

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra molekulární biologie



Bakalářská práce

**Druhý homolog eukaryotického inhibičního
peptidu F_0F_1 -ATPázy u *Trypanosomy brucei*:
jeho lokalizace a funkce**

Monika Fraňková

Vedoucí práce: RNDr. Alena Zíková, PhD.

Biologické centrum AV ČR

Parazitologický ústav

České Budějovice, 2012

Fraňková, M., 2012 Druhý homolog ekaryotického inhibičního peptidu F_0F_1 -ATPázy u *Trypanosoma brucei*: jeho lokalizace a funkce. (A putative homolog of the eukaryotic inhibiting peptide in *Trypanosoma brucei*: its localization and function. Bc. Thesis in Czech.), Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this work was to characterized second putative homolog (TbIF2) of the eukaryotic inhibitory peptide in the bloodstream stage of *Trypanosome brucei*. TbIF2 was localized into the cytosol of the parasitic cell and its over-expression did not cause a growth arrest of the bloodstream stage cells. All together this data suggests TbIF2 is not a functional homolog of the inhibitory peptide, since this protein is localized into the mitochondrion and inhibits the essential activity of the F_0F_1 ATPase complex

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

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

České Budějovice, 24. února 2012

.....

Monika Fraňková

Poděkování

Zde bych chtěla poděkovat především RNDr. Aleně Zíkové, PhD. a BSc. Brianovi Panicci za ochotu a pomoc při vedení mé práce, za pomoc při vypracování této bakalářské práce a za to, že mne naučili různé molekulární techniky. Jsem velice ráda, že jsem mohla vypracovat svou bakalářskou práci právě v jejich laboratoři. Nemalý dík patří i Míše a Karolíně, které mi pomohly pokaždé, když jsem potřebovala.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 <i>Trypanosoma brucei</i>	1
1.2 Mitochondrie	3
1.3 F ₀ F ₁ ATP syntáza/ F ₀ F ₁ ATPáza	5
1.4 Inhibiční peptid TbIF1 a druhý domnělý homolog TbIF2	7
2. Cíle bakalářské práce	9
3. Metodika	10
3.1 Navrhování PCR primerů	10
3.2 Klonování DNA	10
3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	11
3.4 Agarózový gel	11
3.5 Izolace z gelu	11
3.5.1 Ligace do pGEM-Teasy plazmidu	11
3.5.2 Transformace do XL1-Ble <i>E.coli</i>	12
3.5.3 Izolace plazmidové DNA z miniprepu	13
3.6 Restrikční analýza plazmidové DNA pGEM-Teasy obsahující TbIF2 insert	13
3.7 Ligace do pT7v5	13
3.8 Sekvencování DNA	14
3.9 Linearizace plazmidu pT7v5_TbIF2	15
3.10 Kultivace BS <i>T.brucei</i>	15
3.11 Transfekce linearizovaného plazmidu pT7v5_TbIF2 do BS <i>T.brucei</i>	16
3.12 SDS page elektroforéza a westernový přenos	16
3.13 Digitoninová frakcionace	18
3.14 Lokalizace proteinu pomocí <i>imunofluorescence</i>	18
4. Výsledky	21
4.1 Klonování genu TbIF2 do vektoru pT7v5	21

4.2 Vytvoření buněčné linie <i>T.brucei</i>	22
4.3 Růstová křivka	22
4.4 Ověřování indukce tagovaného proteinu TbIF2 pomocí western blotu	24
4.5 Buněčná lokalizace TbIF2_v5 pomocí digitoninové frakcionace	25
4.6 Imunolokalizace tagovaného TbIF2	26
5. Diskuse a závěr	28
6. Použitá literatura	29

1. Úvod

1.1 *Trypanosoma brucei*

Rod *Trypanosoma* patří do podřádu Trypanosomatida, řádu Kinetoplastida a kmene Euglenozoa a zahrnuje jedno - či dvouhostitelské parazitické prvoky. U dvouhostitelských trypanozóm jsou hlavními hostiteli různí obratlovci, na které je parazit přenášen pomocí krev sajícího dvoukřídlého hmyzu, či ploštic. Hmyzí přenašeč je pro trypanozómy důležitý, protože v něm dochází k množení a diferenciaci stádií, která jsou schopná nakazit hostitele. Trypanozóma je heterotrofní organismus, který má charakteristickou stavbu bičíku, a v dlouhé mitochondrii se nachází unikátně strukturovaná mitochondriální DNA, tzv. kinetoplast. Máme tři skupiny trypanozóm, Salivaria (zástupce *T. brucei*), Stercoraria (*T. cruzi*) a trypanozómy ryb a obojživelníků (Volf *et al.*, 2007).

Trypanosoma cruzi se vyskytuje v Americe a způsobuje Chagasovu chorobu. Přenašečem této trypanozómy je krev sající ploštice zákeřnice. Do ran hostitele se zanáší trypomastigoti a v hostiteli se množí se jako intracelulární amastigotní stádium. Stádium amastigota přebývá v různých orgánech jako je srdce, mozek nebo játra. Trypanozómy se poté uvolňují do krve, kde jsou nasáti jako trypomastigoti plošticí (Volf *et al.*, 2007).

Nejdůležitější salivační trypanosomou je *Trypanosoma brucei*, která má tři poddruhy. Jedním poddruhem je *Trypanosoma brucei brucei*, druhým je *T. b. rhodesiense* a třetím poddruhem je *T. b. gambiense*. Tyto druhy trypanozóm způsobují spavou nemoc.

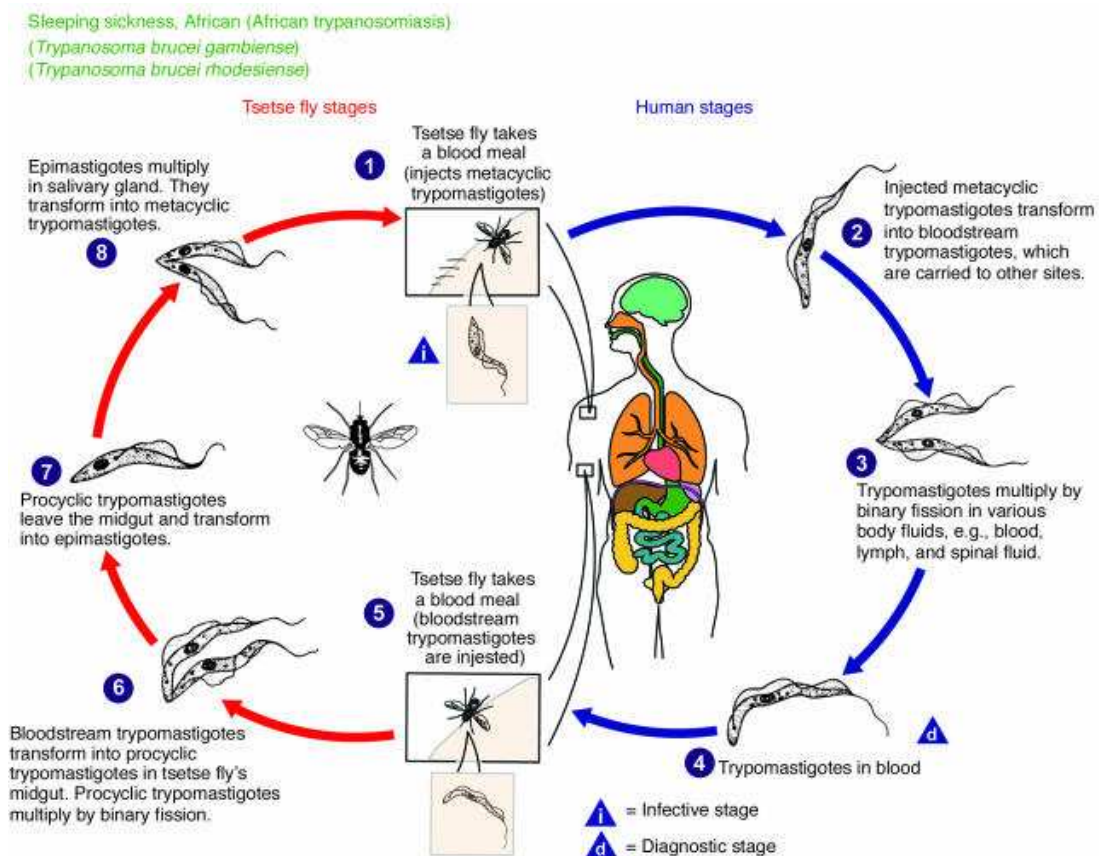
Trypanosoma brucei brucei je pouze parazit zvířat a člověk se tomuto parazitu dokáže ubránit, protože je tento parazit lyzován lidským krevním sérem, ve kterém je toxický HDLs (high density lipoproteins). Tato trypanozóma způsobuje nemoc zvanou nagana (Volf *et al.*, 2007). Nagana je přenášena mouchou tse-tse (*Glossina sp.*). Nemoc způsobuje ekonomické ztráty u domácího dobytka v Africe.

Trypanosoma brucei rhodesiense je schopna nakazit člověka spavou nemocí, jelikož je odolná vůči lidskému séru. Když se spavá nemoc neléčí, tak končí smrtí nakaženého jedince. Tento poddruh trypanosomy se nachází ve východní Africe, především v oblasti savan. *T.b.rhodesiense* je přenášena savanovými glosinami. *T.b.rhodesiense* způsobuje akutní spavou nemoc, která rychle postupuje, a smrt může nastat během měsíců. Tato trypanozóma představuje pouze 10% případů spavé nemoci.

Trypanosoma brucei gambiense se vyskytuje v západní a střední Africe v oblasti velkých řek. Hlavním hostitelem je člověk, ale hostitelem mohou být i domácí zvířata. I tato

trypanozóma způsobuje spavou nemoc, která je smrtelná, pokud se neléčí. Přenašečem jsou glosiny v okolí vodních toků (Schmidt & Roberts, 2009).

Trypanozómy se dostávají do těla přenašeče při sání hmyzu na nakaženém hostiteli. Procylická stádia (procyclic stage PS) se množí v útrokách trávicího traktu a po určité době pronikají do slinných žláz mouchy tse-tse, kde proběhne transformace v epimastigotní a následně trypomastigotní stádia, která jsou připravena na přenos do hostitele. Během sání hmyzího přenašeče se trypomastigotní trypanozómy dostávají do těla hostitele a v jeho krevním oběhu se dělí jako krevní stádia (bloodstream stage, BS). Jelikož je v krvi velmi silná imunitní odpověď hostitele, BS trypanozómy jí unikají díky změně svých povrchových antigenů. Po nějaké době parazit proniká přes mozko-míšň bariéru do mozkové tkáně a do mozkomíšního moku, kde vyvolává hlavní příznaky spavé nemoci. Příznaky spavé nemoci jsou opakující se horečky, malátnost, bolest hlavy, mozkové příznaky a poruchy spánku (Schmidt & Roberts, 2009). V Africe se spavá nemoc vyskytuje v samostatných ohniscích, kde se nachází větší počet much tse-tse a tato ohniska propukávají v epidemii (Hide & Tait, 2009).



Obr.1: Životní cyklus trypanozómy.

(Převzato: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC338269/figure/F2/>)

1.2 Mitochondrie

Mitochondrie jsou důležitou organelou u eukaryot, jelikož v nich vzniká energeticky bohaté ATP (adenosinrifosfát), které se tvoří díky procesům buněčného dýchání a toto ATP se poté využívá pro průběh jiných reakcí v buňce. Díky svému endosymbiotickému původu má mitochondrie dvě fosfolipidové membrány, vnější a vnitřní. Vnější membrána je hodně pórovitá a volně propustná pro malé molekuly, oproti tomu vnitřní membrána je téměř nepropustná pro ionty a je zvlněna v krysty, na kterých probíhají důležité metabolické pochody jako je například redukce molekul kyslíku za vzniku molekul vody pomocí enzymů dýchacího řetězce, či syntéza ATP oxidativní fosforylací. Vnitřní membrána propouští molekuly jen velice selektivně. Jsou na ni umístěny již zmíněné enzymy dýchacího řetězce, F_0F_1 ATP syntáza a ATP/ADP translokátor, který umožňuje export ATP, finálního produktu oxidativní fosforylace do cytosolu. Proteinový komplex TIM je také umístěn na vnitřní membráně a slouží k přenosu bílkovin do mitochondrie (Alberts *et al.*, 2008).

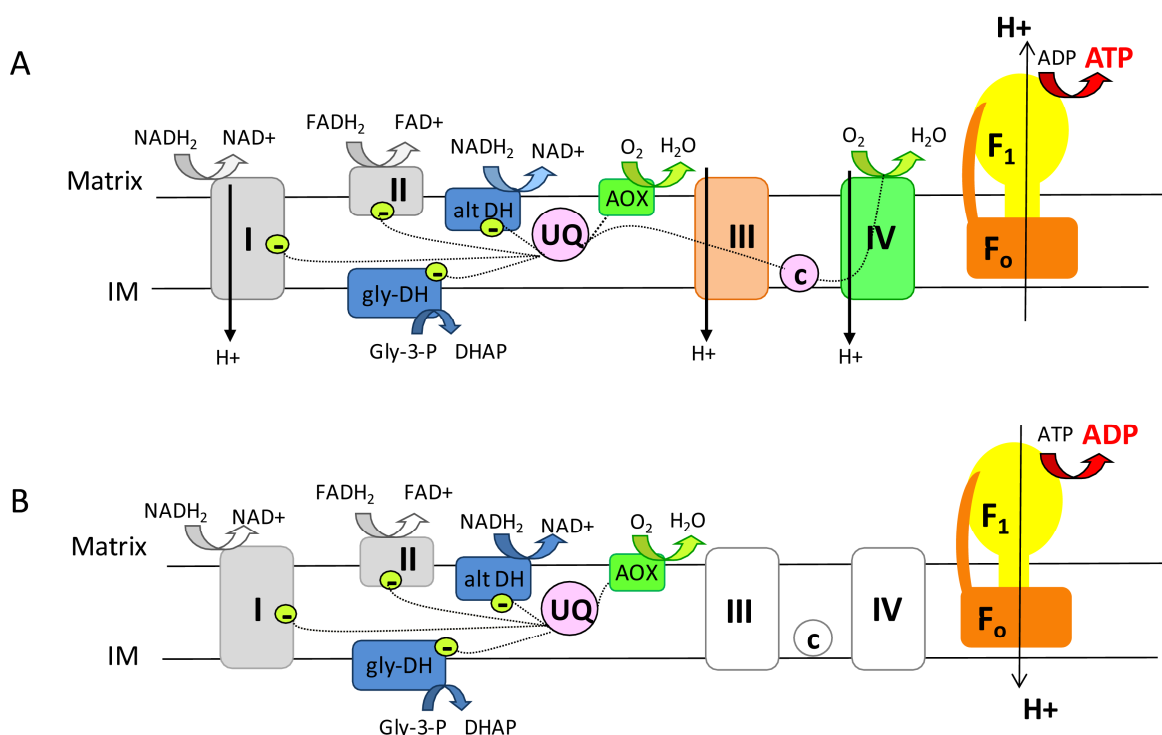
ATP se ve většině savčích buněk vytváří pomocí mitochondriální oxidativní fosforylace F_0F_1 syntázou. Syntéza ATP je spřažena s elektrochemickým protonovým gradientem na vnitřní mitochondriální membráně, který je vytvořen aktivitou proteinových komplexů I, III a IV respiračního řetězce, které fungují jako protonové pumpy. Tento protonový gradient je využíván komplexem F_0F_1 ATP syntázy pro syntézu ATP, který umožňuje návrat protonů zpět do matrix mitochondrie (Alberts *et al.*, 2008).

ATP je poté exportováno z mitochondrie do dalších částí buněk, kde je nezbytné pro esenciální buněčné procesy např. DNA replikace, transkripce, či translace, buněčné migrace, anebo udržování iontového gradientu, který je důležitý pro membránovou dráždivost. Mitochondrie mají také nezbytnou roli při udržování vápenné (Ca^{2+}) homeostáze a fungují jako hlídač buněčné smrti tím, že ukrývají pro- a anti-apoptické proteiny. Proton motivní síla zajišťuje mitochondriální transport, ADP fosforylaci, akumulaci Ca^{2+} a import proteinů, které jsou kódovány v jádře a dalších proteinů nacházejících se v mitochondriích (Alberts *et al.*, 2008).

Mitochondrie procyklických forem (PS) jsou metabolicky velmi podobné většině eukaryotických buněk. Tyto mitochondrie jsou plně vyvinuty s krysty, kompletním dýchacím řetězcem, enzymy Krebsova cyklu a s vysokou úrovní ATP syntázy. U PS buněk má klíčovou roli v energetickém metabolismu elektron-transportní řetězec. Kromě klasického respiračního řetězce obsahujícího komplexy I, II, III a IV, mitochondrie procyklických buněk, také obsahuje alternativní dráhu, která je schopna přenést elektrony z redukované

molekuly NADH na kyslík pomocí dvou enzymů, alternativní dehydrogenázy a alternativní oxidázy. Nicméně je nutno připomenout, že tato dráha není spjata s translokací protonů a tudíž není vytvářen membránový potenciál (Obrázek 2) (Besteiro *et al.*, 2005).

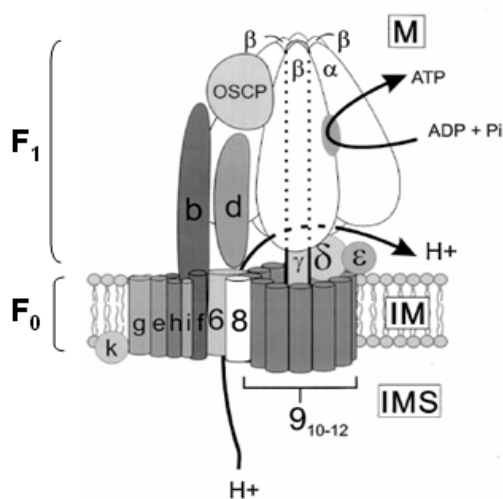
Mitochondrie krevní formy (BS) trypanozómy mají pouze malou roli v energetickém metabolismu a chybí jim většina komplexů dýchacího řetězce. Mitochondrie BS mají také komplex F_0F_1 ATP syntázy, nicméně v tomto případě tento komplex nevytváří ATP, ale spotřebovává ho za účelem tvorby transmembránového protonového gradientu (Schnauffer *et al.*, 2005)(Obrázek 2). Tyto mitochondrie si udržují svou esenciální funkci a tudíž stále obsahují proteinové komplexy, které jsou důležité pro import proteinů a klíčových metabolitů z cytosolu.



Obr. 2: Mitochondriální respirační řetězec v *T. brucei*. (A) hmyzí stádium, procyklická forma (B) krevní stádium . Komplexy ilustrované v barvě jsou aktivní a zásadní pro přežití parazita. Komplexy zobrazené šedě jsou přítomny v parazitické mitochondrii, avšak jejich funkce zůstává nevyužita. Komplexy v bílé barvě zcela chybí. Complex I – NADH:ubiquinone dehydrogenáza, II - sukcinát dehydrogenáza, III - cytochrom c reduktáza, IV - cytochrom c oxidáza, c - cytochrom c, UQ - ubiquinone, AOX - alternativní oxidáza, alt DH - alternativní dehydrogenáza, gly-DH - glycerol-3-fosfát dehydrogenáza, F_0F_1 ATP syntáza / F_0F_1 ATPáza, IM - vnitřní mitochondriální membrána.

1.3 F₀F₁ATP syntáza / FoF₁ATPáza

Komplex F₀F₁ATP syntázy je umístěn na vnitřní membráně mitochondrie a je schopen syntetizovat ATP díky elektrochemickému potenciálu, který je vytvořen během respirace respiračními komplexy I, III a IV (Alberts et al., 2008). Tento proces se nazývá oxidativní fosforylace. Komplex F₀F₁ATP syntázy je složen ze dvou hlavních podkomplexů, které se nazývají F₁ a F₀. F₁ podkomplex je hydrofilního charakteru a ční směrem do matrix mitochondrie. F₁ část je připojena k hydrofóbnímu podkomplexu F₀ pomocí centrálního stonku a periferního ramene. Podkomplex F₁ je složen z podjednotek α , β , γ , δ a ϵ . Celkem šest podjednotek α a β vytvářejí katalytické místo komplexu, kde dochází k syntéze či hydrolýze ATP. Podjednotky γ , δ a ϵ vytvářejí centrální stonek, který navazuje na membránovou část komplexu F₀. Podkomplex F₀ je složen z podjednotek c (9-12 kusů, počet záleží na typu organismu) (Watt *et al.*, 2010), které vytváří kruhovitou strukturu pevně ukotvenou v membráně. Podjednotka c vytváří spolu s mitochondriálně kódovanou podjednotkou a protonový pór, přes něhož dochází k přesunu protonů z mezimembránového prostoru do matrix mitochondrie. Pohyb protonů způsobuje rotaci podjednotek c a tato rotace se převádí na podjednotku γ , jenž se otáčí mezi podjednotkami α a β a tím mění jejich konformaci. V důsledku této konformační změny pak dochází k syntéze, či hydrolýze ATP na podjednotce β (Boyer, 1997).



Obr. 3: Schematické znázornění kvasinkové mitochondriální ATPázy.

Zobrazeny jsou všechny známé podjednotky F₀ a F₁ části. Centrální stonek se skládá z podjednotek γ , δ ϵ . Periferní rameno je zobrazeno tak, aby obsahovalo OSCP společně s podjednotkami b a d s možným zahrnutím podjednotek 8 a f . Podjednotka k , je jedna ze tří podjednotek, které mohou být

zapojeny ve vzniku dimeru ATP syntázy (jako podjednotky e a g). Podjednotka k je periferní membránový protein, který je lokalizován na vnitřním povrchu membrány v těsné blízkosti podjednotek e a g . Katalytické místo ATP syntázy se vyskytuje na rozhraní podjednotek α a β (Velours a Arselin, 2000).

Když je elektrochemický potenciál ohrožen například při nedostatku kyslíku nebo při poškození respiračních komplexů nebo při vzniku mutací mitochondriálně kódovaných respiračních proteinů, dochází ke snížení respirace, ke snížení pH matrixu, a v tomto případě thermodynamická rovnováha upřednostňuje opačnou aktivitu enzymu, kdy enzym může fungovat jako proton motivní ATPáza spotřebující ATP a přemísťující protony z mitochondriální matrix (Campanella *et al.*, 2008). Jelikož je tento proces spojen se spotřebou důležitého buněčného ATP (St-Pierre *et al.*, 2000), je hydrolytická aktivita komplexu regulována inhibičním faktorem 1 (IF1), proteinem kódovaným v jádře. Protein IF1 se váže na F_1 podkomplex a inhibuje jeho ATPázovou aktivitu. Tato inhibice je podmíněna snížením pH (6.5 – 6.7) v mitochondrii (Campanella *et al.*, 2009). Ve chvíli kdy je respirace obnovena a respirační komplexy I, III a IV opět pumpují protony přes mitochondriální membránu, dochází ke zvýšení pH v matrix mitochondrie, IF1 je uvolněn z komplexu a F_0F_1 ATP syntáza začíná opět syntetizovat ATP (Gledhill *et al.*, 2007a).

Inhibice hydrolytické aktivity F_0F_1 ATP syntázy pomocí inhibičního peptidu IF1 byla podrobně studována v hovězích buňkách srdce. Hovězí F_1 -ATPáza je inhibována dimerickou formou inhibičního proteinu IF1 (Cabezón *et al.*, 2003). Důležitou vlastností tohoto proteinu je jeho schopnost zabraňovat pouze ATP hydrolyze, nikoliv syntéze ATP. Existují různé ionty a přírodní produkty, jenž inhibují rotory ATP syntázy v mitochondriích tím, že se vážou na specifické místo v jeho F_1 katalytické doméně, nicméně tyto inhibitory obvykle inhibují oba směry katalýzy – syntézu a hydrolyzu. Např. antibiotika efrapeptins a aurovertins inhibují ATP syntázu a hydrolyzu zabráněním rotace centrálního rotoru ve směru hodinových ručiček i v protisměru hodinových ručiček, jelikož překážejí v uzavírání a otevírání katalytického rozhraní mezi podjednotkami α a β (Gledhill *et al.*, 2007b, Gledhill & Walker, 2006, Gledhill & Walker, 2005).

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* má ve své mitochondrii tři inhibující proteiny (IF₁, STF₁ a STF₂), které regulují ATP syntázu. IF₁ a STF₁ jsou proteiny, které se pojí s podkomplexem F_1 , zatímco STF₂ se pojí s doménou F_0 a tento protein sám o sobě nemá inhibiční aktivitu. Funkcí STF₂ je usnadnit navázání IF₁ a STF₁ na podjednotku F_1 (Cabezón *et al.*, 2002).

Krevní forma *T. brucei* je absolutně závislá na hydrolytické funkci F_0F_1 ATPázy, jelikož během této fáze životního cyklu parazita se v mitochondrii nevyskytují respirační komplexy III a IV, které by udržovaly mitochondriální membránový potenciál. Snížení exprese podjednotky α F_0F_1 -ATP syntázy metodou RNA interference bylo letální pro krevní stádium *T. brucei*. Tento letální efekt byl způsoben selháním mitochondriálního

membránového potenciálu, který je potřebný pro správnou funkci mitochondrie a její biogenezi (Schnauffer et al., 2005).

Jelikož je F_0F_1 ATPáza esenciální pro parazitickou buňku a zároveň má jinou aktivitu než F_0F_1 ATPsyntáza buňky člověka, je tento enzym možným cílem pro vývoj specifického inhibitoru s medicínským využitím, který by specificky inhiboval ATP hydrolytickou aktivitu tohoto komplexu.

1.4 Inhibiční peptid TbIF1 a jeho homolog TbIF2

Úplná sekvence genomu *T. brucei* (El-Sayed et al., 2005) umožnila identifikaci blízkého homologa bovinního a kvasinkového IF1. Přítomnost *T. brucei* inhibičního proteinu (TbIF1) znamená, že tento malý protein může být zapojen v regulaci parazitické F_0F_1 ATPsyntázi/ATPázy, dvě různé aktivity, které se střídají mezi dvěma životními stádii parazita. Over-exprese TbIF1 v *T. brucei* buňkách jednoznačně ukazuje, že exprese tohoto proteinu je letální pro krevní stádia trypanozómy, ale není letální pro PS trypanozómy. Letalita BS stádia byla způsobena snížením mitochondriálního potenciálu, poukazující na fakt, že TbIF1 inhibuje F_0F_1 ATPázu. Dále bylo ukázáno, že rekombinantní TbIF1 inhibuje hydrolytickou aktivitu F_0F_1 ATPázy *in vitro*. Tudíž specifická inhibice hydrolytické aktivity F_0F_1 ATPázy vede ke smrti krevních forem *T. brucei*. Tento inhibiční peptid TbIF1 byl lokalizován v mitochondriích (Panicucci, Zíková, manuskript v přípravě).

Při podrobném zkoumání genomu *T. brucei* byl odhalen také druhý domnělý F_0F_1 -ATPázový inhibiční kandidát, TbIF2.

```

bIF1      GSESGDNVRSSAGAVRDAGGAFGKREQAEEERYFRARAKEQLAALKKHHENEISHHAKET
TbIF2     -MSTVAELRQQLETLLKCRNGDE--IAQATKEVERLQKELEDIAAITEPIEKEINELQRQC
          .:  :*:..  :...  .*      ** :*      :  *::*:...:  *::*:..  ::

bIF1      ERLQKEIERHKQS-----IKKLLQSEDDD-----
TbIF2     MPGRRNRNDSKSSNSGASILSNVMLGLVDPNDGKCKKR
          :::  :  *.*          *   :  :*

yIF1      MLPRSAIARSLQLQRGVAARFYSEGSTGTPRGS-GSEDSFVKRERATEDFFVQRQKEQL
TbIF2     MSTVAELRQQLETLLKCRNGDEIAQATKEVERLQKELEDIAAITEPIEKEINELQRQCMPG
          * . : * :*: : .  :...  . * .  ** . *  :::  **:

yIF1      RHLKEQLEKQRKKIDSLENKIDSMTK-----
TbIF2     RRRNRNDSKSSNSGASILSNVMLGLVDPNDGKCKKR
          *:  :::  :...  . *.*  :  :...

```

Obrázek 4: Srovnání aminokyselinových sekvencí proteinů TbIF2, bIF1 (bovinní IF1), yIF1 (kvasinkový IF1) pomocí programu CLUSTAL W (1.83).

K definování inhibičních vlastností TbIF2 *in vivo*, byl tento protein over-exprimován v BS buňkách *T. brucei*. Westernový přenos byl použit k posouzení expresní úrovně TbIF2 v BS *T. brucei* buněk. Metoda IFA (*Immunofluorescence assay*) byla použita k lokalizaci tohoto proteinu.

Cílem této bakalářské práce bylo objasnit, zda tento malý protein se také váže na F_0F_1 ATPásový komplex a inhibuje jeho aktivitu a zda je zahrnut v regulaci aktivity F_0F_1 ATPázy *T. brucei*.

2. Cíle bakalářské práce

1. Zaklonovat TbIF2 gen do expresního vektoru pT7_v5
2. Overexprimovat TbIF2_v5 protein v BS *T. brucei*
3. Lokalizovat TbIF2_v5 v rámci jedné buňky BS *T. brucei*

3. Metodika

3.1 Navrhování PCR primerů

Primery byly navrženy pro zmnožení genu TbIF2 metodou PCR (Tab I.).

Tab I: Navrhované primery.

Primer	Sekvence
Tb TbIF2 Fw (HindII)	5' AAGCTT ATGTCGACTGTGGCG
Tb TbIF2 Rev (BglIII)	5' AGATCT TCGCTTTTTGCATTCC

3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR nám umožňuje získat specifické sekvence genomové DNA.

Princip: Základem PCR je replikace nukleových kyselin. Enzymová syntéza nových řetězců se cyklicky opakuje ve směru 5' → 3' za pomoci DNA-polymerázy. Úsek DNA, který chceme namnožit, musí být ohraničen primery, což jsou krátké oligonukleotidy DNA. Primery se navazují na protilehlé řetězce DNA tak, že 3'-konce směřují proti sobě. Když přidáme DNA-polymerázu a nukleotidy, tak se nová vlákna syntetizují protisměrně. DNA-polymerázy musejí odolat teplotám, při kterých DNA denaturuje. To je dobré, aby se syntéza DNA mohla opakovat. Střídají se tři kroky. Prvním krokem je denaturace. V tomto kroku dojde k uvolnění vodíkových můstků a rozvolnění dvoušroubovice. Tento krok probíhá za teploty 96° C. Druhým krokem je nasedání primerů k odděleným řetězcům DNA. Probíhá při teplotě 30-65° C. Posledním krokem je syntéza nových řetězců DNA za pomoci DNA-polymerázy při teplotě 65-75° C.

Na 50μl reakce bylo použito:

Genomická DNA (100ng/ μl)	1μl
Primer Fw 10μM	1μl
Primer Rew 10μM	1μl
dNTPs (10mM každý)	1μl
10x PCR pufr	5μl
Taq polymeráza (1U/μl)	0,3μl
MiliQ H ₂ O	40,7μl

Program:

Denaturace	96° C 5 minut
Denaturace	94° C 1 minuta
Nasedání primerů	55° C 1 minuta
Polymerace	72° C 1,5 minut
Polymerace	72° C 10 minut

3.3 Agarózový gel

Gel byl připraven tak, že bylo smícháno 450 mg agarózy a 60 ml pufru TAE (2M Tri-base, 5,7% kyselina octová, 50mM O,5M EDTA pH 8). V mikrovlnné troubě se agaróza nechala rozpustit v pufru. Po vychlazení na cca 70° C bylo přidáno 5µl ethidium bromidu. Pomocí tohoto agarózového gelu byla zkontrolována velikost PCR produktu.

3.4 Izolace z gelu

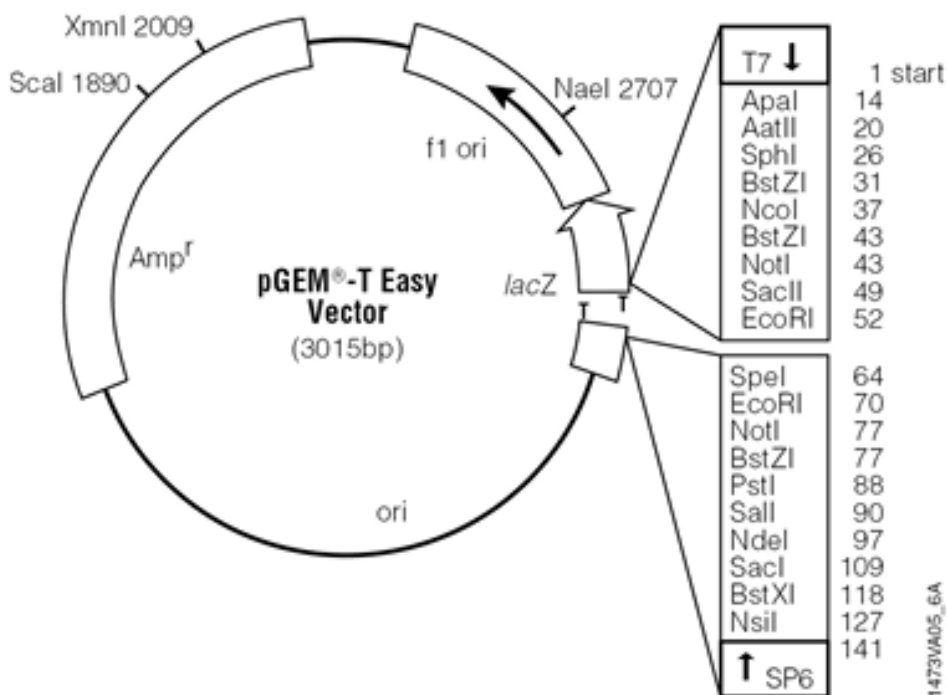
DNA byla vyizolována z gelu podle protokolu kitu QIAquick Gel Extraction (QIAGEN).

3.5 Klonování DNA

Klonování DNA je proces, při kterém vznikají klony DNA. Klon DNA je soubor identických molekul, které vznikly množением molekul DNA v hostitelské buňce-*in vivo* nebo pomocí PCR-*in vitro*. Molekula DNA je přenášena klonovacím vektorem, který přijme cizorodou DNA, spojí se s ní a replikuje v hostitelské buňce.

3.5.1 Ligace do pGEM-T easy plazmidu

Vektor pGEM-T easy (Promega) byl použit podle instrukcí firmy. Plazmid je na Obr 4.



Obr.5: Vektor pGEM-T easy.

Na 10μl reakce bylo použito:

T4 DNA 2x pufr	5μl
Insert Tb IF2 (6,4ng/ μl)	4,5μl
Plastid pGem-T easy	0,5μl
T4 DNA ligáza	1μl

Reakce se inkubovala hodinu na stole.

3.5.2 Transformace do XL1-Blue *E.coli*

Kompetentní buňky XL-1 Blue se nejprve nechaly stát po dobu 20 minut na ledě, aby rozmrzly. Do předchlazené, čisté Ependorfovy zkumavky bylo smícháno 100μl buněk se 3μl ligace. Poté se buňky nechaly stát 30 minut na ledě. Po třiceti minutách byl proveden tepelný šok, kdy buňky byly dány na 45 sekund do 42° C vodní lázně. Po vodní lázni se nechaly stát 2 minuty na ledě. Pak se přidalo 300μl SOC (2% tryton, 0,5% kvasnicovy extrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM glukózy) a buňky se nechaly třepat ve 37° C po 45 minut. Mezitím byla připravena ampicilinová miska na modrobílou selekci, kam bylo přidáno 50μl IPTG (100mM) a 20μl X galu (200mg/ml), potom bylo rozetřeno 50μl buněk. Miska se nechala inkubovat přes noc ve 37° C.

3.5.3. Izolace plazmidové DNA z miniprepu

Vybraná, narostlá kolonie byla přenesena do 3 ml LB média (1% trypton, 1% NaCl, 0,5% kvasný extrakt) a byly přidány 3 μ l ampicilinu (100mg/ml). Miniprepy se inkubovaly přes noc ve 37° C. Izolace plazmidové DNA byla provedena podle QIAprep Spin Miniprep Kit QIAGEN.

3.6. Restrikční analýza plazmidové DNA pGEM-Teasy obsahující TbIF2 inzert

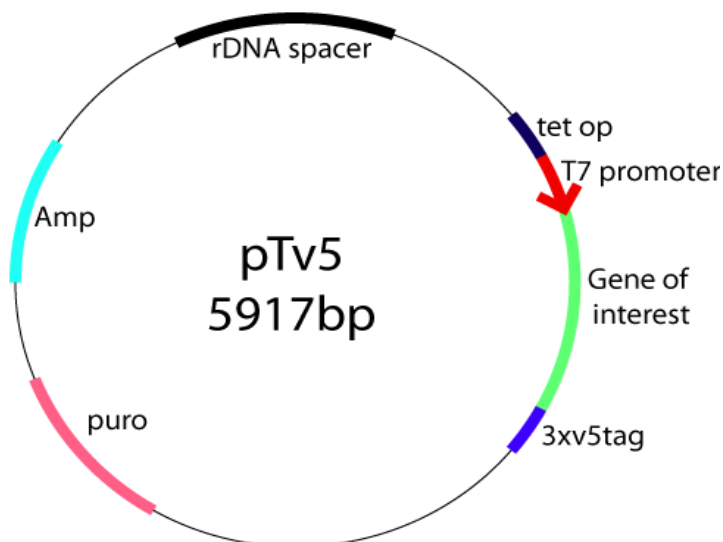
Na 15 μ l reakce bylo použito:

10x pufr	1,5 μ l
Plazmidová DNA	7 μ l
Enzym BglIII/HindIII	0,2 + 0,2 μ l
MiliQ H ₂ O	6,3 μ l

Reakce probíhala 1 hodinu při teplotě 37° C.

Restrikční analýza byla ověřena na 0,75% agarózovém gelu.

3.7 Ligace do pT7v5



Obr. 6: Plasmid pT7v5 (Flaspohler *et al.*, 2010).

Plasmid byl nejprve rozstříhnut restrikčními enzymy BamHI a HindIII (Fermentas).

Na 50 μ l reakce bylo použito:

pTv5 (10 μ g)	15 μ l
10x pufr	5 μ l
MiliQ H ₂ O	29 μ l
Enzymy BamHI, HindIII	0,5 μ l , 0,5 μ l

Reakce probíhala 3 hodiny ve 37° C.

Pozitivní pGEM-T_TbIF2 byl naštípán enzymy BglII a HindIII (Fermentas).

Na 50 μ l reakce bylo použito:

pGEM-T/TbIF2	15 μ l
10x pufr	5 μ l
MiliQ H ₂ O	28,5 μ l
Enzymy BglII, HindIII	1 μ l, 0,5 μ l

Reakce probíhala 3 hodiny ve 37° C a správnost reakce byla ověřena na 0,75% agarózovém gelu.

DNA byla poté vyizolovaná z gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction, byla změřena koncentrace DNA pomocí Nanodrop spektrofotometru a namíchána ligační reakce.

Na 10 μ l ligace bylo použito:

Plasmid pT7v5 (62 ng/ μ l)	3 μ l
Insert Tb IF2 (20 ng/ μ l)	1,3 μ l
T4 DNA ligáza	0,5 μ l
T4 DNA 10x pufr	2 μ l
MiliQ H ₂ O	3,2 μ l

Pak bylo 5 μ l z ligace transformováno do buněk podle předchozího schématu. Izolace z miniprepů dle předchozího schématu.

3.8 Sekvencování DNA

Pomocí sekvencování se zjistí pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Sekvencování probíhá za pomoci PCR primerů. Plasmidy pGEM-T_TbIF2 byly sekvencovány pomocí

komerčních primerů T7 a SP6. Plasmidy pTv5_TbIF2 byly sekvencovány pomocí PCR primerů. Metodou sekvenování byla ověřena správnost inzertu, vyloučeny mutace v nukleotidech a posuny v rámci čtecího rámce.

3.9 Linalizace plazmidu pT7v5_TbIF2

Plasmid byl rozštěpen enzymem NotI (Fermentas).

Na 50μl reakce bylo použito:

10x pufr 3	5μl
Plasmidová DNA (20μg)	17μl
100x BSA	0,5μl
NotI	1,5μl
MiliQ H ₂ O	26μl

Reakce probíhala ve 37° C přes noc. Další den byla přečištěna 2,5 objemu (125μl) etanolem a 0,1 objemu (5μl) sodiem acetátu. Reakce byla inkubována v -20° C po dobu 30 minut. Poté byl pelet promyt 70% etanolem, sterilně vysušen na vzduchu a resuspendován 30μl MiliQ H₂O.

3.10 Kultivace BS *T. brucei*

Krevní forma buněk rostla v HMI-9 médiu v 37° C. Buňky „single marker“ (SM) rostly pod selekcí na G-418 (2,5μg/ml) (HMI-9/G). Vyselektované buňky pro transfekci pTv5_TbIF2 rostly pod selekcí na G-418 (2,5μg/ml) a puromycin (100ng/ml) (HMI-9/G/PURO).

Na 1l HMI-9 média je potřeba:

Sodium bicarbonat	3g
IMDM	17,7g
Hypoxantin	0,136g
Sodium pyruvát	0,110g
Thymidin	0,039g
Batocuproin sulfát	0,028g
L-cystein	0,182g
MiliQ H ₂ O	0,8l
Upravit pH	7,4
Streptomycin	10 ml
MiliQ H ₂ O	Doplnit do 1l

3.11 Transfekce linearizovaného plazmidu pT7v5_TbIF2 do BS

T. brucei

Nejprve bylo sklizeno 3×10^7 narostlých buněk pomocí centrifugace (1300x g, 10 minut). Pelet byl promyt 20 ml sterilního PBS-G (0,01M Na₂HPO₄ x 12H₂O, 0,01M NaH₂PO₄x2H₂O, 0,15M NaCl, 0,45M glukózy). Do buněk bylo přidáno 10μg linearizované DNA. Poté byl pelet resuspendován v 100μl AMAXA lidském T-buněčném roztoku. Buňky s plazmidem byly přeneseny do kyvety a elektroporovány přístrojem ECM650. Buňky byly přeneseny do 30 ml HMI-9 media, tím byla získána kultura o koncentraci 1×10^7 buněk/ml. Pak byly přidány 3 ml do 27 ml media, poté byl proces ještě jednou zopakován. Tím byly získány kultury B a C o koncentraci 1×10^6 a 1×10^5 buněk/ml. Každé ředění bylo rozděleno po 1 ml na 24 jamkovou misku a inkubováno 16 hodin v 37° C.

Po 16 hodinách byl přidán do každé jamky 1 ml HMI-9/G/PURO. Misky byly dále inkubovány ve 37° C až do té doby, než proběhla selekce.

3.12 SDS page elektroforéza a westernový přenos

Princip SDS page elektroforéza: SDS page elektroforéza slouží k separaci proteinů podle jejich elektroforetické pohyblivosti. Ke vzorkům je přidáváno SDS, které slouží k denaturaci proteinu a vzhledem k jeho molekulární hmotnosti učiní daný protein záporným. Dále jsou vzorky zahřívány alespoň na 60° C, což také podporuje denaturaci proteinu. Gel se tvoří

z akrylamidu, bisacrylamidu, SDS a ze zarovňovacího gelu, který má změněné pH. Temed je přidáván proto, aby zahájil polymeraci. Akrylamidová koncentrace může být v rozmezí od 5%-25%. Vysoké molekulární hmotnosti proteinů se rozdělují na nízko procentních gelech. Když je gel zpolymerizován, přidá se pufr a nanesou se vzorky do gelu. Poté může být elektroforéza zpuštěna.

Princip westernového přenosu: Western blot je analytická metoda, která se používá k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny. V této metodě je využívána gelová elektroforéza k separaci proteinů podle jejich velikosti. Poté jsou proteiny přeneseny z gelu na povrch membrány, kde jsou detekovány užitím specifických protilátek. Prvním krokem je rozdělení antigenu podle své molekulové hmotnosti, kdy je nanesen do polyakrylamidového gelu a separován v elektrickém poli za použití SDS-PAGE elektroforézy. Jednotlivé proteiny vytvářejí v gelu bandy. Druhým krokem je přenos proteinu z gelu na nitroceluloseovou membránu pomocí blotovacího zařízení působením elektrického proudu. Blotovací zařízení se skládá z anody, na ni se pokládá v pufru namočená houbička, na ni přijde filtrační papír, který je také namočen v pufru, na ten se položí gel-membrána-filtrační papír-houbička a nakonec přijde katoda. Po ukončení přenosu přichází třetí krok a to je blokování. Povrch membrány musí být zablokován, aby nedošlo k interakci mezi membránou a později přidanými protilátkami, které se používají k detekci proteinu. Blokování se provádí umístěním membrány do zředěného roztoku nějakého levného proteinu např. BSA nebo do netučného suchého mléka v PBS s přidavkem slabého detergentu jako je Tween20 (PBST). Proteiny z roztoku se navážou na všechna místa, kam se dosud nenavázaly proteiny při přenosu. K detekci proteinu se používá specifická primární protilátka (obvykle myší, nebo králíčí) proti tomuto proteinu. Po blokování je tudíž membrána přenesena do zředěného roztoku primární protilátky v pufrovaném roztoku BSA či mléčného kaseinu. Po přidání protilátky si molekuly imunoglobulinu musí specificky vyhledat svůj epitop na přebloetovaných antigenech. Inkubace probíhá za mírného míchání a může probíhat 1 hodinu, ale i přes noc. Po opláchnutí membrány pufrovaným roztokem detergentu (obvykle PBST) jsou odstraněny nenavázané primární protilátky, a poté je membrána přenesena do roztoku sekundární protilátky. Sekundární protilátky jsou nejčastěji protilátky proti myším či králíčím proteinům a jsou konjugovány s nějakým reportérovým enzymem umožňujícím vizualizaci. Jako reportérový enzym se velmi často používá horse-radish peroxidáza (HRP), která katalyzuje oxidaci luminolu 3-aminoftalát na několik meziproductů. Reakce je doprovázena emisí s nízkou intenzitou světla 428 nm, která pod kamerou svítí a tudíž může být redukována.

Postup:

Příprava vzorků na SDS PAGE elektroforézu: Buňky byly přelity do 50 ml falkon tak, aby měli 5×10^7 buněk. Centrifugovaly se ve 4°C po 10 minut na 13000xg, potom bylo vylito medium a buňky resuspendovány v 1ml nesterilního PBS-G a přeneseny do 1,5ml Ependorfových zkumavek. Opět byly dány do centrifugy na 4°C po 10 minut na 13000xg, supernatant byl vylit a zbytek vysát pipetou. Pelet byl resuspendován v 100ul 1xPBS, přidáno 50ul 3xSDS PAGE (150mM Tris pH 6,8, 6% SDS, 0,3% bromfenolová modř, 30% glycerol, 300mM dithiothreitol) nanášecí barvičky. Vzorky byly dány na 7 minut do heat bloku na 97°C .

SDS page elpo : Mezitím byla připravena aparatura na elektroforézu a 12-ti% gel. Po zatuhnutí tohoto gelu, byl přidán 5-ti% gel, to proto, aby se vzorky dostaly na stejnou úroveň (složení gelu viz. Molecular Cloning, Sambrook a kol., 2001). Pak byly nanесeny vzorky, dolit pufr a byl puštěn elektrický proud na 90V a po 30 minutách byl proud zvýšen na 120V. Mezitím byla připravena membrána a další materiál pro přenos.

Western blot: Po vyjmutí gelu bylo složeno blotovací zařízení: anoda-houbička-filtrační papír-gel-membrána-filtrační papír-houbička-katoda. K přenosu proteinu na membránu dochází po dobu 90 minut a při napětí 90V. Poté byla vyjmuta membrána a vložena do 5% mléka (5g/100ml PBST) a byla dána přes noc do 4°C . Další den byla membrána inkubována po 1 hodinu v primární protilátce při pokojové teplotě. Použita byla protilátka anti -V5 (1:2000), která je monoklonální, to znamená, že se váže jen na 1 epitop, a byla vytvořena v myších buňkách. Potom byla membrána promyta 3x10 minut v PBS-T. Po další hodinu byla membrána inkubována se sekundární protilátkou, která byla anti-myší (1:2000). A poté byla membrána opět promyta 5x10 minut v PBS-T a signál byl detekován pomocí záznamového zařízení pro detekci chemiluminiscence LAS 3000).

3.13 Digitoninová frakcionace

Postup: Příprava frakce celých buněk:

Bylo potřeba sklídit 1×10^7 buněk a stočit v centrifuze při 1300xg po 10 minut a při 4°C . Po odebrání supernatantu byly buňky nechány na ledě a pelet resuspendován v 1ml PBS-G. Pak byly buňky opět stočeny při 1300xg po dobu 10 minut a při teplotě 4°C . Pelet byl resuspendován ve 100ul 1x PBS a bylo přidáno 50ul 3x SDS PAGE a nechaly se povařit 7 minut při teplotě 97°C .

Postup: Příprava mitochondriální a cytosolické frakce

Bylo potřeba sklídit 1×10^8 buněk a stočit v centrifuze při 1300xg po 10 minut a při 4° C. Po odebrání supernatantu byly buňky nechány na ledě a pelet resuspendován v 5ml PBS-G. Objem byl upraven na 14 ml s PBS-G. Pak byly buňky stočeny při 1300xg po dobu 10 minut a při teplotě 4° C. Pelet byl resuspendován v 1ml PBS-G. Poté byly buňky opět stočeny při 1300xg po dobu 10 minut a při teplotě 4° C. Pelet byl resuspendován v 500 μ l SoTE a bylo přidáno 500 μ l SoTE/0,03% digitonin. Buňky byly inkubovány 5 minut na ledě a po 5 minutách stočeny na 7000rpm po dobu 3 minut a při teplotě 4° C. Supernatant (cytosolická frakce) byl přenesen do nové zkumavky a z ní bylo odebráno 100 μ l do nové zkumavky a přidáno 50 μ l 3x SDS PAGE. Mitochondriální pelet byl nesuspendován ve 100 μ l x PBS a bylo přidáno 50 μ l 3x SDS PAGE. Oba vzorky se nechaly povařit po dobu 7 minut při 97° C.

3.14 Lokalizace proteinu pomocí *imunofluorescence*

Postup: Nejprve byla dána krycí sklíčka do 24 jamkové misky. Na krycí sklíčka bylo naneseno 20 μ l poly-L-lysine a poté byla miska umístěna na hodinu do 37° C. Po hodině byla sklíčka třikrát promyta 100 μ l 1x PBS. Mezitím bylo sklizeno 5×10^7 buněk, indukovaných i neindukovaných. Buňky byly stočeny při 1300xg po 10 minut. Pelet byl resuspendován v 1ml média HMI-9/G/PURO. Buňky byly přeneseny do nádoby a bylo přidáno 50ml čerstvého média HMI-79G/PURO. Do indukovaných buněk bylo přidáno 10 μ l tetracyklinu a do obou nádob s buňkami bylo přidáno 2,5 μ l 500uM roztoku Mitotrackeru. Poté se daly buňky inkubovat do 37° C po dobu 30 minut. Po 30 minutách byly buňky opět stočeny s 1300xg po dobu 10 minut. Pelet byl resuspendován 50 ml média s antibiotiky a buňky byly ve 37° C po dobu 10 minut. Pak byly zředěny tak, aby bylo neindukovaných i indukovaných buněk 2×10^7 . V padesáti mililitrových falkonách byly buňky stočeny při 1300xg po dobu 10 minut a při teplotě 4° C. Pelet byl resuspendován 1ml PBS-G a buňky byly převedeny do 1,5ml Ependerfových zkumavek a byly opět stočeny při 1300xg po dobu 10 minut a při teplotě 4° C.

Fixace buněk: Supernatant s PBS-G byl oaptrně odstraněn a pelet resuspendován v 200 μ l 1x PBS. Potom bylo přidáno 200 μ l 7,4% formaldehydu v 1x PBS. Na krycí sklíčka bylo dáno 40 μ l fixovaných buněk a nechaly se inkubovat 15 minut. Po 15 minutách byla sklíčka promyta 3x 100 μ l 1x PBS.

Permeabilizace buněk: Buňky byly permeabilizovány 100μl 0,1% Tritonem X-100 v 1x PBS po dobu 10 minut. Po 10 minutách byl pufr odstraněn a sklíčka byla promyta 3x 100μl 1x PBS.

Blokování buněk: Blokování probíhalo po dobu 45 minut se 100μl 5,5% FBS v 1x PBS-T (0,05% Tween). Po dokončení blokování byl pufr odstraněn a sklíčka byla promyta 2x s 1x PBS.

Primární protilátka: Bylo přidáno 40μl primární protilátky v požadovaném měření v 3% BSA v 1x PBS-T a inkubováno po 1 hodinu. Po inkubaci byla protilátka odstraněna a sklíčka promyta 3x ve 100μl 1x PBS-T a 2x ve 100μl 1x PBS.

Sekundární protilátka: Nejprve byla připravena sekundární protilátka v 3% BSA v 1x PBS-T. Poté bylo dáno na sklíčka 40μl sekundární protilátky a necháno inkubovat 1 hodinu ve tmě. Po hodině byla protilátka odstraněna a sklíčka promyta v 3x ve 100μl 1x PBS-T a 2x ve 100μl 1x PBS.

Příprava sklíček na prohlížení: Krycí sklíčka byla dána na podložní sklíčko a před prohlížením musela být alespoň 24 hodin ve tmě.

Používané roztoky:

Na 2 ml Formaldehydu Fix bylo potřeba:

1x PBS	1,6 ml
37% Formaldehyd	0,4 ml

Na 1 ml blokovacího roztoku bylo potřeba:

1x PBS-T	945μl
100% FBS	55μl

Na 400μl primární protilátky (1:200) bylo použito:

1x PBS-T	280μl
10% BSA	120μl
Anti-V5	2μl

Na 400μl sekundární protilátky (1:400) bylo použito:

1x PBS-T	280μl
10% BSA	120μl
Anti-myší	1μl

4. Výsledky

4.1 Klonování genu Tb IF2 do vektoru pT7-v5

Sekvence genu TbIF2 (285 bp):

```
ATGTCGACTGTGGCGGAGCTCCGCCAACAGTTGGAGACCCTCAAAAAACGCAATGGGGATGA  
AATTGCACAAGCGACAAAAGAGGTGGAAAGGTTACAGAAGGAATTGGAAGATATTGCCGCCA  
TCACTGAGCCCATTGAGAAGGAAATCAACGAACTTCAACGCCAATGCATGCCGGGACGCCGT  
AACCGCAATGATTCCAAAAGCAGCAACTCGGGAGCTTCCATTTTATCAAATGTTATGTTGGG  
TTTAGTGGATCCCAATGATGGGAAATGCAAAAAGCGATGA
```

Červeně jsou vyznačeny START a STOP kodóny, modře je vyznačena sekvence restričního enzymu BamHI.

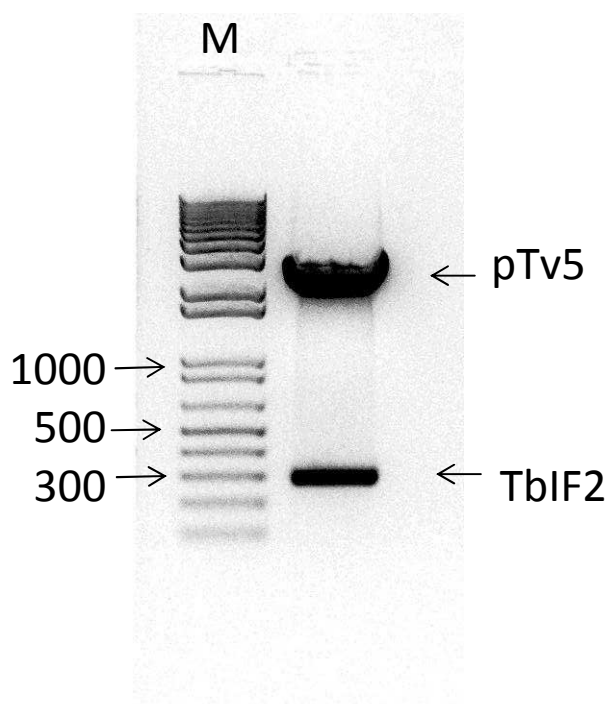
Primery:

TbIF2 (HindIII) Fw: CACAAGCTTATGTCTGACTGTGGCG

TbIF2 (BglII) Rev: CACAGATCT TCGCTTTTGCATTTC

Restrikční místa jsou vyznačena podtržením.

Požadovaný úsek DNA byl zmnožen pomocí polymerázové řetězové reakce. Správnost délky DNA byla ověřena pomocí agarózového gelu. Podle očekávání byla délka produktu necelých 300 bp. DNA byla z gelu vyizolována podle protokolu kitu QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) a zaklonovaná do vektoru pGEM-T Easy. Poté byla DNA zatransformovaná do buněk XL-1 Blue. Narostlé kolonie byly vysazeny do miniprepů a z nich vyizolována plasmidová DNA podle protokolu kitu QIAprep Spin Miniprep Kit QIAGEN. Pak byl TbIF2 inzert zaklonován do vektoru pT7_v5 (Flaspohler et al., 2010). Zda bylo klonování úspěšné bylo ověřeno restriční analýzou enzymy BamHI a HindIII. Po ověření velikosti na agarósovém gelu bylo zjištěno, že klonování bylo správné.



Obr.7: Obrázek z gelu restriční analýzy.- Písmenem M je označen marker 1Kb plus marker (Invitrogen).

4.2 Vytvoření buněčné linie BS *T. brucei*

Princip linie single marker (SM): T7 polymeráza a tet represor je v genomu *T. brucei* pod G-418 selekcí. Tyto dva geny umožňují inducibilní expresi cílového genu TbIF2.

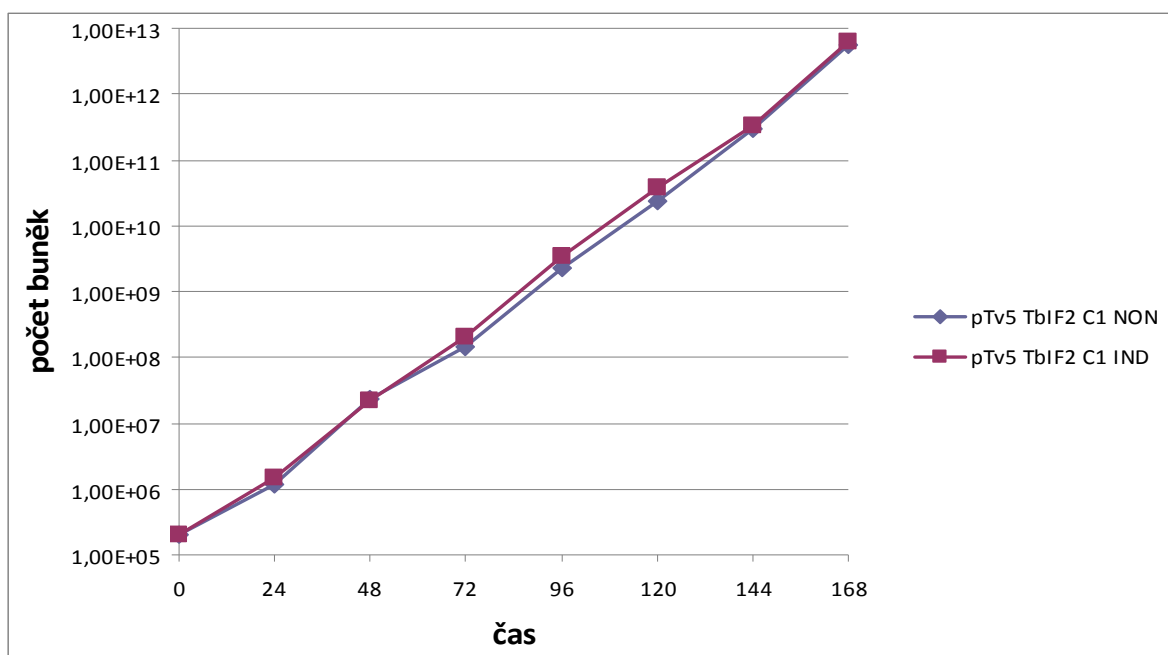
Buněčná linie byla vytvořena transfekcí, kdy se za pomoci elektrického proudu buňka otevřela na 1 sekundu a linearizovaný vektor prošel dovnitř. Vektor se dostává do jádra a je jím přijímán na základě homologní rekombinace, což je výměna úseků DNA se stejnou nebo jen nepatrně jinou sekvencí. Vektor pT7_v5 se integruje do lokusu, který obsahuje geny pro ribozomální RNA. Pro selekci buněk, jež úspěšně integrovaly linearizovanou DNA pTv5_TbIF2 do svého genomu, byl použit puromycin.

4.3 Růstová křivka

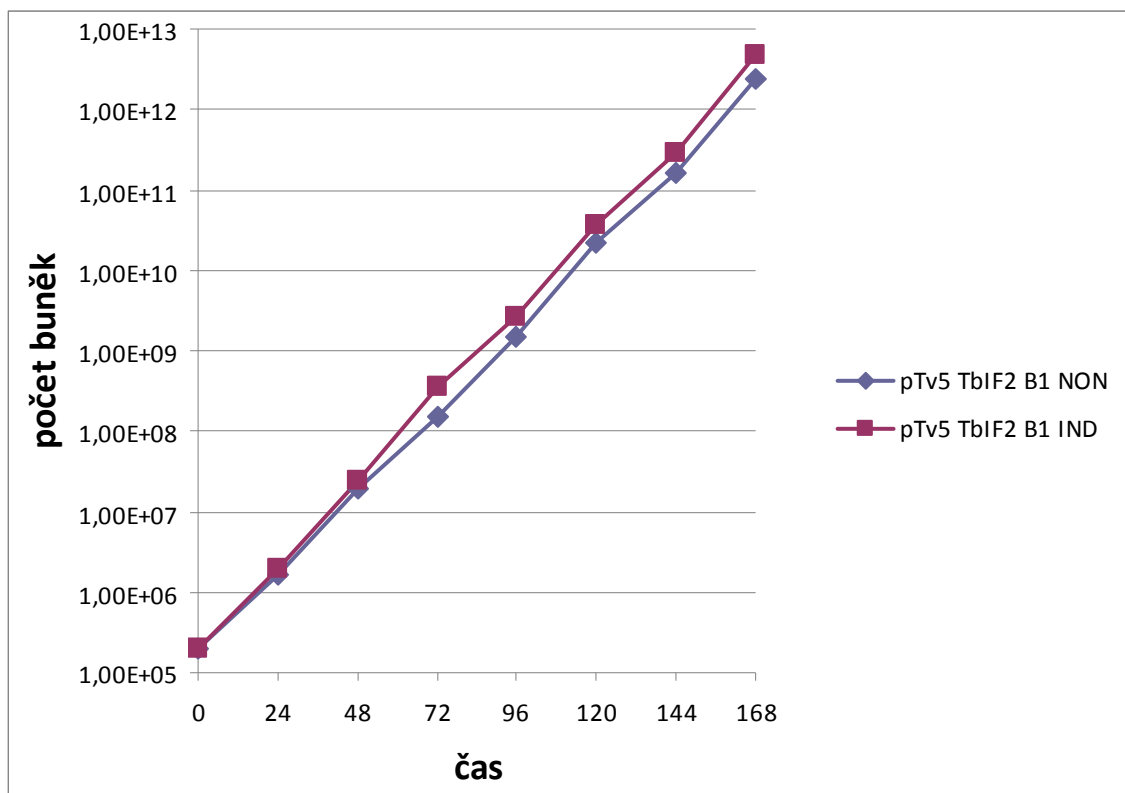
Princip exprese tagovaného proteinu za pomoci indukce tetracyklinu: Buňky *T. brucei* exprimují T7 polymerázu a tetracyklinový represor, který se váže na tet operon v plasmidu pTv5_TbIF2. V tomto případě nedochází k transkripci. Po přidání tetracyklinu do média, dojde k vyvázání tetracyklinového represoru, tím se T7 promotor uvolní a T7 RNA polymeráza může nasednout a začít přepisovat.

Pomocí tetracyklinu byla spuštěna exprese TbIF2_v5. V případě, že tento protein interferuje s ATPázovou aktivitou F_0F_1 ATPázy, buňky exprimující TbIF2_v5 by rostly mnohem pomaleji z důvodu této inhibice.

Hustota buněk byla měřena každých 24 hodiny po dobu 8 dnů. Buňky rostly v médiu HMI-9G/PURO a každý den byly naředěny do výchozí koncentrace 2×10^5 buněk/ml. Měřeny byly dva klony (C1 a B1), z čehož byl každý rozdělen na indukovaný a neindukovaný klon. Do indukovaných buněk byl každý den přidáván tetracyklin ve výsledné koncentraci $1 \mu\text{g/ml}$.



Obr.8: Růstová křivka pro klon C1.



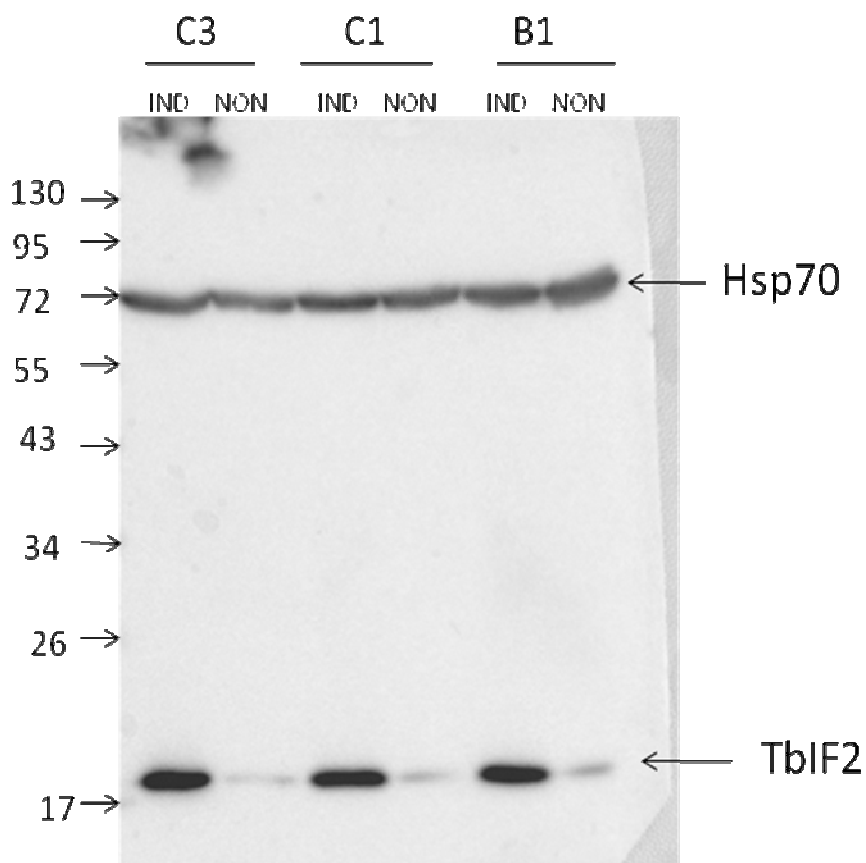
Obr.9: Růstová křivka pro klon B1.

Po dobu 8 dnů neindukované a indukované buňky rostly stejnou rychlostí. Z tohoto výsledku vyplývá, že exprese genu TbIF2_v5 nemá vliv na růst buněk a pravděpodobně neinhibuje ATPázovou aktivitu.

Aby tento výsledek byl platný, musela být ověřena exprese genu TbIF2_v5.

4.4 Ověřování indukce tagovaného proteinu TbIF2 pomocí western blotu

Na gel bylo nanášeno 1×10^7 buněk. Pomocí western blotu byl detekován protein TbIF2_v5. Jako nanášecí kontrola byla použita protilátka rozeznávající mitochondriální protein Hsp70 (Panigrahi *et al.*, 2008).



Obr.10: Detekce proteinu TbIF2 pomocí western blotu. C3, C1 a B1 je označení vzorků. NON – buňky neindukované, IND – buňky indukované.

4.5 Buněčná lokalizace TbIF2_v5 pomocí digitoninové frakcionace

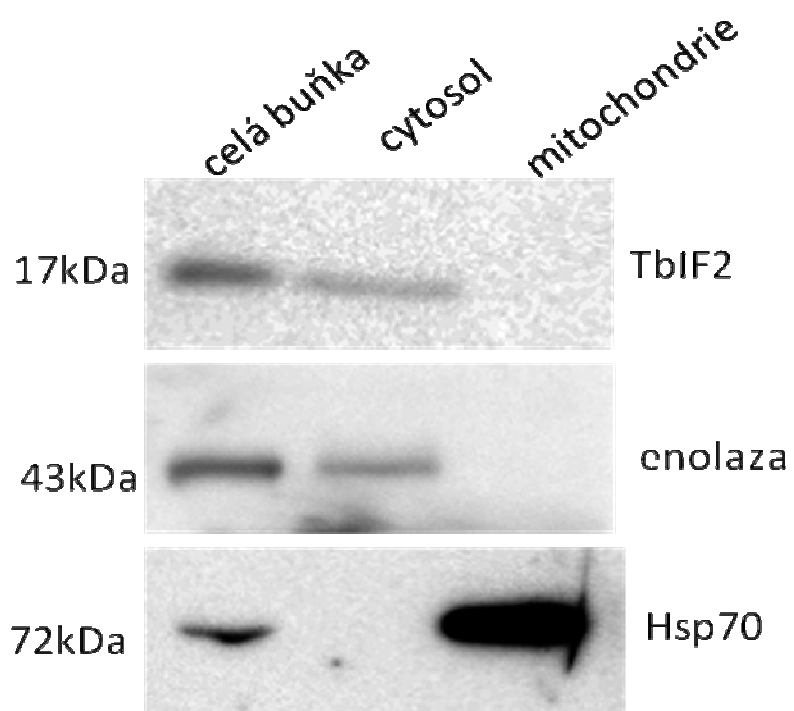
Pokud TbIF2 je schopen inhibice F_0F_1 ATPázy, měl by být lokalizován v mitochondrii. Digitoninovou frakcionací bylo zjišťováno, kde gen TbIF2 je umístěn, jestli v cytosolu nebo v mitochondriích.

Jako kontrola při digitoninové frakcionaci byla použita enolasa a Hsp70. Enolasa je cytosolický protein a Hsp70 je protein mitochondriální.

Nanášené protilátky a jejich ředění je zobrazeno v tabulce II.

Tab II: Množství buněk nanášené na gel a ředění protilátek.

Vzorek	Objem vzorku nanášeného na gel	Primární protilátka	Ředění	Sekundární protilátka	Ředění	Subbuněč-ná frakce
TbIF2 WCL	5μl	Anti-enolase	1:1000	Anti-králík	1:2000	Cytosol
TbIF2 Cyto	5μl	Anti-enolase	1:1000	Anti-králík	1:2000	Cytosol
TbIF2 Mito	5μl	Anti-enolase	1:1000	Anti-králík	1:2000	Cytosol
TbIF2 WCL	10μl	Anti-Hsp70	1:500	Anti-myš	1:2000	Mitochondrie
TbIF2 Cyto	10μl	Anti -Hsp70	1:500	Anti-myš	1:2000	Mitochondrie
TbIF2 Mito	10μl	Anti- Hsp70	1:500	Anti-myš	1:2000	Mitochondrie
TbIF2 WCL	30μl	Anti-V5	1:1000	Anti-myš	1:2000	Cílený protein
TbIF2 Cyto	30μl	Anti-V5	1:1000	Anti-myš	1:2000	Cílený protein
TbIF2 Mito	30μl	Anti-V5	1:1000	Anti-myš	1:2000	Cílený protein



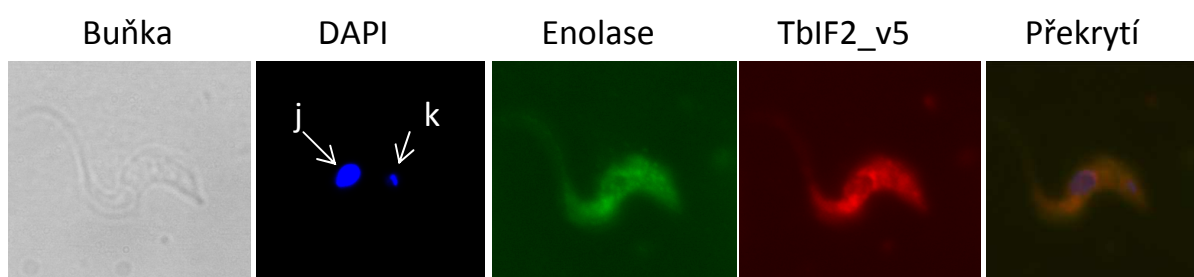
Obr.11: Lokalizace TbIF2_v5 digitoninovou frakcionací.

Na základě kontroly z digitoninové frakcionace vyplývá, že TbIF2_v5 se vyskytuje v cytosolu. Z tohoto výsledku lze říci, že TbIF2_v5 pravděpodobně neovlivňuje F_0F_1 ATPázovou aktivitu.

Pro ověření, zda TbIF2_v5 je opravdu cytosolický, byla použita další nezávislá metoda.

4.6 Imunolokalizace tagovaného TbIF2

Pomocí metody IFA byla zjišťována lokalizace genu TbIF2. Tato metoda využívá specifickou protilátku proti svým antigenům k zaměření fluorescenční barvy na konkrétní cíle uvnitř buňky.



Obr.12: Indukované buňky, DAPI-4',6-diamidino-2-phenylindole se silně váže na DNA, k-kinetoplast, j-jádro. Enolasa byla použita jako cytosolická kontrola. TbIF2_v5 vypadá stejně jako enolasa, z čehož lze soudit, že je tento protein cytosolický. Překrytí-DAPI + enolasa + TbIF2_v5.



Obr.13: Indukované buňky, DAPI-4',6-diamidino-2-phenylindole se silně váže na DNA, k-kinetoplast, j-jádro. Mitotracker byl použit jako mitochondriální kontrola. TbIF2_v5 nevypadá stejně jako mitotracker, což znamená, že se nevyskytuje v mitochondriích, ale pravděpodobně v cytosolu. Překrytí- DAPI + mitotracker + TbIF2_v5.

Z obrázků je vidět, že hledaný protein je pravděpodobně cytosolický. Jako kontrola byla opět použita enolasa, která se vyskytuje v cytosolu. Jelikož signál pro enolázu a TbIF2_v5 se překrývají, lze říci, že TbIF2_v5 je skutečně cytosolický.

5. Diskuse a závěr

Parazit *T.brucei* je závislý na F_0F_1 ATPázové aktivitě, jelikož pomocí této aktivity udržuje mitochondriální membránový potenciál. Zatímco savčí buňka syntetizuje ATP pomocí F_0F_1 ATP syntázy komplexu, tak v buňce trypanozómy je pomocí tohoto komplexu ATP hydrolizováno. Rozdíl aktivit tohoto komplexu mezi savčí a parazitickou formou může být důvodem pro vývoj specifického inhibitoru, jenž bude působit pouze na parazitický komplex a inhibovat jeho ATPázovou aktivitu. Z tohoto důvodu může být parazitická F_0F_1 ATPáza možným cílem pro léčiva. Hydrolytická aktivita komplexu může být specificky inhibována díky konzervativnímu proteinu IF1. Homolog savčího a kvasinkového IF1 byl identifikován v genomu *T. brucei*. Tento protein byl v buňce trypanozómy označen v5 tagem a over-exprimován v krevních buňkách *T. brucei*. Tento experiment ukázal, že tato over-exprese je letální pro krevní formy *T. brucei* a tento výsledek prokázal možnost specifické inhibice ATPázové aktivity komplexu (Panicucci a Zíková, manuskript v přípravě).

V genomu *T.brucei* byl objeven druhý domnělý F_0F_1 ATPázový inhibiční faktor TbIF2. TbIF2 byl exprimován v BS buňkách. Jak je zřejmé z obrázku 10, TbIF2_v5 byl úspěšně over-exprimován, nicméně jeho produkce je také viditelná i u neindukovaných buněk. Je tedy možné, že represe T7 promotoru pomocí tetracyklinového represoru není 100% a tím dochází k slabé expresi cílového proteinu i bez přidání tetracyklínu do média. U růstové křivky nebyl viditelný růstový fenotyp, tudíž exprese proteinu TbIF2_v5 nemá vliv na růst buněk a tak pravděpodobně neinhibuje F_0F_1 ATPázovou aktivitu. Lokalizace genu byla zkoumána dvěma na sobě nezávislými metodami a to digitoninovou frakcionací a IFA. Obě tyto metody ukázaly na cytosolickou lokalizaci.

Z těchto výsledků vyplývá, že TbIF2 nemá funkční podobnost s TbIF1. Role tohoto proteinu je zatím neznámá. K objasnění jeho biologické role v buňce parazita budou potřeba další studie.

V této práci jsem nepřímo ukázala, že peptid TbIF2 neinhibuje F_0F_1 ATPázu.

6. Použitá literatura:

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter, (2008) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, New York.
- Besteiro, S., M. P. Barrett, L. Riviere & F. Bringaud, (2005) Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *Trends Parasitol* **21**: 185-191.
- Boyer, P. D., (1997) The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* **66**: 717-749.
- Cabezón, E., P. J. Butler, M. J. Runswick, R. J. Carbajo & J. E. Walker, (2002) Homologous and heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases. *J Biol Chem* **277**: 41334-41341.
- Cabezón, E., M. G. Montgomery, A. G. Leslie & J. E. Walker, (2003) The structure of bovine F₁-ATPase in complex with its regulatory protein IF₁. *Nat Struct Biol* **10**: 744-750.
- Campanella, M., E. Casswell, S. Chong, Z. Farah, M. R. Wieckowski, A. Y. Abramov, A. Tinker & M. R. Duchén, (2008) Regulation of mitochondrial structure and function by the F₁F_o-ATPase inhibitor protein, IF₁. *Cell Metab* **8**: 13-25.
- Campanella, M., N. Parker, C. H. Tan, A. M. Hall & M. R. Duchén, (2009) IF(1): setting the pace of the F(1)F(o)-ATP synthase. *Trends Biochem Sci* **34**: 343-350.
- El-Sayed, N. M., P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A. N. Tran, E. Ghedin, E. A. Worthey, A. L. Delcher, G. Blandin, S. J. Westenberger, E. Caler, G. C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Aslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D. A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J. F. da Silveira, P. de Jong, K. Edwards, P. T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A. C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M. J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C. R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J. C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J. L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S. L. Salzberg, D. O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A. J. Simpson, E. Sisk, M. T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. Van Aken, C. Vogt, P. N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C. M. Fraser, K. D. Stuart & B. Andersson, (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309**: 409-415.
- Flaspohler, J. A., B. C. Jensen, T. Saveria, C. T. Kifer & M. Parsons, (2010) A novel protein kinase localized to lipid droplets is required for droplet biogenesis in trypanosomes. *Eukaryot Cell* **9**: 1702-1710.
- Gledhill, J. R., M. G. Montgomery, A. G. Leslie & J. E. Walker, (2007a) How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 15671-15676.
- Gledhill, J. R., M. G. Montgomery, A. G. Leslie & J. E. Walker, (2007b) Mechanism of inhibition of bovine F₁-ATPase by resveratrol and related polyphenols. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 13632-13637.
- Gledhill, J. R. & J. E. Walker, (2005) Inhibition sites in F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochem J* **386**: 591-598.
- Gledhill, J. R. & J. E. Walker, (2006) Inhibitors of the catalytic domain of mitochondrial ATP synthase. *Biochem Soc Trans* **34**: 989-992.
- Hide, G. & A. Tait, (2009) Molecular epidemiology of African sleeping sickness. *Parasitology* **136**: 1491-1500.

- Panigrahi, A. K., A. Zikova, R. A. Dalley, N. Acestor, Y. Ogata, A. Anupama, P. J. Myler & K. D. Stuart, (2008) Mitochondrial complexes in *Trypanosoma brucei*: a novel complex and a unique oxidoreductase complex. *Mol Cell Proteomics* **7**: 534-545.
- Schmidt, G. D. & L. S. Roberts, (2009) *Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill Companies, New York.
- Schnauffer, A., G. D. Clark-Walker, A. G. Steinberg & K. Stuart, (2005) The F1-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function. *EMBO J* **24**: 4029-4040.
- St-Pierre, J., M. D. Brand & R. G. Boutilier, (2000) Mitochondria as ATP consumers: cellular treason in anoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8670-8674.
- Volf, P., H. P & a. kol., (2007) Paraziti a jejich biologie. In. Praha: Nakladatelství TRITON, pp.
- Watt, I. N., M. G. Montgomery, M. J. Runswick, A. G. Leslie & J. E. Walker, (2010) Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 16823-16827.