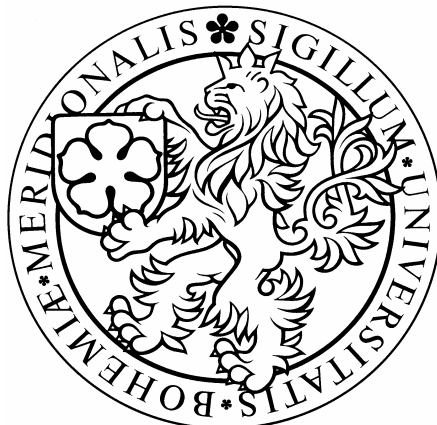


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra molekulární biologie a biochemie



Bakalářská práce

Funkční analýza NifS1 u procyklických stádií

Trypanosoma brucei

Pavel Poliak

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

Parazitologický ústav AV ČR

Laboratoř molekulární parazitologie

České Budějovice, 2008

Poliak P., 2008: Funkční analýza NifS1 u procyklických stádií *Trypanosoma brucei*. [Functional analysis of NifS1 in procyclic *Trypanosoma brucei*]. Bachelor Thesis, in Czech. 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: Aim of this work was to identify the function of NifS-like protein in *Trypanosoma brucei* that seems to belong to selenocysteine lyases. I have shown by RNA interference that it is not essential for procyclic stages. Moreover, by tagging the protein, NifS1 was localized to the cytoplasm. Measurement of selenocysteine lyase activities in wild type cells and cells with eliminated NifS1 protein are under way.

Tato práce byla podpořena grantem SGA2006/015

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedených 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.

V Českých Budějovicích, 8.1.2008

.....

Pavel Poliak

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli, Juliu Lukešovi, za možnost pracovat v Laboratoři molekulární parazitologie, za trpělivost a cenné rady. Dále bych chtěl poděkovat Alče a Zdeňkovi V., za všestrannou pomoc a ochotu kdykoliv poradit. Milanovi, Zdeňkovi P., Drahušce, Silvě, Evě Ch. a Hassanovi děkuji za odbornou pomoc a příjemné pracovní prostředí. Zdeňce, Petře, Janě, Jirkovi, Evě K., Petrovi, Zuzce, Luce a Lence děkuji za každodenní dobrou náladu.

A především děkuji své rodině za všestrannou podporu, porozumění a lásku.

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. <i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.2. Fe-S centra	1
1.2.1. Biosyntéza Fe-S center: Interakce NifS a NifU	1
1.3. NifS homology	2
1.4. Selenoproteiny	2
1.4.1. Selenocystein lyáza	3
1.5. RNA interference.....	3
2. CÍLE PROJEKTU	5
3. MATERIÁL	6
3.1. Organismy.....	6
3.2. Vektory	7
3.3. Média	9
3.3.1. Médium pro kultivaci procyklických stádií <i>T. brucei</i>	9
3.3.1.1. SDM-79.....	9
3.3.1.2. Antibiotika	10
3.3.2. Médium pro kultivaci kompetentních buněk <i>E. coli</i>	11
3.3.2.1. Bakteriální půda (agarové LB miský).....	11
3.3.2.2. LB médium.....	11
3.4. Roztoky a pufrý	12
3.4.1. RNA elektroforéza.....	12
3.4.2. Northernová analýza	13
3.4.3. SDS polyakrylamidová elektroforéza a barvení gelu.....	13
3.4.4. Westernová analýza	15
3.4.5. Agarózová (DNA) elektroforéza	16
3.4.6. Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i>	17
3.4.7. Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i>	18
3.4.8. Elektroporace procyklických stádií <i>T. brucei</i>	18
3.4.9. Digitoninová frakcionace	18
3.4.10. Auranofinový pokus	19

3.5. Ostatní chemikálie.....	20
4. METODY	21
4.1. Kultivace procyklických stádií <i>T. brucei</i>	21
4.2. Stanovení počtu buněk <i>T. brucei</i> v kultuře	21
4.3. Sledování růstového fenotypu.....	21
4.4. Izolace RNA	21
4.5. Stanovení koncentrace RNA.....	22
4.6. RNA elektroforéza.....	22
4.7. Northernová analýza	22
4.7.1. Northern blot.....	22
4.7.2. Příprava radioaktivně značené DNA sondy	22
4.7.3. Prehybridizace, DNA hybridizace, autoradiografie.....	23
4.8. Příprava lyzátů <i>T. brucei</i>	23
4.9. SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS PAGE).....	23
4.9.1. Barvení gelu.....	24
4.10. Westernová analýza.....	24
4.10.1. Western blot.....	24
4.10.2. Hybridizace s protilátkami, autoradiografie	25
4.11. PCR.....	25
4.11.1. Použité primery	25
4.11.2. Složení a podmínky PCR reakce	26
4.12. Agarózová (DNA) elektroforéza	27
4.13. Izolace DNA z gelu.....	27
4.13.1. Izolace DNA z gelu pomocí kitu	27
4.13.2. Izolace DNA z gelu pomocí tekutého dusíku	28
4.14. Stanovení koncentrace DNA.....	28
4.15. Ligační reakce	28
4.16. Příprava kompetentních buněk <i>E. coli</i>	28
4.17. Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> metodou heat-shock.....	29
4.18. Kultivace kompetentních buněk <i>E. coli</i>	29
4.19. Izolace plasmidové DNA	30
4.19.1. Izolace plasmidové DNA pomocí kitu.....	30
4.19.2. Izolace plasmidové DNA metodou alkalické lýze (miniprep).....	30

4.20. Restrikční reakce.....	30
4.21. Příprava transgenních linií <i>T. brucei</i>	31
4.21.1. Příprava plasmidové DNA pro transfekci <i>T. brucei</i>	31
4.21.2. Přečištění DNA fenol-chloroformovou extrakcí	31
4.21.3. Elektroporace procyklických stádií <i>T. brucei</i>	32
4.22. Digitoninová frakcionace	32
4.22.1. Princip	32
4.22.2. Postup.....	32
4.22.3. Analýza vzorků po frakcionaci.....	33
4.23. Auranofinový pokus.....	34
4.23.1. Princip	34
4.23.2. Postup.....	34
5. VÝSLEDKY	35
5.1. Sledování růstového fenotypu.....	35
5.2. Northernová analýza	36
5.3. Westernová analýza	37
5.4. Příprava expresního vektoru pJH54/NifS1	38
5.5. Příprava transgenních linií <i>T. brucei</i>	41
5.6. Lokalizace NifS1 metodou digitoninové frakcionace	42
5.7. Příprava frakcí pro měření enzymových aktivit.....	43
5.8. Auranofinový pokus.....	44
6. DISKUSE.....	46
7. ZÁVĚR	48
8. SEZNAM LITERATURY	49

1. ÚVOD

1.1. *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei je parazitický prvok z kmene Euglenozoa, řádu Kinetoplastida, čeledi Trypanosomatidae. Způsobuje spavou nemoc lidí (poddruhy *T. brucei rhodesiense* a *T. brucei gambiense*) a naganu, smrtelné onemocnění dobytka (*T. brucei brucei*) (Bakker a kol., 2000). Trypanosomy jsou charakteristické celou řadou jedinečných vlastností, mezi něž patří editování RNA, trans-splicing či povrchová antigenní variabilita (Lukeš a kol., 2005).

1.2. Fe-S centra

Fe-S centra jsou koordinační sloučeniny železa a síry, které se nacházejí ve zhruba 120 proteinech v každé eukaryotické buňce a jejich role je tudíž esenciální. Síra může být buď anorganická, vázaná pouze na železo, nebo se vyskytuje v organické formě, např. jako součást cysteinového zbytku proteinu, v němž se Fe-S centrum nachází. Základními stavebními typy těchto sloučenin jsou skupiny [2Fe2S], [3Fe4S], [4Fe4S], z nichž se mohou sestavovat složitější struktury. Někdy se vazby ve složitějších komplexech účastní ještě další kovy (kobalt, nikl, molybden) (Mühlenhoff a Lill, 2000; Lill a Mühlenhoff, 2005).

1.2.1. Biosyntéza Fe-S center: Interakce NifS a NifU

Proteiny obsahující Fe-S centra zastávají řadu důležitých fyziologických funkcí jako je např. přenos elektronů a katalýza, nebo se jedná o senzory koncentrace kyslíku a železa (Beinert, 1997; Lill a Mühlenhoff, 2005). Klíčovou funkci při biosyntéze Fe-S center u eukaryot mají proteiny NifS a NifU. NifS je cystein desulfuráza, která odebírá sulfhydrylovou (HS-) skupinu substrátu za vzniku alaninu. Odštěpená HS- skupina zůstává vázaná na cysteinový zbytek NifS. Pro efektivní předání síry na tvořící se centrum je důležité, aby byl tento zbytek s navázanou HS- skupinou na ohebném rameni, které se může vyklánět z roviny proteinu. NifU má velmi odlišnou primární strukturu. V genu se nachází tři konzervativní cysteinové zbytky, které přechodně vážou železnaté ionty a následně Fe-S centrum během biosyntézy.

NifS s navázanou sírou a NifU s navázaným železem spolu interagují. NifU je oporou pro vznikající Fe-S centrum, pro něž NifS poskytuje anorganickou síru. Hotové, různě složitě Fe-S centrum je z vazby na NifU uvolněno redukcí. Elektrony pro redukci poskytuje ferredoxin typu [2Fe2S]. Mezi další proteiny účastníci se biosyntézy Fe-S center u eukaryot patří NifA, chaperony typu Hsp70 a Hsp40 (Mühlenhoff a Lill, 2000; Lill a Mühlenhoff, 2005).

1.3. NifS homology

Doposud byly NifS geny vypnuté metodou homologní rekombinace u modelových organismů *Azotobacter vinelandii*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Escherichia coli*. Letální byla delece NifS pro *A. vinelandii* (Zheng a kol., 1998) a *S. cerevisiae* (Nakai a kol., 2001; Gerber a Lill, 2002). *E. coli* tento zásah přežila, protože má řadu dalších NifS homologů a jiných desulfuráz, které mohou kompenzovat absenci NifS (Schwartz a kol., 2000; Takahashi a Tokumoto, 2002). Obecně vede deficece v NifS k zastavení syntézy Fe-S center a tudíž k redukcí aktivity či úplné inhibici Fe-S proteinů, např. akonitázy či komplexů I až III dýchacího řetězce. V případě procyklických forem *T. brucei* způsobuje vypnutí NifS2 rozbourání Krebsova cyklu a dýchacího řetězce (Šmíd a kol., 2006).

1.4. Selenoproteiny

Selen je základním stopovým prvkem savců a dalších organismů. Vyskytuje se v selenoproteinech jako selenocysteinový zbytek (Stadtman, 1996), který je kódován UGA kodonem (Low a Berry, 1996; Tujebajeva a kol., 2000). Selenocystein je do vznikajícího polypeptidického řetězce vložen za pomoci RNA struktury, označované jako „Sec insertion sequence“ (SECIS) element (Low a Berry, 1996).

Selen je metabolizován enzymy zahrnujícími selenofosfát syntetázu (Veres a kol., 1994), selenocystein syntázu (Forchhammer a Böck, 1991), selenocystein lyázu (Esaki a kol., 1982; Chocat a kol., 1985) a selenocystein metyltransferázu (Neuhierl a Böck, 1996).

Chemické vlastnosti selenu a síry jsou podobné, ale většina enzymů nedovede rozlišovat sloučeniny selenu od svých sírných analogů (Stadtman, 1990). Přesto existuje několik enzymů, například selenofosfát syntetáza (Veres a kol., 1994), které tyto prvky rozeznávají. Rozlišování selenu od síry je důležité například pro specifickou inkorporaci selenu do selenoproteinů (Pilon a kol., 2003).

1.4.1. Selenocystein lyáza

Selenocystein lyáza (SCL) patří mezi pyridoxal 5'-fosfát (PLP) dependentní enzymy katalyzující uvolnění selenu z L-selenocysteinu za vzniku L-alaninu (Esaki a kol., 1982; Chocat a kol., 1985). Nedávno bylo zjištěno, že selen uvolněný z L-selenocysteinu slouží v živém organismu jako substrát pro selenofosfát syntetázu, která katalyzuje tvorbu selenofosfátu, hlavního molekulového prekurzoru v biosyntéze selenoproteinů (Lacourciere a Stadtman, 1998).

1.5. RNA interference

RNA interference (RNAi) je evolučně konzervovaný mechanismus, kterým se buňka brání virům a produkci aberantních transkriptů z repetitivních sekvencí a transpozónů (Tabara a kol., 1999). Poprvé byla popsána u *Caenorhabditis elegans* (Fire a kol., 1998) a od té doby pozorována u mnoha dalších eukaryot včetně *T. brucei* (Ngô a kol., 1998).

Mechanismus RNAi se stal nástrojem k relativně rychlému studiu funkce genů, které je založeno na specifické eliminaci mRNA a zastavení syntézy daného proteinu (Berstein a kol., 2001).

Prvním krokem RNAi je syntéza dvouvláknové RNA (dsRNA). Ta je následně rozpoznána a štěpena pomocí specifické endonukleázy DICER a za spotřeby ATP na 21-25 nukleotidů dlouhé „sense“ a „antisense“ fragmenty (Elbashir a kol., 2001). Tyto tzv. malé interferující RNA (siRNA) se připojují k nukleázovému komplexu RISC (RNA induced silencing complex) a vytváří tak stabilní ribonukleotidovou částici. Ta se potom prostřednictvím siRNA váže na homologní jednovláknovou mRNA a

mnohonásobně ji štípe. Po uvolnění degradované mRNA je nukleázový komplex připraven ke štěpení další mRNA (Hutvágner a Zamore, 2002).

U *T. brucei* bylo popsáno několik způsobů, jak zavést dsRNA do buňky. První způsob používaný zejména v počátečních studiích byl založen na elektroporaci *in vitro* nasyntetizované dsRNA do buněk. Tento přístup se ukázal být neefektivním, protože v průběhu buněčného dělení dochází ke ztrátám dsRNA (Ngô a kol., 1998). Stabilní produkce dsRNA lze *in vivo* docílit prostřednictvím vektorů, které jsou homologní rekombinací vloženy do chromozómů. Vektory pLEW100 a pZJM β se integrují do rDNA lokusu na megachromozomech (Wirtz a kol., 1999; Wang a kol., 2000). Zde ale může docházet ke slabé neindukované tvorbě dsRNA, která je patrně důsledkem nedokonalé kontroly T7 RNA polymerázy tetracyklinovým represorem. Vektor p2T7-177 je integrován do minichromozómů, intermediálních chromozómů i megachromozómů (Wickstead a kol., 2002).

2. CÍLE PROJEKTU

1. S využitím RNA interference vypnout gen NifS1 v procyklických stádiích *Trypanosoma brucei*, sledovat růstový fenotyp a charakterizovat buněčnou linii na úrovni RNA prostřednictvím northernové analýzy.
2. Analyzovat případné ovlivnění hladin NifS2 a NifU.
3. Zaklonovat NifS1 do expresního vektoru s HA₃ tagem a imunolokalizovat NifS1 pomocí anti-HA₃ protilátky v transgenních buňkách, určit buněčnou lokalizaci proteinu NifS1.
4. Připravit buněčné frakce (cytosolickou, mitochondriální a lyzátovou) pro měření selenocystein lyázové a cystein desulfurázové aktivity (spolupráce s laboratoří Dr. Pilon v Koloradu).

3. MATERIÁL

3.1. Organismy

Trypanosoma brucei brucei, kmen 29-13, procyklické stádium

- divoký typ (WT)
- kultivace pod antibiotikovou selekcí hygromycinu a neomycinu (G418)

Trypanosoma brucei brucei, NifS1 buněčná linie (klony: A, D), procyklické stádium

- transgenní kmen odvozený od kmene 29-13, obsahuje RNAi vektor pZJM β /NifS1 s rezistencí proti phleomycinu
- kultivace pod antibiotikovou selekcí hygromycinu, neomycinu (G418) a phleomycinu

Trypanosoma brucei brucei, NifS2 buněčná linie (klon: 6), procyklické stádium

- transgenní kmen odvozený od kmene 29-13, obsahuje RNAi vektor pZJM β /NifS2 s rezistencí proti phleomycinu
- kultivace pod antibiotikovou selekcí hygromycinu, neomycinu (G418) a phleomycinu

Trypanosoma brucei brucei, NifS1/HA₃ tag buněčná linie, procyklické stádium

- transgenní kmen odvozený od kmene 29-13, obsahuje expresní vektor pJH54/NifS1 s rezistencí proti phleomycinu
- kultivace pod antibiotikovou selekcí hygromycinu, neomycinu (G418) a phleomycinu

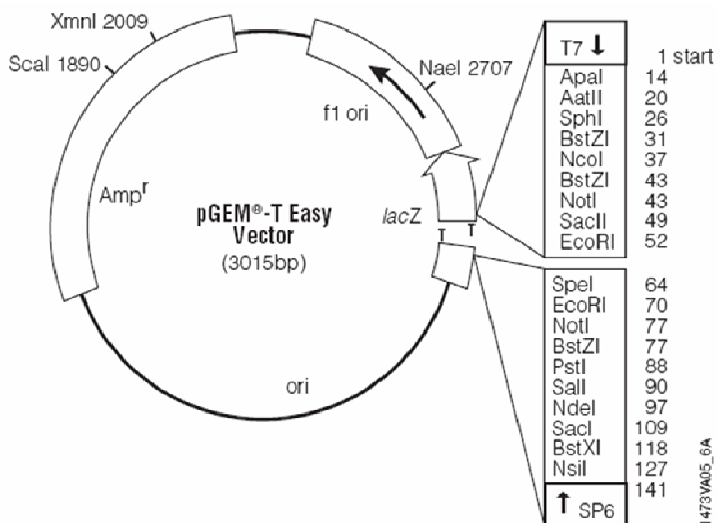
Escherichia coli, DH5 α kompetentní buňky

Escherichia coli, XL1 Blue kompetentní buňky

3.2. Vektory

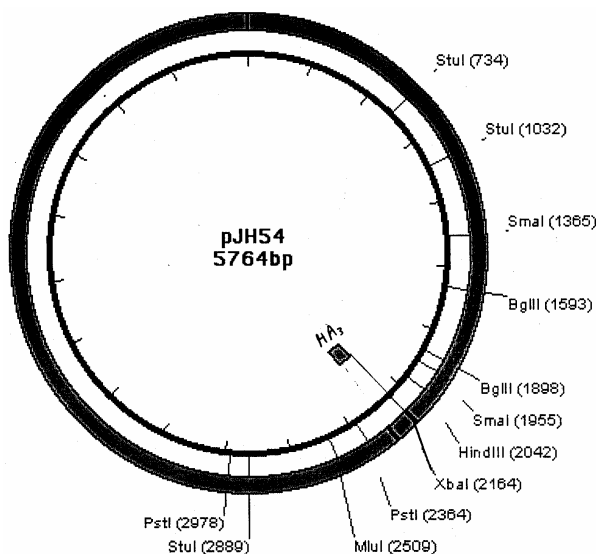
pGEM[®]-T Easy

- plasmid používaný pro klonování PCR produktů
- obsahuje lacZ fragment, který umožňuje modro-bílou (blue-white) selekci bakteriálních kolonií
- nese rezistenci proti ampicilinu



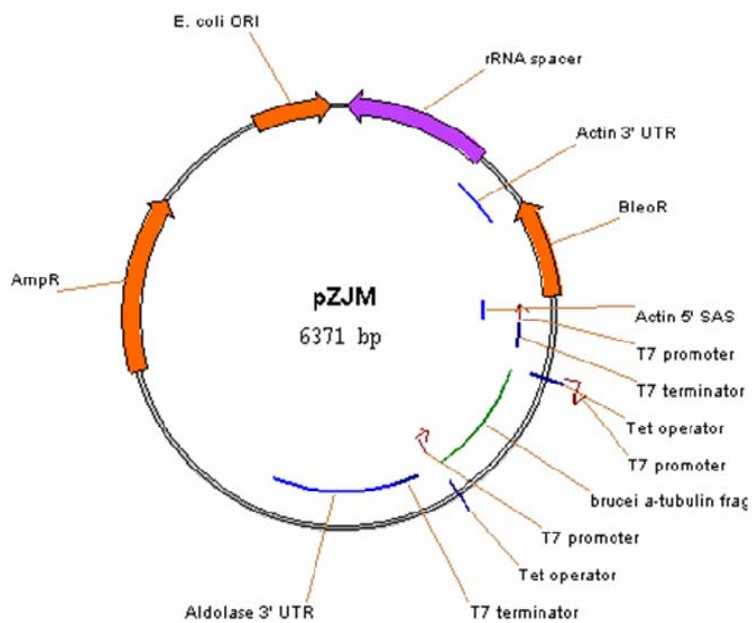
pJH54

- plasmid konstruovaný pro expresi proteinů (odvozený od vektoru pLew100)
- obsahuje malý HA₃ tag proti kterému je komerčně dostupná monoklonální protilátka
- nese rezistenci proti phleomycinu



pZJM β

- plasmid konstruovaný pro expresi dsRNA a používaný pro snížení exprese genů mechanismem RNA interference (RNAi) (Wang a kol., 2000)
- obsahuje dva protisměrné tetracyklinem indukovatelné T7 promotory
- nese rezistenci proti phleomycinu



3.3. Média

3.3.1. Médium pro kultivaci procyklických stádií *T. brucei*

Procyklická stádia *T. brucei brucei* kultivujeme v médiu SDM-79 s přidavkem hygromycinu a neomycinu (G418) (divoký typ) a hygromycinu, neomycinu (G418) a phleomycinu (transgenní buňky). (Brun a Schöenberger, 1979)

3.3.1.1. SDM-79

složka	firma	na 1 litr
Graceho médium s L-glutaminem, bez NaCO ₃	GiBCO	2 g
glukóza	Lachema	1 g
HEPES	AppliChem	8 g
MOPS	AppliChem	5 g
NaHCO ₃	Lachema	2 g
kyselina pyrohroznová	Sigma	100 mg
L-alanin	Sigma	200 mg
L-arginin	Merck	100 mg
L-glutamin	Sigma	300 mg
L-methionin	Sigma	70 mg
L-fenylalanin	Sigma	80 mg
L-prolin	Sigma	600 mg
L-serin	Sigma	60 mg
L-aurin	Sigma	160 mg
L-threonin	Sigma	350 mg
L-tyrosin	Sigma	100 mg
adenosin	Sigma	10 mg
guanosin	Sigma	10 mg
D-glukosamin-HCl	Sigma	50 mg
kyselina listová	Sigma	4 mg
kyselina p-aminobenzoová	Sigma	2 mg
biotin	Sigma	0,2 mg

- 20,2 g předvážené směsi suchých složek (viz tabulka) rozpustit ve 200 ml MilliQ vody
- 6,24 g S-MEM (GiBCO) rozpustit v 600 ml MilliQ vody a smíchat s předešlým roztokem
- přidat 8 ml MEM aminokyselin 50x (bez L-glutaminu) (GiBCO)
- přidat 6 ml MEM neesenciálních aminokyselin 100x (GiBCO)
- přidat 750 µl heminu (Fluka, zásobní roztok 10 mg/ml)

- přidat 100 000 jednotek penicilinu (Pen-Strep 100x) (GiBCO) (zásobní roztok 10 000 jednotek/ml, tj. 10 ml)
- upravit pH na 7,3 pomocí 10 N NaOH a doplnit do 900 ml MilliQ vodou
- přefiltrovat přes 0,22 µm filtr
- sterilně přidat 100 ml inaktivovaného (56°C, 30 min) fetálního hovězího séra (FBS) (PAA)
- skladovat při teplotě 4°C

3.3.1.2. Antibiotika

buňky	antibiotikum	zásobní roztok	ředění	finální koncentrace
kmen 29-13	hygromycin	50 mg/ml	1000x	50 µg/ml
	neomycin (G418)	15 mg/ml	1000x	15 µg/ml
	phleomycin	--	--	--
	tetracyklin	--	--	--
neindukované buňky odvozené od kmene 29-13	hygromycin	50 mg/ml	1000x	50 µg/ml
	neomycin (G418)	15 mg/ml	1000x	15 µg/ml
	phleomycin	2,5 mg/ml	1000x	2,5 µg/ml
	tetracyklin	--	--	--
indukované buňky odvozené od kmene 29-13	hygromycin	50 mg/ml	1000x	50 µg/ml
	neomycin (G418)	15 mg/ml	1000x	15 µg/ml
	phleomycin	2,5 mg/ml	1000x	2,5 µg/ml
	tetracyklin	1 mg/ml	1000x	1 µg/ml

Antibiotika obsažená v médiu SDM-79 se mohou u různých transgenních kmenů *T. brucei* lišit. V tabulce jsou uvedeny nejběžnější typy antibiotik a jejich koncentrace v kultivačních médiích.

3.3.2. Médium pro kultivaci kompetentních buněk *E. coli*

Ke kultivaci kompetentních buněk *E. coli* používáme LB médium v tuhé nebo tekuté formě.

3.3.2.1. Bakteriální půda (agarové LB misky)

trypton (Amresco)	2 g
kvasničný extrakt (Amresco)	1 g
NaCl (Lach-Ner)	2 g
agar (Amresco)	3 g

- doplnit do 200 ml destilovanou vodou
- sterilizovat v autoklávu (121°C, 20 min)
- po zchladnutí na cca 60°C přidat 800 µl ampicilinu (25 mg/ml) (Biotika)
- rozlít do sterilních Petriho misek (vrstva půdy na misku: 3-5 mm)
- po ztuhnutí skladovat při teplotě 4°C dnem vzhůru

3.3.2.2. LB médium

trypton (Amresco)	1 g
kvasničný extrakt (Amresco)	0,5 g
NaCl (Lach-Ner)	1 g

- doplnit do 100 ml destilovanou vodou
- rozlít do zkumavek (objem média na zkumavku: 3 ml)
- sterilizovat v autoklávu (121°C, 20 min)
- skladovat při pokojové teplotě
- před kultivací přidat do zkumavky 12 µl ampicilinu (25 mg/ml) (Biotika)

3.4. Roztoky a pufry

Pokud není uvedeno jinak, jsou uvedené roztoky uchovávány při pokojové teplotě.

3.4.1. RNA elektroforéza

10x MOPS

0,5 M MOPS	40 ml
3 M octan sodný pH 5,5	1,67 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	2 ml
Milli-Q voda	56,33 ml

1% formaldehydový agarózový gel

10x MOPS	12 ml
agaróza (CAMBREX)	1,2 g
Milli-Q voda	104 ml

- za tepla rozpustit (mikrovlnná trouba, cca 2 min)
- po zchladnutí na cca 60°C přidat 4 ml 37% formaldehydu
- nalít do elektroforetické formy s hřebenem a nechat ztuhnout

elektroforetický pufr (dělicí pufr)

10x MOPS	55 ml
37% formaldehyd (PENTA)	50 ml
Milli-Q voda	445 ml

1,5x vzorkový pufr

formamid (Sigma)	600 μ l
37% formaldehyd (PENTA)	210 μ l
10x MOPS	156 μ l
ethidium bromid (Serva)	5 μ l

- mikroskopavku se vzorkovým pufrem obalit alobalem a uchovávat při teplotě 4°C

3.4.2. Northernová analýza

20x SSC

NaCl (Lach-Ner)	175,3 g
citronan sodný (Lach-Ner)	88,2 g

- rozpustit v 800 ml Milli-Q vody
- upravit pH na 7,0
- doplnit do 1 litru Milli-Q vodou

NaPi

NaH ₂ PO ₄ (Lach-Ner)	250 mM
Na ₂ HPO ₄ (Lach-Ner)	250 mM
pH 7,2	
SDS (Serva)	7%
EDTA (Amresco)	1 mM
Milli-Q voda	

3.4.3. SDS polyakrylamidová elektroforéza a barvení gelu

12% SDS polyakrylamidový gel (separační gel) (hodnoty pro 2 gely)

Milli-Q voda	3,3 ml
30% akrylamid (AA) (AppliChem)	4 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 µl

před naléváním přidat:

10% peroxosíran amonný (APS)	100 µl
TEMED (Amresco)	4 µl

5% SDS polyakrylamidový gel (zaostřovací gel) (hodnoty pro 2 gely)

Milli-Q voda	2,7 ml
30% akrylamid (AA) (AppliChem)	670 μ l
1 M Tris (pH 6,8)	500 μ l
10% SDS	40 μ l

před naléváním přidat:

10% peroxosíran amoný (APS)	40 μ l
TEMED (Amresco)	4 μ l

5x elektrodotový pufr

Tris (Amresco)	15 g
glycin (Serva)	72 g
SDS (Serva)	5 g

- doplnit do 1 litru destilovanou vodou

5x vzorkový pufr

1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,6 ml
50% glycerol	5 ml
10% SDS	2 ml
2-mercaptoethanol	0,5 ml
1% bromphenol blue	1 ml
Milli-Q voda	0,9 ml

- uchovávat krátkodobě při teplotě 4°C nebo dlouhodobě při -20°C

2x vzorkový pufr

1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,24 ml
50% glycerol	2 ml
10% SDS	0,8 ml
2-mercaptoethanol	0,2 ml
1% bromphenol blue	0,4 ml
Milli-Q voda	6,36 ml

- uchovávat krátkodobě při teplotě 4°C nebo dlouhodobě při -20°C

Coomassie Blue

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) 1,0 g	
methanol (LAB-SCAN)	450 ml
ledová kyselina octová (PENTA)	100 ml
Milli-Q voda	450 ml

odbarvovací roztok

methanol (LAB-SCAN)	450 ml
ledová kyselina octová (PENTA)	100 ml
Milli-Q voda	450 ml

uchovávací roztok

methanol (LAB-SCAN)	250 ml
ledová kyselina octová (PENTA)	100 ml
Milli-Q voda	650 ml

3.4.4. Westernová analýza**Semi-Dry přenosový pufr**

Tris-HCl (Amresco)	11,64 g
glycin (Serva)	5,86 g
SDS (Serva)	7,5 g
methanol (LAB-SCAN)	400 ml

- doplnit do 2 litrů destilovanou vodou

Ponceau S

Ponceau S	0,5%
kyselina octová	1%
Milli-Q voda	

10x PBS

NaCl (Lach-Ner)	80 g
KCl (Lachema)	2 g
Na ₂ HPO ₄ (Lach-Ner)	14,4 g
KH ₂ PO ₄ (Lachema)	2,4 g

- doplnit do 800 ml destilovanou vodou
- upravit pH na 7,4
- doplnit do 1 litru destilovanou vodou

PBS Tween (PBS-T)

10x PBS	100 ml
Milli-Q voda	900 ml
Tween 20 (LOBA Feinchemie)	500 µl

PBS Tween s 5% mlékem (PBS-TM)

odtučněné mléko (Promil)	10 g
--------------------------	------

- doplnit do 200 ml PBS-T
- uchovávat při teplotě 4°C

3.4.5. Agarózová (DNA) elektroforéza**50x TAE**

Tris-base (Amresco)	242 g
ledová kyselina octová (PENTA)	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml

- doplnit do 1 litru destilovanou vodou

0,75% agarózový gel

agaróza (CAMBREX)	450 mg
0,5x TAE	60 ml

- za tepla rozpustit (mikrovlnná trouba, cca 2 min)
- po zchladnutí na cca 60°C přidat 1 μ l ethidium bromidu
- nalít do elektroforetické formy s hřebenem a nechat ztuhnout

3.4.6. Příprava kompetentních buněk *E. coli***SOB médium**

trypton (Amresco)	20 g
kvasničný extrakt (Amresco)	5 g
NaCl (Lach-Ner)	0,5 g
250 mM KCl	10 ml
2 M MgCl ₂	5 ml

- upravit pH na 7,0
- doplnit do 1 litru destilovanou vodou
- sterilizovat v autoklávu (121°C, 20 min)
- přidat 5 ml 2 M MgCl₂
- uchovávat při teplotě -20°C

Transformation buffer (TB)

PIPES (Sigma)	10 mM
CaCl ₂ (Lachema)	15 mM
KCl (Lachema)	250 mM

- upravit pH na 6,7 pomocí KOH
- sterilizovat v autoklávu
- sterilně přidat 55 mM MnCl₂ (ve formě přefiltrovaného 1M roztoku)
- uchovávat při teplotě 4°C

3.4.7. Transformace kompetentních buněk *E. coli*

SOC médium

složení identické se SOB médiem

- navíc 20 mM glukóza
- uchovávat při teplotě -20°C

3.4.8. Elektroporace procyklických stádií *T. brucei*

Cytomix

KCl (Lachema)	120 mM
CaCl ₂ (Lachema)	0,15 mM
K ₂ HPO ₄ (Lachema)	10 mM
HEPES (pH 7,6) (AppliChem)	25 mM
EDTA (Amresco)	2 mM
MgCl ₂	5 mM
Milli-Q voda	

- uchovávat krátkodobě při teplotě 4°C nebo dlouhodobě při -20°C

3.4.9. Digitoninová frakcionace

SHE

sacharóza (PENTA)	250 mM
HEPES (pH 7,4) (AppliChem)	25 mM
EDTA (Amresco)	1 mM
MilliQ voda	

- uchovávat při teplotě 4°C

HBSS

NaCl (Lach-Ner)	136,9 mM
KCl (Lachema)	5,4 mM
MgSO ₄	0,8 mM
CaCl ₂ (Lachema)	1,3 mM
KH ₂ PO ₄ (Lachema)	0,4 mM
Na ₂ HPO ₄ (Lach-Ner)	0,3 mM
NaHCO ₃ (Lachema)	4,2 mM
glukóza (Lachema)	5,5 mM

- upravit pH na 7,3

digitonin (10 mg/ml)

digitonin (Sigma)	10 mg
Milli-Q voda	1 ml

- za tepla rozpustit (termoblok, 10 min, 96°C)
- uchovávat při teplotě -20°C

10% Triton X-100 (TX-100)

Triton X-100 (Fluka)	5 ml
Milli-Q voda	45 ml

3.4.10. Auranofinový pokus**auranofin (1 mM)**

auranofin (GeneTiCA)	6,785 mg
----------------------	----------

- doplnit do 10 ml dimethyl sulfoxidem (DMSO)
- uchovávat při teplotě -20°C

3.5. Ostatní chemikálie

antibiotika: Ampicilin (Biotika), Hygromycin (Sigma), Neomycin (Sigma), Phleomycin (Sigma), Tetracyklin (Spofa); APS (peroxosíran amonný – Lachema), BioMax MS FILM (KODAK), Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), BSA (New England BioLabs, TaKaRa), dNTPs (Fermentas), Ethanol (Lachema, Sigma), Ethidium bromid (Serva), Fenol (Sigma), Formaldehyd (Lachema), Glycerol (PENTA), Chloroform (PENTA), IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) (Sigma), Isoamylalkohol (PENTA), IsoflowTM (Beckman), LiCl (Lachema), MOPS (AppliChem), NaOH (Lach-Ner), octan sodný (Lachema), proteinové standardy: Precision Plus ProteinTM Standards - All Blue (Bio-Rad) nebo Mark12TM Unstained Standard (Invitrogen); radioizotop α -³²P-dATP (3000 Ci/nmol) (MPO Biochemicals), restrikční enzymy: *Hind*III (TaKaRa), *Mlu*I (New England Biolabs), *Not*I (New England Biolabs), *Sal*I (Amersham), *Xba*I (New England Biolabs); RNáza (Serva), Sephadex G-50 (Sigma), T4 DNA ligáza a příslušný pufr (Invitrogen), Taq DNA polymeráza a příslušný pufr (TaKaRa), TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin) p.a. (Amresco), X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (Amersham)

4. METODY

4.1. Kultivace procyklických stádií *T. brucei*

Kmen 29-13 kultivujeme v médiu SDM-79 (Brun a Schönenberger, 1979) s přídatkem 50 $\mu\text{l/ml}$ hygromycinu a 15 $\mu\text{l/ml}$ neomycinu (G418). V případě transgenních kmenů používáme k selekci buněk s integrovaným plasmidem různá selekční činidla. Nejčastěji přidáváme do média 2,5 $\mu\text{l/ml}$ phleomycinu. Proces RNAi nebo expresi studovaných genů spouštíme u příslušných buněčných linií přidáním 1 $\mu\text{l/ml}$ tetracyklinu. Při dosažení koncentrace 2×10^7 buněk/ml přeočkujeme kulturu do čerstvého média.

4.2. Stanovení počtu buněk *T. brucei* v kultuře

Koncentraci buněk procyklických stádií *T. brucei* v kultuře stanovujeme pomocí přístroje Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer (Beckman Coulter) (dilution factor = 200, TI = 3,5 μm , Tu = 7,7 μm , count = between) na základě měření vodivosti suspenze buněk.

4.3. Sledování růstového fenotypu

Po indukci RNAi sledujeme u příslušné buněčné linie *T. brucei* změny růstové rychlosti a růstový fenotyp. Buňky nejprve naředíme na koncentraci 5×10^6 buněk/ml do 5 ml média SDM-79 s přídatkem odpovídajících antibiotik a přidáme 1 $\mu\text{g/ml}$ tetracyklinu, čímž dojde ke spuštění RNAi. V pravidelných intervalech 24 hodin po dobu 14 dnů stanovujeme koncentraci buněk v kultuře. Pro všechna měření používáme kultury neindukovaných a indukovaných buněk a kulturu buněk kmene 29-13.

4.4. Izolace RNA

Celkovou RNA izolujeme z 10 ml kultur obsahujících 10^8 buněk procyklických stádií *T. brucei*. K izolaci používáme TRI REAGENT™ (Sigma) a postupujeme dle návodu výrobce.

4.5. Stanovení koncentrace RNA

Koncentraci RNA ve vzorku stanovujeme pomocí spektrofotometru Biophotometer (Eppendorf) v oblasti UV světla při vlnové délce 260 nm.

4.6. RNA elektroforéza

Přibližně 10 µg RNA necháme inkubovat s 1,5x vzorkovým pufrům (1:2) (10 min, 65°C) (Sambrook a kol., 1989) a nanese na 1% formaldehydový agarózový gel. Elektroforetické dělení RNA probíhá při současné cirkulaci dělicího pufru a při napětí 60 V 3 hodiny.

4.7. Northernová analýza

4.7.1. Northern blot

Z gelu přeneseme RNA metodou Northern blotu na nylonovou membránu (Biodyne® B Membrane, 0,45 µm, Pall Gelman Laboratory) za použití 5x SSC jako přenosové kapaliny. Po přenosu necháme RNA do membrány přichytit pomocí UV záření v přístroji UV Stratalinker® 1800 (Stratagene). Membránu uchováváme při pokojové teplotě zabalenou do potravinové fólie.

4.7.2. Příprava radioaktivně značené DNA sondy

DNA pro přípravu sondy získáme pomocí PCR reakce nebo vyštípnutím z bakteriálního plasmidu příslušnými restrikčními enzymy. Po agarózové elektroforéze a izolaci DNA z gelu přidáme ke 100 ng DNA 10 µl hexanukleotidů v 5x reakčním pufru a doplníme vodou do celkového objemu 40 µl.

Roztok zdenaturujeme (5-10 min, 100°C) a ihned zchladíme na ledu. Poté přidáme 3 µl Mix A, 1-3 µl [μ -³²P]-dATP (50 µCi) a 1 µl Klenow fragmentu (5 jednotek). Reakci inkubujeme 10 minut při teplotě 37°C. Neinkorporované nukleotidy oddělíme na kolonce obsahující Sephadex 50. Před použitím sondu zdenaturujeme (5 min, 100°C, vodní lázeň).

4.7.3. Prehybridizace, DNA hybridizace, autoradiografie

Membránu s RNA prehybridizujeme v přehřátém roztoku NaPi při teplotě 55°C 2 hodiny. Hybridizujeme přes noc v témže roztoku s radioaktivně značenou DNA sondou při teplotě 55-60°C a za stálého míchání. Membránu promyjeme v roztoku 2x SSC s 0,1% SDS (20 minut při pokojové teplotě) a poté v roztoku 0,2x SSC s 0,1% SDS (20 minut při teplotě 55°C). Po promývání membránu založíme do fotosenzitivní kazety. Podle stáří radioaktivně značeného fosforu zvolíme dobu expozice. Specifický signál detekujeme na přístroji Typhoon PhosphorImager (Amersham).

4.8. Příprava lyzátů *T. brucei*

Objem kultury obsahující 5×10^7 procyklických stádií *T. brucei* stočíme při 3000 g po dobu 5 minut. Pelet opláchneme 1 ml 1x PBS a přeneseme do mikroskopické kumavky. Stočíme ve stolní centrifuzě při 6000 rpm po dobu 5 minut. Odebereme 1x PBS, resuspendujeme v 50 μ l 2x PBS a přidáme 50 μ l 2x vzorkového pufru pro SDS polyakrylamidové gely. Takto připravené lyzáty uchováváme při teplotě -20°C.

4.9. SDS polyakrylamidová elektroforéza (SDS PAGE)

Proteiny dělíme pomocí vertikální SDS polyakrylamidové elektroforézy. Polyakrylamidový gel obsahuje dvě fáze (zaostřovací a separační). Nejprve připravíme směs 12% separačního gelu a nalijeme ji mezi dvě dobře odmaštěná skla (umístěná ve stojánku) tak, aby hladina dosahovala přibližně 1 cm pod hroty zasunutého hřebenu. Poté nalitý gel převrstvíme n-butanolem (100 μ l). Během 20-30 minut separační gel zpolymeruje a mezi ním a vrstvou n-butanolu se vytvoří ostré rozhraní. Po dokončení polymerace n-butanol odsajeme proužkem filtračního papíru a nalijeme směs 5% zaostřovacího gelu. Mezi skla vsuneme opatrně hřeben a dáváme pozor, aby na spodní straně hrotů nebyly žádné vzduchové bubliny. Během 15 minut směs zpolymeruje. Mezitím připravíme 250 ml elektrodového pufru naředěním 5x koncentrovaného zásobního roztoku. Po dokončení polymerace odstraníme hřeben a skla s připraveným dvofázovým gelem vložíme do elektroforetické aparatury Mighty Small (Hofer/Amersham Biosciences). Vytvořené jamky a vnitřní (katodový) prostor naplníme elektrodovým pufrem tak, aby jeho

hladina byla zhruba v polovině mezi horními okraji krátkého a dlouhého skla. Spodní (anodový) prostor rovněž naplníme elektrodoým pufrem.

Vzorky proteinů před nanesením na gel zdenaturujeme (10 minut, 95-100°C) a krátce stočíme. V případě lyzátů *T. brucei* nanášíme do jamek 10 µl, v ostatních případech 20 µl vzorku. Spolu se vzorky nanášíme také proteinový standard, a to buď „barvený“ (Precision Plus Protein™ Standards - All Blue (Bio-Rad), následuje western blot) nebo „nebarvený“ (Mark12™ Unstained Standard (Invitrogen), následuje Coomassie Blue barvení). Vlastní elektroforéza probíhá při napětí 90V v zaostřovacím gelu, po přechodu do separačního gelu pak při 140 V.

4.9.1. Barvení gelu

Po dokončení SDS polyakrylamidové elektroforézy můžeme rozdělené proteiny analyzovat pomocí Coomassie Blue barvení. Nejprve z gelu odřízneme zaostřovací gel a samotný separační gel přeneseme do Petriho misky obsahující roztok Coomassie Blue. Barvení probíhá za stálého míchání po dobu 45-60 minut. Poté gel přeneseme do Petriho misky s odbarvovacím roztokem a necháme odbarvovat do odbarvení pozadí gelu. Gel přeneseme do uchovávacího roztoku, popřípadě vysušíme.

4.10. Westernová analýza

4.10.1. Western blot

Vzorky rozdělené SDS polyakrylamidovou elektroforézou přeneseme z gelu pomocí Semi-Dry blotu (Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad) na nitrocelulóзовou membránu (BioTrace® NT Pure Nitrocellulose Membrane, Pall Corporation Life Sciences). Blotovací sendvič vypadá následovně: blotovací papír Whatman, membrána, gel, blotovací papír Whatman.

Nejprve si připravíme membránu tak, aby její velikost odpovídala velikosti gelu a necháme ji společně s gelem několik minut inkubovat v Semi-Dry přenosovém pufru. V případě blotovacího papíru stačí pouze několikavteřinová inkubace. Po sestavení

blotovacího sendviče odsajeme ubrouskem přebytečný pufr a necháme 60 minut blotovat při napětí 20 V. Po přenosu proteinů opláchneme membránu v PBS Tweenu, popřípadě ještě obarvíme v roztoku Ponceau S a tím přenos ověříme. Po obarvení, které trvá přibližně 3 minuty, membránu promyjeme v Milli-Q vodě a v PBS Tweenu až do odbarvení pozadí. Membránu blokujeme přes noc v PBS Tweenu s 5% mlékem.

4.10.2. Hybridizace s protilátkami, autoradiografie

Před inkubací opláchneme membránu v PBS-T. Vlastní hybridizace probíhá v roztoku PBS-TM, s primární protilátkou 2 hodiny a sekundární protilátkou 1 hodinu; v obou případech pak při pokojové teplotě a za stálého míchání. Po každé inkubaci promyjeme membránu v PBS-T (5x 5 minut). Pro westernovou analýzu používáme různé druhy primárních protilátek, jejichž ředění se pohybuje v rozmezí 1:500 – 1:150000. Sekundární protilátkou je prasečí protilátka proti králičím protilátkám značená peroxidázou SwaR/Px (Sevac) popřípadě protilátka proti myším nebo slepičím protilátkám. U sekundárních protilátek používáme ředění 1:1000. Specifickou vazbu zviditelňujeme pomocí vyvolávacího kitu PIERCE ECL Western Blotting Substrate (PIERCE) a signál detekujeme pomocí filmu KODAK® BioMax MS (KODAK) nebo pomocí přístroje FUJIFILM Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (FUJIFILM Life Science).

4.11. PCR

PCR reakci provádíme na přístroji Mastercycler® personal (Eppendorf).

4.11.1. Použité primery

název	sekvence	restrikční místo
5F	5'- CAC CTC GAG CTT CTA CTC GAA CTT CCG G -3'	<i>Xho</i> I
6R	5'- CCC TCT AGA CGG TTA GGT TCT TGC AGG CC -3'	<i>Xba</i> I
7F	5'- CAC CAT ATG GTA GAG ATG AAG CGT GAT T -3'	<i>Nde</i> I
8R	5'- CAC AAG CTT TTT CCT TCC ATC AGC AAG T -3'	<i>Hind</i> III
NifS1Fw	5'- AAG CTT ATG TGT AGC ATT GAG G -3'	<i>Hind</i> III
NifS1Rv	5'- TCT AGA AAA CTC ACC GAA CTG -3'	<i>Xba</i> I

4.11.2. Složení a podmínky PCR reakce**Amplifikace fragmentu NifS1 pro vytvoření DNA sondy****Složení PCR reakce:**

složka	objem	finální koncentrace
DNA	1 µl	10 ng
5F primer	1 µl	10 pmol
6R primer	1 µl	10 pmol
dNTP	0,5 µl	0,25 mM
10x reakční pufr s MgCl ₂	2,5 µl	1x
Taq polymeráza	1 µl	2 jednotky
MilliQ voda	18 µl	

Podmínky PCR reakce:

1. Denaturace 94°C..... 5 min 1x
2. Denaturace 94°C..... 1 min 35x
3. Nasedání primerů 45°C..... 2 min 35x
4. Polymerace..... 72°C..... 2 min 35x
5. Závěrečná polymerace 72°C..... 10 min 1x

Amplifikace fragmentu NifS2 pro vytvoření DNA sondy**Složení PCR reakce:**

složka	objem	finální koncentrace
DNA	1 µl	10 ng
7F primer	1 µl	10 pmol
8R primer	1 µl	10 pmol
dNTP	0,5 µl	0,25 mM
10x reakční pufr s MgCl ₂	2,5 µl	1x
Taq polymeráza	1 µl	2 jednotky
MilliQ voda	18 µl	

Podmínky PCR reakce:

1. Denaturace 94°C..... 5 min 1x
2. Denaturace 94°C..... 1 min 35x
3. Nasedání primerů 50°C..... 1 min 35x
4. Polymerace..... 72°C..... 2 min 35x
5. Závěrečná polymerace 72°C..... 10 min 1x

Amplifikace genu NifS1 pro klonování do expresního vektoru pJH54**Složení PCR reakce:**

složka	objem	finální koncentrace
DNA	1 μ l	10 ng
NifS1Fw primer	1 μ l	10 pmol
NifS1Rv primer	1 μ l	10 pmol
dNTP	0,5 μ l	0,25 mM
10x reakční pufr s MgCl ₂	2,5 μ l	1x
Taq polymeráza	1 μ l	2 jednotky
MilliQ voda	18 μ l	

Podmínky PCR reakce:

1. Denaturace 95°C 5 min 1x
2. Denaturace 94°C 1 min 35x
3. Nasedání primerů 52°C 1 min 35x
4. Polymerace 72°C 2 min 35x
5. Závěrečná polymerace 72°C 10 min 1x

4.12. Agarózová (DNA) elektroforéza

0,75% agarózy v 0,5x TAE roztoku necháme povařit v mikrovlnné troubě, zchladíme na 60°C a přidáme ethidium bromid do výsledné koncentrace 0,5 μ g/ml. Připravený roztok nalijeme do elektroforetické formy s hřebenem. Po ztuhnutí gelu nanese vzorky DNA smíchané s bromfenolovou modří (0,1 celkového objemu) do jamek. DNA dělíme při napětí 50-90 V a zviditelňujeme pomocí UV transiluminátoru (Bio-Imaging Systems, MiniBis).

4.13. Izolace DNA z gelu

DNA izolujeme z gelu pomocí kitu QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN) nebo pomocí tekutého dusíku.

4.13.1. Izolace DNA z gelu pomocí kitu

Postupujeme dle pokynů výrobce.

4.13.2. Izolace DNA z gelu pomocí tekutého dusíku

Mikrozkumavku s vykrojeným gelem obsahujícím DNA ponoříme na 2 minuty do tekutého dusíku a necháme zmrznout. Poté přidáme 100 μ l vody a zmrzlý obsah rozdrtíme homogénizátorem. Přidáme stejný objem fenolu, zvortexujeme a vložíme do dusíku na 1 minutu. Rozpustíme ve 37°C a centrifugujeme 15 minut při maximální rychlosti. Vodní fázi přeneseme do nové mikrozkumavky a provedeme fenol-chloroformovou extrakci (viz Příprava transgenních linií *T. brucei*, Přečištění DNA fenol-chloroformovou extrakcí).

4.14. Stanovení koncentrace DNA

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

4.15. Ligační reakce

Ke 150 ng insertu (fragmentu DNA) vyizolovaného z gelu přidáme 10-50 ng vektoru, 1 jednotku T4 DNA ligázy, 2 μ l 5x ligačního pufru a doplníme vodou do 10 μ l. Ligační reakci inkubujeme 2-3 hodiny při pokojové teplotě nebo přes noc při teplotě 16°C.

Negativní kontroly k ligační reakci:

	1	2	3	4	5
insert	ANO	NE	NE	ANO	ANO
vektor	ANO	ANO	ANO	NE	NE
ligáza	NE	ANO	NE	ANO	NE
ligační pufr	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO
Milli-Q voda	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO

vysvětlivky:

ANO – složka přítomna, NE – absence složky

1-5 – jednotlivé kontroly

4.16. Příprava kompetentních buněk *E. coli*

Na kultivační půdu bez antibiotik rozetřeme nepatrné množství suspenze netransformovaných kompetentních buněk *E. coli* (skladovány v SOB médiu s 10%

glycerolem při teplotě -80°C) a necháme inkubovat přes noc při teplotě 37°C . Z narostlých kolonií vybereme jednu samostatnou kolonii a přeneseme ji do 3 ml SOB média s MgCl_2 (0,01 M). Kultivujeme za stálého třepání (200 rpm) při teplotě 37°C cca 16 hodin. 1 ml této kultury inokulujeme do 240 ml SOB média s MgCl_2 a kultivujeme za stálého třepání (200 rpm) při pokojové teplotě až do optické hustoty OD_{600} 0,6. Kulturu necháme třepat při 4°C po dobu 30 minut. Centrifugujeme při 2500 g a teplotě 4°C po dobu 10 minut. Pelet opatrně resuspendujeme (ustříženou špičkou) v 80 ml chlazeného TB pufru a za občasného promíchání inkubujeme 10 minut na ledu. Suspenzi centrifugujeme při 2500 g a teplotě 4°C po dobu 10 minut. Pelet opatrně resuspendujeme (ustříženou špičkou) ve 20 ml chlazeného TB pufru, přidáme DMSO do výsledné koncentrace 7% a dobře promícháme. Suspenzi inkubujeme 10 minut na ledu, poté přeneseme do předmražených mikrozkrumavek a okamžitě zamrazíme v tekutém dusíku. Takto připravené kompetentní buňky skladujeme při teplotě -80°C .

4.17. Transformace kompetentních buněk *E. coli* metodou heat-shock

50-100 μl kompetentních buněk *E. coli* (DH5 α ; XL1 Blue) necháme inkubovat 20 minut na ledu. Přidáme 5-10 μl ligační směsi a opět inkubujeme 20 minut na ledu. Vložením buněk do vodní lázně o teplotě 42°C na 1 minutu provedeme heat-shock. Poté buňky ihned umístíme na led a necháme 2 minuty chladit. Přidáme 300 μl SOC a necháme třepat při 200 rpm po dobu 45 minut a teplotě 37°C .

4.18. Kultivace kompetentních buněk *E. coli*

Transformované kompetentní buňky rozetřeme na agarové LB misky s přidavkem 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicilinu a kultivujeme přes noc při teplotě 37°C . Pokud pracujeme s vektory umožňujícími „blue-white“ selekci, tj. rozlišení na základě *lacZ* komplementace, rozetřeme před výsevem kompetentních buněk na misku 40 μl X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) (20 mg/ml) a 4 μl IPTG (isopropylthio- β -D-galactoside) (200 mg/ml). Jednu kolonii *E. coli* inokulujeme do 3

ml tekutého LB média a kultivujeme přes noc za stálého třepání (200 rpm) při teplotě 37°C.

4.19. Izolace plasmidové DNA

Plasmidovou DNA izolujeme pomocí kitu QIA[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN) nebo metodou alkalické lýze. Pokud požadujeme větší množství plasmidové DNA inokulujeme místo 3 ml tekutého LB média 100 ml a pro izolaci použijeme kit QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit (100).

4.19.1. Izolace plasmidové DNA pomocí kitu

Postupujeme dle pokynů výrobce.

4.19.2. Izolace plasmidové DNA metodou alkalické lýze (miniprep)

3 ml narostlé bakteriální kultury centrifugujeme při maximální rychlosti po dobu 2 minut. Odebereme supernatant a pelet resuspendujeme v 50 µl TEG (25 mM Tris-HCl + 10 mM EDTA + 50 mM glukóza). Přidáme 100 µl 0,2 M NaOH s 1% SDS (připravujeme vždy čerstvý roztok: 800 µl Milli-Q vody + 100 µl 10% SDS + 100 µl 2 M NaOH). Resuspendujeme a necháme inkubovat po dobu 5 minut. Přidáme 75 µl chlazeného 3 M octanu sodného pH 5,3 a jemně protřepeme. Přidáme 225 µl 5 M LiCl a opět jemně protřepeme. Centrifugujeme 10 minut při maximální rychlosti a teplotě 4°C. Supernatant přeneseme do mikrozkušavky a přidáme 1 ml 96% ethanolu. Uložíme nejméně na 1 hodinu do -20°C. Poté centrifugujeme 10 minut při maximální rychlosti a teplotě 4°C. Odebereme supernatant a DNA opláchneme 250 µl ledového 70% ethanolu. Centrifugujeme 5 minut při maximální rychlosti a teplotě 4°C. Odsajeme ethanol a pelet necháme vysušit (při pokojové teplotě 1 hodinu; při 37°C 30 minut). Po vysušení pelet resuspendujeme ve 30 µl Milli-Q vody a skladujeme při teplotě -20°C.

4.20. Restrikční reakce

Kontrolu přítomnosti insertu ve vektoru provedeme restrikční reakcí, která obsahuje 5 µl plasmidové DNA, 1 µl 10x reakčního pufru, 2 jednotky enzymu, 1 µl BSA (pokud je

enzymem vyžadováno), 1 μ l Triton X-100 (pokud je enzymem vyžadováno), 0,2 μ l RNázy (100 mg/ml) (u plasmidů izolovaných metodou alkalické lýze), vodu do celkového objemu 10 μ l. Pokud chceme insert vyštěpit za účelem ligace, provedeme restrikci v celkovém objemu 30 μ l (poměry jednotlivých složek zachováváme). Restrikční reakci inkubujeme při 37°C 1-5 hodin, poté analyzujeme pomocí agarózové elektroforézy, případně izolujeme z gelu a ligujeme.

4.21. Příprava transgenních linií *T. brucei*

4.21.1. Příprava plasmidové DNA pro transfekci *T. brucei*

Plasmidovou DNA získáme ze 100 ml kultury transformovaných kompetentních buněk *E. coli*. Před transfekcí *T. brucei* linearizujeme DNA restrikční endonukleázou *NotI* a přečistíme fenol-chloroformovou extrakcí.

4.21.2. Přečištění DNA fenol-chloroformovou extrakcí

1. objem reakční směsi upravit na 100 μ l
2. přidat 100 μ l fenolu
3. 5 minut mírně třepat
4. stočit (5 minut, maximální rychlost)
5. odebrat vodní fázi do nové mikrozkušavky
6. zopakovat kroky 2-4
7. odebrat vodní fázi do nové mikrozkušavky
8. přidat 50 μ l fenolu + 50 μ l chloroformu s isoamylalkoholem (24:1)
9. 5 minut mírně třepat
10. stočit (5 minut, maximální rychlost)
11. odebrat vodní fázi do nové mikrozkušavky
12. přidat 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 2,5 objemu 96% ethanolu
13. umístit minimálně na 30 minut do -20°C
14. stočit (30 minut, maximální rychlost, 4°C)
15. pelet opláchnout 150 μ l ledového 70% ethanolu
16. stočit (5 minut, maximální rychlost)
17. pelet vysušit a rozpustit v 35 μ l Milli-Q vody

4.21.3. Elektroporace procyklických stádií *T. brucei*

Kulturu obsahující 10^8 procyklických stádií *T. brucei* centrifugujeme 10 minut při 3000 rpm a teplotě 4°C. Slijeme supernatant, pelet opláchneme 5 ml cytomixu a centrifugaci opakujeme. Poté slijeme supernatant a pelet rozpustíme v 0,5 ml cytomixu. Přidáme 10 µg linearizovaného plasmidu a celý objem přeneseme do elektroporační kyvety. Elektroporujeme v elektroporátoru BTX ECM-630 při 25 µF a 500 Ω. Kyvetu vystavíme dvěma elektrickým pulsům v intervalu 10 vteřin (1. 1500 V, 2. 1700 V). Poté buňky sterilně převedeme do 4,5 ml SDM-79 s přidavkem hygromycinu a neomycinu (G418). Po 24 hodinách přidáme phleomycin.

4.22. Digitoninová frakcionace

4.22.1. Princip

Digitonin je šetrný neiontový detergent, který patří mezi rostlinné glykosidy. Jeho hydrofobní část interaguje s cholesterolem buněčných membrán za tvorby velkých pórů s hydrofilním středem. Pokud je digitonin přítomen v nižších koncentracích, působí na membrány s vyšším obsahem cholesterolu (cytoplazmatická membrána), ve vyšších koncentracích pak rozrušuje i membrány na cholesterol chudé (mitochondriální membrána a membrána endoplazmatického retikula). Vzniklými póry prochází molekuly až do velikosti 200 kDa. Při nižších koncentracích digitoninu tedy může z buňky unikat většina cytosolických proteinů. Při vysokých koncentracích pak digitonin rozpouští všechny buněčné membrány jako typický neiontový detergent (Schulz, 1990). Mitochondrie procyklických stádií *T. brucei* nemá charakter jednoduchých měchýřků, ale je rozvětvená po celé buňce. Postupy izolace neporušených mitochondrií založené na odstranění cytoplazmatické membrány a následné gradientové frakcionaci jsou technicky náročné (Allemann a Schneider, 2000), proto se u *T. brucei* využívá digitonin.

4.22.2. Postup

Pro digitoninovou frakcionaci potřebujeme 5×10^8 buněk procyklických stádií *T. brucei*. Buňky centrifugujeme 10 minut při 3000 rpm a teplotě 4°C. Pelet promyjeme ledovým SHE (1 ml na 10^8 buněk) a opět stočíme (10 min, 3000 rpm, 4°C). Odstraníme

supernatant a buňky naředíme na koncentraci 5×10^9 /ml ledovým SHE. Suspenzi buněk držíme na ledu.

Koncentraci proteinů stanovujeme podle Bradfordové (Bradford, 1976). Jako kalibrační protein používáme hovězí sérum albumin (BSA). Ke 2 μ l suspenze buněk přidáme 18 μ l HBSS a resuspendujeme. K 5 μ l směsi přidáme 245 μ l Milli-Q vody a 1 ml činidla, poté zvortexujeme a inkubujeme 10 minut při pokojové teplotě. Na přístroji Biophotometer (Eppendorf) změříme absorbanci (při vlnové délce 595 nm) a následně určíme koncentraci proteinů v suspenzi buněk.

K 1 mg buněk (proteinů) přidáme 200 μ l HBSS a 8 μ l digitoninu (10 mg/ml), poté ihned zvortexujeme (10 vteřin) a inkubujeme 5 minut při 25°C. Směs stočíme při 13000 rpm po dobu 2 minut. Supernatant (= cytosolická frakce) přeneseme do mikrozkušavky a umístíme na led. Pelet promyjeme v HBSS a stočíme při 13000 rpm po dobu 2 minut. Po promytí resuspendujeme pelet ve 200 μ l HBSS a přidáme 0,1% Triton X-100 (2 μ l 10% TX-100). Směs inkubujeme 5 minut na ledu a poté centrifugujeme (2 min, 13000 rpm). Supernatant (= mitochondriální frakce) přeneseme do mikrozkušavky a umístíme na led.

K 1 mg buněk (proteinů) přidáme 200 μ l HBSS a 2 μ l 10% TX-100. Směs inkubujeme 5 minut na ledu a následně centrifugujeme 2 minuty při 13000 rpm. Supernatant (= lyzátoová frakce) přeneseme do mikrozkušavky a umístíme na led.

4.22.3. Analýza vzorků po frakcionaci

Jednotlivé frakce smícháme s 5x vzorkovým pufrem nanese na dva SDS polyakrylamidové gely a rozdělíme pomocí SDS PAGE. Jeden gel použijeme pro Coomassie Blue barvení, druhý pro westernovou analýzu.

Kontrola cytosolických frakcí pomocí westernové analýzy:

- primární inkubace se specifickou protilátkou proti cytosolickému proteinu (anti-enolase, 1:150000)
- sekundární inkubace s odpovídající sekundární protilátkou (SwaR/Px, 1:1000)

Kontrola mitochondriálních frakcí pomocí westernové analýzy:

- primární inkubace se specifickou protilátkou proti mitochondriálnímu proteinu (anti-cox6, 1:1000)
- sekundární inkubace s odpovídající sekundární protilátkou (SwaR/Px, 1:1000)

4.23. Auranofinový pokus

4.23.1. Princip

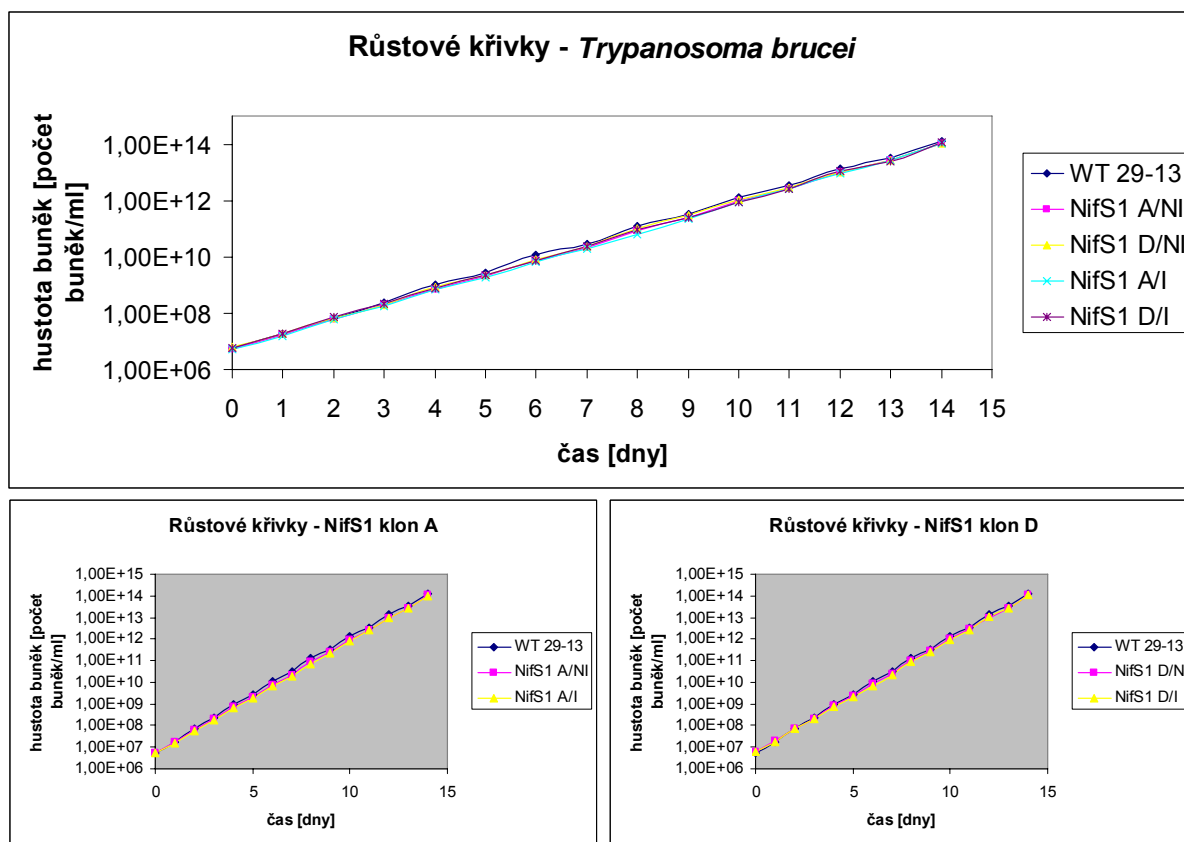
Auranofin je vysoce specifický inhibitor selenoproteinů (Gromer a kol., 1998; Alger a Williams, 2002), u *T. brucei* využívaný jako inhibitor růstu buněk (Lobanov a kol., 2006).

4.23.2. Postup

Ke kulturám obsahujícím 2×10^5 procyklických stádií *T. brucei* na 1 ml média přidáme auranofin rozpuštěný v dimethyl sulfoxidu (DMSO) o výsledných koncentracích 0,0001 μM , 0,001 μM , 0,01 μM , 0,1 μM , 1 μM a 10 μM . Jako kontrolu použijeme kulturu ke které přidáme stejné množství DMSO bez auranofinu. Po 40 hodinách změříme hustotu buněk v kultuře a hodnoty vyneseme do grafu.

5. VÝSLEDKY

5.1. Sledování růstového fenotypu



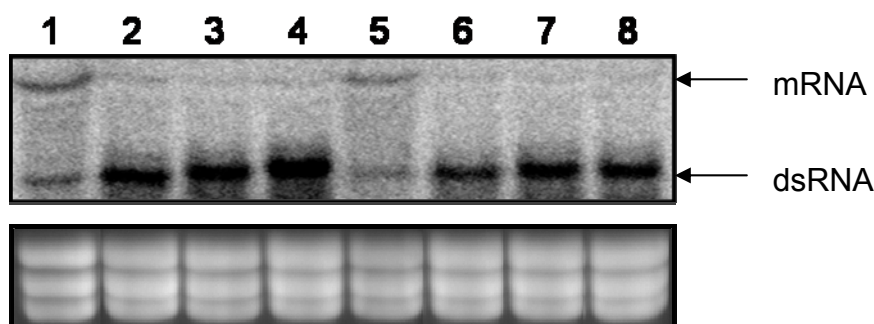
obr. 1 Růstové křivky

Analýza růstového fenotypu NifS1 buněčné linie

Transgenní linie procyklického stádia *Trypanosoma brucei*, která obsahuje RNAi vektor pZJM β se zaklonovaným genem NifS1, byla připravena v naší laboratoři Mgr. Ondřejem Šmídem. Z této linie byly vybrány dva klony (A, D) u kterých byl po indukcii RNA interference (RNAi) sledován růst buněk a růstový fenotyp. Růstové křivky byly zkonstruovány na základě 14 denního měření hustoty buněk u neindukovaných a indukovaných kultur. Měření bylo prováděno v pravidelných intervalech 24 hodin. Pokud přesáhla koncentrace buněk v kultuře hodnotu 2×10^7 na 1 ml média, byly buňky přeočkováním do čerstvého média 10x naředěny. V buňkách byla RNAi spuštěna přidáním tetracyklinu o výsledné koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$. Jako kontrola byly použity buňky rodičovského kmene WT 29-13. Z grafů je patrné, že ani u jednoho klonu nedošlo k významné změně rychlosti dělení buněk a tedy, že buněčná linie NifS1 nevykazuje růstový fenotyp (obr. 1).

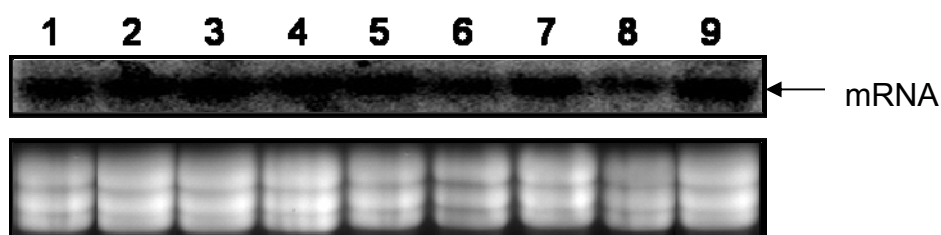
5.2. Northernová analýza

Pro northernovou analýzu byla použita RNA z neindukovaných a indukovaných buněčných kultur NifS1 a z kultury rodičovského kmene WT 29-13. Z buněk byla RNA izolována pomocí TRI-REAGENT™ (Sigma), v případě indukovaných kultur 2., 4. a 6. den po přidání tetracyklinu. 10 µg RNA z každého vzorku bylo naneseno na 1% formaldehydový agarózový gel a rozděleno při 90 V. Poté byla RNA přenesena na nylonovou membránu (Biodyne® B Membrane, 0,45 µm, Pall Gelman Laboratory) a hybridizována při teplotě 55°C s radioaktivně značenou sondou v podobě fragmentu NifS1 resp. NifS2 genu zmnoženého metodou PCR. Jako templát pro PCR posloužila celková DNA z rodičovského kmene WT 29-13.



obr. 2 Northernová analýza NifS1 se sondou proti NifS1

V dráze indukovaných buněk (2, 3, 4, 6, 7, 8) je vidět velké množství dsRNA NifS1. Slabá tvorba dsRNA v neindukovaných buňkách (1, 5) je patrně důsledkem nedokonalé kontroly T7 RNA polymerázy tetracyklinovým represorem. Po indukci je patrný úbytek mRNA, což naznačuje, že došlo k RNA interferenci. 1-4 – NifS1 klon A, 5-8 – NifS1 klon D



obr. 3 Northernová analýza NifS1 se sondou proti NifS2

Po indukci RNAi (3, 4, 5, 7, 8, 9) nedochází k tvorbě dsRNA NifS2 ani k úbytku mRNA NifS2.

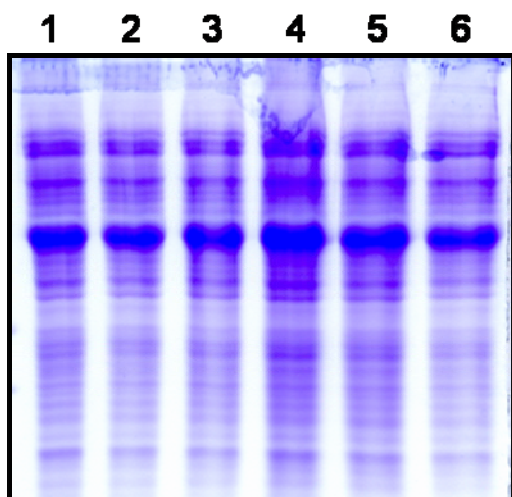
1 – WT 29-13, 2-5 – NifS1 klon A, 6-9 – NifS1 klon D

Výsledky northernové analýzy ukázaly, že v buňkách NifS1 dochází po indukci RNAi k tvorbě dsRNA NifS1 a současně k redukci mRNA NifS1 (obr. 2). Zároveň bylo

zjištěno, že indukce RNAi u NifS1 neovlivňuje expresi NifS2, poněvadž po indukci RNAi nedochází k tvorbě dsRNA NifS2 ani k úbytku mRNA NifS2 (obr. 3).

5.3. Westernová analýza

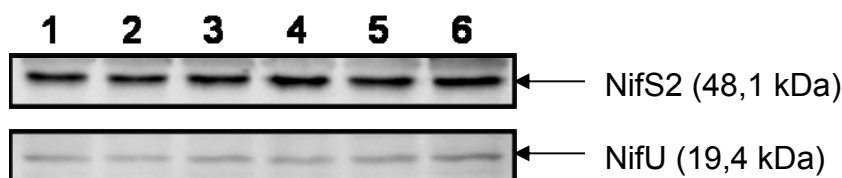
Ovlivnění hladiny NifS2 a NifU proteinu bylo sledováno westernovou analýzou. Cílem bylo zjistit, zda u buněk s eliminovaným proteinem NifS1 dochází ke změnám exprese NifS2 a NifU proteinu. Proto byly připraveny celkové lyzáty neindukovaných a indukovaných buněk NifS1 (2, 4, 6 a 8 dní po indukci RNAi) a lyzát WT 29-13. Vzorky byly rozděleny na 12% polyakrylamidovém gelu (obr. 4) a přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (BioTrace[®] NT Pure Nitrocellulose Membrane, Pall Corporation Life Sciences). Membrána byla hybridizována se specifickou polyklonální protilátkou proti NifS2 resp. NifU proteinu.



obr. 4 SDS polyakrylamidový gel – Coomassie Blue barvení

Kontrola vyváženosti nanesených vzorků

1-6 – celkové lyzáty; 1 – WT 29-13, 2 – NifS1/NI, 3 – NifS1/2I, 4 – NifS1/4I, 5 – NifS1/6I, 6 – NifS1/8I



obr. 5 Westernová analýza – ovlivnění exprese NifS2 a NifU proteinu

1-6 – celkové lyzáty; 1 – WT 29-13, 2 – NifS1/NI, 3 – NifS1/2I, 4 – NifS1/4I, 5 – NifS1/6I, 6 – NifS1/8I

Protein NifS2 má molekulovou hmotnost 48,1 kDa a jeho exprese není ovlivněna RNA interferencí NifS1. NifU je protein o molekulové hmotnosti 19,4 kDa avšak ani jeho hladina není v indukovaných buňkách NifS1 ovlivněna (obr. 5).

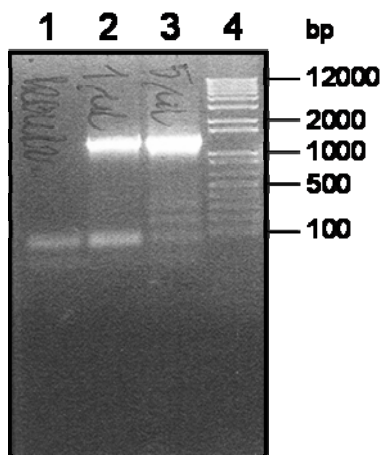
5.4. Příprava expresního vektoru pJH54/NifS1

Podle sekvence genu NifS1 (obr. 6) získané z genové banky byly navrženy primery NifS1Fw a NifS1Rv s restričními místy *Hind*III a *Xba*I (viz Materiál a metody; PCR; Použité primery), podle nichž byl pomocí PCR z celkové DNA *T. brucei* kmene WT 29-13 gen NifS1 amplifikován (obr. 7). PCR produkt byl po izolaci z gelu ligován do vektoru pGEM[®]-T Easy a následně transformován do kompetentních buněk *E. coli* DH5 α . Na základě modro-bílé (blue-white) selekce bylo vybráno několik bílých kolonií, které byly inokulovány do tekutého LB média. Z narostlých bakteriálních kultur byla získána plasmidová DNA, která byla podrobena restriční reakci (s využitím enzymů *Hind*III a *Xba*I) za účelem potvrzení přítomnosti PCR produktu ve vektoru. Po restriční reakci byly fragmenty rozděleny pomocí agaróзовé elektroforézy (obr. 8) a izolovány z gelu. Stejným způsobem byl izolován a štěpen vektor pJH54 (obr. 9), do kterého byl vyštěpený gen NifS1 překlónován. Před vlastní ligací byla provedena kontrola velikostí obou fragmentů pomocí agaróзовé elektroforézy (obr. 10). Po ligaci byl konstrukt pJH54/NifS1 transformován do kompetentních buněk *E. coli* XL1 Blue. Vektor pJH54 neobsahuje *lacZ* operon a proto nebylo možné vybírat kolonie na základě modro-bílé selekce. Jednotlivé kolonie byly vybrány na základě obohacení počtu kolonií vzhledem k negativním kontrolám (viz Materiál a metody; Ligační reakce). Přítomnost insertu NifS1 ve vektoru pJH54 byla opět ověřena restriční analýzou (s využitím enzymů *Sal*I a *Mlu*I) (obr. 11).

atgtgtagcattgagggcccgccactcaaaaaactgcgaccgcagccgctcacgcccaca 60
gaccctattcccatTTtatttggactacaatgccactacaccactctgcatggaatcttgg 120
agggccatgtcggctattgtaccatTTTtctggtggggaaccccagttcagtcctcatccatat 180
ggTTtggcggcaaaaatttTgtgctggatgaggcgagggggaaagtagcaaacgccattcgt 240
gCGgtaactcctgcgaatgTTtatttTcacttcgggtgggacggaggctaataacttagca 300
ataatcggcgggTtcacggcattgCGgggaacggTTtccaagtcgacactatataattacg 360
acaaacgTtgagcaccCCcgcttgaggaaTgttaaagTtttTggaaagagagcattcG 420
gcagTggtgaagggaggagatagacgcatgtcagTggaaaaagcaacagccaccacc 480
gtagaggtgtaccgcttccctgtcGatcctaggaccggtTgCGtgCGcaccgacgagTgG 540
cgcaaacTtctactcgaacttccgggtggcccacaaaacgTtgCactagtaacagTgatG 600
cacGCCaacaatgaaattggtggtattaatcctattgatgacctcgtgaaactTgtgaaG 660
gaaatatgtggtgaggaaacactgTttcactgatgcagcacaatctatcgggaaagTg 720
cccgtaaTgtcagCGccatgCGcgttgacatgctgtccattTgttcgcacaaattctat 780
ggcccaaagggTgtTggtgCGttatatgtcagggatggTgtgCGtatacgaatatTctc 840
tTcggagcaaatcatgaaatggtgCacgcccaggcacagagaatgtgctctTggtaaCa 900
ggTatggcggaggCGcttcatgtgGcctgcaagaacctaaccgcaaacgctgCcacaatG 960
cgcaatactcGCGacgaattatttCGggtgataaagcaagaagTttccaaggTgggtatG 1020
gattgtgtgtTgaaTggtgacatcGaccatgctcttccTaaatacattgagTgtTgcattG 1080
tTtaaagTgacagatagTggtaaGcgaagatacatttccGcccacggactcattcagGcg 1140
gtCGgtgataaggtgtgcatgtcctCGggcGcgGcctgCattctgCagaggagaacgTt 1200
gtTgttccGcctcactgCGcagcgtTggtgtgGatttggatcgtgCGgtagGcacactc 1260
cgtcttTctacaggacgaacaacaacgatggcGgaggtgCGgCGagCGgctcGcatcatt 1320
gttCGgCGggcCGtgcaaccagTtcGgtgagTtttag 1356

obr. 6 Sekvence genu NifS1 s vyznačenými místy pro NifS1Fw a NifS1Rv primery

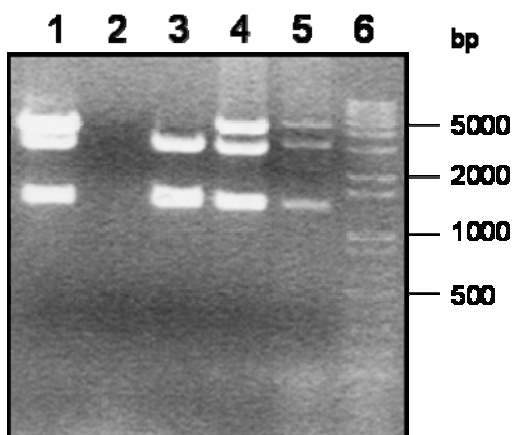
Sekvence získaná z genové banky: Tb09.211.3850, velikost genu: 1356 bp



obr. 7 PCR - Amplifikace genu NifS1

Použité primery: NifS1Fw a NifS1Rv, velikost produktu: 1365 bp

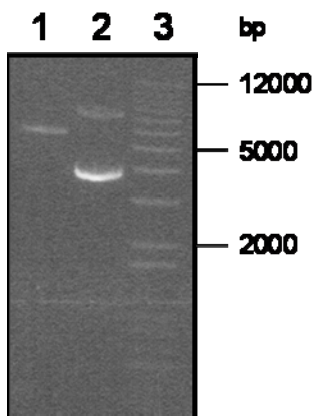
1 – negativní kontrola, 2 – NifS1, 3 – NifS1, 4 – 1 kb plus DNA ladder



obr. 8 Restrikční reakce - pGEM[®]- T Easy s insertem NifS1

Použité enzymy: *Hind*III, *Xba*I, velikost hledaného fragmentu: 1365 bp

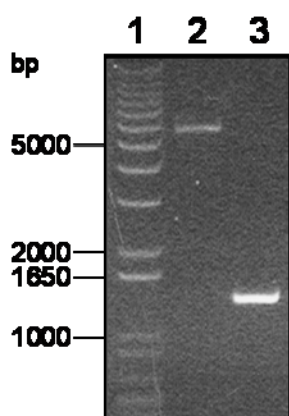
1-5 - pGEM[®]- T Easy s insertem NifS1, 6 – 1 kb plus DNA ladder



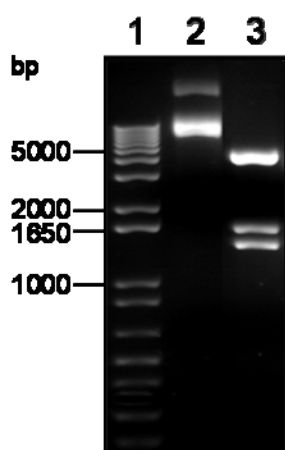
obr. 9 Restrikční reakce – kontrola štípaného plasmidu pJH54

Použité enzymy: *Hind*III, *Xba*I; velikost neštípaného plasmidu pJH54: 5764 bp

1 – štípaný plasmid, 2 – neštípaný plasmid, 3 – 1 kb plus DNA ladder



obr. 10 Kontrola fragmentu pJH54 resp. NifS1 před ligací
Velikost fragmentu pJH54: 5642 bp; velikost fragmentu NifS1: 1365 bp
1 – 1 kb plus DNA ladder, 2 – fragment pJH54, 3 – fragment NifS1

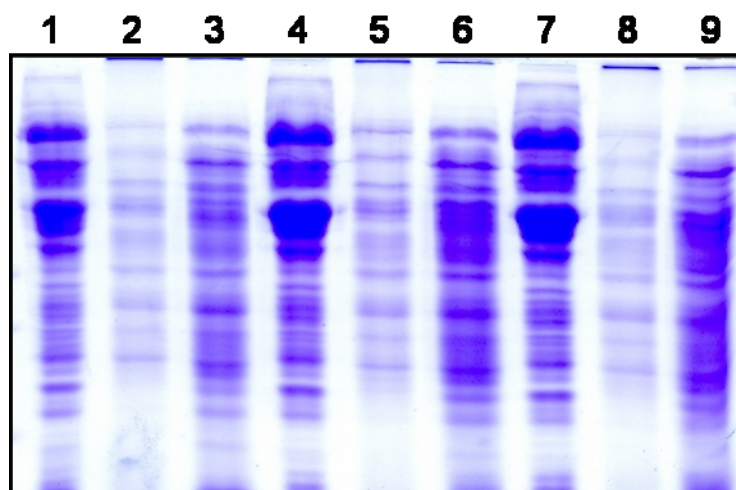


obr. 11 Restrikční reakce – pJH54 s insertem NifS1
Použité enzymy: *SalI* a *MluI*, velikost neštipaného konstrukt pJH54/NifS1: 7007 bp
1 – 1 kb plus DNA ladder, 2 – neštipaný konstrukt pJH54/NifS1, 3 – štipaný konstrukt pJH54/NifS1

5.5. Příprava transgenních linií *T. brucei*

10 µg DNA ve formě expresního vektoru pJH54 se zaklonovaným genem NifS1 bylo po linearizaci restrikční endonukleázou *NotI* elektroporováno do procyklického stádia *T. brucei* kmene WT 29-13. Po elektroporaci byly buňky přeneseny do kultivačního média SDM-79 s obsahem hygromycinu a neomycinu (G418). Po 24 hodinách byl do média přidán phleomycin, kterým byly selektovány buňky s integrovaným plasmidem. Po ustavení stabilní linie byla kultura zamražena v tekutém dusíku.

5.6. Lokalizace NifS1 metodou digitoninové frakcionace

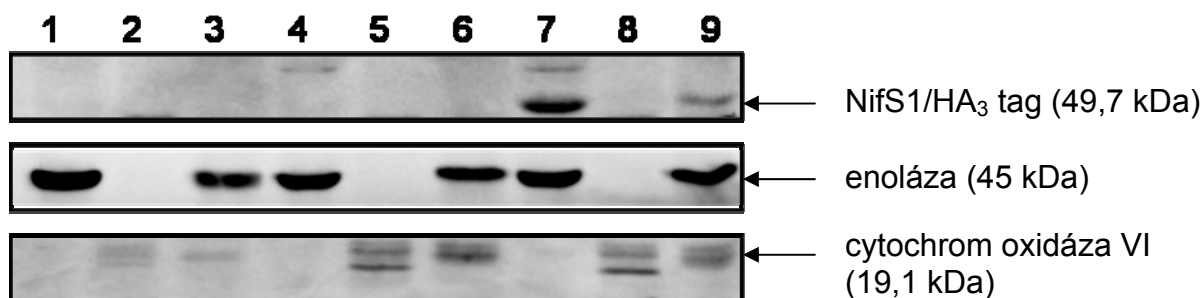


obr. 12 SDS polyakrylamidový gel – Coomassie Blue barvení

Kontrola frakcí pomocí Coomassie Blue barvení

1, 4, 7 – cytosolické frakce; 2, 5, 8 – mitochondriální frakce; 3, 6, 9 – lyzátové frakce

1-3 – WT 29-13; 4-6 – NifS1/HA₃ tag/NI; 7-9 – NifS1/HA₃ tag/3I



obr. 13 Westernová analýza – lokalizace NifS1 metodou digitoninové frakcionace

Lokalizace proteinu NifS1 v buňce a kontrola čistoty frakcí

1, 4, 7 – cytosolické frakce; 2, 5, 8 – mitochondriální frakce; 3, 6, 9 – lyzátové frakce

1-3 – WT 29-13; 4-6 – NifS1/HA₃ tag/NI; 7-9 – NifS1/HA₃ tag/3I

Pro lokalizaci proteinu NifS1 byla vytvořena buněčná linie, která obsahuje expresní vektor se zaklonovaným genem NifS1 a dále tzv. HA₃ tag, proti kterému je komerčně dostupná monoklonální protilátka.

V buňkách byla exprese NifS1 indukována přidáním tetracyklinu o výsledné koncentraci 1 µg/ml. Z indukovaných (3 dny po indukci) a neindukovaných buněk NifS1/HA₃ tag a z buněk WT 29-13 byly vytvořeny cytosolické, mitochondriální a lyzátové frakce. Ty byly získány metodou digitoninové frakcionace, kdy byl k buňkám

přidán digitonin o výsledné koncentraci 0,08 mg na 1 mg proteinů. Při této koncentraci dochází k rozrušení cytoplazmatické membrány, ale mitochondriální membrány zůstávají neporušeny. Tak lze oddělit cytosolické proteiny od mitochondriálních. Cytosolické proteiny jsou po frakcionaci detekovatelné v cytosolické frakci, mitochondriální proteiny ve frakci mitochondriální. Lyzátová frakce obsahuje oba typy proteinů.

Jednotlivé frakce byly rozděleny pomocí SDS PAGE. Jeden gel byl barven v Coomassie Blue (obr. 12), z druhého byly proteiny přeneseny na nitrocelulóзовou membránu a hybridizovány s protilátkami. S využitím zmíněné anti-HA protilátky bylo možné určit buněčnou lokalizaci proteinu NifS1. Na obr. 13 je v dráze indukovaných buněk NifS1/HA₃ tag/3I (7, 9) patrný silný signál, který odpovídá velikosti 49,7 kDa a tedy velikosti proteinu NifS1 (velikost NifS1 48,6 kDa, HA₃ tag přibližně 1,1 kDa). Vzhledem k tomu, že je tento signál detekovatelný pouze v cytosolické a lyzátové frakci, je zřejmé, že protein NifS1 je lokalizovaný v cytosolu.

Westernové hybridizace se specifickou protilátkou proti cytosolické enoláze (anti-enolase) a proti mitochondriální cytochrom oxidáze VI (anti-cox6) byly provedeny pouze za účelem kontroly frakcí.

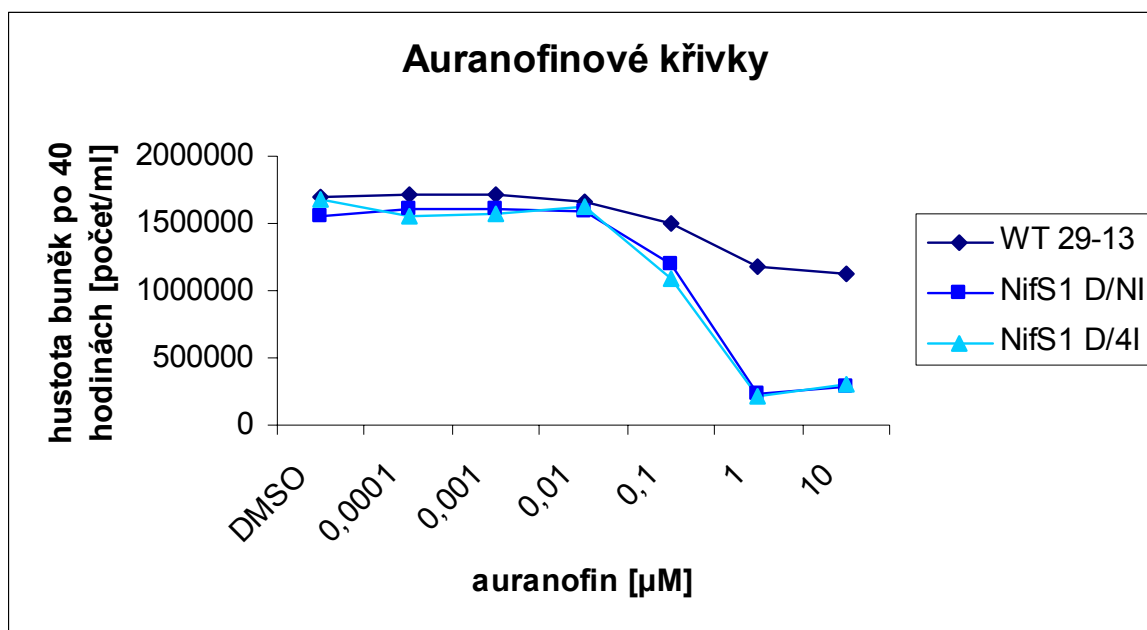
5.7. Příprava frakcí pro měření enzymových aktivit

Pro měření enzymových aktivit byly připraveny cytosolické, mitochondriální a lyzátové frakce z následujících buněčných linií:

- WT 29-13
- NifS1 buněčná linie, klon A – neindukovaná, indukovaná 4 a 8 dní
- NifS1 buněčná linie, klon D – neindukovaná, indukovaná 4 a 8 dní
- NifS2 buněčná linie, klon 6 – neindukovaná, indukovaná 4 a 8 dní

V laboratoři Dr. Piona v Koloradu budou u jednotlivých frakcí měřeny selenocystein lyázové a cystein desulfurátové aktivity.

5.8. Auranofinový pokus



obr. 14 Auranofinové křivky

Auranofin je vysoce specifický inhibitor selenoproteinů a protože NifS1 vykazuje podobnost se selenocystein lyázami, rozhodli jsme se studovat vliv tohoto inhibitoru na růst buněk s eliminovaným proteinem NifS1. K rodičovským buňkám WT 29-13, k neindukovaným a indukovaným buňkám NifS1 (4 dny po indukci) byl přidán auranofin (rozpuštěný v DMSO) o výsledných koncentracích 0,0001 μM, 0,001 μM, 0,01 μM, 0,1 μM, 1 μM a 10 μM. Jako kontroly byly použity kultury neindukovaných a indukovaných buněk NifS1 a kultura buněk WT 29-13, ke kterým bylo přidáno stejné množství DMSO bez auranofinu. Po 40 hodinách působení byla změřena hustota buněk v kultuře.

V NifS1 buňkách dochází po indukci RNAi k eliminaci proteinu NifS1. Vzhledem ke zmíněné podobnosti se selenocystein lyázami byla u indukovaných buněk očekávána vyšší citlivost k auranofinu v porovnání s neindukovanými a WT 29-13 buňkami.

Z grafu (obr. 14) je patrné, že indukované kultury NifS1 vykazují výrazné snížení počtu buněk v porovnání s WT 29-13 buňkami zejména při koncentracích 1 μM a 10 μM.

Podobné změny v počtu buněk byly zaznamenány také u neindukovaných kultur NifS1. Vysvětlením může být částečná eliminace proteinu NifS1, ke které dochází v důsledku slabé tvorby dsRNA (viz Northernová analýza, obr. 2).

Vzhledem k tomu, že byl tento pokus proveden pouze jedenkrát, bude nutné jej alespoň jednou zopakovat. Předběžný výsledek ukázal, že by NifS1 mohl u *T. brucei* plnit funkci selenocystein lyázy.

6. DISKUSE

V předkládané práci jsem se zabýval funkční analýzou NifS1 u procyklického stádia *Trypanosoma brucei*.

V první fázi projektu jsem pracoval s buněčnými liniemi NifS1 a NifS2, které připravil Mgr. Ondřej Šmíd. U obou buněčných linií bylo nejprve nutné ověřit, zda je po indukci tetracyklinem zachován mechanismus RNA interference (RNAi). Vzhledem k tomu, že má práce byla zaměřena na studium NifS1, byla dále podrobněji studována pouze tato buněčná linie.

U dvou vybraných klonů NifS1 (konkrétně A, D) byl po indukci RNAi sledován růst buněk a růstový fenotyp. Na základě získaných dat byly zkonstruovány růstové křivky, avšak ani u jednoho klonu nebyla pozorována významná změna rychlosti dělení buněk a tudíž ani růstový fenotyp. Za účelem detailnější kvantifikace bylo nutné u obou klonů provést northernovou analýzu se sondou proti NifS1. Tím bylo prokázáno, že po indukci RNAi dochází u indukovaných buněk NifS1 k tvorbě dsRNA NifS1 a současně k redukci mRNA NifS1. Slabá tvorba dsRNA v neindukovaných buňkách je patrně důsledkem nedokonalé kontroly T7 RNA polymerázy tetracyklinovým represorem.

Dalším bodem mé práce byla analýza ovlivnění hladin NifS2 a NifU u indukovaných a neindukovaných buněk NifS1. Ta byla provedena metodou westernové hybridizace se specifickou protilátkou proti NifS2 resp. NifU proteinu. Jelikož nebyl mezi indukovanými a neindukovanými buňkami zaznamenán rozdíl v expresi NifS2 a NifU a poněvadž jsou oba proteiny lokalizovány v mitochondrii (Šmíd a kol., 2006), ukázala se mitochondriální lokalizace proteinu NifS1 jako nepravděpodobná.

Pro potvrzení tohoto předpokladu, bylo nutné vytvořit buněčnou linii, která obsahuje expresní vektor se zaklonovaným genem NifS1 a tzv. HA₃ tag, proti kterému je komerčně dostupná monoklonální protilátka. Tento postup je alternativou k přípravě specifické protilátky, je však časově i technicky méně náročný.

Původním úmyslem bylo lokalizovat exprimovaný protein NifS1 přímo v buňce metodou imunolokalizace. Když po několikerém zopakování nebyl získán interpretovatelný výsledek, rozhodli jsme se pro přístup sice náročnější, ale efektivnější. Pro lokalizaci NifS1 jsme použili metodu digitoninové frakcionace, která umožňuje oddělit cytosolické proteiny od mitochondriálních (Schulz, 1990). Náročnost této metody spočívá především v přesnosti určování koncentrace proteinů. I sebemenší odchylka v množství přidávaného digitoninu může vést k porušení mitochondriálních membrán a tím kontaminaci cytosolické frakce mitochondriálními proteiny.

Touto metodou jsem zjistil, že je protein NifS1 lokalizován v cytosolu.

Vzhledem k tomu, že gen NifS1 vykazuje podobnost se selenocystein lyázami, byly z indukovaných a neindukovaných buněk NifS1 připraveny cytosolické, mitochondriální a lyzátové frakce, u kterých bude ve spolupráci s laboratoří Dr. Piona v Koloradu změřena selenocystein lyázová a cystein desulfurázová aktivita. Na základě lokalizačního pokusu NifS1 očekáváme pokles selenocystein lyázové aktivity u cytosolických frakcí z indukovaných buněk NifS1.

Společně s frakcemi NifS1 byly připraveny cytosolické, mitochondriální a lyzátové frakce z indukovaných a neindukovaných buněk NifS2. NifS2 je cystein desulfuráza, která je lokalizována v mitochondrii (Šmíd a kol., 2006). Proto očekáváme snížení cystein desulfurázové aktivity u mitochondriálních frakcí z indukovaných buněk NifS2.

Jedním z posledních, ale neméně důležitých pokusů, byl pokus s auranofinem. Auranofin patří mezi vysoce specifické inhibitory selenoproteinů (Gromer a kol., 1998; Alger a Williams, 2002) a protože NifS1 vykazuje podobnost se selenocystein lyázami, byla u indukovaných buněk NifS1 očekávána vyšší senzitivita k auranofinu v porovnání s WT 29-13 buňkami.

Předběžný výsledek ukázal, že by NifS1 u *T. brucei* mohl plnit funkci selenocystein lyázy.

7. ZÁVĚR

Byla charakterizována NifS1 buněčná linie procyklického stádia *T. brucei*, u které byl s využitím RNAi eliminován protein NifS1. Analýzou růstového fenotypu bylo zjištěno, že protein NifS1 není pro procyklická stádia esenciální. Prostřednictvím northernové analýzy byla potvrzena funkčnost RNAi. U buněk s eliminovaným proteinem NifS1 nebyly pozorovány změny v expresi NifS2 a NifU proteinu.

Byla připravena transgenní linie *T. brucei* obsahující expresní vektor s HA₃ tagem a genem NifS1. Metodou digitoninové frakcionace byly získány buněčné frakce (cytosolická, mitochondriální a lyzátová) a s využitím monoklonální protilátky proti HA₃ tagu určena lokalizace proteinu NifS1 v cytosolu.

Byly připraveny frakce z NifS1 a NifS2 buněčných linií procyklických stádií *T. brucei*, u kterých budou měřeny selenocystein lyázové a cystein desulfurázové aktivity.

Byl studován vliv auranofinu na růst buněk s eliminovaným proteinem NifS1. Na základě předběžného výsledku byl NifS1 u *T. brucei* označen za selenocystein lyázu.

8. SEZNAM LITERATURY

Allemann N. and Schneider A. (2000) ATP production in isolated mitochondria of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 87-94

Alger H. M. and Williams D. L. (2002), The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 129-139

Bakker B. M., 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

Beinert H., Holm R. H. and Münck E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277, 653-659

Bernstein E., Denli A. M. and Hannon G. J. (2001) The rest of silence. *RNA* 7, 1509-1521

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254

Brun R. and Schönenberger M. (1979) Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. *Acta Trop.* 36, 289-292

Chocat P., Esaki N., Tanizawa K., Nakamura K., Tanaka H. and Soda K. (1985) Purification and characterization of selenocysteine β -lyase from *Citrobacter freundii*. *J. Bacteriol.* 163, 669-676

Elbashir S. M., Lendeckel W. and Tuschl T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200

Esaki N., Nakamura T., Tanaka H. and Soda K. (1982) Selenocysteine lyase, a novel enzyme that specifically acts on selenocysteine. Mammalian distribution and purification and properties of pig liver enzyme. *J. Biol. Chem.* 257, 4386-4391

Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811

Forchhammer K. and Böck A. (1991) Selenocysteine synthase from *Escherichia coli*. Analysis of the reaction sequence. *J. Biol. Chem.* 266: 6324-6328

Gerber J. and Lill R. (2002) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. *Mitochondrion* 2, 71-86

Gromer S., Arscott L. D., Williams C. H. (Jr), Schirmer R. H. and Becker K. (1998) Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme steady state kinetics and inhibition by therapeutic gold compounds. *J. Biol. Chem.* 273, 20096-20101

Hutvagner G. and Zamore P. D. (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060

Lacourciere G. M. and Stadtman T. C. (1998), The NIFS protein can function as a selenide delivery protein in the biosynthesis of selenophosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 30921-30926

Lill R. and Mühlenhoff U. (2005) Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes, *Trends Biochem. Sci.* 30, 133-141

Lobanov A. V., Gromer S., Salinas G. and Gladyshev V. N. (2006) Selenium metabolism in *Trypanosoma*: characterization of selenoproteomes and identification of a Kinetoplastida-specific selenoprotein. *Nucleic Acids Res.* 34, 4012-4024

Low S. C. and Berry M. J. (1996) Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends. Biochem. Sci.* 21, 203-208

Lukeš J., Hashimi H. and Zíková A. (2005) Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates, *Curr Genet* 48, 277-299

Mühlenhoff U. and Lill R. (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 370-382

Nakai Y., Nakai M., Hayashi H. and Kagamiyama H. (2001) Nuclear localization of yeast Nfs1p is required for cell survival. *J. Biol. Chem.* 276, 8314-8320

Neuhierl B. and Böck A. (1996) On the mechanism of selenium tolerance in selenium-accumulating plants. Purification and characterization of a specific selenocysteine methyltransferase from cultured cells of *Astragalus bisculatus*. *Eur. J. Biochem.* 239: 235-238

Ngô H., Tschudi C., Gull K. and Ullu E. (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14687–14692

Pilon M., Owen J. D., Garifullina G. F., Kurihara T., Mihara H., Esaki N. and Pilon-Smits E. A. (2003) Enhanced selenium tolerance and accumulation in transgenic *Arabidopsis* expressing a mouse selenocysteine lyase. *Plant Physiol.* 131, 1250-1257

Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning a laboratory manual – second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA

Schulz I. (1990) Permeabilizing cells: some methods and applications for the study of intracellular processes. *Methods Enzymol.* 192, 280-300

Schwartz C. J., Djaman O., Imlay J. A. and Kiley P. J. (2000) The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in *in vivo* Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9009-9014

Stadtman T. C. (1990) Selenium biochemistry. *Science* 183, 915-922

Stadtman T. C. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 83-100

Šmíd O., Horáková E., Vilímová V., Hrdý I., Cammack R., Horváth A., Lukeš J. and Tachezy J. (2006) Knock-downs of iron-sulfur cluster assembly proteins IscS and IscU down-regulate the active mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 281, 28679-28686

Tabara H., Sarkissian M., Kelly W. G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L., Fire A. and Melo C. C. (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123-132

Takahashi Y. and Tokumoto U. (2002) A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* 277, 28380-28383

Tujebajeva R. M., Copeland P. R., Xu X. M., Carlson B. A., Harney J. W., Driscoll D. M., Hatfield D. L. and Berry M. J. (2000) Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep.* 1, 158-163

Veres Z., Kim I. Y., Scholz T. D. and Stadtman T. C. (1994) Selenophosphate synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction. *J. Biol. Chem.* 269, 10597-10603

Wang Z., Morris J. C., Drew M. E. and Englund P. T. (2000) Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J. Biol. Chem.* 275, 40174-40179

Wickstead B., Ersfeld K. and Gull K. (2002) Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125, 211-216

Wirtz E., Leal S., Ochatt C. and Cross G. A. (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99, 89-101

Zheng L., Cash V. L., Flint D. H. and Dean D. R. (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273, 13264-13272