

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Kultivace klíšťaty přenášených babesii a charakterizace jejich proteasomu
jako nového terapeutického cíle**

Bakalářská práce

Dominika Reichensdörferová

školitel: RNDr. Daniel Sojka, PhD.

školitel specialista: RNDr. Marie Jalovecká, PhD.

České Budějovice 2019

Bakalářská diplomová práce

Reichensdörferová D., 2019: Kultivace klišťaty přenášených babesií a charakterizace jejich proteasomu jako nového terapeutického cíle. [Cultivation of tick-transmitted babesia and characterization of proteasome as new drug target. Bc. Thesis, in Czech.] –34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation

Tick-transmitted parasites of the genus *Babesia* represent an important worldwide veterinary threat and an emerging risk to humans. In comparison to their malaria-causative relatives, these erythrocyte infecting Apicomplexa have been widely neglected and no specific treatment has been developed. Thus, this thesis is focused on the optimised cultivation of the two species: *B. divergens* in bovine erythrocyte cultures (*in vitro*) and *B. microti* in BALB/c mice (*in vivo*). Since the *Babesia* 26S proteasome has been recently validated by our laboratory for drug development we applied different strategies used to isolate the *P. falciparum* 26S proteasome to optimize its isolation from the two babesia species - ultrasonication, mechanical homogenization and ultracentrifugation. In addition, we used ion exchange chromatography to purify the 26S proteasome from *B. microti* lysates. Future steps will involve optimised protocols using either ion exchange, immunoprecipitation and/or ubiquitin affinity to purify volumes of *B. microti* proteasome suitable for substrate specificity profiling of the proteolytic subunits as well as for 3D protein studies involving Cryo-EM or conventional protein crystallography. The overall goal of the long term laboratory project is to produce and validate novel *Babesia* selective proteasome inhibitors that could be developed into yet missing specific treatment for babesiosis.

Tato práce byla financována z grantu číslo 17-14631S (GAČR).

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému školiteli RNDr. Danielu Sojkovi Ph.D., Mgr. Luise Robbertse Ph.D. a především své školitelce specialistce RNDr. Marii Jalovecké Ph.D., za jejich vedení, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat ostatním členům laboratoře za jejich pomoc a vytvoření příjemné pracovní atmosféry a v neposlední řadě rodině a kamarádům, kteří mě podporovali ve všech směrech.

Obsah:

1. Úvod	1
1.1 Babesia	1
1.1.1 Fylogeneze babesíí	1
1.1.2 Životní cyklus	2
1.1.3 Člověk jako náhodný hostitel	3
1.1.3.1 <i>Babesia microti</i>	3
1.1.3.2 <i>Babesia divergens</i>	4
1.1.3.3 Léčba babesiosy	4
1.2 Proteasom	4
1.2.1 Katalytické jádro proteasomu	5
1.3 Proteasom jako terapeutický cíl	5
1.3.1 Onkologická terapie	5
1.3.2 Inhibice proteasomu parazitů	6
1.3.2.1 Inhibice proteasomu babesíí	6
2. Cíle práce	7
3. Materiál a metody	8
3.1 Kultivace	8
3.1.1 Parazit	8
3.1.2 Laboratorní zvířata pro <i>in vivo</i> kultivaci <i>B. microti</i>	8
3.1.3 Erythrocyty pro <i>in vitro</i> kultivaci <i>B. divergens</i>	8
3.1.4 Chemikálie	9
3.1.5 Pasážování	9
3.1.6 Stanovení parazitémie	10
3.1.7 Příprava lyzátů	10
3.2 Izolace proteasomu <i>B. divergens</i> a <i>B. microti</i>	10
3.2.1 Ultrasonikace	10
3.2.2 Ultracentrifugace	11
3.2.3 Mechanická homogenizace	11
3.3 Stanovení aktivity	11
3.4 Purifikace 26S proteasomu <i>B. microti</i>	12
3.4.1 Ionexová chromatografie	12
3.4.2 SDS-PAGE a stříbření	13
4. Výsledky	15
4.1 Kultivace	15
4.2 Izolace proteasomu <i>B. divergens</i> a <i>B. microti</i>	17
4.3 Kombinace metod pro izolaci 26S proteasomu	18
4.4 Purifikace 26S proteasomu <i>B. microti</i>	20
5. Diskuze	23
6. Závěr	27
7. Seznam použité literatury	28

1. Úvod

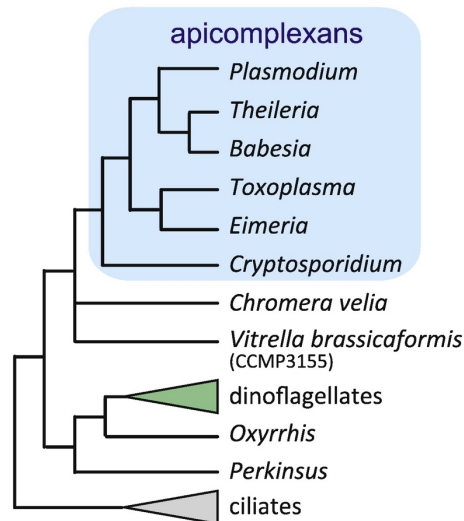
1.1 *Babesia*

Babesie jsou jednobuněční parazité napadající erythrocyty obratlovců a jejich primárním a zároveň definitivním vektorem jsou klíšťatovití (*Ixodidae*) (Homer et al., 2000). Onemocnění způsobené babesiemi se označuje jako babesiosa. Postihuje zejména hospodářská zvířata a řadí se se mezi jejich nejběžnější krevní choroby (Hunfeld et al., 2008). Určité druhy babesií ale napadají i člověka. Případy lidské babesiosy jsou zaznamenávány v Evropě i v USA (Schnittger et al., 2012), kde americké Středisko pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) považuje babesiosu od roku 2011 za „emerging disease“ (Leiby, 2011).

1.1.1 Fylogeneze babesií

V současné době existuje více než 100 druhů babesií (Schnittger et al., 2012). Babesie patří do řádu Piroplasmida, kmene Apikomplexa (Výtrusovci) a skupiny Alveolata (Hunfeld et al., 2008). Kmen Apikomplexa je skupina prvoků parazitujících v buňkách nebo tělních dutinách živočichů a jejich charakteristickým znakem je přítomnost apikálního komplexu, souboru organel zprostředkujících průnik do hostitelské buňky. Tito endoparazité zahrnují původce závažných onemocnění člověka a hospodářských zvířat, jako je například *Plasmodium* spp. (malárie), *Toxoplasma gondii* (toxoplazmóza), *Babesia* spp. (babesiosa), *Cryptosporidium* spp. (kryptosporidióza) a další (Vannier et al., 2015). Piroplasmida a *Plasmodium* spp. (Obr. 1) (Arisue and Hashimoto, 2015; Schreeg et al., 2016) sdílí podobnost například v asexuálním rozmnožování v erythrocytech hostitele a sexuálním množení ve střevě definitivního hostitele z kmene členovci (Arthropoda; Smith et al., 2002).

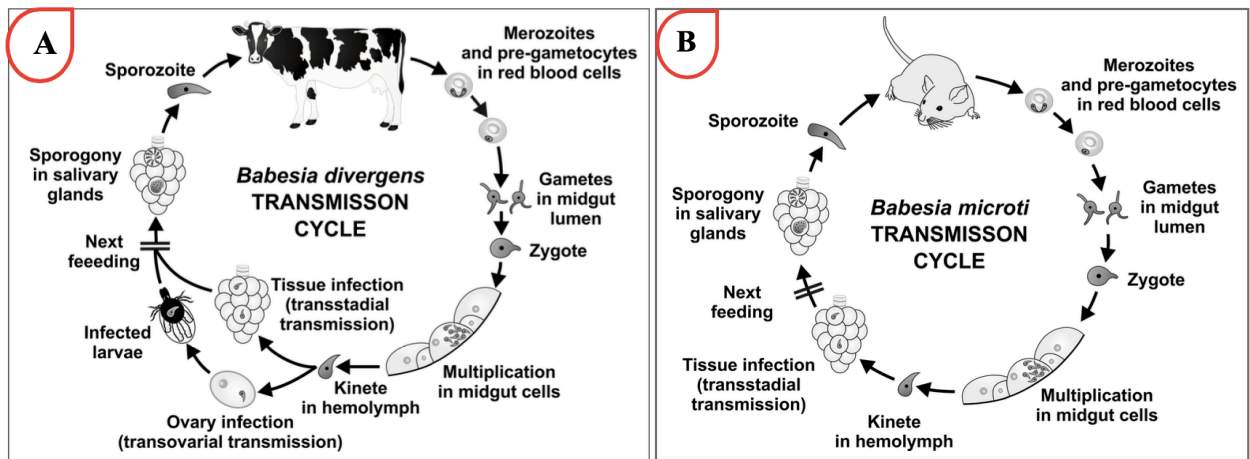
Na rozdíl od komáry přenášených plasmodií jsou babesie přenášeny klíšťaty rodu *Ixodes*. Další odlišností je, že *Plasmodium falciparum* má synchronizovaný vývoj stádií v hostitelských erythrocytech, zatímco *Babesia* spp. se vyznačuje asynchronním cyklem. Vzhledem k relativně krátké evoluční vzdálenosti mezi plasmodii a babesiemi (Obr. 1) je zjevné, že strategie uplatňované při léčbě malárie mohou být efektivní i při dosud chybějící selektivní léčbě babesiosy (Khare et al., 2016; Li et al., 2012).



Obr. 1: Fylogenetická pozice *Babesia* spp. a *P. falciparum* ve skupině Alveolata (Arisue and Hashimoto, 2015).

1.1.2 Životní cyklus

Životní cyklus babesii je charakteristický střídáním hostitelů (Yabsley and Shock, 2013). Skládá se ze tří fází: sporogonie (asexuální rozmnožování v klíštěcích slinných žlázách), merogonie (asexuální rozmnožování v erythrocytech obratlovce) a gamogonie (sexuální rozmnožování ve střevě klíštěte). K přenosu babesii dochází prostřednictvím sání klíštěte na obratlovci (mezihostiteli) (Vannier et al., 2015). Infekce začíná invazí sporozoitů, které jsou transportované do hostitele sekrecí slin během sání klíštěte. Babesie se následně asexuálně množí pouze v erythrocytech, na rozdíl od jiných druhů patřících do řádu Piroplasmida (Jalovecka et al., 2019). Po několika asexuálních cyklech dochází k vytvoření gametocytů (Obr. 2), které jsou nasáty klíštětem (Hildebrandt et al., 2013; Vannier et al., 2015). Ve střevě klíštěte pak probíhá gamogonie: gametocyty se mění na gamety a jejich fúzí vzniká zygota (Schnittger et al., 2012). Zygota penetruje do střevních buněk, kde dochází k meióze a k produkci kinet. Tyto kinety se uvolňují do hemolymfy a infikují různé tkáně (Obr. 2: ovaria, slinné žlázy a další), kde se dále nepohlavně rozmnožují (Kjemtrup and Conrad, 2000). Sporogonie začíná po migraci kinet do slinných žláz (Vannier and Krause, 2009), ve kterých dochází k produkci sporozoitů, které jsou schopné invaze hostitelských erythrocytů (Jalovecka et al., 2018a).



Obr. 2: Životní cyklus *B. divergens* a *B. microti*. Hlavním rozdílem mezi **A** – *B. divergens* (upraveno (Hajdušek et al., 2013)) a **B** – *B. microti* (Jalovecká et al., 2017) je schopnost transovariálního přenosu (infikovaná samice přeneše parazitární organismus na další generace – tzv. horizontální přenos). Tento způsob přenosu byl z těchto dvou druhů potvrzen pro *B. divergens* (Bonnet et al., 2007).

Relativně komplikovaný životní cyklus babesii (Obr. 2) je detailně popsán jen u několika nejznámějších druhů, zatímco u většiny zbývajících chybí popis některých fází životního cyklu a není objasněna role alternativních vektorů a hostitelů (Yabsley and Shock, 2013).

1.1.3 Člověk jako náhodný hostitel

Člověk není přirozeným, ale náhodným hostitelem babesii, přičemž jen některé druhy (např. *B. microti*, *B. divergens*) jsou schopné infikovat člověka (Vannier, 2008). Jednotlivé druhy se liší v míře virulence, patogenitě a dalších faktorech. Mezi příčiny, které vedou k četnějšímu výskytu lidské babesiosy, se řadí kontakt lidí s rozsáhlejším prostředím, ve kterém se vyskytují klíšťata, zvýšené počty jedinců v klíšťecích populacích a další (Yabsley and Shock, 2013).

Kromě infikování člověka při sání klíštěte dochází k přenosu lidské babesiosy také podáním krevních transfuzí. Ačkoliv v celosvětovém měřítku je tomuto způsobu šíření přikládána malá pozornost, velmi často se tento druh přenosu objevuje v endemických oblastech zejména u lidí se sníženou obranyschopností z důvodu stáří nebo nemoci (Hildebrandt et al., 2007). Případ dalšího alternativního přenosu *B. microti*, z matky na novorozence (transplacentární infikování), byl popsán v Americe (Joseph et al., 2012) a následně potvrzen při úspěšném transplacentárním infikování BALB/c myši (Bednarska et al., 2015).

1.1.3.1 Babesia microti

Lidská babesiosa způsobená *B. microti* je v Severní Americe nejčastější chorobou získanou přes krevní transfuze (Yabsley and Shock, 2013). Infekce způsobené *B. microti* jsou ve většině případů asymptomatické (Krause et al., 2003), ale mohou skončit úmrtím zejména

u imunodeficientních (se sníženou funkcí některé ze složek imunitního systému) a starších pacientů (5-10 % pacientů; Yabsley and Shock, 2013). Mezi příznaky patří vyrážka, horečka, zimnice, pocení, bolest hlavy, kloubů a svalů, kašel a zvracení (Yabsley and Shock, 2013). Klinické symptomy mohou přetrvávat po dobu několika týdnů až měsíců, velmi zřídka více než rok (Yabsley and Shock, 2013).

1.1.3.2 Babesia divergens

Nejčastějším zoonotickým (zoonóza = nemoc přenášející se volně mezi lidmi a zvířaty) druhem v Evropě je *B. divergens*. Infekce *B. divergens* se vyznačuje 1–3 týdny dlouhou inkubační dobou (Yabsley and Shock, 2013), po které se stav pacienta rapidně zhoršuje. Velmi běžným znakem této fáze je hemoglobinurie (vysoký obsah hemoglobinu v moči; Telford and Spielman, 1993). Další příznaky infekce, mezi něž patří žloutenka, horečka (40-41 °C), pocení, třes, bolest hlavy či zvracení, jsou snadno zaměnitelné za symptomy malárie (Gorenflot et al., 1998). U 42% pacientů dochází k systémovému selhání do 4 až 7 dnů po začátku hemoglobinurie (Kjemtrup and Conrad, 2000). Při podání krevní transfuze může být úmrtnost značně snížena (Zintl et al., 2003).

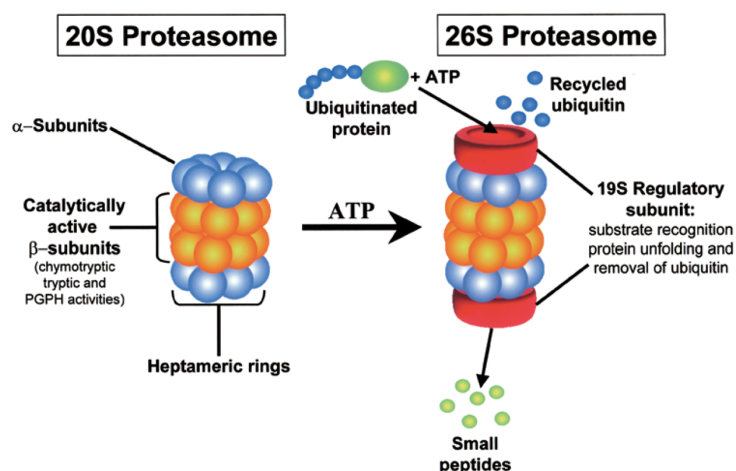
1.1.3.3 Léčba babesiosy

K léčbě lidské babesiosy se využívá různých kombinací antibiotik a antimalarik (Rozej-Bielicka et al., 2015). Pacientům s mírnými příznaky je předepisována kombinace atovaquonu s azithromycinem nebo klindamycinu s chininem po dobu 1 týdne (Hildebrandt et al., 2013). Oba postupy mají srovnatelnou léčivou efektivitu (Vannier et al., 2015). Při léčbě imunodeficientních pacientů se používá klindamycin s chininem nebo se chinin nahradí méně toxickým derivátem quinidenem (Vannier et al., 2008). V současné době proti babesiose neexistuje specifický lék. V zájmu lidské i veterinární medicíny je proto nalézt selektivní lék schopný eliminace parazita s minimálními vedlejšími účinky na hostitele (AbouLaila et al., 2010).

1.2 Proteasom

26S proteasom je proteinový komplex složený ze dvou podjednotek: 19S rozpoznávací podjednotky a 20S katalytického jádra. Proteasom se nachází v cytoplazmě a v jádře všech buněk (Bhattacharyya et al., 2014). Podílí se na regulaci řady buněčných procesů, jako je například rozklad nepotřebných proteinů nebo degradace špatně složených bílkovin. Proteiny určené k degradaci jsou konjugovány s jedním nebo více řetězci ubiquitinu (Pickart, 2004). Polyubiquitované proteiny jsou následně rozpoznány a zpracovány 19S podjednotkou proteasomu: struktura proteinů je rozvolněná regulačními proteiny, ubiquitin je odstraněn deubiquitinázami a zpětně recyklován buňkou k dalšímu použití (Obr. 3) (Burns et al., 2010).

Takto zpracované proteiny vstupují do katalytického 20S jádra, kde jsou degradovány na krátké peptidové úseky. 20S jádro proteasomu je tvořené 2 β prstenci vmezeřenými mezi 2 α prstence (Obr. 3). Každý prsteneček je složený ze 7 podjednotek (Bibo-Verdugo et al., 2017).



Obr. 3: Dráha proteinové degradace 26S proteasomu. Proteiny určené k degradaci jsou označeny několika molekulami ubiquitinů a následně rychle degradovány 26S proteasomem, za spotřeby ATP. 26S proteasom se skládá z 19S regulační podjednotky, která je zodpovědná za rozpoznání substrátu, rozbalení proteinu a deubiquitinaci, a z 20S jádra, které obsahuje katalyticky aktivní podjednotky (Almond and Cohen, 2002)

1.2.1 Katalytické jádro proteasomu

Katalyticky aktivní podjednotky $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5$ zodpovědné za proteolytickou degradaci ubiquitinem označených proteinů jsou součástí 20S jádra proteasomu. Každá z nich má odlišnou aktivitu na základě substrátové specifity: $\beta 1$ podjednotka je označována jako caspase-like proteáza, $\beta 2$ jako trypsin-like proteáza a $\beta 5$ jako chemotrypsin-like proteáza (Bibo-Verdugo et al., 2017).

1.3 Proteasom jako terapeutický cíl

Cílená inhibice proteasomu je selektivní terapeutickou strategií při léčbě rakoviny a autoimunitních chorob (Li et al., 2012; Reynolds et al., 2007). Princip účinku je akumulace abnormálních proteinů (špatně syntetizované nebo špatně sbalené, potenciálně toxické, mutované či poškozené), které jsou obecně eliminovány dráhou proteinové degradace (Obr. 3) (Basler et al., 2015). Proto při inhibici proteasomu dojde k toxickému nahromadění těchto abnormálních proteinů vedoucímu k apoptóze buňky (Goldberg, 2012).

1.3.1 Onkologická terapie

Inhibice chymotrypsin-like aktivity savčího proteasomu je efektivní strategií pro terapie nádorových onemocnění. Pro léčbu mnohočetného myelomu jsou schválené americkým národním úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) tři inhibitory: carfilzomib (Kim and Crews, 2013), bortezomib (Kane et al., 2006) a ixazomib (Muz et al., 2016). Carfilzomib je odvozený od epoxyketonu a váže se ireverzibilně.

Bortezomib a ixazomib jsou odvozené od kyseliny borité a vážou se reverzibilně. ONX-0914 je inhibitorem, který je selektivní pro $\beta 5$ podjednotku imunoproteasomu a jeho působení je signifikantní při léčbě autoimunitních onemocnění (Muchamuel et al., 2009).

1.3.2 Inhibice proteasomu parazitů

Mezi revoluční objevy v oblasti parazitologie patří recentní vývoj inhibitorů proteasomu, které selektivně eliminují parazitární organismy, se značně sníženou toxicitou vůči hostitelským buňkám (Bibo-Verdugo et al., 2017). Tento typ inhibice se ukázal jako velmi efektivní u malárie (Li et al., 2016), leishmaniosy, Chagasovy choroby a spavé nemoci (Khare et al., 2016).

Současným trendem pro použití parazitárních proteasomů jako terapeutických cílů v medicínských aplikacích je řádové (10 – 1000×) zvýšení selektivity nově testovaných inhibitorů (tzv. terapeutického okna – intervalu mezi účinkem na parazitární versus hostitelský proteasom). U *P. falciparum* byla definována struktura aktivních míst pomocí substrátového profilování katalytických podjednotek 20S jádra proteasomu hostitele a parazita pomocí specifických peptidyl-substrátových knihoven („substrate profiling“) a výsledné substrátové preference byly použity pro designování selektivních inhibitorů (Li et al., 2016). Tyto nově získané inhibitory jsou efektivní proti *P. falciparum*, a to i u artemisin-rezistentních kmenů (Li et al., 2016). Pro leishmaniosu, Chagasovu chorobu a spavou nemoc byl popsán inhibitor proteasomu GNF6702, který je selektivní vůči proteasomu těchto parazitů, a to nekompetitivním mechanismem, který neinhibuje savčí komplex a je velmi dobře tolerován u myších BALB/c modelů (Khare et al., 2016). Tyto poznatky dokumentují strategii selektivní inhibice parazitárního proteasomu jako velmi slibný terapeutický nástroj pro léčbu závažných onemocnění (Khare et al., 2016).

1.3.2.1 Inhibice proteasomu babesii

Vzhledem k příbuznosti *P. falciparum* a babesii byl v rámci současně probíhajícího projektu naší laboratoře, kterého je tato bakalářská práce součástí, testován vliv několika komerčně dostupných inhibitorů proteasomu na růst a přežívání *B. divergens* v *ex vivo* kultuře bovinních erytrocytů. Mezi tyto látky patřily: carfilzomib, bortezomib, ixazomib, ONX-0914 a epoxomicin. Všechny inhibitory prokázaly supresivní efekt na růst *B. divergens* (*ex vivo*) v bovinních erytrocytech. Jako nejefektivnější inhibitor byl vyhodnocen carfilzomib, který byl použit k testování vlivu inhibice proteasomu babesii v BALB/c myších, infikovaných *B. microti* (*in vivo*). Byl prokázán terapeutický účinek a demonstrována akumulace polyubiquitovaných proteinů v parazitech pomocí protilátek (Jalovecka et al., 2018b).

2. Cíle práce

- Optimalizace kultivace *B. divergens in vitro* v bovinních erythrocytech a kultivace *B. microti in vivo* v BALB/c myších
- Izolace *B. divergens* z hostitelských bovinních červených krvinek a izolace *B. microti* z myších erythrocytů ultracentrifugací, mechanickou homogenizací, ultrasonikací a jejich kombinacemi
- Ověření aktivity katalytické $\beta 5$ podjednotky 20S jádra proteasomu parazitů *B. divergens* a *B. microti*
- Purifikace 26S proteasomu pomocí ionexové chromatografie, separace 26S proteasomu pomocí SDS-PAGE a vizualizace barvení stříbrem

3. Materiál a metody

3.1 Kultivace

Kultivace *B. divergens* probíhala *in vitro* při neměnných podmínkách: 37 °C a 5% CO₂ v termoboxu Galaxy 170 S (Eppendorf). Manipulace s kulturami byla prováděna v laminárním boxu Airstream® Class II (BSCO) za dodržení základních podmínek sterilní práce. Pro *B. microti* nebyla dosud zavedena kontinuální dlouhodobá *in vitro* kultivace, proto byl tento parazit udržován *in vivo* v laboratorních myších BALB/c (kapitola 3.1.2).

3.1.1 Parazit

B. divergens: Ve všech experimentech byl použit kmen *Babesia divergens* 2210A G2 (Jalovecka et al., 2016).

B. microti: Ve všech experimentech byl použit kmen *Babesia microti* (Franca) Reichenow (ATTC® PRA-99™).

3.1.2 Laboratorní zvířata pro *in vivo* kultivaci *B. microti*

Pro udržení linie *B. microti* byly používány 7–týdenní samice BALB/c myši (Charles River Laboratories). Po dobu trvání experimentů byly laboratorní myši uchovávány v laboratorní místnosti zvěřince PaÚ BC AVČR za konstantních podmínek (20 °C, 60% vlhkost), krmeny sterilní komerční směsí (Velaz) a napájeny sterilní vodou. Se všemi zvířaty bylo zacházeno v souladu se zákonem č. 359/2012 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, s etickým souhlasem č. 112/2016 a všechny *in vivo* experimenty byly schváleny Etickou komisí AV ČR.

3.1.3 Erythrocyty pro *in vitro* kultivaci *B. divergens*

B. divergens byla kultivována *in vitro* v suspenzi bovinních erytrocytů získaných z místních jatek. Po odebrání krve do sterilní nádoby byl obsah manuálně defibrinován důkladným mícháním sterilní špachtlí. Poté byla krev 3× přečištěna v promývacím médiu (Tab. 1) v předchlazené centrifuze Multi Centrifuge 3SR (2000g, 4 °C, 10 min; Heraeus), čímž byly odstraněny zbývající fibrinové složky a krevní sérum. Fibrinová vrstva a leukocyty (tzv. „buffy coat“) byly po každé centrifugaci odstraněny pipetou z povrchu peletu. K přečištěným erytrocytům bylo přidáno promývací médium (Tab. 1) v odpovídajícím poměru 1 : 2 a buňky byly uchovány ve 4 °C. Takto zpracovaná krev byla použita pro kultivování po dobu 3–6 týdnů. Erythrocyty a média (Tab. 1) byly pravidelně testovány, kvůli možné kontaminaci: 10μl erytrocytů / média bylo pipetou rozetřeno na krevní agar (Dulab), který byl uložen do termoboxu (kapitola 3.1) a pozorován po dobu 3–5 dnů.

3.1.4 Chemikálie

Tab. 1: Média použitá pro kultivaci *B. divergens*.

Chemikálie	Promývací médium [celkový objem 503ml]	Kultivační médium [celkový objem 503ml]
RPMI 1640 (Lonza, cat. no. BE12-115F)	500ml	400ml
Amphotericin B (c=250µg/ml; Sigma-Aldrich cat. no. 1397-89-3)	0,5ml	0,5ml
Gentamicin Sulfate (c=10mg/ml; Lonza, cat. no. 17-519L)	2,5ml	2,5ml
Fetální bovinní sérum (inaktivace při 56 °C po dobu 30 min před použitím; Capricorn, cat. no. FBS-11A)		100ml

3.1.5 Pasážování

B. divergens: Pro udržování kultivační linie *B. divergens in vitro* byly použity 24-jamkové kultivační destičky (BioTech; cat. no. 92024). Do kultivační jamky byla připravena suspenze 2ml kultivačního média (Tab. 1) společně s 50µl bovinních erytrocytů. Poté byl přidán pelet rozmražené krve infikované babesiemi (1 díl infikovaných erytrocytů : 1 díl 30% glycerolu v Alservere roztoku (Sigma-Aldrich) : 1 díl fetálního bovinního séra, uchováno v tekutém dusíku). Výsledný 2,5% hematokrit (poměr mezi objemem erytrocytů a objemem celé krve) byl udržován po celou dobu kultivace *B. divergens*. Při dosažení 5–10% parazitémie (kapitola 3.1.6) bylo z jamky odebráno 10µl infikovaných erytrocytů, které byly umístěny do nové jamky se suspenzí média a erytrocytů o stanoveném hematokritu. Při dosažení 5–10% parazitémie (kapitola 3.1.6) byly babesie namnoženy do kultivačních lahví o obsahu 25cm² (VWR; cat. no. 110062-860) a 75cm² (VWR; cat. no. 110062-860), se zachováním stanoveného hematokritu.

B. microti: BALB/c myši bylo intraperitoneálně (i. p.) injikováno 200µl rozmražené krve (2 díly infikované krve: 1 díl 30% glycerolu v Alservere roztoku (Sigma-Aldrich), inkubováno 15 min na ledu a následně zmrazeno v tekutém dusíku) obsahující *B. microti*. Při dosažení 5–10% parazitémie (kapitola 3.1.6) byla myš uspána i. p. injikováním 150µl anestezie (směs 8ml 5% Narkamonu - Spofa, 2ml 2% Rometaru - Spofa a 10ml 1×PBS) a vykrvena. Odebraná krev byla smíchána s antikoagulačním roztokem CPD (Citrated-phosphate-dextrose solution; Sigma-Aldrich, cat. no. C7165) v poměru 3 díly CPD: 7 dílům krve a 250µl této směsi bylo injikováno i. p. do další myši. Po dosažení vysoké parazitémie

(>50%, obvykle 6. den po iniciaci infekce) byla stejným postupem myši opět odebrána krev a využita pro infekci většího množství experimentálních myší.

3.1.6 Stanovení parazitémie

Stanovení parazitémie (počet napadených červených krvinek v celkovém množství krve) bylo stanoveno metodou krevního nátěru. Podložní sklo bylo po uschnutí obarveno komerční barvicí sadou Diff Quick Staining Set (Siemens), která je založená na Giemsa barvení. Preparáty byly ponořeny do Diff-Quik Fix (10s), následně do Diff-Quik I (10s) a poté ponechány v Diff-Quik II (60s). Skla byla opláchnuta vodou a 70% etanolem (odstranění zbytků barvicích roztoků). Takto upravený nátěr byl vizualizován ve světelném mikroskopu Olympus BX53F pod objektivem se zvětšením 100× (celkové zvětšení 1000×) a s použitím imerzního oleje. Dokumentace byla provedena kamerou Olympus DP73. Parazitémie byla počítána vždy na 1000 erytrocytů.

3.1.7 Příprava lyzátů

B. divergens: Lyzát byl připraven ze 120–200ml *in vitro* kultury *B. divergens*, ve které byla stanovena 10% parazitémie (kapitola 3.1.6) s 2,5% hematokritem. K suspenzi byl přidán 2% saponin v poměru 1:10 (fin. c = 100 µl/ml; Sigma-Aldrich). Suspenze byla inkubována při 4 °C po dobu 5 min a následně 2–3× promyta s následnou centrifugací (2000g, 4 °C, 10 min) v 1× PBS (Phosphate Buffered Saline). K získanému peletu byl přidán 20% glycerol v 1× PBS v poměru 2:1 (lyzát : glycerol) a vzorek byl uskladněn při -80 °C.

B. microti: Lyzát byl připraven z krve 5 myší infikovaných *B. microti*, ve kterých byla stanovena 50% parazitémie (kapitola 3.1.6). Ke krvi byl přidán antikoagulační roztok CPD v poměru 3 díly CPD : 7 díly krve a tato směs byla centrifugována (2000g, 4 °C, 10 min) za účelem promytí červených krvinek. Dále byl postup stejný jako pro *B. divergens*.

3.2 Izolace proteasomu *B. divergens* a *B. microti*

K izolaci proteasomu bylo zvoleno několik postupů, které byly vzájemně porovnány měřením chymotrypsinové aktivity β5 podjednotky v enzymatických esejích s fluorescenčně značeným peptidickým substrátem (kapitola 3.3).

3.2.1 Ultrasonikace

Ultrasonikace je účinná metoda pro přípravu homogenních vzorků, která rychle uvolňuje intracelulární materiál z vnitřního prostředí buněk do roztoku pufru. Mechanické smykové síly ultrazvukové homogenizace tkáně slouží k narušení integrity buněk. Lyzát o objemu 300µl v 20% glycerolu (kapitola 3.1.7) byl sonikován pomocí ultrazvukového procesoru UP200S (3×15 s, 0,5 amplituda; Hielscher). Za účelem zabránění přehřívání lyzátu,

byl vzorek po celou dobu uchováván na ledu a zároveň byla mezi intervaly udržována pauza 30s.

3.2.2 Ultracentrifugace

Ultracentrifugace dělí molekuly působením gravitačních sil, které jsou větší než síly difuzní. Makromolekulární látky jsou z buněk uvolňovány fyzikálním působením. Výsledkem je rozdělení vzorku do několika frakcí. 300 μ l lyzátu v 20% glycerolu (kapitola 3.1.7) bylo přemístěno pipetou do silnostěnné polypropylenové zkumavky (Beckman; cat. no. 347287). Vzorek byl následně centrifugován v přístroji Optima TLX (Beckman) při 100 000g, 4 °C po dobu 90 min a výsledný supernatant a pelet byly odděleny. K peletu byl přidán aktivitní pufr (Tab. 2) v poměru 1:1. Poté byl celý obsah homogenizován mnohonásobným pipetováním nahoru-dolů a vzorky byly použity pro měření enzymatické aktivity β 5 podjednotky (kapitola 3.3).

3.2.3 Mechanická homogenizace

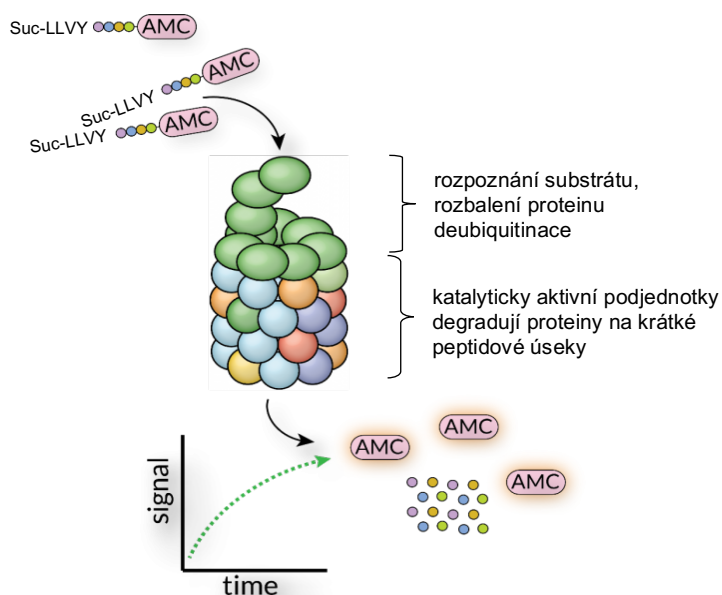
Tento protokol byl převzat a upraven z publikace popisující izolaci a purifikaci proteasomu *P. falciparum* (Wang et al., 2015). Vzorek byl mechanicky protlačen úzkým otvorem za vysokého tlaku pomocí 20ml injekčních stříkaček (Braun; cat. no 4606205) s jehlami o různých průměrech (viz níže), čímž byla narušena integrita buněk. Parazité byly smíchány s aktivitním puffrem (Tab. 2) v poměru 3 díly lyzátu : 7 díly aktivitního puffru. Tato suspenze byla protlačena 1 \times stříkačkou skrz jehlu o průměru 0,55mm (Braun; cat. no 4657675) a poté 8 \times stříkačkou skrze jehlu s diametrem 0,4mm (Braun; cat. no 4657705). Homogenizace probíhala po celou dobu na ledu a výsledný vzorek byl ihned použit pro stanovení enzymatické aktivity β 5 podjednotky (kapitola 3.3).

3.3 Stanovení aktivity

Pro detekování enzymatické aktivity β 5 podjednotky byl používán fluorescenčně značený peptidový substrát suc-LLVY-AMC (fin. c = 20 μ M; Bachem, cat no. S-280). Kinetické probíhalo v destičkovém fluorometru Infinite M200 Pro (Tecan) při excitační/emisní vlnové délce 360/460 nm, v intervalu 1 min po dobu 60 min za konstantní teploty 37 °C. Jako pozitivní kontrola byl použit izolovaný lidský 26S proteasom (fin. c = 10 μ l/ml; Sigma-Aldrich). Jako negativní kontrola byla použita pre-inhibice (30 min) carfilzomibem (fin. c = 10 μ l/ml; Selleckchem, cat no. S2853). Reakční pufr obsahoval inhibitor cysteinových proteáz E64 (fin. c = 1 μ M; Sigma-Aldrich, cat no. 66701-25-5) k minimalizaci degradace proteinů v průběhu esejí a odclonění nespecifické aktivity cysteinových proteáz – bovipainů (Mesplet et al., 2010).

Tab. 2: Pufry používané pro měření aktivity vzorku.

Chemikálie	Aktivní pufr [celkový objem 1ml]	Substrátový pufr [celkový objem 1ml]
100mM HEPES (fin. c = 20mM; Sigma-Aldrich)	200 μ l	200 μ l
2% SDS (dodecylsírán sodný; fin. c = 0,03%; Sigma-Aldrich)	15 μ l	15 μ l
100mM ATP (adenosintrifosfát; fin. c = 1mM; Sigma-Aldrich)	10 μ l	10 μ l
1mM E64 (fin. c = 1 μ M; Sigma-Aldrich)	1 μ l	1 μ l
MiliQ	774 μ l	773 μ l
20mM Suc-LLVY-AMC (fin. c = 20 μ M; Biochem)		1 μ l



Obr. 4: Mechanismus detekování enzymatické aktivity za použití Suc-LLVY-AMC. Po rozštěpnutí substrátového řetězce peptidázou $\beta 5$ podjednotky dochází k uvolnění AMC (aminometyl kumarín), který je fluorescenční a může být detekován ve fluorometru (southbaybio.com)

3.4 Purifikace 26S proteasomu *B. microti*

3.4.1 Ionexová chromatografie

Princip purifikace je založený na iontových interakcích mezi iontoměniččem a separovanou látkou, která nese opačný náboj. Ionty elektrostaticky navázané na povrch pevné, nerozpustné a chemicky inertní kolony se reversibilně vyměňují s ionty z roztoku. Síla vazby je dána iontovou silou prostředí a hodnotou pH. V této práci byl aplikován upravený protokol pro afinitní purifikaci 26S proteasomu pomocí HiTrap DEAE-FF 5ml kolony (GE Healthcare Life Science), který se používá pro izolaci proteasomu *P. falciparum* (Li et al., 2012). Supernatant o objemu 1ml z lyzátu *B. microti*, u kterého byla detekována aktivita (Obr. 11A, izolace pomocí kombinace ultracentrifugace a mechanické homogenizace) chymotrypsinové $\beta 5$ podjednotky proteasomu, byl smíchán s aktivním pufrem (Tab. 2) v poměru 1:1. Tento

vzorek byl použit pro ionexovou chromatografii pomocí purifikátoru ÄKTA pure 25 (GE Healthcare Life Science) při stanovení 0-1 M lineárního gradientu NaCl (pufr A, B - Tab. 3), kterého bylo dosaženo při průtoku 1ml/min. Výsledné frakce o objemu 1 ml, ve kterých byl uvolněn proteasom – zjištěno vysokou hodnotou konduktivity (elektrická vodivost, odpovídající přibývajícím množství solí) – byly analyzovány detekováním enzymatické aktivity $\beta 5$ podjednotky (kapitola 3.3.) a vizualizovány SDS-PAGE (kapitola 3.4.2).

Tab. 3: Pufry použité pro purifikaci proteasomu ionexovou chromatografií.

	Chemikálie
Pufr A	20mM TRIS, 1mM DDT, 10% glycerol, pH: 7,5–8
Pufr B	20mM TRIS, 1mM DDT, 10% glycerol, 1M NaCl, pH: 7,5–8

3.4.2 SDS-PAGE a stříbření

Proteiny byly separovány na základě jejich elektroforetické pohyblivosti pomocí metody SDS-PAGE (Polyakrylamidová elektroforéza). Vzorky frakcí byly smíchány se vzorkovým redukcijním pufrům (Tab. 4) v daném poměru a zdenaturovány varem (95 °C, 10 min). Poté byly vzorky schlazeny, centrifugovány (12000g, 2 min) a naneseny do jamek Criterion™ TGX Stain-Free™ gelu (Bio-Rad, cat. no 5678023) v naředěném elektroforetickém pufru (10× Running buffer, Bio-Rad, cat. no. 1610732). Jako velikostní marker („ladder“) byl použit PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, cat. no. 26616). Vzorky byly separovány v elektroforetické aparatuře The Criterion™ cell (Bio-Rad) ve stejnosměrném elektrickém poli (200V po dobu 45 min – než bromfenolová modř ze vzorkového pufru dosáhla spodní části gelu). Poté byly proteiny v gelu vizualizovány v imageru ChemiDoc MP (Bio-Rad), za použití UV stain-free technologie.

Pro lepší detekci proteinů byla použita metoda stříbření (Silver staining). Roztok Farmer I. (Tab. 4) byl smíchán s roztokem Farmer II. (Tab. 4) v poměru 1:1. Gel byl inkubován směsí těchto roztoků po dobu 2 min. Poté byl gel promyt destilovanou vodou (dH₂O, 30 min). Následovala inkubace gelu v roztoku 0,1% AgNO₃, rozpuštěném v dH₂O (45 min, poté promytí dH₂O). Zvýšení kontrastu bylo dosaženo vyvolávacím roztokem (2–5 min; Tab. 4) a poté bylo vyvolávání zastaveno 1% kyselinou octovou, naředěnou v destilované vodě (10 min).

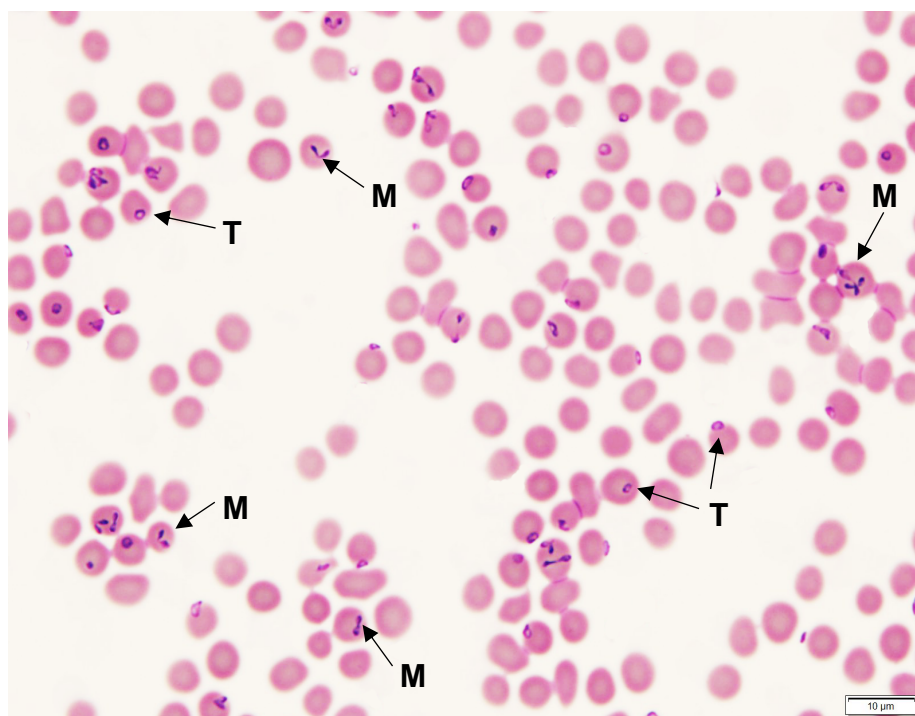
Tab. 4: Roztoky použité pro metodu SDS-PAGE a stříbření.

	Chemikálie
Vzorkový redukující pufr	NuPAGE™ LDS 4× Sample Buffer (Thermo Fisher Scientific, cat. no NP0008) s přidáním redukujícího DTT (fin. c = 50mM)
Farmer I.	2% $K_3 [Fe(CN)_6]$
Farmer II.	2% $Na_2S_2O_3$
Vyvolávací roztok	3% Na_2CO_3 , 0,02% formalín

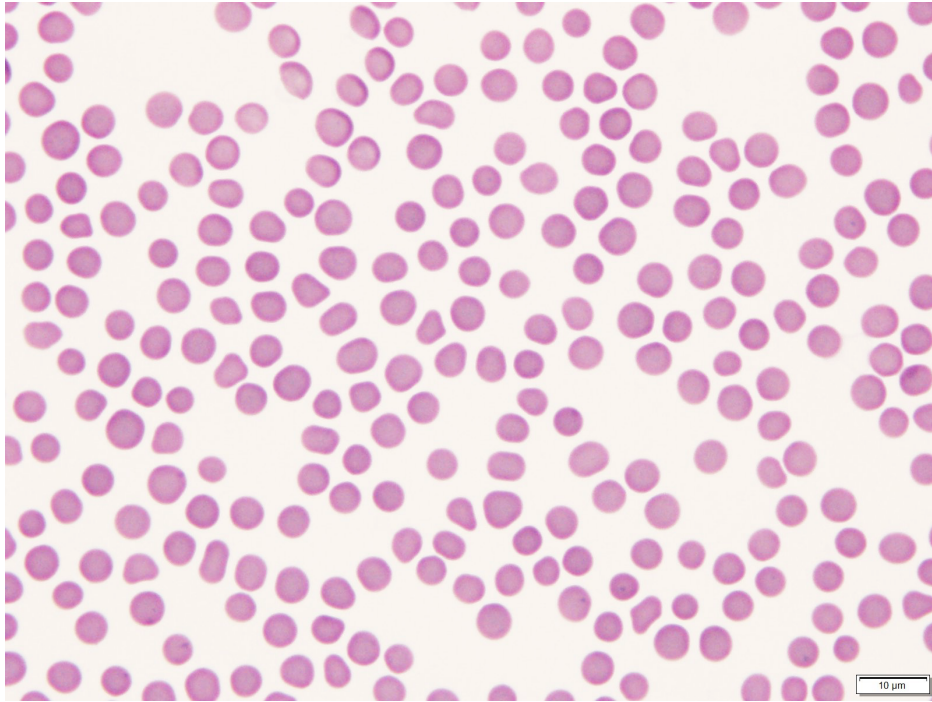
4. Výsledky

4.1 Kultivace

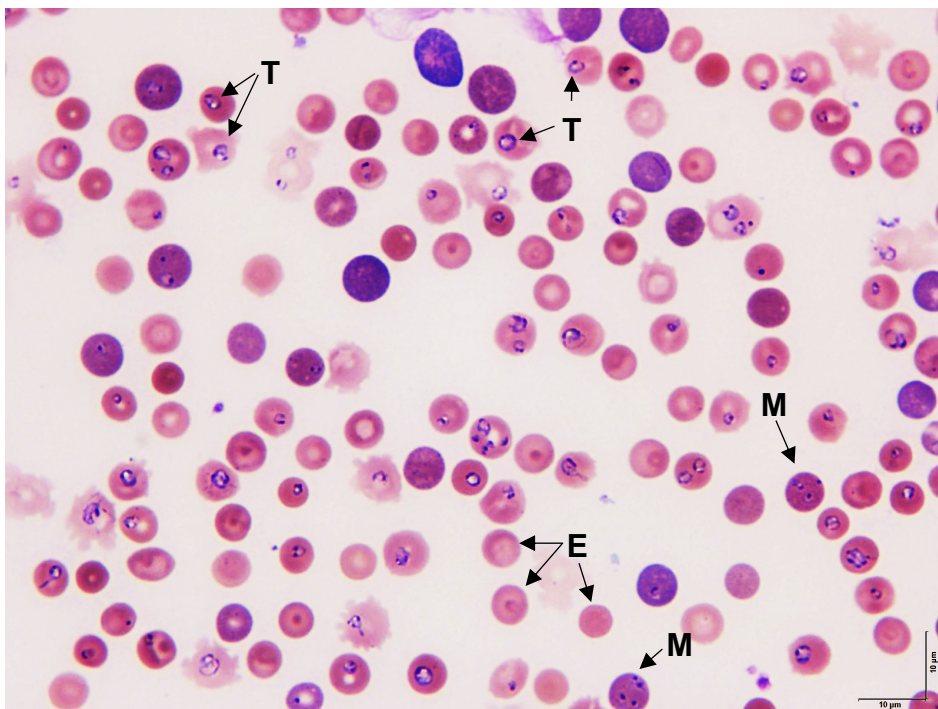
Na Obr. 7 a 9 jsou rozeznatelné jednotlivé fáze intra-erytrocytárního vývoje *B. divergens* a *B. microti*. Na Obr. 7 je krevní roztěr infikovaný *B. divergens*, ve kterém jsou označená stádia trofozoitů, merozoitů a merozoitů, které jsou uspořádané v tetradách. Pro porovnání jsou na Obr. 8 neinfikované bovinní erythrocyty. Na Obr. 9 je krevní roztěr infikovaný *B. microti*, na kterém jsou viditelná stádia trofozoitů, merozoitů. Ideální interval pasážování (výměna média a přidání bovinních erythrocytů) *B. divergens* byl 1× za 2–3 dny při kultivování v čerstvých erythrocytech – stáří do 3 týdnů po odběru. V kratším intervalu nebyla parazitémie dostatečně vysoká, naopak po 3 dnech obsahovala kultura *B. divergens* vysoké procento mrtvých babesií a přestávala se množit. Při kultivaci *B. divergens* v suspenzi starších erythrocytů (stáří delší než 3 týdny po odběru) se tento interval posunul na pasážování 1× 3–5 dní. Při rozmražení peletu krve infikované *B. divergens* bylo pozorováno výrazné prodloužení doby (7–14 dní) potřebné pro dosažení dostatečné parazitémie a následné kultivaci. Pro *B. microti* byl optimalizován interval pasážování na 6–7 dní. Další faktory byly převzaty ze zavedeného postupu, poskytnutého školitelem specialistou (Jalovecká et al., 2017), proto nebyl postup kultivace *B. microti* dále optimalizován. Nejvhodnější parazitémie pro přípravu lyzátu z kultury *B. divergens* byla 15%. Při odběru krve z myši BALB/c, infikované *B. microti*, byla nejlepší doba při dosažení 50% parazitémie.



Obr. 7: Krevní roztěr *in vitro* kultivované *B. divergens* v bovinních erythrocytech. Krevní roztěr byl obarven metodou Diff-Quik a vyšetřen mikroskopicky pod celkovým zvětšením 1000×. M = merozoit, MT = merozoiti tvořící tetradu, T = trofozoit.



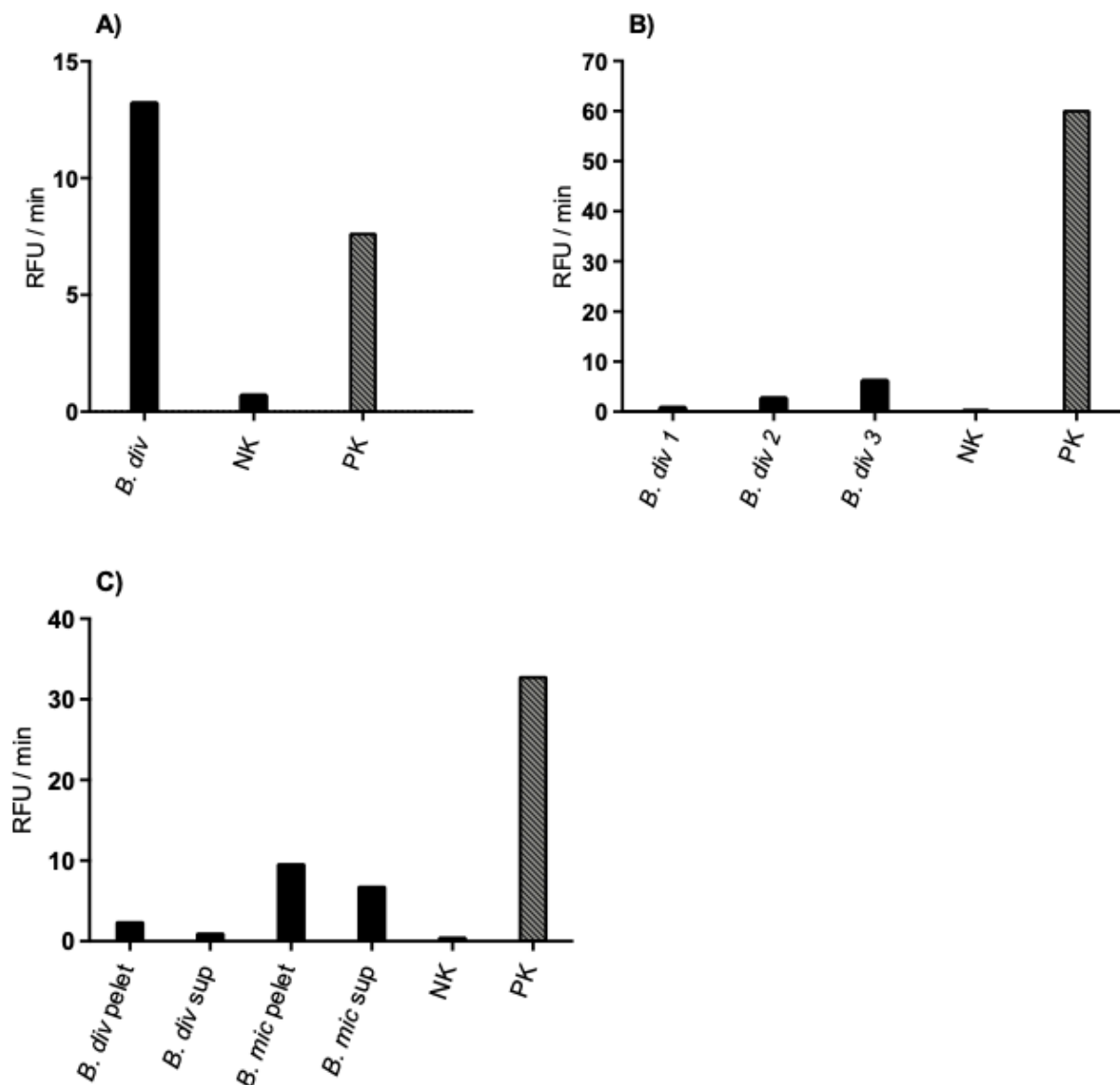
Obr. 8: Krevní roztěr kontrolních neinfikovaných bovinních erytrocytů. Erythrocyty byly kultivovány za stejných podmínek jako *in vitro* kultura *B. divergens*. Krevní roztěr byl obarven metodou Diff-Quik a vyšetřen mikroskopicky pod celkovým zvětšením 1000×.



Obr. 9: Krevní roztěr *in vivo* kultivované *B. microti* v BALB/c myši. Krevní roztěr byl obarven metodou Diff-Quik a vyšetřen mikroskopicky pod celkovým zvětšením 1000×. M = merozoit, T = trofozoit, E = zralý erytrocyt.

4.2 Izolace proteasomu *B. divergens* a *B. microti*

Na Obr. 10 je graficky znázorněn výsledek enzymatických kinetických esejí se substrátem Suc-LLVY-AMC porovnávajících vzorky pocházející z izolace proteasomu *B. divergens* a *B. microti* ultrasonikací, mechanickou homogenizací a ultracentrifugací. Metoda ultrasonikace (Obr. 10A) byla vyhodnocena jako nejefektivnější, protože relativní aktivita je 13,2 RFU/min (relativní fluorescenční jednotky za minutu) při objemové koncentraci 100 μ l/ml vzorku v esěji. V porovnání izolace proteasomu *B. divergens* a *B. microti* ultracentrifugací (Obr. 10C) byla aktivita nejvyšší v peletu vzorku *B. microti* (9,5 RFU/min) a v supernatantu vzorku *B. microti* (6,7 RFU/min). Aktivita těchto vzorků byla detekována při objemové koncentraci 500 μ l/ml vzorku v esěji. Mechanickou homogenizací peletu *B. divergens* (Obr. 10B) bylo dosaženo maximální aktivity ve vzorku 3 při objemové koncentraci 300 μ l/ml vzorku v esěji. Všechny metody byly opakovaně testovány a v této práci je popsán výsledný optimalizovaný postup. Například pro ultrasonikaci bylo zkoušeno několik intervalů: 1 \times 15s, 2 \times 15s, 3 \times 15s, 4 \times 15s a 5 \times 15s, při stejné 0,5 amplitudě. Nejefektivnější způsob ultrasonikace byl vyhodnocen jako 3 \times 15s. Ultracentrifugace byla provedena při 60 000g, 70 000g, 80 000g, 90 000g a 100 000g (4 °C, 90 min), z čehož je 100 000g nejvhodnější použitá hodnota přetížení. Postup mechanické homogenizace byl převzat z publikace (Wang et al., 2015) a nebyl dále optimalizován.

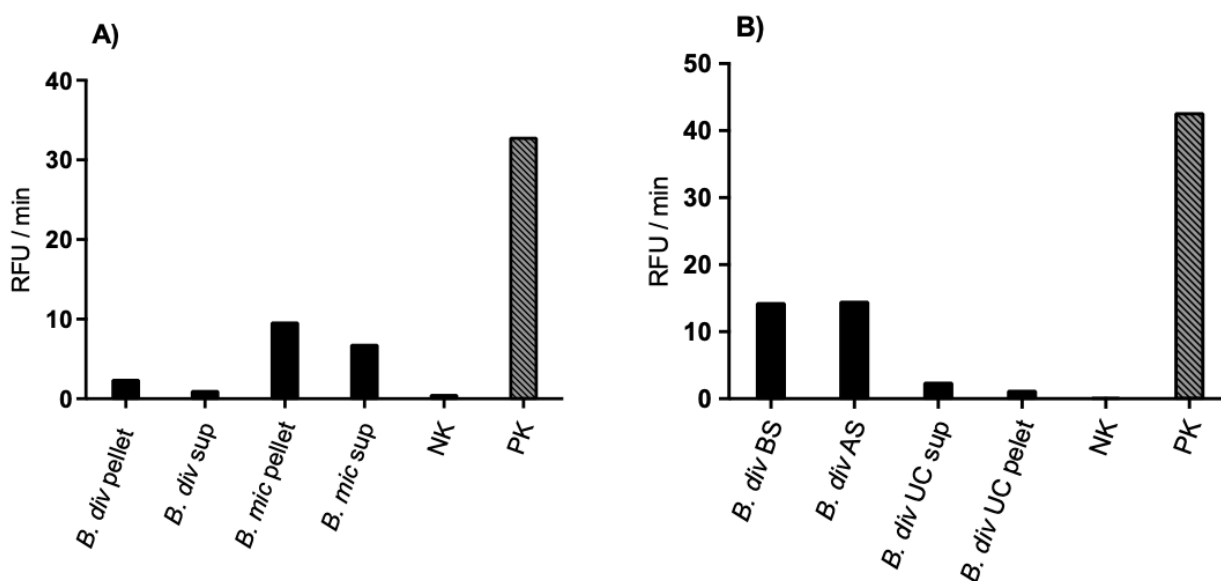


Obr. 10: Metody izolace proteasomu *B. divergens* a *B. microti*. **A) Ultrasonikace:** Vzorek *B. divergens* byl změřen při objemové koncentraci 100 μ l/ml, pozitivní kontrola při objemové koncentraci 30 μ l/ml. **B) Mechanická homogenizace:** Vzorky *B. divergens* pocházely ze stejného lyzátu a pro účel optimalizace byly měřené v různých koncentracích. Vzorek *B. divergens* 1 byl změřený při objemové koncentraci 100 μ l/ml, *B. divergens* 2 při objemové koncentraci 200 μ l/ml a *B. divergens* 3 při objemové koncentraci 300 μ l/ml, pozitivní kontrola při objemové koncentraci 10 μ l/ml. **C) Ultracentrifugace:** Vzorky *B. divergens* a *B. microti* byly změřené při koncentraci 500 μ l/ml, pozitivní kontrola při objemové koncentraci 10 μ l/ml. Při oddělování supernatantu a peletu jsme pelet naředili aktivním puřem (Tab. 2) v poměru 1:1. RFU/min = relativní fluorescenční jednotky/min; NK = negativní kontrola; PK = pozitivní kontrola. Aktivita byla ve všech postupech detekována v intervalu 1 min po dobu 60 min použitím fluorescenčního substrátu suc-LLVY-AMC.

4.3 Kombinace metod pro izolaci 26S proteasomu

Pro izolaci proteasomu *B. divergens* a *B. microti* bylo zvoleno několik kombinací výše uvedených metod (kapitola 4.2). Izolace proteasomu byla testována kombinací ultracentrifugace a následné mechanické homogenizace (Obr. 11A), ultrasonikací a poté ultracentrifugací (Obr. 11B), a kombinací všech tří metod (Obr. 12). Na Obr. 11B je graficky

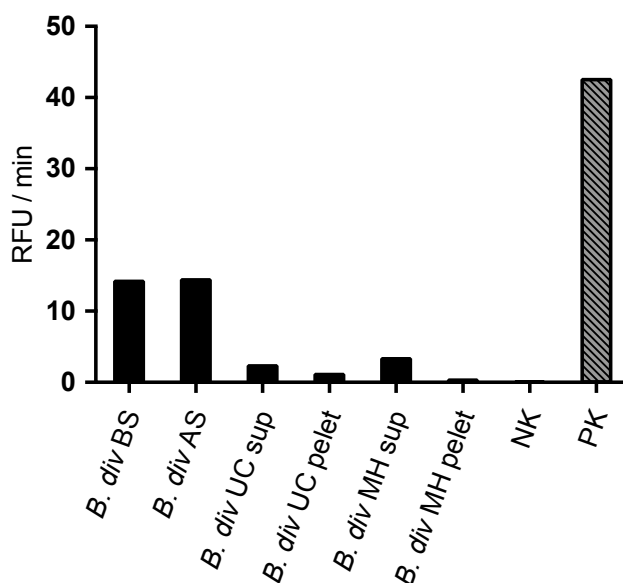
znázorněna kombinace ultrasonikace a následné ultracentrifugace. Vzorky před sonikací (14,2 RFU/min) a po sonikaci (14,4 RFU/min) mají srovnatelnou aktivitu. Po ultracentrifugaci výrazně poklesla aktivita na 2,3 RFU/min v supernatantu *B. divergens* a 1,1 RFU/min v peletu *B. divergens*, při objemových koncentracích 400 μ l/ml vzorku v esejí. Mechanickou homogenizací a následnou ultracentrifugací (Obr. 11A) bylo dosaženo nejvyšší aktivity ve vzorku *B. microti* pelet (9,5 RFU/min) a ve vzorku *B. microti* supernatant (6,7 RFU/min). Tato aktivita byla detekována při objemové koncentraci 500 μ l/ml vzorku v esejí. Tato metoda byla vyhodnocena jako nejefektivnější pro izolaci proteasomu *B. microti*.



Obr. 11: Kombinace metod izolace proteasomu *B. divergens* a *B. microti*. **A) Ultracentrifugace a poté mechanická homogenizace:** Vzorky *B. divergens* a *B. microti* byly změřené při objemové koncentraci 500 μ l/ml, pozitivní kontrola při objemové koncentraci 10 μ l/ml. Při oddělování supernatantu a peletu jsme naředili pelet aktivním pufrém (Tab. 2) v poměru 1:1. **B) Ultrasonikace a následná ultracentrifugace:** Vzorky *B. divergens* byly změřené při objemové koncentraci 400 μ l/ml, pozitivní kontrola při objemové koncentraci 10 μ l/ml. Při oddělování supernatantu peletu jsme naředili pelet aktivním pufrém (Tab. 2) v poměru 1:1. RFU/min = relativní fluorescenční jednotky/min; BS = před sonikací; AS = po sonikaci; UC = ultracentrifugace; NK = negativní kontrola; PK = pozitivní kontrola. Aktivita byla detekována v intervalu 1 min po dobu 60 min použitím fluorescenčního substrátu suc-LLVY-AMC.

Na Obr. 12 je kombinace všech tří metod – ultrasonikace, poté ultracentrifugace a nakonec mechanické homogenizace. Nejvyšší aktivita byla změřena u vzorků před sonikací (14,2 RFU/min) a po sonikaci (14,4 RFU/min), při objemové koncentraci 400 μ l/ml. V supernatantu vzorku *B. divergens* po mechanické homogenizaci byl detekován pokles aktivity na 3,3 RFU/min při objemové koncentraci 400 μ l/ml, indikující ztrátu komplexu 26S proteasomu nebo ztrátu aktivity způsobenou jeho rozpadem.

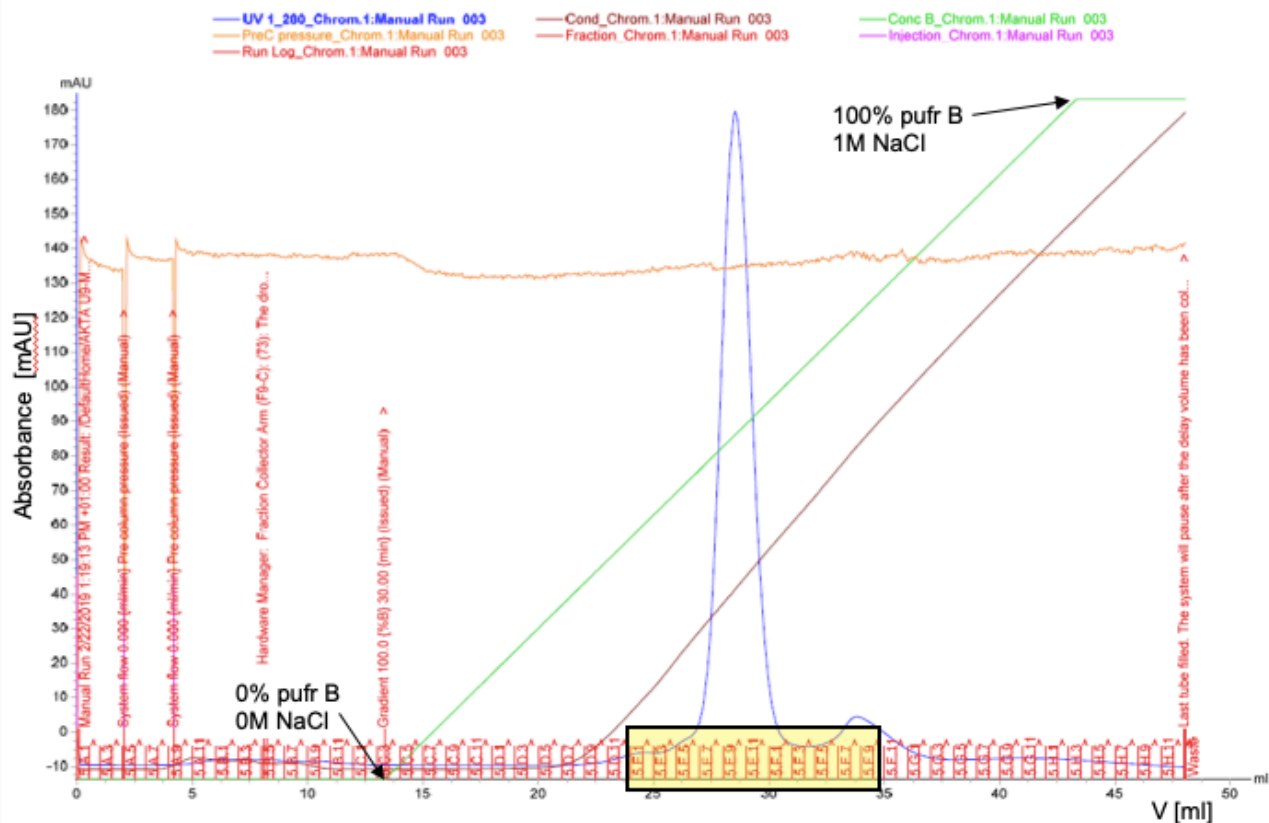
Ultracentrifugace + ultrasonikace + mechanická homogenizace



Obr. 12: Izolace proteasomu *B. divergens* pomocí ultrasonikace, ultracentrifugace a následně mechanickou homogenizací. RFU/min = relativní fluorescenční jednotky/min; BS = před sonikací; AS = po sonikací; UC = ultracentrifugace; MH = mechanická homogenizace; NK = negativní kontrola; PK = pozitivní kontrola. Všechny vzorky *B. divergens* byly změřené při objemové koncentraci 400 μ l/ml, pozitivní kontrola při objemové koncentraci 10 μ l/ml. Při oddělování supernatantu a peletu jsme naředili pelet aktivním pufrům (Tab. 2) v poměru 1:1. Aktivita byla detekována v intervalu 1 min po dobu 60 min použitím fluorescenčního substrátu suc-LLVY-AMC

4.4 Purifikace 26S proteasomu *B. microti*

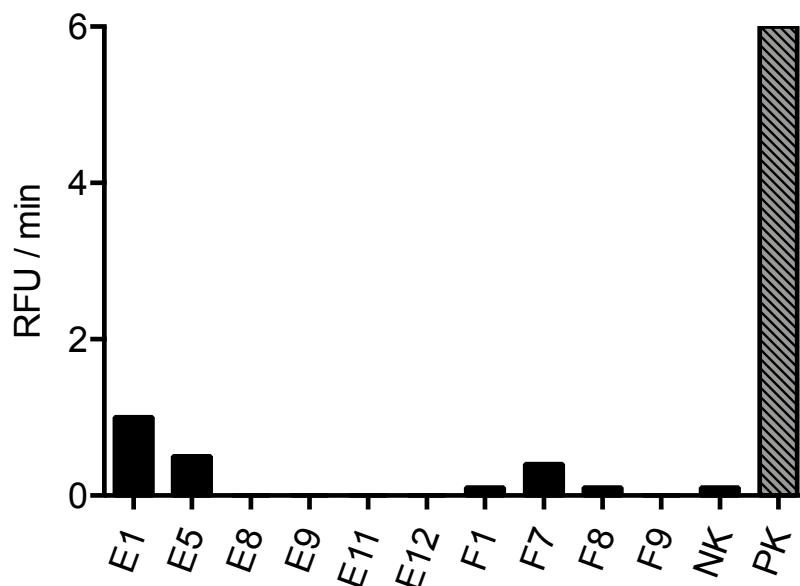
Proteasom *B. microti* byl purifikován metodou ionexové chromatografie za použití 0–1M lineárního gradientu NaCl, kterého bylo dosaženo při průtoku 1ml/min (Obr. 13, zelená křivka). Spolu se zvyšujícím se NaCl gradientem se zvyšovala konduktivita (elektrická vodivost). Modrá křivka znázorňuje absorbanci při vlnové délce 280nm, odpovídající koncentraci proteinů ve sbíraných frakcích na základě jejich extinkčních koeficientů. Ve vyznačených frakcích: (E1, E5, E8, E9, E11, E12, F1, F7, F8 a F9) o objemu 1ml byla stanovena enzymatická aktivita (Obr. 14) a poté byly vzorky separovány SDS-PAGE a vizualizovány pomocí Stain-free technologie (Bio-Rad) a barveny stříbrem.



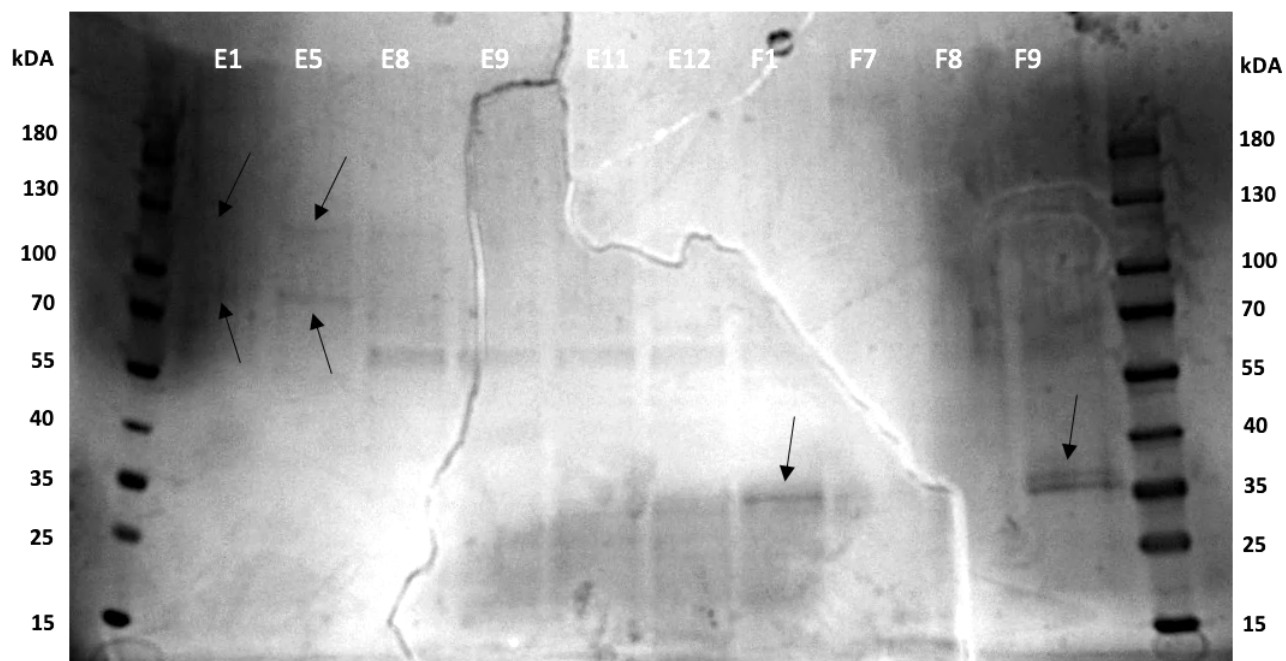
Obr. 13: Purifikace 26S proteasomu *B. microti* pomocí 0-1M lineárního gradientu NaCl (pufr A, B - Tab. 3). Intenzita absorbance byla měřena v mAU (mili-absorbance units). Měření proběhlo při vlnové délce 280nm. Ve vyznačených frakcích: E1, E5, E8, E9, E11, E12, F1, F7, F8 a F9 (žlutý obdélník) byla detekována enzymatická aktivita a tyto vzorky byly dále použity pro separaci SDS-PAGE a následnou vizualizaci barvením stříbrem

Na Obr. 14 je aktivita 26S proteasomu *B. microti* po aplikování ionexové chromatografie. Nejvyšší aktivita byla naměřena ve frakci E1 (1 RFU/min). Ve vzorcích E5 (0,5 RFU/min) a F7 (0,4 RFU/min) byla také detekována aktivita. V ostatních frakcích nebyla pozorována enzymatická aktivita nebo byla velmi nízká (0,1 RFU/min). Při vizualizaci výsledného gelu pomocí TGX Stainfree technologie (Bio-Rad) nebyl dokumentován žádný protein v analyzovaných frakcích (pouze velikostní marker), proto bylo následně zvoleno citlivější barvení stříbrem (Obr. 15), které zviditelnilo dvojité proteinové bandy o velikosti ~ 35kDa ve frakcích F1 a F9 a slabé proteinové bandy o velikostech ~ 120kDa a ~ 90kDa. Tyto proteinové bandy pravděpodobně znázorňují jednotlivé podjednotky komplexu proteasomu, které byly při denuraci varem separovány.

Ionexová chromatografie



Obr. 14: Detekce enzymatické aktivity katalytických podjednotek 26S proteasomu *B. microti* po aplikování ionexové chromatografie. Aktivita byla změřena ve vybraných frakcích (E1, E5, E8, E9, E11, E12, F1, F7, F8 a F9 – označení jednotlivých frakcí, které byly získány ionexovou chromatografií), při objemové koncentraci 500 μ l/ml a pozitivní kontrola při objemové koncentraci 10 μ l/ml. RFU/min = relativní fluorescenční jednotky/min, NK = negativní kontrola, PK = pozitivní kontrola



Obr. 15: TGX Stain-Free (Bio-Rad) SDS-PAGE gel. Frakce E1, E5, E8, E9, E11, E12, F1, F7, F8 a F9 (označení jednotlivých frakcí) byly získány ionexovou chromatografií a obarveny stříbrem (Silver staining). Ve frakcích F1 a F9 jsou viditelné dvojité proteinové bandy o velikosti ~ 35kDa, ve frakcích E1 a E5 lze pozorovat slabé bandy o velikostech ~ 120kDa a ~ 90kDa, které pravděpodobně znázorňují jednotlivé podjednotky.

5. Diskuze

Kultivace *B. divergens in vitro* v bovinních erythrocytech je zavedenou metodou, která je používána již řadu let (Chauvin et al., 2002). *B. divergens* je možné udržovat nejen v *in vitro*, ale i *in vivo* v pískomilech (*Meriones unguiculatus*; Lewis and Williams, 1979) a v krysách (*Rattus rattus*; Phillips, 1984). Tato infekce laboratorních zvířat ale neprobíhá kontinuálně a dlouhodobě (vyvinutí akutní a fatální formy babesiosy; Lewis and Williams, 1979). Infikování pískomilů (*Meriones unguiculatus*) *B. divergens in vivo* bylo testováno školitelem specialistou (Jalovecká et al., 2017). V krvi testovaných laboratorních zvířat byly pozorovány odlišnosti v růstových křivkách; v části laboratorních zvířat byla maximální parazitémie dosažena během 1 týdne po infekci, ale přibližně u jedné třetiny byla vybudována rezistence a nebyly infikovány *B. divergens*. Kultivace *B. microti in vitro* byla ověřena v kultuře erytrocytů křečků (Bautista and Kreier, 1979; Shikano et al., 1995), avšak ani tato metoda nebyla kontinuální a dlouhodobá. Úspěšné *in vivo* infekce *B. microti* bylo dosaženo u makaka (*Macaca mulatta*; Ruebush et al., 1981), pískomilů (*Meriones unguiculatus*; Gray et al., 2002), křečků (*Meriones unguiculatus*; Cullen and Levine, 1987; Ike et al., 2005) a myší (BALB/c; Ruebush and Hanson, 1979), které se ukázaly být nejnímavější, proto byly zvoleny pro naše experimenty.

Kultivace *B. divergens in vitro* byla optimalizována na pasážování 1× za 2–3 dny v čerstvých bovinních erythrocytech (stáří do 3 týdnů po odběru). V kratším intervalu nebyla parazitémie dostatečně vysoká (2-5%), naopak po 3 dnech se proliferace parazitů zastavila a kultura obsahovala mrtvé babesie. Pro *B. microti* byl interval pasážování (1× ze 6–7 dní) v BALB/c myších převzat z již zoptimalizovaného postupu, poskytnutého školitelem specialistou (Jalovecká et al., 2017). Pro přípravu lyzátu *B. divergens* byla stanovena nejvhodnější 15% parazitémie, u *B. microti* tomu tak bylo při dosažení 50% parazitémie. Morfologické rozdíly mezi *B. divergens* a *B. microti* byly pozorovány ve světelném mikroskopu po Giemsa barvení skel (kapitola 3.1.6). U *B. divergens*, patřící do skupiny *Babesia sensu stricto*, jsou stádia trofozoitů kulatého nebo oválného tvaru a jsou velmi dobře rozpoznatelná. Pro *B. divergens* jsou také typická stádia merozoitů, uspořádaných v tetrádách (tzv. Maltézský kříž). Na druhou stranu u *B. microti*, která je fylogeneticky řazena na bázi řádu Piroplasmida do skupiny *Babesia microti-like* (Jalovecka et al., 2019), byla tato uskupení tetrad pozorována výjimečně při dosažení vysoké parazitémie (>50%).

Současná léčba lidské babesiosy je založená na kombinaci antibiotik a antimalarik, například atovaquonu a azithromycinu, která ale může vést k recidivě nebo rezistenci parazita vůči lékům zejména u dlouhodobé léčby (Vannier et al., 2015). U pacientů se závažnou babesiosou se doporučuje alternativní léčba kombinací klindamycinu s quininem,

kteřá vřak nikdy nebyla klinicky testována (Vannier et al., 2008). Proto je v zájmu lidské medicíny nalézt specifický a selektivní lék pro babesiosu, založený na molekulární struktuře proteasomu (Simon et al., 2017; Vannier et al., 2015).

Nízkomolekulární sloučeniny, které selektivně inhibují 26S proteasom parazita a zároveň zůstávají inertní vůči hostitelským buňkám, představují novou strategii léčby parazitárních onemocnění – malárie (Li et al., 2016), leishmaniosy, Chagasovy choroby a spavé nemoci (Khare et al., 2016). Kombinace inhibice cílené na 26S proteasom *P. falciparum* s artemisinem, může vést k dysfunkci protein-recyklačních systémů parazitární buňky, kterým je například ubiquitinová degradační dráha, a je účinná i proti běžné léčbě odolným kmenům *P. falciparum* (Bridgford et al., 2018).

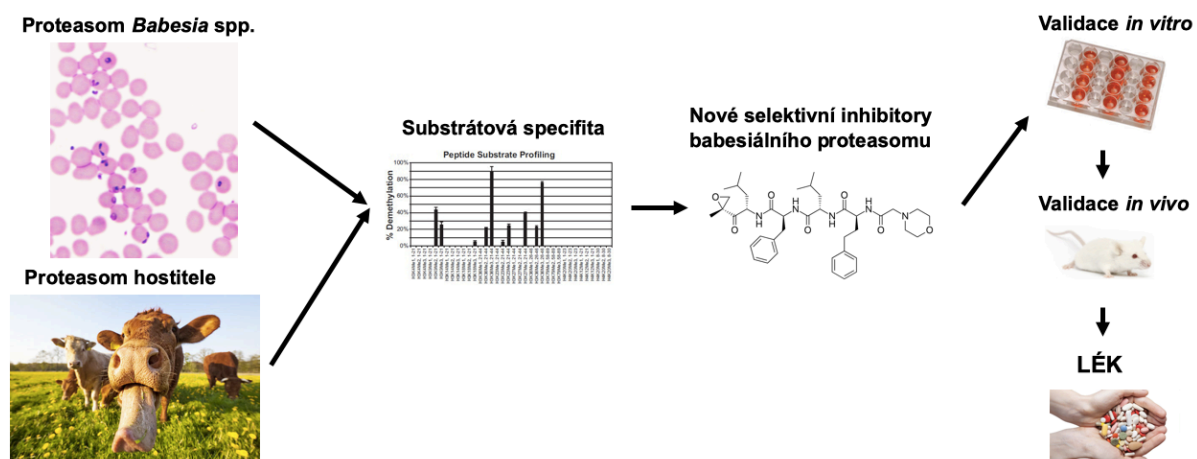
Protože jsou *Babesia* spp. evolučně blíže příbuzné s *Plasmodium* spp. (Arisue and Hashimoto, 2015), lze předpokládat, že cílená inhibice 26S proteasomu babesii skrývá potenciál pro chybějící specifickou léčbu babesiosy. To prokázaly původní experimenty s epoxomicinem, který má inhibiční účinky na proliferaci *Babesia bovis*, *Theileria equi* v *in vitro* kulturách a *B. microti* *in vivo* v BALB/c myřích (AbouLaila et al., 2010). V naší laboratoři byl poté ověřen terapeutický účinek inhibitorů proteasomu pomocí epoxyketonů (carfilzomib, ONX-0914, epoxomicin) a derivátů kyseliny borité (bortezomib, ixazomib) na kultury *B. divergens* *in vitro* v bovinních erythrocytech a *B. microti* *in vivo* v BALB/c myřích (Jalovecka et al., 2018b), který může být využit pro chybějící selektivní léčbu babesiosy.

Z možných postupů izolace proteasomu, které jsou používány pro *P. falciparum*, se pro babesiejevila jako nejúčinnější mechanická homogenizace jehlami o různých průměrech (Wang et al., 2015). Tento postup byl ale efektivní až po změně složení lyzačních a purifikačních pufřů. Ačkoliv izolace proteasomu ultrasonikací je za optimalizovaných podmínek jako samostatná metoda efektivní (Obr. 10A), v kombinaci s ultracentrifugací (Obr. 11B) vede ke snížení enzymatické aktivity proteasomu *B. divergens*. Samostatná ultracentrifugace může vést k získání aktivního proteasomu zejména u *B. microti*, není vřak příliš efektivní při získávání enzymatické aktivity proteasomu v supernatantu (Obr. 10C), což je podmínka pro purifikaci proteasomu ionexovou chromatografií. Proto byla používána v kombinaci s mechanickou homogenizací (Obr. 11A) a s ultrasonikací (Obr. 11B). Zatímco první kombinace vede ke zvýšení aktivity proteasomu *B. microti*, druhá kombinace vede ke snížení enzymatické aktivity proteasomu *B. divergens*. To se potvřdilo i při kombinaci všech tří postupů (Obr. 12), která k úspěšné izolaci aktivního proteasomu babesii také nevedla. Shrnout získané poznatky lze tak, že pro izolaci aktivního proteasomu *B. divergens* z kultury bovinních erythrocytů je nejefektivnější mechanická homogenizace (Obr. 10B), izolace proteasomu *B. microti* z krve BALB/c myří je nejefektivnější při kombinaci mechanické

izolace s ultracentrifugací (Obr. 11A). Alternativní postup používaný pro izolaci proteasomu *P. falciparum* – opakované chlazení peletu parazitů v tekutém dusíku a zahřívání na pokojovou teplotu (LaMonte et al., 2017) – byl testován, ale jevil se jako neefektivní (není součástí prezentovaných výsledků).

Ze třech postupů purifikace proteasomu *P. falciparum* - imunoprecipitace pomocí protilátek (Mata-Cantero et al., 2014; Wu et al., 2016), afinitní purifikace pomocí kombinace UBL (ubiquitin-binding domain) a UIM (ubiquitin-interacting motif) domén (Wang et al., 2015) a ionexové chromatografie pomocí HiTrap DEAE-FF kolony (Li et al., 2012), byla pro purifikaci babesálního proteasomu zvolena třetí možnost. Tato metoda byla vybrána, protože je nejjednodušší, nejšetrnější ke komplexu proteasomu a je nejrychlejší. Výsledné frakce se suc-LLVY-AMC enzymatickou aktivitou (Obr. 14) byly analyzovány pomocí redukující SDS-PAGE a obarveny stříbrem (Obr. 15). Ačkoliv byl gel během manipulace poškozen, lze ve frakcích E1, E5, F1 a F9 pozorovat proteinové bandy odpovídající denaturovanému komplexu 26 proteasomu (porovnání s identickým protokolem pro *P. falciparum*, *Trichomonas vaginalis* a *Schistosoma mansoni*). Vzhledem k okolnostem bude zvolený postup purifikace babesálního proteasomu dále optimalizován zvýšením počátečního množství parazitů a identifikací pozorovaných bandů, odpovídajících podjednotkám 26S proteasomu po tepelné denaturaci. To bude potvrzeno přímo hmotnostní spektrometrií (Mass-spectrometry, MS) nebo nepřímo pomocí Western blotu a protilátek, které rozpoznávají podjednotky 26S proteasomu. Aktivní proteasom lze ověřit i pomocí afinitního značení tzv. aktivními próbami (BMV037 nebo MV151; Li et al., 2016) nebo in-gel aktivní esejí se substrátem suc-LLVY-AMC (Wang et al., 2015).

Hlavním cílem probíhajícího projektu naší laboratoře je navržení, produkce a testování nových inhibitorů selektivních k proteasomu babesii, které mohou být dále testovány jako specifická terapeutika k léčbě babesiosy v rámci projektů aplikovaného výzkumu ve spolupráci s farmaceutickým průmyslem. Na Obr. 16 je znázorněn celkový postup, který se používá pro zvýšení selektivity nových inhibitorů proteasomu *P. falciparum*. Po získání substrátové specifity a proteinové struktury aktivních míst katalytických podjednotek parazitárního a hostitelského proteasomu, budou porovnáním těchto dat navrženy a otestovány selektivní inhibitory proteasomu babesii. Zároveň, vzhledem k blízké příbuznosti řádu Piroplasmida a *P. falciparum*, budou testovány nové generace inhibitorů proteasomu *P. falciparum*, které byly vyvinuty našimi kolegy na Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California San Diego.



Obr. 16: Zjednodušené schéma celkového cíle dlouhodobého projektu laboratoře. Specifická léčiva pro babesiosu, založená na selektivní inhibici proteasomu.

6. Závěr

Kultivace *B. divergens in vitro* v bovinních erythrocytech a *B. microti in vivo* v laboratorních BALB/c myších a stanovení vhodné parazitémie pro izolaci proteasomu byla optimalizována. Nejvhodnější parazitémie pro přípravu lyzátu z kultury *B. divergens* byla 15%. Při odběru krve z myši BALB/c infikované *B. microti* byla nejlepší doba při dosažení 50% parazitémie. Pro izolaci 26S proteasomu *B. divergens* a *B. microti* byly porovnány různé metody izolace: ultracentrifugace, mechanická homogenizace, ultrasonikace a jejich kombinace. Podařilo se zavést a optimalizovat postup pro izolaci proteasomu a následně ověřit aktivitu katalytické $\beta 5$ podjednotky 26S proteasomu za použití fluorescenčně značeného peptidového substrátu Suc-LLVY-AMC. Dále byl vyizolovaný 26S proteasom purifikován pomocí ionexové chromatografie a výsledek byl analyzován pomocí SDS-PAGE a pro lepší vizualizaci obarven stříbrem. Výsledky mají význam v rámci dlouhodobého projektu laboratoře, protože znamenají důležitý posun pro navrhování nových inhibitorů selektivních k proteasomu babesii, které mohou být dále testovány jako specifická terapeutika k léčbě babesiosy.

7. Seznam použité literatury

- AbouLaila, M., Nakamura, K., Govind, Y., Yokoyama, N., and Igarashi, I. (2010). Evaluation of the in vitro growth-inhibitory effect of epoxomicin on Babesia parasites. *Vet. Parasitol.*
- Almond, J. B., and Cohen, G. M. (2002). The proteasome: A target novel for cancer chemotherapy. *Leukemia.*
- Arisue, N., and Hashimoto, T. (2015). Phylogeny and evolution of apicoplasts and apicomplexan parasites. *Parasitol. Int.*
- Basler, M., Mundt, S., Bitzer, A., Schmidt, C., and Groettrup, M. (2015). The immunoproteasome: A novel drug target for autoimmune diseases. *Clin. Exp. Rheumatol.*
- Bautista, C. R., and Kreier, J. P. (1979). Effect of immune serum on the growth of Babesia microti in hamster erythrocytes in short-term culture. *Infect. Immun.*
- Bednarska, M., Bajer, A., Drozdowska, A., Mierzejewska, E. J., Tolkacz, K., and Welc-Falęciak, R. (2015). Vertical transmission of Babesia microti in BALB/c mice: Preliminary report. *PLoS One.*
- Bhattacharyya, S., Yu, H., Mim, C., and Matouschek, A. (2014). Regulated protein turnover: Snapshots of the proteasome in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*
- Bibo-Verdugo, B., Jiang, Z., Caffrey, C. R., and O'Donoghue, A. J. (2017). Targeting proteasomes in infectious organisms to combat disease. *FEBS J.*
- Bonnet, S., Jouglin, M., Malandrin, L., Becker, C., Agoulon, A., L'Hostis, M., et al. (2007). Transstadial and transovarial persistence of Babesia divergens DNA in Ixodes ricinus ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology.*
- Bridgford, J. L., Xie, S. C., Cobbold, S. A., Pasaje, C. F. A., Herrmann, S., Yang, T., et al. (2018). Artemisinin kills malaria parasites by damaging proteins and inhibiting the proteasome. *Nat. Commun.*
- Burns, K. E., Cerda-Maira, F. A., Wang, T., Li, H., Bishai, W. R., and Darwin, K. H. (2010). "Depupylation" of Prokaryotic Ubiquitin-like Protein from Mycobacterial Proteasome Substrates. *Mol. Cell.*
- Chauvin, A., Valentin, A., Malandrin, L., and L'Hostis, M. (2002). Sheep as a new experimental host for Babesia divergens. *Vet. Res.*
- Cullen, J. M., and Levine, J. F. (1987). Pathology of experimental Babesia microti infection in the Syrian hamster. *Lab Anim Sci.*
- Goldberg, A. L. (2012). Development of proteasome inhibitors as research tools and cancer drugs. *J. Cell Biol.*
- Gorenflot, A., Carcy, B., Moubri, K., Precigout, E., and Schetters, T. (1998). Les babésioses humaines. *Médecine Mal. Infect.*
- Gray, J., von Stedingk, L. V., Gürtelschmid, M., and Granström, M. (2002). Transmission studies of Babesia microti in Ixodes ricinus ticks and gerbils. *J. Clin. Microbiol.*
- Hajdušek, O., Síma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., de la Fuente, J., et al. (2013). Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*
- Hildebrandt, A., Gray, J. S., and Hunfeld, K. P. (2013). Human Babesiosis in Europe: What clinicians need to know. *Infection.*
- Hildebrandt, A., Hunfeld, K. P., Baier, M., Krumbholz, A., Sachse, S., Lorenzen, T., et al. (2007). First confirmed autochthonous case of human Babesia microti infection in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*
- Homer, M. J., Bruinsma, E. S., Lodes, M. J., Moro, M. H., Telford, S., Krause, P. J., et al. (2000). A polymorphic multigene family encoding an immunodominant protein from Babesia microti. *J. Clin. Microbiol.*
- Hunfeld, K. P., Hildebrandt, A., and Gray, J. S. (2008). Babesiosis: Recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.*
- Ike, K., Komatsu, T., Murakami, T., Kato, Y., Takahashi, M., Uchida, Y., et al. (2005). High

- Susceptibility of Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus*) to the Infection with *Babesia microti* Supported by Hemodynamics. *J. Vet. Med. Sci.*
- Jalovecka, M., Bonsergent, C., Hajdusek, O., Kopacek, P., and Malandrin, L. (2016). Stimulation and quantification of *Babesia divergens* gametocytogenesis. *Parasit. Vectors.*
- Jalovecka, M., Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., and Malandrin, L. (2018a). The Complexity of Piroplasms Life Cycles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*
- Jalovecka, M., Hartmann, D., Miyamoto, Y., Eckmann, L., Hajdusek, O., O'Donoghue, A. J., et al. (2018b). Validation of *Babesia* proteasome as a drug target. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., and Schnittger, L. (2019). *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. *Trends Parasitol.*
- Jalovecká, M., Urbanová, V., Sojka, D., Malandrin, L., Šíma, R., Kopáček, P., et al. (2017). Establishment of *Babesia microti* laboratory model and its experimental application. in *Tick and Tick-borne Pathogen Conference & 1st Asia Pacific Rickettsia Conference*, 140.
- Joseph, J. T., Purtill, K., Wong, S. J., Munoz, J., Teal, A., Madison-Antenucci, S., et al. (2012). Vertical transmission of *Babesia microti*, United States. *Emerg. Infect. Dis.*
- Kane, R. C., Farrell, A. T., Sridhara, R., and Pazdur, R. (2006). United States Food and Drug Administration approval summary: Bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin. Cancer Res.*
- Khare, S., Nagle, A. S., Biggart, A., Lai, Y. H., Liang, F., Davis, L. C., et al. (2016). Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature.*
- Kim, K. B., and Crews, C. M. (2013). From epoxomicin to carfilzomib: Chemistry, biology, and medical outcomes. *Nat. Prod. Rep.*
- Kjemtrup, A. M., and Conrad, P. A. (2000). Human babesiosis: An emerging tick-borne disease. *Int. J. Parasitol.*
- Krause, P. J., McKay, K., Gadbaw, J., Christianson, D., Closter, L., Lepore, T., et al. (2003). Increasing health burden of human babesiosis in endemic sites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
- LaMonte, G. M., Almaliti, J., Bibo-Verdugo, B., Keller, L., Zou, B. Y., Yang, J., et al. (2017). Development of a Potent Inhibitor of the Plasmodium Proteasome with Reduced Mammalian Toxicity. *J. Med. Chem.*
- Leiby, D. A. (2011). Transfusion-transmitted *Babesia* spp.: Bull's-eye on *Babesia microti*. *Clin. Microbiol. Rev.*
- Lewis, D., and Williams, H. (1979). Infection of the Mongolian gerbil with the cattle piroplasm *Babesia divergens* [14]. *Nature.*
- Li, H., O'Donoghue, A. J., Van Der Linden, W. A., Xie, S. C., Yoo, E., Foe, I. T., et al. (2016). Structure-and function-based design of Plasmodium-selective proteasome inhibitors. *Nature.*
- Li, H., Ponder, E. L., Verdoes, M., Asbjornsdottir, K. H., Deu, E., Edgington, L. E., et al. (2012). Validation of the proteasome as a therapeutic target in plasmodium using an epoxyketone inhibitor with parasite-specific toxicity. *Chem. Biol.*
- Mata-Cantero, L., Lafuente, M. J., Sanz, L., and Rodriguez, M. S. (2014). Magnetic isolation of Plasmodium falciparum schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and synchronized in vitro culture. *Malar. J.*
- Mesplet, M., Echaide, I., Dominguez, M., Mosqueda, J. J., Suarez, C. E., Schnittger, L., et al. (2010). Bovipain-2, the falcipain-2 ortholog, is expressed in intraerythrocytic stages of the tick-transmitted hemoparasite *Babesia bovis*. *Parasites and Vectors.*
- Muchamuel, T., Basler, M., Aujay, M. A., Suzuki, E., Kalim, K. W., Lauer, C., et al. (2009). A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat. Med.*
- Muz, B., Ghazarian, R. N., Ou, M., Luderer, M. J., Kusdono, H. D., and Azab, A. K. (2016).

- Spotlight on ixazomib: Potential in the treatment of multiple myeloma. *Drug Des. Devel. Ther.*
- Phillips, R. S. (1984). Babesia divergens in splenectomised rats. *Res. Vet. Sci.*
- Pickart, C. M. (2004). Back to the Future with Ubiquitin. *Cell.*
- Reynolds, J. M., El Bissati, K., Brandenburg, J., Günzl, A., and Mamoun, C. Ben (2007). Antimalarial activity of the anticancer and proteasome inhibitor bortezomib and its analog ZL3B. *BMC Clin. Pharmacol.*
- Rozej-Bielicka W., Stypułowska-Misiurewicz H., G. E. (2015). Babeszjoza u ludzi. *Przegl. Epidemiol.*
- Ruebush, M. J., and Hanson, W. L. (1979). Susceptibility of Five Strains of Mice to Babesia microti of Human Origin. *J. Parasitol.*
- Ruebush, T. K., Collins, W. E., and Warren, M. (1981). Experimental Babesia microti infections in Macaca mulatta: Recurrent parasitemia before and after splenectomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*
- Schnittger, L., Rodriguez, A. E., Florin-Christensen, M., and Morrison, D. A. (2012). Babesia: A world emerging. *Infect. Genet. Evol.*
- Schreeg, M. E., Marr, H. S., Tarigo, J. L., Cohn, L. A., Bird, D. M., Scholl, E. H., et al. (2016). Mitochondrial genome sequences and structures aid in the resolution of Piroplasmida phylogeny. *PLoS One.*
- Shikano, S., Nakada, K., Hashigushi, R., Shimada, T., and Ono, K. (1995). A Short Term in Vitro Cultivation of Babesia rodhaini and Babesia microti. *J. Vet. Med. Sci.*
- Simon, M. S., Westblade, L. F., Dziedziech, A., Visone, J. E., Furman, R. R., Jenkins, S. G., et al. (2017). Clinical and Molecular Evidence of Atovaquone and Azithromycin Resistance in Relapsed Babesia microti Infection Associated with Rituximab and Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin. Infect. Dis.*
- Smith, T. G., Walliker, D., and Ranford-Cartwright, L. C. (2002). Sexual differentiation and sex determination in the Apicomplexa. *Trends Parasitol.*
- Telford 3rd, S. R., and Spielman, A. (1993). Reservoir competence of white-footed mice for Babesia microti. *J Med Entomol.*
- Vannier, E. G., Diuk-Wasser, M. A., Ben Mamoun, C., and Krause, P. J. (2015). Babesiosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*
- Vannier, E., Gewurz, B. E., and Krause, P. J. (2008a). Human Babesiosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*
- Vannier, E., Gewurz, B. E., and Krause, P. J. (2008b). Human Babesiosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.*
- Vannier, E., and Krause, P. J. (2009). Update on Babesiosis. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*
- Wang, L., Delahunty, C., Fritz-Wolf, K., Rahlfs, S., Helena Prieto, J., Yates, J. R., et al. (2015). Characterization of the 26S proteasome network in Plasmodium falciparum. *Sci. Rep.*
- Wu, Y., Cruz, L. N., Szestak, T., Laing, G., Molyneux, G. R., Garcia, C. R. S., et al. (2016). An external sensing system in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. *Malar. J.*
- Yabsley, M. J., and Shock, B. C. (2013). Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.*
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H. E., Taylor, S. M., and Gray, J. S. (2003). Babesia divergens, a Bovine Blood Parasite of Veterinary and Zoonotic Importance. *Clin. Microbiol. Rev.*