

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra molekulární biologie a biochemie



Bakalářská práce

**Zkoumání funkce a stavby nového  
mitochondriálního komplexu MRB1 u  
*Trypanosoma brucei***

**Lucie Novotná**

**Vedoucí práce: Mgr. Mir Mohamod Hassan Hashimi**

Parazitologický ústav AV ČR  
Laboratoř molekulární parazitologie

**České Budějovice, 2008**

Novotná, L., 2008 Zkoumání funkce a stavby nového mitochondriálního komplexu MRB1 u *Trypanosoma brucei*. (Investigation of function and composition of the novel mitochondrial complex MRB1 in *Trypanosoma brucei*. Bc. Thesis in Czech.) – 43 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

The aim of my study was to produce monoclonal antibodies against “zahada”<sup>1</sup> and 2 proteins, which are subunits of a novel mitochondrial RNA binding complex 1 (MRB1 complex). To further determine the structural composition of the MRB1 complex, glycerol gradients of purified mitochondria were performed using antibodies against some of the proteins from this complex. In addition, growth curves and Northern analyses were performed, showing that both zahada proteins are essential for *T. brucei*.

Tato práce byla podpořena grantem SGA2007/02 z Přírodovědecké fakulty, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Prohlašuji, že předkládanou bakalářskou práci jsem vypracovala sama pouze s použitím přiložené 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

České Budějovice, 22. března 2008

.....  
Lucie Novotná

## **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala Milanovi a Hassanovi za vedení, naučení základních technik a pomoc při vypracování práce. Také děkuji vedoucímu naší laboratoře Juliu Lukešovi, za možnost pracovat v laboratoři molekulární biologie, za cenné rady a ochotu. Mé díky patří i celému kolektivu - Zdeňce, oběma Zdeňkům, Jirkovi, Piyovi, Evě, Zuzce, Pavlovi, Petrovi, Janě a Lence za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Samozřejmě děkuji celé rodině za podporu, lásku a porozumění.

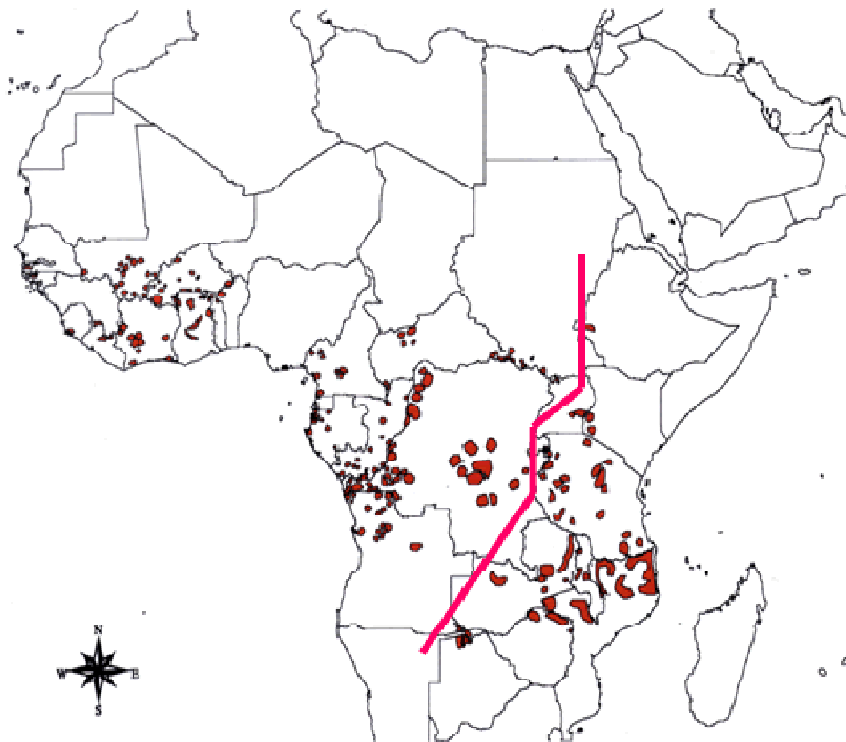
# Obsah

<b>1. Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2. Materiál a cíl práce</b>	<b>6</b>
<b>3. Metody</b>	<b>7</b>
3.1 Příprava protilátek pro proteiny záhada 1 a záhada 2	7
3.1.1 Navrhování PCR primerů	7
3.1.2 PCR reakce, klonování do pET 100 a transformace do buněk E.coli DH5 $\alpha$	7
3.1.3 Izolace plazmidové DNA	9
3.1.4 Restrikční reakce	9
3.1.5 Sekvence	9
3.1.6 Transformace do buněk BL21 Star	10
3.1.7 Overexprese	10
3.1.8 Zkouška rozpustnosti	10
3.1.9 Westernová analýza	11
3.1.10 Nadprodukce ve velkém objemu	13
3.1.11 purifikace proteinů za denaturačních podmínek	13
3.2 Příprava RNAi	14
3.2.1 Navržení primerů a PCR reakce	14
3.2.2 Klonování do plazmidu PCR II – TOPO	15
3.2.3 Izolace z gelu	16
3.2.4 Ligace do plazmidu p2T7-177	16
3.2.5 Izolace plazmidové DNA metodou midiprep, restrikční reakce	17
3.2.6 Linearizace a přesrážení plazmidu	17
3.2.7 Stanovení počtu buněk <i>T. brucei</i> v kultuře	18
3.2.8 Elektroporace	18
3.2.9 Northernová analýza	18
3.2.10 Růstová křivka	21
3.3 Glycerolový gradient	22

3.3.1 Izolace mitochondrií	22
3.3.2 Glycerolový gradient	23
<b>4. Výsledky</b>	<b>25</b>
4.1 Klonování záhady 1 a záhady 2 do vektoru pET 100	25
4.2 Exprese proteinů	26
4.3 Purifikace	28
4.4 Testování polyklonálních protilátek	29
4.5 Příprava konstruktů p2T7-177 pro RNAi	30
4.6 Příprava klonů T. brucei	31
4.7 Northernová analýza	32
4.8 Růstová křivka	33
4.9 Glycerolový gradient	34
<b>5. Diskuze a závěr</b>	<b>38</b>
<b>6. Použitá literatura</b>	<b>41</b>

# 1. Úvod

*Trypanozoma brucei* je parazitický bičíkovec řádu Kinetoplastida, který způsobuje africkou spavou nemoc u lidí a zvířat. Rozeznáváme 3 poddruhy *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* a *T. b. rhodesiense*. *T. b. brucei* způsobuje spavou nemoc u skotu nazývanou nagana. *T. b. gambiense* působí chronické onemocnění v západní a centrální Africe a je zodpovědná více než 90% onemocnění. Člověk může být infikován několik měsíců nebo dokonce let bez znatelných symptomů, avšak důsledky neléčené spavé nemoci jsou prakticky vždy smrtelné. Méně než 10% onemocnění tvoří *T. b. rhodesiense* vyskytující se ve východní a severní Africe (Obr. 1.1). Způsobuje akutní formu infekce s inkubační dobou několika týdnů až měsíců.

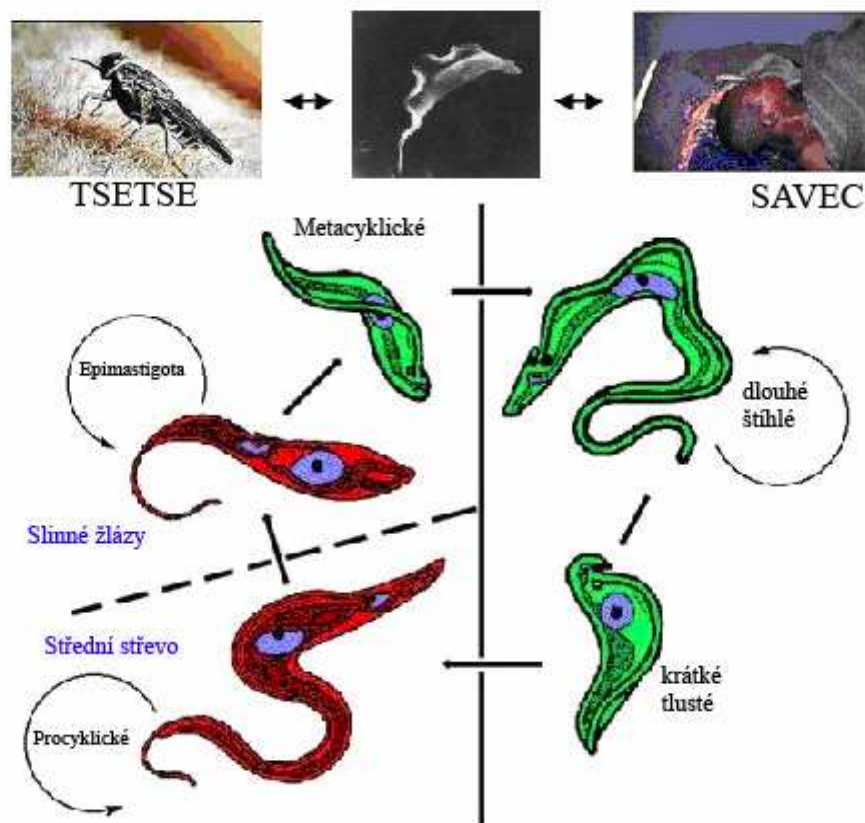


Obr. 1.1 Na pravo od červené linie je rozšířena *T. b. rhodesiense* a na levo *T. b. gambiense*.

*T. brucei* je endemitem v 36 afrických zemích (Barrett et al., 2003).

*T. brucei* má zajímavý životní cyklus, při němž střídá dvě velmi odlišná prostředí. Mezihostitele představují savci, mezi nimiž je parazit přenesen bezobratlým hostitelem – mouchou tsetse. V savcích se trypanosomy vyskytují převážně v krvi ale i lymfě nebo mozkomíšním moku a v naprosté většině se jedná o protáhlé buňky označované jako krevní stádium (KS). Zároveň zde najdeme v malém množství buňky krátké a tlusté, které jsou připravené na nasátí vektorem, z jehož gastrointestinálního traktu (procyklické stádium) se dostávají do slinných žláz a tak mohou být opět přeneseni při sání do savce (Obr.1.2).

Trypanosomy představují časnou větev eukaryotického stromu a patrně z tohoto důvodu jsou jejich buňky obdařeny celou řadou zvláštních mechanismů. V další části úvodu se zaměřím pouze na ty, které jsou relevantní pro tuto práci, tj. kinetoplastovou DNA a editování RNA.



Obr. 1.2 životní cyklus *T. brucei* v savci a mouše tsetse

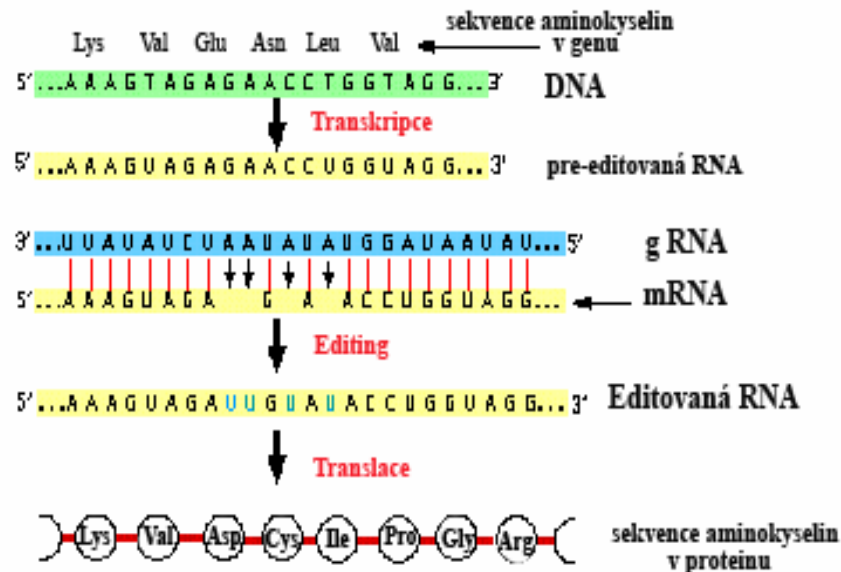
Buňka *T. brucei* obsahuje pouze jedinou protáhlou mitochondrii, jejíž DNA je nazývána kinetoplastová (kDNA). kDNA je obrovská síť tvořena dvěma typy kruhových molekul – maxikroužků a minikroužků (Lukeš et al., 2002). Velikost maxikroužků se pohybuje mezi 20 – 40 kb a v mitochondrii se vyskytují pouze v několika desítkách identických kopiích, zatímco minikroužků je v buňce několik tisíc kopií o velikosti 0,5 – 10 kb (Yurchenko et al., 1999). Obě složky se významně liší svou funkcí. Maxikroužky obsahují mitochondriální geny kódující některé proteiny dýchacího řetězce a ribosomální 9S a 12S (Benne, 1986). Jedinou známou funkcí minikroužků je kódování guide RNA (gRNA), které nesou informaci pro editování transkriptů maxikroužkových genů. Minikroužky jsou formou katenace spojeny do obrovské sítě, která má tvar disku a je uložena poblíž kinetosomu bičíku (Shlomai, 1994). Molekuly maxikroužků jsou také katenovány do sítě, která je uvnitř sítě minikroužků. Obě formy molekul se v síti nacházejí v rozvolněné formě, což je pro kruhové molekuly, vyskytující se v přírodě naprosto ojedinělá vlastnost. Z toho plyne, že tyto bičíkovci vyměnily vlastnost superspiralizace za výhody, které jim poskytuje provázání ve formě kDNA (Rauch et al., 1993; Liu et al., 2005).

Editováním RNA označujeme mechanismus masivní posttranskripční modifikace, kdy se vkládáním nebo odebráním uridinů (U) tvoří zralá mRNA. Při tomto procesu dochází ke změně čtecího rámce, čímž je rozšířeno tzv. centrální dogma molekulární biologie (sekvence DNA je přesně přepsána do RNA). Informace pro tyto změny pochází z gRNA, což jsou malé molekuly RNA o velikosti asi 30 nukleotidů. Na 5' konci obsahují gRNA oblast komplementární k sekvenci pre-mRNA pomocí níž tvoří hybrid, který je stabilizován pomocí polyU konce na 3' konci gRNA (Blum a Simpson, 1990).

Editování RNA probíhá v komplexu proteinů označovaném jako „editozom“. Editozom (Stuart et al., 2005) neboli také L-komplex (Simpson et al., 2004) má velikost asi 1,6 MDa a v glycerolévém gradientu sedimentuje při 20S (Corell et al., 1996). Tento komplex je tvořen asi 20 proteiny, z nichž nejdůležitější co do enzymatických aktivit je endonukleáza, terminální U transferáza (TUTáza) a 3'-U-exonukleáza (ExoUáza), RNA ligáza a RNA helikáza (Stuart et al., 2005, Ernst et al., 2003; Trotter et al., 2005; Carnes et al., 2005). Funkce dalších proteinů je buď neznámá nebo hrají strukturální roli (Lukeš et al., 2005).



V místě hybridu mezi gRNA a pre-mRNA, endonukleáza pre-mRNA nejprve rozštěpí. Pokud mají být nukleotidy dodány, TUTáza od 3' konce U nukleotidy v množství specifikovaném gRNA přidává zatímco exonukleáza je zase v potřebném množství ze sekvence pre-mRNA vyštěpí. Ligáza fragmenty opět spojí dohromady (Obr. 1.3) (Stuart et al., 2005).



Obr. 1.3 schéma editování RNA

Editování RNA je potřebné pro přežití parazita především v mouše tsetse, protože v aktivní mitochondrii tohoto stádia je potřebná řada proteinů syntetizovaných z editovaných mRNA. Tyto proteiny zahrnují například některé nezbytné části podjednotek komplexů dýchacího řetězce, konkrétně podjednotky respiračních komplexů I, III, IV a V. Všechny mitochondriální mRNA až na Cox 1, ND1, 4 a 5 jsou editovány (Arts a Benne, 1996).

Cílem mé práce bylo přispět k poznání proteinového komplexu označovaného nyní jako mitochondriální RNA vazebný komplex MRB1 (Hashimi et al., 2008). Jeho prominentní součástí je protein TbRGG1, který se vyskytuje v procyklickém i krevním stádiu *T. brucei*. Je řazen mezi proteiny spřažené s editováním RNA, jelikož jeho

„vypnutí“ metodou interference RNA (RNAi), způsobí zastavení editování. Jeho velikost je 85 kDa a v glycerolovém gradientu sedimentuje v oblasti 35 - 40S.

Ukázali jsme, že se na protein TbRGG1 váží nejméně dva další proteiny, které jsme nazvali záhada 1 a záhada 2. „záhady“ jsou si asi z 30% sekvenčně podobné a jejich funkce je neznámá. Později byly pomocí TAP-tag analýzy (tandem afinity purification) TbRGG1 i obou záhad objeveny další proteiny, které pravděpodobně tvoří výše popsany komplex MRB1.

## 2. Materiál a cíle práce

- V této práci byly použity dříve zmíněné proteiny záhada 1 a záhada 2 a cílem bylo vytvořit proti nim myší a králičí protilátky
- V dalších fázích byly vybrány některé geny kódující podjednotky (Tab. 2.1) komplexu MRB1 s cílem vypnout je v procyklickém stádiu *T. brucei* a po vypnutí analyzovat vzniklý fenotyp
- Na základě růstových křivek byly vybrány geny pro helikázu a hydrolázu pro analýzu glycerolových gradientů. Touto metodou byly také analyzovány proteiny obou záhad

Systematické jméno proteinu	pracovní název
Tb927.2.3800	záhada 1 (zah1)
Tb927.7.2570	záhada 2 (zah2)
Tb927.3.1820	
Tb927.5.3010	
Tb927.6.2230	
Tb10.61.1820, Tb10.61.1830	
Tb927.6.2140	
Tb10.406.0050	TbRGGm
Tb11.01.8620	Ankarin
Tb927.4.1500	helikáza (hel)
Tb927.4.4600	
Tb927.2.2510, Tb927.2.2520	Tbporin
Tb927.7.210	
Tb927.8.8170	Zinc finger 100 (ZF100)
Tb927.4.4160	Zinc finger 102 (ZF102)
Tb927.3.1590	
Tb927.3.4030	
Tb11.01.7290	hydroláza (hyd)

Mnou vypínané geny
Součástí magisterské práce Zdeňky Čičové
Zpracováváno jinou laboratoří

### 3. Metody

#### 3.1 příprava protilátek pro proteiny záhada 1 a záhada 2

##### 3.1.1 navrhování PCR primerů

Pro zmnožení celých genů metodou PCR byly navrženy primery (Tab. 3.1.1) podle návodu výrobce (Champion<sup>™</sup> pET 100 Directional TOPO Expression Kits Invitrogen).

	záhada 1
Fw	<b>CACCGTATGGGGCTTATGGAA</b>
Rev	CTAGTATGCCGAAACGGC
	záhada 2
Fw	<b>CACCCAGAATCAGGGCAGTGT</b>
Rev	TTACAACCTTCGCCTCAC

Tab. 3.1.1 primery navržené pro amplifikaci genů zah1 a zah2.

##### 3.1.2 PCR reakce, klonování do pET 100 a transformace do buněk *E. coli* - DH5 $\alpha$

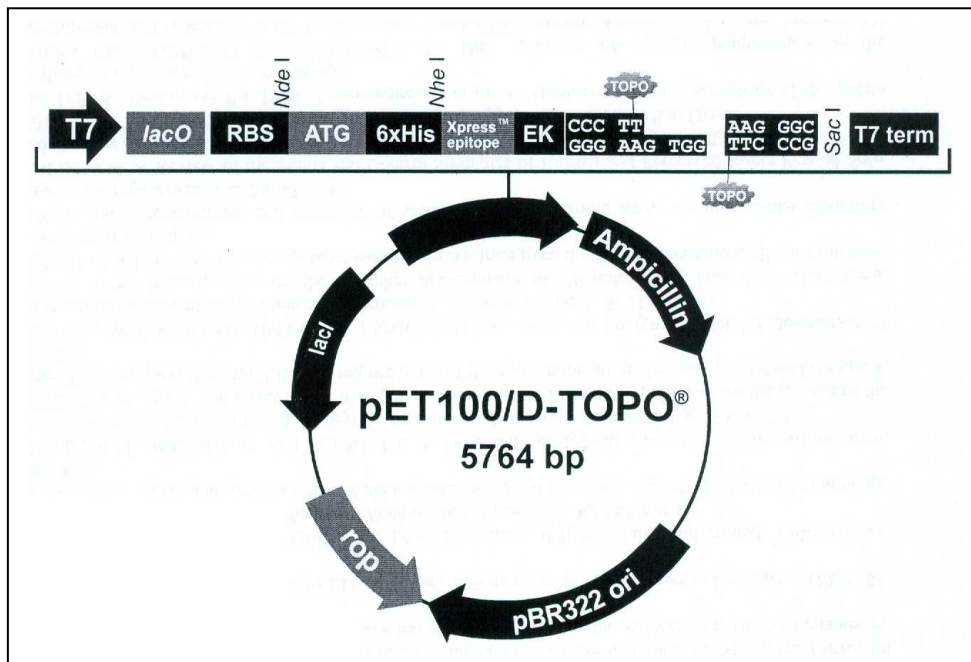
PCR reakce

Program:

1. denaturace	96 °C 5 minut	} 25x
2. dematurace	94 °C 1 minuta	
3. nasedání primerů	50 °C 1 minuta	
4. polymerace	72 °C 1,5 minut	
6. polymerace	72 °C 10 minut	
7. držet při 4 °C		

Kolonování probíhá podle Champion<sup>™</sup> pET 100 Directional TOPO Expression Kits (Invitrogen)

pET 100 vektor obsahuje 6x histidin (His) sekvenci (Obr. 3.1.1)



Obr. 3.1.1 Mapa vektoru pET 100 (Invitrogen)

Transformace do buněk *E. coli* DH5 $\alpha$

- smícháme plazmid a PCR produkt v poměru 1:5 a necháme 20 min na ledu
- směs přidáme k 50  $\mu$ l buněk DH5 $\alpha$  a necháme 20 min na ledu
- teplotní šok (40 sec při 42  $^{\circ}$ C) + 150  $\mu$ l SOC
- třepeme 45 min - 1 hod v 37  $^{\circ}$ C
- rozetřeme na misku a necháme růst 8 - 12 hod v 37  $^{\circ}$ C

SOC médium 2% tryton

0,5% kvasnicový extrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM MgSO<sub>4</sub>

20 mM glukóza

### 3.1.3 Izolace plazmidové DNA

- Narostlou kolonii přeneseme do 3 ml LB média s ampicylinem 1 µg/ml
- Rosteme 8 hod v třepačce při 37 °C
- Izolujeme podle QIAprep Spin Miniprep Kit QAIGEN

LB médium      1% trypton  
                         1% NaCl  
                         0,5% kvasnicový extrakt

### 3.1.4 Restrikční reakce

- Pro štípání používáme restrikční endonukleázy BamH I a XhoI - 0,2 µl (New England BioLab)
- 10 x pufr 1 µl (New England BioLab)
- miliQ H<sub>2</sub>O (do celkového objemu 10 µl)
- Ověříme na agarózovém gelu

DNA agarózový gel 100 ml 0,75%

- 0,75 g agarózy + 100 ml TAE (rozvaříme v mikrovlnné troubě)
- Po schlazení přidáme 1,5 µl ethidium – bromidu 5 mg/ml
- Elektroforéza při 50 – 90 V

TAE	Tris-base	242 g
	Ledová kyselina octová	57,1 ml
	0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
	Doplnit destilovanou vodou do 1 l	

### 3.1.5 Sekvenace

- Sekvenujeme s použitím primerů T7 Rev a M13 Fw, prostřednictvím firmy Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com))

### 3.1.6 Transformace do buněk BL21 Star

- 100x zředěnou sekvenováním ověřenou plazmidovou DNA (miniprep) smícháme s 50  $\mu$ l buněk BL21 Star<sup>TM</sup> – DE3 (Invitrogen) a necháme 20 min na ledu
- teplotní šok (40 sec při 42  $^{\circ}$ C) + 150  $\mu$ l SOC
- třepeme 45 min - 1 hod v 37  $^{\circ}$ C
- inokulum rozetřeme na misku a necháme růst 8 - 12 hod v 37  $^{\circ}$ C

### 3.1.7 Overexprese

Pilotní pokus

- kulturu buněk BL21 – DE3 s transformovaným inzertem necháme růst v třepačce v tekutém LB médiu 37  $^{\circ}$ C přes noc
- změříme OD 600 (optická hustota při 600 nm), kulturu zředíme na OD asi 0,4 – 0,5 a necháme růst v třepačce v 37  $^{\circ}$ C než dosáhne OD 0,6 – 0,8
- kulturu rozdělíme na poloviny, 1/2 indukujeme (IPTG+) do výsledné koncentrace 1mM, druhou necháme jako kontrolu (IPTG-) a rosteme 6 hod při 37  $^{\circ}$ C
- 6 hod po indukci odebíráme 1 ml z obou kultur a v čase 6 hod po indukci odebereme 2ml kultury IPTG+ pro westernovou analýzu a zjištění rozpustnosti proteinů
- odebrané vzorky stočíme při 16100 g, zamrazíme v tekutém dusíku a skladujeme v -80  $^{\circ}$ C

### 3.1.8 Zkouška rozpustnosti

Kombinace protokolů Invitrogen pET a Qiagen

- Sediment z 2ml kultury z -80  $^{\circ}$ C rozpustíme ve 2 ml lyzačního pufru
- Přidáme lysozym do výsledné koncentrace 1mg/ml a inkubujeme 30 min na ledu
- 3x zamrazíme v tekutém N<sub>2</sub> a rozmrazíme ve 42  $^{\circ}$ C
- Stočíme 20 min ve 4  $^{\circ}$ C při 16100 g

- Supernatant vysušíme na odpovídající objem, tak abychom dosáhli koncentrace  $1 \times 10^6$  buněk/ml
- Sediment resuspendujeme v 500  $\mu$ l lyzačním pufru a přidáme Triton-X do výsledné koncentrace 0,25%
- Inkubujeme na ledu 30 min
- Stočíme 20 minut 4  $^{\circ}$ C 16100 g
- Objem supernatantu upravíme tak, abychom dosáhli koncentrace ( $1 \times 10^6$  buněk/ml)
- Sediment rozpustíme v 2x PBS (16 g NaCl, 0,4 g KCl, 2,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,48 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , doplnit miliQ  $\text{H}_2\text{O}$  na 800 ml, upravíme pH na 7,4 a doplníme do 1 l.) ( a 2xSB – vzorkový pufr (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, glycerol, 10% 2-merkaptoetanol, 0,004% bromfenolová modř), abychom opět dosáhli stejné koncentrace buněk ( $1 \times 10^6$  buněk/ml)

#### Nativní lyzační pufr

50 mM pufr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

400 mM NaCl

100 mM KCl

10% glycerol

0,5% Triton-X

10 mM imidazol

Pomocí HCl upravíme pH na 7,8

### 3.1.9 Westernová analýza

#### Akrylamidový gel

12% gel 3,3 ml  $\text{H}_2\text{O}$

4 ml akrylamid

2,5 ml 1,5M Tris HCl pH = 8,0

100  $\mu$ l SDS

100  $\mu$ l 10% APS

4  $\mu$ l TEMED





## Vyvolání filmu

- Membránu vizualizujeme PIERCE ECL Blotting Substrate (PERBIO), necháme 2 min působit, osušíme, zabalíme do fólie a založíme do kazety s filmem BioMax film (Kodak) po dobu 30 sec nebo déle podle intenzity signálu
- Po vyvolání necháme film oschnout a popíšeme podle membrány

### 3.1.10 Nadprodukce ve velkém objemu

- Postup je stejný jako u pilotního pokusu, ale probíhá v objemu 1l
- Stočený sediment, zamrazíme v tekutém dusíku a uschováme do -80 °C

### 3.1.11 Purifikace proteinů za denaturačních podmínek

- Pelet z -80 °C rozpustíme v pufru B (na 1 g mokré váhy sedimentu – 10 ml pufru)
- Inkubujeme 1 hod v pokojové teplotě
- Připravíme si kolonu s chromatografickým sorbentem Ni-NTA, přidáme vzorek a promícháváme 1 hod v pokojové teplotě a necháme protéct
- Promyjeme kolonu
  - 2x 4 ml pufrém C
  - 2x 0,5 ml pufrém D
  - 4x 0,5 ml pufrém E
- Všechny frakce schováme pro analýzu na SDS-PAGE gelu

## Příprava roztoků

1,25 x Pufr A: 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O  
10 mM Tris  
8 M urea  
20 mM Imidazol  
1% Triton-X

Pufr B: 80 ml pufru A upravíme pH = 8,0 a doplníme vodou do 100 ml

Pufr C: 80 ml pufru A upravíme pH = 6,3 a doplníme vodou do 100 ml

Pufr D: 80 ml pufru A upravíme pH = 5,9 a doplníme vodou do 100 ml

Pufr E: 80 ml pufru A upravíme pH = 4,5 a doplníme vodou do 100 ml

## 3.2 Příprava RNAi

### 3.2.1 Navržení primerů a PCR reakce

Na 5' konce Fw primeru přidáme sekvenci pro restriční endonukleázu BamH I a pro Rev primer sekvenci pro enzym Xho I. V případě genu Tb927.4.4160 (ZF100), který obsahuje interní Xho I místo, byl v primeru použita sekvence pro enzym Hind III (Tab. 3.2.1).

	Tb.927.2.2510, Tb.927.2.2510 (Tbporin)
Fw	<b>GGATCC</b> AAAACGTTGGAAGTTGGTGC
Rev	<b>CTCGAG</b> ACCGGGTTTGAGGCTCTTAT
	Tb927.8.8170 (Zinc finger 102) (ZF 102)
Fw	<b>GGATCC</b> TTTGTTCGAAAGACACGCTG
Rev	<b>CTCGAG</b> ATGCCGAGAATAACCGTGAG
	Tb927.4.4160 (Zinc finger 100) (ZF 100)
Fw	<b>GGATCC</b> CCTCCCGTTCTACTGCTGAG
Rev	<b>AAGCTT</b> AGCAGTTGCATGAAGTGACG
	Tb927.4.4600
Fw	<b>GGATCC</b> CGACAGTTTCTTGCCACTCA
Rev	<b>CTCGAG</b> TGGATTTTCATCCTCCTCCTG

Tab. 3.2.1 primery pro PCR reakci genů MRB komplexu. Zvýrazněná místa ukazují přidané sekvence restričních enzymů BamH I pro Fw primer a Xho I pro Rev primer. Pro ZF100 je k Rev primeru přidána sekvence enzymu Hind III.

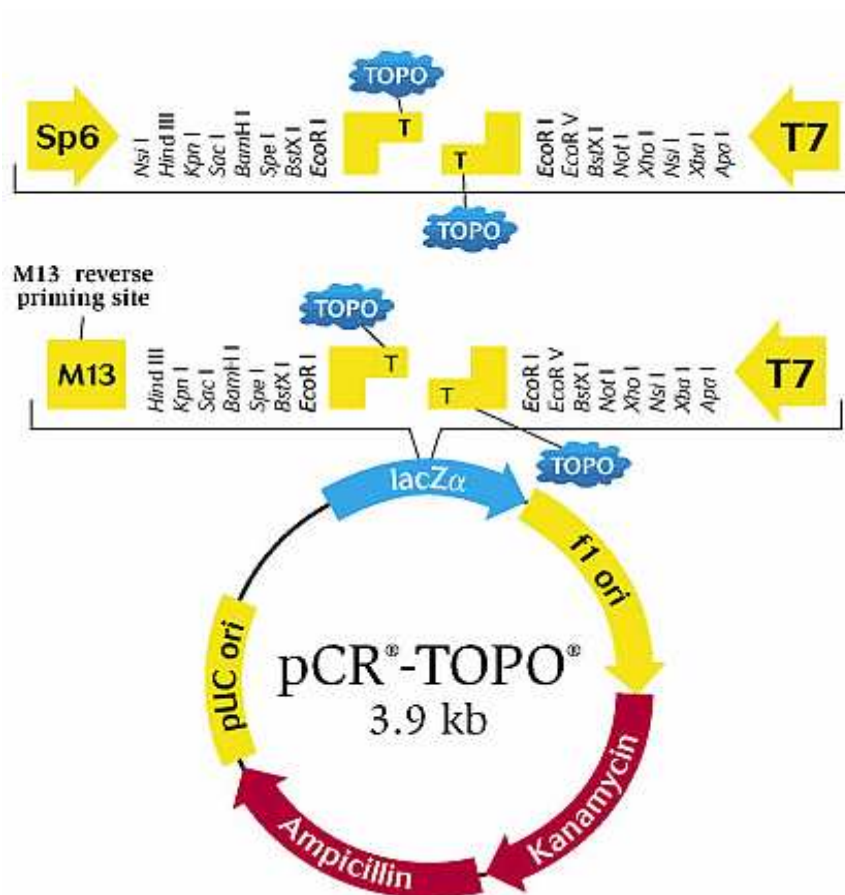
#### PCR reakce

##### Program

- |                     |                |       |
|---------------------|----------------|-------|
| 1. denaturace       | 96 °C 5 minut  | } 25x |
| 2. dematurace       | 94 °C 1 minuta |       |
| 3. nasedání primerů | 55 °C 1 minuta |       |
| 4. polymerace       | 72°C 1,5 minut |       |
| 5. polymerace       | 72 °C 10 minut |       |
| 6. držet při 4 °C   |                |       |

### 3.2.2 Klonování do plazmidu PCR II - TOPO

- Podle kitu TOPO TA Cloning® (Invitrogen) (Obr. 3.2.1)
- Transformace (přidáme buňky *E. coli* DH5α necháme 20 minut na ledu + 150 μl SOC, teplotní šok – 40 sec 42 °C a třepeme 45 min v 37 °C)
- Na agarózové misky před vyšetím buněk přidáme IPTG a X-gal, protože plazmid TOPO má modro-bílou selekci
- Pro izolaci plazmidové DNA metodou miniprep vybereme pouze bílé kolonie
- Zaklonování ověříme restriční reakcí izolované plazmidové DNA s enzymy BamH I a Xho I



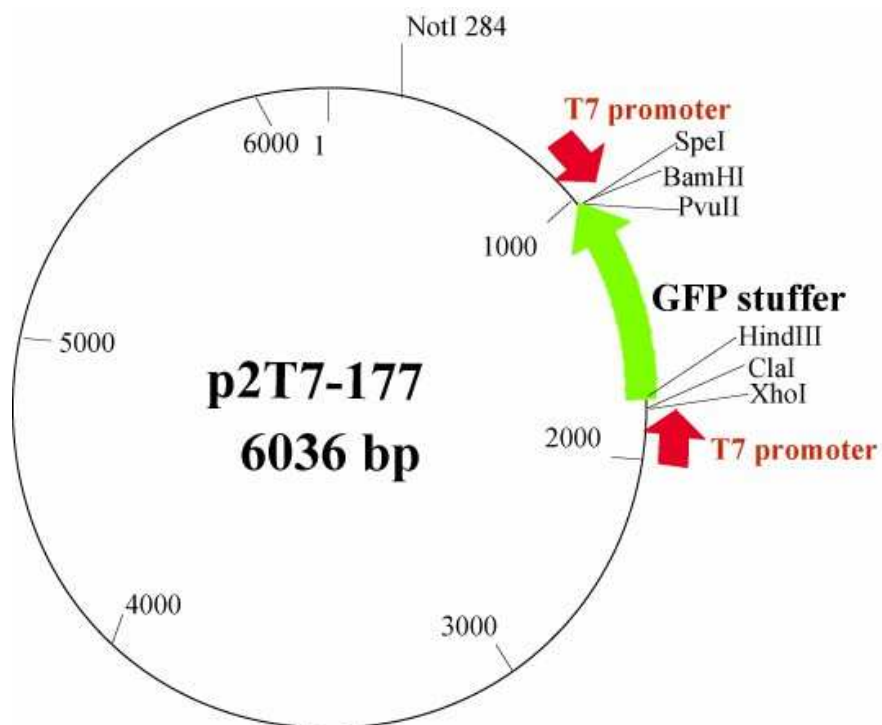
Obr. 3.2.1 mapa vektoru PCR II - TOPO (Invitrogen)

### 3.2.3 Izolace z gelu

- Byla prováděna pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) podle návodu výrobce

### 3.2.4 Ligace do plazmidu p2T7-177

- Podle návodu výrobce (Invitrogen)
- 0,5  $\mu$ l ligáza
- 0,5  $\mu$ l 10x pufr
- 1  $\mu$ l plazmid (Obr. 3.2.2)
- 1  $\mu$ l inzert
- doplníme do 5  $\mu$ l
- necháme v 16  $^{\circ}$ C 24 hodin
- transformujeme a vysejeme na misky
- kultivujeme 8-12 hodin v 37  $^{\circ}$ C



Obr. 3.2.2 mapa vektoru p2T7-177. Vektor použitý pro expresi dsRNA v *T. brucei*. (Wickstead et al., 2002)

### 3.2.5 Izolace plazmidové DNA metodou midiprep, restriční reakce

- Podle Midi-prep Kit (QIAGEN)
- Pro restriční reakci použijeme opět enzymy BamHI I a Xho I nebo BamHI a Hind III

### 3.2.6 Linearizace a přesrážení plazmidu

- Linearizujeme plazmidovou DNA pomocí restriční endonukleázy Not I
- Enzym necháme štípat přes noc v 37 °C a kvalitu štípání ověříme na agarózovém gelu
- K naštípanému plazmidu přidáme 1/2 objemu fenolu a 1/2 objemu chloroform s izoamylalkoholem (20:1) a mícháme 10 min
- Točíme v centrifuze 10 min při 16100 g při 4 °C
- Vodnou fázi přeneseme do čisté zkumavky a přidáme 2,5 objemu 96% ethanolu a 0,1 objemu 3 M acetátu sodného
- Necháme precipitovat v -20 °C 30 min
- Točíme 10 minut ve 4 °C 16100 g
- Sediment opláchneme ledovým 70% ethanolem a točíme 5 minut 4 °C, 16100 g
- Vysušíme a rozpustíme v 400 µl sterilního cytomixu

Cytomix 25 mM HEPES  
120 mM KCl  
0,15 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2 mM EDTA  
6 mM glukóza  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Kultivace *T. brucei*

- používáme kmen 29-13 (Wirtz et al., 1999), který rosteme v médiu SDM-79 při 27 °C
- když kultura dosáhne hustoty 10<sup>7</sup> buněk/ml, je třeba ji přeočkovat  
SDM médium složení lze dohledat v (Brun a Schonenberger, 1979).

### 3.2.7 Stanovení počtu buněk *T. brucei* v kultuře

- pomocí přístroje Beckman Cellcounter Z2

### 3.2.8 Elektroporace

- Po dosažení koncentrace kultury  $10^8$  buněk/ml, buňky stočíme při 300 g ve 4 °C 10 min
- Sediment rozpustíme v 5 ml cytomixu a opět stočíme 10 min 4 °C 300 g
- K sedimentu přidáme 400 µl přesrážené plazmidové DNA a roztok dáme do elektroporační kyvety
- Přístroj Electron Cell Manipulator (ECM 630) nastavíme na puls 1600 V, 25 Ω, 50 µF a spustíme
- Z kyvety vše přeneseme do kultivační lahve a přidáme 5 ml média s antibiotiky hygromycin a G418 (HG médium) o výsledných koncentracích hygromycin 50 µg/ml a G418 15 µg/ml
- Necháme 18 hod v termostatu při 27 °C
- Ke kultuře přidáme 5 ml média HGP a 5 µl phleomycin (výsledná koncentrace 2,5 µg/ml) a buňky rozklonujeme do mikrotitračních destiček postupně na koncentrace 1:1, 1:3, 1:9 a 1:18
- Buňky vyselektujeme, indukujeme tetracyklinem do výsledné koncentrace 1 µg/ml
- Vybrané klony zamrazíme a skladujeme v tekutém dusíku

### 3.2.9 Northernová analýza

#### Izolace RNA

- zamražené buňky *T. brucei* v tri-reagentu vyndáme z -80 °C a necháme rozmraznout
- přidáme 200 µl chloroformu a vortexujeme
- stočíme 10 min 4 °C 16100 g, vodný roztok přemístíme do nové zkumavky
- přidáme 500 µl isopropanolu, vortexujeme a necháme 10 minut stát
- stočíme 10 min 4 °C 16100 g a odsajeme supernatant
- sediment opláchneme studeným 75% ethanolem a stočíme 10 min 4 °C 16100g

- odstraníme supernatant a vysušíme sediment
- sediment rozpustíme ve 30  $\mu$ l vody
- inkubujeme 10 min v 60  $^{\circ}$ C a pomocí spektrofotometru měříme koncentraci

#### Příprava 1% agarózového gelu pro analýzu RNA

10 ml 10x MOPS

1 g agarózy

72 ml deionizované vody

Rozvaříme v mikrovlnné troubě a po zchlazení přidáme 18 ml formaldehydu

#### 1,5x vzorkový pufr pro kladení vzorků na gel

600  $\mu$ l formamidu

156  $\mu$ l 10x MOPS

210  $\mu$ l 37% formaldehydu

5  $\mu$ l ethidium bromidu

#### Elektroforetický pufr (dělicí Pufr)

50 ml 10x MOPS

450 ml deionizované vody (mili Q)

#### Northern

- k 10  $\mu$ l RNA přidáme odpovídající objem 1,5x vzorkový pufr
- 10 min inkubujeme v 65  $^{\circ}$ C
- Necháme 2 min na ledu a do jamek nanášíme celý objem
- Gel běžíme na 60V a každých 30 minut promícháváme pufr
- Kontrolujeme pod UV lampou

#### Blotování RNA

kusy filtračního papíru o rozměrech podle velikosti gelu

nitrocelulózová membrána

buničitá vata



- Na připravené sklo položíme filtrační papír tak, aby nám na všech koncích přečnival asi o 1cm a zalijeme 10x SSC
- Přidáme 1 menší filtrační papír, gel, membránu, 3 filtrační papíry po každém kroku navlhčíme 10x SSC, přidáme vrstvu buničité vaty (~ 20 cm), přikryjeme sklem a závaží a necháme 24 hodin přenášet v pokojové teplotě
- Blot rozebereme, membránu s RNA zkontrolujeme pomocí UV lampy a označíme marker
- RNA na membránu zpečeme v přístroji UV Stratalinker 1800 (STRATAGENE)
- Membránu uchovááme ve 4 °C

#### Příprava sondy

- PCR reakci přečistíme kitem GenElute™ PCR Sigma
  - 100 ng vyčištěné DNA
  - 10 μl Random hexamer pufr (Hexalabel™ DNA Labeling Kit Fermentas)
  - dd H<sub>2</sub>O (doplníme do celkového objemu 44 μl)
- namíchanou reakci necháme 10 min ve 100 °C a potom chladíme 2 min na ledu
- přidáme 3 μl dNTP mix (Fermentas) + 1 μl Klenowův enzym (Fermentas) + 2 μl α-P<sup>32</sup> dATP a inkubujeme 2 hod v 37 °C
- připravenou sondu přečistíme pomocí sephadexové kolony G-25 nebo G-50. Točíme 2 min 800 g.
- kolonu promyjeme 100 μl dd H<sub>2</sub>O nebo TE puforem
- sondu zahříváme 3 min 100 °C
- k sondě přidáme 5 ml NaPi, nalijeme k pre-hybridizované membráně (2 hodiny 60 °C v NaPi) a necháme přes noc v 60 °C v rotujícím válci v hybridizační peci

NaPi	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	250 mM	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	250 mM	pH 7,2
	SDS	7%	
	EDTA	1 mM	
	MiliQ H <sub>2</sub> O		

### Promývání membrány

- Radioaktivně značenou probu uschováme v 50 ml tubě a zamrazíme
- Membránu promyjeme 2xSSC + 0,1% SDS a necháme 20 min v pokojové teplotě
- Roztok vylijeme do radioaktivního odpadu a k membráně přidáme roztok 0,2x SSC + 0,1% SDS a necháme 20 min v 55 °C
- Roztok vylijeme do radioaktivního odpadu a skenujeme membránu, jestli je signál velmi silný, zopakujeme promytí 0,2x SSC + 0,1% SDS 20 min 55 °C
- Membránu (RNA nahoru) založíme do fosfoimagerové kazety a vyvoláváme na přístroji: Typhoon Phosphorimager

### 3.2.10 Růstová křivka

- Kultury z tekutého dusíku necháme narůst na koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/ml v SDM-79 médiu
- Z narostlých kultur nanese 1 ml do 2 jamek na mikrotitrační destičce (je nutné, aby v každé jamce byla na začátku stejná koncentrace buněk)
- Jednu z jamek indukujeme přidáním tetracyklinu do výsledné koncentrace 1  $\mu\text{g/ml}$  a necháme růst v 27 °C
- Koncentraci buněk měříme každých 24 hod
- Každý druhý den kulturu ředíme na koncentraci  $2 \times 10^6$  buněk/ml HGP médiem (hygromycin, G418 a fleomycin) a k indukované linii přidáme tetracyklin
- Růst buněk měříme alespoň po dobu 14 dnů
- Jako kontrola se používají buňky divokého kmene 29-13 (WT), které byly ředěny médiem HG na stejnou počáteční koncentraci jako buňky indukované (tet +) a neindukované (tet -)

### 3.3 Glycerolový gradient

#### 3.3.1 Izolace mitochondrií

- Procyklické *T. brucei* narosteme v takovém objemu média, abychom dostali celkem  $7,5 \times 10^9 - 10^{10}$  buněk
- Buňky stočíme 6000 g 10 minut ve 4 °C
- Sediment rozpustíme v 35 ml pufru SBG
- Stočíme při 6000 g 10 minut 4 °C
- Buněčný sediment rozpustíme v 35 ml DTE pufru
- V homogenizátoru (Dounce Tissue Homogenizer) mechanicky buňky rozbijeme, rychle přidáme 5,85 ml 60% sacharózy a promícháme
- Točíme při 15,800 g 10 minut ve 4 °C
- Sediment rozpustíme v 6,8 ml STM pufru, přidáme 21  $\mu$ l 1M  $MgCl_2$  a 0,1  $\mu$ l 0,1M  $CaCl_2$
- Přidáme 5  $\mu$ l DNase (2 mg/ml), zamícháme a necháme inkubovat na ledu 1 hodinu
- Přidáme 6,9 ml STE pufru, zamícháme a centrifugujeme při 15,800 g 10 minut ve 4 °C
- Slijeme supernatant, sediment opět opláchneme STE puftrem, stočíme a zamrazíme v tekutém dusíku
- uchováváme v -80 °C
  - SBG pufr: 20 mM Glukóza  
150 mM NaCl  
1,4 mM  $NaH_2PO_4$   
8,6 mM  $Na_2HPO_4$
  - DTE pufr: 1 mM Tris pH = 8,0  
1 mM EDTA
  - STM pufr: 20 mM Tris pH = 8,0  
2 mM  $MgCl_2$   
250 mM sacharóza

STE pufr: 20 mM Tris pH = 8,0  
2 mM EDTA  
250 mM sacharóza

Lyzační pufr: 10 mM Tris pH = 7,2  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM KCl

Roztok A : 10 mM Tris pH = 7,2  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM KCl  
10% glycerol  
1 mM DTT (přidáváme před použitím)

Roztok B : 10 mM Tris pH = 7,2  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
100 mM KCl  
30% glycerol  
1 mM DTT (přidáváme před použitím)

### 3.3.2 Glycerolový gradient

#### Příprava gradientu

- Do ultracentrifugační zkušavky nanese 5,5 ml roztoku B a opatrně převrstvíme stejným objemem roztoku A, tak aby se roztoky nesmíchaly
- Necháme několik dní v -80 °C
- Rozmrazíme ve 4 °C po dobu 12 hod

#### Příprava mitochondriálního lyzátu

- Sediment buněk *T. brucei* z -80 °C rozpustíme v 500 – 700 µl lyzačním pufru a přidáme Triton-X do výsledné koncentrace 1% a stočíme 15 min ve 4 °C

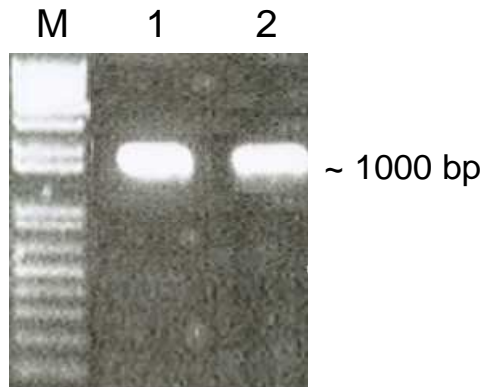
- Supernatant přeneseme do čisté zkumavky a opět stočíme 15 min 4 °C
- Lyzátem převrstvíme připravený 10-30% glycerolový gradient, zkumavky přesně vyvážíme a točíme v ultracentrifuze Beckman L8 - 70M v rotoru SW - 40 TI při 38000 g 12 hod ve 4 °C
- Pipetou sbíráme 0,5 ml frakce a uchováváme je v -80 °C
- Z 0,5 ml frakcí odebereme 20 µl pro analýzu proteinů

## 4. Výsledky

Výsledky byly získány na podjednotkách komplexu MRB1, především na tzv. záhadě 1 a záhadě 2, ale částečně i na helikáze a hydroláze.

### 4.1 Klonování záhady 1 a záhady 2 do vektoru pET 100

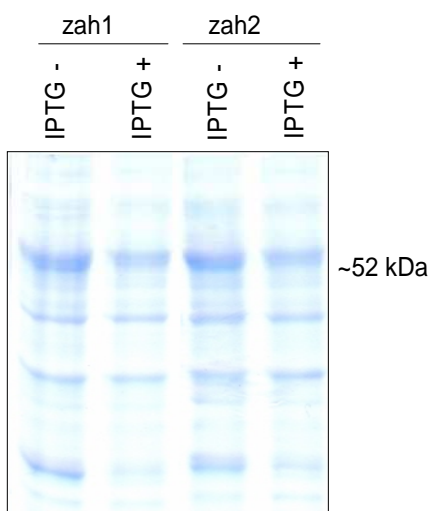
Pomocí PCR reakce byly zmnoženy celé otevřené čtecí rámce obou záhad bez signální sekvence. Produkty byly následně velikostně ověřeny na agarózovém gelu. Z gelu vyříznuty, vyzolovány, zaklonovány do expresního vektoru pET100 a transformovány do buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ . Z narostlých kolonií byla pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (QAIGEN) izolována plazmidová DNA a úspěšnost klonování byla ověřena použitím restriční analýzy enzymy Hind III a Xba I. Velikost vyštěpeného fragmentu byla, dle ověření v agarózovém gelu okolo 1 Kb, což odpovídá očekávaným velikostem (Obr.4.1).



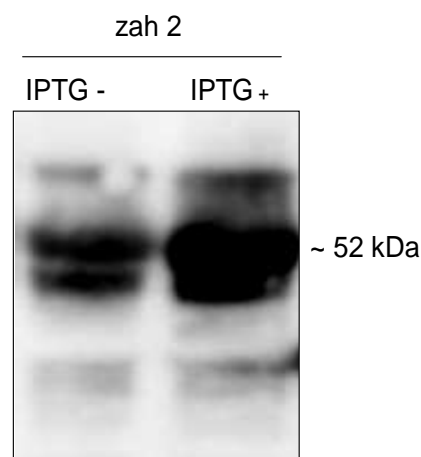
Obr.4.1 PCR reakce pro zah1 jamka 1 a zah2 jamka 2. Velikost produktů je okolo 1000 bp.

## 4.2 Expresse proteinů

Nejprve byly stanoveny sekvence zaklonovaných genů a po srovnání s databází v Gene DB bylo ověřeno (Obr. 4.4), že nedošlo k žádné změně aminokyseliny nebo posunu ve čtecím rámci. Poté byl každý z fragmentů transformován do expresních buněk BL21 (DE3) a vybrané narostlé kolonie byly nasazeny do LB média a při optické hustotě 0,5 indukovány IPTG do výsledné koncentrace 1 mM. Vzorky buněčných lyzátů odebrány v časových intervalech 0 a 6 hodin po indukci byly analyzovány na SDS akrylamidovém gelu. Jako kontroly byly použity buňky neindukované (IPTG-). Akrylamidové gely byly obarveny Coomassie brilliant blue (Obr. 4.2), umožňující stanovit intenzitu i velikost proteinů. Proteiny z dalšího gelu byly zároveň přeneseny na membránu. Použitím primární protilátky anti-His a sekundární myší protilátky byl na membráně specificky zviditelněn cílový nadprodukovaný protein (Obr. 4.3). Tímto postupem byp ověřeno, že se v *E. coli* podařilo dosáhnout úspěšné syntézy záhady 1 a 2.



Obr. 4.2 Nadprodukce obou proteinů. Lyzáty z indukovaných (IPTG+) i neindukovaných (IPTG-) buněk zah1 a zah2 odebrané po 6 hod růstu v 37°C byly naneseny na 12% akryl amidový gel obarvený Coomassie Brilliant Blue. Velikost exprimovaných proteinů odpovídá očekávané velikosti, což je pro zah1 – 53 kDa a zah2 – 52 kDa.



Obr. 4.3 Westernová analýza proteinu zah2 s primární protilátkou  $\alpha$ -His. Protilátka váže protein v očekávané velikosti 52 kDa, což odpovídá předpokládané velikosti. Indukované (IPTG+) i neindukovaných (IPTG-) lyzáty pro westernovou analýzu byly odebrány po 6 hod růstu v 37°C.

A

Sequence Name	< Pos = 380
- +	
Consensus	TTGTTGTGACGGACTATGATCGTGCCGAAGATGCGCTGGAAAGAGCGGATGAATACGGTGATTGGGGCGCAGAACCCGGTTTTGAGGACCCTCGTGAGTTGGACTTTATGGATTAAAGCCCTGGACGAATGGG
3 Sequences	80 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510
Zah 1	TTGTTGTGACGGACTATGATCGTGCCGAAGATGCGCTGGAAAGAGCGGATGAATACGGTGATTGGGGTGCAGAACCCGGTTTTGAGGACCCTCGTGAGTTGGACTTTATGGATTAAAGCCCTGGACGAATGGG
621-T7promoter	TTGTTGTGACGGACTATGATCGTGCCGAAGATGCGCTGGAAAGAGCGGATGAATACGGTGATTGGGGCGCAGAACCCGGTTTTGAGGACCCTCGTGAGTTGGACTTTATGGATTAAAGCCCTGGACGAATGGG
621-T7promoter	TTGTTGTGACGGACTATGATCGTGCCGAAGATGCGCTGGAAAGAGCGGATGAATACGGTGATTGGGGCGCAGAACCCGGTTTTGAGGACCCTCGTGAGTTGGACTTTATGGATTAAAGCCCTGGACGAATGGG

B

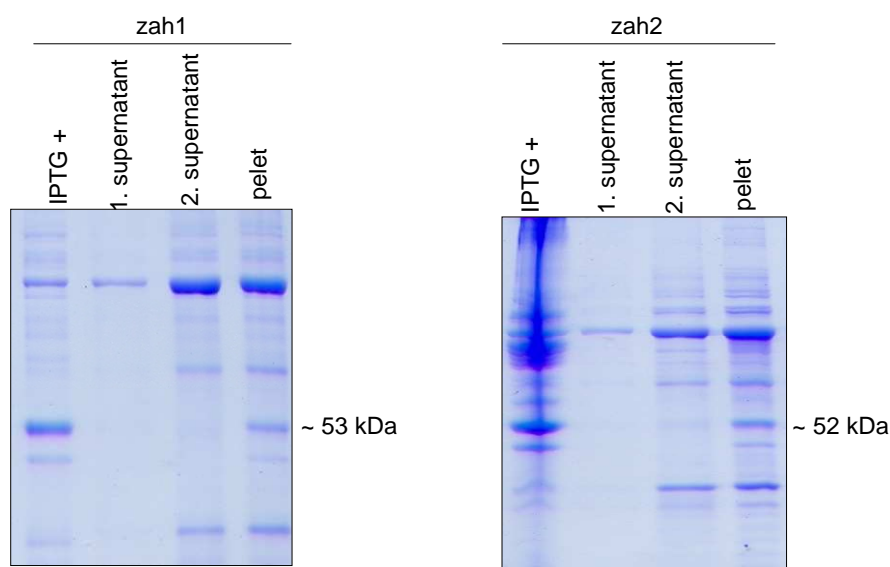
Sequence Name	< Pos = 439
- +	
Consensus	CAGCACCAACAGCATGGGC AACAGGGTGGATATGGTCGATGGAAATCAGGCTTCTGTTATGCAGCCTGAAACACTTCTCGATCTTTCCCAAGCAGGTTTTATGAAGGGGCAGCCAAATATGGTCCC AAAAGGCGT
3 Sequences	440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570
Zah 2	CAGCACCAACAGCATGGGC AACAGGGTGGATATGGTCGATGGAAATCAGGCTTCTGTTATGCAGCCTGAAACACTTCTCGATCTTTCCCAAGCAGGTTTTATGAAGGGGCAGCCAAATATGGTCCC AAAAGGCGT
Z_2_4-T7promot	CAGCACCAACAGCATGGGC AACAGGGTGGATATGGTCGATGGAAATCAGGCTTCTGTTATGCAGCCTGAAACACTTCTCGATCTTTCCCAAGCAGGTTTTATGAAGGGGCAGCCAAATATGGTCCC AAAAGGCGT
Z_2_16-T7promo	CAGCACCAACAGCATGGGC AACAGGGTGGATATGGTCGATGGAAATCAGGCTTCTGTTATGCAGCCTGAAACACTTCTCGATCTTTCCCAAGCAGGTTTTATGAAGGGGCAGCCAAATATGGTCCC AAAAGGCGT

Obr. 4.4 Srovnání sekvencí metodou Clustal V (MegAlign, program DNASTAR). Všechny sekvence byly ověřeny v Gene DB. A – klony 6 a 8 záhady 1 srovnané se sekvencí tohoto genu z databáze Gene DB (zah1). B – klony 4 a 16 záhady 2 srovnané se sekvencí zah2 z databáze Gene DB.

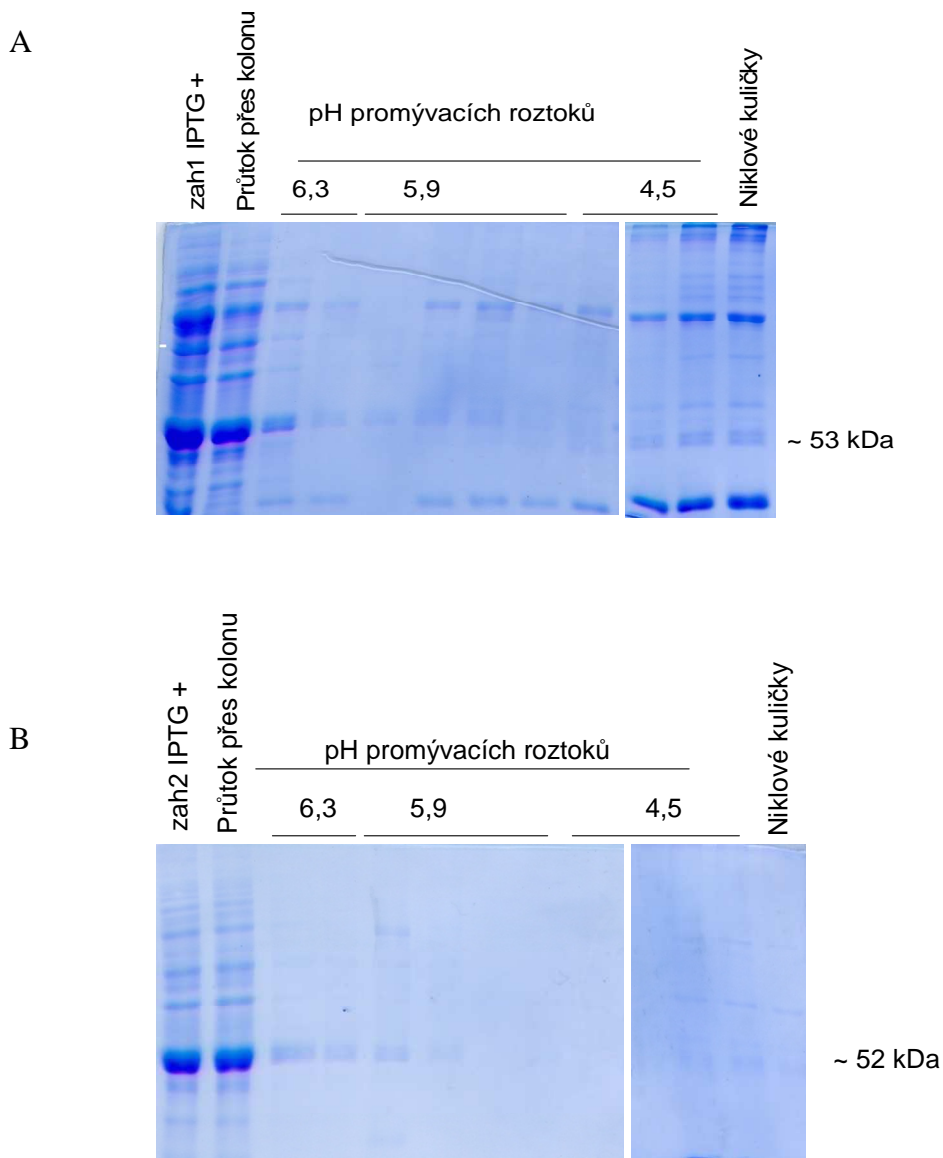


### 4.3 Purifikace

Před vlastní purifikací bylo třeba zjistit, zda se protein nachází v cytoplazmě nebo v inkluzních tělískách bakteriálních buněk. Sedimenty indukovaných i neindukovaných buněk *E. coli* odebraných po 6 hodinách růstu v 37 °C byly lyzovány lysozymem a rozbity opakovaným zamražením v tekutém dusíku a následném rozmražením v 42 °C. Sbírané frakce byly analyzovány na SDS – PAGE, která prokázala, že oba proteiny jsou nerozpustné, to znamená, že jsou sbaleny v inkluzních tělískách (Obr. 4.5). Proto byla purifikace provedena za denaturačních podmínek, kdy k promytí proteinu z Ni-NTA kolony byly použity roztoky o různých hodnotách pH (8,0; 6,3; 5,9 a 4,5). Jednotlivé frakce byly opět analyzovány pomocí 12% akrylamidového gelu (Obr. 4.6).



Obr.4.5 Zkouška rozpustnosti proteinů. M – marker, indukované buňky po 6ti-hodinové nadprodukci. 1. supernatant – lyzační pufr s lysozymem, 2. supernatant – lyzační pufr s Tritonem-X. Očekávaná velikost proteinu je 53 kDa pro zah1 a 52kDa pro zah2. Proteiny jsou v peletu, což znamená, že jsou nerozpustné.

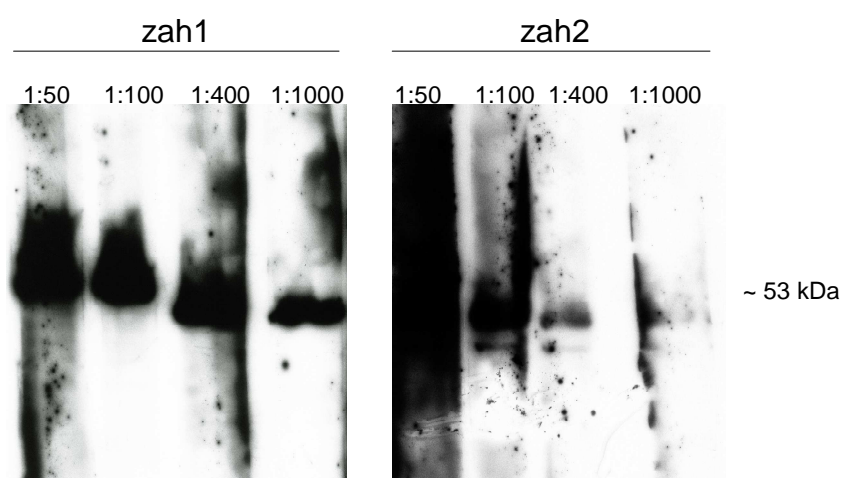


Obr. 4.6 SDS analýza frakcí sbíraných při čištění proteinů. A – vzorky z čištění zah1. Ve všech frakcích jsou kontaminující proteiny. B – frakce z purifikace zah2. Z gelu je patrné, že protein Zah2 se promývá při pH 6,3 a 5,9.

#### 4.4 Testování polyklonálních protilátek

Jelikož se purifikace nadprodukovaných proteinů ukázala problematickou a málo efektivní, rozhodli jsme se pro přípravu protilátek proti syntetizovaným

oligonukleotidům. Dva oligopeptidy o délce 15 aminokyselin byly syntetizovány firmou GenScript a toutéž firmou injektovány do králíků. Obě komerčně vyrobená séra byla testována na přítomnost specifických protilátek proti cílovým proteinům. Výsledky z celkových buněčných lyzátů byly negativní a proto byly protilátky vyzkoušeny na lyzátech mitochondriálních proteinů. Aby se optimalizovala koncentrace pro použití protilátek, byly udělány ředící řady o koncentracích 1:50, 1:100, 1:400 a 1:1000 a ty byly testovány na mitochondriálních lyzátech. Jako optimální ředění bylo vybráno pro protilátku zah1 ředění 1:1000 a pro zah2 ředění séra 1:400 (Obr. 4.7).



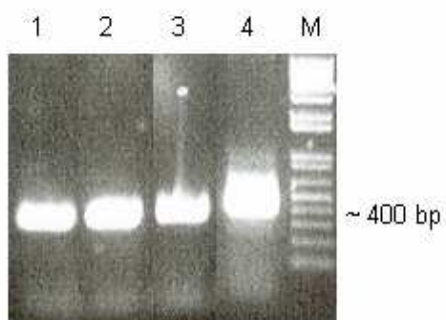
Obr. 4.7 Westernová analýza protilátek proti proteinům zah1 a zah2 na mitochondriálních lyzátech. Sérum bylo naředěno v koncentracích 1:50, 1:100, 1:400, 1:1000. Expoziční doba – 5 minut.

Zásadním zjištěním bylo, že obě polyklonální králičí séra opravdu obsahují specifické protilátky proti cílovým proteinům.

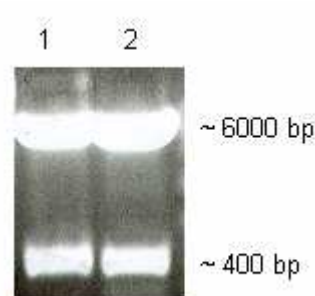
#### **4.5 Příprava konstruktů p2T7-177 pro RNAi**

Nejprve byly pro dané geny zmnoženy pomocí PCR zhruba 400 nukleotidů dlouhé úseky dostačující pro RNA interferenci (Obr. 4.8). Fragменты byly velikostně ověřeny na 0,75% agarózovém gelu, z gelu vyizolovány a zaklonovány do vektoru PCR II -

TOPO. Na základě modro-bílé sekce byly vybrány bílé kolonie, v nichž byla přítomnost inzertu ověřena restrikční analýzou (Obr. 4.9). Poté byly inzerty z gelu izolovány, ligovány do RNAi plazmidu p2T7-177 a transformovány do buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ . Z narostlých kolonií byla izolována plazmidová DNA a úspěšnost zaklonování byla opět ověřena restrikční analýzou. Z pozitivních klonů byla izolována plazmidová DNA pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit QAIGEN, umožňujícího získání dostatečného množství DNA pro elektroporaci do procyklických stádií *T. brucei*.



Obr. 4.8 Fragmenty pro RNAi namnožené pomocí PCR. 1 - Tb927.4.4600 velikost 404 bp, 2 – Zinc finger 100 (ZF 100) o velikosti 410 bp, 3 – Tbporin 414 bp a 4 – Zinc finger 102 (ZF 102) má velikost 445 bp.



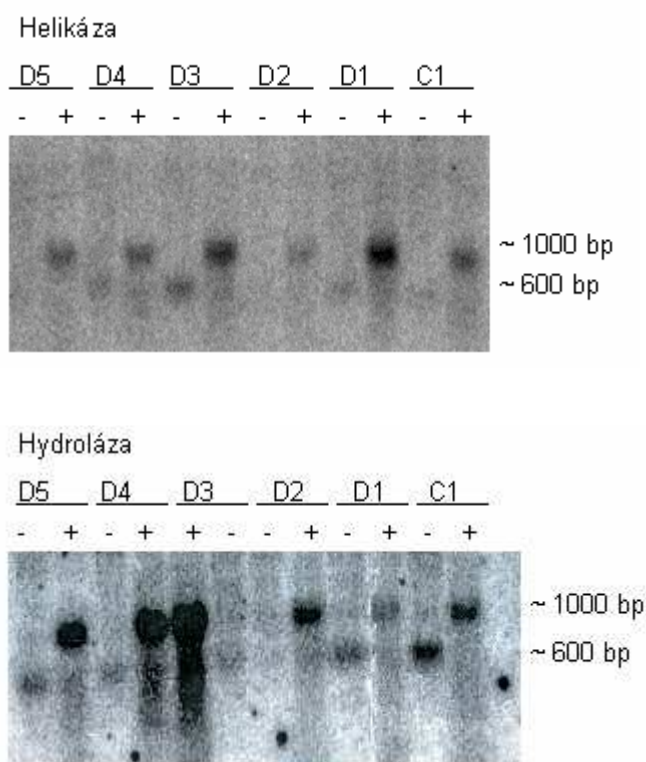
Obr. 4.9 Restrikční reakce plazmidové DNA štípané enzymy BamH I a Xho I. Byly vyštěpeny produkty o očekávané velikosti okolo 400 bp. V horní části gelu se nachází plazmid p2T7 - 177 o velikosti přibližně 6 000 bp. 1- ZF 102 a 2 – ZF 100.

#### 4.6 Příprava klonů *T. brucei*

Endonukleázou Not I bylo linearizováno přibližně 10  $\mu$ g plazmidové DNA a ta byla následně elektroporována do procyklických stádií *T. brucei* kmen 29-13. Po elektroporaci byly buňky zředěny HG médiem. Po 18ti hodinách bylo do kultury přidáno 5 ml HGP média a 5  $\mu$ l antibiotika P – fleomycinu o výsledné koncentraci 2,5  $\mu$ g/ml a kultura byla rozklonována do mikrotitrační destičky v koncentracích kultura: HGP médium 1:1, 1:3, 1:9 a 1:18. V médiu s fleomycinem přežily díky selekci pouze buňky s integrovaným plazmidem. Stabilní linie selektovaných buněk byly zamraženy a uschovány v tekutém dusíku.

#### 4.7 Northernová analýza

Stabilní linie nesoucí RNAi vektory obsahující fragmenty genů helikázy a hydrolázy byly indukovány tetracyklinem a byla z nich izolována celková RNA pro Northernovou analýzu. 10 µg vyizolované RNA z indukovaných a neindukovaných kultur bylo nanášeno na 1% formaldehydový agarózový gel a rozděleno při 50V. RNA byla poté přenesena na membránu a hybridizována radioaktivně značenou sondou vyrobenou z PCR produktu. Signál byl z membrány přenesen na fosfoimagerovou kazetu a po 48 hodinách byl zviditelněn pomocí přístroje Typhoon Phosphorimager (Obr. 4.10).

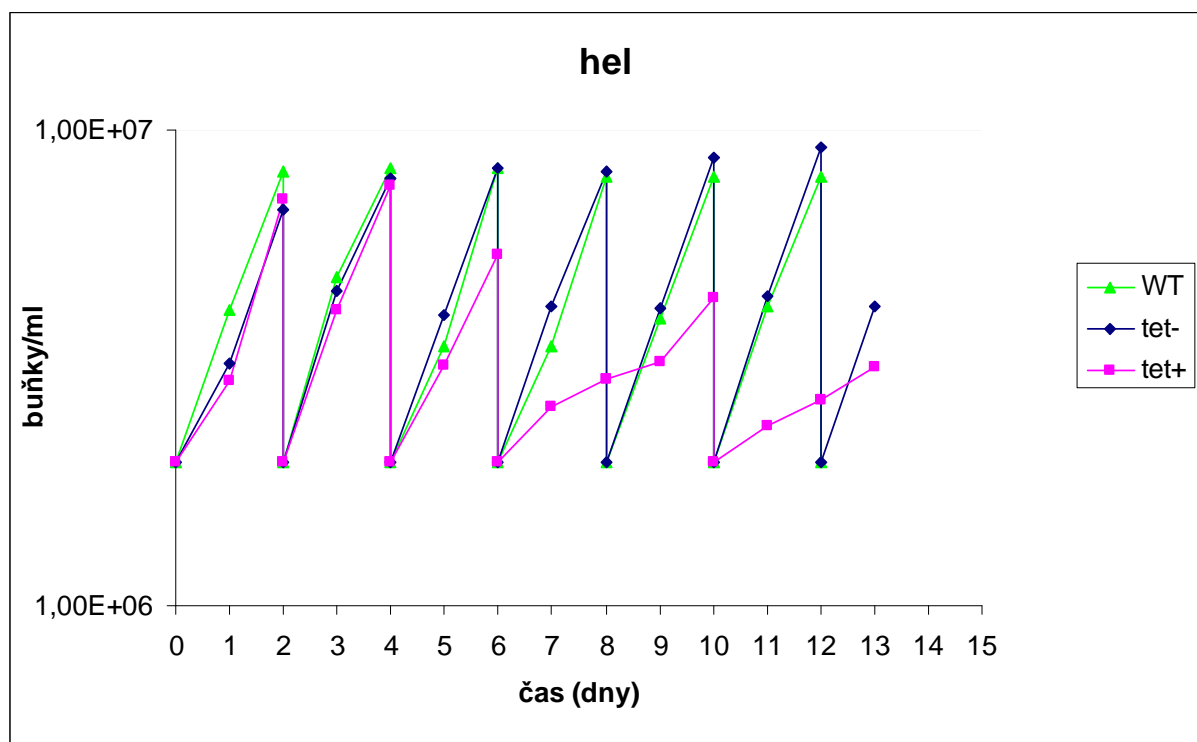


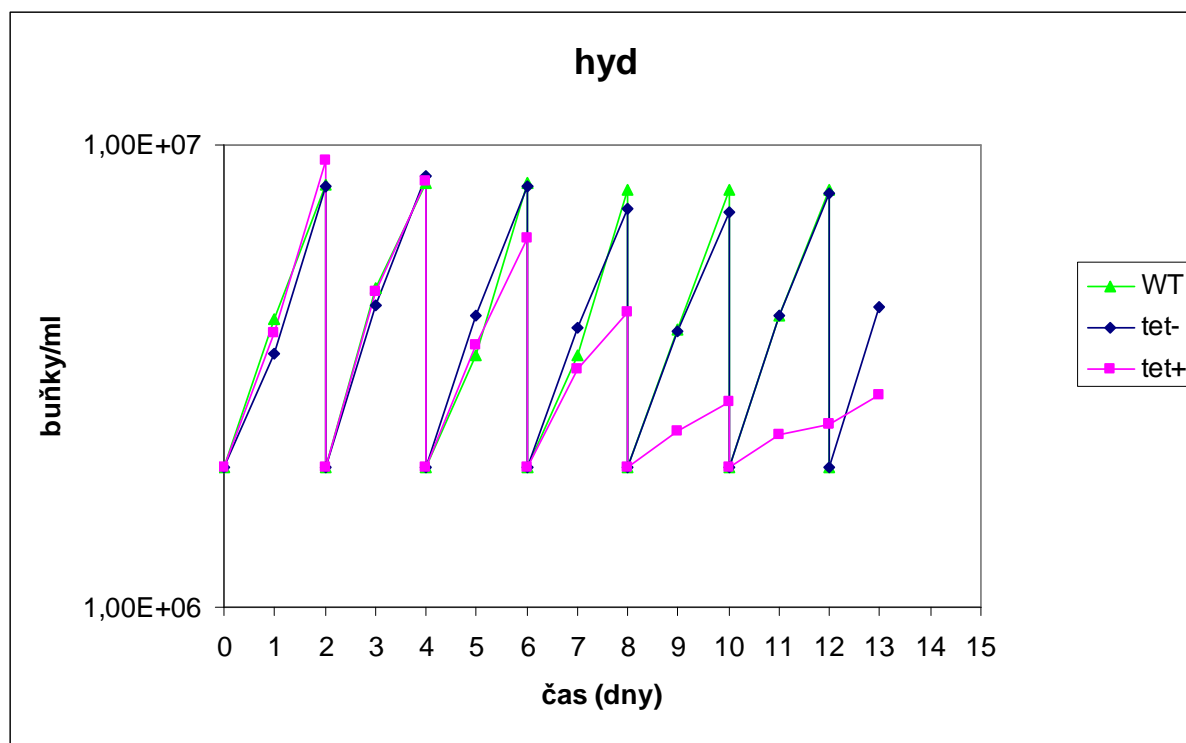
Obr. 4.10 Northernová analýza různých klonů indukovaných (+) i neindukovaných (-) kultur helikázy a hydrolázy procyklického stádia *T. brucei*. Předpokládané velikosti transkriptů jsou 6504 bp u helikázy a 1188 bp u hydrolázy a dsRNA 453 bp – u helikázy a 476 bp u hydrolázy.

Northernová analýza ukázala, že po přidání tetracyklinu je indukována syntéza dvouvláknové RNA. Ačkoli se nepodařilo prokázat příslušné mRNA, lze díky inducibilní a abundantní dsRNA oprávněně ředpokládat funkčnost RNAi.

#### 4.8 Růstová křivka

Po dobu 14 dnů byl sledován růstový fenotyp u divokých kmenů (WT) a indukovaných a neindukovaných linií nesoucích RNAi vektory s fragmenty genů kódujících Helikázu a Hydrolázu. Koncentrace buněk byla měřena každých 24 hodin po indukci tetracyklinem do výsledné koncentrace 1  $\mu\text{g/ml}$  na přístroji Beckman Cellcoulter Z2. Koncentrace buněk na začátku měření byla  $2 \times 10^6$  buněk/ml a každý druhý den byly všechny kultury zředěny opět na počáteční hodnotu.





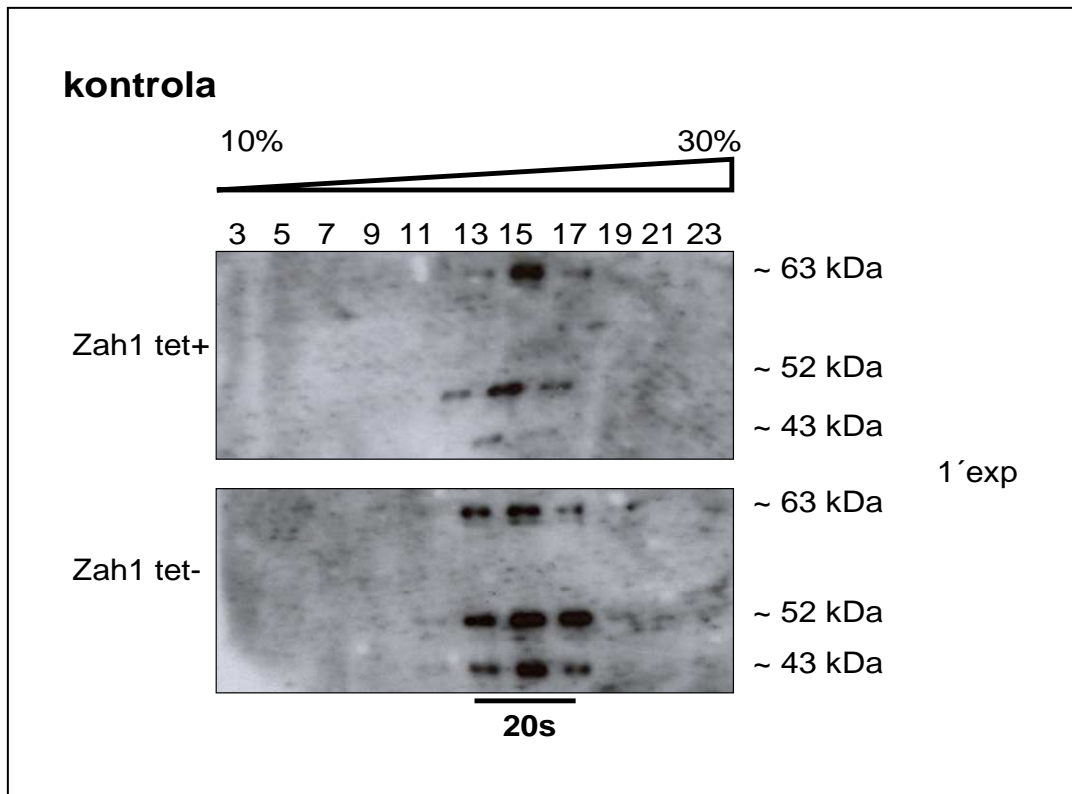
Obr.4.11 Růstové křivky pro RNAi helikázy a hydrolázy. Linie WT – divoký kmen 29-13. Tet- neindukované buňky. Tet+ buňky indukované tetracyklinem.

Růstové křivky kultur nesoucích RNAi konstrukty pro oba cílové geny jednoznačně ukázaly prudké zpomalení růstu kolem šestého dne po indukci RNA (Obr. 4.11) a jejich hynutí v následujících dnech. Tento výsledek ukazuje, že oba proteiny jsou pro procyklicá stádia esenciální.

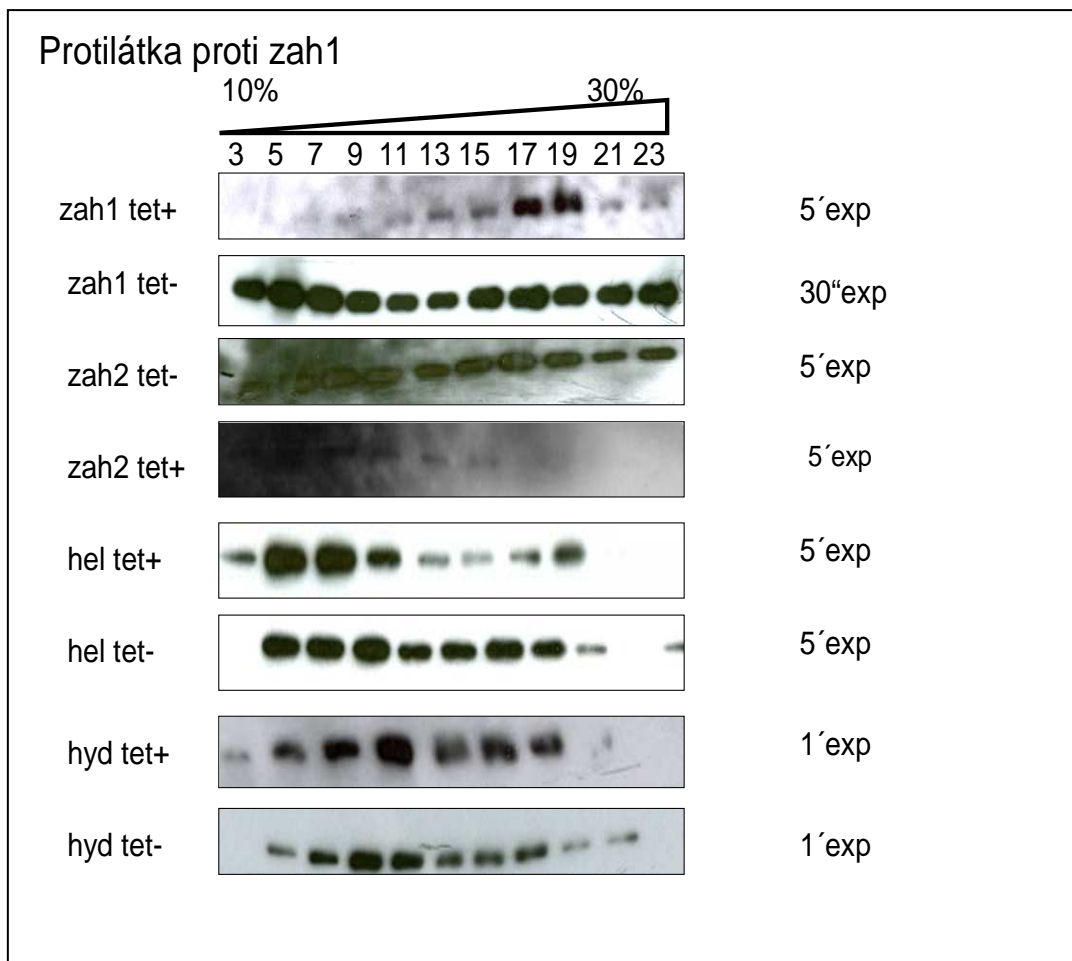
#### 4.9 Glycerolový gradient

Mitochondrie izolované z indukovaných i neindukovaných buněk genů *hel*, *hyd* a obou záhad byly rozděleny v 10 – 30% glycerolovém gradientu pomocí 12ti hodinového točení v ultracentrifuze při 38 000 g ve 4 °C. Celý gradient byl poté pečlivě rozdělen na 0,5 ml frakce. Liché frakce byly naneseny na 10% akrylamidový gel a analyzovány westernovou analýzou s protilátkami proti *zah1* a *zah2* (proti helikáze a hydroláze nejsou protilátky k dispozici). Jako kontrola, že se gradient nesmíchal nám sloužily protilátky proti čtyřem proteinům editozomu sedimentující v oblasti 20S (Obr. 4.12).

A

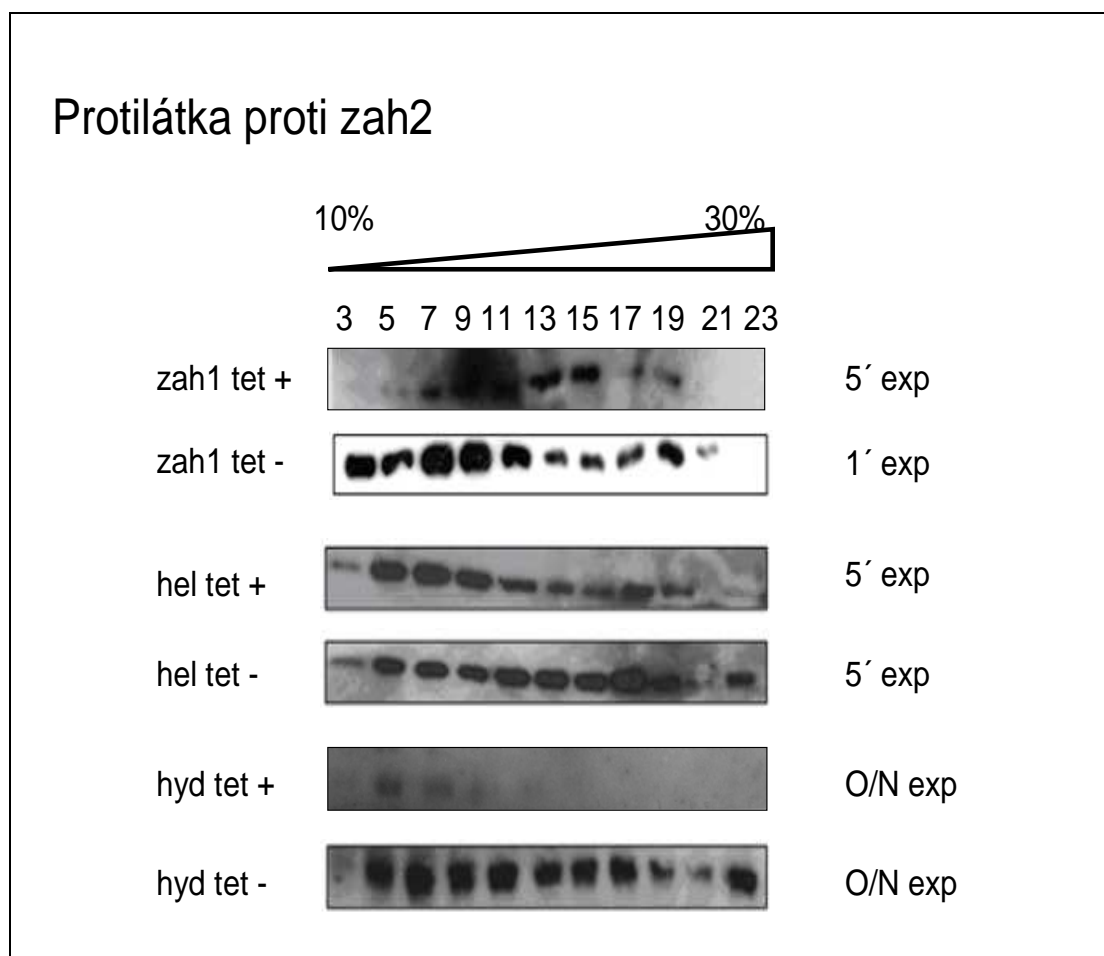


B





C



Obr. 4.12 Westernová analýza indukovaných (tet+) a neindukovaných (tet-) buněk záhady 1, záhady 2, helikázy a hydrolázy frakcionovaných v 10 – 30% glycerolovém gradientu. Ve frakci 3 je koncentrace glycerolu nejnižší a směrem k 23. frakci koncentrace glycerolu stoupá. A – kontrola s protilátkami proti 4 podjednotkám editozomu sedimentujících při 20s. Expoziční doba - 1 minuta. B - westernová analýza s protilátkou proti záhadě 1. C – analýza proteinů s protilátkou proti záhadě 2. Velikost všech frakcí na obrázcích B a C jsou přibližně 55 kDa. Exp je expoziční doba uvedená v minutách. O/N je expoziční doba přes noc.

Skrínování glycerolových gradientů ukázalo, že zah1 a zah2 jsou rozptýleny téměř rovnoměrně v celé šíři gradientu. V případě gradientů obsahujících lyzáty buněk, u nichž byly geny pro zah1 a zah2 vypnuty, dochází k vymizení příslušných proteinů z většiny frakcí a jejich koncentrace do frakcí 17 - 19 (Obr.4.12 B, C). V případě vypnutí hel a hyd je signál záhad obvykle ve frakcích 5 až 17, s jasným

vrcholem ve frakcích 9 a 11. V případě  $\Delta h_2$  zůstává tento protein rozptýlen po celém gradientu i v případě vypnutí  $h_{el}$  (Obr.4.12 C). (Obr.4.12 A) s protilátkami proti editozomální podjednotkám ukazuje, že gradient proběhl podle publikovaných podmínek, jelikož editozom sedimentuje ve frakcích 13-17.

## 5. Diskuze a závěr

Editování RNA je velmi zajímavý mechanismus, který od světového objevení v roce 1986 (Benne et al., 1986) stále překvapuje svou narůstající komplikovaností. Během této doby byly charakterizovány dva proteinové komplexy podílející se na procesu editování v mitochondrii trypanozom. Známe je jako MRP komplex (Vondrušková et al., 2005) a editozom (Stuart et al., 2005).

Pomocí TAP-tagováním bylo prokázáno, že se na protein TbRGG1 váže dalších 14 proteinů, které tím představují dosud nezkoumaný shluk proteinů pojmenovaný komplex MRB1. Dosavadní výsledky ukazují, že tento komplex má určitou funkci v editování RNA. Cílem mé práce bylo přispět k odhalení této funkce pomocí stanovení strukturálního uspořádání jednotlivých proteinů v komplexu zejména metodou glycerolových gradientů.

Abychom mohli začít s analýzou glycerolových gradientů nebo případnou imunolokalizací proteinů v buňce, bylo nutné připravit protilátky proti některým podjednotkám komplexu MRB1 (Panigrahi et al., 2008, Hashimi et al., 2008). Protože jako první byly objeveny geny *zah1* a *zah2* po jejichž vypnutí dochází k poklesu editování (Hashimi et al., 2008), rozhodli jsme se připravit protilátky právě proti nim.

Nejprve jsem metodou PCR zmnožila celé otevřené čtecí rámce genů a zaklonovala je do vektoru pET100. Po sekvenačním ověření správnosti čtecího rámce porovnáním s databází Gene DB, jsem vybrala klon Z1-8 pro *zah1* a Z2-4 pro *zah2*. Připravené konstrukty obou záhad jsem transformovala do expresních buněk *E. coli* a úspěšně dosáhla nadprodukce proteinů. Následnou zkouškou rozpustnosti jsem zjistila, že proteiny jsou v bakterii sbaleny v inkluzních tělískách, a proto bylo nutné provést jejich purifikaci za denaturačních podmínek. Po přečištění proteinu a analýze na SDS-PAGE gelu se bohužel ukázalo, že overexprese proteinů je velmi slabá a získání čistého proteinu pro přípravu protilátek neefektivní. Proto jsme se rozhodli nechat vyrobit komerční protilátky proti syntetickému oligonukleotidu. Po ověření specifčnosti připravených sér a optimalizaci jejich ředění pro westernovou analýzu, byly protilátky použity pro vyhodnocení glycerolových gradientů.

Mezitím jsme „vypínali“ další podjednotky komplexu MRB1 pomocí metody RNAi a sledovali dopad „vypnutí“ genů na růstový fenotyp buněk. Výsledky získané pro geny helikázy a hydrolázy ukazují změnu růstu mezi indukovanými a

neindukovanými kulturami. Zatímco neindukované buňky rostly stejně rychle jako kontrola, indukované buňky přestaly po indukci RNAi růst, čímž se prokázala potřeba obou proteinů pro přežití *T. brucei* ve formě procyklického stádia. Proto jsme pro analýzu glycerolových gradientů vybrali i tyto dva geny.

Mitochondrie vyizolované z výše popsaných indukovaných a neindukovaných buněk, jsem rozdělila pomocí ultracentrifugace na glycerolovém gradientu a rozdělila je na řadu frakcí, které byly vyhodnocovány westernovou analýzou. Touto metodou jsem chtěla blíže specifikovat strukturální funkci jednotlivých proteinů v komplexu. Jako kontrolu jsem použila specifické směsné monoklonální protilátky proti čtyřem podjednotkám editosomu., které sedimentují při 20S. V mnou připravených gradientech to byly frakce 13-17, což je o něco výše než u dřívějších pozorování v naší laboratoři (Vondrušková et al., 2005; Hashimi et al., 2008). Významným zjištěním je, že signál pro zah1 a zah2 prostupuje všemi frakcemi gradientu, přičemž u lyzátů z neindukovaných buněk můžeme vidět dva vrcholy. První vrchol v nižších frakcích pravděpodobně představuje volné proteiny, zatímco druhý vrchol reprezentuje proteiny vázané v komplexu. Rozptýl signálu po celé šíři gradientu můžeme vysvětlit tak, že komplex je velmi dynamický, nebo že jsou proteiny zah1 a zah2 součástí několika různých komplexů, které jsme metodou glycerolového gradientu detekovali. Tento názor potvrzuje práce (Entheridge et al., 2008), kde byly obě záhady nalezeny v dalším proteinovém komplexu.

U buněk s vypnutým genem pro helikázu se proteiny zah1 a zah2 v rámci gradientu přesouvají do vyšších frakcí. Tento posun znamená, že v neindukovaných buňkách jsou záhady součástí komplexu MRB1, zatímco když je gen pro helikázu vypnutý, proteinový komplex se pravděpodobně rozkládá a proteiny se patrně vyskytují ve volné formě.

Vzhledem k tomu, že výsledky týkající se hydrolázy jsou příliš předběžné, nechci z nich prozatím dělat žádný závěr.

V každém případě ale dosažené výsledky ukazují, že proteiny zah1 a zah2 se pravděpodobně podílí na formování celého komplexu a jeho stabilita je závislá na jejich přítomnosti. Podobný výsledek z glycerolového gradientu je uveden v práci (Vondrušková et al., 2005) pojednávající o MRP komplexu, který je složen pouze ze dvou podjednotek (MRP1 a MRP2). Obě tyto podjednotky jsou zodpovědné za stabilitu MRP komplexu.

Závěrem si dovolím konstatovat, že výsledky v předkládané práci přispívají k našemu poznání záhadného komplexu MRB1. Pevně doufám, že se mi v další práci podaří objasnit jeho funkci při editování a dalších úpravách mitochondriálních RNA u trypanosom.

## 6. Použitá literatura

**Arts G.J. a Benne R.** (1996) Mechanism and evolution of RNA editing in Kinetoplastida. *Biochem. Biophys. Acta* **1307**: 39-54

**Barrett M.P., Burchmore R.J., Stich A., Lazzari J.O., Frasch A.C., Cazzulo J.J. a Krishna S.** (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* **362**: 1469-1480

**Benne R., Van den Burg J., Brakenhoff J.P., Sloof P., Van Boom J.H. a Tromp M.C.** (1986). Major transcript of the frameshift coxIII gene from trypanosome mitochondria contains 4 nucleotides that are not encoded in the DNA. *Cell* **48**: 819-826

**Blum B. a Simpson L.** (1990). Guide RNAs in kinetoplastid mitochondria have a nonencoded 3' oligo (U) tail involved in recognition of the preedited region. *Cell* **62**: 391-397

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

**Carnes J., Trotter J.R., Ernst N.L., Steinberg A. a Stuart K.** (2005). An essential RNase III insertion editing endonuclease in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 16614-16619

**Corell R.A., Read L.K., Riley G.R., Nellisery J.K., Allen T., Kable M.L., Wachal M.D., Seiwert P.D., Myler P.J. a Stuart K.D.** (1996). Complex of *Trypanosoma brucei* that exhibit deletion editing and other editing associated properties. *Mol. Cell Biol.* **16**: 1410-1418

**Ernst N.L., Panicucci B., Igo R.P. Jr, Panigrahi A.K., Salavati R. a Stuart K.** (2003). TbMP57 is a 3' terminal uridylyl transferase (TUTase) of the *Trypanosoma brucei* editosome. *Mol. Cell* **11**: 1525-1536

**Etheridge D.R., Aphasizheva I., Gershon P. a Aphasizhev R.** (2008). 3' adenylation determines mRNA abundance and monitors completion of RNA editing in *T. brucei* mitochondria. *EMBO* (ahead of print)

**Hashimi H., Zíková A., Aswini K., Panigrahi, Stuart K.D. a Lukeš J.** (2008). TbRGG1, a component of novel multi-protein complex involved in kinetoplastid RNA editing. *RNA* (ahead of print)

**Liu B., Liu Y., Motyka S.A., Agbo E.E., Englund P.T.** (2005). Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol* **21**: 363-369

**Lukeš J., Guilbrige D.L., Votýpka J., Zíková A., Benne R. a Englund P.T.** (2002). Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable Structure. *Eukaryot. Cell* **1**: 495-502

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

**Panigrahi A. K., Zíková A., Dalley R.A., Acestor N., Ogata Y., Anupama A., Myler P.J. a Stuart K.D.** (2008). Mitochondrial complex in *Trypanosoma brucei* a novel complex and the unique oxidoreductase complex. *Mol. Cell. Proteomics* (ahead of print)

**Rauch C.A., Pérez-Morgana D., Cozzarelli N.R. a Englund P.T.** (1993). The absence of supercoiling in kinetoplast DNA minicircles. *EMBO J.* **12**: 403-411

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

**Simpson L., Aphasizhev R., Gao G. a Kang X.** (2004). Mitochondrial proteins and complexes in *Leishmania* and *Trypanosoma* involved in U-insertion/deletion RNA editing. *RNA* **10**: 159-170

**Stuart K.D., Schnauffer A., Ernst N.L. a Panigrahi A.K.** (2005) Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 97-105

**Trotter J.R., Ernst N.L., Carnes J., Panicucci B a Stuart K.** (2005). A deletion site editing endonuclease in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell* **20**: 403-412

**Vondrušková E., van den Burg J., Zíková A., Ernst N.L., Stuart K., Benne R. a Lukeš J.** (2005). RNA interference analyses suggest a trans-specific regulatory role for mitochondrial RNA-binding protein MRP1 and MRP2 in RNA editing and other RNA processing in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **28**: 2429-2438

**Wickstead B., Ersfeld K. a 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. a 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

**Yurchenko V., Hobza R., Benada O. a Lukeš J.** (1999). *Trypanosoma avium*: large minicircles in the kinetoplast DNA. *Exp. Parasitol.* **92**: 215-218