

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta
Katedra molekulární biologie a biochemie



Bakalářská práce

**Příprava konstruktů pro overexpresi a krystalizaci
prohibitinového komplexu z *T. brucei***

Petr Růžička

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Julius Lukeš, CSc.

České Budějovice, 2008

Růžička P., 2008: Příprava konstruktů pro overexpresi a krystalizaci prohibitinového komplexu z *T. brucei*. [Preparation of constructs for overexpression and crystallisation of prohibitin complex from *T.brucei*. Bc. Thesis, in Czech.] – 29p., Faculty of Science University of South Bohemia in České Budějovice, Czech republic

Anotace: Aim of this work was to prepare plasmids for overexpression of prohibitin complex from *T. brucei*. To overexpress this protein complex full and truncated versions of two prohibitin genes were cloned into RSFDuet-1. These constructs will be used to overexpress prohibitin complex and subsequently to resolve its crystal structure.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval sám, pouze s využitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

03.01. 2008 v Českých Budějovicích

.....

Petr Růžička

Poděkování: Na tomto místě bych chtěl poděkovat Julovi Lukešovi za perfektní vedení a celému kolektivu laboratoře molekulární parazitologie za pomoc a cenné rady.

OBSAH

1.	Úvod	1
1.1	<i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.2	Životní cyklus <i>T. brucei</i>	2
1.3	Prohibitinový komplex	3
2.	Cíle práce	6
3.	Metody a metody	7
3.1	SOC medium	7
3.2	LB medium	7
3.3	Bakteriální půda	7
3.4	50× TAE	7
3.5	TENS	8
3.6	Kity	8
3.7	Ostatní materiál a chemikálie	8
3.8	Použité vektory	8
3.9	Amplifikace genu pomocí PCR	10
3.10	Agarózová elektroforéza	11
3.11	Stanovení koncentrace DNA	12
3.12	Izolace DNA z gelu	12
	3.12.1 Pomocí Gel extraction Kit	12
	3.12.2 Izolace tekutým dusíkem	12
3.13	Fenol-chloroformová extrakce	12
3.14	Klonování do pCR II-TOPO	12
3.15	Transformace metodou heat-shock	12
3.16	Izolace plazmidové DNA	13
	3.16.1 Izolace alkalickou lýzí	13
	3.16.2 Pomocí Quick Clean 5M Miniprep Kit	13
	3.16.3 Pomocí Plasmid Midiprep Kit	13
3.17	Restrikční reakce	13
3.18	Klonování do RSFDuet-1	14
3.19	Sekvenování	14
4.	Výsledky	15

4.1	Amplifikace genu pomocí PCR	15
4.2	Klonování do pCR II-TOPO	16
4.3	Klonování do RSFDuet-1	17
4.4	Sekvenování	17
5.	Diskuze	24
6.	Závěr	26
7.	Literatura	27

1. Úvod

1.1 *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei je parazitický bičíkovec patřící do řádu Kinetoplastida. V klasickém systému založeném na morfologických znacích se tento řád dělí na dva podřády – Trypanosomatina (*T. brucei*, *T. cruzi*, *T. gambiense*, *Leishmania donovani*, *Phytomonas serpens* aj.) a Bodonina (*Trypanoplasma*, *Cryptobia*, *Bodo* aj.), který je fylogeneticky původnější (Simpson a kol., 2006).

Společným znakem celého řádu Kinetoplastida je přítomnost kinetoplastidové DNA (Shapiro a Englund, 1995), která může představovat až 40% celkové DNA organismu (Lukeš a kol., 1998). Jedná se o zvláštní mitochondriální DNA, která se u podřádu Trypanosomatina vyskytuje ve formě obrovské sítě složené z kruhových molekul dvojího typu, minikroužků a maxikroužků (Klingbeil a kol., 2001). Minikroužky tvoří asi 90% kinetoplastidové DNA, jejich velikost je druhově specifická a pohybuje se od 0,5 do 10 kb (Yurchenko a kol., 1999). V mitochondrii jsou minikroužky vzájemně propojeny formou katenace do jediné sítě, která má tvar disku a je uložena poblíž kinetosomu bičíku (Shlomai, 1994). Minikroužky kódují geny pro guide RNA (gRNA), jejichž transkripty nesou informaci pro editování maxikroužkových genů (Sloof a Benne, 1993). Editování RNA je proces, který spočívá ve vkládání a vyjímání uridinů ze sekvence mRNA, přičemž dochází ke změnám ve čtecím rámci (Benne a kol., 1986). Maxikroužky jsou v mitochondrii přítomny jen v několika desítkách kopií a jsou také vzájemně katenovány uvnitř minikroužků (Shapiro, 1993). Maxikroužky jsou typické mitochondriální geny, které kódují mimo jiné ribozomální 9S a 12S RNA a podjednotky respiračních komplexů (Benne, 1985).

Dalším unikátním znakem trypanosom jsou změny povrchových antigenů prostřednictvím variabilních povrchových antigenů (VSG), které slouží k ochraně před imunitním systémem hostitele (Bridgen a kol., 1976). Efektivnější využití glykolýzy parazita, která je nutná pro získávání energie v savčím hostiteli umožňují glykosomy, zvláštní organely v cytoplazmě bičíkovců (Fairlamb, 1989). Mezi ojedinělé vlastnosti kinetoplastid patří i transplicing a polycistronická transkripce.

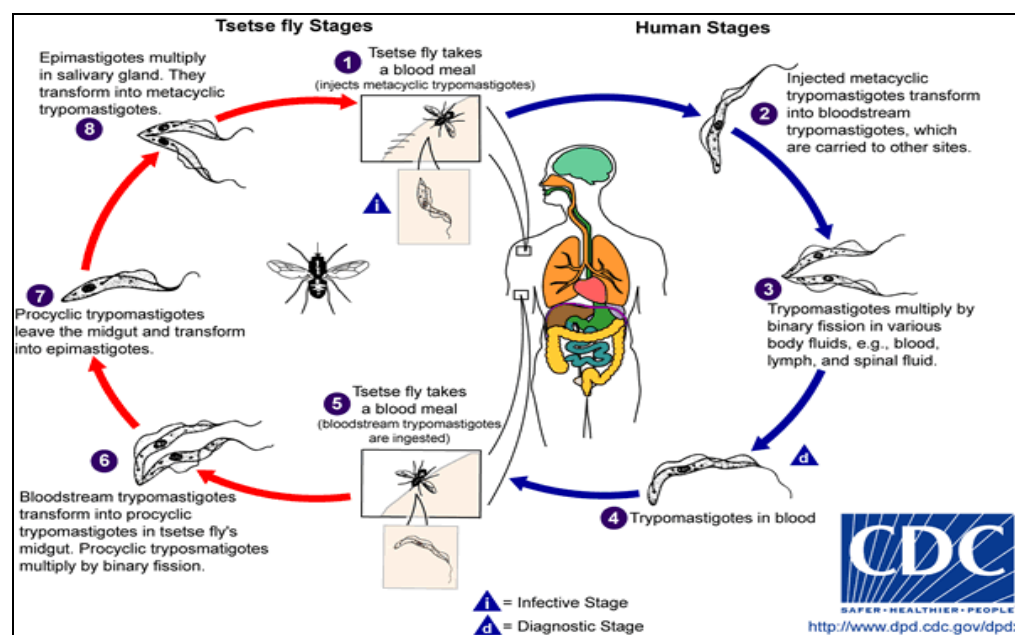
Středem zájmu výzkumu se stal odvozenější podřád Trypanosomatina, jehož zástupci způsobují závažná onemocnění lidí a zvířat. *Leishmania* způsobuje klinicky velice variabilní onemocnění leishmaniózu. *T. rhodesiense* a *T. gambiense* jsou původci spavé nemoci v subsaharské Africe. Tato nemoc ročně postihuje více než půl milionů lidí a více než 70 000

lidí jí podlehne (Matthews, 2005). Poddruh *Trypanosoma brucei brucei* způsobuje u skotu nemoc zvanou nagana (Bakker a kol., 2000).

Životní cyklus *T. brucei*

T. brucei během svého životního cyklu střídá dvě vývojová stádia. Přenašeč moucha tse-tse (*Glossina*) nasaje parazity společně s krví a v jejím trávicím traktu se bičíkovec změní na procyklickou formu. Energetický metabolismus, který je založen převážně na glykolýze se u tohoto stádia mění na metabolismus, který využívá plně funkční mitochondrii (Bowman a kol., 1972). Procyklické trypanosomy se ze zadní části střeva přemísťují do slinných žláz, kde se mění na rychle se dělící epimastigoty. Poté se epimastigoti mění na metacyklické trypomastigoty, kteří jsou připraveni na vniknutí do savčího hostitele a začínají produkovat variabilní povrchové glykoproteiny (VSG) (Donelson, 2003). Celý cyklus v glossině trvá asi dva týdny, po nichž moucha při každém sání přenáší parazity na teplokrevné obratlovce včetně člověka.

V místě vpichu se metacyklické trypanosomy množí, následkem čehož vzniká vřed. Poté se dostávají do lymfatického systému, krve a dalších tkání a mění se na štíhlou krevní formu, která se intenzivně dělí a díky produkci VSG na svém povrchu jsou chráněny před imunitním systémem hostitele. Po čase se v krvi začnou vytvářet infekční trymastigoti, kteří jsou připraveni na vstup do mouchy tse-tse (Beinen a kol., 1991) a celý cyklus se opakuje (Obr. 1).

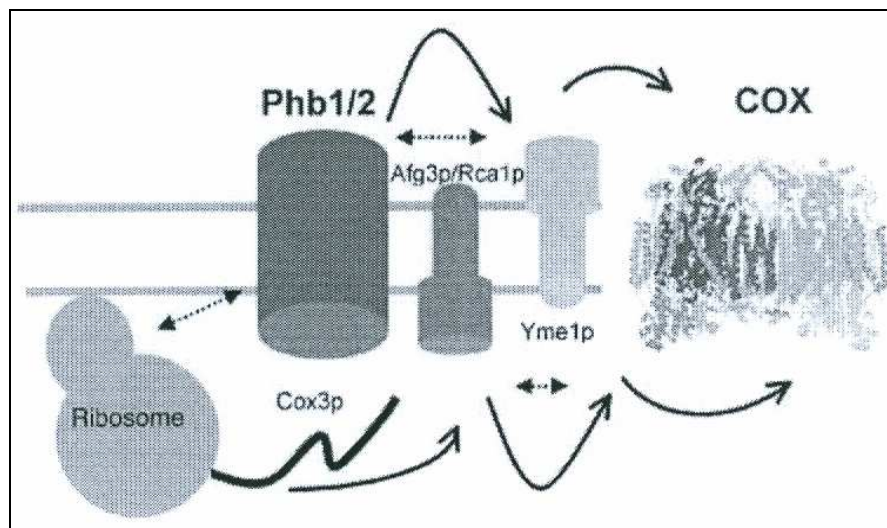


Obr. 1 Životní cyklus *T. brucei*, převzato z www.dpd.cdc.gov

1.2 Prohibitinový komplex

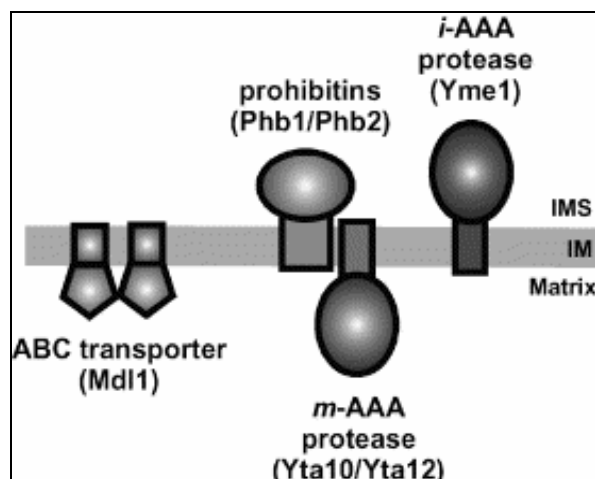
Prohibitiny jsou vysoce konzervativní proteiny s rozmanitými buněčnými funkcemi. Homology těchto jaderně kódovaných proteinů můžeme najít v celé řadě organismů, včetně bakterií (Kihara a kol., 1996), kvasinek (McKlung a kol., 1995), rostlin (Snedden a Fromm H., 1997) a člověka (Sato a kol., 1992). Prohibitinový komplex PHB je tvořen prohibitinem 1 (PHB1) a prohibitinem 2 (PHB2) a je lokalizován v různých částech buňky, většinou na vnitřní mitochondriální membráně, ale i v cytoplazmě a jádře (Terashima a kol., 1994; Wang a kol., 2002).

U *Saccharomyces cerevisiae* PHB komplex funguje jako chaperon, jehož funkcí je stabilizovat nově syntetizované mitochondriální proteiny, příkladem mohou být podjednotky cytochrom c oxidázy Cox2p a Cox3p (Obr. 2) (Nijtmans a kol., 2000). Další možnou funkcí PHB komplexu je regulace aktivity m-AAA (matrix-ATPase associated with a variety of cellular activities) proteázy, prohibitin zde funguje jako její negativní regulátor (Obr. 3) (Steglich a kol., 1999). Výčet možných, ale minimálně experimentálně podpořených funkcí lze ukončit interakcí PHB komplexu s mitochondriálním dýchacím řetězcem (Nijtmans a kol., 2000).



Obr. 2 Schematické znázornění úlohy PHB komplexu v biogenezi dýchacího řetězce, převzato z Nijtmans a kol. (2002).

PHB tvoří na vnitřní mitochondriální membráně kvasinky vysokomolekulární komplex o molekulové hmotnosti 1 MDa. Vzhledem k tomu, že kvasinkový PHB1 má 32 kDa a PHB2 34 kDa, znamená to, že PHB komplex je tvořen 12 – 16 kopiemi obou proteinů (Nijtmans a kol., 2000). Podobná struktura PHB komplexu byla nalezena také v mitochondrii u háďátka (Sanz a kol., 2003).



Obr. 3 Prohibitinový komplex v proteolickém systému na vnitřní mitochondriální membráně, převzato z Arnold a kol. (2002).

Pomocí RNA interference (RNAi) byla u háďátka studována měnící se role PHB proteinu během různých vývojových stádií. Zatímco při embryogenezi mělo utlumení PHB komplexu za následek zastavení vývoje, v postembryonálním vývoji došlo k radikálnímu snížení počtu potomků až sterilitě, redukcí velikosti těla a morfologickým změnám somatických gonád (Sanz a kol., 2003). V jedné z prvních prací zabývajících se funkční analýzou prohibitinů způsobilo vypnutí homologu PHB proteinu u octomilky letalitu během larválního vývoje (Eveleth a Marsh, 1986). Z těchto a dalších studií vyplývá, že cílový protein je nezbytný v jednom nebo více krocích při diferenciaci mnohobuněčných organismů.

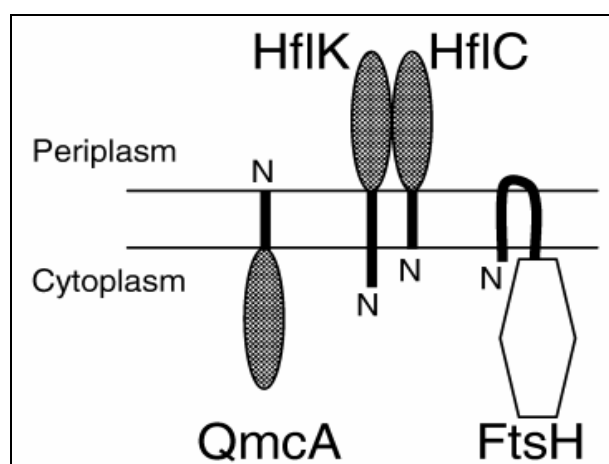
Lidský gen pro prohibitin 1 (*hPHB1*) je lokalizován na chromozomálním úseku 17q21 a kóduje protein o molekulové hmotnosti 32 kDa (White a kol., 1991). Gen pro prohibitin 2 (*hPHB2*) je poněkud delší, jím kódovaný protein má molekulovou hmotnost 37 kDa a nachází se v oblasti chromozómu 12p13 (Asnari a kol., 1997). Díky asociaci s IgM receptorem byly lidské prohibitiny nazvány *BAP32* a *BAP37* (**B**-cell-receptor complex-associated proteins).

Nedávno bylo zjištěno, že se lidský PHB1 váže na mitochondriální komplex I (NADH dehydrogenáza) v dýchacím řetězci (Bourges a kol., 2004). Rovněž byla prokázána interakce PHB1 s retinoblastomovým proteinem, což má za následek utlumení transkripční aktivity

klíčového transkripčního faktoru E2F (Wang a kol., 1999a). V B lymfocytech chrání stabilní overexprese PHB1 buňky před apoptózou a roli při tom pravděpodobně hraje snížení aktivity transkripčního faktoru E2F (Fusaro a kol., 2002). Dále bylo prokázáno, že PHB2 interaguje s estrogenovým receptorem a inhibuje jeho transkripční aktivitu (Montano a kol., 1999). Dosud získané údaje o PHB2 z různých modelových organismů naznačují, že tato univerzální molekula propojuje transkripci v jádře s regulací mitochondriálních funkcí v mitochondrii, čímž hraje roli v komunikaci mezi oběma organelami.

U *T. brucei* také nalezneme PHB komplex, TbPHB1 je dlouhý 834 nukleotidů a jeho lokus se nachází na chromozómu 8. Molekulová hmotnost proteinu je 31,4 kDa. Trypanosomový gen pro prohibitin 2 TbPHB2 je jen o málo větší, je tvořen 888 nukleotidy a nachází se na chromozómu 10. Jeho protein má velikost 32,2 kDa. Stejně jako u jiných organismů také u *T. brucei* vykazují oba proteiny sekvenční homologii a to jak mezi sebou navzájem (35,2%), tak i s lidským prohibitinem PHB1 43,9% a PHB2 39,2% homologie. Navíc mají oba proteiny shodné hlavní domény (Faktorová, nepublikovaná data).

Sekvence podobající se PHB komplexu byla nalezena u *E. coli*. Bakteriální komplex HflK a HflC je homologem PHB1 a PHB2, je zakotven v cytoplazmatické membráně a je orientován do periplasmatického prostoru. Tento komplex, stejně jako jeho kvasinkový homolog, reguluje AAA proteázu FtsH (Kihara a kol., 1996). Uspořádání HflKC na plazmatické membráně je znázorněno na obrázku 4.



Obr. 4 Homolog PHB1/2 v *E.coli* HflKC, převzato z Chiba a kol. (2006).

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo klonování úplných a zkrácených genů pro prohibitin 1 a 2 z *T. brucei* do expresního vektoru RSFDuet-1.

Získané konstrukty byly sekvenovány a poskytnuty spolupracující laboratoři pro účely řešení krystalové struktury PHB proteinů.

3. Materiál a metody

3.1 SOC medium:

- 20g bacto-tryptone (Amresco)
- 5g kvasničného extraktu (Amresco)
- 0.5g NaCl (Lach-Ner)
- 10ml 250mM KCl (Lachema)
- 5ml 2mM MgCl₂ (Lachema)
- 20mM glukóza (Lachema)
- 1000ml H₂O

3.2 LB medium:

- 1g bacto-tryptone
- 0.5g kvasničného extraktu
- 1g NaCl (Lachema)
- 100ml H₂O
- 400μl ampicilinu (25mg/ml) nebo 100μl kanamycinu (50mg/ml),
podle rezistence použitého vektoru

3.3 Bakteriální půda:

- 2g bacto-tryptone
- 1g kvasničného extraktu
- 3g bacto-agar (Amresco)
- 2g NaCl
- 200ml H₂O
- 800μl ampicilinu (25mg/ml) nebo 200μl kanamycinu (50mg/ml),
podle rezistence použitého vektoru

3.4 50× TAE:

- 242g Tris – base (Amresco)
- 57.1ml ledové kyseliny octové (Lachema)
- 100ml 0.5M EDTA (Amresco)
- 1000ml H₂O

3.5 TENS:

- 100 μ M Tris – HCl (pH 8) (Amresco)
- 1 μ M EDTA (pH 8) (Amresco)
- 0,1M NaOH (Amresco)
- 0,5% SDS (Serva)

3.6 Kity:

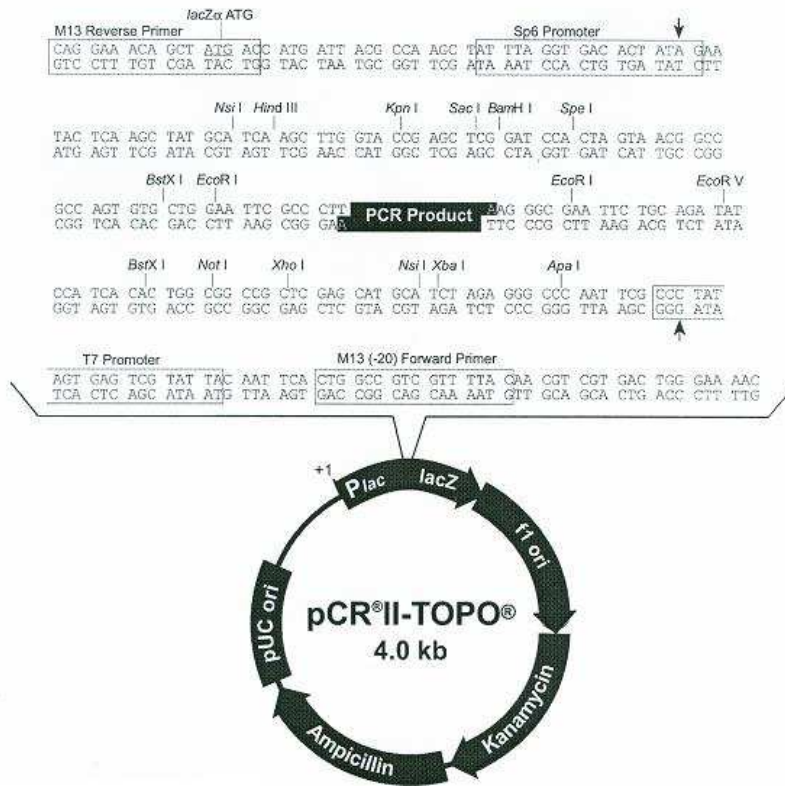
- Quick Clean 5M Miniprep Kit (Genscript)
- Plasmid Midiprep Kit (QIAGEN)
- Quick Clean DNA extraction Kit (Genscript)

3.7 Ostatní materiál a chemikálie:

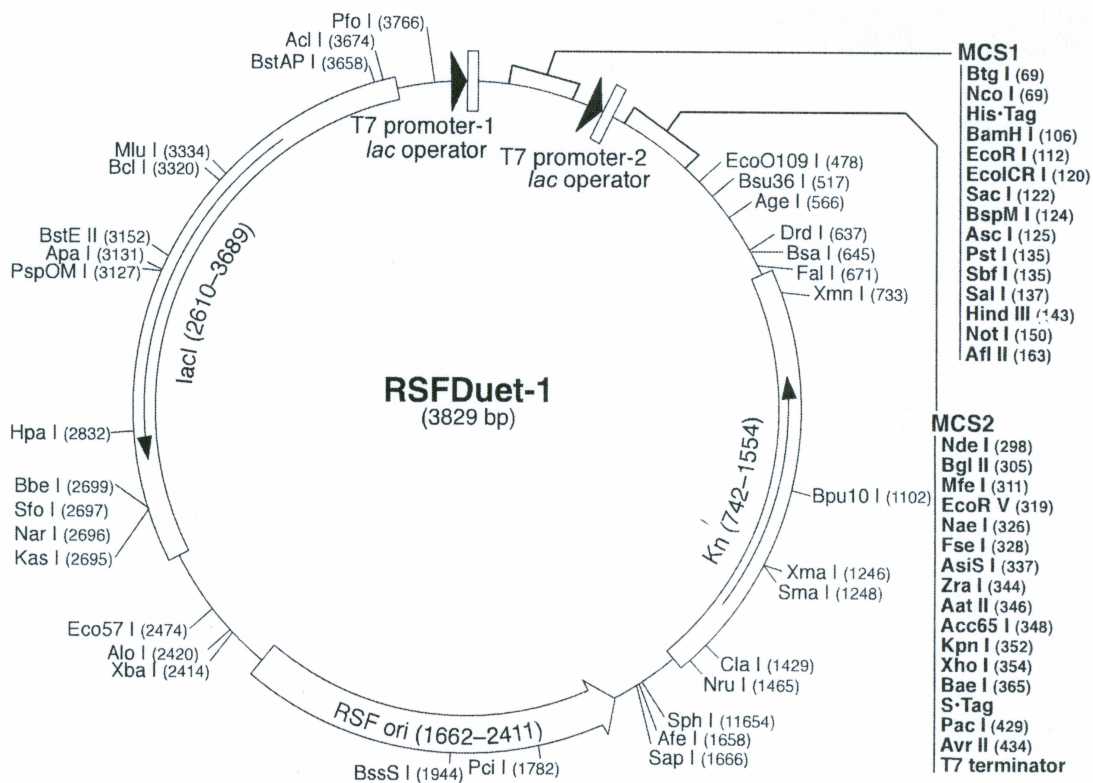
- Antibiotika – ampicilin (Biotika), kanamycin (Amresco)
- Restrikční enzymy – BamHI, HindIII, NdeI, XhoI (NewEnglandBioLabs)
- T4 DNA ligáza (Invitrogen)
- Immoláza (Bioline)
- Taq DNA polymeráza (TopBio)
- dNTPs (Promega)
- X-gal (Alchimica), IPTG (Alchimica)
- Ethidium bromid (Serva)
- DNA Marker 1kb plus (Invitrogen)
- RNáza (NewEnglandBioLabs)
- Agaróza (Rambrex)
- Ethanol (Merck), fenol (Sigma), chloroform (Penta), isopropanol (Sigma), isoamylalkohol (Penta), octan sodný (Penta)
- Kompetentní buňky *E. coli* XL1 Blue
- Celková DNA z *T. brucei*

3.8 Použité vektory:

- pCR II-TOPO (Obr.5) – velikost 3973 nukleotidů, obsahuje *LacZ* gen, T7 promotor, rezistenci proti ampicilinu a kanamycinu (Invitrogen).
- RSFDuet-1 (Obr.6) – velikost 3829 nukleotidů, obsahuje dva T7 promotory a rezistenci ke kanamycinu (Novagen).



Obr. 5 – pCR II-TOPO



Obr. 6 – RSFDuet-1

3.9 Amplifikace genu pomocí PCR

K navrženým oligonukleotidům (Sigma) byla přidána restrikční místa potřebná pro klonování do expresního vektoru RSFDuet-1 (Tab.3). PCR reakce probíhala v přístroji Mastercycler (Eppendorf) za reakčních podmínek uvedených v tabulce 1 a 2.

Složení reakční směsi o výsledném objemu 25 μ l:

1) Reakce s immolázou

2,5 μ l	10 \times immobuffer
1 μ l	50 mM MgCl ₂
0,2 μ l	dNTPs (25mM each)
1 μ l	celková DNA z <i>T. brucei</i>
1 μ l	primer FRW (10 \times zředěné)
1 μ l	primer REV (10 \times zředěné)
0,2 μ l	immolázy
18,1 μ l	H ₂ O
<hr/>	
25 μ l	reakční směsi

2) Reakce s Taq DNA polymerázou

2,5 μ l	10 \times pufr
2 μ l	dNTPs (10 \times zředěné)
1 μ l	celková DNA z <i>T. brucei</i>
1 μ l	primer FRW (10 \times zředěné)
1 μ l	primer REV (10 \times zředěné)
0,5 μ l	Taq DNA polymeráza
17 μ l	H ₂ O
<hr/>	
25 μ l	reakční směsi

Tab. 1 – Reakční podmínky PCR s immolázou:

	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů	Reakce
1.	95	7min.		pre-denaturace
2.	94	30s.	40	denaturace
3.	50	30s.	40	annealing
4.	72	1min.	40	elongace
5.	72	10min.		dosyntetizování
6.	4	-		chlazení

Tab. 2 – Reakční podmínky PCR s Taq DNA polymerázou:

	Teplota (°C)	Čas (min.)	Počet cyklů	Reakce
1.	96	7		pre-denaturace
2.	94	1	30	denaturace
3.	50	1	30	annealing
4.	72	1	30	elongace
5.	72	10		dosyntetizování
6.	4	-		chlazení

Tab. 3 – Seznam primerů pro PCR reakci

Název primeru	Sekvence (5' - 3')	Restrikční místo
Phb1 exp FWD	<u>GGA TCC AGC TTC AGA TTT GTC CAG</u>	BamHI (GGATCC)
Phb1 exp REV	<u>AAG CTT ATG TGC CTG CTC AGA TGC</u>	HindIII (AAGCTT)
Phb2 exp FWD	<u>CAT ATG TCC CGG GCA CCT CCA CCA</u>	NdeI (CATATG)
Phb2 exp REV	<u>CTC GAG ATG TCC AAT AGT TTG GGT</u>	XhoI (CTCGAG)
Phb1 MS FRW	<u>GGA TCC GTA TAT CCT GGT GAA GCT GCC</u>	BamHI (GGATCC)
Phb2 MS FRW	<u>CAT ATG GTT GAT GGC GGC TGC TGC GCG</u>	NdeI (AAGCTT)

3.10 Agarózová elektroforéza

Připravíme si 0.75% agarózový gel (agaróza + 0.5×TAE pufr), který rozvaříme v mikrovlnné troubě a zchladíme proudem studené vody na teplotu přibližně 60°C. Přidáme 1μl ethidium bromidu (5 mg/ml) a gel nalijeme do připravené formy s hřebenem a necháme ztuhnout. Gel vložíme do elektroforeticé vany s 0.5×TAE pufr. Do jamek nanese požadované množství vzorku s nanášecím pufr. v poměru 10:1. Horizontální elektroforézu necháme probíhat při napětí 50 – 90V po dobu nutnou k rozdělení sledovaných fragmentů. Rozdělené fragmenty detekujeme pomocí UV transluminátoru (Stratagene) při vlnové délce 302 nm.

3.11 Stanovení koncentrace DNA

Koncentraci DNA stanovujeme pomocí spektrofotometru Biophotometr (Eppendorf) v oblasti UV světla při vlnové délce 260nm.

3.12 Izolace DNA z gelu

3.12.1 Pomocí Gel extraction Kit

Postupujeme podle návodu dodávaného komerční firmou spolu s kitem.

3.12.2 Izolace tekutým dusíkem

Z gelu vyřízneme fragment o příslušné velikosti a vložíme na dvě minuty do tekutého dusíku. Přidáme 100µl vody a zmrzlý obsah drtíme homogenizátorem. Přidáme stejný objem fenolu, zvortexujeme a opět vložíme do dusíku. Rozmrazíme při 37°C a stočíme při 13000 rpm 10 minut (centrifuge 5415C, Eppendorf). Supernatant přeneseme do čisté mikrokumavky a provedeme fenol-chloroformovou extrakci.

3.13 Fenol-chloroformová extrakce

Do reakční směsi přidáme 0,5 objemu fenolu a 0,5 objemu chloroformu s isoamylalkoholem (1:24) a mícháme 10 minut. Stočíme 10 minut při 14000 rpm. Vodní fázi přeneseme do čisté mikrokumavky, přidáme 2,5 objemu 96% ethanolu a 0,1 objemu NaOAc. Stočíme 10 minut při 14000 rpm. Pelet promyjeme 70% ethanolom a stočíme 8 minut při 14000 rpm. Odstraníme supernatant, pelet vysušíme a resuspendujeme v H₂O.

3.14 Klonování do pCR II-TOPO

Do reakční směsi přidáme 0,5 - 4µl PCR produktu, 1µl salt solution a 1µl pCR II-TOPO. Necháme stát 5 minut při pokojové teplotě a poté transformujeme do bakterií metodou heat-shock.

3.15 Transformace bakterií metodou heat-shock

Na ledu necháme roztát kompetentní buňky *E. coli* XL1 Blue a k 50µl těchto buněk přidáme 2µl vektoru nebo celou ligační směs. Po třicetiminutové inkubaci na ledu provedeme teplotní šok při 42°C po dobu 1 minuty a opět buňky chladíme na ledu po dobu 2 minut. Přidáme 250µl SOC media a necháme třepat v horizontální poloze 45 minut při 37°C

(Inkubator1000, Heidolph). Bakterie rozetřeme na plotny s ampicilinem nebo kanamycinem (podle rezistence daného vektoru) a kultivujeme 12 až 16 hodin při 37°C. Vektor pCR II-TOPO umožňuje rozlišení pozitivních klonů na základě *lacZ* komplementace, tzv. „blue – white selection“, a proto se na agarózové plotny roztrájí 4μl (200mg/ml) IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) a 35μl (20mg/ml) X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside).

3.16 Izolace plazmidové DNA

3.16.1 Izolace alkalickou lýzí

Vybrané bakteriální kolonie inokulujeme do 3 ml LB media a inkubujeme přes noc při 37 °C. Narostlou bakteriální kulturu přeneseme do mikrozkušavky a stočíme 2 minuty při 14000 rpm. K peletu přidáme 320μl TENS a mícháme 3 – 5 minut. Přidáme 150μl 3M acetát sodný (pH5,5) a opět mícháme 3 – 5 minut. Stočíme 2 minuty při 14000 rpm a supernatant přeneseme do čisté mikrozkušavky. Přidáme 900μl 100% etanolu a necháme 20 minut v –20°C. Stočíme a pelet opláchneme 70 % etanolem. Necháme vyschnout a DNA rozpustíme ve 30 – 40 μl H₂O. Přítomnost inzertu si ověříme restriční reakcí. Po 1 hodině inkubace necháme restriční směs rozdělit na agarózové elektroforéze

3.16.2 Pomocí Quick Clean 5M Miniprep Kit

Postupujeme podle návodu dodávaného komerční firmou spolu s kitem.

3.16.3 Pomocí Plasmid Midiprep Kit

Pro izolaci většího počtu buněk inokulujeme vybrané kolonie do 100ml LB media a necháme růst přes noc při 37 °C. Narostlou bakteriální kulturu přeneseme do 50ml zkumavek a stočíme 15 minut při 4°C a 6000 rpm (Multifuge 3 S-r, Heraeus). Dále postupujeme podle návodu dodávaného komerční firmou spolu s kitem.

3.17 Restriční reakce

Pomocí restričních míst je možné překlónovat sekvenci z pCR II-TOPO do expresního vektoru RSFDuet-1. Do restriční reakce dáme 1μl pufru, 0,2μl enzymu, 6μl DNA, 3μl H₂O a inkubujeme 1 hodinu při 37°C.

3.18 Klonování do RSFDuet-1

Produkty zaklonované ve vektoru pCR II-TOPO vyštípáme příslušnými restrikčními enzymy a zaklonujeme do expresního vektoru RSFDuet-1. Nejprve si změříme na spektrofotometru koncentraci vyizolovaného plazmidu a spočítáme si koncentraci daných složek tak, abychom dostali poměr vektor : inzert 1:3. Do reakce napipetujeme 10ng plazmidu, 30ng inzertu, 1U T4 DNA ligázy, 1μl reakčního pufru a celou reakci doplníme do celkového objemu 10μl. Reakční směs necháme 2 hodiny při pokojové teplotě nebo přes noc při 16°C. Poté transformujeme do kompetentních buněk metodou heat-shock.

3.19 Sekvenování

Vzorky byly osekvenovány v komerční firmě Macrogen (www.macrogen.com). K sekvenování v pCR II TOPO byly použity primery M 13F a M 13R-pUC (Tab. 4). Pro sekvenování v RSFDuet-1 byly použity primery pro amplifikaci genu pro prohibitin 1 a 2 (Tab.2). Výsledné sekvence byly upravovány v programu Bio Edit.

Tab. 4 – Primery pro sekvenování PHB1 a 2 v pCRII-TOPO

Název primeru	Sekvence (5' - 3')
M 13F	GTAAAACGACGGCCAG
M 13R-pUC	CAGGAAACAGCTATGAC

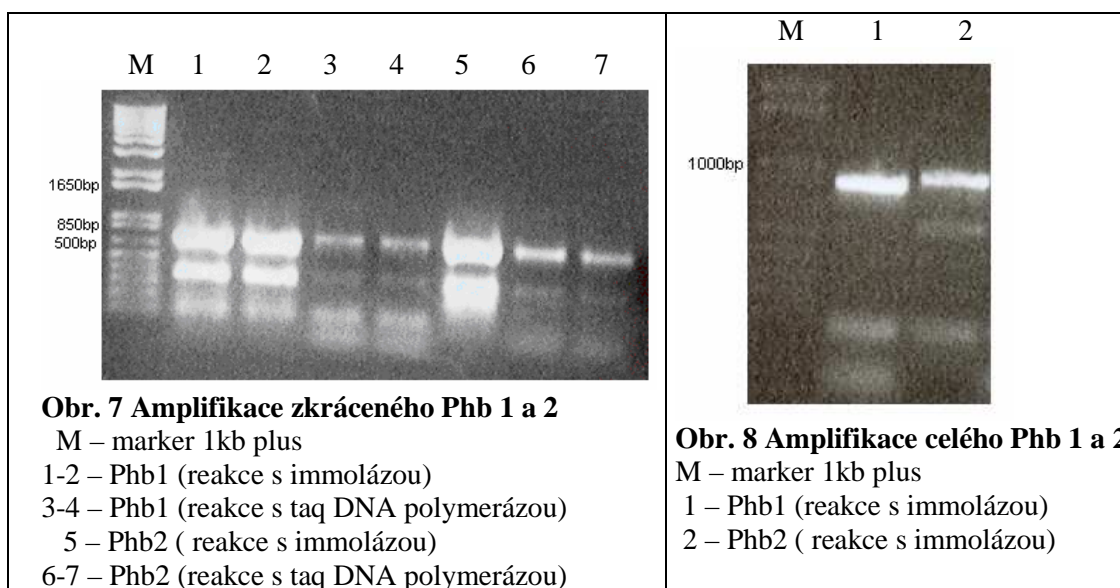
4. Výsledky

4.1 Amplifikace genu pomocí PCR

Pomocí PCR jsem zmnožil celé a zkrácené geny pro prohibitin 1 a 2 s přidanými restrikními místy bez start a stop kodonu. Zkrácená sekvence genu pro prohibitin 1 nemá 26 aminokyselin z N-konce celého genu a sekvence genu pro prohibitin 2 neobsahuje 50 aminokyselin také z N-konce. Jako templát jsem použil celkovou DNA procyklického stádia *T. brucei*. Primery jsem navrhl tak, aby obsahovaly restrikní místa nezbytná pro další postup. Pro prohibitin 1 to byla místa BamHI a HindIII a pro prohibitin 2 NdeI a XhoI. Po PCR reakci jsem reakční směs nanesl na 0,75% agarózový gel (Obr. 7 a 8) a po rozdělení na elektroforéze jsem vyizoloval fragmenty odpovídající velikosti genů pro prohibitin 1 a 2 (Tab.4).

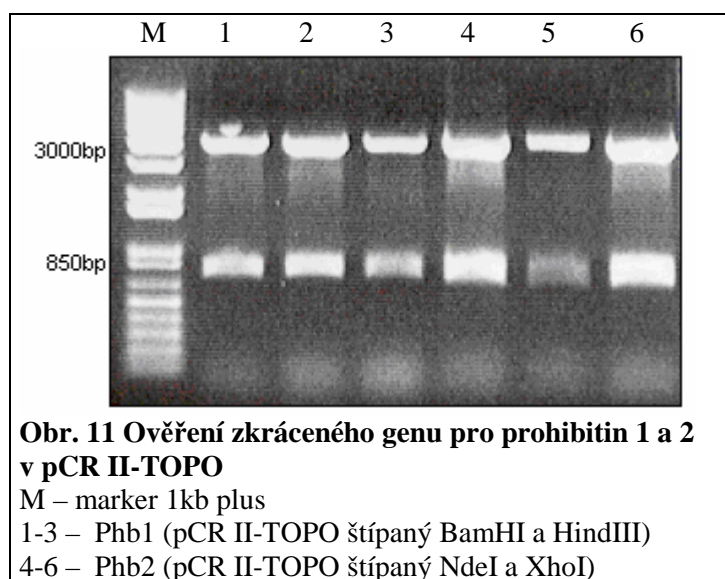
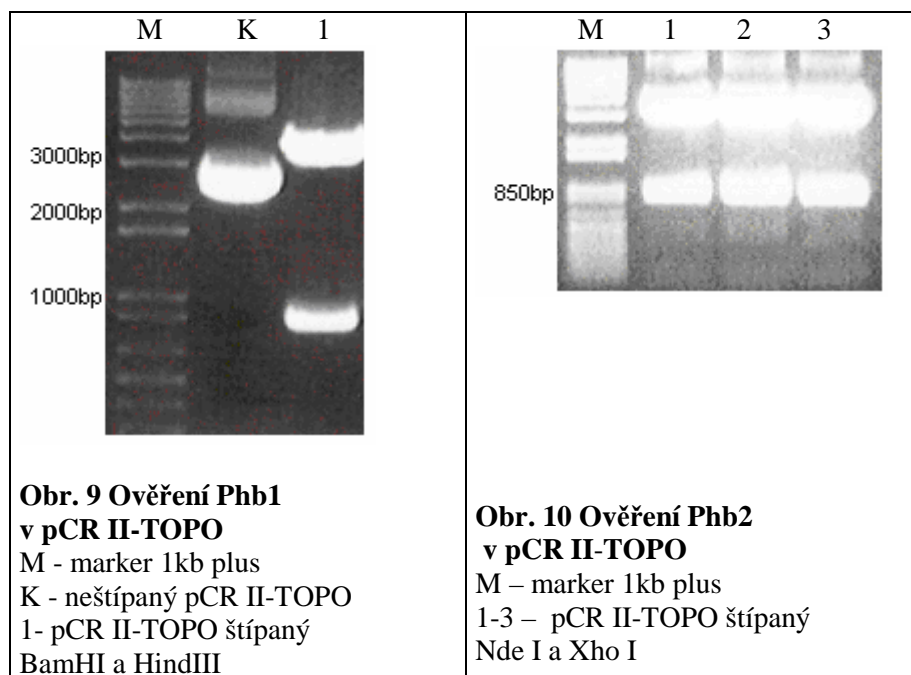
Tab. 4 Očekávané velikosti naamplifikovaných fragmentů

Název genu	Očekávaná velikost fragmentu
Phb1 (celý gen)	840 bp
Phb1 (zkrácený gen)	765 bp
Phb2 (celý gen)	894 bp
Phb2 (zkrácený gen)	747 bp



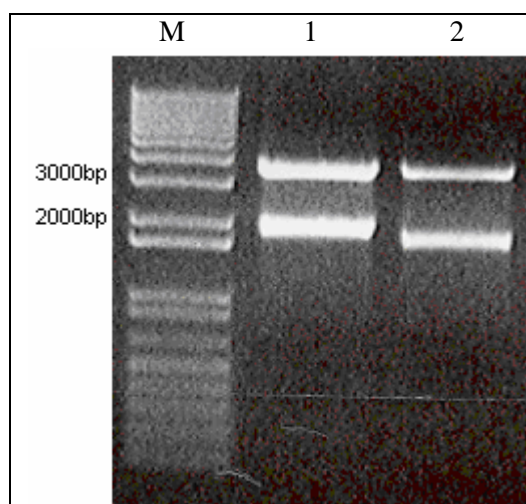
4.2 Klonování do pCR II-TOPO

Vyizolované fragmenty úplných a zkrácených genů pro prohibitin 1 a 2 jsem zaklonoval do vektoru pCR II-TOPO a následně zatransformoval do kompetentních buněk *E. coli* XL1 blue. Na základě modrobílé selekce jsem vybral potenciálně pozitivní klony a vyizoloval z nich plazmidovou DNA. Restrikcí reakcí jsem si potvrdil očekávané velikosti inzertů, které jsem dále překlonovával do cílového expresního vektoru RSFDuet-1. Gen pro prohibitin 1 jsem vyštípl enzymy BamHI a HindIII (Obr 9 a 11) a gen pro prohibitin 2 jsem vyštípl enzymy NdeI a XhoI (Obr. 10 a 11).



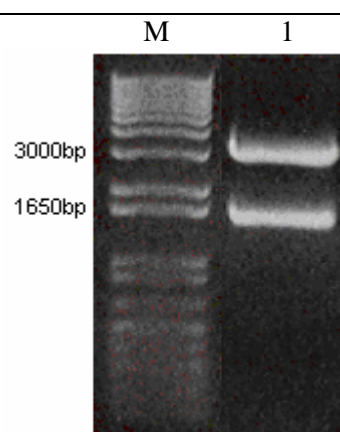
4.3 Klonování do RSFDuet-1

Do expresního vektoru RSFDuet-1 jsem klonoval prohibitin 1 přes restrikční místa BamHI a HindIII jako první, neboť v genu pro prohibitin 2 se nachází interní restrikční místo HindIII. V druhém kroku jsem klonoval prohibitin 2 přes restrikční místa NdeI a XhoI. Celkem jsem připravil 3 konstrukty prohibitinového komplexu, tedy komplex s úplnými geny pro prohibitin 1 a 2, komplex se zkrácenými geny pro prohibitin 1 a 2 a komplex se zkráceným prohibitinem 1 a úplným prohibitinem 2. Pro ověření prohibitinového komplexu v RSFDuet-1 jsem pro restrikční reakci použil enzymy BamHI a XhoI (Obr.12 a 13).



Obr. 12 Ověření prohibitinového komplexu v RSFDuet-1

M – marker 1kb plus
 1 – Phb1 + Phb2 vyštěplé z RSFDuet-1 enzymy BamHI a XhoI
 2 – Phb1 + zkrácený Phb2 vyštěplé z RSFDuet-1 enzymy BamHI a XhoI



Obr. 13 Ověření prohibitinového komplexu v RSFDuet-1

M – marker 1kb plus
 1 – zkrácené geny pro prohibitin 1 a 2 vyštěplé z RSFDuet-1 enzymy BamHI a XhoI

4.4 Sekvenování

Sekvenováním jsem si ověřil správnost sekvence jednotlivých genů jak v pCR II-TOPO, tak i v RSFDuet-1. Sekvence úplného i zkráceného genu pro prohibitin 1 byla zcela bez chyb a ve správném čtecím rámci. V genu pro prohibitin 2 se objevila tichá mutace, tedy triplet TTC se změnil na TTT, v tomto případě nedochází ke změně aminokyseliny a mohli jsme tuto sekvenci použít pro další postup. Srovnání sekvencí v RSFDuet-1 s internetovou databází (www.trig.org) jsou znázorněny na obrázcích 14 až 19.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  TATACCATGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCAAGCCAGGATCCAGCTTCAGATTTGTCCAGCGGTTTATGCTTGGG
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      90     100     110     120     130     140     150     160
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  TGCCTCTGCTGGATTCTACAGCTGCTGCTTTGTCGTATATCCTGGTGAAGCTGCCATTCTTACAATAGGAT
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      170    180    190    200    210    220    230    240
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  CACTGGTCTGAAGGACTCCGCTGTATGGCGAGGGTTTGCAGTGCCTGATCTTAGGGCTCGATGAAATCAAAGGTATTTAATA
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      250    260    270    280    290    300    310    320
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  TTCGATTCCGGCTCGTGTGCTGAAGCCATGACCCGCACAAAAGATCTTCAGATGGTGAACATAAGCTTTCGTGACTC
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      330    340    350    360    370    380    390    400
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  TTCCTCCGCAGACGGATCGGTTGCCACAGATATCCGTGAGTTCGGCATGGATTATGACGAACTATTCTTCCTTCTAT
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      410    420    430    440    450    460    470    480
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  CAGCAACGAAATTTCTCAAAGCAGTTGTGGCCGACTCAAGGCCGAGGAACTGATTCAGAAGCCGACGTCGTGTCGGCC
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      490    500    510    520    530    540    550    560
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  GCATATACCAAGCTGATGCAGAGCAAAGTATCACAATTCGGCCCTTGTAAGGAACTTATCGCTTGTGGATATTCAGTTC
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      570    580    590    600    610    620    630    640
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  GGTAAAGCAATTCATGGTGGCTGTAGAGCAGAAAAGGTTGACACAGCAGGAGGCAGAGGATTCGTTACGTTGTGCTAGA
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      650    660    670    680    690    700    710    720
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  GAATGAGCAAAGAGGCGTCCGCTGTTGTTCCGCCGAAAGGTGAGGCGGAGTCTGCCCGCCTGATCTCGGAAGCCATT
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      730    740    750    760    770    780    790    800
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  AACGCTCGGGAGGGGACTGTTGGAGCTGCGAAGAAATGAAGCCGCTGTGGACATAGCATCAAAGCTCATACCAATCGGA
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      810    820    830    840    850    860    870    880
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  AACGTAACCTTCCTTCCAGGGGGAGTAATATGCTTCTCCACATGAAAGAGCCATCAGGCATCTGAGCAGGCACATAAGCT
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      890    900    910    920
1A-P1 FRW  -----|-----|-----|-----|
1A-P1 REV  TCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAAACAGAAAGTAATCGTATT
Phb1-cely  -----|-----|-----|-----|

```

Obr. 14 – Srovnání sekvencí úplného PHB1 v RSFDuet-1 (komplex s úplnými geny pro prohibitin 1 a 2) s internetovou databází

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
1B-P2 FRW .....CACGAAATGCTGCTGAAATCCGCAAGAGGTTGGGTAATTTGGTGA
1B-P2 REV .....CCCGGGCACCTCCACCAACCGGATTTTT.....
Phb2 cely CATATGTCCTCCCGGGCACCTCCACCAACCGGATTTTT.....

      90      100     110     120     130     140     150     160
1B-P2 FRW TATCGCAGGGCTTACAGCTCTGGTGGTGGGGGATTGGTTTGTGCAGGTTTGTACAAATCCATTACTTCGTTGATG
1B-P2 REV .....
Phb2 cely .....

      170     180     190     200     210     220     230     240
1B-P2 FRW GGGGCTGCTGCGCGGTCAAGTTTAAATGCCATCACAGGCTGAAAAACCGAACGTAACGGGAGGGAGCCAACTTCGCCATC
1B-P2 REV .....
Phb2 cely .....

      250     260     270     280     290     300     310     320
1B-P2 FRW CCGTTTCTTGAACCTCCTGTTGTGTTCCGATATCCGAAATAAGCCAAACAGAAAGTGTGACTGCAACTGGGAGTGTGACCT
1B-P2 REV .....
Phb2 cely .....

      330     340     350     360     370     380     390     400
1B-P2 FRW GCAGACGGTCAACTGGCTGTACCTGTCTACAGCCGCACGTGAGCGCCCTCCCGACATATACCGTAACTGTTGGAA
1B-P2 REV .....
Phb2 cely .....

      410     420     430     440     450     460     470     480
1B-P2 FRW TGGAAATATCAGAAACTGTGTTGCCATCGCTGGTGAACGAGATTATTCGCCCGTAATAGCACAGTTCAACGCCCTGGAT
1B-P2 REV .....
Phb2 cely .....

      490     500     510     520     530     540     550     560
1B-P2 FRW TTGCTGGTGAAGCGCCCGGAGGTGAGCAACCGGATTGGGGTAATGTTGGCCGAACGTGCCAAGCGGTTTCATATTGACAT
1B-P2 REV .....
Phb2 cely .....

      570     580     590     600     610     620     630     640
1B-P2 FRW TACGGATGTCCTCATTACCCAAATGAGTTTGGTAAGGAATACACGAGTGTGTAGAGGGGAAACAGGTCGCCAGCAGA
1B-P2 REV .....
Phb2 cely .....

      650     660     670     680     690     700     710     720
1B-P2 FRW TGGCGGAACGAGCGAAGTGGCGTGTGAAACAAGCGGAACAGGAAAAAGGAAAGGCGCAATTTTGTGGCGAAGGGTGAAGCG
1B-P2 REV .....
Phb2 cely .....

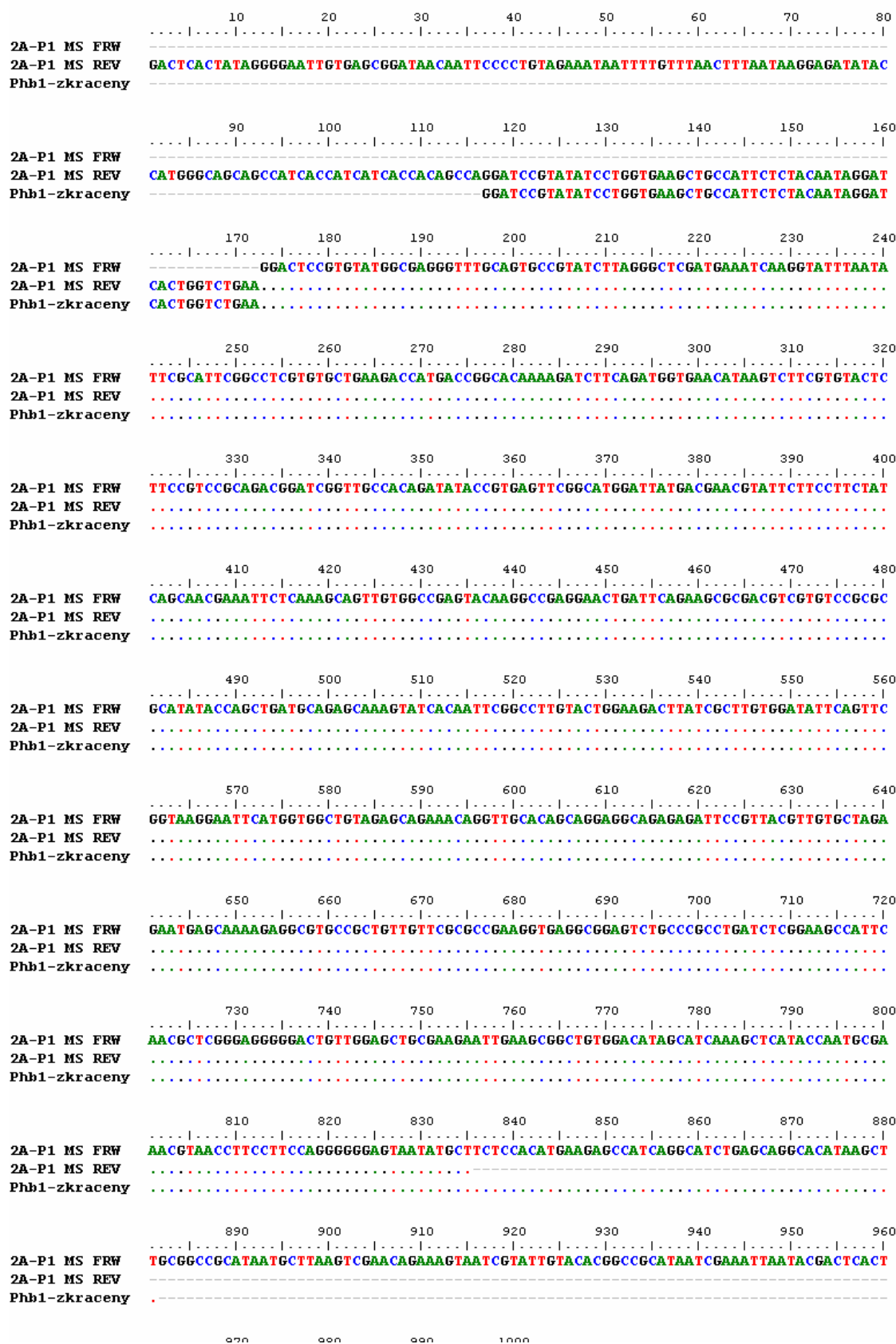
      730     740     750     760     770     780     790     800
1B-P2 FRW GAGGCGGCCAAGCTTATTGGAATGCCGTGCAGAAAGAACCCAGCCTTTATTACGCTGCGAAGCCTTGAGGCGTCCAGGAC
1B-P2 REV .....
Phb2 cely .....

      810     820     830     840     850     860     870     880
1B-P2 FRW TATTGCCGATCTCATGCCACAGAAAGGGTCTGGAAAGCTTTTACATCGACAGTGATACCTTGTCTCTGAAACCCAAACTA
1B-P2 REV .....
Phb2 cely .....C.....

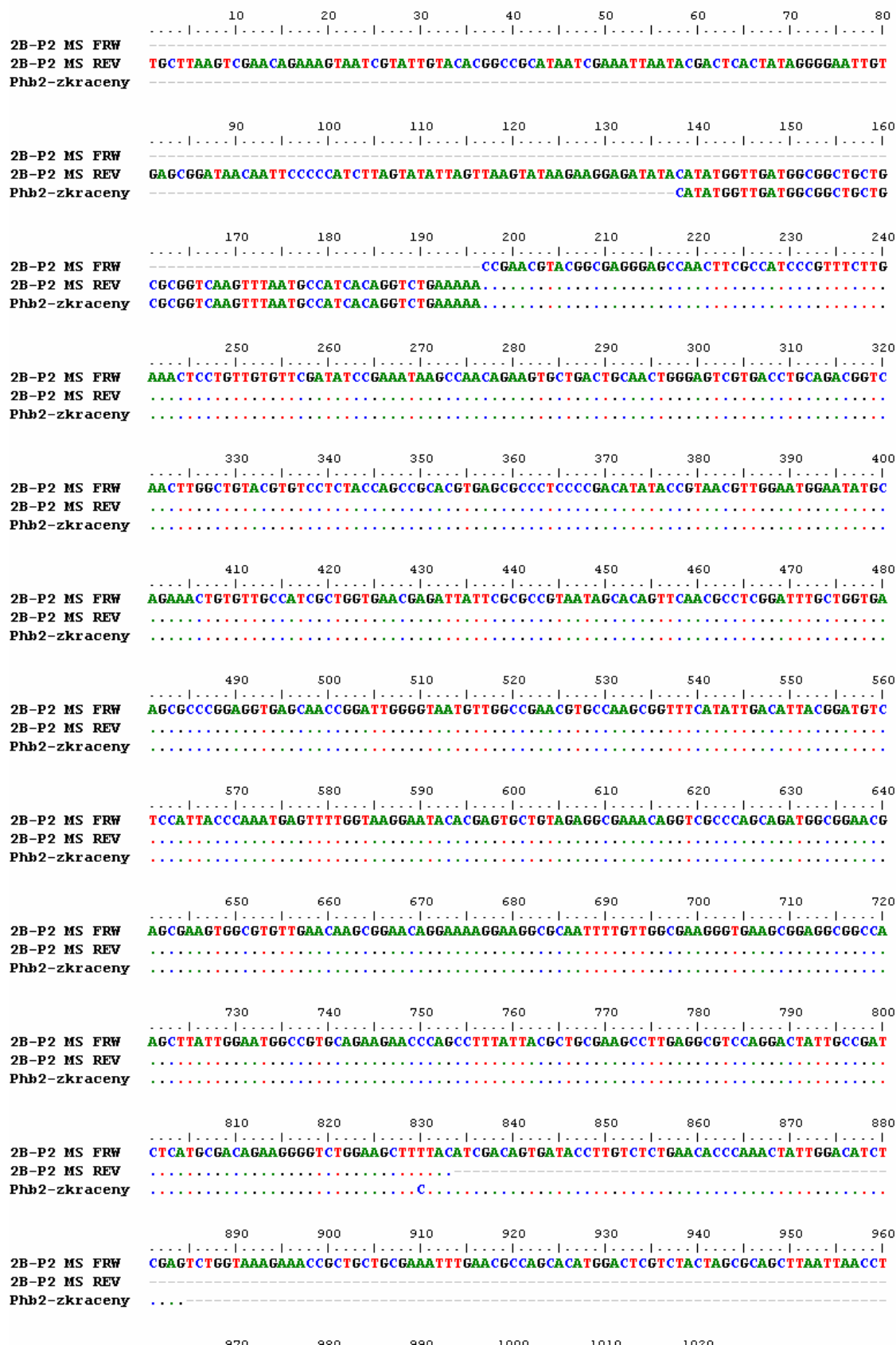
      890
1B-P2 FRW TTGGA-----
1B-P2 REV -----
Phb2 cely .....CATCTCGAG

```

Obr. 15 – Srovnání sekvencí úplného PHB2 v RSFDuet-1 (komplex s úplnými geny pro prohibitin 1 a 2) s internetovou databází



Obr. 16 – Srovnání sekvencí zkráceného PHB1 v RSFDuet-1 (komplex se zkrácenými geny pro prohibitin 1 a 2) s internetovou databází



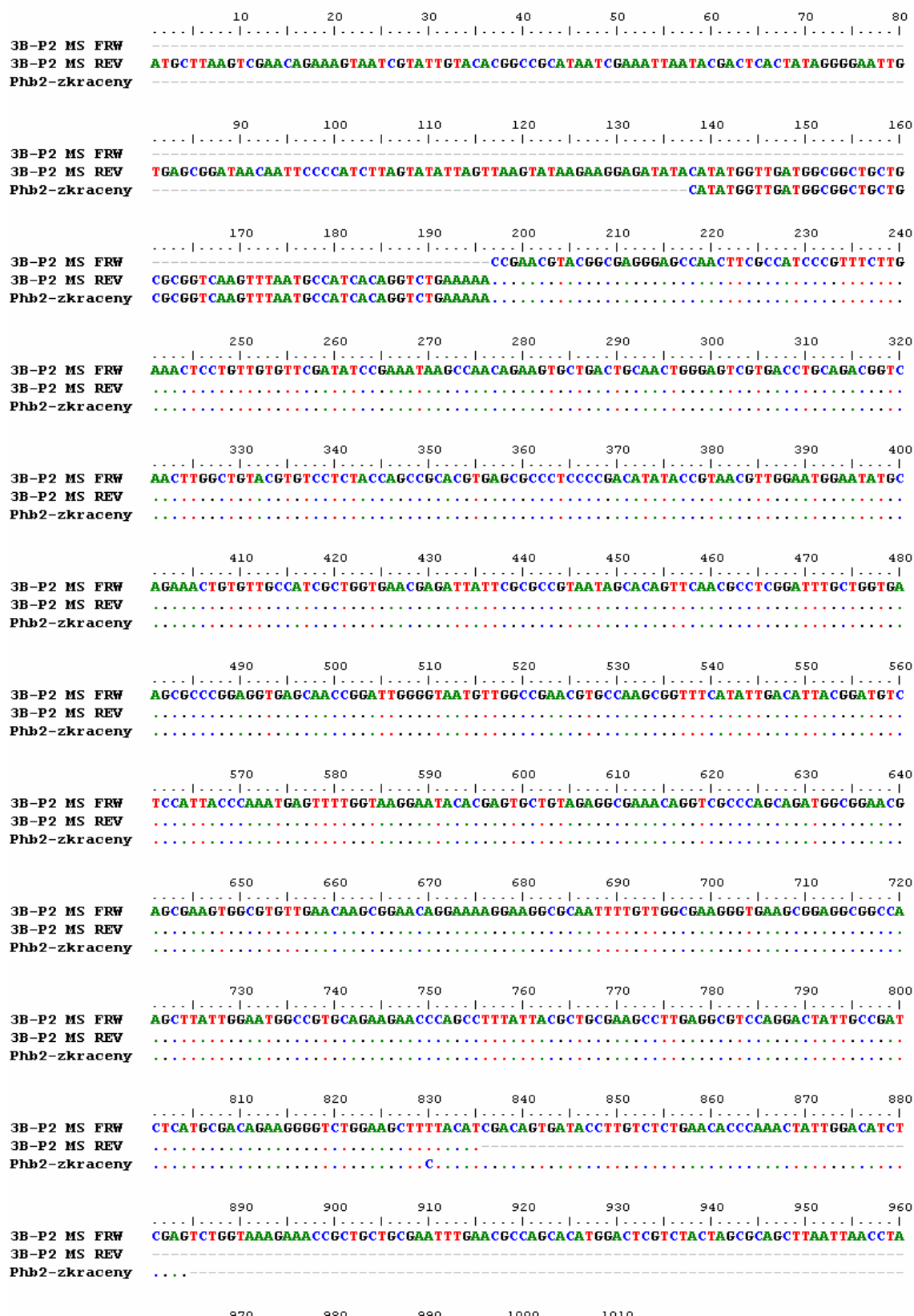
Obr. 17 – Srovnání sekvencí zkráceného PHB2 v RSFDuet-1 (komplex se zkrácenými geny pro prohibitin 1 a 2) s internetovou databází

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
3A-P1 FRW  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3A-P1 REV  TATACCATGGGGCAGCAGCCATCACCATCATCACCACAGCCAGGATCCAGCTTCAGATTTGTCCAGCGGTTTATGCTTGG
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      90      100     110     120     130     140     150     160
3A-P1 FRW  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
3A-P1 REV  GCTGCCTCTGCTGGATTCTACAGCTGCTGCTTTGTCTATATCCTGGTGAAGCTGCCATTCTTACAATAGGA
Phb1-cely  AGTTACA.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      170     180     190     200     210     220     230     240
3A-P1 FRW  TCACTGGTCTGAAGGACTCCGTGTATGGCGAGGGTTTGCACTGCCGTATCTTAGGGCTCGATGAAATCAAGGTATTTAAT
3A-P1 REV  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      250     260     270     280     290     300     310     320
3A-P1 FRW  ATTCGCATTCGGCCTCGTGTGCTGAAGACCATGACCGGCCACAAAAGATCTTCAGATGGTGAACATAAGTCTTCGTGTACT
3A-P1 REV  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      330     340     350     360     370     380     390     400
3A-P1 FRW  CTTCCGTCCGCAGACGGATCGGTTGCCACAGATATACCGTGAGTTCGGCATGGATTATGACGAACTATTCTTCTCTCTA
3A-P1 REV  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      410     420     430     440     450     460     470     480
3A-P1 FRW  TCAGCAACGAAATTCCTCAAAGCAGTTGTGGCCGAGTACAAGGCCGAGGAACTGATTTCAGAAGCGGACGTCGTGTCCGCG
3A-P1 REV  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      490     500     510     520     530     540     550     560
3A-P1 FRW  CGCATATACCAAGCTGATGCAGAGCAAAGTATCACAATTCGGCCTTGTACTGGGAAGACTTATCGCTTGTGGATATTAGTT
3A-P1 REV  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      570     580     590     600     610     620     630     640
3A-P1 FRW  CGGTAAGGAATTCATGTTGGCTGTAGAGCAGAAAAGGTTGCCACAGCAGGAGGCGAGAGATTCCGTTACGTTGTGCTAG
3A-P1 REV  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      650     660     670     680     690     700     710     720
3A-P1 FRW  AGAATGAGCAAAAGAGGCGTGCCTGTTGTTTCGCGCCGAAAGGTGAGGCGGAGTCTGCCCGCTGATCTCGGAAGCCATT
3A-P1 REV  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      730     740     750     760     770     780     790     800
3A-P1 FRW  CAAAGCTCGGGAGGGGACTGTTGGAGCTGCCAAGAATTGAAGCGGCTGTGGACATAGCATCAAAGCTCATACCAATGCG
3A-P1 REV  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      810     820     830     840     850     860     870     880
3A-P1 FRW  AAACGTAACTTCCTTCCAGGGGGGAGTAATATGCTTCTCCACATGAAGAGCCATCAGGCATCTGAGCAGGCCACATAAGC
3A-P1 REV  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      890     900     910     920
3A-P1 FRW  TTGCGGCCGCATAATGCTTAAGTCGAACAGAAAGTAATCGTAT
3A-P1 REV  .....|.....|.....|.....|
Phb1-cely  .....|.....|.....|.....|

```

Obr. 18 – Srovnání sekvencí úplného PHB1 v RSFDuet-1 (komplex s úplným prohibitem 1 a zkráceným prohibitem 2) s internetovou databází



Obr. 19 – Srovnání sekvencí zkráceného PHB2 v RSFDuet-1 (komplex s úplným prohibitem 1 a zkráceným prohibitem 2) s internetovou databází

6. Diskuze

Cílem předkládané práce byla příprava konstruktů prohibitinového komplexu z *T. brucei* určených k dodání spolupracující laboratoři v USA, kde budou proteiny overexprimovány a získány v nativní formě v dostatečném množství potřebném k řešení krystalové struktury. Jelikož se PHB komplex skládá ze dvou proteinů, bylo nutné použít vektor se dvěma klonovacími místy. Nejprve jsem používal vektor pETDuet-1, ale nepodařilo se mi dané geny do tohoto vektoru zaklonovat. Použil jsem proto vektor RSFDuet-1 (Obr.6), který obsahuje téměř shodná restrikční místa s dvěma T7 promotory. Díky tomuto vektoru je možné koexprimovat oba proteiny současně. Ve výše zmíněné laboratoři byl úspěšně overexprimován PHB komplex v *Saccharomyces cerevisiae*, ale ne v dostatečném množství pro jeho purifikaci, proto budou zkoušet overexpresi v jiném organismu.

Většina mitochondriálních proteinů obsahuje na svém N-konci targetovací sekvenci, která je při importu do mitochondrie odštěpena (Neuprt, 1997). Sekvence proteinů *phb1* a *phb2* obsahují blízko svých N-konců úsek pro jeden transmembránový helix, který ukotvuje protein na vnitřní mitochondriální membráně. Hmotnostní spektrometrií bylo u kvasinkového homologu zjištěno, že oba prohibitinové proteiny vstupují do mitochondrie bez odštěpení N-konce a zároveň bylo zjištěno, že transmembránovou doménu PHB1 tvoří úsek od 10. do 30. aminokyseliny a PHB2 od 36. až 54. aminokyseliny (Nijtmans a kol., 2000). V práci zabývající se strukturou kvasinkového prohibitinu byly tyto sekvence určeny u PHB2 v oblasti 37. až 59. a u PHB1 14. až 30. aminokyseliny (Back a kol., 2002). Tyto sekvence na N-konci můžou negativně ovlivnit krystalovou strukturu, proto jsme se rozhodli připravit konstrukty s úplnými a zkrácenými geny pro prohibitin 1 a 2. Spolupracující laboratoř zabývající se krystalografií nám doporučila zkrátit sekvenci genu pro PHB1 o 26 aminokyselin a sekvenci genu pro PHB2 o 50 aminokyselin (Schumacher, osobní sdělení).

Rozhodnutí zkrátit oba proteiny o 26 a 50 aminokyselin bylo učiněno na základě výsledků u kvasinkového homologu, proto se domníváme, že u *T. brucei* bude situace podobná, neboť PHB komplex je velmi konzervativní protein a vykazuje vysokou homologii i u velmi vzdálených organismů. Trypanosomový homolog vykazuje s lidským prohibitinem PHB1 43,9% a PHB2 39,2% homologie (Faktorová, nepublikovaná data). Kvasinkový PHB2 vykazuje dokonce 45% homologii s trypanosomovým PHB2 (Welburn a Murphy, 1998).

PHB komplex tvoří na vnitřní mitochondriální membráně vysokomolekulární komplex, který je u člověka tvořen 14 kopiemi obou genů (Coates a kol., 2001), u kvasinky 12 až 16

kopími (Nijtmans a kol., 2000). Welburnová a Murphy (1998) ve své publikaci uvádějí, že u *T. rhodesiense* se prohibitin vyskytuje pouze v jedné kopii

I přesto, že se jedná o velmi důležitý protein s mnoha funkcemi, doposud se u něj nikomu nepodařilo určit krystalickou strukturu. Důvodem může být složitost prohibitinového komplexu.

6. Závěr

Během mé práce se mi podařilo připravit tři konstrukty prohibitinového komplexu z *T. brucei*. Komplex s úplnými geny pro prohibitin 1 a 2, komplex se zkrácenými geny pro prohibitin 1 a 2 a komplex se zkráceným prohibitinem 1 a úplným prohibitinem 2.

Konstrukty byly poslány spolupracující laboratoři v USA, kde budou použity k řešení krystalové struktury prohibitinu.

7. Literatura

Ansari-Lari M. A., Shen Y., Muzny D. M., Lee W. and Gibbs R. A. (1997) Large-scale sequencing in human chromosome 12q13: experimental and computational gene structure determination. *Genome Res.* 7: 268 – 80

Back Jaap W., Sanz Artal M., De Jong L., De Koning J. L., Nijtmans L. G. J., De Koster G. Ch., Grivell A. L., Van Der Spek H. and Muijsers O. A. (2002) A structure for the yeast prohibitin complex: Structure prediction and evidence from chemical crosslinking and mass spectrometry. *Protein science* 11:2471 – 2478

Bakker M. B., Westerhoff H. V., Opperdoes F. R. and Michels P. A. M. (2000) Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106:1 – 10

Beinen E. J., Saric M., Pollakis G., Grady R. W. and Clarkson A. B. Jr. (1991) Mitochondrial development in *Trypanosoma brucei* transitional bloodstream forms. *Mol. Parasitol.* 45(2):185 – 192

Benne R. (1985) Mitochondrial genes in trypanosomes. *TIG.* 117 – 121

Benne R., Van Den Burg J., Brakenhoff J. P. J., Sloof P., Van Boom J. H. and Tromp M. C. (1986) Major transcript of the frameshifted *coxII* gene from trypanosome mitochondria contains four nucleotides that are not encoded in the Dna. *Cell* 46:819 – 826

Bourges I., Ramus C., Mousson de Camaret B., Beugnot R., Remacle C., Cardol P., Hofhaus G. and Issartel J. P. (2004) Structural organization of mitochondrial human complex I: Role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. *Biochem. J.* 383, 491 – 499

Bowman I. B. R., Srivastata H. K. and Flynn I. W. (1972) Adaptations in oxidative metabolism during the transformation of *trypanosoma rhodesiense* from bloodstream into culture form. In *Comparative biochemistry of Parasites*. Van den Bossche, H (ed.), Academic Press, New York, NY, pp.329 – 342

Bridgen P. J., Cross G. A. M. and Bridgen J. (1976) N-terminal amino acid sequences of variant-specific surface antigens from *Trypanosoma brucei*. *Nature* 263:613 – 614

Coates P. J., Nenutil R., McGregor A., Picksley S. M., Crouch D. H., Hall P. A. and Wright E. G. (2001) Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence. *Exp. Cell. Res.* 265:262 – 273

Donelson J. E., (2003) Antigenic variation and the African trypanosome genome., *Acta Trop.* 85(3):391 – 404

Eveleth D. D. Jr. and Marsh J. L. (1986) Sequence and expression of the *Cc* gene, a member of the dopa decarboxylase gene cluster of *Drosophila*: possible translation regulation. *Nucleic Acids Res.* 14:6169 - 6183

Fairlamb A. H. (1989) Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. *Parasitology* 99 Suppl:93 – 112

Fusaro G., Wang S. and Chellappan S. (2002) Differential regulation of Rb family proteins and prohibitin during camptothecin-induced apoptosis. *Oncogene* 21:4539 – 4548

Kihara A., Akiyama Y. and Ito K. (1996) A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO J.* 15: 6122 – 6131

Klingbeil M. M., Drew M. E., Liu Y., Morris J. C., Motyka S. A., Saxowsky T. T., Wang Z. and Englund P. T. (2001) Unlocking the secrets of trypanosome kinetoplast DNA network replication. *Protist* 152:255 – 262

Lukeš J., Jirků M., Avliyakov N. and Benada O. (1998) Pakinetoplast DNA structure in a primitive bodonid flagellate, *Cryptobia helicis*. *EMBO J.* 17:838 – 846

Matthews K. R. (2005) The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 118:283 – 290

McKlung J. K., Jupe E. R., Liu X. T. and Dell'Orco R.T., (1995) Prohibitin: potential role in senescence, development and tumor suppression. *Exp Gerontol* 30:99 – 124

Montano M. M., Ekena K., Delage-Mourroux R., Chang W., Martini P. and Katzenellenbogen B. S. (1999) An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:6947 - 6952

Neupert W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66:863 – 917

Nijtmans L. G. J., De Jong L., Sanz Artal M., Coates P. j., Berden J. A., Back J. W., Muijsers A. O., Van der Spek H. and Grivell L. A. (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO* 19:2444 – 2451

Nijtmans L. G. J., De Jong L., Sanz Artal M., Grivell L. A., Coates P. J. (2002) The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease *Cell. Life Sci.* 59:143 – 155

Sanz Artal M., Tsang Y. W., Willems M. E., Grivell A. L., Lemire D. B., Van Der Spek H. and Nijtmans L. G. J. (2003) The mitochondrial prohibitin complex is essential for embryonic viability and germline function in *Caenorhabditis elegans*. *The journal of Biol. Chemistry* 34:32091 - 32099

Sato T., Saito H., Swensen J., Olifant A., Wood C., Danner D. et al. (1992) The human prohibitin gene located on chromosome 17q21 is mutated in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* 52: 1643 – 1646

Shapiro T. A. (1993) Kinetoplast DNA maxicircles: Networks within networks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7809 – 7813

Shapiro T. A. and Englund P. T. (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. Ann. Rev. Microbiol. 49:117 – 143

Shlomai J. (1994) The assembly of kinetoplast DNA. Parasitol. Today 10:341 – 346

Simpson L., Aphasizhev R., Gao G. And Kang X. (2006) Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. RNA. 10:159 – 170

Sloof P. and Bene R. (1993) RNA editing in trypanosome mitochondria: guidelines for models. FEBS Lett. 326:146 – 151

Snedden W. A. and Fromm H. (1997) Characterization of the plant homologue of prohibitin, a gene associated with antiproliferative activity in mammalian cells. Plant. Mol. Biol. 33: 753 – 756

Steglich G., Neupert W. and Langer T. (1999) Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. Mol. Cell Biol. 19:2444 - 2451

Terashima M., Kim K. M., Adachi T., Nielsen P. J., Reth M., Kohler G. and Lamers M. C., (1994) The IgM antigen receptor of B lymphocytes is associated with prohibitin and a prohibitin related protein. EMBO J 13: 3782 - 92

Wang S., Fusaro G., Padmanabhan J. and Chellappan S. P., (2002) Prohibitin co localizes with RB in the nucleus and recruits N CoR and HDAC1 for transcriptional repression. Oncogene 21:8388 – 96

Wang S., Nath N., Adlam M. and Chellappan S. (1999) Prohibitin, a potential tumor suppressor, interacts with RB and regulates E2F function. *Oncogene* 18:3501 - 3510

White J. J., Ledbetter D. H., Eddy R. L. Jr, Shows T.B., Stewart D. A., Nuell M. J. et al. (1991) ASSignment of the human prohibitin gene (PHB) to chromosome 17 and identification of a DNA polymorphism [published erratum appears in Genomics 1991 Nov; 11(3):782]. Genomics 11:228 – 230

Yurchenko V., Hobza R., Benada O. and Lukes J. (1999) *Trypanosoma avium*: large minicircles in the kinetoplast DNA. Exo. Parasitol. 92:215 – 218

Welburn C. S. and Murphy B. N. (1998) Prohibitin and RACK homologues are up-regulated in trypanosomes induced to undergo apoptosis and in naturally occurring terminally differentiated forms. Cell Death and Differentiation 5:615 – 622