vavruškové, za jejich výrazné přispění do této práce. Na závěr bych chtěla poděkovat své rodině, svému příteli a přátelům za neochvějnou podporu.

Obsah

1 Úvod.....	1
1.1 Kmen Apicomplexa.....	2
1.2 Rod <i>Babesia</i>	4
1.2.1 <i>Babesia divergens</i>	5
1.2.2 Životní cyklus.....	5
1.2.3 Adaptace na parazitický způsob života	7
1.2.4 Babezióza	8
1.2.4.1 Lidská babezióza	9
1.2.4.2 Detekce a léčba.....	10
1.3 Kalcium-dependentní protein kinázy	11
1.3.1 Struktura a funkce	11
1.4.2 Kalcium dependentní protein kinázy u zástupců z kmene Apicomplexa.....	13
1.4.2.1 Rod <i>Babesia</i>	16
1.4.3 CDPK5	16
2 Cíle práce.....	18
3 Materiál a metody.....	19
3.1 Gradientová PCR.....	19
3.1.1 Příprava a PCR.....	19
3.1.2 Elektroforéza	20
3.2 PCR amplifikace	21
3.2.1 Přečištění DNA	21
3.3 Gibson assembly	21
3.4 Transformace do kompetentních buněk	22
3.5 PCR z kolonií	22
3.6 Miniprep a sekvenace.....	23
3.7 Transformace do expresních buněk.....	24
3.7.1 Inoculum.....	24
3.8 Pilotní exprese	24
3.8.1 Startovací kultura	24
3.8.2 Indukce	24
3.9 Disrupce buněk.....	25
3.10 Western blotting.....	25
3.10.1 Příprava vzorků a elektroforetická separace (SDS-PAGE).....	25

3.10.2 Semi-dry transfer.....	25
3.10.3 Blokování, vazba protilátek.....	26
3.11 Large scale exprese.....	26
3.13 Metalochelatační afinitní chromatografie (IMAC)	27
3.14 Refolding: Step-down dialýza	28
3.15 Imunizace	28
3.16 Western blotting- polyklonální protilátky	29
4 Výsledky.....	30
4.1 Amplifikace genu pro CDPK5	30
4.2 Expese rekombinantního proteinu BdCDPK5	32
4.3 Purifikace rekombinantního proteinu.....	33
4.4 Refolding: Step-down dialýza	37
4.5 Imunizace - získání protilátek	37
5 Diskuze.....	39
6 Závěr.....	43
7 Literatura	44
Příloha 1 –výsledky sekvenace klonu 9 a alignment vůči referenční sekvenci.....	55

1 Úvod

Babesie jsou hemoprotozoární parazité z kmene Apicomplexa (Jerzak et al., 2023), v rámci kterého společně s rody *Theileria* a *Cytauxzoon* tvoří řád *Piroplasmida* (Yabsley & Shock, 2013). Babesie jsou přenášeny klíšťaty z čeledi klíšťatovití (Ixodidae), ve kterých se pohlavně množí (Jalovecka et al., 2018). K přenosu dochází při sání klíštěte na obratlovčím hostiteli, kterým se může stát i člověk (Schnittger et al., 2012). V erythrocytech obratlovců dochází k nepohlavnímu množení babesií (Schnittger et al., 2012), které při výstupu z nich ničí, což může vést až k závažnému nebo dokonce fatálnímu onemocnění zvanému babezióza (Elsworth & Duraisingh, 2021).

Babezióza představuje vážný ekonomický a veterinární problém, především pro země zaměřené na vývoz hovězího dobytka (Kumar et al., 2021). U skotu je spojena s úmrtností, potraty a snížením mlékařské i masné produkce (Jalovecka et al., 2018). Přesto, že člověk není přirozeným hostitelem babesií, i u něj se může toto onemocnění rozvinout. K přenosu může dojít nejen pomocí klíštěcího vektoru, ale také krevní transfúzí, z matky na dítě placentou nebo transplantací orgánů (Jerzak et al., 2023). Onemocnění může probíhat od bezpříznakové infekce, přes mírně až středně závažné onemocnění, až po fulminantní průběh podobný malárii, který může končit až smrtí (Homer et al., 2000; Vannier et al., 2008). Nejvíce jsou ohroženi imunokompromitovaní pacienti, lidé s AIDS, imunosupresivní léčbou a jedinci po splenektomii (Vannier et al., 2008).

I přesto, že se jedná po trypanozomách o druhého nejvíce rozšířeného krevního parazita (Yabsley & Shock, 2013), který představuje velké ekonomické, veterinární a lékařské riziko, není jim věnována taková pozornost ve srovnání s rodem *Plasmodium* (Jalovecka et al., 2019). U mnoha případů babeziózy není znám původce a u mnoha původců babeziózy není znám přenašeč (Yabsley & Shock, 2013). Rozmanitost rodu *Babesia* a všudypřítomnost klíšťat ukazují na jejich vysoký potenciál, jakožto zoonotického patogenu v celosvětovém měřítku (Hunfeld et al., 2008). Výskyt a různorodost infekcí přenášených klíšťaty se v posledních letech zvýšily v důsledku lepších diagnostických nástrojů a stoupajícího počtu imunosuprimovaných a splenektomizovaných jedinců. Změny v životním prostředí, např. suburbanizace nebo klimatické změny, hrají důležitou roli ve zvýšení hustoty klíšťat a mají vliv na jejich přežití, aktivitu a vývoj (Fanelli, 2021; Yabsley & Shock, 2013).

Pro vývoj babesií je zásadní vnitrobuněčná signalizace, která je primárně závislá na vápníku. Jednou skupinou molekul, které reagují na vápenaté ionty, jsou kalcium-dependentní protein kinázy (CDPKs) (Elsworth & Duraisingh, 2021). Specifické role jednotlivých CDPKs

se liší, ale obecně zajišťují klíčové biologické funkce nezbytné pro přežití parazitů. CDPKs hrají roli při přenosu vápníkem zprostředkovaných signálů u všech zkoumaných příslušníků kmene Apicomplexa a jsou klíčové pro vývojový cyklus parazita. (Sharma et al., 2021; Keyloun et al., 2014). Jejich zásadní role v biologii Apicomplexa poukazuje na důležitost popsání jednotlivých kináz také u babesii a naznačuje potenciál jednotlivých kináz jako terapeutického cíle pro specifické inhibitory. O to zajímavější je, že jsou tyto molekuly nepřítomné u savčích hostitelů (Jalovecka et al., 2019; Keyloun et al., 2014; Miranda-Saavedra et al., 2012).

1.1 Kmen Apicomplexa

Kmen Apicomplexa má více než 5000 zástupců, většina z nich vede obligátně vnitrobuněčný parazitický způsob života (Seeber & Soldati-Favre, 2010; Sibley, 2004). Apikální komplex, který se nachází na anteriorním apexu buňky, je klíčovým orgánem zodpovědným za invazi do hostitelských buněk a dává jméno celému kmeni. Apikoplast, další důležitá struktura, pravděpodobně vznikl sekundární endosymbiózou s řasou (Seeber & Soldati-Favre, 2010). Fylogeneticky jsou řazeny do velké skupiny protist Alveolata spolu s nálevníky (Ciliophora) a obrněnkami (Dinoflagellata), se kterými jsou blízce příbuzní (Arisue & Hashimoto, 2015).

Kmen Apicomplexa zahrnuje i mnoho lékařsky a hospodářsky významných parazitů. Mezi nejznámější zástupce patří *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* nebo *Cryptosporidium parvum*. *P. falciparum* je původce nejmrtelnější formy malárie, která má dle WHO každoročně na svědomí statisíce úmrtí a to především na africkém kontinentu. Malárie je přenášena komárem rodu *Anopheles* a je rizikem především pro děti do pěti let, které nemoci podléhají v 80% případů (Arisue & Hashimoto, 2015; Fleige et al., 2010). *P. falciparum* má složitý životní cyklus, který zahrnuje preerytrocytární a erytrocytární stádia u člověka a sexuální rozmnožování v komárovi. Preerytrocytární stádium se odehrává v jaterních buňkách, ve kterých se parazit množí pomocí schizogonie. Ty opouští jejich zničením, díky čemuž se dostává do krevního řečiště, kde napadá červené krvinky. V nich se parazit pomocí schizogonie dále dělí a po 48 hodinách od jejich napadení dochází k jejich destrukci a k uvolnění nově vzniklých parazitů, kteří jsou schopni znovu infikovat další zdravé červené krvinky. Erytrocytární fáze je zodpovědná za klinické příznaky, jako je anémie nebo střídající se horečka a zimnice. Dalšími příznaky jsou bolesti svalů, nevolnost a zvracení (Bonam et al., 2021; Schmidt et al., 2015). *T. gondii*, je nejvíce rozšířeným parazitem z celého kmene, který infikuje více než 200 druhů savců a ptáků a je původcem zoonóz (Anantharaman et al., 2007).

Zvířata z čeledi kočkovitých (Felidae) jsou jedinými definitivními hostiteli, kočka domácí (*Felis catus*) má pak stěžejní význam pro přenos toxoplazmózy. Kočky nakažené *T. gondii* mohou vylučovat s trusem až miliony oocyst, které přetrvávají jako zdroj infekce i po několik měsíců, a jejichž konzumací se mohou nakazit další zvířata. Syrové nebo nedostatečně tepelně upravené maso nakažených zvířat obsahuje tkáňové cysty, které jsou významným zdrojem infekce pro člověka (Garcia, 2009). Většina infekcí u člověka probíhá bezpříznakově, ohroženi jsou především imunokompromitovaní jedinci a těhotné ženy, jelikož průběh infekce během těhotenství může způsobit závažné vrozené vady plodu (Anantharaman et al., 2007). *C. parvum* infikuje gastrointestinální trakt lidí a zvířat a představuje třetí hlavní příčinu průjmových onemocnění na světě (Spano & Crisanti, 2000). Rizikem je především kvůli přetrvávajícím průjmům a infekcím žlučových cest, které způsobuje u pacientů s oslabenou imunitou, zejména u pacientů se syndromem získané imunodeficiency (AIDS), a kvůli hrozbě pro veřejné zdraví v podobě velkých komunitních epidemií přenášených vodou (Laurent et al., 1999). Riziko přenosu kryptosporidií vodou je závažným celosvětovým problémem v oblasti bezpečnosti pitné vody. Oocysty těchto organismů jsou rozšířené ve zdrojích pitné vody, navíc jsou mimořádně odolné a schopné přežít v tomto prostředí po delší dobu (Carey et al., 2004). Oocysty se šíří fekálně-orální cestou. *C. parvum* navíc prokazuje obecnou nespecifičnost pro hostitele a zoonotický přenos (Laurent et al., 1999). Dalšími zástupci, kteří mají především dopad na volně žijící a hospodářská zvířata jsou například parazité z rodu *Eimeria*, kteří způsobují kokcidiózu, střevní onemocnění především domácí drůbeže, nebo *Neospora caninum*, která infikuje především psy a dobytek, u kterého často způsobuje potraty. Dále pak klíšťaty přenášená *Theileria parva* způsobující theileriózu, také známou jako East Coast fever, nebo zástupci rodu *Babesia* způsobující babeziózu (Arisue & Hashimoto, 2015; Fleige et al., 2010).

Adaptace těchto parazitů na obligátní vnitrobuněčný způsob života zahrnuje především využití apikálního komplexu pro vstup do hostitelské buňky. Apikální komplex se nachází na apikálním konci zoitů (souhrnný název pro invazivní stádia) a skládá se z polárního prstence, konoidia, souboru specializovaných sekrečních organel, označovaných jako mikronemy, rhoptrie a denzní granula, které se podílejí na přichycení a invazi do hostitelské buňky, a na tvorbě intracelulárního odděleného prostředí zvaného parazitoforní vakuola (PV), která odděluje parazita od cytoplazmy hostitelské buňky (Cova et al., 2022; Anantharaman et al., 2007; Dubremetz et al., 1998). Mikronemy jsou klíčové pro pohyb, rozpoznání a přichycení se k hostitelské buňce, zejména díky adhezivům, které sekretují, a také pro samotnou invazi (Sibley, 2004). Rhoptrie jsou určeny pro invazi a adaptaci uvnitř hostitelské buňky, kde hrají

hlavní roli ve formaci a remodelingu PV (Cova et al., 2022; Chaabene et al., 2021). Parazité mají také denzní granula náhodně rozptýlená v cytosolu, a jejich obsah se podílí na remodelaci membrány parazitoformní vakuoly na metabolicky aktivní prostor včetně příjmu živin a komunikaci simunitním systémem hostitelské buňky (Chaabene et al., 2021).

Apikoplast je unikátní organela vyskytující se u všech zástupců s výjimkou rodu *Cryptosporidium* a některých zástupců rodu *Gregarina* (Fleige et al., 2010), která byla jednoznačně přiřazena k reliktvům plastidu (plastid apicomplexa). Apikoplast vznikl sekundární endosymbiózou prostřednictvím pohlcení červené řasy nesoucí plastid (Arisue & Hashimoto, 2015; Seeber et al., 2010). Je složený ze dvou membrán a obklopený dalšími dvěma membránami pocházejícími z plazmatické membrány řasy (Seeber et al., 2010). Apikoplast ztratil funkci fotosyntézy, ale jinak je stále metabolicky aktivní. Alespoň částečně v něm probíhá řada esenciálních pochodů, jako je translace proteinů, syntéza mastných kyselin, izoprenoidů, aromatických aminokyselin a hemu (Foth & McFadden, 2003). Narušení funkce apikoplastu má za následek smrt parazita, což z této organely činí nadějný cíl pro vývoj léčiv (Rai et al., 2017).

1.2 Rod *Babesia*

Babesia patří do kmene Apicomplexa, třídy Aconoidasida a řádu Piroplasmida, který získal svůj název díky intraerytrocytárním stádiím, které tvarem připomínají hrušku (pear-shaped) (Filipe et al., 2023; Florin-Christensen & Schnittger, 2009). Historicky byly *Babesia* rozděleny do dvou skupin na základě velikosti jejich trofozoitů. První skupinu tvořily babesie s menšími trofozoity (0,5 μ m až 2,5 μ m), nazývané "small *Babesia*", do kterých spadaly například *Babesia gibsoni*, *Babesia microti* nebo *Babesia rodhaini*. Druhou skupinu tvořily babesie s většími trofozoity (2,5 μ m až 5,0 μ m), označované jako "large *Babesia*", do kterých patřily například *B. canis*, *B. bovis*, *B. caballi* nebo *B. vogeli* (Beugnet & Morea, 2015; Homer et al., 2000).

Toto historické dělení do dvou skupin dle morfologie není v souladu s recentním fylogenetickým rozdělením na základě malé ribozomální podjednotky (18S RNA), kde byly babesie v rámci skupiny Piroplasmida rozděleny do 4 cladů: *Babesia* sensu stricto (*Babesia* s.s.), Percei, Western a *B. microti*-like groups. Poslední tři jmenované clady byly hromadně označeny jako *Babesia* sensu lato (*Babesia* s.l.) (Jalovecka et al., 2019). *Babesia* s.s. jsou charakterizované schopností transstadiálního i transovariálního přenosu (Schnittger et al., 2022). *Babesia* s.l. jsou schopny pouze transstadiálního přenosu. Tato skupina původně

zaštitovala všechny Piropasmida, které nebylo možné jednoznačně zařadit ke skupině *Babesia* s.s., ani ke skupině *Theileria*. Transstadiální přenos a přítomnost schizontů v leukocytech pak definuje rod *Theileria* (Schnittger et al., 2012).

Do *Babesia* s.s. řadíme *B. bovis* a *B. bigemina* infikující skot, *B. ovis* infikující ovce, *B. orientalis* infikující vodní buvol, *B. crassa* a *B. motasi* napadající ovce a kozy, *B. canis* parazitující na psech, *B. cabali* napadající koně, *B. venatorum* napadající jeleny nebo *B. divergens*, která je významným patogenem pro skot i člověka (Schnittger et al., 2022; Jalovecká et al., 2019; Schnittger et al., 2012; Hunfeld et al., 2008). Do *Babesia* s.l. spadají *B. microti* a *B. rodhaini* infikující hlodavce (Goethert & Telford, 2003), *B. vulpes* infikující lišky (Goethert, 2021), *B. felis* kočky (Uilenberg, 2006), *B. lengau* gepardy (Penzhorn & Oosthuizen, 2020) nebo *B. conradae* napadající psy (Kjemtrup & Conrad, 2006).

1.2.1 *Babesia divergens*

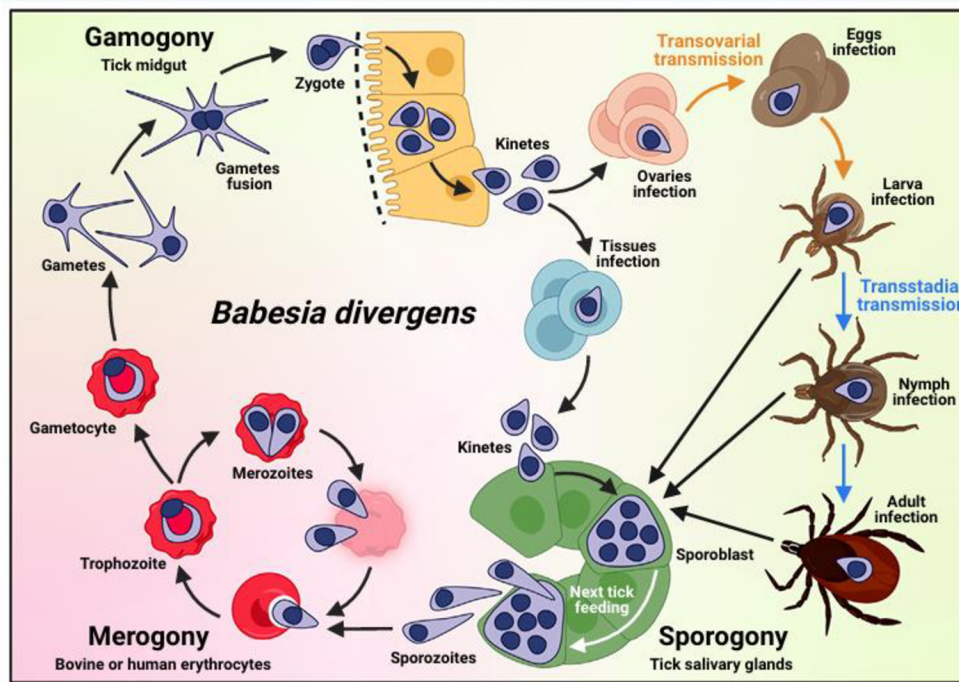
B. divergens je přenášena klíštětem *Ixodes ricinus*, z čeledi klíšťatovitých (Ixodidae), kterému se daří ve vlhčím prostředí a snáší i velké rozpětí teplot (Schnittger et al., 2022). Jedná se o hlavního původce babeziózy skotu a současně hlavní zdroj lidské babeziózy v Evropě (Zintl, et al., 2003). Lidské infekce *B. divergens* se projevují vysokou parazitémií a patogenitou a jsou spojeny především s masivní destrukcí erytrocytů vedoucí k těžké anémii, ke které nejčastěji dochází u splenktomizovaných pacientů (Schnittger et al., 2022; Kjemtrup & Conrad, 2000). Ačkoli jsou infekce u člověka vzácné, až 42% nakažených pacientů umírá z důvodu septické horečky, hemoglobinurie nebo žloutenky v důsledku hemolýzy či na renální, srdeční, respirační nebo jaterní selhání (Hildebrandt et al., 2013; Ord & Lobo, 2015). *B. divergens* má vysoký proliferační potenciál, takže i malý počet přeživších parazitů může znovu rozpoutat akutní onemocnění, a to především u pacientů s oslabenou imunitou (Lobo et al., 2019).

1.2.2 Životní cyklus

Životní cyklus babesii se skládá z merogonie, nepohlavního rozmnožování v obratlovčím hostiteli, gamogonie, pohlavního rozmnožování ve střevě klíštěte, a sporogonie, nepohlavního rozmnožování ve slinných žlázách klíštěte (Fanelli, 2021; Jalovecka et al., 2018). Obratlovčí hostitel je infikován sporozoity ze slinných žláz klíštěte během sání (Fanelli, 2021). Sporozoiti okamžitě napadají červené krvinky, kde se vyvíjí v trofozoity. Trofozoiti se pomocí merogonie, binárního dělení, rozdělí v merozoity (Jalovecka et al., 2019). Po

opuštění erythrocytu, který vede k jeho zničení, každý merozoit napadá nový erythrocyt. I přesto, že vstup do nové buňky trvá pouze několik sekund, merozoiti babesíí jsou schopni v extracelulárním prostředí přežít i několik minut, na rozdíl od merozoitů malárie (Lobo et al., 2019). Celý proces je asynchronní, proto mohou být v krvi pozorována všechna vývojová stádia parazita najednou (Chauvin et al., 2009). Rychlé množení vede v hostiteli k hemolýze, což jej může negativně ovlivňovat. Parazit proto zpětně kontroluje počet napadených erythrocytů, aby hostitele ochránil před masivní hemolýzou. Při vysoké parazitémii se prodlužuje cyklus v červených krvinkách, zatímco při nižší parazitémii je preferováno opuštění červenýchrvinek a invaze nových buněk. Tato strategie je u *Babesia* jedinečná. Například příbuzní z rodu *Plasmodium* mají nitrobuněčný cyklus přesně načasovaný a synchronní (Lobo et al., 2019).

Některé trofozoity se nemnoží, namísto toho zvětšují svoji velikost a stávají se gametocyty (Jalovecka et al., 2018). Během sání klíštěte na nakaženém obratlovcu se s krví dostávají mimo jiné i právě gametocyty střeva klíštěte, kde dochází k jejich vývoji v gamety pomocí schizogonie. Tyto gamety, jinak nazývané také Strahlenkörper nebo spiky-rayed bodies, v procesu gamogonie splývají a vytvoří tak pohyblivé zygoty, též zvané ookinety, které následně pronikají skrz peritoneální matrix a napadají buňky klíštěcího střeva, ve kterých dochází k meiotickému dělení (Jalovecka et al., 2019). Vzniklé pohyblivé haploidní kinety vstupují do hemolymfy a napadají další orgány klíštěte, mezi které patří i slinné žlázy. U skupiny *Babesia* s.s. mohou být napadeny i vaječníky, což vede k transovariálnímu přenosu ze samičky do vajíček a následných larev (Hunfeld et al., 2008, Kjemtrup & Conrad, 2000). Ve slinných žlázách dochází ke sporogonii, která dává vzniku sporontu, který se později vyvine v mnohojaderný sporoblast (Jalovecka et al., 2018). Ten zůstává během ekdyze klíštěte v dormanci, což zajišťuje transstadiální přenos parazita do dalšího instaru klíštěte (Fanelli, 2021). Dozrávání sporoblastů začíná po přisátí dalšího stádia klíštěte na hostitele a vede k dozrání a uvolnění sporozoitů do slin klíštěte (Jalovecka et al., 2018, Bock et al., 2004; Homer et al., 2000).



Obrázek 1: Schéma životního cyklu babesií. Zobrazení všech životních stádií u *Babesia*. Převzato z Filipe et al., 2023.

1.2.3 Adaptace na parazitický způsob života

Transovariální přenos je považován za jednu z neúspěšnějších evolučních strategií mezi zástupci kmene Apicomplexa a je jednou z nejcharakterističtějších vlastností rodu *Babesia* (konkrétně *Babesia s.s.*), který je odlišuje například od blízkce příbuzného rodu *Theileria* (Jalovecka et al., 2019, Orkun, 2019). Poté, co se kinety dostanou do hemolymfy, putují do vaječnicků a setrvávají v cytoplazmě klíštěcích ovariálních buněk, čímž je zajištěn přenos parazita na další generaci. Nakažená samička je schopna vyprodukovat až tisíce infikovaných potomků, z nichž každý slouží jako potenciální zdroj infekce po několik generací, aniž by musel znovu sát na infikovaných zvířatech (Jalovecka et al., 2019; Orkun, 2019; Chauvin et al., 2009). Vzhledem k tomu, že každé stadium klíštěte saje krev pouze jednou, je pro udržení se v klíštěti nezbytný transstadiální přenos z larvy na nymfu, potažmo z nymfy na dospělé (Djokic et al., 2021). Ten umožňují dormantní sporoblasty, který leží volně v cytoplazmě buněk slinných žláz, kde jsou chráněny před změnami provázející klíštěcí ekdyzi (Jalovecka et al., 2019). Transstadiální přenos je pozorován u většiny klíšťaty přenášených patogenů jako jsou bakterie *Borrelia burgdorferi* nebo *Anaplasma phagocytophilum* (Chauvin et al., 2009).

Babesie si také vyvinuly strategii, jak obejít imunitní systém obratlovčího hostitele pomocí cytoadherace (Chauvin et al., 2009). Byla prokázána schopnost některých druhů babesii adherovat infikované červené krvinky k buňkám cévního endotelu. Takto adherované buňky neprochází přes kontrolu ve slezině, a proto se předpokládá, že tento jev chrání napadené buňky před jejich zničením ve slezině (Chauvin et al., 2009; Cooke et al., 2005). Cytoadherence je zprostředkována Variant Erythrocyte Surface Antigen 1 (VESA1), kódovaný multigenetickou rodinou *ves* (Hakimi et al., 2020). Jedná se o heterodimerický protein, sloužící jako vysoce variabilní cytoadhezivní ligand, který je exportován na povrch infikovaného erytrocytu, kde je v dlouhodobém kontaktu s imunitním systémem hostitele. Zajišťuje tak vedle cytoadherence i antigenní variabilitu. Výměna variant antigenů, nacházejících se na povrchu erytrocytů během infekce, má za důsledek vlny získávání a ztráty imunoreaktivity vůči aktuálně exprimovanému antigenu. Hostitel tak nemůže získat účinnou imunitu, a proto trpí chronickou infekcí, čímž parazit zvyšuje svou šanci na další přenos (Jackson et al., 2014; Chauvin et al., 2009).

1.2.4 Babezióza

Babezióza je onemocnění, které vzniká v důsledku napadení erytrocytů obratlovců některým zástupcem rodu *Babesia*. Jde o jedno z nejrozšířenějších, klíštětem přenášených onemocnění domestikovaných i divokých zvířat, které může být přeneseno i na člověka (Beugnet & Morea, 2015). K onemocnění dochází, pokud hemolýza převyšuje erytropoézu, což má za následek anémii a hemoglobinurii. Kromě toho mohou anoxie a toxiny uvolněné v důsledku destrukce erytrocytů nepříznivě ovlivnit renální, respirační či srdeční soustavu (Gray et al., 2019; Ord & Lobo, 2015). Babezióza je celosvětově stále větším problémem v důsledku rozšiřování biotopů klíšťat a zvýšené mobility zvířat, což podporuje šíření parazitů do nových zeměpisných oblastí (Beugnet & Morea, 2015). Ekonomický dopad babeziózy je značný, zejména u skotu (včetně buvolů), ale postiženi jsou i koně, malí přežvýkavci a společenská zvířata. V poslední době také roste zájem o rod *Babesia* jako o původce zoonóz.

Původcem bovinní babeziózy, také nazývané redwater fever, jsou nejčastěji *B. bovis* a *B. bigemina*, typické pro subtropický a tropický podnebný pás, a *B. divergens* a *Babesia major* rozšířené především v Evropě (Zintl et al., 2014; Uilenberg, 2006;). *B. bovis* je považována za nejvirulentnějšího původce babeziózy skotu způsobující infekce se závažnějším průběhem a zvýšenou úmrtností. Navíc společně s *B. canis* mohou díky cytoadherenci v mozkových kapilárách způsobovat cerebrální babeziózu, která téměř vždy končí smrtí (Gray et al., 2019; Bock et al., 2004).

Babezióza skotu má obrovský ekonomický dopad na hovězí a mlékárenský průmysl po celém světě. Náklady s ní spjaté vznikají v důsledku úmrtností, špatného prospívání skotu, potratů, ztrátou produkce mléka i masa a tažné síly, z důvodu nutných veterinárních opatření a celkového negativního dopadu na mezinárodní obchod se skotem (Suarez et al., 2019; Bock et al., 2004). Infikovaná zvířata trpí vysokými horečkami, apatií, nechutenstvím a dehydratací spojenou s průjmy. Horečka během infekce může způsobit potrat březích krav a u býků sníženou plodnost na dalších šest až osm týdnů. Při absenci léčby infekce přechází v těžkou hemolytickou anémii a hemoglobinurii. Zejména u déle trvajících případů se objevuje žloutenka, ochabování svalstva, třes a polehávání, po kterém následuje kóma. V případech, které nejsou smrtelné, může trvat několik týdnů, než dojde k úplnému zotavení, které je ale obvykle úplné (Zintl et al., 2014; Bock et al., 2004).

1.2.4.1 Lidská babezióza

Člověk je nejčastěji nakažen během sání klíštěte patřícího do čeledi Ixodidae. Mezi vzácné způsoby přenosu patří transfuzní, transplacentární a perinatální přenos. V posledních letech, zřejmě díky většímu lékařskému povědomí a lepším diagnostickým metodám, počet odhalených případů celosvětově stoupl (Ord & Lobo, 2015; Hildebrandt et al., 2013). *B. divergens* stojí za většinou případů v Evropě, *B. microti* pak v Severní Americe, kde se šíří převážně z hlodavců. Původcem lidských infekcí může být i *B. venatorum*, vyskytující se v Asii a Evropě, kde primárně infikuje jelenovité (Hussain et al., 2022; Kumar et al., 2021; Beugnet & Morea, 2015). Dalšími potvrzenými druhy babesii identifikovaných v člověku jsou *Babesia duncani*, *B. odocoilei* a *B. motasi* (Kumar et al., 2021; Ord & Lobo, 2015; Kjemtrup & Conrad, 2000).

B. microti je celosvětově nejčastějším zdrojem lidské babeziózy (Vannier et al., 2008). Jen ve Spojených státech je každoročně hlášeno více než 2000 případů a je zde také jedním z hlavních původců infekcí přenášených transfuzí (Kumar et al., 2021). Infekce *B. divergens* jsou vzácnější než infekce *B. microti*, ale případy se projevují mnohem závažnější patologií. Především u splenektomovaných pacientů je považována za lékařsky naléhavou situaci. V některých případech dosahovala parazitémie až 80 % a více než třetina případů skončila smrtí (Krause, 2019; Ord & Lobo, 2015; Kjemtrup & Conrad, 2000).

Většina případů klinické babeziózy má mírný až středně těžký průběh projevující se únavou, malátností, zvýšenou teplotou či horečkou, zimnicí, bolestí hlavy, svalů či kloubů. Průběh nemoci může být i zcela asymptomatický. K těmto případům ale z logických důvodů chybí data (Kumar et al., 2021). Závažné onemocnění se obvykle vyskytuje u imunokompromitovaných

pacientů, mezi které patří jedinci s HIV, na imunosupresivní léčbě, po splenektomii a onkologičtí pacienti (Kumar et al., 2021). Do tří týdnů po infekci se u pacientů objevuje těžká hemolýza spojená s hemoglobinurií a žloutenkou, přetrvávající vysoké horečky, zvracení a průjem. Bez léčby nebo v případech, kdy je léčba zahájena pozdě v průběhu onemocnění, může do týdne dojít k celkovému selhání orgánů a smrti (Krause, 2019; Ord & Lobo, 2015; Kjemtrup & Conrad, 2000).

1.2.4.2 Detekce a léčba

Správná diagnostika babeziózy je obtížná už kvůli nízké povědomosti lékařů o této nemoci, která se dá snadno zaměnit s chřipkou či malárií (Kjemtrup & Conrad, 2000). Klasickou metodou detekce babesii je mikroskopie krevního nátěru za použití Wright–Giemsa barvení a vizualizace merozoitů či trofozoitů. Na začátku onemocnění může být ale parazitémie nižší než 0,1%, takže diagnostika může být velice obtížná (Drews et al., 2023; Ord & Lobo, 2015; Vannier et al., 2008).

Další možností je molekulární detekce babesii v krvi za použití PCR, která je nákladnější než krevní nátěry, ale velmi citlivá. Byly navrženy specifické primery zaměřené na gen 18S malé podjednotky rRNA pro detekci klinické babeziózy (Drews et al., 2023; Ord & Lobo, 2015; Vannier et al., 2008). Další detekční metodou je testování přítomnosti protilátek proti babesii pomocí IFA (Immunofluorescence assay). I přesto, že jde o velmi specifickou a spolehlivou metodu, je časově náročná. Navíc výsledky detekce akutní infekce způsobené *B. divergens* mohou být zavádějící, jelikož protilátky jsou obvykle detekovatelné až 1 týden po nástupu horečky a hemoglobinurie. Má proto spíš epidemiologické uplatnění (Hildebrandt et al., 2013; Kjemtrup & Conrad, 2000).

V evropských laboratořích zatím nejsou k dispozici standardizované metody molekulární detekce pro rutinní použití. Využívají se alternativy, jako je ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), kterou lze automatizovat a efektivně tak zpracovat větší množství vzorků. Při použití rekombinantních antigenů vypadá tento přístup jako slibná cesta pro rychlé, citlivé a specifické testy (Hildebrandt et al., 2013; Kjemtrup & Conrad, 2000).

Pro léčbu lidské babeziózy se nejčastěji užívají klindamycin v kombinaci s chininem a atovaquone v kombinaci s azitromycinem. Pro léčbu závažnějších stavů se nyní preferuje užívání atovaquonu s azitromycinem, namísto dříve používaného klindamycinu a chininu, které mají více nežádoucích účinků. Standardní 7-10 denní léčba ale obvykle nestačí. K odstranění infekce je zapotřebí dlouhodobějšího podávání léků, v některých případech i intravenózně, což sebou ale nese riziko lékové rezistence (Renard & Mamoun, 2021).

U pacientů s vysokou parazitémií a asplenických pacientů se často přistupuje k výměnné transfúzi, ať už erytrocytů nebo plné krve. Cílem transfúze je nahradit napadené erytrocyty zdravými, čímž dochází ke snížení parazitémie a odstranění toxických metabolitů, které vznikají při nadměrné destrukci erytrocytů (Tanyel et al., 2015).

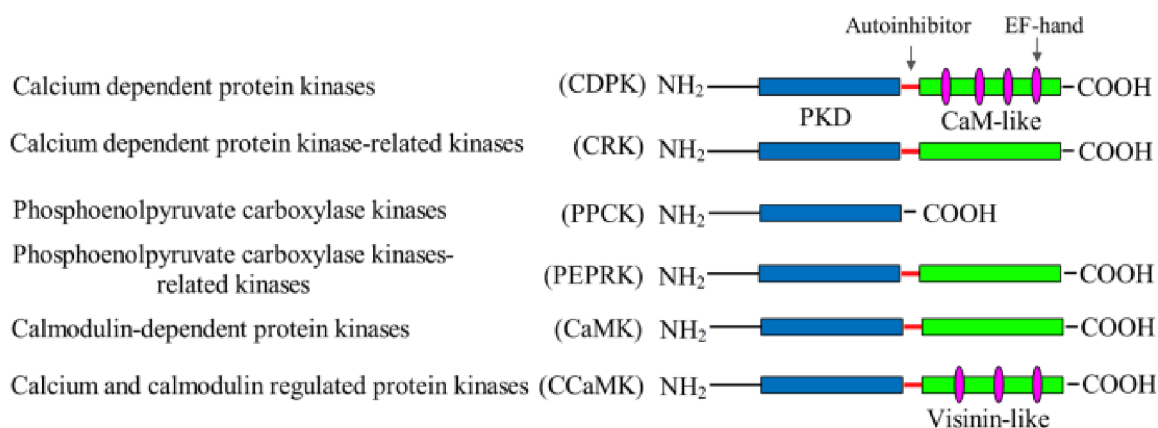
U zvířat se nejčastěji používají imidocarb, diminazene, diaceturate a amicarbalide. Imidocarb se jeví jako nejlepší dostupný lék pro léčbu zvířat. Na rozdíl od klinických léčiv, která jsou antibiotiky a antimalariky, se jedná o specifické léčivo pro babeziózu, které je schopno rychle odstranit veškeré vyskytující se parazity (Hildebrandt et al., 2013; Vial & Gorenflot, 2006). Na druhou stranu jsou ale tyto zvířata více náchylná k reinfekci, proto se někdy používají snížené dávky léků, tak, aby mohlo dojít k dostatečnému rozvinutí imunitní odpovědi (Vial & Gorenflot, 2006).

1. 3 Kalcium-dependentní protein kinázy

1.3.1 Struktura a funkce

Vápenaté ionty Ca^{2+} hrají klíčovou roli v buněčné signalizaci jako druhý posel (second messenger). Jejich koncentrace v cytosolu je mnohonásobně nižší než ta, nacházející se v extracelulárním prostředí, a jejich hladina je přísně regulovaná. Rychlý a krátkodobý přísun vápníku do buňky je proto spjat s řadou klíčových fyziologických funkcí (Billker 2009; Wernimont et al., 2011). Na tyto rychlé změny vnitrobuněčné koncentrace vápníku reagují různé signální proteiny přímo vázající vápník, které takto přenášejí signál k dalším enzymům (Wernimont et al., 2011). Při aktivaci těchto enzymů dochází ke změně konformace díky přímé vazbě Ca^{2+} iontů, které vyústí v odstranění auto-inhibičního prvku z kinázové domény (Igram, 2015). Tímto způsobem dochází k aktivaci i CDPKs.

Kalcium-dependentní protein kinázy (CDPKs) patří do superrodiny protein kináz, společně s CDPK-příbuznými kinázami (CRKs), fosfoenolpyruvát karboxyláza kinázami (PPCKs), PPCK-příbuznými kinázami (PEPRKs), kalmodulin regulovanými kinázami (CaMKs), a kalcium/kalmodulin-dependentními protein kinázami (CCaMKs) (Harmon et al., 2001). Navzájem se odlišují regulační doménou, která u CDPKs mimo jiné slouží k vazbě vápenatých iontů. Fylogeneticky jsou si nejpříbuznější CDPKs a CRKs, které zřejmě sdílí společného předka a obdobnou regulační doménu. Ta však u CRKs není schopna vazby kalcia (Harmon et al., 2001; Zhang et al., 2019). CDPKs hrají klíčovou roli v signální dráze vápníku u Archaeplastida a Alveolata, do kterých patří i parazité z kmene Apicomplexa (Harmon et al., 2001).



Obrázek 2: CDPKs a jim příbuzné protein kinázy. Schéma zobrazuje rozdílnost jednotlivých protein kináz, vyskytujících se u rostlin, konkrétně u *Medicago lupulina*, v jejich regulačních doménách. Některé z nich, CDPK, CRK a CaMK, se vyskytují i u Apicomplexa. Převzato ze Zhang et al. 2019.

CDPKs u rostlin, u kterých jsou velmi typické, zprostředkovávají mnoho rozličných procesů od zakořenění, přes růst, kvetení a plazení až po jejich senescenci. Též hrají roli v reakci na biotický a abiotický stres nebo při syntéze fytohormonů a procesy s nimi spojenými (Xu & Huang, 2017; Liese et al., 2013). U parazitů z kmene Apicomplexa vápník také kontroluje velké množství esenciálních pochodů, zahrnující sekreci proteinů, aktivaci motility, invazi do hostitelské buňky nebo výstup z ní (Igram et al., 2015; Wernimont et al., 2010). Na základě této skutečnosti a faktu, že hostitelské druhy neprodukují vůbec žádné CDPKs, jsou mnohé CDPKs u Apicomplexa označovány za klíčový cíl pro výrobu léčiv (Wernimont et al., 2011).

CDPKs se na svém N-konci skládají z variabilní serin/threonin protein kinazové domény (PKD), zodpovědné za fosforylaci cílového proteinu, a na C-konci z kalmodulin-like domény (CaM-LD), na Obrázku 2 označenou jako CaM-like. CDPKs obsahují EF-hands (elongation factor hands), které slouží k vazbě Ca^{2+} iontů. Primárně se nacházejí na C- konci, a to většinou v páru. Některé CDPKs mají EF-hands na N- konci či dokonce degenerované, nebo je zcela ztratily (Shi et al., 2018). Mezi PKD a CaM-LD leží autoinhibiční oblast, též zvaná junction domain (J). CaM-LD a autoregulační oblasti se souhrnně nazývá jako CDPK aktivační doména (CAD) (Xu & Huang, 2017; Liese et al., 2013; Wernimont et al., 2011; Chandran et al., 2006).

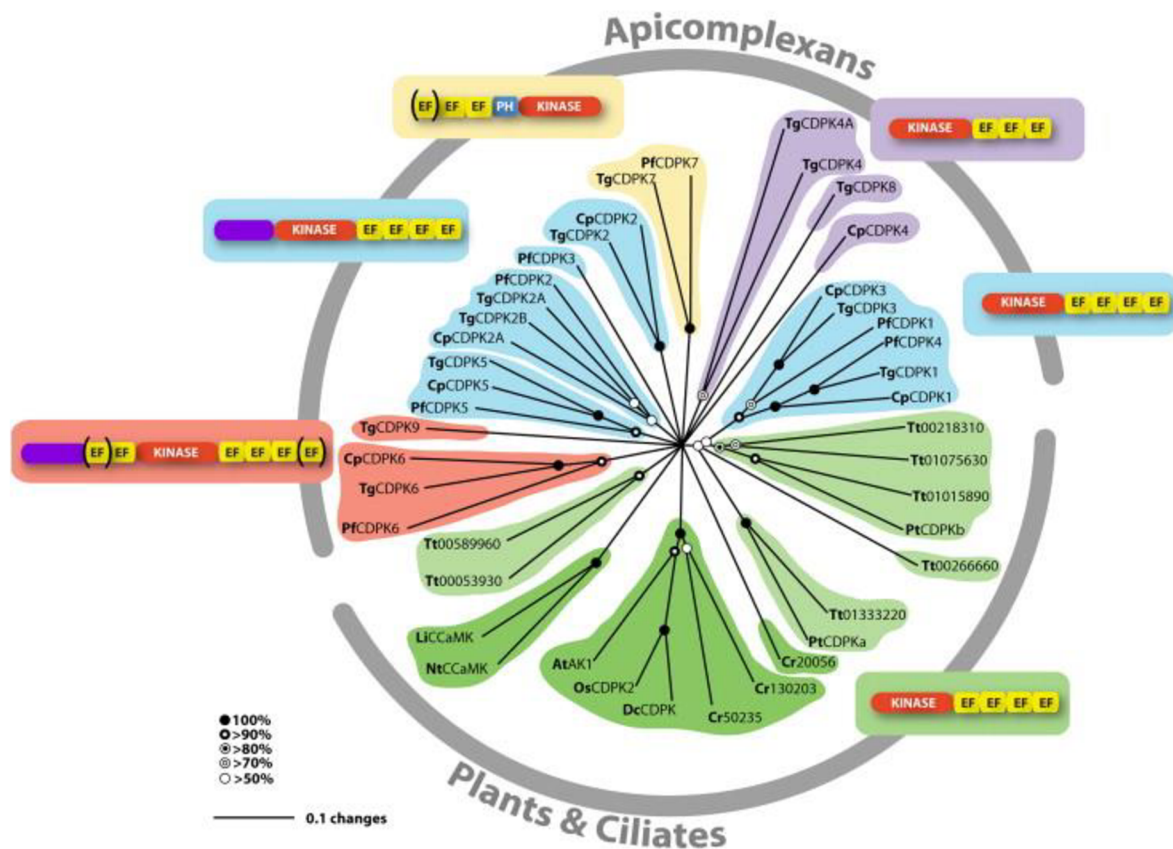
Autoinhibitor nacházející se v junction doméně slouží jako pseudosubstrát pro PKD, díky čemuž udržuje CDPKs pod úroveň bazální aktivity. V inaktivované formě CAD zakrývá

aktivní místo kinázové domény (PKD). Při zvýšené koncentraci vápenatých iontů dojde k jejich postupnému navázání na CaM-LD. Po navázání Ca^{2+} na všechny EF-hands místa dojde k výrazné konformační změně CAD, při které se celá aktivační doména přemístí do nové polohy na druhou stranu kinázové domény a stabilizuje se vytvořením nových kontaktních míst. To vede k odhalení aktivního místa kinázové domény (Liese et al., 2013; Wernimont et al., 2011). Ta poté může vázat ATP (nebo GTP) jakožto donor fosfátu a přenášet jej na akceptorový hydroxylový zbytek, čímž dojde k aktivaci substrátu (Xu & Huang, 2017).

1.4.2 Kalcium dependentní protein kinázy u zástupců z kmene Apicomplexa

CDPKs jsou nejvíce početnou skupinou kalcium-dependentních kináz u Apicomplexa. CDPKs se u Apicomplexa rozdělují do pěti tříd s odlišnou strukturou domén. Jak uvádí Billker et al. (2009), kanonická struktura CDPKs se skládá z N-terminální kinázové domény a 4 EF-hands na C-konci. Tato struktura platí pro většinu CDPKs rostlin a nálevníků a pro dvě z pěti tříd u Apicomplexa. Jedna z nich má relativně kratší N-konec. Patří sem dvě CDPKs u *P. falciparum*, PfCDPK1 a PfCDPK4, a jejich orthology u *T. gondii*, TgCDPK3 a TgCDPK1, jak můžeme vidět na Obrázku 3. Druhá kanonická skupina je typická pro PfCDPK3 a PfCDPK5, stejně tak pro orthology u *C. parvum* a *T. gondii*. Ostatní 3 třídy se liší svým počtem EF-hands na C-konci, jejich přítomností na N-konci místo na C-konci, nebo přítomností plekstrinové homologní domény, jako tomu je u CDPK7 (Billker et al., 2009).

Různé CDPKs mají různou sensitivitu k Ca^{2+} . U *Plasmodium* bylo prokázáno, že se některé CDPKs funkčně překrývají, což naznačuje jejich kooperaci v signální kaskádě a možnost vzájemného nahrazení při snížení nebo úplné ztrátě aktivity jedné z nich (Sharma et al., 2021). Ačkoli mají varianty CDPKs podobnou strukturu a mechanismus účinku, v průběhu životního cyklu parazita hrají různou roli, a to díky načasování a způsobu exprese, posttranslační regulaci a modifikaci, a citlivosti a specifčnosti substrátu vůči vápníku. Nelze se také spoléhat na stejné vlastnosti u orthologů, protože i orthologní CDPKs mohou mít jinou funkci v rámci životních cyklů různých parazitů (Ghartey-Kwansah et al., 2020). Mezi nejstudovanější zástupce kmene Apicomplexa patří *P. falciparum*, *T. gondii* a *C. parvum* (Billker et al., 2009).



Obrázek 3: Fylogenetické analýza CDPKs u rostlin, nálevníků a výtrusovců. Tg, *T. gondii*; Pf, *P. falciparum*; Cp, *C. parvum*; Tt, *Tetrahymena thermophila*; At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa*; Dc, *Daucus carota*; Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Pt, *Paramecium tetraurelia*; Li, *Lilium longiflorum*; Nt, *Nicotiana tabacum*. Převzato z Billker et al. 2009.

Jak již bylo zmíněno, Apicomplexa mají 5 tříd CDPKs dle jejich doménové struktury, jak je zobrazeno na Obrázku 2. Právě tyto jemné rozdíly ve struktuře CDPKs umožňují rozdílnou funkci v různých fázích životního cyklu. *Toxoplasma* má více jak 20 různých CDPKs, *Plasmodium* a *Cryptosporidium* méně než 10 (Ghartey-Kwansah et al., 2020). U rodu *Plasmodium* bylo dosud identifikováno 7 různých CDPKs ze 4 různých tříd. Jsou jimi PfCDPK1- PfCDPK7, přičemž PfCDPK1, PfCDPK2, PfCDPK3, PfCDPK4, a PfCDPK5 má kanonickou strukturu zatímco PfCDPK6 a PfCDPK7 má atypickou organizaci domén, jak můžeme vidět na Obrázku 4 (Sharma et al., 2021).

al., 2020; Sharma et al., 2021). Také CDPK4 u *Plasmodium berghei* reguluje progresi buněčného cyklu v samčím gametocytu (Wang et al., 2015). TgCDPK1, ortholog PfCDPK4 a PbCDPK4, je zapotřebí pro výstup a vstup do buňky. Její suprese vede k oslabení sekrece mikronem, a má vliv na následnou motilitu parazitů a schopnost invaze do hostitelských buněk a výstupu z nich (Wang et al., 2015). U CpCDPK1, orthologu PfCDPK4, bylo prokázáno, že hraje důležitou roli v procesu invaze u *C. parvum* (Zhang et al., 2021).

PfCDPK5 hraje zásadní roli během krevního stadia replikace malárie a zprostředkovává proteázovou kaskádu potřebnou pro výstup z červených krvinek (Dvorin et al., 2010).

PfCDPK6 reguluje přechod sporozoitů z migrační na invazivní fázi, jakmile doputují do jater. Inhibice by pravděpodobně zabránila progresi do schizontů v játrech (Ghartey-Kwansah et al., 2020). Zhang et al. (2021) prokázali potencionální zapojení CpCDPK6 a CpCDPK4 v invazi a intracelulárním vývoji *C. parvum*.

PfCDPK7 má hlavní roli v dozrávání trofozoitů v červených krvinkách (Ghartey-Kwansah et al., 2020; Sharma et al., 2021). TgCDPK7 je klíčová pro dělení parazita, růst a správné udržování centrozomů uvnitř hostitelských buněk (Wang et al., 2015).

1.4.2.1 Rod *Babesia*

U rodu *Babesia* jsou kalcium-dependentní protein kinázy jen málo prozkoumány. Zveřejněná studie Hussein et al. (2014) naznačuje funkci CDPK4 u *B. bovis* a její důležitost při vývoji sexuálních stádií a kinet, a uvádí, že pochopení vývoje pohlavních stádií parazita a jejich regulaci považuje za klíčovou součást budoucích vakcín blokujících přenos a kontrolu bovinní babeziózy. Preprint od Elsworth et al. (2023) uvádí, že při knockdownu *B. divergens* CDPK4 došlo k defektu při výstupu z erytrocytů a potvrzuje její expresi v tomto vývojovém stádiu, ale neobjasňuje zapojení BdCDPK4 do sexuálního vývoje parazita.

1.4.3 CDPK5

CDPK5 patří do jedné z dvou kanonických skupin CDPKs. Na Obrázku 4 můžeme vidět, že CDPK5 má prodloužený N-konec, který není homologní s jinými známými doménami. C-konec obsahuje čtyři EF hands pro vazbu Ca^{2+} (Billker et al., 2009). Do této skupiny řadíme též orthology této kinázy u *P. falciparum*, *C. parvum* a *T. gondii*, všechny značené jako CDPK5, které však navzdory klastrování do stejné skupiny mohou mít odlišnou funkci. PfCDPK5 je exprimována v asexuální fázi vývoje parazita, konkrétně ve zralých schizontech a zralých

merozoitech, a hraje klíčovou roli při úniku merozoitů z infikovaných erytrocytů a invazi do zdravých erytrocytů hostitele (Rout & Mahapatra, 2019).

Dvorin et al. (2010) uvádí, že knockdown PfCDPK5 znemožňuje výstup z hostitelské buňky, a dochází tak k „uvěznění“ parazita v hostitelské buňce. Další role proteinu PfCDPK5 pravděpodobně souvisí s bloádou iontového transportního řetězce, přesněji s odčerpáváním Na^+ a H^+ iontů z PV, což chrání plazmatickou membránu parazita před prasknutím (Rout & Mahapatra, 2019). Govindasamy & Bhanot (2020) poukazují na skutečnost, že CDPK5 u *P. berghei* by mohla být esenciální pro výstup merozoitů z erytrocytů, ale také z hepatocytů. Wang et al. (2016) uvádí, že TgCDPK5 není nezbytná pro lytický cyklus parazita. Může být ale zapojena do invaze hostitelské buňky a výstupu z ní (Wang et al. 2015). Úloha CpCDPK5 se zdá být podobná jako u PfCDPK5 (Zhang et al., 2015). Preprint od Elsworth et al. (2023) odhalil, že při výstupu z erytrocytů nedochází k expresi BdCDPK5 a její knockdown tak nemá žádný vliv na egress *B. divergens* z červených krvinek.

2 Cíle práce

- Stručná literární rešerše na téma charakterizace a funkce kalcium-dependentních proteinkináz (CDPKs) se zaměřením na CDPK5 u parazitů ze skupiny Apicomplexa
- Vytvořit rekombinantní *Babesia divergens* CDPK5 (BdCDPK5)
 - Zaklonovat gen pro BdCDPK5 do expresního vektoru
 - Optimalizovat podmínky pro large scale expresi
 - Purifikovat rekombinantní protein BdCDPK5 pomocí afinitní chromatografie
- Imunizovat myši purifikovaným a refoldovaným rekombinantním proteinem BdCDPK5 pro produkci polyklonálních protilátek

3 Materiál a metody

3.1 Gradientová PCR

3.1.1 Příprava a PCR

Gen kódující BdCDPK5 (Bdiv_035940c) byl pomocí gradientové PCR amplifikován. Pro PCR amplifikaci byl použit kit iProof High-Fidelity PCR kit (Bio-Rad). Pro jednu reakci bylo využito 10µl 5×iProof™ HF Bufferu, 1µl dNTPS (deoxyribonukleotid trifosfát) a 2,5µl DMSO (Dimethylsulfoxid) a 0,5µl iProof High-Fidelity DNA Polymerase. Jako templát byla použita v laboratoři již připravená cDNA z krevních kultur *B. divergens* o koncentraci 115ng/µl, v objemu 0,5µl, námi navržené forward a reverse primery (viz Tabulka I), oba v objemu 2µl, a 31,5µl PCR vody (Top-Bio). Celkový objem reakce, 50µl, byl rozdělen do čtyř mikrozkušavek po 12µl. Každá byla vystavena jiné teplotě: 50°C, 55°C, 60°C, 65°C. PCR probíhala v termocykleru (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) dle protokolu uvedeného v Tabulce II.

Tabulka I: Primery pro gradientovou PCR

Název primeru	Sekvence
BDIV_035940c_pet100_gibson_f	GGATCATCCCTTCACCCCGCGGATGAAGAAT GAGTCGACCGT ¹
BDIV_035940c_pet100_gibson_r	CTTCTCGAGCCATGGAATTcactattaTTAGT CTAATGTGGCTACATCTCC ²

¹ Zeleně je vyznačen overhang primeru, komplementární k sekvenci linearizovaného vektoru na jeho 5'konci, který byl štěpen restriční endonukleázou SacII.

² Modře je vyznačen overhang primeru, komplementární k sekvenci linearizovaného vektoru na jeho 3'konci, který byl štěpen restriční endonukleázou EcoRI.

Tabulka II: Podmínky pro gradientovou PCR

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98°C	30 sekund	1
Denaturace	98°C	10 sekund	30
Nasedání primerů	50°C	15 sekund	
	55°C		
	60°C		
	65°C		
Extenze	72°C	15-30s/kb *1,5 minuty	
Závěrečná extenze	72°C	2 minuty	1
Udržování teploty	4-10°C		

* očekávaná délka PCR produktu = 2376 bp

3.1.2 Elektroforéza

Pro elektroforézu byl vytvořen 1% agarový gel smícháním 50 ml 1×TAE (Tris-Acetat-EDTA), 0,5g agarózy (Bioline) a 0,5μl ethidiumbromidu (ETH) (Sigma-Aldrich). Zásobní roztok 50×TAE vznikl smícháním 242g TRIS (trisaminomethan) (LACH:NER), 100μl 50mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) (LACH:NER), (pH=8) a 57,1ml kyseliny octové doplněného do objemu 1l ddH₂O (double-distilled H₂O). 1×TAE vzniklo doplněním 20ml 50×TAE do 1l ddH₂O. Ke každému z PCR produktů bylo přidáno 1,7μl 6×TriTrack DNA Loading dye (Thermo Scientific™).

Elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně (Mupid-One, Advance) naplněné 1×TAE. Do první jamky gelu byly napipetovány 3μl Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™), do dalších pěti jamek pak PCR produkty. Elektroforéza probíhala po dobu 30 minut při napětí 100 V. Gel byl poté vizualizován pomocí UV transluminátoru (G:BOX F3, Syngene). Nejlepší výsledná teplota byla použita pro následnou PCR amplifikaci.

3.2 PCR amplifikace

Příprava PCR probíhala zcela totožně s gradientovou PCR. Výsledný objem 50 μ l nebyl rozdělen, ale byl ponechán v jedné zkumavce, která byla umístěna do termocykleru (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) nastaveného na protokol z Tabulky III.

Tabulka III: Podmínky pro PCR

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	98°C	30 sekund	1
Denaturace	98°C	10 sekund	30
Nasedání primerů	55°C	15 sekund	
Extenze	72°C	15-30s/kb *1,5 minuty	
Závěrečná extenze	72°C	2 minuty	1
Udržování teploty	4-10°C		

* očekávaná velikost PCR produktu = 2376 bp

Elektroforéza a vizualizace gelu probíhaly totožně s předešlým postupem viz kapitola 3.1.2.

3.2.1 Přechištění DNA

Vizualizované PCR produkty byly vyříznuty z gelu a přechištěny pomocí kitu NucleoSpin gel and PCR Clean-up, PCR Clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel), dle návodu 5.2: DNA extraction from agarose gels. Koncentrace přechištěného produktu byla změřena pomocí NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific™).

3.3 Gibson assembly

Přechištěný PCR produkt byl zaklonován do linearizovaného vektoru pomocí přesahů (overhangů), vzniklých díky použití primerů, obsahující komplementární sekvence ke klonovacímu vektoru na jeho 5' i 3' konci (viz Tabulka I). Klonovacím vektorem byl plasmid pET100/DTOPO®, který byl naštěpen restrikcími endonukleázami SacII a EcoRI. K úspěšnému vložení insertu byl použit NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (New

England Biolabs) a reakce proběhla dle instrukcí v příloženého protokolu v objemu 5 μ l. Použité množství bylo spočítáno pomocí NEBuilder® Protocol Calculator. Reakce obsahovala Master Mix v objemu 2,5 μ l, 1 μ l vektoru a 1,5 μ l insertu o koncentraci 62ng/ μ l a byla inkubována v termocykleru (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad) při 50°C po dobu 1 hodiny.

3.4 Transformace do kompetentních buněk

Celkový objem zkumavky byl poté opatrně smíchán s 50 μ l kompetentních buněk NEB® 5-alpha Competent *E. coli* (New England Biolabs). Vzorek byl na 15 minut umístěn na led, poté na 30 sekund přesunut do heatblocku (Digital Dry Bath, Labnet) předehřátého na 42°C a znovu vrácen na 2 minuty na led, kde k němu bylo přidáno 300 μ l S.O.C. média (Super Optimal broth with Catabolite repression Outgrowth Media (New England Biolabs)). Poté byl na jednu hodinu umístěn do třepačky (211DS Shaking Incubator, Labnet) nastavené na 37°C a 220rpm.

Mezitím byly předehřáty dvě LB (Luria broth) agarové plotny. K výrobě 10 LB agarových ploten bylo potřeba 2g triptonu (Sigma-Aldrich), 2g NaCl (Lach-Ner), 1g kvasnicového extraktu (Amresco), 3g agaru (Amresco) a 200 μ l ampicilinu (50mg/ml) (Sigma-Aldrich), které byly rozpuštěny v 200ml ddH₂O. Obsah zkumavky byl poté rozdělen mezi tyto dvě plotny (50 μ l a 250 μ l) pro vizuální kontrolu účinnosti ampicilinu. Plotny byly přes noc inkubovány při 37°C v inkubátoru (TCH100, Laboratorní přístroje Praha) dnem vzhůru.

3.5 PCR z kolonií

Druhý den bylo z ploten vybráno několik narostlých kolonií, které byly nabrány pomocí špičky, resuspendovány v připravených PCR zkumavkách naplněných 5 μ l PCR vody (Top-Bio) a využity jako templát pro PCR z kolonie.

Pro přípravu jedné PCR reakce bylo použito 5 μ l One Taq Quick Load 2 \times Master Mixu (New England Biolabs), 0,3 μ l T7 forward a 0,3 μ l T7 reverse primeru (viz Tabulka IV), 1 μ l templátu a 3,4 μ l PCR vody, kterou byla reakce doplněna do objemu 10 μ l a umístěna do termocykleru (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad), kde reakce probíhala dle podmínek uvedených v Tabulce V. 2 μ l templátu byly též přeneseny na novou agarovou plotnu, kde byl udělán tzv. křížek. Plotna byla přes noc inkubována při 37°C (TCH100, Laboratorní přístroje Praha) dnem vzhůru.

Tabulka IV: Primery pro PCR z kolonie

Název primeru	Sekvence
T7 Promoter forward	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Terminator reverse	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Tabulka V: Podmínky pro PCR z kolonií

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94°C	30 sekund	1
Denaturace	94°C	15 sekund	30
Nasedání primerů	55°C	15 sekund	
Extenze	68°C	1min/1kb *3 minuty	
Závěrečná extenze	68°C	5 minut	1
Udržování teploty	4-10°C		

* očekávaná velikost PCR produktu = ~ 3000bp

3.6 Miniprep a sekvenace

Z kolonií pozitivně testovaných na přítomnost vektoru s naším insertem byly vytvořeny tzv. miniprepy. Kolonie byly přemístěny do centrifugační zkumavky naplněné 5ml tekutého LB média a 5μl ampicilinu (50mg/ml). 1l tekutého LB média byl vytvořen pomocí 10g triptonu (Sigma-Aldrich), 5g kvasnicového extraktu (Amresco), 10g NaCl (Lachf-Ner) a 1l ddH₂O. Zkumavka byla přes noc třepána (211DS Shaking Incubator, Labnet) při 37°C na 220rpm.

Následující den byl z miniprepu vyizolován plasmid pomocí NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) kitu (Macherey-Nagel) dle přiloženého návodu č. 5: Cell lysis. Koncentrace vyizolovaného plasmidu byla změřena pomocí Nanodropu (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific™). 500ng plasmidu bylo doplněno do 10μl PCR vodou (Top-Bio) a společně s primery z Tabulky I a Tabulky IV zasláno na Sangerovo sekvenování do SEQme s.r.o. Výsledky ze sekvenace byly vyhodnocovány pomocí programu Geneious Prime (verze 2024.0.3), pluginu Clustal.

3.7 Transformace do expresních buněk

Sekvenačně potvrzený vektor pET100/DTOPO® s vloženým genem pro BdCDPK5 ve správném čtecím rámci byl transformován do expresních buněk One Shot™ BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen™). Buňky v objemu 50μl byly inkubovány 15 minut na ledu, poté k nim byl přidán 1μl rekombinantního BdCDPK5 vektoru o koncentraci 71ng/μl, a směs byla inkubována na ledu dalších 30 minut. Poté byla na 30 sekund umístěna do heatblocku (Digital Dry Bath, Labnet) přehřátého na 42°C a okamžitě vrácena na led. Následně k nim bylo napipetováno 250μl S.O.C. média (New England Biolabs) a vše bylo vloženo do třepačky (211DS Shaking Incubator, Labnet) (37°C, 220rpm, 1h).

3.7.1 Inoculum

V centrifugační zkumavce bylo smícháno 10ml tekutého LB média, 10μl AMP (50mg/ml), 250μl 1M glukózy (Sigma-Aldrich) a celý obsah transformační reakce, tj. 300μl. Zkumavka byla třepána přes noc při 37°C a rychlosti 220rpm (211DS Shaking Incubator, Labnet).

3.8 Pilotní exprese

3.8.1 Startovací kultura

V Erlenmeyerově baňce bylo smícháno 60ml tekutého LB média, 60μl AMP (50mg/ml), 1,5ml 1M glukózy (Sigma-Aldrich) a 3ml inocula (viz kapitola 3.7.1). Baňka byla umístěna do třepačky (IOI400.XX2.C, Gallenkamp) nastavené na 37°C a 220rpm. Každou hodinu z ní byl odebrán 1ml vzorku. Pomocí přístroje BioPhotometer (Eppendorf™) bylo měřeno OD600, tedy buněčný růst kultury, dokud nedosáhl hodnoty 1,2 oproti referenční hodnotě. Po jejím dosažení byla zkumavka centrifugována (Heraeus-Multifuge X3R Centrifuge, Thermo Scientific™) při pokojové teplotě a 3500g po dobu 10 minut. Vzniklý pelet byl po odstranění supernatantu resuspendován v malém množství LB média pomocí vortexu (MS 3 basic, IKA).

3.8.2 Indukce

Pelet resuspendovaný v LB médiu (viz kapitola 3.8.1) byl smíchán s 60ml nového LB média a byl rozdělen po 10ml do šesti centrifugačních zkumavek. Ještě před rozdělením došlo k odebrání 1ml vzorku v čase T_0 . Do třech zkumavek byl přidán 1μl IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid) (SERVA) (výsledná koncentrace IPTG 0,1mM), do zbylých třech pak 10μl IPTG (výsledná koncentrace IPTG 1mM). Exprese proteinu probíhala při třech různých

teplotách: 37°C, 27°C a 17°C. Stejně teplotě byly vystaveny vždy dvě zkumavky, každá s jinou koncentrací IPTG. Ze zkumavek byl odebírán 1ml média s buňkami ve čtyřech časových bodech, a to po 1 hodině (T₁), po 2 hodinách (T₂), po 4 hodinách (T₄) exprese a druhý den ráno (T_{ON}). Vzorky byly po celou dobu třepány na 140rpm v Innova™ 44 Incubator Shaker (Eppendorf™). 1ml odebraného média byl následně stočen v centrifuze (Heraeus-Multifuge X3R Centrifuge, Thermo Scientific™) na 5 minut a 5000g a pelet zamražen. Tímto způsobem vzniklo celkem 25 zkumavek obsahující buněčný pelet.

3.9 Disrupce buněk

Každá zkumavka s peletem (viz kapitola 3.8.2) byla rozmrazena a následně smíchána s 500µl Resuspension Buffer RES (Macherey-Nagel). Zkumavky byly vhozeny do termosky s tekutým dusíkem, poté umístěny do heatblocku (Digital Dry Bath, Labnet) přehřátého na 42°C a následně zvortexovány (MS 3 basic, IKA). Tento proces byl proveden celkem třikrát. Zkumavky byly poté cetrifugovány v centrifuze (Heraeus-Multifuge X3R Centrifuge, Thermo Scientific™), (RT(room temperature), 20 000g, 20 min) a vzniklý supernatant byl analyzován metodou Western blot.

3.10 Western blotting

3.10.1 Příprava vzorků a elektroforetická separace (SDS-PAGE)

Pro jednu reakci bylo smícháno 20µl supernatantu (viz kapitola 3.9) s 5µl NuPAGE (Invitrogen™) a 5µl DTT (Dithiotreitol) (Thermo Scientific™). Vzorek byl denaturován 10 minut při 100 °C v heatblocku (Digital Dry Bath, Labnet) a poté elektroforeticky separován na Mini-PROTEAN® TGX Stain-free Gelu (Bio-Rad) při 200V v elektroforetické vaně Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) naplněné 500ml running bufferu (50ml 10×Tris/Glycine/SDS Buffer, Bio-Rad do objemu 500ml ddH₂O). Při elektroforéze byl použit PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™), a gel byl vizualizován pomocí Stain-Free technologie (TGX Stain-Free™, ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad).

3.10.2 Semi-dry transfer

Do misky naplněné CH₃OH byla umístěna polyvinylidendifluoridová membrána (TransBlot® Turbo™ Mini-size PVDF Membrane, Bio-Rad). Do druhé misky naplněné směsí vzniklou smícháním 20ml CH₃OH, 20ml Trans-Blot Turbo 5×Transfer Bufferu (Bio-Rad)

a doplněnou do 100ml destilovanou vodou, byly umístěny dva stohy filtračních papírů (Trans-Blot Turbo Mini-size Transfer stacks, Bio-Rad).

Do blotovacího zařízení byl na sebe naskládán jeden stoh nasáklých filtračních papírů, membrána, gel a druhý stoh filtračních papírů přesně v tomto pořadí. Vrstvy byly postupně zahlazovány válečkem, aby došlo k vytlačení bublin. Pro blotování byl použit Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) a program 1,3A-25V-9min.

3.10.3 Blokování, vazba protilátek

V Erlenmeyerově baňce byl připraven roztok na vyblokování nespecifických vazebných míst na membráně smícháním 2g odtučněného sušeného mléka (Samantha) a 100ml PBS-T (fosfátový pufr s Tween 20) (100ml 10×PBS, 0,5ml Tween 20 (Promega), 900ml ddH₂O). Zásobní roztok 10×PBS (fosfátový pufr) byl připraven smícháním 80g NaCl (LACH:NER), 2g KH₂PO₄(LACH:NER), 29g Na₂HPO₄·12 H₂O (LACH:NER) a 2g KCl (LACH:NER), rozpuštěných v 1l ddH₂O. Přeblokovávaná membrána byla v blokovacím roztoku umístěna na třepací platformu (Polymax 1040, Heidolph) na 30 minut a poté přesunuta do roztoku obsahujícího primární protilátku specificky se vážající na 6× His-Tag (tzv. histidinovou kotvu), nacházející se na našem proteinu, konjugovanou s křenovou peroxidázou. Roztok vznikl smícháním 1,4g odtučněného sušeného mléka (Samantha), 20ml PBS-T a 1μl protilátky Anti-His₆-Peroxidase (Roche) ředěnou v poměru 1:20 000. V tomto roztoku byla membrána ponechána 1 hodinu na třepací platformě (Polymax 1040, Heidolph).

Následně byla membrána 3× promyta PBS-T, ve kterém byla nechána vždy 10 minut, a poté umístěna na skleněnou destičku. K membráně bylo přidáno 1400μl směsi Clarity™ Western ECL Substrate Peroxide solution a Luminol/enhancer solution (Bio-Rad) v poměru 1:1. Po 5minutové inkubaci byla membrána vizualizována pomocí Chemiluminescence (Clarity ECL, ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad) a byly vyhodnoceny optimální podmínky pro následnou large scale expresi.

3.11 Large scale exprese

Optimální podmínky pro large scale expresi byly stanoveny na kombinaci teploty 37°C, koncentraci IPTG 0,1M a dobu exprese přes noc (T_{ON}). Po opětovném provedení transformace do expresních buněk a připravení inocula (viz kapitola 3.7) byly buňky třepány v shakeru (Innova™ 44 Incubator Shaker, Eppendorf™) (37°C, 140rpm) v roztoku obsahujícím 400ml LB média, 400μl AMP (Sigma-Aldrich), 10ml 1M glukózy (Sigma-Aldrich) a 10ml inocula.

Každou hodinu byl odebírán 1ml média a měřeno OD600 pomocí přístroje BioPhotometer (Eppendorf™), dokud nedosáhlo hodnoty 1,2 oproti referenční hodnotě. Obsah láhve byl poté centrifugován (RT, 3000g, 10 min) a vzniklý pelet byl resuspendován v 15ml LB média.

3.11.1 Indukce

Resuspendovaný pelet (viz kapitola 3.11) byl smíchán 400ml LB média a 40 μ l IPTG (SERVA) a třepán přes noc v Innova™ 44 Incubator Shaker (Eppendorf™) při 37°C a 140rpm. Druhý den ráno byl obsah láhve centrifugován (RT, 3000g, 10 min).

3.12 Izolace inkluzních tělísek a sonikace

K peletu (viz kapitola 3.11.1) bylo přidáno 20ml Resuspension Buffer RES (Macherey-Nagel) a 0,5g lysozymu (Bio-Rad). Zkumavka byla zvortexována, ponechána 30 minut stát při pokojové teplotě a poté sonikována ultrazvukem pomocí VialTweeter (Heilscher Ultrasonics). Sonikace probíhala ve 3 sériích po 15 pulzech. Po sonikaci byla zkumavka centrifugována (4°C, 16 000g, 10 min). Pelet byl resuspendován ve 20 ml izolačního pufru (20mM TRIS/Cl, 2M Urea (LACH:NER)), 0,5M NaCl (LACH:NER), 10mM Imidazol (Milipore), 6M guanidinium hydrochlorid, pH=8) a znovu sonikován. Celý proces byl opakován celkem třikrát.

Po poslední centrifugaci byl pelet resuspendován v 10ml solubilizačního pufru (20mM TRIS/Cl, 1mM 2-mercaptoethanol, 5mM Imidazol, 0,5M NaCl, 6M guanidinium hydrochlorid, pH=8) a ponechán třepat přes noc na 37°C a 220rpm. Druhý den byla zkumavka centrifugována (4°C, 16 000g, 10 min) a vzniklý supernatant přefiltrován přes filtr s velikostí pórů 0,22 μ m (TPP).

3.13 Metalochelatační afinitní chromatografie (IMAC)

Pro IMAC byly vytvořeny dva pufrы. Pufr A obsahoval 20mM TRIS/Cl, 8M Ureu, 0,5M NaCl, pH=8. Pufr B (též eluční pufr) obsahoval 20mM TRIS/Cl, 8M Ureu, 0,5M NaCl a 0,5M Imidazol, pH=8. Právě složka imidazolu v pufru B zajišťovala vymývání proteinů slabě navázaných na kolonu (HiTrap IMAC Sepharose FF, Cytiva™), naplněnou 25ml 0,2M NiSO₄, a to už při nízkém poměru k pufru A. Nikelnaté ionty byly využity pro jejich afinitu k histidinu, který se nachází na povrchu našeho rekombinantního proteinu ve formě tzv. histidinové kotvy (6 \times His-Tag), díky čemuž se pevně váže na kolonu. Pro afinitní chromatografii byl použit ÄKTA pure™ Chromatography system (GE Healthcare). Hadičky vedoucí z ÄKTA byly ponořeny do kádinek naplněných pufrem A a pufrem B, kterými byl celý systém promyt. Do

přístroje byla našroubována kolona a postupně injikován přefiltrovaný supernatant. IMAC probíhala automatizovaně pomocí programu UNICORN™ 7. Přečištěný supernatant byl sbírán do Labcon PurePlus™ 96 Well Deep Well Plates with Square Wells (Thermo Scientific™). Sebraných 8 frakcí bylo analyzováno metodou Western blot (viz kapitola 3.10) na přítomnost rekombinantního proteinu. Vzorokly rekombinantního proteinu byly poté analyzovány pomocí hmotnostní spektroskopie MALDITOF (matrix assisted laser desorption/ionization - time-of-flight), která byla provedena Mgr. Filipem Dyčkou, PhD. na katedře chemie Přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích.

3.14 Refolding: Step-down dialýza

K refoldingu rekombinantního proteinu do nativního stavu byla použita step-down dialýza. Dialyzační membrána MEMBRA-CEL® (SERVA) o průměru 22 mm byla naplněna 15ml proteinu z ověřené frakce a byla přichycena ke kraji kádinky, která byla v průběhu dialýzy naplněna pěti různými roztoky (Tabulka VI). Kádinka byla po celou dobu umístěná v chladové místnosti (4°C) na magnetickém míchadle. Výsledný protein byl centrifugován k odstranění případných precipitátů, supernatant byl odebrán a byla změřena jeho koncentrace pomocí eseje Bradfordové.

Tabulka VI: Složení dialyzačních roztoků

1. roztok	2. roztok	3. roztok	4. roztok	5. roztok
250ml pufr B ¹	170ml pufr B	100ml pufr B	500ml pufr C	20mM Tris/Cl
250ml pufr C ²	330ml pufr C	400ml pufr C	2mM β-	0,5M NaCl
2mM β-	2mM β-	2mM β-	merkaptóetanol	pH= 8
merkaptóetanol	merkaptóetanol	merkaptóetanol		V= 500 ml
T ³ = 6 hodiny	T= 6 hodiny	T= ON hodiny	T= 6 hodiny	T= ON

¹ 20mM TRIS/Cl, 8M Ureu, 0,5M NaCl a 0,5M Imidazol, pH=8

² 20mM TRIS/Cl, 0,5M NaCl, 10% glycerol, pH= 8

³ doba dialýzy

3.15 Imunizace

Pro imunizaci 3 myši BALB/c byl použit přečištěný a refoldovaný rekombinantní protein BdCDPK5. BALB/c laboratorní myši (*Mus musculus*) byly získány ze zvěřince

Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR, v. v. i. Na počátku experimentu byly myši 6 týdnů staré a bylo s nimi zacházeno dle zákona na ochranu zvířat proti týrání 359/2012 Sb. a dle vyhlášky o ochraně pokusných zvířat 419/2012 Sb. včetně příslušných předpisů Evropské unie. Manipulace se zvířaty byla vždy prováděna osobou oprávněnou k manipulaci s laboratorními zvířaty dle Osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů nebo Osvědčení o prodloužení doby platnosti odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů (Mgr. Zuzana Vavrušková, RNDr. Marie Jalovecká, Ph.D.). Před začátkem imunizace byla myšim odebrána krev z oční žíly Mgr. Zuzanou Vavruškovou. Krev byla 24 hodin ponechána v lednici, poté centrifugována na 2500g, 4°C, 5 minut, a vzniklé preimunní sérum bylo zamrazeno na -20°C.

Proběhly celkem 4 imunizace v rozmezí 14 dnů. Každá dávka obsahovala 0,305mg proteinu, který byl obsažen v 100 µl, a byla aplikována intraperitoneálně. Při první imunizaci byl protein BdCDPK5 smíchán s kompletním Freundovo adjuvans (Sigma-Aldrich) v poměru 1:1. Při druhé, třetí a čtvrté dávce byl protein smíchán s nekompletním Freundovo adjuvans (Sigma-Aldrich) opět v poměru 1:1. Po čtvrté imunizaci byla myšim opět odebrána krev z oční žíly Mgr. Zuzanou Vavruškovou. Vzniklé imunní sérum bylo testováno metodou Western blot na přítomnost polyklonálních protilátek.

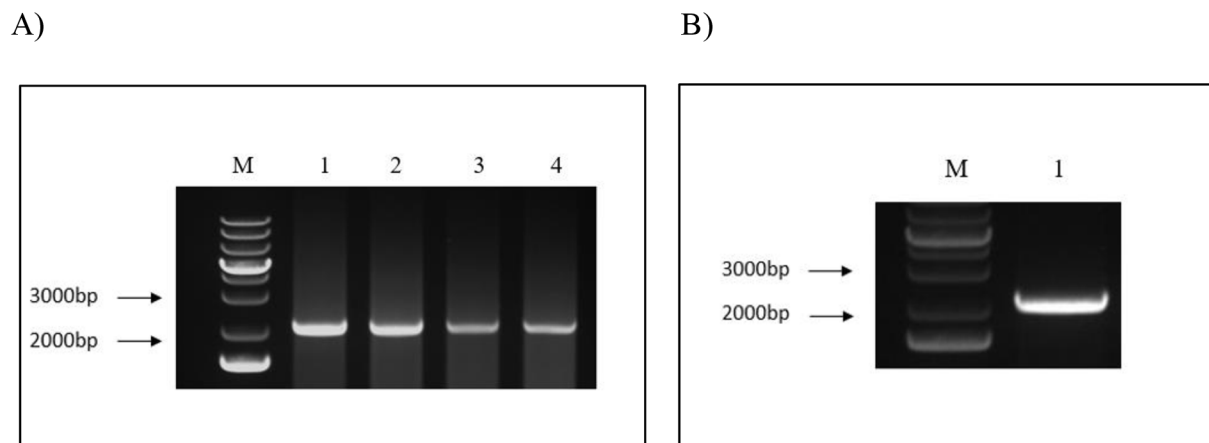
3.16 Western blotting- polyklonální protilátky

Příprava vzorků, elektroforetická separace (SDS-PAGE) a semi-dry transfer probíhaly totožně s předešlým postupem (viz kapitola 3.10.1 a 3.10.2). Po přeblotování byla membrána rozřezána na proužky, tak, aby každý proužek obsahoval jednu jamku s BdCDPK5 proteinem. Proužky membrány byly umístěny do misek obsahující 2,5 ml blokovacího roztoku (7% roztok sušeného mléka (Samantha) rozpuštěného v PBS-T) a sérum vždy jedné ze tří myší. Sérum z každé myši bylo ředěno 5000×, 10 000× a 20 000× pro stanovení nejsilnější imunitní reakce. Misky byly zakryty fólií a přes noc nechány na třepací platformě (Polymax 1040, Heidolph). Druhý den byly proužky membrány třikrát promyty v PBS-T (5 minut) a poté zality blokovacím roztokem obsahujícím 3000× zředěnou sekundární protilátku (Goat Anti-Mouse IgG Antibody, Peroxidase Conjugated, H+L (Sigma-Aldrich)). Následně byly 1 hodinu na třepány na třepací platformě (Polymax 1040, Heidolph) a poté čtyřikrát promyty v PBS-T (5 minut). Vizualizace membrány proběhla stejně jako v kapitole 3.10.3

4 Výsledky

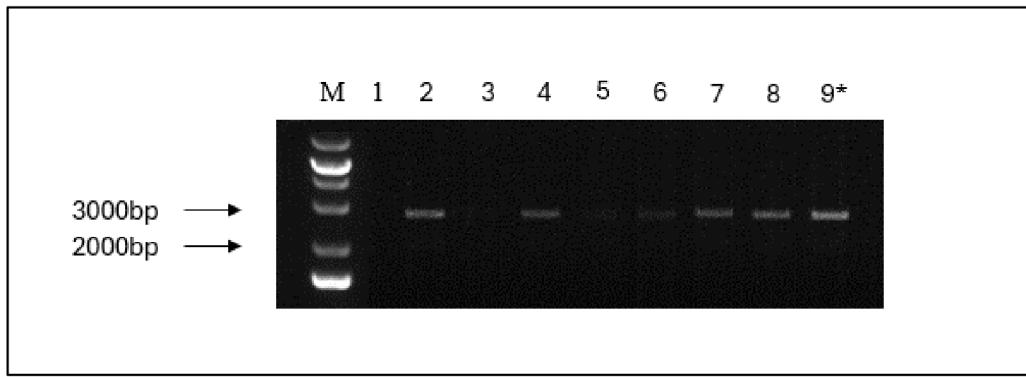
4.1 Amplifikace genu pro CDPK5

Pro amplifikaci genu kódujícího BdCDPK5 (Bdiv_035940c) z cDNA byly použity navržené primery (viz Tabulka I), a pomocí gradientové PCR byla identifikována nejvhodnější teplota nasedání primerů 55°C (Obrázek 5A), která byla následně použita pro amplifikaci genu pro klonování do vektoru pET100/DTOPO® (Obrázek 5B).

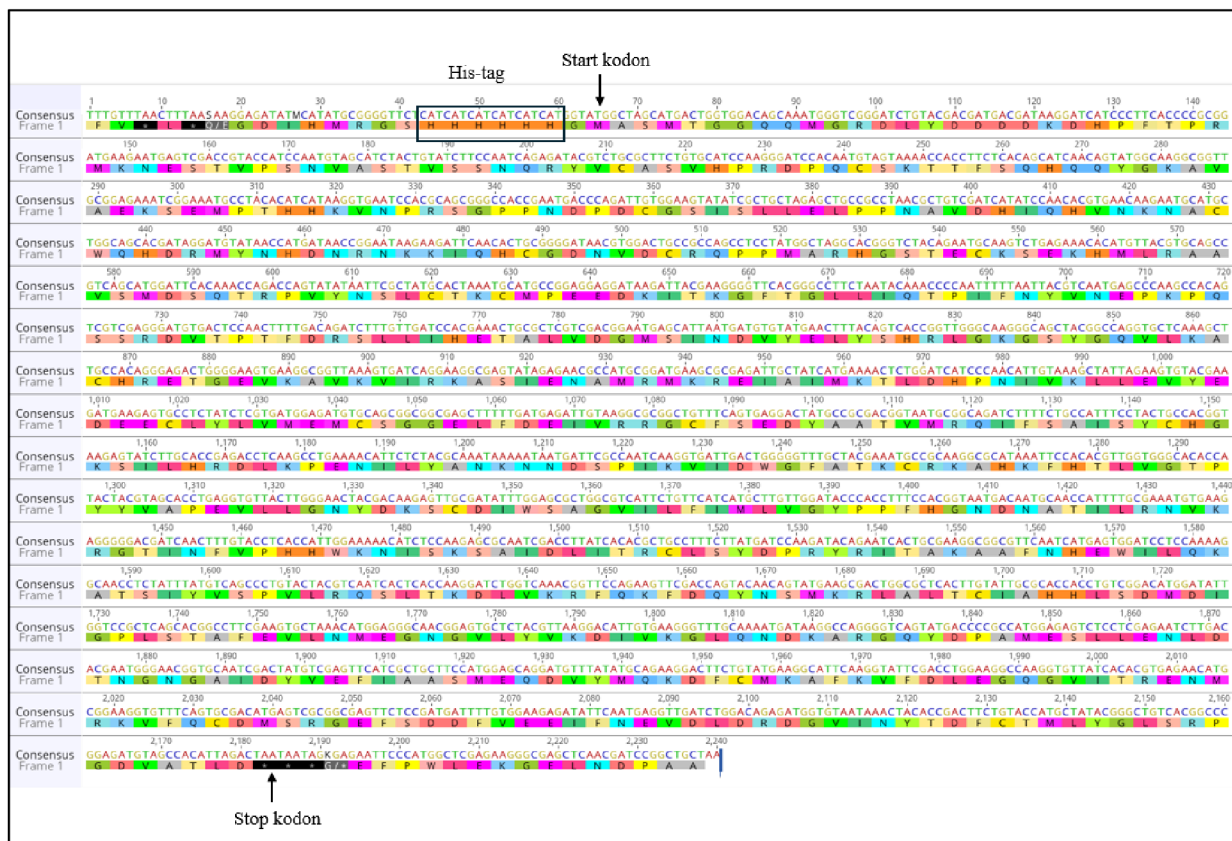


Obrázek 5: PCR amplifikace genu Bdiv_035940c. A) Gradientová PCR genu Bdiv_035940c (2376 bp). M = Ladder (1 kb ladder, Thermo scientific); 1 = 50°C; 2 = 55°C; 3 = 60°C; 4 = 65°C. **B)** PCR amplifikace genu Bdiv_035940c (2376 bp). M = Ladder (1 kb ladder, Thermo scientific); 1 = 55 °C.

Amplifikovaný gen o koncentraci 62ng/μl byl zaklonován do linearizovaného vektoru pET 100/DTOPO®, transformován do kompetentních buněk *E. coli* (5-alpha Competnet *E. coli*, NEB®) a získané kolonie byly testovány na jeho přítomnost pomocí PCR (Obrázek 6) za použití primerů z Tabulky IV. Jeden z pozitivních klonů, klon 9, na obrázku označen hvězdičkou, byl ověřen pomocí Sangerova sekvenování (viz Obrázek 7 a Příloha 1), který potvrdil kompletní shodu s referenční sekvencí kódující BdCDPK5 našeho modelového organismu *B. divergens* 2210A G2 (viz BP- Křečková, T. Pilotní analýza kalcium-dependentních proteinkináz prvoka *Babesia divergens*. 2022).



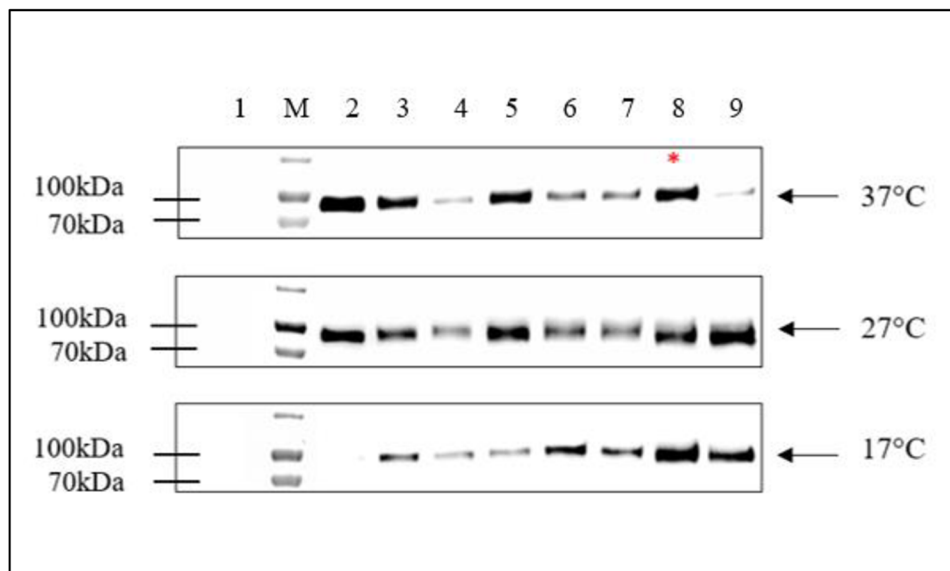
Obrázek 6: PCR z kolonií. Několik kolonií bylo pozitivních na přítomnost vektoru pET 100/DTOPO®, plazmid z kolonie 9, označen hvězdičkou, byl zaslán na Sangerovo sekvenování. Velikost PCR produktu = ~ 3000bp; M = M = Ladder (1 kb ladder, Thermo scientific).



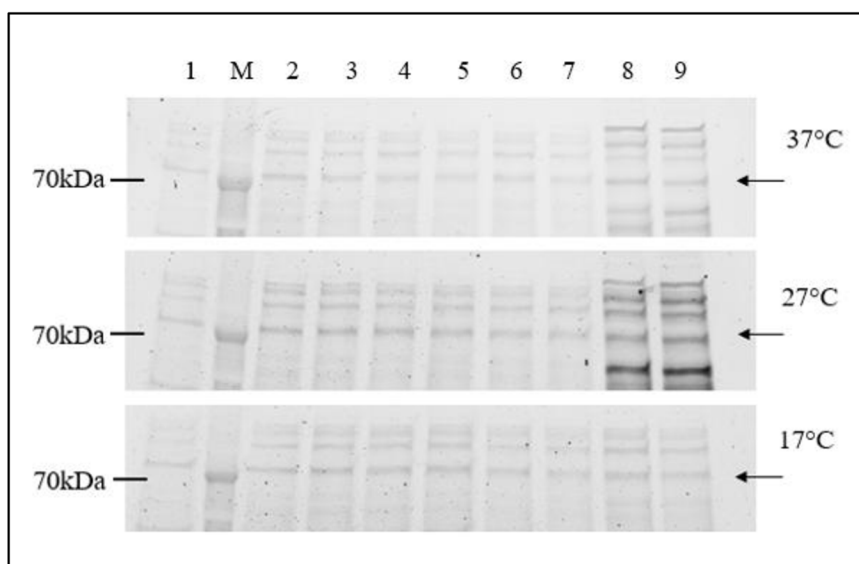
Obrázek 7: Výsledná sekvence genu Bdiv_035940 zaklonovaného do vektoru pET 100/DTOPO®. Alignment s referenční sekvencí je zobrazen v Příloze 1.

4.2 Expresse rekombinantního proteinu BdCDPK5

Sekvenačně potvrzený plasmid se zaklonovaným insertem byl úspěšně transformován do expresních buněk One Shot™ BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent *E. coli*, které posloužily k přípravě pilotní exprese. Z výsledků pilotní exprese (Obrázek 8) jsme vybrali dvě optimální podmínky pro expresi rozpustného rekombinantního proteinu - T_{ON}; 0,1mM IPTG, 17°C a pro expresi do inkluzních tělísek - T₁; 0,1mM IPTG, 37°C. Obě dvě tyto podmínky se nakonec ukázaly jako nevhodné pro large scale expresi, jelikož došlo k expresi jen malého množství proteinu. Proto jsme nakonec zvolili 37°C; 0,1mM IPTG; přes noc (T_{ON}), (Obrázek 8, červená hvězdička), která se nakonec ukázala být optimální pro expresi do inkluzních tělísek.



Obrázek 8: Pilotní exprese: Western blot detekce rekombinantního BdCDPK5 za použití protilátky Anti-His₆-Peroxidase. Exprimovaný protein BdCDPK5 (81kDa). Podmínka označená hvězdičkou, 37°C; 0,1mM IPTG; T_{ON}, byla zvolena jako optimální pro large scale expresi. M = Ladder (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo scientific); 1 = T₀, bez IPTG; 2 = T₁, 0,1mM IPTG; 3 = T₁, 1mM IPTG; 4 = T₂, 0,1mM IPTG; 5 = T₂, 1mM IPTG; 6 = T₄, 0,1mM IPTG; 7 = T₄, 1mM IPTG; 8 = T_{ON}, 0,1mM IPTG; 9 = T_{ON}, 1mM IPTG. Šipkou je označen prominentní signál BdCDPK5. PVDF membrána byla vizualizován pomocí Chemiluminescence (Clarity ECL, ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad).

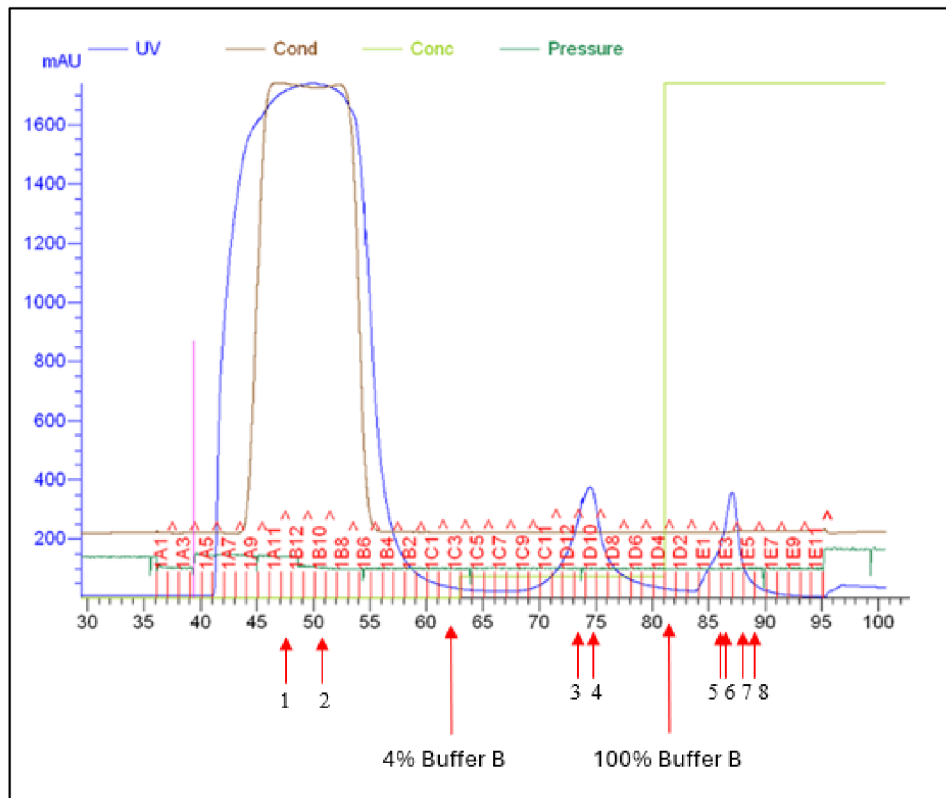


Obrázek 9: Pilotní exprese: 4 – 20% Tris/Glycine SDS-PAGE. Vizualizace TGX Stain-Free gelu – tzv. loading kontrola. Exprimovaný protein BdCDPK5 (81kDa). M = Ladder (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo scientific); 1 = T₀, bez IPTG; 2 = T₁, 0,1mM IPTG; 3 = T₁, 1mM IPTG; 4 = T₂, 0,1mM IPTG; 5 = T₂, 1mM IPTG; 6 = T₄, 0,1mM IPTG; 7 = T₄, 1mM IPTG; 8 = T_{ON}, 0,1mM IPTG; 9 = T_{ON}, 1mM IPTG. Šipkou je označen prominentní signál BdCDPK5. Gel byl vizualizován pomocí Stain-Free technologie (TGX Stain-Free™, ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad).

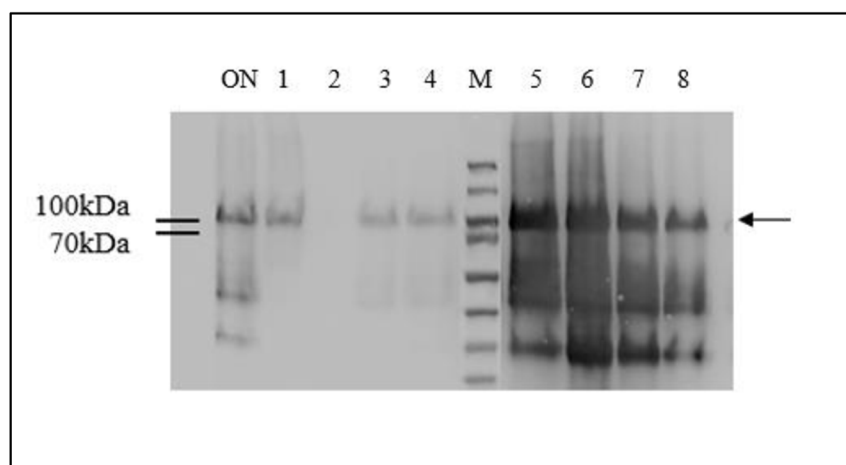
4.3 Purifikace rekombinantního proteinu

Inkluzní tělíska byla rozpuštěná v 6M guanidium hydrochloridu, obsaženém v solubilizačním pufru. K purifikaci rekombinantního proteinu s purifikační značkou His-Tag jsme zvolili metalochelatační afinitní chromatografii (IMAC) založenou na afinitě polyhistidinové kotvy obsažené ve fúzním proteinu exprimovaném z LacZ operonu z transformovaného vektoru k Ni²⁺. Ionty niklu byly imobilizované v HiTrap IMAC Sepharose FF colmuns (Cytiva™) a purifikace probíhala za denaturačních podmínek (6M guanidium hydrochlorid, 8M Urea) na ÄKTA pure™ Chromatografu (GE Healthcare) za použití pufru A a pufru B s obsahem 8M močoviny. Postupným promýváním kolony zvyšující se koncentrací elučního pufru B obsahujícího imidazol, až do koncentrace imidazolu 0,5M, vznikly tři různé fáze Flowthrough (F), Wash (W) a Elution (E). V první fázi Flowthrough (F) docházelo k vymývání proteinů nenavázaných nebo jen velmi slabě navázaných na kolonu, ve fázi Wash (W) k eluci všech slabě vázaných proteinů a při Elution (E) k eluci i proteinu silně navázaných

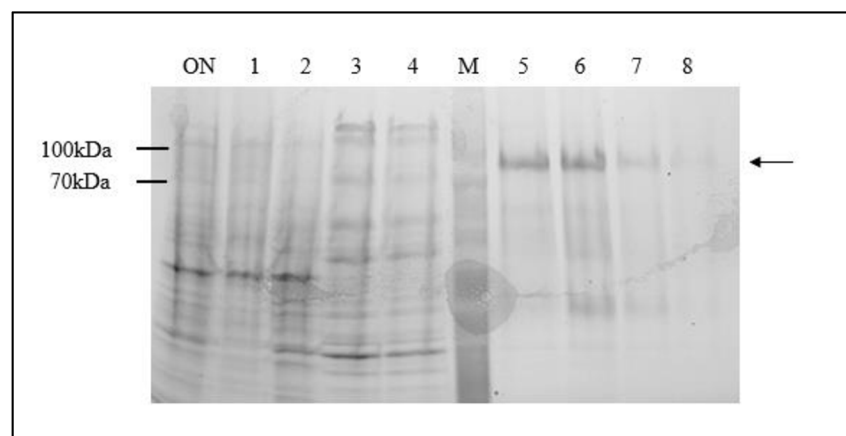
na kolonu pomocí His-tag. Na základě výsledků z chromatogramu vytvořeného programem UNICORN™ 7 (Obrázek 10), jsme zvolili 8 různých frakcí z těchto 3 fází (F, W a E), které byly následně testovány na přítomnost BdCDPK5 pomocí Western blotu (Obrázek 11, Obrázek 12).



Obrázek 10: Chromatogram z IMAC. Na chromatogramu je vyznačeno 8 vybraných frakcí. 1 = Flowthrough; 2 = Flowthrough; 3 = Wash; 4 = Wash; 5 = Elution; 6 = Elution; 7 = Elution; 8 = Elution, Graf znázorňuje závislost absorbance na čase. Modrá křivka znázorňuje množství proteinu ve vzorku měřené pomocí UV záření, hnědá křivka konduktivitu a zelená křivka koncentraci imidazolu.



Obrázek 11: Purifikace: Western blot detekce rekombinantního BdCDPK5 za použití protilátky Anti-His₆-Peroxidase. Ověření přítomnosti BdCDPK5 (81kDa) po purifikaci na Ni²⁺ chelatační koloně. M = Ladder (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo scientific); ON = supernatant odebraný před purifikací; 1 = Flowthrough; 2 = Flowthrough; 3 = Wash; 4 = Wash; 5 = Elution; 6 = Elution; 7 = Elution; 8 = Elution. Šipkou je označen prominentní signál BdCDPK5. Protilátka Anti-His₆-Peroxidase (1:20 000); Chemiluminescence (Clarity ECL, ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad).



Obrázek 12: Purifikace: 4 – 20% Tris/Glycine SDS-PAGE frakcí purifikovaných na Ni²⁺ IMAC FF Sepharose. Vizualizace TGX Stain-free gelu – tzv. loading kontrola. M = Ladder (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo scientific); ON = supernatant odebraný před purifikací; 1 = Flowthrough; 2 = Flowthrough; 3 = Wash; 4 = Wash; 5 = Elution; 6 = Elution; 7 = Elution; 8 = Elution. Šipkou je označen prominentní signál BdCDPK5 (81kDa). Stain-Free technologie (TGX Stain-Free™, ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad).

Nejvíce BdCDPK5 se nacházelo ve frakci 5 a 6 pocházející z fáze Elution. Tyto frakce byly poté analyzovány pomocí hmotnostní spektroskopie MALDITOF, provedená Mgr. Filipem Dyčkou, PhD., která identifikovala sekvenační pokrytí frakce 5 na 36,7% s počtem identifikovaných peptidů 23, a frakce 6 na 41,4% s počtem identifikovaných peptidů 25. Tento výsledek potvrdil, že obě frakce představují purifikovaný BdCDPK5. Z výsledků je zřejmé, že ve fázi Elution došlo k eluci i velkého množství jiných proteinů navázaných na kolonu a purifikace tak nebyla zcela specifická.

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFTPRMKNESTVPSNVA^{STVSSNQRYV}
 CASVHPRDPQCSK^{TTFSQHQYQY}GKAVA^{EKSEMP}THHKVNPRSGPPNDPDCGSI^{SLELPP}
 NAVDHIQHVKNACWQH^{DRMYNHDNRNKKIQHCGDNVDCRQPPMARHGSTECKSEKHMLR}
 AAVS^{MDSQTRPVYNSLCTKCMPEEDKITKGFTGLLIQTPIFNYVNEPKPQSSRDVTPTFD}
 RSLLIHETALVDGMSINDVYEL^{YSHRLGKGSYGV}LKACHRETGEVKAVK^{VIRKASIENA}
 MRMKREIAIMK^{TLDHPNIVK}LLEVYEDEECLYLV^{MEMCSGGELFDEIVRRGCFSE}DYAAT
 VMRQIFSAISYCHGKSILHRDLK^{PENILYANKNNDSP}IKVIDWGFATKCRKAHKFHTLVG
 TPYYVAPEVLLGNYDKSCDIWSAGVILFIMLVGYPPFHGNDNATILRN^{VKRG}TINFVPHH
 WKNISKSAIDLITRCLSYDPRYRITAKAAFN^{HEWILQKATS}IYVSPVLRQSLTKDLVKRF
 QKFDQYNSMKRLALTCIAH^{LSMDIGPLSTAFEVLNMEGNGVLYVKDIVKGLQNDKARG}
 QYDPAMESLLENLDTNGNGAIDYVEFIAASMEQDVYMQKDFCMKAFK^{VFDLEGQGVITRE}
 NMRKVFQCDMSRGEFSDDFVEE^{IFNEVDLDRDGVINYTDFCTM}LYGLSRPGDVATLD

Obrázek 13: MALDITOF frakce 5. Hmotnostní spektroskopie odhalila sekvenační pokrytí (sequence coverage) 36,7% a počet identifikovaných peptidů (protein sequences) 23 (červené označení).

MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHPFTPRMKNESTVPSNVA^{STVSSNQRYV}
 CASVHPRDPQCSK^{TTFSQHQYQY}GKAVA^{EKSEMP}THHKVNPRSGPPNDPDCGSI^{SLELPP}
 NAVDHIQHVKNACWQH^{DRMYNHDNRNKKIQHCGDNVDCRQPPMARHGSTECKSEKHMLR}
 AAVS^{MDSQTRPVYNSLCTKCMPEEDKITKGFTGLLIQTPIFNYVNEPKPQSSRDVTPTFD}
 RSLLIHETALVDGMSINDVYEL^{YSHRLGKGSYGV}LKACHRETGEVKAVK^{VIRKASIENA}
 MRMKREIAIMK^{TLDHPNIVK}LLEVYEDEECLYLV^{MEMCSGGELFDEIVRRGCFSE}DYAAT
 VMRQIFSAISYCHGKSILHRDLK^{PENILYANKNNDSP}IKVIDWGFATKCRKAHKFHTLVG
 TPYYVAPEVLLGNYDKSCDIWSAGVILFIMLVGYPPFHGNDNATILRN^{VKRG}TINFVPHH
 WKNISKSAIDLITRCLSYDPRYRITAKAAFN^{HEWILQKATS}IYVSPVLRQSLTKDLVKRF
 QKFDQYNSMKRLALTCIAH^{LSMDIGPLSTAFEVLNMEGNGVLYVKDIVKGLQNDKARG}
 QYDPAMESLLENLDTNGNGAIDYVEFIAASMEQDVYMQKDFCMKAFK^{VFDLEGQGVITRE}
 NMRKVFQCDMSRGEFSDDFVEE^{IFNEVDLDRDGVINYTDFCTM}LYGLSRPGDVATLD

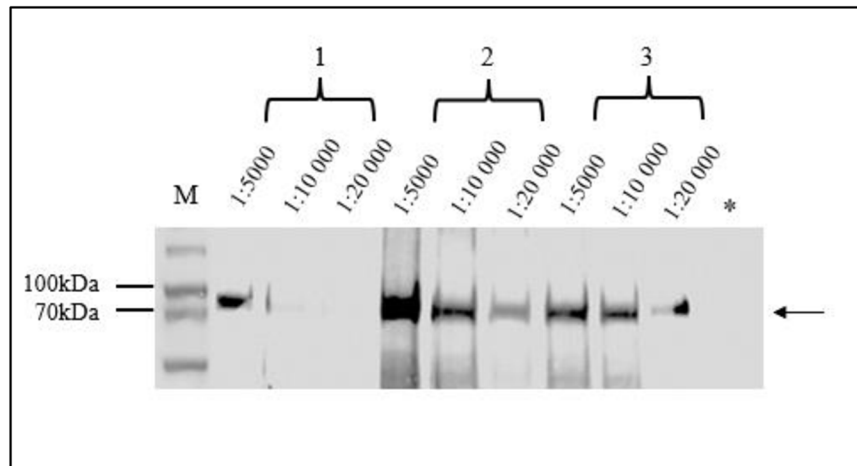
Obrázek 14: MALDITOF frakce 6. Hmotnostní spektroskopie odhalila sekvenační pokrytí (sequence coverage) 41,4% a počet identifikovaných peptidů (protein sequences) 25 (červené označení).

4.4 Refolding: Step-down dialýza

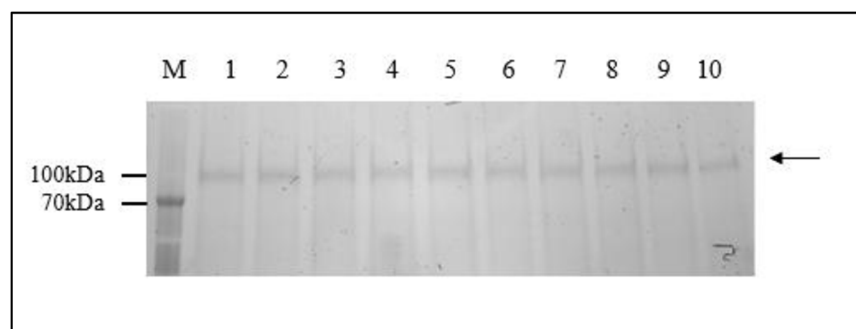
BdCDPK5 byla refoldována do nativního stavu pomocí step-down dialýzy, kdy došlo k postupnému snižování koncentrace denaturačního činidla (8M močoviny) postupným dvojnásobným ředěním, pufrům C bez močoviny a v závěru byl protein dialyzován proti čistému pufru C s obsahem 10% glycerolu. Součástí pufru C byl také 2mM β -merkaptoetanol, jehož přirozenou vzdušnou oxidací dochází k postupnému párování cysteinových můstků a tvorbě správné 3D struktury BdCDPK5. Výsledný protein byl centrifugován k odstranění případných precipitátů, supernatant byl odebrán a byla změřena jeho koncentrace pomocí eseje Bradfordové. Výsledný rekombinantní ,BdCDPK5 o koncentraci 0,305 mg byl uskladněn pro další použití při -20 °C.

4.5 Imunizace - získání protilátek

,BdCDPK5 o koncentraci 0,305mg byl naředěn v PBS a smíchán byl společně s kompletním Freundovým adjuvans při první imunizaci, nekompletním Freundovým adjuvans u ostatních imunizací, pro zvýšení imunogenity a intraperitoneálně podán 3 myším ve 4 imunizačních dávkách. Získané krevní sérum ze všech myší bylo testováno pomocí Western blotu za použití sekundární protilátky značené HRP a chemiluminiscenční detekce substrátem Clarity ECL (Bio-Rad) (Obrázek 13). Byly detekovány specifické signály odpovídající přítomnosti polyklonálních protilátek reagujících na rekombinantní BdCDPK5. Síla výsledných signálů pozitivně korelovala s použitými koncentracemi séra. Nejsilnější imunitní odpověď se vyvinula u myši 2, která vykazovala signál i při zředění primární protilátky 1:20 000.



Obrázek 15: Imunizace myši: imunochemická detekce polyklonálních protilátek proti BdCDPK5 za použití sekundární protilátky Goat Anti-Mouse IgG Antibody, Peroxidase Conjugated, H+L. Testování imunního séra na přítomnost polyklonálních protilátek proti rekombinantnímu BdCDPK5. Imunní sérum z každé myši bylo ředěno 1:5000, 1:10 000 a 1:20 000 pro stanovení nejsilnější imunitní reakce. M = Ladder (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo scientific); 1 = myš 1; 2 = myš 2; 3 = myš 3. Hvězdičkou je označena kontrola bez primární protilátky. Šipkou je označen prominentní signál BdCDPK5 (81kDa). Sekundární protilátka Goat Anti-Mouse IgG Antibody, Peroxidase Conjugated, H+L (1:3 000); Chemiluminescence (Clarity ECL, ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad).



Obrázek 16: Imunizace myši: 4 – 20% Tris/Glycine SDS-PAGE BdCDPK5. Vizualizace TGX Stain-free gelu jako loading kontroly. M = Ladder (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo scientific); 1 – 10 = BdCDPK5. Šipkou je označen prominentní signál BdCDPK5 (81kDa). Free technologie (TGX Stain-Free™, ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad).

5 Diskuze

Tato práce se věnuje přípravě rekombinantního proteinu BdCDPK5. CDPK5 patří do rodiny kalcium dependentních protein kináz (CDPKs), které se podílejí na přenosu vápníkem zprostředkovaných odpovědí u všech sledovaných zástupců kmene Apicomplexa a jsou důležité pro vývojový cyklus parazita (Sharma et al., 2021). Jejich zásadní role v biologii Apicomplexa poukazuje na důležitost popsání jednotlivých kináz také u babesii, a naznačuje potenciál jednotlivých kináz jakožto terapeutického cíle pro specifické inhibitory. Na základě výsledků z Elsworth et al. (2023) může zatím o BdCDPK5 říci, že se zdá být neesenciální pro krevní stádia parazita. Přesná funkce BdCDPK5 zatím není jasná, ale u orthologů této kinázy byla potvrzena účast při egressu u *P. falciparum* a *C. parvum* (Zhang et al., 2015; Dvorin et al., 2010). Naše předběžné výsledky ukazují, že by mohla být důležitá pro klíčící stádia (Ana Maria Filipe, ústní sdělení, dosud nepublikováno). Proto bylo hlavním cílem méj bakalářské práce vytvořit rekombinantní protein BdCDPK5, aby mohla být dále zkoumána její funkce a struktura.

Pro zaklonování a plifikovaného genu kódujícího BdCDPK5 byl zvolen bakteriální směrový klonovací vektor pET100/DTOPO®, pro indukovatelnou expresi proteinu s 6×His-Tag na N-konci, jelikož nese velmi silný promotor T7 pro vysokou míru exprese proteinu a zároveň obsahuje lac operator pro přidanou regulaci bazální exprese (Terol et al., 2021). Klonovací vektory pET jsou standartně používány pro expresi rekombinantních CDPKs u jiných Apicomplexa například u *P. vivax* (Choi et al., 2010) nebo *C. parvum* (Su et al. 2022; Zhang et al., 2021). Jako buňky pro produkci plasmidu byly zvoleny kompetentní buňky NEB® 5-alpha Competent *E. coli*, s nimiž má naše laboratoř Molekulární biologie klíš'at, PaU BC AVČR dobré zkušenosti při produkci různých plasmidů. Tyto buňky jsou konstruovány s delecí v reparačních genech zapojených do opravy DNA, jejichž absence jim umožňuje být více ochotnými k přijetí cizí DNA a snižuje výskyt nechtěných rekombinačních událostí, které by mohly změnit nebo narušit integritu plazmidové DNA (Phue et al., 2008).

Pro expresi BdCDPK5 byly zvoleny expresní buňky One Shot™ BL21 Star™ (DE3) Chemically Competent *E. coli*, které jsou dodávány jako součást použitého Champion™ pET100 Directional TOPO™ expresního kitu pro produkci rekombinantních proteinů (Thermo Fisher). Byly použity například pro expresi CDPK5 u *T. gondii* (Zhang et al., 2014) nebo CDPK3 u *P. falciparum* (Andresen et al., 2017). Jejich výhodou je nízká produkce endogenních proteinů, vysoká úroveň proteinové exprese díky přítomnosti fágové T7 RNA polymerázy a na rozdíl od kmene NEB® 5-alpha nejsou senzitivní k růstovým podmínkám jako je například

vysoká koncentrace glukózy (Rosano et al., 2019; Phue et al., 2008). K indukci exprese kaskádového systému T7 RNA polymerázy, který následně transkribuje cílový gen regulovaný T7 promotorem je potřeba dereprese laktózového operonu nemetabolizovaným analogem laktózy isopropyl- β -D-thiogalaktosidem (Donovan et al., 1996). Tento systém nám umožňoval plnou kontrolu nad indukcí syntézy proteinů s vysokou selektivitou.

Výhodou exprese proteinů v *E. coli* jsou nízké náklady na kultivaci, rychlý růst a vysoká míra exprese cílového proteinu. Nevýhodou je nemožnost posttraslační modifikace, častá tvorba inkluzních tělísek, neúčinná translokace proteinů nebo metabolická zátěž, která může být často způsobena právě přítomností T7 promotoru (Lozano Terol et al., 2021). Nadprodukce proteinů v cytoplazmě *E. coli* je často doprovázena jejich nesprávným skládáním a segregací do nerozpustných agregátů známých jako inkluzní tělíska, která obsahují rekombinantní protein o vysoké čistotě, jsou ale biologicky neaktivní. Ačkoli tvorba inkluzních tělísek může značně zjednodušit purifikaci proteinů, není zaručeno, že refolding navrátí jejich biologickou aktivitu (Yamaguchi et al., 2012; Baneyx, 1999). Pravděpodobnost tvorby inkluzních tělísek se zvyšuje použitím silného promotoru, vysoké koncentrace induktoru či použití vysoké kultivační teploty (Baneyx & Mujacic, 2004).

Při pilotní expresi bylo simulováno několik podmínek pro zjištění optimální podmínky pro large scale expresi. Snažili jsme se o výběr dvou podmínek, z nichž jedna povede k expresi solubilního proteinu a druhá k expresi proteinu do inkluzních tělísek. Pro vznik solubilního rekombinantního proteinu byla vybrána T_{ON}; 0,1mM IPTG, 17°C a pro expresi do inkluzních tělísek podmínka T1; 0,1mM IPTG, 37°C. Obě tyto podmínky byly vybrány na základě Western blot analýzy peletu z pilotní exprese, jelikož vykazovaly největší množství exprimované BdCDPK5 v rámci své kultivační teploty (Obrázek 8). Solubilní protein jsme se snažili vytvořit zvolením podmínek při snížené teplotě i koncentrace IPTG, ale neúspěšně. Protomor T7 je zřejmě příliš silný na to, aby nedošlo k tvorbě inkluzních tělísek. Exprese při 37°C se též ukázala jako nevhodná pro large scale expresi, jelikož došlo k vytvoření jen malého množství rekombinantního proteinu, zřejmě v důsledku krátké expresní doby. Jako další podmínka byla vybrána T_{ON}; 0,1mM IPTG; 37°C u které jsme díky silnému promotoru, vysoké teplotě a dlouhé době exprese předpokládali, že vzniklý protein bude exprimován do inkluzních tělíscích. Stejným způsobem byla provedena large scale exprese CDPK5 u *T. gondii* v Zhang et al. (2014), kde vzniklý protein byl též ve formě inkluzních tělísek.

Izolace inkluzních tělísek z indukovaných buněk *E.coli* a následná metalochelatační afinitní chromatografie (IMAC) za denaturačních podmínek je zavedeným protokolem v laboratoři Molekulární biologie klíštat, PaU BC AVČR, kde byly pokusy prováděny

a v minulosti byl použit například pro produkci klíčící aspartové proteázy IrCD1 (Sojka et al., 2012; Hánová et al., 2018). 6×His-Tag je hojně používanou purifikační značkou díky tendenci neovlivňovat rozpustnost, konformaci nebo biologickou aktivitu cílového proteinu a zároveň může být selektivně odstraněna endopeptidázami nebo exopeptidázami (Mooney et al., 2015). Histidin je navíc aminokyselinou s nejsilnější afinitou ke kovovým iontům. Ionty niklu slouží jako chelatační činidlo, které selektivně váže proteiny s His-Tag, ale také další aminokyseliny, včetně cysteinu a tryptofanu. Tato vlastnost umožňuje Ni^{2+} interakci s širokým spektrem proteinů, což je užitečné pro zachycení různých cílových proteinů. Ionty niklu vykazují v IMAC střední sílu retence. Mohou se tak vázat na proteiny s dostatečnou afinitou pro čištění, ale bez příliš silných interakcí, které by mohly vést k nespecifickému vázání nebo agregaci. Tento rovnovážný stav mezi afinitou a selektivitou je důležitý pro dosažení vysoké čistoty v čištěných frakcích proteinů (Ueda et al., 2003).

Proteiny navázané na kolonu byly postupně vymývány stoupajícím koncentračním gradientem imidazolu až do koncentrace 0,5M. Imidazol je běžně používán jako eluční činidlo v metalochelatační afinitní chromatografii (IMAC), protože má schopnost konkurovat hexahistidinové purifikační značce (His-Tagu) o vazbu k nikelnatým iontům (Ni^{2+}), kterými je kolona při IMAC naplněna. Alternativně lze proteiny eluovat pomocí klesajícího pH gradientu či pomocí chelatační sloučeniny, jako je EDTA, která ale neselektivně eluuje všechny proteiny spolu s použitými kovovými ionty (Li et al., 2018; Ueda et al., 2003). Největší koncentraci BdCDPK5 jsme předpokládali v poslední fázi Elution, kdy dochází k vymývání nejsilněji navázaných proteinů na kolonu. Z výsledků bylo zřejmé, že v této fázi došlo k eluci BdCDPK5, ale i velkého množství jiných proteinů navázaných na kolonu a purifikace tak nebyla zcela specifická. Jelikož je ale purifikace založena na interakci mezi imidazolem, histidinem a ionty niklu, mohly být zachyceny i jiné proteiny s oblastmi bohatými na histidin a cystein, což mohlo mít za následek sníženou selektivitu purifikace vůči His-tagem značeným proteinům. Ačkoli by tento problém mohl být částečně obejit tandemovou purifikační strategií s použitím různých afinitních značek a tandemových purifikačních kroků, mohlo by jejich zavedení zvýšit riziko změny struktury rekombinantních proteinů. Další purifikační kroky mohou také vést ke snížení výtěžnosti cílových proteinů (Li et al., 2018).

Jelikož jsme pro solubilizaci inkluzních tělísek použili vysoké koncentrace denaturačních činidel, při refoldingu muselo dojít k jejich řízenému odstranění. K refoldingu byla zvolena postupná (step-down) dialýza, kdy docházelo k umělému sbalování denaturovaného purifikovaného proteinu postupným snižováním koncentrace denaturačního činidla. Step-down refolding zahrnuje ředění denaturačního činidla v intervalech dostatečně dlouhých pro

stabilizaci proteinu, tak, aby postupně mohl obnovit svou správnou prostorovou strukturu (Yamaguchi & Miyazaki, 2014). Postupné snižování koncentrace denaturačního činidla zabraňuje nežádoucím efektům, jako je agregace proteinů nebo nesprávné skládání, které by mohlo nastat při rychlém snižování koncentrace, jako je tomu často u one-step dialýzy (Yamaguchi & Miyazaki, 2014; Li et al., 2004). Pro refolding byl použit β -merkaptoetanol, který štěpí disulfidové můstky v denaturovaných proteinech, pomáhá otevřít strukturu proteinu a umožňuje, aby se protein po odstranění denaturačního činidla přirozeně složil do své správné, biologicky aktivní konformace. Koncentrace použitého denaturačního činidla, 8M močoviny, díky postupnému ředění pufru B obsahujícího močovinu, pufrům C bez močoviny, snížila její koncentraci až na nulovou hodnotu (Tabulka VI).

Refoldovaný protein byl použit jako antigen pro imunizaci. Společně s kompletním a nekompletním Freundovým adjuvans, pro zvýšení imunogenity, byl intraperitoneálně podán 3 myším celkově ve 4 imunizacích. Myš 2, která vykazoval nejsilnější imunitní odpověď, byla vybrána pro tvorbu monoklonálních protilátek spolupracující laboratoří. Polyklonální protilátky vůči BdCDPK5 budou dále využívány naší laboratoří. Obdobným způsobem bylo docíleno vzniku polyklonálních protilátek proti CDPK4, CDPK5 a CDPK6 u *C. parvum* (Zhang et al., 2021) či specifického antiséra proti CDPK4 u *P. vivax* (Choi et al., 2010). Jelikož k imunizacím sloužil denaturovaný protein, není jisté proti jakým epitopům proteinu se protilátky vytvořily. Jelikož úspěšnost refoldingu do správné konformace jsme nijak nepotvrdili, mohlo dojít k vytvoření protilátek proti epitopům, které u dobře sbaleného proteinu nejsou protilátkám přístupné a naopak. Zůstává tedy otázkou zda budou afinní také k nativnímu BdCDPK5 v krevních stádiích parazita. Polyklonální sérum tak může být v tomto případě výhodou, jelikož vzniklé protilátky proti vícero epitopům mohou ne zcela správný refolding proteinu „obejít“.

Mnou vytvořený rekombinantní protein BdCDPK5 může dále sloužit k biochemické charakterizaci a zkoumání 3D proteinové struktury. Biochemickou charakterizaci nyní již testujeme pomocí enzymatických esejí MaxGlow (Promega). Dále můžeme zkoumat její 3D strukturu po další purifikaci a obohacení. BdCDPK5 můžeme také použít ke zkoumání efektu specifických inhibitorů CDPKs, tzv. Bumped Kinase Inhibitors (BKIs) na její funkci a tím zjistit co přesně v cyklu babesii zajišťuje. Příprava polyklonálních a následně i monoklonálních protilátek má velký smysl pro budoucí použití v imunomikroskopii, jakožto specifické značení BdCDPK5 a její lokalizace v parazitovi, pro konfokální i elektronovou mikroskopii, či pro ověření knock-out linie parazitů, kterou se v laboratoři snažíme vytvořit.

6 Závěr

- Provedla jsem stručnou literární rešerši na téma charakterizace a funkce kalcium-dependentních proteinkináz (CDPKs) se zaměřením na CDPK5 u parazitů ze skupiny Apicomplexa
- Vytvořila jsem rekombinantní *Babesia divergens* CDPK5 (BdCDPK5)
 - Zaklonovala jsem gen pro BdCDPK5 do expresního vektoru
 - Optimalizovala jsem podmínky pro large scale expresi
 - Purifikovala jsem rekombinantní protein BdCDPK5 pomocí afinitní chromatografie
- Imunizovala jsem myši purifikovaným a refoldovaným rekombinantním proteinem BdCDPK5 pro produkci polyklonálních protilátek a potvrdila jsem přítomnost polyklonálních protilátek v séru imunizovaných myši

7 Literatura

- Absalon, S., Blomqvist, K., Rudlaff, R. M., DeLano, T. J., Pollastri M. P., Dvorin, J. D. (2018). Calcium-Dependent Protein Kinase 5 Is Required for Release of Egress-Specific Organelles in *Plasmodium falciparum*. *American Society for Microbiology*, 9(1). <https://doi.org/10.1128/mbio.00130-18>
- Andresen, C., Niklasson, M., Cassman Eklöf, S., Wallner, B., Lundström, P. (2017). Biophysical characterization of the calmodulin-like domain of *Plasmodium falciparum* calcium dependent protein kinase 3. *PLOS ONE* 12(7), 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181721>
- Anantharaman, A., Iyer, L. M., Balaji, S., Aravind, L. (2007). Adhesion Molecules and Other Secreted Host-Interaction Determinants in Apicomplexa: Insights from Comparative Genomics. *International Review of Cytology*, 262, 1-74. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)62001-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)62001-4)
- Arisue, N., & Hashimoto, T. (2015). Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitology International*, 64(3), 254-259. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.10.005>
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 411-421. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00003-8)
- Baneyx, F., & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1399-1408. <https://doi.org/10.1038/nbt1029>
- Bansal, A., Singh, S., More, K. R., Hans, D., Nangalia, K., Yogavel, M., Sharma, A., Chitnis, Ch. E. (2013). Characterization of *Plasmodium falciparum* Calcium-dependent Protein Kinase 1 (PfCDPK1) and Its Role in Microneme Secretion during Erythrocyte Invasion*. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 1590-1602. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.411934>
- Bansal, A., Molina-Cruz, A., Brzostowski, J., Mu, J., Miller, L.H. (2017). *Plasmodium falciparum* Calcium-Dependent Protein Kinase 2 Is Critical for Male Gametocyte Exflagellation but Not Essential for Asexual Proliferation. *American Society for Microbiology*, 8(5). <https://doi.org/10.1128/mbio.01656-17>
- Beugnet, F., & Morea, Y. (2015). Babesiosis. *Scientific and Technical Review*, 34(2), 627-639. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2385>

- Billker, O., Lourido, S., Sibley, L. D. (2009). Calcium-Dependent Signaling and Kinases in Apicomplexan Parasites. *Cell Host and Microbe*, 5(6), 612-622. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.05.017>
- Bock, R. E., Jackson, L., Vos, A. J., Jorgensen, W. K. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129, 247-269. doi: 10.1017/S0031182004005190
- Bonam S. R., Renia, L., Tadepalli, G., Bayry, J., Kumar, H. M. S. (2021). *Plasmodium falciparum* Malaria Vaccines and Vaccine Adjuvants. *Vaccines*, 9(10), 1072. <https://doi.org/10.3390/vaccines9101072>
- Carey, C. M., Lee, H., Trevors, J. T. (2004). Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. *Water Research*, 38(4), 818-862. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.012>
- Chaabene, B. R., Lentini, G., Soldati-Favre D. (2021). Biogenesis and discharge of the rhoptries: Key organelles for entry and hijack of host cells by the Apicomplexa. *Molecular Microbiology*, 115, 453–465. <https://doi.org/10.1111/mmi.14674>
- Chandran, V., Stollar, E. J., Lindorff-Larsen, K., Harper, J. F., Chazin, W. J., Dobson, Ch. M., Luisi, B. F., Christodoulou, J. (2006). Structure of the Regulatory Apparatus of a Calcium-dependent Protein Kinase (CDPK): A Novel Mode of Calmodulin-target Recognition. *Journal of Molecular Biology*, 357(2), 400-410. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.093>
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, 40(2), 37. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>
- Choi, K.-M., Kim, J.-Y., Moon, S.-U., Lee, H.-W., Sattanbongkot, J., Na, B.-K., Kim, Y.-J., Cho, S.-H., Lee, H.-S., Rhie, H.- G., Kim, T.-S. (2010). Molecular Cloning of *Plasmodium vivax* Calcium-Dependent Protein Kinase 4. *Korean J Parasito*, 48(4), 319-324. <https://doi.org/10.3347/kjp.2010.48.4.319>
- Cooke, B. M., Mohandas, N., Cowman, A. F., Coppel, R. L. (2005). Cellular adhesive phenomena in apicomplexan parasites of red blood cells. *Veterinary Parasitology*, 132, 273-295. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.002>

Cova, M. M., Lamarque, M. H., Lebrun, M. (2022). How Apicomplexa Parasites Secrete and Build Their Invasion Machinery. *Annual Review of Microbiology*, 76, 619-640. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041320-021425>

Djokic, V., Rocha, S. C., Parveen, N. (2021). Lessons Learned for Pathogenesis, Immunology, and Disease of Erythrocytic Parasites: *Plasmodium* and *Babesia*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 2235-2988. Doi=10.3389/fcimb.2021.685239

Donovan, R. S., Robinson, C. W., Glick, B. R. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 16(3), 145–154, <https://doi.org/10.1007/BF01569997>

Drews, S. J., Kjemtrup, A. M., Krause, P. J., Lambert, G., Leiby, D. A., Lewin, A., O'Brien, S. F., Renaud, C., Tonnetti, L., & Bloch, E. M. (2023). Transfusion-transmitted *Babesia* spp.: a changing landscape of epidemiology, regulation, and risk mitigation. *Journal of clinical microbiology*, 61(10). <https://doi.org/10.1128/jcm.01268-22>

Dubremetz, J. F., Garcia-Réguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M. N. (1998). Invited review Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *International Journal for Parasitology*, 28(7), 1007-1013. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00076-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00076-9)

Dvorin, J. D., Martyn, D. C., Patel, S. D., Grimley, J. S., Collins, Ch. R., Hopp, Ch. S., Bright, A. T., Westenberger, S., Winzeler, E., Blackman, M. J., Baker, D. A., Wandless, T. J., Duraisingh, M. T. (2010). A Plant-Like Kinase in *Plasmodium falciparum* Regulates Parasite Egress from Erythrocytes. *Science*, 328, 910-912. DOI:10.1126/science.1188191

Elsworth B., & Duraisingh M. T. (2021). A framework for signaling throughout the life cycle of *Babesia* species. *Molecular Microbiology*, 115, 882–890. <https://doi.org/10.1111/mmi.14650>

Elsworth, B., Keroack, C., Rezvani, Y., Paul, A., Barazorda, K., Tennessen, J., Sack, S., Moreira, C., Gubbels, M. J., Meyers, M., Zarringhalam, K., & Duraisingh, M. (2023). *Babesia divergens* egress from host cells is orchestrated by essential and druggable kinases and proteases. *Research square*, rs.3.rs-2553721. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2553721/v1>

Fanelli, A. (2021). A historical review of *Babesia* spp. associated with deer in Europe: *Babesia divergens/Babesia divergens*-like, *Babesia capreoli*, *Babesia venatorum*, *Babesia cf. Odocoilei*. *Veterinary Parasitology*, 294. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109433>

- Filipe A. M., Levytska, V., Jalovecka, M. (2023). *Babesia divergens*. Trends in Parasitology, 40, 271-272. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.11.008>
- Fleige, T., Limenitakis, J., Soldati-Favre, D. (2010). Apicoplast: keep it or leave it. Microbes and Infection, 12(4), 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.12.010>
- Florin-Christensen, & M., Schnittger, L. (2009). Piroplasmids and ticks: a long-lasting intimate relationship. Frontiers in Bioscience-Landmark, 14(8), 3064–3073. <https://doi.org/10.2741/3435>
- Foth, B. J., & McFadden, G. I. (2003). The apicoplast: A plastid in *Plasmodium falciparum* and other apicomplexan parasites. International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, 224, 57-110. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)24003-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)24003-2)
- Garcia, J. L. (2009). Vaccination concepts against *Toxoplasma gondii*. Expert Review of Vaccines, 8(2), 215-225. <https://doi.org/10.1586/14760584.8.2.215>
- Ghartey-Kwansah, G., Yin, Q., Li, Z., Gumper, K., Sun, Y., Yang, R., Wang, D., Jones, O., Zhou, X., Wang, L., Bryant, J., Boampong, J. N., Xu, X. (2020). Calcium-dependent Protein Kinases in Malaria Parasite Development and Infection. Cell Transplantation, 29, 0963689719884888. <https://doi.org/10.1177/0963689719884888>
- Goethert, H. K., & Telford, S. R. (2003). What is *Babesia microti*? Parasitology, 127(4), 301-309. doi:10.1017/S0031182003003822
- Goethert, H. K. (2021). What *Babesia microti* is now. Pathogens, 10(9), 1168. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091168>
- Govindasamy, K., & Bhanot, P. (2020). Overlapping and distinct roles of CDPK family members in the pre-erythrocytic stages of the rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*. PLOS Pathogens, 16, 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008131>
- Gray, J. S., Estrada-Peña, A., Zintl, A. (2019). Vectors of Babesiosis. Annual Review of Entomology, 64, 149-165. doi: 10.1146/annurev-ento-011118-111932
- Hakimi, H., Templeton, T. J., Sakaguchi, M., Yamagishi, J., Miyazaki, S., Yahata, K., Uchihashi, T., Kawazu, S., Kaneko, O., Asada, M. (2020). Novel *Babesia bovis* exported proteins that modify properties of infected red blood cells. PLOS Pathogens, 16(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008917>

- Hanova, I., Brynda, J., Houstecka, R., Alam, N., Sojka, D., Kopacek, P., Maresova, L., Vondrasek, J., Horn, M., Schueler-Furman, O., Mares, M. (2018). Novel Structural Mechanism of Allosteric Regulation of Aspartic Peptidases via an Evolutionarily Conserved Exosite. *Cell Chemical Biology*, 25(3), 318-329. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.01.001>
- Harmon, A. C., Gribskov, M., Gubrium, E. and Harper, J.F. (2001). The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist*, 151, 175-183. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00171.x>
- Hildebrandt, A., Gray, J. S., Hunfeld, K. P. (2013). Human Babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection*, 41, 1057–1072. <https://doi.org/10.1007/s15010-013-0526-8>
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S. R., Krause, P. J., Persing, D. H. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451–469. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.3.451-469.2000>
- Hunfeld, K. P., Hildebrandt, A., Gray, J. S. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1219-1237, <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.001>
- Hussein, H. E., Johnson, W. C., Taus, N. S., Capelli-Peixoto, J., Suarez, C. E., Mousel, M. R., Ueti, M. W. (2021). Differential expression of calcium-dependent protein kinase 4, tubulin tyrosine ligase, and methyltransferase by xanthurenic acid-induced *Babesia bovis* 49 sexual stages. *Parasites & Vectors*, 14(1), 395. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04902-3>
- Hussain, S., Hussain, A., Aziz, M.U., Song, B., Zeb, J., George, D., Li, J., Sparagano, O. A. (2022). Review of Zoonotic Babesiosis as an Emerging Public Health Threat in Asia. *Pathogens*, 11(1), 23. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010023>
- Ingram, J. R., Knockenhauer, K. E., Markus, B. M., Mandelbaum, J., Ramek, A., Shan, Y., Shaw, D. E., Schwartz, T. U., Ploegh, H. L., Lourido, S. (2015). Allosteric activation of apicomplexan calcium-dependent protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 4975-4984. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505914112>
- Jackson, A. P., Otto, T. D., Darby, A., Ramaprasad, A., Xia, D., Echaide, I. E., Farber, M., Gahlot, S., Gamble, J., Gupta, D., Gupta, Y., Jackson, L., Malandrin, L., Malas, T. B. et. all. (2014). The evolutionary dynamics of variant antigen genes in *Babesia* reveal a history of genomic innovation underlying host–parasite interaction, *Nucleic Acids Research*, 42, 7113-7131. <https://doi.org/10.1093/nar/gku322>

Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Malandrini, L. (2018). The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00248>

Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., Schnittger, L. (2019). Babesia Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. *Trends in Parasitology*, 35(5), 356–368. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>

Jerzak, M., Gandurski, A., Tokaj, M., Stachera, W., Szuba, M., Dybicz, M. (2023). Advances in Babesia Vaccine Development: An Overview. *Pathogens*, 12(2), 300. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020300>

Keyloun, K. R., Reid, M. C., Choi, R., Song, Y., Fox, A. M. W., Hillesland, H. K., Zhang, Z., Vidadala, R., Merritt, E. A., Lau, A. O. T., Maly, D. J., Fan, E., Barrett, L. K., Van Voorhis, W. C., Ojo, K. K., Hemphill, A. (2014). The gatekeeper residue and beyond: Homologous calcium-dependent protein kinases as drug development targets for veterinarian apicomplexa parasites. *Parasitology*, 141(11). <https://doi.org/10.1017/S0031182014000857>

Kjemtrup, A. M., & Conrad, P. A. (2000). Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *International Journal for Parasitology*, 30, 1323-1337. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00137-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00137-5)

Kjemtrup, A. M., & Conrad, P. A. (2006). A review of the small canine piroplasms from California: *Babesia conradae* in the literature. *Veterinary Parasitology*, 138, 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.045>

Krause, P. J. Human babesiosis. (2019). *International Journal for Parasitology*, 49(2), 165-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.007>

Kumar A., O'Bryan J., Krause P. J. (2021). The Global Emergence of Human Babesiosis. *Pathogens*, 10(11), 1447. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111447>

Laurent, F., McCole, D., Eckmann, L., Kagnoff, M. F. (1999). Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes and Infection*, 1(2), 141-148. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)80005-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)80005-7)

Li, M., Su, Z.-G., Janson, J-Ch. (2004). In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expression and Purification*, 33(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2003.08.023>

- Li, S., Yang, K., Liu, L., Zhao, B., Chen, Y., Li, X., Zhang, L., Zhang, Y. (2018). Surface sieving coordinated IMAC material for purification of His-tagged proteins. *Analytica Chimica Acta*, 997, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.021>
- Liese, A., Romeis, T. (2013). Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(7), 1582-1589. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.10.024>
- Lobo, C. A., Cursino-Santos J. R., Singh, M., Rodriguez, M. (2019). *Babesia divergens*: A Drive to Survive. *Pathogens*, 8(3), 95. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030095>
- Lourido, S., Tang, K., Sibley, L. D. (2012). Distinct signalling pathways control *Toxoplasma* egress and host-cell invasion. *The EMBO Journal*, 31(24), 4524-4534. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.299>
- Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2021). Impact of the Expression System on Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in microbiology*, 12, 682001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>
- Miranda-Saavedra, D., Gabaldon, T., Barton, G. J., Langsley, G., Doerig, Ch. (2012). The kinomes of apicomplexan parasites. *Microbes and Infection*, 14(10), 796-810. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.04.007>
- Mooney, J. T., Fredericks, D. P., Christensen, T., Schiødt, Ch. B., Hearn, M. T. W. (2015). N-terminal processing of affinity-tagged recombinant proteins purified by IMAC procedures. *Journal of Molecular Recognition*, 28(7), 401-412. <https://doi.org/10.1002/jmr.2456>
- Nagamune, K., & Sibley, L., D. (2006). Comparative Genomic and Phylogenetic Analyses of Calcium ATPases and Calcium-Regulated Proteins in the Apicomplexa. *Molecular Biology and Evolution*, 23(8), 1613–1627. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl026>
- Ord, R. L., & Lobo, C. A. (2015). Human Babesiosis: Pathogens, Prevalence, Diagnosis, and Treatment. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2, 173–181. <https://doi.org/10.1007/s40588-015-0025-z>
- Orkun, Ö. (2019). Molecular investigation of the natural transovarial transmission of tick-borne pathogens in Turkey. *Veterinary Parasitology*, 273, 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.013>

- Penzhorn B. L., & Oosthuizen, M. C. (2020). Babesia Species of Domestic Cats: Molecular Characterization Has Opened Pandora's Box. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00134>
- Phue J. N., Lee S. J., Trinh L., Shiloach J. (2008). Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5alpha). *Biotechnology and Bioengineering*. 101(4), 831-836. <https://doi.org/10.1002/bit.21973>
- Rai, P., Sharma, D., Soni, R., Khatoon, N., Sharma, B., Bhatt, T. K. (2017). *Plasmodium falciparum* apicoplast and its transcriptional regulation through calcium signaling. *Journal of Microbiology*, 55, 231–236. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6525-1>
- Renard, I., & Mamoun, C. B. (2021). Treatment of Human Babesiosis: Then and Now. *Pathogens*, 10(9), 1120. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091120>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412-1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Rout, S., & Mahapatra, R. K. (2019). In silico analysis of plasmodium falciparum CDPK5 protein through molecular modeling, docking and dynamics. *Journal of Theoretical Biology*, 461, 254-267. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.10.045>
- Schmidt, Ch. Q., Kennedy, A. T., Tham, W. H. (2015). More than just immune evasion: Hijacking complement by *Plasmodium falciparum*. *Molecular Immunology*, 67(1), 71-84. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.03.006>
- Schnittger, L., Rodriguez E. A., Florin-Christensen M., Morrison A. D. (2012). Babesia: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1788-1809. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.004>
- Schnittger, L., Ganzinelli, S., Bhoora, R., Omondi, D., Nijhof, A. M., Florin-Christensen, M. (2022). The Piroplasmida Babesia, Cytauxzoon, and Theileria in farm and companion animals: species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. *Parasitology Research*, 121, 1207–1245. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07424-8>
- Seeber, F., & Soldati-Favre, D. (2010). Metabolic Pathways in the Apicoplast of Apicomplexa. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 281, 161-228. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(10\)81005-6](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(10)81005-6)

- Sharma, M., Choudhury, H., Roy, R., Michaels, S. A., Ojo, K. K., Bansal, A. (2021). CDPKs: The critical decoders of calcium signal at various stages of malaria parasite development. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 5092-5107. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.054>
- Shi, S., Li, S., Asim, M., Mao, J., Xu, D., Ullah, Z., Liu, G., Wang, Q., & Liu, H. (2018). The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinases (CDPKs) and Their Roles in Plant Growth Regulation and Abiotic Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1900. <https://doi.org/10.3390/ijms19071900>
- Sibley, L. D. (2004). Intracellular Parasite Invasion Strategies. *Science*, 304, 248-253. DOI:10.1126/science.1094717
- Singh, S. M., Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303-310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
- Sojka, D., Franta, Z., Frantova, H., Bartosova, P., Horn, M., Vachova, J., O'Donoghue, A. J., Eroy-Reveles, A. A., Craik, C. S., Knudsen, G. M., Caffrey, C. R., McKerrow, J. H., Mares, M., Kopacek, P. (2012). Characterization of Gut-associated Cathepsin D Hemoglobinase from Tick *Ixodes ricinus* (IrCD1)*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), 21152-21163. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.347922>
- Spano, F., & Crisanti, A. (2000). *Cryptosporidium parvum*: the many secrets of a small genome. *International Journal for Parasitology*, 30(4), 553-565. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00188-5)
- Su, J., Shen, Y., Li, N., Li, Y., Zhang, Z., Xiao, L., Guo, Y., Feng, Y. (2022). Comparative Characterization of CpCDPK1 and CpCDPK9, Two Potential Drug Targets Against Cryptosporidiosis. *Microorganisms*, 10(2), 333-341. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020333>
- Suarez, C. E., Alzan, H. F., Silva, M. G., Rathinasamy, V., Poole, W. A., Cooke, B. M. (2019). Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? *International Journal for Parasitology*, 49, 183-197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.002>

- Tanyel, E., Guler N., Hokelek, M., Ulger, F., Sunbul M. (2015). A case of severe babesiosis treated successfully with exchange transfusion. *International Journal Of infectious Diseases*, 38, 83-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.07.019>
- Ueda, E. K. M., Gout, P. W, Morganti, L. (2003). Current and prospective applications of metal ion–protein binding. *Journal of Chromatography A*, 988 (1), 1-23. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)02057-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)02057-5)
- Uilenberg, G. (2006). Babesia-A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138, 3-10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.035>
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories* 3, 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>
- Vial, H. J., & Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 138, 147-160. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.048>
- Vannier, E., Gewurz, B. E., Krause, P. J. (2008). Human babesiosis. *Infectious disease clinics of North America*, 22(3), 469-475. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.03.010>
- Wang, J.-L., Huang, S.-Y., Li, T.-T., Chen, K., Ning, H.-R., & Zhu, X.-Q. (2016). Evaluation of basic functions of six calcium-dependent protein kinases in *Toxoplasma gondii* using CRISPR-Cas9 system. *Parasitology*, 115, 697–702. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4791-6>
- Wang, J.-L., Huang, S.-Y., Zhang, N.-Z., Chen, J., & Zhu, X.-Q. (2015). Genome-wide expression patterns of calcium-dependent protein kinases in *Toxoplasma gondii*. *Parasites & Vectors*, 8(1), 304. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0917-z>
- Wernimont, A. K., Artz, J., Finerty, P., Lin, Y., Amani, M., Allali-Hassani, A., Senisterra, G., Vedadi, M., Tempel, W., Mackenzie, F. et al. (2010). Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium. *Nat Struct Mol Biol* 17, 596–601. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1795>
- Wernimont, A. K., Amani, M., Qiu, W., Pizarro, J.C., Artz, J.D., Lin, Y.-H., Lew, J., Hutchinson, A. and Hui, R. (2011). Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation. *Proteins*, 79, 803-820. <https://doi.org/10.1002/prot.22919>

- Xu, W., & Huang, W. (2017). Calcium-Dependent Protein Kinases in Phytohormone Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2436. <https://doi.org/10.3390/ijms18112436>
- Yabsley, M. J., & Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2, 18-31. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2012.11.003>
- Yamaguchi, S., Yamamoto, E., Mannen, T., Nagamune T. (2012). Protein refolding using chemical refolding additives. *Biotechnology Journal*, 8 (1), 17-31. <https://doi.org/10.1002/biot.201200025>
- Yamaguchi, H., Miyazaki, M. (2014). Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*, 4, 235-251. <https://doi.org/10.3390/biom4010235>
- Zhang, N., Huang, S., Xu, Y., Chen, J., Wang, J., Tian, W., Zhu, X. (2014). Evaluation of Immune Responses in Mice after DNA Immunization with Putative *Toxoplasma gondii* Calcium-Dependent Protein Kinase 5. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(7), 924 - 929. <https://doi.org/10.1128/CVI.00059-14>
- Zhang, X.-M., Liu, L.-X., Su, Z.-M., Tang, J., Shen, Z.-J., Gao, G.-F., Yi, Y., Zheng, H.-L. (2019). Expression analysis of calcium-dependent protein kinases (CDPKs) superfamily genes in *Medicago lupulina* in response to high calcium, carbonate and drought. *Plant and Soil*, 441(1–2), 219–234. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04109-7>
- Zhang, Q., Shao, Q., Guo, Y., Li, N., Li, Y., Su, J., Xu, R., Zhang, Z., Xiao, L., & Feng, Y. (2021). Characterization of Three Calcium-Dependent Protein Kinases of *Cryptosporidium parvum*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.622203>
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H. E., Taylor, S. M., Gray, J. S. (2003). *Babesia divergens*, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4), 622-636. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.4.622-636.2003>
- Zintl, A., McGrath, G., O'Grady, L., Fanning, J., Downing, K., Roche, D., Casey, M., Gray, J. S. (2014). Changing incidence of bovine babesiosis in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 67(19). <https://doi.org/10.1186/2046-0481-67-19>

Příloha 1 –výsledky sekvenace klonu 9 a alignment vůči referenční sekvenci

Consensus	tttgtttaactttaasaaggagatatmcatatgcggggttctcatcatcatcatcatcat	60
CDPK5-k9-T7F.ab1	tttgtttaactttaasaaggagatatmcatatgcggggttctcatcatcatcatcatcat	60
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	-----	
CDPK5-k9-F.ab1	-----	
BDIV_035940c_cDNA_seq	-----	
Consensus	ggtagtgctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgat	120
CDPK5-k9-T7F.ab1	ggtagtgctagcatgactggtggacagcaaatgggtcgggatctgtacgacgatgacgat	120
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	-----	
CDPK5-k9-F.ab1	-----	
BDIV_035940c_cDNA_seq	-----	
Consensus	aaggatcatcccttcacccccgggatgaagaatgagtcgaccgtaccatccaatgtagca	180
CDPK5-k9-T7F.ab1	aaggatcatcccttcacccccgggatgaagaatgagtcgaccgtaccatccaatgtagca	180
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	----- atgaagaatgagtcgaccgtaccatccaatgtagca	36
CDPK5-k9-F.ab1	----- gtagca	7
BDIV_035940c_cDNA_seq	----- atgaagaatgagtcgaccgtaccatccaatgtagca	36
Consensus	tctactgtatcttccaatcagagatacgtctgcgcttctgtgcatccaagggatccacaa	240
CDPK5-k9-T7F.ab1	tctactgtatcttccaatcagagatacgtctgcgcttctgtgcatccaagggatccacaa	240
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	tctactgtatcttccaatcagagatacgtctgcgcttctgtgcatccaagggatccacaa	96
CDPK5-k9-F.ab1	tctactgtatcttccaatcagagatacgtctgcgcttctgtgcatccaagggatccacaa	67
BDIV_035940c_cDNA_seq	tctactgtatcttccaatcagagatacgtctgcgcttctgtgcatccaagggatccacaa	96
Consensus	tgtagtataaacaccttctcacagcatcaacagtatggcaaggcgggtgcgagaaaatcg	300
CDPK5-k9-T7F.ab1	tgtagtataaacaccttctcacagcatcaacagtatggcaaggcgggtgcgagaaaatcg	300
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	tgtagtataaacaccttctcacagcatcaacagtatggcaaggcgggtgcgagaaaatcg	156
CDPK5-k9-F.ab1	tgtagtataaacaccttctcacagcatcaacagtatggcaaggcgggtgcgagaaaatcg	127
BDIV_035940c_cDNA_seq	tgtagtataaacaccttctcacagcatcaacagtatggcaaggcgggtgcgagaaaatcg	156
Consensus	gaaatgcctacacatcataaggtgaatccacgcagcggggccaccgaatgaccagattgt	360
CDPK5-k9-T7F.ab1	gaaatgcctacacatcataaggtgaatccacgcagcggggccaccgaatgaccagattgt	360
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	gaaatgcctacacatcataaggtgaatccacgcagcggggccaccgaatgaccagattgt	216
CDPK5-k9-F.ab1	gaaatgcctacacatcataaggtgaatccacgcagcggggccaccgaatgaccagattgt	187
BDIV_035940c_cDNA_seq	gaaatgcctacacatcataaggtgaatccacgcagcggggccaccgaatgaccagattgt	216
Consensus	ggaagtatatcgctgctagagctgccgcctaacgctgtcgatcatalccaacacgtgaac	420
CDPK5-k9-T7F.ab1	ggaagtatatcgctgctagagctgccgcctaacgctgtcgatcatalccaacacgtgaac	420
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	ggaagtatatcgctgctagagctgccgcctaacgctgtcgatcatalccaacacgtgaac	276
CDPK5-k9-F.ab1	ggaagtatatcgctgctagagctgccgcctaacgctgtcgatcatalccaacacgtgaac	247
BDIV_035940c_cDNA_seq	ggaagtatatcgctgctagagctgccgcctaacgctgtcgatcatalccaacacgtgaac	276
Consensus	aagaatgcatgctggcagcagcataggatgtataacctgataaccggaataagaagatt	480
CDPK5-k9-T7F.ab1	aagaatgcatgctggcagcagcataggatgtataacctgataaccggaataagaagatt	480
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	aagaatgcatgctggcagcagcataggatgtataacctgataaccggaataagaagatt	336
CDPK5-k9-F.ab1	aagaatgcatgctggcagcagcataggatgtataacctgataaccggaataagaagatt	307
BDIV_035940c_cDNA_seq	aagaatgcatgctggcagcagcataggatgtataacctgataaccggaataagaagatt	336
Consensus	caaacctgcggggataacgtggactgccgcagcctcctatggctagggcaggggtctaca	540
CDPK5-k9-T7F.ab1	caaacctgcggggataacgtggactgccgcagcctcctatggctagggcaggggtctaca	540
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	caaacctgcggggataacgtggactgccgcagcctcctatggctagggcaggggtctaca	396
CDPK5-k9-F.ab1	caaacctgcggggataacgtggactgccgcagcctcctatggctagggcaggggtctaca	367
BDIV_035940c_cDNA_seq	caaacctgcggggataacgtggactgccgcagcctcctatggctagggcaggggtctaca	396
Consensus	gaatgcaagtctgagaacaacatgttacgtgcagccgtcagcatggattcacaaccaga	600

CDPK5-k9-T7F.ab1	gaatgcaagctctgagaaacacatgttacgtgcagccgtcagcatggattcacaaccaga	600
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	gaatgcaagctctgagaaacacatgttacgtgcagccgtcagcatggattcacaaccaga	456
CDPK5-k9-F.ab1	gaatgcaagctctgagaaacacatgttacgtgcagccgtcagcatggattcacaaccaga	427
BDIV_035940c_cDNA_seq	gaatgcaagctctgagaaacacatgttacgtgcagccgtcagcatggattcacaaccaga	456
Consensus	ccagtatataattcgctatgcactaaatgcatgccggaggaggataagattacgaagggg	660
CDPK5-k9-T7F.ab1	ccagtatataattcgctatgcactaaatgcatgccggaggaggataagattacgaagggg	660
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	ccagtatataattcgctatgcactaaatgcatgccggaggaggataagattacgaagggg	516
CDPK5-k9-F.ab1	ccagtatataattcgctatgcactaaatgcatgccggaggaggataagattacgaagggg	487
BDIV_035940c_cDNA_seq	ccagtatataattcgctatgcactaaatgcatgccggaggaggataagattacgaagggg	516
Consensus	ttcacgggccttctaatacaaaccccaatttttaattacgtcaatgagcccaagccacag	720
CDPK5-k9-T7F.ab1	ttcacgggccttctaatacaaaccccaatttttaattacgtcaatgagcccaagccacag	720
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	ttcacgggccttctaatacaaaccccaatttttaattacgtcaatgagcccaagccacag	576
CDPK5-k9-F.ab1	ttcacgggccttctaatacaaaccccaatttttaattacgtcaatgagcccaagccacag	547
BDIV_035940c_cDNA_seq	ttcacgggccttctaatacaaaccccaatttttaattacgtcaatgagcccaagccacag	576
Consensus	tcgctcaggggatgtgactccaacttttgacagatcctttggtgatccacgaaactgcgctc	780
CDPK5-k9-T7F.ab1	tcgctcaggggatgtgactccaacttttgacagatcctttggtgatccacgaaactgcgctc	780
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	tcgctcaggggatgtgactccaacttttgacagatcctttggtgatccacgaaactgcgctc	636
CDPK5-k9-F.ab1	tcgctcaggggatgtgactccaacttttgacagatcctttggtgatccacgaaactgcgctc	607
BDIV_035940c_cDNA_seq	tcgctcaggggatgtgactccaacttttgacagatcctttggtgatccacgaaactgcgctc	636
Consensus	gtcgcaggaatgagcattaatgatgtgtatgaactttacagtcaccgggttggcaagggc	840
CDPK5-k9-T7F.ab1	gtcgcaggaatgagcattaatgatgtgtatgaactttacagtcaccgggttggcaagggc	840
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	gtcgcaggaatgagcattaatgatgtgtatgaactttacagtcaccgggttggcaagggc	696
CDPK5-k9-F.ab1	gtcgcaggaatgagcattaatgatgtgtatgaactttacagtcaccgggttggcaagggc	667
BDIV_035940c_cDNA_seq	gtcgcaggaatgagcattaatgatgtgtatgaactttacagtcaccgggttggcaagggc	696
Consensus	agctacggccaggtgctcaaaagcttgccacagggagactggggaagtgaaggcggttaaa	900
CDPK5-k9-T7F.ab1	agctacggccaggtgctcaaaagcttgccacagggagactggggaagtgaaggcggttaaa	900
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	agctacggccaggtgctcaaaagcttgccacagggagactggggaagtgaaggcggttaaa	756
CDPK5-k9-F.ab1	agctacggccaggtgctcaaaagcttgccacagggagactggggaagtgaaggcggttaaa	727
BDIV_035940c_cDNA_seq	agctacggccaggtgctcaaaagcttgccacagggagactggggaagtgaaggcggttaaa	756
Consensus	gtgatcaggaagggcagtatagagaacgccatgccgatgaagcgcgagattgctatcatg	960
CDPK5-k9-T7F.ab1	gtgatcaggaagggcagtatagagaacgccatgccgatgaagcgcgagattgctatcatg	960
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	gtgatcaggaagggcagtatagagaacgccatgccgatgaagcgcgagattgctatcatg	816
CDPK5-k9-F.ab1	gtgatcaggaagggcagtatagagaacgccatgccgatgaagcgcgagattgctatcatg	787
BDIV_035940c_cDNA_seq	gtgatcaggaagggcagtatagagaacgccatgccgatgaagcgcgagattgctatcatg	816
Consensus	a-----aaactctggatcatcccaacatt	984
CDPK5-k9-T7F.ab1	a-----aaactctggatcatcccaacatt	984
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	taagttagagctaaaaacatttaacctgccgaaggaaaactctggatcatcccaacatt	876
CDPK5-k9-F.ab1	a-----aaactctggatcatcccaacatt	811
BDIV_035940c_cDNA_seq	a-----aaactctggatcatcccaacatt	840
Consensus	gtaaagctattagaagtgtacgaagatgaagagtgccctctatctcgtgatggagatgtgc	1044
CDPK5-k9-T7F.ab1	gtaaagctattagaagtgtacgaagatgaagagtgccctctatctcgtgatggagatgtgc	1044
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	gtaaagctattagaagtgtacgaagatgaagagtgccctctatctcgtgatggagatgtgc	936
CDPK5-k9-F.ab1	gtaaagctattagaagtgtacgaagatgaagagtgccctctatctcgtgatggagatgtgc	871
BDIV_035940c_cDNA_seq	gtaaagctattagaagtgtacgaagatgaagagtgccctctatctcgtgatggagatgtgc	900
Consensus	agcggcggcgagctttttgatgagattgtaaggcgcggctgtttcagtgaggactatgcc	1104
CDPK5-k9-T7F.ab1	agcggcggcgagctttttgatgagattgtaaggcgcggctgtttcagtgaggactatgcc	1104
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----	
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	
BDIV_035940c_gDNA_seq	--cggcggcgagctttttgatgagattgtaaggcgcggctgtttcagtgaggactatgcc	58
CDPK5-k9-F.ab1	agcggcggcgagctttttgatgagattgtaaggcgcggctgtttcagtgaggactatgcc	996
CDPK5-k9-F.ab1	agcggcggcgagctttttgatgagattgtaaggcgcggctgtttcagtgaggactatgcc	931

BDIV_035940c_cDNA_seq	agcggcggcgagctttttgatgagattgtaaggcgcggctgtttcagtgaggactatgcc	960
Consensus	gcgacggtaatgcggcagatctttctgccatttctactgccacggtaagagtatcttg	1164
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1164
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	-----acggtaagagtatcttg	17
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	gcgacggtaatgcggcagatctttctgccatttctactgccacggtaagagtatcttg	118
BDIV_035940c_gDNA_seq	gcgacggtaatgcggcagatctttctgccatttctactgccacggtaagagtatcttg	1056
CDPK5-k9-F.ab1	gcgacggtaatgcggcagatctttctgccatttctactgccacggtaagagtatcttg	991
BDIV_035940c_cDNA_seq	gcgacggtaatgcggcagatctttctgccatttctactgccacggtaagagtatcttg	1020
Consensus	caccgagacctcaagcctgaaaacatttctctacgcaataaaaaataatgattcgccaatc	1224
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1224
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	caccgagacctcaagcctgaaaacatttctctacgcaataaaaaataatgattcgccaatc	77
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	caccgagacctcaagcctgaaaacatttctctacgcaataaaaaataatgattcgccaatc	178
BDIV_035940c_gDNA_seq	caccgagacctcaagcctgaaaacatttctctacgcaataaaaaataatgattcgccaatc	1116
CDPK5-k9-F.ab1	caccgagacctcaagcctgaaaacatttctctacgcaataaaaaataatgattcgccaatc	1051
BDIV_035940c_cDNA_seq	caccgagacctcaagcctgaaaacatttctctacgcaataaaaaataatgattcgccaatc	1080
Consensus	aagggtgattgactgggggttggctacgaaatgccgcaaggcgcataaattccacacgttg	1284
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1284
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	aagggtgattgactgggggttggctacgaaatgccgcaaggcgcataaattccacacgttg	137
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	aagggtgattgactgggggttggctacgaaatgccgcaaggcgcataaattccacacgttg	238
BDIV_035940c_gDNA_seq	aagggtgattgactgggggttggctacgaaatgccgcaaggcgcataaattccacacgttg	1176
CDPK5-k9-F.ab1	aagggtgattgactgggggttggctacgaaatgccgcaaggcgcataa-----	1111
BDIV_035940c_cDNA_seq	aagggtgattgactgggggttggctacgaaatgccgcaaggcgcataaattccacacgttg	1140
Consensus	gtgggcacaccatactactagtagcacctgaggtgttacttgggaactcgcacaagagttdc	1344
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1344
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	gtgggcacaccatactactagtagcacctgaggtgttacttgggaactcgcacaagagttdc	197
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	gtgggcacaccatactactagtagcacctgaggtgttacttgggaactcgcacaagagttdc	298
BDIV_035940c_gDNA_seq	gtgggcacaccatactactagtagcacctgaggtgttacttgggaactcgcacaagagttdc	1236
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1171
BDIV_035940c_cDNA_seq	gtgggcacaccatactactagtagcacctgaggtgttacttgggaactcgcacaagagttdc	1200
Consensus	gatatttggagcgctggcgtcattctgttcatcatgcttgttggataccacctttccac	1404
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1404
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	gatatttggagcgctggcgtcattctgttcatcatgcttgttggataccacctttccac	257
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	gatatttggagcgctggcgtcattctgttcatcatgcttgttggataccacctttccac	358
BDIV_035940c_gDNA_seq	gatatttggagcgctggcgtcattctgttcatcatgcttgttggataccacctttccac	1296
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1231
BDIV_035940c_cDNA_seq	gatatttggagcgctggcgtcattctgttcatcatgcttgttggataccacctttccac	1260
Consensus	ggtaatgacaatgcaaccattttgcgaaatgtgaagagggggacgatcaactttgtacct	1464
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1464
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	ggtaatgacaatgcaaccattttgcgaaatgtgaagagggggacgatcaactttgtacct	317
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	ggtaatgacaatgcaaccattttgcgaaatgtgaagagggggacgatcaactttgtacct	418
BDIV_035940c_gDNA_seq	ggtaatgacaatgcaaccattttgcgaaatgtgaagagggggacgatcaactttgtacct	1356
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1291
BDIV_035940c_cDNA_seq	ggtaatgacaatgcaaccattttgcgaaatgtgaagagggggacgatcaactttgtacct	1320
Consensus	caccattgaaaaacatctccaagagcgcaatcgaccttatcacacgctgcctttcttat	1524
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1524
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	caccattgaaaaacatctccaagagcgcaatcgaccttatcacacgctgcctttcttat	377
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	caccattgaaaaacatctccaagagcgcaatcgaccttatcacacgctgcctttcttat	478
BDIV_035940c_gDNA_seq	caccattgaaaaacatctccaagagcgcaatcgaccttatcacacgctgcctttcttat	1416
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1351
BDIV_035940c_cDNA_seq	caccattgaaaaacatctccaagagcgcaatcgaccttatcacacgctgcctttcttat	1380
Consensus	gatccaagatacagaatcactgcgaaggcggcgttcaatcatgagtggatcctccaaaag	1584
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1584
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	gatccaagatacagaatcactgcgaaggcggcgttcaatcatgagtggatcctccaaaag	437
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	gatccaagatacagaatcactgcgaaggcggcgttcaatcatgagtggatcctccaaaag	538
BDIV_035940c_gDNA_seq	gatccaagatacagaatcactgcgaaggcggcgttcaatcatgagtggatcctccaaaag	1476
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1411
BDIV_035940c_cDNA_seq	gatccaagatacagaatcactgcgaaggcggcgttcaatcatgagtggatcctccaaaag	1440
Consensus	gcaacctctatttatgtcagccctgtactactgcaatcactaccaaggatctgggtcaaa	1644
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1644
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	gcaacctctatttatgtcagccctgtactactgcaatcactaccaaggatctgggtcaaa	497
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	gcaacctctatttatgtcagccctgtactactgcaatcactaccaaggatctgggtcaaa	598
BDIV_035940c_gDNA_seq	gcaacctctatttatgtcagccctgtactactgcaatcactaccaaggatctgggtcaaa	1536
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1471
BDIV_035940c_cDNA_seq	gcaacctctatttatgtcagccctgtactactgcaatcactaccaaggatctgggtcaaa	1500
Consensus	cggttccagaagttcgaccagtacaacagatgaagcgactggcgtcacttgtattggc	1704
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1704
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	cggttccagaagttcgaccagtacaacagatgaagcgactggcgtcacttgtattggc	557
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	cggttccagaagttcgaccagtacaacagatgaagcgactggcgtcacttgtattggc	658

BDIV_035940c_gDNA_seq	cggttccagaagttcgaccagtacaacagatgaagcgactggcgctcactgtattgcg	1596
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1531
BDIV_035940c_cDNA_seq	cggttccagaagttcgaccagtacaacagatgaagcgactggcgctcactgtattgcg	1560
Consensus	caccacctgtcggacatggatattggtccgctcagcacggccttcgaagtgctaaacatg	1764
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1764
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	caccacctgtcggacatggatattggtccgctcagcacggccttcgaagtgctaaacatg	617
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	caccacctgtcggacatggatattggtccgctcagcacggccttcgaagtgctaaacatg	718
BDIV_035940c_gDNA_seq	caccacctgtcggacatggatattggtccgctcagcacggccttcgaagtgctaaacatg	1656
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1591
BDIV_035940c_cDNA_seq	caccacctgtcggacatggatattggtccgctcagcacggccttcgaagtgctaaacatg	1620
Consensus	gagggcaacggagtgctctacgttaaggacattgtgaagggtttgcaaaatgataaggcc	1824
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1824
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	gagggcaacggagtgctctacgttaaggacattgtgaagggtttgcaaaatgataaggcc	677
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	gagggcaacggagtgctctacgttaaggacattgtgaagggtttgcaaaatgataaggcc	778
BDIV_035940c_gDNA_seq	gagggcaacggagtgctctacgttaaggacattgtgaagggtttgcaaaatgataaggcc	1716
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1651
BDIV_035940c_cDNA_seq	gagggcaacggagtgctctacgttaaggacattgtgaagggtttgcaaaatgataaggcc	1680
Consensus	aggggtcagatgaccccgccatggagagtgctcctcgagaatccttgacacgaaatgggaa	1884
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1884
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	aggggtcagatgaccccgccatggagagtgctcctcgagaatccttgacacgaaatgggaa	737
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	aggggtcagatgaccccgccatggagagtgctcctcgagaatccttgacacgaaatgggaa	838
BDIV_035940c_gDNA_seq	aggggtcagatgaccccgccatggagagtgctcctcgagaatccttgacacgaaatgggaa	1776
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1711
BDIV_035940c_cDNA_seq	aggggtcagatgaccccgccatggagagtgctcctcgagaatccttgacacgaaatgggaa	1740
Consensus	ggtgcaatcgactatgtcaggttcatcgctgcttccatggagcaggatgtttatatgcag	1944
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1944
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	ggtgcaatcgactatgtcaggttcatcgctgcttccatggagcaggatgtttatatgcag	797
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	ggtgcaatcgactatgtcaggttcatcgctgcttccatggagcaggatgtttatatgcag	898
BDIV_035940c_gDNA_seq	ggtgcaatcgactatgtcaggttcatcgctgcttccatggagcaggatgtttatatgcag	1836
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1771
BDIV_035940c_cDNA_seq	ggtgcaatcgactatgtcaggttcatcgctgcttccatggagcaggatgtttatatgcag	1800
Consensus	aaggacttctgtatgaaggcattcaaggatctcgacctggaaggccaaggtgttatcaca	2004
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	2004
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	aaggacttctgtatgaaggcattcaaggatctcgacctggaaggccaaggtgttatcaca	857
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	aaggacttctgtatgaaggcattcaaggatctcgacctggaaggccaaggtgttatcaca	958
BDIV_035940c_gDNA_seq	aaggacttctgtatgaaggcattcaaggatctcgacctggaaggccaaggtgttatcaca	1896
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1831
BDIV_035940c_cDNA_seq	aaggacttctgtatgaaggcattcaaggatctcgacctggaaggccaaggtgttatcaca	1860
Consensus	cgtgagaacatgcggaaggtgtttcagtgcgacatgagtcgcgcgagttctccgatgat	2064
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	2064
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	cgtgagaacatgcggaaggtgtttcagtgcgacatgagtcgcgcgagttctccgatgat	917
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	cgtgagaacatgcggaaggtgtttcagtgcgacatgagtcgcgcgagttctccgatgat	1018
BDIV_035940c_gDNA_seq	cgtgagaacatgcggaaggtgtttcagtgcgacatgagtcgcgcgagttctccgatgat	1956
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1891
BDIV_035940c_cDNA_seq	cgtgagaacatgcggaaggtgtttcagtgcgacatgagtcgcgcgagttctccgatgat	1920
Consensus	tttgtggaagagatattcaatgaggttgatctggacagagatggtgtaataaactacacc	2124
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	2124
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	tttgtggaagagatattcaatgaggttgatctggacagagatggtgtaataaactacacc	977
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	tttgtggaagagatattcaatgaggttgatctggacagagatggtgtaataaactacacc	1078
BDIV_035940c_gDNA_seq	tttgtggaagagatattcaatgaggttgatctggacagagatggtgtaataaactacacc	2016
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1951
BDIV_035940c_cDNA_seq	tttgtggaagagatattcaatgaggttgatctggacagagatggtgtaataaactacacc	1980
Consensus	gacttctgtaccatgctatacgggctgtcacggcccgagatgtagccacattagactaa	2184
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	2184
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	gacttctgtaccatgctatacgggctgtcacggcccgagatgtagccacattagactaa	1037
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	gacttctgtaccatgctatacgggctgtc	1138
BDIV_035940c_gDNA_seq	gacttctgtaccatgctatacgggctgtcacggcccgagatgtagccacattagactaa	2076
CDPK5-k9-F.ab1	-----	2011
BDIV_035940c_cDNA_seq	gacttctgtaccatgctatacgggctgtcacggcccgagatgtagccacattagactaa	2040
Consensus	taatagkgagaattcccatggctcgagaaggcgagctcaacgatccggctgctaa	2240
CDPK5-k9-T7F.ab1	-----	1088
CDPK5-k9-T7R.ab1 (reversed)	taatagkgagaattcccatggctcgagaaggcgagctcaacgatccggctgctaa	1093
CDPK5-k9-R.ab1 (reversed)	-----	1107
BDIV_035940c_gDNA_seq	-----	2076
CDPK5-k9-F.ab1	-----	1098
BDIV_035940c_cDNA_seq	-----	2040

Sekvence primerů použitých k osekvenování klonu 9:

CDPK5-k9-F.ab1 = GGATCATCCCTTCACCCCGCGGATGAAGAATGAGTCGACCGT (viz Tabulka I)

CDPK5-k9-R.ab1 = CTTCTCGAGCCATGGGAATTcactattaTTAGTCTAATGTGGCTACATCTCC (viz Tabulka I)

CDPK5-k9-T7F.ab1= TAATACGACTCACTATAGGG (viz Tabulka IV)

CDPK5-k9-T7R.ab1 = GCTAGTTATTGCTCAGCGG (viz Tabulka IV)